



00550

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Síntesis de profármacos de Adenosina para incrementar su tiempo de vida
media biológico.**

INFORME DE ACTIVIDADES
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

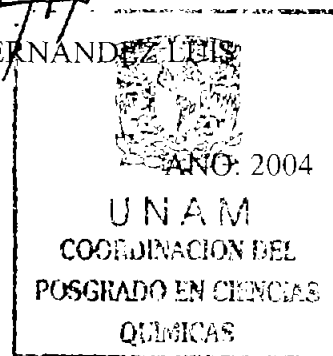
Q.F.B. ISRAEL VELÁZQUEZ MARTÍNEZ.



Ciencias
Químicas

TUTOR: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LEIS

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Francisco Hernández Leis".





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

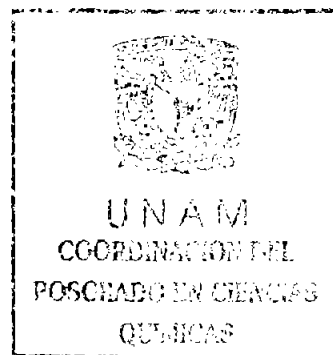
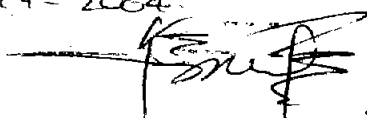
ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES	1
1.1 Cirrosis hepática	2
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. HIPÓTESIS	3
4. OBJETIVOS	3
5. METODOLOGÍA	4
5.1 Preparación de sales de adenosina	4
5.2 Ruta sintética para la obtención del profármaco	5
5.3 Pruebas de actividad biológica	8
6. RESULTADOS	8
6.1 Resultados de la parte química	8
6.2 Resultados de la parte biológica	16
7. CONSIDERACIONES	17
8. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	17
8.1 Instrumentación y materiales	18
8.2 Técnicas para la preparación de los intermediarios y productos finales	19
8.2.1 Preparación de sales de adenosina	19
8.2.2 Grupos Protectores	20
8.2.2.1 Cloruro de tritilo	20
8.2.2.2 Dicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo	21
8.2.3 Agentes acoplantes	22
8.2.3.1 <i>N,N'</i> -carbonildiimidazol	22
8.2.4 Complejo de cobre-ácido aspártico	23
8.2.5 Complejo de borano-ácido aspártico	24

BIBLIOGRAFÍA

Director General de Investigación Científica y Tecnológica
Instituto de Química Orgánica y Síntesis Orgánica
UNAM - Facultad de Química - Ciudad de México
D.F.B. Israel
velazquez martinez
14-Oct-2004



La presente investigación se realizó en el Laboratorio 122, del Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Agradecemos a:

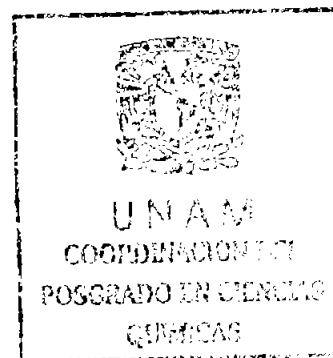
La Universidad Autónoma de Tamaulipas por la beca otorgada dentro del proyecto PIFI clave P/PIFI 2001-29-FO-01, a través del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP).

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, con No. de registro 173212.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) por su colaboración en la realización de los espectros.

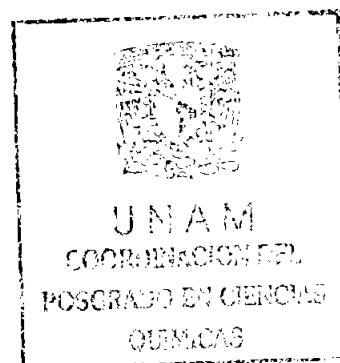
A la Dra. Victoria Chagoya y cols. del Instituto de Fisiología Celular por la colaboración en la realización de las pruebas biológicas.

“ Las ideas expresadas en el mismo representan el punto de vista del autor y no necesariamente los de la institución patrocinadora “



ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS.

ADA	Adenosina Desaminasa
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
c	cuarteto
CCF	Cromatografía en capa fina
CDI	<i>N,N'</i> -carbonildiimidazol
d	doblete
dd	doble de dobles
δ	desplazamiento químico (ppm)
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DEPT	Distortionless enhancement by polarisation transfer.
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDCI	Clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida
FAB ⁺	Fast atom bombardment
IMP	Monofosfato de inosina
¹ H- ¹ H-COSY	Correlated Spectroscopy 2D, H-H
HÉTCOR	Heteronuclear shift correlation 2D, C-H
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation 2D, C-H
IE	Impacto electrónico
ID	introducción directa
<i>J</i>	Constante de acoplamiento (Hz)
m	multiplete
meq	miliequivalentes
mmol	milimoles
m/z	relación masa carga
M ^{•+}	ión molecular radical
v	estiramiento
v _s	estiramiento simétrico
v _{as}	estiramiento asimétrico
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy.
pf	punto de fusión
ppm	partes por millón
R _f	Factor de retardo en CCF
s	singulete
sa	singulete amplio
SAH	S-adenosilhomocisteina
t	triplete
THF	tetrahidrofurano
XO	Xantina Oxidasa



INTRODUCCIÓN.

A pesar del gran avance científico y tecnológico en el área de la salud, la cirrosis hepática es una de las causas más comunes de mortalidad en muchos países, afecta a más del 5% de la población mundial, especialmente a adultos en la etapa reproductiva. En México fue la cuarta causa de muerte en el 2002. Su incidencia se ha incrementado notablemente debido a la detección tardía de hepatitis crónica, especialmente del tipo C.

Actualmente no se ha desarrollado un medicamento que sea capaz de revertir la cirrosis hepática, por lo que la estrategia terapéutica debe enfocarse en desarrollar fármacos que incrementen la protección del hígado, para evitar el desarrollo de fibrosis hepática, causa inicial de la cirrosis.

En la última década se ha demostrado que la administración de adenosina en ratas en estado cirrótico, inducido con tetracloruro de carbono, posee un efecto hepatoprotector debido a la disminución del estrés oxidante causado por el disolvente. Comportamiento que sugiere que la administración de este compuesto podría ser un recurso terapéutico en la cirrosis hepática.

A pesar de que la adenosina es un compuesto prometedor, su desventaja es que presenta un tiempo de vida media biológico muy corto, lo que implicaría administrarla cada treinta minutos durante varios meses.

Para resolver este tipo de problemas, la Química Farmacéutica utiliza la estrategia de preparación de profármacos. Este tipo de compuestos presenta en su estructura al principio activo de interés más una porción estructural (modificador) que le confiere propiedades diferentes a las del principio activo que le dio origen. En este trabajo se utilizaron como modificadores, aminoácidos naturales. Por tal efecto, primero se exploró la actividad de diversas sales de adenosina, preparadas con aminoácidos naturales, en ratas a las que se les indujo cirrosis con tetracloruro de carbono. Los resultados indicaron que el prolinato y aspartato de adenosina fueron los que presentaron los mejores resultados. Por lo que la síntesis del profármaco se ensayó utilizando a la prolina y el ácido aspártico. Para ello se exploró la reactividad de la molécula, frente a diversos grupos protectores y agentes acoplantes. Con este trabajo se pretende contribuir a la investigación sobre las reacciones con grupos protectores que presenta la adenosina, y la reactividad de la misma en el acoplamiento con aminoácidos.

Se presenta como informe de actividades debido a que quedó inconclusa la síntesis del profármaco; sólo se logró realizar la protección del grupo amino de la posición 6 de la adenosina, y un acoplamiento con el *N-tert*-butoxicarbonil aspartato de 4-bencilo. Ambas reacciones se obtuvieron con rendimientos muy bajos, restando la desprotección de la molécula acoplada para obtener el profármaco.

1. ANTECEDENTES.

La adenosina es un nucleósido endógeno que está presente en todas las células del organismo y desempeña un papel importante en la producción y utilización de los sistemas energéticos. En el organismo existe un sistema eficaz para su captación y reciclamiento, principalmente en los eritrocitos y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La adenosina es captada de forma inmediata y metabolizada principalmente en monofosfato de adenosina (AMP). (Figura 1)^{5, 28, 29} *In vitro*, la vida media de la adenosina se ha estimado en menos de 10 segundos. *In vivo* la vida media es aproximadamente de 1 segundo.

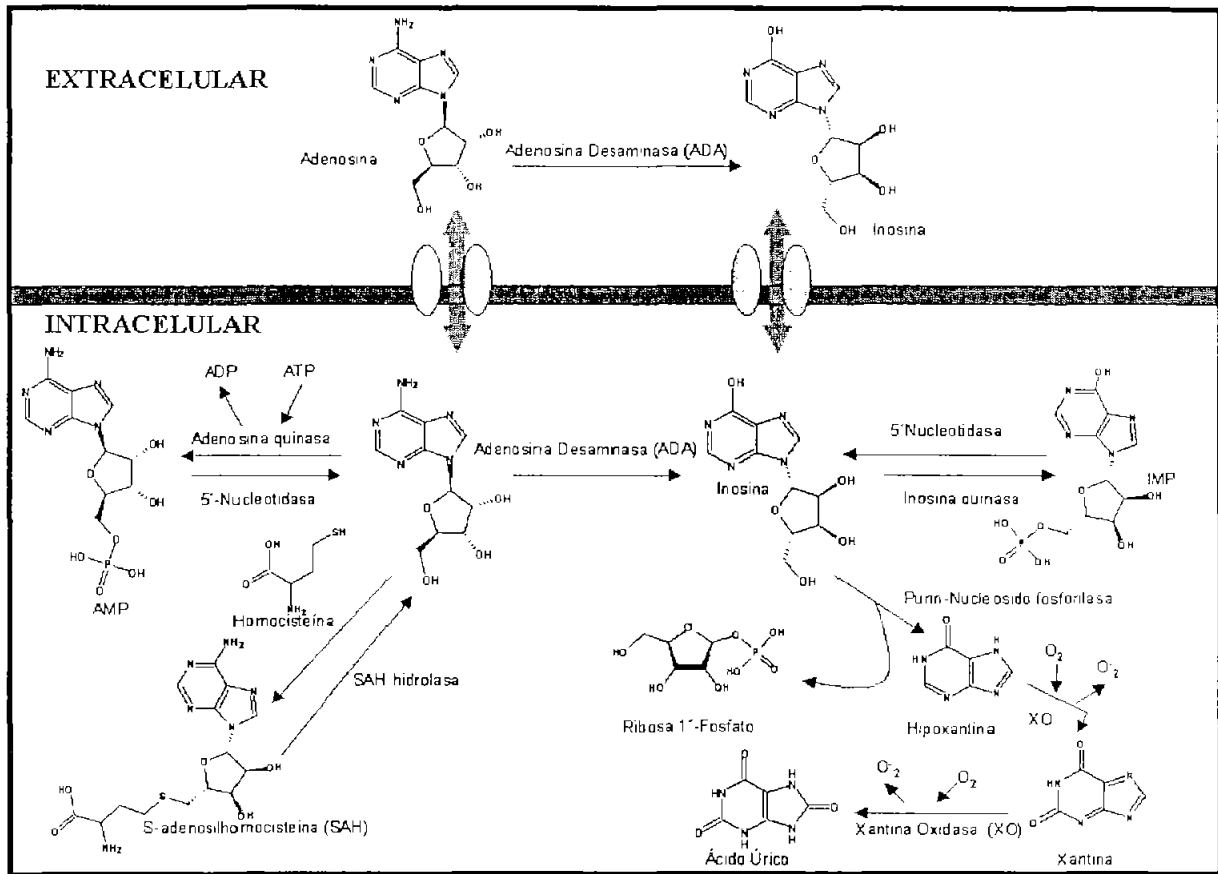


Figura 1. Metabolismo de la adenosina.

