



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA BIORREDUCCIÓN DEL
3-NITRO-2,3-DIFENILPROPENONITRILLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U Í M I C A

P R E S E N T A :

MARIA BEATRIZ GONZALEZ PAREDES



MEXICO, D. F.

1996

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO .

PRESIDENTE: Prof.: ERNESTINA CERVERA FLORES

SECRETARIO: Prof.: MANUEL JIMENEZ ESTRADA

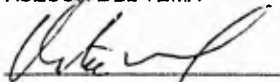
VOCAL: Prof.: ARTURO NAVARRO OCAÑA

1er. SUPLENTE: Prof.: FERNANDO LEON CEDEÑO

2do. SUPLENTE : Prof.: JOSE GUILLERMO DE JESUS AGUILAR OSORIO

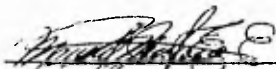
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: INSTITUTO DE QUIMICA

ASESOR DEL TEMA



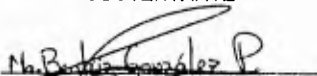
M.C. ARTURO NAVARRO OCAÑA

SUPERVISOR TECNICO



DR. MANUEL JIMENEZ ESTRADA

SUSTENTANTE



MARIA BEATRIZ GONZALEZ PAREDES

El éxito alcanzado
con honradez y esfuerzo
le da sabor a la vida.
Triunfar en las cosas
pequeñas es dar un
paso firme hacia el éxito
en las cosas mayores

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto de Química por haberme permitido utilizar sus instalaciones, para la elaboración de esta tesis.

Quiero agradecer al Dr. Manuel Jiménez Estrada, por su apoyo, paciencia, comprensión y supervisión, ya que gracias a todo esto se realizó esta tesis.

Agradezco al M. en C. Arturo Navarro Ocaña, por todas sus enseñanzas, su cooperación, paciencia, comprensión para la elaboración de esta tesis.

También a la Q. Ernestina Cervera Flores por su cooperación y aprobación de esta tesis.

A una compañera y amiga Ana Laura Castro Rodríguez por su cooperación en la proporción de algunos compuestos para la elaboración de esta tesis.

A una persona que no es visible pero siempre ha estado presente, a la V. San Juan de los Lagos.

Quiero agradecer muy especialmente a mi Madre " Ana María Paredes" por sus enseñanzas, comprensión y apoyo en todo lo que he realizado en mi vida.

A mis hermanas : Estela y Alejandra, muy especialmente Alejandra por su apoyo y estímulo para terminar esta tesis.

A mi sobrino : Christian Osvaldo

A Luis Enrique por todo su cariño y comprensión, así como por sus palabras de aliento para superar mis metas.

A mis amigos : Viviana, Carolina, Claudia, Norma, Consuelo, Rocio , Estela, Zenia, Elizabeth, Jose Luis M. Raul y Ricardo por todo su apoyo que me han brindado.

INDICE

I.- INTRODUCCION

II.- ANTECEDENTES GENERALES

II.A.- BIOREDUCCION DE CARBONILOS.....	5
II.B.- BIOREDUCCION DE DOBLES ENLACE CARBON-CARBON.....	8
II.C.-BIOREDUCCION DE NITROALQUENOS.....	9

III.- PREPARACION DE NITROALQUENOS

III.A.-METODOS DE OBTENCION DE NITROALQUENOS.....	15
III.B.- NITRACION DE ALQUENOS.....	18

IV.-PREPARACION DE NITROALCANOS

IV.A.-REDUCCION QUIMICA DE NITROALQUENOS.....	23
---	----

V.- SINTESIS DE ISOXAZOLES

V.A.-SINTESIS DE 5-AMINOISOXAZOLES.....	26
V.B.- SINTESIS DE 3,4-DISUSTITUIDOS-5-AMINOISOXAZOLES.....	28
V.C.-SINTESIS DE 3-UNISUSTITUIDOS-5-AMINOISOXAZOLES.....	28
V.D.-SINTESIS DE 3,4-DIFENIL-5-AMINOISOXAZOL.....	30

VI.-ISOXAZOLES EN QUIMICA ORGANICA PREPARATIVA

VII.-OBJETIVOS.....	34
---------------------	----

VIII.-PARTE EXPERIMENTAL

VIII.A.-METODO GENERAL DE BIOHIDROGENACION.....	36
VIII.B.-BIOHIDROGENACION DE LOS β -NITROESTIRENOS.....	37
VIII.C.-NITRACION DE OLEFINAS.....	39
VIII.D.-PREPARACION DEL: (E)-3-NITRO-2,3-DIFENILPROPENONITRILO.....	40
IX.- ESTUDIO DE LA BIOREDUCCION DEL:	
(Z)-3-NITRO-2,3-DIFENILPROPENONITRILO (II)	
IX.A.-INACTIVACION DEL BIOCATALIZADOR POR TEMPERATURA.....	41
IX.B.- SIN BIOCATALIZADOR.....	42
IX.C.-ENZIMAS PARTICIPANTES.....	42
X.- PARAMETROS QUE INFLUYEN EN LA BIOREDUCCION	
(FUENTE DE CARBONO, PH, TIEMPO, CONCENTRACION DEL SUSTRATO-	
BIOCATALIZADOR, CONDICIONES ANAEROBIAS Y AEROBIAS).....	
	43
XI.- APLICACIONES DEL METODO DE BIOHIDROGENACION DE SUSTRATOS	
ANALOGOS AL COMPUESTO III.....	46
XII.- REDUCCION QUIMICA DE: (Z)-3-NITRO-2,3-DIFENILPROPENONITRILO (II).....	48
XIII.- BIOREDUCCION DEL 5-AMINO-3,4-DIFENILISOXAZOL.....	49
XIV.- HIDROGENACION CATALITICA DEL 5-AMINO-3,4-DIFENILISOXAZOL.....	50
XV.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	51
XVI.- CONCLUSIONES.....	66
ANEXO 1.....	67
ESTRUCTURAS.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	73
ESPECTROS	

INTRODUCCION

La Química Orgánica preparativa ha ido evolucionando progresivamente, a través de la historia, se han logrado aportaciones significativas para los procesos químicos. Uno de los resultados de dicha evolución es el proceso de biotransformación, el cual es una metodología limpia y económica, de gran aplicación en diversas áreas como son las de alimentos, agricultura, farmacia y en un sin número de reacciones.

La biotransformación es un proceso que consiste en la transformación de un reactivo químico, denominado sustrato, a un producto mediante el uso de biocatalizadores los cuales pueden ser microorganismos, enzimas o células completas como levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*), es de las más utilizadas para llevar a cabo un gran número de reacciones, como de reducción de dobles enlaces C=C, C=O y C=N, de oxidaciones e hidrólisis, abriendo una perspectiva para realizar síntesis asimétrica y para el desarrollo de procesos industriales mediante biocatálisis.

Considerando lo anterior, los nitroalquenos pueden ser empleados como modelo de estudio para realizar una biotransformación, gracias a que estructuralmente son isoelectronicamente similares a los carboxilatos α,β - saturados.

Hoy en día existen diferentes rutas de síntesis para estos compuestos gracias a la facilidad de interconvertirse dada la propiedad de doble reactividad que les permite formar enlaces C-C.

El objetivo de este trabajo es de conjuntar ambas áreas para lograr plantear un modelo de estudio este es el caso de la preparación y biotransformación del (Z)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo **III** (pag 52) empleando como biocatalizador *Saccharomyces cerevisiae*, esperando que el estudio sirva para iniciar nuevas rutas de síntesis por metodologías más limpias. Para ayudar con esto a la protección del medio ambiente.

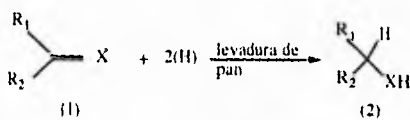
II.-ANTECEDENTES GENERALES

En la actualidad la humanidad enfrenta graves problemas de contaminación ambiental provocadas por diversas fuentes generadoras de productos tóxicos que son subproductos de procesos químicos, por tal motivo surge la inquietud de sustituir dichos procesos por otros que ofrezcan ser no generadores de sustancias nocivas para la salud, que sean metodologías accesibles y económicas. En base a esta ambiciosa idea es posible que dicha sustitución pueda ser realizada por un proceso de biotransformación.

Actualmente se han logrado grandes avances, gracias al impacto causado en las últimas décadas aunque su estudio se inició muchos años atrás, siendo uno de los iniciadores Luis Pasteur en 1862,⁽¹⁸⁾ mediante la oxidación del alcohol a ácido acético usando un cultivo puro de *Bacterium xylinum*, y haciendo una investigación más amplia sobre la oxidación de la glucosa a ácido glucónico con *acetobacter*. Posteriormente Dumas en 1874,⁽¹⁹⁾ reporta el poder reductor de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, ilustrándolo con la reducción de furfural a alcohol furfúrico bajo condiciones anaerobias efectuando la fermentación con levaduras vivas, lo cual le da crédito como el primero en escribir en la literatura sobre la bio-reducción.

En base a esto MacLeod⁽²⁰⁾ y Hub en 1898⁽²¹⁾ después de probar el estudio de la reducción de furfural para obtener el alcohol correspondiente, consiguen extender las aplicaciones de las levaduras de pan, para el caso de reducción de cetonas con varios sustituyentes (Me, Et, n-propilo, n-butilo) produciendo así alcoholes secundarios.

Gracias al avance alcanzado a finales de 1898 se logró reducir compuestos insaturados con levadura de pan. Reacción 1



REACCION 1

Consiguiendo la hidrogenación del sustrato para producir compuestos saturados, manteniendo la R_1 y R_2 sin reducir. Estos resultados sirvieron como aportaciones importantes para el progreso de la biotransformación.

Tomando en cuenta lo conseguido anteriormente surge en esa época un investigador innovador, Chaleff que en el año 1988⁽²²⁾ promovió el proyecto entre investigadores y compañías que se interesaran en esta idea para poder realizar un estudio a fondo, manteniendo presente los beneficios que se podrían tener en el futuro. Siendo algunos de estos, la resolución de mezclas racémicas, selectividad en la conversión de grupos funcionales que tuvieran la misma reactividad, introducción de centros quirales y funcionalización de los centros no activos del átomo de carbono, con el logro de esto se podrían encontrar un gran campo de aplicación en las áreas de alimentos, agricultura, farmacia y de reacciones orgánicas.

Pero quien realmente aporta datos sobre el procedimiento experimental es Yamada y colaboradores⁽²³⁾, que son los que marcan las diferencias entre el medio de fermentación y la biotransformación, considerando todas las variables posibles de modificar para obtener los productos deseados.

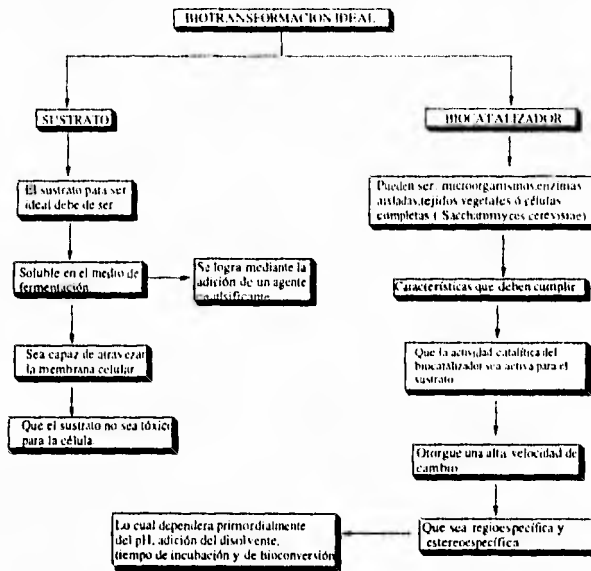
Este grupo describe los diferentes medios que pueden emplearse, para llevar a cabo la bioconversión, alguno de ellos cultivos puros de microorganismos, enzimas aisladas y purificadas ó células completas de *Saccharomyces cerevisiae*, de acuerdo al sustrato que se desea bioconvertir así también aclaran las condiciones experimentales adecuadas para lograr un buen rendimiento.

Dichas condiciones son: pH, temperatura, tiempo, concentración del sustrato con respecto al biocatalizador, fuente de energía, disolvente adecuado, medio de inmovilización de células y una infinidad de variantes que se realizan a las reacciones.

Mucho se ha publicado, sin embargo el empleo de células completas se convertía en una de las mejores expectativas de uso, resultan de fácil operación y económicas, se localizan en el mercado fácilmente. Pero las desventajas que presentan son el tiempo de biotransformación, la operación se realiza a escala en el laboratorio a condiciones estériles, además de una difícil labor de separación de la biomasa.

Al contrario de las enzimas aisladas en las cuales las reacciones son más limpias para separar.

Por tal motivo la biotransformación se convirtió en una área de fácil empleo, y de un gran campo de aplicación. En el esquema 1 se muestran las posibles interacciones del sustrato-biocatalizador, así como las variables que influyen.



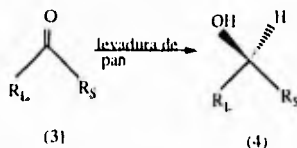
ESQUEMA 1

Pero esto no es nada más que el principio básico de algunas reacciones que se ejecutan exclusivamente con levaduras de pan intactas y las cuales se pueden emplear en diferentes medios de fermentación.

Actualmente existen revisiones de experimentos realizados con las mismas y se clasifican de acuerdo al grupo funcional biotransformado.

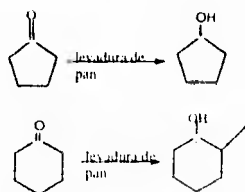
II.A.-BIOREDUCCION DE CARBONILOS

Las levaduras de pan *Saccharomyces cerevisiae*, fueron empleadas principalmente en la reducción de grupos carbonilos, por tal motivo fueron los experimentos más completos y estudiados. Pero en este caso la levadura de pan, se aprovecha como catalizador para la reducción de un sustrato, el cual es un aldehído ó cetona, empleando como fuente de energía glucosa en un medio acuoso, generalmente a un pH neutro, ó entre 5-8, consiguiendo una enantioselectividad en reducciones, sin embargo cuando el proceso no es así, con simples modificaciones de las condiciones experimentales (siendo estos algunos parámetros que influyen en el curso de la biotransformación pH, naturaleza de los nutrientes, concentración de sustrato, temperatura, tiempo, aplicación de un inhibidor enzimático, etc.), los cuales influyen sobre la estereoquímica del producto, por otra parte el uso de un medio orgánico, agregar otros compuestos, o cambio de la fuente de energía puede ayudar, así como las técnicas de inmovilización en agua ó en disolvente orgánico o encerrado en tubo de diálisis puede servir para el mismo fin. Tradicionalmente las levaduras de pan se emplean para reducir grupos carbonilos sustituidos al correspondiente grupo hidroxilo. Reacción 2



REACCION 2

Se consiguió que la enzima distinguiera entre la cara re y si para el sistema π produciendo compuestos quirales que conservan la configuración, lo cual le daba el reconocimiento de ser estereoespecíficas. Existen otras reducciones de este tipo como es el caso de las cicloalcanonas, donde son numerosos los reportes descritos para la reducción de esteroides, en algunos casos se consigue productos con centros quirales en un rendimiento del 40 (%). Reacción 3.

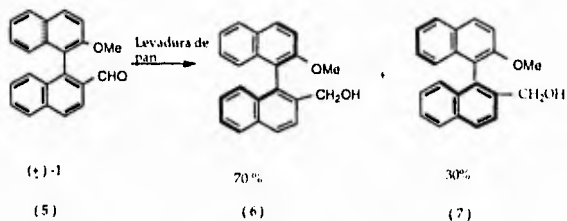


REACCION 3

Con esto se descubre que la estereoquímica depende de la presencia de deshidrogenasas con lo que sigue la llamada regla de Prelog. Las excepciones de esta regla se deben a la presencia de deshidrogenasas competitivas con diferentes requerimientos estequiométricos.

REDUCCION DE ALDEHIDOS α,β INSATURADOS

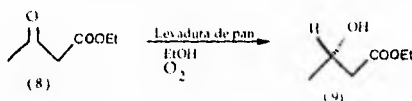
Las levaduras de pan son capaces de reducir a dobles enlaces activados y otros grupos funcionales, algunos informes han sido publicados de biotransformaciones con levadura de pan para reducciones de C=O en aldehidos α,β -insaturados, obteniendo como resultado resoluciones racémicas acompañadas por caras estereoheterotópicas. Reacción 4



REACCION 4

REDUCCION DE β -CETOESTERES

Las levaduras de pan, fueron utilizadas para reducir β -cetoesteres⁽³⁰⁾ representando en este caso a una cetona proquiral, las cuales son usualmente biorreducidas con glucosa ó sacarosa empleando esta como fuente de energía, en medio acuoso con etanol en condiciones aerobias. Ilustrándolo con la biorreducción de acetoacetato de etilo (8) , obteniendo como producto un alcohol secundario quiral (9). Ver Reacción 5. Resultando uno de los grandes avances para ser empleados a nivel industrial .



REACCION 5

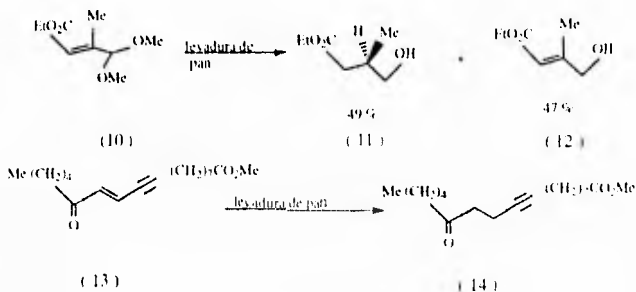
Estas biotransformaciones con levaduras de pan se han realizado tambien por inmovilización física ó absorción química, los cuales consisten en mecanismos de absorción en la superficie entre la materia insoluble y agua, empleando como soporte sólido un oxido de metal, celulosa DEAE (dietilaminoetil) ó resina de intercambio iónico.

Pero en conclusión se reconoce que el efecto de reducir es gracias a la presencia de las deshidrogenasas presentes en la célula, pero aun no se sabe cuales de ellas puedan ser

II.B.-BIOREDUCCION DE DOBLE ENLACES CARBON-CARBON.

El uso de levaduras de pan en la reducción de dobles enlace carbon-carbon fué empleada por primera vez en 1930 por Fischer, quien examinó la reacción con ácido cinnámico y crotilico⁽⁴⁴⁾.

Como consecuencia de esto a mediados de 1970 resurge el interés del grupo de Fuganti, en demostrar del progreso de la estereoquímica empleando esta técnica⁽²⁵⁾. Reacción 6



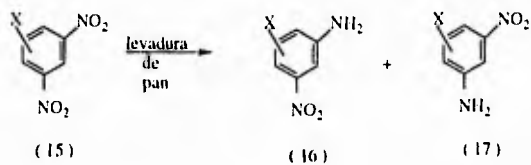
REACCION 6

En esta bioreducción se observa la regioselectividad de las levaduras de pan así como su estereoespecificidad, contribuyendo con esto a la síntesis química de productos quirales.

II.C.- BIOREDUCCION DE NITROALQUENOS

Los reportes encontrados anteriormente sobre la reducción de cetonas, β -cetoesteres y dobles enlaces carbon-carbon, fueron utilizados como guías de estudio para posteriores reducciones de quinonas(27), hidroxilaminas(28) y oximas.

Pero fué en los años 80's cuando con la habilidad de las levaduras se redujeron grupos nitro en anillos aromáticos a anilinas(29), consiguiendo una reducción regioselectiva. Reacción 7

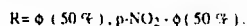
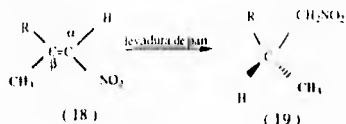


REACCION 7

En base a resultados conseguidos en la reducción de grupos nitro y en doble enlace carbon-carbon. Se esperaba que la bioconversión de los nitroalquenos nos podría dar una diversidad de productos como aminas ó nitroalcanos.

