

03088  
8  
Lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL  
Y DE POSGRADO  
FACULTAD DE QUÍMICA

"SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE BLOQUES DE  
CONSTRUCCIÓN CON *Saccharomyces cerevisiae* A.  
PARTIR DE NITROALQUENOS"

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**  
P R E S E N T A :  
**ARTURO NAVARRO OCAÑA**



MEXICO, D. F.

259961

1998

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.

# **Tesis**

## **"Síntesis Quimioenzimática de Bloques de Construcción con *Saccharomyces cerevisiae* a Partir de Nitroalquenos"**

**Por**

**M en C. Arturo Navarro Ocaña**

Depto. Alimentos y Biotecnología., Facultad de Química e Instituto de Química de la  
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor: Dr. Eduardo Bárzana García

Marzo de 1998

Cd. Universitaria, México, D. F.

**Jurado asignado:**

PRESIDENTE	Dr. Agustín López-Mungía Canales
VOCAL	Dr. Anatoli Iatsimirski
VOCAL	Dr. Héctor M. Luna Contla
VOCAL	Dr. Hugo Sergio García G
VOCAL	Dr. Anatoli Iatsimirski
SECRETARIO	Dra. Rosario A. Muñoz Clares
SUPLENTE	Dra. Martha E. Albores Velasco
SUPLENTE	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

*Esta tesis fue realizada en el laboratorio 2-8 del Instituto de Química y en el laboratorio 314 del Edificio "E" de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, y en el laboratorio del Dr. Horacio Olivo en la Universidad de Iowa.*

Asesoría técnica: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Esta tesis se realizó mediante el apoyo de una beca otorgada por el CONACYT con no. de registro 53175, y con el apoyo económico de PADEP Proyectos 30405 y 05360 y DGAPA Proyecto No. IN2149961IQ.

## ***AGRADECIMIENTOS***

A los miembros del comite tutorial por sus valiosos comentarios y sugerencias durante la realización de este proyecto.

Dr. Eduardo Bárzana García

Dr. Francisco Xavier Soberón

Dr. Roberto Martínez

Dr. Manuel Jiménez Estrada

A los miembros del jurado por sus amables indicaciones para la mejor presentación de este manuscrito.

Al Dr. Horacio Olivo por su apoyo durante mi estancia en su laboratorio.

## ÍNDICE GENERAL

I.-	Introducción	1
II.-	Objetivos	3
III.-	Antecedentes	4
3.1	Biotransformaciones en síntesis orgánica	4
3.2	Bioconversiones con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
3.2.1	Reducción de carbonilos	10
3.2.2	Biohidrogenaciones de dobles enlaces C-C y compuestos nitrados	12
3.2.3	Reducción con <i>S. cerevisiae</i> de otros grupos funcionales.	15
3.2.4	Reducción con otras levaduras	16
3.3	Síntesis de los nitroalquenonitrilos y su empleo en síntesis orgánica	20
3.4	Métodos de obtención y empleo de los 5-aminoisoxazoles en química orgánica	21
3.5	Obtención y usos de las 2-carboxiamidas-2H-aziridinas en síntesis	32
3.6	Preparación y utilización de las oximas en química sintética	35
3.7	Importancia de los nitroalquenonitrilos, 5-aminoisoxazoles y de las azirinas	37
IV.-	Resultados y discusión	40
4.1.-	Preparación de los substratos	42
4.2.-	Biohidrogenación de los 3-propenonitrilos sustituidos con <i>S. cerevisiae</i>	45
4.3.-	Apertura biocatalizada de 5-aminoisoxazoles por <i>S. cerevisiae</i>	50
V.-	Conclusiones y perspectivas	57
VI.-	Parte experimental	59
6.1.-	Síntesis de los substratos	60
6.2.-	Biorreducciones con <i>S. cerevisiae</i> de los nitroalquenonitrilos	62
6.3.-	Apertura biocatalizada de 5-aminoisoxazoles	65
6.4.-	Demostración de la bioconversiones	67
VII.-	Bibliografía	68
VIII.-	Espectros	80
IX.-	Artículos	98

## Índice de Figuras

	Pag.
Figura 1. Reducción de carbonilos con <i>S. cerevisiae</i> .	10
Figura 2. Reducción de carbonilos con <i>S. cerevisiae</i> .	11
Figura 3. Biohidrogenación de dobles enlaces carbono-carbono con <i>S. cerevisiae</i> .	12
Figura 4. Intermediarios de la reducción del grupo nitro.	13
Figura 5. Biohidrogenación de compuestos nitrados con <i>S. cerevisiae</i> .	14
Figura 6. Reducción de otros grupos funcionales con <i>S. cerevisiae</i> .	15
Figura 7. Reducción con diferentes levaduras.	16
Figura 8. Reducción con diferentes levaduras.	17
Figura 9. Nitración del acrilonitrilo con cloruro de nitrilo.	19
Figura 10. Nitración con óxidos de nitrógeno de los propenonitrilos.	20
Figura 11. Preparación de 1,2-cianonitroaromáticos.	20
Figura 12. Síntesis de nitrocianoimidazoles.	20
Figura 13. Usos de los 3-nitroalquenonitrilos en síntesis.	21
Figura 14. Métodos generales de síntesis de 5-aminoisoxazoles.	22
Figura 15. Preparación de 5-aminoisoxazoles por oximación.	23
Figura 16. Síntesis de 5-aminoisoxazoles por oximación de nitrilos.	24
Figura 17. Obtención de 5-aminoisoxazoles por reducción.	25
Figura 18. 5-Aminoisoxazoles obtenidos mediante reacciones de cicloadición.	26
Figura 19. Usos de los isoxazoles.	27
Figura 20. Transformación térmica y fotoquímica de 5-aminoisoxazoles.	28
Figura 21. Reacción de 5-aminoisoxazoles con trietilfosfito.	28
Figura 22. Síntesis con 5-aminoisoxazoles.	29
Figura 23. Síntesis con 5-aminoisoxazoles.	30
Figura 24. Síntesis con 5-aminoisoxazoles.	31
Figura 25. Transformación térmica de los 5-aminoisoxazoles.	32
Figura 26. Reacción de termólisis y fotólisis de isoxazoles.	33
Figura 27. Empleo en síntesis de las 2-carboxiamidas-2H-azirinas.	34
Figura 28. Otros usos de las 2-carboxiamidas-2H-azirinas.	35
Figura 29. Hidrogenólisis de los $\alpha$ -ciano- $\beta$ -nitroestilbenos.	36
Figura 30. Azirinas en productos naturales.	38
Figura 31. Ruta general de síntesis.	40
Figura 32. Estructura de los presubstratos.	41



Figura 33.	Nitración de los nitrilos $\alpha,\beta$ -no saturados.	42
Figura 34.	Nitración de derivados del ácido cinámico.	44
Figura 35.	Nitración del cinamonitrilo.	44
Figura 36.	Nitración del ácido cinámico y del metiléndioxicinamonitrilo.	45
Figura 37.	Estructura de los sustratos.	45
Figura 38.	Formulas de los cianoalquenos modelo.	46
Figura 39.	Requerimientos estereoelectrónicos de los sustrato.	47
Figura 40.	Síntesis de 5-aminoisoxazoles con <i>S. cerevisiae</i> .	48
Figura 41.	Mecanismo propuesto para la formación de los 5-aminoisoxazoles.	49
Figura 42.	Estructura de los productos de apertura del 5-aminoisoxazoles ( <b>3a</b> ).	51
Figura 43.	Mecanismo de formación de la azirina ( <b>5</b> ).	52
Figura 44.	Reacción de apertura del 5-aminoisoxazol ( <b>3c</b> ).	53
Figura 45.	Reacción de apertura del 5-aminoisoxazol ( <b>3g</b> ).	53
Figura 46.	Equilibrio de la oxima y la hidroxilamina.	55
Figura 47.	Perspectivas.	58

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> de presustratos.	Pag. 42
<b>Tabla 2</b> de sustratos.	43
<b>Tabla 3</b> de datos espectroscópicos de <b>4</b> .	54

## Listado de abreviaturas

pf	Punto de fusión
R <sub>f</sub>	Factor de retención
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CC	Cromatografía en Columna
IR	Infrarrojo
RMN H <sup>1</sup>	Resonancia Magnética Nuclear protónica
RMN C <sup>13</sup>	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
EM	Espectrometría de Masas
<i>e.e</i>	Exceso enantiomérico
<i>e.d</i>	Exceso diastereomérico
<b>(Z)</b>	Descriptor para el isómero geométrico <b>cis</b>
<b>(E)</b>	Descriptor para el isómero geométrico <b>trans</b>

## RESUMEN

Los 5-aminoisoxazoles **3**, las oximas **4** y la azirina **5** son tres grupos importantes de bloques de construcción para la síntesis de una amplia variedad de arquitecturas moleculares.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal preparar estos bloques de construcción utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalizador y los 2-fenil-3-alkil o aril-3-nitropropenenitrilos como sustratos.

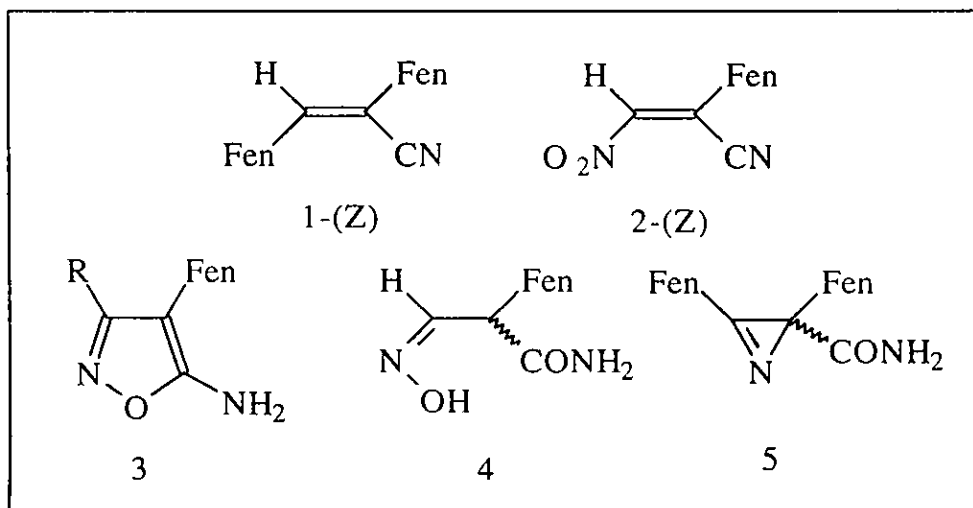
Los (Z)-3-nitropropenenitrilos sustituidos **2a-h** se prepararon mediante una reacción de condensación de Knoevenagel de los aril o alkil aldehídos y el fenilacetnitrilo. La posterior nitración de los propenenitrilos **1a-h** con una mezcla de óxidos de nitrógeno NO<sub>x</sub> dio como productos los (Z)-3-nitropropenenitrilos sustituidos con rendimientos del 75 al 90 %. Esta geometría espacial es requerida para la biohidrogenación con *S. cerevisiae*.

Cuando este biocatalizador fue incubado con los (Z)-3-nitro-3-alkil o aril-3-propenenitrilos se obtuvieron los 5-amino-3-alkil o aril-4-fenilisoxazoles **3a-h** como productos de la reducción del grupo nitro, con rendimientos del 60 al 80 %.

Adicionalmente a la biorreducción del grupo nitro de los nitroalquenos, se estudió la reacción de apertura reductiva con *S. cerevisiae* de los 5-aminoisoxazoles a las oximiniopropanamidas **4a**, **4c** y **4g**. Estas reacciones procedieron con moderados rendimientos que podrían ser mejorados. También se obtuvo la 2-carboxiamida-2,3-difenilazirina **5** por apertura del 5-amino-3,4-difenilisoxazol con *S. cerevisiae*.

Todos los compuestos fueron purificados por cromatografía en silica gel y caracterizados por sus constantes fisico-químicas; pf, R<sub>p</sub>, y espectroscópicas de IR, EM, RMN H<sup>1</sup> RMN <sup>13</sup>.

Este trabajo demuestra por primera vez que *S. cerevisiae* tiene la capacidad de reducir grupos nitro de nitroalquenos y de catalizar la reacción de apertura reductiva de 5-aminoisoxazoles.



# Dissertation

## "Chemoenzymatic Synthesis of Building Blocks from Nitroalkenes with *Saccharomyces cerevisiae*"

by

Arturo Navarro Ocaña

Depto. Alimentos y Biotecnología., Facultad de Química e Instituto de Química de la  
Universidad Nacional Autónoma de México

Adviser: Dr. Eduardo Bárzana García

March, 1998

Cd. Universitaria, México, D. F.

## Abstract

5-aminoisoxazoles **3**, oximes **4** and the azirine **5** are useful synthetic building blocks for the synthesis of relevant molecular architectures.

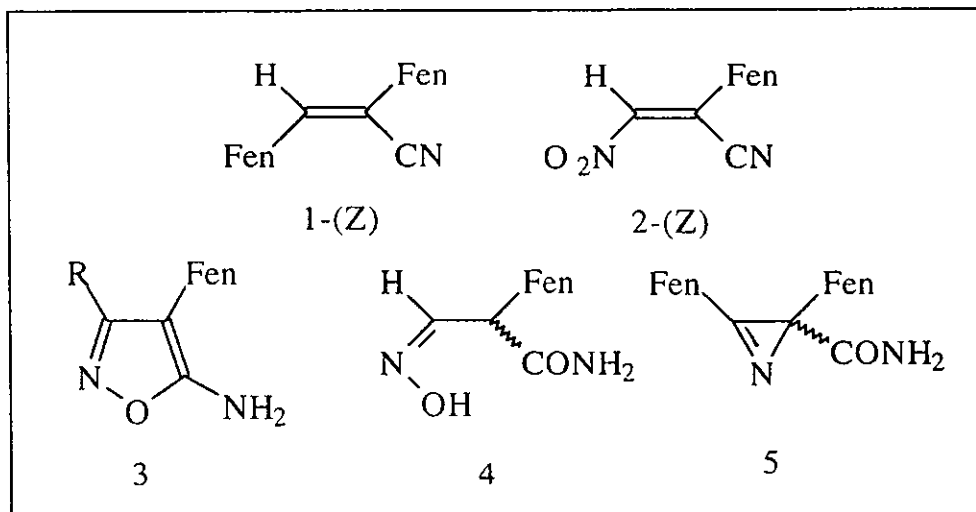
This work's goal to develop a convenient procedure for the preparation of such building blocks using *Saccharomyces cerevisiae* as biocatalyst and 2-phenyl-3-alkyl-aryl-3-nitropropenenitriles and 2-phenyl-3-aryl-3-nitropropenenitriles as substrates.

The substituted (Z)-3-nitropropenenitriles **2a-h** were prepared by Knoevenagel condensation of the aryl or alkyl aldehydes with phenylacetonitrile, followed by nitration of the 3-alkyl-2-phenylpropenenitriles with a mixture of nitrogen oxides NO<sub>x</sub>. The (Z)-3-nitropropenenitriles **2a-h** were obtained in 75 to 90% yields. The products were obtained exclusively with double bond (Z)-geometry. This geometry is required in the substrate for biohydrogenation with *S. cerevisiae*.

When the (Z)-3-nitro-3-alkyl or aryl-3-propenenitriles **2a-h** were incubated with *S. cerevisiae*, the 5-aminoisoxazoles **3a-h** were obtained with yields in the range 60 at 80%. In addition to the bioreduction of vinylic nitro function, reductive ring opening of the 5-aminoisoxazoles was investigated giving rise to the oximinopropanamides **4a, 4c y 4g**. Yields were moderate that may be enhanced.

Other product that was obtained by *S. cerevisiae* cleavage of 5-amino-3,4-diphenylisoxazole was the 2-carboxiamide-2,3-diphenylazirine **5**. All the products were purified by chromatography on silica gel and their structures were confirmed by spectral data.

This is the first report on the ability of *S. cerevisiae* to reduce the nitro group in nitroalkenes and to catalyze the reductive cleavage of 5-aminoisoxazoles rings.



## I.- Introducción

Los organismos vivos -desde los más primitivos hasta los más avanzados- están compuestos de moléculas que son quirales; los procesos de la vida a escala molecular ocurren entre moléculas quirales en ambientes quirales. Probablemente así se han dado desde el inicio de la vida <sup>1</sup>.

Como una consecuencia de la naturaleza quiral de los seres vivos, éstos exhiben estereo-selección (discriminación quiral) . Por ejemplo, sólo los L- $\alpha$ -aminoácidos, D-azúcares y los D-nucleótidos se encuentran en forma natural. El reconocimiento quiral es uno de los principios fundamentales de la actividad biológica y de la vida misma<sup>2</sup>.

Las estrategias para la síntesis de isómeros ópticamente activos se pueden clasificar actualmente en cuatro<sup>3</sup>.

- **Primera.-** Empleando un producto natural el cual ya tiene una estereoquímica determinada (*chiral pool*); no es costosa, fácilmente disponible; los compuestos que sirven como "chiral pool" pueden ser aminoácidos, azúcares, monoterpénos, etc<sup>4</sup>.
- **Segunda.-** Introducción de nuevos centros estereogénicos en un producto natural que contiene uno o más centros quirales usando reacciones estereoselectivas<sup>5</sup>.
- **Tercera.-** Resolución cinética de mezclas racémicas<sup>6</sup>.
- **Cuarta.-** A partir de compuestos proquirales a través de inducción asimétrica empleando un auxiliar quiral (reactivo quiral) o un medio quiral. Cuando se emplean reactivos quirales en cantidades catalíticas los métodos se conocen como " Síntesis asimétricas catalíticas ". Estas son desde el punto de vista práctico muy atractivas debido a que son baratas y generalmente muy eficientes, y se pueden dividir en dos grupos: 1) las que emplean compuestos químicos relativamente simples ya sean naturales o sintéticos, y 2) las que involucran enzimas<sup>7</sup>.

La construcción de moléculas con arquitecturas moleculares simples o complejas que contiene uno o más centros quirales a partir de materias primas proquirales o quirales es uno de los capítulos más excitantes y espectaculares de la química orgánica contemporánea. El arsenal de los químicos sintéticos en el presente es extraordinariamente rico tanto en bloques de construcción proquirales y quirales, como en los métodos para su preparación. Una de las estrategias que más se han desarrollado en los últimos años para la obtención de nuevos bloques de construcción con un arreglo espacial definido, es la que hace uso de auxiliares quirales bioquímicos, los cuales actúan sobre compuestos proquirales. Uno de los requisitos para que esta metodología sea exitosa es contar con métodos sencillos, económicos y versátiles para preparar compuestos proquirales; otro es disponer de un biocatalizador de bajo costo, seguro, fácil de manejar, muy eficiente y específico. Un requisito adicional, exigido en gran parte por la presión social, es el que las metodologías usadas deben ser compatibles con el medio ambiente.

Uno de los biocatalizadores que reúne las características anteriormente descritas es la levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*), que se ha usado como catalizador químico fácil de obtener y manejar en el laboratorio y, además, de bajo costo. Con levaduras se han logrado preparar una amplia variedad de bloques de construcción quirales. En las tres excelentes revisiones que se han publicado en los años anteriores a 1992<sup>8</sup> se pueden encontrar numerosos ejemplos del uso de *S.cerevisiae* en la síntesis de bloques de construcción quirales y en la transformación de sustratos de difícil modificación, o en algunos casos imposible mediante el uso de reactivos químicos tradicionales<sup>9</sup>.

Paralelo al desarrollo de las síntesis biocatalíticas con *S. cerevisiae*, otra metodología que ha experimentado un fuerte desarrollo es la relacionada con la preparación de bloques de construcción, tanto quirales como proquirales, a partir de nitroalquenos. En los últimos años los compuestos nitrados alifáticos han adquirido gran relevancia en síntesis de bloques de construcción, debido principalmente a que se han estudiado en detalle los mecanismos de reacción involucrados en su formación. Los resultados de estos trabajos han permitido diseñar nuevos métodos y mejorar los conocidos<sup>10</sup>. Asimismo, han dado la oportunidad de conocer los mecanismos de interconversión en otros grupos funcionales y su capacidad para formar enlaces carbono-carbono con una buena estereoselectividad<sup>11</sup>.

De aquí se desprende que los compuestos nitrados, saturados o no saturados, reúnen las características ideales para ser empleados en síntesis de bloques de construcción, tanto aquirales como quirales; de hecho, en el presente, ésta es una de las áreas de la química orgánica sintética más activa. En las referencias citadas se pueden encontrar numerosos ejemplos de la utilidad de estos compuestos en síntesis, así como los principales problemas relacionados que se plantean en este campo<sup>12</sup>. Por otro lado, no obstante los avances que se han dado en el uso de biocatalizadores y compuestos nitrados en la preparación de bloques de construcción aquirales y quirales, el hecho de que no se hayan desarrollado más procesos químicos con aportaciones del conocimiento químico-biotecnológico, hace El argumento principal del presente trabajo se planteó como una manera de contribuir al desarrollo de ambas metodologías indispensable que se preste mayor atención a las investigaciones tendientes a modificar esta situación. y para lograrlo es necesario conocer los avances más relevantes que han experimentado las diferentes áreas del conocimiento en donde se inserta el presente estudio.

## II.- Objetivos

### Objetivo general

Actualmente se están realizando numerosas investigaciones con el fin de ampliar y conocer nuevas propiedades biocatalíticas de *S. cerevisiae*, el cual ha sido ampliamente aceptada por los químicos orgánicos como un reactivo más, así como de extender las aplicaciones en síntesis orgánica de los nitroalquenos.

El presente trabajo tiene como objetivo principal preparar algunos bloques de construcción importantes en química orgánica preparativa con *S. cerevisiae* como biocatalizador a partir de nitroalquenos.

### Objetivos Particulares

- Emplear un método de nitración sencillo, barato y limpio para preparar los (Z)-3-nitropropenonitrilos sustituidos.
- Usar el poder reductor de *Saccharomyces cerevisiae* para transformar de manera quimioselectiva los (Z)-3-nitropropenonitrilos sustituidos a intermediarios sintéticos de amplia versatilidad.
- Determinar los principales requerimientos estereoquímicos y electrónicos que deben tener los nitrocianoalquenos para ser biotransformados con *Saccharomyces cerevisiae*.
- Definir los principales parámetros para el diseño de esta nueva bioconversión.



### III.- Antecedentes

Entre los antecedentes directos al presente trabajo se pueden citar los siguientes:

#### 3.1.-Biotransformaciones en síntesis orgánica

La diversidad y la complejidad de las moléculas orgánicas en la naturaleza son un reflejo del poder catalítico de las enzimas. Casi cualquier arquitectura molecular que se encuentre en ella ha sido construída por enzimas, por compleja que ésta sea. Además, por ser macromoléculas quirales, las enzimas catalizan reacciones que dan origen a productos quirales. Estas propiedades catalíticas han sido reconocidas por los químicos sintéticos, los cuales cada vez más recurren a éstas para llevar a cabo la síntesis de sus objetivos moleculares.

El interés por desarrollar este campo se ve reflejado en el número de trabajos publicados, los cuales han tenido un crecimiento cuasi exponencial a partir de la década de los sesentas. Por ejemplo, en los años setentas el número de publicaciones donde se usaban enzimas en síntesis orgánica se calculó en 400 por año, mientras que en los noventas se estimó en 1300 trabajos<sup>13</sup>. Hoy día, al revisar las publicaciones más importantes de síntesis, se puede notar que esta tendencia de crecimiento se mantiene. Por la capacidad de las enzimas para conducir reacciones de una manera regio y estereoespecífica y, porque generalmente funcionan en condiciones de temperatura y pH fisiológicos, representan un recurso potencial por explorar para la producción de moléculas de interés en campos tales como los productos naturales, química medicinal y de alimentos, agroquímicos, etc. Un método para aprovechar el poder de las enzimas es mediante las biotransformaciones o bioconversiones, que consisten en la modificación estructural de un sustrato en un bioproducto. Los biocatalizadores pueden ser: enzimas puras o extractos de éstas, complejos enzimáticos, "enzimas artificiales" (sinzimas), células vegetales completas o extractos de ellas, cultivos de microorganismos (hongos, bacterias o levaduras), anticuerpos catalíticos (abzimas) o ARNs (ribozimas). Aunque las biotransformaciones son conocidas desde hace muchos años (por ejemplo en la producción de aminoácidos y otros productos químicos), no fue sino hasta 1976 cuando apareció la primera revisión referente a las bioconversiones<sup>14</sup>. Desde esta fecha han aparecido numerosas monografías que dan cuenta del vigoroso desarrollo que experimenta este campo. Además de estas revisiones, también se han publicado libros y artículos que dan información de la transformación de sustratos específicos (esteroides, alcaloides, azúcares y compuestos bioactivos) o con un microorganismo en particular (*Saccharomyces cerevisiae*). Recientemente, se han dado a conocer artículos que describen con amplitud los aspectos más relevantes de los biocatalizadores como reactivos químicos<sup>15</sup>.

La explosión de la información referente al uso de los métodos biocatalíticos en síntesis hace imposible tratar de dar cuenta del estado del arte en este campo. En lo que resta de esta

exposición se darán a conocer los que en opinión del autor son los avances más significativos. La presentación se hará en grupos según la naturaleza del biocatalizador empleado.

## Enzimas

Las enzimas hidrolíticas son los biocatalizadores que más se han empleado en síntesis orgánica. De particular interés son las amidasas, proteasas, estereasas, lipasas y carbohidrasas. Se puede afirmar que las más usadas son las lipasas y aunque se han empleado para llevar a cabo una amplia gama de reacciones, la de resolución cinética de los compuestos *meso* (cíclicos, policíclicos, alicíclicos, heterocíclicos y organometálicos) es quizá la aplicación más relevante que se les ha dado en los noventa<sup>16</sup>.

En términos de aplicaciones, siguiendo a las lipasas están las proteasas. Debido a su bajo costo, alta estabilidad, amplia aceptación y relativa inespecificidad por sus substratos, se han empleado principalmente en la resolución de aminoácidos, resolución cinética de ésteres y de amidas *meso* y en la síntesis de péptidos<sup>17-18</sup>.

No obstante que las reacciones de oxidación-reducción, especialmente las de oxidación estereoselectiva de olefinas y anillos aromáticos o la reducción de dobles enlaces carbono heteroátomo, por ejemplo la de carbonilos, son importantes y se usan frecuentemente en los laboratorios de química, las reacciones redox catalizadas por enzimas no son muy comunes en síntesis orgánica, principalmente por requerir de cofactores. El uso de enzimas que necesitan cofactores plantea dos problemas; el de la estabilidad y el de la regeneración. Sin embargo, recientemente se han descrito sistemas para regenerar los cofactores, lo que aumenta las posibilidades de uso de estas enzimas en síntesis orgánica.

Los enzimas más usadas para realizar reacciones redox son las monooxigenasas, cloroperoxidasas, arenodioxigenasas, lipooxigenasas, monosacáridooxidasas y las deshidrogenasas de alcohol, glucosa y lactato, de diferentes fuentes. Dentro de las alcohol deshidrogenasas, la reducción de carbonilos ha sido estudiada con una amplia gama de estas enzimas<sup>19</sup>.

Otras enzimas que próximamente estarán en los anaqueles de muchos laboratorios de química como reactivos comunes son las que catalizan la formación de enlaces carbono-carbono, reacciones que son en última instancia el corazón de la síntesis orgánica; las más estudiadas son las aldolasas<sup>20</sup> y en menor extensión las oxinitrilasas<sup>21</sup>.

Otro grupo de enzimas que son de especial interés porque rompen y forman enlaces glicosídicos, con una alta regio- y estereoselectividad, son las glicosilhidrolasas y las glicosiltransferasas. Avances recientes en la tecnología recombinante del DNA y el desarrollo de nuevos sistemas de

expresión, así como el desarrollo de sistemas de regeneración de los cofactores y el empleo de sistemas de inmovilización han hecho posible la obtención de material suficiente para aplicarse a escala preparativa en la síntesis de algunos oligosacáridos. Una estrategia complementaria para la formación de enlaces glicosídicos es el uso de las glicosidasas, por ejemplo  $\beta$ -galactosidasa de diferentes fuentes<sup>22</sup>, cuando se hace reaccionar en medios no acuosos, catalizan la reacción de formación de enlaces en lugar de la hidrólisis<sup>23</sup>.

Actualmente ambos tipos de enzimas están sujetos a fuertes programas de investigación, con el fin de ampliar y mejorar sus propiedades biocatalíticas<sup>24</sup>.

Otras reacciones catalizadas por enzimas que son importantes, no tanto por su uso intensivo o disponibilidad, sino por el tipo de transformación, son las reacciones pericíclicas<sup>25</sup>. Hasta hace poco tiempo se conocía un sistema enzimático prácticamente para todas las reacciones definidas; la única que no contaba con un sistema biológico era la reacción de cicloadición de Diels-Alder. Cabe mencionar que ésta es una de las reacciones más importantes en síntesis orgánica debido a que permite formar enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo con buena estereoselectividad y mucha versatilidad. Recientemente apareció un artículo en el cual se publicó la preparación de un extracto crudo del microorganismo *Alternaria solani*, que contiene una Diels-Alderasa que cataliza la formación del aducto solanapiranona A<sup>26</sup>.

Otra enzima notable por el tipo de reacción que promueve es la ciclohexanona monooxigenasa, que es estable en forma pura y para la cual se dispone de un sistema de regeneración del cofactor asociado. Esta enzima cataliza la reacción de expansión del anillo de una cicloalcanona y es conocida como reacción de Baeyer-Villiger<sup>27</sup>.

### **Anticuerpos catalíticos (Abzimas o catabs)**

En los últimos diez años los anticuerpos catalíticos (abzimas o catabs) se han convertido en una de las metodologías biocatalíticas que más intensamente se han desarrollando como parte de las reacciones enzimáticas novedosas. La ventaja que ofrecen las abzimas es la capacidad de catalizar reacciones "no naturales" con un alto grado de especificidad. Por otro lado la producción de abzimas es muy laboriosa y costosa, por lo que las reacciones que catalizan han podido llevarse al terreno aplicativo en el orden de los miligramos. No obstante estas limitaciones, el uso de anticuerpos catalíticos altamente selectivos de varios tipos de reacciones sigue atrayendo la atención de varios grupos de investigación<sup>28</sup>. Recientemente los anticuerpos se han usado para realizar transformaciones sintéticas de especial dificultad o de las cuales no se dispone de un método químico. Dos ejemplos son las reacciones de ciclización que proceden en forma contraria a las predichas por la reglas de Baldwin y la eliminación *syn* de substratos acíclicos para obtener

la olefina *cis*. Sin embargo, la reacción más importante y a la cual varios grupos de trabajo han enfocado su atención con abzimas, es la reacción de cicloadición de Diels-Alder. El uso de esta tecnología fue demostrada por la adición de un dieno no simétrico a un dienófilo que contiene un grupo nitroso con rendimientos moderadamente buenos<sup>29</sup>. Otros ejemplos de esta reacción y otras pericíclicas se dan a conocer en la revisión de Thomas<sup>30</sup>.

Por último, en el año de 1996 se diseñó una abzima que cataliza el rearrreglo térmico conocido como reacción "ene"<sup>31</sup>.

### **Cultivo de células vegetales en suspensión**

Las biotransformaciones con cultivos de células vegetales en suspensión han permitido llevar a cabo modificaciones estructurales de una amplia variedad de sustratos tanto naturales como sintéticos. Las más importantes son glicosilaciones, condensaciones, hidroxilaciones, hidrólisis, isomerizaciones, reacciones de oxidación y reducción de dobles enlaces C=C y de carbonilos. Los biocatalizadores más usados han sido las células de zanahoria (*Daucus carota*), árbol de tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Catharanthus roseus*, planta de gardenia (*Gardenia jasminoides*) y *Marchantia polymorpha*. La reacción de reducción de carbonilos es quizá la más importante<sup>32</sup>.

Los avances más recientes en este campo son los referentes a las reacciones de glicosidación de salicilamida<sup>33</sup>, la hidroxilación de algunos monoterpenos<sup>34</sup> y el uso de una glicosiltransferasa para glicosidar carotenoides<sup>35</sup>. Por último, los cultivos de células en suspensión de *Podophyllum peltatum* se han usado para ciclizar los productos naturales conocidos como podofilotoxinas y monoterpenos<sup>36</sup>.

### **Ribozimas y enzimas artificiales**

El desarrollo de ribozimas y enzimas artificiales (que incluye a los anticuerpos catalíticos) es una de las áreas más promisorias de las transformaciones químicas. Los trabajos más importantes de las ribozimas son la interconversión de los rotámeros de los bifenilos<sup>37</sup> y la ruptura del enlace amídico de un polinucleótido<sup>38</sup>. La sofisticación involucrada en esta técnica biocatalítica impone actualmente serias limitaciones a su uso intensivo en química orgánica preparativa. Sin embargo, el hecho de que se hayan encontrado propiedades catalíticas diferentes a las naturales les augura interesantes perspectivas para su uso.

Las enzimas artificiales conocidas como sinzimas (e.g. polileucina) desarrolladas por Roberts, es uno de los desarrollos más incipientes de la biocatálisis, habiendo sido empleadas en la oxidación de alquenos a epóxidos ópticamente activos<sup>39</sup>. Otros tipos de enzimas artificiales son; los biomiméticos de metaloenzimas y enzimas, abzimas y "estampados moleculares"<sup>38</sup>.

## Bioconversiones con microorganismos

La naturaleza nos ha provisto del almacén más variado y grande de reactivos biológicos a través de una gran cantidad de microorganismos y especies superiores de los más diversos tipos que trabajan en una gran variedad de ambientes.

Los microorganismos producen todos los catalizadores que necesitan para acelerar y coordinar las múltiples reacciones que necesitan para vivir; por eso los químicos sintéticos recurren con más frecuencia a ellos por ser la fuente actual más importante de enzimas. Sin embargo, en muchas ocasiones los procesos de separación y purificación de enzimas son en general largos y costosos. En estos casos resulta más barato y conveniente utilizar toda la maquinaria enzimática de los microorganismos para llevar a cabo una transformación. Esto ha motivado que las células completas sean los biocatalizadores que más se usen en la preparación de una amplia gama de especialidades químicas.

Intentar dar un panorama del estado actual del empleo de los microorganismos en química sintética está fuera de los propósitos y los alcances de este trabajo. Sin embargo, es pertinente mencionar algunos de los aspectos surgidos a partir de la excelente revisión publicada por Turner <sup>40</sup>.

A continuación únicamente se presentarán datos de microorganismos diferentes a *S. cerevisiae*, dejando para la siguiente sección lo que concierne a esta levadura.

Un grupo de reacciones importantes en química orgánica preparativa son las reacciones de oxidoreducción ya que permiten funcionalizar grupos poco reactivos. Por ejemplo, diferentes tipos de hidrocarburos tanto alifáticos como aromáticos se pueden transformar en los alcoholes o en los productos de oxidación posteriores (ácidos carboxílicos), o bien llevar a cabo la interconversión estereoespecífica de un grupo funcional a otro en presencia de otro de igual reactividad; por ejemplo, la reducción de carbonilos a alcoholes en presencia de dobles enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo (oximas, iminas, tioles, etc).

Dentro de los estudios distintivos más recientes de las reacciones de oxidación de moléculas orgánicas por microorganismos destaca la oxidación de arenos por varias especies de *Pseudomonas putida* que contienen arenodioxigenasas. Una de las aportaciones más relevante a la síntesis orgánica ha sido el empleo de *Pseudomonas putida* 39D descubierta por Gibson, y ampliamente utilizada por Hudlicky y otros investigadores. Esta bacteria ha permitido preparar arenodiolos quirales (configuraciones complementarias) para las cuales hasta hace poco no se disponía de ningún método químico<sup>41</sup>. Otras reacciones de biooxidación importantes son la transformación de grupos alquilo a los ácidos carboxílicos de N-heterocícllos aromáticos con varias especies de *Pseudomonas* <sup>42</sup> y la de sulfuros a sulfóxidos quirales; para esta última

reacción se han empleado diferentes especies de *Pseudomonas* que han dado como resultado sulfóxidos con ambas configuraciones (R y S)<sup>43</sup>.

Otras reacciones de oxidación con microorganismos estudiados por muchos grupos de investigación son las de epoxidación y expansión de anillos; la primera para sintetizar epóxidos quirales y la segunda para dar ésteres cíclicos. Para la formación de oxiranos quirales se han seguido dos estrategias; la primera consiste en la epoxidación estereoselectiva de alquenos proquirales y la segunda en la resolución cinética de mezclas racémicas de epóxidos. Para la primera ruta se han empleado una gran variedad de microorganismos, destacando varios géneros de *Pseudomonas* y de *Rhodococcus*<sup>44</sup>. Respecto a la segunda, se han empleado principalmente lipasas (ver sección de enzimas). Otra forma de preparar oxiranos quirales es mediante la reacción de haloperoxidación de alquenos con *Pseudomonas* y también con *Caldariomyces fumago*<sup>45</sup>. La reacción de Baeyer-Villiger para expansión del anillo, se ha logrado usando *Pseudomonas* y *Xanthobacter autorophicus*<sup>46</sup>. La oxidación de enlaces carbono-hidrógeno no activados de hidrocarburos alifáticos es uno de los campos de investigación más activos; una revisión reciente relacionada con esta oxidación es la publicada por Kovolenko<sup>47</sup>.

Otras reacciones de oxidación emparentadas con la anterior son la hidroxilación de 1-azidomantano con los hongos *Beauveria bassiana* y con *Rhizopus nigricans*, así como de azabicicloalcanos con *Aspergillus ochraceus* y *Rhizopus arrhizus*. La biooxidación de los alquilos no activados de los 2-cicloalquilbenzoxazoles con *Cunninghamella blakesleeana* DSM 1906 y *Bacillus megaterium* DSM 32 son quizá de lo más relevantes que se han publicado sobre oxidación con microorganismos en años recientes<sup>48</sup>.

*Pseudomonas chloraphis* y *Corynebacterium* han sido estudiadas por su capacidad para hidrolizar nitrilos. Sin embargo, recientemente se publicó un trabajo donde se da a conocer un nuevo y muy eficiente catalizador de *Rhodococcus rodhocrous* AJ270 el cual lleva a cabo la hidrólisis de un gran número de nitrilos<sup>49</sup>.

En el texto precedente, se ha descrito como los métodos biocatalíticos se han usado para resolver un buen número de problemas sintéticos. Las aportaciones más relevantes a la síntesis se pueden agrupar en tres: Generación de uno o más centros estereogénicos, formación de enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo y la interconversión de un grupo funcional a otro. De las tres operaciones sintéticas mencionadas, la que más se ha desarrollado es la primera; la segunda está actualmente experimentando un vigoroso desarrollo. Sin embargo, la tercera no obstante su importancia no presenta la misma situación. Uno de los objetivos principales del presente estudio es contribuir al establecimiento de los métodos biocatalíticos como una herramienta de rutina para la interconversión de grupos funcionales y en particular de nitrocianoalquenos con S.

*cerevisiae*.

El empleo de microorganismos para realizar reacciones de reducción se ha concentrado en gran parte en *S. cerevisiae* para substratos tanto orgánicos, como inorgánicos. En la siguiente sección se describirán los avances más recientes de este tipo de bioconversiones.

### 3.2.- Bioconversiones con *Saccharomyces cerevisiae*.

En química preparativa uno de los retos más comunes es la introducción de un centro quiral para preparar compuestos homo y poliquirales. La reducción microbiana de compuestos proquirales (carbonilos, oximas, etc) es la operación sintética a la cual se ha recurrido con más frecuencia y el microorganismo que más se ha empleado es *S. cerevisiae*. Otras operaciones sintéticas en que se han usado levaduras son la interconversión de un grupo funcional a otro (por ejemplo compuestos nitrados a aminas, tioéteres a sulfóxidos, oximas a aminas), reacciones de formación de enlaces carbono-carbono y reacciones de cicloadición y condensación.

El desarrollo acelerado de los métodos biocatalíticos, y en particular los que involucran a *Saccharomyces cerevisiae*, hacen difícil cubrir con amplitud todas las aplicaciones que éstos han tenido en los últimos años. A continuación se presentan los avances que se han publicado en las revistas más importantes de química orgánica preparativa de 1995 a la fecha. En las revisiones previas sobre el uso de levaduras de pan en síntesis orgánica y en los libros de "Preparative Biotransformations" y "Asymmetric Synthesis" se puede encontrar información de los años anteriores a 1995<sup>50</sup>.

#### 3.2.1.- Reducción de carbonilos

Sin duda alguna, en los últimos tres años la reacción más estudiada con participación de *S. cerevisiae* ha sido la reducción de carbonilos de cetonas y aldehídos que presentan diferentes sustituyentes y para la preparación de bloques de construcción quirales (homo y poliquirales) según se indica a continuación:

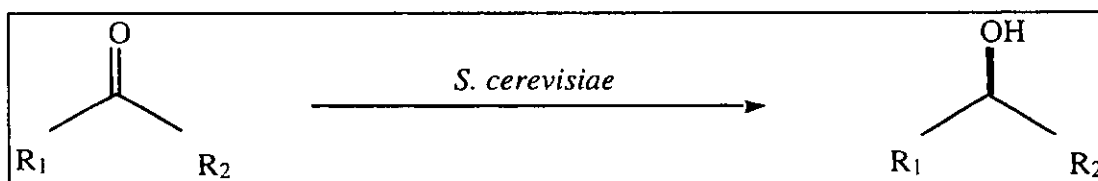


Figura 1. Reducción de carbonilos con *S. cerevisiae*.

Los tipos de cetonas biotransformadas reportadas en este periodo han sido cetonas cíclicas, alicíclicas, aromáticas y heterocíclicas<sup>51-65</sup>, dicetonas<sup>66-70</sup>,  $\alpha,\beta$  y  $\gamma$ -cetoésteres<sup>71-77</sup>,  $\alpha$ -cetonitrilos<sup>77</sup>, carbonilos  $\alpha,\beta$ -no saturados<sup>77-81</sup>,  $\beta$ -cetofosfonatos<sup>80,82</sup>. Por otra parte, sólo se

publicó un trabajo sobre la reducción de aldehídos<sup>83</sup>. En la Figura 2 se presentan las estructuras tanto de los sustratos como de los bioproductos junto con las referencias a estos trabajos.

