



12 20j
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS DE
CISTEINA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
Q U I M I C O
P R E S E N T A
FRANCISCO GONZALEZ AGUILAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O.

1. - Introducción
2. - Generalidades
3. - Objetivo
4. - Plant experimentales de la alfalfa
5. - Discusión
6. - Parte Experimental
7. - Conclusiones
8. - Bibliografía
- 9.- Espectros.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCION.

1.1. PROTEINAS

La palabra "proteína" procede del adjetivo griego proteios, que significa de primer rango o importancia.

El vocablo proteína abarca lo que con toda probabilidad es el grupo más grande y más ampliamente diversificado de sustancias orgánicas nitrogenadas, sin embargo las unidades fundamentales con que están construidas sus moléculas son sustancias relativamente sencillas: los α -aminoácidos. Estos se combinan entre sí en la proteína por medio de enlaces de amidas; $R-CO-NH-R'$, que se denominan enlaces peptídicos. A cada extremo de esta cadena pueden agregarse unidades de aminoácidos para dar una serie de polipeptidos.

Existen tres funciones biológicas importantes que pueden señalarse claramente de las proteínas:

a) Las proteínas son componentes de tejidos estructurales, como las membranas de toda clase, desde el exterior de las células

amalgamas a la piel de los animales, y entran en la composición de los pelos, escamas, plumas, cuernos y garras.

b) Una segunda función comprende las que sirven como sustancias de reserva del organismo.

c) La tercera incluye proteínas que poseen la capacidad de catalizar determinadas reacciones químicas e son las enzimas.

Es claro que toda célula viva debe contener muchos componentes proteicos, pues las reacciones químicas que son características del proceso viviente son catalizadas por enzimas y las enzimas son proteínas. Estas enzimas son específicas para cada reacción.

Un grupo importante de proteínas casi inertes e insolubles son las queratinas, que son los principales componentes proteicos del pelo, cuernos, uñas, garras, escamas, plumas y ciertas capas de la piel de los animales.

Por medio del análisis elemental de las proteínas encontramos: C, H, O y S. Una tabla de composición cuantitativa hecha por Osborne muestra que el contenido de los elementos no varía notablemente¹⁰¹.

Elemento	Rango de composición
C	55-58%
H	6.7-7.3%
N	15.5-19.32%
S	intervalo amplio

El azufre varía dependiendo de la proteína 0.39%-4.5%.

1.1.1. HIDROLISIS.

De la descomposición completa de las proteínas con ácido (A) o con concentrado o alcalis en caliente y con enzimas proteolíticas a un pH apropiado, se obtienen una mezcla de aminoácidos, alrededor de 25 de estas sustancias han aparecido como productos de la hidrólisis de una u otra proteína. Sin embargo, las proteínas se diferencian notablemente en cuanto a las cantidades relativas de los aminoácidos que de ellas se obtienen⁽¹⁾.

Reacción de hidrólisis de una proteína.



Fig. 1.1. REACCIÓN DE HIDROLISIS DE UNA PROTEÍNA.

Agentes hidrolíticos:

- 1. - ácidos.
- 2. - enzimas.
- 3. - bases.

1.2. AMINOACIDOS

Todos los aminoácidos, obtenidos por hidrólisis de las proteínas son ópticamente activos. Por consiguiente, tres de los cuatro grupos que van enlazados al átomo de carbono asimétrico son fundamentalmente los mismos en todos estos ácidos. La fórmula general es:



y los diversos aminoácidos difieren solamente en la estructura del radical R. La glicina, el aminoácido más sencillo, es no asimétrico porque R es el hidrógeno; pero todos los demás aminoácidos naturales, son ópticamente activos, y por lo que se conoce, todos los que han sido obtenidos por hidrólisis de auténticas proteínas tienen la misma configuración y pertenecen a la familia L, configuracionalmente relacionado con el gliceraldehído.

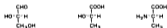


Fig. 1.2. L-DIACETOSUCCINATO L-ACIDO LACTICO L-ALANINA.

En 1947 la Comisión sobre Nomenclatura, Ortografía y Pronunciación de la American Chemical Soc., aprobó la siguiente regla: "En lugar de las equívocas d y l de que algunos autores se valen para indicar la rotación y otros para designar relaciones de configuración, se le

deben sustituir por *D* y *L* para indicar la configuración de los grupos alrededor de átomos de carbonos asimétricos como se hace en los hidratos de carbono".

Los aminoácidos naturales son *L* y los sintéticos son *D*, o sea una mezcla de las formas *L* y *D*.



Fig. 1.3. *DL*-aminoácidos

Los prefijos *dextro* y *levo*, o los signos (+) y (-) se usan para indicar rotación en el polarímetro.

1.2.1. RESOLUCIÓN ÓPTICA.

Resolución de aminoácidos: El término resolución puede definirse como un procedimiento por medio del cual los isómeros ópticos son separados de una mezcla racémica.

En muchos casos los α -aminoácidos se pueden obtener a través de síntesis química solamente en forma de mezclas racémicas. Por consiguiente, la resolución óptica es indispensable para conseguir las formas ópticamente activas *D* o *L*, las cuales son usadas como componentes de algunos fármacos.

En una u otra forma todos los procedimientos de resolución comienzan con los estudios de Louis Pasteur.

Los principios de la separación se basan generalmente en lo siguiente:

- a) Separación mecánica de los cristales.
- b) Diferencia de la solubilidad de las sales diastereoméricas.
- c) La acción de organismos vivos o de enzimas derivadas de los organismos vivos, los cuales utilizan preferentemente uno de los dos isómeros ópticos para formar derivados.

1.2.2. PRODUCCION DE AMINOACIDOS.

Los métodos de producción de aminoácidos se pueden clasificar de la siguiente forma:

- a) Producción fermentativa
- b) Producción enzimática
- c) Métodos sintéticos
- d) Producción por aislamiento.

1.2.3. ASPECTOS ECONOMICOS.

Debido a la gran variedad de usos de los aminoácidos, su demanda se incrementa cada vez en mayor proporción. En la actualidad el aminoácido de mayor demanda es el ácido glutámico.

A continuación se muestra una tabla que indica el precio de los aminoácidos y su forma de producción.

Aminoácido	Costo \$/100g	Método de producción
sal sódica del ácido glutámico	1.34	F
L-alanina	25.50	E, C
L-serina	5.55	C
L-arginina	11.70	F
L-ácido aspártico	5.10	E
L-cisteína	22.50	Ex
L-metionina	235.0	Ex
L-norleucina	19.15	F, C
L-norvalina	5.45	C
L-treonina	45.50	F
glicina	2.52	C
L-histidina	24.45	F

Tabla 1-1. E: SÍNTESIS ENZIMÁTICA, C: SÍNTESIS QUÍMICA, F: PRODUCCIÓN FERMENTADA, Ex: EXTRACCIÓN.⁽²⁾

1.2.4. EFECTOS DE LOS AMINOÁCIDOS.

La eficacia máxima en la síntesis animal de las proteínas se consigue solamente cuando se dispone de todos los aminoácidos esenciales necesarios como piezas, de una concentración en las cantidades y relaciones adecuadas. Si las relaciones de aminoácidos presentes en los tejidos no se ajustan al patrón óptimo, resulta una

situación no equilibrada.

Primero, el exceso de aminoácidos esenciales se desperdician en reacciones metabólicas menos vitales; y segundo, este exceso de aminoácidos, retrata la utilización de otros aminoácidos en la síntesis proteicas.

Como el animal no sintetiza aminoácidos esenciales, estos deben ser proporcionados por una fuente externa. Así pues, el valor biológico o nutritivo de una proteína está determinada en gran parte por la cantidad y proporción de aminoácidos esenciales que contiene.

Las proteínas vegetales en general son relativamente deficientes en L-histina, L-metionina y L-triptófano. La L-metionina equivale a la L en valor nutritivo y contribuye reportantemente a la industria química sintética.

Debido a que en muchas regiones subdesarrolladas, las proteínas provienen exclusivamente de fuentes vegetales, existe un serio problema de nutrición, y por consiguiente todos los problemas que aqueja este hecho.

La L-cisteína es un aminoácido con características terapéuticas, además de ser precursor de algunos fármacos con propiedades mucolíticas como la S-carboximetilcisteína y la N-acetylcisteína ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica.

CAPÍTULO 2

2. GENERALIDADES

CISTEINA

Nombre químico:

ácido 2-amino-3-mercaptopropiónico

ácido L-cisteína-β-L-cilopropiónico

Número de registro en Chemical Abstracts:

cisteína (15014-72-9)

L-(52-60-3)

D-(951-63-7)

DL-(3374-22-9)

Fórmula Molecular:



Peso molecular:

121.16

Estructura y designación de estereoisómeros de:



L-CISTEÍNA



D-CISTEÍNA

Fig. 8.1. ESTRUCTURA Y DESIGNACIÓN DE ESTEREISÓMEROS DE LA CISTEÍNA.

2.1. HISTORIA Y AISLAMIENTO.

En 1810 Wollaston²⁸ describió un compuesto orgánico, el cual fue aislado de dos piedras marmáreas; es insoluble en ácidos y bases, y se separa de soluciones alcalinas aciduladas con ácido acético en forma de cristales hexagonales. Wollaston le asignó el nombre de "cystic oxide" debido a su naturaleza anfotérica y a que se acumula en la vejiga. La sustancia cuando se quema da una flama azul y un olor característico desagradable, pero, a pesar de este fenómeno el cual Wollaston reportó tan cuidadosamente, la presencia de azufre no fue reportado. El compuesto fue analizado por Thénard en el laboratorio de Liebig y reportó la fórmula correcta $C_6H_{11}H_2O_6S_2$ de la cistina; el nombre de cistina es introducido por Berzelius en 1833.

Aunque se conocía la existencia de azufre en muchas proteínas, la relación del azufre con la cistina fue intocada por mucho tiempo.

El tiempo que transcurrió entre el descubrimiento de Wollaston en 1810 y el aislamiento hecho por Horner en 1899 de un hidrolizado de cuerno fue mucho, debido a diferentes factores:

4) El uso de ácido sulfúrico como un agente de hidrolizado para proteínas y su posterior precipitación como sulfato de calcio, acerca a la cistina.