Sin embargo los experimentos realizados recientemente con estos compuestos nos han proporcionado nitroalcanos que son intermediarios importantes para síntesis de bloques de construcción, además de la obtención de nitrocompuestos quirales que pueden tener actividad antibiótica, así como precursores de fármacos.

Existen actualmente resultados de dichos experimentos. Uno de ellos es la hidrogenación del 2-fenil-1-nitropropeno⁽¹⁾ el cual fué realizado bajo una relación de sustrato / biocatalizador, fuente de carbono (glucosa) y agua de 1: 100 : 1:50 y un tiempo de biotransformación de 48 hrs. de este experimento se obtuvo el 1-nitro-2- fenil- propano. Reacción 8



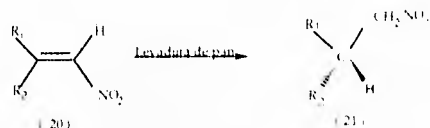
REACCION 8

Este fué el primer modelo de estudio, hidrogenado por el método enzimático, existiendo también algunos otros microorganismos que son efectivos para hidrogenarlos asimétricamente.

Los productos así obtenidos nos demuestran que solo reaccionaba uno de los 2 grupos funcionales exclusivamente, por lo cuál era una reacción quimioselectiva.

Para observar el comportamiento y la quimioselectividad de las levaduras de pan en el mismo sistema para diferentes R se modificaron parámetros de pH, temperatura, fuente de carbono, concentración del biocatalizador así como el tiempo de biotransformación.

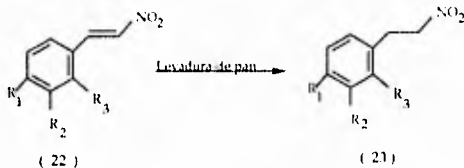
Un trabajo amplio elaborado por Naoki Kobayashi y Kazuhiko Ozaki en el año de 1988 fue considerado completo por realizar modificaciones al sistema 1-nitro-1-alqueno con diferentes sustituyentes, bajo las mismas condiciones variando únicamente el pH de 5-8, de esto se logró una reducción enantioselectiva del 1-nitro-1-alqueno. Reacción 9



$R_1 = o, p, Cl-o, p, Br-o, o, Hexido$
 $R_2 = H, Me, Et, Me$

REACCION 9

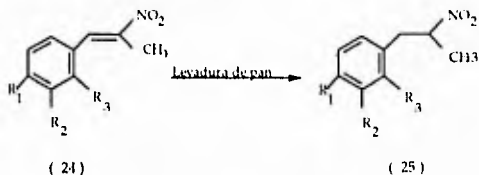
En el año de 1994 el grupo de Takeshita, Yoshida y Kohno⁽¹⁴⁾, describen la reducción quimioselectiva con levaduras de pan para nitroalquenos aromáticos con varios sustituyentes como Br, Cl y CN, bajo condiciones experimentales de temperatura de 31-33 °C por un intervalo de 72-74 hrs de tiempo de biotransformación, obteniendo los nitroalcanos correspondientes. Reacción 10



$R_1 = H, CH_3, O, CH_3, OH, CN, Br, Cl$
 $R_2 = H, CH_3, O, CH_3, CN, Br$
 $R_3 = H, Cl, CH_3, O, CH_3, Br, Cl$

REACCION 10

Lo anterior, impulsó al mismo grupo de investigadores a realizarlo para nitroalquenos con otros sustituyentes en la doble ligadura, siendo uno de estos el metilo, obteniendo así al nitroalcano correspondiente. Reacción 11



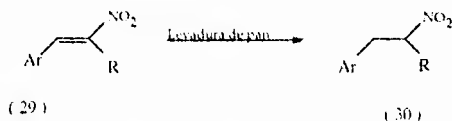
$R_1 = H, CH_3, O, OH, CN, H, Cl$
 $R_2 = H, CH_3, O, CH_3, CN, Cl, Br$
 $R_3 = H, CH_3, Cl, Br$

REACCION 11

Sin embargo cuando se encuentra en posiciones orto, meta y para el grupo NO₂ y la R=CH₃ (14) la biohidrogenación se efectúa con pocas posibilidades de conseguir un solo producto, esto se debe al impedimento estérico que presenta el metilo para hidrogenar C=C, por que es muy voluminoso, lo cual favorece a que la reducción se efectúe en el anillo, y también en el nitroalqueno pero en menor cantidad, por lo tanto se convierte en regioselectiva pero para la obtención de 28.

Pero esto marco, el camino para la ampliación de la reducción enzimática para llegar hasta la biohidrogenación de nitroalquenos heteroaromáticos variando las condiciones experimentales en el tiempo de biotransformación un rango de 72-109 hrs, con levaduras de pan. En dicha biohidrogenación la selectividad de reducir dobles enlaces C=C, sin alterar la estructura del heteroaromático para dar su respectivo nitroalcano convirtiéndose esto en el estudio más reciente que se tenga realizado para bioconvertir a través de levaduras de pan nitroalquenos obteniendo así resultados importantes para la química orgánica(14).

Reacción 13



R= H, CH₃.

Ar= 3-indol, n-fenil-3-indol, 3-piridit.

REACCION 13

Existen otras reducciones para estos sistemas nitrados cuando se tiene un heteroátomo con diferentes sustituyentes en el mismo, incluso grupos activantes como el Br logrando biohidrogenar exclusivamente la doble ligadura y con rendimientos que superan a los primeros estudios realizados, todo esto resulta alentador para la investigación en este área porque además que se encuentran buenos resultados, se pueden encontrar mejores condiciones y seguir incrementando los avances, para el bien de la industria farmacéutica, debido a que la mayoría son precursores de fármacos(14).

Reacción 14



$X = S, O, N-CH_3$
 $R_1 = H, Br$
 $R_2 = H, CH_3$

REACCION 14

Los resultados obtenidos de nitroalquenos fueron comprobados por puntos de fusión en su caso y por constantes espectroscópicas de RMN, IR y MASAS (14). Todos estos informes me permitieron llegar a varias conclusiones en la obtención de nitroalcanos.

- 1) Tamaño de la R que se encuentra sustituida, así como su posición.
- 2) Reactividad de los grupos funcionales sustituidos
- 3) Medio de reacción y tiempo de biotransformación. Estos son los factores importantes para que realice una biohidrogenación quimioselectiva, estereoselectiva ó regioselectiva

Las cuales nos fueron de suma utilidad para llevar a cabo los objetivos propuestos.

III.- PREPARACION DE NITROALQUENOS

En la historia de la Química Orgánica, los nitroalquenos son compuestos que se han caracterizado por tener un gran campo de aplicación en diversas áreas, pero es a recientes fechas que han cobrado importancia, y esto es gracias a las vías de síntesis que se han desarrollado para obtenerlos, así como la versatilidad que en síntesis orgánica poseen, basados estos en la propiedad de doble reactividad que presentan que les permite formar enlaces C-C.

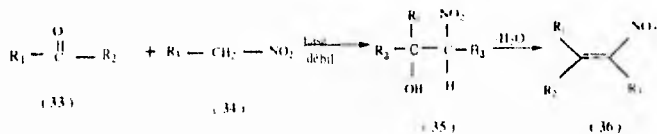
Actualmente los nitroalquenos reaccionan con una variedad de nucleófilos, y su carácter de deficiencia de electrón representa el poder de dienófilos en reacciones de Diels-Alders. Adicionalmente los β -nitroestirenos tienen fundamentalmente una aplicación reciente en la síntesis de 3-nitrocromenos, 3-cromanonaóximas, 3-nitrocromanos, 3-aminocromanos, hidroxiaminocromanos y otros sistemas heterocíclicos.

Lo antes mencionado, fue determinante para la aportación de nuevas rutas de síntesis para nitroalquenos que nos garanticen buenos rendimientos y el producto deseado. Por tal motivo serán descritas las más importantes y utilizadas para la obtención de los mismos.

III.A.-METODOS DE OBTENCION DE NITROALQUENOS

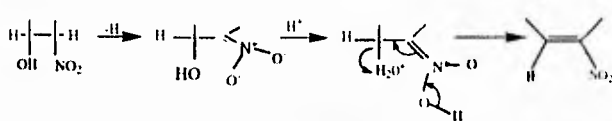
1.- Partiendo de compuestos carbonílicos

Para la preparación de nitroalquenos una de las rutas clásicas utilizadas es la condensación aldólica, la cual parte de un aldehído o cetona (33) y un nitroalcano que posea un hidrógeno α (34), para que posteriormente se combine el carbono α de la primera con el carbono ligado al nitro de la segunda, siendo catalizada por una base débil (carbonato, bicarbonatos, hidróxido de potasio, calcio y sodio en solución acuosa, etóxidos de aluminio o magnesio, así como bases orgánicas aminas primarias o acetato de amonio) para formar así el β -nitroalcohol (35), que posteriormente es deshidratado con agentes como: cloruro de sulfonilmetano, anhídrido naftálico, decilohexilcarbodiimida (DCC), cloruro de pivaloilo y una variedad de soportes sólidos como alumina, para conseguir finalmente la formación del nitroalqueno (36). Reacción 15



REACCION 15

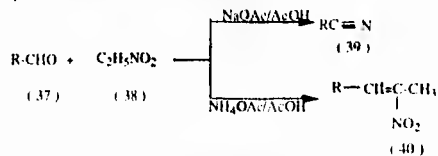
Después de observar las materias fundamentales Dampawan y Zajac así como sus colaboradores proponen al β-nitroalcohol como un intermediario en el método descrito anteriormente, el cual sufre una eliminación de H₂O, con uno de los agentes nitrantes antes mencionados siguiendo el siguiente mecanismo. Reacción 16



REACCION 16

2.- Partiendo de aldehído aromático ó heterocíclicos.

Schales y Graefe⁽³¹⁾, describen otra técnica de síntesis para nitrometano y nitroetano para cuando su R sea un aromático o heterocíclico. En este caso se parte de un aldehído con su respectiva R (37), adicionando posteriormente el nitroetano o nitrometano segun sea el caso (38), catalizados con metilamina, acetato de amonio (CH₃COONH₄). Nota es importante elegir bien la base así como la cantidad exacta que se empleará debido a que cada una de estas bases dan un producto diferente. Reacción 17

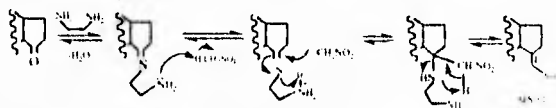


REACCION 17

3.- Mediante una reacción de condensación

Barton y colaboradores⁽³²⁾, mediante una reacción de condensación de un acil-cetona, en presencia de un alifático y un nitrometano para ser catalizados por etilendiamina, obteniendo un rendimiento del 95%.

Basándose en el resultado se sugirió que se debía a que la etilendiamina facilita la transferencia del protón en la adición del anión nitrometano y esto es seguido por un β -eliminación, el rendimiento fué mejorado simplemente por el empleo de aminas primarias. Reacción 18



REACCION 18

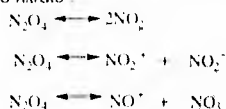
III.B.-NITRACION DE ALQUENOS

La nitración de alquenos empleando óxidos de nitrógeno se remonta al año de 1869, cuando con el tetracloroetileno y el tetróxido de dinitrógeno fueron utilizados como iniciadores de la primera obtención del nitroeteno, la cual se logró con un alto rendimiento; en trabajos posteriores se reportaron numerosos trabajos para la nitración de olefinas bajo este método mostrando la importancia de la temperatura y la presión en esta reacción.

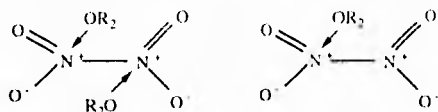
1.-Obtención de nitroalquenos empleando gases de tetróxido de dinitrógeno

Basandose en lo anterior, durante 1940, las reacciones con tetróxido de dinitrógeno para olefinas fueron investigadas por N. Levy, C. W. Scalfé y otras asociaciones como Imperial Chemical Industries Limited. Esto fué muy importante porque la adición de tetróxido de dinitrógeno puro o tetróxido de dinitrógeno en presencia de oxígeno en las olefinas dió resultados satisfactorios, considerando la temperatura de trabajo de -10 a 25° C, en presencia de oxígeno o sin él, pero tomando en cuenta el disolvente empleado debido a que es un controlador de la acción de oxidación. Los disolventes propios para una satisfactoria adición son los que contienen oxígeno como éter-éster, y los no satisfactorios para la adición en las olefinas son el tetracloruro de carbono y cloroformo. Es necesario utilizar el disolvente apropiado debido a que su función es muy efectiva sobre todo si es una base de Lewis porque forman complejos con el tetróxido de dinitrógeno.

El mecanismo es determinante para el resultado del producto, por tal motivo la importancia de la disociación del tetróxido de dinitrógeno, considerando que su disociación depende del disolvente que se emplea, la coordinación del éter produce una disociación del tetróxido de dinitrógeno en un dióxido de nitrógeno o nitrito nitronio y/o nitroso nitrato



El comportamiento del éter con respecto al nitrógeno, se debe a que el oxígeno sirve de donador al átomo deficiente de electrones como es el caso del nitrógeno en el N_2O_4 . Ejemplo del comportamiento: Reacción 19.

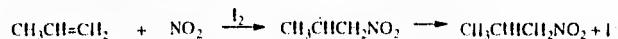


REACCION 19

Como antes ya se mencionó, los disolventes son determinantes para la disociación y para el camino que siga la reacción. Los que favorecen la disociación homolítica son hexano, CCl_4 , CHCl_3 y los que desfavorecen son los disolventes electrodonadores como THF y éteres.

2.- Obtención de nitroalquenos empleando yodo como catalizador.

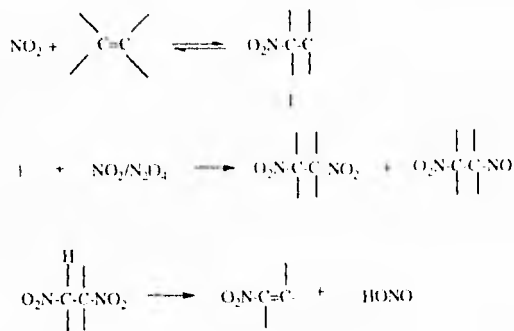
Shechter y Conrad ⁽⁴⁵⁾ emplearon acrilato de metilo y yodo en exceso para nitración de olefinas provocando una adición por radicales libres, donde el yodo atrapa al radical nitroalquil, logrando el β -nitroalquilyodo en un rango de rendimiento de 50-70%. Reacción 20



REACCION 20

La obtención de la nitroolefina se logró por dehidro-halogenación del yodo- β -nitroalquil con acetato de sodio, considerando esto como uno de los grandes poderes catalíticos del yodo en la nitración de olefinas ⁽⁴⁶⁾.

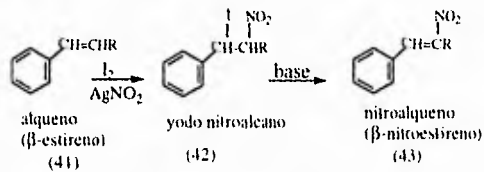
En la reacción 21 se muestra la adición del grupo NO_2 en alquenos.



REACCION 21

3.- Utilizando nitrito de plata como generador del ión nitroso

Posteriormente en 1932 Hassner's Claim y colaboradores ⁽¹¹⁾ desarrollaron una nueva forma de obtención de nitroalquenos, en la cual utilizan nitrito de plata generador del ión nitroso, yodo como agente catalizador y como materia prima un β-estireno, originando así el yodo nitroalcano el cual es tratado con una base para formar así el β-nitroestireno. Observando el seguimiento de la reacción y la obtención del producto, esta es considerado como una adición regioselectiva. Reacción 22

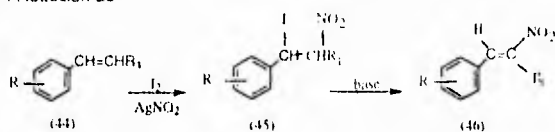


REACCION 22

Hassner's Claim ⁽¹²⁾ logra en el mismo año mejorar el rendimiento agregando un exceso de yodo y por el tratamiento del producto crudo con trietilemina.

4.- Utilizando nitrato de plata para sistemas β-estirenos con sustituyentes en el anillo aromático

Arnold W. By en 1985 le realiza modificaciones al método antes mencionado para que pueda ser empleado en sistemas de β-estirenos con sustituyentes en el anillo aromático, utilizando en este caso condiciones anhidras y bajo atmósfera de nitrógeno. Efectuando así una adición regioselectiva vía intermediario (45) inestable. El tratamiento con base genera el β-nitroestireno (46). Reacción 23



siendo R: CH_3 - O - C_6H_4 - C_6H_4 - C_6H_4 - H $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ - H

REACCION 23

5.- Utilizando nitrato de sodio como generador del ión nitroso .

En el año de 1986, se logró avanzar en el empleo de sales para nitración de alquenos utilizando el mismo método y condiciones, cambiando exclusivamente al nitrato de plata por el de sodio con yodo como catalizador, bajo el mismo mecanismo de radicales libres o mecanismo iónico formando así a los iones NO_2^+ y I^- ó I^+ y NO_2^- para su posterior adición .

Comparando ambas sales en la obtención de β-nitroestireno cuando $\text{R}_1 = \text{H}$

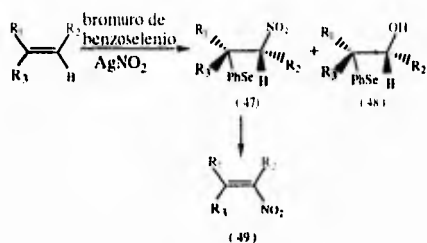
Tabla 2

Sales	Rendimiento
AgNO_3/I_2	45.3 %
NaNO_3/I_2	81 %

Se observa que el comportamiento de la sal es diferente para el mismo sustrato que en este caso fue el β-nitroestireno.

6.- Empleando bromuro de benzoselenio y nitrito de plata

Otra técnica dentro de la síntesis de nitroalquenos es el uso de selenio para la cual Tomoda y Nomura (33), reportaron un nuevo método de preparación para nitroalquenos conjugados, donde por inactivación del alqueno vía nitroselenación se logra la síntesis. Inicialmente se trabajó con bromuro de benzoselenio y nitrito de plata, resultando en la mezcla y el 2-nitroalquil-fenilselenio (47) y 2-hidroalquil fenil selenio (48) siendo este último el predominante, por tal motivo los autores discutieron sobre suprimir la formación de (48) mediante el uso de cloruro de mercurio (II). Reacción 24

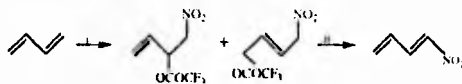


REACCION 24

En el mecanismo que se ilustra en la reacción 24, de la nitroselenación (anti) y la subsecuente eliminación del selenoxido (sin) fueron estereoespecíficas. Todos los intermediarios fueron comprobados mediante espectros de RMN.