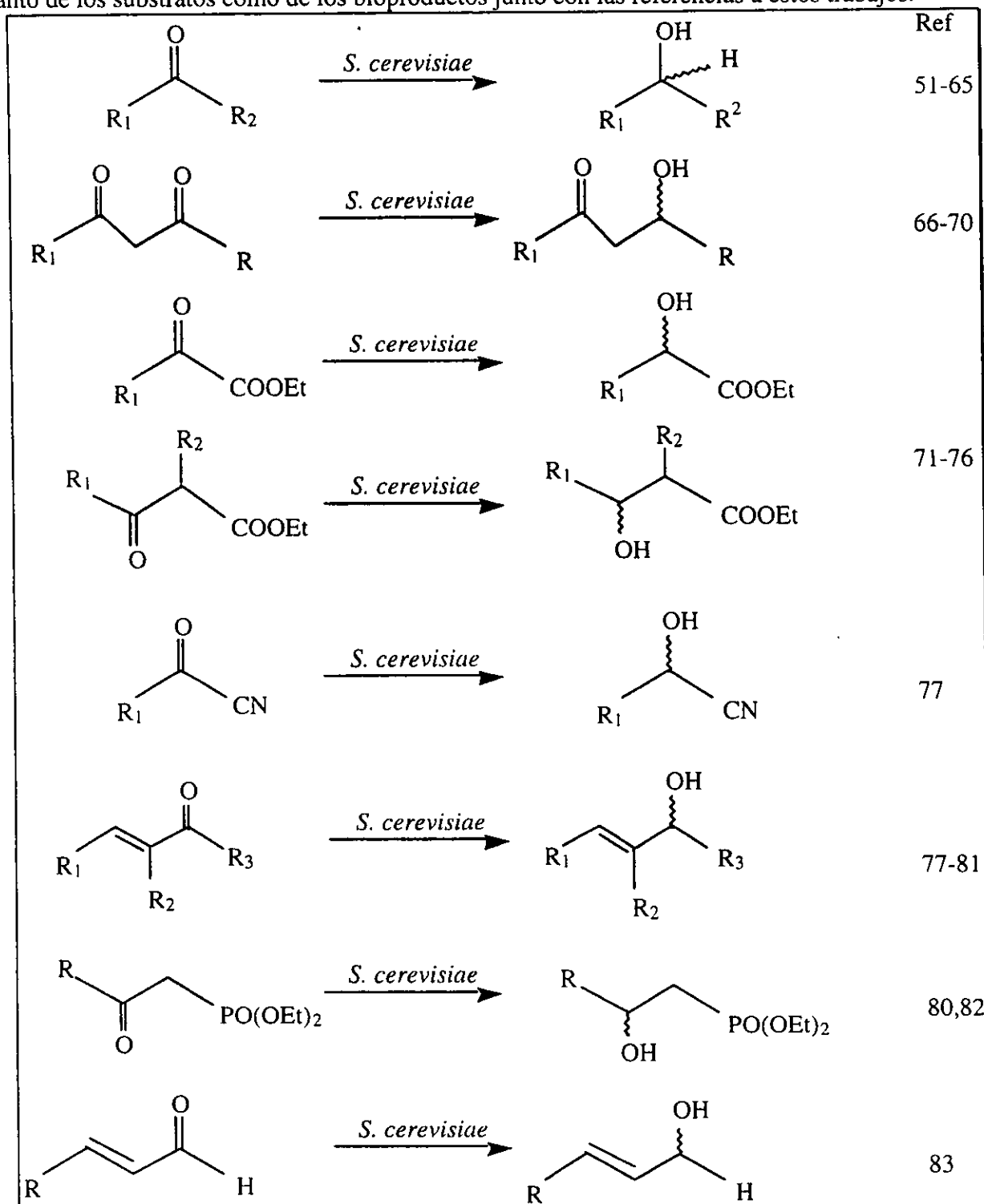


Figura 2. Reducción de carbonilos *S. cerevisiae*.



### 3-2.2.- Biohidrogenación de dobles enlaces carbono-carbono y de nitroalquenos

Otra importante reacción de reducción con *S. cerevisiae* es la saturación de los dobles enlaces carbono-carbono. En los tres años que comprende esta revisión, únicamente se dieron a conocer tres trabajos: el más reciente aborda la reducción del bencilideno de la tiazolidinediona al correspondiente derivado bencílico<sup>84</sup>, otro es la hidrogenación de la 4-(4-hidroxifenil)-2-butenona<sup>85</sup> y el tercero se refiere a la reducción de carbonilos  $\alpha,\beta$ -no saturados donde suceden los siguientes tres eventos: 1) reducción tanto del doble enlace C-O como del C-C, 2) la reducción del carbonilo sin saturación del doble enlace C-C y 3) la hidrogenación del doble enlace sin reducción del carbonilo<sup>86</sup>. En la Figura 3 se ilustran estas tres biotransformaciones.

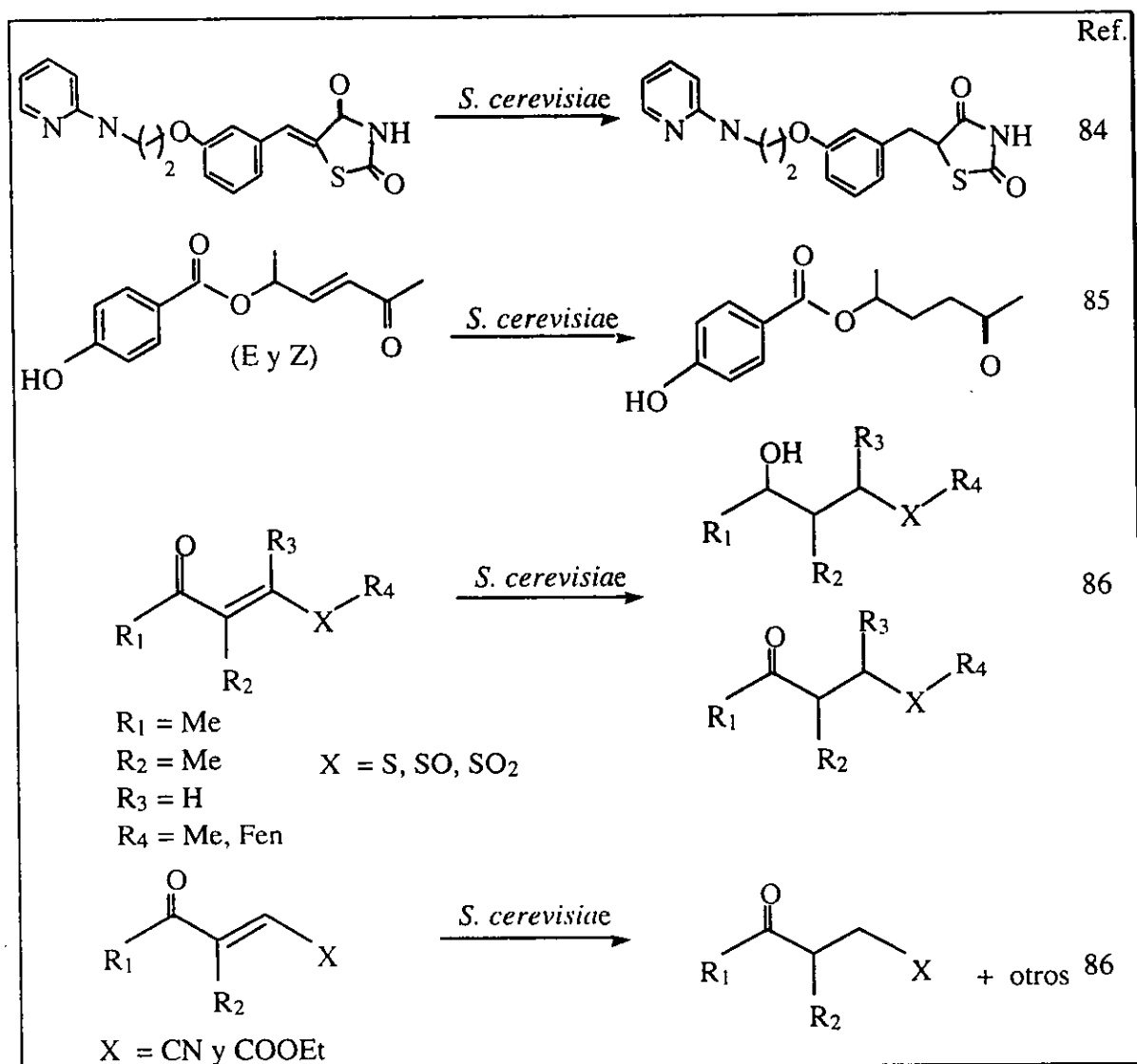


Figura 3. Biohidrogenación de dobles enlaces carbono-carbono con *S. cerevisiae*.

La hidrogenación del grupo nitro o de sus productos intermedios de reducción es otra reacción de interés biocatalizada por *S. cerevisiae* y siguiente a la reducción de carbonilos en términos de importancia.

En la siguiente figura (Fig. 4) se presentan los intermediarios de la reducción del grupo nitro.

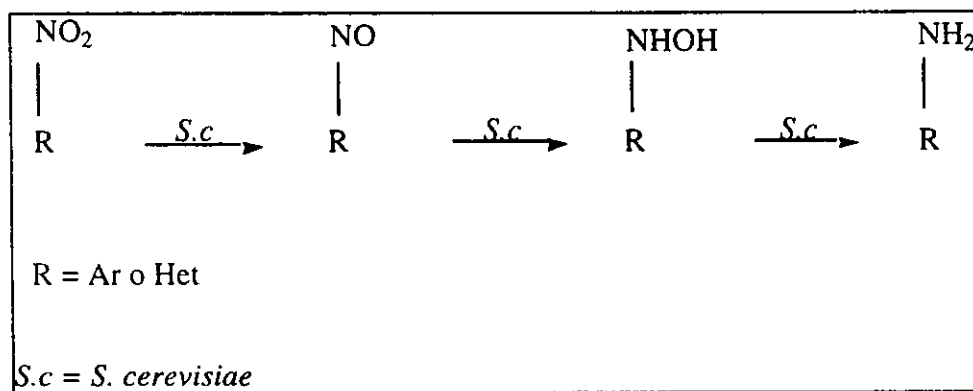


Figura 4. Intermediarios de la reducción del grupo nitro.

Durante estos tres años la transformación de compuestos nitrados fue motivo de seis trabajos; cuatro de ciclización donde los dos primeros se refieren a la ciclización de los 2-nitrocinnamaldehídos y los 1,2-nitrocianoarenos sustituidos a las quinolinas y benzamidas correspondientes<sup>87a-b</sup>, mientras que el tercero y el cuarto se refieren a los 3-nitropropenonitrilos y al colorante o-nitrofenilazo para formar los 5-aminoisoxazoles y los 2-aril-2H-benzotriazoles y sus óxidos respectivamente<sup>88-89</sup>. Los restantes, quinto y sexto, son la biorreducción de los compuestos nitrosos y de los N-óxidos, para formar las anilinas y las piridinas correspondientes<sup>90-91</sup>. La figura 5 resume estas hidrogenaciones.

La Figura 4 también muestra que todos los trabajos se refieren a la reducción de un grupo nitro aromático, a excepción del segundo. La publicación de esta última reacción es resultado de nuestra investigación sobre la biohidrogenación del grupo nitro de un compuesto nitrado  $\alpha,\beta$ -no saturado (los (Z)-3-nitro-2-fenil-3-alkil o aril propenonitrilos), siendo ésta la primera publicación acerca de la reducción de un grupo nitro en un nitroalqueno<sup>88</sup>.

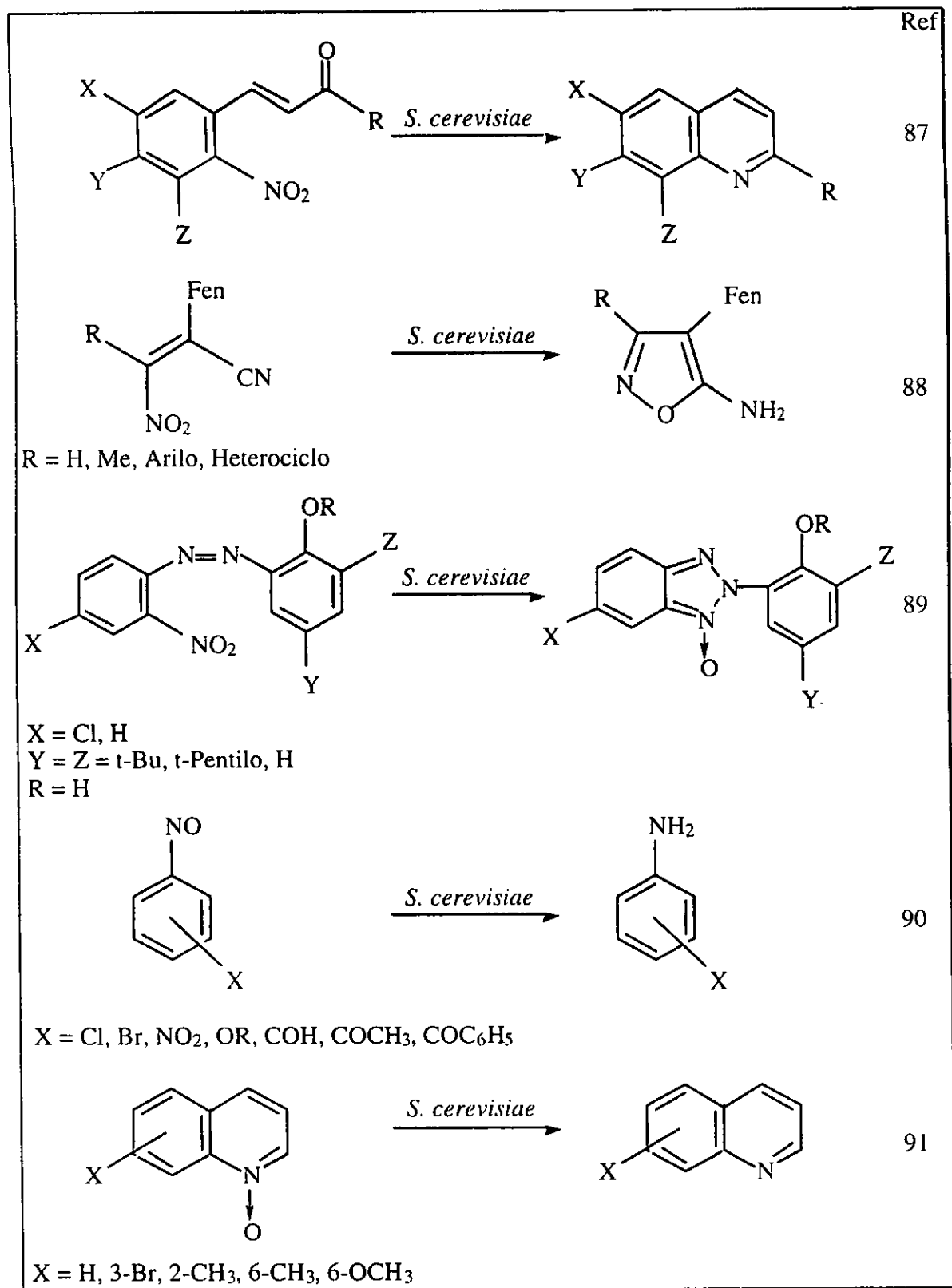


Figura 5. Biohidrogenación de compuestos nitrados con *S. cerevisiae*.

### 3.2.3.-Reducción con *S. cerevisiae* de otros grupos funcionales

Otros grupos funcionales que se han transformado usando la capacidad reductora u oxidante de *S. cerevisiae* son: las biorreducciones de las azidas arílicas a aminas arílicas<sup>92</sup>, la biooxidación de cetonas a lactonas, mejor conocida como reacción de Baeyer-Villiger, la oxidación de ditioles alicíclicos y cíclicos a sulfóxidos y sulfonas y la de sulfuros a sulfóxidos quirales<sup>93-95</sup>.

Finalmente, *S. cerevisiae* también se ha empleado para biocatalizar la reacción de cicloadición de óxidos de nitrilo de arilos con cinamato de etilo y vinilpiridinas, para formar las isoxazolininas correspondientes<sup>96</sup>. En la Figura 6 se presentan las estructuras de los substratos y bioproductos de estas bioconversiones.

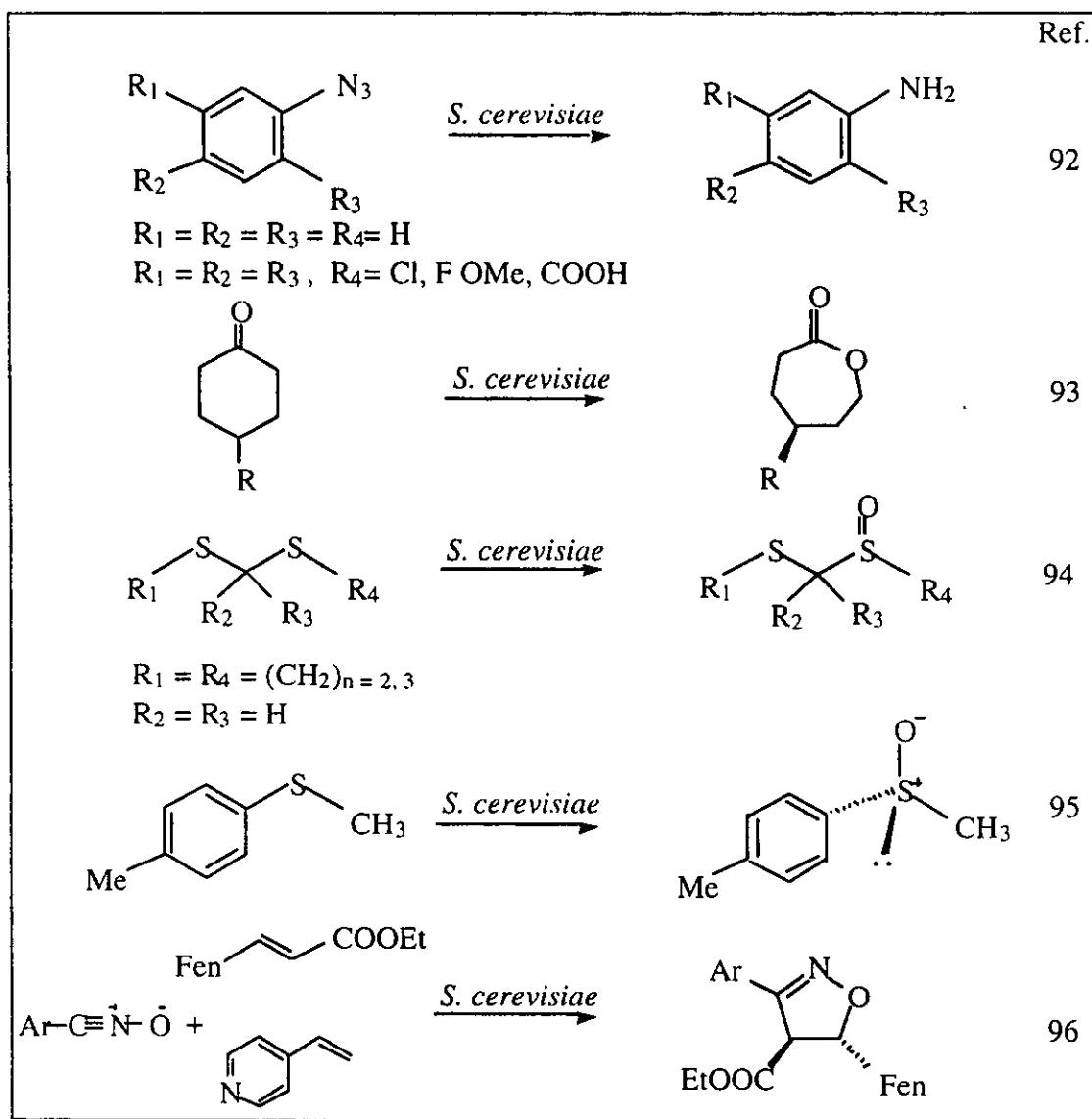


Figura 6. Reducción de otros grupos funcionales con *S. cerevisiae*.

### 3.2.4.- Reducción con otras levaduras

Otras levaduras que se han usado para realizar transformaciones equivalentes a *S. cerevisiae* se muestran en la figura 7 y 8<sup>97-104</sup>. En estas transformaciones al igual que en *S. cerevisiae* se usa la capacidad reductora que se genera en el metabolismo primario. Otra similitud que guardan estos microorganismos con las levaduras de pan es que la reacción que más se ha estudiado y empleado con fines sintéticos es la de reducción estereoselectiva del carbonilo de cetonas para obtener los alcoholes homoquirales correspondientes.

Otras biorreducciones son la hidrogenación de carboxilatos y tiofenocarboxialdehídos a los alcoholes quirales correspondientes, la primera con *Colletotrichum gloeosporoides* y la segunda con levadura comercial de fermentación de cerveza<sup>105-106</sup>.

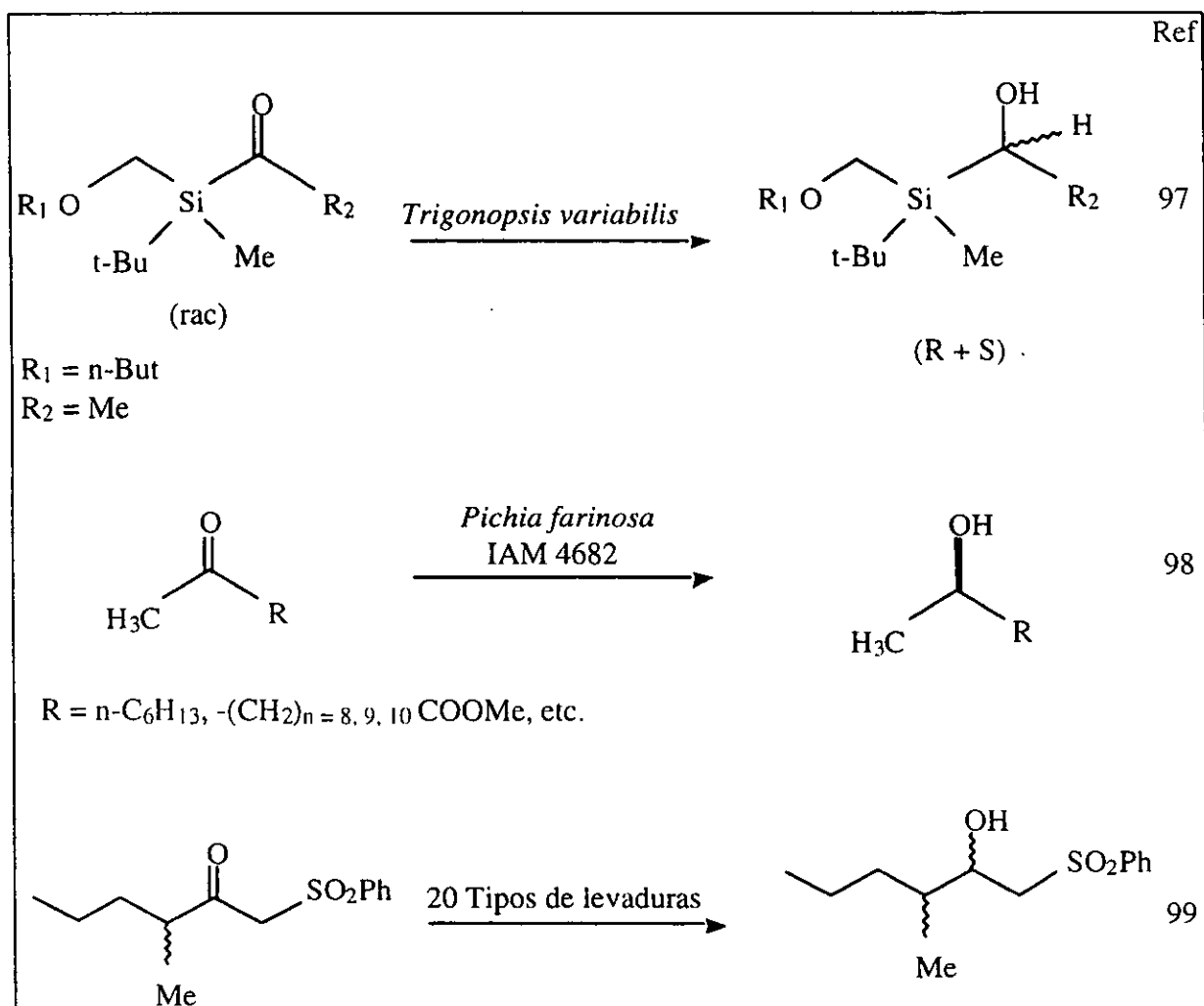


Figura 7. Reducción con diferentes levaduras.

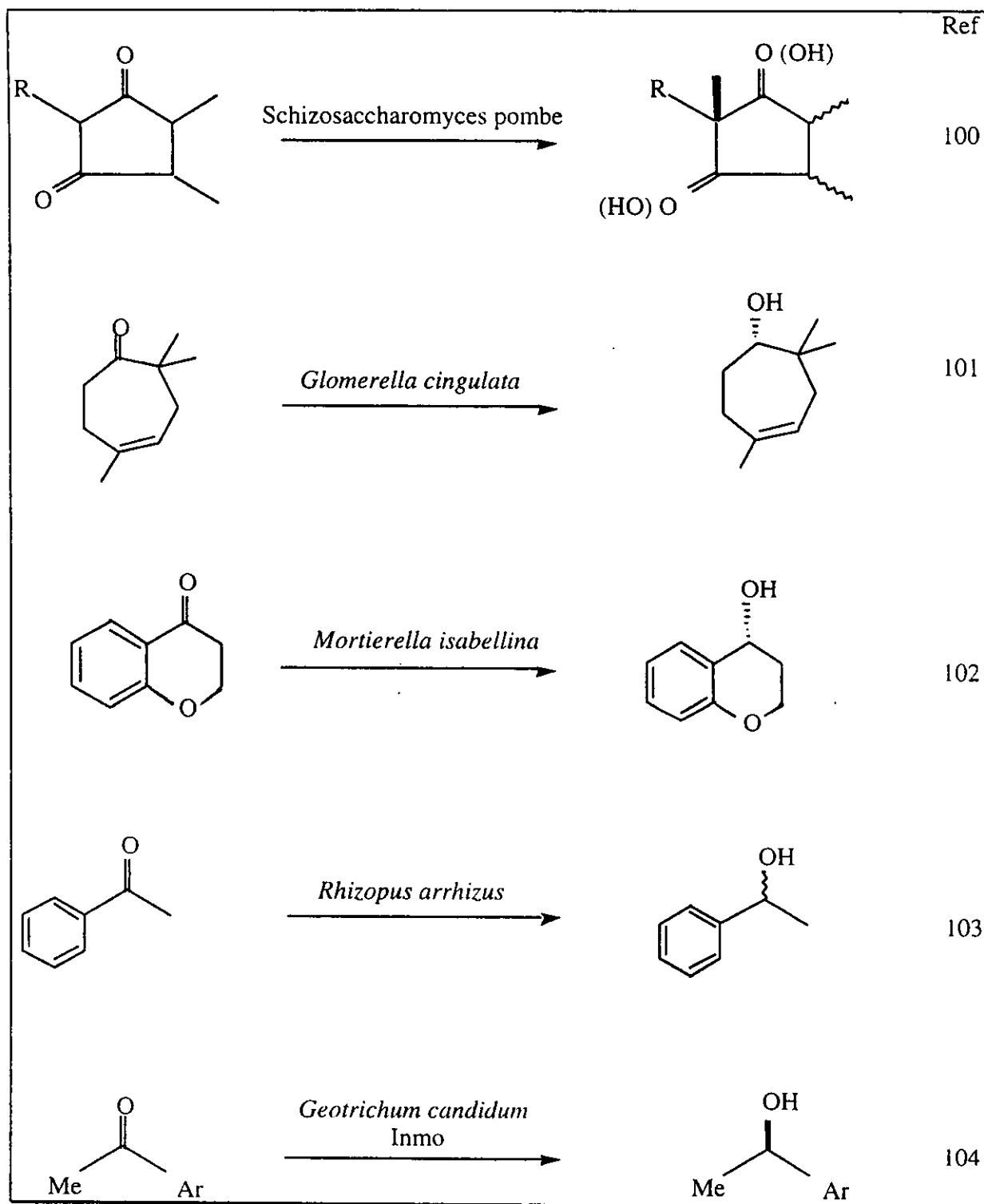


Figura 8. Reducción con diferentes levaduras.

De los usos más importantes que ha tenido *S. cerevisiae* en la síntesis de bloques de construcción

quirales: carbonilos y  $\beta$ -cetoésteres a alcoholes ópticamente activos y la modificación de grupos funcionales, por ejemplo tioéteres y nitroaromáticos a sulfóxidos y aminas aromáticas respectivamente, se desprenden tres hechos importantes. Primero, con respecto a la reducción de grupos nitro la mayoría de los estudios se han enfocado a la biohidrogenación de grupos nitro aromáticos y pocos a la de nitro alifáticos; segundo, pocos son los que su objetivo principal ha sido usar la biohidrogenación de los compuestos nitrados para preparar bloques de construcción, puesto que la mayoría se refieren únicamente al estudio de la reducción *per se*; tercero, sólo un número reducido de trabajos publicados utilizaron a *S. cerevisiae* para sintetizar heterociclos. Otro hecho adicional importante al que no se ha puesto mucha atención es que pocas son las investigaciones que han propuesto un substrato modelo estereoelectrónico susceptible de dar la reacción de biohidrogenación. Los puntos anteriormente descritos ofrecieron, en parte, la pauta para plantear como objetivo principal de este trabajo el uso sistemático de *S. cerevisiae* y compuestos nitrados alifáticos para preparar diversos bloques de construcción acíclicos y heterocíclicos y al mismo tiempo proponer y probar un modelo estereoquímico y electrónico capaz de dar la reacción de biohidrogenación con *S. cerevisiae*.

### **3.3.- Síntesis de los nitroalquenonitrilos y su empleo en síntesis orgánica**

Los compuestos nitrados son más bien escasos como productos naturales. La actividad biológica de los pocos que se conocen incluyen acción como bactericida, fungicida, herbicida o de defensa contra insectos. Más ejemplos se pueden encontrar en las referencias de Bauer<sup>107</sup>.

Sin embargo, los compuestos nitrados, principalmente los aromáticos, son de gran importancia industrial, ya que se utilizan como materias primas para la elaboración de colorantes, fármacos, explosivos, disolventes, agroquímicos, etc. Este no es el caso para los nitrados alifáticos, debido en gran parte a que su química no se ha estudiado tan extensamente como la de los aromáticos<sup>108</sup>.

Es conocido que el objetivo fundamental de la síntesis orgánica es la construcción de arquitecturas moleculares complejas a partir de moléculas simples. Idealmente, la síntesis de una molécula aislada de una fuente natural u obtenida mediante un proceso químico debe realizarse a partir de materias primas abundantes y baratas, con poco o nulo impacto ambiental, con una relación recursos-operación económicamente factible, además de que el proceso debe llevarse a cabo rápidamente y con altos rendimientos.

En los últimos años los compuestos nitrados alifáticos han adquirido gran relevancia en la síntesis de compuestos químicos, debido principalmente a que ya se han estudiado en detalle los mecanismos de reacción involucrados en su formación. Los resultados de estos trabajos han

permitido diseñar nuevos métodos y mejorar los ya conocidos<sup>109</sup>, así mismo, han dado la oportunidad de conocer los mecanismos de interconversión en otros grupos funcionales y su capacidad para formar enlaces carbono-carbono con una buena estereoselectividad<sup>110</sup>.

La química de los compuestos nitrados alifáticos es importante en síntesis debido básicamente a tres aspectos; se dispone de varios métodos para prepararlos, se pueden interconvertir en casi todos los grupos funcionales y debido a su doble reactividad pueden actuar como electrófilos o nucleófilos, lo que les permite formar enlaces carbono-carbono en una gran variedad de formas.

A continuación, se describen los avances más recientes en los métodos de síntesis y de interconversiones en otros grupos funcionales de este importante grupo de compuestos orgánicos, con un enfoque a los nitroalquenonitrilos. Barret<sup>111</sup> ha resumido de manera excelente los avances en la preparación y uso en síntesis de los nitrados saturados y no saturados.

### Preparación de los nitroalquenonitrilos

La preparación de los nitroalquenonitrilos, al contrario de los nitroalquenos, ha sido poco estudiada; el método más común consiste en la nitración de alquenos con óxidos de nitrógeno o bien con agentes nitrantes derivados de éstos.

El 3-nitropropenonitrilo se ha preparado mediante la nitración con cloruro de nitrilo ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ) del acrilonitrilo para formar primero el cloronitroalcano; el cual, por tratamiento con acetato de sodio forma el 3-nitropropenonitrilo con buenos rendimientos<sup>112</sup>.

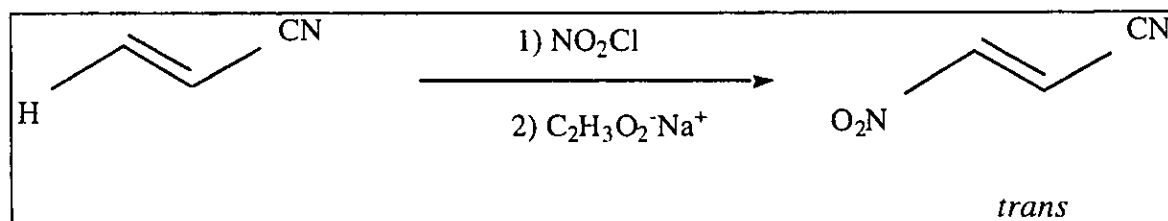


Figura 9. Nitración del acrilonitrilo con cloruro de nitrilo.

Este compuesto se ha empleado como dipolarófilo en las reacciones de cicloadición 1,3<sup>113</sup>.

Los 3-nitro-3-alkil-2-arylpropenonitrilos sustituidos son otros nitroalquenonitrilos conocidos que pueden ser sintetizados a partir de los 3-alkil-2-arylpropenonitrilos<sup>114</sup> mediante la nitración con dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2 = \text{N}_2\text{O}_4$ ) a 0-5 °C .



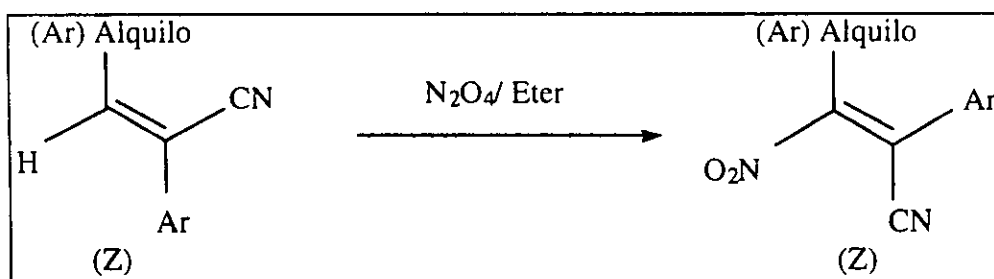


Figura 10. Nitración con óxidos de nitrógeno de los propenenitrilos.

Otros compuestos que contienen la unidad estructural de los 3-nitropropenenitrilos son los 2-nitro-1-benzonitrilos sustituidos, que se han preparado ya sea por la nitración directa de los benconitrilos o mediante la adición nucleofílica del ión cianuro a compuestos heterocíclicos nitrados. En la Figura 11 se dan dos ejemplos de este tipo de reacciones<sup>115</sup>.

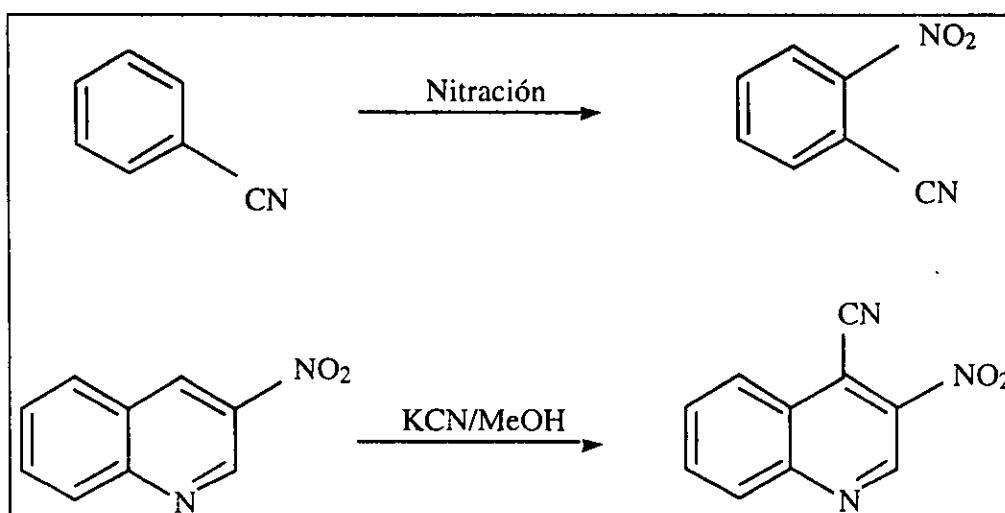


Figura 11. Preparación de 1,2-cianonitroaromáticos.

Otros compuestos 1,2-cianonitrados se sintetizaron por medio de varios pasos, como en el caso de los 4(5)-nitro-5(4)cianoimidazoles<sup>116</sup>.

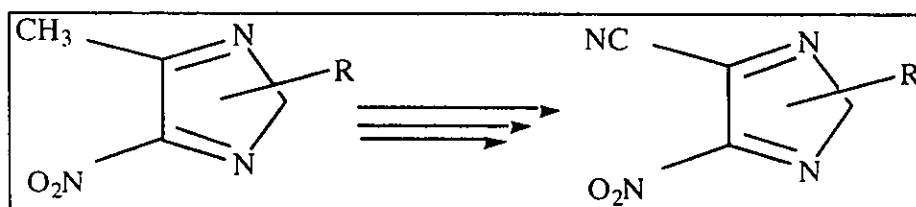


Figura 12. Síntesis de nitrocianoimidazoles.

### 3.4.- Empleo de los nitroalquenonitrilos en síntesis orgánica.

Si bien es cierto que los mononitroalquenos son ampliamente usados en síntesis orgánica, los nitroalquenos con otros grupos funcionales colocados en el mismo carbono o en carbonos adyacentes se han empleado en menor medida. En particular los 3-nitropropenonitrilos sustituidos se han utilizado como materias primas en la síntesis de algunos objetivos moleculares.

Los usos más importantes de los 3-nitroalquenonitrilos incluyen 5-aminoisoxazoles **1**<sup>117</sup>, pirazolinas **2**<sup>118</sup>, β-lactamas **3**<sup>119</sup>, isoxazolidinas **4**<sup>120</sup>, (Figura 11). Otros compuestos que se han preparado son los heterociclos oxazinomicina<sup>121</sup> y 3-alkilpiridinas<sup>122</sup>. Por otra parte, los 1,2-nitronitrilos aromáticos también se han usado para sintetizar dihidropiridinas<sup>123</sup>, así como 5-aminoisoxazoles adyacentes a un heterociclo<sup>124</sup>. Las estructuras de estos ciclos se encuentran en la sección de uso de isoxazoles en síntesis (pág.27 ).

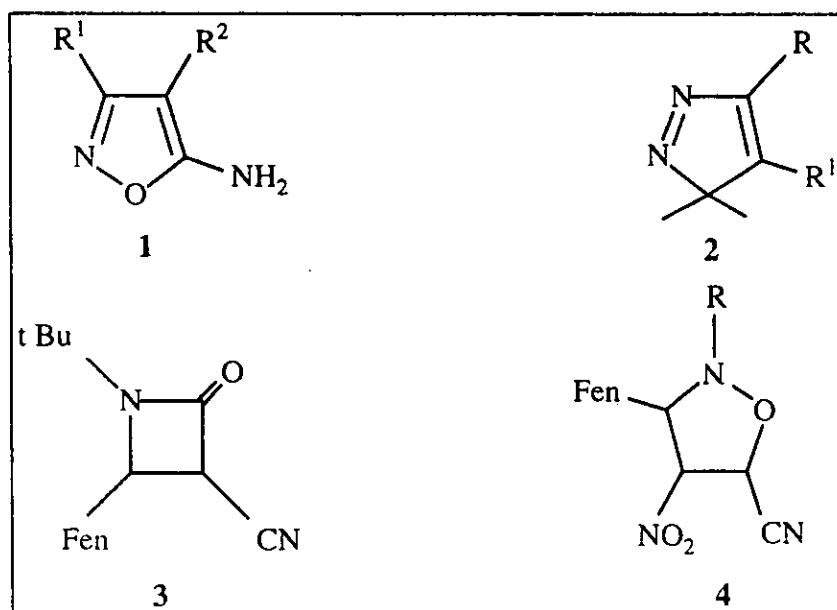


Figura 13. Usos de los 3-nitroalquenonitrilos en síntesis.

La revisión de los usos que han tenido los nitrocianoalquenos en síntesis muestra que, no obstante presentar una doble funcionalidad y que los métodos para transformarlos a otros grupos funcionales están bien establecidos, las ventajas que ofrecen no han sido bien explotadas. Un factor limitante es que los métodos para sintetizarlos no son de uso común, lo que nos habla de la necesidad de desarrollar nuevos agentes nitrantes para preparar y posteriormente explotar las potencialidades ofrecidas.

Recientemente Navarro-Ocaña *et al* diseñaron un nuevo agente nitrante para nitrar dobles enlaces C-C de productos naturales y de propenonitrilos sustituidos con buenos rendimientos<sup>125</sup>. En el

presente trabajo se fijó como un objetivo adicional a la síntesis de bloques de construcción extender las aplicaciones del nuevo agente nitrante a la preparación de otros nuevos cianonitroalquenos.

### 3.4.- Métodos de obtención y empleo de los 5-aminoisoxazoles en química orgánica

#### Métodos de Obtención de 5-aminoisoxazoles

En 1972 Lednicer<sup>126</sup> introduce el concepto de la funcionalidad latente en heterociclos y Meyers<sup>127</sup> publica su popular libro " Heterocycles in Organic Synthesis". Con esto se inicia una nueva era en la química heterocíclica, debido al vasto potencial que presentan estos compuestos para la síntesis de moléculas más complejas.

Los heterociclos llamados isoxazoles son comunes en estructuras de compuestos medicinales y en productos naturales ó químicos. En particular los 5-aminoisoxazoles son importantes intermediarios debido a que son precursores de algunos fármacos, y de otras moléculas con interesantes propiedades biológicas. Los 5-aminoisoxazoles son una forma enmascarada de los compuestos 1,3-dicarbonílicos, los cuales son importantes intermediarios en síntesis de materias primas para la preparación de aziridinas. También forman parte del esqueleto de productos naturales como por ejemplo la vitamina B-12, pirimidinas, piridinas y derivados del furano<sup>128</sup>.

La Figura 12 muestra las rutas más comunes para preparar este importante grupo de heterociclos.

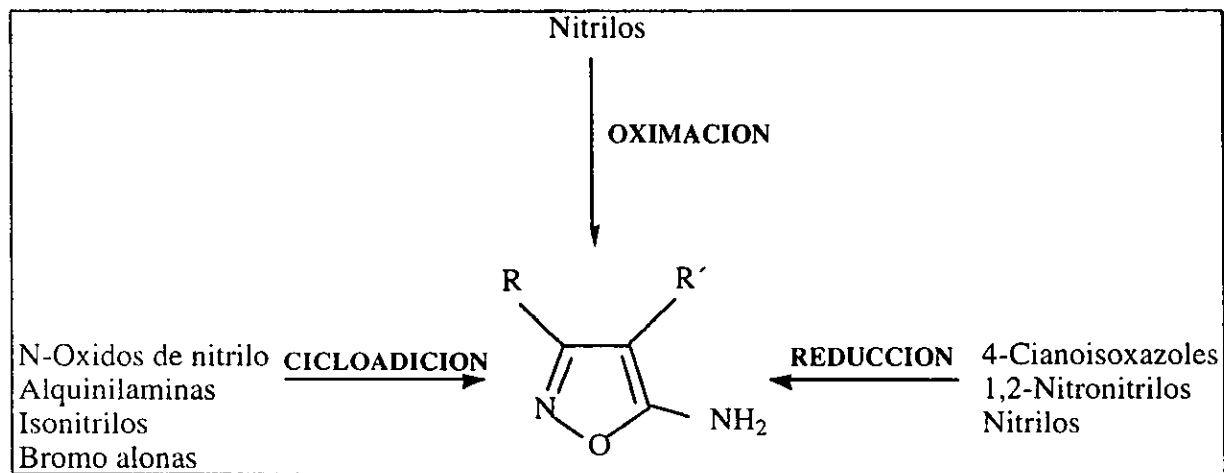


Figura 14. Métodos generales de síntesis de 5-aminoisoxazoles.

