

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD XOCHIMILCO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**  
**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**NOMBRE DEL PROYECTO**

“Resolución Biocatalítica del (±)-3- acetoxi -2-metilen-3-fenilpropanometilo y del (±)-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanometilo”.

**PROYECTO GENERICO**

Obtención de Materias Primas, Principios Activos, Medicamentos y Productos Biológicos

**ALUMNA:** Mariana Peralta Osorio

**MATRÍCULA:** 2113024349

**ASESORA INTERNA:** Dra. Herminia Inés Pérez Méndez

**ASESORA EXTERNA:** Dra. Concepción Ramírez Lubianos

**LUGAR DE REALIZACIÓN:** Laboratorio de Biotransformaciones (N-201) en la Unidad Interdisciplinaria de Docencia Investigación y Servicio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

**FECHA DE INICIO:** 28 octubre 2016

**FECHA TÉRMINO:** 28 abril 2017

## 1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología se hace cada vez más necesaria para complementar y modernizar los métodos químicos, buscando hacerlos cada vez más amigables con el ambiente. En el campo de la industria químico farmacéutica, facilita el obtener fármacos y moléculas complejas que difícilmente se podrían obtener por los métodos tradicionales de síntesis química.

La biotransformación o bioconversión, es un proceso biológico, donde un sustrato es modificado mediante reacciones catalizadas por enzimas. La biocatálisis es una herramienta útil en la síntesis orgánica, básicamente consiste en el empleo de enzimas que pueden provenir de células microbianas, vegetales o animales, las enzimas son los catalizadores capaces de aceptar una amplia gama de sustratos, realizando biotransformaciones con una alta estereoselectividad<sup>1</sup>. Una de sus aplicaciones es la producción de compuestos homoquirales<sup>2</sup>. En los fármacos, la interacción de sus enantiómeros con los sitios activos es diferente, por ello la industria farmacéutica ha empleado los procesos biocatalíticos como parte de sus programas de desarrollo de nuevos fármacos.

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica, estas catalizan un gran número de reacciones necesarias para la síntesis, modificación y degradación de compuestos orgánicos que constituyen a los seres vivos, o que son producidas por estos para protección o comunicación existen tres fuentes principales de obtención de enzimas, siendo las células microbianas de las más utilizadas, ya que el mundo microbiano es vasto en especies, ampliando la variedad de enzimas y con ello las reacciones sobre diversos compuestos. Por otra parte, los microorganismos son fácilmente adaptables a un ambiente artificial impuesto por los requerimientos técnicos y económicos.

Las implicaciones de la estereoquímica en la terapéutica han sido bien establecidas durante las últimas décadas. La mayoría de los sistemas biológicos tienen preferencia por una de las formas estereoquímicas en numerosos procesos

bioquímicos. Un gran número de las sustancias biológicamente activas, poseen centros quirales y normalmente los estereoisómeros de una molécula no poseen la misma actividad biológica, ya que no tienen la misma interacción con los receptores, esto da como consecuencia respuestas biológicas diferentes. <sup>(3,4)</sup>

Los alcoholes secundarios Baylis-Hillman (BH) ópticamente activos son de gran interés en la manufactura de agroquímicos, fármacos y otros compuestos con actividad biológica<sup>5</sup>. Sin embargo, la obtención de estos por síntesis química da mezclas racémicas<sup>6</sup>.

Este tipo de aductos se obtienen por la reacción que involucra tres componentes: un alqueno activado, un electrófilo y una amina terciaria<sup>7,8</sup>

Reacción Baylis- Hillman



Esta reacción puede proporcionar aductos multifuncionales, que se emplean en la preparación de antibióticos,  $\beta$  y  $\gamma$  lactamas, isoxazoles, entre otras moléculas.

Un ejemplo es el aducto ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo (BH) es empleado en la preparación de importantes farmacóforos en diversas moléculas de importancia farmacológica. Si se hidroliza el ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo se obtiene el ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoamida o el ácido ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico. Derivados del ácido ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico, son empleados en la síntesis de diferentes intermediarios, como:

Preparación de antibióticos, como Fluoranfenicol, Florfenicol, Cloramfenicol, Tiamfenicol.<sup>9</sup>

En el presente proyecto se busca la resolución biocatalítica de aductos BH vía hidrólisis enantioselectiva empleando *Nocardia corallina* B.276 y polvos acetónidos de hígado.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Biocatálisis**

La biocatálisis es el proceso por el que se aumenta la velocidad de una reacción metabólica debido a la acción enzimática. Las enzimas no alteran el equilibrio químico de la reacción que catalizan, sino que aceleran la reacción. Intervienen sobre la energía de activación de las reacciones químicas, disminuyéndola de manera que la reacción ocurre con mayor velocidad.

La industria farmacéutica se enfrenta a dos retos fundamentales; por un lado, debe reducir al menos en un orden de magnitud la producción de residuos y por otro desarrollar terapias donde las dosis sean menores, más selectivas y cada vez menos tóxicas. Ello implica el desarrollo de procesos de síntesis más eficaces y selectivos utilizando mejores catalizadores y/o biocatalizadores disminuyendo la generación de subproductos y el desarrollo de nuevos productos bioterapéuticos como vacunas u hormonas.

El interés práctico del empleo de biocatalizadores en uno o varios pasos de la síntesis de un fármaco reside en que dada su especificidad, no es necesaria la utilización de grupos protectores, disminuyendo así los pasos de la síntesis, aumentando el rendimiento y reduciendo la producción de residuos contaminantes.

Un aspecto muy interesante a considerar y de gran importancia en la industria farmacéutica es la capacidad que tienen las enzimas para resolver mezclas racémicas. Gran parte de los principios activos farmacéuticos son moléculas que poseen uno o varios centros estereogénicos, de cuya correcta configuración depende su bioactividad. Los procesos de síntesis química se caracterizan en general por la obtención de mezclas de isómeros que son además difíciles de purificar. En este sentido, los procesos biocatalíticos presentan una gran ventaja, ya que las enzimas producen de un modo específico y selectivo únicamente uno de los isómeros posibles.

## 2.2 Enzimas

Las enzimas son biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula. Son muy eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas y además son altamente específicos ya que cada uno de ellos induce la transformación de un solo tipo de sustancia y no de otras que se puedan encontrar en el medio de reacción.

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

A) Oxidoreductasas: Actúan en reacciones de óxido-reducción y se les llama también deshidrogenasas.

B) Transferasas: Transfieren grupos funcionales (grupos acilo, glucosilo, fosfatos y equivalentes de aldehídos y cetonas) de una molécula a otra. Las quinasas representan un grupo especializado que transfiere grupos fosfato.

C) Hidrolasas: Rompen un enlace adicionando una molécula de agua por ejemplo: glucósidos, anhídridos, ésteres, amidas, péptidos, epóxidos y otras funcionalidades que contienen el enlace C-N.

D) Liasas, rompen enlaces por mecanismos distintos a la hidrólisis o la oxidación. Las descarboxilasas y aldolasas son ejemplos de liasas.

E) Isomerasas, catalizan reacciones de interconversión de isómeros.

F) 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).

### 2.2.1 Proceso enzimático

Todas las enzimas actúan de la misma manera aun 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 de la enzima en una reacción enzimática típica. Por lo tanto, cada molécula de enzima cataliza la conversión en producto de varias moléculas de reactivo. El sustrato es convertido a producto en el sitio activo

de la enzima, cuando el sustrato y la enzima se unen, se forma el complejo enzima-sustrato (ES).<sup>10</sup>

### **2.3 Actinomicetos**

Los actinomicetos comprenden aproximadamente el 20-60% de la población microbiana del suelo, el olor característico a tierra húmeda se debe a su actividad metabólica y a la producción de pigmentos, terpenoides y enzimas extracelulares que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal y animal. Algunas otras especies son patógenas para los humanos, animales o plantas, o son fijadoras de nitrógeno.

Los rasgos morfológicos que presentan las bacterias unicelulares y los hongos filamentosos han permitido diferenciarlos y separarlos claramente en dos grandes grupos. Sin embargo, un “grupo de transición”, los actinomicetos, puede ser considerado como la excepción a la regla. Los rasgos distintivos por los cuales durante algún tiempo se les consideró como miembros del grupo de los hongos filamentosos fueron: a) la similitud en su forma de crecer y desarrollarse, b) formación de un filamento denominado hifas con extensas ramificaciones (micelio), c) muchos de ellos forman micelio aéreo y esporas, y d) su crecimiento en cultivo líquido raramente presenta la turbidez asociada con las bacterias unicelulares, sino que durante el crecimiento se forman filamentos, grumos o esferas de micelio. No obstante lo anterior, los filamentos de los actinomicetos son mucho más delgados que aquellos formados por los hongos. Cabe mencionar que no todos los actinomicetos comparten estas características, por ejemplo, algunos géneros como *Mycobacterium* y *Corynebacterium* no producen micelio aéreo. La forma y ornamentación de las esporas es diversa, así como la manera en que se agrupan, siendo este criterio empleado para subdividir e identificar algunos grupos de actinomicetos. Un aspecto relacionado con el desarrollo de las esporas es la producción y excreción de metabolitos secundarios bioactivos que pueden ser de varios colores y que se observan como pequeñas secreciones en forma de gotitas sobre la colonia microbiana (Figura 1). Del filo Actinobacteria, los actinomicetos son el grupo con más especies descritas, además de ser un grupo de importancia para

el hombre debido a las aplicaciones biotecnológicas que representa. Históricamente los actinomicetos han sido descritos como microorganismos que habitan en el suelo, pero actualmente se conoce que están ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos como océanos, ríos y lagos, donde también se encuentran asociados a los sedimentos, sobre todo en el material orgánico que está en proceso de descomposición. En el suelo, el tamaño y número de la comunidad de actinomicetos depende de diversos factores, principalmente de las características físicas y químicas como pueden ser la textura, humedad, pH y contenido de materia orgánica. Cuando se aíslan actinomicetos del suelo mediante medios de cultivo sólidos, el género predominante suele ser *Streptomyces*, con el 70 al 90% de las colonias, seguido por *Nocardia* con 10 a 30%, y el tercero puede ser *Micromonospora* que constituye del 1 al 15% de actinomicetos.

Un rasgo interesante de estos microorganismos es que durante determinadas etapas de su ciclo de vida producen metabolitos secundarios y otras moléculas bioactivas de utilidad para la industria, tal es el caso de la producción de algunos antibióticos producidos por especies del género *Streptomyces*. Estos antibióticos inhiben el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos de diversas categorías taxonómicas. Debido a la importancia económica y médica de los antibióticos producidos por los estreptomicetos, estos microorganismos han sido objeto de una variedad de estudios, y en la actualidad se continúa la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas en otros géneros de actinomicetos. Se ha determinado, por ejemplo, que una sola especie puede producir más de un antibiótico con estructuras químicas diferentes. A pesar de contar con muchas moléculas con actividad antimicrobiana, solo a poco más de cien se les da uso comercialmente y de estas, 60 son antibióticos producidos por estreptomicetos, entre los cuales están la estreptomicina, espectinomicina, neomicina, tetraciclina, eritromicina y nistatina, entre otros. Con la prevalencia de cepas patógenas cada vez más resistentes a múltiples fármacos, incluso a agentes antimicrobianos de última línea como la vancomicina (antibiótico sintetizado por un actinomiceto del género *Nocardia*), la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana es muy relevante. Los microorganismos que habitan ambientes extremos, nichos ecológicos inexplorados,

ambientes marinos, aquellos que son endófitos, entre otros, están entre las prioridades de la exploración biotecnológica. Diversos informes científicos en salud pública muestran que una gran variedad de bacterias patógenas de humanos como *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* han desarrollado resistencia a fármacos, fenómeno que ha promovido la búsqueda de más y mejores antibióticos, especialmente porque estas bacterias son una clara amenaza a la salud mundial. Además, los hongos y levaduras se han convertido en una amenaza, puesto que algunos de ellos provocan infecciones en pacientes inmunocomprometidos, principalmente aquellas personas afectadas por VIH, o bien, pacientes con transplante de órganos que deben consumir fármacos inmunosupresores.

