



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
PRODUCCIÓN DE FARMOQUÍMICOS

“PREPARACIÓN DE NUCLEÓSIDOS DE URIDINA POR BIOCATÁLISIS”

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

PRESENTA

Q.F.B. RUBRIA MARLEN MARTÍNEZ CASARES
Matrícula: 209180710

COMITÉ TUTORAL

Tutora: **DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ**
Asesor: **DR. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ**
Asesora: **DRA. AÍDA SOLÍS OBA**

Noviembre 2012

PREPARACIÓN DE NUCLEÓSIDOS DE URIDINA POR BIOCATÁLISIS

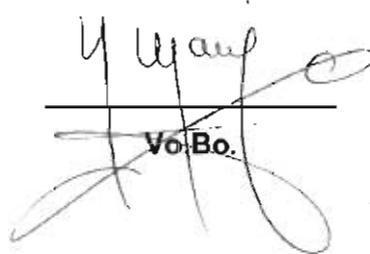
COMITÉ TUTORAL

Tutora: Dra. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ



Vo.Bo.

Asesor: Dr. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ



Vo.Bo.

Asesora: Dra. AIDA SOLÍS OBA



Vo.Bo.

Alumna: Q.F.B MARTÍNEZ CASARES RUBRIA MARLEN

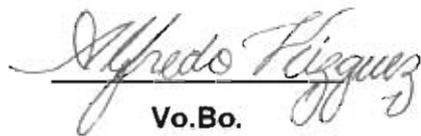
Matrícula: 209180710



PREPARACIÓN DE NUCLEÓSIDOS DE URIDINA POR BIOCATÁLISIS

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

PRESIDENTE: Dr. JOSE ALFREDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ


Vo.Bo.

VOCAL: Dr. ALEJANDRO CORDERO VARGAS


Vo.Bo.

SECRETARIA: Dra. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ


Vo.Bo.

RESUMEN

Actualmente la biocatálisis es un área con gran auge en la obtención de intermediarios o principios activos enantiopuros y/o en la transformación de grupos funcionales aquirales, obteniéndose compuestos con alto valor agregado; a través de procesos simples, selectivos, de bajo costo y generando un menor impacto ambiental, los cuales pueden ser difíciles de obtener por métodos químicos convencionales.

Los derivados nucleosídicos de uridina pueden obtenerse por: síntesis química y biocatálisis, son considerados diastereoisómeros, debido a que cuentan en su estructura con más de un centro quiral. Estos compuestos son de gran interés para la industria farmacéutica debido a que son intermediarios en la preparación de diversos compuestos con propiedades farmacológicas como: antivirales, antitumorales, antimicóticos, antibióticos y antihelmínticos, los cuales son empleados en el tratamiento de diversas enfermedades que afectan a la población en general. Por lo que es importante desarrollar procedimientos de síntesis, vía biocatálisis, que favorezcan una inducción asimétrica, para obtener estereoisómeros de los derivados de la uridina con alta pureza óptica.

Por lo anterior se planteó como objetivo principal “estudiar la inducción asimétrica aplicando enzimas, en la preparación de nucleósidos de uridina”, empleando oxinitrilasas como biocatalizadores, caracterizando y separando los diastereoisómeros del derivado 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina creando un nuevo centro estereogénico.

Para la obtención del nuevo centro estereogénico se emplearon polvos acetónidos de: mamey, almendra, capulín, cereza, ciruela, durazno y guanábana a diferentes temperaturas (5, 10, 20 y 30°C), distintos pH (4 y 5) y diferentes equivalentes de la solución amortiguadora de KCN/citratos (1.0 y 1.5). Se desarrollaron los métodos analíticos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹H) para la cuantificación, caracterización, separación e identificación de los diastereoisómeros del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina obtenidos tanto por síntesis química como por biocatálisis.

Se cuantificó la relación diastereoisomérica por CLAR y RMN ¹H, con base en los resultados del %ed se realizaron los análisis estadísticos de: ANOVA, t-pareada y Tukey-

Kramer, encontrándose: 1) que los datos obtenidos por ambos métodos (CLAR y RMN ^1H) no presentan diferencia estadísticamente significativa, por lo que es confiable y reproducible utilizar cualquiera de estos métodos para la determinación del %*ed*; 2) se logró determinar la diferencia estadística al modificar factores como la temperatura o el pH en los diferentes experimentos, consiguiendo de esta forma un mayor o menor %*ed*.

Por otro lado, al utilizar los diferentes biocatalizadores se hizo evidente la susceptibilidad enzimática que presenta este tipo de reacciones, ya que el cambio de temperatura, pH y/o concentración de la solución, se refleja en su capacidad de inducción asimétrica (%*ed*).

Se lograron altos excesos diastereoisoméricos del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina, con los biocatalizadores de: almendra (*Prunus dulcis*) y mamey (*Pouteria sapota*), empleando temperaturas de 20 y 30°C y pH 5.0, el mejor resultado se obtuvo a 30°C, donde se presentó una mayor inducción en el proceso enzimático con respecto a la registrada en los controles químicos, las mejores relaciones diastereoisoméricas son las siguientes: mamey 82.9/17.0 por CLAR y 83.4/16.6 por RMN ^1H ; mientras que para almendra 78.6/21.4 y 81.1/18.9 por CLAR y RMN ^1H respectivamente.

De esta manera se cuenta con un procedimiento enzimático, para preparar un importante intermediario quiral para la síntesis de derivados de uridina con potencial actividad biológica.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar estudios de Maestría, durante el periodo Enero-2009 a Diciembre-2010 con número de registro 225025.

A mi "*Alma mater*" Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, por abrirme las puertas una vez más y ofrecerme la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente.

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

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Estas palabras son las mas difíciles de plasmar en negro sobre blanco, llegando a este punto uno debe mirar hacia atrás para recordar y agradecer a cada una de las personas que me han ayudado a lograr que este proyecto llegara a su punto, seguido, nunca final.

Gracias Mamá por todo tu cariño, apoyo, comprensión, consejos, enseñanzas y desvelos, y sobre todo gracias por cada regaño que me hace enderezar la dirección y alumbrar mi camino cuando esta mas oscuro.

Papá gracias por todas tus enseñanzas, cariño, apoyo y sobre todo por impulsarme a buscar y luchar por todo aquello que me hace feliz y mejor ser humano.

A mis hermanas Edna, Jenifer y Joselyn, por todo su cariño, comprensión, apoyo, por todo lo que me han enseñado y me han dejado compartir con ustedes, pero sobre todo por siempre estar a mi lado, son únicas e invaluable, mil gracias.

A mi hermanito Christian por todo el cariño que me brindas sin condiciones, por ser una de mis mayores motivaciones en la vida y por que con tu sonrisa logras que mi niña interior siga viva, mil gracias enano.

A la Dra. Mina y el Dr. Norberto muchas gracias por compartir con gran pasión sus conocimientos y experiencias, por el apoyo incondicional para la culminación de este proyecto y sobre todo por ser los grandes seres humanos que son y dejar una huella en cada alumno que forman.

A la Dra. Aida, Dra. Julia, Dr. Héctor, Dr. Ernesto, Dra. Lili, gracias por todo el apoyo, colaboración y orientación académica.

A Conny por tu amistad incondicional, apoyo, cariño, consejos, enseñanzas, por tu respaldo en los momentos más difíciles. Muchas Gracias por ser tu y por todos los momeritos compartidos.

A Omar por todo tu cariño, amistad y paciencia incondicional, por tantas experiencias, enseñanzas y risas, por brindarme tu mano y levantarme cada vez que tropezaba y sobre todo por ser mi compañero en este largo viaje y parte fundamental en el, muchas gracias.

A todos mis amigos, esa familia que uno gana día tras día, que hacen que todos los momentos se han dulces y por lo tanto nunca son olvidados, Pao, Cynthia, Sheila, Marhita, Gaudencio, Josefina, Lucy, Isabel, Betito, Victorino, Mare, Betsa, Juan, Normita, Ricardo, Mario, Adolfo, Luz Ma, Fadia, Jacky, Jorsh, Clau, David, Eve, Joselyn, muchas gracias por estar ahí y hacerme sentir afortunada por su amistad y compañía.

A cada uno de ustedes y a los que me faltaron de corazón, ¡Muchas Gracias!

"Lo que con mucho trabajo se adquiere, más se ama"

INDICE

Resumen	i
Agradecimientos institucionales	iii
Agradecimientos personales	iv
Índice de esquemas, figuras, gráficas y tablas	xi
Índice de esquemas	xi
Índice de figuras	xii
Índice de gráficas	xv
Índice de tablas	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Biocatálisis	3
2.2. Proceso de biocatálisis	4
2.3. Ventajas y desventajas de la biocatálisis	5
2.4. Importancia de la biocatálisis para la industria farmacéutica	7
2.5. Enzimas	9
2.6. Mecanismo de las reacciones enzimáticas	9
2.7. Clasificación de las enzimas	11
2.8. Oxinitrilasas	12
2.9. Aplicación de las oxinitrilasas en síntesis orgánica para la obtención de compuestos ópticamente activos	15
2.10. Estereoquímica y actividad óptica	18
2.10.1. Estereoisomería.	19
2.10.2. Diastereoisómeros y enantiómeros	20
2.10.3. Uso de la formación de diastereoisómeros	20
2.11. Nucleósidos	21
2.12. Derivados de nucleósidos con actividad farmacológica	22
2.13. Aplicación farmacéutica de los derivados nucleosídicos de uridina	25
2.13.1. Anticancerígenos	25
2.13.2. Antivirales	26
2.13.3. Antibióticos	28

2.13.4.	Antifúngicos	32
2.13.5.	Antimaláricos	36
2.14.	2',3'-O-isopropilidenuridina	36
2.15.	Oxidación química de alcoholes	37
2.15.1.	Oxidación química de alcoholes utilizando IBX	37
2.16.	Aldehídos	39
2.16.1.	Características del grupo carbonilo	39
2.16.2.	Reacción de adición nucleofílica	40
2.17.	Síntesis química de cianohidrinas a partir de aldehídos	40
2.18.	Síntesis química de amidas a partir de nitrilos	41
2.19.	Métodos analíticos empleados en la determinación de estructuras	41
2.19.1.	Espectroscopía UV-Visible	41
2.19.2.	Espectroscopía Infrarroja (IR)	42
2.19.3.	Resonancia Magnética Nuclear	42
2.19.4.	Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	43
2.20.	Estadística	44
2.20.1.	Análisis de varianza	44
2.20.2.	Distribución de t de Student	45
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46
4.	HIPÓTESIS	47
5.	OBJETIVOS	47
5.1	Objetivo general	47
5.2	Objetivos específicos	47
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	48
6.1	Instrumentos y equipos	48
6.2	Insumos químicos	48
6.2.1	Reactivos	48
6.2.2	Disolventes	49
6.3	Síntesis química para la obtención de los derivados de uridina	49
6.3.1	Síntesis del ácido o-iodoxibenzoico (IBX)	50
6.3.2	Síntesis del 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina	51
6.3.2.1	Método A (oxidante IBX)	51

6.3.2.2	Método B (oxidante CrO ₃)	52
6.3.3	Síntesis química de 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina	52
6.3.3.1	Método de síntesis A	53
6.3.3.2	Método de síntesis B	53
6.3.3.3	Método de síntesis C	54
6.3.4	Síntesis química para la obtención de 1-[2',3'-O- isopropiliden (α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida]uracilo	55
6.3.4.1	Método de síntesis I	55
6.3.4.2	Método de síntesis II	56
6.3.4.3	Método de síntesis III	57
6.3.4.4	Método de síntesis IV	57
6.3.4.5	Método de síntesis V	58
6.4	Síntesis biocatalítica	59
6.4.1	Preparación de la solución amortiguadora de KCN/citratos	59
6.4.1.1	Preparación de la solución amortiguadora de KCN/citratos 1N pH 5 y pH 4.	59
6.4.1.2	Preparación de la solución amortiguadora de KCN/citratos 1.5 N pH 5	59
6.4.2	Preparación del biocatalizador	60
6.4.3	Obtención del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina por biocatálisis	60
6.5	Métodos espectrofotométricos empleados para la caracterización e identificación de los compuestos	61
6.5.1	Caracterización por UV-Visible	61
6.5.2	Caracterización por Infrarrojo	61
6.6	Caracterización y cuantificación del % exceso diastereoisomérico y % de conversión por Resonancia Magnética Nuclear	62
6.7	Desarrollo de métodos analíticos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	62
6.7.1	Desarrollo del método analítico para la cuantificación e identificación por CLAR fase reversa	63

6.7.2	Desarrollo del método analítico para la cuantificación e identificación por CLAR fase normal	63
6.7.2.1	Método Analítico para la cuantificación de los %ed de los compuestos obtenidos por síntesis química y biocatalítica	64
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
7.1	Análisis de resultados del compuesto IBX	65
7.1.1	Síntesis del reactivo IBX	65
7.1.2	Caracterización por IR del compuesto IBX (2a)	66
7.1.3	Caracterización por UV-Visible	66
7.1.4	Caracterización por RMN para el compuesto (2a)	67
7.1.5	Análisis de IBX por CLAR en fase reversa	69
7.1.6	Análisis de IBX por CLAR en fase normal	70
7.2	Caracterización e identificación de 2',3'-O-isopropilidenuridina (1b) por IR, UV-Visible y RMN	71
7.2.1	Caracterización e identificación de 2',3'-O-isopropilidenuridina (1b) por IR	71
7.2.2	Caracterización por UV-Visible de 2',3'-O-isopropilidenuridina (1b)	72
7.2.3	Caracterización e identificación por RMN de ¹ H y ¹³ C de 2',3'-O-isopropilidenuridina (1b)	73
7.3	Síntesis de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (2b)	75
7.3.1	Caracterización e identificación por IR de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (2b)	77
7.3.2	Caracterización por UV-Visible de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (2b)	78
7.3.3	Caracterización e identificación por RMN 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (2b)	78
7.4	Desarrollo del método analítico por CLAR para 2',3'-O-isopropilidenuridina (1b) y el 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (2b)	81
7.4.1	Desarrollo del método analítico por CLAR fase reversa para los compuestos (1b) y (2b)	81

7.4.2	Desarrollo del método analítico por CLAR fase normal para el compuesto (1b) y (2b)	84
7.5	Síntesis del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (3b)	85
7.5.1	Síntesis del compuesto (3b) por el método A	86
7.5.2	Síntesis del compuesto (3b) por el método B	87
7.5.3	Síntesis del compuesto (3b) por el método C	88
7.5.4	Caracterización e identificación por IR del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (3b)	89
7.5.5	Caracterización e identificación por RMN del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (3b)	90
7.5.6	Análisis del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (3b) por CLAR en fase reversa	95
7.5.7	Análisis del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (3b) por CLAR en fase normal	97
7.6	Síntesis del 1-[2',3'-O-isopropiliden (α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida]uracilo (4b)	98
7.6.1	Caracterización e identificación por IR 1-[2',3'-O-isopropiliden (α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida]uracilo (4b)	99
7.6.2	Caracterización e identificación por RMN de 1-[2',3'-O-isopropiliden (α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida]uracilo (4b)	100
7.7	Síntesis biocatalítica	104
7.7.1	Reacción no enzimática en la formación de cianohidrinas (3b)	104
7.7.1.1	Reacción utilizando el método A (control químico A)	105
7.7.1.2	Reacción utilizando el método B (control químico B) a pH 4 y 5 y concentraciones de 1.0 y 1.5 equivalentes de KCN en la solución amortiguadora de citratos (SA).	108
7.7.1.2.1	Reacción Método B a pH 4	108
7.7.1.2.2	Reacción Método B a pH 5	111
7.8	Proceso biocatalítico	119
8.	CONCLUSIONES	133
9.	PERSPECTIVAS	136
10.	REFERENCIAS	138

ÍNDICE DE ESQUEMAS, TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

Índice de Esquemas

Esquema 1. Papel central de la biocatálisis y la biotecnología	3
Esquema 2. Interdependencia de tres principales áreas de aplicación de la catálisis enzimática	4
Esquema 3. Formación selectiva de cianohidrinas de aldehídos y cetonas	12
Esquema 4. Procedimiento para inmovilizar (<i>R</i>)-oxinitrilasas	14
Esquema 5. Obtención de diferentes intermediarios a partir de cianohidrinas	16
Esquema 6. Síntesis de enalapril catalizada por oxinitrilasas	18
Esquema 7. Esquema de isomería	19
Esquema 8. Oxidación de alcoholes primarios para la formación de aldehídos y ácidos carboxílicos	37
Esquema 9. Oxidación química de alcoholes con IBX	38
Esquema 10. Ataque nucleofílico al carbonilo, para la formación de moléculas con quiralidad	40
Esquema 11. Ataque de ácido cianhídrico al grupo carbonilo	40
Esquema 12. Reacción general de hidrólisis de nitrilos para obtener amidas	41
Esquema 13. Ruta de síntesis química para la obtención de derivados de uridina	50
Esquema 14. Síntesis para la obtención de IBX	50
Esquema 15. Síntesis del 5'-desoxi-2',3'- <i>O</i> -isopropiliden-5'-oxo-uridina	51
Esquema 16. Síntesis química para la obtención del 5'-desoxi-2',3'- <i>O</i> -isopropiliden-5'-oxo-uridina	52
Esquema 17. Síntesis química del método A para la obtención del 2',3'- <i>O</i> -isopropiliden-5'-ciano-uridina	53
Esquema 18. Síntesis química del método B para la obtención del 2',3'- <i>O</i> -isopropiliden-5'-ciano-uridina	54
Esquema 19. Síntesis química del método C para la obtención del 2',3'- <i>O</i> -isopropiliden-5'-ciano-uridina	55

Esquema 20. Síntesis química del método I para la obtención del 1-[2',3'-O- isopropiliden(α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida] uracilo	56
Esquema 21. Síntesis química del método II para la obtención del 1-[2',3'-O- isopropiliden(α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida] uracilo	56
Esquema 22. Síntesis química del método III, para la obtención del 1-[2',3'-O- isopropiliden(α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida] uracilo	57
Esquema 23. Síntesis química del método IV para la obtención del 1-[2',3'-O- isopropiliden(α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida] uracilo	58
Esquema 24. Síntesis del acetato del 2'.3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina	58
Esquema 25. Síntesis química para la obtención del acetato de 1-[2',3'-O- isopropiliden(α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida] uracilo	59
Esquema 26. Obtención por biocatálisis del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina	61
Esquema 27. Diagrama de flujo para la determinación del método por CLAR en fase reversa	63
Esquema 28. Diagrama de flujo para la determinación del método por CLAR en fase normal	64
Esquema 29: Rutas de síntesis para el compuesto (4b)	99
Esquema 30. Esquema general de la síntesis biocatalítica para la obtención de la cianohidrina de uridina (3b)	119

Índice de Figuras

Figura 1. AZT, aciclovir y capecitabina derivados nucleosídicos pirimídicos y púricos	23
Figura 2. Fármacos nucleosídicos aprobados por la FDA	23
Figura 3. Estructura de R1479, antiviral obtenido de derivados nucleosídicos	24

Figura 4. Tiosemicarbazona del derivado nucleosídico de uridina	25
Figura 5. Derivados dioxolanos de nucleósidos de uridina	26
Figura 6. Nucleósidos inhibidores de NS5B	27
Figura 7. A) Profármaco MB07811 (derivado del nucleósido monofosfatado de citosina), B) Profármaco nucleosídico monofosfatado de uridina	27
Figura 8. Antibióticos con actividad antifúngica derivados de nucleósidos	33
Figura 9. Estructura y variación en los tipos de polioxinas	34
Figura 10. Estructura de los tipos de nicomicinas	34
Figura 11. Estructura de fosfonoxina B1 y B2 comparada con la estructura del sustrato de la enzima sintasa de quitina (UDPGlcNac) y el antifúngico polioxina	35
Figura 12. Estructura base de los antimaláricos	36
Figura 13. Molécula 2',3'-O-isopropilidenuridina	36
Figura 14. Estructuras de IBX y DMP	38
Figura 15. Condiciones de reacción utilizadas en la oxidación de alcoholes con IBX	39
Figura 16. Espectro de IR para el compuesto (2a)	66
Figura 17. Espectro UV-Visible para IBX	67
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H para IBX	68
Figura 19. Espectro de RMN ¹³ C para IBX	68
Figura 20. Cromatograma del IBX, columna XDB C8, flujo 0.4 mL/min, λ= 220, 260 y 280 nm, T= 25°C, CH ₃ CN:MeOH (99:1)	69
Figura 21. Cromatograma de IBX, columna OJ-H, flujo 1.0 mL/min, λ= 260 nm, T= 28°C, <i>n</i> -hexano:isopropanol (80:20)	71
Figura 22. Espectro de infrarrojo para el 2',3'-O-isopropilidenuridina	72
Figura 23. Espectro de UV-visible para el 2',3'-O-isopropilidenuridina	72
Figura 24. Espectro de RMN ¹³ C para 2',3'-O-isopropilidenuridina	74
Figura 25. Espectro de RMN ¹ H para 2',3'-O-isopropilidenuridina	74
Figura 26. Espectro de Infrarrojo para el compuesto (2b), lote 7	77
Figura 27. Espectro de UV-visible para el compuesto 2b	78
Figura 28. Espectro de RMN ¹³ C para el compuesto (2b), lote 7	79

Figura 29. Espectro de RMN ¹ H para el compuesto (2b), lote 7	80
Figura 30. Cromatogramas del compuesto (1b), para los métodos A'4, A'3 y B (Tabla 17) con una velocidad de flujo 0.4 mL/min, volúmen de inyección 5 µL, λ = 260 nm	82
Figura 31. Cromatogramas del compuesto (2b), para los métodos A'4, A'3 y B (Tabla 17) con una velocidad de flujo de 0.4 mL/min, volumen de inyección 5 µL, λ de 260 nm	83
Figura 32. Cromatograma de (1b), columna OJ-H, flujo 1 mL/min, λ= 260 nm, temperatura de la columna 28°C, <i>n</i> -hexano:isopropanol (80:20), t _R = 12.776 min	84
Figura 33: Cromatograma de (2b), columna OJ-H, flujo 1 mL/min., λ= 260 nm, temperatura de la columna 28°C, <i>n</i> -hexano:isopropanol (80:20), t _R = 7.75 min. *hidrato del compuesto (2b)	85
Figura 34: Espectro de IR del compuesto (3b)	89
Figura 35. Espectro de RMN ¹³ C para los diastereoisómeros del compuesto (3b)	91
Figura 36. Espectro de RMN ¹ H para el compuesto (3b)	92
Figura 37. Ampliación de espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) del compuesto (3b)	92
Figura 38. Espectro de RMN (gCOSY) del compuesto (3b)	93
Figura 39. Ampliación del espectro de RMN de ¹ H del compuesto (3b), asignación de los diastereoisómeros	94
Figura 40. Cromatogramas del compuesto (3b), para los métodos A1, A 2 y A3 (Tabla 25) con un volúmen de inyección 5 µL, λ de 260 nm	96
Figura 41: Cromatograma de (3b), columna OJ-H, flujo 1 mL/min, λ= 260 nm, Temperatura de la columna 28°C, <i>n</i> -hexano:isopropanol (80:20)	97
Figura 42: Espectro de IR del compuesto (4b)	100
Figura 43. Espectro de RMN ¹³ C para el compuesto (4b)	102
Figura 44. Espectro de RMN ¹ H para el compuesto (4b)	103
Figura 45. Ampliación del espectro de RMN ¹ H para el compuesto (4b)	103

Figura 46. I) Cromatograma y II) Espectro de RMN para la obtención de la cianohidrina de unidina (3b), A y B: Picos utilizados para la determinación del % <i>ed</i>	120
--	-----

Índice de Gráficas

Gráfica 1. % <i>ed</i> para el método A, a diferentes temperaturas	107
Gráfica 2. % <i>ed</i> para el método B, a diferentes temperaturas pH 4 y 1.0 eq. de la SA	110
Gráfica 3. % <i>ed</i> para el método B, a diferentes temperaturas pH 5 y 1.0 eq. de la SA de KCN/citratos.	113
Gráfica 4. % <i>ed</i> para el método B, a diferentes temperaturas pH 5 y 1.5 eq. de la SA.	116
Gráfica 5. Comparación del % <i>ed</i> para ambos métodos A y B, a diferentes temperaturas.	118
Gráfica 6. % <i>ed</i> , para el método A y B y cada biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 5°C.	121
Gráfica 7. % <i>ed</i> , para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 20°C	122
Gráfica 8. % <i>ed</i> , para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 30°C	124
Gráfica 9. % <i>ed</i> , para el método A y B y mamey como biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 5°C a diferentes relaciones sustrato:biocatalizador	125
Gráfica 10. % <i>ed</i> , para el método A y B y mamey como biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 20°C y diferentes relaciones sustrato:biocatalizador	126
Gráfica 11. % <i>ed</i> , para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 30°C	127
Gráfica 12. % <i>ed</i> , para el método A y B y cada biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 30°C	128

Gráfica 13. %ed, para el método A y B y cada biocatalizador a pH 4 y 1.0 eq de la SA a 30°C	129
Gráfica 14. %ed, para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 4 y 5 a 1.0 eq de la SA y 30°C	130
Gráfica 15. %ed, para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 5 a 1.5 eq de la SA y 20°C	131
Gráfica 16. %ed, para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 5 a 1.5 eq de la SA y 30°C	132

Índice de Tablas

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la biocatálisis	6
Tabla 2. Diversas fuentes de oxinitrilasas, tipos de sustrato y selectividad	13
Tabla 3. Ejemplos de cianohidrininas obtenidas por oxinitrilasas a partir de aldehídos y cetonas	17
Tabla 4. Diferentes bases nitrogenadas y nucleósidos	21
Tabla 5. Antibióticos nucleosídicos derivados de uridina	29
Tabla 6. Comparación de la fase normal y fase reversa	44
Tabla 7. Rendimientos de reacción del compuesto IBX (2a)	65
Tabla 8. Desplazamiento químico para RMN ¹³ C para el compuesto IBX (2a) lote 11	67
Tabla 9. Condiciones CLAR fase reversa para el IBX	69
Tabla 10. Condiciones para el IBX y las materias primas por CLAR fase normal	70
Tabla 11. Resultados con el método A y B para IBX y sus materias primas	70
Tabla 12. Desplazamiento químico de RMN ¹³ C para el compuesto (1b)	73
Tabla 13. Modificaciones a las condiciones de reacción para obtener el 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (2b)	75
Tabla 14. Condiciones de reacción para obtener el compuesto (2b)	76
Tabla 15. Desplazamiento químico de RMN ¹³ C para el compuesto (2b) lote 7	79
Tabla 16. Condiciones CLAR fase reversa para el compuesto (1b) y (2b)	81

Tabla 17. t_R de los métodos analíticos desarrollados por CLAR fase reversa para el compuesto (1b)	82
Tabla 18. Condiciones CLAR fase normal para el compuesto (1b) y (2b)	84
Tabla 19. Parámetros obtenidos con el método A'3 para el compuesto (1b y 2b)	85
Tabla 20. Condiciones de reacción y rendimientos en la obtención del compuesto (3b)	86
Tabla 21. Condiciones de reacción utilizadas para obtener el compuesto (3b) por método B	87
Tabla 22. Promedio de los triplicados por lote para el % de rendimientos en la obtención del compuesto (3b)	88
Tabla 23. Desplazamiento químico de RMN ^{13}C para el compuesto (3b)	90
Tabla 24. Condiciones CLAR fase reversa para el compuesto (3b)	95
Tabla 25. Parámetros obtenidos con el método A'3 para el compuesto (3b)	98
Tabla 26. Desplazamiento químico de RMN ^{13}C para el compuesto (4b)	101
Tabla 27. Condiciones de reacción, rendimientos, % de conversión y %ed en la obtención del compuesto (3b)	105
Tabla 28. Promedios y DE del %ed y del % del diastereoisómero A y B por CLAR y RMN utilizando el método A.	106
Tabla 29. % conversión, relación diastereoisomérica y %ed en la obtención del compuesto (3b) a pH 4 y 1.0 equivalentes de KCN en la SA de KCN/citratos	108
Tabla 30. Promedios (\bar{y}) y DE del %ed y del % del diastereoisómero A y B por CLAR y RMN utilizando el método B a pH 4 y 1.0 equivalentes de la SA	109
Tabla 31. % de conversión, relación diastereoisomérica y %ed en la obtención del compuesto (3b) a pH 5 y 1.0 equivalente de la SA de KCN/citratos	111
Tabla 32. Promedios (\bar{Y}) y DE del %ed y del % del diastereoisómero A y B por CLAR y RMN utilizando el método B a pH 5 y 1.0 equivalentes de la SA de KCN/citratos	113
Tabla 33. % conversión, relación diastereoisomérica y %ed en la obtención del compuesto (3b) a pH 5 y 1.5 equivalentes de la SA	115

Tabla 34. Promedios (\bar{Y}) y DE del % <i>ed</i> y del % del diasteroisómero A y B por CLAR y RMN utilizando el método B a pH 5 y 1.5 equivalentes de la SA	116
Tabla 35. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 5°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA	121
Tabla 36. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 20°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA	122
Tabla 37. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 30°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA	123
Tabla 38. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 5°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA	125
Tabla 39. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 20°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA	126
Tabla 40. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 30 °C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA	127
Tabla 41. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 30°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA	128
Tabla 42. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 30 °C a pH 4 y 1.0 eq. de la SA	129
Tabla 43. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 30°C a pH 4 y pH 5 a 1.0 eq. de la SA	130
Tabla 44. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 20°C a pH 5 y 1.5 eq. de la SA	131
Tabla 45. % <i>ed</i> de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 20°C a pH 5 y 1.5 eq. de la SA	132

1. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente la industria química se ha destacado como uno de los sectores económicos más grandes y de mayor desarrollo a nivel mundial, esto en gran parte es debido a su capacidad y eficiencia para la búsqueda e introducción de tecnologías novedosas y sustentables. En este sentido, es importante resaltar el gran número de aplicaciones exitosas que en el sector de la síntesis orgánica ha tenido el uso de biocatalizadores en la última década.

La biocatálisis es una herramienta muy importante dentro de la síntesis orgánica, basada en el empleo de enzimas que pueden provenir de células microbianas, vegetales o animales. Las enzimas son catalizadores capaces de aceptar una amplia gama de sustratos, realizando biotransformaciones para preparar compuestos orgánicos, debido no sólo a las características regio, quimio- y enantioselectivas que presentan las reacciones enzimáticas, sino también por la bondad de las condiciones de reacción con que se llevan a cabo.¹

Estudios recientes indican que los vegetales disponibles a nivel local pueden ser utilizados como biocatalizadores, ya que ofrecen una alternativa para la investigación de sus recursos y para la ejecución eficaz de las principales transformaciones sintéticas con importantes repercusiones económicas y ecológicas.²

Actualmente, la biocatálisis tiene un gran campo de acción en la farmoquímica, como son las biotransformaciones para la preparación industrial de fármacos, en los procesos de obtención de compuestos enantiopuros y la transformación de grupos funcionales aquirales.^{3,4}

La biocatálisis ha adquirido un papel relevante en el desarrollo de nuevos fármacos y moléculas complejas difíciles de producir por métodos químicos tradicionales. De este modo, el empleo de biocatalizadores abre una nueva vía para el diseño y elaboración de procesos y compuestos más óptimos.⁵

Los derivados nucleosídicos de uridina poseen más de un centro quiral y son denominados diastereoisómeros, los cuales son característicos por tener propiedades

físicas y químicas diferentes,^{6,7} como por ejemplo la 2',3'-O-isopropilidenuridina, la cual es un producto obtenido por síntesis química y biocatalítica. Este compuesto es de interés farmacéutico, ya que es intermediario en la preparación de anticancerígenos, antivirales, antimaláricos, antibióticos y antimicóticos como son las polioxinas y nicomicinas, los cuales son dos familias de antibióticos y antimicóticos nucleosídicos, que tienen actividad selectiva para ciertos hongos fitopatógenos y algunas bacterias patógenas, como es el caso de *Candida albicans*, un importante patógeno para el humano. Estos antibióticos inhiben la síntesis de quitina en las paredes celulares, por lo cual, es una meta atractiva para la terapia química de antifúngicos y antiparasitarios, además de tener actividad como insecticidas^{8,9} y acaricidas siendo los más conocidos el fosfonoxin B1 y B2.¹⁰

Los derivados nucleosídicos son intermediarios de una gran variedad de productos con actividad farmacológica. Debido a su compleja estereoquímica es importante caracterizarlos, identificarlos, cuantificarlos y analizar su toxicidad y la eficiencia de cada diastereoisómero, por lo que será importante contar con métodos analíticos eficientes que ayuden no solo a identificar, sino también a cuantificar adecuadamente los excesos diastereoisoméricos de los productos sintetizados.

Por lo anterior, se sintetizaron intermediarios quirales para la obtención de nuevos compuestos con actividad farmacéutica, además de caracterizar y separar los diastereoisómeros de los derivados nucleosídicos del compuesto 2',3'-O-isopropilidenuridina formando un nuevo centro estereogénico utilizando biocatálisis, mediante el uso de oxinitrilasas.

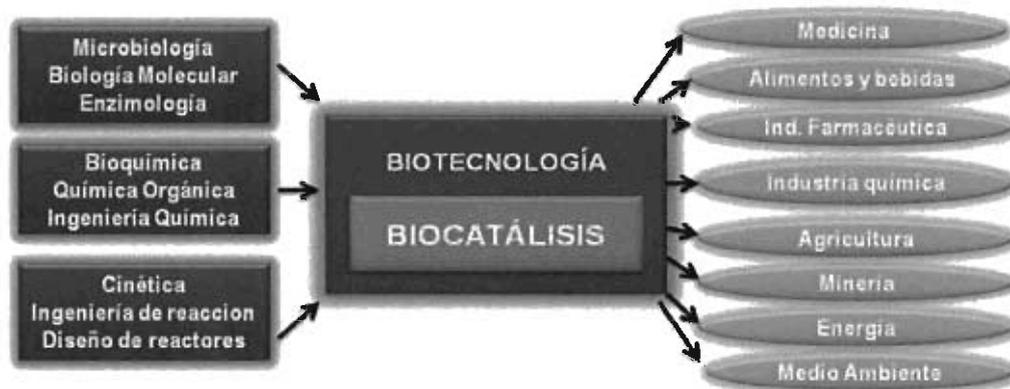
2. ANTECEDENTES

2.1. Biocatálisis

La biocatálisis es un proceso biológico, donde un sustrato es modificado mediante reacciones catalizadas por enzimas, las cuales pueden ser: puras, parcialmente purificadas o extractos crudos. Estas enzimas pueden provenir de células microbianas, vegetales o animales (organismos vivos); una ventaja de las enzimas es que pueden seguir funcionando *in vitro*,¹¹ siendo esta una herramienta utilizada dentro de la síntesis orgánica. Los primeros biocatalizadores, fueron valorados y se comenzaron los estudios cinéticos en 1900.¹²

La biocatálisis es considerada una disciplina que forma parte importante de la biotecnología, siendo esta un área que utiliza células vivas, cultivo de tejidos o moléculas derivadas de un organismo, como son las enzimas, para obtener o modificar un producto útil para la humanidad.

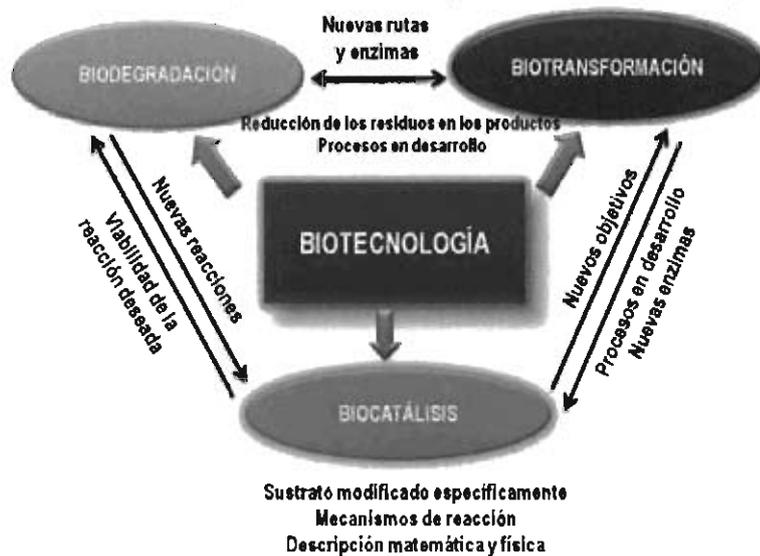
La biocatálisis y la biotecnología son multidisciplinarias, es decir requieren de varias ciencias y a la vez tienen aplicación en diferentes áreas de la industria como se describe en el **esquema 1**.¹¹



Esquema 1. Papel central de la biocatálisis y la biotecnología.

La biocatálisis tiene un enorme impacto en la industria, utilizándose el 65% en la preparación de detergentes, almidón, textiles, papel, un 25% es utilizado en el procesamiento de alimentos y el 10% restante en los suplementos de alimentación animal.¹³

Las tres principales áreas de la catálisis enzimática son: las biotransformaciones, la biorremediación y la biocatálisis, todas estas áreas se basan en una comprensión profunda de los principios bioquímicos básicos de las enzimas que catalizan reacciones químicas, en el **esquema 2** se observa la interdependencia que existe entre ellas, además de que éstas forman parte de la biotecnología.¹²



Esquema 2. Interdependencia de tres principales áreas de aplicación de la catálisis enzimática.¹²

La diferencia entre biocatálisis y los procesos de biorremediación y biotransformación es que estos utilizan células completas para la transformación del sustrato, aunque ambas usan las enzimas de estas células y por lo tanto usan la biocatálisis dentro de sus procesos.^{14,15}

Hoy en día el biocatalizador ideal, debe ser capaz de transformar un gran número de sustratos químicos, ya que el desarrollo de un catalizador específico para un solo compuesto no es económicamente viable.¹⁶

2.2. Proceso de Biocatálisis

El proceso de biocatálisis se puede realizar con enzimas parcialmente purificadas o extractos crudos como pueden ser los polvos acetónicos de plantas o animales (en estas no es necesario purificar la enzima involucrada ya que se tiene la enzima

inmovilizada sobre un soporte natural).^{11,17} Las enzimas libres pueden estar en solución, en un reactor de membrana, en suspensión, "cross-linked" o inmovilizadas.¹

Adicionalmente, cuando los biocatalizadores están inmovilizados se pueden reciclar varias veces sin pérdida significativa de sus propiedades catalíticas. Las enzimas para la biocatálisis pueden usarse de varias maneras, pueden ser naturales, recombinadas, o genéticamente modificadas para incrementar su actividad o especificidad.¹⁸

El medio de reacción puede ser acuoso, orgánico o en dos fases. El proceso en medio acuoso representa una gran limitación debido a la baja o nula solubilidad de una gran cantidad de compuestos hidrofóbicos. Recientemente se ha encontrado que la mejor termoestabilidad de una enzima se puede lograr en sistemas bifásicos y que es posible encontrar una mayor actividad en el medio orgánico, también utilizando técnicas de ingeniería de proteínas, unión covalente de los compuestos anfipáticos (moléculas no solubles en agua), la interacción no covalente con los lípidos o de los tensoactivos, formación de micelas, inmovilización de enzimas y la utilización de enzimas liofilizadas.^{13,19}

Los sistemas bifásicos utilizan una fase orgánica y agua; estos sistemas se emplean con el fin de solubilizar los reactivos y/o productos. Los disolventes generalmente utilizados son poco solubles en solución acuosa, los disolventes más utilizados son moléculas orgánicas: alcoholes, éteres, aldehídos, hidrocarburos y sus derivados halogenados.²⁰ Algunas de las ventajas de la biocatálisis en medios bifásicos, son el equilibrio termodinámico para catalizar las síntesis que son desfavorables en agua y la facilidad de extracción de algunos productos, teniendo una mejor termoestabilidad evitando así la contaminación microbiana.^{3,13}

2.3. Ventajas y Desventajas de la Biocatálisis

Durante las tres últimas décadas, los procesos de biocatálisis se han considerando como una importante alternativa en la síntesis de productos orgánicos; 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 muestran en la **tabla 1**.^{17,21,22}

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la biocatálisis.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Reacciones más amigables con el ambiente (generalmente se realizan en medios acuosos)	El empleo de altas diluciones y el uso de cofactores costosos.
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, las cuales se presentan frecuentemente en la metodología química tradicional.	Limitada estabilidad térmica y su incompatibilidad con algunos disolventes orgánicos.
Especificidad del sustrato (las enzimas catalizan solamente la transformación de un tipo de sustrato).	En algunos casos los procesos de biotransformación tienen rendimientos bajos.
Son quimioselectivas: Es la reacción preferencial de una enzima sobre uno de dos o más grupos funcionales diferentes.	
Son altamente enantioselectivas: En presencia de una mezcla racémica como material de partida, solamente un enantiómero es convertido (pureza óptica).	
Son altamente regioselectivas: La especificidad estructural de las enzimas permite efectuar reacciones en donde se tiene preferencia para romper o crear un enlace en particular por encima de todos los demás posibles.	Altos costos de implementación de los procesos a escala industrial.
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} .	
La biocatálisis es extremadamente versátil y cataliza un amplio espectro de reacciones, encontrando aplicación en la preparación de algunos compuestos que son difíciles o imposibles de realizar usando técnicas de química orgánica.	Se puede presentar baja actividad específica.
Permite llevar a cabo diferentes reacciones químicas sin la necesidad de pasar por etapas de protección y desprotección.	Inestabilidad a pH extremos.
Se facilita la obtención de compuestos químicos de alta pureza óptica y química, minimizando reacciones laterales y subproductos.	

2.4. Importancia de la Biocatálisis para la Industria Farmacéutica

Junto a la separación cromatográfica y la catálisis química, la biocatálisis se está convirtiendo en un componente clave en la caja de herramientas de la síntesis química.²³

En los últimos años hay una creciente tendencia al uso de uno solo de los estereoisómeros de los fármacos quirales, en lugar de emplear la mezcla racémica. La razón más importante para el desarrollo de compuestos estereoisoméricamente puros, es la diferente actividad biológica que presenta cada estereoisómero.

La quiralidad es un factor clave en la seguridad y eficacia de los fármacos y por lo tanto la producción de un solo enantiómero en los intermediarios y productos farmacéuticos, es de gran importancia para la industria farmacéutica.^{22,23}

Las ventas mundiales de fármacos quirales enantiopuros crecieron en una tasa anual de más del 13% en la década de los 90 hasta los \$133 billones de dólares en el 2000 y para el 2008 llegaron a \$200 billones. Un 40% de todas las ventas de productos farmacéuticos lo son en forma de un único enantiómero.³

Aunque la principal aplicación de la biocatálisis en síntesis orgánica está en la preparación de compuestos enantiopuros, éstas también se usan para efectuar transformaciones de grupos funcionales aquirales; ya que las biotransformaciones se llevan a cabo generalmente a temperatura ambiente y presión atmosférica, evitándose con ello el uso de condiciones de reacción extremas, las cuales pudieran causar isomerizaciones, racemizaciones, epimerizaciones o transposiciones.¹⁸

Las biocatálisis son reconocidas como una excelente estrategia para la preparación de productos farmacéuticos. Sin embargo, en muchos casos, la combinación de procedimientos químicos con métodos biocatalíticos puede ser una excelente estrategia para la producción de química fina.¹⁸ Por ejemplo, la cefalexina un antibiótico, ha reducido su síntesis de 10 hasta 6 pasos usando un procedimiento químico-enzimático.³

La síntesis de moléculas enantiopuras es una de las áreas más fascinantes y desafiantes en química orgánica. La metodología quimio-enzimática está siendo muy utilizada en la preparación de moléculas ópticamente puras. Las enzimas puras son muy caras, por lo que se han utilizado las enzimas sin purificar (crudas).²⁴

La biocatálisis continúa ganando impulso, sobre todo en la industria por ejemplo, la industria farmacéutica, en donde se demanda velocidad y selectividad en un proceso, lo que depende de ponerla en paralelo a la química convencional con compuestos complejos con múltiples centros quirales, buscando productos de alta pureza óptica.²⁵

Se han obtenido una gran cantidad de fármacos por biocatálisis, los cuales son usados para diferentes tratamientos como: antidepresivos, antidiabéticos, anticancerígenos, antileucémicos, anticolesterol, antibacteriales, antiinfecciosos, antihipertensivos, antivirales (en tratamientos contra el virus del herpes y hepatitis B), fármacos para el tratamiento de VIH, influenza y para el Alzheimer.²²

Para diversas empresas farmacéuticas, las etapas de síntesis son el punto central en el descubrimiento y formulación de un compuesto. Sin embargo, independientemente de que dichos procesos biocatalíticos desarrollen los intermediarios químicos, estas requieren métodos de implementación de estos procesos biocatalíticos.

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, (iv) que se pueda identificar rápido y fácilmente al catalizador (menos de un día) y que se generen cantidades iniciales de gramos (menos de tres días), para que el producto (forma y concentración) se evalúe con rapidez y pueda encajar en la vía de síntesis, si este es un intermediario.¹³

Las reacciones de protección y desprotección en síntesis orgánica de fármacos, representaron más del 20% de todas las reacciones de síntesis. Estos son retos importantes para desarrollar tecnologías biocatalíticas de alto rendimiento y optimizar

la actividad catalítica, la estabilidad y la selectividad de las enzimas evitando el uso de grupos protectores.

Durante los últimos 10 años, muchas empresas de química fina han estado explorando el uso de los procesos de biocatálisis en la síntesis de sus productos, lo que es un indicador de las múltiples ventajas que se pueden obtener.²

2.5. Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos, estas sustancias favorecen las reacciones al disminuir la energía de activación, catalizan un gran número de reacciones necesarias para la síntesis, modificación y degradación de compuestos orgánicos que constituyen a los seres vivos.

Todas las enzimas son de naturaleza proteica y son compuestos de alto peso molecular, que contienen desde 62 a más de 2500 aminoácidos, pero sólo 3 o 4 aminoácidos están directamente involucrados en la catálisis; este sitio es denominado *centro activo* y en esta zona se produce la reacción, tras un acoplamiento mutuo entre enzima y sustrato.

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.^{4,6,26}

2.6. Mecanismo de las reacciones enzimáticas

Todas las enzimas actúan en general de la misma manera, aún cuando el mecanismo de acción de cada enzima es único. Los reactivos y los productos están en concentraciones cientos o miles de veces mayores que las enzimas en una reacción enzimática típica. Por lo tanto, cada molécula de enzima cataliza la conversión en producto de varias moléculas de reactivo.

Para la obtención del producto, primero se forma el complejo enzima sustrato (ES), algunas veces más de un sustrato diferente se adhiere al centro activo, en este sitio el sustrato es transformado en producto.

Cuando se lleva a cabo la reacción, se libera el producto del centro activo y la enzima queda disponible para unirse a otra molécula de sustrato, e iniciar nuevamente el proceso, por lo tanto como las enzimas no se consumen en el proceso, se reutilizan y la cantidad que se requiere es muy baja.⁴

Recientemente, se ha propuesto que las enzimas catalizan las reacciones por un acoplamiento dinámico entre los movimientos conformacionales y las coordenadas químicas (longitud de enlace, ángulos de enlace y ángulos de torsión) el cual ha atraído gran interés teórico y experimental.²⁷

Varios factores afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas como pueden ser la temperatura, el pH, la concentración de la enzima o el sustrato y algunos inhibidores y activadores de la enzima.

- Efecto de la temperatura: Al igual que en las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa al aumentar la temperatura; un aumento de 10°C puede incrementar la actividad de la enzima de un 50 a un 100%; aunque muchas enzimas se pueden ver afectadas negativamente con un aumento de la temperatura y algunas son desnaturalizadas a temperaturas mayores a 40°C.
- Efecto del pH: Las enzimas son afectadas por los cambios de pH; el valor de pH adecuado es en donde la enzima es más activa y se conoce como pH óptimo; pH en extremos (altos o bajos) inactivan la enzima y el pH óptimo varía de una enzima a otra.⁶

2.7. Clasificación de las enzimas

Las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de reacción que catalizan:

- **Oxidoreductasas:** Catalizan reacciones de óxido-reducción y se les llama también deshidrogenasas.
- **Transferasas:** Transfieren grupos funcionales (grupos acilo, glucosilo, fosfatos y equivalentes de aldehídos y cetonas) de una molécula a otra.
- **Hidrolasas:** Rompen un enlace adicionando una molécula de agua, por ejemplo: la ruptura de enlaces peptídicos en las proteínas, los enlaces glucosídicos en los carbohidratos, enlaces tipo éster en los lípidos.
- **Liasas:** catalizan la adición de grupos a enlaces dobles o la formación de enlaces dobles a través de la eliminación de grupos, así los enlaces dobles se rompen por mecanismos distintos a la hidrólisis o la oxidación. Las descarboxilasas, las aldolasas y las oxinitrilas son ejemplos de liasas.
- **Isomerasas:** catalizan reacciones de interconversión de isómeros.
- **Ligasas:** unen moléculas utilizando energía proveniente del ATP. También se llaman sintetasas (adición o eliminación de moléculas pequeñas en uniones C=C, C=N y C=O).^{4,26,28,29}

El nombre específico de una enzima hace referencia al sustrato y al tipo de reacción que cataliza.