5.- Utilizando TFAA y nitrato de amonio

Finalmente en 1980 se reportó el más recientemente método que fue el de J. V. Crivello⁽⁷⁾, el cual está basado en el empleo del reactivo TFAA Anhidrido trifluoroacético y nitrato de amonio como sal. Uno de los ejemplos de dicho método es la síntesis del 1-nitro-1,3 dieno con nitro-fluoroacetoxilación y 1,3-dienos, como producto de la reacción se obtiene el 1,3 dieno con una sustitución generada por el nitrato de trifluoroacetil (preparado mediante nitrato de amonio y anhídrido trifluoroacético) que es rápidamente eliminado como ácido trifluoroacético y posteriormente el 1-nitro-1-3 dieno en un alto rendimiento. Reacción 25



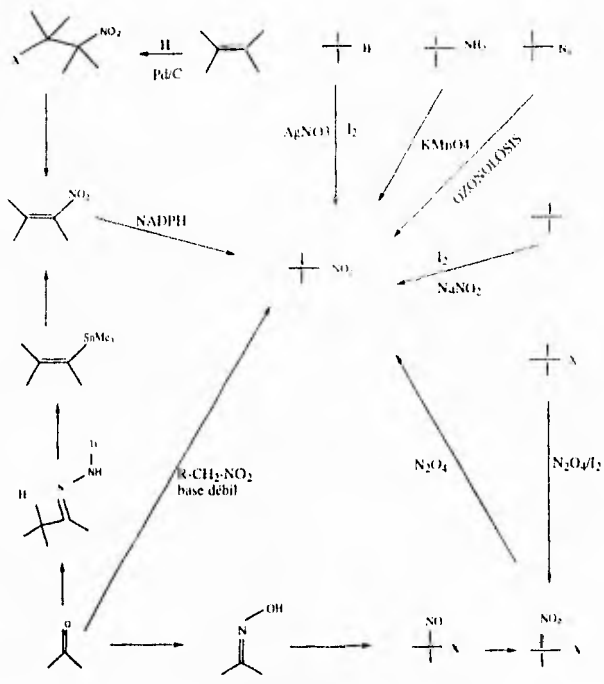
(i) $\text{NH}_4\text{NO}_3, \text{TFAA}, \text{CH}_2\text{Cl}_2, \text{reflujo}$ (ii) KOAc , anhídrido, eter

REACCION 25

IV.- PREPARACION DE NITROALCANOS

El desarrollo de nuevos métodos de síntesis para nitroalcanos en Química Orgánica despertó gran interés desde hace 20 años, debido a su gran utilidad en interconversiones así como la facilidad para formar enlaces C-C.

Pero Seebach, en el año de 1979, destaca la utilidad de los nitroalcanos, como sintones en Química Orgánica, siendo uno de ellos los aniones alquil, también como intermediarios de síntesis. Por lo cual dió origen a diferentes rutas para la obtención de nitroalcanos. Esquema 2.



El esquema nos muestra los posibles precursores de nitroalcanos, por diferentes técnicas, algunas de ellas son las mismas que para la nitración de alquenos (que ya antes se mencionaron); incluso la mayoría de la información proporcionada para nitración de alcanos es partiendo de nitroalquenos o bien por **BIOTRANSFORMACION DE NITROALQUENOS** o por **REDUCCION QUIMICA DE NITROALQUENOS**.

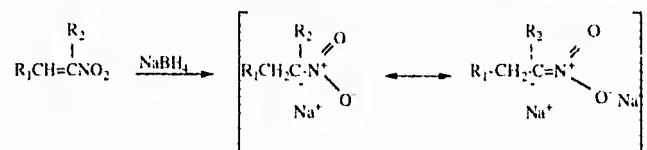
1.- Partiendo de alcanos empleando nitrito de sodio.

Hassner Calim en 1932 (12) lo utiliza mediante un haloalcano, que es preparado con nitrito de sodio o plata con el procedimiento anteriormente descrito para nitroalquenos.

Otro método es, por una simple conversión de nitroolefinas mediante una reducción selectiva con borohidruro de sodio, borohidruro de trialquilo, un hidruro de un metal, así como por una hidrogenación catalítica y con NADPH.

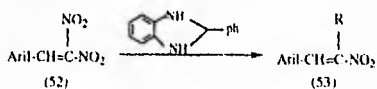
2.- Reducción química de nitroalquenos con borohidruro de sodio

En este método la reducción química se propone que el mecanismo seguido por esta reacción, es un ataque nucleofílico obteniéndose una sal (47).



3.- Utilizando como agente reductor a la 2-fenilbenzimidazolína.

Este método mediante el empleo del PBI (2- fenilbenzimidazolína), este posee la gran propiedad de reducir arílnitroalquenos para dar su correspondiente nitroalcano en un rendimiento del 70-91 %, esto es aplicable para nitroalquenos alifáticos (48). Reacción 26.



R=φ

Nota: no es aplicable para nitroalquenos alifáticos.

REACCION 26

4.- Reducción de nitroalquenos con NADPH

Ohno y colaboradores (37) describen sobre el poder reductor del NAD(P)H para nitroalquenos en presencia de silica gel y reportan que se obtienen los nitroalquenos con un buen rendimiento, siendo esto valido para nitroalquenos aromáticos y alifáticos.

5.- Partiendo de aminas alifáticas

Las aminas alifáticas pueden ser convertidas a nitroalcanos mediante una oxidación con O_3/SiO_2 , $KMnO_4$, $3-ClC_4H_4CO_3H$, dimetil dixirano (49).

Sin embargo, recientemente Corey reporta la más eficiente conversión de azidas para la obtención de nitroderivados mediante la ozonólisis en presencia de fosfinas (38).

6.- Biorreducción de nitroalquenos

Actualmente se ha demostrado también que los microorganismos son capaces de hidrogenar nitroolefinas asimétricas siendo esto reportado para levaduras de pan (11) antes mencionado.

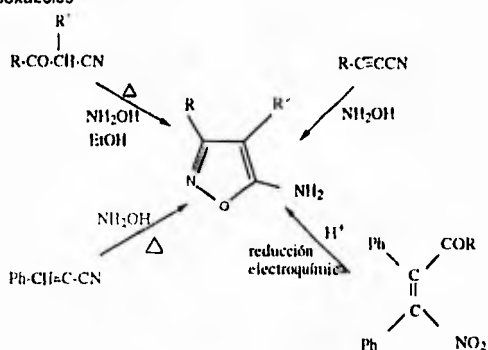
V SINTESIS DE ISOXAZOLES

El estudio de los compuestos heterocíclicos en síntesis orgánica cobran interés a partir de 1972 (27) cuando se descubren conceptos teóricos básicos que permiten deducir la importancia de estos productos.

Uno de dichos compuestos son los isoxazoles que son comunes en estructuras medicinales y en productos naturales ó químicos. En particular el 3-hidroxi-isoxazol. Así como los que estan trisustituídos son importantes intermediarios en farmacología debido a que son una herramienta vital para la formación de los fármacos como es el caso de la oxacilina y la sulfometazol que son antibióticos potentes que son administrados oralmente. Por lo tanto estos hechos han permitido que existan diferentes métodos de obtención de isoxazoles.

Encontrándose dentro de estos los 5- aminoisoxazoles, los cuales son precursores de la formación de aziridinas, así como forman parte del esqueleto de productos naturales, como pueden ser la vitamina B12, pirimidinas, piridinas y derivados del furano, también se les reconoce la aplicación en el campo de fungicidas, adicionalmente el 5-aminoisoxazol es precursor del antibiotico sulfometazol. Pero se espera que en el futuro los isoxazoles se utilizen como pesticidas.

El siguiente esquema 3 nos muestra los precursores que se emplean para obtener isoxazoles

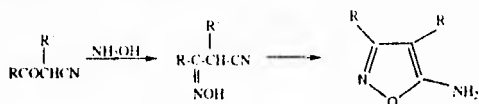


ESQUEMA 3

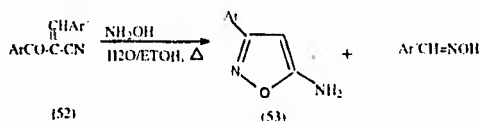
V A.-SINTESIS DE 5-AMINOISOXAZOLES

1.- Partiendo de β -cetonitrilos

El primer método general descrito para la elaboración de 5-aminoisoxazoles es a partir de β -cetonitrilos (52) y adición de hidroxilamina, la cual ataca al carbonilo de los β -cetonitrilos, originando como intermediario a la oxima que en algunos casos es posible aislar, las condiciones experimentales usualmente empleadas hacen que la oxima se cycle para formar los 5-aminoisoxazoles (53) con buenos rendimientos.



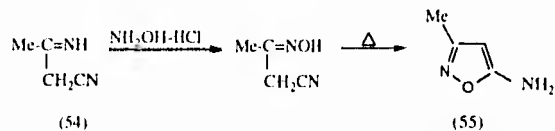
El procedimiento general antes mencionado fue empleado para la síntesis de isoxazoles, donde el R puede ser un aromático y el R' = CHAR, regularmente son siempre tratadas con H₂O/EtOH y calor. Reacción 27



REACCIÓN 27

2.- Utilizando β -iminonitrilo

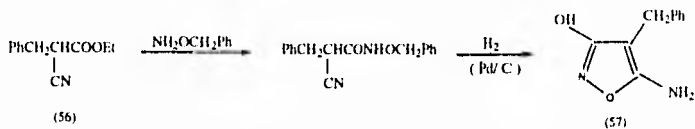
Este método para sintetizar 5-aminoisoxazoles es empleando como materia prima el β -iminonitrilo conseguido por la dimerización del nitrilo por medio de una reacción de Thorpe con hidroxilamina en ácido clorhídrico para formar la oxima que usualmente no es aislada. Reacción 28



REACCION 28

3.- Empleando α - β -etilcarbonílicos

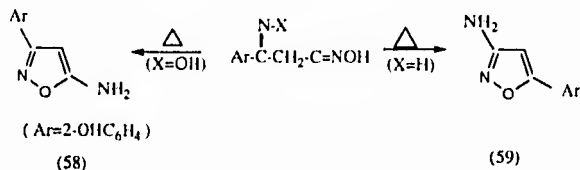
Otra técnica para sintetizar 5-aminoisoxazoles, es mediante la oximación de α - β -etilcarbonílicos, los cuales son complejos de cetonas α,β -insaturados $\text{RCOCH}=\text{CHR}$ con paladio en carbon activado consiguiendo los siguientes resultados. Reacción 29



REACCION 29

4.- Partiendo de β -cetonitrilos

Otro método emplea derivados de β -cetonitrilos en condiciones básicas y calentamiento para formar así los 5-aminoisoxazoles, si se agrega ácido en lugar de base los resultados son los 3-aminoisoxazoles. Reacción 30



REACCION 30

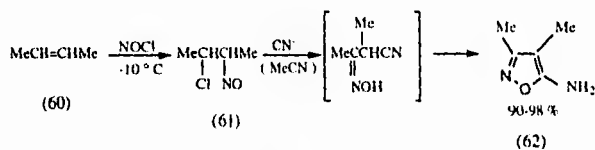
Básicamente la obtención de 5-aminoisoxazoles es mediante el empleo de β -cetonitrilos, los cuales en algunos casos nos conducen a la ciclización directa del 5-aminoisoxazol, en la actualidad este método es considerado como uno de los más importantes, debido a que se consiguen altos rendimientos.

La síntesis de 5-aminoisoxazoles utiliza como principal materia primá a β -cetonitrilos los cuales son obtenidos por el tratamiento de cloroaloximas (con su correspondiente cloruro de nitroso) con cianuro de potasio ó sodio en un disolvente aprótico.

V B.-SINTESIS DE 3,4-DISUSTITUIDOS-5-AMINOISOXAZOLES

1.- Conversión de olefinas 1,2- disustituidas

Esta síntesis procede a través de la conversión de olefinas 1,2-disustituidas (60) con cloruro de nitroso, derivando el intermediario (61), que para su posterior ciclización requiere de la presencia de un átomo de hidrogeno sobre el carbono ligado al cloruro obteniendo rendimientos del rango de 90-98 % Reacción 31.

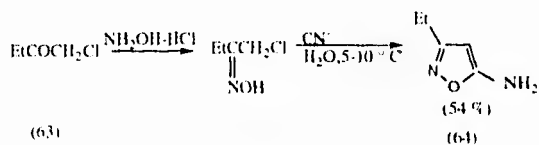


REACCION 31

V C.-SINTESIS DE 3-UNISUSTITUIDOS-5-AMINOISOXAZOLES

1.- Partiendo de α -cloroaloximas

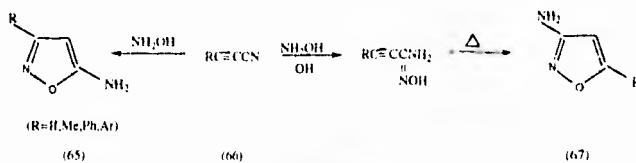
Para la preparación de 3-unisustituidos-5-aminoisoxazoles es a partir de α -cloroaloximas e hidroxilamina en ácido clorhídrico seguido de cianuro de sodio agua y un temperatura de 5-10 °C . Reacción 32



REACCION 32

2.- Oximación de ésteres acetilénicos

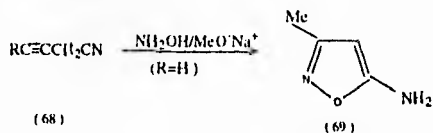
Otro método de obtención de 3-unisustituidos -5-aminoisoxazoles es basado en la oximación de los ésteres acetilénicos. Sin embargo esto es a partir de nitrilos α,β -acetilénicos, en medio ácido o neutro el triple enlace es atacado exclusivamente para dar el derivado del 5-aminoisoxazol. Una nota importante en este tipo de reacción es controlar el pH, temperatura, así como el disolvente Reacción 33.



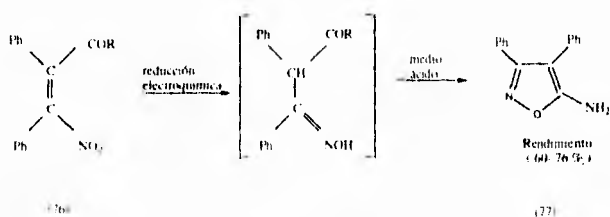
REACCION 33

3.- Utilizando α - β -acetilénicos

La preparación de los 3-unisustituidos -5-aminoisoxazoles puede lograrse a partir de nitrilos α - β -acetilénicos e hidroxilamina, con metóxido de sodio. Consiguiendo bajo este método el 3-metil-5-aminoisoxazol con un alto rendimiento. Reacción 34



REACCION 34



REACCION 37

4.- Partiendo de α -ciano- β -nitroestirenos

Los derivados de los 5-aminoisoxazoles también se pueden obtener por electrolisis análogos al anterior, en este caso se pueden conseguir a partir de los α -ciano- β -nitroestirenos o α -ciano- β -nitrotoluenos, mediante el intermediario de una hidroxilamina, esto ocurre generalmente en la preparación de tioles por el uso de agentes reductores. Pero con el empleo de otros reductores forman productos heterocíclicos.

Sin embargo todavía no existen reportes de obtención de 5-aminoisoxazoles, por medio de biocatalizadores.

VI.- ISOXAZOLES EN QUIMICA ORGANICA PREPARATIVA

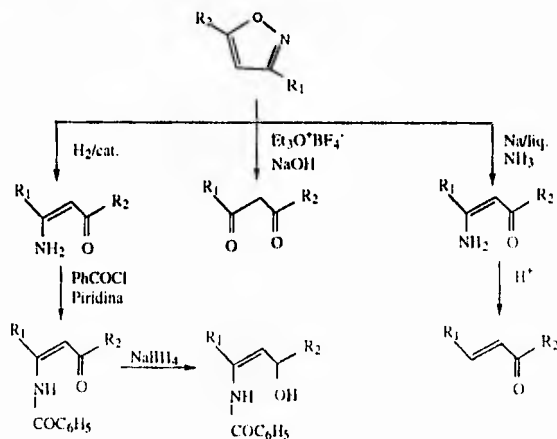
Los 5-aminoisoxazoles estructuralmente poseen enlaces nitrogeno-oxigeno que les permiten tener una serie de funcionalizaciones de las cuales, la conversión de isoxazoles sustituidos no da su correspondiente amida para que posteriormente se trate en medio ácido y obtener así cetonas insaturadas.

Otra funcionalización es la de conseguir enamidas, amidas, aziridinas, así como ayudar a la conformación de esqueletos en productos naturales tales como la vitamina B12 ó en síntesis de semicorina E.

Stagno d'Alcontres hace la hidrogenólisis de isoxazoles en presencia de níquel Raney para obtener 1,3-dicetonas.

Años después en 1972 Buchi Vederas (34), reporta la formación de amidas partiendo de isoxazoles tratados con sodio en amoníaco líquido.

Con estos antecedentes, el uso de isoxazoles para obtener cetonas saturadas e insaturadas con grupos R voluminosos los marcan como importantes intermediarios sintéticos. Esquema 4

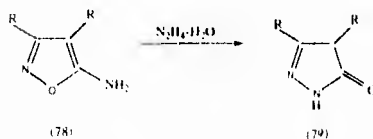


ESQUEMA 4

1.- Partiendo de 5-aminoisoxazol

La transformación del 5-aminoisoxazol a su correspondiente amida sin perder la conformación del heterocíclico.

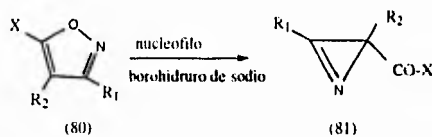
Reacción 38



REACCION 38

2.- Reducción de 5-aminoisoxazoles con borohidruro de sodio

El uso de 5-aminoisoxazoles con un nucleófilo para que posteriormente se reduzca con borohidruro de sodio da como producto a 2-carbonil-sustituidos-2H-azirinas. Reacción 39



REACCION 39

VII.- OBJETIVOS

- 1) HACER LA SINTESIS DEL SUSTRATO (Z)-3-NITRO-2,3-DIFENILPROPENONITRILLO.
- 2) APLICAR AGENTES QUIMICOS PARA LA REDUCCION DEL (Z)-3-NITRO-2,3-DIFENILPROPENONITRILLO .
- 3) REALIZAR LA BIOHIDROGENACION DEL (Z)-3-NITRO-2,3-DIFENILPROPENONITRILLO CON LEVADURAS DE PAN (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*) .
- 4) ESTUDIAR EL EFECTO DE LA VARIACION DE DIFERENTES PARAMETROS FISICOQUIMICOS SOBRE LA BIOHIDROGENACION.
(TIEMPO,PH,FUENTE DE CARBONO,CONDICIONES ANAEROBIAS,AEROBIAS Y RELACION SUSTRATO/BIOCATALIZADOR)
- 5) COMPARAR LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN AMBAS METODOLOGIAS
- 6) HACER LA BIOTRANSFORMACION DE SUSTRATOS ANALOGOS A (Z)-3-NITRO-2,3-DIFENILPROPENONITRILLO.

VIII. PARTE EXPERIMENTAL

Las biohidrogenaciones se mantuvieron en agitación constante en un equipo Innova 4330 que contiene un regulador de temperatura, tiempo y revoluciones por minuto. En la identificación de las enzimas participantes, en biohidrogenación, se empleó una centrifuga Janetzki K-24 y un sonicador. Las reacciones químicas así como las biohidrogenaciones fueron seguidas por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios ALUGRAMSILG UV254 de 0.25 mm de espesor, se utilizaron como reveladores luz ultravioleta, y solución de sulfato cérico al 1 % en ácido sulfúrico 2 N.

Los productos fueron purificados por cristalización y por cromatografía. Las cromatografías en columna fueron realizadas empleando gel de sílice 60 MERCK (35-70 mallas ASTM). Las cromatografías en placa preparativa se realizaron empleando cromatoplaques de gel de sílice 60F-254 de 2 mm de espesor. Los puntos de fusión se tomaron en un aparato Fisher Johns.

Los espectros de IR fueron realizados por la QFB Rocío Patiño Maya y el Q. Arturo Zapien en el espectrofólmetro PERKIN-ELMER 283 Y NICOLET FT-IR 55X.

Los espectros de RMN H^1 fueron determinados por el Q. Atilano García y M.C. Isabel Chávez en los espectrómetros Variant Gemini-200 y Varian VXR-300S.

Los espectros de masas se realizaron en un espectrometro de masas Hewlett-Packard modelo 5945 A, mediante técnicas de impacto electrónico a 70 eV o por ionización química utilizando metano para producir los iones, determinados por el I.Q. Luis Velasco.

Los desplazamientos químicos se dan en ppm y se asignaron las siguientes abreviaturas: s=singulete, d=doblete, dd=doble doblete, t=tripleto, m=multiplete y sextuplete (sin abreviar). Las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz.

Método general de biohidrogenación.