Los actinomicetos son cosmopolitas, están distribuidos en los ecosistemas naturales en todo el mundo y juegan un papel muy importante en el reciclaje de la materia orgánica, dicho grupo microbiano ha recibido considerable atención en el desarrollo de la biotecnología. Además de la función ecológica de los actinomicetos, son de gran importancia industrial y comercial debido a que han demostrado ser la fuente más importante de metabolitos secundarios bioactivos.<sup>11</sup>

### **2.3.1 *Nocardia corallina***

*Nocardia corallina* pertenece al género de *Nocardia*, son bacilos gram-positivos parcialmente ácidosresistentes.<sup>12</sup> El género *Nocardia*, pertenece al cuarto tipo químico de actinomicetos. En particular la *Nocardia corallina* es una bacteria gram positiva aerobia obligada, capaz de crecer en presencia de una variedad de fuentes de carbono, como alcanos, alquenos<sup>13</sup> y nitrilos.<sup>14</sup>

La morfología en la mayoría de las *Nocardias* son bacilos gram-positivos aerobios, parcialmente ácidosresistentes, en este género es común la formación de filamentos, los cuales son profundos y aéreos, estos últimos tienden a fragmentarse y producir células similares a esporas. Al igual que otros actinomicetos, la pared celular contiene ácidos micólicos, también llamados ácidos nocárdicos, a la presencia de estos se le atribuye la ácidosresistencia que puede ser débil o parcial cuando se tiñen con carbolfucsina (Método Kinyoun).

Las Nocardias proliferan con facilidad y rapidez en diversos medios de cultivo. En aquellos que contienen agar, la aparición de colonias es variable, de 1 a 5 días. Después de 7 a 10 días se presentan colonias apiladas, irregulares, cerosas, brillantes y de varios milímetros de diámetro. A medida que se forman los filamentos aéreos la superficie de la colonia se torna opaca y vellosa. *Nocardia* puede diferenciarse de géneros similares por su capacidad para descomponer y utilizar la parafina como una fuente de carbono y energía. Esta propiedad permite el aislamiento selectivo de *Nocardia* de cultivos mixtos.<sup>15</sup>

Las especies como la *Nocardia corallina* y *Nocardia globerla* son de gran importancia a nivel industrial como biodegradadores de nitrilos<sup>16</sup> y biotransformadores de alcoholes.<sup>17</sup>

En particular la *Nocardia corallina* B-276, es de interés ya que se ha demostrado su actividad enzimática de Nitrilo hidratasa en células suspendidas, tanto con nitrilos aromáticos como nitrilos alifáticos.<sup>18</sup> Además es un microorganismo capaz de resolver alcoholes quirales vía oxidación enantioselectiva, biotransformando a uno de los enantiómeros a la cetona correspondiente, como es el caso de ariletil carbinoles y diaril carbinoles, donde tiene preferencia por el enantiómero S, resolviendo así el enantiómero R con buenos excesos enantioméricos (> 99 % ee) dependiendo del sustrato.<sup>19-21</sup>

## 2.4 Oxidación de alcoholes

Una de las reacciones más comunes de los alcoholes es su oxidación para dar compuestos carbonílicos, los alcoholes primarios dan aldehídos o ácidos carboxílicos, y los alcoholes secundarios cetonas, por lo general los alcoholes terciarios no reaccionan con la mayor parte de los agentes oxidantes.<sup>22</sup>

Entre los agentes más comunes que se utilizan a nivel laboratorio se encuentran los cromatos ( $\text{CrO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ),<sup>22</sup> o permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ),<sup>23</sup> sales de  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  en  $\text{NaOCl}$ ,<sup>24</sup> aire sobre  $\text{Ag}_2\text{O}$  en medio alcalino,  $\text{H}_2\text{O}_2$  en medio alcalino, entre otros.

Para los alcoholes más sensibles, con frecuencia se utiliza el clorocromato de piridinio (PCC) debido a que la reacción es más suave y se efectúa a temperaturas

más bajas, también se emplean complejos de aminas terciarias con bromo como: BQBB (Quinuclidina·2Br<sub>2</sub>) y PDB (DABCO·2Br<sub>2</sub>), para tener reacciones de oxidación más controladas.<sup>25, 26</sup>

Se han empleado diversos microorganismos para realizar oxidaciones sobre una gran variedad de sustratos, las cuales ocurren químio-, regio- o estereoselectivamente, características difíciles de alcanzar con los métodos químicos convencionales.

Muchas bacterias, levaduras y hongos filamentosos son capaces de oxidar y metabolizar diversos compuestos químicos. Entre ellas se encuentran especies de los géneros *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Candida* y algunos Actinomicetos. El género *Nocardia* ha sido utilizado ampliamente para la epoxidación microbiológica de alquenos, siendo *Nocardia corallina* la que ha proporcionado los mejores resultados<sup>27</sup>

La oxidación microbiológica de alcoholes primarios y secundarios a sus aldehídos y cetonas respectivamente, es una reacción que raramente presenta problemas en la síntesis química, sin embargo, son pocos los reportes del uso de enzimas aisladas, en este caso la alcohol-deshidrogenasa (ADH), para llevar a cabo dichas oxidaciones, las razones de esta situación son las siguientes:<sup>28,29</sup>

- a) La oxidación de alcoholes es termodinámicamente desfavorable, lo cual provoca que el reciclaje del cofactor sea complicado.
- b) La inhibición por formación de productos es un fenómeno común, ya que los aldehídos o cetonas formados, tienen una mayor afinidad a la parte hidrofóbica del sitio activo de la enzima que el alcohol el cual es más polar.
- c) La oxidación enzimática usualmente tiene mejor resultado a valores de pH entre 8 y 9.
- d) La oxidación de un alcohol secundario implica la destrucción de un centro estereogénico.

Se ha reportado el uso de los siguientes microorganismos para efectuar oxidaciones enantioselectivas de alcoholes secundarios *Corynebacterium equi*,<sup>30</sup> *Rhodococcus*

*erythropolis*,<sup>31</sup> *Bacillus stearothermophilus*,<sup>32</sup> *Yarrowia lipolytica*,<sup>33</sup> y *Nocardia corallina*, dando como productos de biotransformación la cetona correspondiente y el alcohol enantioméricamente enriquecido.

Se han utilizado células de *Nocardia corallina*, para llevar a cabo la oxidación de alcoholes secundarios, como un método de resolución microbiológica, ya que la oxidación se lleva a cabo enantioselectivamente, preferentemente en el enantiómero S.

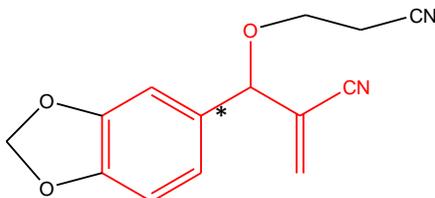
## 2.5 (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo

El aducto (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo (BH), es una molécula altamente reconocida por ser una excelente fuente para transformaciones químicas con varias metodologías, ya que este sustrato es empleado en reacciones como: Friedel-Crafts, Heck, Diels-Alder, radicales, hidrogenación, estudios fotoquímicos, transposición de Claisen, etc. y en el desarrollo de nuevas reacciones estratégicas con un alto nivel de control estereoquímico.<sup>34</sup>

El (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo es empleado en la preparación de isoxazolinas, que son importantes farmacóforos en diversas moléculas de importancia farmacológica.<sup>35</sup> Pero no se describe en la literatura, si la actividad biológica fue determinada para cada uno de los cuatro estereoisómeros posibles que se obtendrían sin inducción asimétrica<sup>36</sup>.

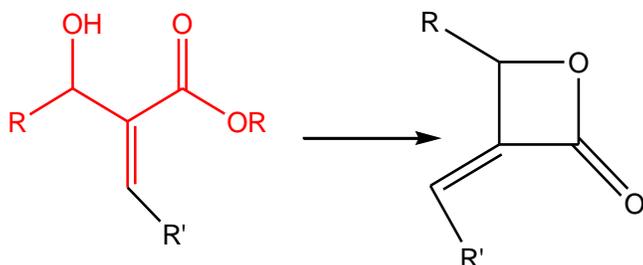
Si se hidroliza el (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo se obtiene el (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoamida o el ácido (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico. Derivados del ácido (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico, son empleados en la síntesis de diferentes intermediarios, como:

a) También se puede sintetizar moléculas con actividad antimalaria.<sup>38</sup>

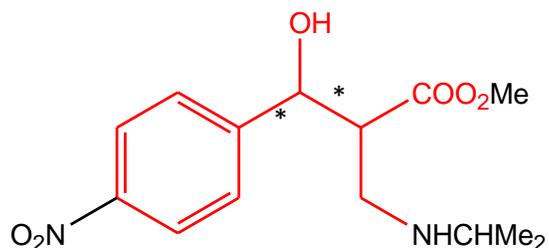


Si se hidroliza el ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo se obtiene el ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoamida o el ácido ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico. Derivados del ácido ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico, son empleados en la síntesis de diferentes intermediarios, como:

Preparación de  $\beta$ -lactonas ( $\alpha$ -alquiliden- $\beta$ -lactonas).

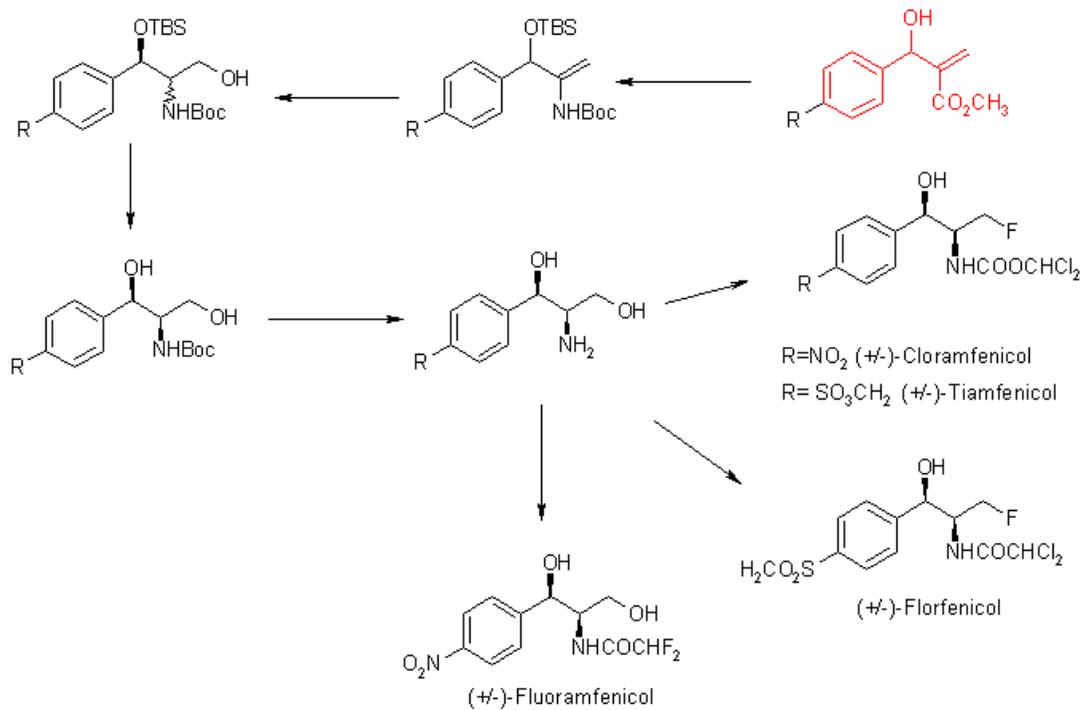


b) Derivados del ácido 3-hidroxi-2-metilen-propiónico, con actividad antimalaria.<sup>39</sup>



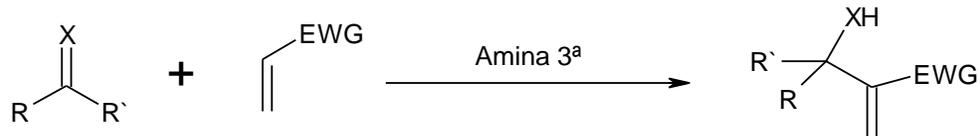
**\*Centro quiral**

b) Preparación de antibióticos, como Fluoranfenicol, Florfenicol, Cloramfenicol, Tiamfenicol.<sup>40</sup>



## 2.6 Aductos Baylis-Hillman (BH)

Los aductos Baylis-Hillman, son moléculas importantes en la síntesis orgánica y en la industria farmacéutica, este tipo de aductos se obtienen por la reacción que involucra tres componentes: un alqueno activado, un electrófilo y una amina terciaria (Esquema 4) <sup>34,35</sup>



$X = \text{O}, \text{NR}^2$

EWG= Grupo atractor de electrones

Esta reacción fue informada por primera vez en 1972, puede proporcionar aductos multifuncionales, que se emplean en la preparación de antibióticos,  $\beta$  y  $\gamma$  lactamas, isoxazoles, entre otras moléculas. Sin embargo, esta reacción puede ser lenta con algunos sustratos.<sup>36-38</sup>

La reacción de Morita-Baylis-Hillman (MBHR) es una relativa forma reciente a la formación del enlace C – C.<sup>1,2</sup> Esta reacción ocurre entre un carbón electrofílico  $sp^2$  (por ejemplo, aldehídos, cetonas o iminas) y la posición de un alqueno (o alquino) conectado a un grupo de atractores de electrones (EAG), bajo aminas terciarias como catálisis nucleófila, que es 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO) Catalizador ampliamente utilizado. Esta reacción genera compuestos. llamados aductos de Morita-Baylis-Hillman (MBHA). El MBHA han sido ampliamente utilizados como el material de partida en el natural y síntesis de productos antinaturales. Cuando el grupo X es N (típicamente NTs) esta reacción se clasifica como Aza-MBHR y los productos de esta reacción son los Aza-MBHA. Esta reacción tiene características importantes como el átomo completo, es económica, tiene la posibilidad de realizarse en un medio acuoso o en ausencia de disolventes y en estado libre de metales (organocatálisis).