5) El uso posterior de ácido clorhídrico como agente de hidrolizado, casi invariablemente en la presencia de cloruro estannoso, el cual reduce la cistina presente a cisteína, fue la causa de no poder

detectarla.

En 1890 Kutz reportó que una mezcla de casi partes iguales de fibras y de pancreas finamente picado, después de digestión en una suspensión acuosa por dos días en presencia de salicilato como antiséptico, seguido por filtración y condensación del filtrado, produjo un precipitado blanco, que al analizarlo fue cistina.

No después de mucho tiempo, Suter en 1893 empleando una reacción la cual fue descrita por Fleitmann pudo detectar cistina en una proteína hidrolizada.

Esta reacción depende del hecho de que la cistina en suy líbel es alcali soluble. Todo el nitrógeno aparece como amoniaco, mientras el azufre aparece como un precipitado blanco de sulfuro de plomo, cuando se trata con alcali en presencia de acetato de plomo.

Puesto que las queratinas tambien dan reaccion al igual que los cuernos, se pensó en la probabilidad de que esta proteína contenga una cantidad apreciable de cistina. Suter trabajó con los filtrados de cuernos pero no pudo aislar fácilmente la cistina. En 1890 Horner logró aislar α -cistina. El material proteico es calentado entre 60-65°C. en ácido clorhídrico al 15% durante 1-2 semanas, y después de un tratamiento logró que la cistina y la tirosina precipitaran. Estos dos aminoácidos insolubles se separan por cristalización fraccionada con amoniaco diluido. La tirosina precipita con amoniaco muy diluido, mientras toda la cistina permanece en solución. Cuando la hidrólisis se realiza por no mas de una semana, los cristales de

cistina se obtienen en forma hexagonal y poseen la misma rotación específica para la aislada de las piedras del riñon, es decir valor de 200° . Hörter hizo una interesante observación que cuando la hidrólisis acida de la proteína se prolonga a dos semanas, se obtiene una variedad más soluble y menos levorrotatoria de la cistina y además su cristalización es en forma de agujas, encontrándose una gran variación entre sus propiedades químicas y analíticas. Esto hizo pensar a Hörter que las agujas eran una mezcla de L-cistina, β-cistina y meso-cistina.

La concepción estereoisomérica de Hörter, sin embargo, es posible solamente en base de que la formulación sea un disulfuro, el cual permite la existencia de dos centros asimétricos en la molécula.

Baumann trató la cistina con estafío y ácido clorhídrico, obteniendo un compuesto fácilmente oxidable con aproximadamente la misma composición elemental pero con diferentes propiedades, incluyendo una baja rotación negativa en ácidos. Él aisló los cristales y los disolvió en etanol, obteniendo el compuesto libre lo que él denominó cisteína. Baumann formuló la siguiente reacción de oxidoreducción:

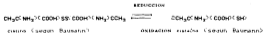


Fig. 2.2. REACCION DE OXIDO-REDUCCION SEGUN BAUMANN.

Hasta esa fecha no se conocía la estructura de la cistina, y después de varios experimentos se llegó a la estructura correcta en 1905.

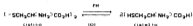


Fig. 2.3 Isómeros de cistina.

El problema de estereoisomerismo mencionado por Morner fue analizado en 1905 por Neuberg y Mayer, quienes utilizando los resultados encontrados con el ácido tartárico, son los primeros en aplicar los términos racémico y mesoímeros a el caso de la cistina.

Estos autores encontraron que cuando la incistina se calienta con 15-20 partes de ácido clorhídrico concentrado en un tubo cerrado a 105°C se pueden todas las trazas de actividad óptica. La inactividad óptica de la cistina, la cual es mucho más soluble que el material de inicio, es considerado como una mezcla de formas *rac* y *meso*. Esta mezcla no se separó, pero se comprobó la presencia de la variedad racémica al someter la mezcla aislada de inactividad óptica a la acción de *Aspergillus niger* durante seis semanas. Toda la cistina residual se aisló después de la digestión por la acción del acetato de mercurio, y al analizar su rotación se obtuvo una $[\alpha]_D^{20} = +33.6^\circ$ en solución de HCl. La presencia de *rac* cistina en la preparación, indicó

la inclusión de DL-cistina en la mezcla original que era inactiva, mientras que el bajo valor de la rotación se considera que se debe a la presencia de meso-cistina. La mezcla original ópticamente inactiva de las formas DL y meso de cistina se redujo completamente con estano en HCl a DL-cisteína.HCl.

Existen igualmente ácido cistina del hidrolizado de cuerno y otras proteínas tales como albuminas por medio de dos métodos, utilizando hidróxido de cobre y cloruro mercúrico como agentes de precipitación de la cistina.

A continuación se muestran las formas del mercapturo de cistina.

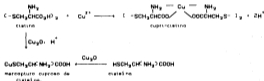


Fig. 2.4 FORMAS DEL MERCAPTURO DE CISTINA.

La L-cistina puede separarse del clorhidrato de cistina, por los siguientes métodos:

- a) por adición de acetato de sodio o solución de amoníaco hasta un pH de 5.5 o,
- b) por cristalización en agua.

Es posible el uso de cloruro cuproso en lugar de óxido cuproso para la sucesiva reducción de cistina y precipitación del mercapturo cuproso.



o con cisteína:



Fig. 2.5. reacciones con cloruro cuproso.

Un exceso en el empleo de Cu_2Cl_2 durante la reacción es innecesario. Las sales de plata también forma mercapturos cuando se deja reaccionar con cistina.

El procedimiento del aislamiento de la cistina ha sido refinado por el uso de óxido cuproso como agente de precipitación, y este es probablemente el procedimiento más elegante del aislamiento de este aminoácido y de su producto de reducción, la cisteína, de fuentes biológicas. A continuación se describe el procedimiento detallado del aislamiento de la cistina.

2.1.1. Aislamiento de L-cistina a partir de proteínas.

Una proteína apropiada se pone a reflujo con 10 veces su peso de H_2SO_4 9N por 24 horas. La mezcla se trata con Norita, se filtra y el filtrado se diluye con aproximadamente seis veces su volumen de agua. La solución clara se agita fuertemente, manteniendo la temperatura

entre $45-50^{\circ}\text{C}$ y se adiciona una suspensión acuosa de óxido cuproso puro en pequeñas porciones, esperando entre cada adición hasta que el color rosa del óxido desaparezca. Durante este tiempo aparece un precipitado gris del mercapturo cuproso de cristina.

El final de la reacción se determina cuando permanece el color rosa o el precipitado presenta un color rojo. No es perjudicial un exceso de óxido cuproso, pero por razones obvias no es conveniente. Cuando la precipitación es completa, se adiciona una solución de acetato de sodio al 50% en agua con agitación hasta que la reacción es alcalinizada a rojo Congo.

La suspensión se deja en reposo por 1-2 horas a temperatura ambiente y se centrifuga, la nata clara que se forma se desecha. El residuo se suspende en agua y se lava agitando vigorosamente en una botella de centrifugación y el precipitado se lava, después se centrifuga, y la nata de nuevo se desecha. El líquido para lavar que se usa es estand al 50%. El mercapturo se suspende finalmente en agua, y se disuelve por adición de bastante HCl en manteniendo la temperatura a 50°C y se descompone con una corriente de H_2S gas. El sulfuro cuproso se centrifuga, se lava con agua caliente a la cual se le ha agregado unas gotas de HCl concentrado, se centrifuga nuevamente y se combinan las soluciones. Esta solución de cristina se trata con NH_4OH concentrado hasta un pH de 9.5 y se burbujea una corriente de aire húmedo directamente hasta que la reacción con nitroprusiato sea negativa. La adición de ácido acético induce la cristalización de cristina. Después de enfriar por horas a 5°C , la cristina se colecta por filtración, se lava bien con agua, se disuelve en una mínima cantidad de HCl, se filtra y se le adiciona una solución acuosa de acetato de sodio al 50%, hasta reacción alcalina con rojo Congo. La obtención de la cristina pura es del 95%.

El siguiente procedimiento es aplicable para el aislamiento de cistina o cisteína o seccias de ellas, a partir de proteínas hidrolizadas. Este método no requiere de la etapa de precipitación con metales pesados.

2.1.2. Aislamiento de L-cistina a partir de proteínas hidrolizadas.

El cabello u otras queratínas se lavan muchas veces con agua y se secan. Dos kg. de cabellos se pesan en un matrón de fondo redondo de 12 L. y se le adicionan 5 l. de una seccia de HCl 20% en ácido fórmico al 15%. Se pone bajo reflujo durante 12-18 hrs. La seccia se trata con 50g de Norita, se filtra en caliente y se evapora a vacío hasta obtenerse un jarabe espeso. Al residuo se le adiciona 3 l. de agua y se trata con una solución acuosa caliente de acetato de sodio al 50% en agua hasta que la reacción es alcalina a rojo Congo. Después de tres días a temperatura ambiente, el precipitado de cistina se filtra por succión, se lava con agua caliente y se coloca con 3 L. de HCl caliente al 5%. La seccia se filtra, se calienta con 20 g de Norita, y se filtra de nuevo. Si algo de color permanece, el filtrado se trata nuevamente con Norita, la última filtración se hace bajo gravedad para remover todo el carbón. La cistina se precipita de la solución clara adicionando una solución acetato de sodio al 50% en agua hasta que la reacción es alcalina a rojo Congo. Después de 5-6 hrs. de reposo a temperatura ambiente, la cistina se filtra bajo succión y se lava dos veces con porciones de 500 mL de agua caliente para remover las últimas trazas de tirosina. El tratamiento previo con Norita y luego con agua caliente, debe eliminar la contaminación por tirosina. Sin embargo, algunas trazas de este aminoácido permanece, lo cual se revela por una reacción de Millón's débil pero positiva por lo que es aconsejable disolver la cistina en HCl 1N, ajustando el pH a 5, y agitando suavemente por 1hr con 20g de carbon Durco G-60, el cual previamente ha sido agitado con

ácido acético al 5% (v/v) por litro y después lavado con agua. Esta preparación del carbón lo hace un excelente absorbente de aminoácidos aromáticos. El uso de mucho carbón en el curso del aislamiento, reduce el rendimiento de la L-cistina, debido a que este aminoácido se absorbe en parte. Si es deseable evitar el uso de mucho carbón, es posible prevenir la contaminación por tiroxina con el empleo de sales de cobre insolubles de cistina descrito anteriormente.