Tras el ingreso de la adenosina a las células, sufre una reacción de fosforilación catalizada por la enzima citosólica adenosina quinasa. Por otro lado, la desaminación, lleva a una gran acumulación de inosina, y se convierte en el principal camino de biotransformación de la adenosina cuando sus niveles intracelulares son elevados. La mayor actividad de la adenosina desaminasa es citosólica.⁶

Recientemente se ha descrito la participación de la adenosina en la regulación de diferentes aspectos de la vida celular. Estudios actuales, demuestran que este nucleósido de purina participa en los siguientes procesos biológicos:

- 1) Como agente hepatoprotector, demostrado en ratas con cirrosis hepática inducida con tetracloruro de carbono.¹⁴
- 2) Como neuromodulador en el sistema nervioso central.⁸
- 3) Como inductor de apoptosis en varios tipos de células epiteliales de cáncer de colón, gástrico, neuroblastoma, pecho y ovario.⁸
- 4) Como vasodilatador coronario en el sistema cardiovascular.¹⁸
- 5) Como agente inductor de ureagénesis en hepatocitos aislados.¹⁹
- 6) Como vasoconstrictor renal, disminuyendo la velocidad de filtración glomerular.⁹
- 7) Como anticonvulsivo en trastornos epilépticos.¹³
- 8) Como posible antioxidante en enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson).^{15, 16}

Las presentaciones farmacéuticas de adenosina que existen en el mercado, conocidas como Adenosina Biol. ®, Krenosin ® y Tricor ® se utilizan como antiarrítmicos.

Como se mencionó con anterioridad, estudios recientes han demostrado que la adenosina al ser administrada en ratas en estado cirrótico, inducido con tetracloruro de carbono, presenta múltiples efectos hepatoprotectores: bloquea la esplenomegalia, reduce un 60% el depósito de colágeno, mejora la disfunción hepática, incrementa la actividad de la colagenasa, preserva la función de la mitocondria y estimula la proliferación celular.¹⁴ Estas características hacen a la adenosina un excelente candidato para el tratamiento de este padecimiento.

1.1 CIRROSIS HEPÁTICA.

La cirrosis hepática es una condición ocasionada por ciertas enfermedades crónicas del hígado que provocan la cicatrización de tejido y daño permanente. El tejido cicatrizado que se forma en la cirrosis hepática daña la estructura del hígado, bloqueando el flujo de sangre a través del órgano. La pérdida del tejido hepático normal disminuye la capacidad que tiene el hígado de procesar nutrientes, hormonas, fármacos y toxinas. También disminuye la capacidad del hígado para producir proteínas y otras sustancias.²

Según el Instituto Nacional de la Diabetes y de las Enfermedades Digestivas y del Riñón (NIDDK), la cirrosis es la séptima causa principal de muerte en Estados Unidos.³ En México en el 2002 fue la cuarta causa de muerte en la población en general, siendo la octava causa de muerte en mujeres y la tercera en los hombres.³⁰ A nivel mundial afecta al 5% de la población.¹⁴

El tratamiento para la cirrosis está dirigido a detener o retrasar su progreso, minimizar el daño a las células hepáticas y reducir las complicaciones. En la cirrosis alcohólica, la persona debe dejar de consumir alcohol. En el caso de personas que tienen hepatitis viral, el médico podría administrarle esteroides o medicamentos antivirales para reducir el daño a la célula hepática.

En casos críticos, podría ser necesario realizar un trasplante de hígado.² Actualmente en la industria farmacéutica no existen medicamentos que sean capaces de revertir la cirrosis hepática, por lo que la estrategia terapéutica debe enfocarse en desarrollar fármacos que incrementen una degradación del colágeno, para revertir la avanzada fibrosis hepática. Por los efectos hepatoprotectores de la adenosina, la hacen un excelente candidato para ser utilizado en el tratamiento de la cirrosis; la gran desventaja de este compuesto, es su corta vida media al ser administrado en el organismo.

Una estrategia utilizada en el área de la Química Farmacéutica para resolver este tipo de problemas, es la preparación de profármacos; compuestos que son farmacológicamente inertes, pero son convertidos en la forma activa del fármaco por la participación de una enzima (**Figura 2**).

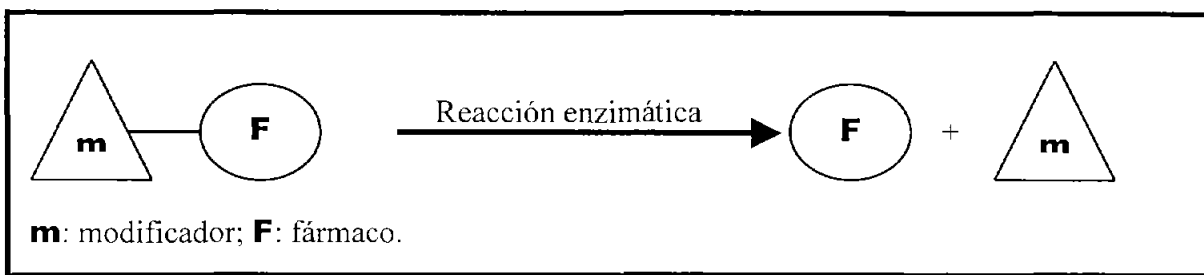


Figura 2. Concepto de profármaco.

La porción modificadora es la que confiere al fármaco nuevas características que ayudan a resolver los inconvenientes que presenta dicho principio activo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Dado que el corto tiempo de vida media biológico de la adenosina limita su utilidad terapéutica, ¿existe la posibilidad de realizar una modificación estructural que aminore esta desventaja sin que se pierdan sus propiedades bioactivas?

3. HIPÓTESIS.

En virtud de que la reacción principal de biotransformación de la adenosina es la fosforilación del hidroxilo de la posición 5', se deben sintetizar profármacos para incrementar su tiempo de vida media biológico, utilizando como modificadores aminoácidos naturales. La unión del aminoácido se hará mediante la formación de un enlace covalente.

4. OBJETIVO GENERAL.

Preparar un profármaco de la adenosina con un aminoácido natural.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

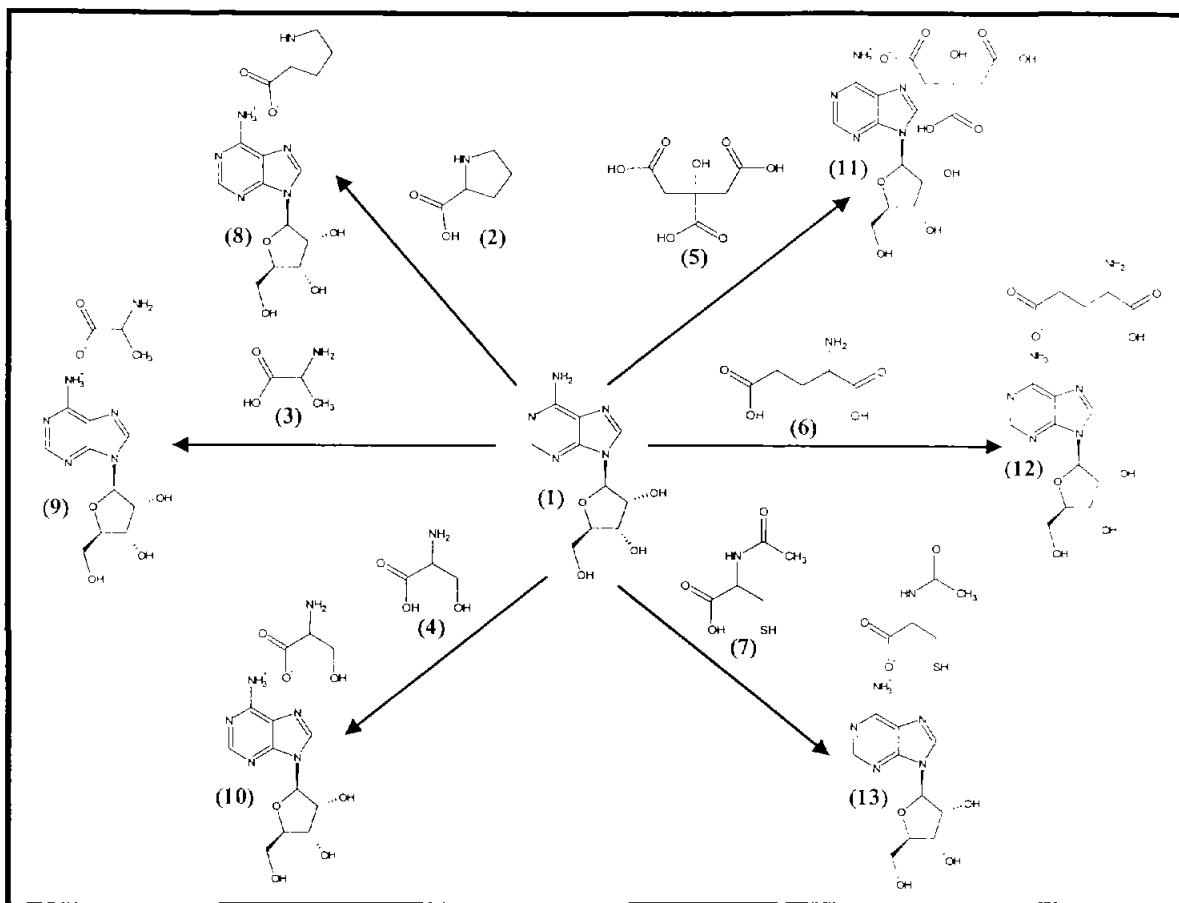
- ✓ Preparar las sales de adenosina y los siguientes aminoácidos naturales: alanina, serina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, y *N*-acetilcisteína; y el ácido cítrico.
- ✓ Realizar pruebas biológicas de estas sales en ratas a las que se les induce un estado cirrótico con tetracloruro de carbono.
- ✓ Sintetizar el profármaco de adenosina con el aminoácido que resulte mayor efecto hepatoprotector según las pruebas preliminares de las sales de aminoácidos.
- ✓ Aislar, purificar y determinar las constantes físicas de los compuestos finales y sus intermediarios (pf y R_f).
- ✓ Identificar y caracterizar los compuestos finales y sus intermediarios, mediante técnicas espectroscópicas (IR, RMN-¹H, RMN-¹³C) y espectrométricas (EM).
- ✓ Evaluar la actividad del nuevo profármaco en el mismo modelo biológico.
- ✓ Analizar y comparar los resultados del nuevo profármaco con estudios realizados anteriormente.

5. METODOLOGÍA.

Las actividades llevadas a cabo que se describen en esta sección, se dividen en dos partes; la primera comprende la secuencia de síntesis que nos llevó a la preparación de los compuestos intermediarios y las sales de adenosina, así como una breve descripción de la misma. En la segunda parte, se presenta una descripción de los ensayos de la actividad biológica a la que fueron sometidas las sales de adenosina sintetizadas. Las técnicas involucradas para la preparación de cada uno de los compuestos, así como la elucidación estructural realizada por métodos espectroscópicos y espectrométricos, se presenta en otra sección.