Estas características están recibiendo gran atención por parte del Químicos orgánicos sintéticos que trabajan en el área académica e industrial, laboratorios en busca de técnicas más ecológicas y eficientes, así como protocolos sintéticos baratos para el descubrimiento de nuevos fármacos. Una limitación fundamental descrita en varios artículos sobre esta reacción es el largo tiempo de reacción, por ejemplo, hay reacciones que se realizaron en más de 65 días. Sin embargo, debido a la utilidad sintética de estos aductos MBHA, varios protocolos han descrito una mejora en el tiempo de reacción y en los rendimientos, tales como el uso de ultrasonido, altas presiones, uso de líquidos iónicos, cambio de catalizador, cambio de solventes, irradiación de microondas entre otros protocolos experimentales.

Se han utilizado la MBHA como intermedios sintéticos en la síntesis total. Se sintetizaron diversos productos naturales y moléculas de interés biológico a partir

de MBHA o utilizando la reacción de MBH como paso clave para la preparación de compuestos con interés biológico.

La evaluación biológica de MBHA preparada a partir de aldehídos aromáticos y alquenos activados, en el primer informe de 1999, detalla una actividad antimalárica significativa de once MBHA simples contra *P. falciparum* y *P. berghei* in vitro. Los aductos 15 y 20 demostraron una mayor potencia contra *P. berghei* en una dosis de 80 mg / kg.

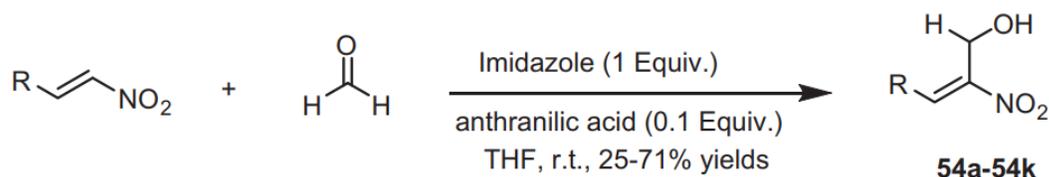
En 2005, Narender et al. sintetizó en excelentes rendimientos (97–98%) seis aductos que utilizan o cloronicotinaldehídos y acrilonitrilo o metil acrilato como material de partida, la bioevaluación contra cepas sensibles y resistentes a la cloroquina, mostró una significativa actividad para todos los compuestos sintetizados.

Los compuestos aromáticos son significativamente más activos que los no aromáticos. Estos resultados respaldan los estudios previos y todos los estudios posteriores en esta área, donde solo las MBHA aromáticas (o heteroaromáticas) se han sintetizado y bioevaluado. De hecho, ya se sabe que los anillos aromáticos y / o heteroaromáticos tienen características ubicuas en los fármacos de moléculas pequeñas. Cuanto menor sea el número de anillos aromáticos y / o heteroaromáticos contenidos en un fármaco candidato, es más fácil de desarrollar ese candidato, específicamente, más de tres anillos aromáticos en una molécula se correlacionan con una capacidad de desarrollo del compuesto más pobre y, por lo tanto, un mayor riesgo de desgaste del compuesto.

También se ha informado la bioactividad de varios MBHA como anticancerígenos. Se obtuvieron utilizando los nitroalquenos aromáticos conjugados como aceptor de Michael catalizado por imidazol. En su primer artículo, se obtuvieron 2411 MBHA por reacción entre nitroalquenos como aceptor de Michael con formaldehído usando ácido antranílico como aditivo. Los aductos se sintetizaron en rendimientos bajos a moderados (25–71%) y se probaron en las células de cáncer cervical y demostraron que los aductos 54b, 54e y 54g mostraron IC<sub>50</sub> de 2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M y 3  $\mu$ M, respectivamente. Los estudios sobre el mecanismo biológico de acción mostraron

que estos MBHA inhibían la formación de tubulina que promueve la despolimerización de los microtúbulos celulares.

En una segunda investigación, se sintetizaron once aductos que utilizan N-tosiliminas como sustrato electrofílico (un Aza-MBHR), LiCl como aditivo que usa 1,4-dioxano como disolvente. Los Aza-MBHA 55a-55k se sintetizaron e incubaron con células cancerosas cervicales humanas (HeLa) a concentraciones de 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  durante 24 h, donde los compuestos 55a, 55f y 55h mostraron una



inhibición in vitro de las células (HeLa). > 40% a 5  $\mu\text{M}$ ). Estos Aza-MBHA también inhibieron in vitro la formación de tubulina que causa la despolimerización de los microtúbulos celulares similar a la observada anteriormente.

La actividad herbicida de algunos MBHA se ha demostrado con la síntesis de diecinueve MBHA a temperatura ambiente usando trimetilamina o DABCO como catalizador y mostraron que 2-[(2,4-diclorofenil)(hidroxi)] metilacrilato mostró una actividad herbicida de amplio espectro, con un control del 100% de las malezas de hoja ancha *Zinnia elegans* y *Abutilon theophrasti*, 80% y 75% de control de malezas de la hierba *Echino chloa crusgalli* y *Digitaria sanguinalis*.

La síntesis de nuevos compuestos que tienen estructuras diseñadas para actuar en una patología seleccionada, es una de las estrategias más comunes en química medicinal. Para este propósito, la posibilidad de obtener una síntesis más corta, más barata y más eficiente utilizando protocolos sintéticos respetuosos con el medio ambiente se obtiene ampliamente utilizando la síntesis MBHA.

Recientemente se sintetizaron 20 MBHA fácilmente en rendimientos moderados (50–70%) por Bhat y Singh<sup>61</sup>, a partir de diferentes aldehídos aromáticos y derivados de vinilo activados. Estos aductos, que son derivados del ácido 3-hidroxi-

2-metilen-3-fenilpropiónico sustituidos de manera diferente, se seleccionaron por su actividad antimicrobiana In vitro por el método de dilución en serie. Muchas de estas moléculas, mostraron potentes actividades antibacterianas y antifúngicas.

Los MBHA simples se han convertido en una clase importante de compuestos bioactivos que ya presentan actividades biológicas diversificadas como antipalúdicas, molusquicidas, leishmanicidas, anticagásicos, antitumorales, antifúngicos, antibacterianos y herbicidas. Ahora, la preparación de MBHA se puede realizar en un solo paso sintético, de manera eficiente, con varios desafíos en estas síntesis según los aditivos y las condiciones de reacción, un hecho que lleva a una alta quimioselectividad.

La reacción de Morita Baylis Hillman, ha surgido en las últimas décadas como una de las reacciones más buscadas para la síntesis de diversos andamios multifuncionales.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Es de gran importancia la separación y obtención de compuestos enantioméricamente puros, debido a que algunos de estos son empleados para la síntesis de compuestos con actividad biológica. Uno de los procedimientos actualmente empleados en la obtención de compuestos quirales puros son las biotransformaciones.

Por ello se desarrollará la “Resolución Biocatalítica del ( $\pm$ )-3- acetoxi -2-metilen-3-fenilpropanoato de metilo y del ( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de etilo”., empleando la bacteria *N. corallina* y PHA se espera contar con otra alternativa para la degradación de nitrilos y/o oxidación de alcoholes, ya que se cuenta con referencias de que ésta es capaz de hidrolizar nitrilos y oxidar alcoholes enantioselectivamente, dado que en esta molécula se encuentran ambos grupos funcionales.

#### 4. HIPOTESIS

Las enzimas generadas por *Nocardia corallina* llevaran a cabo la resolución de los enantiómeros del ( $\pm$ )-3- acetoxi -2-metilen-3-fenilpropanometilo y del ( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanoetilo.

#### 5. OBJETIVOS

- **Objetivo general:** Resolución biocatalítica de alcoholes secundarios Baylis-Hillman.
  
- **Objetivos específicos:**
  1. Síntesis del ( $\pm$ )-3- acetoxi -2-metilen-3-fenilpropanoato de metilo (**A**) y del ( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de etilo (**B**).
  2. Resolución biocatalítica de los alcoholes (**A**) y (**B**) con polvos acetónidos de hígado (PAH) y *Nocardia corallina*.
  3. Desarrollo de los métodos analíticos (CLAR y CG) para la cuantificación de los excesos enantioméricos y el porcentaje de conversión del ( $\pm$ )-3- acetoxi -2-metilen-3-fenilpropanoato de metilo y del ( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de etilo.

#### 6. MATERIAL Y MÉTODOS

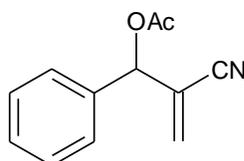
- 1.- Cromatógrafo de gases (CG) HP 6890 series.
- 2.- Espectrofotómetro de infrarrojo (IR) Perkin-Elmer Spectrum BX, FT-IR System.
- 3.- Agitador orbital REVCO
- 4.- Espectrofotómetro de infrarrojo (IR) Perkin-Elmer Spectrum BX, FT-IR System.
- 5.- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent 1100 con detector de UV/visible de arreglo de diodos.

## 7. REACTIVOS

- Benzaldehído, Reactivo analítico (R.A), J.T.Baker
- Acrilamida, R.A, Aldrich
- 1, 4-Diazabicyclo[2,2,2]-octano (DABCO), Aldrich
- Anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O), R.A, Aldrich
- Diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), R.A, J.T. Baker
- Sulfato de sodio anhídrido (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), R.A, J.T.Baker.
- Acrilato de metilo, Merck
- Dioxano, R.A, Mallinckrodt
- Acetato de etilo (AcOEt ) y hexano, R.A, J.T.Baker y Tecsiquim
- Sílica Gel, 230-400 mesh, 60 Å, Aldrich
- Placas de Sílica gel 20x20 cm., MERCK

## 8. METODOLOGÍA

### I.- Síntesis del (±)-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo <sup>39</sup>

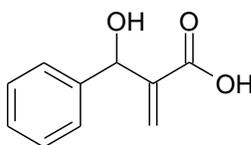


En un matraz balón de 100 mL se pesaron 100 mg (0.63 mmol) de (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo con 3 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O y 97 mg (0.95 mmol) de Ac<sub>2</sub>O, la mezcla se agito a temperatura ambiente durante 68 h, se lavó con una solución de NaHCO<sub>3</sub>, se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, posteriormente el disolvente orgánico se filtró y se concentró a sequedad y purificando por placa de 20x20 (hexano:AcOEt, 80:20), se obtuvieron 60 mg de un líquido viscoso ámbar con un rendimiento de 46.90 %.

**Preparación de la muestra para el desarrollo analítico:** Se pesaron 5 mg de ( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, se disolvieron en 500  $\mu$ L de isopropanol CLAR, se filtraron a través de una membrana de 0.45  $\mu$ m y el filtrado se colectó en un vial.

**Método analítico CG:** Columna HP-5 (5% HP ME Siloxano, 30000 X 0.25 mm L X ID), flujo de 0.8 mL/min, temperatura de inyección de 250°C, temperatura del detector de 250 °C y horno con rampa de 50-100°C (10°C/min, 5min), 100-180°C (10°C/min, 2min), t.r = 18.98 min.

## II.- Síntesis del ácido ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico <sup>40</sup>



En un matraz balón de 100 mL, se pesaron 500 mg (5.81 mmol) de acrilato de metilo, 500 mg (4.72 mmol) de benzaldehído y 1 g (8.9 mmol) de DABCO en 2 mL de dioxano. La mezcla se agito durante 10 días a temperatura ambiente, el dioxano fue removido a presión reducida. Se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró a sequedad, se purificó por cromatografía en columna SiO<sub>2</sub> (hexano:AcOEt, 80:20), se obtuvieron 231.83 mg de un líquido viscoso ámbar, con un rendimiento de 27.75 %.