La calidad de la cistina puede ser mejorada por las siguientes alternativas:

a) Por adición de una solución de hidróxido de sodio, filtrando para eliminar las trazas de materia insoluble y precipitando con HCl.

b) Por disolución de la cistina a temperatura de ebullición en el menor volumen posible de HCl y adicionando dos volúmenes de alcohol caliente; posteriormente, la cistina se separa en largas placas con un rendimiento de cerca del 75%. Lo que permanece en solución se recupera por neutralización. El producto final es lavado con etanol y después con éter. Se seca y se obtiene 100g de L-cistina pura.

2.2. REACCIONES ANALÍTICAS ESPECÍFICAS.

Se han desarrollado un gran número de procedimientos gravimétricos, colorimétricos y titulaciones para la determinación de cistina después de que se ha convertido a cisteína. Tales procedimientos dependen en parte de:

- a) La labilidad del grupo disulfuro de la cistina que experimenta una deprotonación con metales pesados y con ciertos reactivos químicos.
- b) La marcada labilidad del azufre de la cistina y cisteína hacia el álcali e hidrazina.

c) Las reacciones de oxidación-reducción en las cuales el grupo sulfhidrilo de la cisteína puede participar.

d) La propensión de esta función de formar colores conjugados con varios reactivos y de aquí se puede estimar por métodos colorimétricos o espectrofotométricos. La titulación del grupo sulfhidrilo se puede llevar a cabo directamente por la aplicación de métodos como volumetría, acidimetría y potenciométrica.

8.2.1. LABILIDAD ALCALINA DEL SULFURO.

Las proteínas se tratan con álcalis fuertes en caliente en presencia de bórax o sales de plomo, y los sulfuros precipitados se filtran y se oxidan a sulfatos para ser por último cuantificados gravimétricamente después de su conversión a sulfatos de bario.

Schulz logró refinar este procedimiento por adición de zinc en polvo durante la descomposición alcalina. Solamente la mitad del total de azufre se recuperó como sulfuro. Actualmente se utilizan métodos modernos exactos para tal efecto. Por lo tanto, considerando que el azufre de la cisteína no es altamente labil y el rendimiento del sulfuro no es muy cuantitativo bajo condiciones fuertemente alcalinas, la cisteína libre bajo estas condiciones no se degrada completamente.

El análisis de los productos de la degradación alcalina de la cisteína sugiere la siguiente secuencia de reacción:

desarrollado por Duratoni, Orso y Alabari. Aunque este analizado bajo descomposición reductiva con hidrazina a 120°C , da H_2S cuantitativamente, ni la metionina ni la leucina da H_2S bajo estas condiciones.

Determinación de cistina y cisteína via hidrasulfidita.

Una muestra biológica conteniendo de 10 a 50 μmoles de cistina o cisteína o ambas, se trata con 0.5 ml. de hidrato de hidrazina pura y la mezcla se calienta en un baño de aceite a $115-120^{\circ}\text{C}$ durante 5-7h a reflujo. El matraz se enfría, el refrigerante se reemplaza con agua y el contenido se transfiere a un matraz volumétrico y se diluye a 5 ml. de metano que la solución contiene 1-3 μmoles de H_2S . Estos 5ml. son transferidos a un matraz. Se colocan 10 ml. de H_2SO_4 6N, teniendo un equipo especial que permite la salida de los gases, y se le pasa una corriente de nitrógeno a razón de 3 L. por hora. Es necesario calentar la mezcla entre $80-95^{\circ}\text{C}$ para permitir la expulsión del sulfuro de hidrógeno completamente. El sulfuro de hidrógeno se pasa a una solución de acetato de zinc en 5 ml. de agua (50 g. de acetato de zinc, 17 g. de acetato de sodio, y 0.005 g. de cloruro de sodio en 1 L. de solución acuosa). Cuando todo el sulfuro de hidrógeno ha sido absorbido por la solución del acetato de zinc, el tubo de comunicación se desconecta y se lava con agua. A esta solución se le adiciona 5 ml. de dimetil-pirrolidona (0.5 g. del clorhidrato en 1 L. de una solución acuosa conteniendo 200 ml. de H_2SO_4 concentrado) e inmediatamente 1 ml. de sulfato ferrico amoniacal (20 g. de sulfato ferrico amoniacal disuelto en agua). Después de 1 h la solución colorida resultante se diluye 5 a 10 veces con agua y se mide su absorción en una longitud de 620 m μ . El resultado se compara con una serie estándar de cistina.

2.2.3. DETECCIÓN CUALITATIVA.

Cuando un compuesto sulfhidrico se le permite reaccionar con una solución alcalina de nitroprusiato de sodio se desarrolla un color magenta. Aunque esta formación del color es conveniente para pruebas cualitativas de cistena en solución, la intensidad del color no es suficientemente reproducible para permitir una estimación cuantitativa del aminoácido.

La prueba no solo es específica para mercapturos, sino también para sustancias tales como acetona, acetato y creatina.

Detección cualitativa de mercapturo via reacción con Nitroprusiato.

A unos 0.5 ml de la mezcla se le adiciona una gota de cianuro de potasio en solución 0.1 M para prevenir la inhibición de la formación del color debido a la presencia de metales pesados. La muestra se trata después con una gota de una solución recientemente preparada de nitroprusiato de sodio al 5% y una gota de hidruído de amonio al 27%. Cuando la reacción es positiva se desarrolla un color magenta.

La detección de cistina y cistena por cromatografía en papel se puede llevar a cabo directamente usando nitroprusiato o reactivos de platino, esto fue descrito por Tonnies y Kolb, quienes usaron papel Scheicher y Schull No. 589 y como disolvente para la separación cromatográfica fenol-isopropanol-agua (70:5:25). Se emplean tres soluciones, a decir:

A) Una solución de 1.5 g de nitroprusiato de sodio en 5 ml. de H_2SO_4 8N se le adicionan a 95 ml. de metanol y 10 ml. de NH_4OH conc., después por filtración se separan las sales.

B) Una solución de 2 g de cloruro de sodio en 5 ml. de agua se le adicionan 95 ml. de metanol.

C) Se mezclan iguales volúmenes de las soluciones A y B.

Los compuestos sulfhidricos se detectan por la aparición de un color rojo brillante inmediatamente después de sumergir el papel en la solución A. Los compuestos disulfuros a pocos segundos de sumergir el papel en la solución B. El desarrollo del color es el siguiente; primero toma una coloración amarilla pálido, después se pone verde y finalmente persiste la mancha roja. Si la diferencia del color del sulfhidrico y disulfuro no es deseable, es conveniente una simple inmersión en la solución C. La reacción colorada es sensible para 0.3-0.6 µg de cistina. La Arginina da un color naranja.

3.3. RACEMIZACIÓN.

Con excepción de la cistina que ha sido preparada ópticamente activa, utilizando materiales para tal efecto, las síntesis generalmente producen una mezcla de cistina racémica. La forma meso se obtiene bajo condiciones en las cuales la inversión ocurre en uno o en los dos centros asimétricos de la molécula de cistina, y bajo estas condiciones las formas ee se producen por inversión de ambos. Aunque el reconocimiento de los diferentes formas estereoquímicas fue realizado por Werner en 1909, la identificación de los estereoisómeros ocurrió muchos años después. La separación de los diastereoisómeros por cristalización fraccionada en agua fue descrita por Loring y du Vigneaud.

Resolución de L-cistina y separación de diastereoisómeros DL y D

Una solución de 100 g de L-cistina en 1 L de HCl 6N se refluxa por cinco días. La solución se decolora con Norita y se concentra a vacío hasta que el material solidifica. La mezcla se disuelve después en 1 L de agua y se neutraliza a Bajo Congo por adición de NH_4OH concentrado. El precipitado se filtra y se disuelve en una misma cantidad de HCl 3N. Se diluye con 700 mL y nuevamente se decolora con Norita. Después de neutralizar, como antes, el precipitado de cistina ópticamente inactiva se filtra después de 24 h a una temperatura de 4°C obteniéndose un rendimiento de 80%.

80 g de cistina inactiva se disuelve en 200 mL de HCl 6N y la solución se concentra a vacío a $40-50^\circ\text{C}$ hasta la formación inicial de cristales. La solución se enfría a temperatura ambiente y los cristales se separan por filtración una hora después. Los cristales se lavan con agua de hielo y una mezcla de partes iguales de alcohol y éter conteniendo 5 mL de HCl conc. por 100 mL de solución, obteniendo 30 g. Los lavados se adicionan a las aguas madres y nuevamente se concentran por evaporación para repetir el procedimiento. Así se obtiene una segunda fracción de 10 g. Dos recristalizaciones de la primera cosecha y tres o cuatro de la segunda cosecha es suficiente para obtener DL-cistina.HCl pura. Las recristalizaciones se realizan disolviendo el clorhidrato en 5 volúmenes de agua conteniendo suficiente HCl para mantener la cistina en solución y después adicionando a dos partes de esta solución una parte de HCl conc., obteniendo finalmente la cantidad de 15-25 g de DL-cistina.HCl.

El filtrado y los lavados de la segunda fracción se concentran para obtener cristales de la forma meso en bajo rendimiento. Estos se filtran obteniendo 20-25 g y se recristalizan inicialmente por una solución de HCl 3N, después se concentra la solución a un jarabe a vacío y finalmente induciendo la cristalización del clorhidrato por raspar vigorosamente los lados del vaso con una varilla de vidrio.

Tres cristalizaciones son suficientes para obtener meso-cistina.HCl pura en una cantidad de 8-10 g.

La liberación de los ciclohidratos ya se mencionó anteriormente (ver sección 2.13).

2.4. REDUCCION

La cisteína es el derivado más simple obtenido por reducción de la cistina. La preparación clásica fue hecha por Boumann, quien redujo la cistina a L-cisteína.HCl por la acción del estaño a una solución de cistina en ácido ciclohidrico.

Reducción de cistina a cisteína.