5.1 PREPARACIÓN DE SALES DE ADENOSINA.

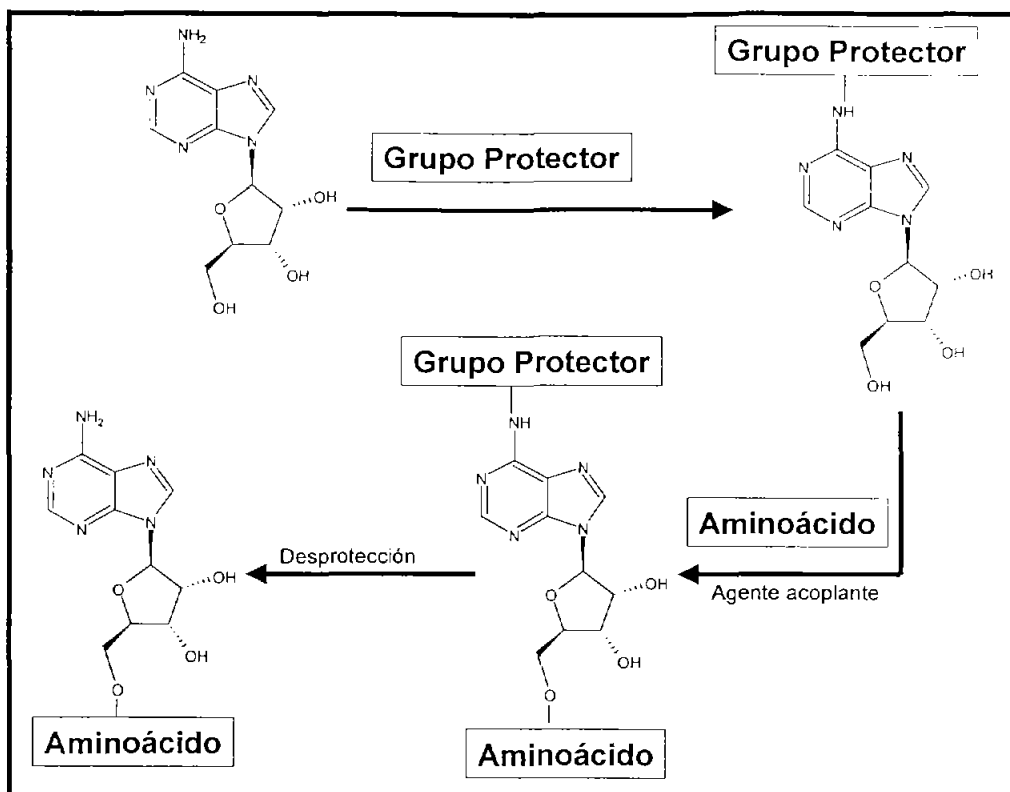
Para obtener las sales: prolinato de adenosina (8), alaninato de adenosina (9), serinato de adenosina (10), citrato de adenosina (11), glutamato de adenosina (12), *N*-acetilcisteinato de adenosina (13); se realizó una reacción ácido-base en medio acuoso entre la adenosina (1) y cada uno de los aminoácidos naturales: prolina (2), alanina (3), serina (4), ácido glutámico (6), *N*-acetilcisteína (7); y el ácido cítrico (5). Posteriormente se adicionó acetona, y se concentró cada una de las sales en un rotaevaporador a 20 mm de Hg de presión, para obtener un sólido blanco. Todas las sales se obtuvieron como una mezcla de ambas materias primas y la sal formada. (Esquema 1).



Esquema 1. Síntesis de Sales de Adenosina.

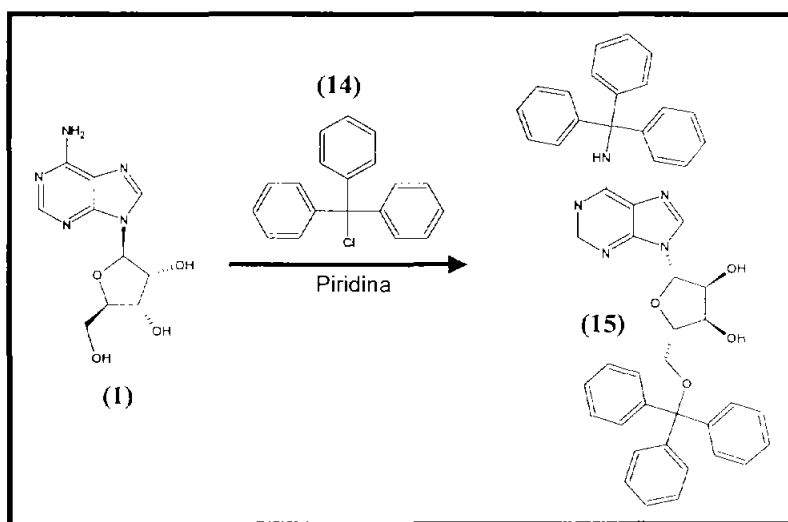
5.2 RUTA SINTÉTICA PARA LA OBTENCIÓN DEL PROFÁRMACO.

Con la finalidad de obtener el profármaco, era necesario primero proteger el grupo amino de la posición 6 de la adenosina, posteriormente realizar la reacción de acoplamiento en el hidroxilo de la posición 5' de la adenosina con el aminoácido natural; desproteger la molécula y finalmente obtener el profármaco. (Esquema 2)



Esquema 2. Síntesis del profármaco.

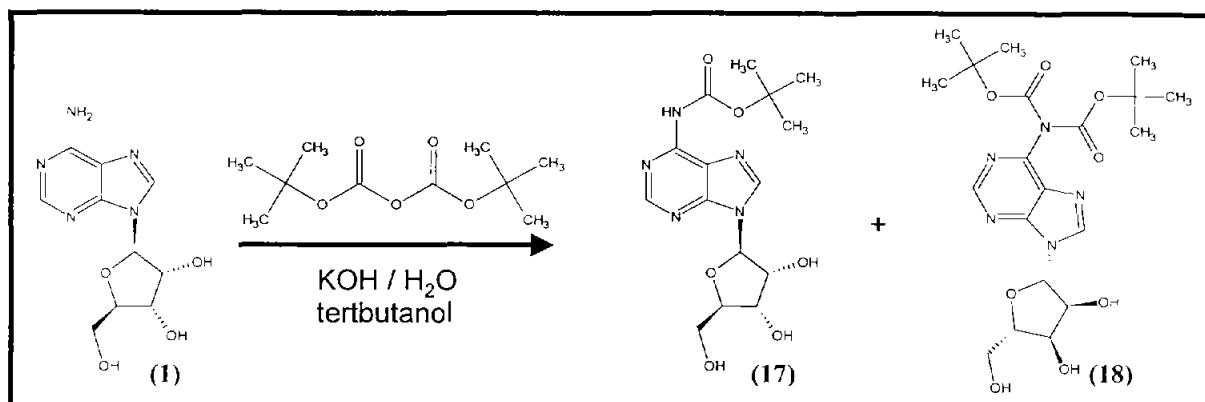
Para realizar la protección del grupo amino, se exploraron varios agentes, como el dicarbonato de di *tert*-butilo, cloroformiato de fenilo, cloroformiato de bencilo y el cloruro de tritilo. Se logró la protección utilizando el cloruro de tritilo, pero la desventaja fue que también se protegía el hidroxilo de la posición 5' de la adenosina, impidiendo así el posterior acoplamiento con el aminoácido natural, por lo que este grupo protector no era factible utilizarlo. (Esquema 3)



Esquema 3. Protección con Cloruro de tritilo.

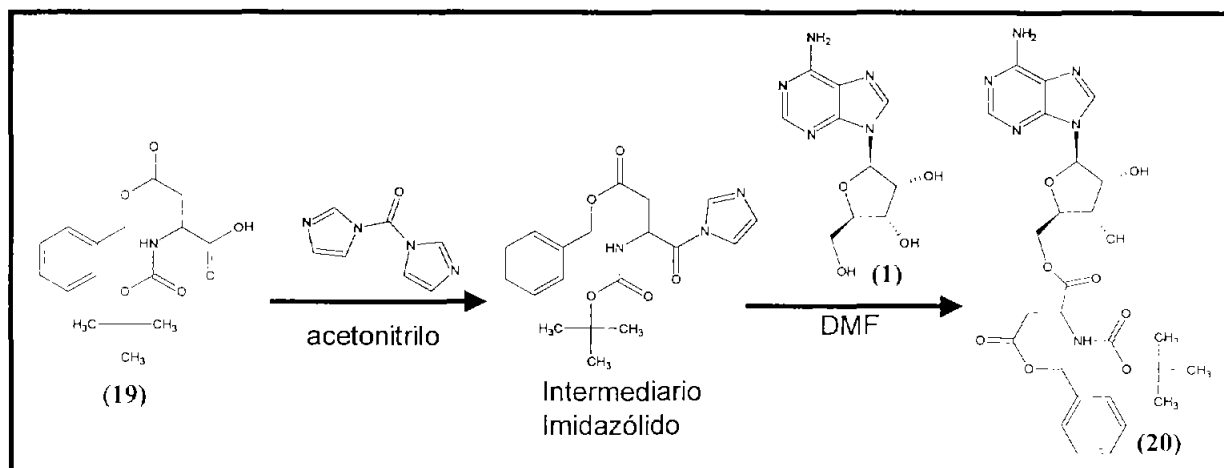
En una segunda alternativa se logró proteger el grupo amino de la posición 6 de la adenosina utilizando el dicarbonato de di-*tert*-butilo, pero se obtuvo la mezcla de adenosina mono y di protegida, que se separaron por cromatografía en placa preparativa, debido a que la separación por cromatografía en columna no funcionó. (**Esquema 4**)

La exploración con otros agentes como el clorofornato de fenilo y bencilo no funcionó, ya que en el medio de reacción descomponían a fenol y alcohol bencílico respectivamente.^{23, 24}



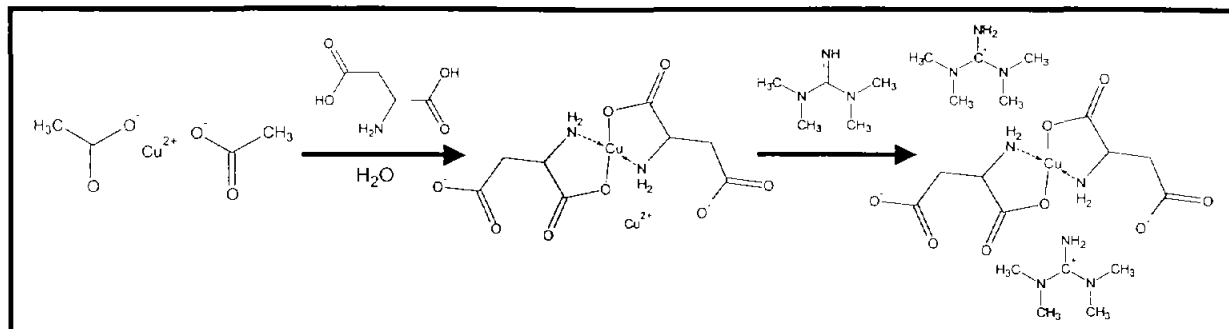
Esquema 4. Protección con dicarbonato de di-*tert*-butilo.