#### Metodos de Oximación

A continuación se presentan los métodos descritos para la síntesis de 5-aminoisoxazoles, empleando la reacción de oximación de nitrilos  $\alpha,\beta$ - sustituidos con hidroxilamina (Figura 15 y

16).

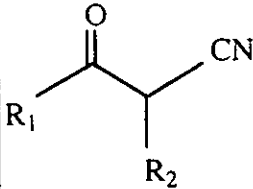
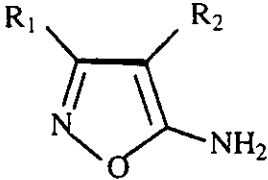
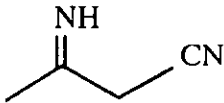
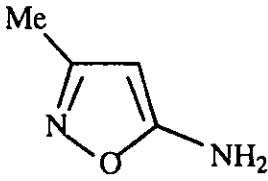
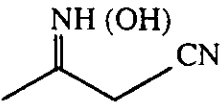
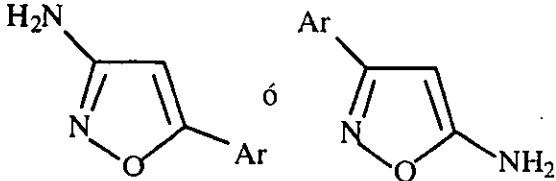
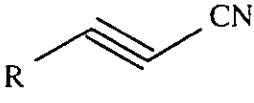
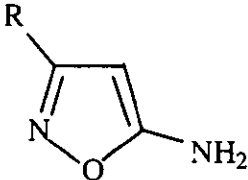
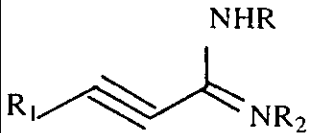
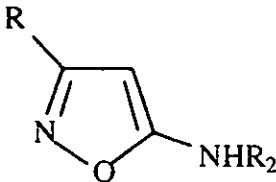
Materia prima	Producto	Ref
		129-139
		140
		141
		142
		143

Figura 15. Preparación de 5-aminoisoxazoles por oximación.

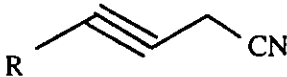
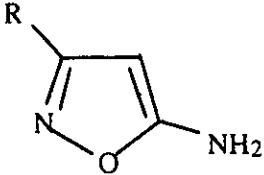
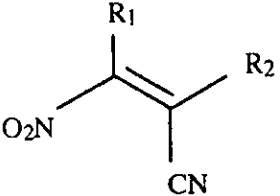
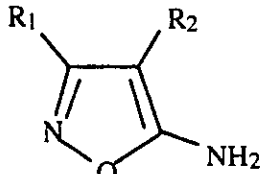
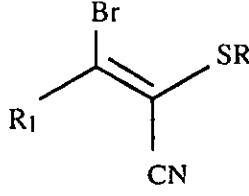
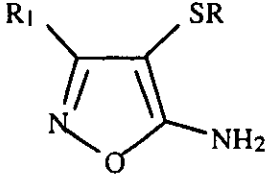
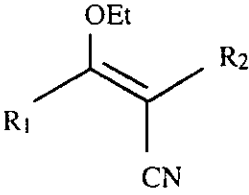
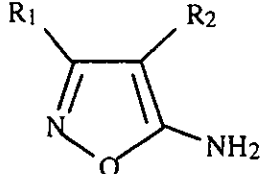
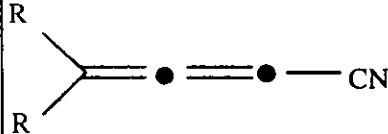
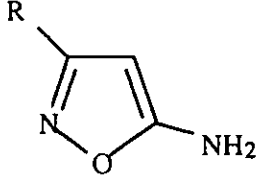
Materia prima	Producto	Ref
		144
		145
		146
		147
		148

Figura 16. Síntesis de 5-aminoisoxazoles por oximación de nitrilos.

### Métodos de reducción y rearreglos

Otros procedimientos desarrollados para la síntesis de 5-aminoisoxazoles, que hacen uso de reacciones de reducción o de rearreglos, son los que se presentan en la Figura 17.

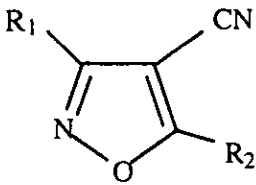
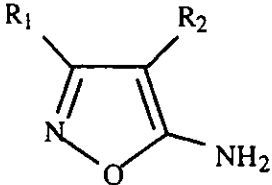
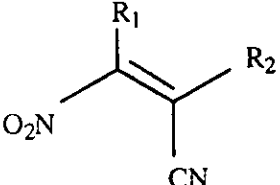
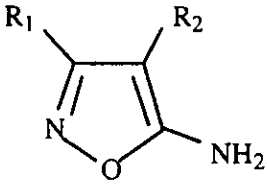
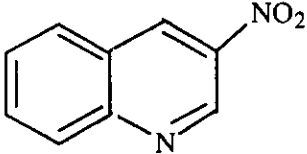
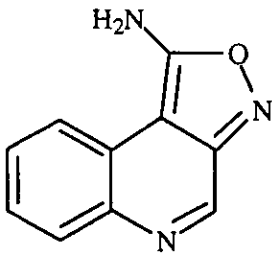
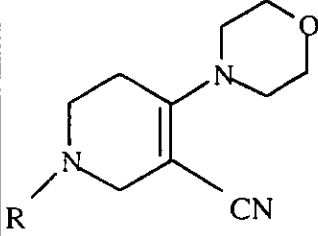
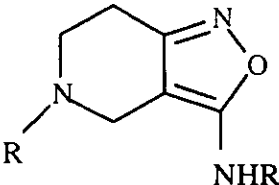
Materia prima	Producto	Ref
		149
		150-152
		153
		154a

Figura 17. Obtención de 5-aminoisoxazoles por reducción.

### Métodos que emplean reacciones de adición.

Los 5-aminoisoxazoles también se han sintetizado mediante reacciones de cicloadición como se muestra en la siguiente figura.

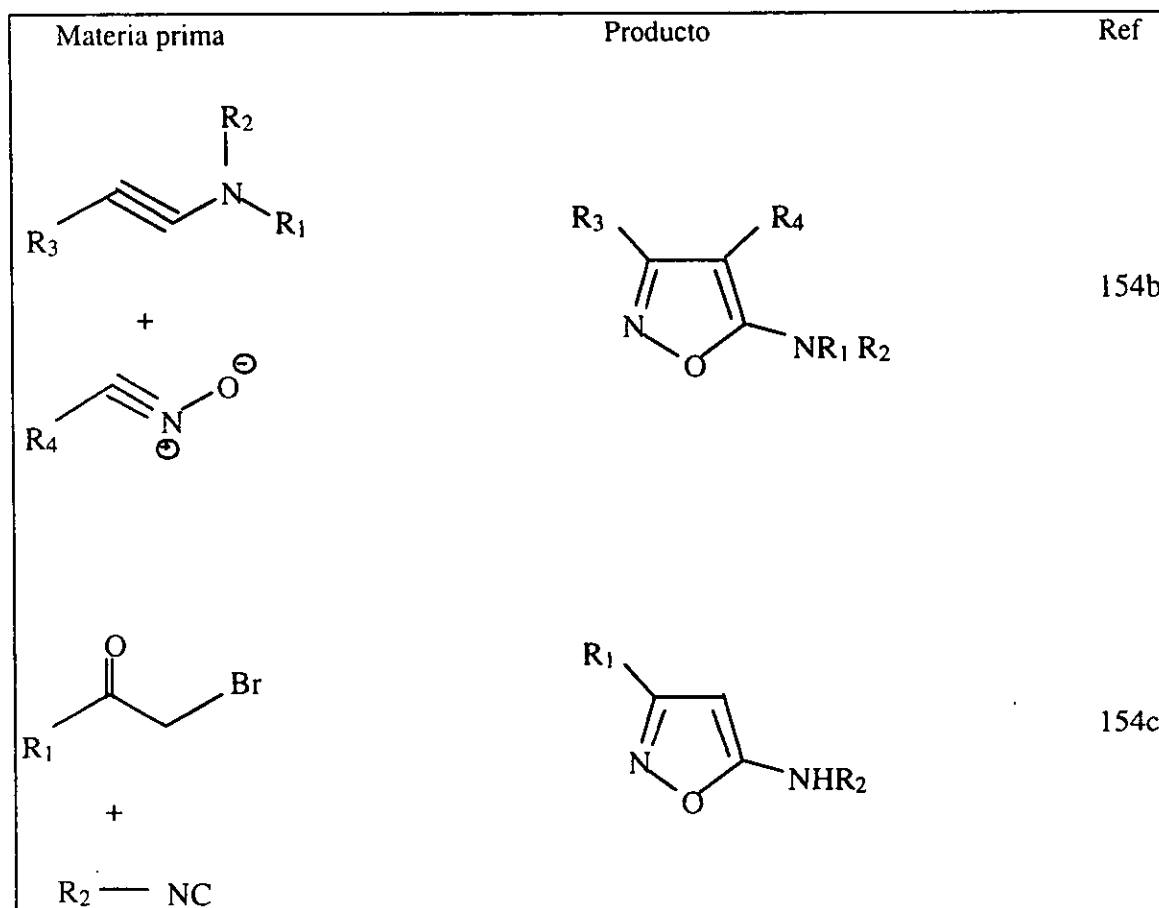


Figura 18. 5-Aminoisoxazoles obtenidos mediante reacciones de cicloadición.

### Empleo de los 5-aminoisoxazoles en química orgánica

El estudio de la transformación de los anillos de los compuestos heterocíclicos ha sido uno de los más interesantes y fascinantes tópicos desde los primeros días de la química orgánica<sup>155</sup>.

La modificación del anillo de los isoxazoles permite proveer de materias primas (bloques de construcción) para la síntesis de moléculas complejas. Los isoxazoles son importantes bloques de construcción por las siguientes razones. Primero, existen métodos sencillos y eficientes para prepararlos. Segundo, pueden ser modificados convenientemente a otras estructuras simples pero muy funcionalizadas. Tercero, la presencia de sustituyentes adecuados hacen que el anillo se conserve en una gran variedad de condiciones de reacción, mientras que otras partes de la molécula se puedan modificar con cierta facilidad. En este sentido la labilidad del enlace

nitrógeno-oxígeno a las reducciones químicas o catalíticas permite obtener otras funcionalidades. La reacción que más se ha estudiado para hacer útiles a los izoxazoles en síntesis orgánica es la de apertura, que se ha hecho tanto química como térmica y fotoquímicamente. En la Figura 19 se presentan los métodos más importantes para realizar esta transformación.

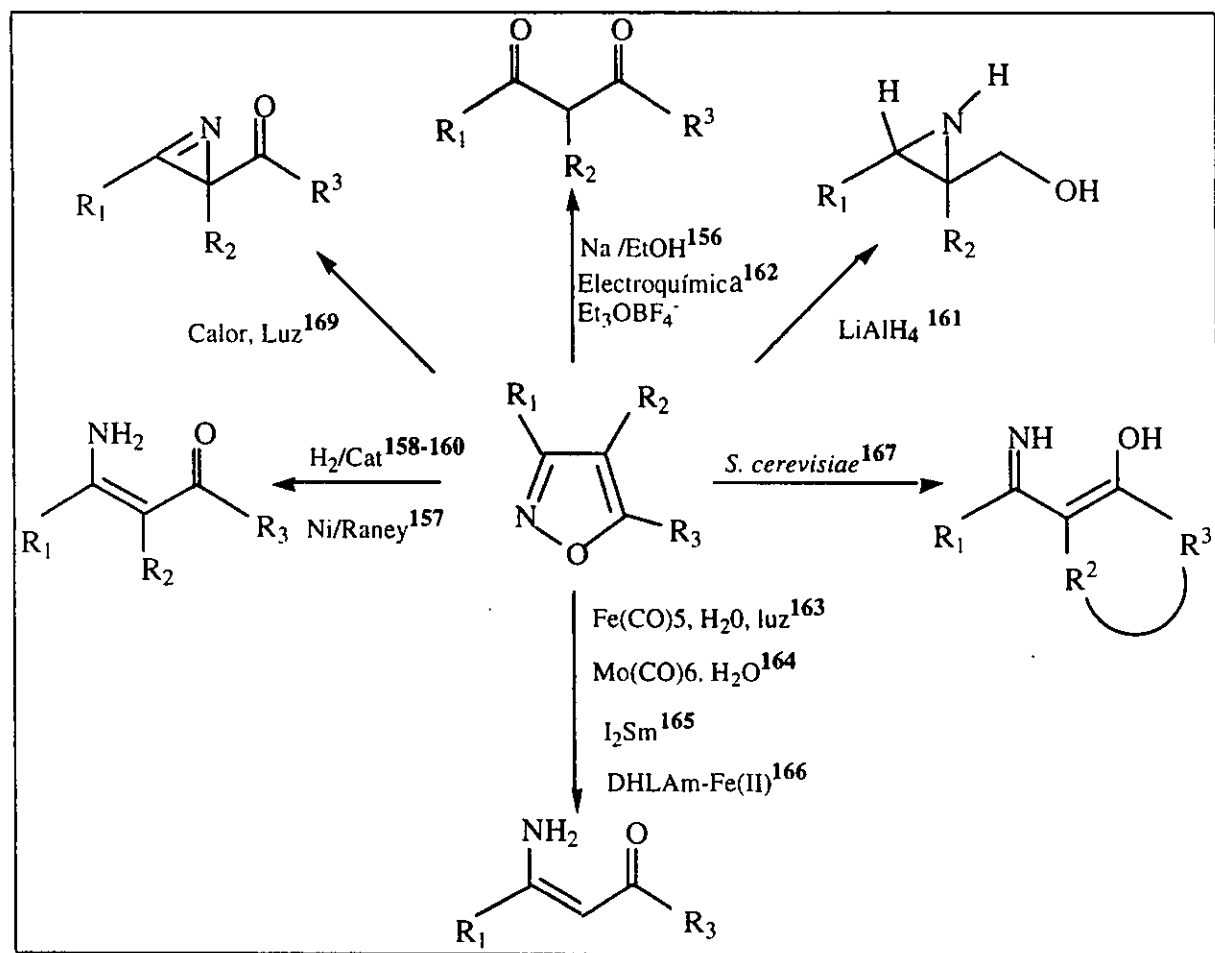


Figura 19. Usos de los isoxazoles.

Si bien es cierto que se dispone de un buen número de procedimientos para llevar a cabo la apertura de isoxazoles sustituidos, no es la misma situación que se presenta para los 5-aminoisoxazoles, los que en teoría podrían dar productos de apertura químicamente equivalentes a las β-cetoiminas, las 1,3-dicetonas y los β-cetoésteres productos de la ruptura del enlace N-O de algunos isoxazoles sustituidos.

Hoy día no se dispone de un método general para la apertura directa de los 5-aminoisoxazoles; sin embargo, en los últimos años éstos se han empleado, quizá de manera no tan intensiva como



los isoxazoles sustituidos, en la preparaci3n de algunos grupos de mol3culas importantes.

El uso m3s com3n de los 5-aminoisoxazoles en s3ntesis org3nica es en la preparaci3n de 1-azirinas sustituidas o de sus derivados, empleados como materias primas para la s3ntesis de las aziridinas, las cuales tienen importantes propiedades biol3gicas<sup>168</sup>.

Los 5-aminoisoxazoles se transforman de manera t3rmica 6 fotoqu3mica a las 2-carboxamidas-2H-azirinas, tanto sustituidas como libres, bajo condiciones controladas<sup>169</sup>.

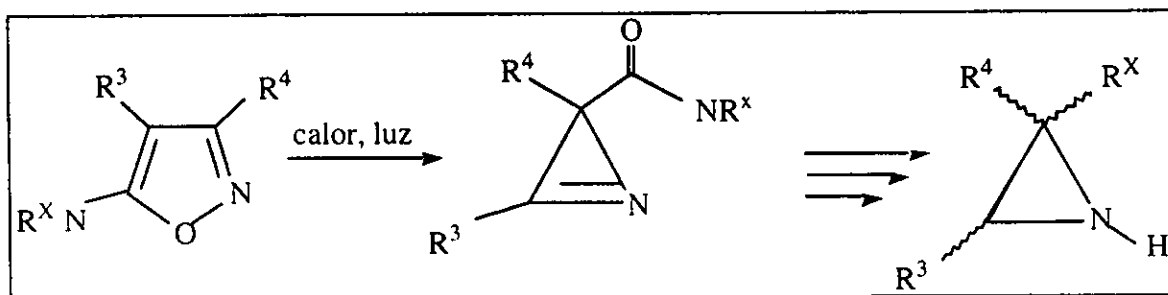


Figura 20. Transformaci3n t3rmica y fotoqu3mica de 5-aminoisoxazoles.

Los 5-amino-3-arilisoxazoles y los 5-amino-3-aril-4-metilisoxazoles sufren reacciones de dimerizaci3n y rearrreglos al calentarse a 150-200 0C. Estas transformaciones dan como productos principales las 2,5-dicarboxiamidas-3,6-diarilpirazinas y las 4-aril-5-metil-Δ<sup>4</sup>-imidazolin-2-onas respectivamente, con bajos rendimientos<sup>170</sup>.

Otra reacci3n relacionada con las anteriores resulta del calentamiento de 5-aminoisoxazoles con trietilfosfito en condiciones de reflujo para dar los dietil-3-carboxamidos-2-aril-2-aziridinafosfonatos con buenos rendimientos<sup>171</sup>.

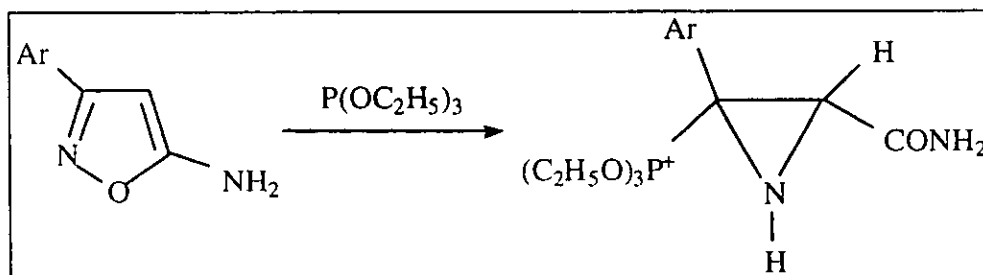


Figura 21. Reacci3n de 5-aminoisoxazoles con trietilfosfito.

A continuaci3n se presentan otros estudios que dan cuenta de la importancia que tienen los 5-aminoisoxazoles para prop3sitos de s3ntesis de estructuras moleculares de inter3s en diferentes 3reas.

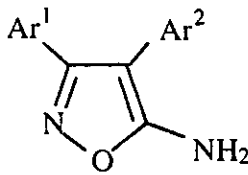
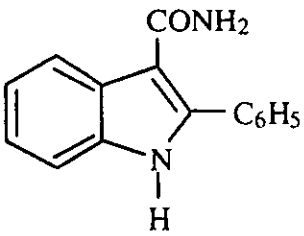
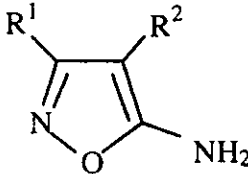
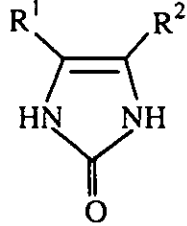
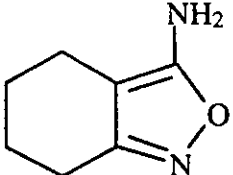
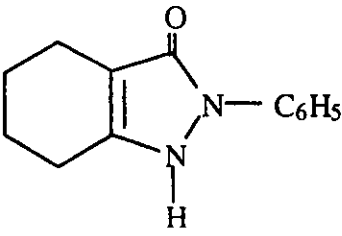
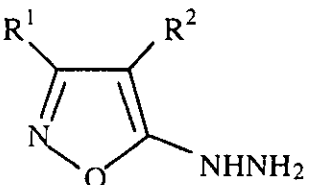
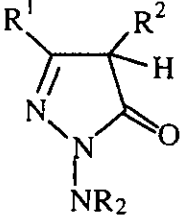
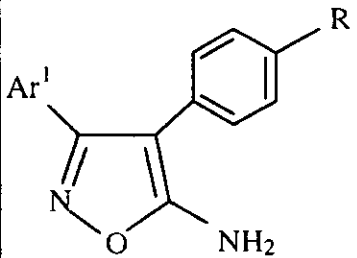
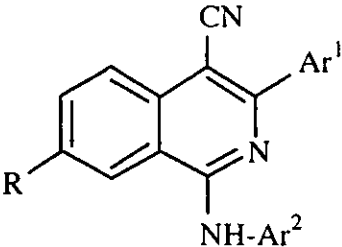
Materia prima	Producto	Ref
		172
		173-174
		175
		176
		177

Figura 22. Síntesis con 5-aminoisoxazoles.

Materia prima	Producto	Ref
		178
		179
		180-181
	182	
$R - C \equiv C - R^1$	183	

Figura 23. Síntesis con 5-aminoisoxazoles.

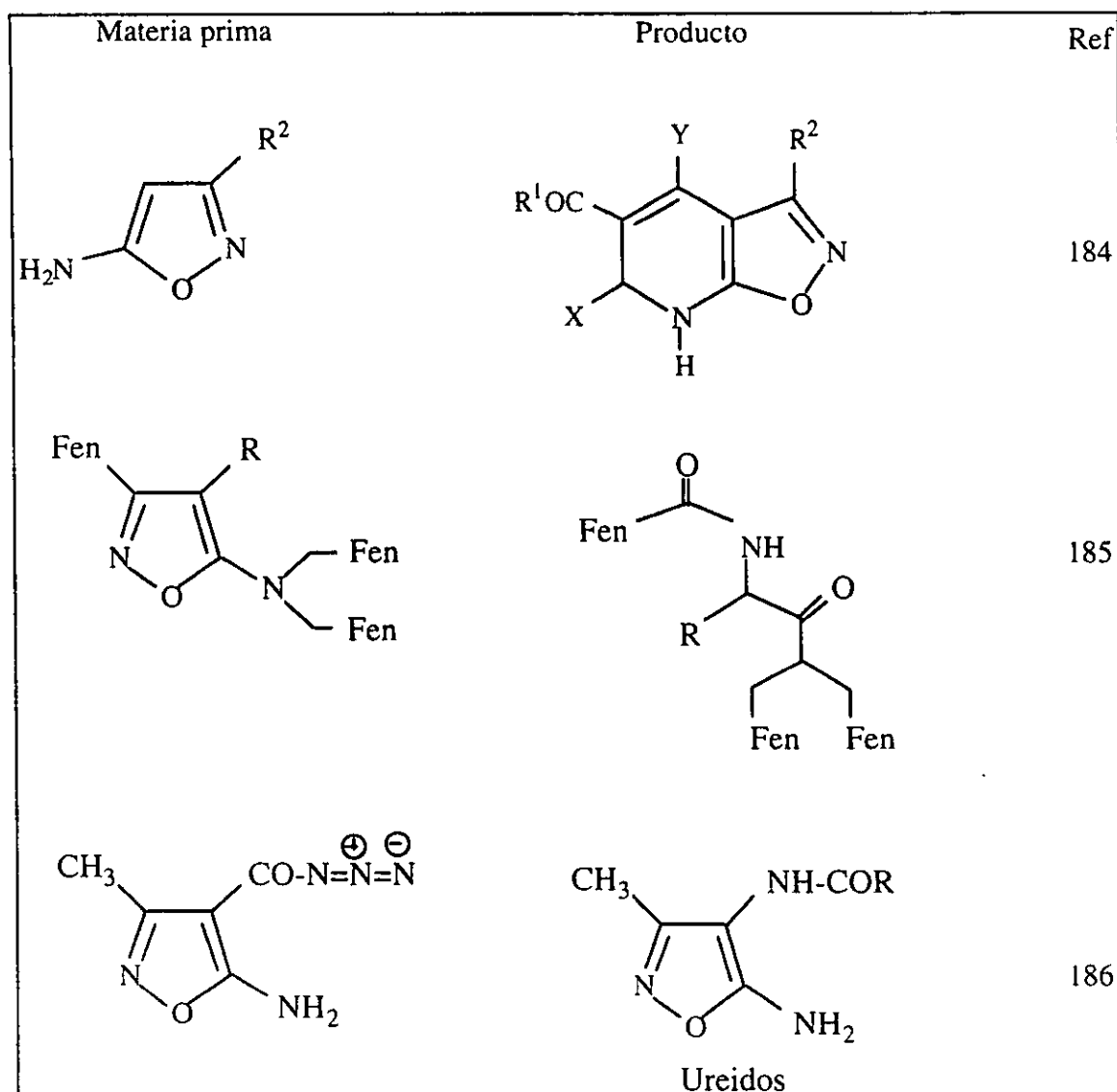


Figura 24. Síntesis con 5-aminoisoxazoles.

Después de haber revisado las estrategias conocidas para preparar 5-aminoisoxazoles y su empleo como materias primas para la síntesis de varios objetivos moleculares, encontramos que todos los métodos hasta ahora publicados se basan en procesos químicos y ninguno en métodos biocatalíticos, no obstante las ventajas que éstos ofrecen. Una posible explicación es que la comunidad de químicos sintéticos, en particular los que se dedican a la química heterocíclica, no están familiarizados con esta nueva biotecnología. El presente trabajo ofrece la oportunidad de contribuir a desarrollar y difundir ésta nueva herramienta de síntesis. Por otro lado, resulta de la

revisión que los 5-aminoisoxazoles se han usado para preparar un número considerable de objetivos moleculares. Un punto importante es que la mayoría de los 5-aminoisoxazoles usados no tienen sustituyentes susceptibles de funcionalizarse; este hecho explica en parte por qué no se han empleado tan intensivamente como otros isoxazoles. Debido a su alta selectividad los métodos biocatalíticos se presentan como un alternativa recomendable para preparar 5-aminoisoxazoles con grupos funcionales reactivos en las condiciones de reacción usadas.

### 3.5.- Obtención y usos de las 2-carboxiamidas-2H-azirinas en síntesis

#### Obtención de las 2-carboxiamidas-2H-azirinas.

Hoy en día se dispone de varios métodos para sintetizar azirinas como la reacción modificada de Neber, termólisis y fotólisis de azidas vinílicas y de isoxazoles y termólisis de oxazafosfolinas. Existen otros métodos para la síntesis de este importante grupo de heterocícl<sup>187</sup>. Por otra lado, es conocido que las azirinas como tales se han usado para la síntesis de otros intermediarios sintéticos importantes, como las aziridinas o los aminoácidos, pero también es cierto que las azirinas sustituidas se han empleado para preparar objetivos moleculares importantes como los que se presentan en la figura 30.

Dentro de las azirinas sustituidas las 2-carboxiamidas-2H-Azirinas son un grupo importante. Su síntesis ha demostrado la versatilidad de estos ciclos y también han ofrecido la oportunidad de vislumbrar el desarrollo de nuevas estrategias sintéticas. En el presente se está estudiando intensivamente a este grupo de heterocícl<sup>187</sup> con el fin de ampliar su utilidad en síntesis orgánica. A continuación se presentan los métodos más importantes de síntesis y los usos más relevantes.

En la década de los setentas Nishiwaki<sup>188</sup> preparó 2,3-diaril-2-carboxiamidas-2H-azirinas mediante el calentamiento de los 5-amino-3,4-diarilisoxazoles con un disolvente de alto punto de ebullición y controlando cuidadosamente las condiciones experimentales para evitar la descomposición de las azirinas.

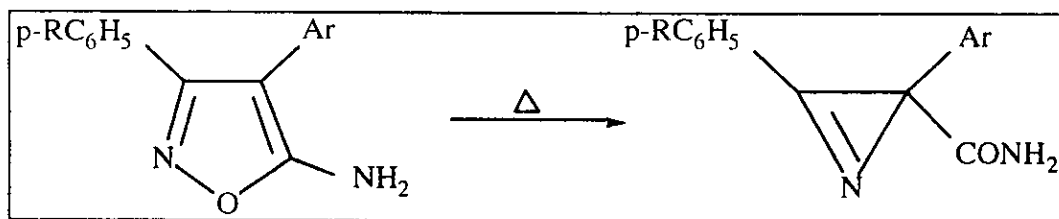


Figura 25. Transformación térmica de los 5-aminoisoxazoles.

Otro método de síntesis fue reportado por Bestman<sup>189</sup> en el cual hace reaccionar los óxidos de nitrilo con los iluros de fósforo.

Las carbonil-2H-azirinas y las carboxilatos-2H-azirinas son otros dos grupo de compuestos análogos a las 2,3-diaril-2-carboxamidas-2H-azirinas. Los que contienen el grupo carbonilo se han preparado por la fotociclización intramolecular de los isoxazoles y su formación depende de la longitud de onda de la irradiación; longitudes de onda > 300 nm son adecuadas<sup>190</sup>.

Los carboxilatos se han preparado mediante la termólisis o fotólisis de isoxazoles como los que se muestran en la siguiente figura<sup>191</sup>.

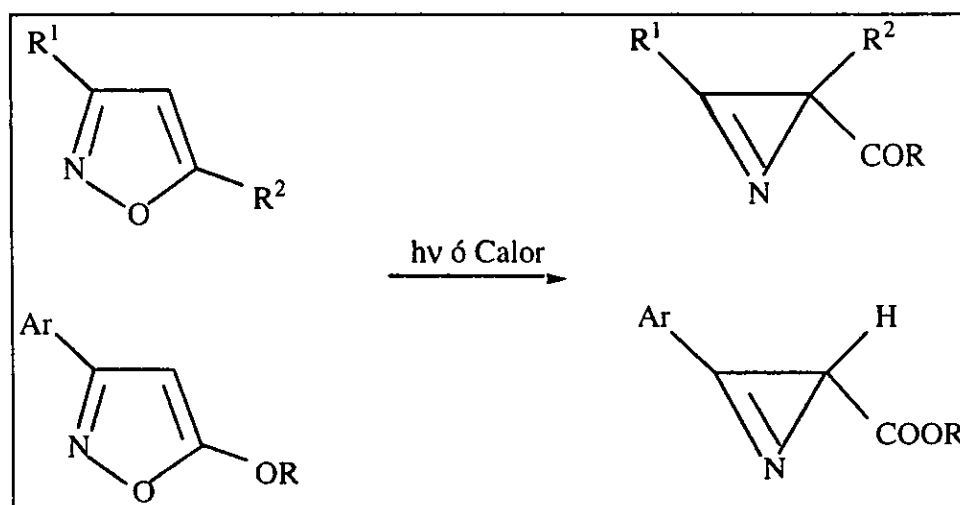


Figura 26. Reacciones de termólisis y fotólisis de isoxazoles.

### Usos de las 2-carboxiamidas-2H-azirinas en síntesis

El anillo muy tensionado y reactivo de las 2H-azirinas ha sido estudiado de manera exhaustiva con el fin de utilizarlo en la síntesis de varios objetivos sintéticos. Las aplicaciones más importantes incluyen reacciones de expansión de anillos<sup>192</sup>, de cicloadición<sup>193</sup> y en la preparación de aziridinas y aminas funcionalizadas<sup>194</sup>. Un grupo de heterocícllos derivados de las azirinas son las 2-carboxiamidas-2H-azirinas, que han sido recientemente motivo de estudio. A continuación se describen los avances más recientes en la utilización de este grupo de heterocícllos en la síntesis de otras moléculas complejas.

Se puede afirmar que el uso más importante para las 2-carboxiamidas-2H-azirinas en la síntesis de otros heterocícllos resulta de la reducción del doble enlace C-N. Estas moléculas tienen importantes propiedades biológicas como se puede ver en la sección de actividad biológica. Para llevar a cabo esta reducción se han empleado tanto borohidruro de sodio como de potasio, hidruro de bis(metoxietoxi) y aluminio, para dar las 2-carboxiamida-aziridinas con buenos rendimientos<sup>195</sup>. Otras reacciones donde se han obtenido aziridinas resultan de tratar 2-carboxiamidas-2H-azirinas con trialquilfosfito para formar los 2-fosfonatos de las aziridinas. Los

rendimientos de esta transformación son altos cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de donadores de protones<sup>196</sup>. Cuando la hidroxilamina y la hidrazina se hacen reaccionar con las 2-carboxiamidas-2H-azirinas producen las 2-carboxiamidas-3-hidroxilamino-2,3-diarilaziridinas y las carboxiamidas-3-hidrazino-2,3-diarilaziridinas respectivamente<sup>197-198</sup>, que son difíciles de obtener por otro método.

En la siguiente figura se presentan las estructuras de las últimas tres reacciones mencionadas.

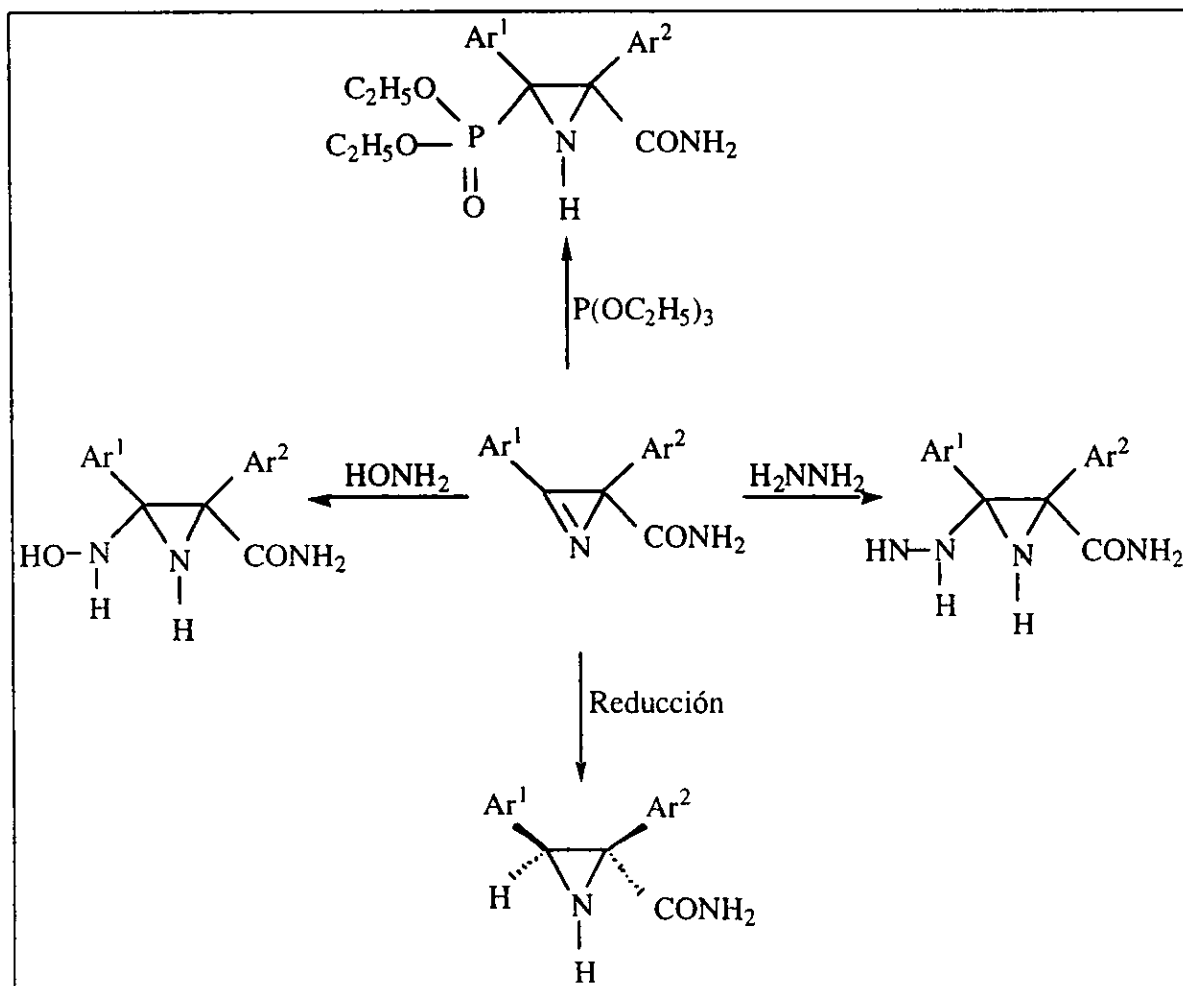


Figura 27. Empleo en síntesis de las 2-carboxiamidas-2H-azirinas.

Otras aplicaciones no menos importantes donde se utilizan las carboxiamidas-2,3-diaril-2H-azirinas, son para preparar las isoquinolinas<sup>199</sup> y las tetrahidro-1,2,4-triazin-6-onas<sup>200</sup>. Las estructuras de estos heterociclos se muestran en la Figura 28.

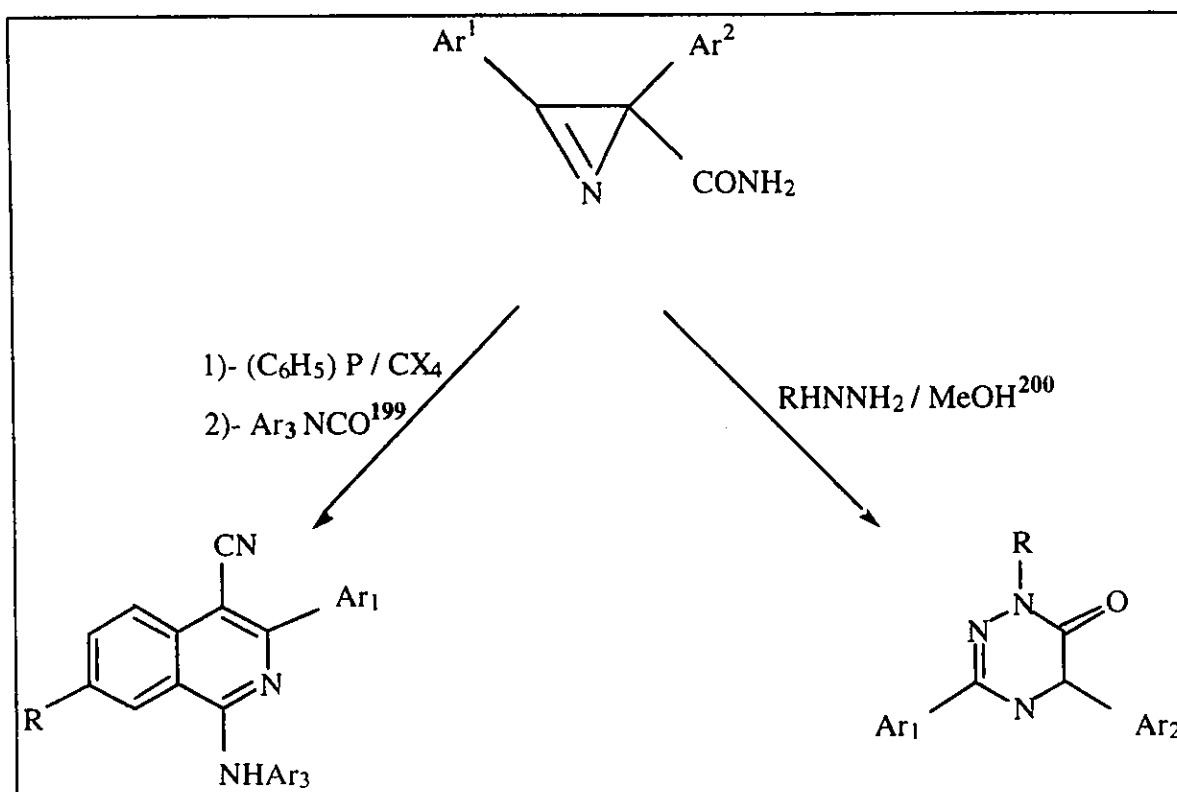


Figura 28. Otros usos de las 2-carboxiamidas-2H-azirinas.

Algunos puntos que se pueden señalar respecto a las síntesis y usos de las 2-carboxi-2H-azirinas sustituidas, son los siguientes: Son pocos los métodos de síntesis, y éstos se basan en la reacción de Neber o en el rearrreglo de 5-aminoisoxazoles y el uso más importante que tienen las azirinas es como precursores de las aziridinas. Para que las azirinas sigan teniendo más aplicaciones es necesario desarrollar nuevos métodos de síntesis y de transformación, lo que hace necesario realizar más investigaciones en los procedimientos de síntesis y en general de su química.

### 3.6.-Preparación y utilización de las oximas en química sintética

La química concerniente a las aplicaciones sintéticas de las oximas es bien conocida y existen numerosas publicaciones que dan cuenta de este hecho. En vista de que la química de las oximas es muy amplia, en lo que resta de esta sección se hará una breve descripción de lo más relevante en cuanto a la preparación y usos de las oximas en química orgánica. En las referencias de esta sección se podrán encontrar citas de excelentes textos y revisiones sobre ese tópico.

Las oximas son un importante grupo funcional usadas comunmente para proteger el grupo carbonilo y como intermediarios en la reacción de Beckman. Hay dos procedimientos generales



para su preparación; el primero hace uso de un grupo carbonilo (aldehído o cetona) y el segundo de un compuesto no carbonílico. Este último generalmente es un compuesto nitrado (nitroso o nitro), el cual puede estar o no saturado<sup>201</sup>. Los procedimientos para la síntesis de oximas están bien establecidos y existen numerosas revisiones que describen ampliamente estos métodos<sup>202</sup>.

No obstante que actualmente se dispone de una gran variedad de rutas para preparar oximas, a la fecha no se ha descrito la utilización de 3-nitropropenonitrilos o de 5-aminoisoxazoles para su síntesis. Sólomente se ha publicado un reporte donde se propone a la oxima del 3-(4-nitrofenil)-3-nitro-2-fenilpropenonitrilo como intermediario de la hidrogenólisis de los  $\alpha$ -ciano- $\beta$ -nitroestilbenos. En compuestos de estructura similar al propenonitrilo no fue posible aislar la correspondiente oxima intermediaria, según se muestra en la siguiente Figura<sup>203</sup>. Por otra parte a la fecha no se conoce ningún reporte donde se haga uso de 5-aminoisoxazoles para la síntesis de oximas.