50 g de L-cistina se disuelve en 1 l. de HCl 3N, se adicionan 25 g de estaño y la mezcla se pone a reflujo por 2 h (Precaución: durante la reacción se desprende hidrogeno). Al finalizar el periodo de calentamiento la mezcla se enfría, y el metal que no se disolvió se filtra. El filtrado se diluye con dos volúmenes de agua, y se satura con H_2S gas. El sulfuro de estaño se filtra con la ayuda de Whatman y el filtrado se evapora a vacío por medio del cual el agua de cristalización se pierde. Si el secado se lleva a cabo a $100^{\circ}C$ no solamente se pierde el agua sino también la mitad del HCl. El rendimiento de la cisteína.HCl anhidra es casi del 90%. La cisteína también se puede obtener por una hidrogenación de cistina catalizada en presencia de paladio, pero este procedimiento no es generalmente usado.

La L-cisteína libre se puede obtener disolviendo L-cisteína.HCl en una mínima cantidad de etanol a temperatura ambiente y se le adiciona cuidadosamente, goteando, una solución de amoníaco al 20% o $LiOH$ 2 N a neutralidad con papel tornasol. La cisteína rápidamente precipita. Se filtra de inmediato y se recristaliza en la misma cantidad de agua, la cual previamente se ha hervido para expulsar el aire. Luego

de recristalizar el aminoácido se filtra rápidamente y se transfiere a un desecador previamente lleno con nitrógeno, p.f. $240^{\circ}\text{C}/10$. Bajo una prolongada exposición al vacío, la sustancia se convierte por oxidación a cistina. El compuesto también puede obtenerse por disolución de cistina HCl en 7 ml. de agua con un suave calentamiento, adicionando 150 ml. de etanol y luego, filtrando la mezcla si es necesario, y adicionando 5.3 ml. de piridina con agitación, con lo cual ocurre la cristalización de la cistina libre. Después de enfriar por 2 h., el precipitado se filtra y se lava seis veces con dicloroetano, y se seca a vacío en un desecador conteniendo H_2SO_4 conc.

2.5. RESOLUCIÓN.

Un reflujo prolongado de acrilina en HCl concentrado produce una cistina ópticamente inactiva, du Vigneault y colaboradores encontraron que la composición de la mezcla era de cistina 51 y meto; las sales formadas fueron insolubles y por medio de cristalización fraccionada se lograron separar. Otro procedimiento de obtención consistió en acetilar una mezcla semejante y la mezcla de los derivados acetilados fue tratada con bromina, el primer precipitado fue la sal del alcaloide de acetil-cistina, la cual después de 18 cristalizaciones, se obtuvo D-cistina con $[\alpha]_D^{20}$ en HCl. Con esto se comprobó la presencia de D-cistina en la mezcla original. Una mezcla de cistina 50:50 y 50 fue puesta en una columna con Dowex 50, y la forma meto fue la primera en eluir, pero la separación no fue satisfactoria.

Podemos dividir en tres las técnicas utilizadas para la resolución de la disteína en:

- a) Métodos Cromatográficos
- b) Métodos químicos
- c) Métodos biológicos

2.5.1 Métodos Cromatográficos:

Se han realizado resoluciones de la DL-cisteína por columna utilizando derivados de este aminoácido, donde la columna se empacó con celulosa¹⁴⁴(Merck Cellulose 8000)/C, activado o también se puede utilizar una columna de 19 mm de diámetro y 30 cm de largo, empacada con 75g de almidón¹⁴⁵ donde se aplica 5g de DL-cisteína disuelta en 15 mL de HCl 1 N y se eluye con HCl 1 N separando fracciones de 5 mL.

La cromatografía de gases¹²⁸ se ha llevado a cabo con éxito utilizando una fase estacionaria de polistireno. La HPLC^{17,46} en fase reversa usando como agente de resolución L-aspartilciclo heclanida-Cu, también ha tenido éxito.

La cromatografía en capa fina donde los platos quirales son impregnados con un selector quiral y un metal divalente de transición tiene gran éxito por su rapidez y facilidad del método¹⁴¹.

2.5.2. Métodos químicos.

método	reactivo	separación
sales diastereoisoméricas ¹¹⁸¹	ácido mandélico	crystalización
derivados ¹¹⁸¹ diastereoisoméricos	D-C+3-galactosa D-C+3-glucosa D-C+3-manosa L-C+3-arabinosa	crystalización crystalización crystalización crystalización

Tabla 2.1. RESOLUCIÓN DE CISTEINA POR MÉTODOS QUÍMICOS.

2.5.3. Métodos biológicos.

Esta clase de métodos son muy numerosos y aunque en rigor no cumplen con la definición de la resolución se basan en la capacidad que tienen algunos organismos que metabolizan solamente uno de lo enantiómeros.

2.6. USOS

El carácter oxido-reductor de este aminoácido es el factor principal en cuanto a su uso, principalmente en el campo de la fotografía y corrosión.

Debido a que la cisteína se encuentra en gran proporción en el cabello se han hecho estudios para el tratamiento de la seborrea utilizándola en forma de shampoo.

Su carácter quelatante con metales pesados se ha aprovechado como

desmercurizador en pescados y en análisis químicos de metales.

El campo más importante en cuanto a su estudio y aplicación es el biológico y farmacéutico.

La cisteína es un aminoácido con características terapéuticas, además de ser precursor de algunos fármacos con propiedades analgésicas como la *S*-carbamocisteína y la *N*-acetilcisteína ampliamente utilizadas en la en la industria farmacéutica.

CAPÍTULO 3

3.1. PROBLEMA:

Como en muchos otros productos de consumo nacional existe dependencia material y tecnológica en la producción de 5-carboximetilcisteína (así como de algunas otras materias primas de la industria farmacéutica), ya que la cisteína utilizada para la producción de la 5-carboximetilcisteína, es de origen extranjero, por lo que se considera de gran importancia los trabajos que contribuyan a la producción de esta materia prima en nuestro país.

3.2. HIPÓTESIS:

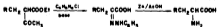
Entre los fármacos que son susceptibles de producirse en México tanto por las vías descritas en la literatura como por nuevas rutas de síntesis a partir de materias primas de origen nacional, se encuentra la 5-cisteína.

La posibilidad de optimizar una síntesis química, utilizando únicamente materias primas de origen nacional, hace factible de realizar su estudio a nivel industrial.

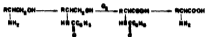
3.3. OBJETIVO:

Seleccionar una o dos vías de síntesis para desarrollar y optimizar cada uno de los pasos en la obtención de la cisteína, tomando en consideración que se requiere utilizar materias primas de origen nacional, de bajo costo y procesos industrialmente rentables para que la síntesis pueda ser considerada como un proceso industrial factible.

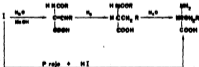
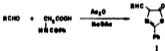
4.1.3. Reducción de nitroácidos, aminoácidos y derivados de cetonas ácidos.



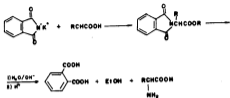
4.3.4. Oxidación de amina alcohólicas.



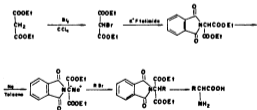
4.3.5 Condensaciones de aldehídos con compuestos que contienen un grupo metileno activo.



4.1.6. Síntesis de Gabriel.



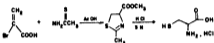
4.1.7. Condensaciones con ésteres amino salicilicos H-sustituídos.



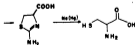
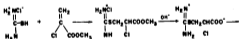
4.2. Síntesis de Cisteína.

4.2.1. A partir de derivados del ac. acrílico¹²³.

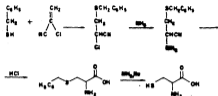
4.2.1.1. de derivados del ac. acrílico¹²⁴.



4.2.1.2. Síntesis de Behringer¹²⁵.

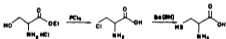


4.2.1.5. Sinteză de Gungersbach¹²

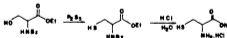


4.2.2. a partir de serină¹³

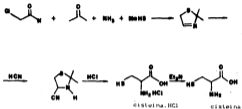
4.2.2.1. Fischer (1908).



4.2.2.2. Erlenmeyer (1900).



4.2.4.2. A través de la δ^2 -Thiazolidina^{23,24,25}



4.9 SINTESIS MAS AFECTIBLES.

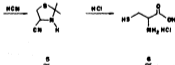
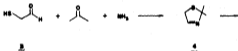
Después de analizar las síntesis informadas, se seleccionaron por su estabilidad las rutas 4.2.4.1 y 4.2.4.2. Entre ellas hay mucha similitud ya que utilizan los mismos reactivos inorgánicos y estas partes del cloroacetaldéido.

Puesto que el cloroacetaldéido no es disponible en nuestro país se hace necesario su síntesis, de la cual se encontraron en la literatura las siguientes posibilidades.



Una vez desarrollada la técnica para la obtención del cloroacetaldéido en forma de hemiacetato se eligió la ruta 4.2.4.2. para iniciar la obtención de cistina ya que se ha encontrado que es la única síntesis química total informada.

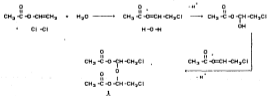
4.2.4.2. A Través de la d³-Tiarofilina^(21,24,26,28)



5. DISCUSION.

Para el proceso de preparación del hemiacetato del cloroacetaldéhiduo 1 a partir del acetato de vinilo (ruta 2), en los experimentos iniciales se ejecuto fielmente la técnica descrita en la literatura¹⁹⁵ siguiendo el curso de la reacción por CC² cromatografía en capa fina, mediante la cual y al término de la reacción se aprecian tres compuestos cuando el pH es 1 y al incrementarlo por adición de NaHCO₃ sólido hasta 6 se observa que predomina una mancha, lo cual significa que hay un desplazamiento hacia la formación de un producto, las características del producto obtenido concuerdan plenamente con lo informado y que corresponde al hemiacetato 1 (RMO).

La formación de 1 se explica de la siguiente manera:

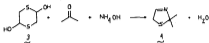


Los rendimientos que se obtuvieron de 3 determinados por GC (Cromatografía de gases), en los primeros experimentos fueron bajos, pero sirvieron para hacer las siguientes observaciones: el control de la temperatura en el rango establecido es muy importante para obtener un buen rendimiento. También se observó que 1 es muy inestable ya que de no utilizarse inmediatamente el rendimiento de la siguiente reacción decrece además de que la solución etérea que en un principio es incolora toma una coloración amarilla al transcurso del tiempo.