**Preparación de la muestra para el desarrollo analítico:** Se pesaron 5 mg de ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico, se disolvieron en 500  $\mu$ L de isopropanol, se filtraron a través de una membrana de 0.45  $\mu$ m y el filtrado se colectó en un vial.

**Método analítico CG:** Columna HP-5 (5% HP ME Siloxano, 30000 X 0.25 mm L X ID), flujo de 0.8 mL/min, temperatura de inyección de 250 °C, temperatura del detector de 250 °C y horno con rampa de 50-100°C (10°C/min, 5min), 100-180 °C (10°C/min, 2min), t.r = 20.58 min.

**Método analítico CLAR:** Columna Chiracel OJ, flujo de 1.2 mL/min., 90:10 hexano:isopropanol, temperatura de 25°C y un volumen de inyección de 20  $\mu$ L,  $\lambda$ = 230 nm, (Enantiómero *R* t.r= 15.68 min., Enantiómero *S* t.r= 28.69 min).

### III.- Síntesis del ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanometilo (**A**) y ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoetilo (**B**).

Reacción Baylis- Hillman



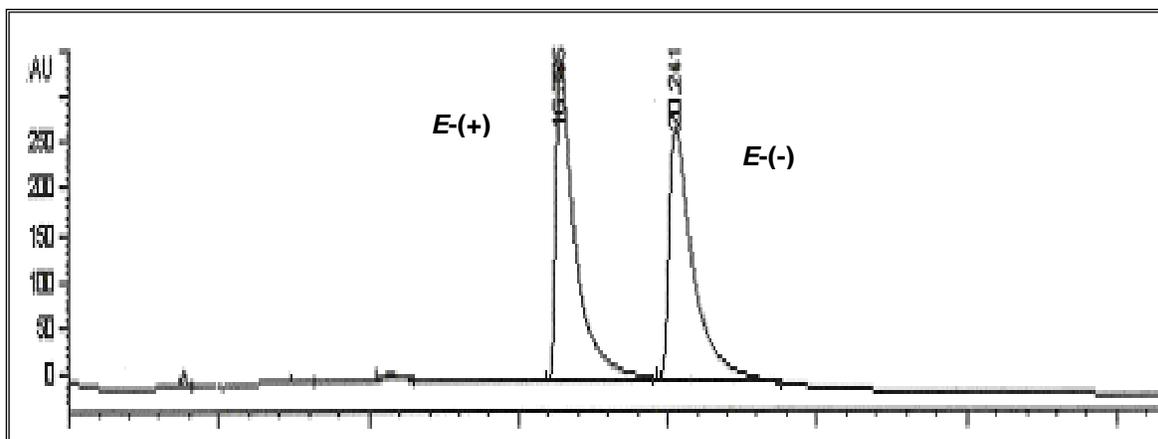
**EWG: COOMe y COOEt**

#### ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo (nitrilo **a**)

Inicialmente se utilizó la columna quiral Chiracel OB-H, para la cuantificación de la relación enantiomérica del **nitrilo a**.

Las condiciones de análisis más adecuadas para la separación de los enantiómeros fueron las siguientes: flujo 0.8mL/min., temperatura 25°C, hexano: isopropanol (90:10),  $\lambda$ = 230 nm, **nitrilo a** del **Lote A**: Enantiómero, *E*-(+) t.r= 16.38 min., Enantiómero, *E*-(-) t.r= 20.24 min., (*E*-(+):*E*-(-), 50.18: 49.82), (Figura 1), **nitrilo a** del **Lote B**: Enantiómero, *E*-(+) t.r= 16.36 min., Enantiómero, *E*-(-) t.r= 20.59 min., (*E*-(+):*E*-(-), 48.70:51.30).

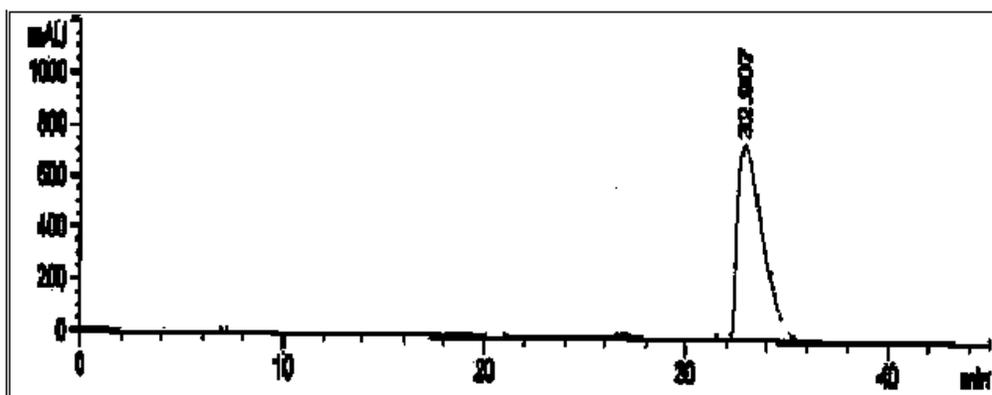
**Figura 1** Cromatograma obtenido por CLAR del ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, Lote A.



*E*(+)= 16.38 min., *E*(-)= 20.24 min. Columna Chiracel-OB-H, flujo a 0.8mL/min.,  $\lambda$ = 230 nm, T= 25°C, hexano: isopropanol (90:10)

Posteriormente se utilizó la columna OJ-H con flujo 0.6mL/min., longitud de onda 230 nm, temperatura 25°C, hexano: isopropanol (90:10), pero no separaron los enantiómeros presentando un tiempo de retención de 32.9 min., (Figura 2).

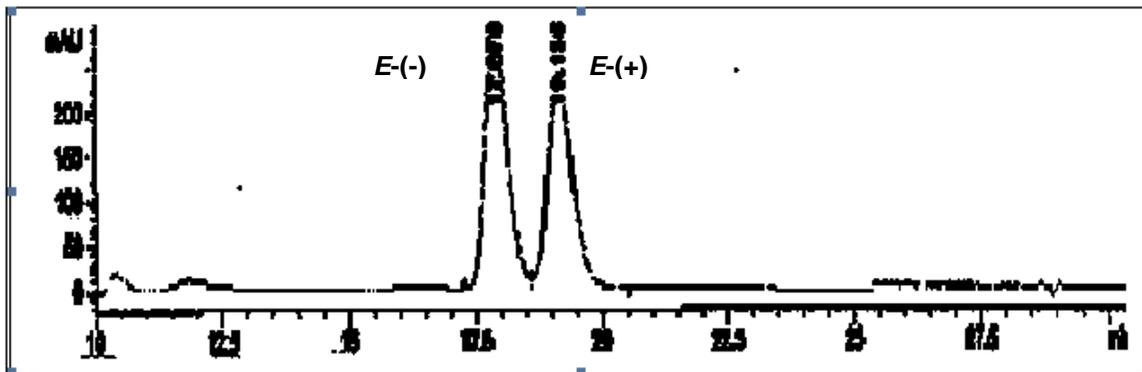
**Figura. 2** Cromatograma obtenido por CLAR del ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, Lote A.



Columna Chiracel-OJ-H, flujo a 0.6 mL/min.,  $\lambda$ = 230 nm, T= 25°C, hexano: isopropanol (90:10), t.r= 32 min.

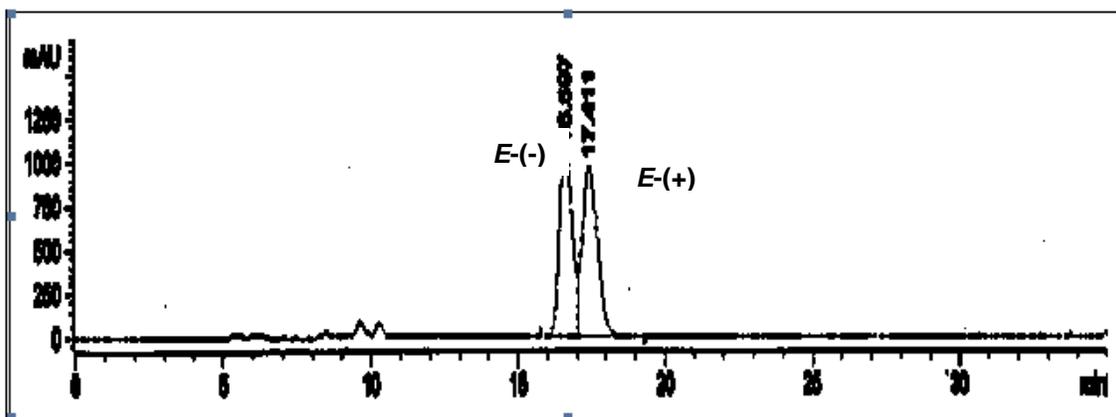
Por último se utilizó la columna OD con un flujo 0.6mL/min., longitud de onda 230 nm, temperatura 25 °C, hexano: isopropanol (90:10), en estas condiciones se separaron los enantiómeros, observándose picos simétricos con tiempos de retención del **nitrilo a** del **Lote A**: *E*-(-) t.r= 17.10 min., *E*-(+ ) t.r= 18.23 min., (*E*-(-):*E*(+), 49.65:50.35), (Figura 3) y **nitrilo a** del **Lote B**: *E*-(-) t.r= 16.59 min., *E*-(+ ) t.r= 17.41 min., (*E*-(-):*E*(+), 47.74:52.23), (Figura 4), la correlación en el sentido de la rotación, fue asignada de conformidad con Dálaigh y Connon.<sup>74</sup>

Figura. 3 Cromatograma obtenido por CLAR del ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, Lote A.



*E*-(-): 17.10 min., *E*(+) : 18.23 min., columna OD, flujo a 0.6mL/min.,  $\lambda$ = 230 nm, T= 25°C, hexano: isopropanol (90:10).

Figura. 4 Cromatograma obtenido por CLAR del ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, Lote B.

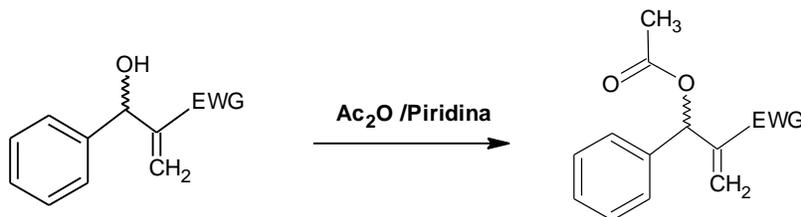


*E*-(-): 16.59 min., *E*-(+): 17.41 min., columna OD, flujo 0.6mL/min.,  $\lambda$ = 230 nm, T= 25°C, hexano: isopropanol (90:10).

Comparando las columnas OB-H y OD en las que se logra la separación de los enantiómeros del **nitrilo a**, en la OD se tiene una mejor resolución, con picos más simétricos, con respecto a la relación enantiomérica en ambas columnas estas son muy cercanas.

**Método analítico para Cromatografía de Gases (CG):** Columna HP-5 (5% HP ME Siloxano, 30000 X 0.25 mm L X ID), flujo de 0.8 mL/min, temperatura de inyección de 250°C, temperatura del detector de 250 °C y horno con rampa de 50-100°C (10°C/min, 5min), 100-180°C (10°C/min, 2min), tiempo de retención (t.r)= 22.019 min.

#### IV.- Síntesis de los acetatos ( $\pm$ )-3- acetoxi -2-metilen-3-fenilpropanoato de metilo (C) y ( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de etilo (D).



#### V.- Hidrólisis biocatalítica de los acetatos ( $\pm$ )-3- acetoxi -2-metilen-3-fenilpropanoato de metilo y ( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de etilo.