Se realizó de la siguiente manera:

I.- PREINCUBACION

Se colocó en un matraz de fermentación de 500 mL : 100 mL de una solución buffer (fosfatos) a pH= 6, a esta solución se le agregó una mezcla de glucosa y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en relación 1:2 (fuente de carbono-biocatalizador), se tapó y agitó durante 30 min a 116 rpm y 30 °C .

II.- BIOTRANSFORMACION

Después de realizar la preincubación se agregó el sustrato previamente disuelto en 10 mL de una solución 1:1 de acetona/etanol. Se agitó el tiempo necesario para biotransformación total del sustrato en las mismas condiciones la cual se comprobó por cromatografía en capa fina.

III.- PURIFICACION

A la mezcla obtenida se le agregó 8 g de celita , así como NaCl hasta saturación. Se filtró, y al residuo obtenido se lavó con 3 porciones de 100 mL de acetato de etilo; al filtrado se le realizaron 3 extracciones sucesivas de 25 mL con acetato de etilo . El lavado y la fase orgánica se juntaron, esta solución se secó con Na₂SO₄ anh, y se concentró en un rotaevaporador . El residuo obtenido fué purificado por cromatografía en capa fina preparativa o columna.

BIOHIDROGENACION DE LOS β -NITROESTIRENOS

La metodología de las biohidrogenaciones se ejemplificará con el sustrato (E)-2-fenil-nitroeteno **I (a)** 300 mg (2 mmol), y la misma se aplicara a los sustratos (E)-2-(p)-metoxifenil-nitroeteno **I (b)** 300 mg (1.676 mmol), (E)-2-m-metoxifenil - nitro-eteno **I (c)** 300 mg (1.676 mmol), 2-(o,m,-dimetoxifenil)-2-metil-nitroeteno **I (d)** 300 mg (1.41 mmol). Esquematizados en la pag (72)

Preincubación :Se colocó en un matraz de fermentación de 500 mL : 100 mL de solución buffer a pH= 6 , con 7.5 g de fuente de carbono (glucosa) , así como 15 g de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), esta mezcla se tapó y agitó durante 30 min. a 116 rpm y 30 °C.

Terminada la preincubación se agregó el sustrato **I (a)** 300 mg (2mmol) disuelto previamente en 10 mL de una solución 1:1 de acetona / etanol . Esta mezcla se agitó durante 48 hrs más en las mismas condiciones.

A la mezcla obtenida se le agregó 8 g de celita , así como NaCl hasta saturación . Se filtró , y al residuo obtenido se lavó con 3 porciones de 100 mL de acetato de etilo; al filtrado se le realizaron 3 extracciones sucesivas de 25 mL con acetato de etilo . El lavado y la fase orgánica se juntaron , esta solución se secó con Na₂SO₄ anh. y se concentró en un rotaevaporador . El residuo obtenido fué purificado por cromatografía en capa fina preparativa utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo (8.5/1.5) .

La asignación de las señales así como los grupos a que corresponden estan descritas en el ANEXO 1 página 68 .

(E)-2-fenil-nitroeteno compuesto **I (a)**

Bajo el método general se obtuvieron 49.981 mg (0.331 mmol) de cristales con agujas blancas con un *mp*= 55°C y rendimiento 16.55 % *rt*=0.24 Hexano-Acetato de etilo (8.5/1.5). Se caracterizo como: 2-fenil-nitroetano compuesto **V (a)**

RMN H¹(CDCl₃) δ 7.5 (5H,m), 4.6 (2 H , t) , 2.9 (2 H , t)

I.R 1554.76, 1452, 1415, 1377, 1345, 1175.57 , 938 , 920 cm⁻¹ .

EM (Cl, 70 eV) *m/z* : 151 (M⁺, 15), 105 (95.7), 77 (100)

(E)-2-(p)-metoxifenil-nitroeteno compuesto I (b)

Después del trabajo de reacción se produjeron 43.15 mg (0.2383 mmol) de un aceite de color amarillo , con rendimiento 14.2 % y un rf= 0.41 de hexano-acetato de etilo (8.5 /1.5). Caracterizado como: **2-(p)-metoxifenil-nitroeteno compuesto V (b)**.

RMN H^1 ($CDCl_3$) δ 7.16 (4H , dd, J= 18,18 Hz) , 4.6 (2 H , t) , 3.8 (3 H , s) , 3.3 (2H , t) .

I.R 2928, 1707 ,1554, 1379 , 1301, 1250 ,1178 , 1034 , 970 , 909 , 864 cm^{-1} .

EM ($Cl, 70 eV$) m/z : 181(M^+ , 5), 134(71.4), 121(100)

(E)-2-m-metoxifenil - nitro-eteno compuesto I (c)

Obtuvieron 48.14 mg (0.2650 mmol) de un aceite de color amarillo , con rendimiento 15.87 % , rf= 0.4390 hexano-acetato de etilo (8.5 /1.5).

2-(m)-metoxifenil-nitroeteno compuesto V (c) .

RMN H^1 ($CDCl_3$) δ 7.3 (H-m) , 6.8 (3 H , m) , 4.5 (2H , t) , 3.8 (3 H , s) , 3.3 (2H , t) .

I.R 2926 , 1734 , 1554 , 1379 , 1341 , 1260 , 1157 , 1054 , 873 , 864 cm^{-1} .

EM ($Cl, 70 eV$) m/z : 181(M^+ , 3), 77 (48), 121(56.8).

2-(o,m,-dimetoxifenil)-2-metil-nitroeteno compuesto I (d)

39.61 mg (0.1850 mmol) de un aceite de color amarillo , con rendimiento 13.2% , rf= 0.43 de hexano-acetato de etilo (8.5 / 1.5). Identificado como:

2-(o,m-dimetoxifenil)-2-metil-nitroeteno compuesto V(d).

RMN H^1 ($CDCl_3$) δ 6.79 (2H , s) , 6.69 (1H , s) , 4.98 (1H , sext uplete) , 3.68 (6 H , d , J=20 Hz) , 1.6 (3H , d , J=16 Hz) .

I.R 2931, 1732, 1549, 1502, 1390, 1360, 1282, 1157, 1127, 1048, 938, 872 cm^{-1} .

EM ($Cl, 70eV$) m/z : 225 (M^+ , 48), 151(86.9), 178(100)

NITRACION DE OLEFINAS

PREPARACION DE : (Z)- 3-NITRO-2,3-DIFENILPROPENONITRILLO (III)

En un matríz bola de 250 mL se colocaron 5g (24 mmol) de fenilcinnamonitrilo (II) disuelto en 75 mL de acetonitrilo en un matríz bola de 250 mL , a esta disolución se le adicionó 6.5 g de yodo, se agitó y enfri  a 0  C. A esta solución se le adicionaron los gases nitrantes , que se prepararon de la siguiente manera :

En un matríz de 500 mL, para generar los óxidos de nitrógeno, se colocaron 5 mL de THF adicionándolo lentamente 10 mL de ac. nitr ico al 75 % . Esta operación será repetida varias veces.

PRECAUCION : (Reacción exotérmica). Los gases nitrantes (NO₂/N₂O₄) asi obtenidos se burbujearon lentamente con agitación hacia el matríz de reacción hasta saturación de la solución (10 a 15 min.).

La reacción se mantuvo en agitación hasta la transformación total del reactivo; lo cual se comprobó por cromatografía en capa fina, finalmente se procedió a la purificación del producto obtenido.

A la mezcla de reacción se le evaporó el disolvente en un rotaevaporador , el residuo se disolvió en etanol caliente; este se concentró hasta obtener un volumen mínimo y se enfri  en baño de hielo para inducir la cristalización.

De lo cual se obtuvieron 4.54 g (18.01 mmol) del producto III, de cristales en forma de agujas color amarillo canario con *pf*= 89-90 C, rendimiento 74.4 % y un *rf*=0.48 hexano-acetato de etilo (8 / 2) -

Obteniendo como resultado los siguientes datos espectroscopicos descritos para el compuesto (III) en el ANEXO 1 página 67. Ver espectros en pags 75,76 y 77.

RMN H¹(CDCl₃)   7.4 (10 H , s) :

I.R 2854,2300,1737,1542,1375,1097,1035 cm⁻¹

EM (Cl,70eV) m/z: 250(M+,11),178(5),204(100)

PREPARACION DE : 2-FENIL-PROPENOTRILLO (X)

2-FENIL-3-METILPROPENONITRILLO (IX)

Se obtuvieron bajo las mismas condiciones.

PREPARACION DE : (E)-3-NITRO-2,3-DIFENILPROPENONITRILLO (IV)

Se utilizó la misma metodología que para la obtención de (Z)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo (III) , variando unicamente el disolvente, se usó tetracloruro de carbono en la misma cantidad, se obtuvo una mezcla de sólidos en los cuales tiene (E) y (Z)- 3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo. La mezcla de sólidos se sometió a la biohidrogenación, colocando a bioseparar 250 mg de la mezcla de los dos sólidos, obteniendo después del tiempo de biotransformación transcurrido el cual fué de 2hrs, una mezcla de bioproductos que en su mayor parte tenía el (E)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo(IV) y el 5-amin-3,4-difenilisoxazol (III) logrando con esto una separación selectiva de la mezcla racémica.

Para la purificación de los 2 bioproductos se montó una columna utilizando como eluyente una mezcla de Hexano-Acetato de Etilo (9/1) , saliendo el (E)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo (IV) en las fracciones 2-5, y el 5-amin-3,4-difenilisoxazol (III) en las fracciones 6-9, de la separación se obtuvo 150 mg (0.6 mmol) de un sólido de color amarillo claro con $pf = 165-166\text{ }^{\circ}\text{C}$, rendimiento de 60 % y un $rf=0.66$ hexano-acetato de etilo (8/2), caracterizado como (E)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo (IV)

Obteniendo sus datos espectroscópicos de RMN,IR Y EM para el compuesto IV ver ANEXO 1 página 67

RMN H^1 ($CDCl_3$) δ 7.75(4H,m),7.5 (6H,m)

IR 3066,2879,2222,1533,1496,1355,1000,972,792,771,459

EM (Cl,70eV) m/z: 250(M^+ ,7),177(33),204(100).

Ver espectros de RMN, IR Y EM en pags 78,79 y 80

Y de otro bioproducto indentificado como 5-amin-3,4-difenilisoxazol (VI) con un rendimiento del 37 (%) ver ANEXO 1 página 68.

RMN H^1 ($CDCl_3$) δ 7.49 (10H,m) 4.53 (2H,s) (intercambia con D_2O)

I.R. 3490,3394,1413,1341,1014,964 cm^{-1} .

EM (Cl,70eV) m/z: 236(M^+ ,100),208(62.9),89(47.7)

Los espectros de RMN,IR Y EM ver pags. 81,82 y 83

ESTUDIO DE LA BIORREDUCCION DE:

(Z)-3-NITRO-2,3 DIFENILPROPENOTRILO.

La biorreducción se realizó siguiendo los pasos del método general de biohidrogenación: mediante previa preincubación, seguida de la biotransformación que el tiempo de esta fué de 2 hrs. Para su purificación se siguió la metodología descrita en la página 36.

Obteniendo de la separación cromatográfica 154 mg (0.64 mmol) con un rendimiento del 80.49 % de cristales en forma de agujas color amarillo claro con $mp = 160\text{ }^{\circ}\text{C}$, $rd = 0.457$ hexano-acetato de Etilo 7/3. Se caracterizado como: 5-amino-3-4-difenilisoxazol. (VI)

Sus datos de IR,RMN Y EM ver ANEXO 1 página 68.

DEMOSTRACION DE LA BIORREDUCCION

INACTIVACION DEL BIOCATALIZADOR POR TEMPERATURA

Se colocó en un matríz de fermentación de 500 mL: 100 mL de solución buffer (fosfatos) a $pH = 6$, con 2.5 g de fuente de carbono (glucosa), así como 5 g de levaduras de pan (*Saccharomyces cerevisiae*), esta mezcla se calentó a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Para su preincubación: El matríz de reacción se tapó y agitó durante 30 min. a 116 rpm y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Terminada la preincubación se agregó el sustrato III 250 mg (0.99mmol) disueltó previamente en 10 mL de una solución 1:1 de acetona / etanol. Esta mezcla se agitó durante 2 hrs más en las mismas condiciones.

Para su purificación al matríz de reacción se agregó 8 g de celita así como NaCl hasta saturación. Se filtró, y al residuo obtenido se lavó con 3 porciones de 100 mL de acetato de etilo; al filtrado se le realizaron 3 extracciones sucesivas de 25 mL con acetato de etilo. El lavado y la fase orgánica se juntaron esta solución se secó con Na_2SO_4 anh. y se concentró en un rotaevaporador.

El residuo fué purificado por una cromatografía en columna usando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo 9/1. En las fracciones 2-5 salió el producto principal.

De la separación cromatográfica se obtuvo como resultado 0.224 mg (0.89 mmol) del sustrato **III** con un 90 % de materia prima recuperada con $pf=89-90$ °C y $rf=0.48$ de hexano -acetato de etilo 8/2, con cristales en forma de agujas color amarillo canario. Obteniendo datos espectroscopicos similares a los citados en la página 39.

SIN BIOCATALIZADOR

Se utilizo el método general de bioreducción, descrito anteriormente, manteniendo constante todos los parámetros y como única variante el no agregar el biocatalizador.

El residuo obtenido se recristalizó de metanol .

Como resultado de la purificación se obtuvieron 0.2399 mg (0.952 mmol) y 96 % de materia prima recuperada sustrato **III**, con $pf= 89-90$ °C, $rf=0.4883$ de hexano-acetato de etilo (8/2) .

ENZIMAS PARTICIPANTES EN LA BIORREDUCCION

ENZIMAS ENDOCELULARES

Estas enzimas se obtuvieron mediante una previa preincubación descrita en el método general de biohidrogenación, una vez realizada la preincubación la mezcla se centrifugó a 110 r.p.m durante 10 min .

Como resultado se obtuvo sobrenadante y el precipitado. Trabajando con el precipitado este se disolvió en 100 ml de solución buffer (fosfatos) a pH=6, colocando la mezcla en el sonicador durante 5 min.(para liberar enzimas).

Al preparado enzimático se agregó 250 mg (0.99 mmol) sustrato **III** disuelto previamente en 10 mL de una solución 1:1 de acetona/ etanol .

El matríz de reacción se sometió a biotransformación durante 2 hrs a 116 rpm y 30 °C .

Para su purificación se siguió la metodología descrita en la página 36.

Obteniendo 150 mg (0.635 mmol) de 5-amino-3,4, difenilisoazol (**VI**) con datos espectroscópicos y propiedades citados para producto **VI** ver ANEXO 1 página 68.

ENZIMAS EXOCELULARES

Las enzimas se consiguieron del sobrenadante obtenido anteriormente , agregandole 250 mg (0.99 mmol) del sustrato III, sometiendo la mezcla de reacción a biotransformación durante 2 hrs a 116 rpm y 30 ° C.

Para su purificación se empleó la descrita para el método de biohidrogenación Produciendo 200 mg (0.79 mmol) de (Z)-2,3.-difenilpropenonitrilo (III) con características descritas para el producto III.

PARAMETROS QUE INFLUYEN EN LA BIOREDUCCION

UTILIZANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Se siguió la metodología general manteniendo constante todos los parámetros a excepción de la fuente de carbono

En las 4 fuentes de carbono utilizadas, siempre se obtuvo el producto VI.

AZUCAR

La mezcla de bioproductos se purificó por cromatografía en columna usando como eluyente una mezcla 7/3 de hexano/acetato de etilo. En las fracciones 5-9 se obtuvo el producto principal .

Obteniéndose 188 mg (0.798 mmol) con un rendimiento del 80.49 % .

GLUCOSA

Se consiguieron 154.5 mg (0.647 mmol) con un rendimiento del 65.278 % .

SACAROSA

Produciendo 109 mg (0.4653 mmol) con un rendimiento del 46.91 %.

ALMIDON

Logrando 116 mg (0.494 mmol) con rendimiento del 49.88 % .

El producto VI, son cristales en forma de agujas de color amarillo claro con $pf= 160\text{ }^{\circ}\text{C}$, $rf= 0.457$ de hexano-acetato de etilo (7/3). Caracterizado como:

5-amino-3-4-difenilisoxazol (VI) ver ANEXO 1 y espectros en las pags.68,81,82 y 83.

RMN H^1 ($CDCl_3$) δ 7.49 (10 H^1 , m) , 4.53 (2 H^1 ,s) (intercambio D_2O)

IR 3490,3394,1637,1603,1502,1477,1431,1073,1014,964,888 cm^{-1} .

EM ($Cl,70eV$) m/z : 236 (M^+ ,100),208(62.9),89(47.7).

EFFECTO DEL PH

Las biorreducciones se efectuaron manteniendo constante todo los parámetros , variando unicamente la solución buffer (fosfatos) a pH= 4, 5, 6, 7 y 8 obteniéndose siempre como resultado el producto VI en las siguientes cantidades:

pH= 4

163.2 mg (0.692 mmol) y un rendimiento del 69.76 % .

pH= 5

148.37 mg (0.629 mmol) con un rendimiento del 63.41 % .

pH= 6

171.94 mg (0.728 mmol) con un rendimiento del 73.48 % .

pH=7

136.32 mg (0.577 mmol) con un rendimiento del 58.26 % .

pH=8

145.82 mg (0.618 mmol) con un rendimiento del 62.32 % .

TIEMPO

Todos los parámetros se mantuvieron constantes, ahora la variable fué el tiempo de biotransformación considerando: 0.5 , 1 , 1.5 , 2 , 4 , 6 , 12 y 24 hrs . Siempre se obtuvo el producto VI principalmente .

Produciendo las siguientes cantidades para cada tiempo :

0.5 hrs

79.93 mg (0.338 mmol) con un rendimiento del 34.16 % .

1 hrs

83.86 mg (0.335 mmol) con un rendimiento del 35.84 %

1.5 hrs

127.87 mg (0.542 mmol) con un rendimiento del 54.69 % .

2 hrs

205 mg (0.871 mmol) con un rendimiento del 87.84 % .

4 hrs

114 mg (0.438 mmol) con rendimiento del 48.72 % .

6 hrs

92.8 mg (0.393 mmol) con un rendimiento del 39.68 % .

12 hrs

83.4 mg (0.3538 mmol) con un rendimiento del 35.67% .

24 hrs

47.2 mg (0.200 mmol) con un rendimiento del 20.18% .

CONCENTRACION DEL SUSTRATO RESPECTO AL BIOCATALIZADOR

La biohidrogenación se efectuó variando la concentración del sustrato respecto al biocatalizador, en las siguientes proporciones 1:48, 1:40, 1:30, 1:24, 1:20. Obteniendo siempre VI, como producto principal.

Cuando la relación fue 1:48 sustrato/biocatalizador, se obtuvieron 168.52 mg (0.7144 mmol) con un rendimiento del 72.02%.

En la relación 1:40 se obtuvo 104.6 mg (0.4434 mmol) rendimiento del 44.7%.

Empleando una proporción del 1:30 se obtuvieron 153.27 mg (0.649 mmol) rendimiento 65.5%.

En una relación 1:24, se consiguieron 145.78 mg (0.6180 mmol) rendimiento 62.3%.

En proporción 1:20, se obtuvieron 203.86 mg (0.86mmol) rendimiento 87.12%.

CONDICIONES ANAEROBIAS Y AEROBIAS

CONDICIONES ANAEROBIAS

En condiciones anaerobias, se mantuvo constante los parámetros y condiciones, la variable fué inyectar CO₂ al matríz de bio-reducción durante la preincubación y la biotransformación. El resultado obtenido de las condiciones anaerobias fué 140.93 mg (0.597 mmol) del producto VI, con un rendimiento de 60.23%.

CONDICIONES AEROBIAS

En condiciones aerobias, se utilizó O₂, bajo las mismas condiciones.

Obteniendo 104.94 mg, (0.444 mmol) del producto VI, con rendimiento de 44.85%.