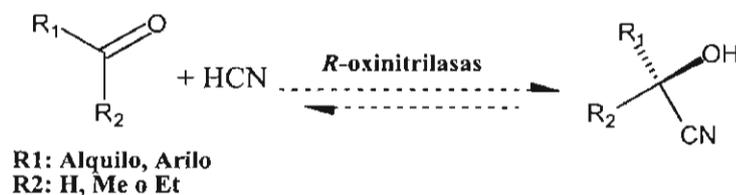
Las enzimas se pueden usar de dos formas:²⁸

Enzimas aisladas: enzimas purificadas o inmovilizadas sobre diversos soportes o a través de entrecruzamiento de la enzima, lo cual permite emplear medios con una mínima cantidad de agua, haciéndose así posible el uso de una mayor variedad de sustratos y dependiendo del método de inmovilización de la enzima, la actividad enzimática del biocatalizador va desde un 90 hasta el 100%.^{30,31}

Células completas: Al emplear este método se dispone como ventaja que los cofactores son reciclados por el propio sistema celular. La principal limitación reside en la necesidad de que el sustrato sea soluble en los medios de cultivo acuosos y sea captado al interior de la célula.³¹

2.8. Oxinitrilasas

Las oxinitrilasas o nitrilo hidratasas son liasas, son enzimas con mayor aplicación dentro de este grupo. Catalizan la adición reversible estereoselectiva de ácido cianhídrico a aldehídos y cetonas para dar α -hidroxinitrilos enantiopuros, ver **esquema 3**.^{3,32} Dependiendo de la estereoquímica de la oxinitrilasa, el ataque nucleófilo, HCN, podrá darse por una cara u otra del compuesto carbonílico, obteniéndose la (*R*)- o la (*S*)-cianohidrina.



Esquema 3. Formación selectiva de cianohidrinas de aldehídos y cetonas.

Las oxinitrilasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se cree que unas 3000 plantas poseen estas enzimas, además de un gran número de bacterias y hongos, son utilizadas por estos como defensa frente a un daño externo o como fuente de nitrógeno para la posterior biosíntesis de aminoácidos y cianogénesis.³³⁻³⁵

Una de las primeras síntesis efectuadas por oxinitrilasas fue publicada por L. Rosenthaler en 1908, obteniendo mandelonitrilo a partir de benzaldehído y HCN, utilizando emulsiones con fuentes de enzimas que catalizaban la reacción.³⁶

Las oxinitrilasas se han encontrado en la semillas de diversas plantas, principalmente del género *Prunus*.^{37,38} Por ejemplo las (*R*)-oxinitrilasas se han obtenido de semillas de almendras, manzanas, cerezas, durazno, capulín, ciruela; mientras que las (*S*)-oxinitrilasas se pueden obtener del caucho, mandioca, caña y sauco negro ver **tabla 2**.^{32,37}

Tabla 2. Diversas fuentes de oxinitrilasas, tipos de sustrato y selectividad.³²

Fuente de oxinitrilasa	Especificidad por sustrato	Selectividad
Árbol de caucho	Alifáticos, Aromáticos, Heteroaromáticos, α,β -insaturados	(S)
Mandioca	Alifáticos, Aromáticos, Heteroaromáticos, α,β -insaturados	(S)
Caña	Aromáticos, Heteroaromáticos	(S)
Almendra	Alifáticos, Aromáticos, Heteroaromáticos, α,β -insaturados	(R)
Lino	Alifáticos, Aromáticos, α,β -insaturados	(R)
Manzana	Aromáticos	(R)
Cereza, Durazno, Ciruela, Capulín	Alifáticos, Aromáticos, Heteroaromáticos, α,β -insaturados	(R)
Sauco negro	Aromáticos	(S)

En la actualidad, se han purificado y caracterizado oxinitrilasas de 11 plantas cianogénicas (de seis familias), encontrando por ejemplo en *Prunus* sp, el cofactor flavina adenina dinucleótido, ayudando a elucidar la funcionalidad de dichas enzimas.³³

Se sabe que la actividad catalítica y la enantioselectividad de estas enzimas depende del pH y la máxima actividad se ha determinado a pH 5.5, pero a ese pH la reacción química de adición de cianuro al aldehído es significativa, lo cual conduce a una disminución de la actividad óptica del producto, por lo que la disminución del pH para minimizar la reacción química se refleja en un aumento en la pureza enantiomérica del producto.³⁸⁻⁴⁰

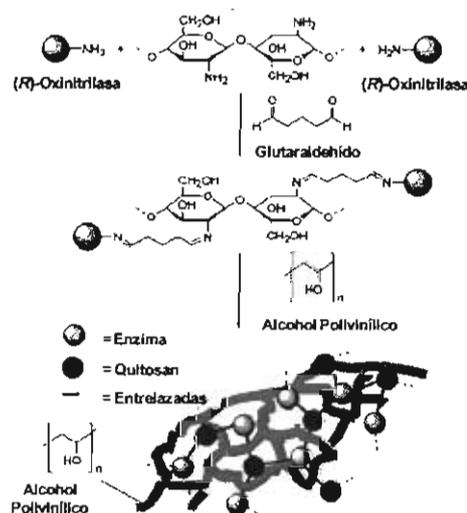
Las enzimas trabajan adecuadamente en rangos de temperatura de -10°C a 40°C . La mejor temperatura reportada para las oxinitrilasas se encuentra de 15 a 25°C utilizando benzaldehído como sustrato, a 40°C decrece su actividad significativamente produciendo cianohidrinras racémicas.

El utilizar medios bifásicos da un fácil acceso para obtener cianohidrinras enantiopuras con altos rendimientos, los disolventes más utilizados son: el diisopropiléter, *tert*-butilmetiléter y di-*n*-butiléter, en los cuales se ha encontrado más de 95% de enantioselectividad.^{32,33,39} También se han encontrado reportes de medios bifásicos pero utilizando líquidos iónicos, estos se consideran altamente polares y son utilizados como disolventes con buenas transformaciones catalizadas por enzimas.⁴¹

Hoy en día los medios bifásicos son los más utilizados y recientemente se han empleado enzimas inmovilizadas, existen varias formas para inmovilizarlas i) como harina desengrasada, ii) si las enzimas se encuentran purificadas, se han desarrollado soportes diferentes al natural como los intercambiadores iónicos basados en celulosa, gel de sílice, celulosa microcristalina, nitrocelulosa y celita, iii) método CLEA (enzimas entrelazadas por agregados), iv) enzimas atrapadas en gel de alcohol polivinílico formando lentejas de tamaño macroscópico (micrómetros), evitando la lixiviación del catalizador, en donde se habilitó la aplicación de disolventes orgánicos, abriendo nuevas posibilidades.^{39,42}

En los últimos años se ha aplicado con éxito el método de CLEA por ejemplo: Se utiliza las (R) oxinitrilasas de *Prunus amygdalus* (almendra) para la formación de cianohidrinas en medios microacuosos y estas enzimas se han reciclado 10 veces sin pérdida de actividad, obteniéndose buenos resultados en transformaciones con disolventes orgánicos, que puede dar mayor enantioselectividad comparado con las enzimas libres, debido a la supresión prácticamente completa de la competencia no enzimática por el ácido cianhídrico en estas condiciones; la supresión de la reacción no enzimática se da en rangos de pH ácidos y en medios orgánicos.

La inmovilización de estas enzimas se realiza por la precipitación con 1,2-dimetoxietano y se inmovilizan con glutaraldehído como se observa en la **esquema 4**.

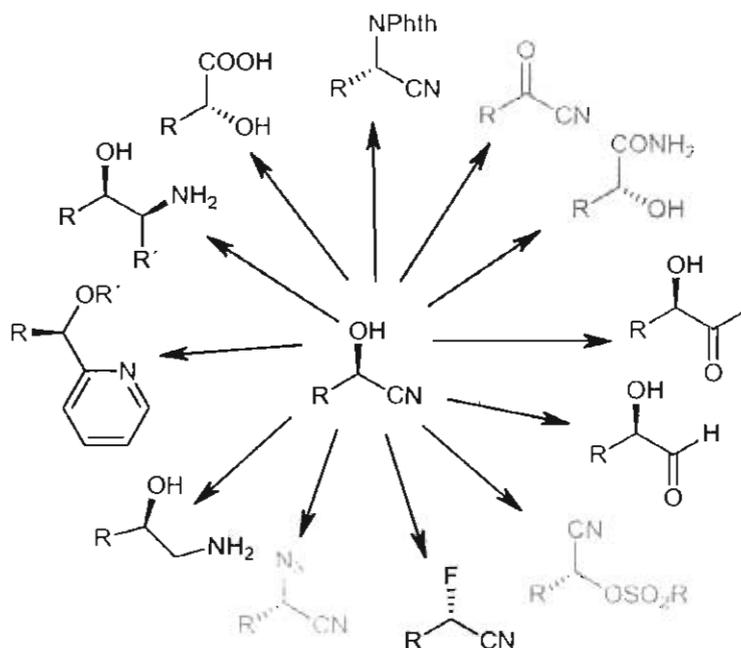


Esquema 4. Procedimiento para inmovilizar (R)-oxinitrilasas.

Además si se incrementa la enzima y se reduce el volumen de la fase acuosa, aumenta la competitividad de la reacción enzimática incrementándose la pureza enantiomérica del producto. La reacción enzimática en medio orgánico microacuoso en combinación con enzimas inmovilizadas, tienen muchas ventajas pero pueden estar limitadas al contenido de agua de un 4 a 8% (v/v), si se utilizan grandes cantidades de agua resulta problemático reciclar la enzima, además la velocidad de reacción de la enzima reciclada baja, encontrándose que la enzima anhidra tiene una alta actividad y aumenta la catálisis, al colocar una cantidad de agua adicional en el sistema.^{30,43}

2.9. Aplicación de las oxinitrilasas en síntesis orgánica para la obtención de compuestos ópticamente activos

La síntesis a nivel industrial de cianohidrinas enantiopuras esta basada en el uso de oxinitrilasas, ya que este tipo de biocatálisis son versátiles, estables y económicamente atractivas; pudiéndose 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, aunado a que son intermediarios importantes en la síntesis de compuestos como precursores de aminoácidos, aminoalcoholes y otros compuestos con actividad biológica como fármacos y agroquímicos (**Esquema 5**).^{32,44}

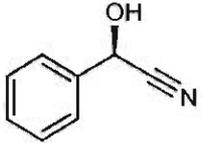
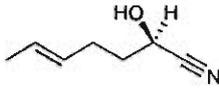
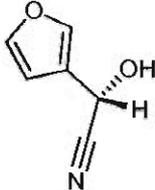
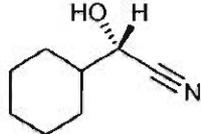
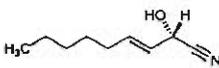
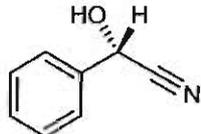


Esquema 5. Obtención de diferentes intermediarios a partir de cianohidrinas.⁴⁴

Hace algunos años, fue reportado el proceso de transcianación de un ω -bromoaldehído y cianohidrinras racémicas utilizando HCN como fuente de cianuro, esta reacción fue el primer ejemplo de la posible obtención, en un solo paso, de compuestos ópticamente activos como (*R*)- ω -bromocianohidrinras, utilizadas como materia prima para la obtención de (*R*)-2-cianotetrahidrofurano y (*R*)-2-cianotetrahidropirano, importantes compuestos con actividad biológica.⁴⁴

El uso de las oxinitrilasas se ha explotado en síntesis orgánica para la obtención de una gran variedad de cianohidrinras,^{3,33,45} algunos ejemplos se muestran en la **tabla 3**.

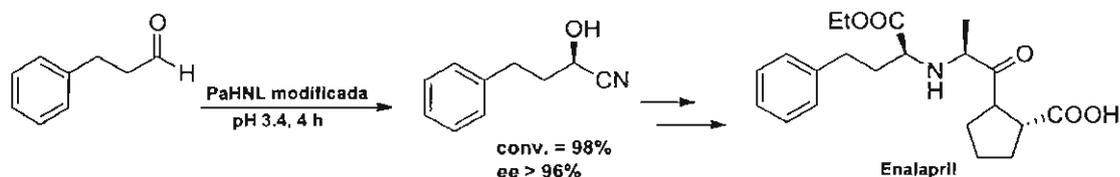
Tabla 3. Ejemplos de cianohidrinas obtenidas por oxinitrilasas a partir de aldehídos y cetonas.^{33,46}

Estructura	Fuente de Oxinitrilasas	ee (%)	Rendimiento (%)	Condiciones de reacción
(R)-Cianohidrinas				
	Almendra	99	95	Etanol/solución amortiguadora de acetatos (pH 5.4), KCN/OHAc, 0°C.
	Almendra	97	80	Oxinitrilasa adsorbida en avisel, diisopropiléter/solución amortiguadora de acetatos (pH 4.5), HCN, temperatura ambiente.
(S)-Cianohidrinas				
	Mandioca	98	92	Enzima adsorbida en nitrocelulosa, diisopropiléter/solución amortiguadora de citratos (pH 4.3), HCN, temperatura ambiente.
	Árbol de caucho	99	94	Solución amortiguadora de citrato (pH 4.0), KCN, 0°C
	Árbol de caucho	96	99	Metil <i>tert</i> -butiléter/ solución amortiguadora de citratos (pH 5.5), HCN, temperatura ambiente.
	Árbol de caucho	74	95	Solución amortiguadora de citratos (pH 4.0), KCN, 0°C

Algunos ejemplos de la aplicación de estas enzimas es en la obtención de los siguientes compuestos: broncodilatadores adrenérgicos como (*R*)-terbutalina o (*R*)-salbutamol; (*R*)-pantolactona utilizado en la síntesis de (*R*)-ácido pantoténico constituyente importante de la coenzima A; (*R*)-pantenol un bactericida; (*R*)-pantoteína, un factor de crecimiento.^{3,45}

Otro grupo importante son los ésteres, obtenidos a partir de cianohidrinas, estos son utilizados en la síntesis de insecticidas.

El antitrombótico Clopidrogel conocido como Plavix, preparado a partir del 2-clorobenzaldehído, la cianohidrina se forma utilizando enzimas genéticamente modificadas del género *Prunus amygdalus* (*PaHNL*), obteniéndose alta pureza enantiomérica del principal intermediario para la síntesis; utilizando esta enzima también se obtiene la cianohidrina del principal intermediario altamente enantioenriquecido para la síntesis de Enalapril (**Esquema 6**).



Esquema 6. Síntesis de Enalapril catalizada por oxinitrilasas.

También se pueden obtener compuestos estimulantes del sistema nervioso central o agonistas adrenérgicos, como es la efedrina a partir del mandelonitrilo con una excelente enantioselectividad y diastereoselectividad.⁴⁷

La aplicación de oxinitrilasas en la síntesis enantioselectiva para formar cianohidrinias comenzó 100 años atrás, continuando su desarrollo y con el avance actual de la bioquímica y la genética, las enzimas son una herramienta ineludible en química orgánica.³²

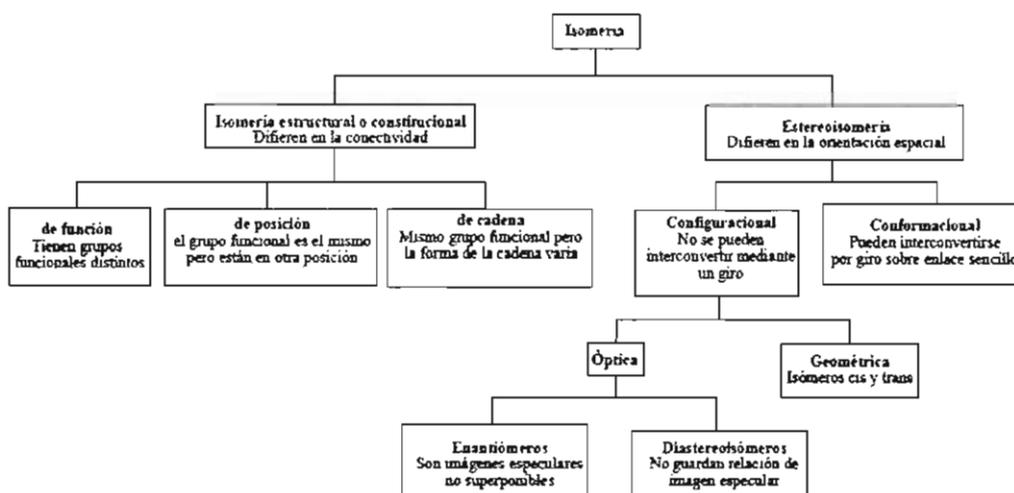
2.10. Estereoquímica y Actividad Óptica

La estereoquímica es la química en tres dimensiones. Sus fundamentos fueron establecidos por Jacobus van't Hoff y Joseph Achille Le Bell en 1874 y propusieron que los cuatro enlaces al carbono estaban dirigidos hacia los vértices de un tetraedro. Una consecuencia de un arreglo tetraédrico de los enlaces de carbono es que dos compuestos pueden ser diferentes debido a que el arreglo de sus átomos en el espacio es diferente. Los isómeros que tienen la misma constitución pero difieren en el arreglo espacial de sus átomos se llaman estereoisómeros.

2.10.1. Estereoisomería.

Dos compuestos con igual fórmula molecular pero con propiedades físicas y/o químicas diferentes se denominan isómeros. La palabra isómero se emplea, a modo de término general, para designar aquellos compuestos que están relacionados entre sí de alguna de las siguientes formas: como isómeros estructurales o como estereoisómeros.

Estereoisómeros son sustancias cuyas moléculas tienen el mismo número y tipo de átomos colocados en el mismo orden, diferenciándose únicamente en la disposición espacial que ocupan. En la **esquema 7** se muestra un esquema de la isomería y sus diferentes divisiones.



Esquema 7. Esquema de isomería.

El tipo de estereoisomería más interesante es el que da lugar a la actividad óptica. A principios de siglo XIX Biot señaló que algunas sustancias orgánicas de origen natural poseían la propiedad de girar el plano de la luz polarizada. Este fenómeno consiguió explicarse cuando los químicos comenzaron a considerar la disposición tridimensional de las moléculas en el espacio y la configuración tetraédrica del átomo de carbono. Las propiedades geométricas de un carbono con hibridación sp^3 hacen que, en el caso de que esté unido a cuatro átomos o grupos de átomos diferentes, la molécula no tenga plano de simetría y que existan dos maneras diferentes de ordenar a los

cuatro átomos o grupos de átomos. Estas dos ordenaciones o configuraciones generan dos formas isoméricas denominadas enantiómeros.

2.10.2. Diastereoisómeros y Enantiómeros

Los enantiómeros son moléculas con imágenes especulares no superponibles, estas sustancias son capaces de desviar el plano de un haz de la luz polarizada. A esta propiedad se la conoce con el nombre de "actividad óptica".

Los enantiómeros presentan idénticas propiedades físicas y químicas, pero pueden tener diferente actividad biológica. Además hacen girar el plano de la luz polarizada en diferentes sentidos.

Los diastereoisómeros son estereoisómeros que tienen dos o más centros quirales, no son imagen especular en el espejo, presentan propiedades físicas diferentes y algunas diferencias en su comportamiento químico.

Para una constitución particular, el número máximo de estereoisómeros es 2^n , donde n es el número de unidades estructurales capaces de variación estereoquímica; por lo regular es el número de centros quirales pero pueden utilizarse también para enlaces dobles como *cis* o *trans*, o usando la nomenclatura *E* y *Z*.^{48,49}

2.10.3. Uso de la formación de diastereoisómeros

La formación de diastereoisómeros puede ser útil en la resolución de enantiómeros. Si la mezcla racémica a ser resuelta contiene un grupo carboxilo y carece de un grupo fuertemente básico es posible formar una sal con una base ópticamente activa. Si la base utilizada es por ejemplo la forma *S*, existirá una mezcla de dos sales con configuración *SS* y *RS*. La mezcla de sales diastereoméricas se cristalizan en disolventes adecuados, como las solubilidades son diferentes, los cristales formados inicialmente serán ricos en un diastereómero. La filtración en este punto habrá llevado a cabo una resolución parcial. Aunque la cristalización fraccionada es el método común más usado para la separación de diastereómeros, lo tedioso y el hecho de estar limitado a sólidos ha inducido a investigar otros métodos. La destilación fraccionada ha dado solamente separaciones limitadas, pero la cromatografía de

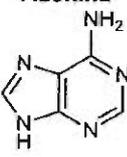
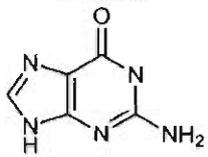
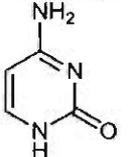
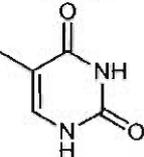
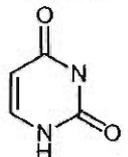
gases y la cromatografía líquida preparativa han probado tener mayor utilidad, por lo que pueden sustituir a la cristalización fraccionada.^{48,50}

2.11. Nucleósidos

Los nucleósidos están formados por una pentosa unida a una base nitrogenada en C1, que puede ser una purina o pirimidina y un azúcar cíclico, con mayor frecuencia D-ribose o 2-desoxi-D-ribose, ligada a través de un enlace covalente β -N-glucosídico, ya sea al N-9 de una purina o al N-1 de una pirimidina. La numeración de los átomos de azúcar emplea el signo de prima (por ejemplo, 3'- o 5'-) para distinguir los átomos de azúcar de los de la base heterocíclica. Los nucleósidos se denominan ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, con base en si el azúcar es una ribosa o una 2-desoxirribosa.^{48,6}

En la **tabla 4** se pueden observar las principales bases nitrogenadas (púricas o pirimídicas) así como su formación en nucleósidos.⁵¹

Tabla 4. Diferentes bases nitrogenadas y nucleósidos.

BASE	Purinas		Pirimidinas		
	Adenina 	Guanina 	Citosina 	Timina 	Uracilo 
NUCLEÓSIDO	Adenosina Desoxiadenosina	Guanosina Desoxiguanosina	Citidina Desoxicitidina	Timidina Desoxitimidina	Uridina Desoxiuridina

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. Los nucleótidos son las unidades o monómeros utilizados para construir largas cadenas de polinucleótidos.⁵²

2.12. Derivados de nucleósidos con actividad farmacológica

Los derivados de nucleósidos y nucleótidos son utilizados clínicamente como agentes medicinales y constituyen una importante contribución en: la quimioterapia, antivirales, agentes cardiovasculares, contra enfermedades del sistema nervioso central y como inmunomoduladores.⁵³⁻⁵⁶

La investigación de 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 con las nucleobases y luego con nucleósidos.⁵⁷

Consecuentemente se han realizado extensivas modificaciones tanto a la base heterocíclica como al azúcar, dando una gran variedad de derivados nucleosídicos con ciertas aplicaciones; estas modificaciones han sido mediante la aplicación de la química orgánica o la catálisis enzimática, con procesos que van desde hidrólisis enzimáticas en purinas y pirimidinas, protecciones regioselectivas en ambas partes de la molécula, disminuyendo la toxicidad al modificar químicamente los nucleósidos. Un importante descubrimiento se dio al remplazar el oxígeno, en la fracción de la azúcar, sustituyéndolo con un grupo metilo en el carbono cíclico obteniendo compuestos altamente resistentes a las fosforilasas.⁵⁸

El primer análogo sintetizado, después de múltiples estudios, fue la idoxiuridina utilizado principalmente por vía tópica para el tratamiento del herpes simple en 1959, tras este descubrimiento los derivados de nucleósidos han tomado mayor auge en la investigación clínica durante las últimas décadas.⁵⁹

En la preparación y desarrollo de estos derivados, se ha encontrado actividad antiviral y antitumoral, son efectivos, selectivos y no tóxicos, por lo cual están sujetos a una intensa investigación.^{53,60} Se han realizado extensivos estudios como agentes anticancerígenos, lo cual han originado la exploración de nuevas estructuras de nucleósidos con aplicaciones clínicas, algunos ejemplos representativos son: el 9-[(2-hidroxi)metil]guanina mejor conocido como aciclovir desarrollado por Elion en 1977 como agente antiviral; el 3'-ácido-3'-desoxitimidina (AZT) descubierto por Mitsuya y colaboradores en 1985, utilizado en el tratamiento del VIH y citosina β-D-

arabinofuranosina (citarabina o capecitabina) el cual mostró actividad antitumoral, aprobado por la FDA en 1969 (Figura 1).⁵³

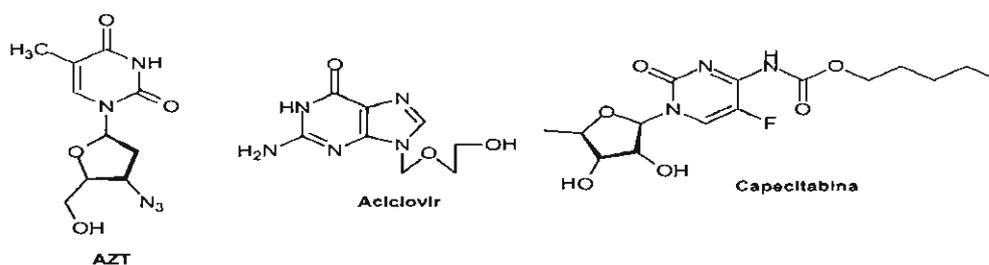


Figura 1. AZT, Aciclovir y Capecitabina derivados nucleosídicos pirimídicos y púricos.

Algunos ejemplos recientes de nucleósidos aprobados por la FDA como anticancerígenos y antivirales son: nelarabina, un profármaco que es desmetilado por la enzima desaminasa y es utilizado en leucemia linfoblástica, entecavir es un antiviral prescrito en el tratamiento de hepatitis B, clofarabina y algunos derivados presentan actividad anticancerígena para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica estos son derivados nucleosídicos de la adenina y azacitidina, algunos se ilustran en la **figura 2**.^{55,61,62}

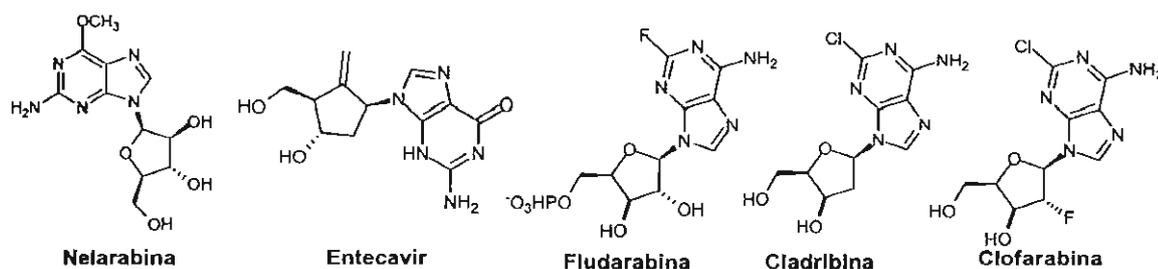


Figura 2. Fármacos nucleosídicos aprobados por la FDA.

El lobucavir es un análogo del nucleósido ciclobutilguanina, el cual se encuentra en desarrollo como un agente antiviral para el tratamiento del virus del herpes y del virus de la hepatitis B.^{63,64} La ribavirina es un efectivo antiviral nucleosídico utilizado para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C crónica (VHC) en combinación con interferón alfa-2 β ,⁶⁵ otros derivados de nucleósidos de adenina e inosina han encontrado utilidad en terapias combinada contra infecciones del herpes simple,⁶⁶ algunos derivados de citidina se utilizan en tratamientos antitumorales probados contra la leucemia en células de ratón.⁶⁷ En la **figura 3**, se muestra el compuesto 4'-azidocitidina R1479, derivado de citidina, que funciona inhibiendo la síntesis de RNA, siendo éste uno de los más potentes y no tiene actividad citotóxica.⁶⁸

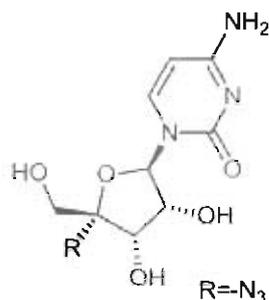


Figura 3. Estructura de R1479, antiviral obtenido de derivados nucleosídicos.

En la mayoría de los casos, los derivados de nucleósidos, se comportan como profármacos o bioprecusores que necesitan ser activados farmacológicamente por enzimas celulares o virales. Sin embargo, hay un número cada vez mayor 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. Los inhibidores alostéricos de las enzimas pueden ofrecer algunas ventajas en comparación con los compuestos que interactúan en el sitio de unión del sustrato, debido a que no es necesario ser relacionados estructuralmente con los sustratos de las enzimas, superando problemas de selectividad y competencia con el sustrato.

Un ejemplo típico de inhibidor alostérico está representado por el inhibidor nucleosídico de transcriptasa inversa de la inmunodeficiencia humana (VIH).⁵⁵

Aún con la mejora en los tratamientos para el VIH utilizando análogos de nucleósidos, como el AZT o zidovudina, didanosina, zalcitabina, d4t o estavudina, 3tc o lamivudina y abacavir, se han atribuido raras complicaciones provocando la aparición de acidosis láctica asociada a disfunción hepática en pacientes.⁶⁹

Debido a que los nucleósidos y nucleótidos tienen múltiples tareas en todos los organismos, es probable que sus análogos interfieran con la regulación de muchos

procesos celulares *in vivo*. Sin embargo, debido a las pequeñas cantidades usadas para trabajar, no se han reportado riesgos para la salud. Se tiene que tomar en cuenta que las propiedades de estos compuestos no están bien caracterizadas hasta ahora.⁵⁴

2.13. Aplicación farmacéutica de los derivados nucleosídicos de uridina

2.13.1. Anticancerígenos

Se han sintetizado nuevas moléculas de tiosemicarbazonas con propiedades antivirales, antibacteriales y antitumorales, derivados de citronellal, citral, xilopentaldofuranosa, gliceraldehídos y nucleósidos de uridina, estos nuevos compuestos se han probado en la inhibición de la proliferación y la apoptosis en líneas celulares cancerígenas U937.

Se utilizó el derivado nucleosídico de uridina debido a que cualquier modificación en los nucleósidos es de gran interés en la biomedicina, ya que pueden conducir a obtener compuestos con actividad antitumoral y antiviral. Además el grupo isopropilideno que protege a los hidroxilos, podría favorecer el paso de la molécula a través de la membrana celular.

El compuesto tiosemicarbazona, derivado nucleosídico de uridina (**Figura 4**) sintetizado a partir del 2',3'-isopropilidenuridina-5'-aldehído, demostró inhibir la proliferación celular, pero no induce la apoptosis; se ha encontrado que la parte del azúcar, no es la responsable de la actividad biológica de la molécula, por lo cual el nucleobase determina la actividad biológica.⁷⁰

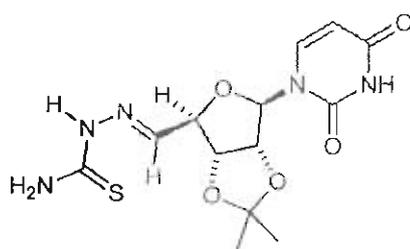


Figura 4. Tiosemicarbazona del derivado nucleosídico de uridina.

2.13.2. Antivirales

La mayoría de los agentes antivirales que han tenido éxito en medicina, son resultado de un bajo perfil de efectos secundarios, por su alta eficacia y a que están dirigidos a evitar la síntesis enzimática de los virus. El grupo más grande de agentes antivirales aprobados por las autoridades reglamentarias, actúan inhibiendo la polimerización de los ácidos nucleicos virales, dentro de ese grupo se encuentran los derivados de nucleósidos y se han autorizado para tratar el VIH, la hepatitis B, C y enfermedades como el herpes simple.^{71,72}

I. Antivirales contra el Herpes Simple

El análogo 2',3'-didesoxinucleosido-3'-tia y los oxo sustituidos, son una clase importante de fármacos antivirales y anticancerígenos. Por ejemplo, los dioxolanos nucleosídicos como: α,β -L-dioxolano 5-(2-bromovinil)uracilo y (α / β -L-dioxolano-BVU), ver **figura 5**, inhiben al virus del herpes simple (VHS) tipo 1 y 2.⁶⁰

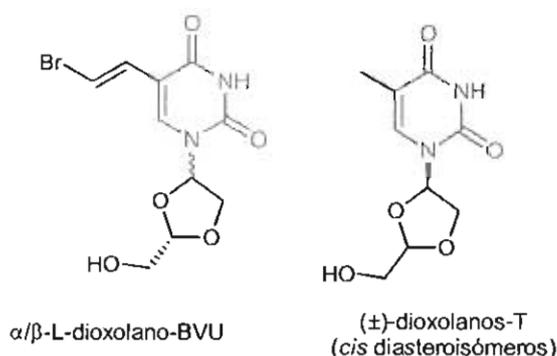


Figura 5. Derivados dioxolanos de nucleósidos de uridina.

II. Antivirales contra la Hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) es un importante agente causal de la enfermedad hepática crónica y se estima que más de 170 millones de personas en todo el mundo están infectadas con esta enfermedad. Actualmente, las terapias con interferón son los únicos regímenes aprobados por la FDA para el tratamiento del VHC.⁷³

Informes recientes han demostrado que algunos análogos ribonucleósidos modificados en 2' inhiben la replicación del VHC. En la **figura 6** se muestran algunos ejemplos: 2'-desoxi-2- α -flúoronucleosido (1), 2'-O-metilcitidina (2), 2'- β -desoxi-2'- β -

metil-2'- α -fluorocitidina (5), 7-deaza (3), 2'- β -metilcitidina (4), denominados NS5B, los cuales se encuentran en ensayos fase II (desarrollo clínico), para el tratamiento de la infección por el VHC.⁵⁵

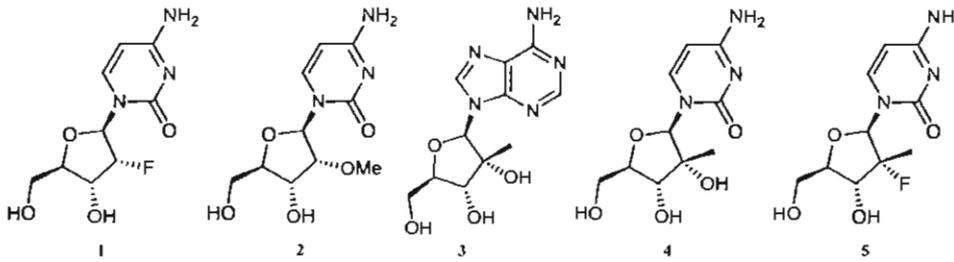


Figura 6. Nucleósidos inhibidores de NS5B.

III. Antivirales Nucleosídicos Monofosfatados contra la Hepatitis B

Varios derivados de nucleósidos (monofosfato, ésteres y amidas) se han desarrollado como profármacos. Se han desarrollado nuevos profármacos denominados "HepDirect" que ofrecen la ventaja de ser específicos en hepatocitos, utilizados para la hepatitis B, por ejemplo el compuesto MB07811 (nucleósido de citosina) y el profarmaco nucleosídico de uridina (**Figura 7**), se ha utilizado para el carcinoma hepatocelular, están siendo evaluados en ensayos clínicos en humanos y se ha encontrado que el profármaco se activa específicamente en el hígado.⁵⁷

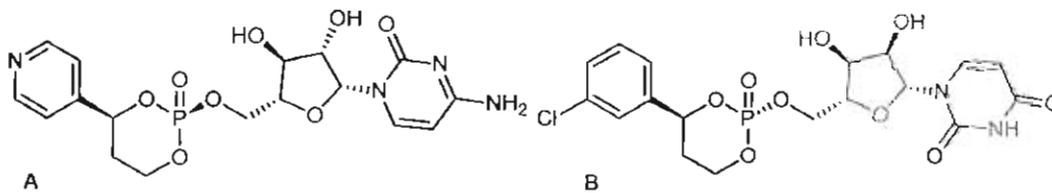


Figura 7. A) Profármaco MB07811(derivado del nucleósido monofosfatado de citosina), B) Profármaco nucleosídico monofosfatado de uridina

Los nucleósidos modificados tienen la habilidad de actuar como antivirales, interfiriendo con la polimerasa o transcriptasa reversa, sin embargo un gran número de análogos sintéticos tienen baja actividad o toxicidad excesiva. La modificación más simple y común es la metilación.^{74,75}

Finalmente las aportaciones para la salud que estos análogos nucleosídicos tienen en el combate de las infecciones provocadas por el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), ya que este representa un problema social.⁷⁶

2.13.3. Antibióticos

Los antibióticos nucleosídicos representan una clase interesante de productos naturales con estructuras inusuales.^{77,78}

Isono clasificó a los antibióticos nucleosídicos con base en su estructura, existen más de 163 antibióticos nucleosídicos, divididos en cuatro grupos, que a su vez se subdividen en distintas clases de compuestos.^{79,80,9}

1. Análogos de Base (modificaciones en la base heterocíclica)

2. Nucleósidos simples:

- I) Análogos de adenosina
- II) Análogos de guanosina
- III) Análogos de uridina
- IV) Nucleósidos derivados de pirrolpirimidina
- V) Nucleósidos derivados de tetrahidroimidazodiazepina
- VI) C-Nucleósidos
- VII) Nucleósidos indólicos
- VIII) Otros. Compuestos que presentan un heterociclo diferente al de cualquier base nitrogenada o que contienen anillos azucarados distintos al de ribofurano, y que además, no están en ninguna otra categoría.

3. Acil y Glicosil Nucleósidos:

- I) Sulfamoi nucleósidos
- II) 3'-Aminoacil-3'-deoxiadenosinas
- III) 4'-Aminoacil-4'-deoxihexosa (piranosil) citosinas
- IV) Glicosil nucleósidos
- V) Peptidil nucleósidos
- VI) Nucleósidos que contienen un azúcar de cadena larga
- VII) Nucleósidos que contienen una cadena de ácido graso.

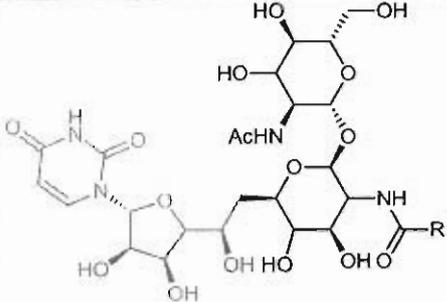
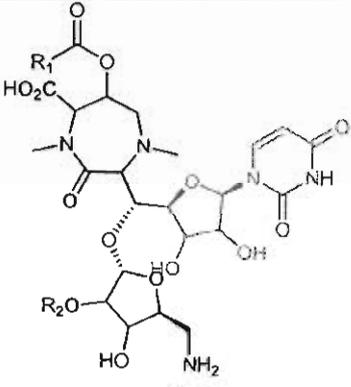
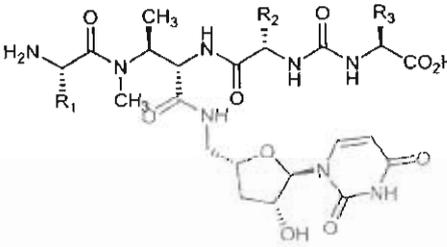
4. Nucleótidos

Algunos derivados nucleosídicos de uridina son utilizados en diversos compuestos farmacéuticos por su actividad antibiótica. Estas moléculas son capaces de inhibir la

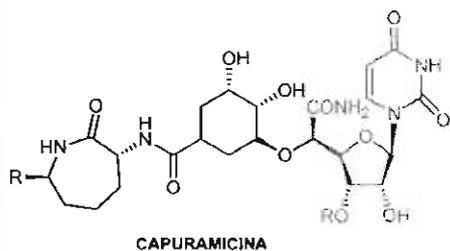
translocasa I (MraY), enzima involucrada en la biosíntesis de peptidoglicano,⁸¹ y los cuales tienen como blanco específico la reacción catalizada por la enzima MraY.⁸²

Otro tipo de antibióticos nucleosídicos son los amino peptídicos y los antibióticos 5'-dipeptidil nucleosídicos,⁸³ se ilustran en la **tabla 5**.

Tabla 5. Antibióticos nucleosídicos derivados de uridina.

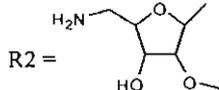
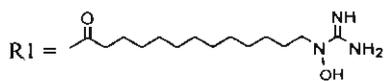
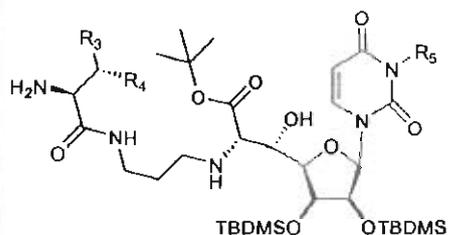
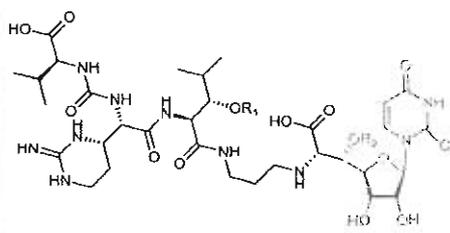
Nombre de la familia de antibióticos	Estructura	Información
Tunicamicinas	 <p style="text-align: center;">TUNICAMICINAS</p>	<p>Fue aislado en 1971 por Takatsuki y Tamura, del caldo de fermentación de <i>Streptomyces glysosuperificus</i> nov. sp, puede inhibir la replicación de los virus, bacterias y hongos.^{84,85}</p>
Liposidomicinas	 <p style="text-align: center;">LIPOSODOMICINA</p>	<p>Son producidos por <i>Streptomyces griseosporus</i>,⁸² aislado de muestras de tierra recogidas en Misaka, Yamanashi-ken, en Japón. Se han reportado 4 tipos de liposodomicinas.^{9,84,86}</p>
Pacidamicinas	 <p style="text-align: center;">PACIDOMICINA</p>	<p>Es una familia de antibióticos uridil tetra/pentapéptido, aislado de <i>Streptomyces coeruleorubidus</i>. En 1989, por lo menos 10 compuestos relacionados han sido reportados los cuales comparten un esqueleto estructural común con un nucleósido 3'-desoxiuridina, conectado a un ácido N-metil-2,3-diaminobutírico (DABA) a través de residuos de 4',5'-enamida.⁸⁷</p>

Capuramicinas



Antibióticos aislados de cultivos de *Streptomyces griseus* 466-S3 y tienen la capacidad de inhibir la enzima translocasa I, sin embargo su espectro de acción es bajo. Se han sintetizado diversos análogos realizando modificaciones en diferentes grupos funcionales con la finalidad de mejorar su actividad farmacológica.^{9, 84,85}

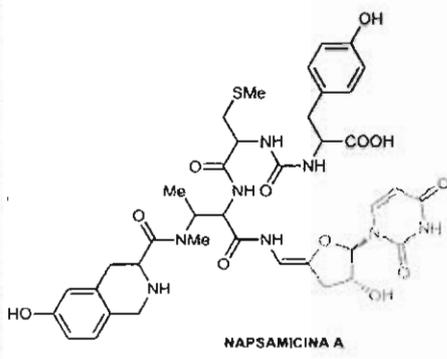
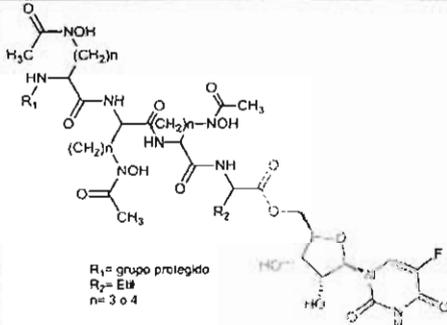
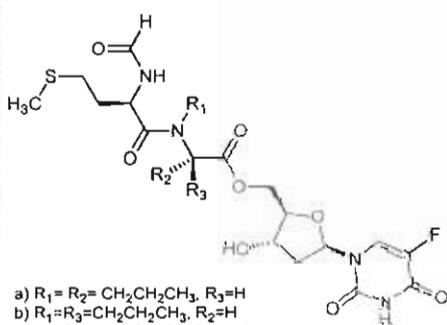
Mureidomicinas



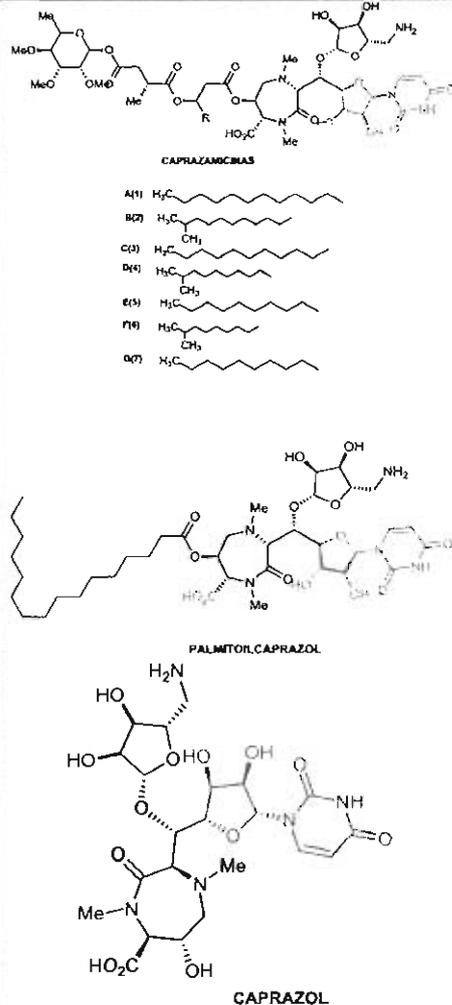
- 2 R3 = i-Pr, R4= H, R5= PMB
- 3 R3 = i-Pr, R4= OH, R5= PMB
- 4 R3 = R4= H, R5= PMB
- 5 R3 = H₂N (CH₂)₃, R4= H, R5= PMB
- 6 R3 = i-Pr, R4= H, R5= H

ANÁLOGOS 5'-EPI-MUREIDOMICINA

Antibióticos nucleosídicos, aislados de *Streptomyces flavidoviridens* SANK60486 en 1989 por Isono e Inukai, actúan como un potente inhibidor de la membrana bacteriana translocasa I (MraY), enzima clave en las primeras etapas de la biosíntesis de peptidoglicano.^{82,88,89} Estos análogos han reportado actividad notable contra bacterias Gram-negativas como *Staphylococcus aureus*.

<p>Napsamicina</p>	 <p style="text-align: center;">NAPSAMICINA A</p>	<p>Nadkarni patentó la producción y el uso como antibiótico, fue aislado de cepas de <i>Streptomyces candidus</i>, exhiben actividad antimicrobiana dirigida a la enzima translocasa <i>MraY</i> para bloquear la formación de lípidos en la pared de la célula bacteriana. Tienen un espectro muy corto de acción, siendo particularmente activa contra las cepas de <i>Pseudomonas</i>, y muy poco activo frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, que puede ser explicado por el hecho de que estos compuestos poseen acceso restringido a la célula bacteriana, debido a su polaridad y a su gran potencial para formar puentes de hidrógeno con el agua.^{83, 84}</p>
<p>Amino-peptídicos</p>	 <p>$R_1 =$ grupo protegido $R_2 =$ Et# $n = 3$ o 4</p>	<p>Marvin sintetizó ácidos amino-peptídicos nucleosídicos que contienen de 5-fluorouridina y 5-fluorocitidina como antibióticos potenciales. Inhiben bacterias Gram-positivas, resistentes a estafilococos y algunos organismos Gram-negativos.⁸³</p>
<p>Dipeptidil nucleosídico</p>	 <p>a) $R_1 = R_2 = CH_2CH_2CH_3$, $R_3 = H$ b) $R_1 = R_3 = CH_2CH_2CH_3$, $R_2 = H$ c) $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_2CH(CH_3)$, $R_3 = H$ d) $R_1 = H$, $R_2 = R_3 = CH_3$</p>	<p>Recientemente, Pei y col. sintetizaron 5'-dipeptidil derivados de 5-flúoro-desoxiuridina, profármaco activado por la enzima petidil deformilasa para liberar el fármaco activo 5-flúorodesoxiuridina. Esta enzima elimina el grupo <i>N</i>-terminal de formil polipéptidos sintetizados en ciertas bacterias eucariotas. Debido a que la deformilasa esta ubicado en bacterias y ausente en las células de mamíferos, estos derivados proporcionan una nueva clase de potenciales agentes antibacterianos.⁸³</p>

Caprazamicinas



Son antibióticos liponucleosídicos pertenecen a la clase de antibióticos 6'-N-alkil-5'-β-O-iminoribosilgliciluridina, producido por *Streptomyces* sp., utilizados en el tratamiento de la tuberculosis. Muestran excelente actividad contra bacterias Gram-positivas: *Mycobacterium tuberculosis* y *M. avium complex (MAC)*.^{84,88} Hirano y colaboradores sintetizaron varios análogos de caprazamicina, incluyendo caprazol y palmitoilcaprazol, los cuales fueron probados frente a *Mycobacterium* sp.⁹⁰ Los grupos alquilo en la molécula son fundamentales para la permeabilidad de la célula bacteriana.⁸⁴ Palmitoilcaprazol es el fármaco que puede ayudar en enfermedades como tuberculosis y es un excelente antimicrobiano de bacterias Gram-positivas además de ser un agonista de fármacos como es la vancomicina resistente a *Enterococcus*.⁹¹

2.13.4. Antifúngicos

Por otro lado, las infecciones oportunistas causadas por hongos patógenos han aumentado progresivamente hasta el grado de convertirse en un grave problema terapéutico, debido principalmente a la creciente resistencia hacia los fármacos, la toxicidad a estos compuestos antimicóticos y a un número mayor de huéspedes inmunodeprimidos.⁷⁹

Los antibióticos peptidil nucleósidos son metabolitos secundarios con gran actividad antifúngica frente a diversos hongos patógenos. Así, los derivados de los compuestos acetónidos como los (2',3'-O-isopropiliden), es un grupo protector para *cis*-1,2-dioles,

y han demostrado tener útiles características, para su empleo como intermediarios en la síntesis de antifúngicos como las polioxinas y nicomicinas.^{92,93,94}

A principios de 1970, Moffatt y Emoto, estudiaron la síntesis de polioxinas y nicomicinas derivadas de estos compuestos naturales. Emoto desarrolló la síntesis del antibiótico dipeptidil polioxina J en 1973, tres años más tarde Sorm logró sintetizar la thuringiensina, un compuesto utilizado como insecticida y Moffatt en 1982 realizó la síntesis de sinefungina un agente antimicótico. A partir de la década de los 80's se incrementó el desarrollo e investigación de derivados de nucleósidos con actividad farmacológica,⁹ ver figura 8.