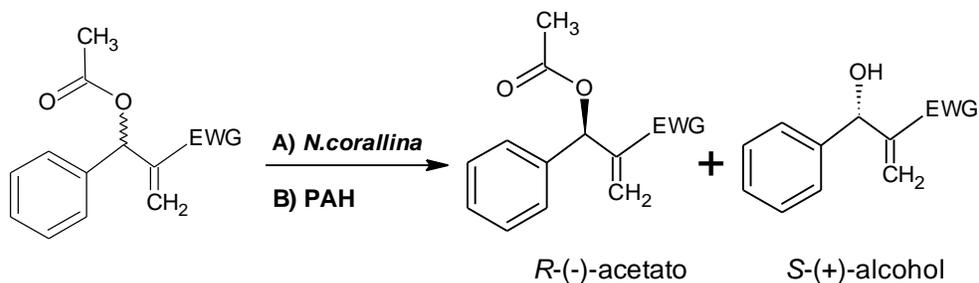
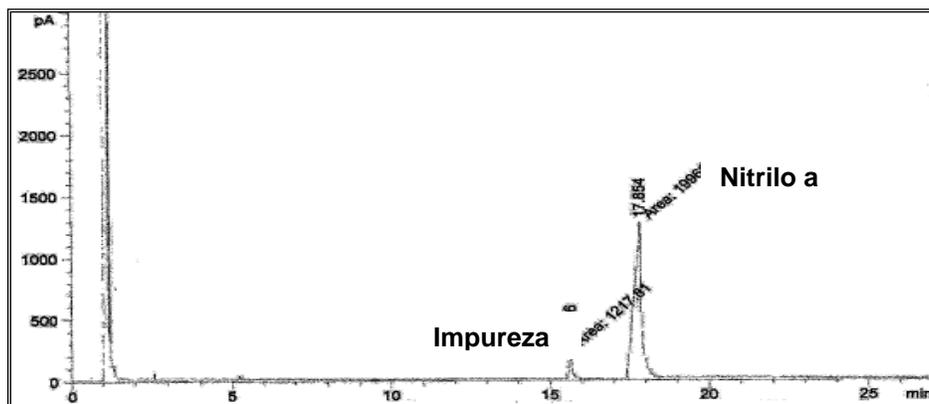
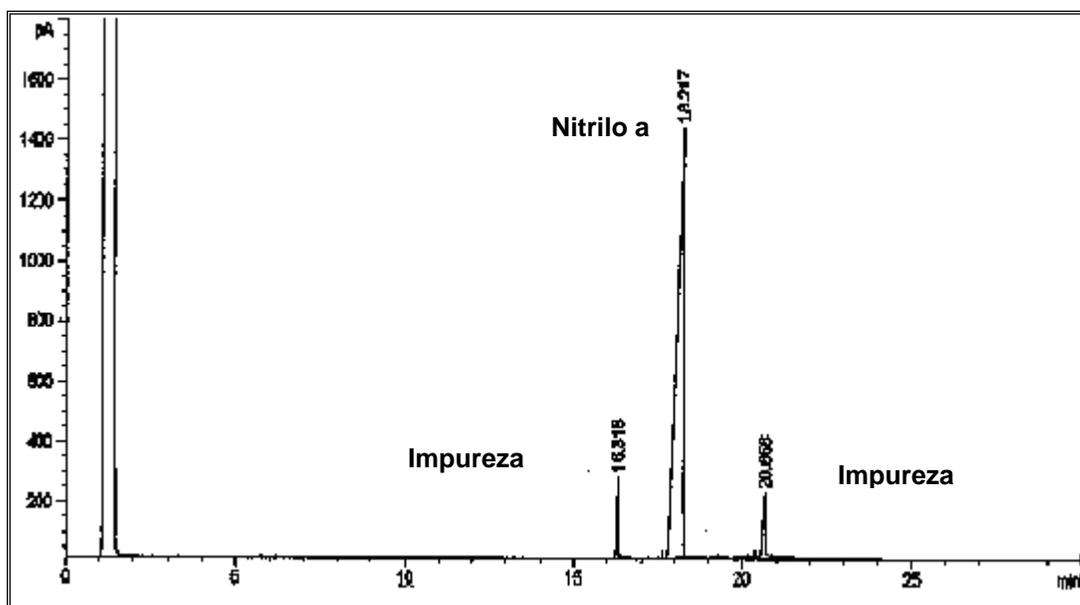


Figura. 5. Cromatograma obtenido por CG del ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, Lote A.



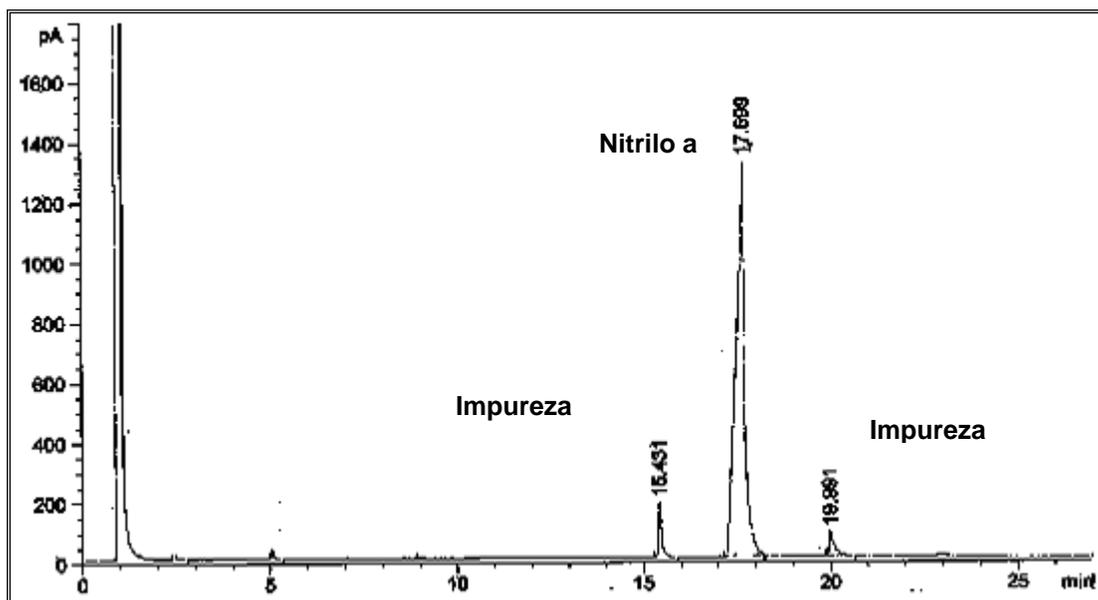
Relación de área 94.08 %, t.r= 17.85 min.

Figura. 6. Cromatograma obtenido por CG del ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, Lote B.



Relación de área 90.77 %, t.r= 18.21 min.

Figura 7. Cromatograma obtenido por CG de la mezcla 1:1 del Lote A y Lote B del (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo.



t.r= 17.69 min.

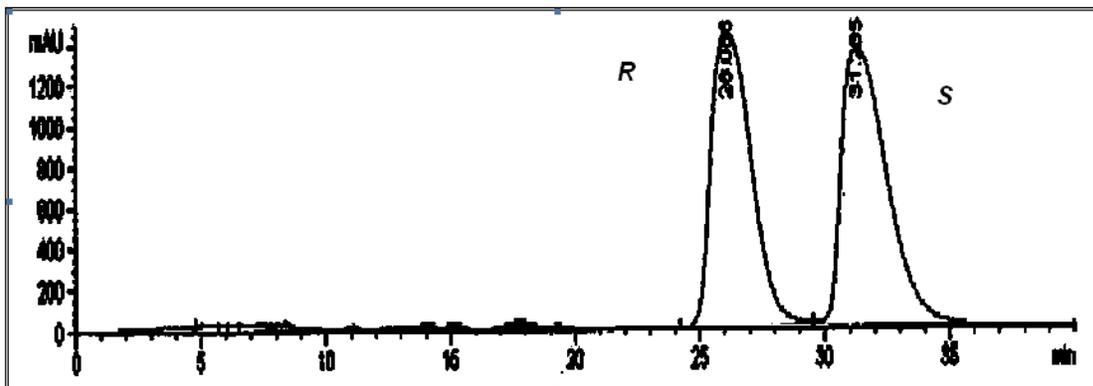
#### Desarrollo del método analítico utilizando CLAR y CG

#### (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoamida (amida b)

Se desarrolló el método analítico por CLAR, para la separación de los enantiómeros de la **amida b**, columna OB-H, flujo 0.8mL/min., longitud de onda de 230 nm., hexano:isopropanol (90:10), temperatura de 25°C y un volumen de inyección de 20  $\mu$ L, pero no se logró la separación de los enantiómeros de la **amida b**, obteniendo un t.r= 27.95 min.

Empleando la columna Chiracel OD, flujo 0.6mL/min., hexano:isopropanol 90:10, temperatura de 25°C y un volumen de inyección de 20  $\mu$ L,  $\lambda$ = 240 nm., se separaron los enantiómeros de la **amida b**, *R* t.r= 26.08 min. y *S* t.r= 31.25 min. (*R*:*S*, 49.23:50.77), (Figura 8), la configuración absoluta fue asignada de conformidad a los resultados informados por Wang y colaboradores.<sup>47</sup>

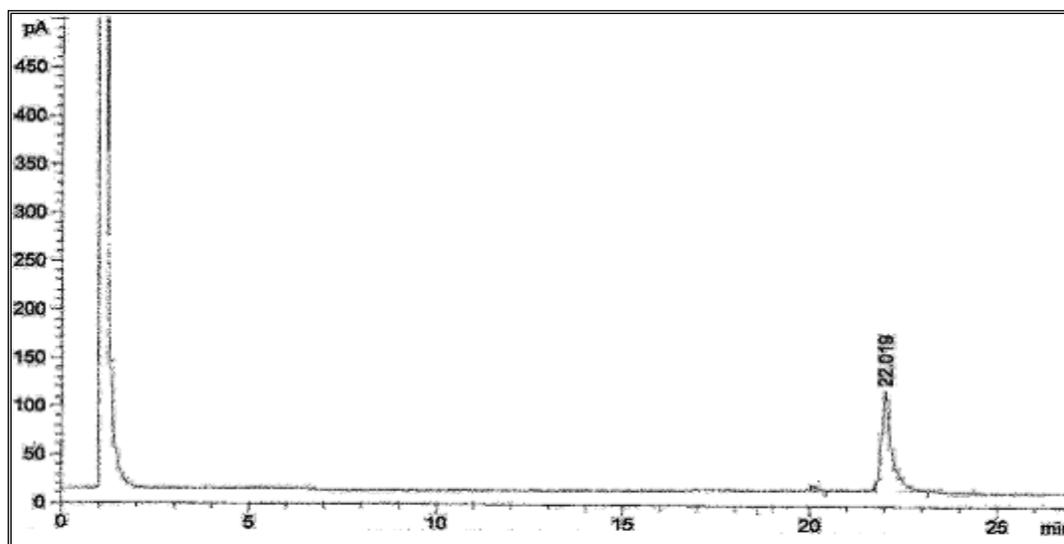
Figura 8. Cromatograma obtenido por CLAR de la ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoamida.



R : 26.08 min., S : 31.25min.

En el análisis por CG de la **amida b**, columna HP-5, las condiciones mas adecuadas fueron: flujo de 0.8mL/min, temperatura de inyección de 250°C, temperatura del detector de 250°C, rampa de 50-100°C (10°C/min, 5min), 100-180°C (10°C/min, 2min) teniendo un t.r= 22.019 min. (Figura 9).

Figura 9. Cromatograma obtenido por CG de la ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoamida.



t.r= 22.019 min.

## **VI.- Obtención de Biocatalizadores:**

### **Adaptación y crecimiento de *Nocardia corallina* B-276 (ATCC 31338)**

La bacteria se adaptó mediante siembra en placas de agar y su posterior incubación a 28-32°C durante 72-96 horas.

#### **Precultivo I**

Se inocularon las bacterias activadas en placas de agar en 8 matraces Erlenmeyer con deflectores de 125 mL con 50 mL de medio líquido y 2 matraces de 250 mL, conteniendo 100 mL de medio, se incubaron durante 20-24 horas a 28-32°C a 170 rpm.

#### **Precultivo II**

Se transfirió el contenido de los matraces del precultivo I, cada matraz de 125 mL con 50 mL de preinoculo I, se trasvasó a un matraz con deflectores de 250 mL con 100 mL de medio líquido y cada matraz de 250 mL con 100 mL de preinoculo I se trasvasó a un matraz de 1000 mL con 400 mL de medio líquido todos los matraces con deflectores, se incubaron a 28-32°C a 170 rpm durante 24 horas.

#### **Aislamiento y activación de células**

Las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación a 4,500 rpm durante 15 minutos desechando el sobrenadante, las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.0, centrifugando en cada ocasión bajo las mismas condiciones.

La biomasa se pesó y se activó con 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos a 170 rpm, 28-32°C durante 30 min.