Para ambas condiciones el producto obtenido fué VI con características y datos espectroscópicos citados en la página 43.

**APLICACION DEL METODO DE BIOHIDROGENACION A SUSTRATOS
ANALOGOS AL COMPUESTO (Z)-2,3-DIFENILPROPENITRILLO (III)**

2-FENIL-3-METIL PROPENONITRILLO (IX)

La biohidrogenacion de sustratos análogos se efectuó siguiendo la metodología general de biohidrogenación, empleando las condiciones encontradas para el producto **III**.

Se produjeron las cantidades necesarias del producto **XI** a partir del compuesto **IX** para realizar sus experimentos respectivos de RMN, IR por los cuales se identificó al 3-fenil-4-metil-5-aminoisoxazol (**XI**) con un $pf = 85-86^\circ C$ y $rf = 0.634$ en una mezcla de 7/3 (hexano-acetato de etilo).

Los datos espectroscópicos de ambos productos obtenidos estan descritos en el ANEXO 1 ver página 69 .

RMN (CDCl₃) δ 7.47 (5H, m), 4.61 (2H,s) (intercambia con D₂O), 2.3 (3H,s)

IR 3394,1433,1329,1011 cm⁻¹.

2-FENIL-PROPENONITRILLO (X)

Igualmente se preparó el compuesto **XII**, a partir de **X**, en cantidades suficientes para obtener datos de RMN, IR, del cual se identificó el : 4-fenil-5-aminoisoxazol (**XII**), con un $rf = 0.52$ en una mezcla de 7/3 (hexano-acetato de etilo). RMN (CDCl₃) δ 8.2 (1H,s) 7.5 (5H,m) 4.7 (2H,s) (intercambia con D₂O)

IR 3489,3396,1641,1492,1456,1075 cm⁻¹

REDUCCION QUIMICA DE (Z)-3-NITRO,-2-3 DIFENILPROPENONITRILLO (III)

Se prehidrogeno: en un matr az de hidrogenación de 125 mL se colocaron 0.15g de Pd/C suspendidos en 20 mL de acetato de etilo se agitaron vigorosamente , se burbujeo hidrogeno durante 2 hrs a presión atmosférica y temperatura ambiente.

Después se agregó III 1.5 g (6 mmol) disuelto en 10 mL de acetato de etilo . La mezcla de reacción se agitó y mantuvo en el hidrogenador durante 24 hrs más.

Por cromatografía en capa fina se observo reacción total.

La mezcla se filtró a través de celita, realizándole lavados con acetato de etilo, se evaporó el disolvente.

El residuo obtenido se recrystalizó de etanol.

Obteniendo 82.6254 mg (0.350 mmol) con $pf=160\text{ }^\circ\text{C}$, $rf=0.457$ de hexano-acetato de etilo (7/3) , de agujas color amarillo claro , con rendimiento 35.31%.. Caracterizado como 5-amino-3,4-difenilisoxazol (V).

Por sus datos espectroc picos de RMN,IR Y EM ver ANEXO 1 y espectros en las pags 68, 81,82 y 83.

RMN H^1 (CDCL₃) δ 7.49 (10 H ¹,m) , 4.53 (2 H ¹ , s) (intercambio D₂O)

IR 3490,3394,1637,1603,1502,1477,1431,1073,1014,964,888 cm^{-1} .

EM(Cl,70 eV) m/z : 236(M⁺·100),208(62.9),89(47.7).

BIORREDUCCION DEL 5-AMINO 3-4-DIFENILISOXAZOL (VI)

En la bioreducción sustrato VI: En un matr az fermentación de 500 mL ,se colocaron 100 mL de solución buffer (fosfatos) a pH=6 con 5 g de fuente de carbono (glucosa) así como 10 g de levaduras de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) se tapó y agitó durante 30 min a 116 rpm y 30  C.

Después de realizar la preincubación, se agregó 100 mg (0.423 mmol) del sustrato VI disuelto previamente en 10mL de una solución 1:1 de acetona/etanol .

Se agitó durante 12 hrs más . bajo las mismas condiciones .

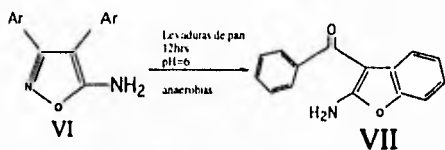
El tratamiento a seguir es el empleado en el método general de biohidrogenación. El residuo obtenido fué purificado con 30 g de silica gel por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla 1: 1 de hexano/acetato de etilo saliendo en las fracciones 10-15 el producto .

Se obtuvieron 60 mg (0.254mmol),rendimiento de 60 %, con $p_f=168-170$  C, $r_f= 0.18$ de hexano-acetato de etilo (6/4), de cristales blancos producto VII, caracterizado como 2-amina-3-fenilcetona-benzofurano.

RMN $H^1(CDCl_3)$ δ 7.8 (2H, m) , 7.4 (5H, m) , 7.2 (2H, m) 5.86 (2H, s)

I.R 3517,3390,2335,1750,1659,1576,1453,1398 cm^{-1}

EM(Cl.70eV) m/z: 237 (M+,0.4),105(100),77(21).



La asignación de las señales ver ANEXO 1 página 68 , así como los espectros en las pags. 84,85 y 86.

HIDROGENACION CATALITICA DEL:5-AMINO-3,4-DIFENIL-ISOXAZOL (VI)

En un matr az de hidrogenación de 125 mL: se colocaron (0.10 g) de Pd/C suspendido en 20 mL de etanol al 98%, se agitó vigorosamente a esta suspensión y se burbujeó hidrógeno durante 2 hrs a presión atmosférica (hidrogenador).

Se agregó 1g (4.2372 mmol) de VI disuelt  en 10 mL de etanol al 98% . Manteni ndolo en el hidrogenador y con agitación constante durante 24 hrs.

La reacción total se observó por cromatografía en capa fina.

Obteniendo (0.840 mmol) (47 mg) de cristales crema con $pf=170-171\text{ }^\circ\text{C}$, con un $rf= 0.3191$ de hexano-acetato de etilo (6/4) con rendimiento de 19.91 % . producto VIII, caracterizado como 2,3-difenil-3-amino-enamida

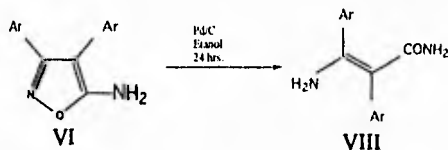
Con los siguientes datos espectroscópicos :

Los grupos funcionales a los que corresponde cada señal ver ANEXO 1 página 68, así como los espectros se observan en las pags. 87,88 y 89.

RMN H^1 ($CDCl_3$) δ 7.5 (10H,m), 5.8(2H,s),5.4(2H,s)

IR 3460,3150,1635,1560,1060,960 cm^{-1} .

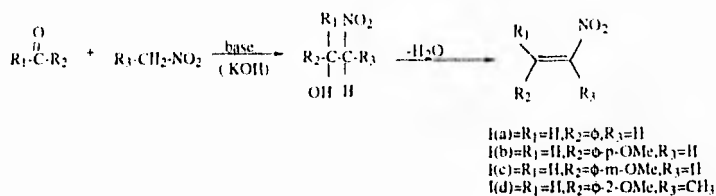
EM (Cl.70eV) m/z: 238(M^+ , 69.2),220(100),106(43.4)



RESULTADOS Y DISCUSION

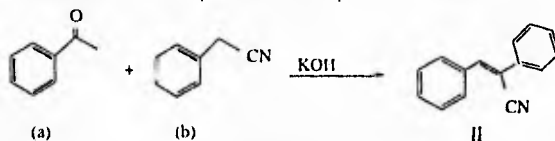
Los β -nitroestirenos (E)-2-fenil-nitroeteno I(a), (E)-2-(p)-metoxifenil-nitroeteno I(b), (E)-2-(m)-metoxifenil-nitro-eteno I (c), 2-(o,m-dimetoxifenil)-2-metil-nitroeteno I (d), se prepararon mediante una condensación de Knoevenagel a partir de un benzaldehído sustituido y nitrometano catalizados por una base.

Reacción 40



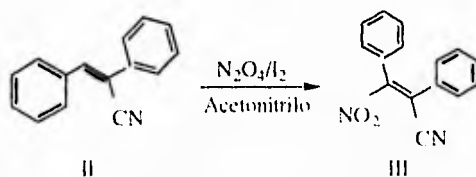
REACCION 40

La elaboración del (Z)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo (III) se hizo en dos etapas: La primera consistió en la condensación del benzaldehído y fenilcinnamonitrilo catalizado por hidróxido de potasio. Reacción 41



REACCION 41

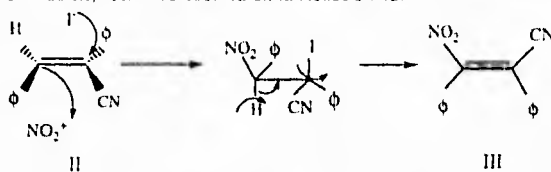
El segundo paso fué la nitración del fenilcinnamonitrilo (II) con gases nitrantes como el N₂O₄ generados en el laboratorio en presencia de yodo. Cuando se empleó como disolvente acetonitrilo se formó el (Z)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo (III). Reacción 41



REACCION 41

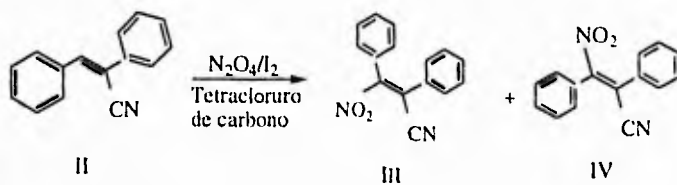
De dicha nitración se obtuvieron unos cristales de color amarillo canario con $pf=89-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un rendimiento de 74.42 % .

El mecanismo de la reacción de nitración esta basado en las investigaciones realizadas por N.Levy C.W. (35), y se propone un mecanismo iónico para la obtención de III, como se observa en la Reacción 42.



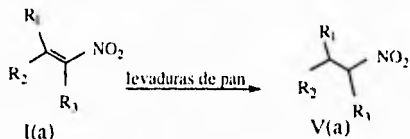
REACCION 4

Para la elaboración del isómero (E)-3-nitro-2,3-difenilpropenenitrilo (**IV**) se generaron los gases nitrantes $\text{N}_2\text{O}_4/\text{I}_2$ de igual forma que en la preparación de (**Z**), pero en éste caso se empleó tetracloruro de carbono como disolvente, obteniéndose una mezcla de (**Z**) y (**E**).



Para familiarizarse con la metodología experimental de las biotransformaciones se prepararon los β -nitroestirenos y se sometieron a una biotransformación siguiendo integralmente las técnicas de Misuhiro Takeshita (14).

Una vez que se estableció el método experimental de bioreducción en el laboratorio se sometieron los sustratos (E)-2-fenil-nitroeteno **I(a)**, (E)-2-(p)-metoxifenil-nitroeteno **I(b)**, (E)-2-m-metoxifenil-nitro-eteno **I(c)**, 2-(o,m-dimetoxifenil)-2-metil-nitroeteno **I(d)**, y se obtuvieron los productos 2-fenil-nitroetano **V(a)**, 2-(p)-metoxifenil-nitroetano **V(b)**, 2-(m)-metoxifenil-nitroetano **V(c)**, 2-(o,m-dimetoxifenil)-2-metil-nitroetano **V(d)** y los resultados fueron semejantes a los descritos en la literatura. Reacción 43



I(a)=R₁=H, R₂= ϕ , R₃=H

I(b)=R₁=H, R₂= ϕ -p-OMe, R₃=H

I(c)=R₁=H, R₂= ϕ -m-OMe, R₃=H

I(d)=R₁=H, R₂= ϕ -2-OMe, R₃=H

V(a)=R₁=H, R₂= ϕ , R₃=H

V(b)=R₁=H, R₂= ϕ -p-OMe, R₃=H

V(c)=R₁=H, R₂= ϕ -m-OMe, R₃=H

V(d)=R₁=H, R₂= ϕ -2-OMe, R₃=H

REACCION 43

Los productos obtenidos fueron identificados por sus datos espectroscópicos de RMN, IR. Los datos anteriores se observan en el Anexo 1 página 68. (14)

TABLA 3
PROPIEDADES FISICAS Y RENDIMIENTO
DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS.

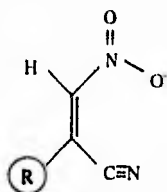
SUSTRATO	PF ° C	Rendimiento (%)
V(a)	55	16.5
V(b)	-	14.2
V(c)	-	15.6
V(d)	-	13.1

Se ha encontrado que la biotransformación de nitroalquenos la provoca la hidrogenación del doble enlace C=C y no se llega a la reducción del grupo NO₂ (14)

Por otra parte los nitroalquenos con sustituyentes aromáticos, que a su vez están sustituidos por grupos nitro en las posiciones orto, meta y para (14). Se produce la bioreducción del grupo nitro del anillo aromático a la correspondiente anilina, no reduciendo el grupo nitro sobre la doble ligadura, en algunos casos se ha logrado reducir el doble enlace C=C de los nitroalquenos. (14),(29).

Haciendo un estudio de estos antecedentes en la literatura consideramos como requisitos estructurales para la bioreducción de sistemas nitroalquénicos los siguientes puntos: 1) grupos desactivantes NO₂,CN estén en posición cis, 2) que tengan un sustituyente aromático en posición trans al NO₂. 3) Ser similares electrónicamente a los grupos carbonilo α,β insaturados.

Basándose en estos puntos se eligió el **(Z)**-2,3-difenilpropenitrilo **(III)** como modelo de estudio para llevar a cabo su biotransformación y establecer los productos formados



Para establecer las condiciones experimentales de la biotransformación del compuesto **III** y aprovechando el poder reductor de las enzimas de las levaduras de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) y el medio, consideramos otros parámetros no presentes en las reacciones químicas tradicionales. Así pues enseguida se describen algunos de los parámetros que se cuidaron para lograr los objetivos.

Los más importantes son efecto del biocatalizador, fuente de carbono, pH, tiempo, concentración de sustrato, biocatalizador, condiciones anaerobias ó aerobias (14)(50).

Se realizaron 2 experimentos para comprobar si en realidad es una biotransformación: El primero consistió en la terminación del biocatalizador por temperatura, para lo cual se logró calentando el medio y las levaduras de pan durante 15 min sin agregar el sustrato **III** aún, después se realiza la preincubación durante 15 min en seguida de este tiempo se agrega el sustrato **III**.

Obteniendo a la materia prima **III** en un 90 %, el biocatalizador es parte fundamental para realizar esta reacción de transformación.

El segundo experimento fué para observar el efecto de no agregar biocatalizador este se hizo colocando el medio sin la levadura de pan a preincubación durante 15 min después de este tiempo se agregó el sustrato **III** y se dejó 2 hrs para su biotransformación, resultando la materia prima **III** en 96%, por lo cual es necesaria la presencia del biocatalizador.

Otro experimento que se realizó fué para identificar el tipo de enzimas participantes

La cual (metodología descrita anteriormente en la pag 42), por este se logró establecer que las enzimas endocelulares(dentro de la célula) son las que realizan la biotransformación.

FUENTE DE CARBONO

Se manejaron 4 posibles fuentes de carbono, tabla 4 de la cual se encontró que la fuente de carbono que mayor rendimiento dió fué **AZUCAR COMERCIAL**. Sin embargo esta describo que la mejor fuente de carbono es la glucosa (14)(50).

TABLA 4
ANALISIS A DIFERENTES FUENTE DE CARBONO

RENDIMIENTO %	FUENTE DE CARBONO
46.91	SACAROSA (R.A)
49.88	ALMIDON
65.27	GLUCOSA
80.49	AZUCAR COMERCIAL

EFFECTO DEL PH

Otro variable que se considero fué pH, para la cual se eligió un intervalo de pH=4 a pH=8, por ser de un rango accesible para el crecimiento de las levaduras de pan, segun Naoki Kobayashi y Kazuhiko (15).

En este trabajo se encontró que el pH=6 fué el óptimo dando el mayor rendimiento, como se muestra en la tabla 5

TABLA 5
ANALISIS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO %	PH
69.76	4
63.41	5
73.48	6
58.28	7
62.32	8

TIEMPO

El tercer parámetro que se tomo, en cuenta fué el tiempo de biotransformación. El cual se establecio en un intervalo entre 0.5-24 hrs. eligiéndose este por considerarlo el necesario para realizar la biorreducción (14)(15). Los resultados conseguidos en dicho intervalo se tabulan en la siguiente tabla. De la cual analizando los datos el tiempo óptimo de biotransformación total del sustrato III es a las 2 hrs.

TABLA 6

RENDIMIENTO %	TIEMPO HRS
34.16	0.5
35.84	1
54.69	1.5
87.84	2
48.72	4
39.68	6
35.67	12
20.18	24

CONCENTRACION DE SUSTRATO RESPECTO A BIOCATALIZADOR

Para sistemas similares a III⁽¹⁾ el cuarto parámetro que se consideró y basado en los antecedentes fué de establecer el intervalo de la relación de concentración entre sustrato-biocatalizador.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla 7, se encontró como concentración favorable para la biotransformación la relación 1: 20 (sustrato/ biocatalizador).

Encontramos que cuando se aumentaba la cantidad del biocatalizador se aumentaba la formación de otro producto así mismo cuando se bajó la cantidad de biocatalizador se favorece la formación del producto mayoritario.

TABLA 7
DATOS ENCONTRADOS A DIFERENTES PROPORCIONES

RELACION SUSTRATO / BIOCATALIZADOR	RENDIMIENTO %
1: 48	72.02
1: 40	44.70
1:30	65.5
1:24	62.3
1: 20	87.12

La otra variable importante que se consideró es la influencia del oxígeno y el dióxido de carbono durante la biotransformación. Esta descrito que en otros sistemas de biotransformación que en condiciones anaerobias y aerobias el rendimiento era mejor en condiciones anaerobias.

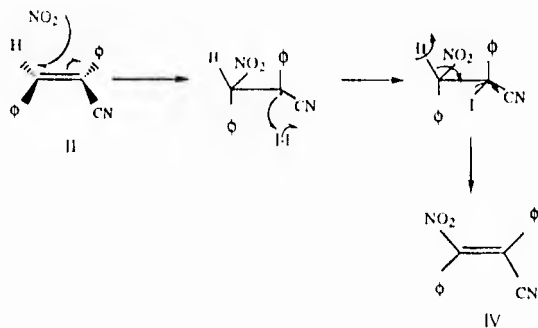
En el presente trabajo las condiciones favorables encontradas son las **ANAEROBIAS**, tabla 8

TABLA 8
CONDICIONES EMPLEADAS

CONDICIONES	RENDIMIENTO %
ANAEROBIAS	60.23
AEROBIAS	44.85

El sistema biológico enzimático bioreduce solamente al isómero **Z** entonces aprovechando esta biotransformación de la mezcla de **Z** y **E**, se utilizó como método de separación de estereoisómeros.

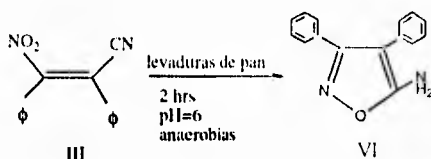
Cuando la mezcla de **E** y **Z** se sometieron a las condiciones de bioreducción únicamente **Z** se biotransforma obteniéndose el 5-amino-3,4-difenilisoaxazol (**VI**) y al no reaccionar (**E**) -3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo (**IV**) se obtiene a **E** en forma pura como un sólido amarillo claro y en un rendimiento de 35 %. Otra forma de separación es por cromatografía en columna empleando sílica gel soportado sobre nitrato de plata. Debido a la mezcla de productos obtenidos por el cambio de disolvente se propone un mecanismo mixto, uno de ellos para la obtención de **Z** por mecanismo iónico (antes descrito pag. 52) y **E** se forma a través de un mecanismo de radicales libres como se describe en la reacción 44



REACCION 44

Los isómeros **E** y **Z** obtenidos fueron identificados por sus *pf*, *ccf* descritos y por sus datos RMN, IR y EM, Ver Anexo (1). página 67 así como sus espectros en las pags. 78,79 y 80.