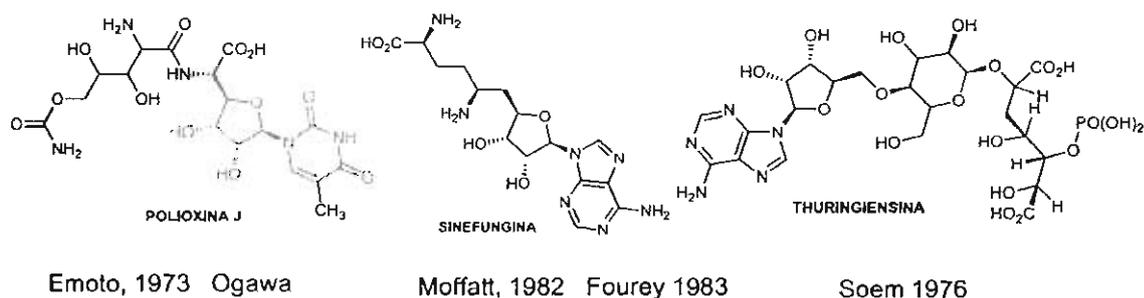


Figura 8. Antibióticos con actividad antifúngica derivados de nucleósidos.

I. Polioxinas y Nicomicinas

Las polioxinas y nicomicinas, son un grupo de antibióticos peptidil nucleósidos derivados de uridina, producidos por especies de *Streptomyces* y dichos compuestos inhiben la síntesis de quitina, el segundo polisacárido más común encontrado en la naturaleza, presente en la pared celular de una variedad de hongos fitopatógenicos. Las polioxinas también inhiben la síntesis de quitina de *Candida albicans*, un importante patógeno humano en sistemas celulares libres, pero poco activo contra la célula entera.^{9,95-98}

El procedimiento usual para la síntesis de los derivados de polioxina es la condensación del aminoácido del nucleósido con polioxámicos, ver figura 9. El nucleósido se puede obtener por aislamiento y degradación de polioxinas naturales con protección adecuada de los derivados de hexosa, con bases de pirimidina y por elaboración de derivados de uridina 5'-carboxialdehídos. La generación de un centro

asimétrico por este último procedimiento da una mezcla de un derivado del ácido β -D-alofuranurónico y su diastereoisómero, (un derivado del ácido α -L-talofuranurónico).⁹⁵

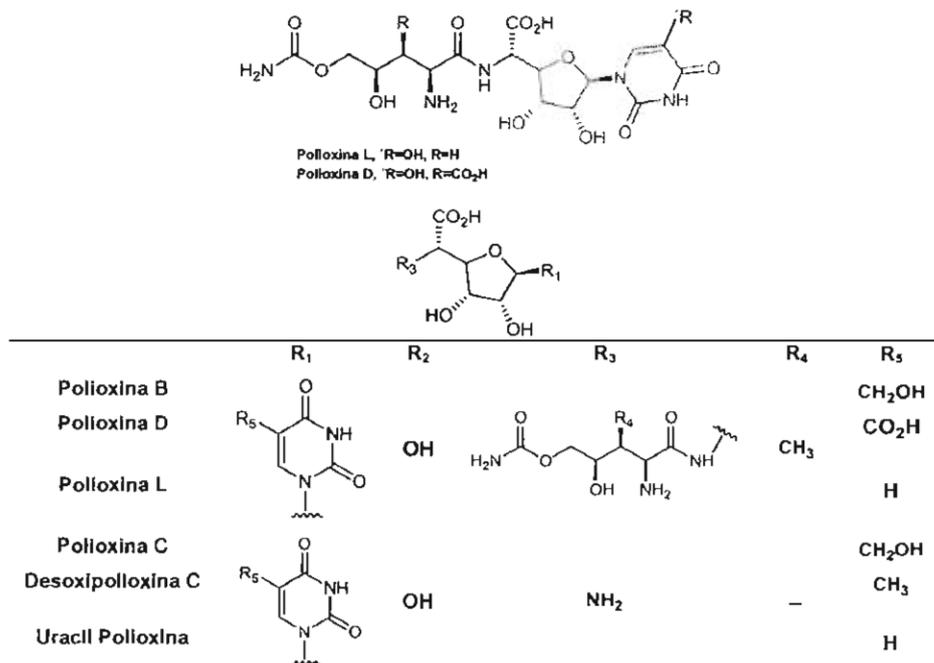


Figura 9. Estructura y variación en los tipos de Polioxinas.

Las nicomicinas, denominadas neopolioxinas, están estrechamente relacionadas con las polioxinas. Las nicomicinas al igual que las polioxinas inhiben la biosíntesis de quitina, ver figura 10.⁹⁷

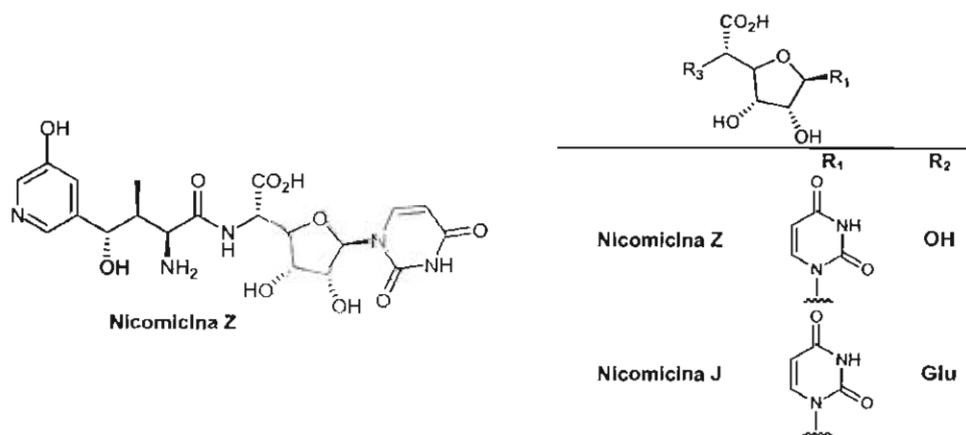


Figura 10. Estructura de los tipos de Nicomicinas.

Es indispensable tener una comprensión detallada de la farmacología de estos compuestos, para entender la capacidad y dificultades estructurales hacia la optimización del potencial antifúngico y mejorar los aspectos farmacodinámicos en la búsqueda de aplicaciones clínicas. En vista de su gran potencial antifúngico, las nicomicinas y polioxinas siguen siendo punto de enfoque, dónde aun se sigue investigando el proceso de síntesis considerando la relación estructura-actividad.⁹⁹⁻¹⁰¹

II. Fosfonoxinas

Son derivadas de nucleósidos fosfatados que presentan actividad anti-giardial y antifúngica, debido a su parecido con las polioxinas fueron llamados fosfonoxinas B1 y B2, son derivados de segunda generación, como se observa en la **figura 11**. Estos derivados se ensamblan de un análogo de ácido fosfórico o de ácido polioxámico y uridina.

Inhiben la síntesis de quitina al igual que las polioxinas y las nicomicinas, muestran actividad como antimicóticos, insecticida y acaricidas. En contraste con la nicomicinas y polioxinas, las fosfonoxinas no son péptidos, son nucleósidos fosfonados y son capaces de penetrar en las células, siendo química y enzimática estables.¹⁰

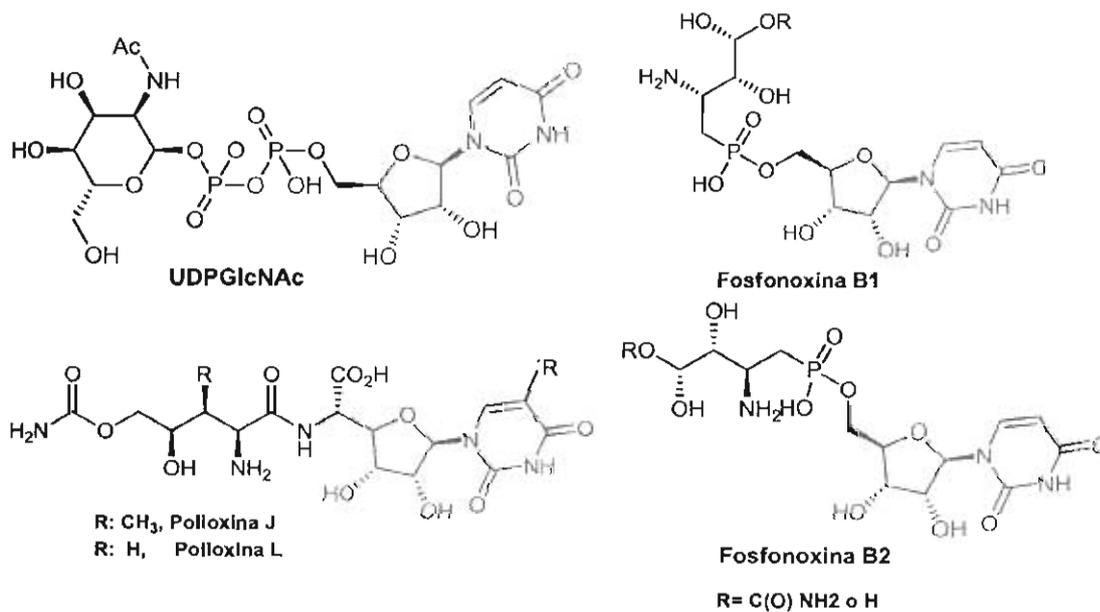


Figura 11. Estructura de Fosfonoxina B1 y B2 comparada con la estructura del sustrato de la enzima sintasa de quitina (UDPGlcNAc) y el antifúngico polioxina.

2.13.5. Antimaláricos

Las enfermedades parasitarias son las afecciones más importantes de la humanidad. De las once enfermedades prioritarias en la lista del Tropical Diseases Research (TDR) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), siete son parasitarias. Muchas de estas infecciones son causadas por parásitos protozoarios entre las que se encuentra la malaria. Entre los antimaláricos efectivos se encuentran los derivados de uridina 6' sustituidos, son inhibidores de la enzima orotidina-5'-monofosfato decarboxilasas, la cual está investigándose como diana para combatir cáncer, malaria y algunos antivirales. Se encuentra una larga lista de derivados de uridina, sustituidos con diferentes grupos funcionales como: bromo, cloro, flúor, metilos, grupos ciano, grupos fosfato entre otros en la **figura 12** se observa la estructura base uridinica.¹⁰²

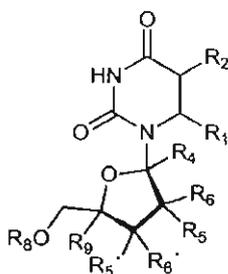


Figura 12. Estructura base de los antimaláricos.

2.14. 2',3'-O-isopropilidenuridina

Es un derivado de uridina, sintetizado por Hampton A. en 1961, con peso molecular de 284.26 g/mol. Existen 3 tautómeros, además contiene 4 centros quirales, todos de configuración (*R*). Son cristales blancos obtenidos por recristalización con acetona y éter, con un punto de fusión de 172-174°C. Soluble en acetonitrilo, acetona y éter (**Figura 13**).

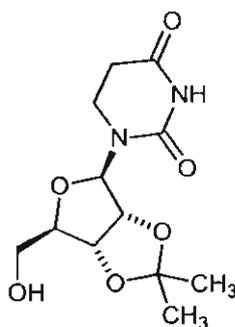
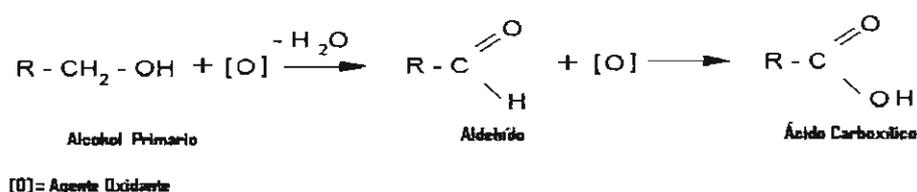


Figura 13. Molécula 2',3'-O-isopropilidenuridina.

2.15. Oxidación química de alcoholes

La oxidación de los alcoholes es una de las reacciones más comunes para dar compuestos carbonilo, depende del tipo de alcohol y el compuesto oxidante para que el compuesto carbonílico resultante sea un aldehído, una cetona o un ácido carboxílico.

Los alcoholes primarios se oxidan a aldehídos o ácidos carboxílicos (**Esquema 8**), la oxidación conduce a la formación del ácido carboxílico, pero existen algunos métodos que permiten detener la oxidación en el aldehído, por lo general los reactivos que más se usan se basan en metales de transición con estados de oxidación altos, en particular cromo.



Esquema 8. Oxidación de alcoholes primarios para la formación de aldehídos y ácidos carboxílicos.

Este tipo de métodos presentan desventajas ambientales sobre todo a escala industrial, ya que la cantidad utilizada es grande y el cromo es considerado como carcinógeno y aparece en la lista de la EPA de compuestos que requieren métodos de eliminación especiales y altamente tóxicos al ambiente, una opción es utilizar agentes oxidantes menos peligrosos como las oxidaciones biológicas metabolizadas por enzimas.⁴⁸

2.15.1. Oxidación química de alcoholes utilizando IBX

Un ejemplo de oxidación de alcoholes para la obtención de aldehídos y cetonas, con métodos menos dañinos para el ambiente es el agente oxidante denominado ácido 2-iodoxibenzoico (IBX).

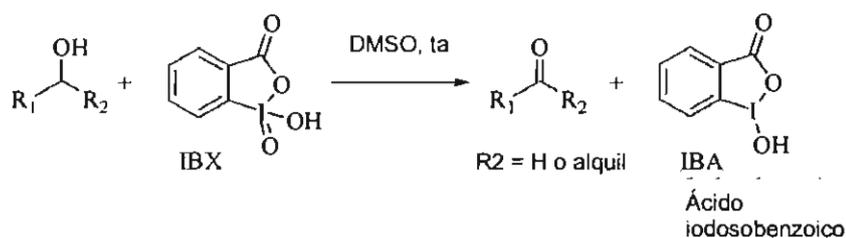
Este reactivo, se descubrió en 1893 por Hartmann y Meyer y fue olvidado durante casi un siglo, probablemente debido a su notable insolubilidad en la mayoría de los

disolventes orgánicos y en agua. En 1983, Dess y Martin, utilizaron el IBX para preparar un reactivo oxidante más soluble conocido como periodinano de Dess-Martin (DMP), se hizo muy popular en la síntesis orgánica como uno de los más utilizados para la oxidación de alcoholes.¹⁰³



Figura 14. Estructuras de IBX y DMP.

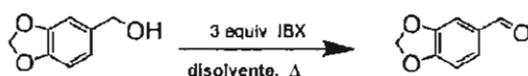
Frigerio y Santagostino en 1994 obtuvieron el primer éxito de una variedad de oxidaciones de alcoholes con IBX en dimetil sulfóxido (DMSO), el único disolvente en el que su solubilidad es apreciable. El IBX es comercial, no tóxico y no se descompone con la presencia de aire o de humedad. Puede prepararse por la oxidación de ácido 2-iodobenzoico con monopersulfato potásico (Oxone®). Desafortunadamente el IBX y el DMP se descomponen violentamente a temperaturas mayores de 200°C, lo que limita claramente su aplicación industrial.^{104,105}



Esquema 9. Oxidación química de alcoholes con IBX.

A elevada temperatura, el IBX es soluble en la mayoría de los disolventes para llevar a cabo la oxidación de alcoholes. Los mejores resultados se han obtenido con acetato de etilo (AcOEt) como disolvente, los subproductos de reacción, como el IBA, ver **esquema 9**, son insolubles en este y se eliminan por simple filtración.

Entre los beneficios de utilizar este reactivo para la oxidación de alcoholes, esta la obtención de altos rendimientos, como se muestra en la **figura 15**.¹⁰⁶



Disolvente	Rendimiento (%) ^b	Tiempo	Temperatura (° C)
Acetato de Etilo	90	3.25 hr	80
Cloroformo	80	6.5 hr	55
Acetona	100	45 min	55
Benceno	91	6.5 hr	80
Acetonitrilo	94	25 min	80
Tetrahidrofurano	0 ^c	-	80
Tolueno	0 ^c	-	80

^a Todas las reacciones se realizan a escala de 1 mmol. ^b Rendimiento aislado.
^c Disolvente de oxidación

Figura 15. Condiciones de reacción utilizadas en la oxidación de alcoholes con IBX.

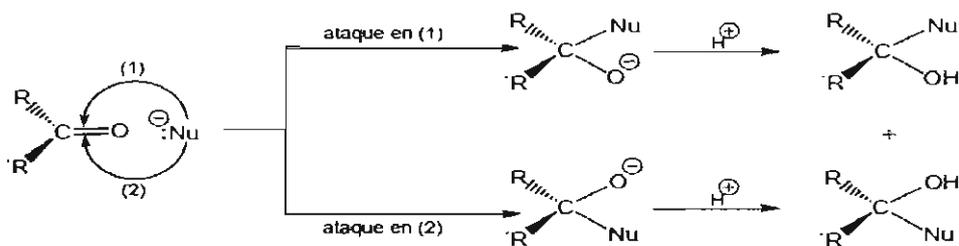
2.16. Aldehídos

2.16.1. Características del grupo carbonilo

Dos aspectos notables del grupo carbonilo son su geometría y su polaridad. El carbonilo lo contienen un gran número de compuestos orgánicos importantes tales como los aldehídos, las cetonas, los ácidos, los derivados de ácido como ésteres, haluros de acilo, amidas y anhídridos.

El grupo carbonilo es aquiral por lo que no puede proporcionar propiedades quirales a la molécula. Aunque las moléculas que contienen al grupo carbonilo pueden ser quirales, logran existir en formas enantiómeras debido a los centros asimétricos existentes en alguna parte de esta.

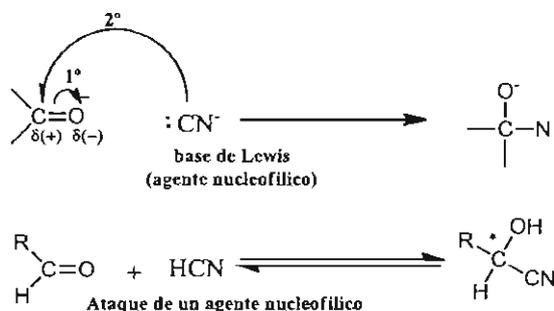
Por lo que algunos compuestos carbonílicos con excepción de las cetonas simétricas y el formaldehído, generan un nuevo centro asimétrico cuando experimentan una adición nucleofílica. Como el precursor carbonilo es plano, el ataque se puede dar en cualquier lado, dando como resultado una mezcla equimolar de enantiómeros, que es óptimamente inactiva, como se muestra en la **esquema 10**.



Esquema 10. Ataque nucleofílico al carbonilo, para la formación de moléculas con quiralidad.

2.16.2. 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 (rica en electrones). Así, como se observa en la **esquema 11**, quien inicia el ataque es el agente nucleofílico, de ahí que, este tipo de reacciones se denominan de adición nucleofílica y al originarse sobre el oxígeno una carga negativa, ésta se neutraliza por adición de una parte positiva del agente nucleofílico. Es decir, al hacer reaccionar un aldehído o cetona con HCN por ejemplo, éste primero se disocia en H^+ y CN^- , enseguida estas partículas se adicionan al aldehído.



Esquema 11. Ataque de ácido cianhídrico al grupo carbonilo

2.17. Síntesis química de cianohidrinas a partir de aldehídos

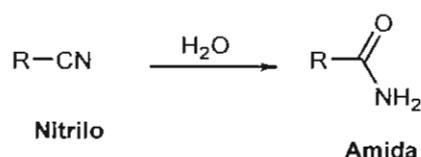
El producto de la adición del ácido cianhídrico a un aldehído o una cetona contiene un grupo hidroxilo y un grupo ciano, al mismo tiempo, enlazados al mismo carbono. Los productos obtenidos son denominados cianohidrinas; estas se pueden producir empleando ácido cianhídrico (HCN). Sin embargo, como el HCN es peligroso muchos

métodos emplean un equivalente de cianuro de potasio o de sodio disuelto en algún disolvente donador de protones.

2.18. Síntesis química de amidas a partir de nitrilos

Las amidas son comunes en la naturaleza y se encuentran en sustancias como los aminoácidos, las proteínas, el ADN y el ARN, hormonas, vitaminas. Es utilizada en el cuerpo para la excreción del amoniaco (NH_3). Muy utilizada en la industria farmacéutica y en la industria del nailon.

Una síntesis para obtener amidas es la hidrólisis de nitrilos en medios básicos o ácidos con calentamiento durante varias horas, esta reacción es irreversible, la reacción general se muestra en el **esquema 12**.⁴⁸



Esquema 12. Reacción general de hidrólisis de nitrilos para obtener amidas.

2.19. Métodos analíticos empleados en la determinación de estructuras

Es importante contar con técnicas analíticas como: UV, IR, RMN y CLAR, que nos ayudan a caracterizar, identificar y cuantificar compuestos con alta pureza óptica, como son los diastereoisómeros nucleosídicos, sobre todo si presenan actividad biológica o son intermediarios de compuestos con actividad terapéutica, ya que dicha actividad para cada diastereoisómero no necesariamente es la misma para ambos.

La espectroscopía estudia las interacciones que suceden entre la radiación y la materia, los métodos espectrofotométricos miden la cantidad de radiación producida o absorbida por las especies atómicas o moleculares que se analizan y estos métodos se clasifican de acuerdo con la región del espectro electromagnético que se utilice en la medición.

2.19.1. Espectroscopía UV-Visible

Es una técnica espectroscópica de absorción en donde la materia absorbe energía para pasar de un estado fundamental a uno excitado.

Esta técnica es muy útil para la identificación de especies químicas orgánicas, inorgánicas y bioquímicas, es utilizada en el análisis cuantitativo y cualitativo, aunque con mucha menor aplicación en esta última, ya que los espectros dan pocas bandas y muy anchas lo que dificulta la identificación precisa de un compuesto, pero si proporciona información sobre las características estructurales de la molécula o indica que posee un determinado grupo. Una ventaja de esta técnica es que un gran número de moléculas son absorbentes, es decir cuentan con un grupo cromóforo, tienen una elevada sensibilidad de 10^{-4} a 10^{-7} M. El margen de error de esta técnica se encuentra alrededor de 1-3%.

Longitud de onda UV: 200-400nm Visible: 400-800nm

2.19.2. Espectroscopía Infrarroja (IR)

Los métodos espectroscópicos vibracionales incluyen la espectroscopía de infrarrojo (IR). Ofrecen información sobre los modos vibracionales moleculares fundamentales y proporcionan espectros de las «huellas dactilares» de los grupos funcionales.

La espectroscopía de IR permite observar los modos vibracionales que cambian el momento dipolar. Los espectros vibracionales son especialmente sensibles al entorno molecular y a las conformaciones. Esta técnica es muy utilizada debido a que las bandas vibracionales de muchos grupos funcionales aparecen a longitudes de onda características, además de que el espectro en su conjunto constituye un criterio inequívoco para la identificación de una molécula.

La espectroscopía infrarroja es un buen método de análisis que se aplica principalmente para identificar grupos funcionales de compuestos y establecer o confirmar estructuras de moléculas, es utilizada como una técnica auxiliar para emplearse con otras técnicas como son la espectroscopía RMN y la espectroscopía de masas.¹⁰⁷

2.19.3. Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es un procedimiento analítico basado en las propiedades magnéticas de ciertos núcleos atómicos, es similar a otros tipos de espectroscopía en que la absorción o emisión de energía electromagnética a frecuencias características proporciona información analítica.

La RMN difiere en que los niveles discretos de energía entre los que ocurren las transiciones, son creados artificialmente sometiendo al núcleo a un campo magnético. Es una técnica no destructiva y analiza toda la muestra simultáneamente, eliminando el inconveniente de analizar sólo una porción de la muestra.

La RMN es una técnica de alta especificidad pero baja sensibilidad, los espectros de RMN se han utilizado en un amplio rango de aplicaciones como por ejemplo la elucidación de estructuras, estudios de termodinámica, cinética y mecánica en análisis cuantitativo. En aplicaciones cualitativas usualmente acoplado a otras técnicas analíticas es una poderosa herramienta.

Los desplazamientos químicos proporcionan información del entorno químico de los núcleos. La multiplicidad de las señales proporciona información de estereoquímica importante. La partición mutua de señales de grupos funcionales que indican proximidad. La constante de acoplamiento (J) entre protones residuales en estructuras aromáticas sustituidas, se utiliza para identificar la posición relativa de los sustituyentes.

En aplicaciones cuantitativas es utilizado cuando el equipo se encuentra bien calibrado, en donde las áreas o intensidades de dos señales son proporcionales al número total de protones que las generan. Para la cuantificación se utilizan las áreas bajo la curva de las señales que se utilizaran.¹⁰⁷⁻¹¹⁰

2.19.4. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Es una técnica desarrollada a principios de siglo XX, permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. Es un proceso de migración diferencial, en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil y retenidas selectivamente por una fase estacionaria.

Las fases estacionarias más comunes son la sílice modificada o las microperlas de polímeros, dependiendo de la longitud y diámetro de las columnas se ve afectada la separación. La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes. La selección de ambas dependerá de las características fisicoquímicas de la molécula, además dependiendo de la polaridad de la fase móvil (FM) como de la fase estacionaria se considera fase normal o fase reversa, como se ejemplifica en la **Tabla 6**, por lo que es de suma importancia tener una adecuada selección de ambas fases.^{107,109,111}

Tabla 6. Comparación de la fase normal y fase reversa.

FASE NORMAL	FASE REVERSA
Fase móvil no polar	Fase móvil polar
Fase estacionaria polar	Fase estacionaria no polar
Solutos poco polares eluyen rápido	Componentes más polares aparecen primero
Incrementando la polaridad de la FM se reduce el tiempo de elución	Incrementando la polaridad de la FM aumenta el tiempo de elución
Empaque de las columnas polar: ciano, diol, amino, dimetilamino.	Empaque de la columna más común C-8 (<i>n</i> -octil) o C-18 (<i>n</i> -octadecil)
Fase móvil polaridad baja (éter dietílico, cloroformo, hexano)	Cuanto mayor es el número de carbonos del empaque de la columna es más efectiva

Algunos criterios importantes a considerar dentro del desarrollo de métodos analíticos por CLAR son: el número de platos teóricos en la columna (**N**), Tiempo de retención (t_R), Factor de retención, también se le conoce como factor de capacidad (**k**) el cual se recomienda sea mayor a 2, Resolución (**R_s**) mayor a 2, Factor de simetría (**A_s**) para el cual se recomienda un valor menor a 2.

En esta técnica instrumental se pueden acoplar diferentes detectores, la elección del detector dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la molécula.

2.20. Estadística

La estadística es una herramienta que nos ayuda a probar la reproducibilidad, precisión y exactitud en la metodología y en la cuantificación de un compuesto determinado.

Esta herramienta además puede diferenciar la desviación que existe entre dos o más variables con la finalidad de facilitar la toma de decisiones respecto a un gran volumen de datos al examinar solo una pequeña parte de ellos.

2.20.1. Análisis de varianza

En la mayoría de los experimentos se estudia el efecto de una o más variables independientes sobre una respuesta. Las variables independientes controlables en un

experimento reciben el nombre de factores y el nivel de intensidad de un factor se denomina nivel del factor.

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

2.20.2. Distribución de t de Student

Se le denomina distribución de t, a las distribuciones de medias en las que se emplea la desviación estándar de la muestra. Al igual que con la distribución normal estándar o distribución z, la distribución t también es simétrica, pero su desviación estándar es amplia. El tamaño exacto de una desviación estándar depende de un concepto complejo, relacionado con el tamaño de la muestra llamado grados de libertad, el cual se relaciona con el número de veces que se usa la información de la muestra. Debido a que esta se usa una sola vez para estimar la desviación estándar. Las hipótesis o suposiciones para aplicar la t de Student son que, en cada grupo, la variable estudiada siga una distribución normal y que la dispersión en ambos grupos sea homogénea (igualdad de varianzas). Si no se verifica que se cumplen estas premisas, los resultados de la prueba t de Student no tienen ninguna validez. Por otra parte no es obligatorio que los tamaños de los grupos sean iguales, ni tampoco es necesario conocer la dispersión de los dos grupos.¹¹²

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los derivados de uridina son intermedarios para la obtención de antibióticos nucleosídicos como el palmitoilcaprazol entre otros, este fármaco puede ayudar en enfermedades como la tuberculosis, además de ser un excelente agonista de fármacos resistentes a bacterias *Enterococcus*¹⁰ como la vancomicina. Lo anterior es relevante, porque a partir de estos compuestos se pueden sintetizar antibióticos, antimicóticos y antivirales, los cuales son empleados en el tratamiento de algunas enfermedades que afectan a la población en general, lo que los hace importantes para coadyuvar en la conservación de la salud.

La aparición clínica a la resistencia generalizada a los antibióticos pone en peligro la eficacia actual en el uso de estos, por lo que es necesaria la exploración de nuevas moléculas y sus metodologías de preparación, para contar con compuestos con altos valores de excesos enantioméricos para las pruebas biológicas, lo que sin duda reforzara los estudios de quimioterapia antibacteriana.

Por lo anterior, es importante desarrollar procedimientos sintéticos, vía biocatálisis, que permitan una inducción asimétrica, para obtener así uno solo de los posibles estereoisómeros de derivados de la uridina, o al menos enriquecer a uno de ellos; lo anterior encontrará un campo fértil en la producción de intermedarios de gran pureza en la obtención biocatalítica de estos derivados o nuevos compuestos. Además, el contar con los métodos analíticos que permitan detectarlos y cuantificarlos con mayor eficacia, será muy útil en las siguientes etapas de estudio de cuantificación de estos principios activos ó sus metabolitos en un organismo vivo.

4. HIPÓTESIS

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

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

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

5.2. Objetivos Específicos

1. Preparar por métodos químicos convencionales los derivados nucleosídicos de uridina: 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina y sus respectivos derivados.
2. Caracterizar e identificar la materia prima 2',3'-O-isopropilidenuridina y el intermedio 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina y sus respectivos derivados; empleando sus espectros de infrarrojo y resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C).
3. Estudiar el uso de oxinitrilasas, de diferentes orígenes, para la preparación biocatalítica de los nucleósidos de la uridina.
4. Diseñar y desarrollar el método analítico por CLAR con las condiciones más adecuadas para lograr la separación y cuantificación de los diastereoisómeros, de los compuestos 2',3'-O-isopropilidenuridina, 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina y de sus respectivos derivados.
5. Purificar y caracterizar los compuestos obtenidos por métodos espectroscópicos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Instrumentos y Equipos

1. Parilla de Termo-Agitación IKA.
2. Estufa Incufridge REVSCI SR-IF-202.
3. Estufa Thermoelectric cooler & warmer TK-20T.
4. Estufa REVSCI SR-IF-202.
5. Rotavapor Büchi R-210.
6. Destilador Büchi Glass Oven B-580.
7. Espectrofotómetro de infrarrojo (IR) Perkin-Elmer Paragon 1600 FT, FT-IR System.
8. Resonancia magnética nuclear (RMN) Varian Mercury DMX400 de 400 MHz.
9. Espectrofotómetro UV/VIS, Beckman DU650.
10. Espectrofotómetro Genesis 20 (325 – 1100 nm).
11. Polarímetro Perkin Elmer modelo 341.
12. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent 1050 con detector de UV/visible de arreglo de diodos.
13. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent 1100 con detector de UV/visible de arreglo de diodos.

6.2. Insumos Químicos

La materia prima 2',3'-O-Isopropilideneuridina se adquirió de Sigma Aldrich, los reactivos y disolventes utilizados para las síntesis fueron grado reactivo (J.T. Baker, Merck), los disolventes grado CLAR (Tecsiquim y J.T. Baker), columnas para CLAR: Zorbax Eclipse XDB C8 de 4.6 x 150 mm x 5 µm No. de parte 993967-902 y Columna quiral OJ-H de 4.6 mm x 250 mm x 5 µm No. de parte 554-0103.

6.2.1. Reactivos

- Ácido 2-iodobenzoico, 98%, R.A., Aldrich.
- Oxone, R.A., Aldrich
- Cloruro de amonio, R.A., J.T. Baker
- Cianuro de sodio, R.A., J.T. Baker
- Cianuro de potasio, R.A., J.T. Baker

- Ácido cítrico, R.A., J.T. Baker
- Yoduro de Zinc, R.A., J.T. Baker
- Cianuro de trimetilsilano, R.A., J.T. Baker
- Carbonato de potasio, R.A., Técnica Química
- Ácido 3-cloroperbenzoico, R.A., J.T. Baker
- Sulfato de sodio anhídrido, R.A., J.T.Baker.
- Ácido clorhídrico, R.A., MERCK
- Ácido acético, R.A., MERCK
- Peróxido de hidrógeno, R.A., J.T.Baker
- Sílica gel, 230-400 mesh, 60 Å, Aldrich
- Placas de sílica gel 20x20 cm., MERCK

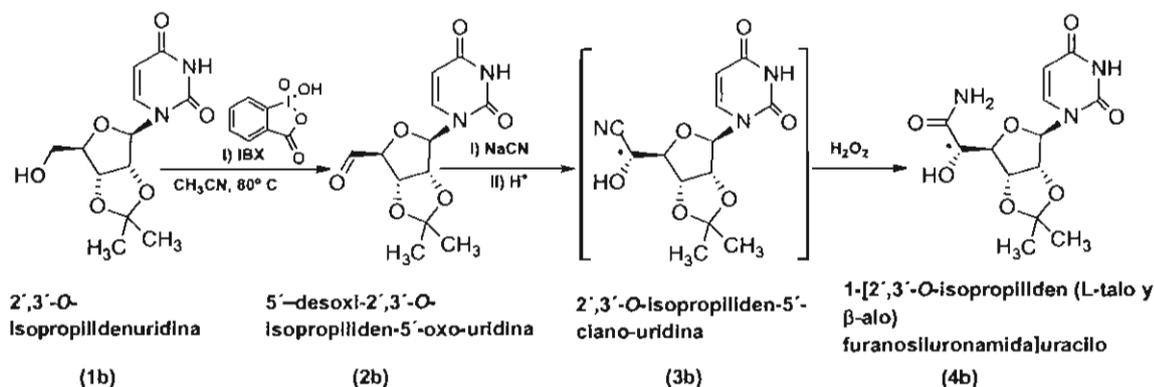
6.2.2. Disolventes

- Isopropanol y *n*-hexano grado CLAR, Tecsiquim y J.T.Baker.
- Acetonitrilo, Reactivo analítico, J.T.Baker
- Eter diisopropílico, Reactivo analítico, J.T.Baker
- Metanol, Reactivo analítico, J.T.Baker
- Cloroformo, Reactivo analítico, J.T.Baker
- Dimetilsulfóxido, Reactivo analítico, J.T.Baker
- Etanol, Reactivo analítico, J.T.Baker
- Dimetilformamida, Productos Químicos Monterrey
- Piridina, MERCK
- Cloruro de acetilo, Reactivo analítico, J.T.Baker
- Anhídrido acético, Reactivo analítico, Aldrich
- Cloruro de metileno Reactivo analítico, J.T. Baker
- Acetato de etilo y *n*-hexano, Reactivo analítico, J.T.Baker y Tecsiquim

6.3. Síntesis química para la obtención de los derivados de uridina

En el **esquema 13** se muestra la ruta de síntesis para la obtención de los tres productos derivados de uridina, utilizando síntesis química y posteriormente se

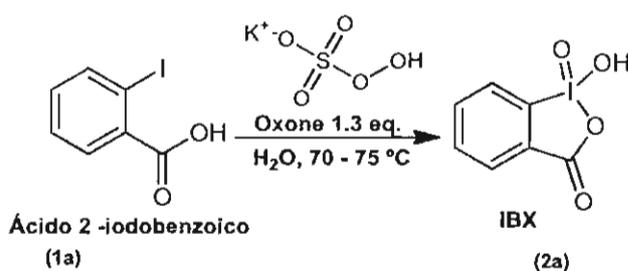
describe cada uno de los pasos de síntesis y las diferentes metodologías probadas para la obtención de cada uno de los compuestos.



Esquema 13. Ruta de síntesis química para la obtención de derivados de uridina

6.3.1. Síntesis del ácido o-iodoxibenzoico (IBX)

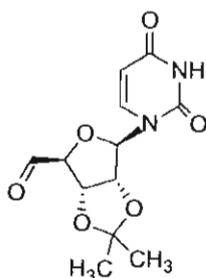
Se pesaron 2.53 g (1 mmol) de ácido 2-iodobenzoico (1a) y se transfirió a un matraz de bola de 500 mL con agitación mecánica, se adicionó una solución de Oxone® 18.62 g (3 mmol) en 100 mL de agua desionizada, a 75°C- 80°C, se monitoreó la reacción por cromatografía de capa fina (CCF). Se enfrió la mezcla de 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. En el **esquema 14** se presenta la síntesis para la obtención del compuesto IBX (2a) a partir de ácido 2-iodobenzoico.¹⁰⁴



Esquema 14. Síntesis para la obtención de IBX.

Solubilidad. Poco soluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos, soluble a altas temperaturas.

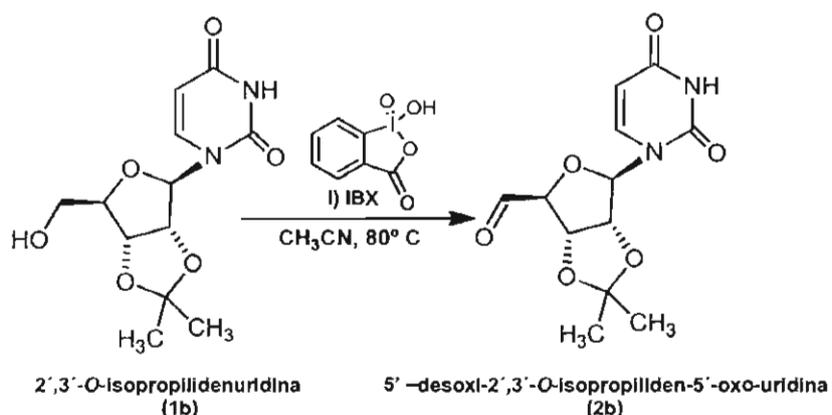
6.3.2. Síntesis del 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina



5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina.
(2b)

6.3.2.1. Método A (oxidante IBX)

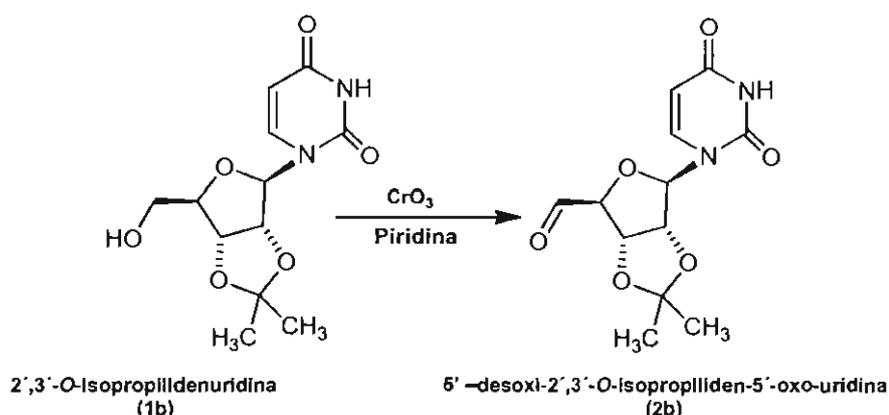
En un matraz de bola de 50 mL provisto de refrigerante, se pesaron 284.3 mg (1 mmol) de 2',3'-O-isopropilideneuridina (**1b**) la cual se disolvió en 8 mL de acetonitrilo (CH_3CN), se adicionaron 840 mg (3 mmol) del reactivo IBX, la reacción se llevó a una temperatura de 80°C , se monitoreó la reacción por CCF, una vez determinado el término de la reacción mediante CCF e infrarrojo, la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró en vidrio sinterizado para eliminar residuos de IBX, se realizaron dos lavados de 10 mL con CH_3CN . El disolvente se destiló a presión reducida (rotavapor) y se desplazó el aire con N_2 seco para evitar la hidratación del aldehído, 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (**Esquema 15**).^{113,114}



Esquema 15. Síntesis del 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina.

6.3.2.2. Método B (oxidante CrO₃)

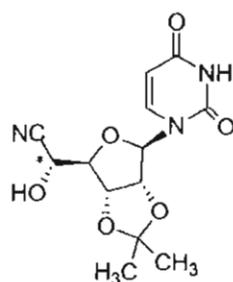
Se preparó una mezcla de CrO₃ (704 mg, 7.04 mmol) y piridina (1.14 mL, 14.08 mmol) en cloruro de metileno y N,N-dimetilformamida en una relación de 4:1 (10 mL), la reacción se agitó en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 30 min, se adicionó 2',3'-O-isopropilidenuridina (1b) (500 mg, 1.76 mmol) en una solución de cloruro de metileno y N,N-dimetilformamida en una relación de 4:1 (10 mL) y anhídrido acético (0.66 mL, 7.04 mmol). La reacción se monitoreó por CCF y una vez determinado el término de la reacción por CCF e infrarrojo, la reacción se lavó con una solución saturada de cloruro amónico (2 x 10 mL) y agua (10 mL), se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL), se filtró a través de florisil, se secó con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se destiló a presión reducida, se desplazó el aire con N₂ para evitar la hidratación del aldehído, 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (2b), ver esquema 16.



Esquema 16. Síntesis química para la obtención del 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina.

6.3.3. Síntesis química de 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina

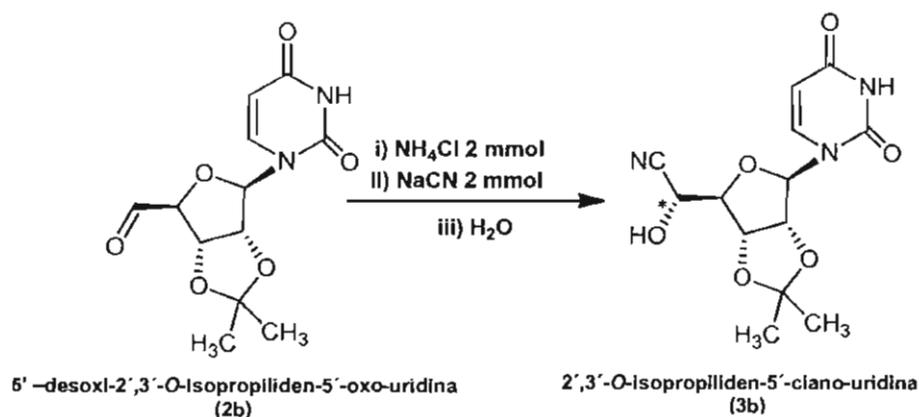
La síntesis química para la obtención del compuesto 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (3b), se realizó por tres métodos a partir del compuesto 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (2b).



2',3'-O-Isopropiliden-5'-ciano-uridina (3b)

6.3.3.1. Método de Síntesis A

Este procedimiento experimental fue descrito por W. Jian-qiang et al¹⁵ **esquema 17**, consistente en la preparación de soluciones acuosas de cloruro de amonio (2.2 mmol) en 2 mL de agua y 2.2 mmol de cianuro de sodio en 2 mL de agua; estas soluciones se mezclaron y se adiciona 1 mmol del compuesto (2b), la reacción se dejó en agitación y temperatura entre 20 y 30°C, se monitoreó por CCF durante 5 hrs, se extrajo la cianohidrina 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 sólido café claro.

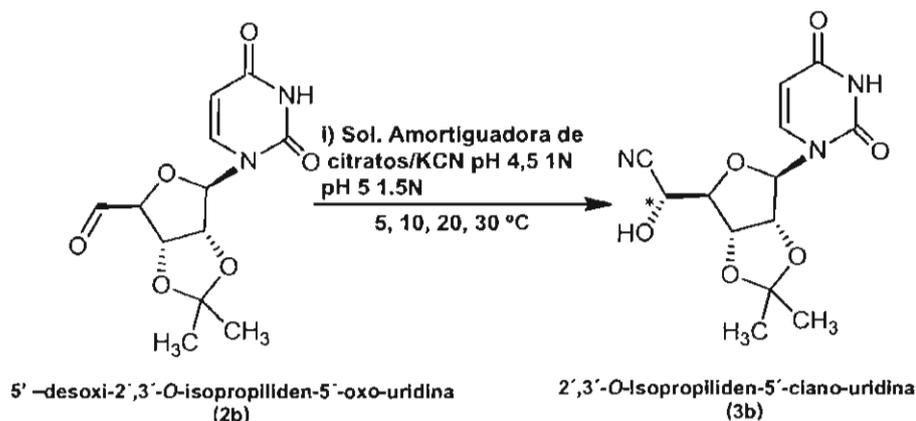


Esquema 17. Síntesis química del método A para la obtención del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina.

6.3.3.2. Método de Síntesis B

Se emplearon como fuente de HCN soluciones amortiguadora de cianuro de potasio (KCN) y ácido cítrico: 1N a pH 4.0 ± 0.05 y pH 5.0 ± 0.05 y 1.5 N a pH 5.0 ± 0.05 . Se tomó 0.5 mL de una de las soluciones y se colocó en un tubo de ensayo, se extrajo con éter diisopropílico (2 x 1 mL) el HCN y se adicionó 141.65 mg (0.5 mmol) del

compuesto (**2b**) a la fase orgánica, agregando un exceso de la solución amortiguadora de KCN/ citratos (50 μ L), se colocó en agitación a temperaturas de: 5, 10, 20 y 30°C. La reacción se monitoreó por CCF e IR, se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL), se filtró y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se destiló a presión reducida, el producto obtenido se analizó por CLAR y RMN para determinar el exceso diastereoisomérico,^{37,38} **esquema 18**.



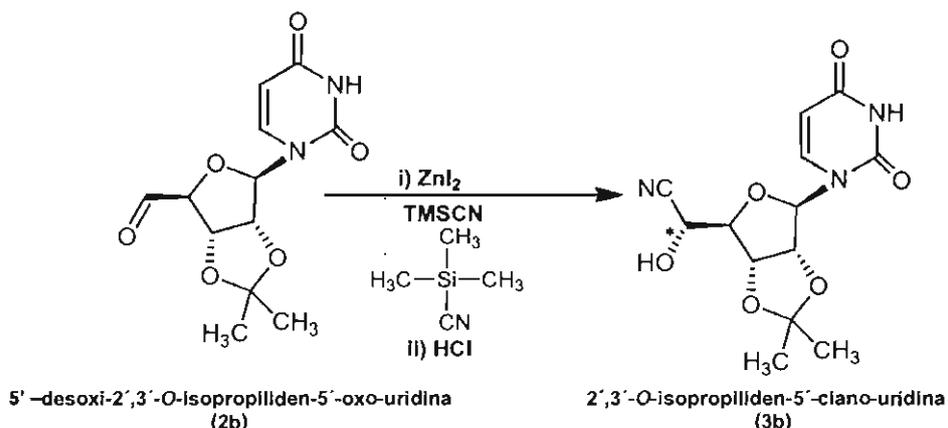
Esquema 18. Síntesis química del método B para la obtención del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina.