Cuando se hizo reaccionar la solución etérea de 1 con la solución acuosa del bisulfuro de sodio 2, se formó un precipitado blanco, al cual se le determinó un espectro de IR que al compararlo con la información²⁰ para el aldehído tioglicólico en su forma más estable que es el dímero 3 se encontró que son iguales.

Siendo variar la técnica con el objetivo de trabajar con el dímero aislado y así evitar impurezas, se varió el tiempo de adición y orden de los reactivos, así como también la temperatura y la reacción se efectuó tanto en atmósfera normal (aire) como en atmósfera de N_2 . Sin embargo con estas variaciones no se logró incrementar el rendimiento.

Al compuesto 3 generado durante la reacción y sin purificación alguna, se le adicionó la acetona y el hidróxido de amonio de acuerdo con la siguiente reacción:



con lo cual se forma el compuesto 4. (Caracterizado por IR y RMN).

La reacción se siguió por OCF y al utilizar el aldehído tioglicólico generado in situ nos proporcionó un rendimiento del 80% de 4 basado en el acetato de vinilo. Comparando este rendimiento con el obtenido a partir del dimer se concluye que tanto el monómero, como el dimer y el polímero del aldehído tioglicólico toman parte de la reacción, al igual que en los casos anteriores las primeras pruebas nos dieron rendimientos bajos, pero al encontrar las condiciones para seguir la reacción por OCF nos facilitó este paso, ya que inicialmente se seguía por OB, lo cual impedía la rapidez en el análisis y como consecuencia un tiempo prolongado de reacción que es contraproducente debido a que se favorece la formación de subproductos, detectados fácilmente por OCF al apreciar la aparición de nuevas manchas.

La obtención del compuesto 5 es una etapa muy difícil de realizar ya que de no efectuarse los pasos anteriores cuidadosamente, las impurezas que pudiera contener 4 impiden una buena adición del

cianuro en C-4, además de que las condiciones de esta reacción deben ser cuidadosamente semejadas. El seguimiento práctico de la reacción se hizo por CCF, pero esta presenta la limitante de que el RI de la materia prima y el producto son muy semejantes y aunque se trabajó cambiando las condiciones de la CCF no se logró encontrar un sistema donde se pudiera fácilmente diferenciar 4 de 5. Otro modo de seguimiento es por CO en la que se puede observar la conversión de 4. La caracterización de 5 se hizo por RMN. Hasta esta etapa de la síntesis logramos obtener un rendimiento del 64% a partir del acetato de vinilo (determinada por HPLC).

Debido a la inestabilidad de 5 que se pudo observar por CCF además de que la solución metanólica que un su principio es amarilla se torna roja al transcurso del tiempo, se hizo necesario hidrolizarlo una vez formado y sin purificación alguna.

La reacción de hidrólisis de 5 nos produjo gran dificultad tanto para efectuarla como para purificar el producto.

Se llevaron a cabo algunos experimentos para determinar las mejores condiciones para la hidrólisis. Inicialmente se probó HCl 2N, pero aún manteniendo el tiempo de reflujo por 24 h no logramos observar la formación de 5 siguiendo la reacción por CCF y utilizando para tal efecto un eluyente modificado^{48h} que nos permitiera efectuarla en placa de Silice en lugar de papel. Luego cambiamos la concentración del ácido a 0.1 N y pudimos detectar a 5 pero al intentar purificarlo nos encontramos la dificultad de eliminar el NH_4Cl formado porque una

vez evaporada a presión reducida la solución resultante de la hidrólisis, la sustancia cruda se disuelve en MeOH para separar la sal por filtración, sin embargo el MeOH si disuelve parte de esta sal y además todas las impurezas también eran disueltas por el MeOH y por lo tanto no se logró purificar la sustancia cruda.

En un experimento posterior logramos observar que al adicionar HCl conc. a la solución tetanólica, se formaba un precipitado blanco que al analizarlo correspondió al NH_4Cl . Después de eliminar dicha sal se le adicionó el agua suficiente para tener una solución de ácido 6 H y se refluxó la solución. Al analizar la reacción por CCP encontramos que había pocas impurezas y además logramos eliminar el NH_4Cl .

Con lo anterior se apresó la formación de 6, pero al intentar aislarlo por los métodos descritos (ver parte experimental 6.3) no se alcanzó el objetivo.

Aunque se variaron las condiciones de temperatura, tiempo y presión de la hidrólisis, el aislamiento de 6 en forma pura no se lograba.

Hasta aquí habíamos podido resolver el problema de la hidrólisis y el que se nos presentaba era el de encontrar un método para aislar a 6 en forma pura.

Por lo anterior se procedió a estudiar con más detalle los subproductos de la hidrólisis para tener idea de como separarlos. Se pensó que un posible intermediario de esta reacción podría ser el ácido 2,2-dimetil-4-tiazolidincarboxílico 7 debido a la aparición de

NH_4Cl proveniente de la hidrólisis del nitrilo, pero al intentar aislarlo durante la reacción por medio de CCF y Cromatografía de alta resolución no se logró el objetivo.

Debido a lo anterior se procedió a sintetizarlo de acuerdo a lo informado²⁸ y así conocer sus características.

Al efectuar la reacción para obtener B utilizando Ac_2O , HCl (Merck) y acetona se observó la presencia del producto al caracterizarlo por RMN el cual concuerda plenamente con lo informado. El seguimiento de esta reacción no se pudo realizar por CCF ya que B tiene el mismo Rf que A y revelan con las mismas características, y aunque nos enfocamos al sistema de la CCF cambiando el eluyente y la fase estacionaria por celulosa y el revelador por nitroprusiato de sodio, no se logró diferenciar los Rf de estos compuestos. Por HPLC tampoco es posible diferenciarlos. Al encontrar que tanto B como A presentan las mismas características condujo a que no se pudo concluir que B fuera o no un intermedio de la hidrólisis.

El resultado de esta reacción nos hizo pensar que B sería un derivado a través del cual se podría purificar A, para lo cual se sometió a B a condiciones de hidrólisis obteniéndose un rendimiento de 90% y no presentó problema alguno de purificación.

Para al aplicar la reacción para la obtención del derivado B a la castaña cruda (pasta) nos hizo variar las condiciones ya que se tiene que adicionar metanol para disolver la pasta y permitir un mejor contacto con la acetona y el rendimiento alcanzado fue bajo

debido a las impurezas. Con lo anterior pudimos detectar cisteína en la mezcla de reacción no solamente por CCF (ya que por IR las bandas aparecían sin resolución y por RMN si se apreciaban las señales correspondientes pero con otras más), sino también al formar un derivado de 8 lo cual no dejó duda de su existencia.

Sabiendo que la cisteína reacciona con compuestos carbonílicos para formar tiacolídinias, se optó por otro derivado. Se pensó en sintetizar otro ácido 4-tiacolídinancarboxílico desustituido en la posición 2 para lo cual se eligió la ciclohexanona. No hay ninguna síntesis reportada para este compuesto y se optó por utilizar las mismas condiciones que con la acetona, después se varió la relación de los reactivos pero no hubo influencia alguna sobre la reacción, luego se varió la temperatura encontrándose que no se requiere de calentamiento. Se logró alcanzar un rendimiento del 80% en la obtención del ácido 8,8-pentasetilien-4-tiacolídinancarboxílico 9 utilizando cisteína. La ventaja de usar ciclohexanona en lugar de acetona es que el ácido tiacolídinancarboxílico derivado de la primera, tiene un IR distinto a la cisteína, lo cual permite seguir fácilmente la reacción por CCF.

Al someter la cisteína cruda a las mismas condiciones encontradas anteriormente para obtener a 9 se alcanzó un rendimiento global de 15%, el cual es mayor que el obtenido cuando se hace reaccionar con acetona.

Una vez obtenido este derivado se procedió a hidrolizarlo, pero

esta reacción de hidrólisis no es cuantitativa (determinado por COF donde se aprecia producto en igual proporción que el reactivo) y aunque se probaron diferentes condiciones de concentración de ácido y presión nunca se logró desplazar la reacción hacia la formación de $\underline{6}$ y su separación no fue factible. Por lo anterior este derivado no permitió la purificación de $\underline{6}$.

Como el trabajar con ácidos triazolidinocarbenólicos como derivados para la purificación de $\underline{6}$ nos imponía realizar una hidrólisis y concluyendo que $\underline{6}$ es inestable en estas condiciones se pensó en otro derivado en el que la regeneración de $\underline{6}$ no implicara una hidrólisis. Sabiendo que la cisteína se puede condar a cistina $\underline{10}$ y encontrando que tiene una gran insolubilidad en diferentes solventes y que por medio de una reacción de reducción se podía regenerar la cisteína nos inclinamos por este derivado. Primeramente se realizó la reacción con cisteína patrón para desarrollar la técnica.

La reacción de la oxidación se efectuó sin problema alguno pero donde se tuvieron que probar varios métodos fue en la reducción, variando los metales utilizados (Fe, Zn y Sn). Con los tres metales se efectuó la reacción de reducción pero debido a que la oxidación del Fe no solamente es a Fe^{2+} sino también a Fe^{3+} , esto impidió su eliminación con H_2S_{aq} . Por lo que respecta al Zn este forma el ZnS con características que lo hacen difícil de eliminar (precipitado floco). El SnS es el más fácil de eliminar y por lo tanto se utilizó este metal.

Al efectuar la reacción de oxidación con la sistema cruda logramos obtener un rendimiento total hasta 10 de 10%. Caracterizando 10 por IR, y al efectuar la reacción de reducción de 10 un rendimiento del 10% a partir del acetato de vinilo hasta 8 o sea rendimiento total de la ruta.

El hecho de que el rendimiento decreciera del 64% al 10% en tres reacciones (hidrólisis de 5, oxidación de 6 y reducción de 10) y sabiendo que las reacciones de oxidación-reducción son de rendimientos de 70% y 60%, respectivamente nos comprobó que la hidrólisis es el paso donde se decrecienta el rendimiento.