La biotransformación de **III** llevó a la obtención del 5-amino-3,4-difeniloxazol (**VI**) como producto mayoritario, que se identificó por RMN, IR, MASAS, ccf y pf. Algunas bandas características son 1014, 1341, 3394, 3490 cm^{-1} concuerdan con las descritas para dicho producto (**VI**) ver ANEXO 1 pag. 68. Reacción 45

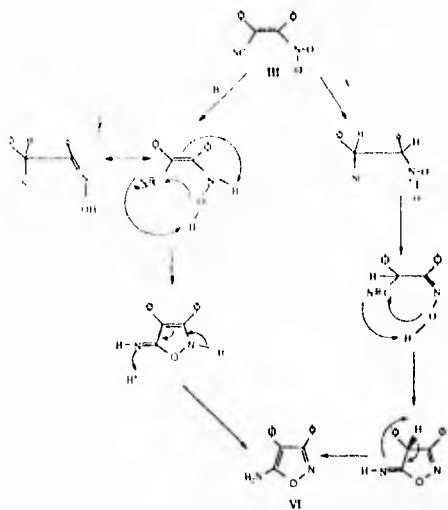


REACCION 45

El producto formado se puede explicar mediante dos mecanismos.

En el primero ocurre exclusivamente la biorreducción del doble enlace C-C activado y después la reducción del grupo nitro para formar posteriormente la oxima (**A**) y en seguida ocurre la ciclización para formar finalmente a **VI**.

El segundo mecanismo de reacción (**B**) se puede explicar por la formación de la hidroxilamina para formar el heterocíclico **VI** ambos mecanismo son posibles para explicar la formación de **VI**. Reacción 46



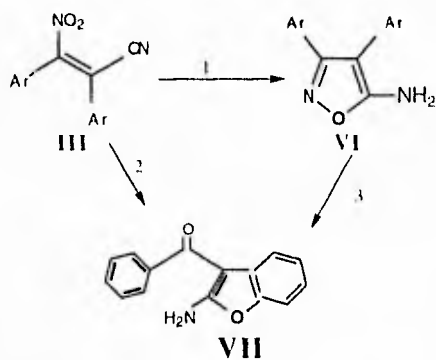
REACCION 46

Una vez que se establecieron las condiciones experimentales optimas de VI se decidió continuar con la biorreducción y se llevo a la formación de un compuesto VII después de 12 hrs (camino 3)

Por otro lado se encontró que si III se dejaba más tiempo 48 hrs en las condiciones de biotransformación (camino 2 reacción 47) se obtiene el compuesto VII .

El compuesto (VII) fue caracterizado por RMN,IR, masas, Ver Anexo (1), pag 68 con un pf=168-170 °C y rendimiento de 60 % y sus espectros ver pags. 84,85 y 86.

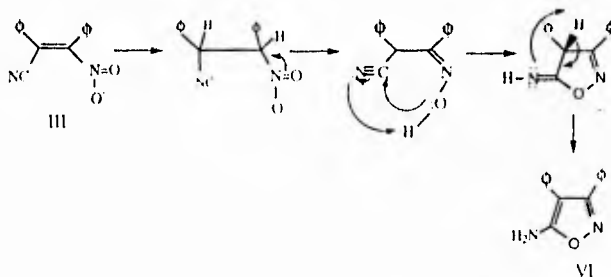
El compuesto VII es 2-amina-3-fenilcetona-benzofurano.



- 1.- Levaduras , 2 hrs
- 2.- Levaduras, 48 hrs
- 3.- Levaduras 12 hrs

REACCION 47

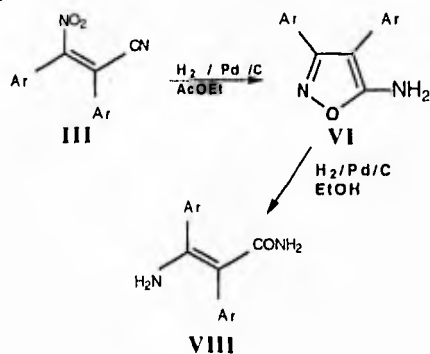
El producto **III** se sometió a una reducción química en un hidrogenador catalítico con (Pd/C) al 10 %, se obtuvo el compuesto **VI** entonces debemos pensar que hubo posiblemente la hidrogenación del doble enlace y las siguientes etapas de reducción del grupo NO₂ y del nitrilo que llevaron en estas condiciones al 5-amino-3,4-difenilisoxazol (**VI**) aunque en menor rendimiento 35.3%. Reacción 48



REACCION 48

Posteriormente el compuesto **VI** se sometió a una reacción de hidrogenólisis, provocándose la apertura del anillo, el cual dió lugar a la 3-amina-2,3-difenilpropenamida (**VIII**) con 19.9 % de rendimiento.

Reacción 49



REACCION 49

El producto obtenido por reducción química de **VI** no es el mismo que de biotransformación de **VI**.

Debido a que en el medio de biotransformación hay suficiente cantidad de NADPH generado durante la fermentación, el cual es un agente reductor

y este realiza la reducción total del producto. El motivo por el cual la reducción química no da el mismo producto.

Los compuestos fueron identificados por sus datos espectroscópicos de RMN, IR Y MASAS. Ver ANEXO 1 página 68 y los espectros en las pags 87,88 y 89.

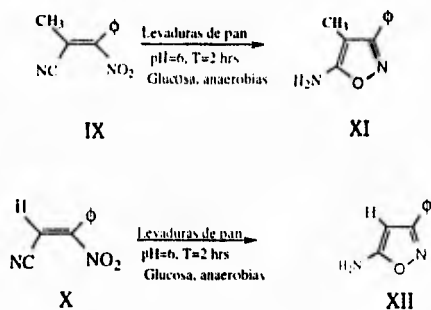
En seguida se hace una comparación de metodologías para resaltar la importancia del uso de biocatalizadores en síntesis orgánica y la gran ventaja que presentan al emplearlos. Como se puede observar en la tabla 9 el rendimiento es mejor cuando se emplea un reactivo biológico que un reactivo químico, considerando además que son de fácil empleo, económicas y biodegradables.

TABLA 9
RESULTADOS OBTENIDOS POR AMBOS METODOS

RESULTADOS CONDICIONES	RENDIMIENTO %
BIORREDUCCION	87.12
REDUCCION QUIMICA	35.31

El método general de biotransformación empleado para sintetizar el 5-amino-3,4-difenilisoxazol (VI), se utilizó para obtener otros 5-aminoisoxazoles. Para lo cual se emplearon sustratos análogos a III, como 3-nitro-2-fenil-3-metilpropenenitrilo (IX) y el 3-nitro-2-fenilpropenenitrilo (X) y se sometieron a las mismas condiciones experimentales descritas.

Se consiguió la biotransformación de IX, obteniéndose en rendimientos bajos, un producto con $pf=86^{\circ}C$, que se caracterizó por RMN, IR, (ver Anexo 1 página 69) como 5-amino-3-metil,4-fenil isoxazol (XI) y para el caso de 3-nitro-2-fenilpropenenitrilo (X) se logró identificar el 4-fenil-5-aminoisoxazol (XII) como producto principal líquido aceitoso con un $rf=0.5$, en rendimientos bajos y sus datos espectroscópicos estan en el Anexo (1) página 69 .



REACCION 50

CONCLUSIONES

- 1.-La técnica de nitración desarrollada para la obtención del (Z)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo (III) y la del (E)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo (IV), da excelentes rendimientos. Se considera, como un método de nitración de alquenos.
- 2.-Se desarrolló un nuevo método de síntesis del 5-amino-3,4-difenilisoxazol (VI) con mejores rendimientos, que la reducción catalítica y más sencillo que los anteriormente descritos y es una tecnología limpia para el ambiente.
- 3.-Se encontraron y optimizaron las condiciones experimentales para la biotransformación del (Z)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo (III) al 5-amino-3,4-difenilisoxazol (VI). Comprobándose la quimioselectividad y la estereoespecificidad de las enzimas para este sistema nitroalquénico (Reacción 45).
- 4.-Se estableció que las enzimas endocelulares son las que participan en la biotransformación de la clasificación de las alcohol-deshidrogenasas.
- 5.- Es la primera vez que se reporta la reducción de grupos nitro sobre doble ligadura.
- 6.-El método encontrado se aplicó a los sustratos (III,IX,X) y se obtuvieron los respectivos 5-aminoisoxazoles (VI,XI,XII) (Reacción 50).
- 7.-La apertura del anillo 5-amino-3,4-difenilisoxazol (VI) se logró por dos caminos, uno de ellos usando levaduras de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) y por reducción química, consiguiendo los productos VII y VIII (Reacción 47 y 49).

ANEXO 1
DATOS ESPECTROSCOPICOS DE RMN ¹ H E IR

COMPUESTO	RMN ¹ H δ (ppm) J=Hz	INFRARROJO cm ⁻¹
I (a)	7.62(5H,m, ar.) 5.45(2H,d,d,J=8.8) (C ¹ ,C ²)	967 (HC=CH, E) 1067,3047 (ar) 1347,1522 (nitro) 1635 (C=C)
I (b)	7.9-8.0 (H,d,J=20) (C ²) 7.52 (H, d,J=20) (C ¹) 7.5 (2H,d,J=20) (C ² ,C ⁴) 7.0 (2H,d,J=20) (C ¹ ,C ⁵) 3.8(3H,s)(-OCH ₃)	822 (p-sustituido) 967 (HC=CH,E) 11345,1512 (nitro) 1637 (C=C)
I (c)	8 (1H,d,J=20) (C ²) 7.53(1H,d,J=20)(C ¹) 7.41(4H,m)(C ² ,C ⁴ ,C ⁵ ,C ⁶) 3.9 (3H,s) (-OCH ₃)	681,721 (ar.m-disust.) 967 (HC=CH, E) 1637 (C=C) 1345,1512 (nitro)
I (d)	8.3 (1H,s) (C ³) 6.9 (3H,m)(C ¹ , C ³ ,C ⁴) 3.9 (6H,d,J=20) (2-OCH ₃) 2.4 (3H,s) (C ¹)	1046,3055 (ar.-OCH ₃) 1656 (C=C) 1325,1518 (nitro) 1387 (-CH ₃)
III	7.40 (10H,s) (2-ar.)	1035,1737 (C=C,Z) 1097 (aromatico) 1375,1542 (nitro) 2300 (nitrido)
IV	7.75 (4 H, m) (ar. C ² ,6) 7.5 (6H,m) (ar.C ³ ,4,5)	972 (C=C,E) 1000 (ar. mono) 1355,1533 (nitro) 2222 (nitrido)

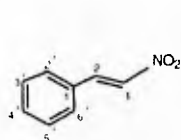
V(a)	7.5 (5H,m, ar) 4.6 (2H,t) (C ¹) 2.9 (2H,t) (C ²)	933,1025 (ar mono) 1175,1345 (C-C,C-H) 1415,1554 (nitro) 1377,1452 (-CH ₂)
V(b)	7.16 (-H,t,d,d,J=18,18 ar.) 4.6 (2H,t) (C ¹) 3.8 (3H,s) (-OCH ₃) 3.3 (2H,t) (C ²)	909,970 (ar mono) 1034 (-OCH ₃ -ar) 1178, 2928(C-C, C-H) 1379,1553 (nitro)
V(c)	7.3 (1H,t) (C ²) 6.8 (3H,m) (C ⁴ ,C ⁵ ,C ⁶) 4.5 (2H,t) (C ¹) 3.8 (3H,s) (-OCH ₃) 3.3 (2H,t) (C ²)	873 (ar mono) 1054 (ar-OCH ₃) 1157,1260 (C-C) 1379,1554 (nitro) 2928 (C-H)
V(d)	6.79 (2H,s) (C ² ,C ⁴) 6.69 (1H,s) (C ⁵) 4.98 (1H,sexuplete) (C ²) 3.68(6H,d,J=20)(2OCH ₃) 1.6 (3H,d,J=16) (-CH ₃)	872,938 (ar) 1048 (ar.-OCH ₃) 1181,1282 (C-C) 1360,1549 (nitro) 1390 (-CH ₂)
V.I	7.49 (10H,m) (2-ar.) 4.53 (2H,s) (intercambia con D ₂ O) (NH ₂)	964,1014 (ar mono) 1413 (C-O) 1341,3394,3490 (-NH ₂)
VII	7.8 (2H,m) (C ^{5,6}) 7.4 (5H,m)(C ^{2,3,4,5,6}) 7.2 (2H,m) (C ^{7,8}) 5.86-6.30 (2H,s) (-NH ₂)	1398 (-NH ₂) 1453 (C-O) 1659 (ce(ona ar.) 3390 (-NH ₂)
VIII	7.5 (10H,m) (2-ar.) 5.8 (2H,s) (CONH ₂) 5.4 (2H,s) (NH ₂)	960 (HC=CH, E) 1060 (HC=CH-NH ₂) 1560 (amida,amina) 1635 (carbonilo) 3150-3460 (amina)

IX	7.5 (5H,m) (ar.) 2.4 (3H,s) (C ⁴ -CH ₃)	984,1079 (ar. mono) 1333,1536 (nitro) 1387 (-CH ₃) 1630 (C=C) 2200 (nitrilo)
X	7.8 (5H,m)(ar.) 5.3 (H,s) (C ³)	999,1025 (ar. mono) 1341,1531 (nitro) 1613 (C=C) 1727 (HC=CH) 2288 (nitrilo)
XI	7.47 (5H,m) (ar.) 4.6 (2H,s) (intercambia con D ₂ O) (-NH ₂) 2.3 (3H,s) (-CH ₃)	1011 (ar. mono) 1329 (-CH ₃) 1433 (C-O) 3394 (-NH ₂)
XII	8.2 (1H,s) (C ³) 7.5 (5H,m) (ar.) 4.7 (2H,s) (intercambia con D ₂ O)	1075 (ar. mono) 1456 (C-O) 1641 (nitrilo) 3396,3489 (-NH ₂)

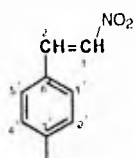
ESPECTROMETRIA DE MASAS

COMPUESTO	PM (g/mol)	EM (CI, 70 eV) m/z
III	250	250(M ⁺ , 11)(C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₂) 204 (100) (C ₇ H ₇ N) ⁺ 178 (5) (C ₁₄ H ₇) ⁺
IV	250	250 (M ⁺ , 7)(C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₂) 204 (100) (C ₁₅ H ₇ N) ⁺ 177 (5) (C ₁₄ H ₉) ⁺
V (a)	151	151 (M ⁺ , 15)(C ₈ H ₉ NO ₂) 105 (95.7) (C ₈ H ₉) ⁺ 77 (100) (C ₈ H ₇) ⁺
V (b)	181	181(M ⁺ , 5) (C ₉ H ₁₁ NO ₃) ⁺ 134 (71.4) (C ₉ H ₁₀ O) ⁺ 121 (100) (C ₉ H ₉ O) ⁺
V (c)	181	181(M ⁺ , 3)(C ₉ H ₁₁ NO ₃) ⁺ 121 (56.8) (C ₈ H ₉ O) ⁺ 77 (48) (C ₈ H ₇) ⁺
V (d)	225	225 (M ⁺ , 48) (C ₁₁ H ₁₅ NO ₄) ⁺ 178 (100) (C ₁₁ H ₁₁ NO ₄) ⁺ 122 (10) (C ₇ H ₇ O ₂) ⁺
VI	236	236(M ⁺ , 100) (C ₁₅ H ₁₇ N ₂ O) 208 (62.9) (C ₁₄ H ₁₂ N ₂) ⁺ 89 (17.7) (C ₇ H ₅) ⁺
VII	237	237(M ⁺ , 0.4) (C ₁₅ H ₁₀ NO ₂) 105(100)(C ₇ H ₅ O) ⁺ 77(21)(C ₆ H ₅) ⁺
VIII	238	238(M ⁺ , 69.2) (C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O) 220(100)(C ₁₅ H ₁₂ N ₂) ⁺ 106(43.4)(C ₇ H ₅ N) ⁺

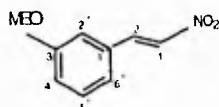
ESTRUCTURAS



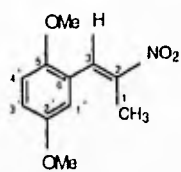
I (a)



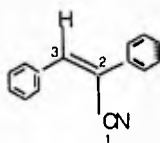
I (b)



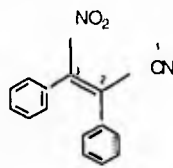
I (c)



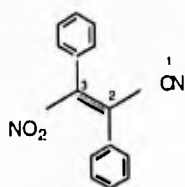
I (d)



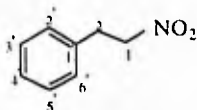
II



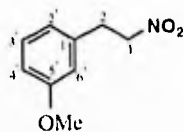
III



IV

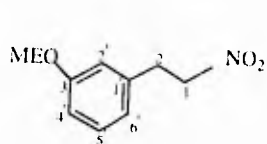


V(a)

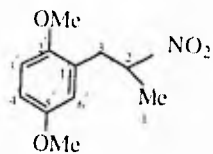


V(b)

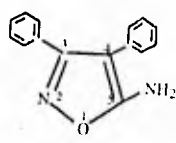
ESTRUCTURAS



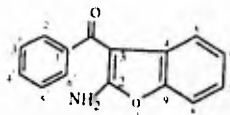
V (c)



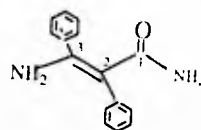
V (d)