6.3.3.3. Método de Síntesis C

Se empleó como catalizador yoduro de zinc (ZnI₂) el cual interactúa con el cianuro de trimetilsilano para la obtención de la cianohidrina protegida de uridina, ver **esquema 19**.

Se pesaron 3.2 mg, (10 μ mol) del catalizador de ZnI₂, este compuesto se mezcló con el cianuro de trimetilsilano 119 mg (1.2 mmol) en cloruro de metileno. Una vez obtenida una mezcla homogénea se añadió 1 mmol del compuesto (**2b**) disuelto en 10 mL de cloruro de metileno, esta reacción se mantuvo en agitación constante, a temperatura ambiente, se monitoreó por CCF hasta identificar la conversión total del aldehído. Una vez concluida la reacción el disolvente se evaporó y el producto crudo se redisolvió en 10 mL de metanol. La cianohidrina protegida con el trimetilsilano se libera con HCl (3M, 5 mL). La mezcla de reacción se evaporó hasta lograr un volumen de 5 mL, se lavó con agua (5 mL) y cloruro de metileno (10 mL) se separaron las dos fases, la fase acuosa se extrajo nuevamente con cloruro de metileno (2 x 10

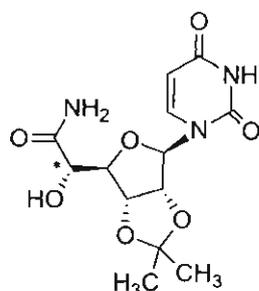
mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se destiló a presión reducida. La cianohidrina cruda se purificó por recristalización en *n*-hexano o mediante cromatografía de columna con cloruro de metileno/ácido acético 99:1 como mezcla eluyente.¹¹⁶



Esquema 19. Síntesis química del método C para la obtención del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina.

6.3.4. Síntesis química para la obtención de 1-[2',3'-O-isopropiliden(α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida]uracilo

Para la obtención del compuesto 1-[2',3'-O-isopropiliden(α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida]uracilo (**4b**), se utilizaron 6 metodologías de síntesis descritas a continuación:

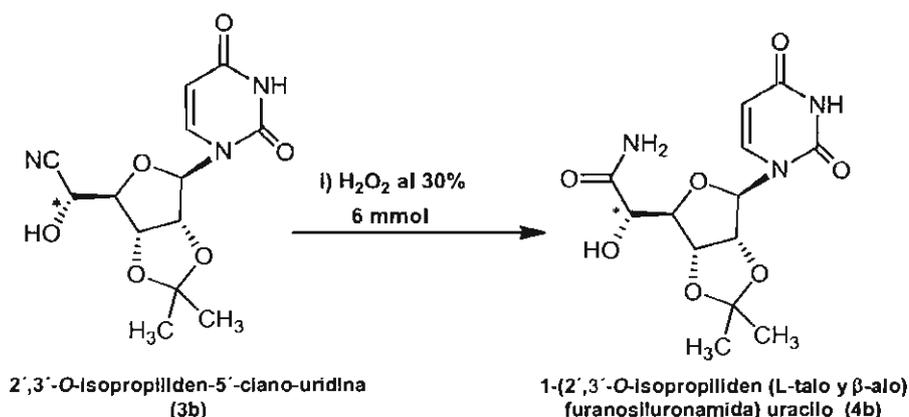


1-[2',3'-O-isopropiliden (L-talo y β -alo) furanosiluronamida]uracilo (4b)

6.3.4.1. Método de Síntesis I

Se pesaron en un matraz de bola de 50 mL, 327 mg (1mmol) del compuesto (**3b**) obtenido por el método de síntesis A, descrito en el punto 6.3.3.1, se le adicionaron 0.15 mL (6 mmol) de H_2O_2 al 30% **esquema 20**, se mantuvo en agitación a

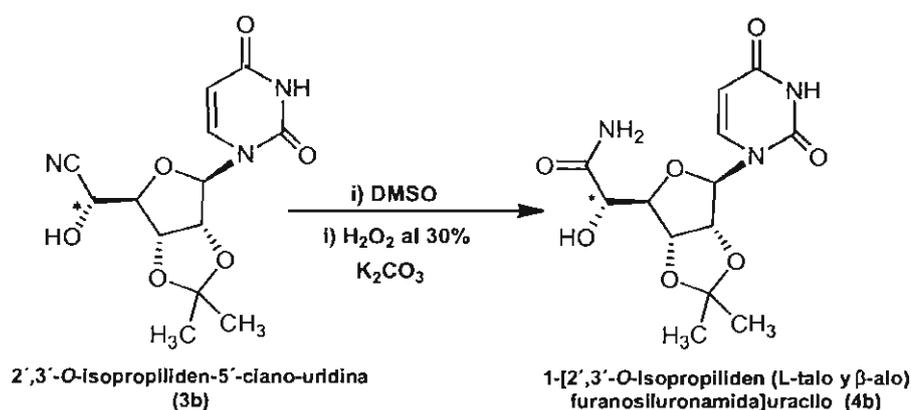
temperatura ambiente, se monitoreó por CCF, se diluyó con MeOH y la solución se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó por cromatografía en columna empleando como fase móvil una mezcla de CHCl_3 :MeOH 75/25 (15 mL) y 50/50 (10 mL).¹¹⁵



Esquema 20. Síntesis química del método I para la obtención del 1-[2',3'-O-isopropiliden(α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida]uracilo.

6.3.4.2. Método de Síntesis II

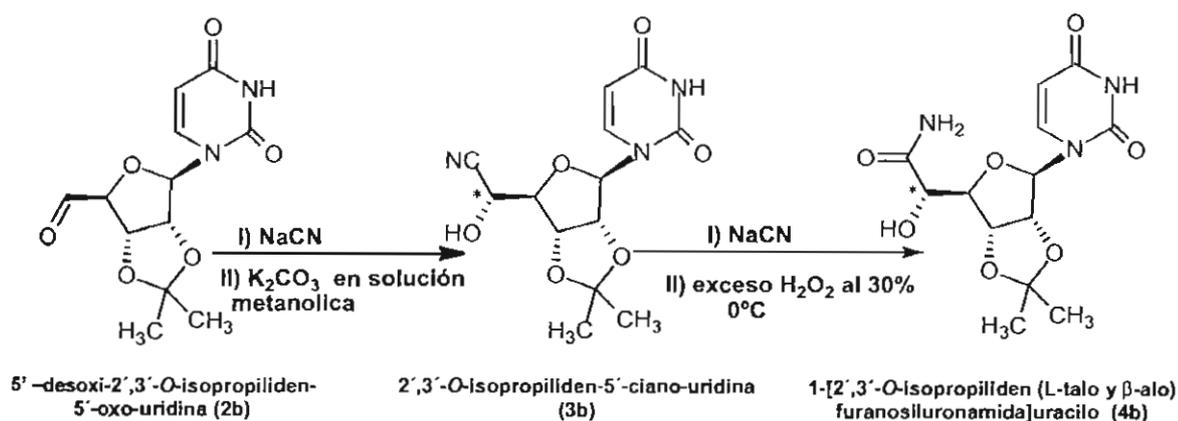
Se pesaron en un matraz de bola de 50 mL, 327 mg (1 mmol) del compuesto (3b) obtenido con el método de síntesis A, se disolvió en 1.5 mL de DMSO, la mezcla se puso en baño de hielo con agitación, se adicionaron 0.15 mL (6 mmol) de H_2O_2 al 30%, se agregó 20 mg de K_2CO_3 , ver **esquema 21**. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente, se monitoreó por CCF e infrarrojo. Se extrajo con AcOEt o se concentra hasta la total evaporación del disolvente.¹¹⁷



Esquema 21. Síntesis química del método II para la obtención del 1-[2',3'-O-isopropiliden(α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida]uracilo.

6.3.4.3. Método de Síntesis III

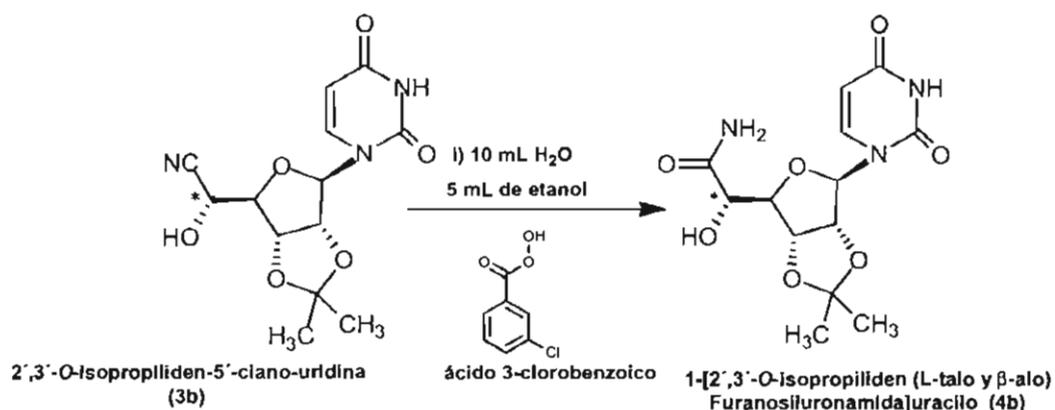
Se pesaron 100 mg (0.31 mmol) del compuesto (2b) se mezcló con 38.2 mg NaCN (2.2 mmol), se empleó como medio de reacción solución metanólica saturada de K₂CO₃, la mezcla se colocó en agitación a temperatura ambiente, se monitoreó por CCF e IR. Una vez concluida la reacción se añaden (0.5 mmol) de NaCN y un exceso del 15% de H₂O₂ al 30% para dar el compuesto (4b) ver **esquema 22**. Se monitorea la reacción por CCF e IR hasta el término de la reacción. Se concentró y se recrystalizó en etanol. Si es necesario, se purifica por cromatografía en columna.^{118,119}



Esquema 22. Síntesis química del método III, para la obtención del 1-[2',3'-O-isopropiliden(α-L-talo y β-D-alo)furanosiluronamida]uracilo.

6.3.4.4. Método de Síntesis IV

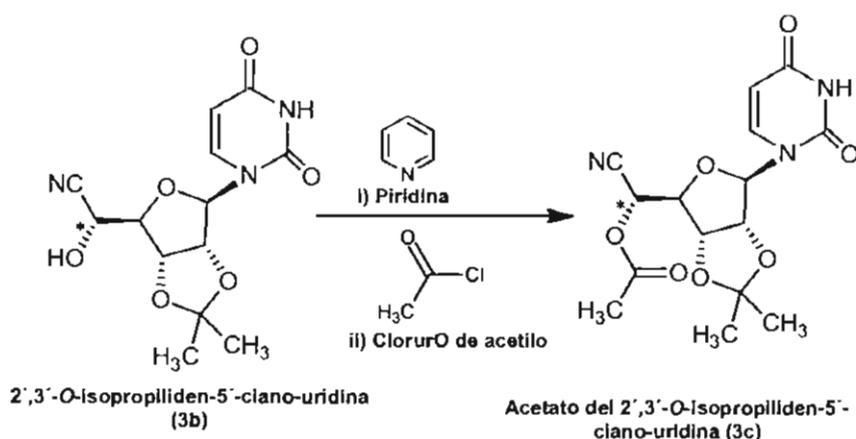
Se pesaron 136 mg (4 mmol) del ácido 3-cloroperbenzoico como catalizador, se mezcló con 60.9 mg (1 mmol) del compuesto (3b), con 10 mL de agua y 5 mL etanol, en agitación a una temperatura de 25°C a 30°C ver **esquema 23**, se monitoreó por CCF e IR. Se concentró a presión reducida hasta sequedad.¹²⁰



Esquema 23. Síntesis química del método IV para la obtención del 1-[2',3'-O-isopropiliden(α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida]uracilo.

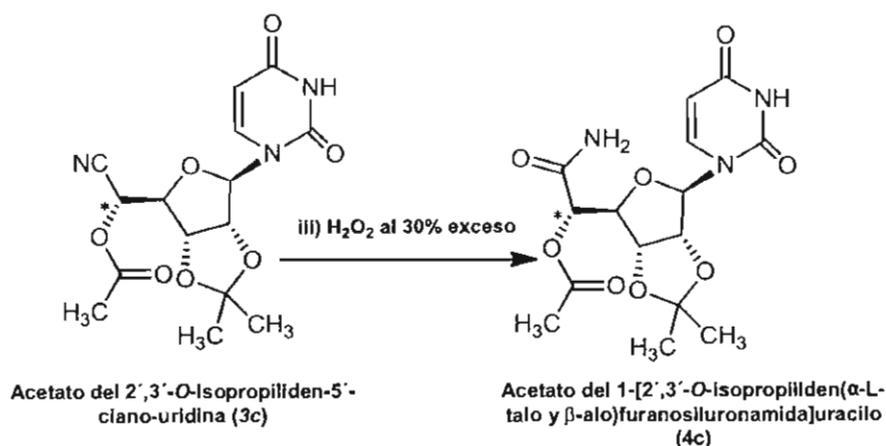
6.3.4.5. Método de Síntesis V

Se pesaron en un matraz bola de 50 mL, 0.20 g (0.61 mmol) del compuesto (2b), se disolvió en 5 mL de piridina anhidra a 0°C, en baño de hielo, se agitó hasta obtener una mezcla homogénea, se añadió cloruro de acetilo (0.73 mmol) a la solución, se mantuvo en agitación a temperatura ambiente, **esquema 24**. Se monitoreó por CCF, obteniéndose la cianohidrina de uridina protegida (3c), utilizada para la obtención de un derivado del compuesto 4b.



Esquema 24. Síntesis del acetato del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina.

Una vez obtenido el compuesto (3c), se adicionó un exceso de H₂O₂ al 30%, se monitoreó por CCF e IR hasta determinar que la reacción se ha completado para obtener el compuesto (4c) el acetato de 1-[2',3'-O-isopropiliden(α -L-talo y β -D-alo)furanosiluronamida]uracilo (**Esquema 25**).¹¹⁵



Esquema 25. Síntesis química para la obtención del acetato de 1-[2',3'-O-isopropiliden(α-L-talo y β-D-alo)furanosiluronamida]uracilo

6.4. Síntesis Biocatalítica

6.4.1. Preparación de la solución amortiguadora de KCN/citratos

6.4.1.1. Preparación de la solución amortiguadora de KCN/citratos 1N pH 5 y pH 4

Se pesaron 6.512 g de KCN, se disolvieron en 60 mL de agua destilada, ajustando el pH a 5.0 ó 4.0 ± 0.05 con ácido cítrico, la solución se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y llevando a volumen con agua. 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.

6.4.1.2. Preparación de la solución amortiguadora de KCN/citratos 1.5 N pH 5

Se pesaron 9.512 g de KCN, se disolvieron en 60 mL de agua destilada, ajustando el pH a 5.0 ± 0.05 con ácido cítrico, la solución se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y llevando a volumen con agua. 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 cianuro.

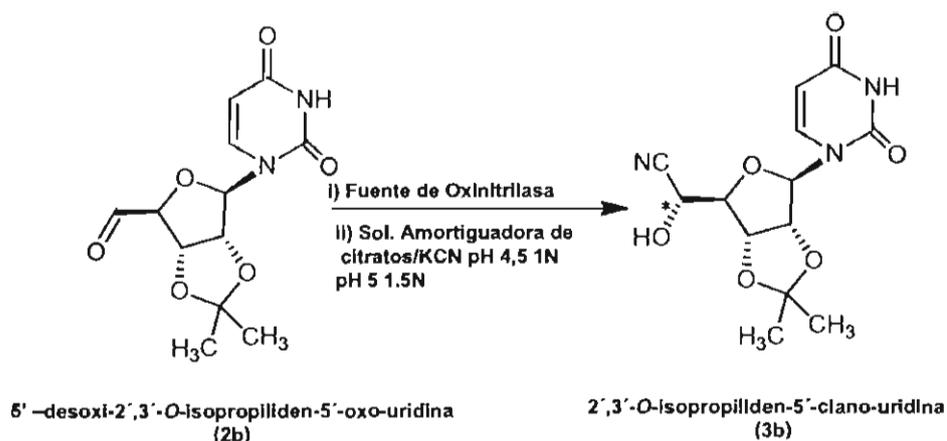
6.4.2. Preparación del biocatalizador

Se seleccionaron fuentes vegetales ricas en oxinitrilasas como son los géneros *Prunus*, *Annona* y *Pouteria*, en los que podemos encontrar en las semillas de: almendra, ciruela, capulín, cereza, durazno, guanábana y mamey.^{41,121,122}

Se prepararon las harinas desengrasadas (povos acetónidos) utilizando los huesos de cada uno de los frutos, estos se lavaron perfectamente y se eliminó el endocarpio en frutos con coraza dura, se remojó en agua para retirar el tegumento que recubren el endospermo, el cual se muele (licuadora) con acetona decantando el líquido y este proceso se realiza tres veces. El sólido se filtró para eliminar la acetona, se extendió en un recipiente para facilitar el secado a temperatura ambiente. Posteriormente se tamizó para homogenizar el tamaño de partícula y obtener un polvo fino y uniforme. Se colocó el polvo en frascos ámbar y en refrigeración a 4°C.¹²³

6.4.3. Obtención del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina por biocatálisis

Se utilizó como fuente de HCN la solución amortiguadora de KCN/citratos 1N, pH 5 y pH 4 (0.50 mL), el HCN se extrajo con éter diisopropílico (2 x 1.5 mL), se colectó la fracción orgánica y se adicionaron 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 oxinitrilasa en relación 1:1 sustrato:biocatalizador, la reacción se agitó con agitación magnética durante 10 minutos a temperaturas de 5, 10, 20 o 30°C; transcurrido el tiempo, se adicionó el 2',3'-O-isopropilideninosin-5'-aldehído (**2b**) (1 mmol)¹¹⁷ y se mantuvo con agitación a temperatura constante de 5, 10, 20 o 30°C, ver **esquema 26**. La reacción biocatalítica se monitoreó por CCF e IR, después del término de la reacción se agregó una mínima cantidad de agua para eliminar el HCN y se extrajo con AcOEt (3 x 4 mL), se lavó con solución saturada de cloruro de sodio, se filtró y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se destiló a presión reducida, el producto se analizó por CLAR y RMN para determinar los excesos diastereoisoméricos (%*ed*).



Esquema 26. Obtención por biocatálisis del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina.

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

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

6.5.1. Caracterización por UV-Visible

Se realizó un barrido de las materias primas en el espectrofotómetro de UV-Visible de 200-800 nm, para este análisis se pesaron 5 mg del compuesto (**1a**, **1b**, **2a** y **2b**) se disolvieron en 2 mL de metanol, con la finalidad de obtener la máxima longitud de onda a la que absorbe cada uno de los productos analizados.

6.5.2. Caracterización por Infrarrojo

El análisis se realizó en un espectrofotómetro de infrarrojo (IR) Perkin-Elmer Spectrum BX, FT-IR System, se analizó cada uno de los reactivos y productos de reacción. En los espectros de infrarrojo se registraron los máximos de absorción en cm^{-1} .

La técnica de análisis consiste en disolver algunos cristales en cloroformo (CHCl_3) y esta mezcla se aplicó sobre la celda con ATR, formando una ligera película, al finalizar el análisis las muestras se recuperaron.

6.6. Caracterización y Cuantificación del % exceso diastereoisomérico y % de conversión por Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C se realizaron en un equipo de RMN, Varian de 400 MHz. La mayoría de los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente en CHCl_3 deuterado como disolvente, para la caracterización del compuesto (**4b**) se llevó a cabo el experimento a 30°C en DMSO deuterado como disolvente. Los desplazamientos químicos se describen en la escala δ (en ppm) tomando como referencia la señal del disolvente empleado o, en su defecto, la señal del tetrametilsilano (TMS).

En los espectros de ^1H se indica la multiplicidad, el valor de las constantes de acoplamiento (J , en Hz), el número de protones correspondientes a cada señal y la asignación de las señales más significativas.

Esta técnica además de ser fundamental en la caracterización de cada uno de los compuestos sintetizados, se utilizó para: 1) la cuantificación de los % de exceso diastereoisomérico ($\%ed$), utilizando las áreas bajo la curva (ABC) de 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 de la síntesis química y biocatalítica, empleando el área bajo la curva de la señal característica al aldehído y las áreas bajo la curva de las señales utilizadas para determinar el $\%ed$, esta información la proporciona el equipo integrando únicamente las señales de interés o se puede utilizar la siguiente fórmula.

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

6.7. Desarrollo de métodos analíticos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

El análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizaron en dos cromatógrafos Agilent serie 1050 y 1100, para obtener las mejores condiciones de

separación y cuantificación de cada uno de los diastereoisómeros de la uridina. Utilizando columnas con fase estacionaria C8 y columnas quirales.

6.7.1. Desarrollo del método analítico para la cuantificación e identificación por CLAR Fase Reversa

Se pesaron 5 mg del compuesto y se disolvieron en 2 mL de metanol, se filtraron las muestras por membrana de nailon de 0.20 μm y se colocaron en viales CLAR.

La determinación se realizó en un equipo Agilent 1050, se utilizó una columna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 de 150 mm de largo x 4.6 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula de la fase estacionaria (*n*-octadecilsilano), se probaron diferentes variables: la polaridad de la fase móvil dependiendo del compuesto, la velocidad de flujo de la fase móvil, la temperatura fue de 25°C, el volumen de inyección fue de 2, 5, 10 μL , se realizó un barrido alrededor de la longitud de onda máxima determinada para algunos derivados de nucleósidos, utilizando las siguientes longitudes de onda λ : 220, 240, 254, 260, 280 nm. Las variables se modificaron con base al **esquema 27**.¹²⁴

128

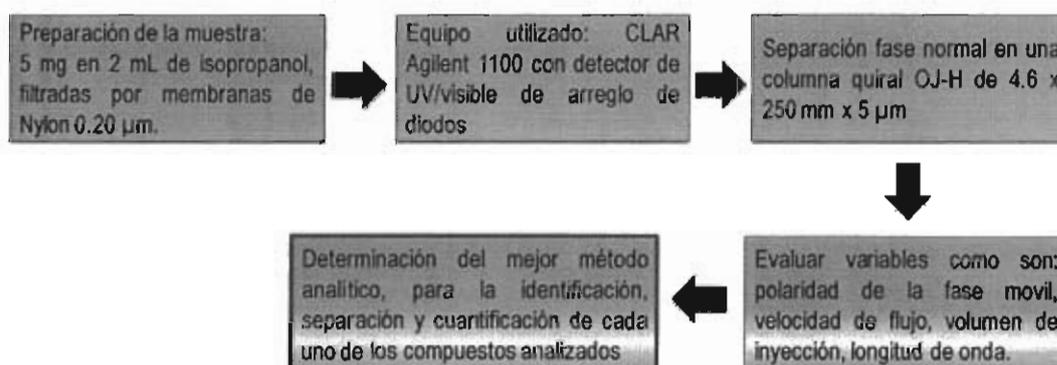


Esquema 27. Diagrama de flujo para la determinación del método por CLAR en fase reversa.

6.7.2. Desarrollo del método analítico para la cuantificación e identificación por CLAR Fase Normal

Se pesaron 5 mg del compuesto y se disolvieron en 2 mL de isopropanol, se filtraron las muestras por membrana de nailon de 0.20 μm y colocaron en viales CLAR.

La determinación se realizó en un equipo Agilent 1100, la separación de la muestra se realizó en una columna quiral Chiracel OJ-H de 250 mm de largo 4.6 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula de celulosa tris (4-metilbenzoato) recubierta por 5 μm de silica gel de fase estacionaria, se probaron diferentes variables: la polaridad de la fase móvil dependiendo el compuesto, la velocidad de flujo de la fase móvil, la temperatura fue de 25°C y 28°C, el volumen de inyección fue de 5, 10 μL y la longitud de onda realizándose un barrido de λ : 220, 240, 254, 260, 280 nm. Las variables se modificaron con base al **esquema 28**.¹²⁹⁻¹³¹



Esquema 28. Diagrama de flujo para la determinación del método por CLAR en fase normal.

6.7.2.1. Método Analítico para la cuantificación de los %ed de los compuestos obtenidos por síntesis química y biocatalítica

Se utilizó una columna quiral Chiracel OJ-H con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min., utilizando una polaridad de la fase móvil 80:20 *n*-hexano:isopropanol, a una temperatura de 28°C y un volumen de inyección de 10 μL , $\lambda = 260$ nm.

Una vez separados e identificados los diastereoisómeros de la molécula, se cuantificaron los % ed, utilizando el área bajo la curva de los picos de interés.

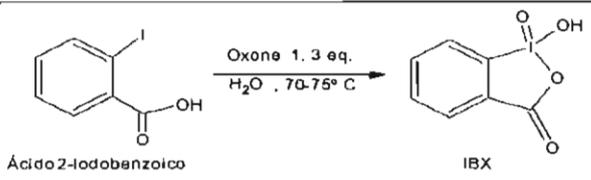
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Análisis de resultados del compuesto IBX

7.1.1. Síntesis del reactivo IBX

Se realizaron 14 lotes de IBX (2a), el cual se empleó para realizar la oxidación del compuesto 2',3'-O-isopropilidenuridina (1b). La reacción se siguió por CCF empleando como mezcla de disolventes 90:10 CHCl₃/MeOH, la reacción se lleva a cabo en 3 hrs. Los lotes con mejores rendimientos obtenidos y su punto de descomposición del polvo blanco (presenta un cambio de coloración roja) se presentan en la **tabla 7**.

Tabla 7. Rendimientos de reacción del compuesto IBX (2a).

			
IBX			
	Gramos (g)	Rendimiento (%)	Temperatura de descomposición (°C)
Reportada	—	79-81 %	233° C
Lote 1	2.12	77 %	230°C
Lote 2	2.25	79 %	---
Lote 3	1.97	65 %	225°C
Lote 4	2.26	80 %	230°C
Lote 5	1.27	45 %	228-234°C
Lote 6	2.82	100 %	232°C
Lote 7	1.25	44 %	---
Lote 8	2.25	39 %	---
Lote 9	2.59	91 %	---
Lote 10	13.40	79 %	225°C
Lote 11	12.99	76 %	---
Lote 12	15.12	89 %	227°C
Lote 13	15.86	93 %	---
Lote 14	4.70	83 %	227°C

7.1.2. Caracterización por IR del compuesto IBX (2a)

En la **figura 16**, se muestra el espectro para el lote 11, se observa la banda correspondiente a la vibración por estiramiento de C-H correspondientes a hibridación sp^2 en 2922 y 2852 cm^{-1} respectivamente, dos bandas muy intensas del carbonilo en 1739 y 1709 cm^{-1} , que corresponden a la estructura del IBX sintetizado.

Por otra parte se observa una inflexión en 3310 cm^{-1} , correspondiente a la vibración por estiramiento del enlace OH de la molécula.

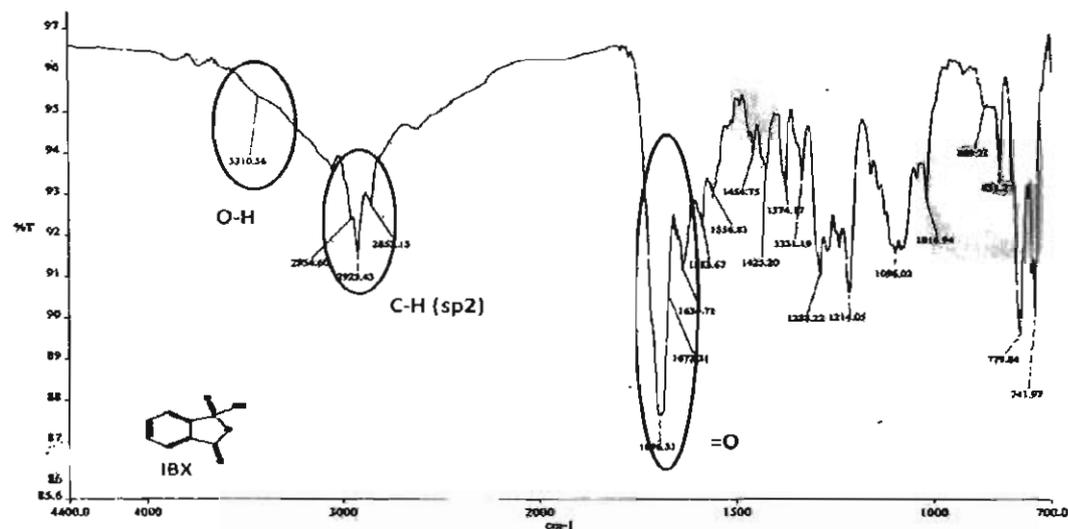


Figura 16. Espectro de IR para el compuesto (2a).

7.1.3. Caracterización por UV-Visible

Esta técnica espectrofotométrica permitió identificar la mayor longitud de onda de absorción del IBX, utilizando como disolvente DMSO, ver **figura 17**, en el espectro se observa la absorción a 216 nm .

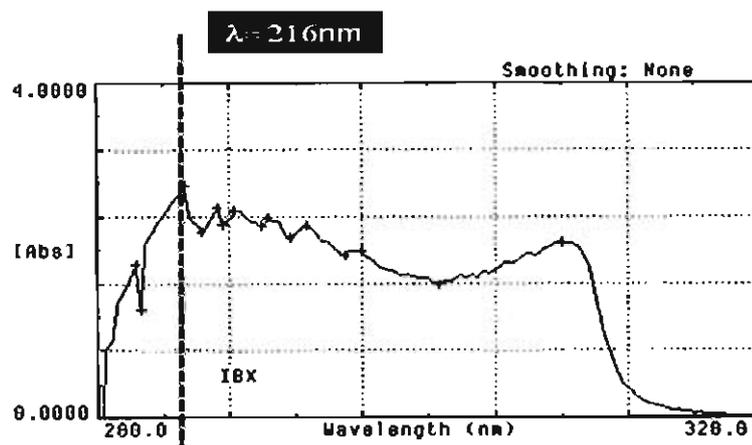


Figura 17. Espectro UV-Visible para IBX.

7.1.4. Caracterización por RMN para el compuesto (2a)

El análisis de RMN para el reactivo IBX se realizó en DMSO, en la **tabla 8** se muestra el desplazamiento químico en la que aparece cada carbono, comparando los valores experimentales con los calculados por el programa ACD/Labs CNMR HNMR Predictor versión 5.11.

Tabla 8. Desplazamiento químico para RMN ^{13}C para el compuesto IBX (2a) lote 11.

No de Carbono	CHn	Lote 5 (ppm)	Predictor (ppm)
3	C	111.4	109.2
4	C	132.1	127.1
5	C	167.9	162.6
6	CH	124.6	125.7
7	CH	133.9	135.3
8	CH	130.7	126.8
9	CH	133.5	127.3

En la **figura 18** se muestra el espectro RMN ^1H (400.10 MHz). Se observa dos tripletes dobleteados en 7.7 y 7.8 ppm que corresponde a la resonancia del protón

del C7 y del C8 respectivamente y en la literatura se reportan tripletes en 7.7 ppm, los cuales se muestran en la **figura 18**, se puede observar la presencia de algunas impurezas con señales en desplazamientos químicos de 7.3 y 7.5 ppm que corresponden a los acoplamientos de la materia prima utilizada en la síntesis (ácido 2-iodobenzoico) para la formación del IBX, aunque se debe mencionar que estas señales son de baja intensidad.

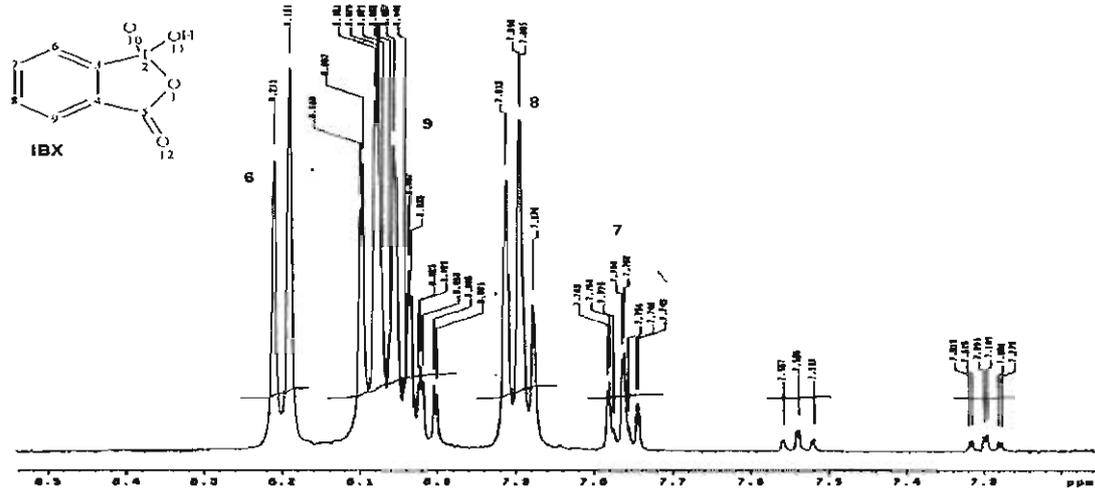


Figura 18. Espectro de RMN ^1H para IBX.

En la **figura 19** se muestra el espectro de RMN para carbono, ^{13}C (100 MHz) en donde se muestran todas las señales de carbono y sus desplazamientos químicos que corresponden a lo esperado, la intensidad de las señales es baja y se debe a la poca solubilidad del compuesto.

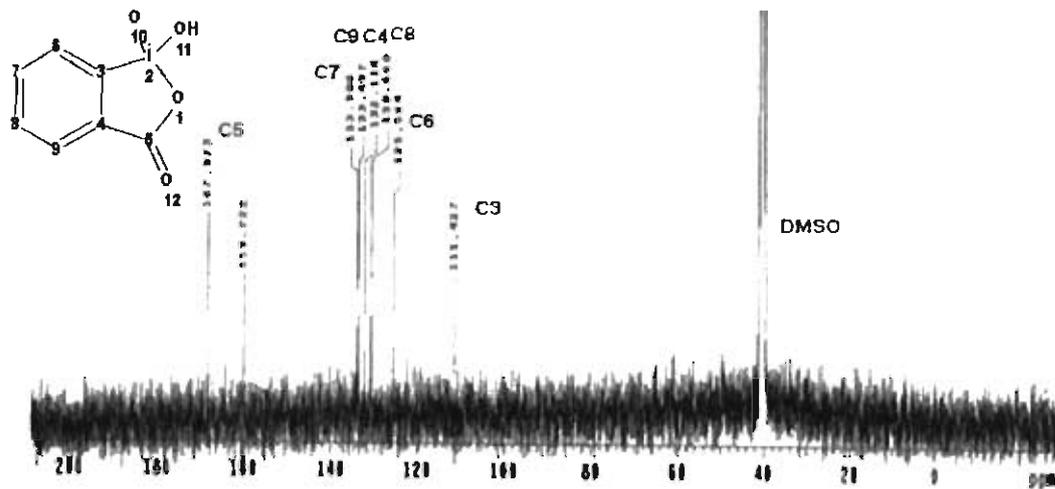


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C para IBX.

7.1.5. Análisis de IBX por CLAR en fase reversa

Al ser un reactivo sintetizado en el laboratorio y con la finalidad de identificar el tiempo de retención del IBX y de las materias primas empleadas en su obtención, se desarrolló el método analítico cualitativo por CLAR en fase reversa, con una columna XDB C8 de 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m, a 25°C, con volumen de inyección de 5 μ L, modificando la velocidad del flujo y utilizando como fase móvil CH₃CN:MeOH con modificaciones en la polaridad como se observa en la **tabla 9**.

Tabla 9. Condiciones CLAR fase reversa para el IBX.

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

El mejor método para la identificación del IBX fue el método C en la λ de 280 nm, debido al parecido estructural de la materia prima y algunos derivados en la reacción química, se observa un pico ancho no definido, en λ de 220 nm que es la máxima λ en la que absorbe el compuesto IBX no se logró resolver todas las probables impurezas y/o reactivos utilizados en la síntesis del IBX, que posiblemente no absorban en λ de 280 nm y se obtienen picos traslapados observar **figura 20**, por lo tanto los métodos no tienen especificidad, por lo cual se decidió utilizar fase normal con columnas quirales.

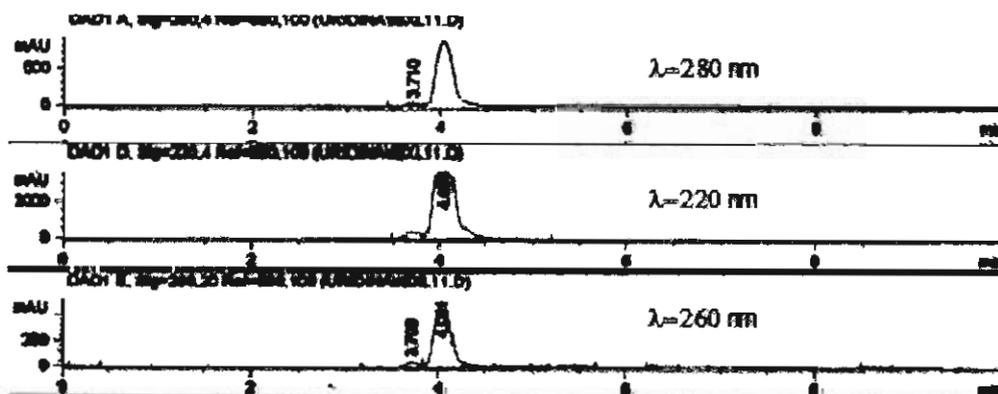


Figura 20. Cromatograma del IBX, columna XDB C8, flujo 0.4 mL/min, λ = 220, 260 y 280 nm, T= 25°C, CH₃CN:MeOH (99:1).

7.1.6. Análisis de IBX por CLAR en fase normal

El análisis de CLAR en fase normal, para la separación del IBX y sus materias primas se utilizó como fase móvil *n*-hexano: isopropanol a diferentes velocidades de flujo con una columna quiral OJ-H. En la **tabla 10**, se muestran las condiciones desarrolladas.

Tabla 10. Condiciones para el IBX y las materias primas por CLAR fase normal

Método	Columna	Fase móvil	Vol. Inyección	Flujo mL/min	λ (nm)	Temperatura
A	OJ-H	<i>n</i> -hexano:isopropanol (80:20)	10 μ l	0.8	220 240 254	28°C
B	OJ-H	<i>n</i> -hexano:isopropanol (80:20)	10 μ l	1.0	260 280	28°C

Con ambos métodos se obtiene una buena separación del IBX y sus materias primas, facilitando la identificación y cuantificación por áreas, por lo que ambos métodos son específicos, los t_R se muestran en la **tabla 11**, además existen trazas de las materias primas: el ácido 2-iodobenzoico y Oxone. Se corrobora que en la λ 280 nm no absorbe el ácido 2-iodobenzoico tal como se había discutido en los métodos realizados para CLAR fase reversa, se descartó la λ 220 nm, por que a esta longitud todos los compuestos absorben dificultando la integración.

Tabla 11. Resultados con el método A y B para IBX y sus materias primas

	Producto	t_R min	λ 254 %	λ 260 %	λ 280 %
Método A	IBX	10.37	75.00	76.06	80.00
	Ácido 2-iodobenzoico	13.97	4.00	2.56	-
	Oxone®	15.15	20.00	21.36	20.00
Método B	IBX	9.45	79.01	91.15	91.60
	Ácido 2-iodobenzoico	12.27	11.38	-	-
	Oxone®	13.19	9.59	8.85	8.40

En la **figura 21**, se observa el cromatograma para el IBX lote 13, este lote se lavó con CH₃CN en caliente y en frío para eliminar la mayor cantidad de las materias primas que no reaccionaron. Con este método se logra caracterizar el reactivo IBX y sus componentes presentes al final de la reacción.

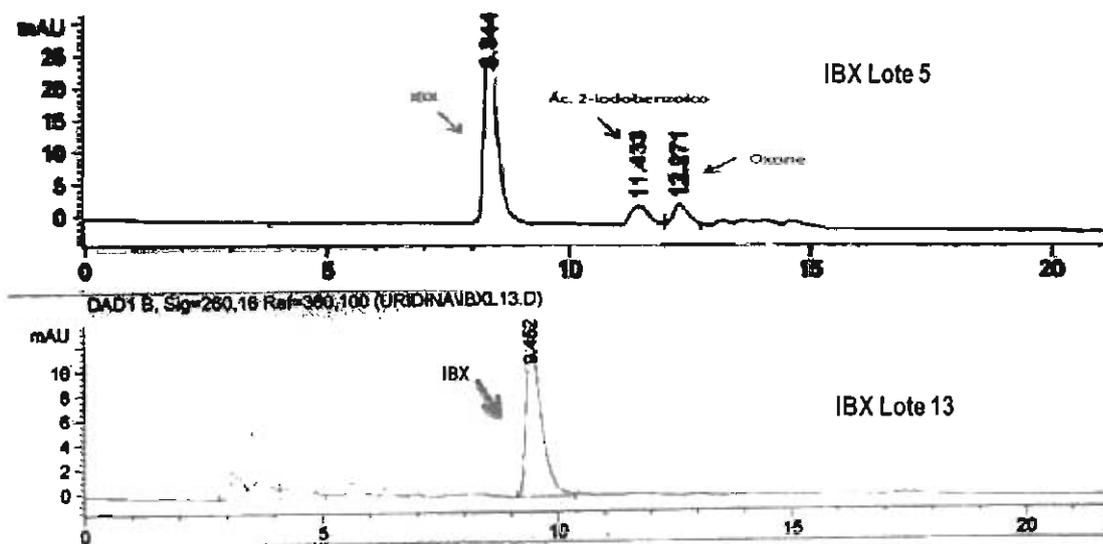


Figura 21. Cromatograma de IBX, columna OJ-H, flujo 1.0 mL/min, $\lambda = 260$ nm, $T = 28^\circ\text{C}$, *n*-hexano:isopropanol (80:20).

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

La materia prima 2',3'-O-isopropilidenuridina (1b) fue caracterizada por IR, UV y RMN con la finalidad de analizar y compararla con los derivados de los nucleósidos obtenidos (2b, 3b y 4b), al término de cada reacción.

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

El espectro de IR, figura 22, muestra dos bandas en 1693 y 1675 cm^{-1} características a las vibraciones por estiramiento a los grupos carbonilos, además se observan dos banda de poca intensidad que podría corresponder a la vibración por estiramiento de los grupos O-H y N-H en 3418 y 3210 cm^{-1} , aunque la bandas de los alcoholes son intensas y muy anchas esta podría ser pequeña por la interacción de este grupo funcional con los grupos vecinos; se identifican las vibraciones por estiramiento de C-N para compuestos aromáticos en 1490, 1420 y 1382 cm^{-1} y vibraciones por estiramiento de C-O que van desde 1280 hasta 1076 cm^{-1} dependiendo de la interacción y el tipo de compuesto.

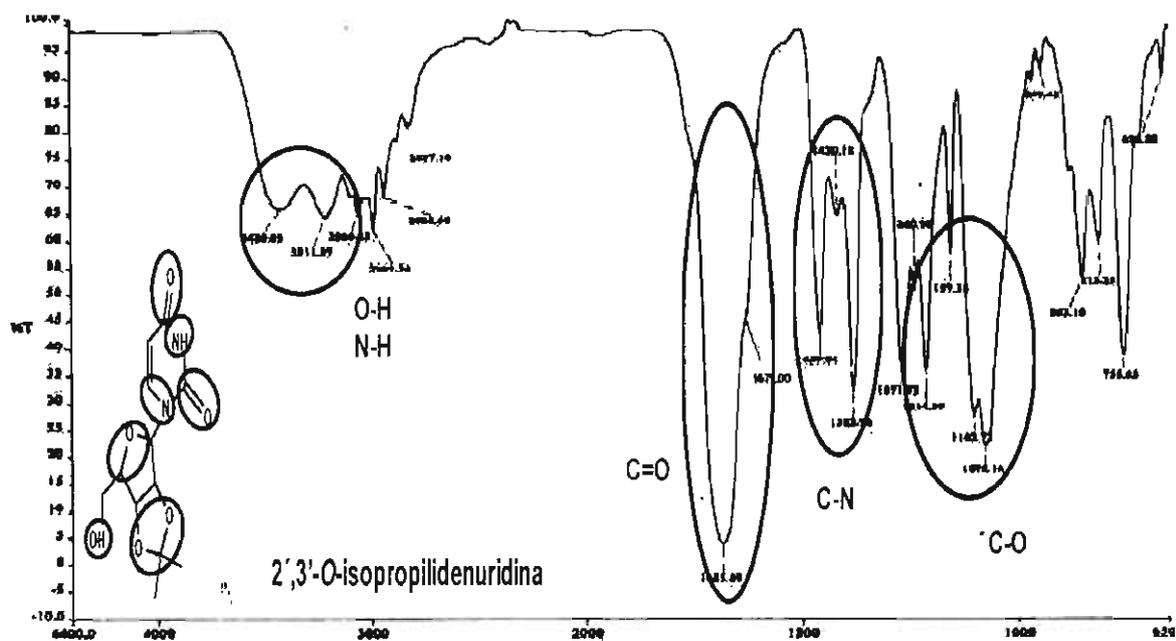


Figura 22. Espectro de infrarrojo para el 2',3'-O-isopropilidenuridina.

7.2.2. Caracterización por UV-Visible de 2',3'-O-isopropilidenuridina (1b)

Se pesaron 5 mg de 2',3'-O-isopropilidenuridina y se disolvieron en 2 mL de acetonitrilo, este disolvente se utilizó para calibrar el equipo, obteniendo una longitud máxima de 221 nm como se muestra en la figura 23.

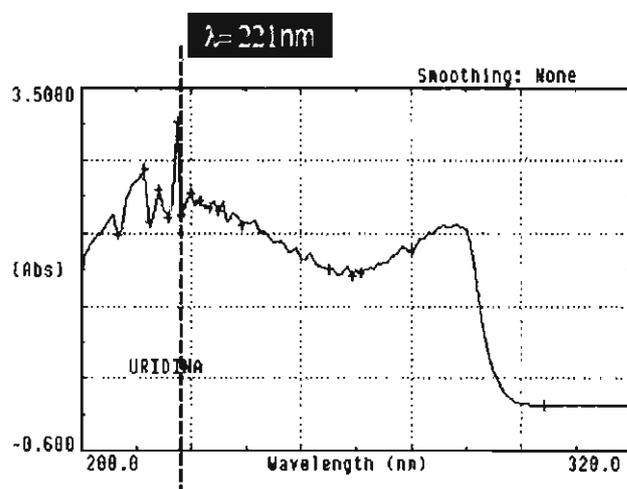


Figura 23. Espectro de UV-visible para el 2',3'-O-isopropilidenuridina.

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

Para el análisis de RMN el compuesto 2',3'-O-isopropilidenuridina se disolvió en CDCl_3 , en la **tabla 12**, se puede observar los desplazamientos químicos en los que aparece cada carbono, se compararon los valores experimentales con los calculados por el programa ACD/Labs CNMR HNMR Predictor versión 5.11.

Tabla 12. Desplazamiento químico de RMN ^{13}C para el compuesto (1b)

No. De Carbono	CHn	Desplazamiento químico (δ) (ppm)	Predictor (ppm)
2	C	113.3	112.9
4	CH	84.1	83.8
5	CH	92.1	91.2
7	CH	86.3	86.6
8	CH	80.2	80.6
9	CH_3	27.1	27.0
10	CH_3	25.2	25.2
12	C	150.2	150.4
14	C	163.3	163.2
15	CH	101.9	101.8
16	CH	141.1	141.9
17	CH_2	61.7	61.3

En la **figura 24** se muestra el espectro de RMN ^{13}C (100 MHz). Los valores obtenidos presentan un ligero desplazamiento, pero corresponde a lo esperado para esta estructura.