Caso se contaba con la información^{***} de la síntesis de la 2,2-diclopentametileno-4-tiazolina 11 la cual por reacción de adición del grupo -CN al C-4 y posterior hidrólisis proporciona 9 del cual se conocían sus características en CCF, IR y RMN ya que se había sintetizado por otra ruta, este compuesto podría ser utilizado para saber si en la hidrólisis se formaba el intermediario de ácidos 4-tiazolidinocarbónicos, en otras palabras si se hidrolizaba primero el nitrilo y luego se rompe el anillo o viceversa.

La obtención de 2,2-pentametileno-4-tiazolidinocarbonitrilo 12 se realizó fácilmente desarrollando la técnica en base a la síntesis de 2,2-dimetil-4-tiazolidinocarbonitrilo, debido a que la cetona usada es ciclohexanona en lugar de acetona.

Buscando producir el compuesto 9, se hidrolizó 12 y por CCF se encontró un producto cuyo Rf correspondía al Rf del compuesto 9.

Sintetizado con cistina patrón y ciclohexanona, pero nos fue imposible aislarlo de la mezcla de reacción de hidrólisis por OCF y HPLC. Al continuar la hidrólisis obtuvimos el compuesto 8 el cual purificamos via cistina pero el rendimiento fue inferior al obtenido cuando se utilizó acetona.

Como en la reacción de hidrólisis de 5 ya habíamos variado temperatura, tiempo, presión, concentración del ácido y atmósfera en la cual se efectuaba la hidrólisis lo último que nos faltaba era cambiar el tipo de ácido utilizado bajo las mismas condiciones encontradas para el ácido HCl.

Buscando incrementar el rendimiento cambiamos el HCl por los ácidos H_2SO_4 , HNO_3 y HBr conc. pero no se logró mejorar el rendimiento además de que la reacción presenta mayor número de impurezas (determinada por OCF) y la purificación via cistina es más difícil.

CAPITULO 6

6. Parte experimental:

El progreso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina, utilizando cromatoplaques Merck de silicagel 60 F60 (0.25 mm de espesor, 8.5 cm de ancho y 9 cm de largo). Los cromatogramas de gases se determinaron en un aparato Perkin Elmer modelo 3920 equipado con un detector de ionización de flama, utilizando una columna de 6 ft por 1/8 inch rellena con OV-17. Los análisis en HPLC se realizaron en un aparato modelo Waters, equipado con una columna Radial Pak C_{18} . Las determinaciones fueron hechas por la Q. Patricia Elizalde y la Q. Eiva Rojas. Los espectros de IR fueron determinados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 1260 y las determinaciones fueron hechas por la Q. Graciela Chávez y la Q. Mariela Gutierrez. Los espectros de RMN fueron determinados en un espectroscopio Varian EM-390 y las determinaciones fueron hechas por la Q. Alejandrina Acosta.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos.

Todas las determinaciones se hicieron en el departamento de Química Orgánica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, excepto los espectros de IR que se determinaron en el departamento de Química Analítica.

6.1. Síntesis del cloroacetaldehído 1.

En un matraz de 500 ml. de dos bocas se colocaron 25.2 g de acetato de vinilo y 25 ml. de agua. El matraz se colocó dentro de un baño de acetona-hielo seco y cuando la temperatura interna fue de -77° , se pasó una corriente de cloro con un flujo de 2.3 g-min bajo fuerte agitación. La temperatura interna se mantuvo de -2° a 10° C, y al cabo de 10 min se observó un exceso de cloro. Se suspendió la corriente de cloro y se le pasó nitrógeno por 10 min para desplazar el exceso de cloro. Luego se adicionaron 20 ml. de agua, obteniendo un pH de 1 en la solución. Lentamente se le agregó bicarbonato de sodio bajo agitación hasta obtener un pH final de 6. La solución se extrajo con 120 ml. de éter (7 porciones de 40 ml. c/u), quedando el cloroacetaldehído en solución éterea.

El compuesto 1 se obtuvo con un rendimiento del 60%, con una pureza del 67%, determinada por Cromatografía de Gases (CG).

Por Cromatografía en Capa Fina (CCF) este compuesto muestra tres manchas de las cuales las más intensa tiene un R_f de 0.67. (Eluyente: Hexano:acetato de etilo 2:1, revelador: I_2).

En RMN- H^1 se observaron las siguientes señales:

Tabla 6: ^{1}H -RMN ^{100}MHz

Señal	Asignación
6.7 t	$Cl-CH_2-CH-CHO$
5.2 t	$Cl-CH_2-CH-CHO$
3.8 d	$Cl-CH_2-CH-CHO$
3.55 d	$Cl-CH_2-CH-CHO$
2.15 s	$Cl-CH_2-CH-CHO-O-CH_3$
2.0 s	$Cl-CH_2-CH-CHO-O-CH_3$

cd CH_2Cl_2 , TMS como referencia química, disolvente $CDCl_3$.

t = multiplete, d = doblete, s = simplete.

5.2. Obtención del bisulfuro de sodio 2.

A 14 g de hidróxido de sodio disueltos en 50 ml. de agua se le puso una corriente de ácido sulfídrico hasta que la solución alcanza un pH de 10.

5.3. Obtención de la 2,2-dimetil-4⁺-iazolina 4.

A un matraz esférico de 500 ml. con dos bocas, con un termómetro en una de ellas y un embudo de presión compensada en la otra, se le colocó la solución etérea de 1, se enfrió esta solución en un baño de acetona-hielo seco bajo agitación hasta llegar a una temperatura interna de -10°C. En el embudo de adición se colocó la solución de 2 y se le adicionó lentamente a la mezcla de reacción manteniendo la temperatura interna entre -10 a 0°C. Después de la adición de la solución 2 se continuó la agitación por 10 min. donde se observó un precipitado blanco que corresponde al compuesto 3. Manteniendo la temperatura entre el intervalo mencionado se le adicionó lentamente 55 ml. de acetona. Posteriormente se adicionaron 55 ml. de una solución de hidróxido de amonio al 20%. Al finalizar la última adición se retiró el baño de acetona-hielo seco y se mantuvo la agitación por 30 min. a una temperatura de 10°C.

Se separaron las dos fases y la fase acuosa se lavó con 120 ml. de éter (3 porciones de 40 ml. c/u). Se colectaron las capas etéreas, se seco con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el éter a presión reducida obteniéndose 31.70 g del compuesto 4.

El compuesto 3 se obtuvo con un rendimiento del 20% a partir de acetato de vinilo.

En IR se observaron las siguientes señales:

Tabla 6.3.1. IR¹⁶⁰⁰

Señal	3300	2900	750
Asignación	-OH	-S-CH ₂	-S-C-

a: en ¹³C señalada de 480, referenciada este.
 b: concuerda con la literatura⁽¹⁶⁰⁾.

El compuesto **3** se obtuvo con un rendimiento del 90% a partir del acetato de vinilo y con una pureza del 99%, determinada por GC (Columna OV-17, Temperatura Programada: 60°C por 1 min., calentamiento: 4°C/min., 100°C por 4 min. Gas arrastrador N₂, Detector de ionización de flama).

Por GC, este compuesto muestra un RT de 0.43 (bajas condiciones que en el inciso 6.1., pero revelando con nifhidrina el 2% en etanol al 99% y calentamiento).

En RMN-¹H se observaron las siguientes señales:

Tabla 6.3.2. RMN-¹H⁽¹⁶¹⁾

Señal	1.95 s.	7.35 s.a.	4.0 s.a.
Asignación	CH ₂ (C-2)	HC-4	HC-5

a: 8 ppm; TMS como referencia interna, disolvente DMSO.

b: en singuleto, s.a.: singuleto de otro.

En IR se observaron las siguientes señales:

Tabla 6.3.3. IR^{cm⁻¹}.

S-Real	1000	1600	600
Asignación	-CH ₃	-C=O-	-S-C-

en cm⁻¹, punta de 480, referencia 600.

6.4. Obtención del clorhidrato de la α -cisteína 6.

En una matraz esférico se colocaron 36.70 g del compuesto 4 disueltos en 80 mL de metanol con 3.2 g de NaOH; este matraz se enfrió externamente con un baño de acetona-hielo seco hasta llegar a una temperatura interna de -10°C, una vez estabilizada la temperatura se le burbujeo ácido cranhédrico (preparado con una solución de 50 g de HCl en 210 mL de agua que se adicionó lentamente a una solución de 100 mL de H₂SO₄ concentrado y 40 mL de agua, esta última solución debe tener una temperatura de 60°C^{±0.5}).

Al finalizar la adición del ácido cranhédrico se dejó agitando la solución por 30 min más. Se tomó una alícuota de la solución y se analizó por CO₂, encontrándose una conversión del compuesto 4 al 5 del 80%.

La solución metabólica anterior del 2,2-dimetilisovalón-4-cifeno-nitrilo 5, se trató de la siguiente manera.

a) Hidrólisis con HCl 2N.

La solución del compuesto 5 se adicionó a 100 mL de HCl 2N, y se calentó a reflujo 4 h, durante ese tiempo no se logró observar la formación de la α -cisteína.HCl; se siguió el curso de la reacción por CCP.

b) Hidrólisis con HCl 6N en un paso.

La solución del compuesto 5 se adicionó a 100 mL de HCl 6N, y se calentó a reflujo 4 h, tiempo durante el cual se observó la formación de la α -cisteína.HCl siguiendo la reacción por CCP y utilizando

baseina HCl (Merck) como referencia. Así mismo se detectaron otros productos, uno de los cuales tenía un Rf que correspondía a la baseina estírica (Merck). Se eliminaron los disolventes por evaporación a presión reducida al vacío y se obtuvo una pasta café oscura. En este punto se quiso aislar la baseina HCl por los métodos señalados en la literatura⁽¹⁾ sin conseguir resultados positivos. Se detectó una gran cantidad de NH_4Cl y se decidió cambiar las condiciones.

c) Hidrólisis con H_2SO_4 9N y HCl concentrado.

La solución del compuesto 5, se trató por separado con H_2SO_4 9N y HCl conc. y se calentó a reflujo. Al seguir las reacciones por ODF se logra observar la presencia de la baseina HCl pero en condiciones muy impuras y su aislamiento no fue factible.

d) Hidrólisis con HCl 9N en dos pasos.