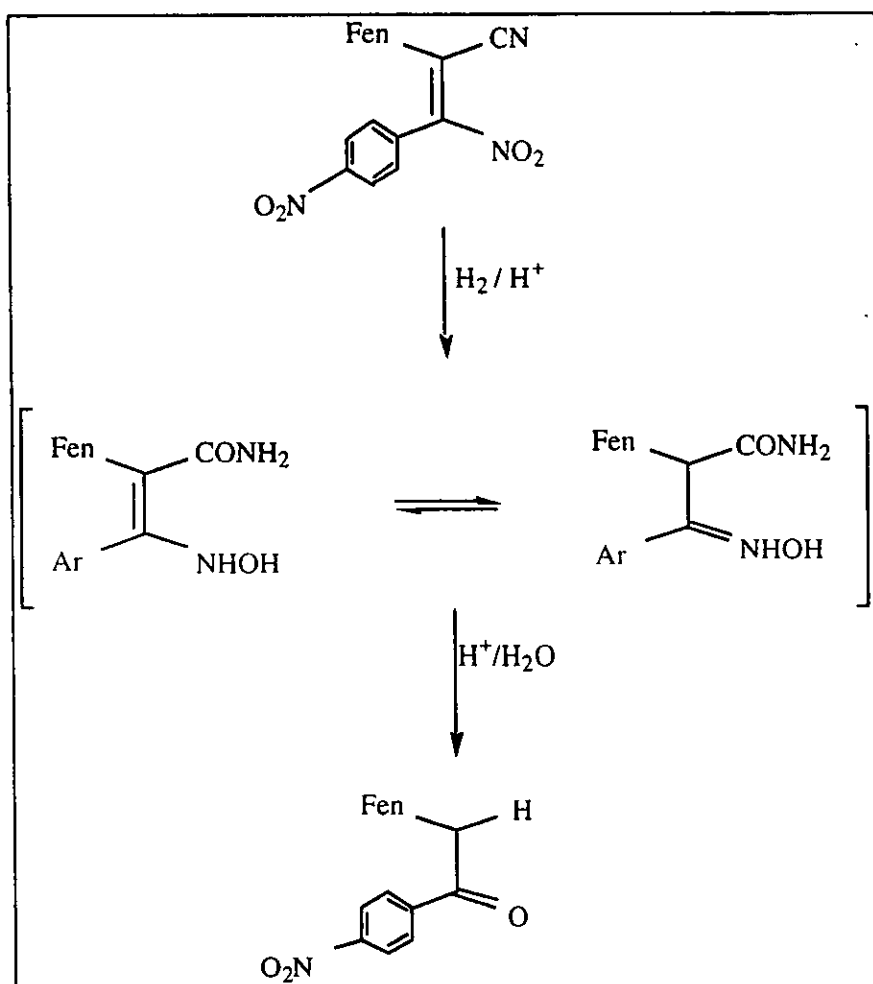


Figura 29. Hidrogenólisis de los  $\alpha$ -ciano- $\beta$ -nitroestilbenos.

## Utilización de las oximas en química sintética

Por décadas las oximas se han empleado para caracterizar aldehídos y cetonas, así como en la determinación cuantitativa de grupos carbonilos<sup>204</sup>. Sin embargo, también se han empleado en síntesis orgánica, según se describe a continuación. Comúnmente se han usado para la protección del grupo carbonilo<sup>205</sup>, intermediarios en la transposición de Beckman, para preparar amidas tanto cíclicas como alicíclicas<sup>206</sup>, síntesis de heterocícllos de cuatro, cinco y seis miembros<sup>207</sup> y en la reacción de rearrreglo de Neber<sup>208</sup>. En la referencia de Kabalka<sup>209</sup> se puede encontrar más información respecto a éstos y otros temas de la química de oximas.

La revisión de las rutas de síntesis de oximas muestra que, a pesar de los numerosos métodos de síntesis existentes, no se han descrito en la literatura alguno que use 5-aminoisoxazoles y especialmente *S. cerevisiae*.

### 3.7.- Importancia de nitroalquenenitrilos, 5-aminoisoxazoles y azirinas

#### Compuestos nitrados

Los compuestos nitrados alifáticos son más bien escasos como productos naturales, encontrándose únicamente en angiospermas y en leguminosas. La actividad biológica de los pocos que se conocen es potente en términos bactericidas, fungicidas, herbicidas ó como compuestos de defensa en contra de insectos. A pesar de su presencia limitada en la naturaleza, son un grupo importante de compuestos orgánicos en diferentes industrias. En la industria farmacéutica ya que presentan importantes e interesantes propiedades fisiológicas; por ejemplo, los antibióticos más potentes que se conocen son el nistatina y el griseofulvina que son compuestos nitrados  $\alpha,\beta$ -no saturados.

Otras aplicaciones que tienen los compuestos nitrados alifáticos, aromáticos y heterocíclicos son en la industria espacial (propelentes), militar (explosivos), alimentación (colorantes), farmacéutica (antitumorales, antivirales, bactericidas, citotóxicos, fungicidas, herbicidas, nematocidas, etc), de polímeros (polímeros ópticos no lineales y ramificados, dendrímeros), química (especialidades químicas e intermediarios sintéticos).

#### Isoxazoles

A los isoxazoles, tanto saturados como no saturados, se les han encontrado diferentes usos en medicina, agricultura y en la industria de especialidades químicas. Se han empleado como alucinógenos y para el estudio de los mecanismos de la interacción de éstos con el sistema nervioso central. También se ha encontrado que inducen la diferenciación en células tumorales y sus derivados se han empleado para mejorar la fluorescencia en el estudio de las membranas

naturales y sintéticas, como relajantes de músculos, para el tratamiento de la hipercolesteremia, arterioesclerosis e hiperlipidemia y como bactericidas. También se han empleado en la síntesis de esteroides como el trilostano y epostano.

Los isoxazoles sustituidos se usan como insecticidas para la conservación de las semillas de *Echinochloa crus-galli*, *Setaria viridis* y *Avena fatua*.

El dimetilisoxazol se usa como co-disolvente en las baterías de automóviles. Asimismo funcionan como electrolitos orgánicos en baterías que no emplean agua y en la preparación de emulsiones fotográficas y de colorantes de fibras.

En particular, los 5-aminoisoxazoles se han usado como intermediarios en la síntesis de sulfafurazol, 2-alkilpiridinas análogas de la pirimetamina (agente antimalárico) y en la preparación del antibiótico oxazinomicina.

### Azirinas

El anillo de la azirina se ha encontrado en algunos productos naturales. El primer compuesto de este tipo que se aisló es la Azirinomicina. Otro compuesto natural que contiene el anillo de azirina aislado recientemente es el Dysidazirine, que presenta actividad antibacteriana y citotóxica. Hace pocos años se publicó la primera síntesis de un péptido que contiene el anillo de azirina.

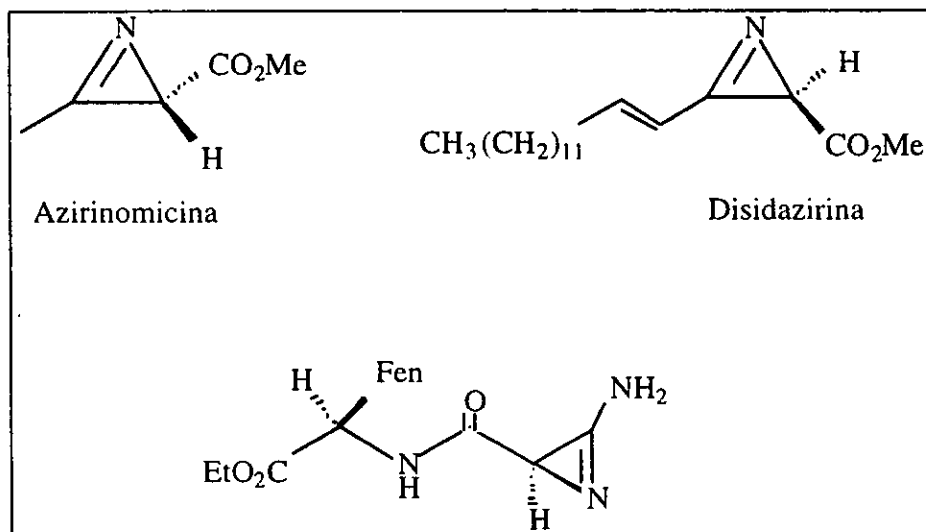


Figura 30. Azirinas en productos naturales.

El principal uso que tienen las azirinas es como intermediarios para la síntesis de aziridinas, que presentan numerosas e importantes propiedades biológicas no ofrecidas por las azirinas.

La revisión de los usos de los nitroalquenos, isoxazoles y azirinas indica que estos grupos de sustancias tienen propiedades interesantes. Resulta muy importante continuar en la búsqueda de nuevos procedimientos para prepararlos y encontrarles nuevas aplicaciones. La contribución del presente trabajo a éste campo es el de desarrollar nuevos métodos de síntesis empleando tecnologías limpias.

#### IV.- Resultados y Discusión

La ruta general de síntesis que se propuso para la preparación de los bloques de construcción tanto aquirales como quirales motivo de esta investigación consta de tres etapas: Primera, la preparación de los substratos (3-nitropropenonitrilos sustituidos) y compuesta de dos operaciones sintéticas: reacción de condensación para sintetizar los nitrilos  $\alpha,\beta$ -no saturados y la posterior nitración de los mismos. Segunda, la reducción bioquímica con *S. cerevisiae* de los nitrocianoalquenos. Tercera, interconversión de los bloques de construcción obtenidos en la etapa anterior.

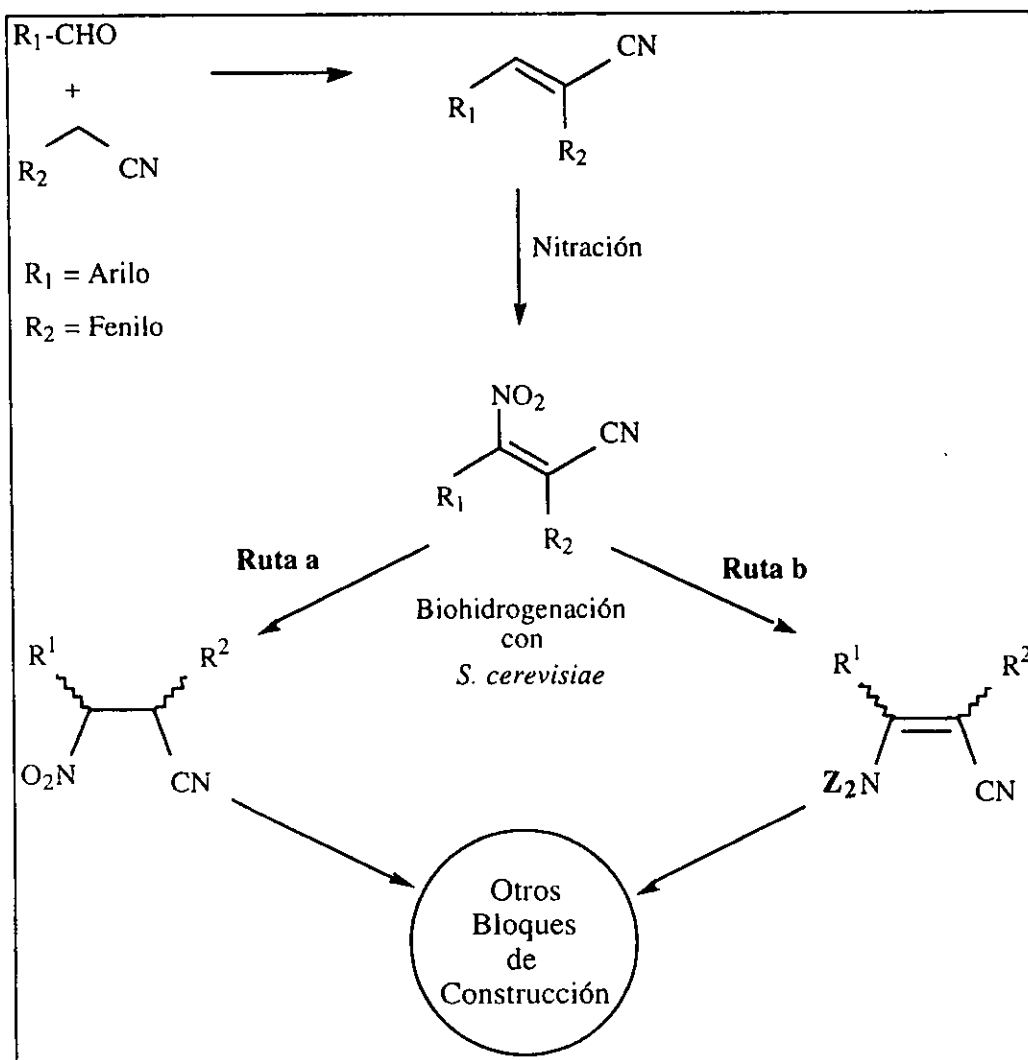


Figura 31. Ruta general de síntesis.

Es importante señalar que el paso clave de esta ruta de síntesis es el tercero (biohidrogenación),

donde se pueden ocurrir dos eventos: la reducción del doble enlace carbono-carbono y generación de los centros estereogénicos (**ruta a** Figura 31), o la reducción del grupo nitro. Si este último evento ocurre, no se forman centros quirales pero se funcionaliza la molécula (**ruta b** Figura 31). A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos para cada una de las etapas propuestas.

#### 4.1.- Preparación de los substratos

Las materias primas de esta ruta de síntesis son los 2-fenil-3-aryl o alquil-propenonitrilos, los cuales se sintetizaron mediante una condensación Knoevenagel<sup>210</sup>. Para esto se hizo reaccionar el aldehído sustituido con el fenilacetnitrilo en presencia de una base y usando como disolvente etanol al 95%. Otros nitrilos se adquirieron comercialmente.

En la Figura 32 se presentan las estructuras de los productos de las reacciones de condensación de Knoevenagel. La caracterización de los nitrilos se hizo mediante: pf, factor de retención ( $R_f$ ) y por análisis espectroscópico (IR, EM, RMN  $H^1$ ). Los datos obtenidos se compararon con los descritos en la bibliografía para estos compuestos <sup>211-212</sup>.



Figura 32. Estructura de los presubstratos.

En la **tabla 1** se presentan los pf y una comparación de los rendimientos publicados con los obtenidos.

**Tabla 1 de presubstratos**

Compuesto	pf publicado	pf experimental <sup>a</sup>	Rendimientos publicados.	Rendimientos experimental	Referencia
<b>(E)-1a</b>	85-86.5	87	80-90	80	212
<b>1b</b>	101-101.5	100	80-90	90	"
<b>1c</b>	93.5-94.5	93	80-90	87	"
<b>1d</b>	-	117	-	60	-
<b>1e</b>	90-90.7	90-91	80-90	70	"
<b>1f</b>	42.5-43	42-43	80-90	70	"
<b>1g</b>	no conocido	aceite inestable	no conocido	80	-
<b>1h</b>	p.e 100-103	p.e 100	40	30	212
<b>1i</b>	pe 95-98	pe 95-100	89	90	212

a) Las reacciones se llevaron en la escala de los mmoles.

En resumen, se prepararon los propenonitrilos sustituidos (presubstratos) con rendimientos equiparables a los publicados y en cantidad suficiente para probar el nuevo método de nitración en desarrollo.

### Nitración de los nitrilos $\alpha,\beta$ -no saturados.

Es importante destacar que la introducción del grupo nitro en los compuestos **1a-i** ocurre en la posición 3 y del mismo lado del nitrilo ( $\beta$  y *cis*). La forma (**Z**) es la configuración requerida para las biohidrogenaciones de acuerdo a un modelo previamente elaborado y descrito posteriormente (Figura 39, Pág. 48), el cual se diseñó con base en una revisión bibliográfica de reducciones biocatalíticas<sup>213</sup>. Esta posición discriminativa se indica con la flecha en el siguiente diagrama.

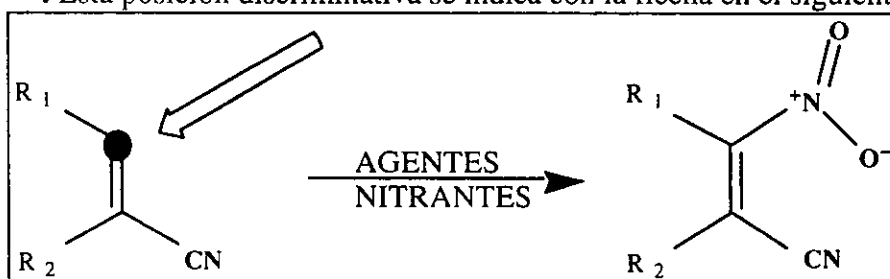


Figura 33. Nitración de los nitrilos  $\alpha,\beta$ -no saturados.

Los substratos con los requisitos anteriores fueron preparados mediante la reacción de nitración de los 2-fenil-3-aril o alquil-propenonitrilos. Cabe destacar que el agente nitrante empleado fue desarrollado en nuestro laboratorio. Este se preparó mediante la reacción de oxidación de THF con HNO<sub>3</sub>. La reacción produce una mezcla de gases, siendo el monóxido y el dióxido de nitrógeno (NO/NO<sub>2</sub>) los principales componentes. Hemos encontrado que la mezcla de óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) sirve para nitrar en forma fácil y rápida dobles enlaces carbono-carbono y algunos compuestos heterocíclicos<sup>214</sup>.

Cuando los propenonitrilos se hicieron reaccionar con el NO<sub>x</sub> se obtuvieron los nitrocianoalquenos con el arreglo espacial requerido para ser biohidrogenados con *S. cerevisiae*. En la siguiente Tabla se presentan los puntos de fusión y los rendimientos obtenidos para la reacción de nitración mediante la cual se prepararon los substratos que reúnen las características estereoelectrónicas para la biorreducción.

**Tabla 2 de substratos**

Compuesto	pf Rend publ	pf. Rend exp	% Rend publ.	% Rend exp	Referencia
(Z)-2a	95.5	95	92	90	// 7
2b	116.0	113	85	80	"
2c	92.0	90-92	90	90	"
2d	92.0	90	70	70	"
2e	-	186	-	50	-
2f	-	-	-	40	-
2g	-	sólido, inestable	-	80	-
2h	115.0	110-112	75	60	"
2i	72	70	80	50	"

a) Las reacciones se llevaron en la escala de los mmoles.

Los detalles concernientes a la nitración se presentan en el artículo anexo que fue sometido a arbitraje para su posible publicación.

Además de los nitrilos anteriormente mencionados, otros compuestos que se nitraron mediante este procedimiento fueron: ácido cinámico, cinamonitrilo y metiléndioxycinamonitrilo Figura 34. Al realizar las reacciones de nitración con el agente nitrante NO<sub>x</sub> se obtuvieron en los tres casos una mezcla de productos, de los cuales únicamente se pudo separar el producto de nitración del anillo aromático, no así los productos de nitración del doble enlace carbono-carbono.



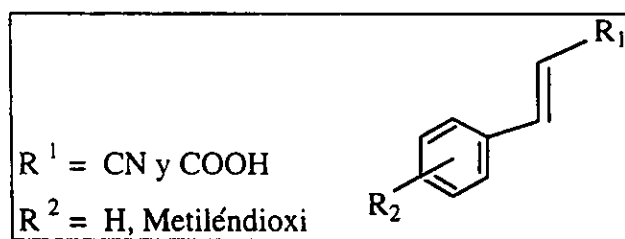


Figura 34. Nitración de derivados del ácido cinámico.

La nitración del cinamonitrilo se hizo con otros agentes nitrantes<sup>215</sup>. Estos reactivos se adicionan en forma iónica al doble enlace C-C, de manera similar a las que lo hacen en forma de radicales libres<sup>215</sup>. Los resultados de las reacciones se presentan en la Figura 35.

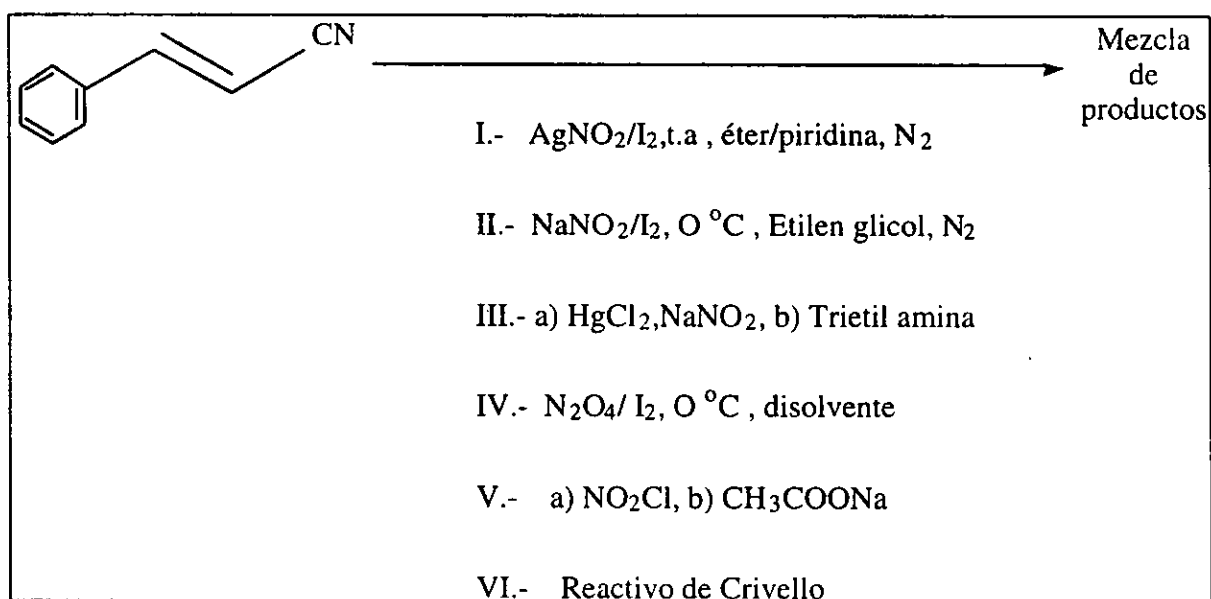


Figura 35. Nitración del cinamonitrilo.

Se puede observar de esta figura como todos los agentes nitrantes empleados reaccionaron con el cinamonitrilo. Sin embargo, también se obtuvo una mezcla de varios productos de los cuales se logró separar solamente el producto de nitración del anillo aromático. Una situación igual se presentó cuando se nitraron el ácido cinámico y el metiléndioxycinamonitrilo Figura 34 con los mismos agentes.

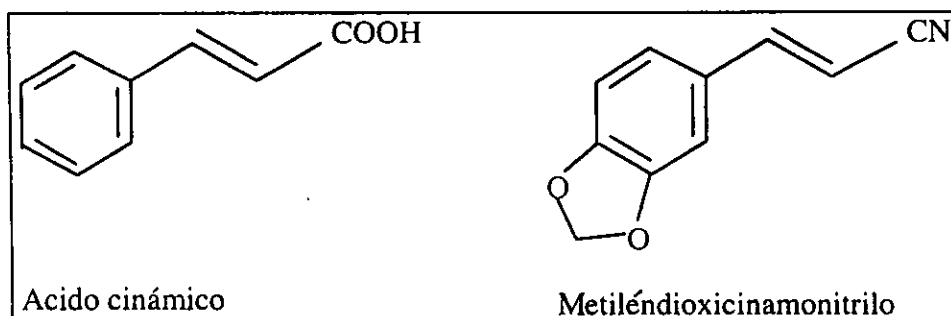


Figura 36. Nitración del ácido cinámico y del metiléndioxicinamonitrilo.

Podemos afirmar que el uso del nuevo agente nitrante permitió preparar los substratos con los requerimientos estereoelectrónicos exigidos para la reacción de hidrogenación con *S. cerevisiae* según el modelo previamente diseñado. Sin embargo, se encontró que para dobles enlace C-C nucleofílicos la nitración conduce a los productos de nitración del anillo aromático en lugar del doble enlace. Es importante mencionar que los rendimientos y la estructura de los productos nitrados son equiparables los obtenidos con el nuevo agente nitrante propuesto o cuando se emplea  $N_2O_4$  puro<sup>117</sup>. La utilidad de dicho método queda validada y justificada a partir de su economía y simpleza.

#### 4.2.- Biorreducciones con *S. cerevisiae* de los nitroalquenonitrilos

Es importante mencionar que antes de que se iniciara el trabajo con los 3-nitropropenonitrilos sustituidos se repitieron algunos experimentos de biohidrogenación de nitroalquenos con levaduras buscando familiarizarse con esta metodología. Al analizar la bibliografía referente a las biorreducciones de dobles enlace C-C activados con grupos electroattractores, en particular con grupos nitro, se encontró que los modelos propuestos por Ohta (a) y Ono (b)<sup>216-217</sup> (figura 35) serían de mucha utilidad, así como también los trabajos de Ohta, Hiroi y Takeshita, en donde las  $\beta$ - y  $\gamma$ -nitrocetonas y los  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ -cetonitrilos son reducidos por las levaduras<sup>218-220</sup>.

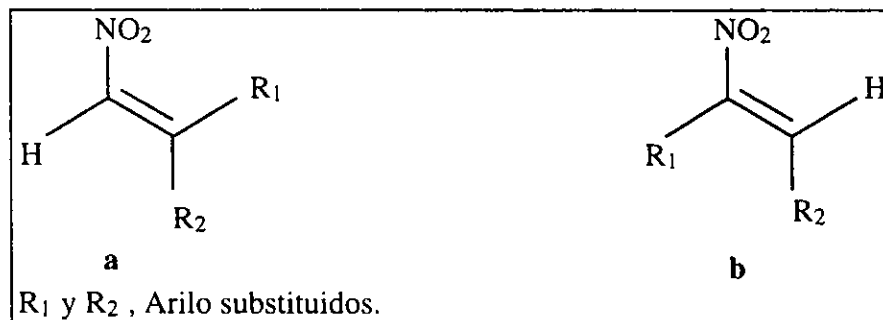


Figura 37. Estructura de los substratos.

Se seleccionaron y prepararon algunos sustratos del modelo **a** y del **b**, así como también de otros que contienen dobles enlaces con grupos electroatrayentes diferentes al grupo nitró (modelo **c**). En la figura 38 se muestran las estructuras de estos compuestos.

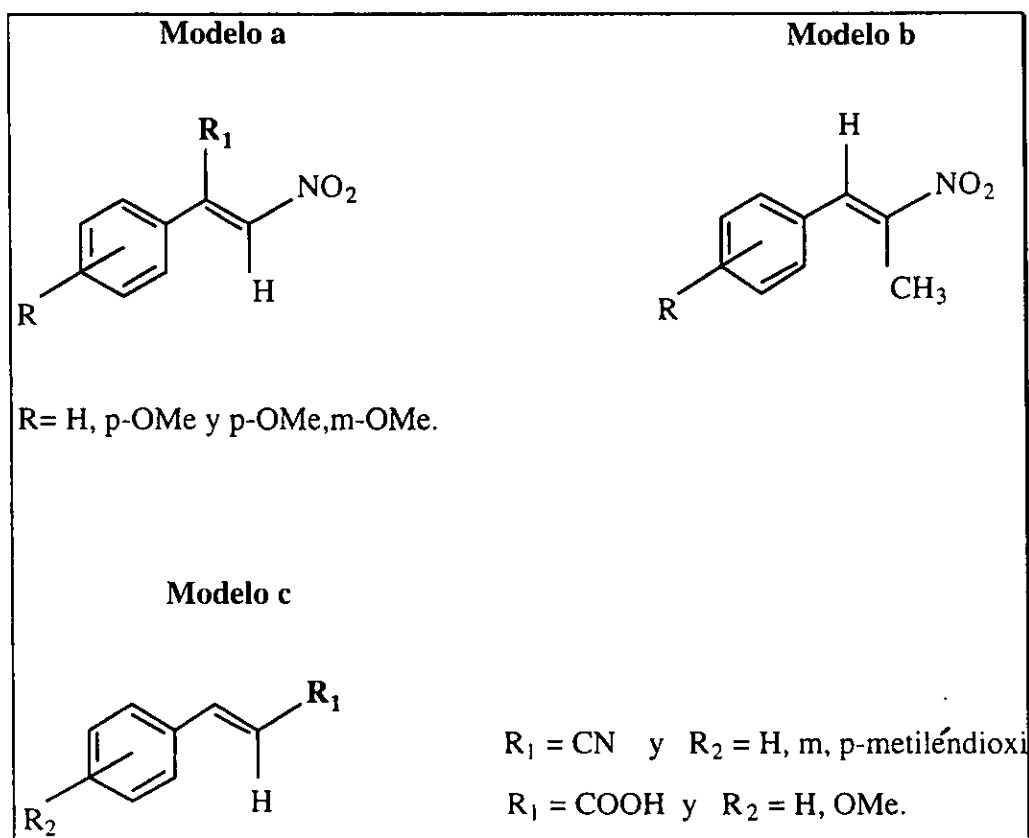


Figura 38. Formulas de los cianoalquenos modelo.

Al someter a reacción los sustratos modelo **a**, **b** y **c** bajo las condiciones reportadas se comprobó la biorreducción por CCF y por comparación de las constantes espectroscópicas obtenidas para los sustratos reducidos con las reportadas<sup>221</sup>.

Cabe mencionar que para seleccionar el biocatalizador más adecuado para biohidrogenar el doble enlace de los 3-nitropropenonitrilos se realizó una revisión de toda la información publicada<sup>222</sup>, tanto de los biorreductores como de sus sustratos naturales y miméticos. La revisión arrojó los siguientes resultados: primero, el biocatalizador ideal para la biorreducción de los nitrilos sería la *S. cerevisiae*; segundo, los requisitos estereo y electrónicos que debe tener el sustrato son que el doble enlace carbono-carbono esté activado, es decir, que tenga enlazado por lo menos un grupo electroattractor entre los siguientes: ácidos carboxílicos y sus derivados, nitrilos, nitros, sulfóxidos, sulfonas, fosfonatos y carbonilos (aldehídos y cetonas).

A continuación se enlistan otros requisitos necesarios para la biorreducción

- Tener por lo menos un grupo electroattractor en uno de los átomos de carbono.
- Contener un sustituyente pequeño en uno de los átomo de carbono.
- No deben existir dos grupos voluminosos sobre el átomo de carbono que no contiene el grupo electroattractor.
- La configuración del alqueno debe tener al grupo electroattractor **trans** al grupo voluminoso.

En la siguiente figura se presentan en forma gráfica estos requisitos.

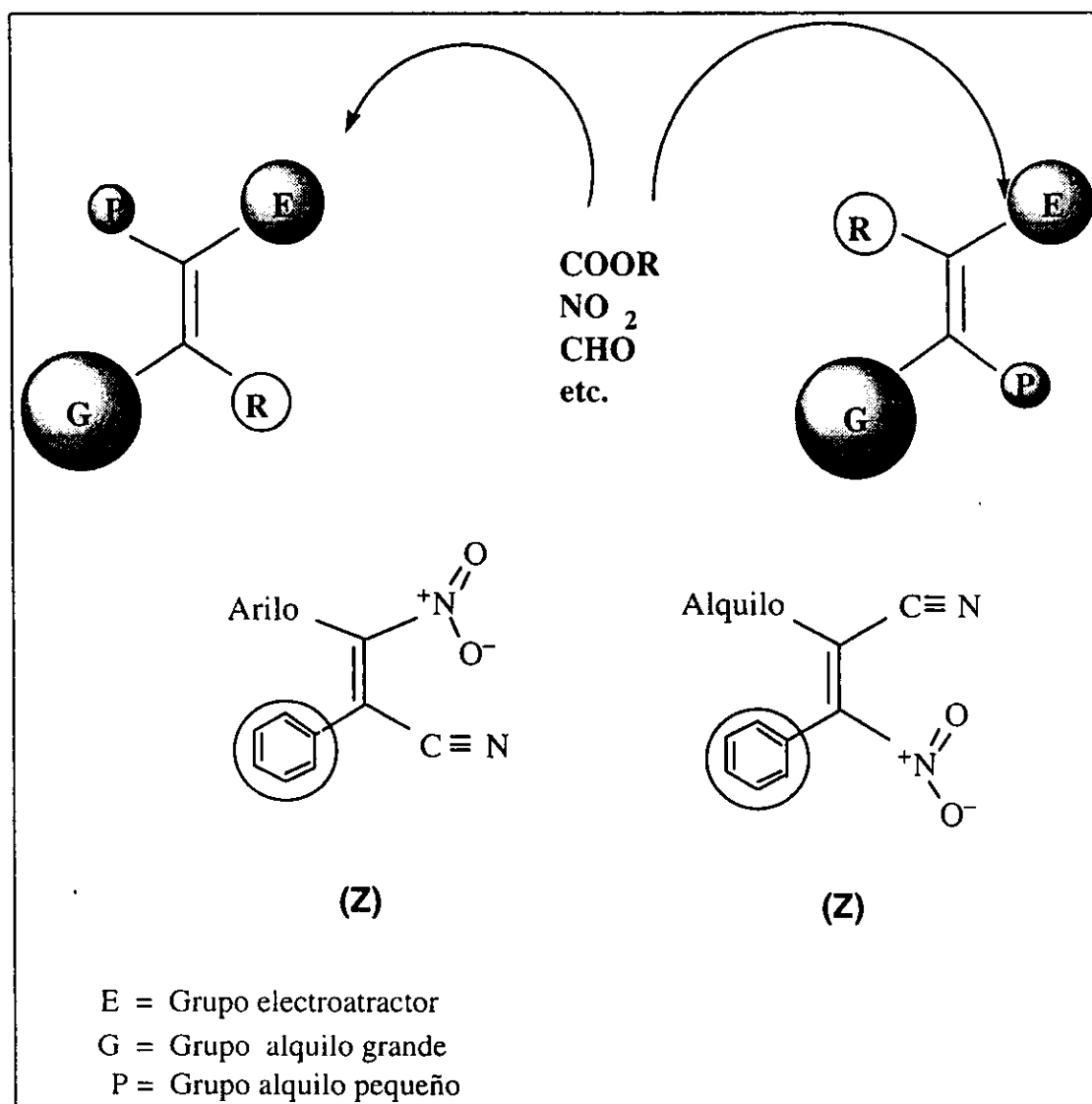


Figura 39. Requerimientos estereoelectrónicos de los substrato.

Los 3-nitropropenonitrilos sustituidos son los precursores de los bloques de construcción

objetivo de este trabajo y estos se dividen en dos tipos. Los 3-nitro-3-alkil-2-fenilpropenenitrilos y los 3-nitro-3-aryl-2-fenilpropenenitrilos. Los primeros cumplen con todos los requisitos del modelo; sin embargo, los 3-nitro-3-aryl-2-fenilpropenenitrilos solo lo hacen parcialmente (Figura 39). Cabe destacar que ambos tipos de sustratos presentan un grupo electroattractor adicional y por lo tanto un grupo funcional más. El que este modelo tenga dos grupos funcionales hace que presente una doble funcionalidad y por lo tanto lo hace potencialmente más versátil en síntesis.

Una vez que se adquirió experiencia en el manejo de las biotransformaciones de alquenos activados con levaduras de pan y que se vio que los 3-nitropropenenitrilos sustituidos reunían los requisitos exigidos para ser biohidrogenados, se procedió a realizar las biotransformaciones. Cuando se hicieron reaccionar los (Z)-3-nitro-2-fenil-3-alkil o aril-,3-propenenitrilos con *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvieron como bioproductos los 5-amino-3-alkil o aril-4-fenilisoxazoles Figura 40. Los resultados de esta biohidrogenación se publicaron en la revista *Synlett*, donde se describen todos los detalles de la reacción<sup>223</sup>. Es importante mencionar que se esperaba que ocurriera la reducción del doble enlace carbono-carbono como uno de las dos posibles eventos previstos. Sin embargo, primero se dió la reducción del grupo nitro, siendo ésta la primera vez que se conoce la biorreducción de un grupo nitro sobre un doble enlace C-C con *Saccharomyces cerevisiae*.

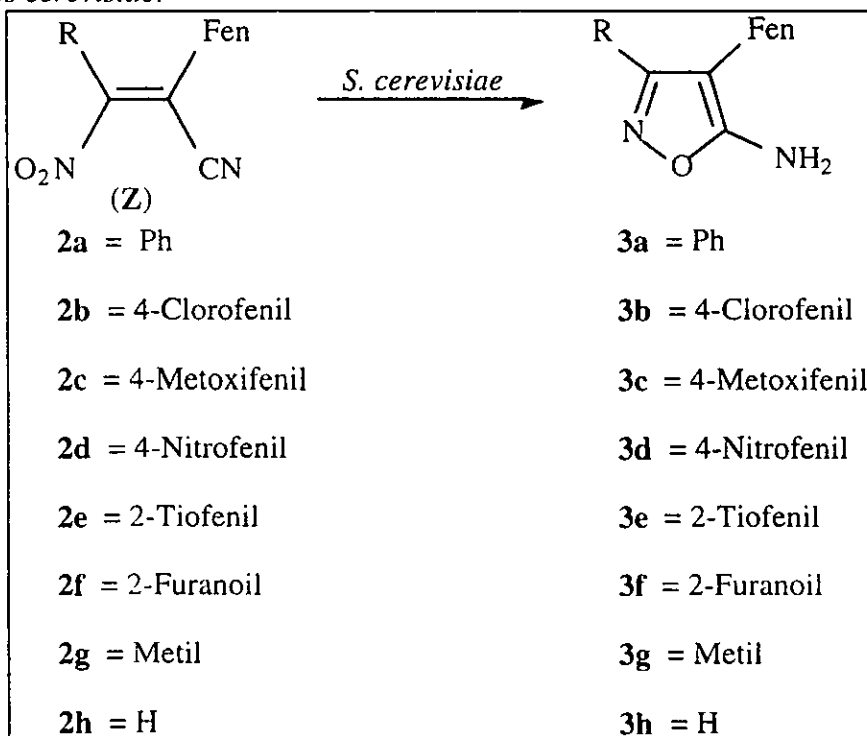


Figura 40. Síntesis de 5-aminoisoxazoles con *S. cerevisiae*.

La formación de los 5-aminoisoxazoles se puede explicar por el mecanismo que se propone en la Figura 41.

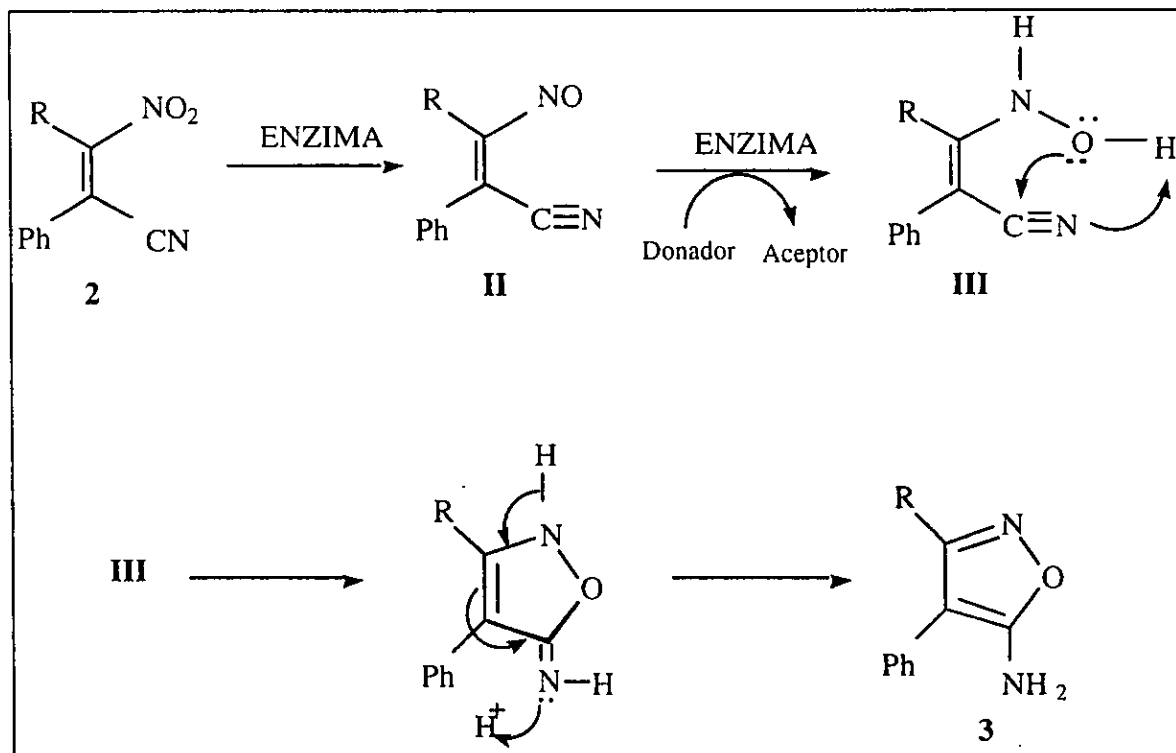


Figura 41. Mecanismo propuesto para la formación de los 5-aminoisoxazoles.

El mecanismo involucra dos eventos de reducción en los que se transfieren en total 4e<sup>-</sup> y 4H<sup>+</sup>; el primero es la reducción del grupo nitro al nitroso y el segundo la reducción del grupo nitroso a la correspondiente hidroxilamina<sup>224</sup>. Posteriormente ocurre un ataque nucleofílico de la hidroxilamina sobre el nitrilo, formando el intermediario **III**, el cual finalmente por pérdida de un protón forma el anillo del 5-aminoisoxazol (**3**). En los estudios de la reducción electroquímica de nitroalquenos se propone que la reducción de nitroalquenos a oximas posiblemente siga esta ruta, aunque no hay evidencias concluyentes<sup>225</sup>.

Es importante mencionar que cuando el compuesto **2a** (Figura 40), que tiene la configuración (**Z**), se hizo reaccionar con levaduras de pan la biorreducción ocurrió rápidamente; sin embargo, cuando el compuesto **2a** con una configuración (**E**) se sometió a las mismas condiciones, la materia prima se recuperó totalmente. Esto indica que solamente cuando los grupo nitro y nitrilo están en posición (**Z**) hay hidrogenación, resultado que fue confirmado cuando todos los compuestos restantes (**b-h**), (que tienen la misma configuración a **2a**), produjeron los 5-aminoisoxazoles correspondientes al someterse a la biohidrogenación. Aunque los rendimientos

obtenidos son moderadamente buenos, además de no formar subproductos, existe la posibilidad de mejorarlos.

Los resultados anteriormente descritos, nos permiten formular las siguientes conclusiones para esta sección. Se propuso y validó experimentalmente un modelo de sustrato para la biohidrogenación con *S. cerevisiae* con características estereo y electrónicas previamente diseñadas. Esta permitió desarrollar un método nuevo y original de síntesis de 5-aminoisoxazoles sustituidos que ofrece la ventaja sobre los anteriormente descritos en la literatura de hacer uso de un reactivo biológico con los siguientes beneficios: barato, simple y más compatible con el medio ambiente.

En este punto es importante destacar que durante la realización de esta investigación se publicaron tres trabajos donde se logró la biohidrogenación con *S. cerevisiae* de dos sustratos que reúnen las características estereoelectrónicas exigidas por nuestro modelo<sup>226</sup>. Estos resultados son muy alentadores ya que demuestran que la estrategia seguida se puede aplicar al diseño de otras biotransformaciones.

#### **4.3.- Apertura biocatalizada de 5-aminoisoxazoles**

Del 5-amino-3,4-difenilisoxazol **3a**.

Cuando la biorreducción del (Z)-2,3-difenil-3-nitropropenonitrilo **2a** (Figura 40) se prolongo más allá de la formación del 5-amino-3,4-difenilisoxazol, se observó mediante cromatografía en capa fina la formación de otro producto y la desaparición del 5-aminoisoxazol.