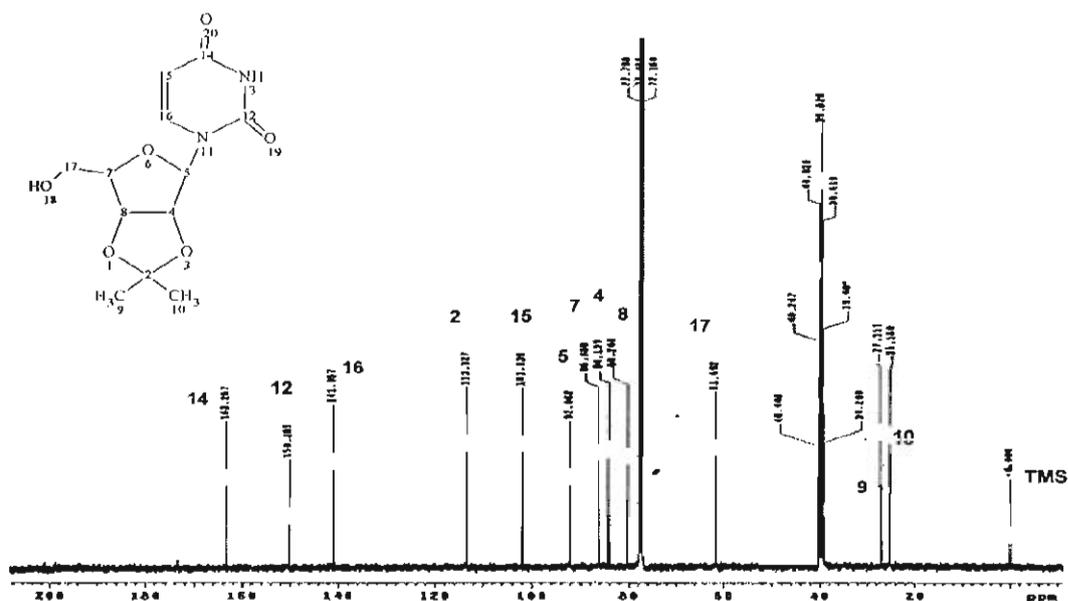


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C para 2',3'-O-isopropilidenuridina.

En la figura 25 se muestra el espectro RMN ^1H (400 MHz), en donde se identificaron las señales correspondientes a cada protón.

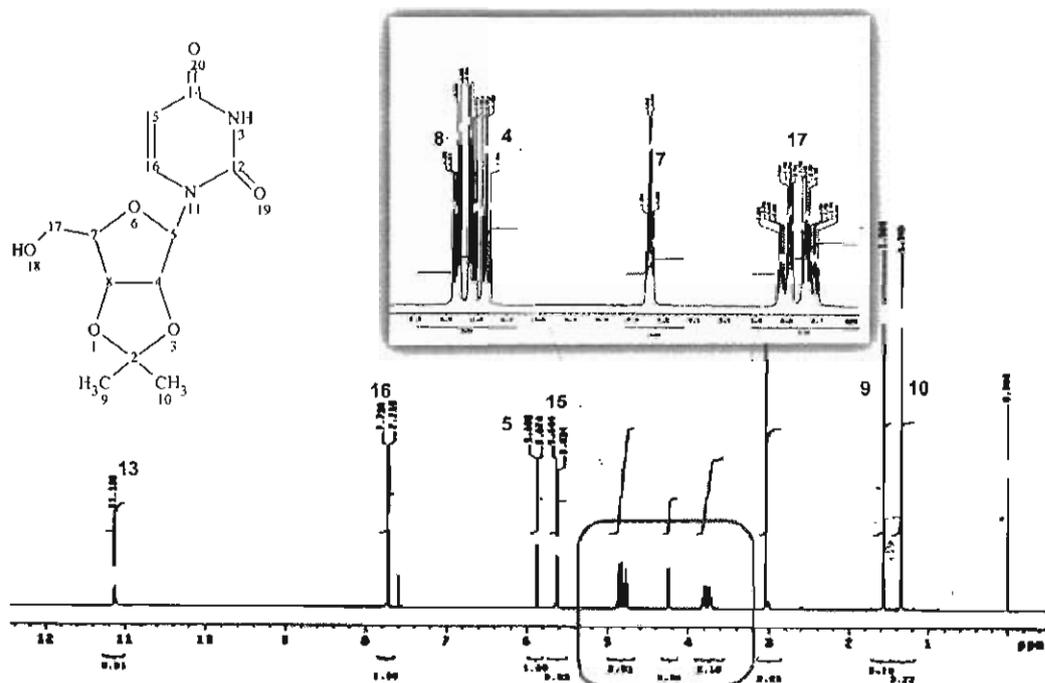


Figura 25. Espectro de RMN ^1H para 2',3'-O-isopropilidenuridina

RMN ^1H (CDCl_3): δ 1.34(s 3H), 1.56(s 3H), 3.80 (m 2H), 4.28 (m 1H), 4.77 (t 1H), 4.82(dd, 1H), 4.87 (dd, 1H), 5.62 (d, 1H) / 5.64 (d, 1H), 7.71 (d 1H), 11.13 (s, 1H) ppm

Se logró identificar las señales características por RMN ^{13}C y el ^1H para la materia prima (**1b**), este análisis fue de gran utilidad para la caracterización del aldehído sintetizado (**2b**) y los otros derivados (**3b** y **4b**).

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

Para la obtención del aldehído (**2b**) se realizaron 14 lotes con la técnica A utilizando como oxidante al reactivo IBX a partir de la materia prima 2',3'-O-isopropilidenuridina para la obtención del 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (**2b**). La reacción se siguió durante 4 hrs, al realizar la caracterización de los tres primeros lotes se observó presencia del alcohol (**1b**), obteniéndose un bajo % de conversión. Por lo que se realizaron modificaciones a la técnica: las primeras reacciones se hicieron en acetonitrilo (CH_3CN), con base en la bibliografía consultada,¹¹³ modificando el volumen del disolvente al doble en la reacción, en la extracción y en la técnica de filtración obteniéndose con estas modificaciones un rendimiento de 98.69 %, en la **tabla 13** se muestran las modificaciones y los resultados obtenidos para la síntesis del aldehído de uridina. La relación alcohol (**1b**): IBX fue de 1:3 eq.

Tabla 13. Modificaciones a las condiciones de reacción para obtener el 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (**2b**).

Prueba	Tiempo de reacción (horas)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Extracción	No. de lavados (CH_3CN)	Rendimientos (%)
A	1 ½	75-80	CH_3CN (25 $^{\circ}\text{C}$)	3	40
B	2	79-80	CH_3CN (25 $^{\circ}\text{C}$)	4	30
C	3	80-82	CH_3CN (25 $^{\circ}\text{C}$)	6	89
D	4-6	80-82	CH_3CN^*	6	99

* Disuelto en caliente y filtrado en frío

Las mejores condiciones de reacción se obtuvieron con la prueba D, manteniendo la temperatura por arriba de los 80 $^{\circ}\text{C}$, usando como disolvente acetonitrilo con filtración en frío, tratando de evitar el arrastre de IBX o impurezas del mismo ya que la solubilidad de este disminuye en frío, lo que ayudó a mejorar la pureza del aldehído (**2b**), además se aumentó el número de lavados con acetonitrilo y el uso de una mejor técnica para el seguimiento de la reacción como fue la espectroscopía por IR,

colaboró a aumentar el % de conversión. En la **tabla 14** se muestran los rendimientos y condiciones de reacción para cada lote sintetizado.

Tabla 14. Condiciones de reacción para obtener el compuesto (**2b**)

Lote	Compuesto 1 (mg)	IBX (mg)	Tiempo de reacción (horas)	Temperatura (° C)	Rendimientos (%)
1	100.50 ^A	295.48	1 ½	75-80	40
2	93.68 ^A	295.46	1 ½	78-80	—*
3	50.23 ^B	147.73	2	79-80	30
4	50.15 ^B	147.73	2	80-82	44
5	50.32 ^B	147.73	2	80-82	47
6	100.06 ^C	295.46	3	80-82	89
7	50.89 ^D	147.73	3	80-82	89
8	300.08 ^D	886.40	3 ½	80-82	90
9	500.32 ^D	1477.31	4	80-82	92
10	500.67 ^D	1437.31	4	80-82	93
11	1002.78 ^D	2954.60	6	80-82	95
12	1000.23 ^D	2954.60	6	80-82	99
13	1000.45 ^D	2954.60	6	80-82	89
14	1000.09 ^D	2954.60	6	80-82	93

^{A, B, C, D} Modificación realizada, observar **Tabla 14**, * Se continuo la reacción.

Las reacciones de oxidación se siguieron por CCF e IR y la fase móvil adecuada para eluir los compuestos fue AcOEt. La elución por CCF se realizó por triplicado, para observar una buena separación, los reveladores utilizados fueron cámara de yodo, lámpara UV y solución de anisaldehído para revelar los componentes debido a la difícil identificación del aldehído (**2b**) por CCF, ya que los R_f de la materia prima y el aldehído son muy similares, por lo cual para el seguimiento de la reacción y una mejor identificación del término de la misma, se apoyó en la espectroscopía por IR, lo que permitió una mayor eficacia en el seguimiento de la reacción y por lo tanto incrementar el rendimiento.

Se probó la técnica B utilizando el CrO₃ como oxidante con la finalidad de mejorar el rendimiento y la pureza del compuesto (**2b**), el compuesto se purificó por columna obteniendo un rendimiento de 45%, pero de difícil identificación ya que por RMN tiene

demasiadas señales difícil de asignar y al ser una técnica con residuos peligrosos al ambiente se descartó.

Una vez obtenido el aldehído 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (**2b**) se prosiguió con su caracterización e identificación, implementando las técnicas de IR, UV y RMN.

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

En la **figura 26** se muestra el espectro de IR del compuesto (**2b**), en donde se observa la aparición de una tercera banda en 1676, 1621 y 1565 cm^{-1} , características a las vibraciones por estiramiento de los grupos carbonilos que corresponde al carbonilo formado en la reacción, además se observa la desaparición de la banda que correspondía a la vibración por estiramiento del grupo O-H en 3419 cm^{-1} (ver **Figura 22**) permaneciendo únicamente la banda que corresponde a la vibración por estiramiento del N-H en 3202 cm^{-1} , también se pueden identificar las bandas correspondientes a las vibraciones por estiramiento de C-N y a las de estiramiento de C-O en la zona de la huella digital de la molécula.

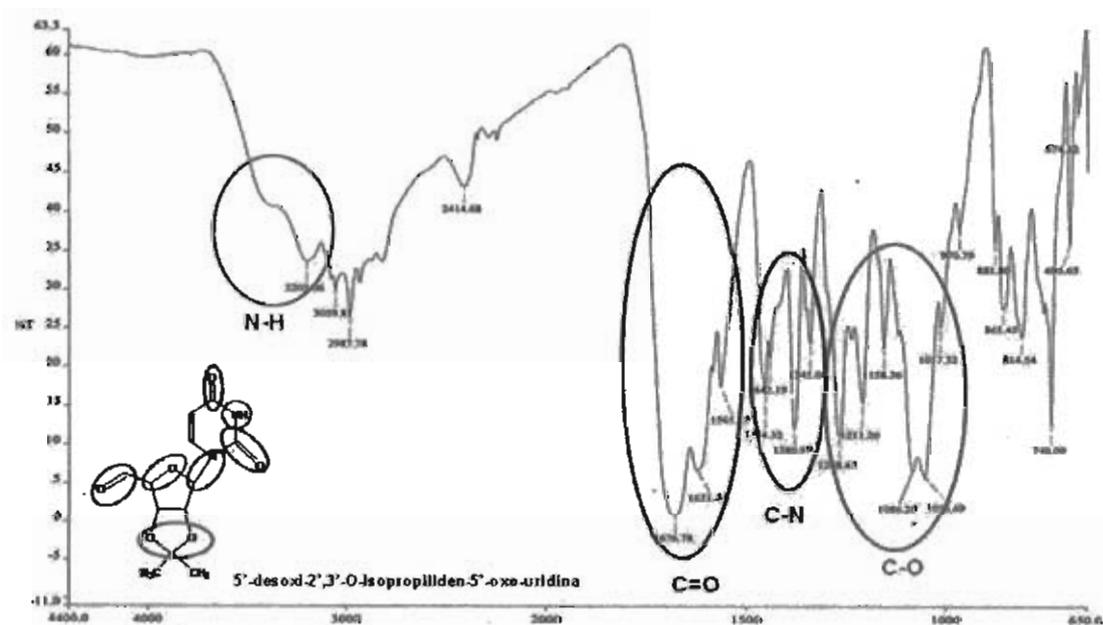


Figura 26. Espectro de Infrarrojo para el compuesto (**2b**), lote 7.

7.3.2. Caracterización por UV-Visible de 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (2b)

Se pesaron 5 mg del compuesto (2b) y se disolvieron en 2 mL de acetonitrilo, este disolvente se utilizó para calibrar el equipo, obteniendo una longitud máxima de 224 nm, como se muestra en la figura 27.

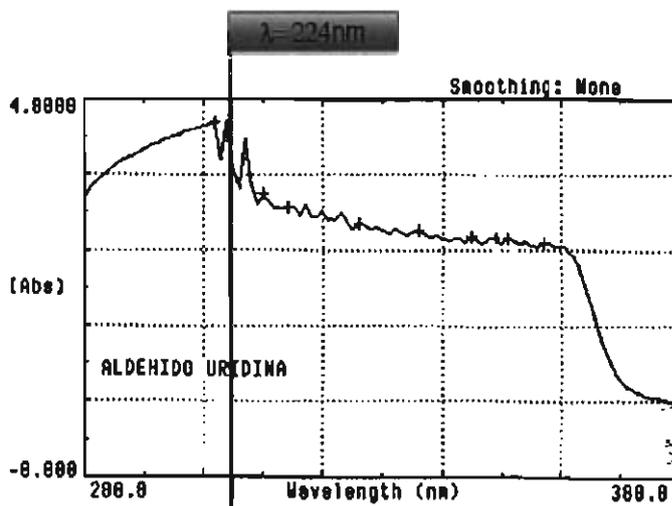


Figura 27. Espectro de UV-visible para el compuesto 2b.

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

Para el análisis de RMN, el compuesto (2b) se disolvió en CDCl_3 , en la tabla 15, se pueden observar los desplazamientos químicos en los que aparece cada carbono y se compararon los valores experimentales con los calculados por el programa ACD/Labs CNMR y HNMR Predictor versión 5.11. En la figura 28 se muestran el espectro de RMN^{13}C (100 MHz) del lote 7 en donde, se observa la presencia del carbono correspondiente al carbonilo del aldehído en 199.1 ppm siendo la señal más característica.

Tabla 15. Desplazamiento químico de RMN ¹³C para el compuesto (2b) lote 7.

No. de Carbono	CHn	Desplazamiento químico (δ) (ppm)	Predictor (ppm)
2	C	113.7	113.8
4	CH	83.7	75.3
5	CH	84.9	84.3
6	CH	100.3	88.8
8	CH	94.1	85.8
9	CH ₃	26.4	26.6
10	CH ₃	24.8	24.9
12	C	150.3	150.7
14	C	162.5	163.6
15	CH	102.9	102.9
16	CH	143.9	144.3
17	CH	199.1	199.3

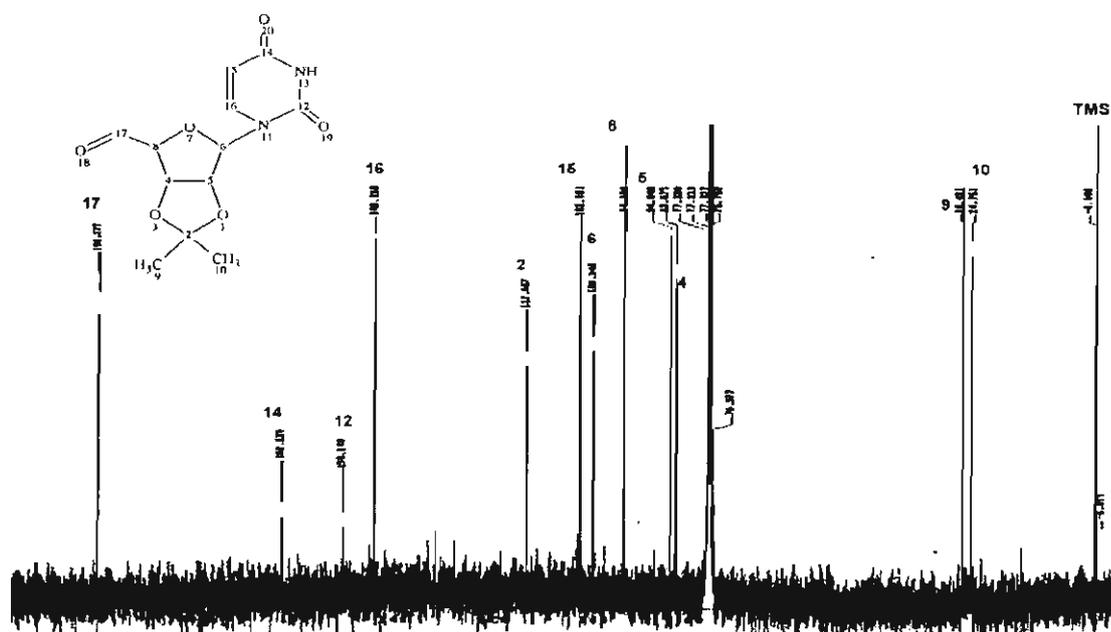


Figura 28. Espectro de RMN ¹³C para el compuesto (2b), lote 7.

La asignación en la **figura 28** y la asignación realizada en la **tabla 15** nos permite concluir que se obtuvo el compuesto esperado, sin embargo los valores obtenidos presentan un ligero desplazamiento en la zona donde aparece la señal del disolvente (CDCl_3), razón por la cual los desplazamientos químicos de la molécula que aparecen en esta zona se recorren, pero corresponde al compuesto, lo que corrobora su identificación y caracterización. También se puede observar que no hay presencia de materia prima lo que confirma que las modificaciones realizadas a la técnica para la síntesis, prueba D, es la adecuada para obtener el compuesto (**2b**) con altos rendimientos y pureza.

En la **figura 29** se muestra el espectro de RMN ^1H (400.10 MHz) del lote 7, en donde fue posible asignar los acoplamientos correspondientes a los protones presentes en la molécula.

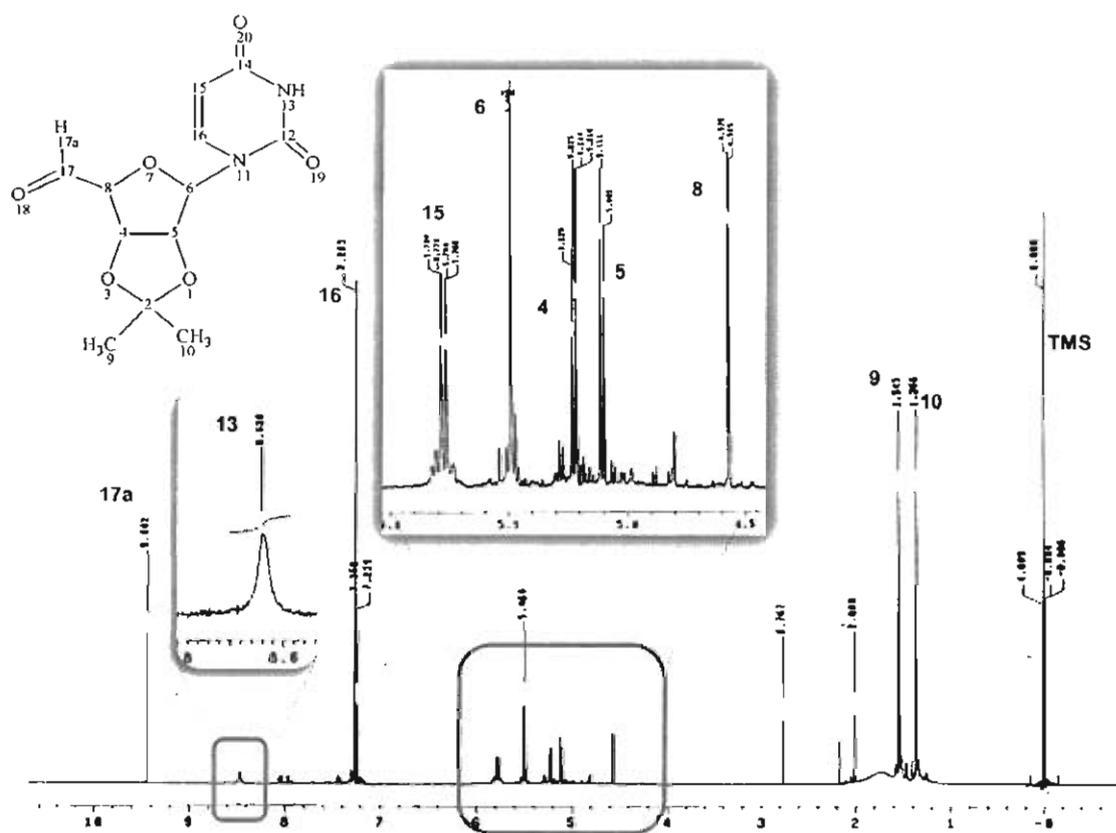


Figura 29. Espectro de RMN ^1H para el compuesto (**2b**), lote 7.

RMN $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.37(s 3H), 1.54(s 3H), 4.56 (d 1H), 5.11 (d 1H), 5.22 (dd 1H), 5.49 (s, 1H) / 5.78 (d, 1H), 7.26 (d 1H), 8.64 (s 1H), 9.44 (s, 1H) ppm.

Además del análisis de ^{13}C y ^1H se realizaron análisis de dos dimensiones COSY, gHSQC y gHMBC para corroborar dicho resultado, debido a que en los primeros lotes se encontraron las señales de IBX y del alcohol (**1b**), dando con ello un espectro de RMN más complejo y de difícil caracterización. El uso de estas técnicas ayudaron a elucidar la estructura del compuesto y a corroborar los acoplamientos presentes en la molécula.

7.4. Desarrollo del método analítico por CLAR para 2',3'-O-isopropilidenuridina (**1b**) y el 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxouridina (**2b**)

7.4.1. Desarrollo del método analítico por CLAR fase reversa para los compuestos (**1b**) y (**2b**)

Con la finalidad de identificar el alcohol (**1b**) y el aldehído (**2b**) se desarrolló el método analítico por CLAR en fase reversa, empleando la columna XDB-C8 de 150mm x 4.6 mm, 5 μm , manteniendo la temperatura de la columna a 25°C y utilizando un detector de arreglo de diodos empleando cinco diferentes longitudes de onda: 220, 240, 254, 260 y 280 nm, las modificaciones al método analítico se muestran en la **tabla 16**.

Tabla 16. Condiciones CLAR fase reversa para el compuesto (**1b**) y (**2b**)

Método	Columna	Fase móvil	Inyección μL	Flujo mL/min
A	XDB-C8	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (50:50)	5	0.8
A'1	XDB-C8	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (80:20)	5	0.8 0.4
A'2	XDB-C8	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (90:10)	5	0.4
A'3	XDB-C8	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (95:5)	5 2	0.4 0.2 0.1
A'4	XDB-C8	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (99:1)	5 2	0.4
A'5	XDB-C8	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$ (99.9:0.1)	5 2	0.4
B	XDB-C8	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}:\text{Buffer de acetatos pH 6.6}$ 94:5:1	2	0.2 0.4

El compuesto (**1b**) al ser de grado analítico con alta pureza, no presenta ninguna dificultad, observándose cambios en el tiempo de retención y en la simetría del pico, para la identificación de este compuesto se puede utilizar cualquier método; sin embargo para reducir el tiempo de retención y obtener un pico bien definido, se recomiendan los métodos A'3, A'4 y el método B con una velocidad de flujo de 0.4 mL/min y un volumen de inyección de 5 μ L; con los que se obtuvieron los mejores resultados, en la **tabla 17** se muestran los t_R para el compuesto (**1b**) para cada método y en la **figura 30** se muestra los cromatogramas correspondientes a los t_R para el compuesto (**1b**).

Tabla 17. t_R de los métodos analíticos desarrollados por CLAR fase reversa para el compuesto (**1b**).

Método	Flujo mL/min	t_R min
A	0.8	2.061
A'1	0.8	2.062
	0.4	4.205
A'2	0.4	4.180
A'3	0.4	4.15
	0.2	8.774
	0.1	18.505
A'4	0.4	3.961
A'5	0.4	4.181
B	0.4	4.175
	0.2	8.719

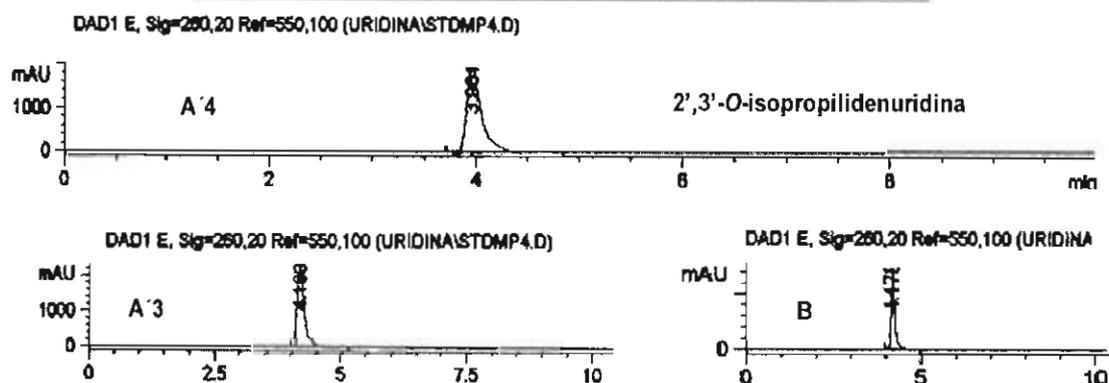


Figura 30. Cromatogramas del compuesto (**1b**), para los métodos A'4, A'3 y B (**Tabla 17**) con una velocidad de flujo 0.4 mL/min, volumen de inyección 5 μ L, λ = 260 nm.

7.4.2. Desarrollo del método analítico por CLAR fase normal para el compuesto (1b) y (2b)

Al analizar el compuesto (1b) por CLAR, utilizando la columna OJ-H, a 5 diferentes longitudes de onda: 220, 240, 254, 260 y 280 nm, con una fase móvil de 80:20 *n*-hexano: isopropanol, con flujos de: 0.8 y 1.0 mL/min; con un volumen de inyección de 5 μ L y temperatura de 28°C. En la **tabla 18** se muestran las condiciones utilizadas.

Tabla 18. Condiciones CLAR fase normal para el compuesto (1b) y (2b).

Método	Columna	Fase Móvil	Inyección μ L	Flujo mL/ min
A	OJ-H	<i>n</i> -hexano: isopropanol (50:50)	5	1.0 0.8
A'1	OJ-H	<i>n</i> -hexano: isopropanol (70:30)	5	0.8
A'2	OJ-H	<i>n</i> -hexano: isopropanol (80:20)	5	0.8
A'3	OJ-H	<i>n</i> -hexano: isopropanol (80:20)	5	1.0

En las **figuras 32** y **33** se muestran los cromatogramas para el compuesto (1b) y (2b). Se logró la mejor resolución entre (1b y 2b), empleando las condiciones del método A'3, con un tiempo de retención de 12.8 min para el compuesto (1b) y de 7.75 min para el compuesto (2b).

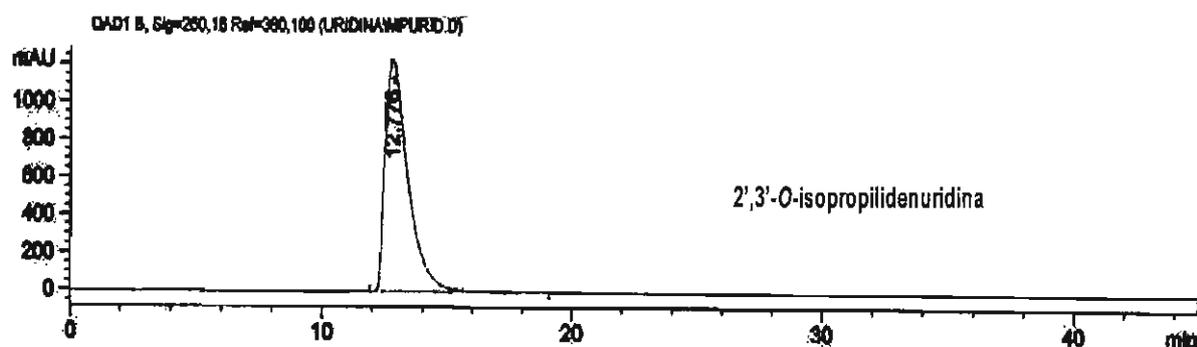


Figura 32. Cromatograma de (1b), columna OJ-H, flujo 1 mL/min, λ = 260 nm, Temperatura de la columna 28°C, *n*-hexano:isopropanol (80:20), t_R = 12.776 min.

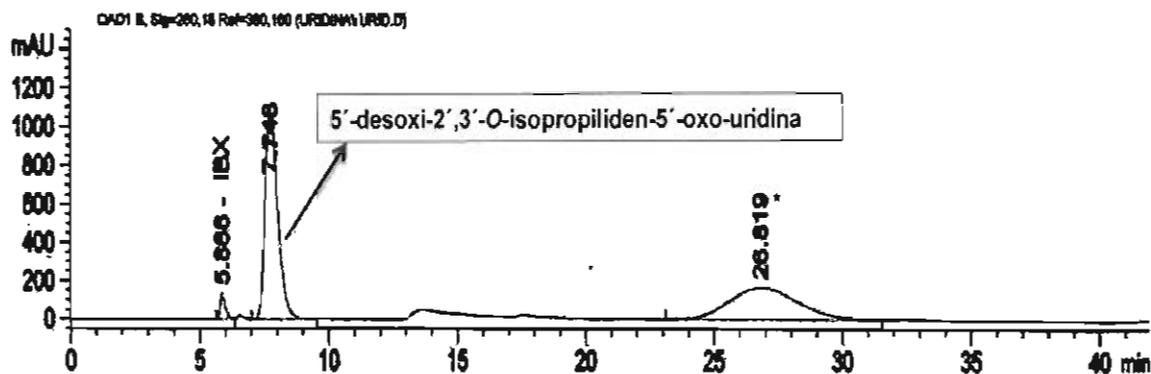


Figura 33: Cromatograma de (2b), columna OJ-H, flujo 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Temperatura de la columna 28°C, n-hexano:isopropanol (80:20), $t_R = 7.75$ min. *hidrato del compuesto (2b).

En la figura 33 se pueden observar otros picos en 5.866 min que corresponde al IBX y en 26.819 min, este pico se puede atribuir al hidrato de compuesto (2b).

Además de obtener un método selectivo y específico, no solo para el compuesto (1b) y (2b) si no también específico para los reactivos utilizados en la síntesis del compuesto (2b), estos resultados nos permitió optimizar la reacción de oxidación logrando con ello, en lotes posteriores, a un porcentaje de conversión alto. La separación de los compuestos por medio de CLAR fase normal, fue apropiada, ya que, se tiene buena resolución con una simetría adecuada de ambos picos y un factor de coe menor a 2, obteniéndose métodos confiables para una correcta identificación de ambos compuestos, estos parámetros se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Parámetros obtenidos con el método A'3 para el compuesto (1b y 2b).

Compuesto	Tiempo de retención (t_R) min	Factor de coe (T)	Simetría (As)	Platos teóricos (N)
2',3'-O-isopropilidenuridina (1b)	12.78	1.450	0.51	2711
5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (2b)	7.75	1.290	0.721	1380

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

Se realizaron tres métodos de síntesis tratando de encontrar el método con mejor rendimiento y % de conversión.

7.5.1. Síntesis del compuesto (3b) por el Método A

Para el método A se realizaron 11 lotes a partir de (2b) para la obtención de la cianohidrina (3b). Se empleó NH₄Cl y NaCN en relación de 2.2 mmol de cada uno, pero se modificó la temperatura de reacción para mejorar los % de conversión y los % ed, obteniéndose un rendimiento máximo del 97%, ver tabla 20.

Tabla 20. Condiciones de reacción y rendimientos en la obtención del compuesto (3b).

5'-desoxyl-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina

	2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina										
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8	Lote 9	Lote 10	Lote 11
Temperatura de reacción (°C)	SC	SC	5	5	5	20	20	20	30	30	30
Tiempo de reacción (horas)	6.0	5.5	4.0	4.0	4.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Rendimiento (%)	89.3	80.9	54.8	52.1	57.1	97.8	95.6	90.7	97.6	91.06	90.6

^{SC} Sin controlar, pH_{inicial} 10, pH_{final} 8

Se tomó el pH inicial y final de la reacción para poder comparar con los otros métodos, se determinó el %ed por CLAR y RMN y el % de conversión por ambas técnicas, aunque por CLAR el compuesto (2b) absorbe más que el (3b), por lo que no se considera una técnica confiable para el % de conversión, siendo más confiable para esta determinación la RMN (Tabla 27).

Las reacciones se siguieron por CCF, la fase móvil adecuada para eluir los compuestos fue una mezcla de AcOEt/MeOH 90:10, además de emplearse la técnica espectroscópica de IR para determinar la completa conversión de (2b) a (3b) con un tiempo de reacción de 4 hrs y un 99 % de conversión, determinado por RMN.

7.5.2. Síntesis del compuesto (3b) por el Método B

Para el método B se realizaron 10 lotes, por triplicado, cambiando las condiciones de reacción como: la temperatura de reacción, el pH de la solución amortiguadora de citratos/KCN (SA) y los equivalentes en la SA con la finalidad de mejorar el %*ed* y el % *de conversión*, en la **tabla 21** se muestran las modificaciones realizadas.

Tabla 21. Condiciones de reacción utilizadas para obtener el compuesto (3b) por método B.

Lotes	Modificaciones en las condiciones de reacción			
	pH de la SA	Eq. de la SA	Temperatura de reacción (°C)	Tiempo de reacción (horas)
1	5	1.5	20	24
2	5	1.5	30	24
3	5	1	5	150
4	5	1	10	150
5	5	1	20	150
6	5	1	30	90
7	4	1	5	150
8	4	1	10	150
9	4	1	20	90
10	4	1	30	90

En la **tabla 22** se muestra el promedio de los triplicados de cada lote, igual que en el método A se determinó el %*ed* por CLAR y RMN y el % *de conversión* por ambas técnicas obteniéndose un rendimiento máximo del 97 %.

Tabla 22. Promedio de los triplicados por lote para el % de rendimientos en la obtención del compuesto (3b).

5'-desoxi-2',3'-O-isopropilideno-5'-oxo-uridina $\xrightarrow[\text{5, 10, 20, 30 } ^\circ\text{C}]{\text{I) Sol. Amortiguadora de citratos/KCN pH 4,5 1N pH 5 1.5N}}$ 2',3'-O-isopropilideno-5'-ciano-uridina

	2',3'-O-Isopropilideno-5'-ciano-uridina									
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8	Lote 9	Lote 10
pH de la SA	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4
Eq. de la SA	1.5	1.5	1	1	1	1	1	1	1	1
Temperatura de la reacción	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
Rendimiento (%)	89.6	87.6	69.9	72.2	97.1	93.6	84.3	73.0	75.52	89.1

El curso de las reacciones se siguieron por CCF, la fase móvil adecuada para eluir los compuestos fue una mezcla de AcOEt/MeOH 90:10, además de emplearse la técnica espectroscópica de IR para determinar la completa conversión de (2b) a (3b) con un tiempo de reacción de 150 y 90 hrs, hasta con un 100 % de conversión (Tabla 29), determinado por RMN.

Los resultados obtenidos en los métodos de síntesis **A** y **B** para el compuesto (3b) servirán como base (controles) para compararse con las reacciones biocatalíticas y observar si existe influencia del biocatalizador. Además de comparar los métodos analíticos de RMN y CLAR y observar si hay diferencia estadísticamente significativa entre los métodos analíticos de RMN y CLAR para la evaluación del %ed y del % de conversión.

7.5.3. Síntesis del compuesto (3b) por el Método C

Para el método C se realizó un lote, el rendimiento fue bajo, 22%, por lo que este método se estimó no adecuado para los fines de esta investigación, al igual que en los otros métodos se siguió la reacción por CCF e IR, para determinar la completa conversión de (2b) a (3b) con un tiempo de reacción de 72 hrs y con un % de conversión de 33%.

7.5.4. Caracterización e identificación por IR del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (3b)

Todos los lotes fueron analizados por IR, RMN y CLAR, pero solo uno de estos lotes se describirá a detalle.

El espectro de IR, figura 34, muestra dos bandas en 1693 y 1675 cm^{-1} características de las vibraciones por estiramiento de los grupos carbonilos de la base nitrogenada de la molécula, además se pueden identificar las bandas de las vibraciones por estiramiento del C-N para compuestos aromáticos que van desde 1250 hasta 1350 cm^{-1} y las bandas por las vibraciones del estiramiento de C-O que van desde 1280 hasta 1000 cm^{-1} dependiendo de la interacción y el tipo de compuesto. La banda característica a las vibraciones por estiramiento de nitrilo (unión $\text{C}\equiv\text{N}$) se reporta en la literatura en 2250 cm^{-1} , se observa esta banda en el espectro de IR en 2367 cm^{-1} y en 3226 cm^{-1} , se observa una banda que corresponde a la vibración por estiramiento del grupo O-H.

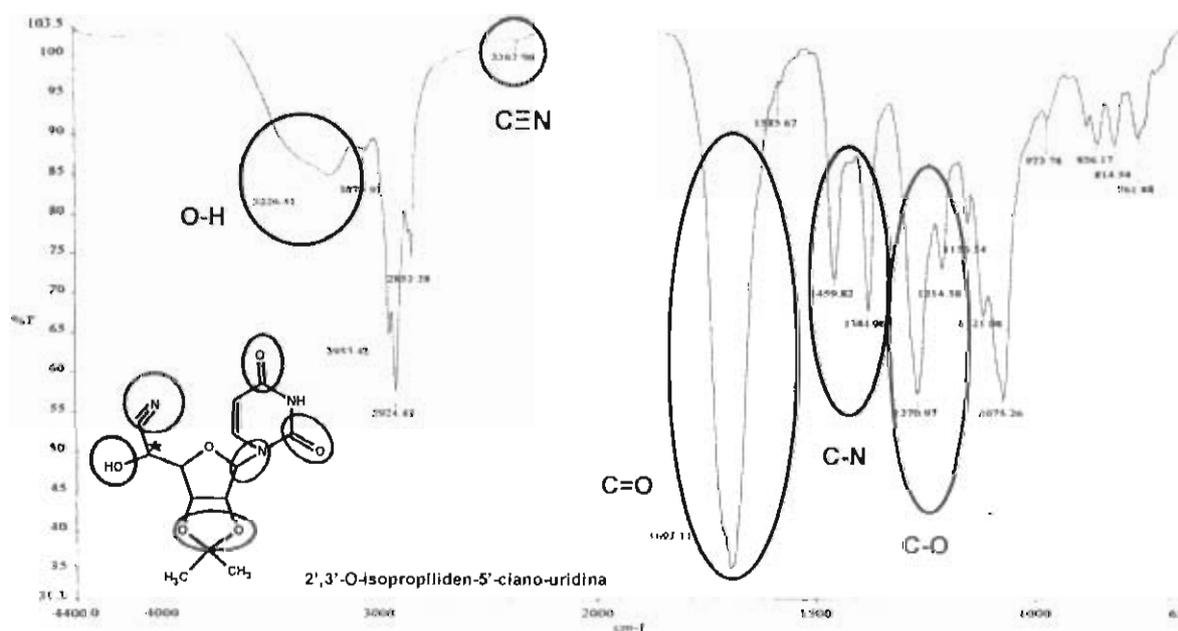


Figura 34: Espectro de IR del compuesto (3b).

7.5.5. Caracterización e identificación por RMN del 2',3'-O-isopropilideno-5'-ciano-uridina (**3b**)

Para el análisis de RMN el compuesto (**3b**) se disolvió en CDCl_3 , en la **tabla 23**, se pueden observar los desplazamientos químicos en los que aparece cada carbono y se compararon los valores experimentales con los calculados por el programa ACD/Labs CNMR HNMR predictor versión 5.11.

Tabla 23. Desplazamiento químico de RMN ^{13}C para el compuesto (**3b**).

No. de Carbono	CHn	Desplazamiento químico (δ) (ppm)	Predictor (ppm)
2	C	114.9	114.0
4	CH	86.8	79.8
6	CH	97.9	87.6
7	CH	79.8	76.9
8	CH	84.5	79.0
9	CH_3	29.4	26.8
10	CH_3	27.2	25.1
12	C	150.9	150.7
14	C	163.2	164.4
15	CH	103.3	101.9
16	CH	143.8	142.1
17	CH	61.8	58.8
21	C	117.6	116.8

En la **figura 35** se muestran el espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) para el compuesto (**3b**) en donde se tiene la presencia del C17 correspondiente a la formación del nuevo centro estereogénico en 62.1 ppm, siendo la señal más característica, además de

observarse un desdoblamiento de las señales debido a la formación de un quinto centro estereogénico, obteniéndose los diastereoisómeros, los cuales tienen características físicas diferentes y se pueden perfectamente diferenciar en RMN sin la necesidad de utilizar algún reactivo de desplazamiento, como sería en el caso de los enantiómeros.

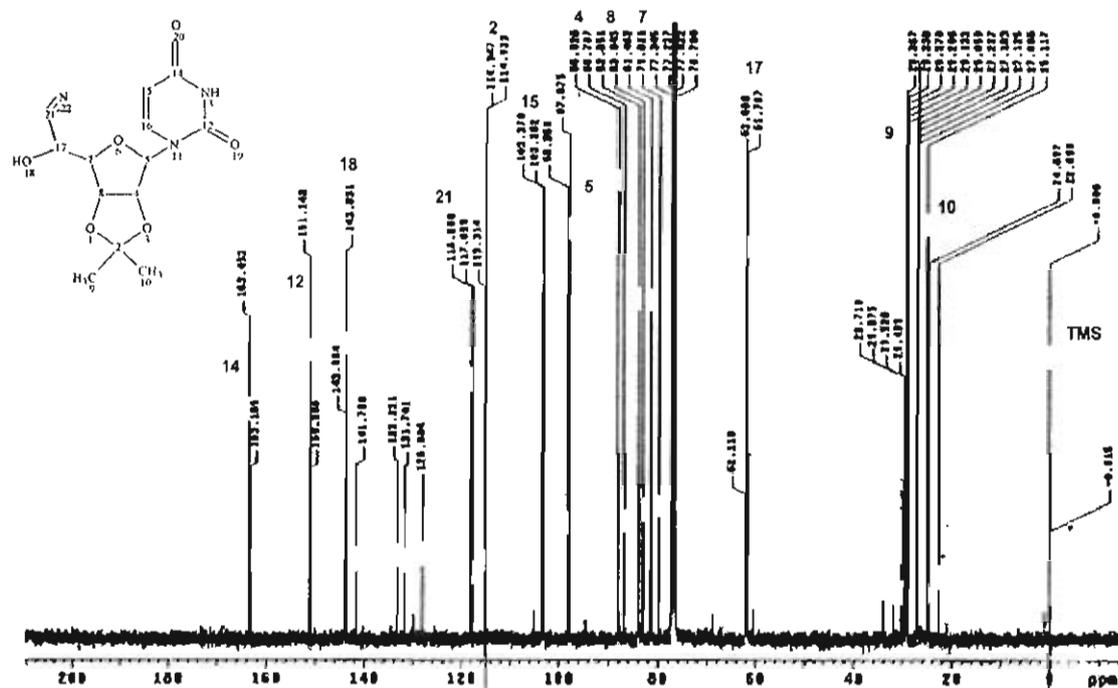


Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C para los diastereoisómeros del compuesto (3b).

Además de la clara asignación en la figura 35 la asignación realizada en la tabla 16 para (2b), nos permite concluir que se obtuvo el compuesto deseado, sin embargo los valores obtenidos presentan un ligero desplazamiento en la zona donde aparece la señal del disolvente (CDCl_3), razón por la cual los desplazamientos químicos de la molécula que aparecen en esta zona se recorren, pero corresponde a lo esperado, lo que corrobora la identificación y caracterización del compuesto por RMN de ^{13}C .

Debido a la duplicidad de las señales, se complicó la asignación para el análisis de ^1H , por lo cual fue necesario emplear técnicas de 2 dimensiones para lograr asignar con precisión cada una de las señales obtenidas, en la figura 36 y 37 se muestran el

espectro de resonancia y su ampliación para poder distinguir la duplicidad presentada en el espectro obtenido para caracterizar el compuesto (3b).

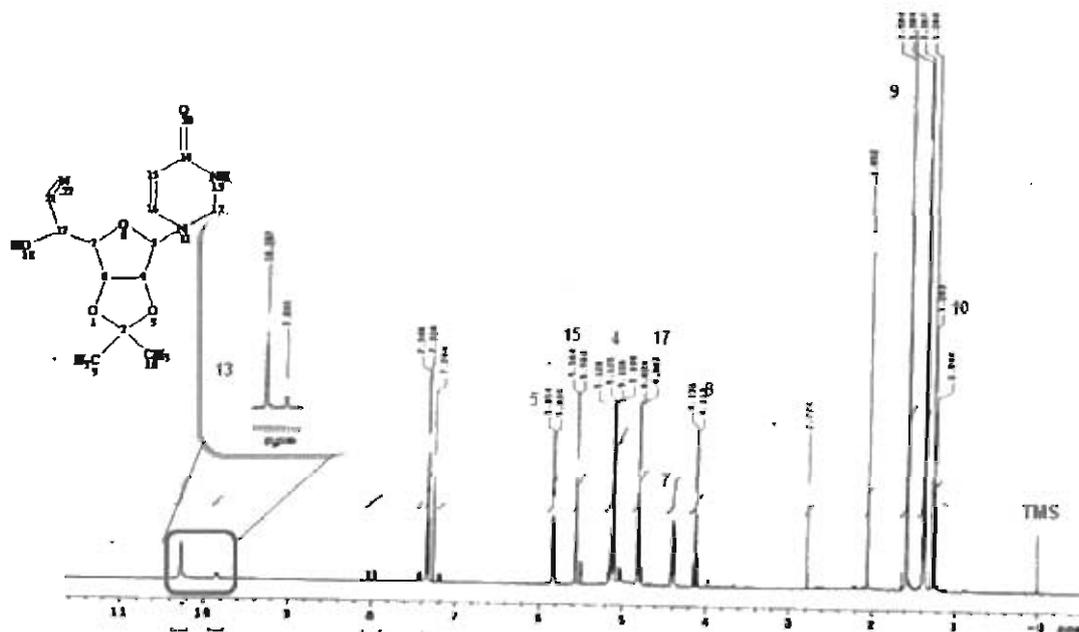


Figura 36. Espectro de RMN ¹H para el compuesto (3b)

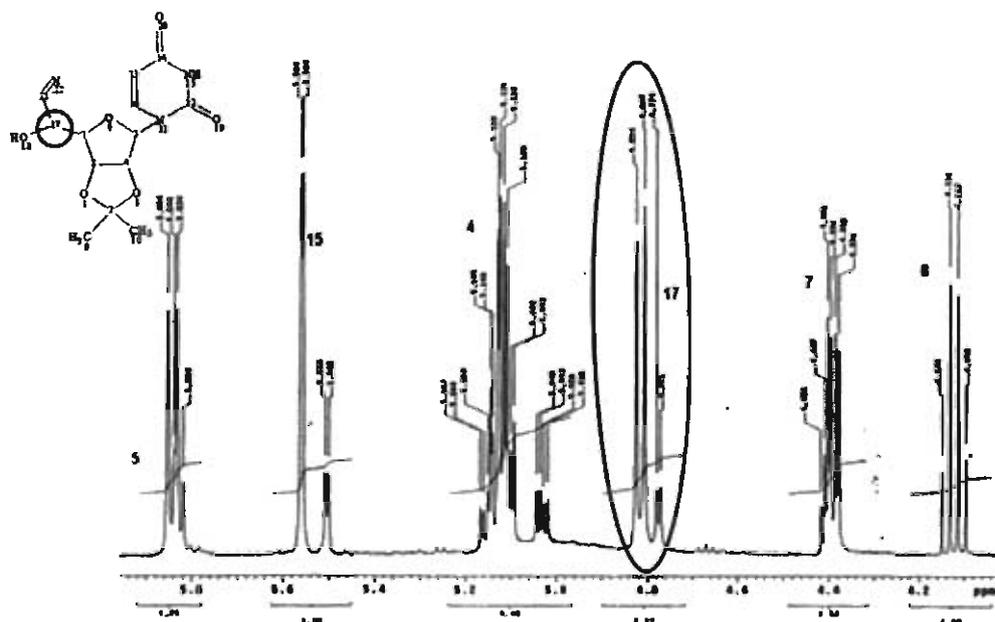


Figura 37. Ampliación de espectro de RMN ¹H (CDCl₃) del compuesto (3b).

En la **figura 37** se observa la duplicidad de señales generadas al obtener un nuevo centro estereogénico, con la formación de la cianohidrina de uridina (**3b**), el cual es un compuesto diastereoisomérico al tener más de un centro quiral, dificulta la asignación de cada protón debido al desplazamiento y multiplicidad de señales, por lo que se realizó un análisis **COSY** para asignar con precisión cada una de las señales adquiridas. Este análisis permite referenciar cada señal con el acoplamiento que se presenta en la molécula con tres enlaces de distancia, permitiendo de esta manera asignar los acoplamientos y determinar a qué protón le corresponde cada señal **figura 38**.