De forma conjunta se exploró la reacción de acoplamiento entre la adenosina sin protección y el *N*-*tert*-butoxicarbonil aspartato de 4 bencilo (**19**); utilizando: yoduro de 2-cloro *N*-metilpiridinio, *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI), dicitclohexilcarbodiimida (DCC), y clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) como agentes acoplantes. (**Esquema 5**) El mejor resultado se obtuvo vía la formación del intermediario imidazólido utilizando CDI en acetonitrilo. Se obtuvo una mezcla, que por espectrometría de masas (FAB⁺) indicaba el acoplamiento con una, dos y tres moléculas de aminoácido. Por lo que el rendimiento de la reacción fue muy bajo (menor 20%) y no se pudo continuar con la posterior reacción de hidrogenación para romper el éster bencílico, y realizar la hidrólisis ácida del grupo *tert*-BOC, para obtener finalmente el profármaco.



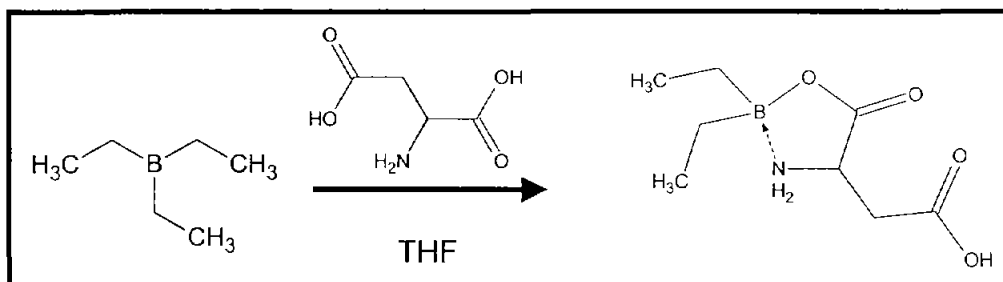
Esquema 5. Acoplamiento con *N,N'*-carbonildiimidazol.

Por lo que se planteó otra ruta alterna para obtener el profármaco, a través de la formación de complejos de cobre-ácido aspártico, y complejos de borano-ácido aspártico, con la finalidad de no utilizar aminoácidos protegidos; para posteriormente acoplarlo con la adenosina y finalmente realizar la ruptura del complejo y obtener el profármaco. (**Esquema 6 y 7**).



Esquema 6. Síntesis del complejo cobre-ácido aspártico.

Se logró la síntesis de ambos complejos de ácido aspártico, pero las reacciones de acoplamiento utilizando: *N,N'*-carbonildiimidazol, diciclohexilcarbodiimida, yoduro de 2-cloro *N*-metilpiridinio, y el clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida, no arrojaron resultado alguno.



Esquema 7. Síntesis del complejo de borano-ácido aspártico.

5.3 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

El ensayo biológico para la evaluación de la actividad hepatoprotectora se llevó a cabo en el Instituto de Fisiología Celular bajo la supervisión de la Dra. Victoria Chagoya.

6. RESULTADOS.

6.1 RESULTADOS DE LA PARTE QUÍMICA.

Los intermediarios sintetizados en este trabajo, así como sus rendimientos se muestran en la Tabla 1 y 2, donde también se resume la caracterización realizada para cada uno de éstos, mediante las constantes físicas más importantes, y elucidación estructural por medio de las técnicas espectroscópicas de IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y espectrometría de masas. En algunos

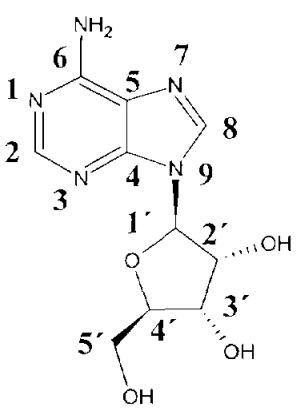
casos se recurrió a las técnicas en dos dimensiones, como: ^1H , ^1H -COSY, HETCOR, HMBC y NOESY.

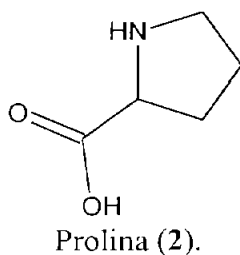
Tabla 1. Constantes físicas de los compuestos sintetizados.

COMPUESTO	RENDIMIENTO	pf (°C)	R _f (SISTEMA)
8	90%	237.1-238.6 ^c	0.0
9	90%	233-235 ^c	0.0
10	90%	221.6-223.8 ^c	0.0
11	90%	115-117 ^c	0.0
12	90%	222.3-223.5 ^c	0.0
13	90%	181.3-182.4 ^c	0.0
15	Menor 15% ^a	ND ^d	0.32 (II)
17	11% ^b	132.2-134.1	0.32 (II)
18	15% ^b	166.7-167.7	0.37 (II)
20	Menor 15%	ND ^d	0.58 y 0.46 (IV)
21	92%	132.9	0.46 (IX)

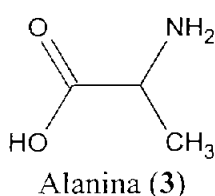
a: Se aisló de Cromatografía en columna; b: Se aisló de Cromatografía en placa preparativa; c: Se obtuvo como mezcla con ambas materias primas; d: Se obtuvo como aceite; ND: no se determinó.

Tabla 2. Elucidación estructural de las materias primas y compuestos sintetizados.

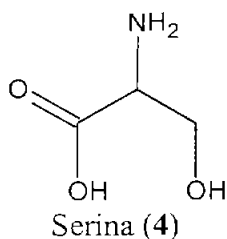
COMPUESTO	SEÑALES
 <p>Adenosina (1).</p>	<p>IR (KBr) cm⁻¹: 3332 (ν O-H y ν N-H), 2932(ν_{as} C-H de -CH₂-), 2841 (ν_s C-H de CH₂), 1604 (torsión N-H en el plano), 1473 y 1413 (ν C=N), 1209 (ν C-N de la amina), 1108 (ν C-O de alcohol secundario), 1070 (ν_s C-O-C), 1055 (ν C-O de alcohol primario), 904 (ν_{as} C-O-C), 767 (torsión N-H fuera del plano).</p> <p>RMN-¹H (TMS, DMSO-d₆) δ en ppm: 3.54 (m, 1H, H-5'), 3.67 (m, 1H, H-5'), 3.96 (dd, J= 6.59 y J= 3.59, 1H, H-4'), 4.14 (m, 1H, H-3'), 4.61 (dd, J= 11.38 y J= 6.29, 1H, H-2'), 5.18 (d, J= 4.49, 1H, int. con D₂O, OH-3'), 5.42 (dd, J= 7.04 y J= 4.19, 1H, int. con D₂O, OH-5'), 5.44 (d, J= 4.49, 1H, int. con D₂O, OH-2'), 5.87 (d, J= 6.29, 1H, H-1'), 7.35 (s, 2H, int. con D₂O, NH₂-6), 8.13 (s, 1H, H-8), 8.34 (s, 1H, H-2).</p> <p>RMN-¹³C (TMS, DMSO-d₆) δ en ppm: 61.6 (C-5'), 70.6 (C-3'), 73.45 (C-2'), 85.9 (C-4'), 87.9 (C-1'), 119.3 (C-5), 139.9 (C-8), 149.0 (C-4), 152.3 (C-2), 156.1 (C-6).</p>

COMPUESTO**SEÑALES**

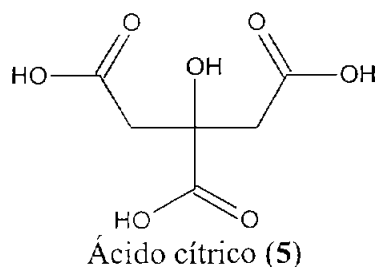
IR (KBr) cm^{-1} : 3415 (ν N-H), 2980 (ν_{as} C-H), 1620 (ν C=O y torsión N-H en el plano), 1038 (ν C-N), 777 (torsión N-H fuera del plano).



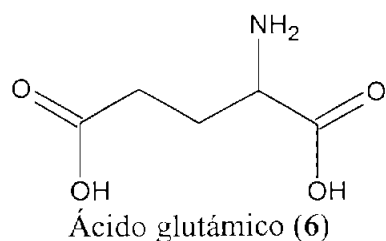
IR (KBr) cm^{-1} : 3437 (ν N-H), 3083 (ν O-H ácido), 2938 (ν_{as} C-H), 2813 (ν_{s} C-H), 1621 (ν C=O), 1599 (torsión N-H en el plano), 1455 (torsión asimétrica C-H), 1362 (torsión simétrica C-H), 1114 (ν C-N), 850 (torsión N-H fuera del plano).



IR (KBr) cm^{-1} : 3451 (ν N-H y ν O-H alcohol), 3093 (ν O-H ácido), 2960 (ν_{as} C-H), 2870 (ν_{s} C-H), 1598 (ν C=O y torsión N-H en el plano), 1469 (torsión asimétrica C-H), 1384 (torsión simétrica C-H), 1126 (ν C-N), 1086 (ν C-O alcohol primario), 953 (torsión N-H en el plano).



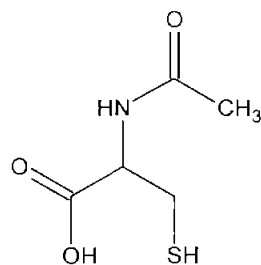
IR (KBr) cm^{-1} : 3495 (ν O-H), 3290 (ν O-H ácido), 1709 (ν C=O), 1428 (torsión O-H), 1243 y 1217 (torsión C=O...HO-), 1150 (ν C-O alcohol terciario), 641 (torsión O-H).



IR (KBr) cm^{-1} : 3439 (ν N-H), 2924 (ν O-H ácido), 2854 (ν C-H de CH₂), 1641 (torsión N-H en el plano), 1516 (ν C=O), 1126 (ν C-N), 807 (torsión N-H fuera del plano).

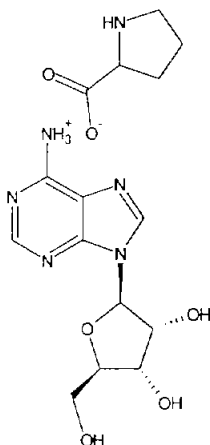
COMPUESTO

SEÑALES



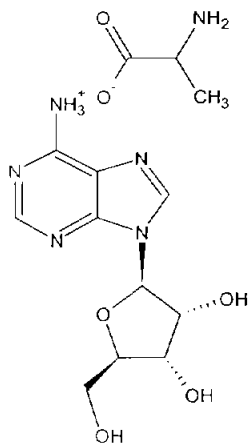
N-acetil-cisteína (7)

IR (KBr) cm^{-1} : 3374 (ν N-H), 2900 (ν_s C-H de CH_3), 2547 (ν S-H), 1717 (ν C=O), 1585 y 1534 (ν N-H amida), 568 (ν C-S).



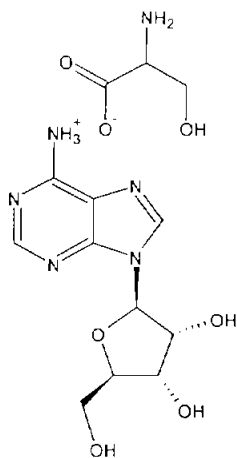
Prolinato de Adenosina (8)

IR (KBr) cm^{-1} : 3422 y 3362 (ν N-H), 3362 (ν O-H), 1656 (ν C=O), 1577 (torsión N-H en el plano), 1478 y 1422 (ν C-N), 1205 (ν C-N), 1102 (ν_{as} C-O-C y ν C-OH de alcohol secundario), 1056 (ν C-OH de alcohol primario), 722 (torsión N-H fuera del plano).