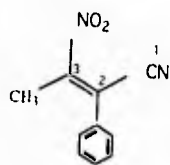
VI



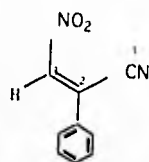
VII



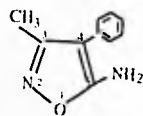
VIII



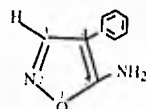
IX



X



XI

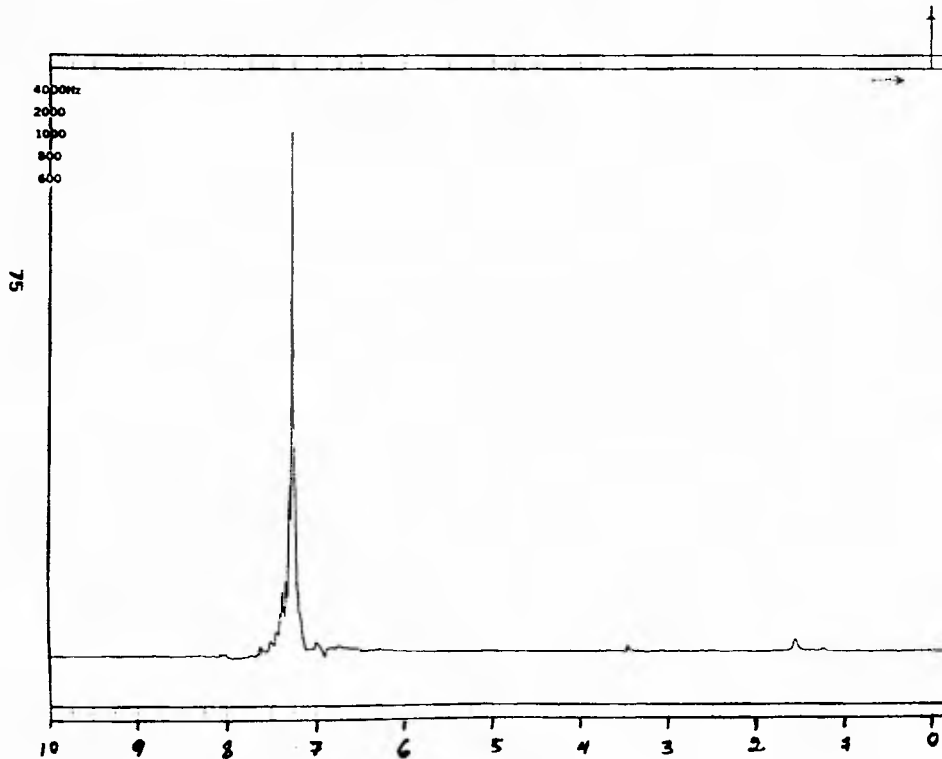


XII

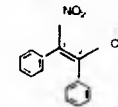
BIBLIOGRAFIA

- 1.-E. Santaniello, Ferraboschi, Grisenti and Manzocchi , *Chem.Rev.***1992** , 92, 1071-1079 ,1120-1121.
- 2.- A.Tramontano., K.J Janda,R.A. Lerner, *Science* **1986**, 234,1566; *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* **1986**, 83, 6736 .
- 3.- T.S. Scanlon, Schultz, *Trans. R . Soc . London B.* **1991**, 332,157.
- 4.- Elsevier, "Enzyme Nomenclature " , Amsterdam,1973.
- 5.- C. Fuganti, *Puro Appl.Chem.* **1990**, 62,1449 .
- 6.- J.B Jones, *Tetrahedron*,**1986**,42,3351.
- 7.- J.V.Crivello, *J.Org.Chem.* **1981** , 46, 3056-3060 .
- 8.- A. Jon Bloom and M. Mellor , *Tetrahedron Letters*,**1986**, 27, 7, pp 873-876
- 9.- R. Nicholas Natale and R. Mirzaei Yousef , *Organic Preparations and Procedures int.* ,**1993** , 25,5, pp 517-520.
- 10.- W. Kabalka and S. Rajender Varma , *Syntheses and selected Reductions of Conjugated nitroalkenes, A. Review* , pp. 285-315 .
- 11.- S. JEW , H. Kim, Y. Cho and C. Cook,*The Chemical Society of Japan* , **1986**, pp. 1747-1748.
- 12.- S. Wing-Wab and B.Arnold, *Tetrahedron Letters*,**1985**,26,9
- 13.- Grunger,P.Vila-Finzi ISOXAZOLES Part. One "THE CHEMISTRY OF HETEROCYCLIC COMPUONDS " , John Wileys Sons. Inc. 1991 USA
- 14.- Misuhiro Takeshita , Sachiko Yoshida and Yoichiro Kohno ; *HETOROCYCLES* , **1994** , 37, No.1,
- 15.- H. OTha, K. Ozaki, and G. Tsuchihashi; *CHEMISTRY LETTERS* , **1987** , pp 191-192.
- 16.-G. Rosini, R. Ballini REVIEW FUNCTIONALIZED NITROALKANES AS USEFUL REAGENTS FOR ALKYL ANION SYNTHONS
- 17.- C. Brindaban and R Chakraborty; *Tetrahedron* , **1992**, 48, No.25 pp 5312-5322
- 18.- L. Pasteur, C.R. Hebd, *Seances Acad. Sci.* **1862**, 55,28.
- 19.- J.B. Dumas, *Ann.Chim.Phys*, **1874**,5,3
- 20.- R.Macleod, H.Prosser,H.Fikehtsche,L.Lanyi,H.S.Masher, *Biochemistry*, **1964**, 3,838.
- 21.-O.Cervinka, L. Hub, *Collect.Czech. Commun*,**1966**,31,2165
- 22.- R.S.Chaleff,*Puro Appl. Chem.***1988**, 60, 821.

- 23.- H.Yamada,S.Shimizu, *Angew. Chem*, **1988**,100,640; *Angew.Chem, int. Ed. Engl.* **1988**, 27,622.
- 24.- R. Csuk, J. Brigitte Glanzer, *Chem Rev.*, **1991**, 91,49-97.
- 25.- Nitrosation ,D.LH. Williams, Printed in Great. Britain at the University Press,Cambridge. pad.1-30,41-45.,1988.
- 26.- P. Dampawan and W.Zajac, *Synthesis*, **1983**,545.
- 27.- H. Lüers, J.Mengele, *Z. Brochem*,**1926**,179
238. C.Neuberg, E.Simón, *Z Biochem*, **1926**,171,256.
- 28.- C. Neurberg, E.Welde, *Z. Biochem*, **1914**,67,18.
- 29.- C.Neuberg, E. Welde, *Z. Biochem*, **1914**,60,427.
- 30.- R.W. Hofmann, W. Helbing, W. Ladner, *Tetrahedro Lett.* **1982**, 23,3479.
- 31.- O.Schaes and H.A. Graefe, *J.Am. Chem. Soc.*, **1952**,74,4486.
- 32.- D.H.R. Barton, W.B. Yotherwell and S.Z. Zard, *Chem. Commun.*, **1982**,551.
- 33.- R.T. Gilsdart and F.F. Nond, *ibid*, **1950**, 15, 807.
- 34.- G.Buchi,J.Veders,J.*Am.Chem.Soc.* **1972**,94,9128.
- 35.- N. Levy and C.W. Scaife, *J. Chem. Soc*, **1948**, 1093, 1100.
- 36.- R.Csuk and B. Glonzer, *Chem Rev*, **1991**,91,49-97.
- 37.- K.Nakamura,M.Fujii,S.Oka,A.Ohno, *Chem.Lett*, **1985**,523.
- 38.- Nitration of hydro carbons, and other organic compunds,
Topchiv,Alesander Valsil ' evich, **1959**,Vol. 2 Nitración.
- 39.- H.Ohta,N.Kobayashi. and K.Ozak, *J.Org.Chem*, **1989**,54,1802-1804.
- 40.-L.Davey,W.Powell,J.Turner and A. Wells, *Tetrahedron Letters*,**1994**,35,42,
pp 7867-7870.
- 41.-H.Shechter,*Record of Chemical Progress*,**1964**,vol.25,1
- 42.- Organic Nitro Chemistry Series, Nitration Methods and Mechanisms,
George A. Olah, R.Malhotra, S.C. Narang, **1989**,Ed. Board,pag 241-261.
- 43.-A.Sera,H.Yamuchi,H.Yamada,K.Itoh,*Tetrahedron Letters*,**1990**,pp477-478.
- 44.- F.G. Fisher and O. Weideman, *Annalen*,**1934**,513,260.
- 45.- H.Shechter,F.Conrad,A.L.Daultan and R.B.Kaptan,
J.Am.Chem,**1947**,33,255.
- 46.- L.Birchenbach,J.Goubeau and E. Berniger, *Ber*, **1932**,65,339.
- 47.- J.M. Larkin and K.L.Kreuz, *ibid*,**1971**,36,2574.
- 48.- L.Nakamura,M.Fujii,S.Oka and A.Ohno, *Chem.Letters*,**1985**,523.
- 49.-Keinan,E.Mazur, *J.Am.Chem.Soc.*,**1977**,99,3861.
- 50.-T.Kometani,E.Kitatsuji and R.Matsuno, *Chemistry Letters*, **1989**,pp1465-
1466.



FT-80A SPECTRUM NO. _____
 OPERATOR _____ DATE _____
 NUCLEUS _____ FREQUENCY _____
 SYNTHESIZER SETTING _____
 EXPERIMENT NAME _____
 FILE NAME _____
 SAMPLE _____



COMPUESTO III

LOCK INTERNAL EXTERNAL
 LOCK SIGNAL _____
 SPIN RATE rpm _____ TEMP °C _____
 INSERT _____ mm _____

ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (SW) Hz _____
 NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
 ACQUISITION TIME (AT) _____
 PULSE WIDTH (PW) _____
 PULSE DELAY (PD) _____
 DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (TO)
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) kHz _____
 ACQUISITION MODE (AM) _____

DISPLAY
 S.I. ENHANCEMENT (SE) _____
 WIDTH OF PLOT (WP) _____
 END OF PLOT (EP) _____
 WIDTH OF CHART (WC) _____
 END OF CHART (EC) _____
 VERTICAL SCALE (VS) _____
 REFERENCE LINE (RL) _____

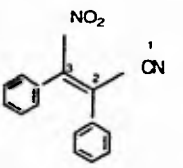
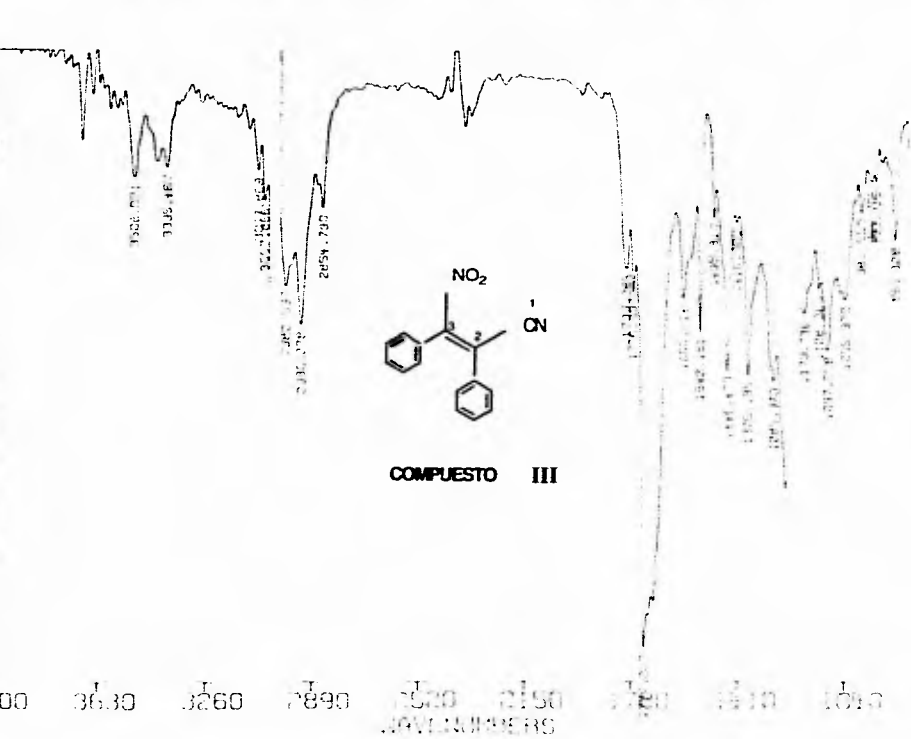
FALLA DE ORIGEN

76

% TRANSMITTANCE

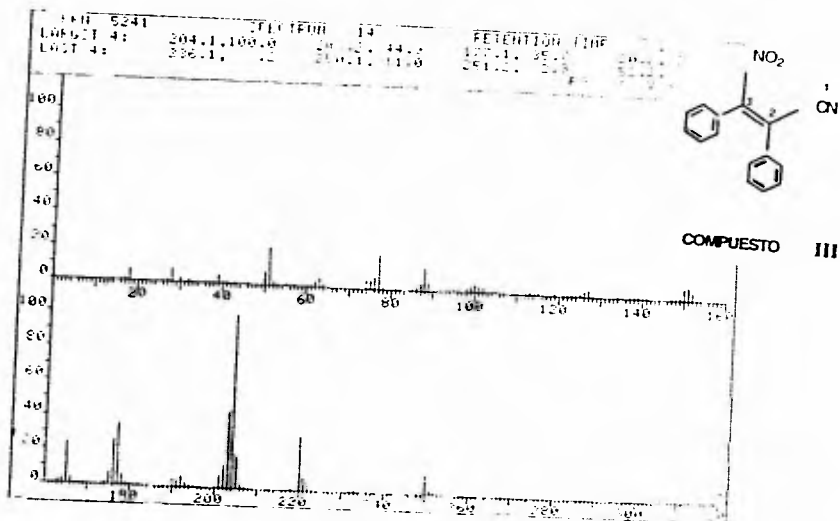
4000 3600 3260 2890 2500 2150 1650 1510 1410 1310 1210 1110 1010 910

cm⁻¹



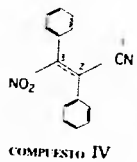
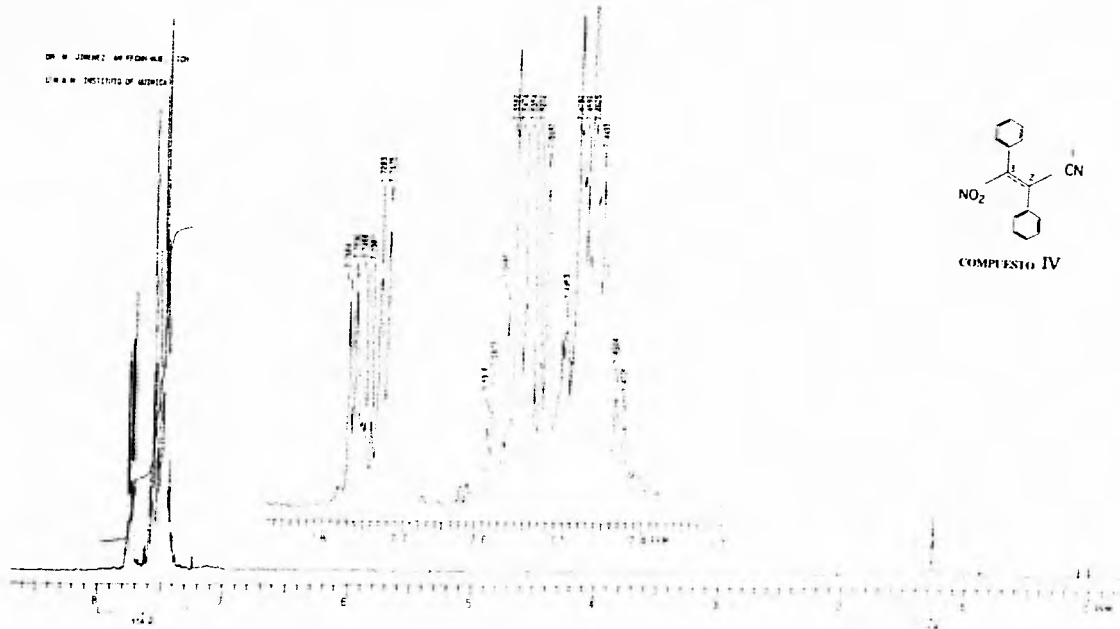
COMPUESTO III

”
FALLA DE ORIGEN

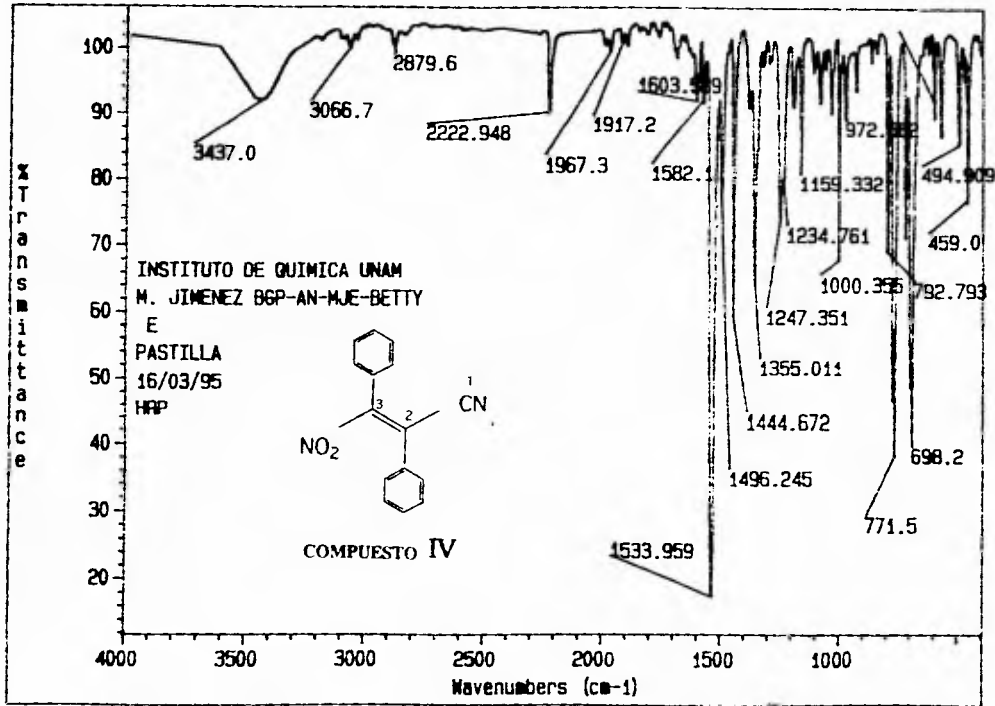


DR. J. J. JONES, JR. UNIVERSITY OF MICHIGAN
CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT

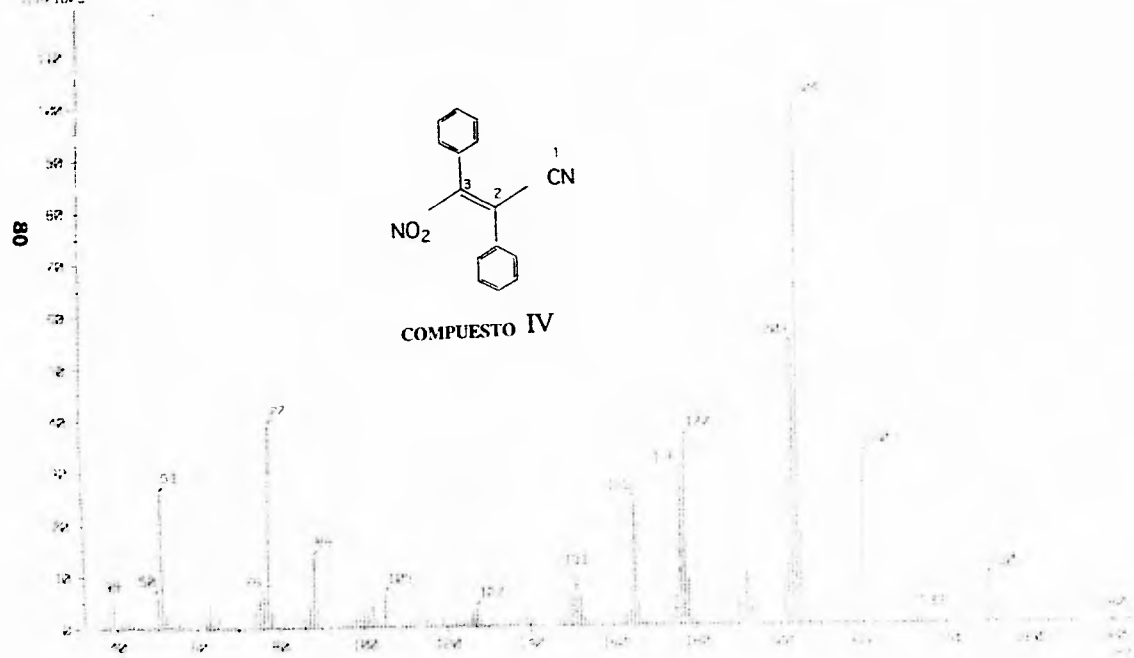
78



79
ESTÁ TRABAJO NO DEBE
SER USADO SIN LA AUTORIZACIÓN

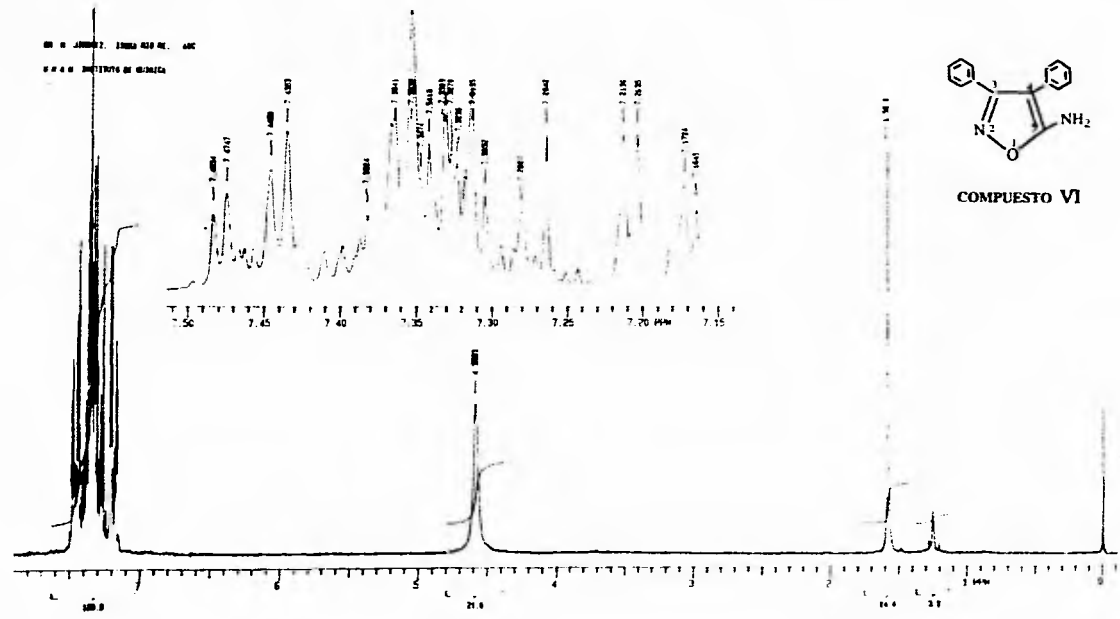


1 Mass Spectrum 1
Date : 17-Mar-95 10:58
Data : BR
Sample: BGP-AN-BettyE
Note : Dr-Manuel-J-RODRIGUES
Inlet : Direct Ion Mode : E1+
Spectrum type : Regular (MSE) (near)
SL : 2.72 min Scan# : (14,17)
BF : m/z 204.0000 Int. : 1029.56 Temp : 55.1 deg.C
Output m/z range : 33.0000 to 286.4600 Cut level : 0.000 %
171865