La solución acetilada del 3,8-dimetilhidroxidim-4-carbonitrilo 5 se colocó en un matraz esférico de dos bocas y se puso en un baño de acetona-hielo seco a $0^\circ C$. y bajo agitación se le adicionó lentamente 70 ml. de HCl conc.; una vez que se finalizó la adición del ácido, se cambió el baño por uno de agua y se elevó la temperatura hasta $50^\circ C$, manteniendo esta temperatura por 3 hrs.; al término de este periodo se eliminó el NH_4Cl y se adicionaron 70 ml. de agua; el matraz se calentó a una temperatura de $90^\circ C$ por 4h y por ODF se detectó la baseina HCl. Se le adicionó 5 g de carbón activado y se mantuvo el reflujo por 10 min. más y se filtró la solución.

Se evaporó la solución a sequedad bajo presión reducida, hasta que se formó un jarabe espeso, el cual se trató con metanol para eliminar el NH_4Cl totalmente. Esta solución de metanol se evaporó a sequedad a presión reducida obteniéndose un residuo pastoso (A3).

A continuación se muestran los métodos empleados para aislar la baseina sin haber obtenido buenos resultados.

a) El residuo A obtenido se trató con HCl al 20% para cristalizar

la succinimida, HCl, a pesar de realizar cuidadosamente lo anterior solo se logró aislarla en muy bajo rendimiento.

b) Al residuo A se le adicionó agua hasta disolverlo. A esta solución se le adicionó trietilamina hasta un pH 5, que es el punto isoeléctrico de la succinimida, pero el ácido no precipitó. Se cambió la base por piridina y los resultados fueron los mismos.

c) Al residuo A se le adicionó etanol hasta disolverlo, luego se le agregó éter, pero el precipitado obtenido fue poco y muy inestable.

d) Al residuo A se le adicionó agua y se saturó con NaCl, pero no se obtuvo ninguna cristalización.

El compuesto 5 se obtuvo con un rendimiento del 61% a partir del acetato de vinilo (Determinado por Cromatografía de Alta Resolución (HPLC) Columna C-18, solvente: Acetonitrilo: Agua 40:60 Flujo: 1 ml/min. Detector de índice de refracción.) Por GC se observa que la conversión del compuesto 4, es del 100%. (Columna de OV-17, temperatura 50°C por 8 min., calentamiento de 16°C/min, 150°C por 8 min. Detector de ionización de flama).

Por CCP, este compuesto tiene un RT de 0.4 (estas condiciones que en el inciso 5.3.3).

En RMN-¹H se observaron las siguientes señales:

Tabla 5.4.1. RMN-¹H, (a,b)

Señal	Asignación
1.63 s	CH ₃ (C-2)
1.45 s	CH ₃ (C-2)
4.45 t	H-C-4
3.26 d	H-C-5
3.25 d	H-C-5

a) δ ppm., TMS como referencia interna, disolvente CD₃OD.

b) en acetato, doblado, tripleto.

El compuesto g por CCF Celuyente (modificado¹⁰⁰), (n-butanol): ácido fórmico: agua 72:19:13, revelador: vanilidrina al 2% en etanol al 60% y calentamiento tiene un Rf de 0.46.

6.5. Obtención del ácido 2,2-dimetil-4-tiazolidinaetilenoico h ¹⁰⁰

1 g de acidoctina.HCl (fresco) se adicionó a 200 mL de acetona y la mezcla se refluxó por 7 h. Al final de este periodo se destiló la acetona y cuando se observó una turbidez se suspendió la destilación, se dejó enfriar y luego reposar en el refrigerador por 24 h. Los cristales formados se filtraron y se reprecipitaron en acetona. Se obtuvo 0.86 g (17% de rendimiento) con un p.f. de 170-172°C.

Cuando el residuo A se sometió a la técnica anterior, se observó que era muy insoluble en acetona por lo cual se le adicionó primero metanol para disolverlo, 10 g del residuo A se le adicionó 5 mL de metanol y se calentó suavemente hasta disolver la pasta. Una vez ya disuelta se le adicionó 1 L de acetona y se puso a refluxo por 7 h y después se destiló la acetona. El rendimiento fue muy bajo (1% del la muestra total). Por CCF se observó una gran pureza.

El compuesto h por CCF (estas condiciones que en la caracterización de g) tiene un Rf de 0.46.

En RMN-H¹ se observaron las siguientes señales:

Tabla 6.5.1. RMN-H¹ (40°C).

Señal	Asignación
1.70 s	CH ₃ (C-6)
4.77 t	H(C-4)
3.50 d	H(C-5)
3.45 d	H(C-5)

s = s. simple, TMS como referencia interna, desdoblado δ_{ppm}

t = se. tripleta, desdoblada, integrable.

d = coincide con lo reportado ¹⁰⁰.

En IR se observaron las siguientes señales:

Tabla 6.5.2. IR^{cm⁻¹}.

Señal	3450	2900	1740	1400
Asignación	-OH	-NH ₂ ⁺	-C=O	S-OH ₂

en cm⁻¹ ,gemita de KBr, referencia cero.

6.5 Obtención del ácido 2,2-pentametileno-4-tiazolidinocarboxílico 9.

0.5 g de succinimida.HCl se disolvieron en la mínima cantidad de metanol, se le adicionó 5 ml. de ciclohexanona recién destilada y se agitó por 2 h a temperatura ambiente. Se concentró la solución a presión reducida hasta la aparición de cristales, se enfrió el matraz y se guardó en el refrigerador por 18 h. Los cristales se filtraron obteniéndose 0.6 g de 8 (60% de rendimiento) p.f. de 130-135°C.

Cuando se trató el residuo A bajo las condiciones anteriores se obtuvo el compuesto 9. (Se siguió la reacción por CCF) pero su purificación es muy difícil debido a las impurezas del residuo A. Este compuesto se obtuvo con un rendimiento del 15% de la síntesis total.

El compuesto 9 por CCF (mismas condiciones que en el inciso 6.5.1) tiene un RF de 0.62.

En RMN-H¹ se observaron las siguientes señales:

Tabla B.6.1. RMN- ^{13}C , CDCl_3 .

Señal	Asignación
1. 0-2. 2 m. a.	CH_2 (C-2)
6. 2 m. a. ^{17}O	HCOO (C-4)
4. 03 t.	H (C-4)
3. 40 d.	H (C-5)
5. 50 d.	H (C-5)

en δ ppm, TMS como referencia interna.

m. a. a. = multiplete ancho, doblete, triplete.

s. a. = multiplete ancho.

d. intercambiado con D_2O .

En IR se observaron las siguientes señales:

Tabla B.6.2. IR $^{\text{cm}^{-1}}$.

Señal	3450	2900	1740	1470
Asignación	-OH	-NH $_2$	-C=O	S-CH $_2$

en cm^{-1} , escala de KBr, referencia org.

6.7. Obtención de la purestina, HCl 8 a través de los derivados del ácido 4-tiamidindicarbonílico disustituidos en la posición 2.

a) 0.5 g de 8 se disolvieron en 1 mL de HCl 6N y se pusieron a reflujo por 3 h. Se evapora a sequedad y se obtuvo 0.26 g del compuesto 8 (90% del rendimiento).

b.) 0.5 g de 8 se disolvieron en 1 mL de HCl 6N y se puso a reflujo por 3 h donde se observó por CCF la aparición del compuesto 8, pero aun con la presencia de 8. Cuando se aumenta el tiempo de reflujo no se encontró variación alguna.

b.2) 0.5 g de 9 se disolvieron en 1 ml. de HCl 6N y se colocaron en una ampollita de vidrio la cual posteriormente se cerró. Esta fue colocada en un baño de agua a temperatura de 62°C por un periodo de 3 h. al analizar la solución por CCP no se encontro variación alguna respecto al anterior inciso.

B.6. Obtencion de masa y su-cistina 10³¹.

a.1) 1 g de su-cistina HCl (Merck) se disolvió en H₂O, se le adicionó NH₄OH concentrado hasta un pH de 9.5 y se le burbujeo aire por 24 h. Al cabo de este periodo se observó un precipitado blanco, el cual se filtra obteniendose 0.6 g de 10 (rendimiento 70% con un p.f. de 250-255°C (desc.)).

a.2) La solución obtenida del hidrolizado del compuesto 5 (mencionada en 6.4. d.) fue tratada con C. activado, luego se le adicionó NH₄OH conc. hasta un pH de 9.5 y se le paso una corriente de aire por 24 h. al finalizar este periodo se observo un precipitado el cual fue filtrado a vacio, obteniendose 5 g del compuesto 10 (rendimiento 14% a partir el acetato de vinilo) con un p.f. de 180-185°C (con desc.).

Por CCP, en las mismas condiciones que el inciso 6.5 se detectará un Rf de 0.22 que fue el mismo de la cistina estandar.

En IR se observaron las siguientes señales:

Tabla 6.6.1. IR ^{cm⁻¹}

Señal	3400	3000	1600	1400	475
Asignacion	OH	NH ₃ ⁺	C=O	S-CH ₂	S-S

si en ³¹, pedida de Nro. referencia que:

0.5 M (biensana, de α -cristalina.HCl) 5 por reducción de peso y α -cristalina 10.

5 g de 10 se disolvieron en 100 ml de HCl 30 (cuando fue necesario se trató antes con C activado), y se le adicionaron 0.5 g de Zn. La mezcla se redujo sucesivamente por 1 h (por ECF se siguió la reacción). Al finalizar este período se dejó enfriar y se le pasó una corriente de H_2O que hasta saturación, el precipitado luego que se formó se filtró. La solución resultante se secó a presión reducida y el sólido se recristalizó con HCl 20%. Se obtuvo 0.7 g de α -cristalina HCl (rendimiento del 10% de la síntesis total).

Por ECF este compuesto tiene un PI de 0.26 (misma condiciones que 6.50).

En IR se observaron las siguientes señales:

Tabla 6.9.1. IR ^{cm⁻¹}

Señal	3400	3000	1740	1480	475
Asignación	OH	NH ₂ ⁺	C=O	S-CH ₂	S-S

en cm⁻¹, posición de IR, referido a KBr.