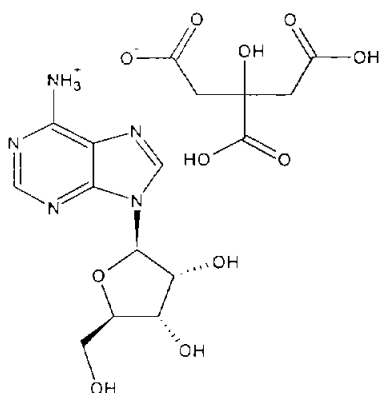
Alaninato de Adenosina (9)

IR (KBr) cm^{-1} : 3417 (ν N-H y ν O-H), 2935 (ν_{as} C-H de CH_2), 1621 (ν C=O y δ N-H en el plano), 1479 y 1413 (ν C=N), 1455 (ν_{as} C-H de CH_3), 1362 (torsión simétrica C-H de CH_2), 1206 (ν C-N), 1113 (ν C-OH de alcohol secundario), 1070 (ν_s C-O-C), 1050 (ν C-OH de alcohol primario), 917 (ν_{as} C-O-C), 850 (torsión N-H fuera del plano), 724 (torsión de balanceo C-H de CH_2), 645 (torsión O-H).



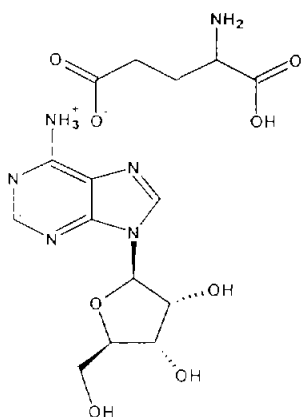
Serinato de adenosina (10)

IR (KBr) cm^{-1} : 3339 (ν N-H y ν O-H), 1641 (torsión N-H en el plano), 1603 (ν C=O), 1470 (torsión de tijera C-H de CH_2), 1470 y 1414 (ν C=N), 1208 (ν C-N), 1104 (ν C-OH de alcohol secundario), 1070 (ν_s C-O-C), 1055 (ν C-OH de alcohol primario), 917 (ν_{as} C-O-C), 722 (torsión de balanceo C-H de CH_2), 640 (torsión O-H).



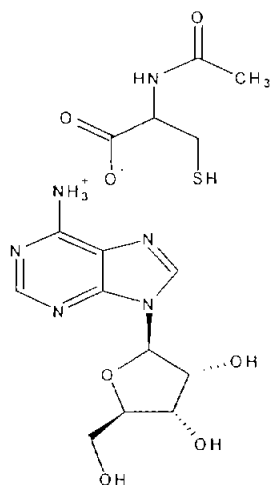
Citrato de Adenosina (11)

IR (KBr) cm^{-1} : 3413 (ν N-H y ν O-H), 2932 (ν_{as} C-H de CH_2), 1693 (ν C=O), 1608 (torsión N-H en el plano), 1417 (ν C=N), 1212 (ν C-N), 1100 (ν C-OH de alcohol secundario), 1084 (ν_s C-O-C), 1056 (ν C-OH de alcohol primario), 895 (torsión N-H fuera del plano), 721 (torsión de balanceo C-H de CH_2), 637 (torsión O-H).



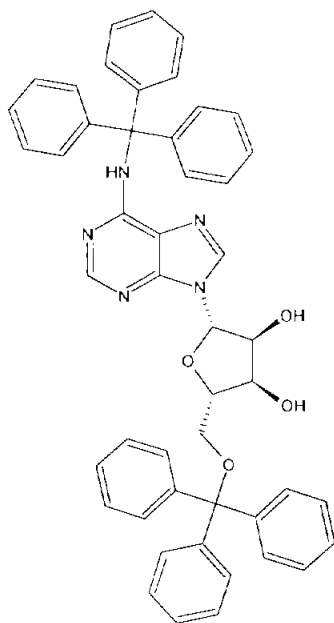
Glutamato de Adenosina (12)

IR (KBr) cm^{-1} : 3422 (ν N-H y ν O-H), 2923 (ν_{as} C-H de CH_2), 2854 (ν_s C-H de CH_2), 1649 (ν C=O), 1605 (torsión N-H en el plano), 1481 y 1421 (ν C=N), 1127 (ν C-N), 1101 (ν C-OH de alcohol secundario), 1070 (ν_s C-O-C), 1055 (ν C-OH de alcohol primario), 867 (torsión N-H fuera del plano), 640 (torsión O-H).



IR (KBr) cm^{-1} : 3374 y 3334 (ν N-H amina), 3334 (ν O-H y ν N-H amida), 2919 (ν_{as} C-H de CH_2), 2842 (ν_{s} C-H de CH_2), 2547 (ν S-H), 1665 (ν C=O), 1604 (torsión N-H en el plano), 1474 (torsión de tijera C-H de CH_2), 1474 y 1413 (ν C=N), 1372 (torsión simétrica C-H de CH_3), 1209 (ν C-N), 1108 (ν C-OH de alcohol secundario), 1070 (ν , C-O-C), 1055 (ν C-OH de alcohol primario), 903 (torsión N-H fuera del plano), 722 (torsión de balanceo C-H de CH_2), 567 (ν C-S).

N-acetilcisteinato de adenosina
(13).



5'-*O*,6-*N*-bis(trifenilmetil)
adenosina. (15)

EM (IE/ID) m/z : M^+ 751 (20%); 243 (100%).
EM (FAB⁺/ID) m/z : 752 (3%, $M+1$)

COMPUESTO

SEÑALES

IR (KBr) cm^{-1} : 3347 (ν O-H y ν N-H de carbamato), 2932 (ν_{as} C-H de CH_2), 1740 (ν C=O de carbamato), 1481 y 1432 (ν C=N), 1373 y 1252 (ν C-H de CH_3 *tert*-butilo), 1135 (ν_{as} C-O-C), 1092 (ν C-OH alcohol secundario), 646 (torsión O-H).

EM (FAB⁺/ID) m/z : 368 (44%, M+1).

RMN-¹H (TMS, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) δ en ppm: 1.50 (s, 9H, CH_3), 3.77 (dd, $J=12.58$ y $J=3.29$, 1H, H-5'), 3.88 (dd, $J=12.58$ y $J=3.29$, 1H, H-5'), 4.29 (m, 1H, H-4'), 4.90 (dd, $J=7.49$ y $J=5.39$, 1H, H-2'), 5.21 (dd, $J=5.39$ y $J=1.49$, 1H, H-3'), 5.94 (d, $J=7.49$, 1H, H-1'), 8.18 (s, 1H, H-2), 8.28 (s, 1H, H-8).

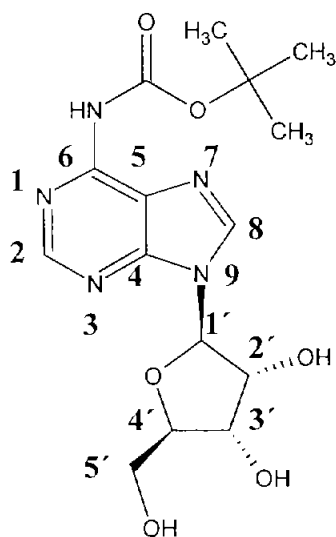
RMN-¹³C (TMS, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) δ en ppm: 27.97 (CH_3), 63.50 (C-5'), 73.99 (C-2'), 77.62 (C-3'), 83.57 (C de *tert*-butilo), 86.11 (C-4'), 90.85 (C-1'), 141.72 (C-8), 149.98 (C-6), 153.55 (C-2), 154.33 (C de C=O), 157.67 (C-4).

DEPT δ en ppm: 27.97 (CH_3), 63.50 (CH_2), 73.99 (CH), 77.62 (CH), 86.11 (CH), 90.85 (CH), 141.72 (CH), 153.55 (CH).

¹H-¹H-COSY: H-1'(H-2'), H-2'(H-1' y H-3'), H-3'(H-2' y H-4'), H-4'(H-3' y H-5'), H-5'(H-4').

NOESY: CH_3 (H-1', H-3', H-4'), H-8 (H-1', H-2'), H-1'(H-8, H-3', H-4'), H-2'(H-8), H-3'(H-1', H-5'), H-4'(H-1'), H-5'(H-3').

HETCOR δ en ppm: H-1.50 (C-27.97), H-3.83 (C-63.50), H-4.29 (C-86.11), H-4.90 (C-73.99), H-5.21 (C-77.62), H-5.94 (C-90.85), H-8.18 (C-153.55), H-8.28 (C-141.72).

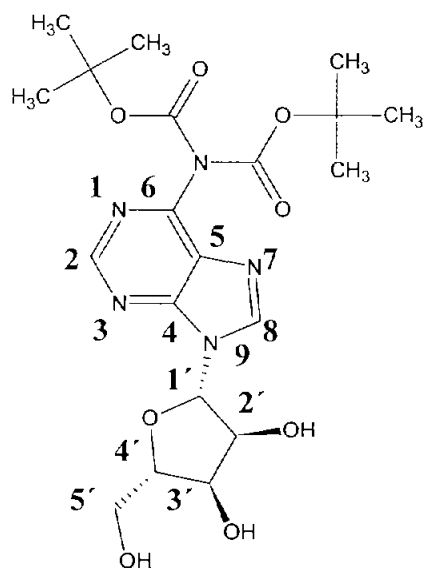


6-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl) adenosina (17)

IR (KBr) cm^{-1} : 3368 (ν O-H), 2935 (ν_{as} C-H de CH_2), 1743 (ν C=O carbamato), 1480 y 1435 (ν C=N), 1375 y 1249 (ν C-H de CH_3 *tert*-butilo), 1130 (ν_{as} C-O-C). 1094 (ν C-OH alcohol secundario), 646 (torsión O-H).

EM (FAB⁺/ID) m/z : 468 (80%, M+1).

RMN-¹H (TMS, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) δ en ppm: 1.36 (s, 9H, CH_3), 1.50 (s, 9H, CH_3), 3.79 (dd, $J=12.58$ y $J=2.39$, 1H, H-5'), 3.91 (dd, $J=12.58$ y $J=2.39$, 1H, H-5'), 4.36 (m, 1H, H-4'), 5.45 (dd, $J=5.09$ y $J=1.79$, 1H, H-3'), 5.80 (dd, $J=7.04$ y $J=5.24$, 1H, H-2'), 6.19 (d, $J=7.19$, 1H, H-1'), 8.20 (s, 1H, H-2), 8.33 (s, 1H, H-8).



6-*N,N*-(di-*tert*-butoxycarbonyl) adenosina (**18**)

RMN-¹³C (TMS, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) δ en ppm: 27.76 (CH_3), 28.02 (CH_3), 63.07 (C-5'), 75.53 (C-3'), 76.81 (C-2'), 83.95 (C de *tert*-butilo), 84.41 (C de *tert*-butilo), 85.90 (C-4'), 88.0 (C-1'), 120.95 (C-5), 141.6 (C-8), 150.06 (C-6), 153.23 (C de C=O), 153.79 (C-2), 153.92 (C de C=O), 157.67 (C-4).

DEPT δ en ppm: 27.76 (CH_3), 28.02 (CH_3), 63.07 (CH_2), 75.53 (CH), 85.90 (CH), 88.0 (CH), 141.6 (CH), 153.79 (CH).

¹H-¹H-COSY: H-1'(H-2'), H-2'(H-1' y H-3'), H-3'(H-2' y H-4'), H-4'(H-3' y H-5'), H-5'(H-4').