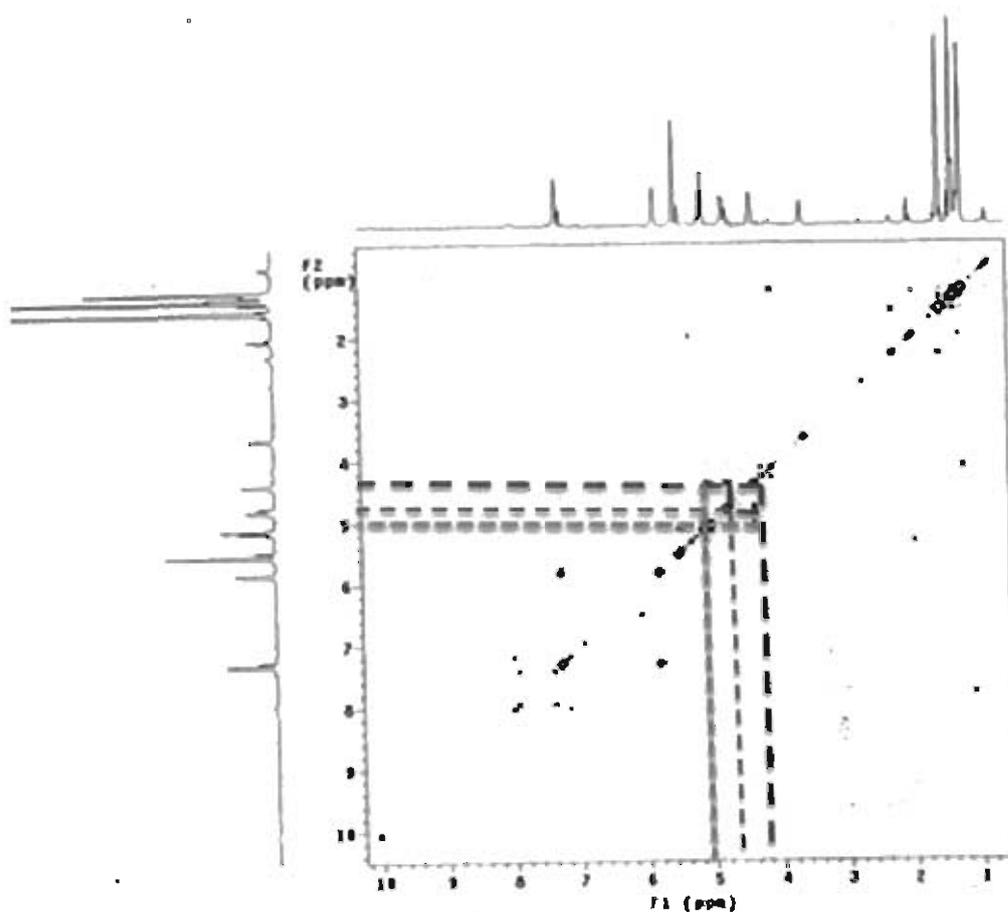


Figura 38. Espectro de RMN (gCOSY) del compuesto (**3b**).

En la **figura 38** podemos observar un acoplamiento entre el H 7 con el H 17 y 4; y del H4 con 17 lo que corrobora la posición de los protones asignados, mostrándonos la correlación de acoplamiento de los protones de la molécula, por mencionar algunas de las interacciones.

También se realizaron otros estudios de dos dimensiones como fue **HSQC**, el cual nos permite observar correlaciones hidrógeno-carbono a un enlace y **HMBC** este análisis realiza correlaciones carbono- hidrógeno a larga distancia o a varios enlaces de distancia, pero debido quizá a la cantidad de muestra, poca estabilidad y largo tiempo de análisis para obtener ^{13}C se complicaron ambos análisis, no obteniéndose resultados claros, sin embargo con los análisis obtenidos se pudo realizar la asignación y la caracterización del compuesto y del quinto centro estereogénico formado en la síntesis de la cianohidrina.

Una vez asignadas las señales y acoplamientos, se determinó la señal perteneciente al nuevo centro estereogénico formado. Estas señales fueron utilizadas para determinar el porcentaje de exceso diastereoisomérico (*%ed*) por RMN y de esta forma contar con una técnica para determinar además del *%ed*, el porcentaje de conversión, cuantificando el área bajo la curva de la señal correspondiente al protón del aldehído (**2b**) en 9.4 ppm y el área bajo la curva de los diastereoisómeros A y B en 4.7 ppm. En la **figura 39** se muestra una ampliación de las señales utilizadas para la determinación del *%ed* y del *% de conversión*.

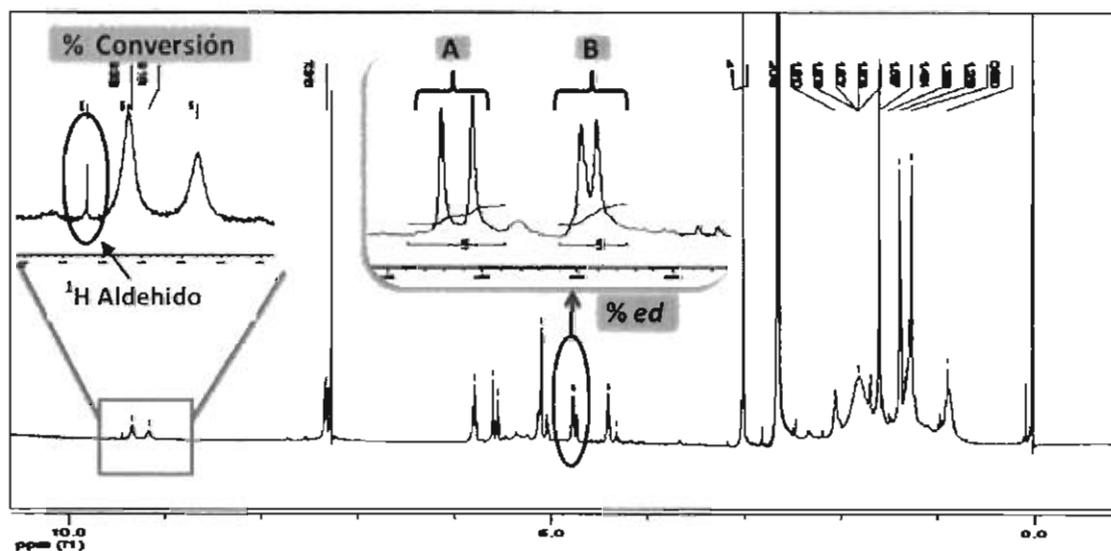


Figura 39. Ampliación del espectro de RMN de ^1H del compuesto (**3b**), asignación de los diastereoisómeros.

Se logró caracterizar el compuesto (**3b**), mediante el empleo de la técnica espectroscópica por RMN. Se cuantificó el %ed de 15% por este método encontrando una relación de diastereoisómeros de 57 para A y 43 para B.

7.5.6. Análisis del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (**3b**) por CLAR en fase reversa

Con la finalidad de identificar, cuantificar y comparar los resultados de RMN de los diastereoisómeros A y B del compuesto (**3b**), se desarrolló el método analítico CLAR en fase reversa, empleando la columna XDB-C8 de 150 mm x 4.6 mm, 5 µm, manteniendo la temperatura de la columna a 25°C y utilizando un detector de arreglo de diodos, utilizando cinco diferentes longitudes de onda: 220, 240, 254, 260 y 280 nm, las modificaciones al método analítico se muestran en la **tabla 24**.

Tabla 24. Condiciones CLAR fase reversa para el compuesto (**3b**).

Método	Columna	Fase móvil	Inyección µL	Flujo mL/min
A1	XDB-C8	CH ₃ CN:MeOH (99:1)	5	0.4
A2	XDB-C8	CH ₃ CN:MeOH (99.9:0.1)	5	0.4 0.2 0.1
A3	XDB-C8	CH ₃ CN:MeOH 99.5:0.5	5	0.2 0.4

En la **figura 40** se pueden observar los cromatogramas, sin embargo no se logró una buena resolución de los diastereoisómeros del compuesto (**3b**); esto se puede atribuir a que el compuesto analizado puede contener otras impurezas de síntesis, complicando su resolución no obteniendo un método analítico de CLAR fase reversa selectivo ni específico para el analito en cuestión.

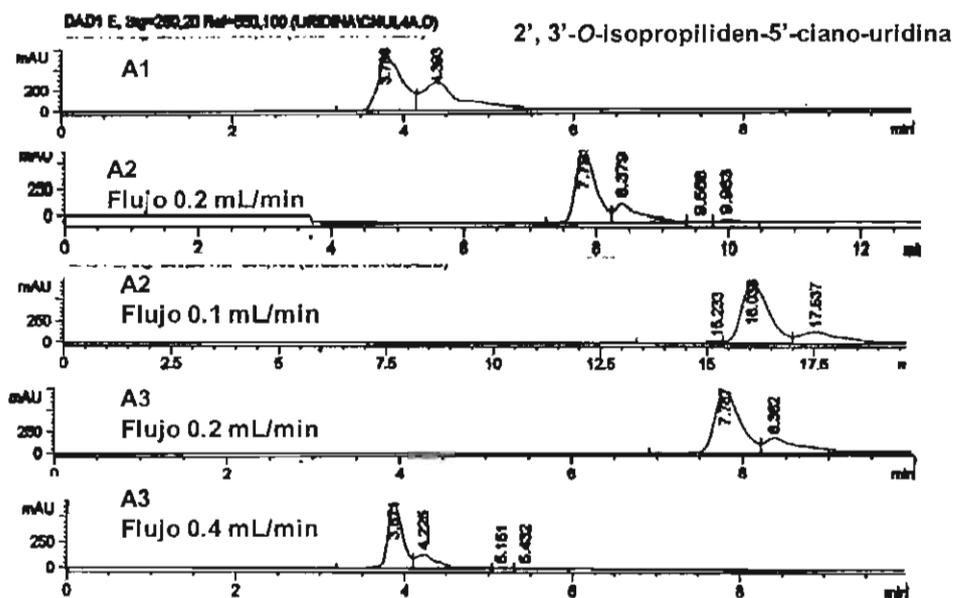


Figura 40. Cromatogramas del compuesto (3b), para los métodos A1, A 2 y A3 (Tabla 25) con un volúmen de inyección 5 μ L, λ de 260 nm.

Para mejorar la especificidad y la selectividad de los diastereoisómeros se pueden hacer varias propuestas para futuras investigaciones y de este modo obtener una adecuada resolución entre los diastereoisómeros A y B de la cianohidrina de uridina (3b), aldehído (2b), alcohol (1b), reactivos (1a y 2a) e impurezas resultantes de la síntesis. Un factor importante sería cambiar la polaridad de la fase móvil, disminuyendo la fuerza del disolvente, lo que implicaría quitar el metanol y aumentar el % de agua, utilizar una solución amortiguadora en la fase móvil modificando con el pH y la ionización de los compuestos, favoreciendo así su separación, también se podría probar con una columna C18 o aumentando la longitud de la columna, lo que ayudaría la retención de los analitos y quizá se obtendría una adecuada resolución aunque con tiempos más largos de análisis.

Sin embargo, con la finalidad de mejorar la resolución y la identificación de los diastereoisómeros del compuesto (3b) se decidió probar con CLAR fase normal utilizando columnas quirales con diferentes condiciones.

7.5.7. Análisis del 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (3b) por CLAR en fase normal

Para el análisis de CLAR fase normal, se utilizó la columna OJ-H, a 5 diferentes longitudes de onda: 220, 240, 254, 260 y 280 nm, utilizando una fase móvil de 80:20 *n*-hexano:isopropanol, con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min; con un volumen de inyección de 5 μ L, temperatura de 28°C. Se empleó el método A'3 de la **tabla 18**, con estas condiciones los t_R fueron de 22.78 y 37.20 min para A y B respectivamente, que corresponden a los dos diastereoisómeros formados a partir de la generación del quinto centro estereogénico, señales que se utilizaron para determinar el %*ed* de cada uno de los lotes sintetizados. En la **figura 41** se muestra el cromatograma para el compuesto (3b).

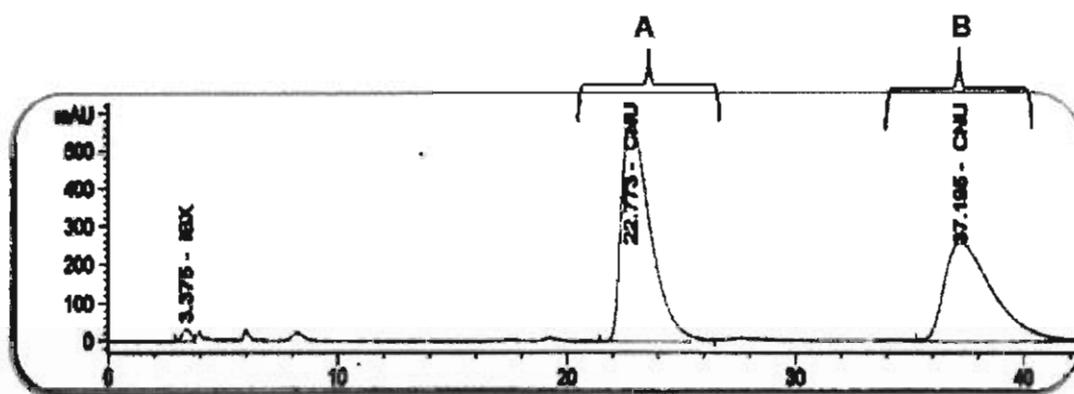


Figura 41: Cromatograma de (3b), columna OJ-H, flujo 1 mL/min, $\lambda = 260$ nm, Temperatura de la columna 28°C, *n*-hexano:isopropanol (80:20).

Se obtuvo un método selectivo y específico, no solo para el compuesto (3b), si no también específico y selectivo para los reactivos utilizados en la síntesis del compuesto (3b). La resolución de los compuestos por medio de CLAR fase normal, es la adecuada, con una resolución mayor a 2. El método proporciona una clara identificación de los diastereoisómeros del compuesto, algunos parámetros se muestran en la **tabla 25**.

Tabla 25. Parámetros obtenidos con el método A'3 para el compuesto (3b).

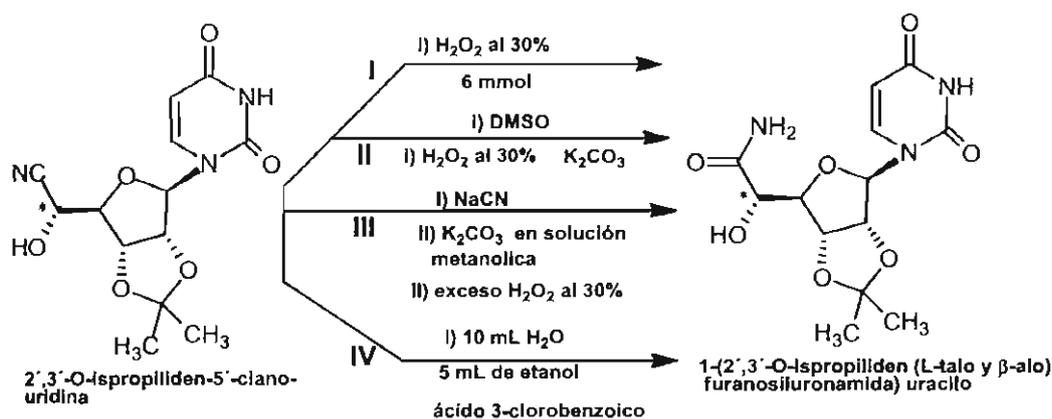
Compuesto	Tiempo de retención (t _R) min	Resolución (R _s)	Factor de coleo (T)	Simetría	Platos teóricos
2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (Diastereoisómero A)	22.78	5.17	2.127	0.406	1468
2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (Diastereoisómero B)	37.20	5.17	2.168	0.398	1440

El resultado del %*ed* obtenido con este método analítico se comparara con el %*ed* obtenido por RMN¹H, teniendo la posibilidad de emplear ambas metodologías para la cuantificación del %*ed*.

Este método se utilizara posteriormente en nuestro estudio para la cuantificación del %*ed* en la obtención de la cianohidrina (3b) empleando polvos acetónidos de vegetales (ruta biocatalítica). Con base en estos resultados contamos con dos métodos analíticos (RMN¹H y CLAR) para la cuantificación del %*ed*.

7.6. Síntesis del 1-[2',3'-O-isopropiliden (α-L-talo y β-D-alo)furanosiluronamida]uracilo (4b)

Con la finalidad de obtener la amida del derivado de uridina (4b), se llevaron a cabo diferentes reacciones de hidrólisis química de nitrilos, esquema 29, se seleccionó primero al peróxido de hidrógeno a diferentes tiempos de reacción para realizar la hidrólisis. Sin embargo, en algunos lotes se obtuvieron productos que no se pudieron identificar. Esto puede deberse a que la cianohidrina (3b) presenta inestabilidad química y fácil reversibilidad de reacción, por lo que no se logró identificar por CCF, IR y no presenta las señales esperadas por RMN. Es importante mencionar que la síntesis de (4b) generaría un compuesto con una mayor estabilidad que el compuesto (3b), esto nos permitiría contar con un derivado al cual se le pueden anclar otras cadenas de compuestos más complejos estructuralmente, que proporcionen una activación de la molécula generando actividades farmacológicas descritas en el marco teórico.



Esquema 29: Rutas de síntesis para el compuesto (4b).

Se probaron y desarrollaron las cinco técnicas de síntesis, realizándose un total de 18 lotes, modificándose las condiciones de reacción, extracción y purificación de los productos obtenidos. De las cinco síntesis descritas en el **esquema 29**, el mejor resultado se alcanzó empleando peróxido de hidrógeno al 30%, 6 mmol (**Técnica I**), con 196 hrs de reacción. Se obtuvieron cristales blancos con un pf. 180-215°C, en la literatura se reporta el punto de descomposición para el isómero *R* de 278°C cambiando de color blanco a negro, la mezcla cruda de reacción contiene la mezcla de diastereoisómeros y las materias primas, con un rendimiento del 25%.

7.6.1. Caracterización e identificación por IR 1-[2',3'-O-isopropilideno (α -L-talo y β -D-alo) furanosiluronamida]uracilo (4b)

El espectro de IR **figura 42**, muestra tres bandas en 1636 y 1684 cm^{-1} características a las vibraciones por estiramiento a los grupos carbonilos de la base nitrogenada de la molécula y la tercera banda, correspondiente al carbonilo de la amida, se observa en 1733 cm^{-1} , además se pueden identificar las vibraciones por estiramiento de N-H que van desde 3300 hasta 3500 cm^{-1} observándose en el espectro las dos bandas clásicas de amida en 3178 y 3375 cm^{-1} y vibraciones por estiramiento de C-O que van desde 1280 hasta 1000 cm^{-1} dependiendo de la interacción y el tipo de compuesto. Observándose la desaparición de la banda correspondiente a las vibraciones por estiramiento de nitrilo (unión $\text{C}\equiv\text{N}$) en 2367 cm^{-1} y la desaparición de la banda que corresponde a la vibración por estiramiento del grupo O-H en 3226 cm^{-1} .

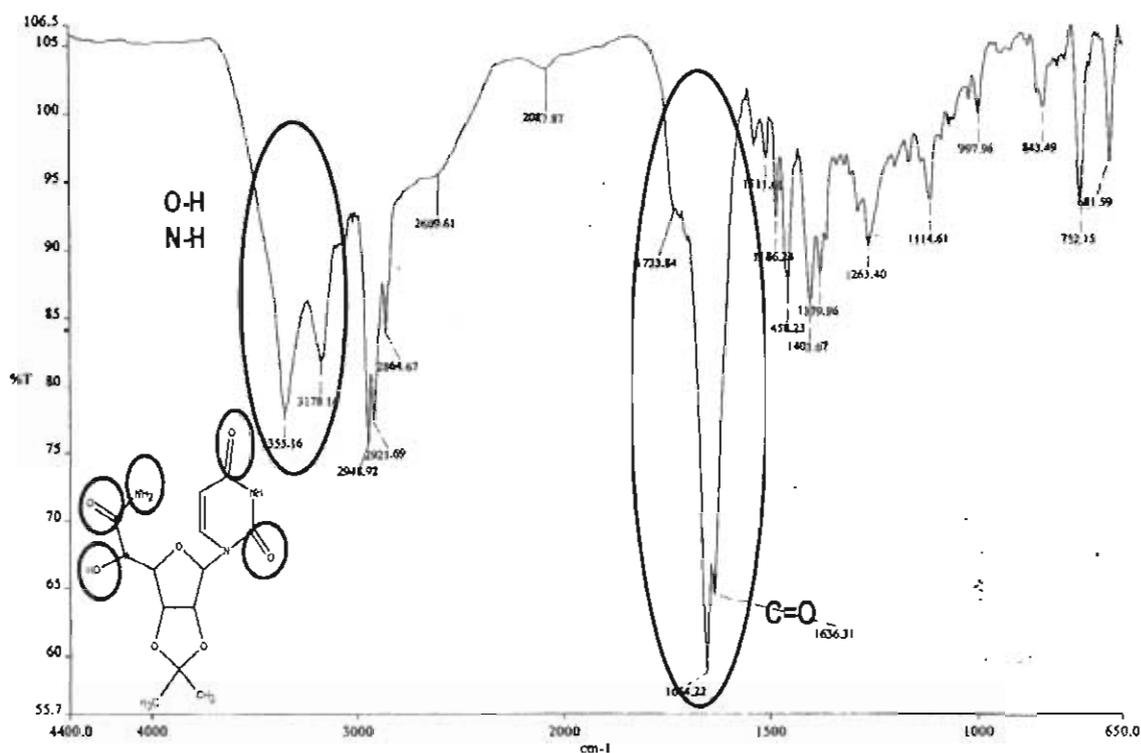
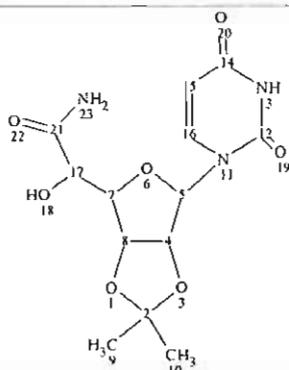


Figura 42: Espectro de IR del compuesto (4b).

7.6.2. Caracterización e identificación por RMN de 1-[2',3'-O-isopropiliden (α-L-talo y β-D-alo)furanosiluronamida]uracilo (4b)

Para el análisis de RMN se utilizó como disolvente DMSO y en la tabla 26 se muestran los desplazamientos químicos en los que aparece cada carbono, se realizó la comparación de los valores experimentales con los calculados por el programa ACD/Labs CNMR y HNMR Predictor versión 5.11 además de comparar con los resultados publicados para el compuesto (4b) por Jian-qian Wang y colaboradores.¹¹⁵

Tabla 26. Desplazamiento químico de RMN ¹³C para el compuesto (4b).



No. de Carbono	CHn	Desplazamiento químico (δ) (ppm)	Valores Jian-qian et al ¹ (ppm)	Predictor (ppm)
2	C	113.3	113.0	113.9
4	CH	83.3/83.4	85.9/86.6	80.8
5	CH	94.0	89.8	88.6
7	CH	81.6	83.4/83.6	79.4
8	CH	79.11	78.9/80.1	76.1
9	CH ₃	26.7/26.9	27.0/27.1	26.8
10	CH ₃	24.9/25.1	25.1/25.2	25.1
12	C	150.5/150.4	150.3/150.4	150.7
14	C	163.1/163.2	162.0	164.4
15	CH	101.9	101.9	101.9
16	CH	143.4	141.0/141.1	142.0
17	CH	61.0/61.2	70.8/71.2	68.7
21	C	169.8/169.7	172.6/172.9	173.0

En la **figura 43** se muestra el espectro de RMN ¹³C (100 MHz) para el compuesto (4b) en donde se tiene la presencia del carbono de la amida correspondiente en 169.7/169.4 ppm, siendo la señal más característica, además de observarse un desdoblamiento de las señales dada la formación de un quinto centro estereogénico, al formarse los dos diastereoisómeros los cuales tienen características físicas diferentes y se pueden diferenciar en RMN sin la necesidad de utilizar algún reactivo de desplazamiento, como sería en el caso de los enantiómeros.

También se puede observar la presencia de otras señales con mayor o menor intensidad, esto se debe a que es una mezcla cruda de reacción en donde aún se tiene

la presencia de la cianohidrina de uridina (**3b**) lo que complica aún más el espectro. Sin embargo, pueden observarse todas las señales tanto reportadas por Jian-qian et al¹⁵ como las calculadas con el programa Predictor ACD Labs.

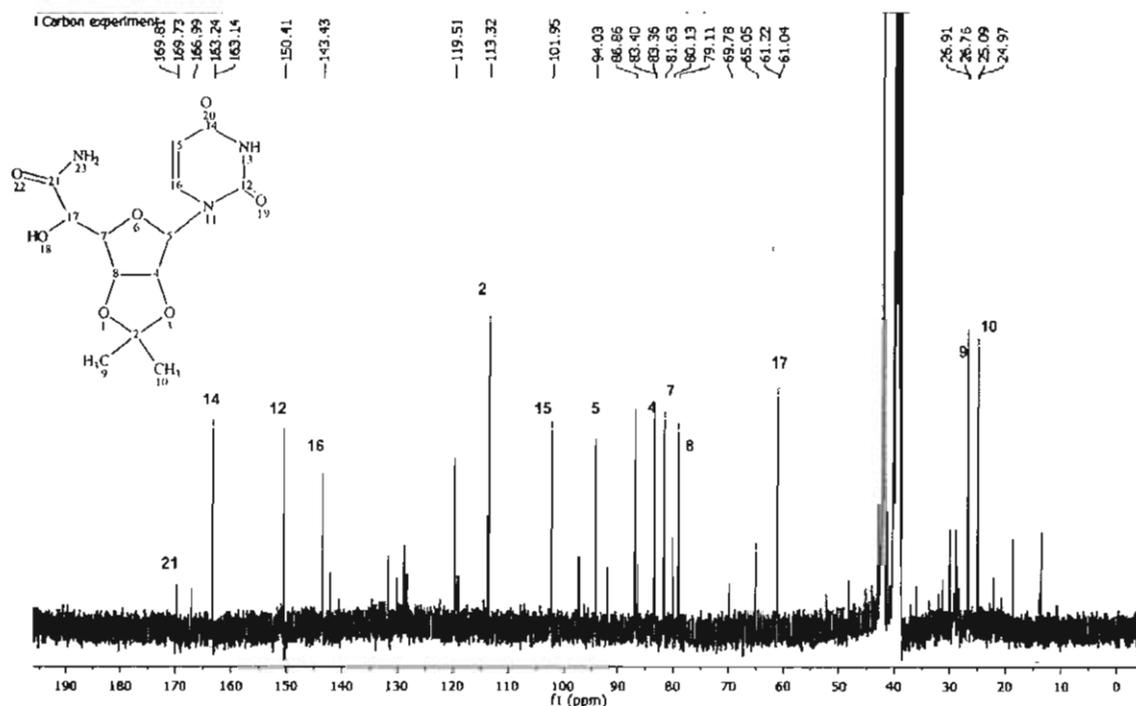


Figura 43. Espectro de RMN ¹³C para el compuesto (**4b**).

En la **figura 44** y **45** se presentan las ampliaciones del espectro de RMN ¹H (400 MHz), en la **figura 44**, se puede observar el protón del quinto centro estereogénico H-17 (marcado con rosa) y la señal de los protones de la amida formada H-23 (marcado con rojo).

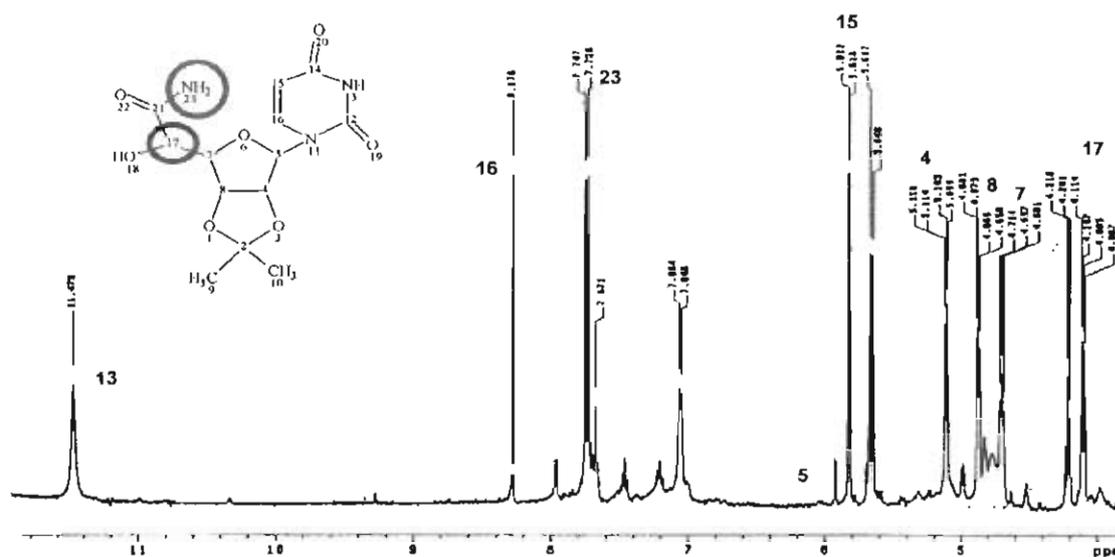


Figura 44. Espectro de RMN ^1H para el compuesto (4b).

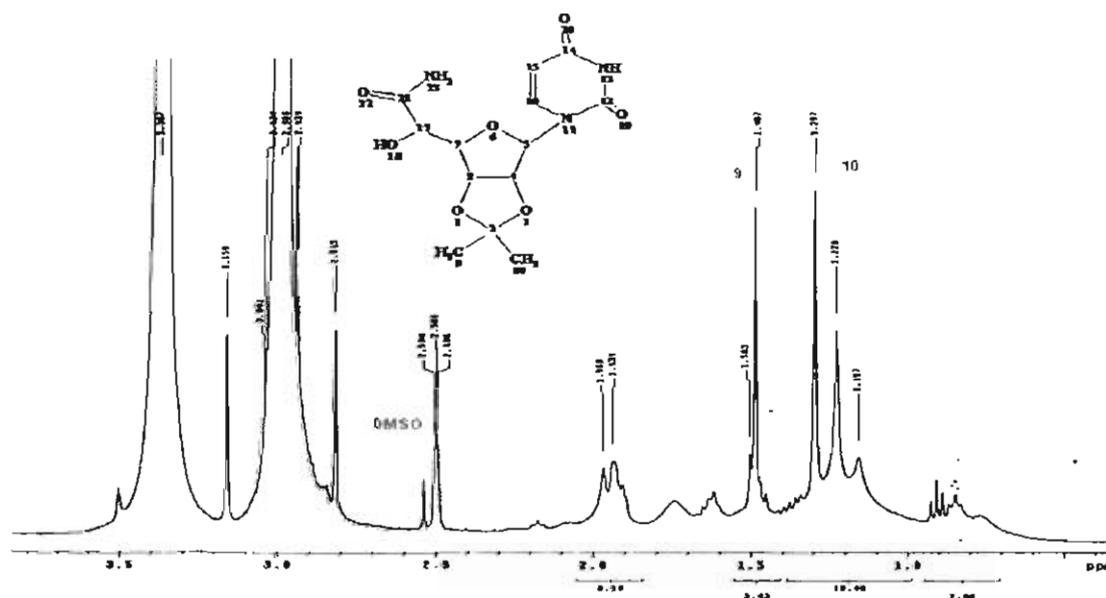


Figura 45. Ampliación del espectro de RMN ^1H para el compuesto (4b).

RMN ^1H DMSO- d_6 , 400 MHz: 1.29/1.23 (s, 3H), 1.48/1.50 (s, 3H), 4.1/4.2 (dd, 1H), 4.7/4.86 (m, 2H), 5.1 (d 1H), 5.64/5.66 (d 1H), 5.81/5.82 (d, 1H), 7.04/7.06 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.72/7.74 (d, 1H).

Finalmente, con este análisis y a pesar de que el punto de fusión no es similar por ser una mezcla diastereoisomérica, el espectro de IR nos permite observar la generación

de un tercer grupo carbonilo y la presencia del grupo $-NH_2$ añadiendo que el comportamiento por RMN 1H y ^{13}C es similar a lo informado en la literatura,¹¹⁵ por lo que se puede concluir que se obtuvo la amida del derivado de uridina (**4b**). Se propone afinar la técnica de síntesis química o en su caso recurrir a métodos biocatalíticos (empleando enzimas nitrilo hidratasas) para lograr la transformación; así como purificar el compuesto, para eliminar las materias utilizadas en su síntesis y obtener a su vez un compuesto de alta pureza óptica, de manera que sea mas clara su elucidación con las técnicas utilizadas, además de un futuro desarrollo de identificación y cuantificación por CLAR, ya que debido al bajo rendimiento no se pudo extender la investigación.

7.7. Síntesis biocatalítica

Una vez sintetizado el compuesto (**2b**), se llevó a cabo la reacción para a obtención del compuesto (**3b**) probando las enzimas oxinitrilasas obtenidas de las semillas de plantas del género *Prunus*, *Pouteria* y *Annona* con el fin de preparar la correspondiente cianohidrina (**3b**) con alta pureza óptica.

7.7.1. Reacción no enzimática en la formación de cianohidrinas (**3b**)

Para el estudio de las biocatálisis se tomó en cuenta que el uso de una pequeña cantidad de solución amortiguadora (2-10%) en un disolvente orgánico inmiscible es la metodología habitual para las reacciones catalizadas por las oxinitrilasas, mejor conocida en la literatura como sistemas bifásicos, que dependiendo de la cantidad del sistema acuoso pueden ser sistemas micro-acuosos. Sin embargo, trabajos recientes han establecido que debido a que la adición química de ácido cianhídrico transcurre en la fase acuosa y de manera espontánea, se debe considerar este punto como clave en el proceso de biocatálisis. Por lo tanto fué necesario tener un control químico donde se determinara el %*ed* que se genera con el empleo de los sistemas bifásicos, que en este caso serían utilizados en este proceso. Con base en lo anterior se decidió plantear en nuestra metodología, la presentación de dos controles químicos: el primero se realizaría con NaCN y NH_4Cl denominado como **método A**, y el segundo fue elaborado empleando sistemas "microacuoso" donde se utilizó como disolvente orgánico éter diisopropílico/solución amortiguadora de citratos a pH 4 y 5, utilizando

1.0 y 1.5 eq. de la solución amortiguadora de citratos/KCN, el cual se denominó como **método B**, descrito en la metodología.

7.7.1.1. Reacción utilizando el método A (control químico A)

Las reacciones químicas se realizaron a 5, 20 y 30°C con NaCN y NH₄Cl, en agua, en la **tabla 27** se muestran los resultados, se elaboraron 11 lotes, con 3 repeticiones por cada temperatura utilizada. Las cianohidrinas obtenidas fueron analizadas por CLAR utilizando una columna quiral OJ-H el método de análisis se describió en el apartado 7.5.7 y por RMN ¹H descrito en el apartado 7.5.5.

Tabla 27. Condiciones de reacción, rendimientos, % de conversión y %ed en la obtención del compuesto (**3b**).

		2',3'-O-Isopropiliden-5'-ciano-uridina										
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8	Lote 9	Lote 10	Lote 11
Temp. de reacción (°C)		SC	SC	5	5	5	20	20	20	30	30	30
Tiempo de reacción (horas)		6.0	5.5	4.0	4.0	4.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Rendimiento (%)		89.3	80.9	54.8	52.1	57.1	97.8	95.6	90.7	97.6	91.1	90.6
		% Conversión CLAR y RMN										
% Conversión CLAR		98.6	97.3	96.6	96.2	100	98.9	97.7	95.7	98.8	96.1	92.8
% Conversión RMN		98.9	98.4	92.4	94.7	97.2	94.2	92.3	96.9	92.7	91.0	91.9
		Relación Diastereoisomérica y %ed por CLAR y RMN										
%A CLAR		57.9	55.1	52.1	50.8	56.5	56.06	57.21	56.09	56.36	56.45	57.4
%B CLAR		42.1	44.9	44.8	49.2	43.5	43.94	42.79	43.91	43.64	43.55	42.6
% ed CLAR		7.89	10.2	7.24	1.6	12.9	12.2	14.4	12.2	12.72	12.9	14.7
%A RMN		56.54	57.0	54.02	55.25	58.14	58.22	58.33	56.13	54.94	54.64	61.65
%B RMN		43.46	43.0	45.98	44.75	41.86	41.78	41.67	43.87	45.03	45.35	38.35
% ed RMN		13.08	14.0	8.04	10.5	16.0	16.44	16.66	12.26	9.94	9.29	23.3
		SC Sin controlar, pH _{inicial} 10 pH _{final} 8										

Como se puede observar en la **tabla 27**, se compararon los dos métodos analíticos para la cuantificación del %*ed*, utilizando CLAR y RMN ¹H. La relación diastereoisomérica para el **método A**, presentó valores que van desde 54.0 hasta 61.7% por RMN¹H y 50.8/ 57.9 % por CLAR de la relación hacia uno de los dos diastereoisómeros generados. Obteniendo un % *de conversión* de entre 91 a 98.9% en un máximo 6 horas de reacción.

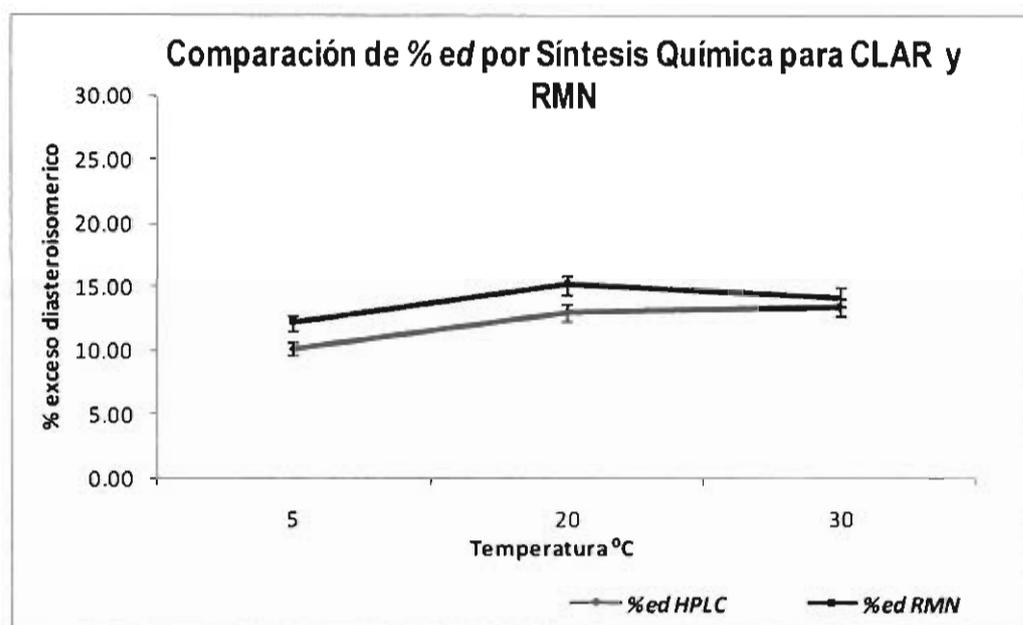
En la **tabla 28** se muestra el promedio (\bar{y}) del grupo de datos obtenidos por temperatura de reacción, el %*ed*, el % de los diastereoisómeros A y B; así como la desviación estándar (DE), para cada una de las temperaturas utilizadas, tanto por CLAR y RMN¹H.

Tabla 28. Promedios y DE del %*ed* y del % del diastereoisómero A y B por CLAR y RMN utilizando el **método A**.

Temperatura (° C)		% <i>ed</i>	% ÁREA por CLAR		% <i>ed</i>	% ÁREA por RMN	
		CLAR	% A	%B	RMN	%A	%B
5	\bar{y}	10.09	54.30	44.21	12.16	56.08	43.92
	DE	5.66	2.96	2.96	4.23	2.12	2.12
20	\bar{y}	12.91	56.45	43.55	14.53	57.26	42.73
	DE	1.31	0.66	0.66	2.12	1.06	1.06
30	\bar{y}	13.45	56.72	43.28	14.18	57.09	42.91
	DE	1.11	0.55	0.55	7.91	3.96	3.95

Del %*ed* obtenido, se realizó un análisis estadístico inferencial y se aplicó un análisis de varianza de dos factores (ANOVA) y una prueba de t pareada para cada temperatura empleada. Lo anterior con el fin de determinar si existe diferencia estadística entre los resultados obtenidos por CLAR y RMN¹H.

En la **gráfica 1** se observa la dispersión de los datos del %*ed* analizados por CLAR y por RMN ¹H.



Temperatura (°C)	5	20	30
%ed CLAR	10.09	12.91	13.45
%ed RMN	12.16	14.53	14.18

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

Los resultados del ANOVA muestran que no existe diferencia significativa entre los valores del %ed con ambos métodos analíticos CLAR y RMN ¹H a las diferentes temperaturas estudiadas; comparando la varianza de ambos métodos, obteniendo una $F_{cal}=1.2735$ y una $F_{tab} (\alpha=0.05/2, 1/16)=6.04$, para la comparación de las diferentes temperaturas utilizadas tampoco existe diferencia estadísticamente significativa, comparando la varianza de cada grupo obteniendo una $F_{cal}=2.1535$ y una $F_{tab} (\alpha=0.05/2, 2/15)=4.77$. Por lo tanto no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de ambos métodos analíticos, ni entre las medias de las temperaturas empleadas.

El análisis de t pareada mostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa para poder decir que existe diferencia entre los métodos, ni las temperaturas empleadas obteniendo una $p>0.05$. Por lo tanto, ninguno de los dos factores (método analítico y temperatura) tienen influencia significativa en el resultado.

7.7.1.2. Reacción utilizando el método B (control químico B) a pH 4 y 5 y concentraciones de 1.0 y 1.5 equivalentes de KCN en la solución amortiguadora de citratos (SA)

El método B son controles químicos obtenidos a partir del empleo de sistemas bifásicos utilizando pequeñas cantidades de agua presente en la solución amortiguadora de citratos (SA) mejor conocidos como sistemas "micro-acuosos". Esta reacción control fue estudiada a diferentes temperaturas: 5, 10, 20 y 30°C con éter diisopropílico. Se realizó cada lote por cuadruplicado a las diferentes temperaturas, empleando 1.0 y 1.5 equivalentes de solución amortiguadora (SA) de KCN/citratos a pH 4 y 5.

7.7.1.2.1. Reacción Método B a pH 4

Se realizaron 12 lotes empleando sistemas "micro-acuosos" a pH 4 utilizando 1.0 equivalentes de SA de KCN/citratos y éter diisopropílico a diferentes temperaturas. En la **tabla 29** se muestra la relación diastereoisomérica de A y B, el %*ed* determinado por CLAR y RMN ¹H y el % *de conversión* por ambas técnicas obteniendo un rendimiento máximo del 99.86 % por RMN ¹H con tiempos de reacción máximos de 150 hrs.

Tabla 29. % *conversión*, relación diastereoisomérica y %*ed* en la obtención del compuesto (**3b**) a pH 4 y 1.0 equivalentes de la SA de KCN/citratos.

	Temperatura (°C)	pH	eq. de SA	Relación diastereoisomérica y % <i>ed</i> por CLAR y RMN ¹ H						% <i>conversión</i>	
				%A CLAR	%B CLAR	% <i>ed</i> CLAR	%A RMN	%B RMN	% <i>ed</i> RMN	CLAR	RMN
Método B	1.0 Equivalentes de KCN en la Solución Amortiguadora de citratos										
	5	4	1.0	50.10	49.90	0.20	50.49	49.51	0.98	97.09	95.68
	5	4	1.0	52.15	47.85	4.30	51.60	48.40	3.20	96.36	93.02
	5	4	1.0	53.66	46.34	7.32	53.42	46.58	6.84	97.69	96.65
	5	4	1.0	50.60	49.40	1.20	51.55	48.45	3.10	97.39	97.04
	10	4	1.0	53.65	46.35	7.30	54.05	45.95	8.10	99.07	97.37
	10	4	1.0	52.02	47.98	4.04	51.26	48.74	2.52	98.72	96.60
	10	4	1.0	54.75	45.25	9.50	52.61	47.39	5.22	99.97	97.67
	10	4	1.0	51.20	48.80	2.40	54.80	45.20	9.60	98.78	97.67
	20	4	1.0	56.11	43.89	12.22	55.58	44.42	11.2	88.44	90.33
	20	4	1.0	57.21	42.79	14.42	56.82	43.18	13.6	96.21	92.19
	20	4	1.0	53.45	46.55	6.90	56.82	43.18	13.6	98.88	97.57
20	4	1.0	56.89	43.11	13.78	59.84	40.16	19.7	100.0	98.5	

30	4	1.0	55.61	44.39	11.22	57.23	42.77	14.5	98.22	97.77
30	4	1.0	55.80	44.20	11.60	55.93	44.07	11.9	97.79	98.12
30	4	1.0	61.89	38.11	23.78	62.42	37.58	24.8	98.74	97.84
30	4	1.0	54.13	45.87	8.26	54.64	45.36	9.28	100	99.86

Dificultad de cuantificación señales a nivel de ruido

Se puede observar un aumento en el %ed conforme aumenta la temperatura, obteniendo relaciones diastereoisoméricas que van desde 50.5/49.5% a 5°C hasta 62.4/37.6% a 30 °C por RMN ¹H y de 50.1/49.9% a 5°C hasta 61.9/38.1% a 30°C por CLAR, con % de conversión mayores al 90% y tiempos de reacción de 90 hrs, los tiempos de reacción son más largos que los obtenidos con el método A.

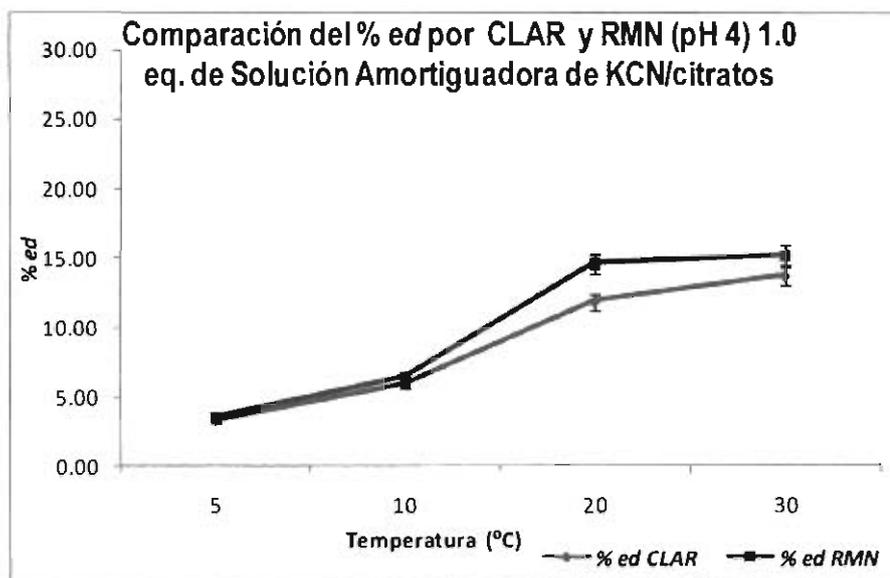
En la tabla 30 se muestra el promedio (ȳ) del grupo de datos obtenidos para el %ed y para el % de los diastereoisómeros A y B; así como la desviación estándar (DE), para cada una de las temperaturas utilizadas, tanto por CLAR y RMN¹H.

Tabla 30. Promedios (ȳ) y DE del %ed y del % del diastereoisómero A y B por CLAR y RMN utilizando el método B a pH 4 y 1.0 equivalentes de la SA.

Temperatura °C		%ed	% ÁREA por CLAR		%ed	% ÁREA por RMN	
		CLAR	% A	%B	RMN	CLAR	% A
5	ȳ	3.26	51.6275	48.3725	3.53	51.765	48.235
	DE	3.22	1.61	1.61	2.43	1.22	1.22
10	ȳ	5.81	52.905	47.095	6.36	53.18	46.82
	DE	3.19	1.60	1.60	3.14	1.57	1.57
20	ȳ	11.83	55.915	44.085	14.53	57.27	42.74
	DE	3.41	1.71	1.71	3.63	1.81	1.81
30	ȳ	13.71	56.8575	43.1425	15.11	57.555	42.445
	DE	6.87	3.44	3.44	6.82	3.41	3.41

Los resultados generados del análisis por CLAR y RMN¹H con solución amortiguadora de KCN/citratos a pH 4 y 1.0 eq. de la SA de KCN/citratos a temperatura 20 y 30°C no muestran una diferencia en la relación diastereoisomérica con respecto al método A. Sin embargo comparando la temperatura de 5°C se observa por debajo de lo obtenido con el método A, lo cual puede atribuirse a la liberación de HCN en el medio a altas temperaturas y una mayor velocidad de reacción a mayor temperatura, por lo cual a bajas temperaturas se tendría mejor controlado el no favorecer uno de los diastereoisómeros con la simple presencia de HCN en la solución amortiguadora.