#### **Biotransformaciones**

Se estudió la biotransformación de los siguientes sustratos: (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de metilo y el (±)-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de etilo

con las células aisladas de *Nocardia corallina* suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0, con la relación deseada de sustrato:células húmedas, temperatura 28-32°C y a 170 rpm.

Se tomaron muestras a diferentes tiempos de reacción, manteniendo una muestra control (de cada sustrato con células) y un blanco de células (células de *Nocardia corallina* en solución amortiguadora).

Se utilizaron (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, (±)-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo y el (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoamida, como blanco de los sustratos, para ver su estabilidad en la solución amortiguadora de fosfatos.

### **Tratamiento de las muestras**

Para aislar los sustratos biotransformados de la solución amortiguadora, se adiciono NaCl; la mezcla se agitó 10 min., posteriormente se centrifugó a 4,500 rpm/15 min., el sobrenadante se extrajo con AcOEt (3 x 10mL), la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se analizó por IR y RMN de 3 a 5 mg de éste fue disuelto en isopropanol CLAR determinando la relación enantiomérica por CLAR bajo las condiciones descritas para cada sustrato, por CG se determinó el % de conversión en las condiciones descritas para cada sustrato.

## **9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Biotransformaciones del (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo (nitrilo a)**

Durante el proyecto se emplearon dos lotes de (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, para fines prácticos se denominaron como Lote A y B, por CG se determinó la relación de área de los lotes A y B del nitrilo a, obteniendo 94.08 % y 90.77 % respectivamente.

Se realizaron 15 experimentos, 7 empleando el Lote A y 8 empleando el Lote B.

Ya que al inicio del proyecto solo se contaba con la columna quiral OB-H, con ella se analizaron los productos obtenidos de la biotransformación.

### **Desarrollo del método analítico utilizando CG**

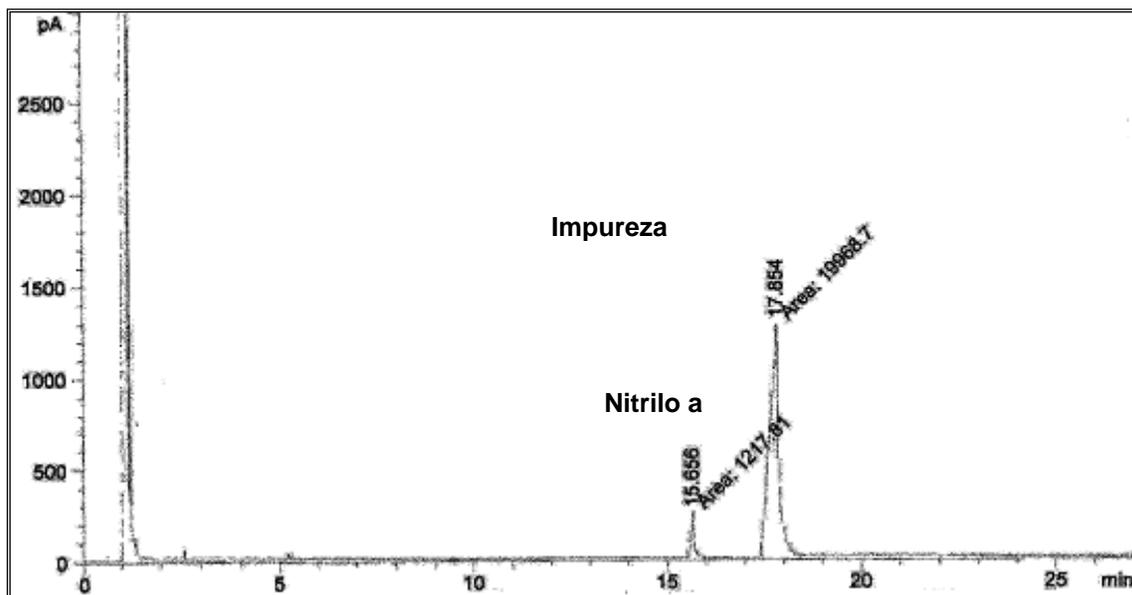
#### **I.- (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo (nitrilo a)**

El análisis por CG del **nitrilo a** se llevó a cabo empleando una columna HP-5, donde las condiciones más adecuadas fueron: flujo de 0.8 mL/min, temperatura de inyección de 250°C, temperatura del detector de 250°C, rampa de 50-100°C (10°C/min, 5min), 100-180°C (10°C/min, 2min) el **nitrilo a** del **Lote A** tuvo un t.r = 17.85 min. (Figura 5), **nitrilo a** del **Lote B** tuvo un t.r = 18.23 min., (Figura 6). Ya que ambos lotes presentaron tiempos de retención diferentes, se analizó una mezcla 1:1 de estos lotes, donde el tiempo retención fue 17.69 min. (Figura 7). Por este método se determinó la relación de área del **nitrilo a**, (Fórmula 1) de cada uno de los lotes del (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, donde el Lote A tiene relación del 94.08 % y el Lote B de 90.77 %.

Fórmula 1:

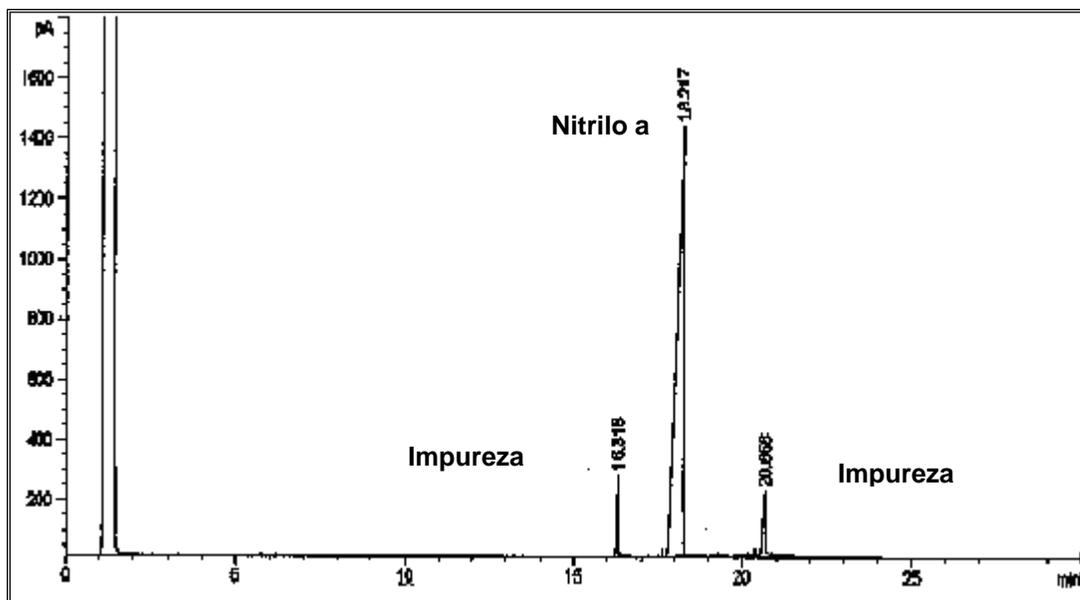
$$\text{Relación de área} = \frac{\text{Área del nitrilo a}}{\Sigma \text{ Áreas}} \times 100$$

Figura 1. Cromatograma obtenido por CG del ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, Lote A.



Relación de área 94.08 %, t.r= 17.85 min.

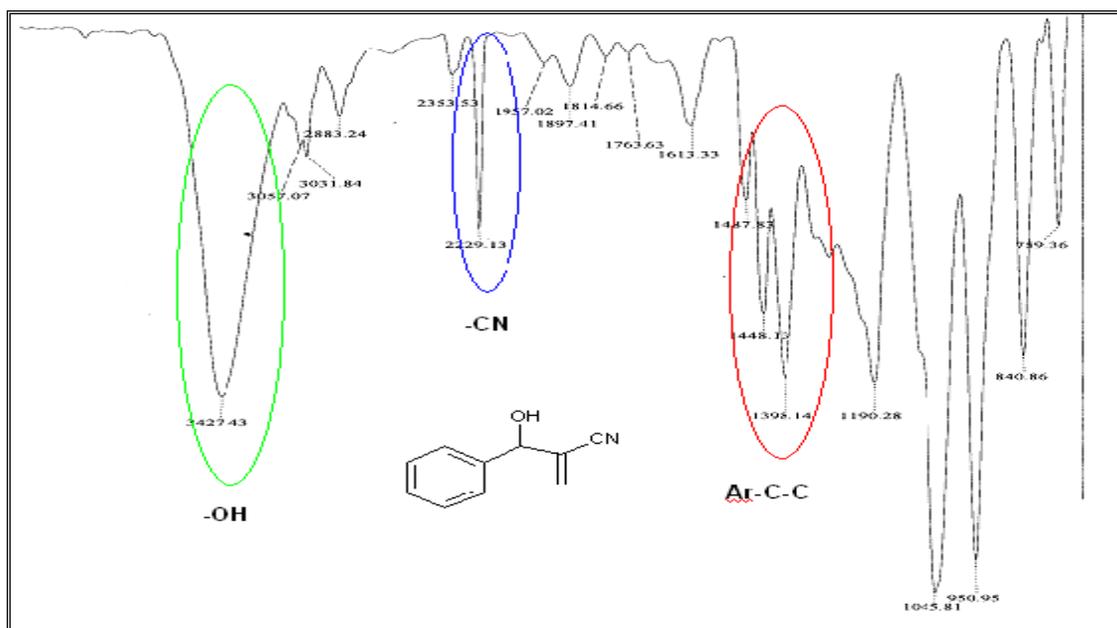
Figura. 2. Cromatograma obtenido por CG del-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, Lote B.



Relación de área 90.77 %, t.r= 18.21 min.

Se realizó el análisis por IR, comparando los espectros del nitrilo a (Figura 17) y el producto de biotransformación (Figura 18). En el espectro IR del producto de biotransformación (Figura 18), se observa una disminución en la señal del grupo hidroxilo ( $3054\text{ cm}^{-1}$ ), en  $2992$  y  $2853\text{ cm}^{-1}$  se aprecian señales que son producidas por desechos de la *Nocardia corallina*, ya que estas señales también aparecen en el blanco de células, en el mismo espectro del producto desconocido, se observa la señal del grupo nitrilo que es igual a la que se aprecia en el espectro del nitrilo a ( $2227\text{ cm}^{-1}$ ). Por otra parte, se observa la presencia de una señal en  $1702\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a un grupo carbonilo, que de acuerdo a la literatura aparecen en el intervalo del grupo funcional de cetona  $1765\text{-}1645\text{ cm}^{-1}$ . La disminución en la señal de grupo hidroxilo y la presencia de un grupo carbonilo de cetona nos indica que la biotransformación siguió la ruta biocatalítica de la oxidación, obteniéndose el 2-benzoilpropenonitrilo (d), sin embargo no se puede asegurar que ésta se efectúe enantioselectivamente, ya que el producto en CLAR, presenta el mismo tiempo de retención que el enantiómero E(-) del nitrilo a, lo que impide determinar la relación enantiomérica.

**Figura 1. Espectro de IR del nitrilo a, Lote B.**



IR ( $\text{CHCl}_3$ ): (-OH)  $3054$ , (-CN)  $2228$ , (Ar-C-C)  $1486$ ,  $1446$ ,  $1396\text{ cm}^{-1}$

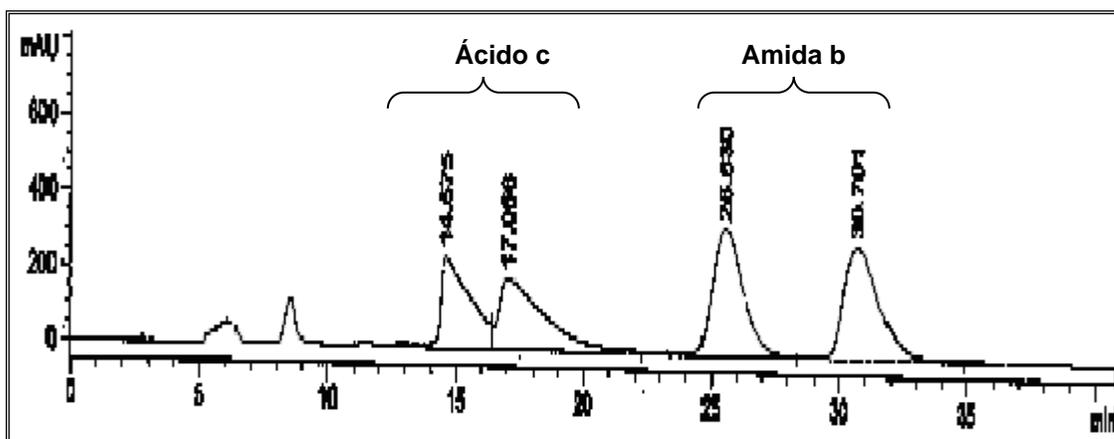
## Biotransformaciones de la ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoamida

Se realizaron tres experimentos empleando como sustrato la ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoamida sintetizada químicamente, se esperaba que la biotransformación siguiera la ruta de oxidación y obtener la 2-benzoilpropenoamida (e) o en su caso la ruta de hidrólisis y obtener así el ácido ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico (ácido c), (Ver Esquema 5).