Se procedió a estudiar esta segunda transformación. Primero se demostró el origen del segundo producto mediante los siguientes experimentos; inicialmente se realizó la biotransformación en las mismas condiciones que para la síntesis de los 5-aminoisoxazoles, salvo que en esta ocasión se empleó como sustrato el 5-amino-3,4-difenilisoxazol en presencia de *S. cerevisiae*. Después de trabajar la reacción se detectó por cromatografía en capa fina un producto similar al obtenido en la reacción prolongada del 2,3-difenil-3-nitropropenonitrilo. Este resultado sugiere que el segundo bioproducto resulta de la acción de *S.cerevisiae* sobre el 5-amino-3,4-difenilisoxazol.

Como control se repitió la reacción en las mismas condiciones de la síntesis del 5-amino-3,4-difenilisoxazole pero sin *S.cerevisiae*. Al término del tiempo de reacción únicamente se detectó la materia prima (5-amino-3,4-difeniliosoxazol), lo que indica que *S. cerevisiae* es la responsable de la transformación del 5-amino-3,4-difenili soxazol.

Una vez demostrado que había una segunda biotransformación y que el compuesto que se modificaba era el 5-aminoisoxazol, se procedió a buscar las mejores condiciones para la segunda reacción. En este caso se varió únicamente la relación de sustrato/biocatalizador hasta alcanzar

el 30% de rendimiento del producto y recuperándose el sustrato. Después de obtener el bioproducto en forma pura se determinaron las constantes fisicoquímicas encontrando que presentaba un p.f de 147 °C, mientras que los espectros de IR, RMN  $H^1$ ,  $C^{13}$  y EM, sugieren una oxima (**4a**) cuya estructura se presenta en la Figura 42. Para confirmar esta estructura se purificó de nuevo por cromatografía de columna "relámpago" y sucesivas recristalizaciones. Como resultado de esta purificación se obtuvieron cristales que en estudios cristalográficos de Rayos-X correspondieron a la 2-carboxiamida-2,3-difenil-2H-azirina (**5**)<sup>227</sup> (Figura 42).

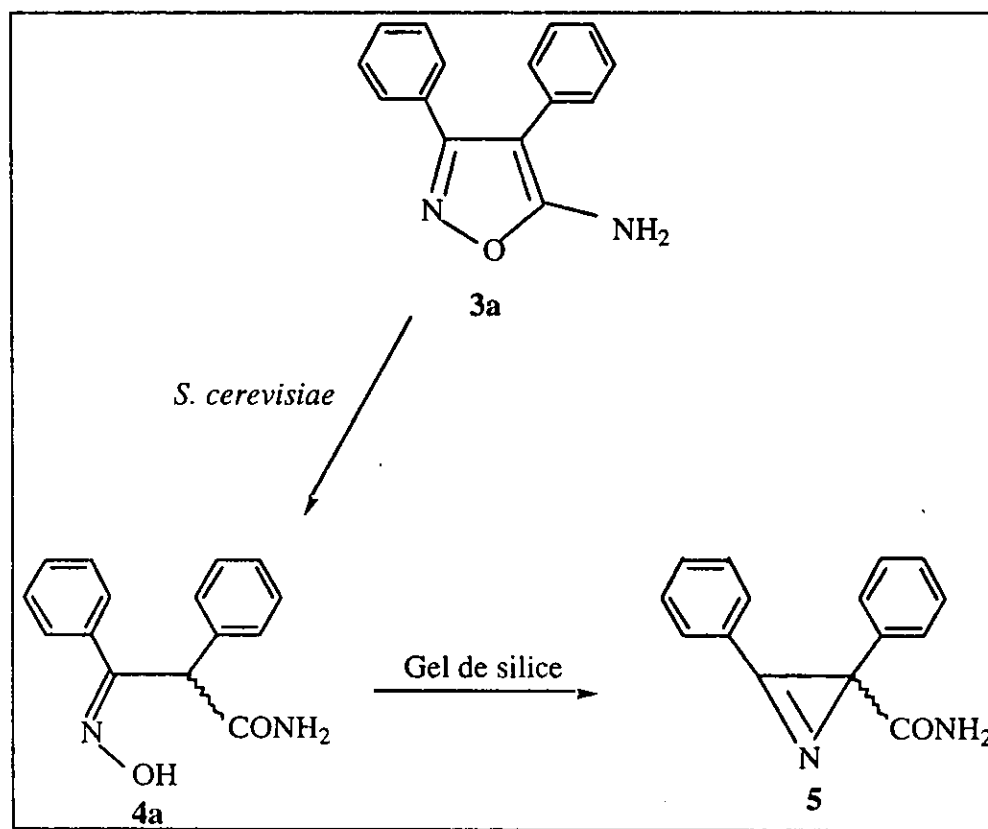


Figura 42. Estructura de los productos de apertura del 5-aminoisoxazoles (**3a**).

El resultado de los Rayos-X no concuerda con los datos espectroscópicos inicialmente asignados a **4a**. Para comprobar si los cristales a los que se les hizo el estudio de difracción de Rayos-X corresponden al compuesto **5** se les determinaron nuevamente sus datos fisicoquímicos (p.f= 182,  $R_f$ , IR, RMN  $H^1$ , RMN  $C^{13}$  y EM). Estos concuerdan con la estructura asignada por Rayos-X, pero no con los datos antes de la purificación. El que los datos iniciales de **4a** no concuerden con los que se toman después de la primera purificación, indica que la oxima sufre una transformación durante la segunda purificación. La secuencia de reacciones que se presenta en la



figura 43 explica los resultados anteriormente descritos; primero el 5-amino-3,4-difenilisoxazol (3a) se abre por la acción *S. cerevisiae*, para dar la oxima 4a, cuando ésta se purifica por segunda ocasión (cromatografía y recrystalización) se deshidrata formando la 2-carboxiamida-2,3-difenil-2H-azirina (5)<sup>228</sup>.

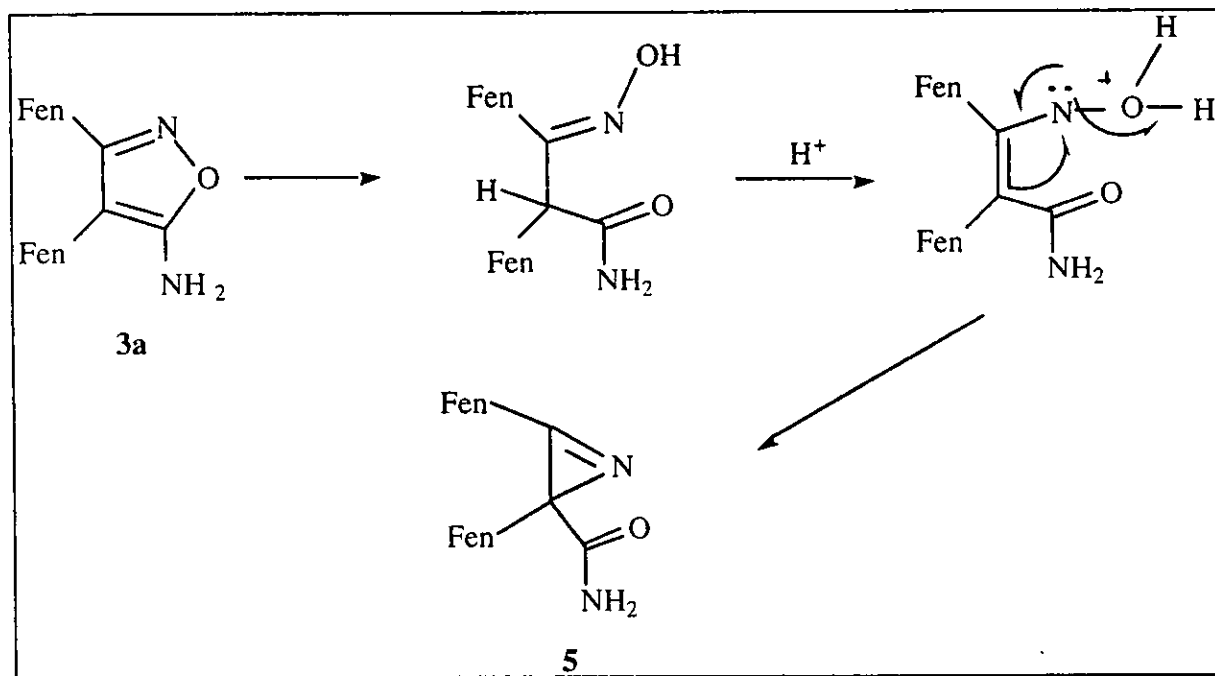


Figura 43. Mecanismo de formación de la azirina 5.

Es importante mencionar que esta es la primera vez que se describe la formación de una oxima a partir de 5-aminoisoxazoles empleando una biotransformación<sup>229</sup>.

Otros 5-aminoisoxazoles que se hicieron reaccionar con *S. cerevisiae* son el 5-amino-3-(4-MeO-fenil)-4-fenilisoxazol (3c) y el 5-amino-3-metil-4-fenilisoxazol (3g).

Cuando 3c se hizo reaccionar a las mismas condiciones que 3a, se obtuvo un sólido amarillo paja, con un pf 170 °C. y los siguientes datos espectroscópicos; espectro de I.R. 3446, 3338, 1670 1575 cm<sup>-1</sup> señales características de amidas y oximas además de la bandas de los nucleos aromáticos; su espectro de RMN H<sup>1</sup> presenta desplazamientos a 5.8 y 5.6 ppm protones de la amida y a 5.5 un singulete que integra para el protón del C-2. Además de estas señales también se observan las de los núcleos aromáticos, su espectro de RMN C<sup>13</sup> presenta además de los carbonos aromáticos desplazamientos a 174(C-amida), 165(C-oxima), 42 ppm (C-C-H). Finalmente su EM presenta un ión molecular M<sup>+</sup> m/z 284 que concuerda para un compuesto de peso molecular de 284 uma. Los datos anteriormente descritos permiten proponer la estructura de

la oxima **4c** la cual se presenta en la Figura 44. En la tabla 3 (Pag. 57) se presentan los datos físicoquímicos completos para **4c** y las otras oximas **4a** y **4g**.

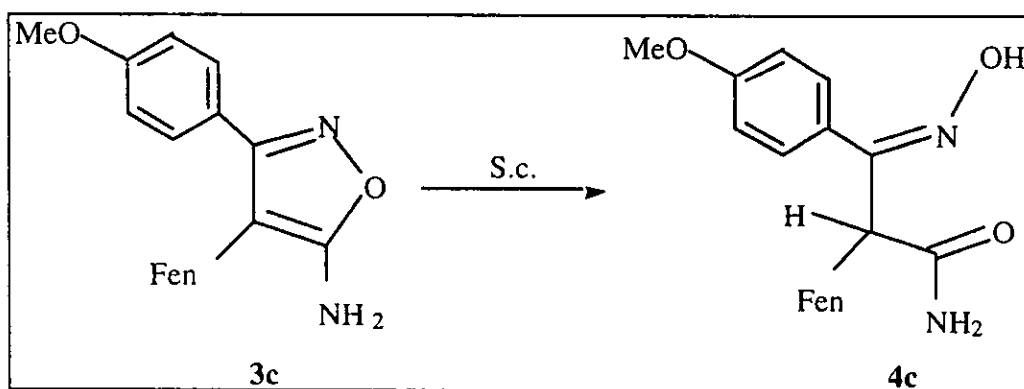


Figura 44. Reacción de apertura del 5-aminoisoxazol (**3c**).

Otro isoxazol que también dió la reacción de apertura fue 5-amino-3-metil-4-fenilisoxazol (**3g**) dando como producto la oxima **4g** que se presenta en la siguiente figura.

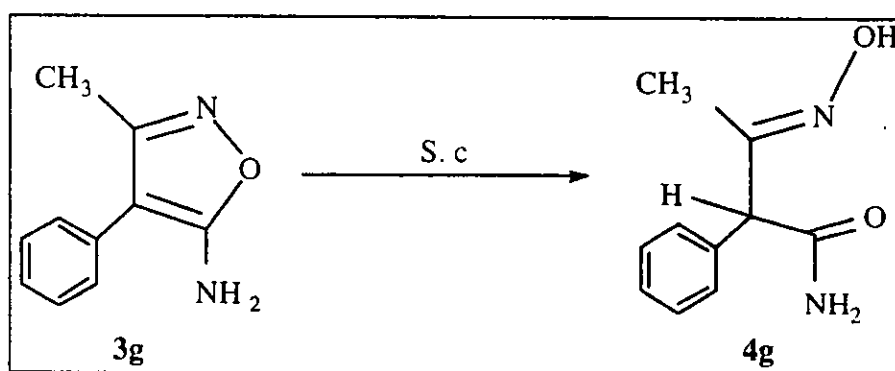


Figura 45. Reacción de apertura del 5-aminoisoxazol (**3g**).

Esta oxima se caracterizó por medio de sus propiedades físicoquímicas (p.f, EM, IR, RMN H<sup>1</sup> y C<sup>13</sup>, Tabla 3, Pág. 55). En la sección de espectros se presenta la estructura determinada por el estudio de difracción de Rayos-X.

**Tabla 3** de datos espectroscópicos de **4a, c y g**<sup>230</sup>.

p.f (°C) y Ren (%)	Tiempo de Reacción (hrs)	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> )	RMN <sup>13</sup> C (DMSO)	EM (m/z) (I.E)
<b>4a</b> 162° (25)	48	7.80 (m, 2H, arom)	172.3 (CONH)	236( M-H <sub>2</sub> O), 208, 105, 89, 77, 57
		7.30(m, 8H, arom)	162.7 (C=NOH)	
		6.30(am, 1H, CONH <sub>2</sub> )	136.0 (arom)	
		5.80(am, 1H, CONH <sub>2</sub> )	133.0 (arom)	
		4.20 (s, 1H, C-H)	130.0 (arom)	
			129.1 (arom)	
			128.1 (arom)	
			127.9 (arom)	
<b>4c</b> 170° (30)	48	7.94(d, J=9.0Hz, 2H, arom)	174 (CONH)	284 (M <sup>+</sup> ), 266 (M-H <sub>2</sub> O), 135, 97, 77, 57
		6.90(d, J=9.0Hz, 2H, arom)	165 (C=NOH)	
		7.30(m, 5H, arom)	137 (arom)	
		5.8(am, 1H, CONH <sub>2</sub> ),	132 (arom)	
		5.6(am, 1H, CONH <sub>2</sub> )	131 (arom)	
		5.5(s, 1H, C-H),	128 (arom)	
		3.8(s, 3H, O-CH <sub>3</sub> )	115 (arom)	
			54 (OCH <sub>3</sub> )	
<b>4g</b> 142° (30)	48	10.5 (s, 1H, =NO-H)	171.7 (CONH)	192 (M <sup>+</sup> ), 175 (M-H <sub>2</sub> O), 149, 132, 117, 90, 57
		7.20 (m, 5H, arom)	154.5 (C=NOH)	
		7.30 (am, 1H, CONH <sub>2</sub> )	136.8 (arom)	
		6.89 (am, 1H, CONH <sub>2</sub> )	128.5 (arom)	
		4.40 (s, 1H, C-H),	127.8 (arom)	
		1.70 (s, 3H, C-CH <sub>3</sub> )	126.5 (arom)	
			57.00 (C-H)	
			12.50 (C-H <sub>3</sub> )	

Por otro lado, se esperaba que estas reacciones de bioapertura dieran productos quirales por ser

catalizadas por enzimas<sup>231</sup>. Cuando se determinó la rotación óptica de todas las oximas **4a,c** y **g** fue de cero, lo que indica que estos productos se encuentran como mezclas racémicas. El siguiente equilibrio (Figura 46) podría explicar la formación de las mezclas racémicas observadas: Como la reacción se lleva a cabo en medio acuoso y a pH = 6 (Amortiguador de fosfatos) y existe un protón ácido en la molécula, éste se puede intercambiar con el agua<sup>232</sup>.

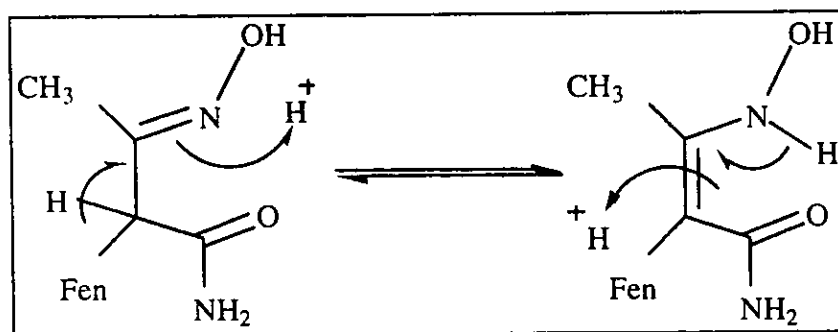


Figura 46. Equilibrio de la oxima y la hidroxilamina.

Para el caso donde se obtuvo la azirina la rotación óptica también fue de cero. Este resultado se explica también según el equilibrio mostrado en la Figura 46 y ocurre antes de la reacción de formación del ciclo de la azirina.

Es importante destacar que al ocurrir la racemización de las oximas no fue posible preparar bloques de construcción quirales con algún grado de *e.d.* Sin embargo, los resultados obtenidos son muy alentadores ya que se logró la formación de productos con un centro estereogénico. Se sabe que las modificaciones físico-químicas ofrecen la posibilidad de obtener buenos *e.e* y *e.d* para el caso de moléculas parecidas a las oximas obtenidas. Una posible forma de evitar la racemización sería emplear medios no acuosos para la biotransformación.

Actualmente se están realizando experimentos con el fin de obtener algún grado de inducción asimétrica. Por otro lado, a pesar de que no se logró preparar compuestos quirales puros resulta atractivo el haber encontrado una nueva ruta de síntesis para preparar 5-aminoisoxazoles y promisorios métodos para preparar oximas y las 2-carboxiamidas azirinas sustituidas. Por el momento se están llevando a cabo experimentos tendientes a determinar la generalidad de estas nuevas rutas de síntesis para otros importantes intermediarios sintéticos.

En resumen para esta sección, se pueden enumerar las siguientes conclusiones. Se demostró que el empleo de compuestos nitrados (3-nitropropenonitrilos sustituidos) en conjunto con el sistema biocatalítico que provee *S. cerevisiae* representan una buena y promisoriosa fuente de

intermediarios, para la síntesis de objetivos moleculares con diversos usos.

Es importante destacar que esta metodología es una alternativa más compatible con el medio ambiente que las anteriormente descritas en la literatura para la obtención de este tipo de bloques de construcción así como otros objetivos moleculares.

## V. Conclusiones y Perspectivas

- Se demostró que los 3-nitropropenonitrilos son reconocidos como sustratos del sistema biocatalítico presente en *S. cerevisiae*.
- Se encontró y se publicó el primer ejemplo de la biohidrogenación de nitroalquenos sustituidos con *S. cerevisiae*.
- Se determinaron los requisitos estereoelectrónicos que deben cumplir los nitroalquenos sustituidos para ser biohidrogenados por *S. cerevisiae*, los cuales indican que la presencia de dos grupos electroattractores (nitro-nitrilo) en posición (Z) en un doble enlace C-C impiden la reducción del doble enlace pero favorecen la del grupo nitro.
- Se demostró la viabilidad de llevar a cabo nitraciones eficientes con un método simple y económico
- Se dio a conocer un nuevo método de síntesis de 5-amino-3-alkil o aril-4-fenilisoxazoles, que se basa en la nueva y publicada propiedad catalítica encontrada a *S. cerevisiae*.
- Se obtuvo un nuevo procedimiento biocatalítico para romper enlaces O-N de un heterociclo (5-aminoisoxazoles sustituidos)
- Se encontró un nuevo método de síntesis tanto de oximas como de azirinas. Por el momento únicamente se cuenta con tres ejemplos para las oximas y un ejemplo para las azirinas, por lo que debe continuarse con la experimentación necesaria para determinar la generalidad de estos nuevos procedimientos.

## Perspectivas

Esta es la primera vez que se da a conocer la reducción del grupo nitro de un nitroalqueno. Esta reacción *per se* es interesante. No menos importante es el uso que se le pueda dar a los productos que se obtienen de la biohidrogenación, dado que los 5-amino, 3-alkil-4-fenilisoxazoles, las oximas y la 2-carboxi-azirina pueden utilizarse como intermediarios de la síntesis de otras arquitecturas moleculares.

En las figuras siguientes se presentan el uso potencial de estos bioproductos.

### 5-aminoisoxazoles

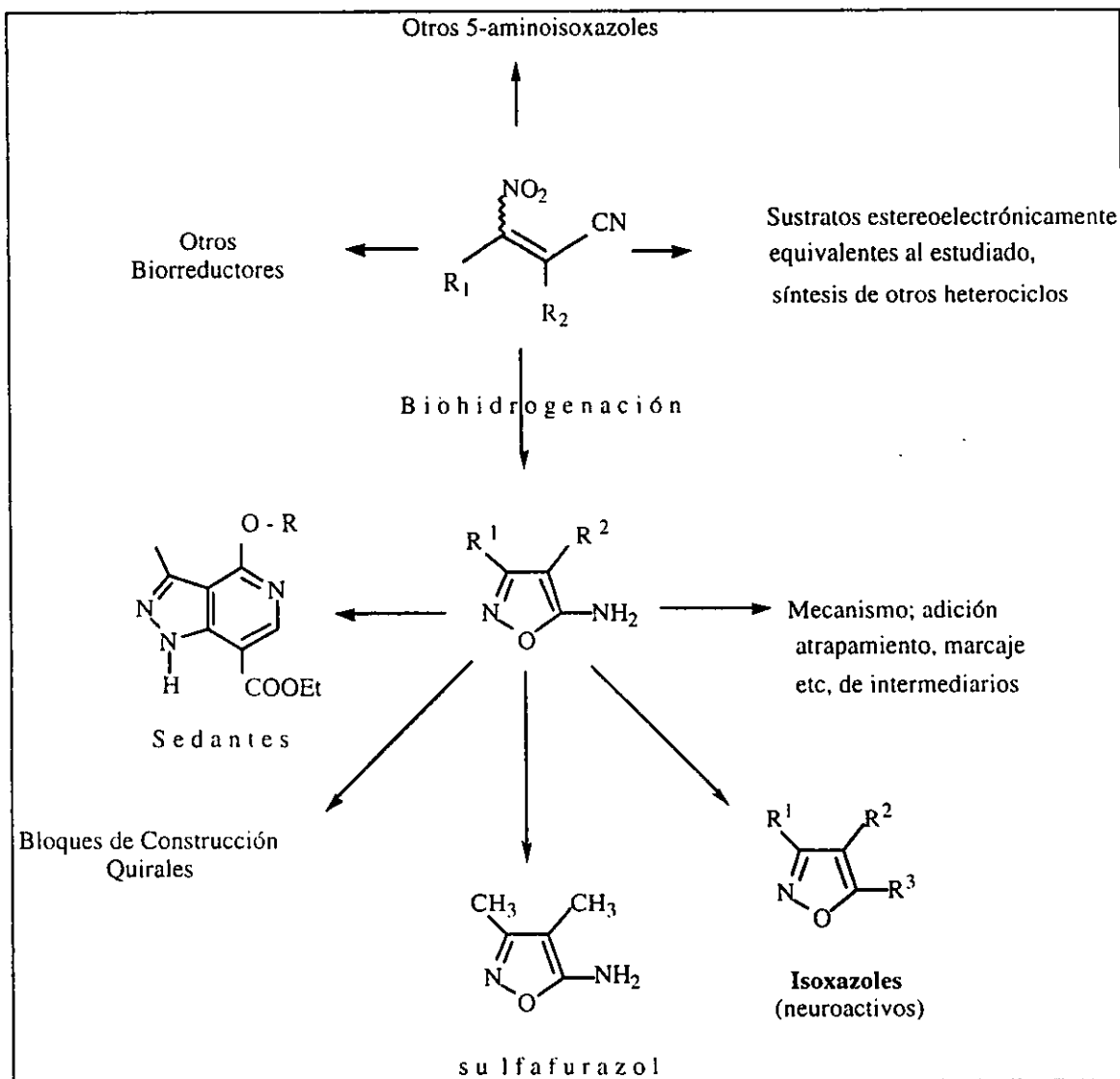


Figura 47. Perspectivas.

## VI.- Parte experimental

Las biohidrogenaciones se mantuvieron en agitación constante en un equipo **Innova 4330**. En la identificación de las enzimas extra o intracelulares participantes en la biohidrogenación se empleó una centrífuga **Janetzki K-24** y un sonicador.

Las reacciones químicas así como las biohidrogenaciones se siguieron por cromatografía en capa delgada 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 en cromatoplacas de gel de sílice **60F-254** de 2 mm de espesor. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato **Fisher Johns** y no están corregidos.

Los espectros de IR fueron realizados en los espectrofotómetros **PERKIN-ELMER 283** y **NICOLET FT-IR 55X**.

Los espectros de RMN  $H^1$  fueron determinados en los espectrómetros **Varian Gemini-200** y **Varian VXR-300S**, empleándose  $CDCl_3$  y  $DMSO-d_6$  como disolventes.

Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro de masas **Hewlett-Packard modelo 5945 A**, **JMS-SX102A JEOL** y **JMS-AX505** mediante técnicas de impacto electrónico a 70 eV o por ionización química utilizando metano para producir los iones.

Los desplazamientos químicos se dan en ppm y se asignaron las siguientes abreviaturas: s = singulete, d = doblete, dd = doble doblete, t = triplete, m = multiplete y sextuplete, am = amplia.

Las constantes de acoplamiento ( J ) están dadas en Hertz (Hz).

Para los estudios de Difracción de Rayos X se empleó un equipo **Siemens P4** y un **Enraf-Nonius CAD4**, con una fuente de radiación de  $CuK\alpha$  ( $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$ ) y  $Mo K-\alpha$  ( $\lambda = 0,71070 \text{ \AA}$ ) respectivamente a una temperatura de 298 °K. Los estudios se hicieron en la Unidad de Rayos X del Instituto de Química de la UNAM.



## 6.1.- Preparación de los substratos

Procedimiento general para la preparación de los 2-fenil-3-arylpropenenitrilos.

Los 2-fenil-3-arylpropenenitrilos se prepararon mediante una condensación de Knoevenagel, que consiste en la reacción de fenilacetnitrilo con el benzaldehído sustituido correspondiente catalizada con base (hidróxido, etóxido o metóxido de sodio). A continuación se describe como un ejemplo de este procedimiento la síntesis del (E)-2,3-difenilpropenenitrilo.

### Preparación del (E)-2,3-difenilpropenenitrilo (1a)

En un matraz Erlen Meyer de 125 ml se colocaron 0.5 mol (59 g) de fenilacetnitrilo y 0.5 mol (53 g) de benzaldehído. A esta disolución se le adicionó 5 ml de una solución de hidróxido de sodio al 40%, la mezcla se agitó vigorosamente con una varilla de vidrio hasta la formación de un sólido amarillo paja, la mezcla de reacción se filtró, el residuo se lavó con dos porciones de agua fría, el producto crudo se disolvió en etanol al 80%, se evaporó parte del disolvente hasta saturación y al enfriarse esta disolución se obtuvieron 92 g (90%) de unos cristales blancos del nitrilo **1a**.

Los restantes presubstratos **1a-i** se prepararon siguiendo el mismo procedimiento. En la tabla 1 de la página 44 se encuentran sus puntos de fusión y los rendimientos obtenidos y publicados. Todos los datos espectroscópicos (IR, RMN <sup>1</sup>H y EM) determinados a los nitrilos concuerdan con los publicados.

### **Síntesis de los substratos**

Procedimiento general para la preparación de los (Z)-2-fenil-3-aryl-3-nitropropenenitrilos

Todos los 2-fenil-3-aryl-3-nitropropenenitrilos se sintetizaron mediante al nitración con óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) de los 2-fenil-3-arylpropenenitrilos, a continuación se describe como un ejemplo de este procedimiento la síntesis del (Z)- 3-nitro-2,3-difenilpropenenitrilo (**2a**).

### Preparación del (Z)-3-Nitro-2,3-difenilpropenenitrilo **2a**

En un matraz bola de 250 mL se colocaron 5g (24 mmol) de 2,3-difenilpropenenitrilo **1a**, disuelto en 75 mL de tetracloruro de carbono, a esta solución se le adicionó 0.5 g de yodo (5mmol), se agitó y enfrió a 0 °C. Se le adicionaron los gases nitrantes, que se prepararon de la siguiente manera :

En un matraz de 500 mL, para generar los óxidos de nitrógeno, se colocaron 5 mL de THF adicionándole lentamente 10 mL de ác. nítrico al 75 % . Esta operación se repitió varias veces.

PRECAUCION: (Reacción exotérmica). Los gases nitrantes ( $\text{NO}_x$ ) así obtenidos se burbujearon lentamente con agitación al matraz 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 adicionó cantidad suficiente de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) hasta eliminación del Iodo ( $\text{I}_2$ ), después se separó la fase orgánica de la acuosa, el disolvente orgánico se concentró en un rotavapor; el residuo se disolvió en etanol caliente, se concentró hasta obtener una solución saturada, que se enfrió hasta que el producto nitrado cristalizó. Se obtuvieron 4.54 g (18.01 mmol) de cristales en forma de agujas color amarillo canario con pf 95-96 °, con un rendimiento del 74 % y un  $R_f = 0.48$  Hexano-Acetato de etilo (8 / 2) .

Datos espectroscopicos para el compuesto **(Z)-2a**

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  7.40 (s, 10 H).

I.R. ( $\text{CHCl}_3$ );  $\nu$  3045, 3009, 2225, 1542, 1446, 1333  $\text{cm}^{-1}$

EM. (IE);  $m/z$  250 ( $\text{M}^+$ , 18), 204(100), 203(84), 176 (60).

Las constantes físico-químicas para los compuestos **(Z)-2b-i** se encuentran en el artículo de nitraciones que se presenta en la sección de artículos. El trabajo donde se describe el nuevo procedimiento de nitración fué enviado a revisión para su posterior publicación.

#### Preparación del (E)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo (E)-2a

Se utilizó la misma metodología que para la obtención de **(Z)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo 2a** , variando únicamente el disolvente, se usó tetracloruro de carbono en la misma cantidad, se obtuvo una mezcla de sólidos conteniendo los **(E)** y **(Z)**- 3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo. La mezcla de sólidos se sometió a la bihidrogenación 250 mg de la mezcla de los dos sólidos, obteniendo después del tiempo de biotransformación transcurrido, el cual fue de 2 h, una mezcla de bioproductos que en su mayor parte es **(E)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo (E)-2a** y el 5-amino-3,4-difenilisoxazol **3a** logrando con esto una separación selectiva de la mezcla de isómeros.

Para la purificación del bioproducto y del isómero que no reaccionó se montó una columna utilizando como eluyente una mezcla de Hexano-Acetato de Etilo ( 9:1 ), eluyendo primero el **(E)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo** en las fracciones 2-5, y posteriormente el 5-amino-3,4-difenilisoxazol en las fracciones 6-9, de la separación se obtuvieron 150 mg (0.6 mmol, 60%) de un sólido de color amarillo claro con un pf 165-166 ° y un  $R_f = 0.66$  (Hexano/Acetato de etilo, 8:2), que se caracterizó como **(E)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo**

Datos espectroscópicos para el compuesto (E)-2a

RMN <sup>1</sup>H, (CDCl<sub>3</sub>); δ 7.75(m, 4H, arom), 7.50(m, 6H).

RMN <sup>13</sup>C, (CDCl<sub>3</sub>); δ 132.5 (C, arom), 130.9(C, arom), 129.6(C, arom), 129.4(C, arom), 129.3(C, arom), 128.2(C, arom), 127.7(C, arom), 115.9(C, C=C), 109.9(C, C=C).

IR (CHCl<sub>3</sub>); ν 3066, 2879, 2222, 1533, 1496, 1355 cm<sup>-1</sup>.

## 6-2.- Biohidrogenación de los 2,3-difenil-3-nitropropenenitrilos

Procedimiento general de biohidrogenación con *S. cerevisiae*.

Todos los 2-fenil-3-aryl-3-nitropropenenitrilos **2** se hicieron reaccionar con *S. cerevisiae* de la misma manera, a continuación se describe como un ejemplo de este procedimiento la biohidrogenación del (Z)-3-Nitro-2,3-difenilpropenenitrilo **2a**.

### Preincubación

Se colocó en un matraz de fermentación de 500 mL: 100 mL de una solución amortiguadora (fosfatos 0.2 M) 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 125 rpm y 30 °C .

### Biotransformación

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 la biotransformación total del sustrato en las mismas condiciones, el curso de la biotransformación se siguió por cromatografía en capa fina.

### Purificación

A la mezcla de biorreacción obtenida se le adicionaron 8 g de celita y cloruro de sodio hasta saturación, esta mezcla se filtró y el 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 los extractos orgánicos se juntaron, la solución se secó con sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se concentró en un rotaevaporador. El concentrado así obtenido fue purificado por cromatografía en capa fina preparativa o columna-semilíquida

De la separación cromatografica se obtuvieron 187 mg (75%) de isoxazol (**3a**) el cual se recrystalizó de etanol obteniéndose cristales en forma de agujas de color amarillo claro con pf 160 °C, y un R<sub>f</sub> = 0.457 usando como eluyente una mezcla Hexano-Acetato de etilo (7/3), y se

caracterizó como el 5-amino-3-(4-difenilisoxazol los datos espectroscópicos determinados concuerdan con los reportados.

RMN  $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  7.49(m, 10H, arom), 4.53(s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 4.53(intercambio  $\text{D}_2\text{O}$ ).

IR ( $\text{CHCl}_3$ );  $\nu$  3490, 3394, 1637, 1603, 1502, 1477, 1431  $\text{cm}^{-1}$ .

EM (IE);  $m/z$  236 ( $\text{M}^+$  100), 208(62), 89(47).

#### **5-amino-3-(4-clorofenil)-4-fenilisoxazol, (3b)**

Cuando **2b** reaccionó con *S. cerevisiae* después de realizado el trabajo de purificación se obtuvieron 58 mg (82%) del isoxazol **3b**, la recrystalización con etanol dio un sólido amarillo paja con un p.f 160 °C y un  $R_f = 0.45$  (Hexano/Acetato de etilo, 7:3).

RMN  $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  4.55(s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.31(m, 9H, arom), 4.55(intercambio  $\text{D}_2\text{O}$ ).

IR ( $\text{CHCl}_3$ );  $\nu$  3492, 3396, 3010, 2927, 1637, 1602, 1500,  $\text{cm}^{-1}$ .

EM (70eV)  $m/z$  270( $\text{M}^+$ , 100), 269(20), 242(25), 235(22), 207(25), 139(100), 89(38), 77(25).

#### **5-amino-3-(4-metoxifenil)-4-fenilisoxazol, (3c)**

Se obtuvo de la reacción de **2c** con *S. cerevisiae*, después del trabajo de purificación se obtuvieron 164 mg (70%) de isoxazol **3c**, que se recrystalizó de etanol dando un sólido amarillo claro con un p.f 135 °C y un  $R_f = 0.40$  (Hexano/Acetato de etilo 7:3).

RMN  $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ );  $\delta = 3.76$ (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.60(s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.80(d,  $J=8.7\text{Hz}$  2H, arom), 7.35(d,  $J=8.7\text{Hz}$ , 2H), 7.22(m, 5H, arom), 4.60(intercambio  $\text{D}_2\text{O}$ )

IR ( $\text{CHCl}_3$ );  $\nu$  3465, 3323, 3170, 2925, 2851, 1638, 1611, 1503  $\text{cm}^{-1}$ .

EM (IE);  $m/z$  266 ( $\text{M}^+$ , 55), 238(15), 222(10), 135(100), 134(90), 105(22), 77(21).

#### **5-amino-3-(4-nitrofenil)-4-fenilisoxazol, (3d)**

El isoxazol **3d** se obtuvo de la reacción de **2d** con *S. cerevisiae*. Después del trabajo de la reacción y la purificación se obtuvieron 207 mg (74%) de un sólido-blando, con un  $R_f = 0.21$  (Hexano/Acetato de etilo 1:1).

RMN  $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  4.54(s, 2H), 7.26(d,  $J=8.0\text{Hz}$ , 2H, arom), 7.38(d,  $J=8.0\text{Hz}$ , 2H, arom) 7.5(m, 5H, arom), 4.52 (intercambio  $\text{D}_2\text{O}$ )

IR ( $\text{CHCl}_3$ );  $\nu$  3446, 3314, 3176, 2926, 1640, 1607, 1504, 1434  $\text{cm}^{-1}$ .

EM (IE)  $m/z$  174(100), 158(5), 146(15), 130(20), 116(11), 105(98), 77(42).

#### **5-amino-3-(2-tionil)-4-fenilisoxazol, (3e)**

El compuesto **3e** se preparó de la reacción de **2e** con *S. cerevisiae*, después de la purificación

cromatográfica se obtuvieron 124 mg (52%) de un aceite amarillo que tiene un  $R_f = 0.35$  (Hexano/Acetato de etilo 7:3).

RMN  $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  7.35(m,6H, arom), 7.05 (m,1H, fur), 6.93(m, 1H, fur), 5.32(m, 1H, fur), 4.47(2H,  $\text{NH}_2$ ), 4.47(intercambio  $\text{D}_2\text{O}$ )

EM (70eV) m/z: 242( $\text{M}^+$ , 35), 226(10), 149(36), 111(100), 97(35).

### **5-amino-3-(2-furil)-4-fenilisoazol, (3f)**

El compuesto **3f** se obtuvo de la reducción de **2f** con *S. cerevisiae*, después de la cromatografía en columna se obtuvieron 119 mg (50%) de un aceite amarillo inestable con un  $R_f = 0.37$  (Hexano/Acetato de etilo 8:2). La presencia de este bioproducto solo se realizó por su comportamiento en CCF.

### **5-amino-3-metil-4-fenilisoazol, (3g)**

De la reacción de **2g** con *S. cerevisiae*, después de la separación cromatográfica se obtuvieron 195 mg (80%) de un sólido amarillo, que se recrystalizó de etanol con un  $\text{pf } 70^\circ\text{C}$  y un  $R_f = 0.37$  (Hexano/Acetato de etilo 2:8).

RMN  $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  2.5 (s, 3H, Me), 4.5(s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.35(m, 5H, arom), 4.5 (intercambio  $\text{D}_2\text{O}$ ).

IR ( $\text{CHCl}_3$ );  $\nu$  3310, 2924, 2853, 1656, 1606, 1507, 1460, 1436  $\text{cm}^{-1}$ .

EM (IE); m/z 174( $\text{M}^+$ , 35), 158(5), 146(25), 130(16), 115(11), 89(33), 77(54).

### **5-amino-4-fenilisoazol, (3h)**

El compuesto **3h** se obtuvo de la reacción de **2h** con *S. cerevisiae*. Después de la purificación se obtuvieron 167 mg (75%) de un sólido amarillo, que se recrystalizó de etanol con un  $\text{pf } 95^\circ\text{C}$  y un  $R_f = 0.47$  (Hexano/Acetato de etilo 7:3).

RMN  $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  4.71 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.33(m, 5H, arom), 8.19(s,1H, isox), 4.71(intercambio  $\text{D}_2\text{O}$ )

IR ( $\text{CHCl}_3$ );  $\nu$  3302, 3184, 2918, 2850, 1641, 1608, 1513, 1490  $\text{cm}^{-1}$ .

EM (IE); m/z 160( $\text{M}^+$ ,75), 144(28), 143(25), 117(100), 104(75), 89(50), 77(40).

### 6-3.- Apertura biocatalizada de 5-aminoisoxazoles

#### 5-amino-3,4-difenilisoaxazol, (3a)

La metodología seguida en las bioaperturas fue la misma en todos los casos, a continuación esta se ejemplificará con el sustrato 5-amino-3,4-difenilisoaxazol.

Preincubación :

Se colocó en un matraz de fermentación de 500 ml, 100 ml de una solución amortiguadora a pH = 6, con 12.5 g de glucosa como fuente de carbono, así como 12.5 g de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), esta mezcla se tapó y agitó durante 30 min a 116 rpm y 30 °.

Terminada la preincubación se agregó el sustrato **3a** (250 mg) disuelto previamente en 10 mL de una solución 1:1 de acetona/etanol. Esta mezcla se agitó durante 48 h más en las mismas condiciones.

A la mezcla obtenida se le agregaron 8 g de celita, así como cloruro de sodio (NaCl) hasta saturación. Se filtró, y el residuo se lavó con 3 porciones de 100 mL de acetato de etilo; al filtrado se le realizaron 3 extracciones sucesivas de 25 mL con el mismo disolvente. El lavado y la fase orgánica se juntaron, esta solución se secó con sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró en un rotaevaporador. El residuo fue purificado por cromatografía en columna "relampago" utilizando como eluyente una mezcla de Hexano/Acetato de etilo ( 8.5:1.5).

De la cromatografía en columna se obtuvieron 115 mg (31%) de la 2,3-difenil-3-oximinopropanamida (**4a**). Esta se recristalizó de metanol. El compuesto **4a** es un sólido blanco con un pf 162 ° y un R<sub>f</sub> = 0.35 (Hexano/Acetato de etilo 1:1).

RMN H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>); δ 7.80 (m, 2H, arom), 7.3 (m, 8H, arom), 6.30(amplio, 1H, CONH<sub>2</sub>), 5.80(an, 1H, CONH<sub>2</sub>), 4.20 (s, 1H, C-H), 6.30 y 5.80(intercambio D<sub>2</sub>O ).

RMN C<sup>13</sup> (CDCl<sub>3</sub>); δ 172.8 (CONH), 162.9(C=NOH), 136.5 (arom), 133.0 (arom), 130.8 (arom), 129.3 (arom), 128.4 (arom), 128.1 (arom), 127.8 (arom), 122.0 (arom), 42.3 (C-H).  
IR (CHCl<sub>3</sub>); ν 3390.9, 3190, 1748, 1659, 1597, 1453, 1398 cm<sup>-1</sup>.

EM (70eV); m/z = 236(M<sup>+</sup> -H<sub>2</sub>O, 10), 208(25), 192(7), 105(100), 89(18), 77(20), 63(12).

#### 5-amino-3-(4-metoxifenil)-4-fenilisoaxazol (3c)

De la cromatografía en columna se obtuvieron 113 mg (34%) de la 2-fenil-3-(4-metoxifenil)-3-oximinopropanamida (**4c**), esta se recristalizó de metanol. El compuesto **4c** (mezcla) es un sólido amarillo claro con un pf 170° y un R<sub>f</sub> = 0.28 (Hexano/Acetato de etilo 1:1).

RMN H<sup>1</sup>(CDCl<sub>3</sub>); δ 7.94(d, J=9.0Hz, 2H, arom), 6.90(d, J=9.0Hz, 2H, arom) 7.30(m, 5H, arom), 5.8(s, amplio, 1H, CONH<sub>2</sub>), 5.6(s, amplio, 1H, CONH<sub>2</sub>), 5.5(s, 1H, C-H), 3.8(s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 5.8

y 5.6(intercambio D<sub>2</sub>O ).

RMN C<sup>13</sup>(CDCl<sub>3</sub>); δ 174(CONH), 165(C=NOH), 137(arom), 132(arom), 131(arom), 128(arom), 115(arom), 54(OCH<sub>3</sub>), 42(C-H).

IR (CHCl<sub>3</sub>); ν 3446, 3338, 2924, 1747, 1670, 1602, 1575, 1508 cm<sup>-1</sup>.

EM (IE); m/z 284(M<sup>+</sup>, 2), 266(M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O, 10), 135(100), 97(5), 57(12).