En RMN-H¹ se observaron las siguientes señales:

Tabla 6.9.2. RMN-H¹, ¹⁰⁰Me₂S₂

Señal	Asignación
3.15 δ	CH ₂ CH ⁺ NH ₂ ⁺ COOH
4.15 δ	HSCH ₂ CH

en δ ppm., TMS como referencia interna, disolvente D₂O.

Se multiplicó, multiplicar

5.10. Obtención de la 2,2-pentametileno-4²-tiazolina 11¹⁰⁰.

A una matraz esférico de 500 ml. con 2 bocas, se colocó en una de ellas un termómetro y en la otra un embudo de presión compensada, se le adicionó 20.33 g de 1 y se enfrió esta solución en un baño de hielo seco-acetona bajo agitación hasta que se alcanzó una temperatura de -10°C. En el embudo de adición se puso la solución 2 y se le adicionó lentamente sosteniendo la temperatura interna entre -10 y 0°C. Después de la adición se continuó la agitación por 10 min y se observó la formación de un precipitado blanco que corresponde al compuesto 3. Se adicionó lentamente 32 ml. de ciclohexano recién destilada. Posteriormente se adicionó lentamente 60 ml. de NH₄OH al 28% sosteniendo la temperatura entre -10 y 0°C. Al finalizar esta última adición se le agregó 50 ml. del cloroformo y se dejó agitando a temperatura ambiente por 6 h. Se siguió la reacción por GCP. Al finalizar este tiempo se separaron las fase y se extrajo con CCl₄ 3 porciones de 20 ml. cada una. Se seca la solución con MgSO₄ anh y se eliminó el CCl₄ a presión reducida.

El compuesto 11 se obtuvo con un rendimiento del 93% a partir del cloroacetaldehído 1, y una pureza del 78% (Determinada por GC mismas condiciones que el inciso 5.30).

Por GCP (mismas condiciones que el inciso 5.30, muestra un Rf de 0.44.

En RMN-H¹ se observaron las siguientes señales:

Tabla 5.10.1. RMN-H¹, ^{ppm}

Señal	1.20 m	7.30 s. s.	3.65 d
Asignación	CH ₂ (C-2)	HC(4)	HC(5)

si δ ppm., TMS como referencia interna. Solvente CDCl₃.

s. s. = simpleta simple, m. multiplete, d. doblete.

6.11. Obtención del ácido 2,2-pentametilhex-4-tiazolidinocarboxílico 12.

En un matraz esférico se colocó el compuesto 11 obtenido anteriormente disuelto en 50 ml. de CCl_4 y 3.3 g de NaOH. Este matraz se enfrió externamente con un baño de acetona-hielo pero hasta lograr una temperatura interna de $+10^\circ\text{C}$. una vez estabilizada la temperatura se le burbujeó HCN gas (obtenido de la misma forma que anteriormente en 6.4.3). Al finalizar la adición se dejó agitando la solución por 20 min más a temperatura ambiente. Se analizó por GCF la desaparición de 11 y se observó la aparición de 12.

A esta solución se le adicionó lentamente 70 ml. de HCl conc. y se agitó por 5 h a una temperatura de 50°C . Al finalizar este periodo se tomó una alícuota y se analizó por GCF pero no se pudo aislar de la reacción.

El compuesto 12 se optuvo por una muestra de RMN (determinada por HPCL) mismas condiciones que en el compuesto 50. Por CD se observa que la conversión del compuesto 11, es del 100% mismas condiciones que en el compuesto 50. Por GCF (mismas condiciones que el compuesto 50) tiene un Ef de 0.49. En RMN- ^1H se observaron las siguientes señales:

Tabla 6.11.1. RMN- ^1H , $^{\text{DMSO}}$.

Señal	Asignación
1.0-2.2 s.a.	$\text{CH}_2\text{C}=\text{S}$
4.5 t	$\text{HC}=\text{S}$
4.62 t	$\text{HC}=\text{S}$
3.25 d	$\text{HC}=\text{S}$
3.10 d	$\text{HC}=\text{S}$

si δ ppm., RMN como referencia interna, disolvente D_2O .

1. s. a. s. multiplete (siete), multiplete, multiplete.

s. s. t. multiplete (siete).

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSIONES.

1.- Por medio de la cromatografía en capa fina se desarrolló la técnica más práctica para poder realizar el seguimiento de la síntesis total.

2.- Se sintetizó el ac. 2,2-pentanileno-4-tiazolidincarbonílico 8 para el cual no hay una síntesis informada.

3.- No se pudo determinar si los ácidos 4-tiazolidincarbonílicos disustituídos en la posición 2 son intermediarios de la hidrólisis de los 4-tiazolidincarbonitrilos disustituídos en la posición 2.

4.- La reacción de hidrólisis de los 4-tiazolidincarbonitrilos disustituídos en la posición 2, es baja en rendimiento debido a la inestabilidad tanto del reactivo como del producto bajo condiciones de hidrólisis.

5.- El método encontrado para el aislamiento de la cistina puede ser aplicado a otras rutas, con lo cual se facilitará su purificación.

6.- De varias opciones reportadas para la reducción de la cistina, se probaron y se seleccionó la utilización de Sn en medio ácido, lo que permite el mejor rendimiento y pureza.

7.- Se comprobó que la utilización de derivados como medio de purificación de un producto es exitoso, ya que permite obtener compuestos con propiedades químicas y físicas que facilitan dicho proceso.

8.- La producción industrial de la L-cisteína por síntesis química no es costosa debido al bajo rendimiento, por lo que se recomienda estudiar su aislamiento de proteínas.

B. BIBLIOGRAFIA.

1. - Kirk, D.F. - Oliver, D.F., *Encyclopedia of Chemical Technology*, 2 pp 376-426 Ed. Wiley-Interscience U.S.A. 1968.
2. - Aldrich, *Catalog Handbook of Fine Chemicals U.S.A.* 1963.
3. - Steinmann, J.P., and Vancic, H., *Chemistry of the Amino Acids*, 3 Chap. 24, pp 1979-1029. Ed. John-Wiley and Sons, Inc., USA, 1961.
4. - CA 54:1744.
5. - CA 100:226970z
6. - CA 87:202749z
7. - CA 93:69142z
8. - CA 66:6496z
9. - Günther, K. and Schuchardanz, M., Thin Layer Chromatographic Enantiomeric Resolution, *Naturwissenschaften* (1965) 72 149-50.
10. - CA 66:16116z
11. - CA 100:22699z
12. - *ibid* 3 Chap. 29
13. - *Food's Chemistry of Carbon Compounds*, 10 Ed. 2nd Ed. Edited by S. Coffey Elsevier Pub.
14. - CA 66:5449z
15. - CA 85:25602z
16. - CA 65:7082z

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

17. - CA 96:05381a
18. - CA 95:25010a
19. - CA 100:11368B
20. - CA 100:73323y
21. - CA 100:95676c
22. - CA 98:21790y
23. - CA 89:24008a
24. - *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* (1981) 20, 668.
25. - *Pat. Aleman. Con. Exten.* 2,849,748
26. - JACS (1960) 82 (5) 1124-6
27. - CA 71:12378a
28. - CA 97:144705v
29. - Ca 100:34145v
30. - CA 68:49067v
31. - Ca 95:160790w
32. - CA 23:3470
33. - CA 23:3698
34. - CA 76:13730y
35. - Santos, E., León, F. y Pérez, Gloria Síntesis de al.1-Cuafeno (1987) UDAH, (en publicar).
36. - Spatler Research Laboratories Inc. IR-52323C
37. - CA 51:2973j
38. - Howard-Loock, H. E., Loock, C. J. L., Martins, H. L., Seelley, P. S., and Bell, F. A., *Can. J. Chem.* (1986) 64 1219-9.

- 39.- Santos, Elvira, León, Fernando y Contreras, L. Síntesis de 4-oxo-1,5-dicloro-2-metil-2-pirrolidinas sustituidas en la posición 3. (1980 UNAM (en publicar)).
- 40.- Ziegler, K. Nitrogen Cyanide. Organic Syntheses I, (1941) 814-16.
- 41.- Pretsch, E. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Ed. 1 Ed Alhambra España 1980.
- 42.- Kawanishi, K. Infrared Absorption Spectroscopy. Ed Maruzen Company Limited Japan 1962.

9. ESPECTROS

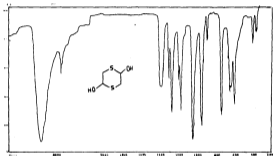


figura 9.1

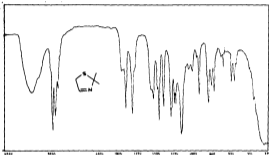


Figure 9.2

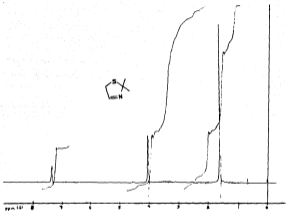


figura 9.3

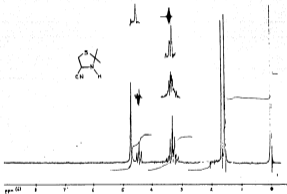


figura 9.4

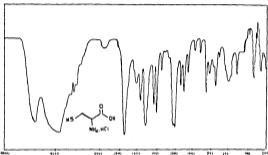


figure 9.5

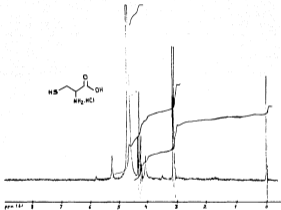


figura 9.6

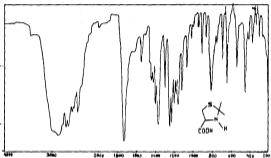


Figure 9.7

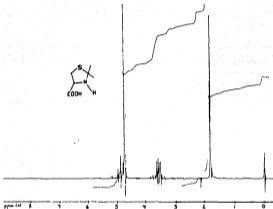


Figure 9.8

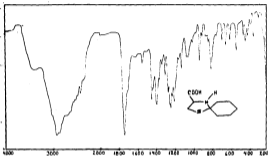


Figura 9.9

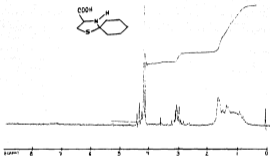


figure 9.10