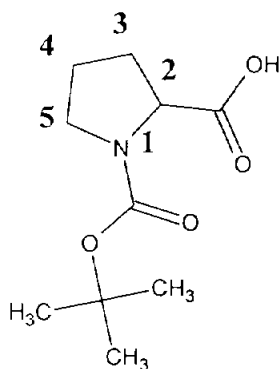
NOESY: CH_3 (H-8, H-2, H-1', H-2'), H-3' (H-1', H-2'), H-8 (H-1', H-2'), H-1' (H-8, H-3', H-4'), H-2' (H-8), H-3' (H-1', H-5'), H-4' (H-1'), H-5' (H-3').

HETCOR δ en ppm: H-1.36 (C-27.76), H-1.50 (C-28.02), H-3.85 (C-63.07), H-4.36 (C-85.90), H-5.45 (C-75.53), H-5.80 (C-76.81), H-6.19 (C-88.03), H-8.20 (C-153.79), H-8.33 (C-141.69).

HMBC: CH_3 (C de *tert*-butilo), H-5'(C-4' y C-3'), H-2 (C-4 y C-6), H-8 (C-5).

COMPUESTO

SEÑALES

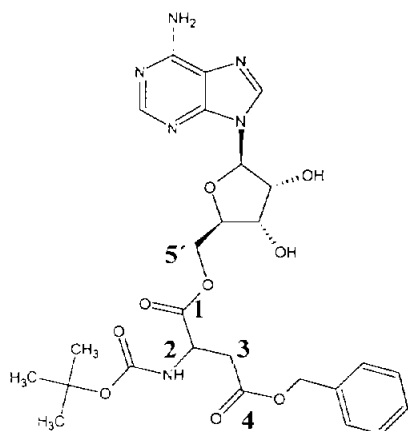


N-*tert*-butoxycarbonyl prolina (**21**)

IR (KBr) cm^{-1} : 2976 (ν C-H de CH_3), 2934 (ν_{as} C-H de CH_2), 2896 (ν_{s} C-H de CH_2 y CH_3), 1739 (C=O carbamato y ácido), 1479 (torsión de tijera de CH_2), 1430 (torsión asimétrica C-H de CH_3), 1367 y 1240 (ν C-H de CH_3 *tert*-butilo), 1217 (ν_{as} N-CO-O), 899 (ν_{s} N-CO-O), 728 (torsión de balanceo CH_2)

EM (IE/ID) m/z : M^+ 215 (1%); 170 (10%); 114 (100%)

RMN- ^1H (TMS, CDCl_3) δ ppm: 1.42-1.48 (d, $J= 17.41$, 9H, CH_3 *tert*-butilo), 1.83-2.34 (m, 4H, H-3 y H-4), 3.32-3.60 (m, 2H, H-5), 4.22-4.37 (m, 1H, H-2), 11.39 (sa, 1H, int. con D_2O , OH ácido)



4-bencil-1-(adenosin-5'-*O*-il) *N*-
(*tert*-butoxycarbonyl) aspartato
(**20**)

EM (FAB $^+$ /ID) m/z :

573 (25%, $M+1$: adenosina + 1 aminoácido);
788 (28%, $M+1$: adenosina + 2 aminoácidos);
1183 (4%, $M+1$: adenosina + 3 aminoácidos).

Por falta de espacio no se anexaron los espectros, pero se encuentran a disposición para consulta.

6.2 RESULTADOS DE LA PARTE BIOLÓGICA.

Los resultados de la actividad hepatoprotectora de las sales de adenosina en ratas con cirrosis hepática, inducida con tetracloruro de carbono, se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Actividad de las sales de adenosina.

COMPUESTO	% DE SOBREVIVENCIA (16 DÍAS)
Aspartato de adenosina	100%
Prolinato de adenosina (8)	100%
Alaninato de adenosina (9)	5%
Serinato de adenosina (10)	5%
Citrato de adenosina (11)	5%
Glutamato de adenosina (12)	5%
<i>N</i> -acetilcisteinato de adenosina (13)	5%

7. CONSIDERACIONES.

De acuerdo a la metodología desarrollada en este trabajo, concluimos que la reactividad de la adenosina bajo las condiciones manejadas fue relativamente baja. La protección del grupo amino de la posición 6 se logro con el dicarbonato de di-*tert*-butilo, obteniéndose dos productos: adenosina mono y di-prottegida. La exploración con los otros agentes como el cloroformiato de fenilo y bencilo no dio buenos resultados, ya que bajo las condiciones de reacción manejadas, descomponían al fenol y alcohol bencilico respectivamente. La utilización de cloruro de tritilo no era conveniente ya que se protegía el grupo amino de la posición 6 y el hidroxilo de la posición 5', impidiendo posteriormente llevar a cabo el acoplamiento en esa posición con el aminoácido natural.

Se sugiere optimizar las condiciones de reacción, utilizando el dicarbonato de di-*tert*-butilo en medio acuoso con sosa o potasa, para poder obtener en mayor concentración uno de los dos productos, y aumentar el rendimiento de la reacción.

El acoplamiento con uno de los aminoácidos se logro utilizando el *N,N'*-carbonildiimidazol, aunque el rendimiento fue muy bajo, debido a que se obtuvo una mezcla del acoplamiento de la adenosina con 1, 2 y 3 moléculas del aminoácido; por lo que consideramos que una vez optimizada la primer reacción de protección del grupo amino, el acoplamiento con el aminoácido utilizando CDI, podría obtenerse con rendimientos más altos.

Lo esencial para que las reacciones pudieran proceder, es que la adenosina debe de encontrarse disuelta en medio acuoso, o en DMF.

8. PROCEDMIENTOS EXPERIMENTALES.

Este trabajo se divide en dos etapas. La primera parte involucra la síntesis orgánica de los intermediarios del profármaco de adenosina, realizada en el Conjunto E Laboratorio 122 de la Facultad de Química; la segunda, la parte biológica, describe las pruebas de actividad de las sales de adenosina en ratas con estado cirrótico, realizado bajo la supervisión de la Dra. Victoria Chagoya en el Instituto de Fisiología Celular.

8.1 INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES.

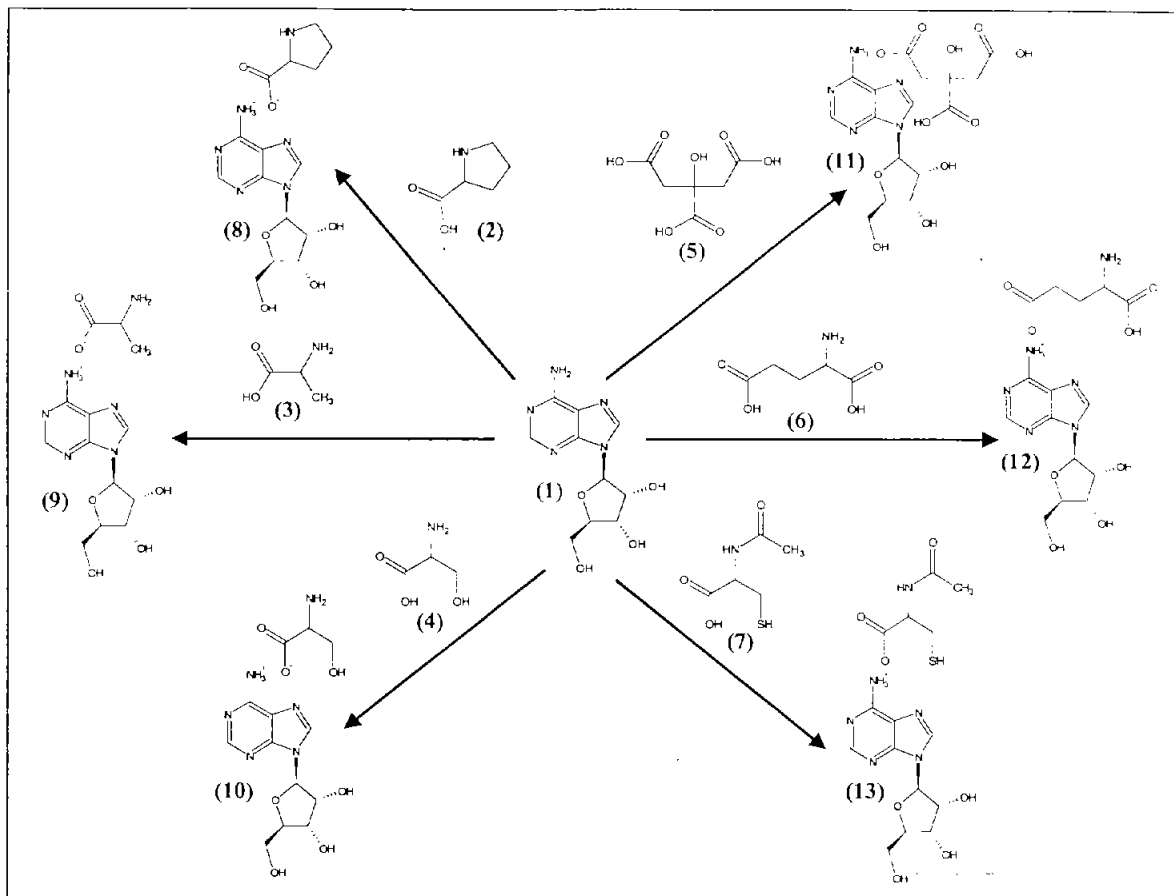
- ❖ La concentración de los disolventes se realizó a presión reducida utilizando un rotaevaporador marca Büchi Modelo RE 114, adaptado con un condensador marca VWR Scientific Modelo 1107 y una bomba de vacío marca GAST modelo 0523-V4F.
- ❖ Los puntos de fusión (pf) Se determinaron en un aparato Marca Büchi Modelo B-540 mediante capilar, y no están corregidos.
- ❖ Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrómetro Perkin Elmer de Transformadas de Fourier modelo FT-IR-1600 en pastilla KBr. Las señales se reportan en cm^{-1} .
- ❖ Los espectros de Resonancia Magnética Protónica (RMN^{-1}H , 300 MHz) y los de Resonancia Magnética de Carbono 13 (RMN^{-13}C , 75 MHz) se realizaron en un espectrómetro Varian, Modelo VRX-300 MHz. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, dimetilsulfóxido hexadeuterado ($\text{DMSO}-d_6$), metanol deuterado ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) y deuterocloroformo (CDCl_3) como disolventes. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm).
- ❖ Los espectros de masas, por impacto electrónico (IE 70 eV), Cromatografía de gases, y bombardeo rápido de átomos (FAB^+), se determinaron en un espectrómetro de masas marca Joel, Modelos-102 A. La simbología utilizada es m/z relación masa carga y M^+ para el ión molecular. La aplicación de la muestra fue por introducción directa o mediante cromatografía de gases (EM-CG), con un cromatógrafo marca Hewlett Packard, Modelo 5890 Serie II.
- ❖ El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizó por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF254 (Merck) y una lámpara de luz ultravioleta para visualizar. En algunos casos se utilizó vapores de yodo y ninhidrina para visualizar el avance de las reacciones que involucraban aminoácidos. Los sistemas de elusión utilizados se resumen en la **Tabla 4**.
- ❖ La separación de algunos intermediarios de síntesis se llevó a cabo por cromatografía en columna, utilizando gel de sílice 60 (Merck), con un tamaño de partícula de 0.2 – 0.5 mm.

Tabla 4. Sistemas de elusión para CCF.