En los dos primeros experimentos se manejó una relación 1:100 sustrato: células húmedas, en éstas no se observó conversión por CLAR, ni por CG. El primero se dejó hasta 115 h y el segundo hasta 168 h, sin obtener resultados positivos, es decir la amida b no sufrió cambio alguno, esto nos llevó a realizar un tercer experimento aumentando la relación 1:200, dejando ésta hasta las 263 h. Por CLAR se observa un pico a los 17.19 min. (Figura 19), que corresponde a una relación de 20.90 contra un 79.1 de amida b, la relación enantiomérica de la amida b es de 51.02:48.98 (R:S), hay que hacer mención que la materia prima tenía originalmente 48.28:51.72 (R:S).

Al analizar por CLAR (Figura 22) la mezcla de las referencias (ácido c: amida b) los enantiómeros del ácido c presentan R t.r= 14.56 min. y S t.r= 17.05 min., y los enantiómeros de la amida b R t.r= 25.52 min. y S t.r= 30.69 min.

**Figura 1.** Cromatograma obtenido por CLAR de mezcla 1:1 de productos de referencia del ácido c : amida b.

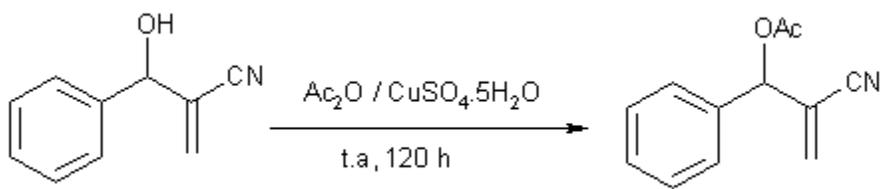


**Ácido c** R: 14.56 min., S: 17.05 min.; **Amida b** R: 25.52 min., S: 30.69 min.

## Biotransformaciones del (±)-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo

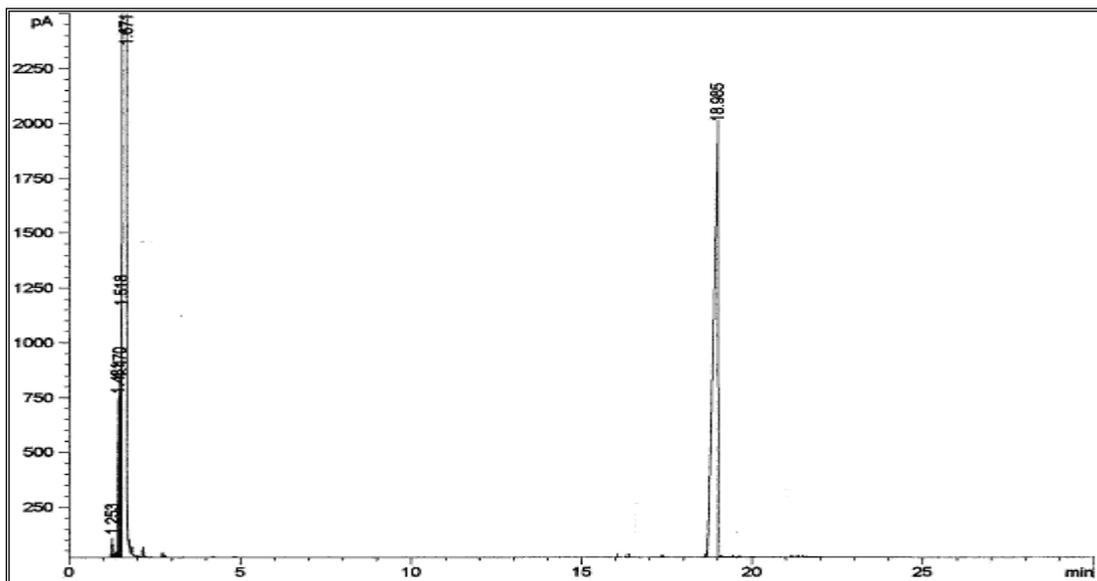
Con la finalidad de favorecer la hidrólisis del nitrilo, se realizó la protección del alcohol del (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo (nitrilo a), obteniendo un 46.90 % de rendimiento, el acetato obtenido fue identificado y caracterizado por IR y RMN.69

### Esquema 1. Obtención del (±)-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo.



Utilizando las condiciones de análisis por CG del nitrilo a, se analizó el (±)-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, presentó un t.r= 18.98 min. (Figura 1).

### Figura 1. Cromatograma obtenido por CG del (±)-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo.



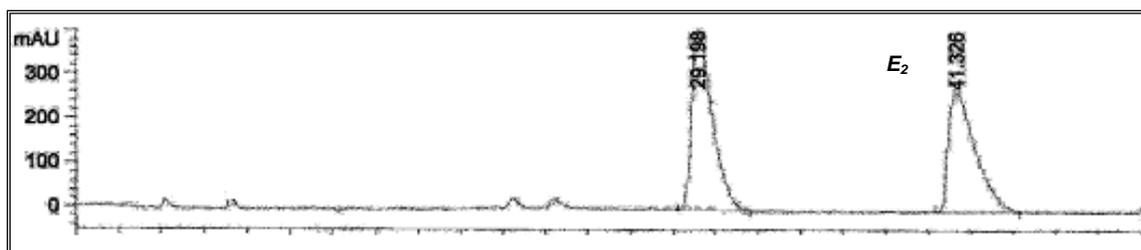
t.r= 18.98 min.

Se desarrolló el método analítico para determinar la relación enantiomérica por CLAR, se inició empleando la columna Chiracel-OD, bajo las condiciones de análisis del nitrilo a. El ( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo no se resuelve presentando un t.r= 10.97 min.

En la columna OB-H con flujo de 0.8 mL/min, 90:10 hexano:isopropanol,  $\lambda$ = 254 nm y T=25 °C, se separaron los enantiómeros E1 t.r= 19.15 min., E2 t.r= 22.92 min., pero la resolución no fue adecuada ya que los picos fueron gaussianos.

Con la columna OJ-H con flujo de 0.8mL/min, 90:10 hexano:isopropanol,  $\lambda$ = 230 nm y T= 25°C, la resolución y separación de picos fue mas adecuada, enantiómero E1 t.r= 29.18 min., E2 t.r= 41.32 min.,(E1:E2, 52.23:47.77), (Figura 2).

**Figura 2. Cromatograma obtenido por CLAR del ( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo., columna OJ-H.**



$E_1$ : 29.18 min.,  $E_2$ : 41.32 min., columna OJ-H con flujo de 0.8mL/min, 90:10 hexano:isopropanol,  $\lambda$ = 230 nm y T= 25°C.

Se sintetizaron los alcoholes quirales BH como: ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo **1**, ácido ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico **2** y sus ésteres ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de metilo **3a**, ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de etilo **3b** y el ( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo **4** y los acetatos de los alcoholes **1**, **3a (Ac-3a)** y **3b (Ac-3b)**. Los porcentajes de conversión de los alcoholes **3a** y **3b** por reacción química fueron inferiores al 25%, y los productos de purificación fueron menores al 20%, estos bajos rendimientos se pueden asociar a los subproductos obtenidos en la reacción química, a los dímeros correspondientes a los acrilatos empleados, así como al benzaldehído que no

reacciono y al ácido benzoico que se forma por el tiempo prolongado de agitación, las reacciones fueron monitoreadas por 300 horas, se probando diferentes medios de reacción para incrementar los porcentajes de conversión y disminuir los subproductos, sin mejorar estos resultados. Para realizar las acetilaciones se empleó anhídrido acético, sulfato de cobre y cloruro de metileno, como medio de reacción, estas reacciones dan porcentajes de conversión superiores al 80%.

Se obtuvieron cantidades inferiores a los 100 mg de **3a**, **Ac-3a**, **3b** y **Ac-3b**, que permitieron obtener los estándares de los alcoholes y acetatos correspondientes los cuales se caracterizaron por IR (Infrarrojo). El (±)-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, fue el único acetato que se logró obtener con porcentajes de conversión superiores al 90 %, fue purificado por columna, se obtuvo con una pureza mayor a 98%, empleándose para llevar a cabo la selección de biocatalizadores.

Después de una revisión bibliográfica y con los resultados obtenidos previamente, se seleccionaron los polvos acetónidos de hígado (PAH) de res y puerco, así como células aisladas de *Nocardia corallina* B-276, está adaptada en Medio GYEA.

**Biocatálisis con PAH de res y puerco:** La biocatálisis se llevó a cabo empleando como codisolvente Dimetilformamida (DMF) al 0.6% v/v, PAH suspendidos en una solución amortiguadora de fosfatos 0.5M pH 8, relación BH:PAH de 1:1.24 (p/p), se monitoreó a diferentes tiempos de biotransformación a 30°C y 150 rpm con seguimiento de la hidrólisis por CG. Basavaiah y Dharma, emplearon PAH de puerco relación 1:1.24 (BH:PAH, w/w), teniendo la resolución del S-(+)-alcohol y R-(-)-acetato, con un ee de 60% y 42% de hidrólisis a las 9 horas. Nuestros resultados empleando las mismas condiciones fue el 100% de hidrólisis y 60% de ee del S-(+)-alcohol con los dos PAH empleados (res y cerdo), al incrementar la relación del PAH 1:15 en 10 minutos se tenía un 52% hidrólisis con PAH de res y un 41% hidrólisis con PAH de puerco, estadísticamente no hay diferencia significativa entre la actividad de estos dos biocatalizadores, pero empleando esta relación no hay enantioselectividad, en ningún caso. Cabe resaltar que se realizaron experimentos con diferentes relaciones BH:PAH, pero las condiciones antes mencionadas fueron

las más óptimas para la resolución enantioselectiva del aducto BH **4**, todos los experimentos se realizaron por triplicado.

**Biotransformación con células de *Nocardia corallina* B-276:** Para la obtención de células de *Nocardia corallina* B-276, esta fue adaptada medio GYEA (10g/L de Extracto de Levadura y 10g/L de Glucosa). La biotransformación se llevó a cabo empleando como codisolvente DMF al 0.6% v/v, adicionando células de *N. corallina* suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7, se realizaron diferentes biotransformaciones modificando la relación BH:células húmedas, monitoreando a diferentes tiempos de biotransformación a 30°C y 150 rpm con seguimiento de la hidrólisis por CG. Con el medio GYEA se obtuvieron de 11 a 15g/L de biomasa.

Empleando el medio GYEA, relación 1:1.24, a las 72h, se obtuvo un 53.67% de hidrólisis y un 68.66% ee del S-(+)-alcohol, incrementando la relación a 1:10, se reduce el tiempo de hidrólisis a 50 min se obtuvo 65% de hidrólisis y 64.18% ee. Se determinó que el pH influye en el proceso de resolución enzimática con *N. corallina*, después de separar las células del medio de crecimiento, se mide el pH de este, como ya se mencionó anteriormente se seleccionó medio GYEA, para la obtención de biomasa ya que se obtenía mayor cantidad de biomasa, se obtuvieron 3 lotes diferentes pH del sobrenadante 6.5, 7.1 y 7.3, se realizaron biotransformaciones con relación 1:10 de BH:células, en tiempos de 10 a 90 min, en intervalos de 10 min, con pH de 6.5 a los 90 min se obtiene un 12 % de hidrólisis, con pH 7.1, 15.69 % de hidrólisis, en tanto el pH óptimo fue el de 7.3 con un 93 % de hidrólisis y 65% ee, en los otros lotes los ee fueron inferiores al 15 %. Con las células de *N. corallina* obtenidas el medio GYEA se obtienen mejores resultados, que los reportados con PAH, se requiere seguir realizando experimentos para encontrar la relación BH:células y el tiempo óptimo para incrementar el ee.