En la **gráfica 2** se observa la dispersión de los datos del %ed analizados por CLAR RMN ¹H, a pH 4 y 1.0 eq. de la solución amortiguadora de KCN/citratos.



Temperatura (°C)	5	10	20	30
% ed CLAR	3.26	5.81	12.65	13.71
% ed RMN	3.53	6.36	14.53	15.11

Gráfica 2. %ed para el método B, a diferentes temperaturas pH 4 y 1.0 eq. de la SA.

Se realizó un análisis estadístico para ver si existía diferencia estadísticamente significativa entre los métodos analíticos empleados para la cuantificación del %ed y las temperaturas utilizadas para el método B, en las condiciones de pH y concentración de la SA de KCN/citratos.

Comparando las varianzas de ambos métodos analíticos, CLAR y RMN ¹H, utilizando la prueba de ANOVA, se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas del %ed obtenido con ambas métodos analíticos a las diferentes temperaturas empleadas; obteniendo una $F_{cal}=0.3129$ y una $F_{tab(\alpha=0.05/2, 1/30)}=5.57$, por lo que no hay evidencia suficiente para decir que exista diferencia estadísticamente significativa entre las medias de ambos métodos analíticos. Sin embargo, al comparar la varianza del %ed a las diferentes temperaturas, se puede observar que si hay diferencia estadísticamente, obteniendo un valor de $F_{cal}=13.3606$

y una $F_{\text{tab}(\alpha=0.05/2, 3/28)}=3.63$ con una $p<0.0001$, por lo tanto existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las temperaturas empleadas.

El análisis de t pareada mostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa para decir que hay diferencia entre los métodos analíticos CLAR y RMN ^1H ($p>0.05$).

Se realizó un análisis de t student para comparar los diferentes grupos de temperaturas, encontrando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre 5 y 10°C y entre 20 y 30°C pero 5 y 10°C, sí son diferentes a 20 y 30°C.

Se realizó una prueba de Tukey-Kramer para determinar la influencia de la temperatura en el %ed de la reacción, este se puede emplear para comparar diferentes bloques. Con lo anterior se puede concluir que no existe diferencia estadísticamente significativa entre 5 y 10°C, pero ambas son diferentes estadísticamente con 20 y 30°C y éstas a su vez no son diferentes entre si. Lo cual representa una variación e inferencia de los resultados al cambiar la temperatura de reacción.

7.7.1.2.2. Reacción Método B a pH 5

A) pH 5 y 1.0 Equivalentes de la SA de KCN/citratos

En el empleo de los lotes control en condiciones de reacción pH 5 y 1.0 equivalente de la SA de KCN/citratos, se realizaron 4 lotes por cuadruplicado a 5, 10, 20 y 30°C. En la **tabla 31** se muestra la relación diastereoisomérica de A y B, el %ed determinado por CLAR y RMN ^1H y el % de conversión por ambas técnicas obteniendo un rendimiento máximo del 100%, con tiempos de reacción de 112 hrs.

Tabla 31. % de conversión, relación diastereoisomérica y %ed en la obtención del compuesto (3b) a pH 5 y 1.0 equivalente de la SA de KCN/citratos.

	Temperatura (°C)	pH	eq. de SA	Relación diastereoisomérica y % ed por CLAR y RMN ^1H						% conversión	
				%A CLAR	%B CLAR	%ed CLAR	%A RMN	%B RMN	%ed RMN	CLAR	RMN
Método B	1.0 equivalentes de KCN en la solución amortiguadora										
	5	5	1.0	53.03	46.97	6.06	52.33	47.67	4.66	96.70	94.64
	5	5	1.0	49.06	50.97	1.91	52.59	47.41	5.13	96.36	94.79
	5	5	1.0	51.74	48.26	3.48	53.95	46.05	7.90	97.69	97.67
	5	5	1.0	52.92	47.08	5.85	51.86	48.14	3.72	99.39	99.64

10	5	1.0	55.85	44.15	11.7*	56.00	44.00	12.0	94.00	93.75
10	5	1.0	54.42	45.58	8.84	56.25	43.75	12.5	100.0	91.14
10	5	1.0	53.20	46.80	6.40	54.09	45.91	7.51	100.0	96.99
10	5	1.0	53.13	46.87	6.26	54.09	45.91	8.18	100.0	100.0
20	5	1.0	51.11	48.89	2.22*	52.46	47.54	4.92	95.95	94.33
20	5	1.0	55.01	44.99	10.02	56.50	43.50	13.0	97.47	92.19
20	5	1.0	56.83	43.17	13.66	56.50	43.50	13.0	98.95	99.70
20	5	1.0	57.13	42.87	14.26	58.47	41.53	16.9	98.61	96.50
30	5	1.0	61.59	38.41	23.18	60.76	39.24	21.5	98.34	96.93
30	5	1.0	63.97	36.03	27.94	63.95	36.05	27.9	99.09	99.32
30	5	1.0	57.20	42.80	14.40	58.75	41.25	17.5	98.90	98.76
30	5	1.0	57.59	42.41	15.18	64.23	35.76	28.5	99.15	100.0

* Dificultad de cuantificación señales a nivel de ruido

Los resultados generados del análisis por CLAR y RMN¹H con 1.0 eq de solución amortiguadora de KCN/citratos a pH 5, muestran un aumento en la relación diastereoisomérica con respecto al **método A** y al **método B (pH 4)**.

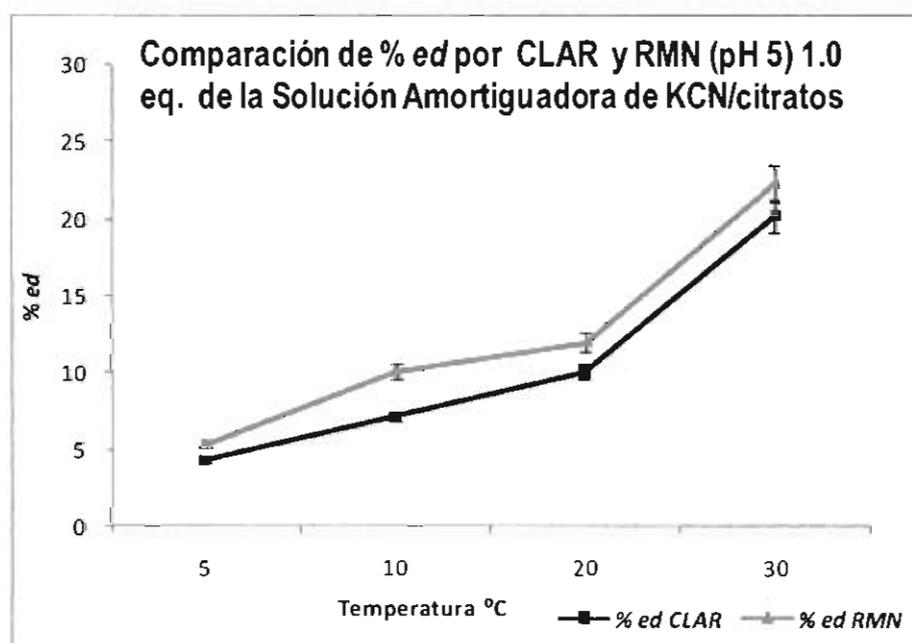
Se puede observar en la **tabla 31** un ligero aumento en el %*ed*, conforme aumenta la temperatura, obteniendo relaciones diastereoisoméricas que van desde 64.2/35.8 a 51.9/48.1 por RMN ¹H y de 64.0/36.0 a 49.1/50.9 por CLAR, con % *de conversión* mayores al 90%, con tiempos de reacción de 112 hrs, tiempos de reacción más largos que los obtenidos con el **método A** y menores que el **método B (pH 4)**.

En la **tabla 32** se muestra el promedio (\bar{y}) del grupo de datos obtenidos para el %*ed* y para el % de las relaciones diastereoisoméricas de A y B; así como la desviación estándar (DE), para cada una de las temperaturas utilizadas, tanto por CLAR y RMN ¹H.

Tabla 32. Promedios (\bar{Y}) y DE del %ed y del % del diastereoisómero A y B por CLAR y RMN utilizando el método B a pH 5 y 1.0 equivalentes de la SA de KCN/citratos.

Temperatura °C		%ed	% ÁREA por CLAR		%ed RMN	% ÁREA por RMN	
			CLAR	% A		%B	CLAR
5	\bar{Y}	4.33	51.69	48.31	5.35	52.68	47.32
	DE	1.99	1.86	1.99	1.80	0.90	0.90
10	\bar{Y}	7.17	54.15	45.85	10.05	55.11	44.89
	DE	4.44	2.43	2.43	2.57	1.18	1.18
20	\bar{Y}	10.04	55.02	44.98	11.96	55.98	44.02
	DE	5.54	2.77	2.77	5.04	2.53	2.53
30	\bar{Y}	20.18	60.09	39.91	22.30	61.92	38.08
	DE	6.52	3.26	3.26	11.94	2.64	2.64

En la gráfica 3 se observa la dispersión de los datos del %ed analizados por CLAR RMN ^1H a pH 5 y 1.0 eq. de la solución amortiguadora de KCN/citratos.



Temperatura (°C)	5	10	20	30
% ed CLAR	4.33	7.17	10.04	20.18
% ed RMN	7.18	10.05	11.96	22.31

Gráfica 3. %ed para el método B, a diferentes temperaturas pH 5 y 1.0 eq. de la SA de KCN/citratos.

Las **gráficas 2 y 3** de dispersión de datos muestran un incremento en los *%ed* conforme aumenta la temperatura, demostrándose una influencia de la temperatura en la adición espontánea del ión CN^- en la reacción de formación de la cianohidrina. Además de esto, se debe considerar el pH de la solución de citratos, ya que los resultados obtenidos en los controles, muestran una influencia en la relación diastereoisomérica obtenida y por ende en el *%ed* calculado para los lotes elaborados.

Se realizó un análisis estadístico para ver si existía diferencia estadísticamente significativa entre las temperaturas y los métodos analíticos para el **método B** en estas condiciones de temperatura y concentración de la SA de KCN/citratos.

Los resultados del ANOVA muestran que no existe diferencia entre los valores del *%ed* obtenido con ambas técnicas analíticas CLAR y RMN ^1H a las diferentes temperaturas utilizadas; obteniendo una $F_{\text{cal}}=0.6065$ y una $F_{\text{tab}(\alpha=0.05/2, 1/30)}=5.57$ por lo que no hay evidencia suficiente para decir que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de ambos métodos analíticos. Sin embargo, al comparar la varianza del *%ed* a las diferentes temperaturas, se puede observar que existe diferencia estadística obteniendo un valor de $F_{\text{cal}}=24.7686$ y una $F_{\text{tab}(\alpha=0.05/2, 3/28)}=3.63$ con una $p<0.0001$, por lo tanto existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las temperaturas empleadas.

El análisis de t pareada mostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa por lo cual los métodos analíticos de CLAR y RMN ^1H ($p>0.05$) pueden ser empleados indistintamente.

Para comparar las diferentes temperaturas se utilizó el análisis de t student, el cual compara medias poblacionales, encontrando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre 5, 10 y 20°C pero son diferentes estadísticamente con 30°C.

Al mismo tiempo, se realizó una prueba de Tukey-Kramer para determinar la influencia de la temperatura en el *%ed* de la reacción. Esta prueba se encarga de comparar diferentes bloques, obteniendo los mismos resultados que con la t student, al comparar los diferentes grupos de temperaturas, se puede concluir que no existe

diferencia estadísticamente significativa entre 5, 10 y 20°C, sin embargo son diferentes estadísticamente con respecto a 30°C. Lo cual representa una variación e inferencia de los resultados al cambiar la temperatura de reacción a 30°C.

B) pH 5 y 1.5 equivalentes de la SA de KCN/citratos

Se realizaron 6 lotes a 20 y 30°C, empleando solución de citratos a pH 5, utilizando 1.5 equivalentes de la solución amortiguadora. En la **tabla 33** se muestra el % de conversión, la relación diastereoisomérica y se determinó el %ed por CLAR y RMN ¹H y el % de conversión por ambas técnicas obteniendo un rendimiento máximo del 99.35 %.

Tabla 33. % conversión, relación diastereoisomérica y %ed en la obtención del compuesto (**3b**) a pH 5 y 1.5 equivalentes de la SA.

	Temperatura (°C)	pH	eq. de SA	Relación diastereoisomérica y %ed por CLAR y RMN ¹ H						% conversión	
				%A CLAR	%B CLAR	%ed CLAR	%A RMN	%B RMN	%ed RMN	CLAR	RMN
Método B	1.5 equivalentes de KCN en la Solución Amortiguadora										
	20	5	1.5	54.47	45.53	8.94	54.05	45.95	8.10	99.60	99.20
	20	5	1.5	55.35	44.65	10.70	55.05	44.95	10.1	97.40	98.16
	20	5	1.5	54.20	45.80	8.40	53.75	46.25	7.50	95.30	97.15
	30	5	1.5	51.16	48.84	2.32	52.05	47.95	4.10	98.45	98.65
	30	5	1.5	52.86	47.14	5.72	51.88	48.12	3.76	97.35	99.35
	30	5	1.5	50.67	49.33	1.34	51.09	48.91	2.18	96.14	97.16

Los resultados generados del análisis por CLAR y RMN ¹H con solución amortiguadora de KCN/citratos a pH 5 y 1.5 eq. de KCN en la SA, muestran una disminución en la relación diastereoisomérica con respecto al **método B** pH 4 y pH 5, utilizando 1.0 eq. de la SA, obteniendo tiempos de reacción más cortos de 92 hrs.

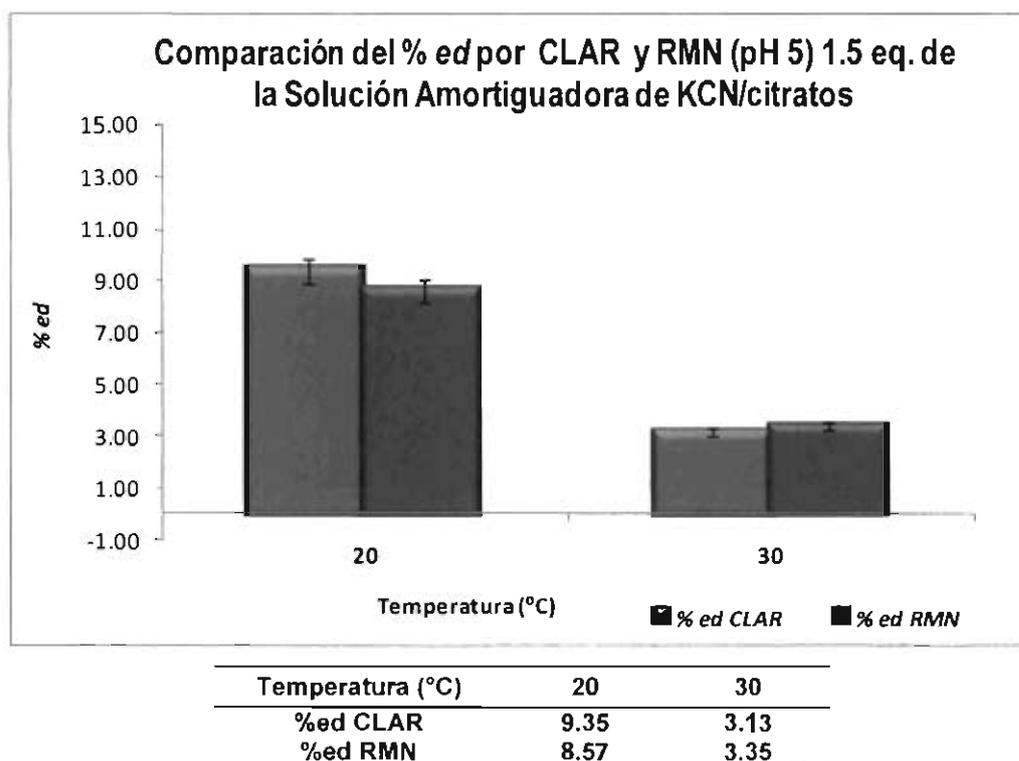
No se puede observar un gran diferencia en la relación diastereoisomérica al cambiar la temperatura, obteniendo las relaciones diastereoisoméricas que van desde 55.05/44.95 a 51.1/48.9 por RMN ¹H y de 55.4/44.6 a 50.7/49.3 por CLAR, con % conversión mayores al 97% y con tiempos de reacción de 92 hrs; siendo tiempos de reacción más largos que los obtenidos con el **método A** pero más cortos que los obtenidos con el **método B** a pH 5 y con 1.0 eq. de la SA.

En la **tabla 34** se muestra el promedio (\bar{y}) del grupo de datos obtenidos para el %ed y para el % de los diastereoisómeros A y B; así como la desviación estándar (DE), para cada una de las temperaturas utilizadas, tanto por CLAR y RMN ^1H .

Tabla 34. Promedios (\bar{Y}) y DE del % ed y del % del diastereoisómero A y B por CLAR y RMN utilizando el método B a pH 5 y 1.5 equivalentes de la SA.

Temperatura °C		%ed	% ÁREA por CLAR		%ed	% ÁREA por RMN	
		CLAR	% A	%B	RMN	% A	%B
20	\bar{Y}	9.35	54.67	45.33	8.57	54.28	45.72
	DE	1.20	0.60	0.60	1.36	0.68	0.68
30	\bar{Y}	3.13	51.56	48.44	3.35	51.67	48.33
	DE	2.30	1.15	1.15	1.02	0.51	0.51

En la **gráfica 4** se observa el histograma donde se comparan los datos del %ed analizados por CLAR y RMN ^1H a pH 5 y 1.5 eq. de SA a 20 y 30°C. El %ed es menor a 10% para ambas temperaturas.



Gráfica 4. %ed para el método B, a diferentes temperaturas pH 5 y 1.5 eq. de la SA.

Se realizó el análisis estadístico para ver si existía diferencia estadísticamente significativa, entre las temperaturas y los métodos analíticos, para el **método B** en estas condiciones de temperatura y concentración de la SA de KCN/citratos.

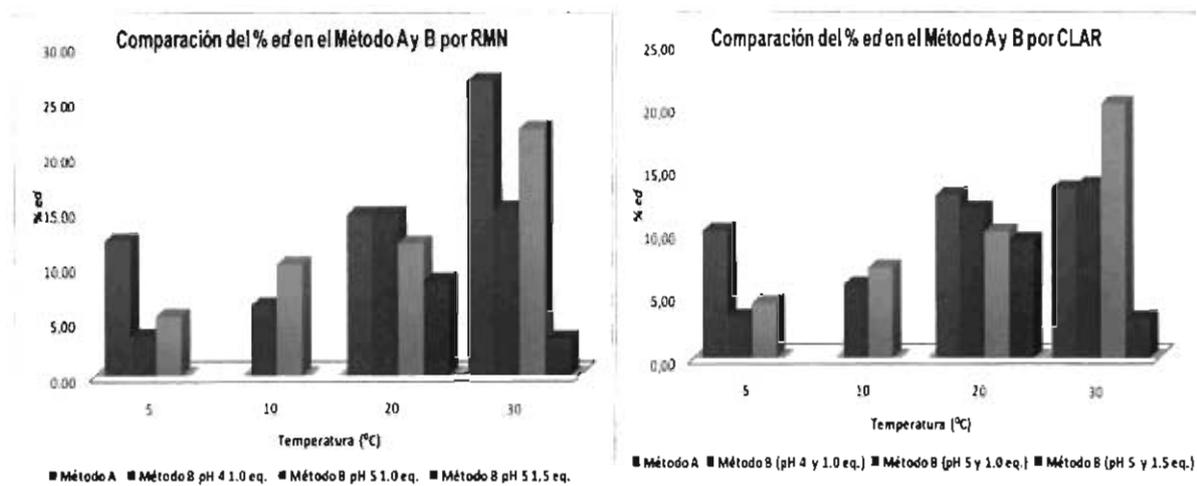
Los resultados del ANOVA muestran que no existe diferencia entre los valores del % *ed* obtenido con ambas técnicas analíticas CLAR y RMN ¹H; obteniendo una $F_{cal}=0.0199$ y una $F_{tab(\alpha=0.05/2, 1/10)}=6.94$ por lo que no existe evidencia suficiente para decir que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de ambos métodos analíticos. Sin embargo al comparar la varianza del %*ed* a las diferentes temperaturas se puede observar que existe diferencia estadística, obteniendo un valor de $F_{cal}=48.4653$ y una $F_{tab(\alpha=0.05/2, 1/10)}=6.94$ con una $p<0.0001$, por lo tanto existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las temperaturas empleadas.

El análisis de t pareada mostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa para decir que existe diferencia entre los métodos analíticos CLAR y RMN ¹H ($p>0.05$).

Para comparar las diferentes temperaturas se utilizó el análisis de t student, el cual compara las medias poblacionales encontrando que existe diferencia estadísticamente significativa entre 20 y 30°C.

El análisis estadístico elaborado para el **método B** a pH 4 y pH 5, al realizar la prueba de t pareada para las mediciones de %*ed* por CLAR y RMN ¹H, demostró que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados calculados con una probabilidad menor a 0.5 respecto de las temperaturas (5, 10, 20 y 30°C).

En la **gráfica 5** se muestran los histogramas donde se comparan los dos métodos A y B y la diferencia de %*ed* calculado en cada uno, como se puede observar en ambas gráficas la obtención de un mayor o menor exceso diastereoisomérico esta determinado en este caso por dos factores determinantes como son la temperatura y el pH.



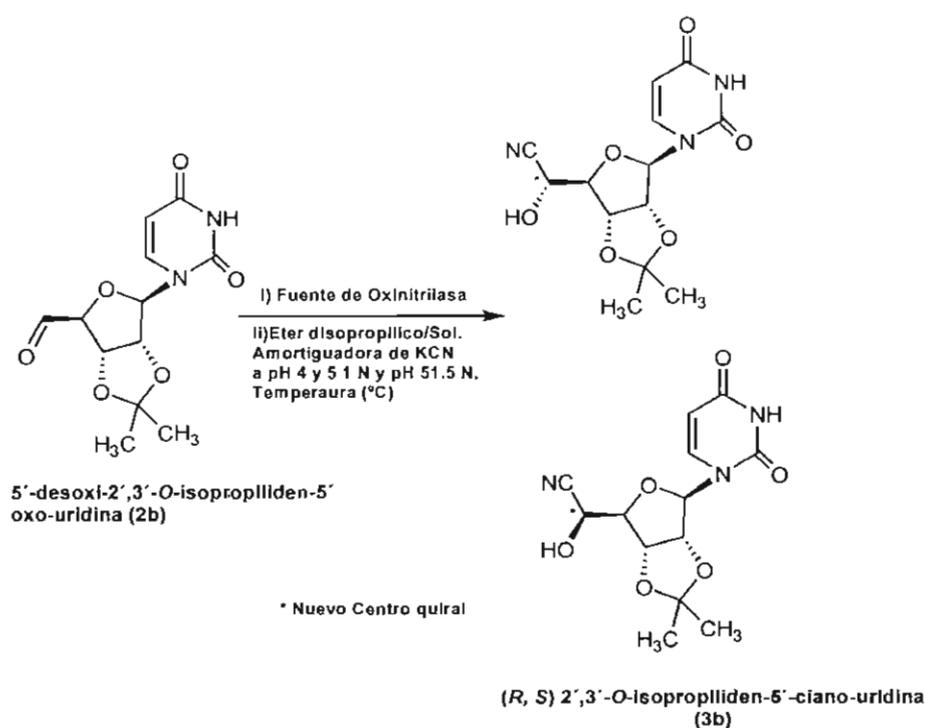
Gráfica 5. Comparación del %ed para ambos métodos A y B, a diferentes temperaturas.

En la **gráfica 5** se puede distinguir que al emplear un sistema “micro-acuoso” a pH 5 y 30°C se puede obtener el mayor exceso diastereoisomérico, en ambos métodos a pH 4 y pH 5 y 1.0 equivalente del ion CN^- , resulta más conveniente utilizar temperaturas altas obteniéndose %ed altos, dando como resultado la obtención de cianohidrinás con una mayor pureza óptica.

Con estos resultados se confirma que al emplear RMN y CLAR se pueden determinar el exceso diastereoisomérico para el compuesto (**3b**), obteniéndose resultados confiables y reproducibles por ambos métodos sin destruir la muestra, por lo tanto se puede cuantificar el %ed con ambas técnicas sin diferencia estadísticamente significativa. Lo anterior permite contar con dos métodos rápidos y no destructivos para la cuantificación del %ed. Además es importante mencionar el efecto que ejerce el pH, la temperatura y los medios de reacción utilizados, ya que los resultados se ven modificados al cambiar alguna de estas variables. Con este estudio se pueden realizar mejoras para la implementación de estas técnicas y determinar cual de ellas es más rápida, eficiente y de menor costo para la obtención de la información requerida en función de las necesidades estructurales de la molécula a considerar en una investigación.

7.8. Proceso Biocatalítico

Con base en los resultados obtenidos de los dos métodos químicos y el pequeño valor de *%ed* observados, se optó por probar que el método biocatalítico como una opción para incrementar el % al generar un nuevo centro estereogénico. Inicialmente se estudió el comportamiento del aldehído (**2b**) en la reacción de formación de la cianohidrina enzimática, empleando un sistema bifásico disolvente orgánico/solución de citratos, 1 equivalente de KCN a pH 4 y 5. La cantidad de enzima utilizada en los procesos biocatalíticos fue en relación sustrato/biocatalizador 1:1 a diferentes temperaturas 5, 10 y 20°C empleando como disolvente orgánico éter diisopropílico, ver **esquema 30**.



Esquema 30. Esquema general de la síntesis biocatalítica para la obtención de la cianohidrina de uridina (**3b**).

Se decidió utilizar para el proceso biocatalítico la solución de citratos a pH 5, dado que en la literatura se considera como el pH óptimo en el cual las oxinitrilasas, obtenidas de fuentes vegetales, muestran su mayor actividad enzimática. Probando las temperaturas de 5, 10, 20 y 30°C, debido a que a mayor temperatura se

incrementa la adición química de ácido cianhídrico al carbonilo, provocando con ello la obtención de un menor %*ed*.

Se elaboraron 50 lotes por triplicado distribuidos en las diferentes temperaturas, pH, y la fuente de oxinitrilasa empleada, en las tablas se muestran los promedios de cada biocatalizador teniendo entre 4 y 5 datos para cada uno. En la **figura 46** se muestra el cromatograma y el espectro de RMN de un experimento biocatalítico con la finalidad de identificar nuevamente los picos y las señales utilizadas en ambas técnicas analíticas para la determinación de la relación diastereoisomérica como del % de conversión.

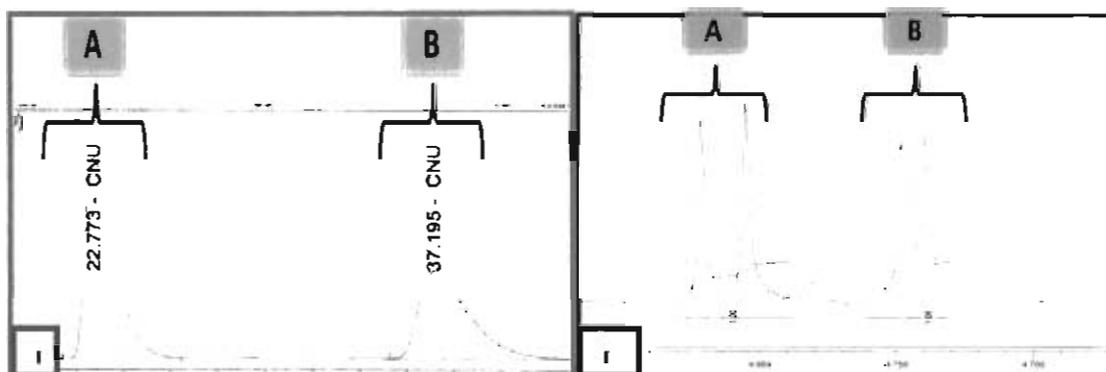


Figura 46. I) Cromatograma y II) Espectro de RMN para la obtención de la cianohidrina de uridina (3b), A y B: Picos utilizados para la determinación del %*ed*.

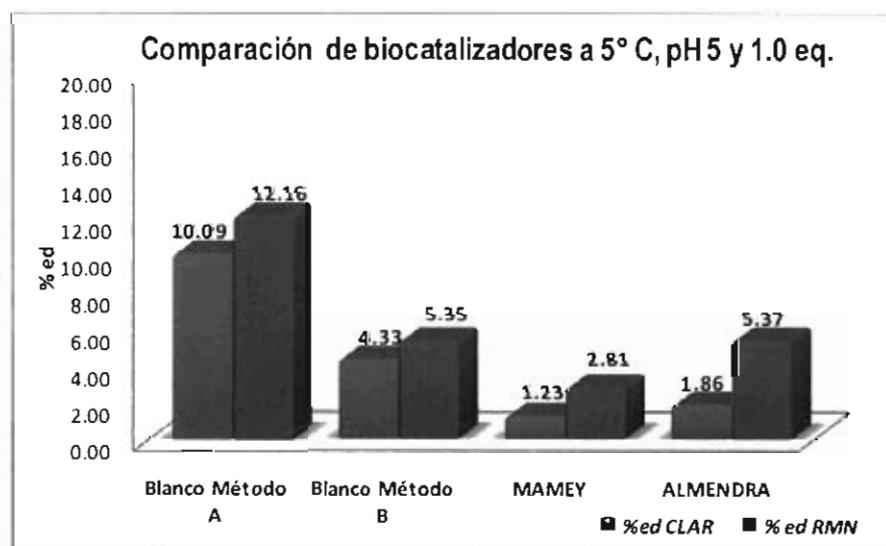
Una vez analizada cada muestra obtenida por vía biocatalítica por: CLAR y RMN ^1H , se procedió a determinar en cuál de las diferentes fuentes vegetales utilizadas, se obtuvieron cianohidrininas con una mayor pureza óptica. Se seleccionaron fuentes vegetales ricos en oxinitrilasas como son los géneros: *Prunus*, *Annona* y *Pouteria*, en los que podemos encontrar a la almendra, ciruela, capulín, cereza, durazno, guanábana y mamey. A continuación se muestran los resultados para las síntesis biocatalíticas elaboradas con los diferentes biocatalizadores seleccionados, empleando diferentes temperaturas y pH.

Primero se realizó un análisis de las diferentes temperaturas 5, 20 y 30°C utilizando 4 biocatalizadores (mamey, almendra, ciruela y capulín) en las condiciones recomendadas en la bibliografía para la solución amortiguadora de citrato/ KCN pH 5 y 1.0 eq. de la SA.

En la **tabla 35** se muestran los resultados de los *%ed* y el *% de conversión*, al utilizar 1.0 eq. de la solución de citratos a pH 5, a 5°C y los diferentes biocatalizadores utilizados en estas condiciones. Es importante señalar que se buscó determinar el mejor tiempo de reacción con el objetivo de optimizar la reacción y obtener altos porcentajes de conversión, sin embargo al presentar elevados *% de conversión* en estos procesos de cianación, hay que considerar que en ciertos casos se induce el proceso no enzimático (químico). Así mismo, en la **Gráfica 6** se puede observar la comparación de los resultados obtenidos con los diferentes biocatalizadores y el **método A y B** (control del proceso no enzimático).

Tabla 35. *%ed* de la cianohidrina (**3b**) en sistemas bifásicos a 5°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA.

Fuente	Temperatura (°C)	eq. de SA	Relación Sustrato: Biocatalizador	pH	<i>%ed</i> CLAR	<i>%ed</i> RMN	<i>% conversión</i>
Método A	5	1.0	--	--	10.09	12.16	94.77
Método B	5	1.0	--	5	4.335	5.35	96.69
Mamey	5	1.0	1:1	5	1.23	2.81	92.56
Almendra	5	1.0	1:1	5	1.86	5.37	100.0



Gráfica 6. *%ed*, para el **método A y B** y cada biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 5°C.

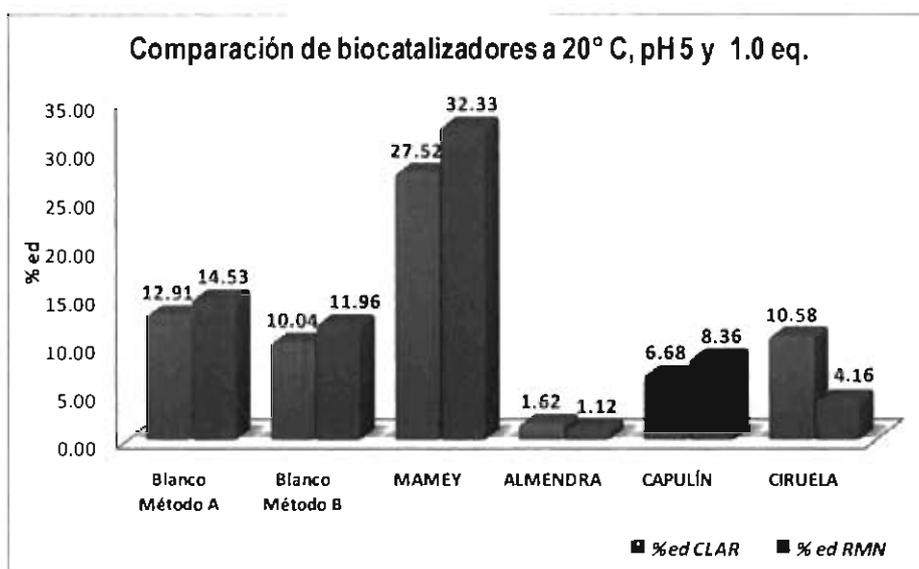
En la **gráfica 6** se puede observar que los biocatalizadores no presentan un *%ed* mayor al **método B** (control), la inducción no sobrepasa el 6 % de *ed*. En este caso

los biocatalizadores utilizados no presentan diferencia al control, por lo que se puede decir que en estas condiciones, con los biocatalizadores utilizados, no se genera un aumento en la pureza óptica de la cianohidrina además de que los %ed son menores al control químico (**Método A**).

A la temperatura de 20°C hubo un aumento en el %ed para el biocatalizador mamey ver **tabla 36**, presentando un %ed de 27.2 y 32.3 por CLAR y RMN¹H respectivamente, ver **gráfica 7** en donde se compararon los tres métodos.

Tabla 36. %ed de la cianohidrina (**3b**) en sistemas bifásicos a 20°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA.

Fuente	Temperatura (°C)	eq. de SA	Relación Sustrato: Biocatalizador	pH	%ed CLAR	%ed RMN	% conversión
Método A	20	1.0	--	--	12.91	14.53	94.47
Método B	20	1.0	--	5	10.04	11.96	95.68
Mamey	20	1.0	1:1	5	27.57	32.33	97.75
Almendra	20	1.0	1:1	5	1.62	1.12	98.67
Capulín	20	1.0	1:1	5	6.70	8.40	100.00
Ciruela	20	1.0	1:1	5	4.40	3.80	100.00



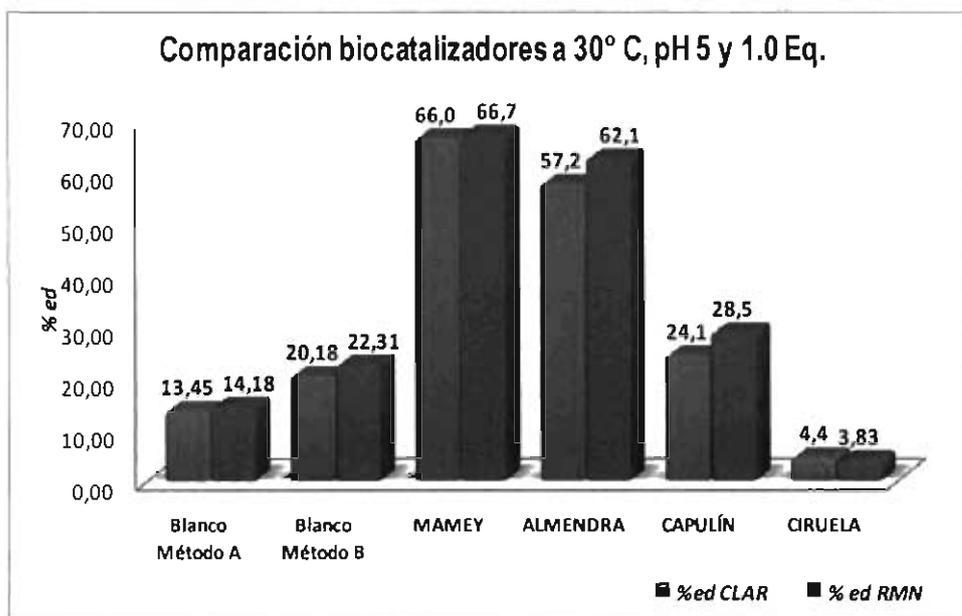
Gráfica 7. %ed, para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 20°C.

En la **gráfica 7** podemos observar que a 20°C y un pH 5, el mejor biocatalizador es el mamey, incrementándose en un 17% el %*ed* con respecto a los controles, presentando una relación de diastereoisómeros por CLAR de 63.8/36.2 y por RMN de 66.2/33.8, mientras que los biocatalizadores almendra, capulín y ciruela no mostraron una inducción mayor al control. El menor %*ed* fue para el biocatalizador almendra con una relación de diastereoisómeros de 50.8/49.2 y 50.6/49.4 por CLAR y RMN respectivamente. Ciruela y capulín presentan un %*ed* mayor a la almendra pero no mayor al control. El mejor biocatalizador a esta temperatura fue mamey con %*ed* de 27.5 por CLAR y 32.3 en RMN ¹H.

A 30°C se obtienen los mejores %*ed* con los catalizadores mamey y almendra con %*ed* de más del 60%, ver **tabla 37**. En la **gráfica 8**, podemos observar que mamey y almendra son los biocatalizadores donde se presenta un mayor exceso comparado con los controles **método A y B**, las relaciones de diastereoisómeros para los biocatalizadores son las siguientes: mamey 82.99/17.01 por CLAR y 83.4/16.6 RMN ¹H; mientras que para almendra 78.1/21.9 y 81.1/18.9 por CLAR y RMN ¹H respectivamente.

Tabla 37. %*ed* de la cianohidrina (**3b**) en sistemas bifásicos a 30°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA.

Fuente	Temperatura (°C)	eq. de SA	Relación Sustrato: Biocatalizador	pH	% <i>ed</i> CLAR	% <i>ed</i> RMN	% conversión
Método A	30	1.0	--	--	13.45	14.18	91.87
Método B	30	1.0	--	5	20.18	22.31	98.75
Mamey	30	1.0	1:1	5	66.00	66.70	95.24
Almendra	30	1.0	1:1	5	57.22	62.10	94.38
Capulín	30	1.0	1:1	5	24.10	28.50	96.54
Ciruela	30	1.0	1:1	5	4.40	3.80	96.96



Gráfica 8. %ed, para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 30°C.

Como se puede observar el mejor %ed se presentó a 30°C con mamey y almendra como biocatalizadores en relación 1:1 sustrato:enzima, a pH 5 y 1.0 eq. de la SA. En las gráficas 6, 7 y 8 se observó que dependiendo del biocatalizador, la temperatura es un factor clave para la inducción asimétrica en los diastereoisómeros formados, ya que a 30°C almendra da el mejor %ed, y a 20°C no se favorece la inducción; en 20°C, a excepción de mamey, todos los biocatalizadores utilizados dan un bajo %ed. Esto puede deberse que al preparar los polvos acetónidos en las diferentes fuentes de oxinitrilasas se considera que las enzimas están inmovilizadas en el soporte natural de cada semilla y como las fuentes varían es de suponer que también el soporte, lo que nos lleva a concluir que cada fuente requiere diferentes condiciones para activar dicha enzima y se tenga así una mayor interacción de la misma con el sustrato para realizar la inducción asimétrica deseada. Suponiendo que el soporte del polvo acetónico de almendra, mamey y capulín requieran mayor energía para liberar la enzima y de esta manera interactúe con el sustrato mientras que para ciruela, esta temperatura pudiera desactivarla y no favorezca la inducción.

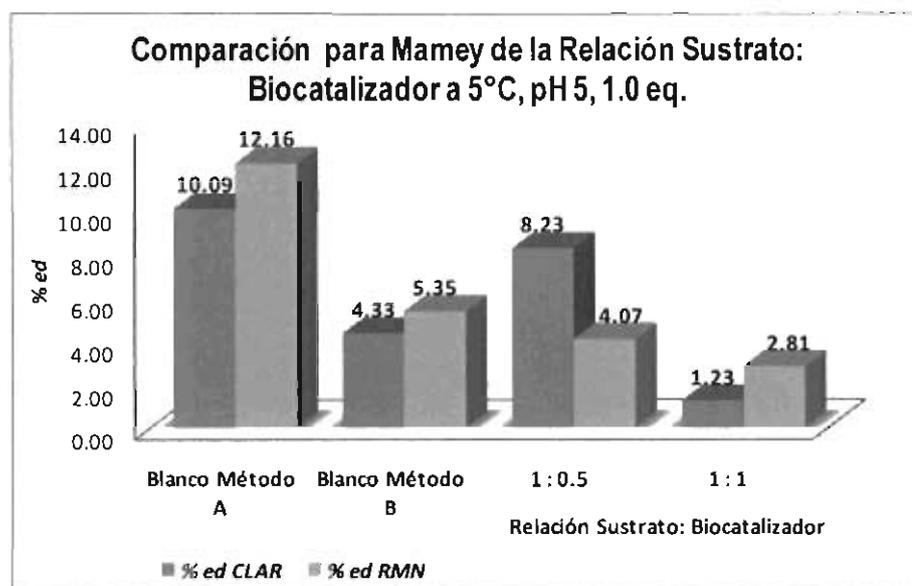
Se realizaron algunas modificaciones en la metodología buscando obtener menores tiempos de reacción y altos %ed, utilizando como biocatalizadores mamey y almendra

modificando la relación sustrato:biocatalizador se probó con 1:0.5, 1:1, 1:2 y 1:4 a 5, 20 y 30°C.

En la **tabla 38** se muestran los resultados de los *%ed* y el *% de conversión*, al utilizar 1.0 eq. de la SA a pH 5 y con una temperatura de 5°C para mamey en diferentes relaciones sustrato:biocatalizador. Así mismo en la **gráfica 9** se puede observar la comparación de los resultados obtenidos con los diferentes biocatalizadores y el **método A y B** (control del proceso no enzimático).

Tabla 38. *%ed* de la cianohidrina (**3b**) en sistemas bifásicos a 5°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA.

Fuente	Temperatura (°C)	eq. de SA	Relación Sustrato: Biocatalizador	pH	<i>%ed</i> CLAR	<i>%ed</i> RMN	% conversión
Método A	5	1.0	--	--	10.09	12.16	94.77
Método B	5	1.0	--	5	4.33	5.35	96.69
Mamey	5	1.0	1:1	5	1.23	2.81	92.56
Mamey	5	1.0	1:0.5	5	8.23	4.07	84.38



Gráfica 9. *%ed*, para el método A y B y mamey como biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 5°C a diferentes relaciones sustrato:biocatalizador.

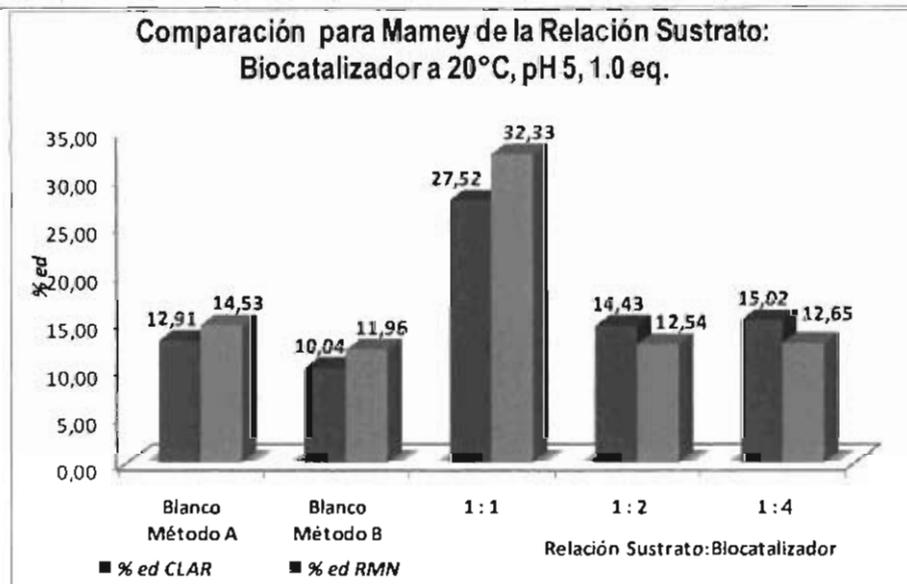
En la **gráfica 9** se observa que no hay impacto al cambiar la relación sustrato biocatalizador en el *%ed*, la inducción no sobrepasa el *%ed*. En este caso los biocatalizadores utilizados no presentan diferencia al control, no se genera una

disminución del tiempo de reacción y se evidenció una mayor dispersión en los datos estadísticos en la relación diastereoisomérica calculada por ambas técnicas analíticas, lo cual se atribuye directamente al bajo % de conversión obtenido en el caso de utilizar la relación 1:05 sustrato:biocatalizador, debido a la duplicidad de señales y a las trazas de la materia prima, dificultando la cuantificación por RMN ¹H.

En la **tabla 39** se muestran los resultados de los %ed y el % de conversión, al utilizar temperaturas de 20°C para mamey en las diferentes relaciones sustrato:biocatalizador. Así mismo en la **gráfica 10** se puede observar la comparación de los resultados obtenidos con los diferentes biocatalizadores y el método A y B (control del proceso no enzimático).

Tabla 39. %ed de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 20°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA.

Fuente	Temperatura (°C)	eq. de SA	Relación Sustrato: Biocatalizador	pH	%ed CLAR	%ed RMN	% conversión
Método A	20	1.0	--	--	12.91	14.53	94.47
Método B	20	1.0	--	5	10.04	11.96	95.68
Mamey	20	1.0	1:1	5	27.57	32.33	97.75
Mamey	20	1.0	1:2	5	14.43	12.54	99.60
Mamey	20	1.0	1:4	5	15.02	12.65	98.52



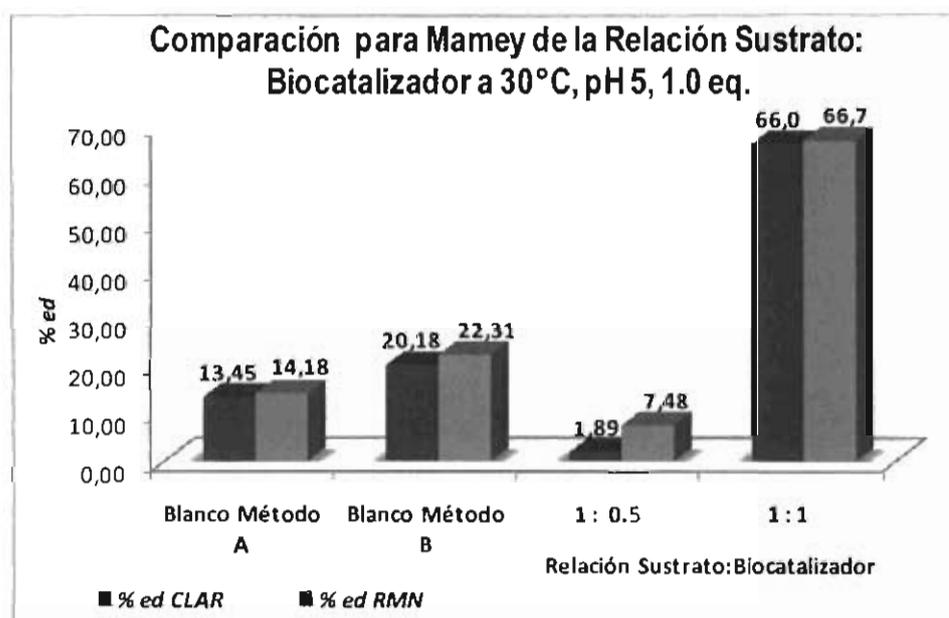
Gráfica 10. %ed, para el método A y B y mamey como biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 20°C y diferentes relaciones sustrato:biocatalizador.

En la **gráfica 10** podemos observar que a 20°C, pH 5, 1.0 eq. de la SA y mamey como biocatalizador, al incrementar la relación sustrato:biocatalizador el tiempo de reacción disminuyó a la mitad, pero también se observa una disminución en el %ed, mayor al 13% de ed.

Para el biocatalizador mamey a 30°C ver **tabla 40**, se muestran los resultados de los %ed y el % de conversión.

Tabla 40. %ed de la cianohidrina (**3b**) en sistemas bifásicos a 30 °C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA.