SISTEMA	COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN
I	Cloroformo – metanol	95:5
II	Cloroformo – metanol	90:10
III	Cloroformo – metanol	98:2
IV	Cloroformo – metanol	80:20
V	Cloroformo – metanol	70:30
VI	Cloroformo – metanol	60:40
VII	Hexano – cloroformo – acetato de etilo	50:35:15
VIII	Hexano – acetato de etilo	70:30
IX	Cloroformo - acetona	50:50
X	Cloroformo - acetona	95:5

8.2 TÉCNICAS PARA LA PREPARACIÓN DE INTERMEDIARIOS Y PRODUCTOS FINALES.

8.2.1 PREPARACIÓN DE SALES DE ADENOSINA.

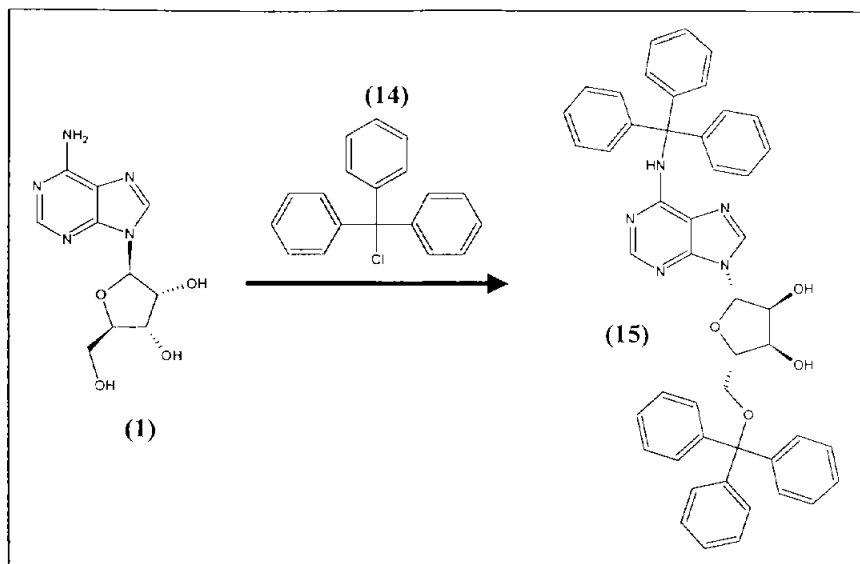


Procedimiento General.

En un matraz bola de 100 ml de una boca (14/20) se disolvieron 1 meq (0.3741 mmol) de Adenosina Aldrich en 7 ml de agua caliente. Una vez disuelta la adenosina, se permite que la mezcla alcance la temperatura ambiente. A esta mezcla se le agregó 1 meq (0.374 mmol) del aminoácido (o ácido cítrico en su caso) disueltos en 1 ml de agua. Se agitó magnéticamente durante 2 horas, a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 7 ml de acetona y la mezcla se dejó en reposo a temperatura de refrigeración durante el resto de la noche. La mezcla de reacción se concentró en rotaevaporador a 20 mm de Hg de presión. La CCF con ninhidrina reveló que todas las sales se obtuvieron como una mezcla de ambas materias primas y la sal formada

8.2.2 GRUPOS PROTECTORES.

8.2.2.1 CLORURO DE TRITILO.



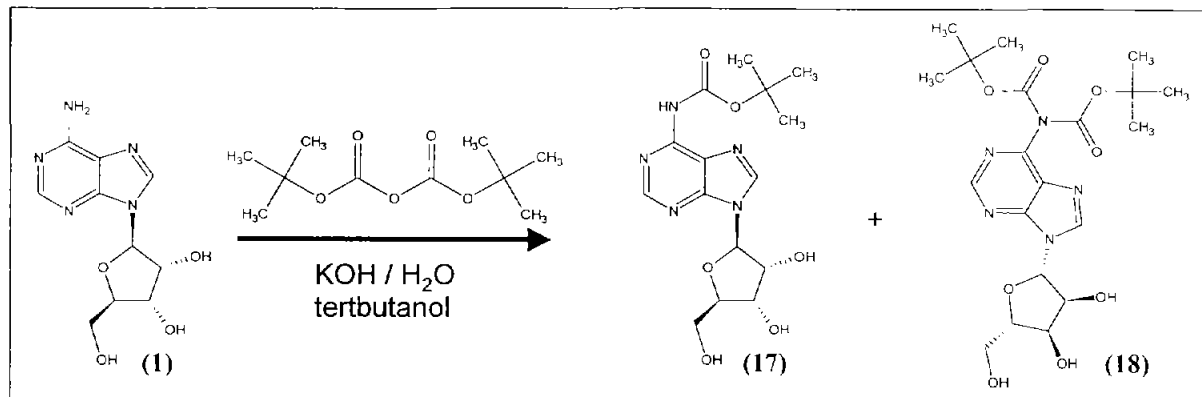
Síntesis de 5'-O,6-N-bis(trifenilmetil) adenosina (15).²⁶

En un matraz bola de 50 ml adaptado con canastilla de calentamiento, reóstato, columna vigreux y trampa de humedad se suspenden 0.05 gr (1 meq, 0.1870 mmol) de Adenosina (1) en 10 ml de Piridina. A esta mezcla se le agregó 0.156 gr (3 meq, 0.5612 mmol) de Cloruro de Tritilo (14) y se agitó magnéticamente durante 48 horas a una temperatura entre 50-60 °C. La mezcla de reacción se monitoreo por CCF en sistema II donde se observó la formación de un producto con un R_f de 0.36 (referencia 0.76). La reacción se mantuvo en calentamiento y agitación magnética durante 5 días más. Después de este tiempo se comprobó por CCF que no se consume por completo la materia prima.

La mezcla de reacción se vertió a un vaso de precipitado de 100 ml y en agitación magnética se añadieron 70 ml de una solución de bicarbonato de sodio fría (2.5 gr de Bicarbonato de sodio en 300 ml de agua) formándose un precipitado blanco, que posteriormente se separó por filtración al vacío. El precipitado se lavó con 3 x 80 ml de agua fría y se dejó secando al vacío por 24 horas. Se obtuvieron 0.1170 g (83%) que en el sistema II por CCF reveló que era una mezcla del producto esperado y Cloruro de Tritilo (mayoritario). La mezcla se separó mediante una cromatografía en columna, utilizando hexano y acetato de etilo. El rendimiento final del producto obtenido fue aproximadamente del 15%.

Esta reacción también se realizó utilizando DMF como disolvente²⁶; cloruro de metileno y acetonitrilo como disolventes, trietilamina y 4-dimetilaminopiridina como catalizador²⁷, pero no arrojaron resultado alguno.

8.2.2.2 DICARBONATO DE DI-*TERT*-BUTILO.



Síntesis de 6-*N*-(*tert*-butoxicarbonyl) adenosina (17) y 6-*N,N*-(*di-tert*-butoxicarbonyl) adenosina (18).²²

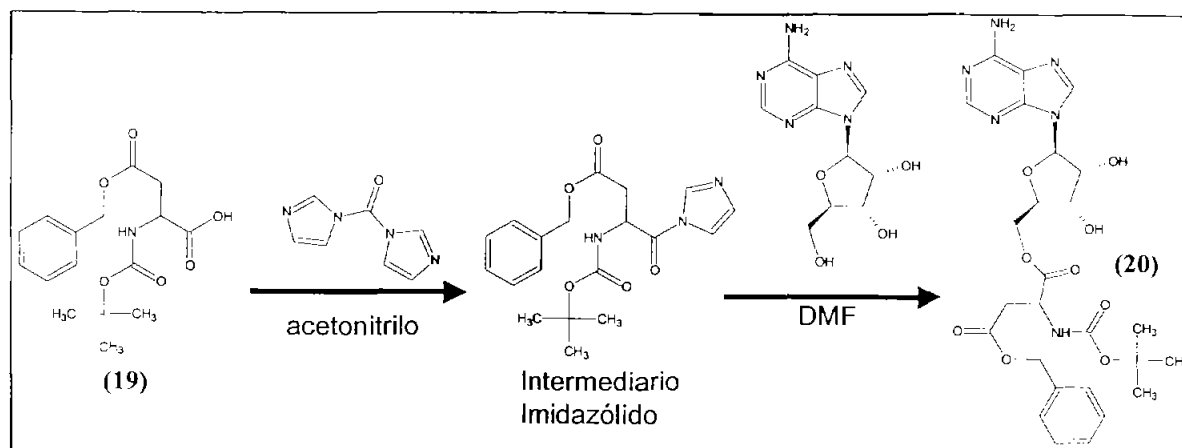
En un matraz bola de 250 ml se disolvieron 0.5 gr (1 meq, 1.8709 mmol) de Adenosina Aldrich (1) en 20 ml de agua. A esta mezcla se le agregó 0.41 gr (4.0 meq, 7.4839 mmol) de hidróxido de potasio. Enseguida se añadieron 40 ml de *tert*-butanol y 1.77 ml (4.0 meq, 7.4839 mmol, $d = 0.979$, 97%) de dicarbonato de di *tert*-butilo (16) y se agitó magnéticamente a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se monitoreó por CCF en sistema II donde se observó la formación de dos productos con un R_f de 0.32 (17) y 0.37 (18). La reacción se mantuvo en agitación magnética durante 48 horas. Después de este tiempo se comprobó por CCF que no se consume por completo la materia prima.

La mezcla de reacción se vertió a un embudo de separación de 250 ml y se le agregaron 20 ml más de agua. Se lavó con 3 porciones de acetato de etilo de 70 ml cada una y secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad obteniendo un aceite. Se lavó con hexano y solidificó, obteniéndose 0.588 gr (85.5%) de un sólido amarillo. Se intentó la separación de ambos productos por recristalización de par de disolventes y por cromatografía en columna, pero no funcionó. Una pequeña fracción se disolvió en acetona y se separó por cromatografía en placa preparativa, utilizando como sistema de elusión una mezcla de cloroformo-metanol (9:1). El rendimiento final de los productos obtenidos a partir de la placa preparativa fue aproximadamente del 11% y 15% respectivamente.

Esta reacción también se realizó utilizando trietilamina al 5% en DMF²¹; cloroformo como disolvente²⁰, pero no arrojaron resultado alguno. Cuando se utilizó tetrahydrofurano como disolvente y 4-dimetilaminopiridina como catalizador, dio 4 productos de reacción.²⁵

8.2.3 AGENTES ACOPLANTES.

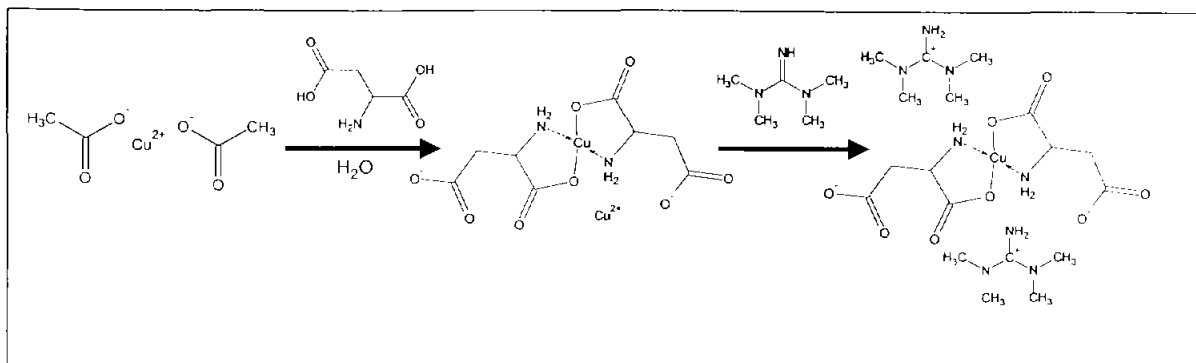
8.2.3.1. *N,N'*-CARBONILDIIMIDAZOL.