FALLA DE ORIGEN

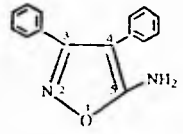
81



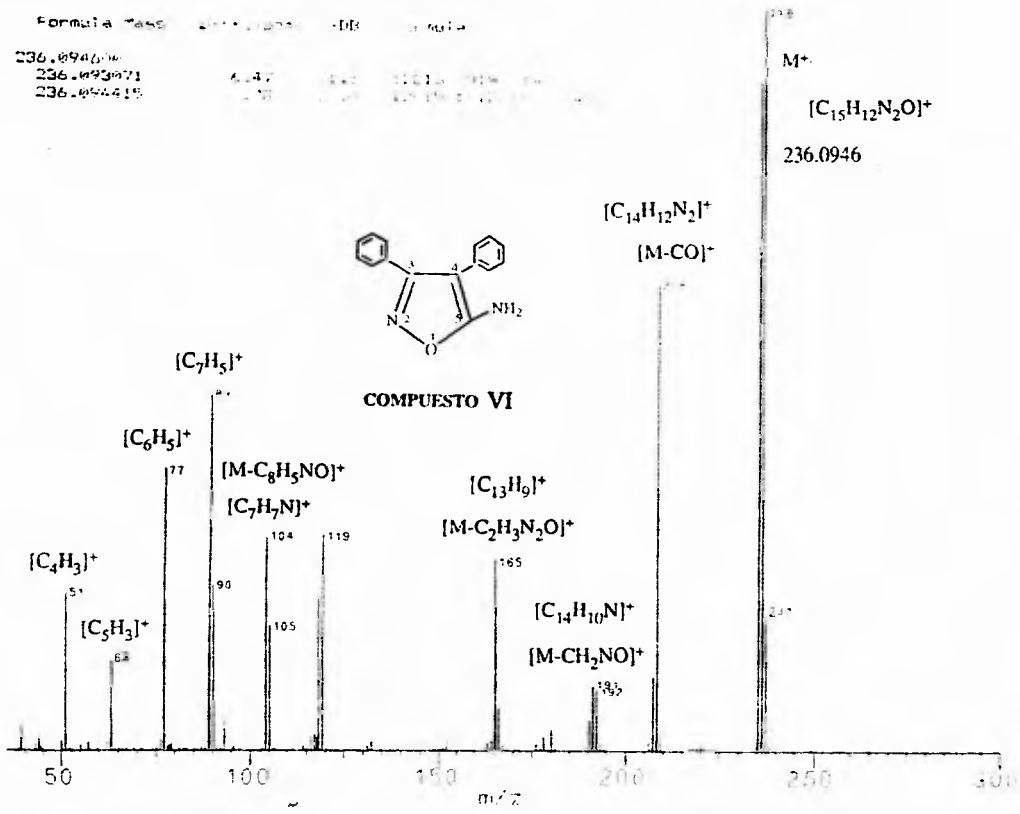
EI MS OF SAMPLE #2 (C15H12N2O2)

Formula	Mass	DB	Formula
	236.0946		
	236.093971		
	236.094415		

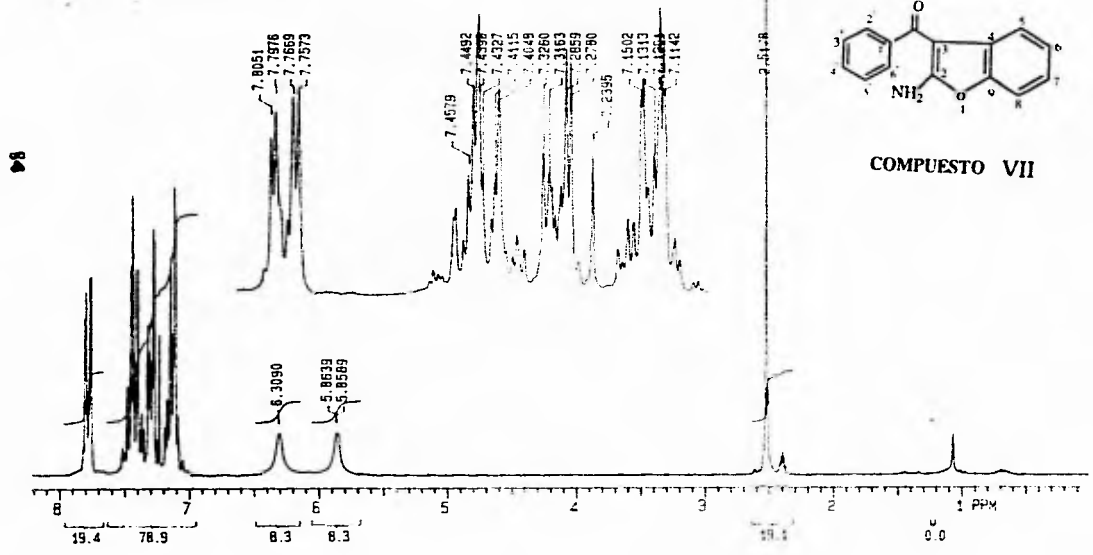
82



COMPUESTO VI

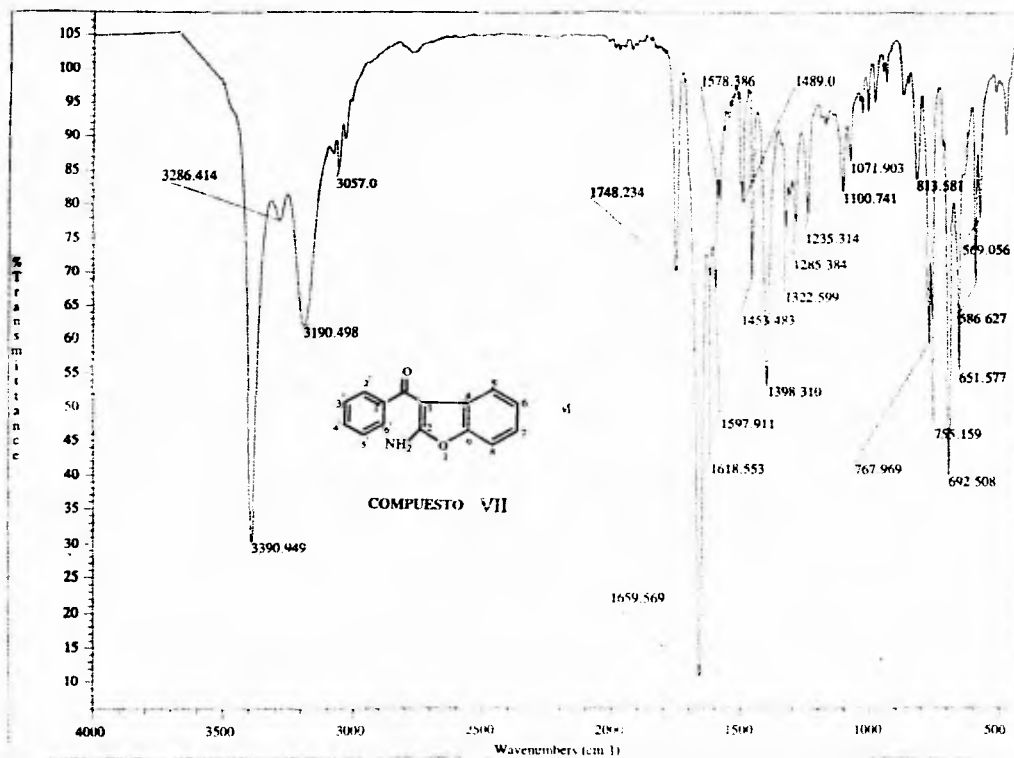


M. JIMENEZ A. NMR 200150 HR

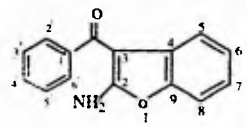
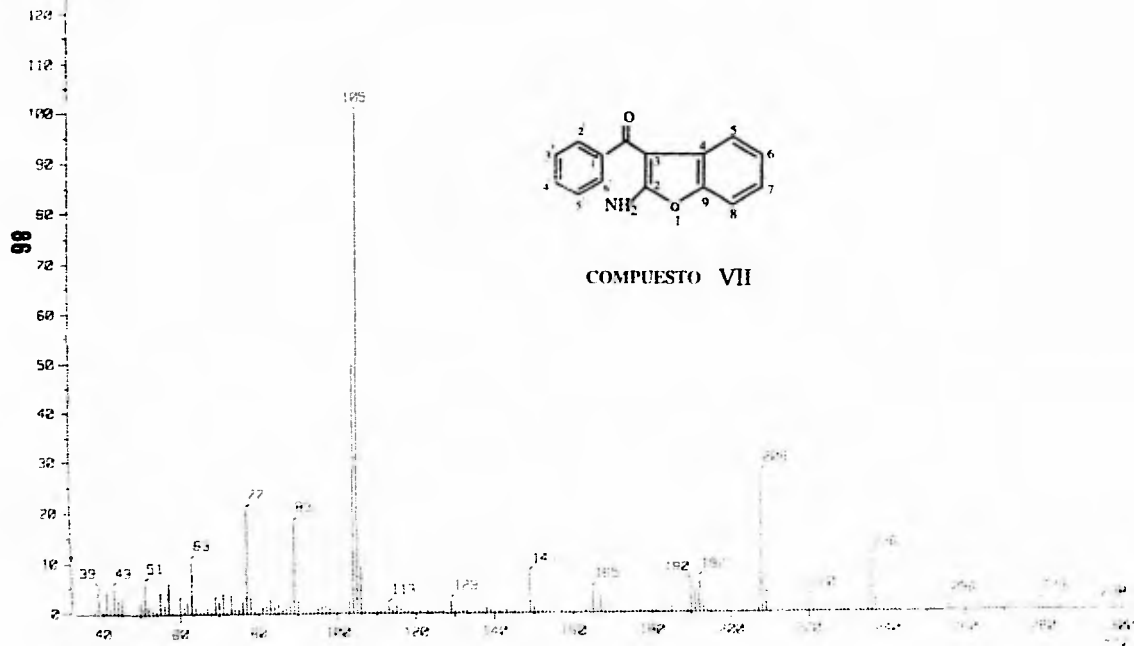


COMPUESTO VII

85



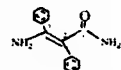
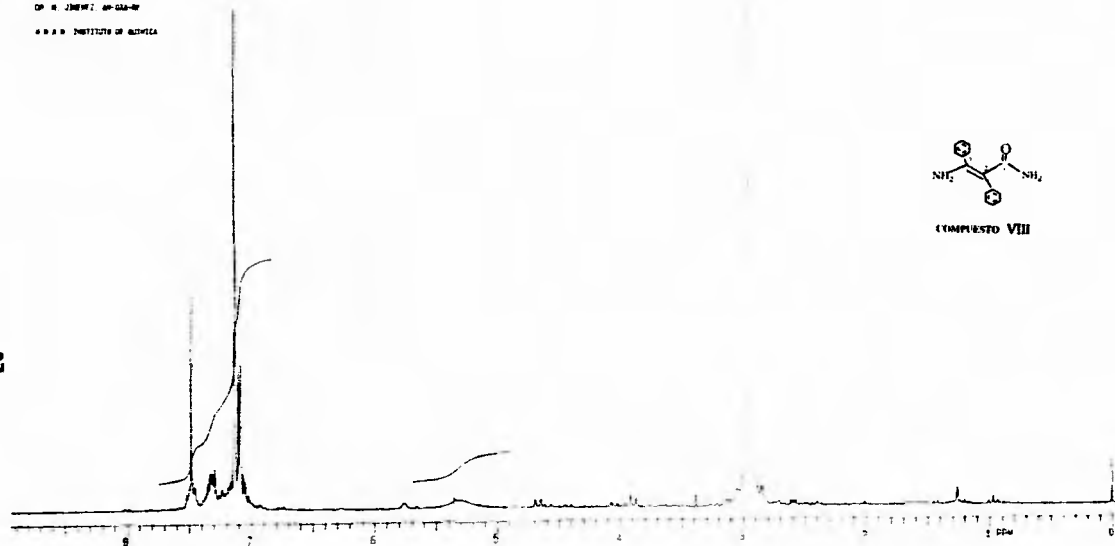
Mass Spectrum 1
 Date : 19-Apr-95 06:27
 Data : 150
 Sample: AN-MULBIODISCO
 Note : Dr-Manuel-J-RXS05
 Inlet : Direct Ion Mode : E1+
 Spectrum Type : Regular (MF-Linear)
 RT : 0.85 min Scan# : (17,19) Temp : 40.7 deg.C
 BP : m/z 105.0000 Int. : 1000.00
 Output m/z range : 33.0000 to 301.5900 Cut Level : 0.00 %
 :0004170



COMPUESTO VII

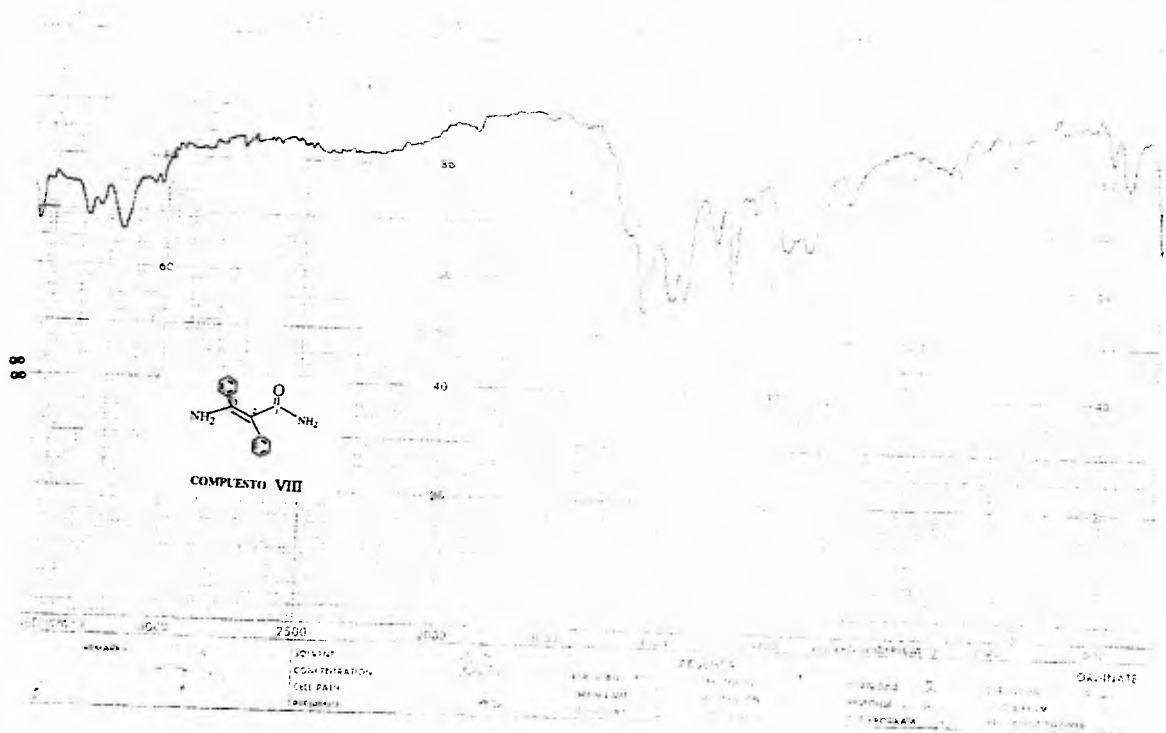
DR. H. JIMENEZ, UN-CA-87
C. R. R. INSTITUTE OF CHEMISTRY

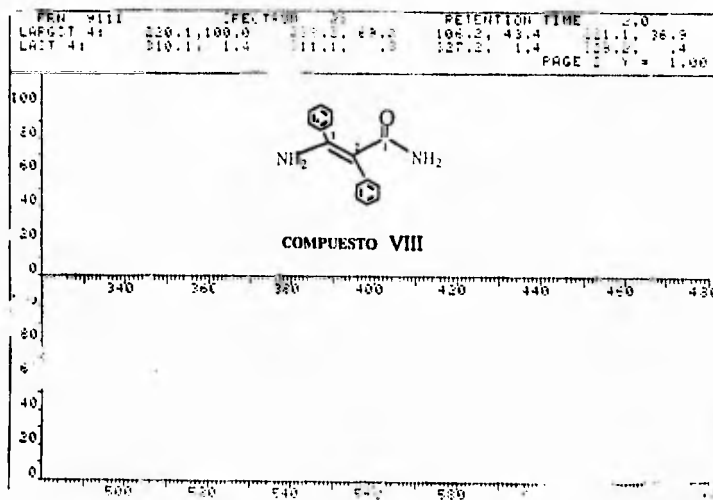
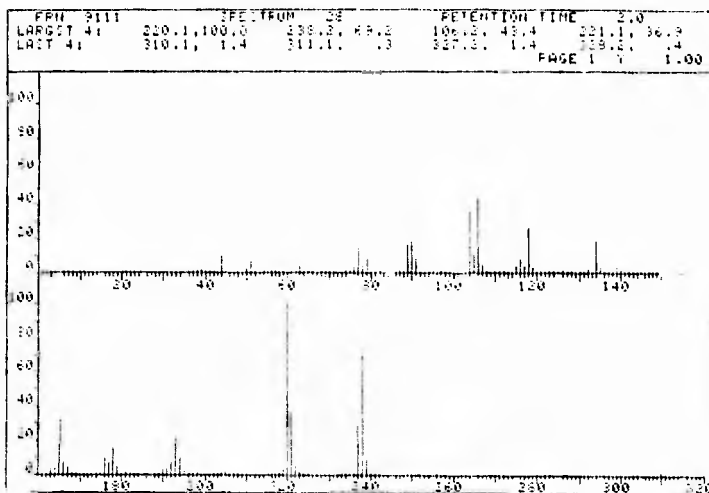
87



COMUESTO VIII

FALLA DE OMIEN







IMPRESOS MAYA

Edición No. 114 y 11
Ced. Coo. 100
Tel. 2017 09 91