Para el bioproducto **4c** no ha sido posible obtener cristales adecuado para su estudio cristalográfico de Rayos X.

### **5-amino-3-metil-4-fenilisoxazol (3g)**

De la cromatografía en columna se obtuvieron 107 mg (32%) de la 2-fenil-3-oximino-butanamida **4g**, esta se recristalizó de metanol. El compuesto **4g** es un sólido cristalino blanco con un pf 142° y un R<sub>f</sub> = 0.46 (Hexano/Acetato de etilo 1:1).

RMN H<sup>1</sup>(CDCl<sub>3</sub>); δ 10.5(s, 1H, =NO-H), 7.20(m, 5H, arom), 7.30(am, 1H, CONH<sub>2</sub>) 6.89(an,1H, CONH<sub>2</sub>), 4.40(s, 1H, C-H), 1.70(s, 3H, C-CH<sub>3</sub>), 7.30 y 6.89(intercambio D<sub>2</sub>O ).

RMN H<sup>13</sup>(CDCl<sub>3</sub>); δ 171.7(CONH), 154.5(C=NOH), 136.8(arom), 128.5(arom), 127.8 (arom), 126.5 (arom), 57.00 (C-H), 12.50 (C-H<sub>3</sub>).

IR (CHCl<sub>3</sub>); ν 3467.6, 3411.2, 3207.9, 1693.1, 1651.9, 1600.8, 1398.4, 1012.5, 700.1, cm<sup>-1</sup>.

EM (IE); m/z 192(M<sup>+</sup>, 3), 175(M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O, 7), 149(100), 132(75), 117(44), 90(15), 57(14).

Como se obtuvieron cristales adecuados de **4g** se le realizó un estudio cristalográfico, la estructura resultante concuerda con las otras constantes físico-químicas.

### **Obtención de la 2-carboxiamida-2,3-difenil-2H-azirina (5)**

Cuando la oxima **4a** se paso por una columna de cromatografía en columna después de concentrar las diferentes fracciones se obtuvieron 100 mg (31%) de **5**, el cual posteriormente se recristalizó con metanol. El compuesto **5** es un sólido cristalino blanco con un pf 177-179 ° (lit. 181 °C) y un R<sub>f</sub> = 0.28 (Hexano/Acetato de etilo 1:1) y presenta las siguientes constantes espectroscópicas:

RMN H<sup>1</sup>(CDCl<sub>3</sub>); δ 7.16(m 10H, arom), 4.60(s, 2H, CONH<sub>2</sub>), (4.6,intercambio D<sub>2</sub>O ).

RMN C<sup>13</sup>(CDCl<sub>3</sub>); δ 165.5(CONH<sub>2</sub>), 161.9(C=N), 130.6(arom), 129.4(arom), 129.2(arom), 129.2(arom), 129.1(arom), 128.9(arom), 128.3(arom), 128.3(arom), 126.9(arom), 94.2(C-arom).

IR. (CHCl<sub>3</sub>); ν 3406, 3163, 1634, 1508, 1484, cm<sup>-1</sup>.

EM. (IE); m/z 236(M<sup>+</sup>, 5), 220(M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O, 3), 208(18), 105(100), 89(28), 77(35), 63(18).

#### 6.4.-Demostración de las biohidrogenaciones

##### Inactivación del biocatalizador por temperatura.

Se colocó en un matraz de fermentación de 500 ml: 100 ml de solución amortiguadora (fosfatos) a pH = 6 , con 2.5 g de fuente de carbono (glucosa) , así como 5 g de *Saccharomyces cerevisiae*, esta mezcla se calentó a 75 ° durante 30 min.

Preincubación: El matraz de reacción se tapó y agitó durante 30 min. a 116 rpm y 30 °.

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

Purificación: Al matraz de reacción se le agregaron 8 g de celita así como cloruro de sodio (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 con 25 mL con el mismo disolvente. El lavado y la fase orgánica se juntaron esta solución se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh), y se concentró en un rotaevaporador .

El residuo fue purificado por cromatografía en columna usando como eluyente una mezcla de Hexano/Acetato de etilo 9:1. En las fracciones 2-5 se obtuvo el producto principal.

De la separación cromatográfica se obtuvieron 224 mg (0.89 mmol ) del sustrato (**Z**)-**2a** con un 90 % de materia prima recuperada con pf 95-96 ° y R<sub>f</sub> = 0.48 de Hexano/Acetato de etilo 8:2, con cristales en forma de agujas color amarillo canario.

Obteniendo datos espectroscópicos similares a (**Z**)-**2a**.

##### Experimento de biohidrogenación sin biocatalizador

Se utilizó el método general de bioreducción, descrito anteriormente, manteniendo constante todos los parámetros y como única variante la ausencia del biocatalizador.

Después de realizar el trabajo de la reacción se obtuvo un residuo el cual se recrystalizó de metanol .

Como resultado de la purificación se obtuvieron 0.239 mg (0.952 mmol ), (96 %) de materia prima recuperada sustrato **2a**, con pf 95-96 °C, y R<sub>f</sub> = 0.48 de Hexano-Acetato de etilo ( 8:2 ) .

Es importante mencionar que a todos los sustratos que se biotransformaron con *S. cerevisiae* se les realizaron los dos experimentos descritos.



## VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Hargittai, I.; Hargittai, M. *Symmetry Through the Eyes of a Chemist*. Plenum-Press, New York, 1995, p.72.
- 2.- Gaffiel, W. *Studies in Natural Products Chemistry*; Ed. Atta-ur-Rahman., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1990, Vol. 7, p. 3-29.
- 3.- Davies, S. D. *Chem. Ind. (London)*. 1986, 506-509.
- 4.- Hannesian, S. *Total Synthesis of Natural Products: The Chiron Approach*; Pergamon Press, New York, 1983.
- 5.- Davies, S. G. *Organotransition Metal Chemistry: Applications to Organic Synthesis*; Pergamon Press, Oxford, 1982.
- 6.- Schuring.; Nowotny, H. P. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 939.
- 7.- Jones, J. B. *Asymmetric Synthesis*; Ed. Morrison, J. O., Academic Press, New York, 1983, vol.4.
- 8.- *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Tech. Chem*; Jones, J. B.; C.J. Sih, C. J.; Perlam, D. Eds. Wiley, New York, 1976, vol.10, 001p.  
Servi, S. *Synthesis*. 1990, 1.  
Csuk, R.; Glanzer, B. I. *Chem. Rev.* **1991**, 91, 49.  
Azerad, R.; *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, 132, 17.
- 9.- *Preparative Biotransformations*; Roberts, S. M. Ed., John Wiley, Chichester. 1997, 0.0.0. p.
- 10.- Olah, G. A.; Malhotra, R.; Narang, S. C. *Nitration: Methods and Mechanisms*, VHC.Publishers, 1989.
- 11.- Seebach, D. *Modern Synthetic Methods*; Scheffold, Ed, R. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio, 1986.
- 12.- Barret, A. G. M. *Chem. Soc. Rev.* **1991**, 20, 95-127.
- 13.- Wong, C. H. and Whitesides, G. M. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*. Pergamon, Oxford, 1995.
- 14.- Kieslich, K. *Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds*. John Wiley, New York, 1976.  
Sih, C. J.; Rosazza, J. P. *Microbial Transformation in Organic Synthesis*; Jones, J. B.; Sih, C. J.; Perlam, D. Ed. *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry*, John Wiley, New York, 1976.
- 15.- Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1071.  
Turner, N. J. *Nat. Prod. Rep.* **1994**, 11, 1.

- Meijer, E. M.; Ed. *Biocatalysis in Organic Chemistry, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* special issue, 1990, 3, 1.
- Crout, D. H. G.; Roberts, S. M.; Jones, J.B. Ed, *Enzymes in Organic Synthesis, Tetrahedron-Asymmetry.* special issue. 1993, 4, 1.
- 16.- Schoffers, E.; Golebiowski, A.; Johnson, C. R. *Tetrahedron.* **1996**, 52, 3769.
- 17.- Wong, C. H.; Whitesides, G. M, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*; Pergamon; Oxford, 1994.
- 18.- Jakubke, H. D. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 175.
- 19.- Fang, J. M.; Lin, C. H.; Bradshaw, C. W.; Wong, C. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **1995**, 967.
- 20.- Rasor, J. P. *Chim. Oggi/chemistry today.* **1995**, 9.
- 21.- Förster, S.; Roos, J.; Effenberger, F.; Wajat, H.; Sprauer, A. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 437.
- Luna, H.; Pérez-Mendez, I.; Manjarrez-Alvarez, N.; Sánchez, R.; Solis-Oba, A. *THE FIFTH CHEMICAL CONGRESS OF NORTH AMERICA 1997*, Cancún, México.
- 22.- Chiffoleau-Giraud, V.; Spangenberg, P.; Rabiller, C. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1997**, 2017.
- 23.- McGarvey, G. J.; Wong, C. H. *Liebings Ann/Recueil.* **1997**, 1059.
- 24.- Wong, C. H.; Halcomb, R. L.; Ichikawa, Y.; Kajimoto, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 521.
- Danieli, B.; Luisetti, M.; Schubert-Zsilavec, M.; Likussar, W.; Steurer, S.; Riva, S.; Monti, D.; Reiner, J. *Hel. Chem. Acta.* **1997**, 80, 1153.
- 25.- Laschat, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 289.
- 26.- Oikawa, H.; Katayama, K.; Suzuki, Y.; Ichihara, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1321.
- 27.- Hudlicky, T. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3.
- 28.- Humphrey, A. J.; Turner, N. J.; McCague, R.; Taylor, S. J. C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2475.
- 29.- Meekel, A. A. P.; Resmini, P.; Pandit, U. K. *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 571. Yli-Kauhahuoma, J. T.; Ashley, J. A.; Lo, C. H.; Tucker, L.; Wolfe, M. M.; Janda, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7041.
- 30.- Thomas, N. R. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, 479.
- 31.- Hase, T.; Brunow, G.; Hase, A.; Kodaka, M.; Neagu, C.; Nevanen, T.; Teeri, T.; Teleman, O.; Tiainen, E.; Yli-Kauhahuoma, J.; Yliniemela, A. *Pure & Appl. Chem.* **1996**, 68, 605.

- 32.- Alfermann, A. W.; Reinhard, E. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1980**, 1-2, II-35. Suga, T.; Hirata, H. *Phytochemistry* **1990**, 29, 2393.
- 33.- Syahrani, A.; Indrayanto, G.; Sutarjadi. Wilkins, A. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, 45, 555.
- 34.- Hamada, H.; Yasumune, H.; Fuchikami, Y.; Hirata, T.; Sattler, I.; Williams, H. J.; Scott, I. *Phytochemistry* **1997**, 44, 615.
- 35.- Dufresne, C.; Cormier, F.; Dorion, S. *Planta Medica* **1997**, 63, 150.
- 36.- Kutney, J. P. *Pure & Appl. Chem.* **1997**, 69, 431.
- 37.- Prudent, J. R.; Uno, T.; Schultz, P. G. *Science* **1994**, 264, 1924.
- 38.- Xiaochang, D.; Mesmaeker, A.D.; Joyce, G. F. *Science* **1995**, 267, 237.
- 39.- Tomado de *Chemistry & Industry*, **1995**, 675.
- 40.- *Preparative Biotransformations*; Ed. by Roberts, S. M. John. Wiley, Chichester. 1997, 2.1.1. p.  
Ver también referencia 3.  
Kieslich, K.; Leuenberger, H. G. W.; Seebach, D. Ed, "Proceeding of the International Biorganic Symposium " Biotransformation in Organic Chemistry: Principles and applications", Interlaken 1993, *Chimia* . special issue. 1993, 47, 4.
- 41.- Hudlicky, T. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 14.
- 42.- Birch, O. M.; Brass, J. M.; Kiener, A.; Robins, K.; Schmidhalter, D.; Shaw, N. M.; Zimmermann, T. *Chim. Oggi/Chemistry today.* **1995**, 9.
- 43.- Coñonna, S.; Gaggero, N.; Pasta, P.; Ottolina, G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1996**, 2303.
- 44.- Pedragosa-Moreau, S.; Archelas, A.; Furstoss, R. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1996**, 769.
- 45.- Fang J. M.; Lin, C. H.; Bradshaw, C. W.; Wong, C. H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans, I.* **1995**, 967.
- 46.- Cagnon, R.; Crogan, G.; Groussain, E.; Pedragosa-Moreau, S.; Richardson, P. F.; Roberts, S. M.; Willetts, A. J.; Alphand, V.; Lebreton, J.; Furstoss, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans, I.* **1995**, 2528.
- 47.- Kovalenko, G. A. *Russ. Chem. Rev. ( Engl. Transl).* **1996**, 65, 625.
- 48.- Davis, C. R.; Johnson, R. A.; Cialdella, J. I.; Liggett, W. F.; Mizesak, S. A.; Han, F.; Marshall. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2252.  
Davis, C. R.; Johnson, R. A.; Cialdella, J. I.; Liggett, W. F.; Mizesak, S. A.; Han, F.; Marshall. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2244.  
de Raadt, A.; Griengl, H.; Petsch, M.; Plachota, P.; Schoo, N.; Weber, H. *Tetrahedron; Asymmetry* **1996**, 7, 467.

- 49.- Nagasawa, T.; Yamada, H. *Pure & Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1241.
- 50.- Ager, D. J.; East, M. B. *Asymmetric Synthetic Methodology*; CRC Press: Boca Raton, 1995, p.391.  
*Preparative Biotransformations*, Ed by Roberts, S. M. J. Wiley, Chichester. 1997, H1 p.  
 Servi, S. *Synthesis* **1990**, 1.  
 Csuk, R.; Glanzer, B. I. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 49.
- 51.- Tanikaga, R.; Shibata, N.; Yoneda, T. *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. I.* **1997**, 2253.
- 52.- Rykowski, A.; Lipinska, T.; Gizik, E.; Adamiuk, M.; Olender, E. *Polish. J. Chem.* **1997**, *71*, 69.
- 53.- Forzato, C.; Nitti, P.; Pitaco, G.; Valentin, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1811.
- 54.- Maguire, A. R.; Lowney, D. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans, I.* **1997**, 235.
- 55.- Takatori, K.; Tanaka, K.; Matsuoka, K.; Morishita, K.; Kajiwara, M. *Synlett* **1997**, 159.
- 56.- Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Medici, A.; Pedrini, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 1811.
- 57.- Kanerva, L. T. *Acta. Chem. Scand.* **1996**, *50*, 234.
- 58.- Izumi, T.; Satou, K.; Ono, K. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1996**, *66*, 233.
- 59.- Manitto, P.; Speranza, G.; Monti, D.; Fontana, G.; Panosetti, E. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 11531.
- 60.- Resnick, S. M.; Torok, D, S.; Gibson, D. T. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3546.
- 61.- Sakakibara, M.; Ogawa-Uchida, A. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, *59*, 1300.
- 62.- Guarna, A.; Occhiato, E. G.; Spinetti, L. M.; Vallecchi, M. E.; Scarpi, D. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1775.
- 63.- Ishihara, K.; Higashi, Y.; Tsuboi, S.; Utaka, M. *Chem. Lett.* **1995**, 253.
- 64.- Occhiato, E. G.; Guarna, A.; De Sarlo, F.; Scarpi, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2971.
- 65.- Rike, A. G.; Jenssen, L.; Bordalen, B. E.; Ringtan, O.; Hustoft, A. G.; Seip, K. L. Proceedings of the "3rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUPERCRITICAL FLUIDS", TOME 2, STRASBOURG ( FRANCE), OCTOBER **1994**.
- 66.- Brenna, E.; Caraccia, N.; Fogliato, G.; Fronza, G.; Fuganti, C. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10555.
- 67.- Nakamura, K.; Komdo, S.; Kawai, Y.; Hida, K.; Kitano, K.; Ohno, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 409.
- 68.- Inoue, T.; Hosomi, K.; Araki, M.; Nishide, K.; Node, M. *Tetrahedron: Asymmetry*

- 1995, 6, 31.
- 69.- Utaka, M.; Ito, H.; Mizumoto, T.; Tsuboi, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 685.
- 70.- Fogliato, G.; Fronza, G.; Fuganti, P. G.; Servi, S. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5693.
- 71.- Byrgesen, E.; Nielsen, J.; Willert, M.; Bols, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 36, 5697.
- 72.- Danchet, S.; Bigot, C.; Buisson, D.; Azerad, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 1735.
- 73.- Buisson, D.; Azerad, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 9.
- 74.- Bardot, V.; Besse, P.; Gelas-Miahle, Y.; Remuson, R.; Veschambre, H. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 1077.
- 75.- Nakamura, K.; Kondo, S.; Nakajima, N.; Ohno, A. *Tetrahedron* **1995**, 51, 687.
- 76.- Cabon, O.; Buisson, D.; Larcheveque, M.; Azerad, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 2199.
- 77.- Koul, S.; Crout, D. H. G.; Errington, W.; Tax, J. *J. Chem., Soc. Perkin. Trans, I.* **1995**, 2969.
- 78.- Mehmandoust, M.; Buisson, D.; Azerad, R. *Tetrahedron. Lett.* **1995**, 36, 6461.
- 79.- Fronzza, G.; Fogliato, G.; Fuganti, C.; Lanati, S.; Rallo, R.; Servi, S. *Tetrahedron. Lett.* **1995**, 36, 123.
- 80.- Fogliato, G.; Fronza, G.; Fuganti, C.; Lanati, S.; Rallo, R.; Rigoni, R.; G.; Servi, S. *Tetrahedron* **1995**, 51, 10231.
- 81.- Kawai, Y.; Saitou, K.; Hida, K.; Ohno, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 2143.
- 82.- Zymanczyk-Duda, E.; Lejczak, B.; Kafarski, P.; Grimaud, J.; Fischer, P. *Tetrahedron* **1995**, 51, 11809.
- 83.- Howell, J. A. S.; O'Leary, P. J.; Palin, M. G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 307.
- 84.- Heat, C. M.; Imrie, R. C.; Jones, J. J.; Rees, M. J.; Robin, K. G.; Verall, M. S. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1997**, 68, 324.
- 85.- Fronza, G.; Fuganti, C.; Mendozza, M.; Rallo, R. S.; Ottolina, G.; Joulain, D. *Tetrahedron* **1996**, 52, 401.
- 86.- Koul, S.; Crout, D. H. G.; Errington, W.; Tax, J. *J. Chem., Soc. Perkin. Trans, I.* **1995**, 2969.
- 87.- a) Baik, W.; Kim, D.I.; Lee, H.J.; Chung, W. J.; Kim, B.H.; Lee, S. W. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4579. b) Blackie, J. A.; N. J. Turner.; Well, A. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3043.
- 88.- Navarro-Ocaña, A.; Jiménez-Estrada, M.; González-Paredes, M.B.; Bárzana, E. *Synlett* **1996**. 695.
- 89.- Baik, W.; Park, T.H.; , Kim, B.H.; Jun, Y.M. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5683.

- 90.- Baik, W.; Rhee, J.U.; Lee, S.H.; Lee, N.H.; Kim, B.H.; Kim, K.S. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2793.
- 91.- Baik, W.; Kim, D.I.; Koo, S.; Rhee, J. U.; Shin, S.H.; Kim, B. H. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 845.
- 92.- Kamal, A.; Damayanthi, Y.; Narayan Reddy, B. S.; Lakminarayana, B.; Praveen Reddy, B. S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1997**, 1015.
- 93.- Stewart, J. D.; Reed, K. W.; Kayser, M. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **1996**, 755.
- 94.- Alphanh, V.; Gaggero, N.; Colonna, S.; Pasta, P.; Furstoss, R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9695.
- 95.- Beecher, J.; Brackenridge, I.; Roberts, S. M. Tang, J.; Willetts, A. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans, I.* **1995**, 1645.  
Tang, J.; Brackenridge, I.; Roberts, S. M. Beecher, J.; Willetts, A. J. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 13217.
- 96.- Easton, C. J.; Hughes, C. M. M.; Tiekink, E. R. T.; Savage, G. P.; Simpson, G. W. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 629.
- 97.- Huber, P.; Bratovanov, S.; Bienz, S.; Sylatk, C.; Pietzsch, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 69.
- 98.- Ikeda, H.; Sato, E.; Sugai, T.; Ohta, H. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8113.
- 99.- Svatos, G.; Hunkova, Z.; Kren, V.; Hoskovec, M.; Saman, D.; Valterova, J. V.; Koutek, B. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1285.
- 100.- Lee, S. S.; Lin, G. S.; Wang, K. C. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1563.
- 101.- Miyazawa, M.; Tsuruno, K.; Kameoka, H. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1221.
- 102.- Holland, H. L.; Qi, J.; Manoharan, S. *Can. J. Chem.* **1995**, *73*, 1399.
- 103.- Salvi, N. A.; Patil, P. N.; Udupa, S. R.; Banerji, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2287.
- 104.- Nakamura, K.; Inoue, Y.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 265.
- 105.- Fronza, G.; Fuganti, C.; Grasselli, P.; Servi, S.; Zucchi, G.; Barbeni, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 439.
- 106.- Mochizuki, N.; Sugai, T.; Ohta, H.; Yokomatsu, T.; Shibuya, S. *Heterocycles* **1997**, *45*, 331.
- 107.- Revisiones sobre el uso de los compuestos nitrados en síntesis.  
(a) Fuji, K.; Node, M. *Synlett* **1991**, 603.  
(b) Tamura, R.; Kamimura, A.; Ono, N. *Synthesis* **1991**, 423.  
(c) Karakhanov, R. A.; Kelarev, V. I.; Polivin, Y. N. *Russ. Chem. Rev.* **1993**, 933, 725.

- (d) Rudchenko, V. F. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 725.
- (e) Bott, K. In *Methoden der Organischen Chemie*, (Houben-Wely), 4th ed.; Kropf, H., Schaumann, E., Eds.; Georg Thieme, Stuttgart, 1993; Vol E15/1, pp 1129-1200.
- (f) *The Chemistry of Amino, Nitroso and Nitro compounds and Their Derivatives*; Patai, S., Ed.; John Wiley: New York, 1982; Part 1.
- (g) Perekalin, V. V.; Lipina, E. S. Berestovitskaya, V. M.; Efremov, D. A. In *Nitroalkenes: Conjugated Nitro Compounds*. Wiley, New York, 1994.
- h) Olah, G. A. *Aldrichimica Acta.* **1979**, 12, 43.
- i) Bauer, H.; Urbas, L. *The Chemistry of the Nitro and Nitroso group*; Feuer, H., Ed.; Wiley-interscience, New York, 1970, Part 1 and 2.
- 108.- 'Encyclopedia of Chemical Technology', 3rd,ed., Kirk Orthmer, eds. Wiley, New York, 1981, vol.15, .
- 109.- Olah, G. A. Malhotra, R and Narang, S.C. 'Nitration: Methods and Mechanisms', VHC.Publishers, 1989.
- 110.- Seebach, D. 'Modern Synthetic Methods', ed.R.Scheffold, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio, 1986.,  
Seebach, D.; Colvin, E. W.; Lehr, F.; Weller, T. *Chimia* **1979**,311.
- 111.- Barret, A. G. M. et al, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 992.  
Barret, A. G. M.; Graboski, G.G. *Chem. Rev.* **1986**, 86, 751.  
Barret, A. G. M. *Chem. Soc. Rev.* **1991**, 20, 95.
- 112.- Schechter, H.; Conrad, F.; Daulton, A. L.; Kaplan, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3052.
- 113.- Doré, J.C.; Viel, J. *Eur. J. Med. Chem.* **1974**, 9, 666.
- 114.- Deswarte, P. M.; Viel, C. *J. Heterocyclic Chem.* **1979**, 16, 1611.
- 115.- Okamoto, T.; Takahashi, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, 16, 1700.
- 116.- Hosmane, R. S.; Bhan, A.; Rauser, M. E. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 5892.
- 117.- Colau, R.; Viel, C. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1980**, 3-4, 163.  
Deswarte, S.; Bellec, C. *J. Heterocyclic Chem.* **1980**, 17, 891.  
Bellec, C.; Bertin, D.; Colau, R.; Deswarte, S.; Maitte, P.; Viel, C. *J. Heterocyclic Chem.* **1979**, 16, 1611.
- 118.- Franck-Neumann, M.; Miesch, M. *Tetrahedron* **1983**, 39, 1254.
- 119.- Padwa, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 4974.
- 120.- Padwa, A.; Fisera, L.; Koeehler, K. F.; Rodriguez, A.; Wong, G. S. K. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 276.

- 121.- De Bernardo, S.; Weigele, M. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 109.
- 122.- Yamamori, T.; hiramatu, Y.; Sakai, K.; Adachi, I. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 913.
- 123 Okamoto, T.; Takahashi, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, *16*, 1700.
- 124 Griss, G.; Machleidt, H. *Ann. Chem.* **1970**, 738, 60.
- 125.- Artículo en revisión.
- 126.- Lednicer, D. *Adv. Org. Chem.* **1972**, *8*, 179.
- 127.- Meyers, A. I. *Heterocycles in Organic Synthesis*, Wiley. New York, 1974.
- 128.- Kozikowski, A. P. in: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Eds. Katrizky, A. R.; Rees, C. W. Vol. 1. Pergamon Press, Oxford, 1984, 453 p.
- 129.- Obregia, A. *Ann. Chem.* **1891**, 266, 324.
- 130.- *Chem. Abstr.* **1982**, *97*, 72372.
- 131.- Uno, H.; Kurotawa, M.; Nishimura, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1976**, *24*, 624.
- 132.- Nishiwaki, T.; Kondo, K. *J. Chem. Soc., Perkin I.* **1972**, 90.
- 133.- *Chem. Abstr.*, **1982**, *96*, 181271.
- 134.- *Chem. Abstr.* **1947**, *42*, 4202.
- 135.- *Chem. Abstr.* **1956**, *50*, 214.
- 136.- Dokic, S.; Servis, L.; Suskovic, B. *Hem. Ind.* **1980**, *34*, 325.
- 137.- L'abbé, G.; Mathys, G.; Toppet, S. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 3449.
- 138.- Harsányi, K.; Heja, G. *Chem. Ber.* **1974**, *107*, 2794.
- 139.- Dines, M.; Scheinbaum. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 4817.
- 140.- Takeda, K.; Tokuyama, K. *J. Pharm. Soc. Japan.* **1956**, *76*, 77.
- 141.- Uno, H.; Kurotawa, M.; Nishimura, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1976**, *24*, 624.
- 142.- Moureu, J.; Lazennec, C. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1907**, 1079.
- 143.- Fujita, H.; Endo, R.; Oayama, A.; Ichii, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1972**, *45*, 1846.
- 144.- Harki, E.; Hirai, Y.; Imoto, I.; Ichii, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1968**, *41*, 267.
- 145.- Harsányi, K.; Takacs, K.; Horváth, K. *Chem. Ber.* **1974**, *107*, 2563.
- 146.- Pochat, P. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 3755.
- 147.- Kampe, K. D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1982**, *21*, 540.
- 148.- Tornetta, B. *Gazz. Chim. Ital.* **1962**, *92*, 651.
- 149- Alberola, A.; González, A.M.; Laguna, M.A.; Pulido, F.J. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3423.
- 150.- Colau, R.; Viel, C. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1980**, 3-4, 163.
- 151- Bellec, C.; Bertin, D.; Colau, R.; Deswarte, S.; Maitte, P.; Viel, C. *J. Heterocyclic Chem.* **1979**, *16*, 1611.



- 152.- Deswarte, S.; Bellec, C.; Pucheault, J.; Ferradini, C.; Gilles, L. *J. Heterocyclic Chem.* **1980**, *17*, 891.
- 153.- Okamoto, T.; Takahashi, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, *16*, 1700.
- 154.- a) Griss, G.; Machleidt, H. *Ann. Chem.* **1970**, 738, 60.  
 b) Himbert, G.; Khun, H.; Barz, M. *Liebigs. Ann. Chem.* **1990**, 403.  
 c) Buron, C.; Kaïm, L. E.; Uslu, A. *Tetrahedron Letters.* **1997**, *38*, 8027.
- 155.- Meyers, A. I. *Heterocycles in Organic Synthesis*, Wiley. New York. 1974.
- 156.- Claisen, L. *Chem. Ber.* 1891, 3900.
- 157.- Mc Gregor, D. N.; Corbin, U.; Swigor, J. E.; Cheney, L. C. *Tetrahedron* 1969, *25*, 389.
- 158.- Bianchi, G.; De Amici, M. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 962.
- 159.- Aurichio, S.; Morrocchi, S. Ricca, A. *Tetrahedron. Lett.* **1974**, 2793.
- 160.- Stork, G.; Danishefski, S.; Ohashi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5459.
- 161.- Khurana, A. L.; Unrau, A. M. *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 3011.
- 162.- Surov, I.; Lund, H. *Acta. Chem. Scand. B40*, **1986**, 831.
- 163.- Nitta, M.; Kobayashi, T. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 877.
- 164.- Nitta, M.; Kobayashi, T. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 3925.
- 165.- Natale, N. R. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 5009.
- 166.- Kijima, M.; Nambu, Y.; Endo, T. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1140.
- 167.- Easton, C. J.; Hughes, C. M.; Kirby, K. D.; Savage, G. P.; Simpson, G. W.; Tiekink, E. R. T. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2035.
- 168.- Katritzki, A. R.; Rees, C. W. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Pergamon Press, New York, 1995, Vol. 6, Part. B.
- 169.- Nishiwaki, T. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 2049. Nishiwaki, T.; Kitamura, T.; Nakano, A. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 453.
- 170.- Nishiwaki, T.; Nakano, A.; Matsuoka, H. *J. Chem. Soc. [C]*. **1970**, 1825.
- 171.- Nishiwaki, T.; Saito, S.; Onamura, K.; Kondo, K. *J. Chem. Soc. [C]*. **1971**, 2644.  
 Nishiwaki, T.; Saito, T. *J. Chem. Soc. [C]*. **1971**, 3021.
- 172.- Nishiwaki, T.; Azechi, K.; Fujiyama, F. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1974**, 1867.
- 173.- *Chem. Abstr.* **1952**, *46*, 11180.
- 174.- *Chem. Abstr.* **1953**, *47*, 6936.
- 175.- *Chem. Abstr.* **1955**, *49*, 1007.
- 176.- Adembri, G.; Ponticelli, F.; Tedeschi, P. *J. Heterocycl. Chem.* **1972**, *9*, 1219.
- 177.- Nishiwaki, T.; Fujiyama, F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*. **1973**, 817.
- 178.- Shaw, G. *J. Chem. Soc.* **1954**, 665.

- 179.- De Bernardo, S.; Weigele, M. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 109.
- 180.- Katritzki, A. R.; Rees, C. W. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*. Pergamon Press. 1995, Vol. 6, Part 4B.
- 181.- *Chem. Abstr.* **1957**, 9629.
- 182.- Albrecht, H. A.; Blount, J. F.; Konzelmann, F. M.; Plati, J. T. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4191.
- 183.- Becalli, E.M. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2372.
- 184.- Yamamori, T.; Hiramatu, Y.; Sakai, K.; Adachi, I. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 913.
- 185.- Lipshutz, B.H.; Reuter, D.C. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *47*, 6067.
- 186.- Ryng, S.; Głowiak, T. *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 1359.
- 187.- Nair, N. "Azirines" *In The Chemistry of Heterocyclic Compounds*; Ed. Hassner, A. John Wiley, New York, 1983, Chapter 2.
- 188.- Nishiwaki, T.; Saito, T. *J. Chem. Soc. [C]*. **1971**, 2648.
- 189.- Bestman, H. J.; Kunstmann, R. *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 1816.
- 190.- Nishiwaki, T.; Kitamura, T.; Nakano, A. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 453.
- 191.- Nishiwaki, T. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 2049.
- 192.- Crist, D. R.; Leonard, N. J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1980**, *8*, 962.
- 193.- Anderson, D. J.; Hassner, A. *Synthesis* **1975**, 483.
- 194.- Hassner, A. *Heterocycles*. **1980**, 1517. Padwa, A.; Woolhouse, D. *In Comprehensive Heterocyclic Chemistry*. Lowowski, W., Ed.; Pergamon Press; New York, 1984, Vol. 7, p.47.
- 195.- Nishiwaki, T.; Fujiyama, F. *Synthesis* **1972**, 569.
- 196.- Nishiwaki, T.; Saito, T. *J. Chem. Soc. [C]*. **1971**, 3021.
- 197.- Nishiwaki, T.; Onomura, S. *J. Chem. Soc. [C]*. **1971**, 3026.
- 198.- Freeman, J. P.; Pucci, D. G.; Binsch, J. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1894.
- 199.- Nishiwaki, T.; Fujiyama, F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1973**, 817.
- 200.- Nishiwaki, T.; Saito, T. *J. Chem. Soc. [C]*. **1971**, 2648.
- 201.- Sandler, S. R.; Caro, W. *Organic Functional Group Preparation*. Academic Press, New York, 1972, p.372.
- 202.- Winterfeldt, E. "Comprehensive Organic Synthesis". Trost, B. M.; Fleming, I. Eds. Pergamon Press, 1991, Vol. 6, p 675
- 203.- Colau, R.; Viel, C. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1979**, II-363.
- 204.- Winterfeldt, E. "Comprehensive Organic Synthesis". Trost, B. M.; Fleming, I. Eds. Pergamon Press, Oxford, Vol 1991, vol.6, 763.

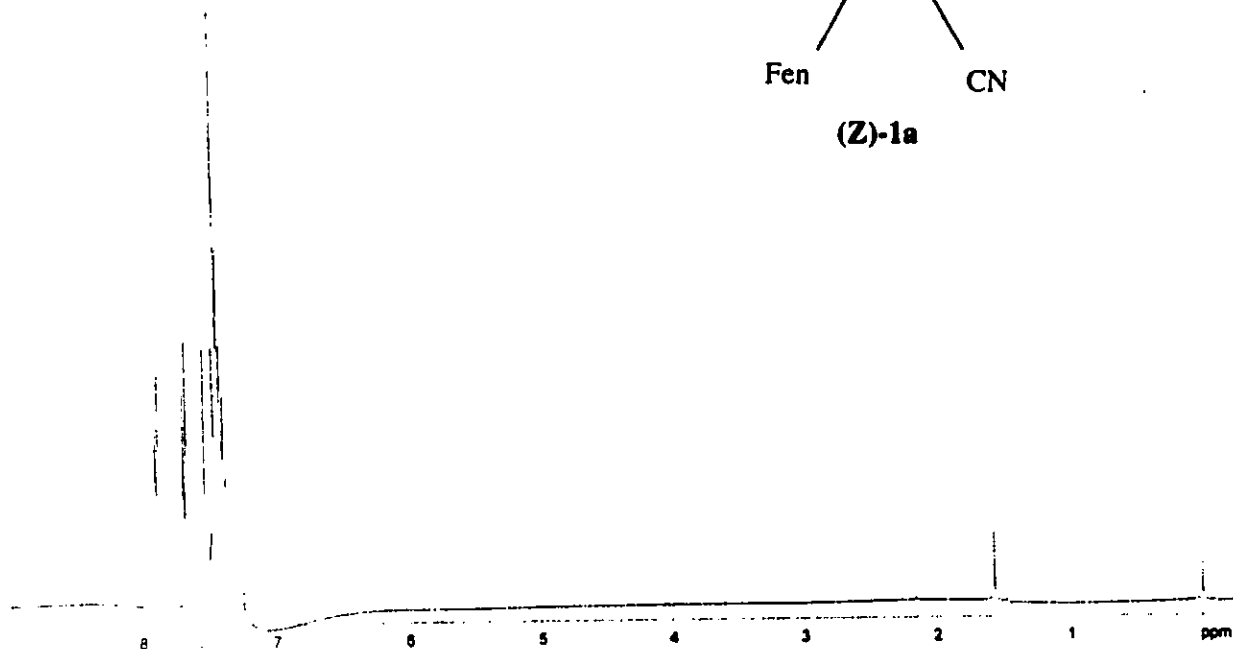
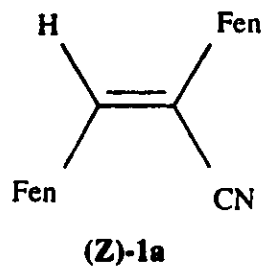
- 205.- Sandler, S. R.; Caro, W. "*Organic Functional Group Preparation*". Academic press, New York, 1972.
- 206.- Donaruma, G.; Hedt, W. Z. "*Organic Reactions*", Ed. Kende, A. S., John Wiley, New York, 1960, Vol. 11.
- 207.- Gawley, R. E. "*Organic Reactions*", Ed. Kende, A. S., John Wiley, New York, 1986, Vol. 35.  
 Volodarsky, L. B.; Tirkhonov, A. Y. *Synthesis* **1986**, 704.
- 208.- O'Brien, C. *Chem. Rev.* **1964**, *64*, 81.
- 209.- Kabalka, G. W.; Varma, R. S. "*Comprehensive Organic Synthesis*". Trost, B. M.; Fleming, I. Eds. Pergamon Press, Oxford, 1991, Vol. 8, p 363.
- 210.- Jones, G. "*Organic Reactions*", Cope, A.C. Ed.; John. New York, 1967, 15, p. 204.
- 211.- Navarro-Ocaña, A. 1986, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
- 212.- Kulp, S. S.; Caldwell, C.B. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 171.
- 213.- Ward, P. P.; Young, C. S. *Enzyme Micro. Technol.* **1990**, *12*, 482., y referencias sobre uso de *S. cerevisiae* en síntesis, Servi, S. *Synthesis* **1990**, 1., Csuk, R.; Glanzer, B. I. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 49., Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1071.
- 214.- Minor, M. M. A. 1989, Tesis de Licenciatura, Dpto. de Ing. y Tecnología, UAT, México.
- 215.- Hassner, A.; Kropp, J. E.; Kent, G. J. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2628.  
 Jew, S. S.; Kim, H. D.; Cho, Y. S.; Cook, C. H. *Chem. Lett.* **1986**, 1747.  
 Corey, E. J.; Estreicher, H. J. *Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6294.  
 Jäger, V.; Günther, H. J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1977**, *16*, 246.  
 Sy, W. W.; By, A. W. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1193.  
 Crivello, J. V. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3056.
- 216.- Ohta, H.; Kobayashi, N.; Ozaki, K. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1802.
- 217.- Ono, N.; Kaji, A.J. *Syn. Org. Chem. Japan* **1980**, *38*, 115.
- 218.- Ohta, H.; Ozaki, K.; Tsuchihashi, G. I. *Chem. Lett.* **1987**, 129.
- 219.- Hiroi, K.; Achiwa, K.; Yamada, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1972**, *20*, 246.
- 220.- Takeshita, M.; Yoshida, S.; Kohno, Y. *Het.* **1994**, *37*, 553.
- 221.- González-Paredes, M. B. 1995, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
- 222.- Ver referencia 8 y referencias sobre uso de *S. cerevisiae*.
- 223.- Navarro-Ocaña, A.; Jiménez-Estrada, M.; González-Paredes, M.B.; Bárzana, E. *Synlett* **1996**, 695.

- 224.- "Comprehensive Organic Synthesis". Trost, B. M. Ed. Pergamon Press, 19XX, New York, Vol. 8.
- 225.- Leskovac, V.; Trivic, S. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 6123.
- 226.- Baik, W.; Kim, D. I.; Lee, H. J.; Chung, W. J.; Kim, B. H. Lee, S. W. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4579.  
 Baik, W.; Park, T. H.; Kim, B. H.; Jun, Y. M. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5683.  
 Blackie, J. A.; Turner, N. J.; Wells, A. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3043.
- 227.- Nishiwaki, T.; Saito, T.; *J. Chem. Soc., (C)*. **1971**, 2648.
- 228.- Hassner, A.; Fowler, K. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 2869.
- 229.- Servi, S. *Synthesis* **1990**, 1.  
 Csuk, R.; Glanzer, B. I. *Chem. Rev.* **1991**, 91, 49.  
 Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1071.  
 Además se consultaron artículos citados.
- 230.- Hawkes, G. E.; Herwing, K.; Roberts, J. D. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 1017.  
 Levy, G. C.; Nelson, G. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4897.  
 Buchanan, G. W.; Dawson, B. A. *Can. J. Chem.* **1977**, 55, 1437.  
 Rajappa, S. *Tetrahedron.* **1981**, 37, 1453.  
 Bakhmutov, V. I. Burmistrov, V. A. *Org. Mag. Res.* **1979**, 12, 185.
- 231.- Whitesides, G. M.; Wong, C. H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 617.  
 Jones, J. B. *Tetrahedron* **1986**, 42, 3351.  
 "Enzymes as Catalysts in Organic Synthesis", Schneider, M. P., Ed. D. Reidel, Dordrich, 1986.
- 232.- Tennant, G. "Comprehensive Organic Chemistry". Barton, D. H. R.; Ollis, W. D. Ed; Pergamon Press, Oxford, 1979, Vol. 2, Chap. 8.  
 Laso, N. M.; Quiclet-Sire, B.; Zard, S. Z. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1605.  
 "The Chemistry of Enamines". Ed. Rappoport, Z. John Wiley, Chichester, 1994, Part 2.

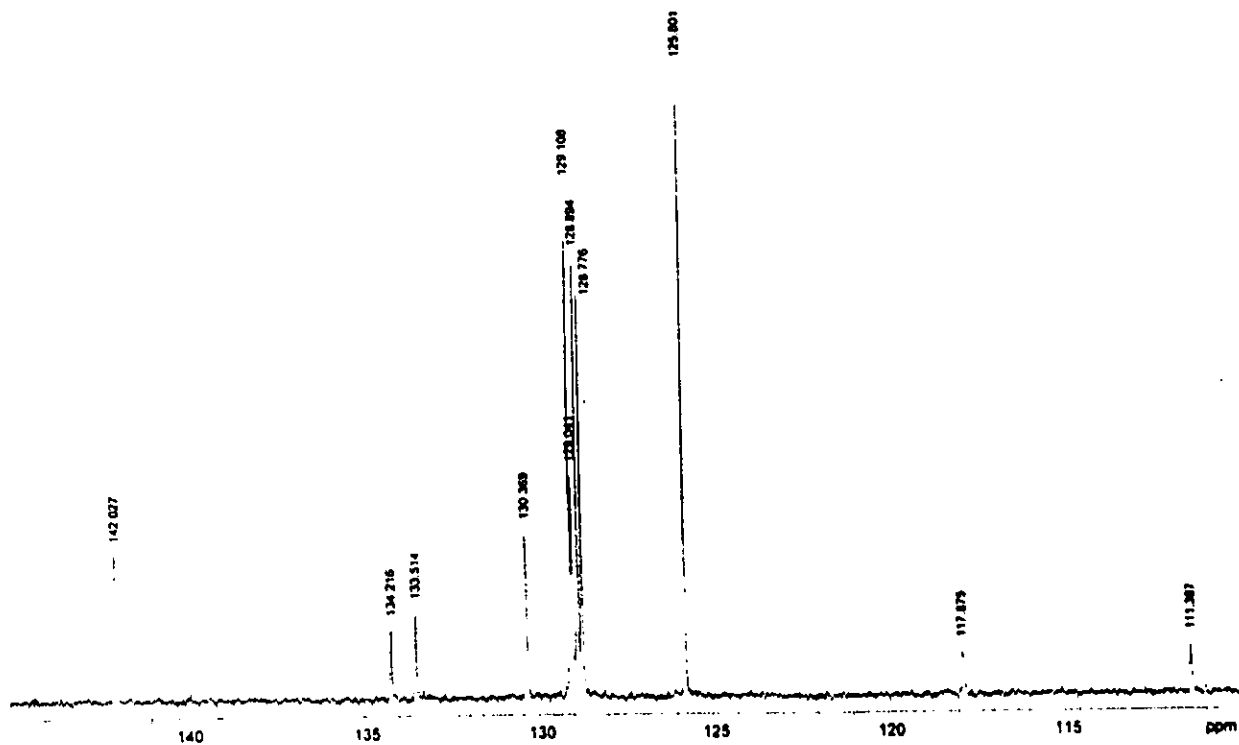
### VIII.- Espectros

Se incluyen los espectros de: IR., EM. (IE), RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C.