Fuente	Temperatura (°C)	eq. de SA	Relación Sustrato: Biocatalizador	pH	%ed CLAR	%ed RMN	% conversión
Método A	30	1.0	--	--	13.45	14.18	91.87
Método B	30	1.0	--	5	20.18	22.31	98.75
Mamey	30	1.0	1.0.5	5	1.89	7.48	92.54
Mamey	30	1.0	1:1	5	66.00	66.70	95.24



Gráfica 11. %ed, para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 30°C.

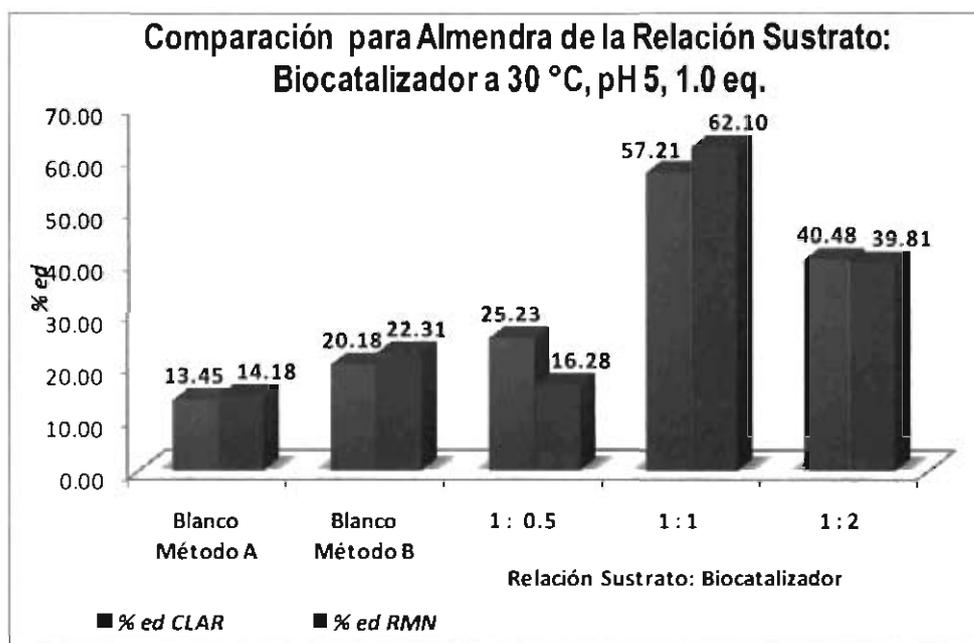
Como se observa el mejor %ed se presentó a 30°C con la relación 1:1 sustrato:biocatalizador, a pH 5 y 1.0 eq, al disminuir la relación de biocatalizador se obtuvo mucha variación en los resultados. Por lo tanto para el biocatalizador mamey

la mejor relación sustrato:biocatalizador para este compuesto, en todas las temperaturas empleadas, es de 1:1.

Para el biocatalizador almendra a 30°C ver **tabla 41**, se muestran los resultados de los %ed y el % de conversión al utilizar la temperatura de 30°C en diferentes relaciones sustrato:biocatalizador. En la **gráfica 12** se visualiza la comparación de las diferentes relaciones con los controles.

Tabla 41. %ed de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 30°C a pH 5 y 1.0 eq. de la SA.

Fuente	Temperatura (°C)	eq. de SA	Relación Sustrato: Biocatalizador	pH	%ed CLAR	%ed RMN	% conversión
Método A	30	1.0	--	--	13.45	14.18	91.87
Método B	30	1.0	--	5	20.18	22.31	98.75
Almendra	30	1.0	1:0.5	5	25.23	16.28	89.87
Almendra	30	1.0	1:1	5	57.21	62.10	94.38
Almendra	30	1.0	1:2	5	40.48	39.81	98.76



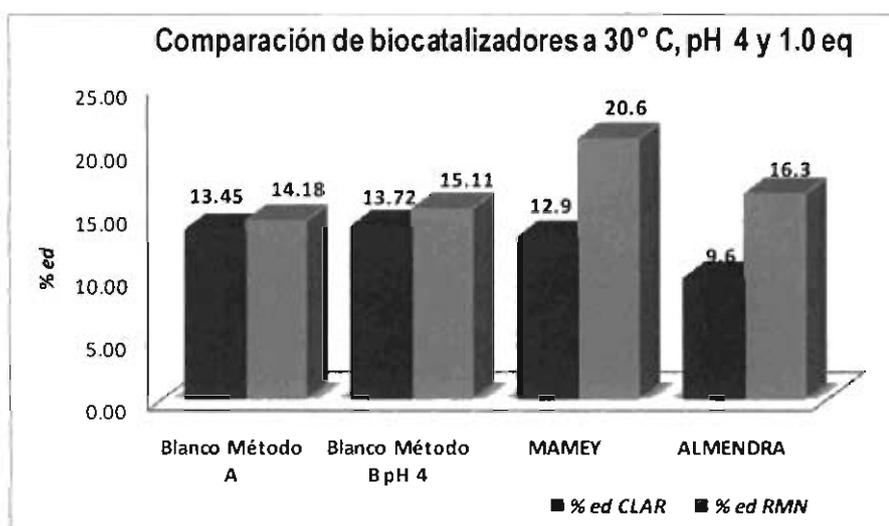
Gráfica 12. %ed, para el Método A y B y cada biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq. de la SA a 30°C.

Como se puede observar en la **gráfica 12** el mejor *%ed* se presentó a 30°C con la relación 1:1 sustrato:biocatalizador a pH 5 y 1.0 eq, al disminuir la relación del biocatalizador se obtuvo mucha variación. Al utilizar la relación sustrato:biocatalizador 1:2, se disminuye el tiempo de reacción con *%ed* de 40% y una relación diastereoisomérica de 70.2/29.8 para CLAR y de 69.9/30.1 por RMN ¹H, menor al 10% que lo obtenido a 30°C. Por lo tanto para el biocatalizador almendra, la mejor relación sustrato biocatalizador para este compuesto a 30°C es 1:1.

Se realizaron algunos experimentos disminuyendo el pH de la solución de citratos a 4, los mejores resultados se obtuvieron a una temperatura de 30°C, con biocatalizador de mamey y almendra, relación sustrato biocatalizador 1:1. Los *%ed* a pH 4 no muestran una inducción significativa comparada con los controles. El mayor *%ed* se obtuvo con mamey, 12.9 y 20.6 *%ed* por CLAR y RMN ¹H y para almendra de 9.6 y 16.0 *%ed* por CLAR y RMN ¹H respectivamente, ver **tabla 42** y **gráfica 13**.

Tabla 42. *%ed* de la cianohidrina (**3b**) en sistemas bifásicos a 30 °C a pH 4 y 1.0 eq. de la SA.

Fuente	Temperatura (°C)	eq. de SA	Relación Sustrato: Biocatalizador	pH	<i>%ed</i> CLAR	<i>%ed</i> RMN	% conversión
Método A	30	1.0	--	--	13.45	14.18	91.87
Método B	30	1.0	--	4	13.72	15.11	98.75
Mamey	30	1.0	1:1	4	12.90	20.60	96.37
Almendra	30	1.0	1:1	4	9.60	16.30	95.45

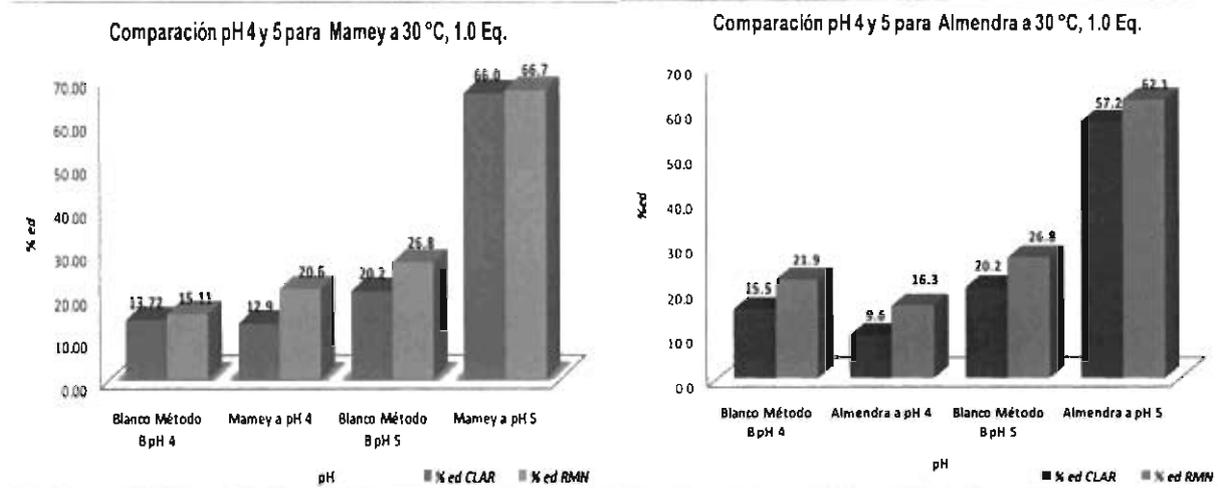


Gráfica 13. *%ed*, para el método A y B y cada biocatalizador a pH 4 y 1.0 eq de la SA a 30°C.

Se compararon los %ed para mamey y almendra a 30°C y 1.0 eq. de la SA a los diferentes pH 4 y 5 como se muestra en la **tabla 43** y en la **gráfica 14**.

Tabla 43. %ed de la cianohidrina (**3b**) en sistemas bifásicos a 30°C a pH 4 y pH 5 a 1.0 eq. de la SA.

Fuente	Temperatura (°C)	eq. de SA	Relación Sustrato: Biocatalizador	pH	%ed CLAR	%ed RMN	% conversión
Método A	30	1.0	--	--	13.45	14.18	91.87
Método B	30	1.0	--	4	13.72	15.11	98.75
Mamey	30	1.0	1:1	4	12.90	20.60	96.37
Almendra	30	1.0	1:1	4	9.60	16.30	95.45
Método B	30	1.0	--	5	20.18	22.31	98.75
Mamey	30	1.0	1:1	5	66.00	66.70	95.24
Almendra	30	1.0	1:1	5	57.22	62.10	94.38



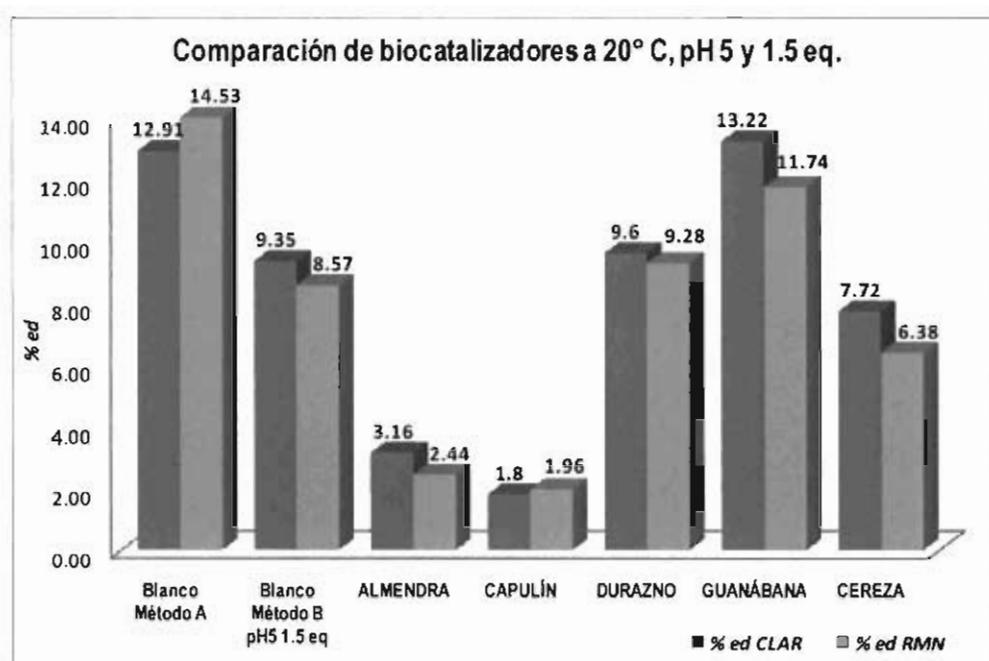
Gráfica 14. %ed, para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 4 y 5 a 1.0 eq de la SA y 30°C.

Los %ed a pH 4 se encuentran por debajo de lo observado para los mismos biocatalizadores, en la mismas condiciones pero a pH 5 como se puede observar en la **gráfica 14**, por lo tanto se tiene un mayor %ed a pH 5 y un 1.0 eq. de la SA.

En las biocatálisis donde se utilizó solución amortiguadora 1.5 eq. a pH 5 y fuentes de oxinitrilasas de almendra, capulín, durazno, guanábana y cereza, se obtuvo la mayor inducción con guanábana, con un %ed de 13.2% por CLAR y 11.7% por RMN ¹H respectivamente, como se aprecia en la **tabla 44** y en la **gráfica 15**.

Tabla 44. %ed de la cianohidrina (**3b**) en sistemas bifásicos a 20°C a pH 5 y 1.5 eq. de la SA.

Fuente	Temperatura (°C)	eq. de SA	Relación Sustrato: Biocatalizador	pH	%ed CLAR	%ed RMN	% conversión
Método A	20	--	--	--	12.91	14.53	94.47
Método B	20	1.5	--	5	9.35	8.57	98.17
Almendra	20	1.5	1:1	5	3.16	2.44	99.56
Capulín	20	1.5	1:1	5	1.80	1.96	98.76
Durazno	20	1.5	1:1	5	9.60	9.28	97.65
Guanábana	20	1.5	1:1	5	13.22	11.74	98.64
Cereza	20	1.5	1:1	5	7.72	6.38	99.37

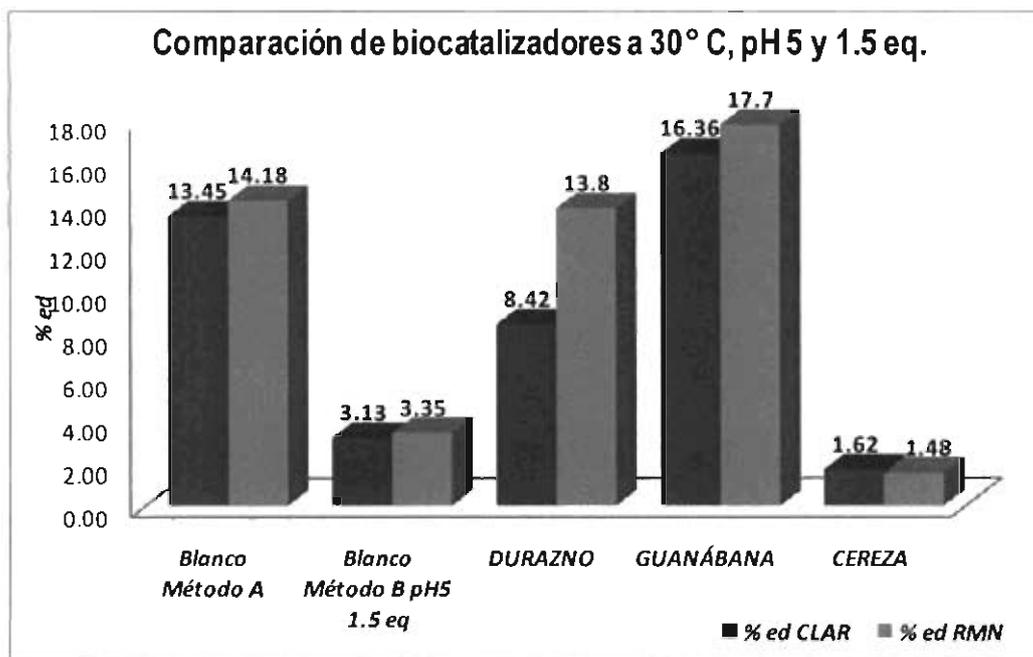


Gráfica 15. %ed, para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 5 a 1.5 eq de la SA y 20°C.

Mientras que a 30°C con solución amortiguadora 1.5 N a pH 5, las fuentes de oxinitrilasas utilizadas fueron durazno, guanábana y cereza; obteniéndose la mayor inducción para guanábana con un %ed de 16.4% por CLAR y 17.7%, por RMN ¹H respectivamente, como se aprecia en la **tabla 45** y en la **gráfica 16**.

Tabla 45. %ed de la cianohidrina (3b) en sistemas bifásicos a 20°C a pH 5 y 1.5 eq. de la SA.

Fuente	Temperatura (°C)	eq. de SA	Relación Sustrato: Biocatalizador	pH	%ed CLAR	%ed RMN	% conversión
Método A	30	--	--	--	13.45	14.18	94.47
Método B	20	1.5	--	5	3.13	3.35	98.39
Durazno	20	1.5	1:1	5	8.42	13.8	96.54
Guanábana	20	1.5	1:1	5	16.36	17.7	98.67
Cereza	20	1.5	1:1	5	1.62	1.48	93.24



Gráfica 16. %ed, para el método A y B y para cada biocatalizador a pH 5 a 1.5 eq de la SA y 30°C.

De las gráficas 15 y 16 se desprende que el mejor biocatalizador, en estas condiciones, es guanábana aunque solo supera a los controles a 30°C además de que tiene un mayor %ed superando a los métodos químicos reportados en la literatura, en donde el exceso diastereoisomérico informado es de solo 9 %ed.¹¹

8. CONCLUSIONES

Se obtuvo por síntesis química el aldehído derivado de uridina 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (**2b**), empleando como catalizador IBX, el cual debido a sus propiedades fisicoquímicas presenta ciertas ventajas por la baja solubilidad en la mayoría de los disolventes utilizados en síntesis orgánica, eliminándolo por filtración, su solubilidad disminuye en frío, ayudándonos a mejorar el rendimiento y su pureza al eliminar la mayor cantidad de subproductos y materias primas de reacción.

La síntesis del compuesto 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (**3b**) tanto química como biocatalítica se obtuvieron con % de conversión altos y con elevada pureza óptica en las biocatalíticas.

La obtención del compuesto (**4b**) empleando peróxido de hidrógeno al 30% fue la que dió mejores resultados de las 5 técnicas probadas.

Se caracterizó e identificó la materia prima (2',3'-O-isopropilidenuridina) así como sus derivados, los compuestos sintetizados (**2b**), (**3b**) y (**4b**), con técnicas espectroscópicas (UV, Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear). Además se desarrollaron los métodos analíticos por CLAR y RMN para la identificación y caracterización de los siguientes compuestos: IBX (**1a**), ácido 2-iodobenzoico, Oxone®, 2',3'-O-isopropilidenuridina (**1b**), 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (**2b**) y 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (**3b**) y para cuantificar la relación de diastereoisómeros obtenidos al generar un nuevo centro estereogénico tanto química como biocatalíticamente al obtener la cianohidrina (**3b**).

Con los resultados obtenidos se confirma que la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), empleando una columna quiral, son métodos analíticos adecuados para cuantificar la relación diastereoisomérica en una reacción estereoselectiva, ya que los resultados obtenidos por ambos métodos son confiables y reproducibles sin diferencia estadísticamente significativa. Lo anterior permite contar con dos métodos rápidos y no destructivos para la cuantificación del %*ed* de 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (**3b**), importante intermediario en química fina.

Se demostró la actividad biocatalítica de diferentes fuentes de oxinitrilasas empleando diversas fuentes vegetales de los géneros *Prunus*, *Pouteria* y *Annona*, con el compuesto 5'-desoxi-2',3'-O-isopropiliden-5'-oxo-uridina (**2b**), ya que el cambio de temperatura, pH y la concentración de la solución amortiguadora, modifican la actividad enzimática y por lo tanto se reflejan en su capacidad de inducción asimétrica (porcentaje de exceso diastereoisomérico en este caso).

Se obtuvieron altos excesos diastereoisoméricos en el compuesto 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (**3b**), teniendo los mejores resultados con los biocatalizadores de harinas de: almendra (*Prunus dulcis*) y mamey (*Pouteria sapota*).

El biocatalizador de mamey presentó los mayores excesos diastereoisoméricos a temperaturas de 20 y 30°C, mientras que para el biocatalizador almendra la mayor inducción asimétrica se presentó al emplear una temperatura de 30°C. Observándose un mayor %*ed* con mamey y almendra con respecto al obtenido por métodos químicos.

Con los otros biocatalizadores utilizados: ciruela, capulín, guanábana, durazno y cereza, se obtuvieron bajos excesos diastereoisoméricos, los cuales pudieran atribuirse a la adición química no enzimática (espontánea), que se lleva a cabo en competencia con la reacción enzimática de cianación o a la complejidad del sustrato empleado. Por lo que se debe buscar minimizar la reacción química en estos procesos biocatalíticos, para lograr así la obtención de cianohidrinas con una mayor pureza óptica. Es de resaltar que se logró un mayor %*ed* con respecto al logrado por métodos químicos al utilizar la biocatálisis.

En este estudio se hizo evidente la susceptibilidad enzimática que presenta este tipo de reacciones, ya que el cambio de temperatura, pH y la concentración de la solución amortiguadora, modifican la actividad enzimática y por lo tanto se reflejan en su capacidad de inducción asimétrica (porcentaje de exceso diastereoisomérico). Es importante mencionar la selectividad que presentan este tipo de reacciones, pudiendo ser empleadas en la obtención de compuestos enantiopuros, para elaborar diversos compuestos con alto valor agregado útiles en la producción de una amplia gama de

productos farmacéuticos, desde antibióticos hasta antivirales, utilizados para combatir diversas infecciones.

En este estudio fue posible determinar que el empleo de agentes biocatalíticos son una herramienta útil por la inducción asimétrica que favorecen la obtención de compuestos enantiopuros o enriquecidos de utilidad en la Industria Farmacéutica. Estos resultados son 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.

9. PERSPECTIVAS

Al obtener el compuesto 2',3'-O-isopropiliden-5'-ciano-uridina (**3b**) enriquecido diastereoisoméricamente por métodos biocatalíticos, nos permite vislumbrar una serie de modificaciones que podrían realizarse a la base nucleosídica, con la finalidad de aumentar la pureza enantiomérica de otros derivados nucleosídicos; cambiando la base nucleosídica y obteniendo potenciales intermediarios farmacéuticos con alta pureza óptica. Empleando para ello una enzima desaminasa, misma que se encuentra en bacterias Gram positivas; estas enzimas modifican el grupo amino de las bases nucleosídicas y juegan un rol importante en el metabolismo de los nucleósidos, que son atractivos blancos como anticancerígenos, antibacteriales y antivirales, entre otras.

Un elemento a considerar es la disponibilidad de estas enzimas, ya que varias de ellas son comerciales, para futuras preparaciones quimioenzimáticas, transformando las bases de nucleósidos. Así se puede considerar el cambiar la base nucleosídica (en este caso la uridina) por una base púrica o pirimídica con alto valor para la Industria Farmacéutica como lo es la adenina, guanina o inosina.¹³² Lo anterior abre las posibilidades de generar un gran número de derivados nucleosídicos y obtener así una variedad de análogos nucleosídicos enriquecidos, con alta pureza óptica en un nuevo centro quiral.

Otro enfoque a estudiar es el ampliar las fuentes de oxinitrilasas (biocatalizador), buscando catalizadores en los que se obtenga mayor o igual %*ed* al obtenido con mamey, lo que puede considerar oxinitrilasas con conocida capacidad de formar (S)-cianohidrinas. Además de continuar explorando sintetizar con mayor pureza el compuesto (**4b**), tratando de caracterizar al diastereoisómero *R* y al *S*, así como desarrollar el método analítico para su identificación y cuantificación por CLAR en fase reversa.

Una alternativa de conversión del grupo $-C\equiv N$ a la amida, sería el explorar el uso de enzimas nitrilo hidratasas para evitar reactivos químicos y lograr así mejores rendimientos y buscar también la inducción asimétrica, de tal forma que en dos pasos

biocatalíticos se podría tener uno solo de los diastereoisómeros de la amida como meta con una mayor integración de pasos amigables con el ambiente.

10. REFERENCIAS

1. Panke S., Wubbolts M., Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates, **2005**, *Curr Opin Chem Biol*, 9:1-7.
2. Cordell G. A., Lemos T. L., Monte F. J., Mattos M. C., Vegetables as chemical reagents, **2007**, *J Nat Prod*, 70:478-492.
3. Gotor V., Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals, **2002**, *Org Process Res Dev*, 6:420-426.
4. Lehninger A., Cox M., Nelson D., Lehninger Principios de Bioquímica, **2006**, Ed. Omega, 4ª ed, 136-230.
5. Sánchez J., Sinisterra J., Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica. **2007**, *An R Acad Nac Farm*, 73:1199-1236.
6. Murray R., Mayes P., Granner D., Rodwell.; Bioquímica de Harper. 14 Ed., **1997**, Manual Moderno, México, 419-428.
7. Jiménez V., Láinez M., Martínez E., Matas A., Nieto M., Recalde J.; Medicamentos esteroisómeros: el cuento del cambio quiral, *Bol Ter Andal*, **2008**, 24:18-20.
8. Ferrero M., Gotor V., Biocatalytic selective modifications of conventional nucleosides, carbocyclic nucleosides, and C-nucleosides, **2000**, *Chem Rev*, 100:4319-4347.
9. Spencer K., Synthesis of complex nucleoside antibiotics, **1995**, *Chem Rev*, 95:1859-1876.
10. Zhou D., Staake M. And Patterson S. E., Phosphonoxins II: diastereoselective synthesis of phosphonic acid analogues of polyoxins, **2008**, *Org Lett*, 10:2179-82.
11. Bommarius A. S., Riebel B. R., Biocatalysis: fundamentals and applications, **2004**, Ed. I Wiley-VCH, 4-15.
12. Parales R.E., Bruce N. C., Schmid A., Wackett L. P., Biodegradation, Biotransformation and Biocatalysis (B3), **2002**, *Appl. Environ Microbiol*, 68:4699-4709.
13. Pitel R. S., Zhao H., Recent advances in biocatalysis by directed enzyme evolution, **2006**, *Comb Chem High T Scr*, 9:247-257.
14. DeSantis G., Benjamin G. D., The expanding roles of biocatalysis and biotransformation, **2006**, *Curr Opin Chem Biol*, 10:139-140.
15. Reetz T. M., Hauer B., Frontiers of biocatalysis: theory and applications, **2007**, *Curr Opin Chem Biol*, 11:172-173.

16. Faber K., Kroutil W., New enzymes for biotransformations, **2005**, *Curr Opin Chem Biol*, 9:181-187
17. Luna H., Manjarrez N., Perez H. I., Sólis A., Nuevas fuentes potenciales de enzimas oxinitrilasas, **1997**, *Rev Soc Quím Méx*, 41:111-114.
18. Luna H., Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos, **2004**, *Rev Soc Quím Méx*, 48:211-219.
19. Torres S., Castro G. R., Non-aqueous biocatalysis in homogenous solvent systems, **2004**, *Food Technol Biotech*, 42:271-277.
20. Nicolau S.A., Gaida S. M., Papoutsakis T. E., A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation, **2010**, *Metab Eng*, 12:307–331.
21. Wang A.; Zhang F., Huang L., Yin X., Li H., Wang Q., Zeng Z., Xie T., New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids, **2010**, *J Med Plant Res*, 4:847-856.
22. Patel N. R., Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis, **2008**, *Coordin Chem Rev*, 252:659-70.
23. Avi M., Wiedner R. M., Griengl H., Schwab H., Improvement of a stereoselective biocatalytic synthesis by substrate and enzyme engineering: 2-hydroxy-(4'-oxocyclohexyl)acetonitrile as the model, **2008**, *Chem Eur J*, 14:11415-11422.
24. Basavaiah D., Krishna Rama P.; Enantioselective synthesis using crude enzymes, **1992**, *Pure Appl Chem*, 64:1067-1072.
25. Pollard D. J., Woodley J.M., Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, **2006**, *Trends Biotechnol*, 25:66-73.
26. Stryer L., Berg J., Tymoczko J., Bioquímica, 5 ed.; 205-225.
27. Pislakov A. V., Cao J., Kamerlin S. C. L., Warshel A., Enzyme millisecond conformational dynamics do not catalyze the chemical step, **2009**, *PNAS* , 106:17359-17364.
28. Castro H.F.; Fine chemicals by biotransformation using lipase, **1995**, *Quim Nova*, 18:544-554.
29. Held M., Schmid A., van Beilen J. B., Witholt B., Biocatalysis. Biological systems for the production of chemicals, **2000**, *Pure Appl Chem*, 72:1337-1343.
30. Sheldon R. A., Cross-linked enzyme aggregates (CLEA@s): stable and recyclable biocatalysts, **2007**, *Biochem Soc T*, 35:1583-1587.

31. Montes H. M., Enzimas con aplicación industrial, **2002**, *Avance y Perspectiva*, 21:279-282.
32. Holt J., Hanefeld U., Enantioselective enzyme-catalysed synthesis of cyanohydrins, **2009**, *Curr Org Synth*, 6:15-37.
33. Griengl H., Schwab H., Fechter M., The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases, **2000**, *Tibtech*, 18:252-256.
34. Knowles C., Microorganisms and Cyanide, **1976**, *Bacteriol Rev*, 40:652-680.
35. Yosef. H.A.A., Morsy N.M., Mahran M.R.H., Aboul-Enein H.Y., Preparation and reactions of optically active cyanohydrins using the (*R*)-hydroxynitrile lyase from *Prunus amygdalus*, **2007**, *J Iran Chem Soc*, 4:46-58.
36. Effenberger F., Synthesis and reaction of optically active cyanohydrins, **1994**, *Ang Chem Int Ed Engl*, 33:1555-1564.
37. Solís A., Luna H., Pérez H. I., Manjarrez N., Sánchez R., Preparación de (*R*)-cianohidrininas usando harina de semilla de capulín y mamey como biocatalizadores, **1998**, *Rev Soc Quím Méx*, 42:214-216.
38. Solís A., Luna H., Pérez H. I., Manjarrez N., Sanchez R., Velasco M. A., Castillo R., New sources of (*R*)-oxynitrilase: capulin (*Prunus capulí*) and mamey (*Mammea americana*), **1998**, *Biotechnol Lett*, 20:1183-1185.
39. Nanda S., Kato Y., Asano Y., A new (*R*)-hidroxynitrile lyase from *Prunus mame*: asymmetric synthesis of cyanohydrins, **2005**, *Tetrahedron-asymmetr*, 61:10908-10916.
40. Kiljunen E., Kanerva L., (*R*)- and (*S*)-cianohidrin using oxynitrilases in whole cells, **1996**, *Tetrahedron-asymmetr*, 7:1105-1116.
41. Gaisberger R., Fechter M., Griengl H., The first hidroxynitrile lyase catalysed cyanohydrins formation in ionic liquids, **2004**, *Tetrahedron-asymmetr*, 15:2959-2963.
42. Groger H., Capan E., Barthuber A., Vorop D. K., Asymmetric synthesis of an (*R*)-cyanohidrin using enzymes entrapped in lens-shaped gels, **2001**, *Org Lett*, 3:1969-1972.
43. Van Langen L. M., Selassa R. P., Rantwijk F., Sheldon R. A., Cross-linked aggregates of (*R*)-oxynitrilase: A stable, recyclable biocatalyst for enantioselective hydrocyanation, **2005**, *Org Lett*, 7:327-329.

44. Gotor V., Lipases and (*R*)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis, **2002**, *J Biotechnol*, 96:35-42.
45. Davis B. G., Boyer V., Biocatalysis and enzymes in organic synthesis, 2001, *Nat Prod Rep*, 18: 618-640.
46. Johnson D., Zabelinskaja M., Griengl H., Oxynitrilases for asymmetric C-C bond formation, **2000**, *Curr Opin Chem Biol*, 4:103-109.
47. Hu Z., Poulton J. E., Molecular analysis of (*R*)-(+)-mandelonitrile lyase microheterogeneity in black cherry, **1999**, *Plant Physiol*, 119:1535-1546.
48. Carey F. A., Química Orgánica, Ed. Mc Graw Hill, 6ª ed, México, **2004**, 288-359, 530-576.
49. Morrison T. R., Boyd N. R., Química Organica, Ed. Pearson Addison Wesley, 5ª ed, México, **1998**, 123-158.
50. <http://fesc.cuautitlan2.unam.mx/organica/directorio/jaime/Estroismria.pdf>, Mondragón J, Estereoisomería, fecha de consulta 5-May-2012.
51. Starr C., Taggart R., Biología. La Unidad y Diversidad de la Vida. 10ª Ed, **2002**, Ed. Thomson Learning. Estados Unidos, 50-53.
52. Díaz J., Juares M., Bioquímica: un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida, **2006**, Ed. McGraw-Hill, México, 270-300.
53. <http://www.tciamerica.com/usefulInfo/.../L3014E.pdf>, *Nucleosides, nucleotides & related reagents*, Fecha de consulta 13-Ene- 2012.
54. http://www.biolog.de/uploads/tx_eshop/K%20001.pdf, Technical information about Biolog's Ko-Libri library of nucleosides and nucleotides, Fecha de consulta 15-Feb-2012.
55. Casanova E., Hernandez A.I., Priego M., Liekens S., Camarasa M., Balzarini J., Perez P. M., 5'-O-tritylinosine and analogues as allosteric inhibitors of human thymidine phosphorylase, **2006**, *J Med Chem*, 49: 5562-5570.
56. Yokoyama M., Toyoshima H., Shimizu M., Togo H., Stereoselective coupling of riboses with metallic salts of aromatic heterocycles, **1997**, *J Chem Soc Perkin Trans*, 1:29-33.
57. Bookser B. C., Raffaele N. B., High-throughput synthesis of HepDirect prodrugs of nucleoside monophosphates, **2008**, *J Comb Chem*, 10:567-72.
58. Gonzalo G. C. Biotransformaciones en la síntesis y resolución de compuestos de interés farmacéutico, Tesis Doctoral, **2003**, Universidad de Oviedo, España, 13-19.

59. De Clercq E., Field H., Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy, **2006**, *Brit J Pharm*, 147:1-11.
60. Janes L., Cimpoaia A., Kazlauskas R., Protease-mediated separation of cis and trans diastereomers of 2(*R,S*)-benzyloxymethyl-4(*S*)-carboxylic acid 1,3-dioxolane methyl ester: Intermediates for the synthesis of dioxolane nucleosides, **1999**, *J Org Chem*, 64:9019-9029.
61. Sivapriya, K., Suguna, P., Shubashree, S., Sridhar, P. R., Chandrasekaran, S., Novel chalcogenides of thymidine and uridine: synthesis, properties and applications, **2007**, *Carbohydr Res*, 342:1151-1158.
62. Gandhi V., Kantarjian H., Faderl S., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of plasma clofarabine and cellular clofarabine triphosphate in patients with acute leukemias, **2003**, *Clin Cancer Res*, 9:6335-6342.
63. Alcántara L. A., Sánchez M. J., Utilización de hidrolazas en la preparación de fármacos e intermedios homóquiales, **2010**, *An R Acad Nac Farm*, 76:259-305.
64. Martin I. B., Edward G. B., Laure P., Loi A., Antiviral L-nucleosides specific for hepatitis B virus infection, **2001**, *Antimicrob Agents Chemother*, 229-235.
65. Wang G., Ramasamy K., Johnson L., Nucleoside compounds and use thereof, **2001**, Estados Unidos, *INC Pharmaceuticals*, Pat WO 01/68663A1.
66. Boyd M., Análogos de nucleósidos en la terapia combinada de infecciones por herpes simples, **2004**, España, *Novartis International Pharmaceutical Ltd*, Pat ES 2 199 339 T3.
67. Dvornich W., Harvey E., Antitumor derivatives of periodate-oxidized cytidine, **1977**, Estados Unidos, *American Home Products Corporation*, US 260/256.4C.
68. Smith, D. B., Martin, J. A., Klumpp, K., Baker, S. J., Blomgren, P. A., Devos, R., Granycome, C., Design, synthesis, and antiviral properties of 4'-substituted ribonucleosides as inhibitors of hepatitis C virus replication: The discovery of R1479, **2007**, *Bio Med Chem Lett*, 17:2570-2576.
69. Martínez M., Santos M., Ortiz M., Pino M., Acidosis láctica grave, insuficiencia hepática y fallo multiorgánico secundarios al tratamiento con análogos de los nucleósidos, **2002**, *Emergencias*, 14:132-134.
70. Tarasconi P., Capacchi S., Pelosi G., Cornia M., Albertini R., Bonati A., Dall'Aglio P. P., Lunghi P., Pinelli S., Synthesis, spectroscopic characterization and biological

- properties of new natural aldehydes thiosemicarbazones, **2000**, *Bioorg Med Chem*, 8:157-162.
71. Chen J.J., Drach C.J. Townsend B. L., Convergent synthesis of polyhalogenated quinoline C-nucleosides as potential antiviral agents, **2003**, *J Org Chem*, 68:4170-4178.
72. Zon, G., Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents, **1988**, *Pharm Res*, 5:539-49.
73. Devos R., Hobbs C., Jiang W., Martin J., Merrett J., Najera I., Uso de derivados de nucleósidos antivirales para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infecciones de hepatitis C, **2004**, España, F. Hoffmann-La Roche AG, Pat ES 2 272 732 T3.
74. http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/2_AF_VIH_2002/2_farmacologia_antirretroviral_es.pdf, Farmacología de los antirretrovirales. 2º Seminario de atención farmacéutica, Fecha de consulta 10-Dic-2011
75. Hostetler K., Antiviral liponucleosides: Treatment of hepatitis B, **1993**, Estados Unidos, *Vical INC*, Pat. WO 93/00910.
76. Miyasaka T., Tanaka H., De Clercq E., Baba M., Walker R., Ubasawa M., Derivados de nucleósidos de aciclovir 6-sustituidos y agente antivírico que los contiene como su ingrediente activo, **1991**, España, *Mitsubishi Chemical Corporation*, Pat ES 2 134 758T3.
77. Spork A., Koppermann S., Ducho C., Improved convergent synthesis of 5'-epi-analogues of muraymycin nucleoside antibiotics, **2009**, *Synlett*, 15:2503-2507.
78. Cordiés J. L., Machado R. L., Hamilton C. M., Principios generales de la terapéutica antimicrobiana, **1998**, *Acta médica*, 8:13-27.
79. Kimura K., Bugg T., Recent advances in antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall biosynthesis, **2003**, *Nat Prod Rep*, 20:252-273.
80. Winn M., Goss R., Kimura K., Bugg T. Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: Recent advances in structure-function studies and nucleoside biosynthesis, **2010**, *Nat Prod Rep*, 27:279-304.
81. Martín O. L. Explorando la química de los iluros de azufre en la síntesis de antibióticos tipo nucleósido: Aproximación sintética de liposidomicinas y muraimicinas, Tesis Doctoral, **2006**, Universidad de Málaga, España, 19-33.
82. Spork A., Koppermann S., Dittrich B., Herbst-Irmer R., Ducho C., Efficient synthesis of the core structure of muraymycin and caprazamycin nucleoside

- antibiotics based on a stereochemically revised sulfur ylide reaction, **2010**, *Tetrahedron-asymmetr*, 21:763-766.
83. Rachakonda S., Cartee L., Challenges in antimicrobial drug discovery and the potential of nucleoside antibiotics, **2004**, *Curr Med Chem*, 11:775-793.
84. De Souza M., Facchinetti V., Cardinot D., Gomes C., Natural products with translocase I inhibitory activity, as new lead compounds against tuberculosis, **2010**, *Bol Latinoam Caribe*, 9:1-12.
85. Ichikawa S., Matsuda A., Synthesis of complex nucleoside antibiotics, **2005**, *Nucleos Nucleot Nucl*, 24:319-329.
86. Knnapp S., Gore K V., Synthesis of the shimofuridin nucleoside disaccharide, **1996**, *J Org Chem*, 61: 6744-6747.
87. Zhanga W., Ostash B., and Walsha C., Identification of the biosynthetic gene cluster for the pacidamycin group of peptidyl nucleoside antibiotics, **2010**, *PNAS*, 107: 16828-16833.
88. Igarashi M., Takahashi Y., Shtara T., Nakamura H., Naganawa H., Miyake T., Akamatsu Y.; Caprazamycins, novel lipo-nucleoside antibiotics, from *Streptomyces* sp. **2005**, *J Antibiot*, 58:327-337.
89. Gentle C., Harrison S., Inukai M., Bugg T., Structure-function studies on nucleoside antibiotic mureidomycin A: synthesis of 5'-functionalised uridine models, **1999**, *J Chem Soc*, 1:1287-1294.
90. Hirano S., Ichikawa S., Matsuda A., Total synthesis of caprazol, a core structure of the caprazamycin antituberculosis antibiotics, **2005**, *Angew Chem Int Edit*, 44:1854-1856.
91. Hirano S., Ichikawa S., Synthesis of caprazamycin analogues and their structure-activity relationship for antibacterial activity, **2008**, *J Org Chem*, 73:569-577.
92. Bhaket P., Stauffer C., Datta A. Complex peptidyl nucleoside antibiotics: Efficient synthesis of the glycosyl nucleoside amino acid cores, **2004**, *J Org Chem*, 69: 8594-8601.
93. Mvondo C., Georges G., Synthesis of uracil polyoxin C from uridine, **1996**, *Tetrahedron Lett*, 37:163-166.
94. Jones G., Moffat J., Edge M., Synthesis of polyoxin type nucleosides, **1972**, US, *Syntex Inc*, Pat US 3935184.
95. Fiandor J., Garcia T., Synthesis of modified polyoxins by reaction of uridine-5'-aldehyde with trimethylsilyl cyanide and amino acids, **1987**, *Synthesis*, 11:978-981.

96. Chapman T., Kinsman O., Houston J., Chitin biosynthesis in *Candida albicans* grown in vitro and in vivo and its inhibition by nikkomycin z, *Antimicrob. Agents Ch*, 36: 1909-1914.
97. <http://www.uv.es/divulga/misitio/articulos/ciencia%20y%20tecnologia/marrer01.pdf>. Aspectos actuales y revisión de los mecanismos de acción de los fármacos antifúngicos. Fecha de consulta 10-Dic-2011
98. Plant A., Thompson P., Synthesis of modified polyoxins by reaction of uridine-5'-aldehyde with trimethylsilyl cyanide and amino acids, **2008**, *J Org Chem*, 73:3714-3724.
99. Lenardon M., Munro C., Gow N. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. **2010**, *Curr Opin Microbiol*, 13:416-423.
100. Anderson M., Roemer T., Fabrey R. Section IV: Cancer and infectious diseases, Chap. 17: Progress in antifungal drug discovery. **2003**, *Annul Rep Med Chem*, 163-172.
101. Stauffer C., Bhaket P., Fothergill A., Rinaldi M., Datta A., Total synthesis and antifungal activity of a carbohydrate ring-expanded pyranosyl nucleoside analogue of nikkomycin B, **2007**, *J Org Chem*, 72: 9991-9997.
102. Kotra L. P., Pai E. F., Bello A. M., Fujihashi M. Odcase inhibitors for the treatment of malaria. **2007**, US, *University Health Network*, Pat WO2007038859
103. Zhdankin V., Benziodoxole-based hypervalent iodine reagents in organic synthesis, **2005**, *Curr Org Synt*, 2:121-145
104. Frigerio M., Santagostino M., Sputore S., A user-friendly entry to 2-iodoxybenzoic acid (IBX), **1999**, *J Org Chem*, 64:4537-4538.
105. Stevenson J. P., Treacy B. A., Nieuwenhuyzen M., Preparation of Dess-Martin periodinane-the role of the morphology of 1-hydroxy-1,2-benziodoxol-3(1H)-one 1 oxide, **1997**, *J Chem Soc*, 2:589-591.
106. Bockman K. R., Shao P., Mullins J. J., The Dess-Martin periodinane:1,1,1-triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-one, **2004**, *Org Synth*, 10:696.
107. Skoog P.A, Principios de análisis instrumental, **2004**, Ed Mc-Graw Hill, 7ª ed, España pp 567-612
108. McMurry J., Química orgánica, **2004**, Ed Thomson, 6ª ed, México pp 393-463.
109. Pharmacopeia of The United States USP, 34th ed, 266-273, 340-345, 460-468.

110. Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S. Introduction to spectroscopy, **2000**, Ed Brooks Cole, 3^a ed, USA.
111. Noa M., Pérez N., Díaz G., Vega S. Cromatografía de gases y de líquidos de alta resolución aplicación en alimentos. **2005**. UAM. México D.F.
112. Dawson B., Trapp R. G. Bioestadística médica, **2005**, Ed Manual Moderno, 4^a ed, México, pp 10-50.
113. More J. D., Finney N. S. A simple and advantageous protocol for the oxidation of alcohols with o-iodoxybenzoic acid (IBX). **2002**, *Org Lett*, 4:3001-3003.
114. Corey J.E., Samuelsson B., One-step conversion of primary alcohols in the carbohydrate series to the corresponding carboxylic *tert*-butyl ester, **1984**, *J Org Chem*, 49:4735-4735.
115. Wang J., Archer C., Li J., Bott S., Wang P. Thermophilic esterases/lipases as an effective tool for the resolution of nucleoside diastereoisomers: Convenient one-pot synthesis of α -L-taluronamide and α -D-alluronamide nucleosides, **1998**, *J Org Chem*, 63:4850-4853.
116. Bencze C. L., Csaba P., Tosa M., Vass E., Irimie F. D. Synthesis of enantiomerically enriched (*R*)- and (*S*)-benzofuranyl- and benzo[b]thiophenyl 1,2-ethanediols via enantiopure cyanohydrins as intermediates, **2010**, *Tetrahedron asymmetr*, 21:443-450.
117. Katritzky A. R., Pilarski B., Urogi L., Efficient conversion of nitriles to amides with basic hydrogen peroxide in dimethyl sulfoxide, **1989**, *Synth Commun*, 949-950.
118. Demodaran N. P., Jones G. H., Moffat J. G. Synthesis of the basic nucleoside skeleton of the polyoxin complex, **1971**, *J Org Chem*, 3812-3813.
119. Kornblum N., Singaram S., Conversion of nitriles to amides and esters to acids by the action of sodium superoxide, **1979**, *J Org Chem*, 44:4727-4729.
120. Sharafi A., Mohsenzadeh F., Mojtahedi M., Saidi M., Balalaie S. Microwave-promoted transformation of nitriles to amides with aqueous sodium perborate, **2001**, *Synth Comm*, 31:431-434.
121. Brunel M. J., Holmes P. I., Chemically catalyzed asymmetric cyanohydrin syntheses, **2004**, *Angew Chem Int Edit*, 43:2752-2778.
122. Roos J., Effenberger F., Hydroxynitrile lyase catalyzed enantioselective HCN addition to O-protected α -hydroxyaldehydes, **1999**, *Tetrahedron asymmetr*, 10:2817-2828.

123. Solís A., Luna H., Pérez H.I., Manjarrez N. Evaluation of guanabana (*Annona muricata*) seed meal as a source of (S)-oxynitrilase, **2003**, *Tetrahedron asymmetr*, 14:2351-2353.
124. Qiam Z M., Wan J B., Zhang Q W., Li S P. Simultaneous determination of nucleobases, nucleosides and saponins in *Panax notoginseng* using multiple columns high performance liquid chromatography, **2008**, *J Pharmaceut Biomed*, 1361-1367.
125. Gao J. L., Leung K., Wang Y. T., Lai C. M., Li S. P., Hu F. L., Lu G. H., Jiang Z. H., Yu Z. L. Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in *Ganocletrla* spp. by HPLC-DAD-MS, **2007**, *J Pharmaceut Biomed*, 44:807-811.
126. Brown S., White C., Chu Ch., Bartlett M., Determination of acyclovir in maternal plasma, amniotic fluid, fetal and placenta tissues by high-performance liquid chromatography, **2002**, *J Chromatogr B*, 772, 327-334.
127. Fresenius Z., Rapid and direct HPLC analysis of methylated nucleosides in microliter sample of urine and serum, **1982**, *Anal Chem*, 421.
128. Frischman M., Bidmon C., Angerer J., Pischetsrieder M., Identification of DNA adducts of methylglyoxal, **2005**, *Chem Res Toxicol*, 18:1586-1592.
129. Goossens J. F., Roux S., Egron D., Perigaud C., Bonte J. P., Vaccher C., Foulon C. Separation of nucleoside phosphoramidate diastereoisomers by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, **2008**, *J Chromatogr B*, 875: 288–295.
130. Pesek J., Matyska M., Duley J., Zamzami M., Fischer S. Aqueous normal phase retention of nucleotides on silica hydride columns: Method development strategies for analytes relevant in clinical analysis, **2010**, *J Sep Sci*, 33:930–938.
131. Jandera P., Selection of separation conditions for HPLC and HPLC/MS of aromatic sulphonic acids and acid azo dyes, **2007**, *J Liq Chromatogr*, 30:2349-2367.
132. Medic R., Lewkowicz S. E., Iribarren M. A., *Arthrobacter oxydans* as a biocatalyst for purine deamination, **2008**, *FEMS Microbiol Lett*, 289:20-26.