Síntesis del 4-bencil-1-(adenosin-5'-*O*-il) *N*-(*tert*-butoxicarbonil) aspartato (20).³¹

En un matraz bola de tres de 50 ml, adaptado con un termómetro, embudo de presiones igualadas, agitación magnética y condensador en posición de reflujo con trampa de humedad en la parte superior, se suspendieron 0.150 gr (1.5 meq, 0.9280 mmol) de *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI), pesados bajo atmósfera de nitrógeno, en 10 ml de acetonitrilo. Después se adicionaron 0.2 g (1 meq, 0.6187 mmol) de *N-tert*-butoxicarbonil aspartato de 4 bencilo (19). Tras la adición la mezcla de reacción se calentó en baño de aceite a 50 °C por tres horas, observándose evolución de CO₂. Al verificar por CCF (sistema X) la desaparición de 19, la mezcla se enfrió a 30-35 °C. Posteriormente se adicionó 0.124 gr (0.75 meq, 0.461 mmol) de adenosina (1) disuelta en 5 ml de DMF calentando ligeramente. La reacción se mantuvo toda la noche en la misma temperatura. Al verificar por CCF (sistema X y IV) la existencia de materia prima, se calentó a 50 °C durante 24 horas más. Transcurrido este tiempo se dio término a la reacción. La solución resultante se pasó a un embudo de separación agregándose 50 ml de agua. Se lavó con tres porciones de acetato de etilo de 15 ml cada una, y con tres porciones de agua salada de 100 ml cada una. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad obteniéndose 0.07 g (20 %) de un líquido aceitoso que por análisis en CCF, utilizando el sistema IV, mostró dos manchas principales con R_f de 0.46 y 0.58 .

8.2.4 COMPLEJO DE COBRE-ÁCIDO ASPÁRTICO.



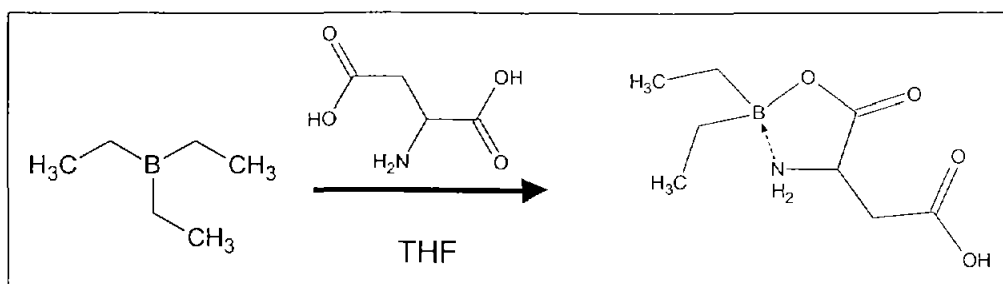
Síntesis del Complejo de cobre (II) ácido L-aspártico.³²

En un matraz bola de 1 boca (24/40) de 100 ml se disolvieron 0.3 gr (1 meq, 2.2539 mmol) de ácido aspártico en 12.5 ml de agua. La mezcla se mantuvo en baño de aceite a 70 °C y con agitación magnética. En un vaso de precipitado de 100 ml se disolvieron 0.463 gr (1.03 meq, 2.3215 mmol) de acetato de cobre (II) en 8.5 ml de agua. La solución de acetato de cobre se pasó a un embudo de adición y se adicionó gota a gota a la solución de ácido aspártico en un transcurso de 1 hora. Durante la adición se formó un sólido esponjoso de color azul-celeste. Terminada la adición se retiró el baño de aceite, y la mezcla se dejó en agitación durante 48 horas a temperatura ambiente. El sólido se separó por filtración, y se lavó con 100 ml de agua, 60 ml de etanol y 60 ml de acetato de etilo. Se dejó secar durante 48 horas, para obtener 0.494 gr (41%) de un sólido azul.

Síntesis del Complejo N,N,N',N' -tetrametilguanidina ácido L-aspártico cobre (II).

En un matraz bola de 50 ml con agitación magnética se suspendieron 0.998 gr (2 meq, 0.7499 mmol) de ácido aspártico y 0.2 gr (1 meq, 0.3749 mmol) del Complejo de Cobre (II) ácido L-aspártico en 2.7 ml de DMF. Enseguida se añadieron con un embudo de adición gota a gota en un período de 30 min., 0.18 ml (4 meq, 1.4948 mmol) de N,N,N',N' -tetrametilguanidina. Después de 2 horas de agitación se disolvió la mayor parte de los sólidos, y se añadieron 3 ml de DMF. La solución de color azul oscuro formada, se utilizó directamente para el acoplamiento con adenosina, utilizando: yoduro de 2-cloro N -metilpiridinio, N,N' -carbonildiimidazol (CDI), dicitclohexilcarbodiimida (DCC), y clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) como agentes acoplantes. Pero no arrojaron resultado alguno.

8.2.5 COMPLEJO DE BORANO-ÁCIDO ASPÁRTICO.



Síntesis del complejo borano-ácido aspártico.^{33, 34}

En un matraz bola de 50 ml con agitación magnética, se suspendieron 0.2 gr (1meq, 1.5026 mmol) de ácido aspártico en 3 ml de DMF. A esta solución se agregó 1.8 ml (1.2 meq, 1.8 mmol) de una solución 1 Molar de trietilborano en THF. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 48 horas, a temperatura ambiente, con trampa de humedad. Transcurrido este tiempo se formó una solución de color amarillo, se filtró para remover los restos de sólido. La solución formada, se utilizó directamente para el acoplamiento con adenosina, utilizando: yoduro de 2-cloro *N*-metilpiridinio, *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI), dicitclohexilcarbodiimida (DCC), y clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) como agentes acoplantes. Pero no arrojaron resultado alguno.

BIBLIOGRAFÍA.

1. http://www.tuotromedico.com/temas/cirrosis_hepatica.htm
2. http://www.alfal.org/info_alfa_higado_cirrosis.htm
3. <http://www.methodisthealth.com/spanish/liver/chronic.htm>
4. M. Bruguera; J. Ródes. Tratamiento de las enfermedades hepáticas y biliares. Capítulo 9 Cirrosis Hepática Compensada. pp. 99-104.
5. <http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/mex/productos/8859.htm>
6. Devlin, T.M. Bioquímica (1999) libro de texto con aplicaciones clínicas, 3ª ed. Reverté.
7. Guinzberg P.R. et al. Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem. J.* **1987**; 245: 371-374.
8. Masaru Saitoh, et al. Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase. *Biochemical Pharmacology.* **2004**; 67: 2005-2011.
9. William J. Welch. Adenosine A1 receptor agonists in the kidney: effects in fluid-retaining disorders. *Current opinion in Pharmacology.* **2002**; 2: 165-170
10. <http://www.iladiba.com/upr/1997/No51997/htm/tera3.asp>
11. Laila Y. Al-Ayadhi; Ali S. Al-Tuwajri. The synergistic effect of adenosine A_{2A} receptors agonist, type IV phosphodiesterase inhibitor and ATP-sensitive K channels activation on free radical production and aggregation of human polymorphonuclear leukocytes. *Pharmacological Research.* **2004**; 50: 157-163.
12. Manuella P. Kaster, et al. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice evidence of the involvement of A₁ and A₂ receptors. *Neuroscience Letters.* **2004**; 355: 21-24.
13. Beata Zuchora, et al. Protective effect of adenosine receptor agonist in a new model of epilepsy-seizures evoked by mitochondrial toxin, 3-nitro propionic acid, in mice. *Neuroscience Letters.* **2001**; 305: 301-304.
14. Hernández-Muñoz Rolando y cols. Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl₄-induced cirrhosis: Protective role of adenosine administration. *Hepatology.* **1997**; 26(5): 1100-1110.
15. La adenosina podría combatir el Alzheimer.
<http://www.ondasalud.com/edicion/noticia/0%2C2458%2C3225%2C00.htm>
16. Khan Shoeb Zafar, et al. Protective effect of adenosine in rat model of Parkinson's disease: Neurobehavioral and Neurochemical evidences. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* **2003**; 26: 143-151.
17. C. Forsberg, et al. Effects of adenosine infusion on gastric emptying in healthy volunteers. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica.* **1999**; 43(1): 87.
18. R.T. Smolenski, et al. Exogenous adenosine, supplied transiently during reperfusion ameliorates depressed endogenous adenosine production in the post-ischemic rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1997**; 29: 333-346.
19. Guinzberg P.R, et al. Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem. J.* **1987**; 245: 371-374.
20. D. Stanley Tarbell, et al. New method to prepare N-*t*-Butoxycarbonyl derivatives and the corresponding sulfur analogs from di-*t*-Butyl Dicarboxylate or di-*t*-butyl Dithiol Dicarboxylates and Amino Acids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1972**; 69(3): 730-732.

21. E. Ponnusamy, et al. A novel method for the rapid non-aqueous *t*-Butoxycarbonylation of some ¹⁷O-labeled Amino Acids and ¹⁷O-N.M.R. Parameters of the Products. *Synthesis Communications*. **1986**: 48-49.
22. Carl M. Svahn, et al. Tranexamic Acid derivatives with Enhanced Absorption. *J. Med. Chem.* **1986**; 26:448-453.
23. G.S. Atwell and W.A. Denny. *Synthesis*. **1984**: 1032.
24. David B. Berkowitz and Michelle L. Pederson. Simultaneous Amino and Carbonyl group protection for α -branched Amino Acids. *J. Org. Chem.* **1994**; 59: 5476-5478.
25. Subhakar Dey and Philip Garner. Synthesis of *tert*-Butoxycarbonyl (BOC) protected purines. *J. Org. Chem.* **2000**; 65: 7697-7699.
26. David G. Normon, et al. 2',3'-*O*-Methylene Derivatives of Ribonucleosides. *Synthesis Communications*. **1985**; August: 751-754.
27. Chaudhary, S.K. and Hernández O. Tritylation of Benzyl alcohol. 4-(4-methyl-1-piperidinyl)pyridine (MPP) as catalyst. *Tetrahedron Letters*. **1979**: 95.
28. Greg J. Ghiardi, Jeffrey M. Gidday, Steven Roth. The purine nucleoside adenosine in retinal ischemia-reperfusion injury. *Vision Research*. **1999**; 39: 2519-2535.
29. György Haskó, Michail V. Sitkovsky, Csaba Szabó. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. **2004**. Vol. 25 No. 3: 152-157.
30. Base de datos de defunciones INEGI - Secretaría de Salud. Dirección General de información en salud. CONAPO. **2002**.
31. Nanda D. Sinha, et al. A Simple Method for N-Acylation of Adenosine and Cytidine Nucleosides using Carboxylic Acids Activated *In-Situ* with Carbonyldiimidazole. *Tetrahedron Letters*. **1995**; Vol. 36, No. 51: 9277-9280.
32. W.A.R. Van Heeswijk, M.J.D. Eenink, J. Feijen. An Improved Method for the preparation of γ -Esters of Glutamic Acid and β -Esters of Aspartic Acid. *Synthesis Communications*. **1982**: 744-747.
33. F. Albericio y cols. Convenient Synthesis of Fluorenylmethyl-Based Side Chain Derivatives of Glutamic and Aspartic acids, Lysine, and Cysteine. *Synthesis*. **1990**: 119-122.
34. Jordi Robles y cols. 2-(4-Acetyl-2-nitrophenyl)ethyl: A new Base-Labile Carboxyl Protecting Group. *Synthesis*. **1993**; 12: 1261-1265.