- 1.- (Z)-2,3-Difenilpropenonitrilo (**1a**)
- 2.- (Z)-2,3-Difenil-nitropropenonitrilo ((Z)-**2a**)
- 3.- (E)-2,3-Difenil-3-nitropropenonitrilo ((E)-**2a**)
- 4.- 5-Amino-3,4-difenilisoxazol (**3a**)
- 5.- 2,3-Difenil-3-oximinopropanamida (**4a**)
- 6.- 2-Fenil-3-(4-metoxifenil)-3-oximinopropanamida (**4c**)
- 7.- 2-Fenil-3-oximinobutanamida (**4g**)
- 8.- 2-Carboxiamida-2,3-difenil-2H-azirina (**5**)
- 9.- Estructura de R-X de la amida (**4g**)
- 10.- Estructura de R-X de la azirina (**5**)

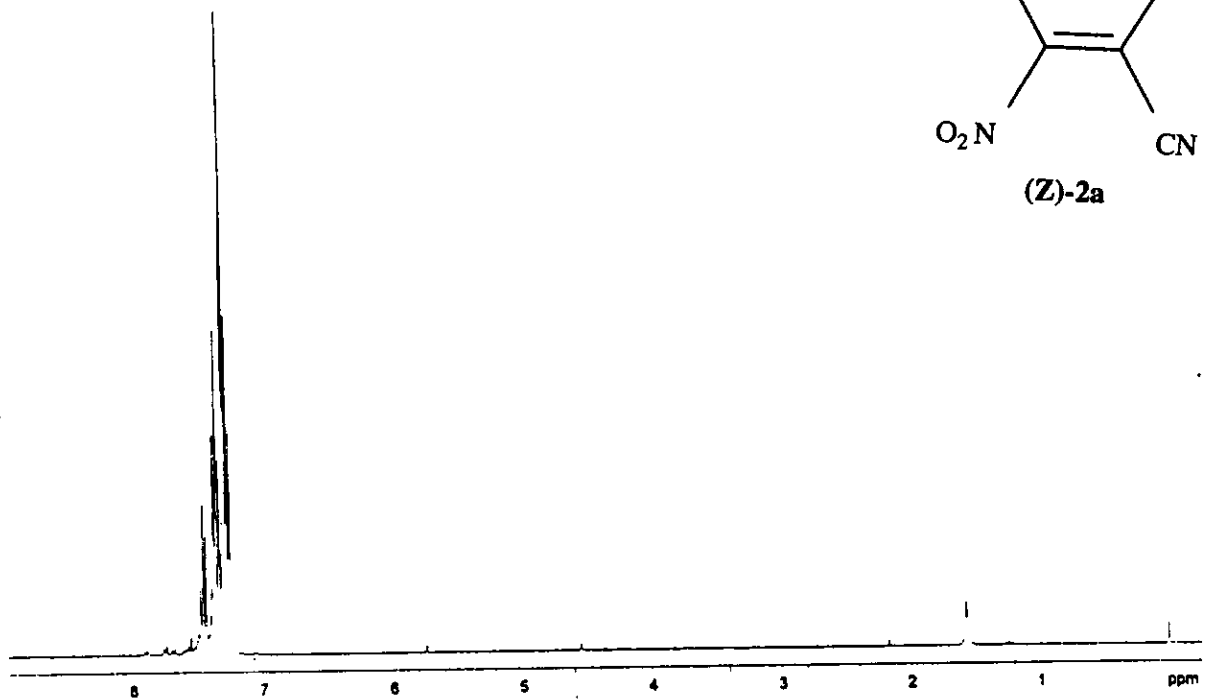
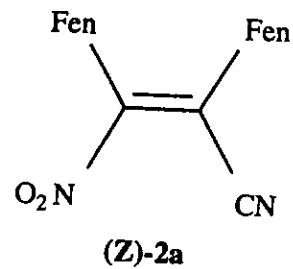


Arturo Navarro, AN-1-29  
 E1: 360.137  
 EX: ZEGOEMFT  
 SW1: 7248  
 PW: 6.0 usec  
 PO: 0.0 sec  
 OF: 2128.3  
 INA: 16  
 LB: 0.2  
 P781c 65036  
 WinAuto - 8Ann.029  
 USER: DATE: 01/10/98

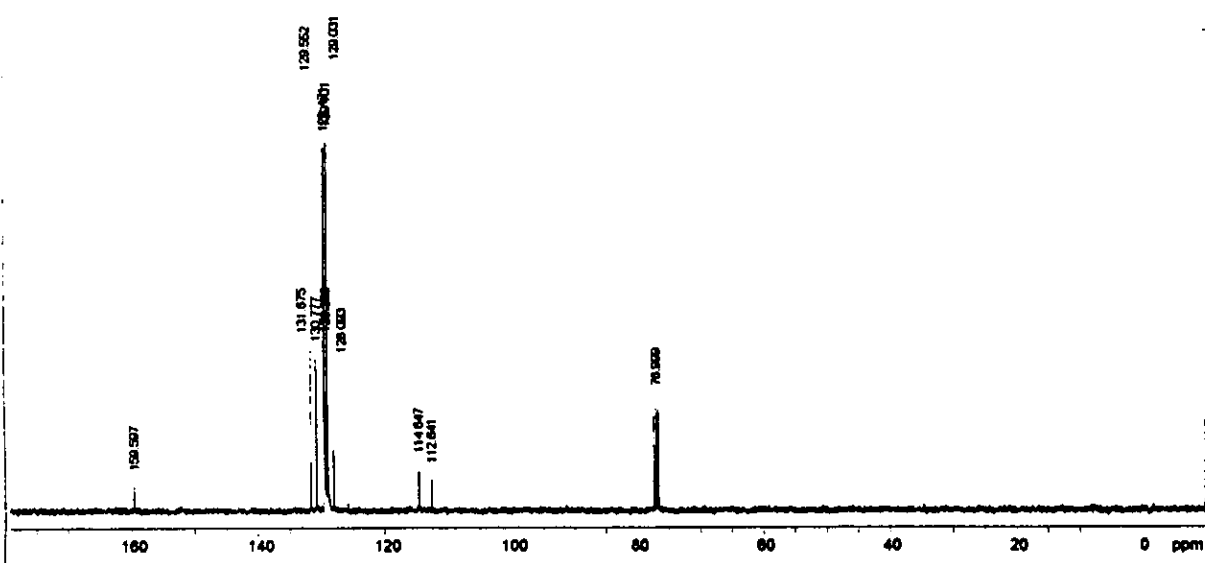


Arturo Navarro, AN-1-29  
 F1: 90.565  
 EX: SOLSUP  
 SW1: 23809  
 PW: 4.0 usec  
 PO: 6.0 sec  
 OEJ  
 INA:  
 USER: DATE: 01/10/98

1.- (Z)-2,3-Difenilpropenonitrilo (1a)

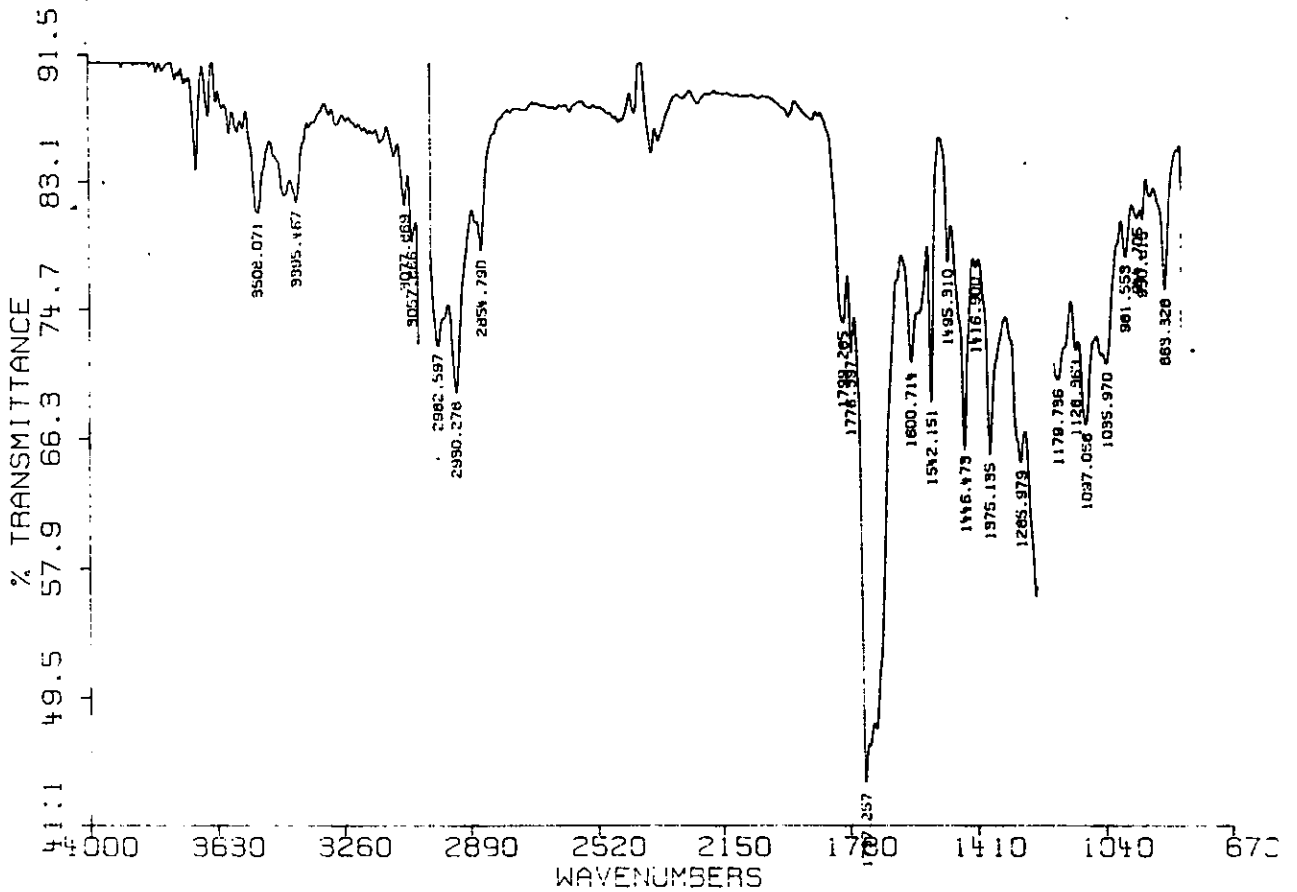


Arturo Navarro AN-1-31 USER: DATE: 02/10/98  
 F1: 360.137 SW1: 7248 QF1: 2135.5 PTS1d: 85536  
 EX: ZEGEMET PW: 6.0 usec PD: 0.0 sec NA: 18 LB: 0.2 WinNuts - \$Anh.031

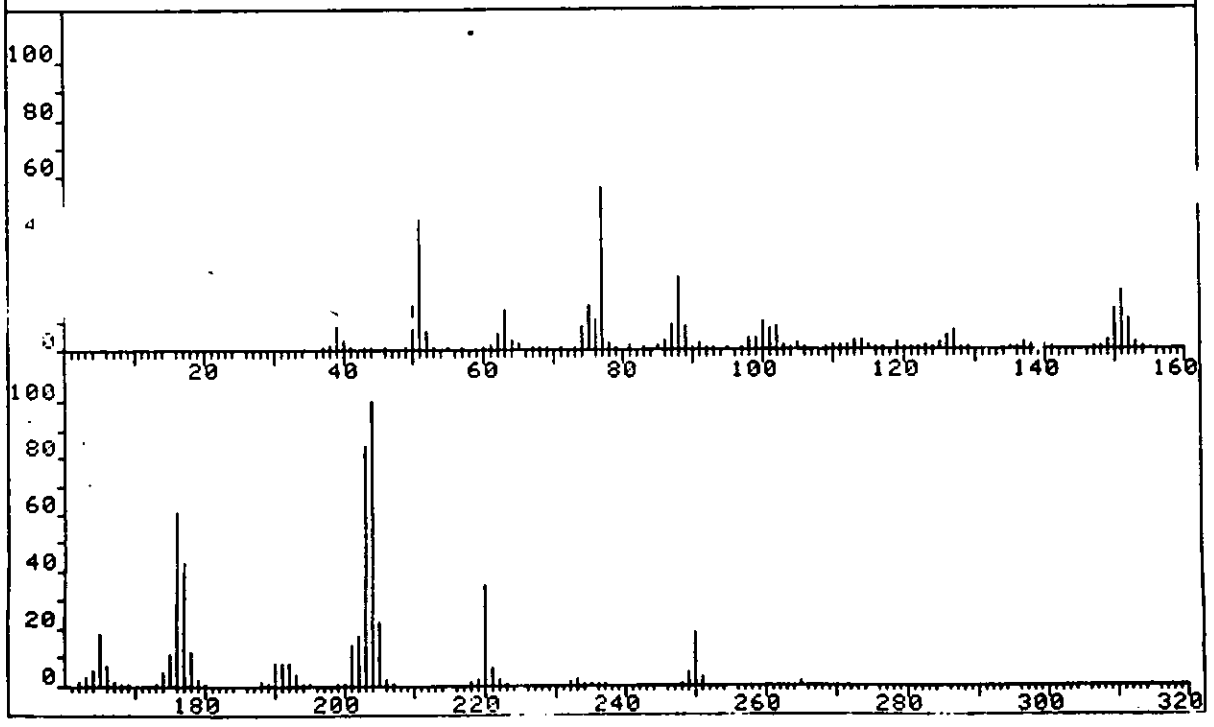


Arturo Navarro AN-1-31 USER: DATE: 02/10/98  
 F1: 90.565 SW1: 23809 QF1: 9438.0 PTS1d: 32768  
 EX: SOLGUP PW: 4.0 usec PD: 13.0 sec NA: 150 PR: 1.5 WinNuts - \$Anh.031

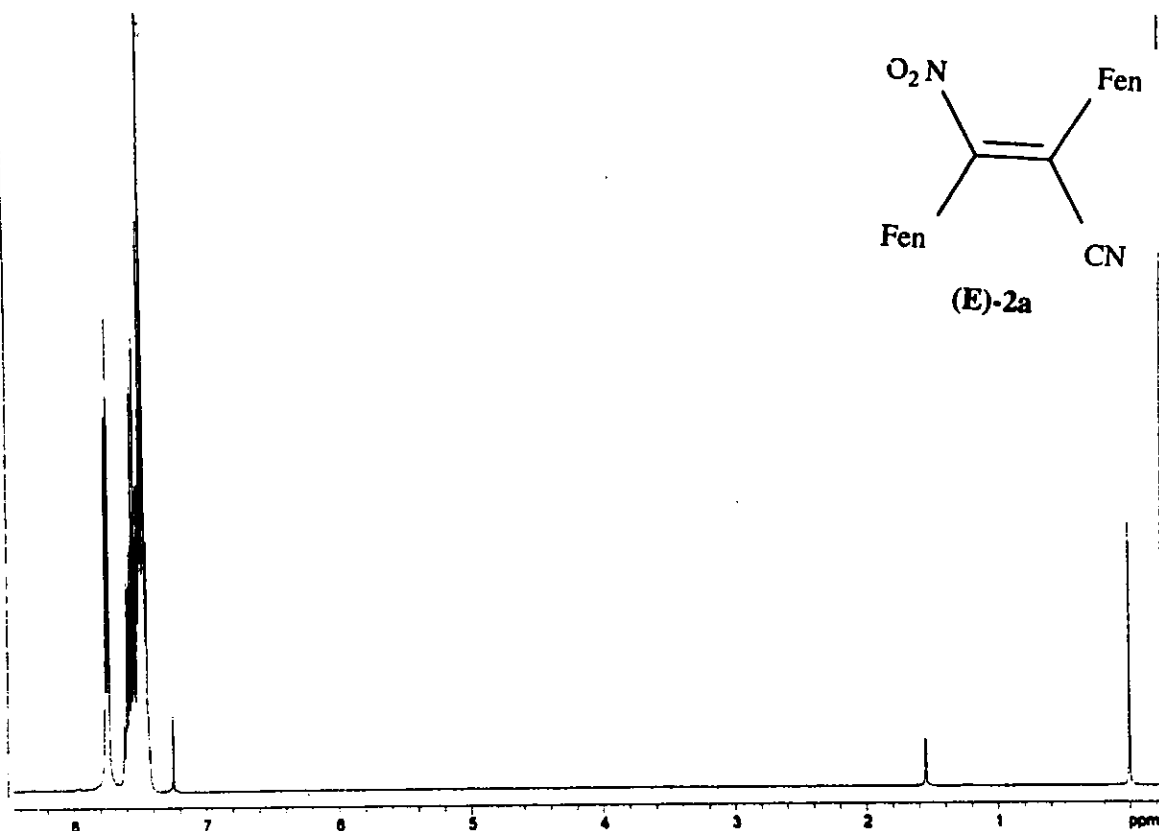
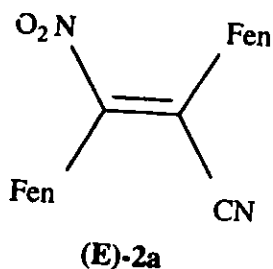
2.- (Z)-2,3-Difenil-nitropropenonitrilo ((Z)-2a)



FRN 9213	SPECTRUM 13		RETENTION TIME	
LARGST 4:	204.1, 100.0	203.1, 84.1	176.1, 60.8	77.1, 56.3
LAST 4:	249.1, 4.6	250.1, 18.4	251.1, 2.8	265.1, 1.2
PAGE 1 Y = 1.00				







AN: 1-85 in CDCl3  
 F1: 380.137  
 EX: ZEGOMPT

SWH: 7248  
 PW: 9.0 usec  
 PD: 0.0 usec

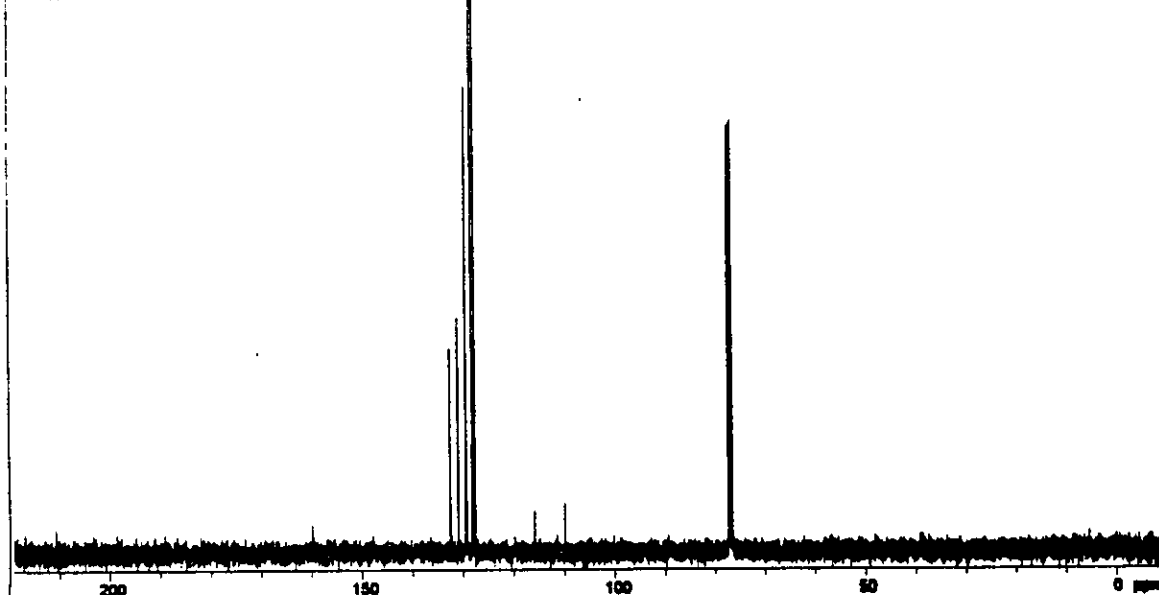
CF1: 2132.0  
 NA: 18

PTB1d: 32788  
 LB: 0.2

USER: DATE: 03/12/88  
 W: 800000 - 8400000

Interpolated Peak Listing

PEAK	POINT	HEIGHT	REL. HT	FZ	PPM
1	12861	99193K	31.96	12008.80	132.598
2	13062	123096K	39.66	11863.07	130.989
3	13232	41718K	13.44	11739.28	129.622
4	13251	214358K	69.07	11725.39	129.469
5	13262	241922K	77.95	11717.52	129.382
6	13404	334657K	107.83	11614.74	126.247
7	13469	315854K	101.77	11567.45	127.725
8	14942	20831K	6.71	10496.71	115.902
9	15685	26539K	8.55	9957.03	109.943
10	19747	214489K	69.11	7005.52	77.353
11	19755	18194K	5.86	6999.66	77.289
12	19791	216418K	69.73	6973.52	77.000
13	19835	217303K	70.02	6941.49	76.646



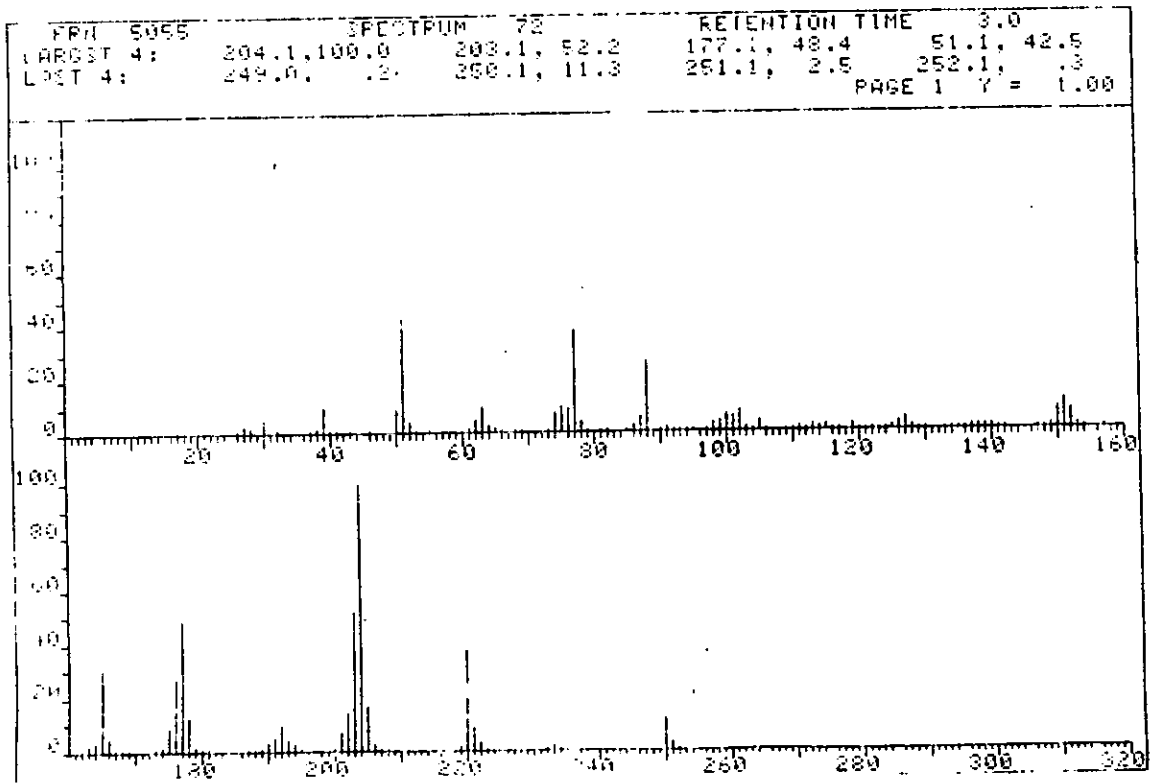
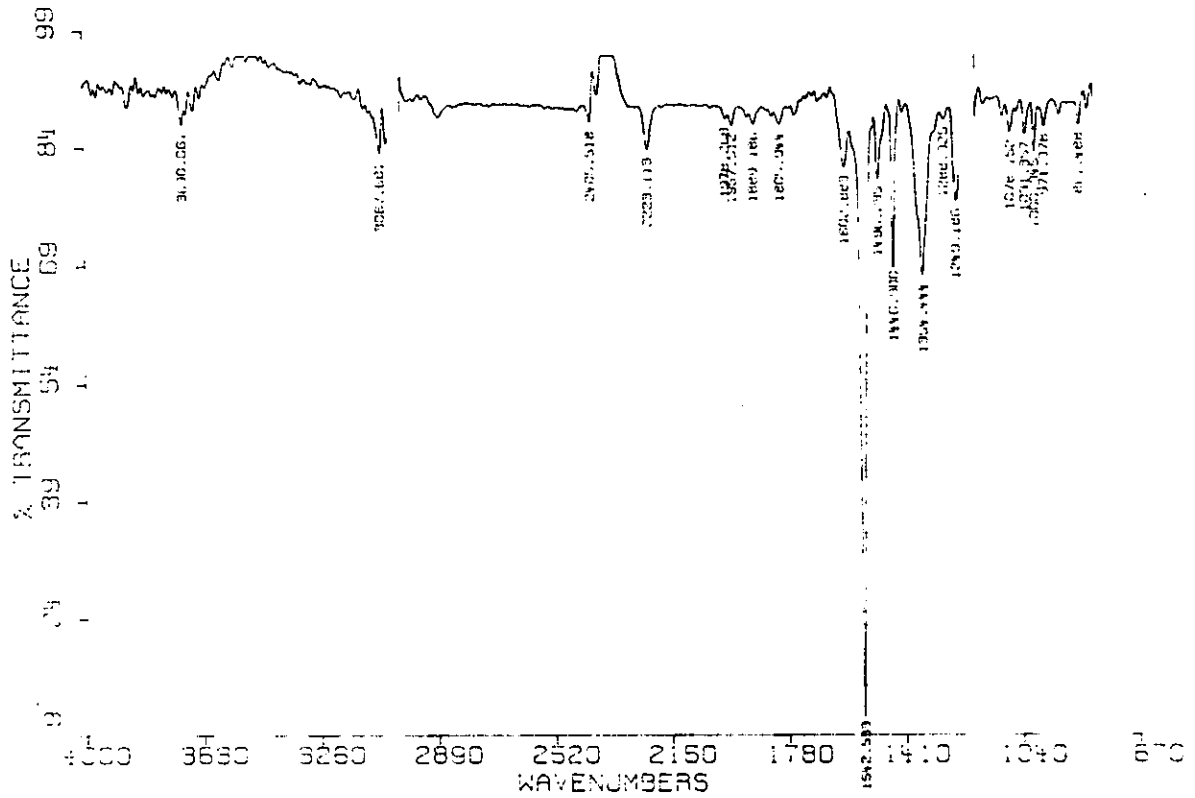
AN: 1-85  
 F1: 80.565  
 EX: SOLSLP

SWH: 23808  
 PW: 4.0 usec  
 PD: 0.0 usec

CF1: 8448.2  
 NA: 300

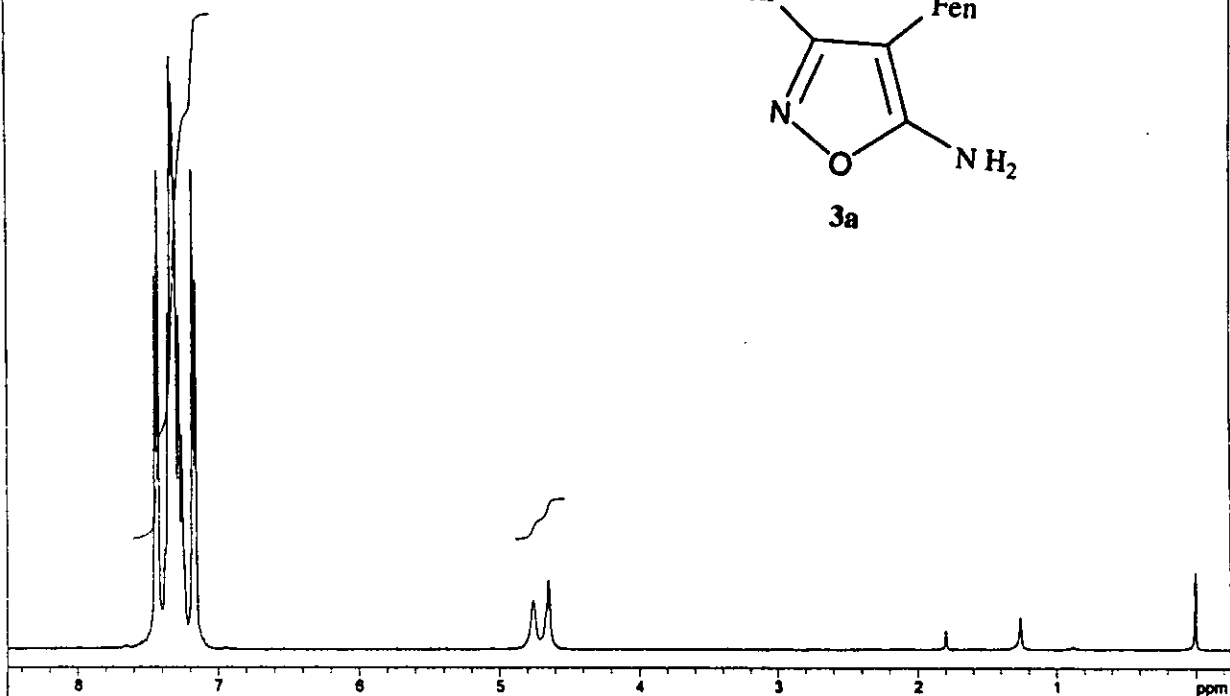
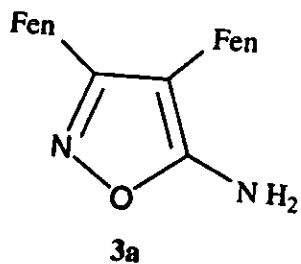
PTB1d: 32788  
 LB: 0.8

USER: DATE: 03/12/88  
 W: 800000 - 8400000



10.00

0.76



AN-148 Isoxazole + D2O

USER: DATE: 29/10/98

F1: 360.137

SW1: 7248

OF1: 2132.1

PTS1d: 32768

EX: ZEGOEMFT

PW: 6.0 usec

PD: 0.0 sec

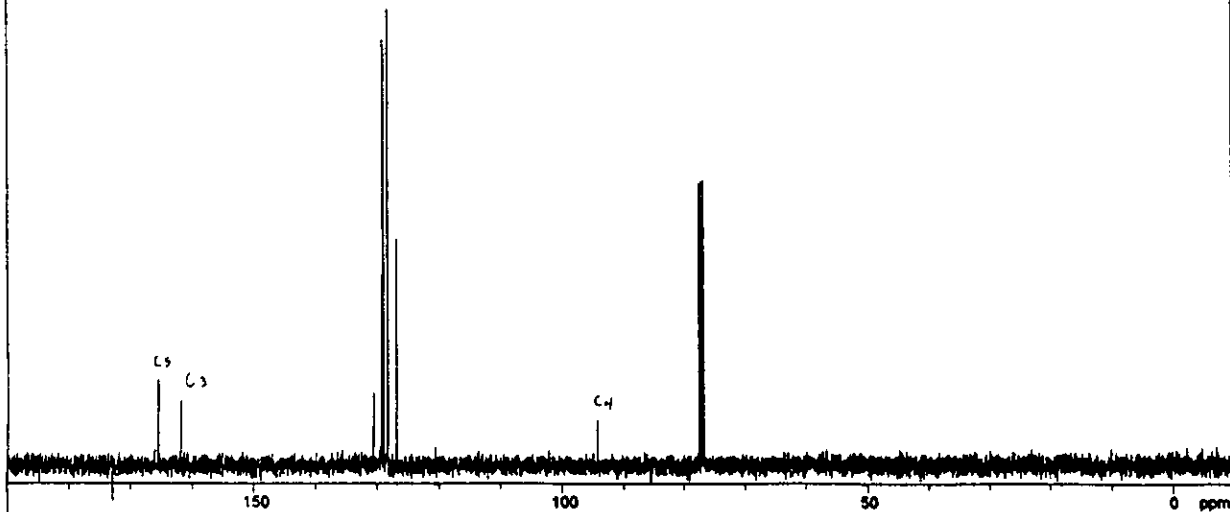
NA: 16

LB: 0.2

WinNuts - SANW2.046

## Interpolated Peak Listing

PEAK	POINT	HEIGHT	REL. HT	HZ	PPM
1	15660	-15042208	-7.32	15660.52	172.920
2	17486	37308K	18.16	14996.94	165.593
3	18405	28027K	13.64	14663.17	161.907
4	26209	31413K	15.29	11827.79	130.600
5	26511	27861K	13.56	11718.10	129.389
6	26537	80262K	39.07	11708.52	129.283
7	26579	179280K	87.27	11693.25	129.114
8	26620	177608K	86.46	11678.42	129.950
9	26771	177454K	86.38	11623.57	128.345
10	26783	195171K	95.01	11619.24	128.297
11	27132	96717K	47.08	11492.55	126.898
12	35277	19205K	9.35	8533.21	94.222
13	39483	118918K	57.89	7005.14	77.349
14	39570	119192K	58.02	6973.51	77.000
15	39659	120190K	58.51	6941.19	76.643



AN-148 Isoxazole

USER: DATE: 29/10/98

F1: 60.565

SW1: 23089

OF

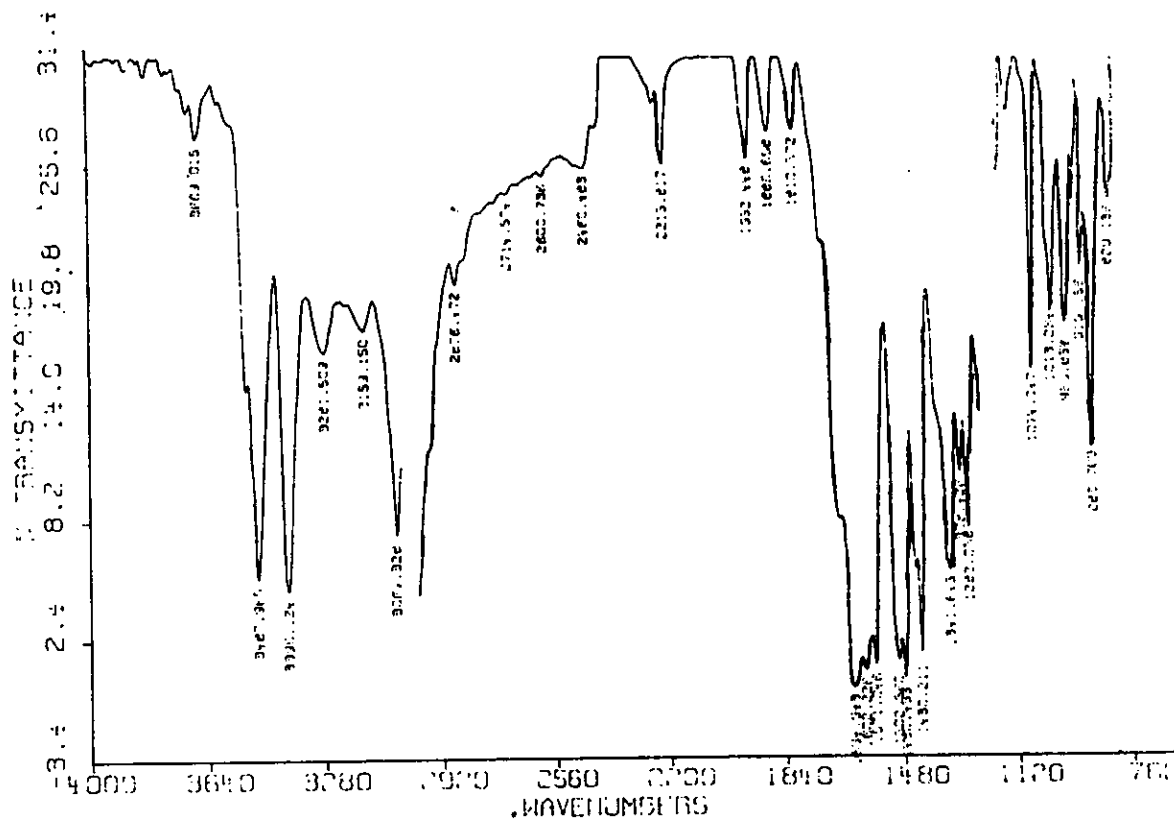
EX: SOLSUP

PW: 6.0 usec

PD: 0.0 sec

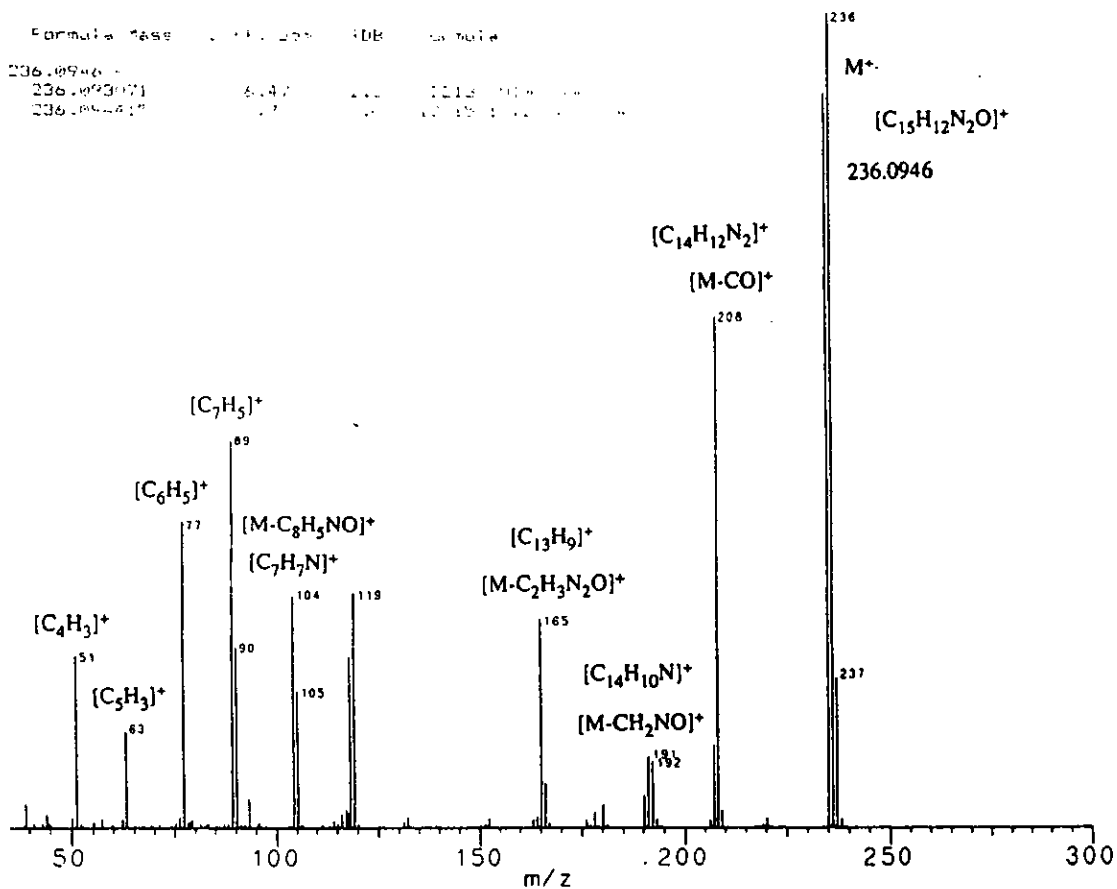
IN

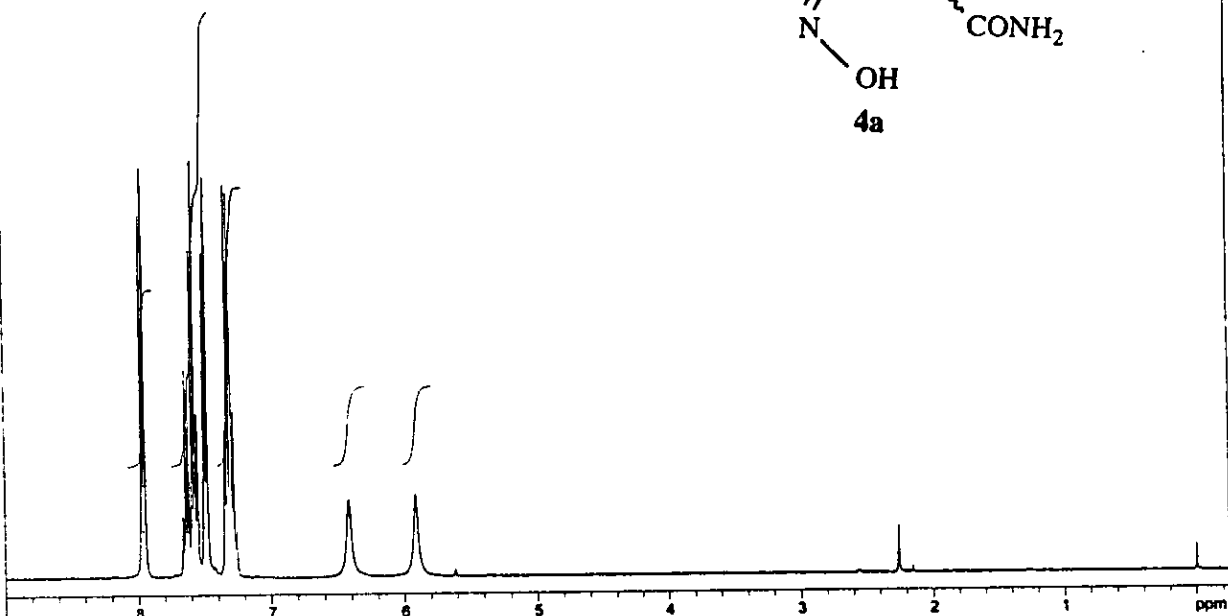
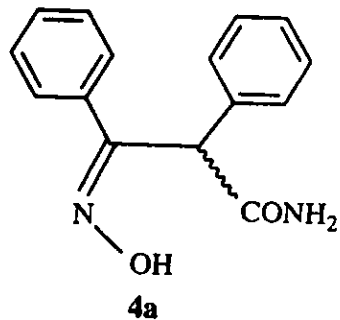
4.- 5-Amino-3,4-diphenylisoxazole (3a)



EI MS OF SAMPLE #2 (C15H12N2O)

Formula	Mass	Abundance	DBE	Structure
C15H12N2O	236	100	1	M+
C14H12N2	208	~80	1	(M-CO)+
C14H10N	182	~10	1	(M-CH2NO)+