Los experimentos con el (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo **1**, empleando células de *N. corallina*, se tienen reportes, que esta tiene actividad de nitrilo hidratasa y amidasa, se probaron diferentes relaciones hasta 1:1000 BH:células y tiempos superiores a las 200 horas, sin obtener los productos de hidrólisis deseados

(amida o ácido correspondientes), se tienen que evaluar la biomasa con otros pH y tiempos de biotransformación.

Se desarrollaron los métodos analíticos para la cuantificación de los porcentajes de conversión por Cromatografía de Gases (CG) y los ee, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

**Método CG (% de conversión):** Se empleó una columna HP-5 de alta resolución (30m, D.I 0.25mm, película 0.25  $\mu$ m), las temperaturas empleadas en el inyector y detector fueron de 250°C, en el horno se empleó una rampa la temperatura inicial fue de 50°C, se subió 10°C/min hasta 180°C se dejó 10 min esta temperatura y se bajó 10°C/min hasta 50°C, se empleó un flujo de 0.8 mL/min. Donde los tiempos de retención ( $t_R$ ) de los productos y subproductos son los siguientes:

( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo **1**, 14.44 min.

Ácido ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico **2**, 20.60 min.

( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de metilo **3a**, 14.38 min.

( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de metilo **Ac-3a**, 17.01 min.

( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de etilo **3b**, 16.04 min.

( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanoato de etilo **Ac-3b**, 21.66 min

( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo **4**, 14.44 min.

Benzaldehído, 7.28 min.

Ácido Benzoico, 10.12 min.

Dímero de acrilato de metilo 3.56 min.

Dímero de acrilato de etilo, 4.47 min.

**Método CLAR (% ee):** Se emplearon diferentes columnas quirales como la Chiracel OD (para ee alcoholes BH) y OJ-H (para ee de los acetatos BH y ácido **2**), se empleó un gradiente de 90:10 de hexano:isopropanol (v/v), con un flujo de 1.0 mL/min. Se obtuvieron los siguientes  $t_R$ :

( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo **1**,  $E_R$ : 14.60 min y  $E_S$ : 16.72 min.

( $\pm$ )-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo **4**,  $E_R$ : 28.00 min y  $E_S$ : 42.56 min.

Ácido ( $\pm$ )-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico **2**,  $E_R$ : 15.68 min y  $E_S$ : 28.69 min.

## 10. CONCLUSIONES.

Se desarrollaron los métodos analíticos necesarios para el análisis del (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, el ácido (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico, (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanometilo y (±)-3-acetoxi-2-metilen-3-fenilpropanoetilo.

Se obtuvieron los siguientes compuestos:

(±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanonitrilo, el ácido (±)-3-hidroxi-2-metilen-3-fenilpropanoico, por el método reportado por Drewes y colaboradores.<sup>40</sup>

## BIBLIOGRAFÍA

1. M. Wang, T. Si, H. Zhao. Biocatalyst development by directed evolution, *Bioresource Technology*, 115 (2012), 117–125.
2. C.G. Lima-Junior, M. L. A. A. Vasconcellos. Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological activities and potencialities to the discovery of new cheaper drugs, *Bioorganic & Medical Chemistry*, 20 (2012), 3954-3971.
3. K.S. Park, J. Kim, H. Choo, Y. Chong. Octanol-Accelerated Baylis-Hillman Reaction, *Synlett*, 3 (2007), 395-398.
4. D. Basavaiah, P. Dharma-Rao. Biocatalytic Approach to Optically Active Baylis-Hillman Reaction Products, *Synthetic Communications*, 24:7 (1994), 917-923.
5. Ramírez C., Manjarrez N., Pérez H., Solís A., Luna H, Cassani J., "Preparación de ingredientes farmacéuticos activos de derivados de aductos de Baylis-Hillman con *Nocardia corallina* B-276" *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40 (4), (2009), 5-11.
6. Woodly J., **2007**, *J. Chem. Technol. Biot*, 82, pp 1053-154.
7. Bu'lock J., Kristiansen B., **1991**, *Biotechnología Básica*, Edit. Academic Press, Londres.

8. Straathorf A.J.J., Adlercreutz P., **2000**, *Applied Biocatalysis*; Edit. Harwood Academic Publishers, 2<sup>a</sup> ed., pp 156.
9. Straathof A. J. J., Panke S., Schmid A., **2002**, *Curr. Opin. in Biotech*, 13, pp 548-556.
10. Yazbeck D., Martinez C., Hu S., Tao J., **2004**, *Tetrahedron: Asymmetry*, 15, pp. 2757-2763.
11. <http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap14/>, Fecha de consulta 13-Mayo-08.
12. Joklik W., Willet H., Amos B., Wilfert C., **1998**, *Microbiología Zinsser, Ed. Médica Panamericana*, 20<sup>a</sup> ed., Argentina, pp 729-39.
13. Daniel. D C., Scott. A. E., **1999**, *J. Bacteriology*, 181, pp 2752-2758.
14. Kobayashi M., Shimizu S., **2000**, *Curr. Opin. in Biotech*, 4, pp 95-102.
15. Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Scheleifer K.H., **1992**, "A handbook on the Biology and bacteria: ecophysiology, aislation, identification, applications", ed 2<sup>a</sup>, Ed. Springer-Verlay, Vol. 2, New-York, pp 1188-1213.
16. Bhalla T.C., Kumar H., **2005**, *Can. J. Microbiol.*, 51 (8), pp 705-708.
17. Pérez H.I., Luna H., Manjarrez N. y Solís A., **2001**, *Rev. Soc. Quím. Méx.*, 45 (2), pp 43-46.
18. Pérez H. I., Manjarrez N., Luna H., Solís A., Ramírez C., **2005**, *J. Braz. Chem. Soc.*, 16, pp 1150-1153.
19. Pérez H. I., Manjarrez N., Luna H., Solís A., **2001**, *Biotech. Letters*, 23, pp 1467-1472.
20. Pérez H. I., Luna H., Manjarrez, N., Solís A., **2001**, *Tetrahedron: Asymmetry*, 12, pp 1709-1712
21. Pérez H. I., Luna H., Manjarrez, N., Solís A, Nuñez M. A., **2000**, *Tetrahedron:Asymmetry*, 11, pp 4263-4268.
22. Smith M.B., **1994**, *Organic Synthesis*, Ed. McGraw-Hill, New York, pp 221, 253-255.
23. Furniss B., Hannaford A., Smith P., **1989**, *Tetchell A., Vogel's Textbook of practical Organic Chemistry*, 5<sup>a</sup> ed., Ed Longman, England, pp 445, 610.
24. Ho T-L., Hall T. W., **1975**, *Synth. Commun.*, 5 (4), pp 309-313.

25. Blair L., Baldwin J., Smith W., **1977**, *J. Org. Chem.*, 42 (10), pp 1816-1817.
26. Struss J., Barnhart W., Velasco M., Bronley-DeLancey A., **2006**, *Tetrahedron Letters*, 47, pp 6635-6636.
27. Takahashi O, Furuhashi K., **1990**, Japanese patent, 15, 039/1990. Chem. Abstr. 113:5708.
28. Faber K., **2000**, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4a ed, Edit. Springer, Alemania, pp. 21-22, 220-221.
29. Luna H., Prasad K., Repič O., **1993**, [\*Biocatalysis and Biotransformation\*](#), 8, pp 155-162.
30. Luna H., Prasad K., Repič O., **1993**, [\*Biocatalysis and Biotransformation\*](#), 8, pp 155-162.
31. Jonson W. S., Ireland R.E., **1963**, *Organic Synthesis.*, 4, 760.
32. Hall J.H., Gisler M., **1976**, *J. Org. Chem.*, 41 (23), pp 3769-70.
33. Moorthy J. N., Singhal N., **2005**, *J. Org. Chem*, 70 (5), pp 1926-1929.
34. Acke D. R.J., Stevens C. V., **2006**, *Org. Process Res. Dev.*, 10, 417-422.
35. Verkade, J. G., You, J., Xu, J., **2003**, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, (41), pp 5054-5056
36. Basavaiah D., Jaganmohan A., Sayanarayana T., **2003**, *Chem. Rev.*, 103, pp 811-891.
37. Das B., Mahender G., Holla H., Banerjee J, **2005**, *ARKIVOC (iii)*, pp 27-35.
38. Kundu M. K., Sundar N., Kumar S., K., Bhat S.V., Biswas S., Valecha N., **1999**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9, pp 731-736.
39. Heravi M.M., Behbahani F.K., Zadsirjan V., Oskooie H., **2006**, *J. Braz. Chem. Soc.*, 17 (5), pp 1045-1047.
40. Drewes S., Emslie N., Field J., Khan A., Ramesar, N., **1992**, *Tetrahedron: Asymmetry*, 3 (2), pp. 255-260.
41. Richter Ha., Walk T., Hölzel A., Jung G, **1999**, *J. Org. Chem*, 64 (4), pp. 1362-1365.
42. Kajita S., Ohmura H., Akashi M., Kojima S., Satoh A., Tomida K., **2004**, Japanese patent, Appl. WO 2003-JP15843 20031211, pp. 94.

43. Compton D., Sheng S., Carlson K., Rebacz, N. A., Lee I. Y., Katzenellenbogen B. S., Katzenellenbogen J. A., **2005**, *J. Med. Chem.*, 48 (7), pp 2724.
44. Cho H., Ueda M., Shima K., Mizuno A, Hayashimatsu M., Ohnaka Y., Takeuchi Y, Hamaguchi M., Aisaka K., **1989**, *J. Med. Chem.*, 32 (10), pp 2399-406
45. Berger D. M., Dutia M., Birnberg G., Powell D., Boschelli D. H., Wang Y.D., Ravi M., Yaczko D., Golas J., Lucas J., Boschelli F., **2005**, *J. Med. Chem.*, 48 (19), 5909-5920.
46. Boschelli D. H., Wang Y. D., Ye F., Wu B., Zhang N., Dutia M., Powell D. W., Wissner A., Arndt K., Weber J.M., Boschelli F., **2001**, *J. Med. Chem.*, 44 (5), pp 822-833.
47. Boschelli D. H., Wang Y. D., Johnson S., Wu B., Ye F., Barrios A.C., Golas J. M., Boschelli F., **2004**, *J. Med. Chem*, 47 (7), pp1599-1601.
48. Gazit A., Oshero N., Posner I., Yaish P., Poradosu E., Gilon C., Levitzki A., **1991**, *J. Med. Chem*, 34 (6), pp 1896-1907.
49. Wentland M.P., Carlson J.A., Dorff P.H., Aldous S.C., Perni R. B., Young D. C., Woods M.G., Kingsley S.D., Ryan K. A., Rosi D, Drozd M.L., Dutko F.J., **1995**, *J. Med. Chem.*, 38, pp 2541-2545.
50. Bakuniak E., Ptaszkowska J., Ziminska Z., **1997**, Polish patent, Appl. PL 93-301073 19931117, pp 8.
51. Hogenkamp D.J., Johnstone T.B.C., Huang J.C., Li W.Y., Tran M., Whittemore E.R., Bagnera R.E., Gee K.W., **2007**, *J. Med. Chem.*, 50, pp 3369-3379.
52. Eckardt K., Tresselt D., Ihn W., Bradler G., Reinhardt G., **1982**, *J. Antibiot.*, 35 (12), pp. 1638-1640.
53. Katzung B., **1996**, *Farmacología básica y clínica*, 6ª ed, Ed. El Manual Moderno, México, pp 906 Katzung B., **1996**,
54. Heravi M.M., Behbahani F.K., Zadsirjan V., Oskooie H., **2006**, *J. Braz. Chem. Soc.*, 17 (5), pp 1045-1047.
55. Drewes S., Emslie N., Field J., Khan A., Ramesar, N., **1992**, *Tetrahedron: Asymmetry*, 3 (2), pp. 255-260.
56. Aggarwal V.K., Emme I., Fulford S.Y., **2003**, *J. Org. Chem.*, 68 (3), 692-700.
57. <http://www.ugr.es/~quiorred/doc/p10.pdf>, Fecha de consulta 13-Mayo-2008.

58. Mayo D.W., Pike Ronald M., Butcher S.S., **1986**, "*Microscale Organic Laboratory*", *Qualitative Identification of Organic Compounds*", Chapter 7, John Wiley & USA.
59. Dálaigh C.Ó., Connon, S.J. **2007**, *J. Org. Chem.* 72, pp 7066-7069.
60. Basavaiah D., **2001**, *ARKIVOC* (viii), pp 72-82.
61. Basavaiah D., Rao P.D. **1994**, *Synth. Commun.* 24 (7), pp 917-923.