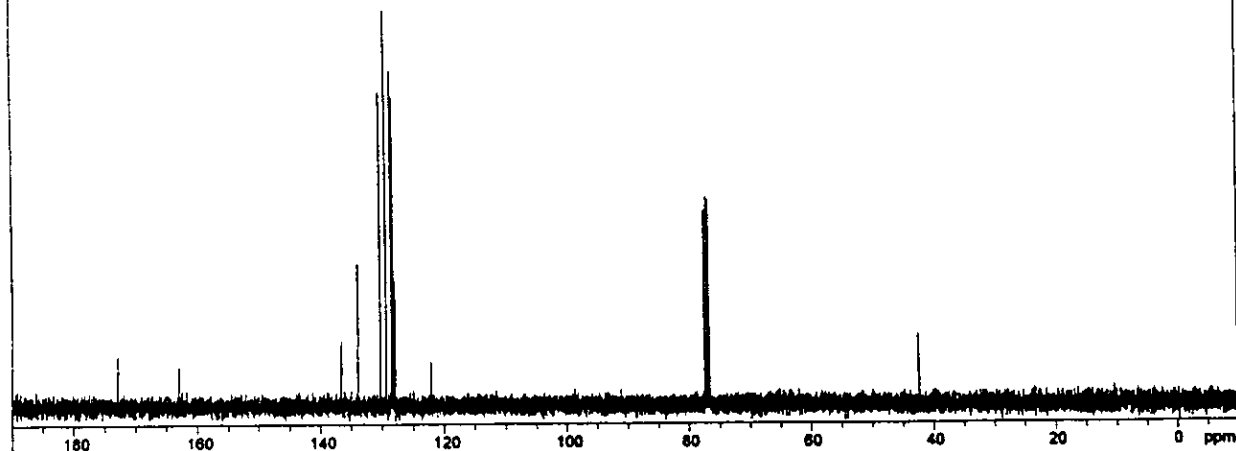




AN-1-48 oxime      USER:      DATE: 28/10/98  
 F1: 360.137      SW1: 7246      OF: 1: 2153.7      PTS: 16: 32768  
 EX: ZFGOEMET      PW: 6.0 usec      PD: 0.0 sec      NA: 16      LB: 0.0      WnNum: SANHO.048

Interpolated Peak Listing

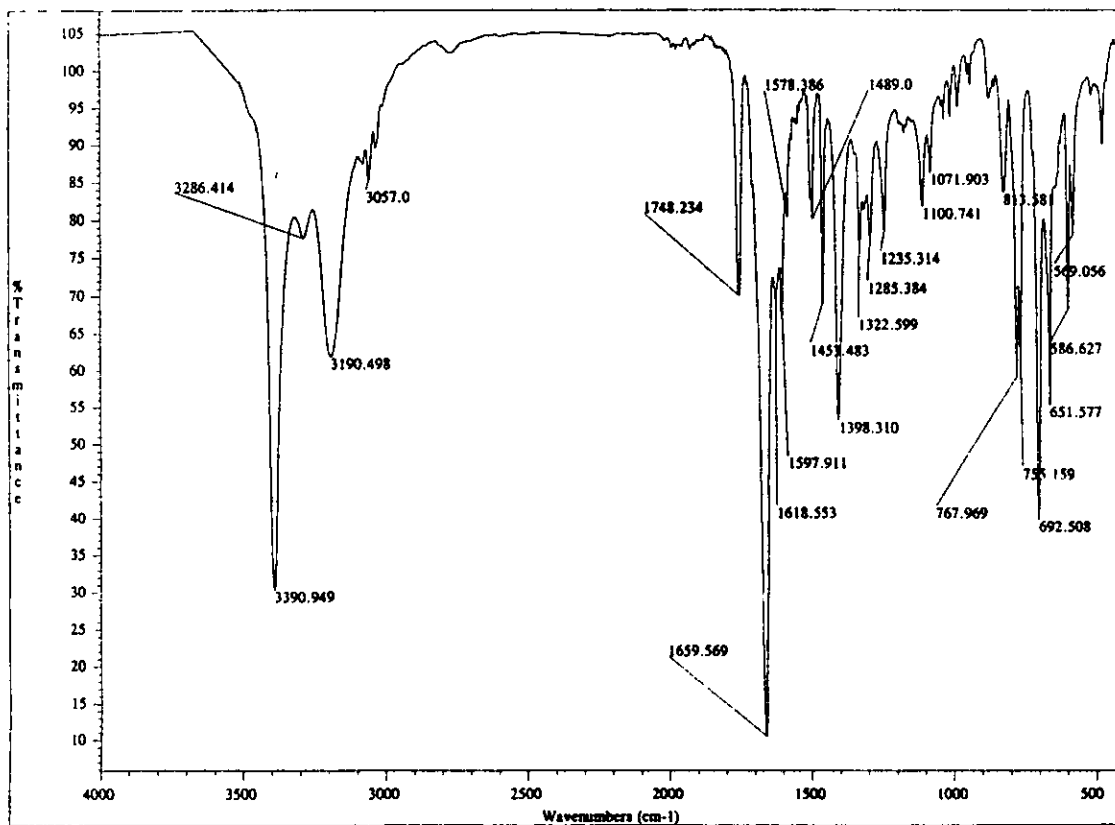
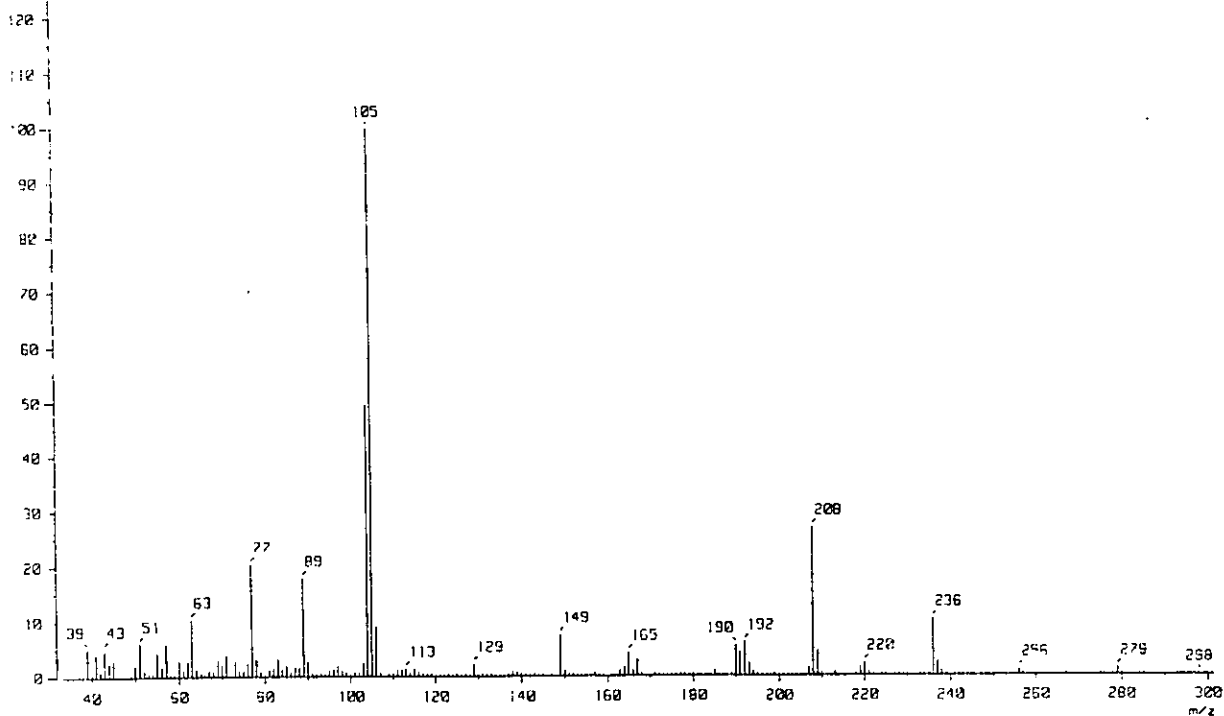
PEAK	POINT	HEIGHT	REL. HT	HZ	PPM
1	7834	171579K	14.34	15651.03	172.815
2	9062	114915K	9.61	14758.35	162.958
3	12351	196576K	16.43	12369.12	136.577
4	12685	445530K	37.24	12126.38	133.897
5	13137	1026M	85.77	11797.89	130.270
6	13256	1292M	108.02	11711.43	129.315
7	13368	1084M	90.60	11630.06	128.416
8	13398	1088M	90.92	11608.02	128.173
9	13434	430121K	35.95	11581.78	127.883
10	14161	126292K	10.56	11053.27	122.048
11	19732	595041K	49.74	7005.33	77.351
12	19776	667485K	55.79	6973.52	77.000
13	19820	652975K	54.58	6941.66	76.648
14	24097	207029K	17.30	3834.19	42.336



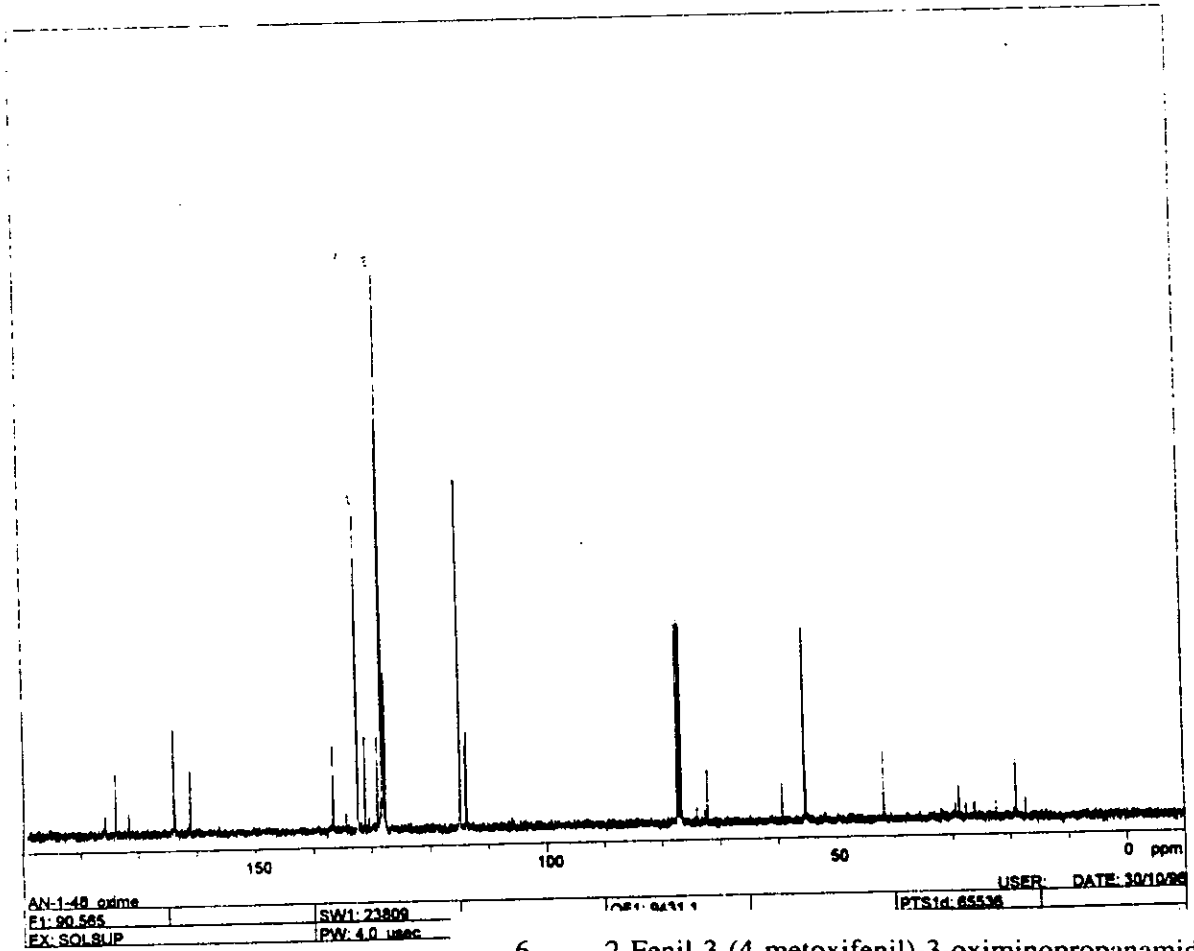
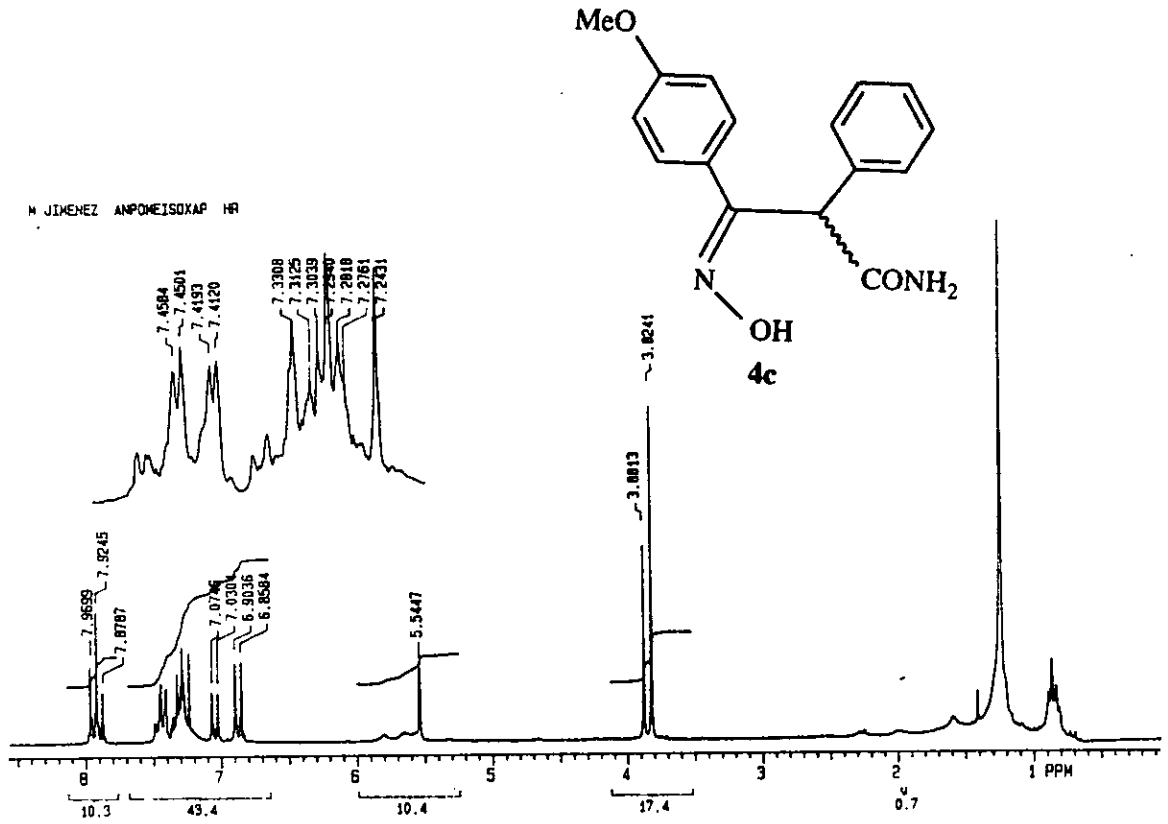
AN-1-48 oxime      USER:      DATE: 28/10/98  
 F1: 90.565      SW1: 23809      PD: 0.0 sec  
 EX: SOL SUP      PW: 4.0 usec

5.- 2,3-Difenil-3-oximinopropanamida (4a)

[ Mass Spectrum ]  
 Data : 150 Date : 19-Apr-95 09:27  
 Sample: AN-MJEB1001500  
 Note : Dr-Manuel-J-RX505 Ion Mode : EI+  
 Inlet : Direct  
 Spectrum Type : Regular (MF-Linear)  
 RT : 0.85 min Scan# : (17,19) Temp : 40.7 deg.C  
 BP : m/z 105.0000 Int. : 1070.26  
 Output m/z range : 33.0000 to 301.5920 Cut Level : 0.00 %  
 3894178

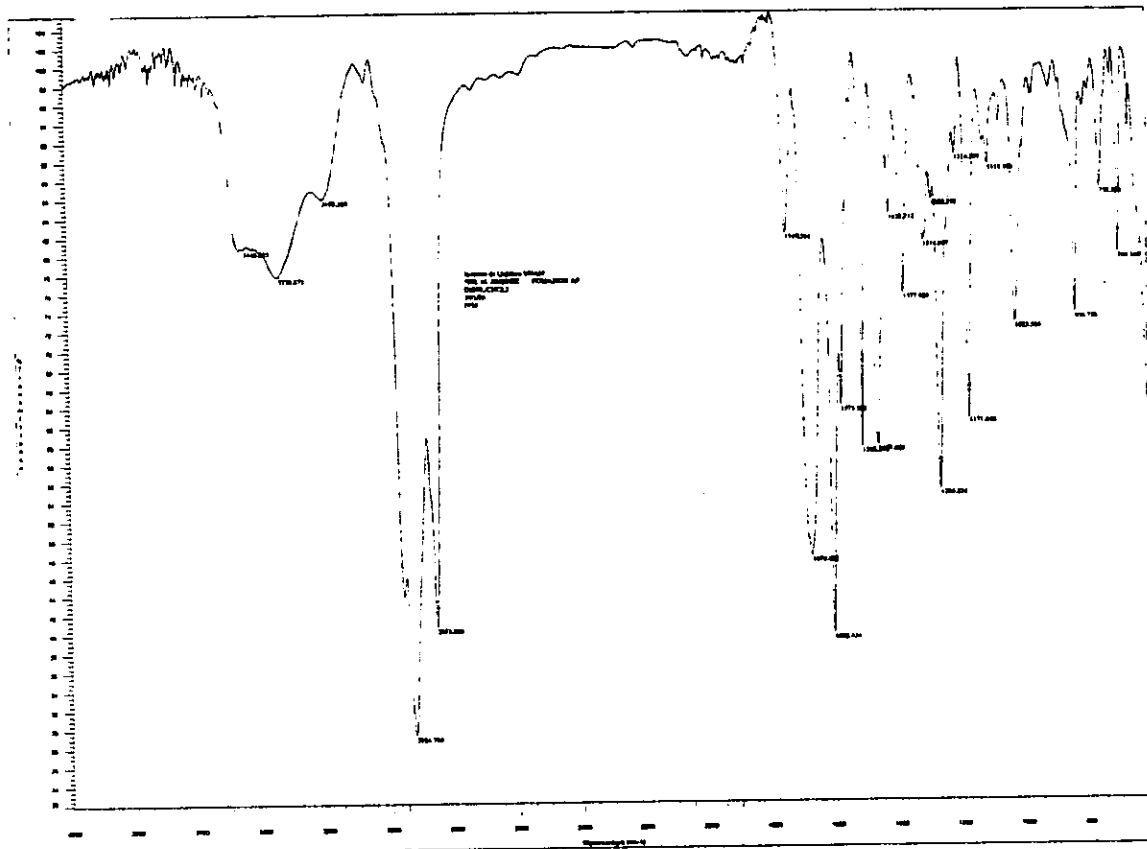


M. JIMENEZ ANPOMEISOXAP HR

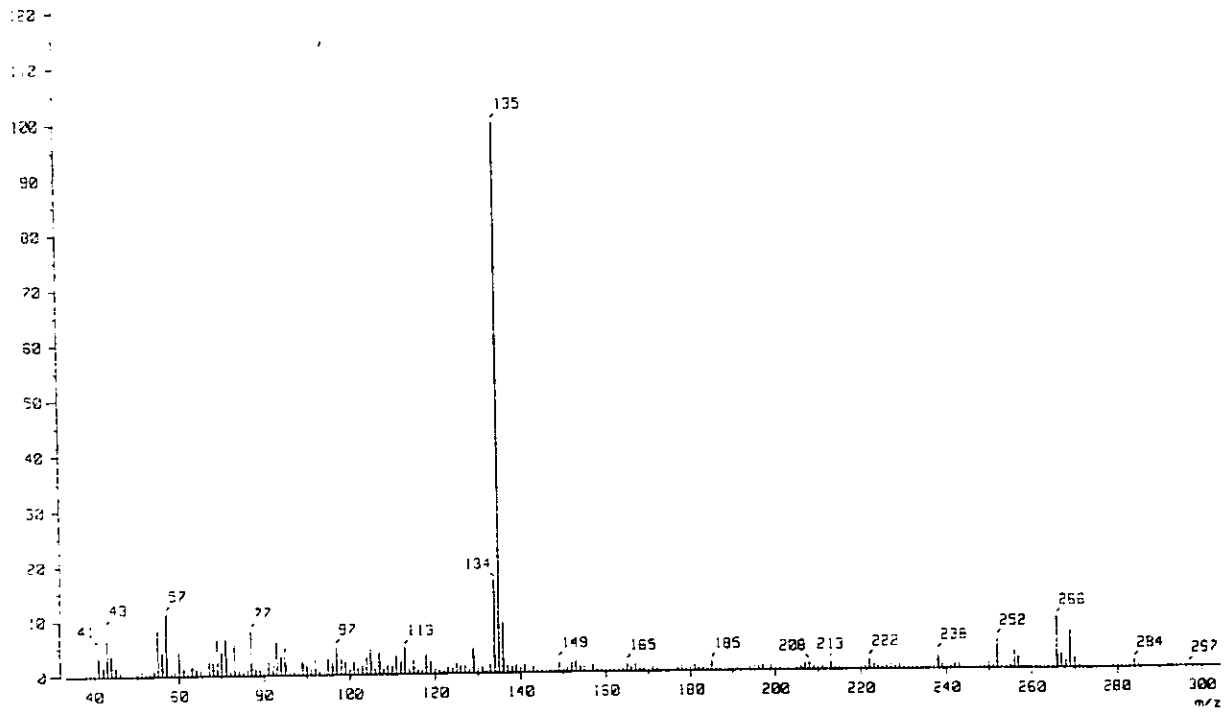


AN-1-48 oxime SW1: 23809 USER: DATE: 30/10/98  
E1: 90.565 PW: 4.0 usec  
EX: SOL8UP

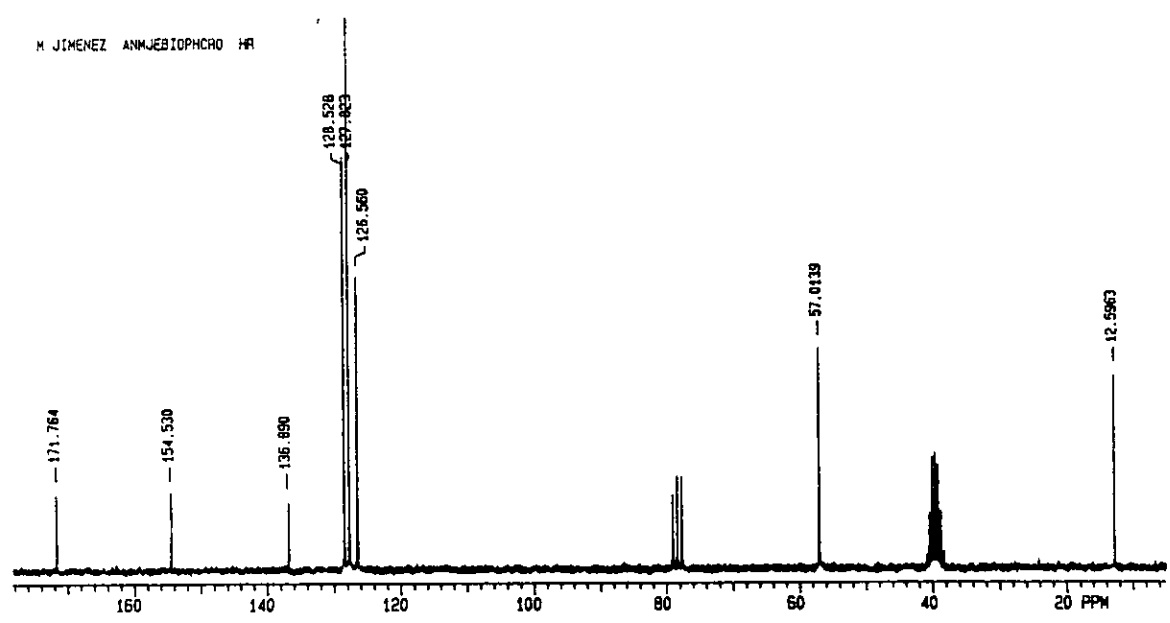
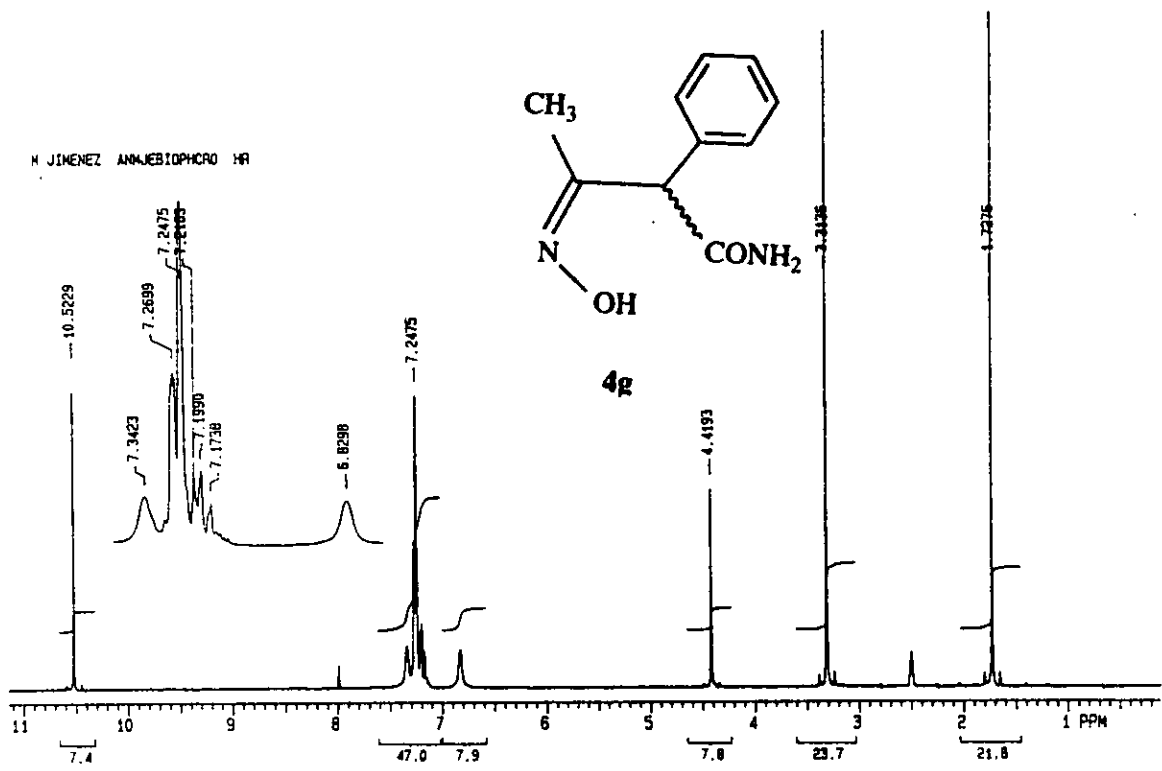
6.- 2-Fenil-3-(4-metoxifenil)-3-oximinopropanamida (4c)



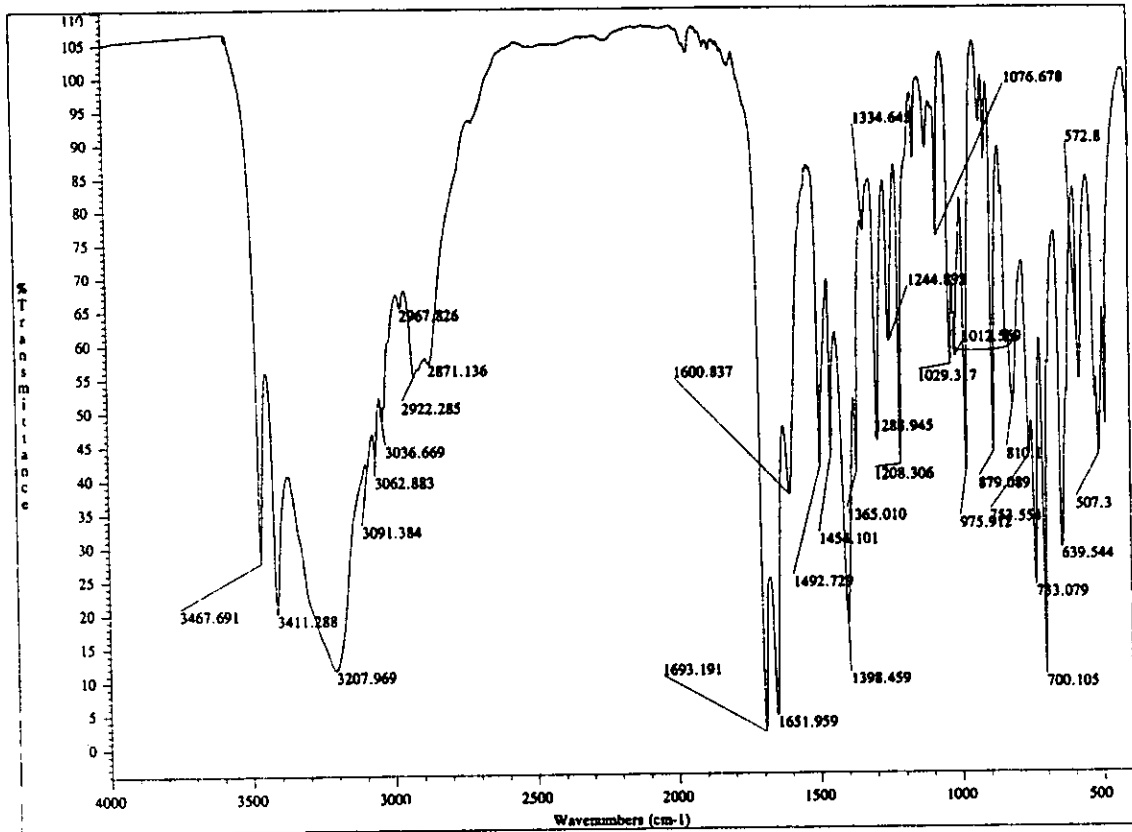
[ Mass Spectrum ]  
 Date : 11-Mar-96 12:28  
 Sample : MJC-NO2MePAlrox  
 Note : Dr-Manuel-Jimenez-RX505  
 Inlet : 1  
 Ion Mode : EI+  
 Acquisition Date : 11-Mar-96  
 Acquisition Time : 12:28  
 Temp : 400.0 deg.C  
 BP : 135.0000 Int. : 391.99  
 Output File Name : 33.0000 to 304.4290 Cut Level : 0.00 %  
 5220452



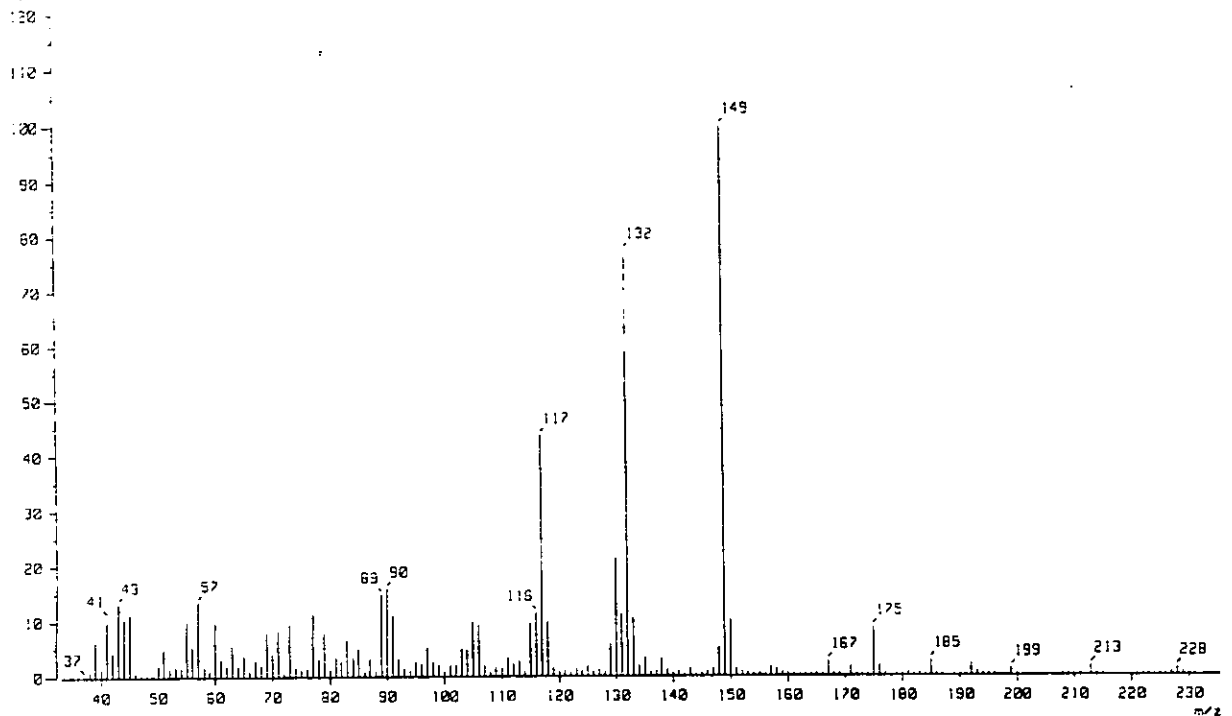


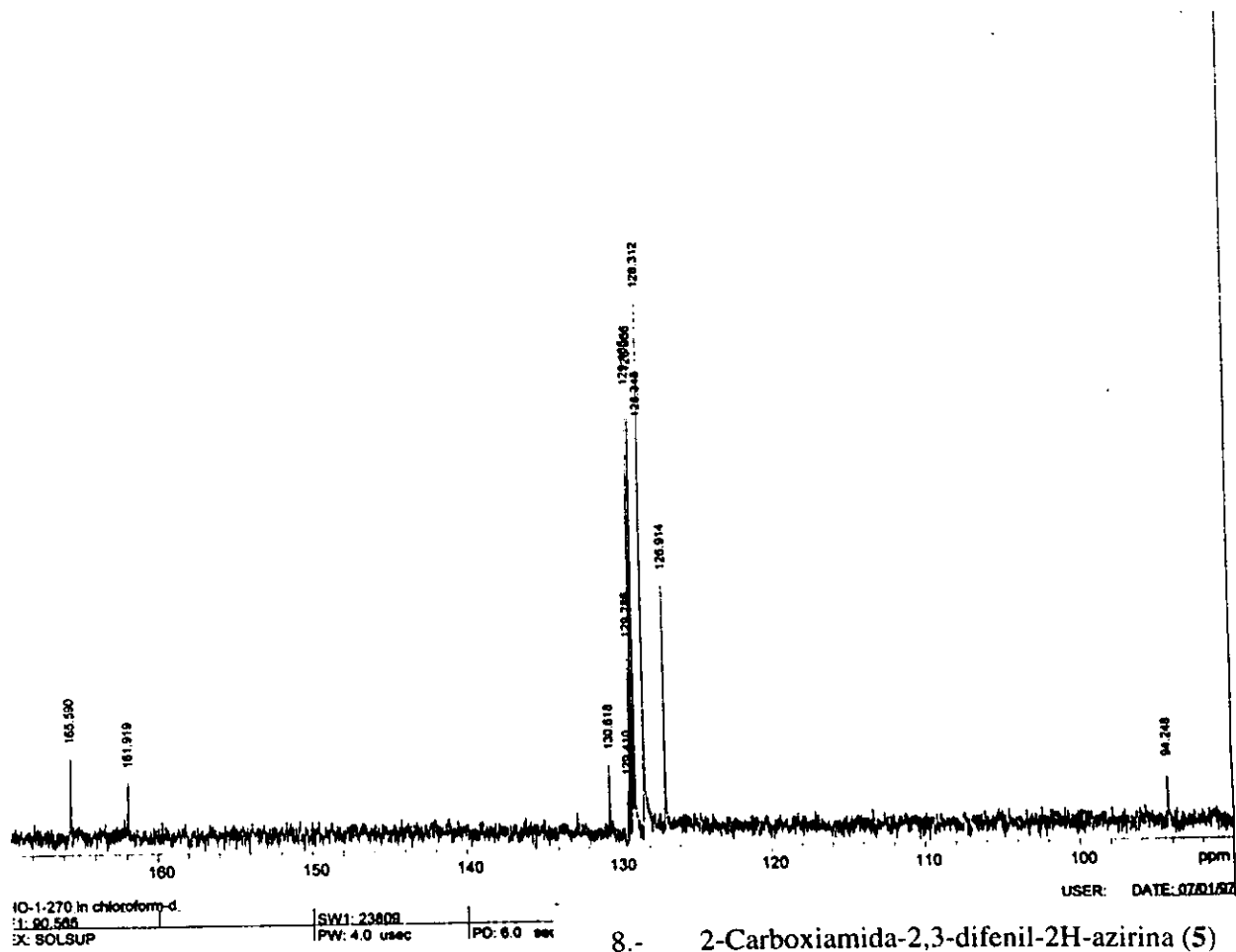
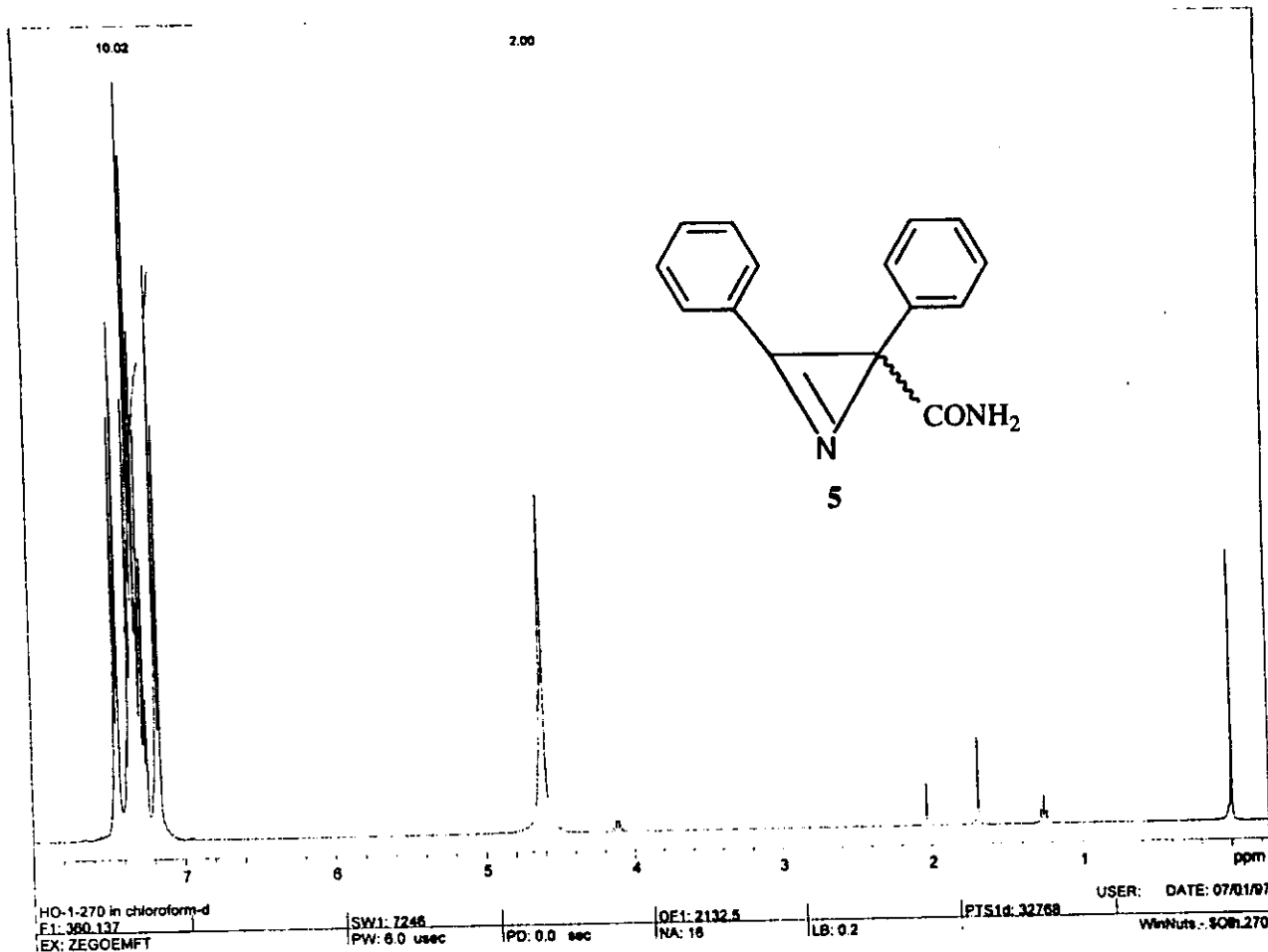


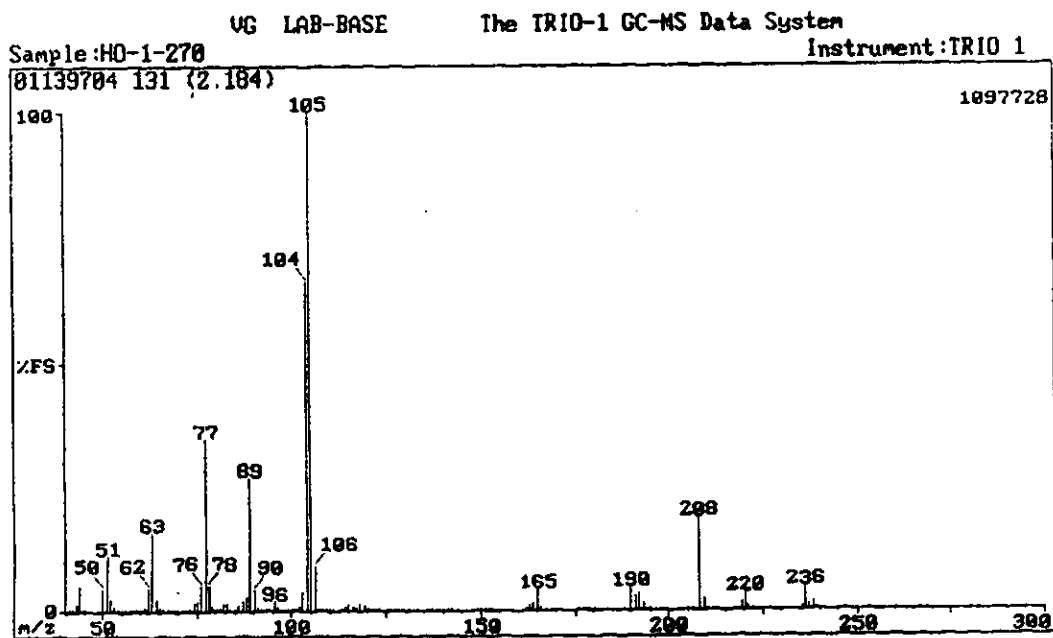
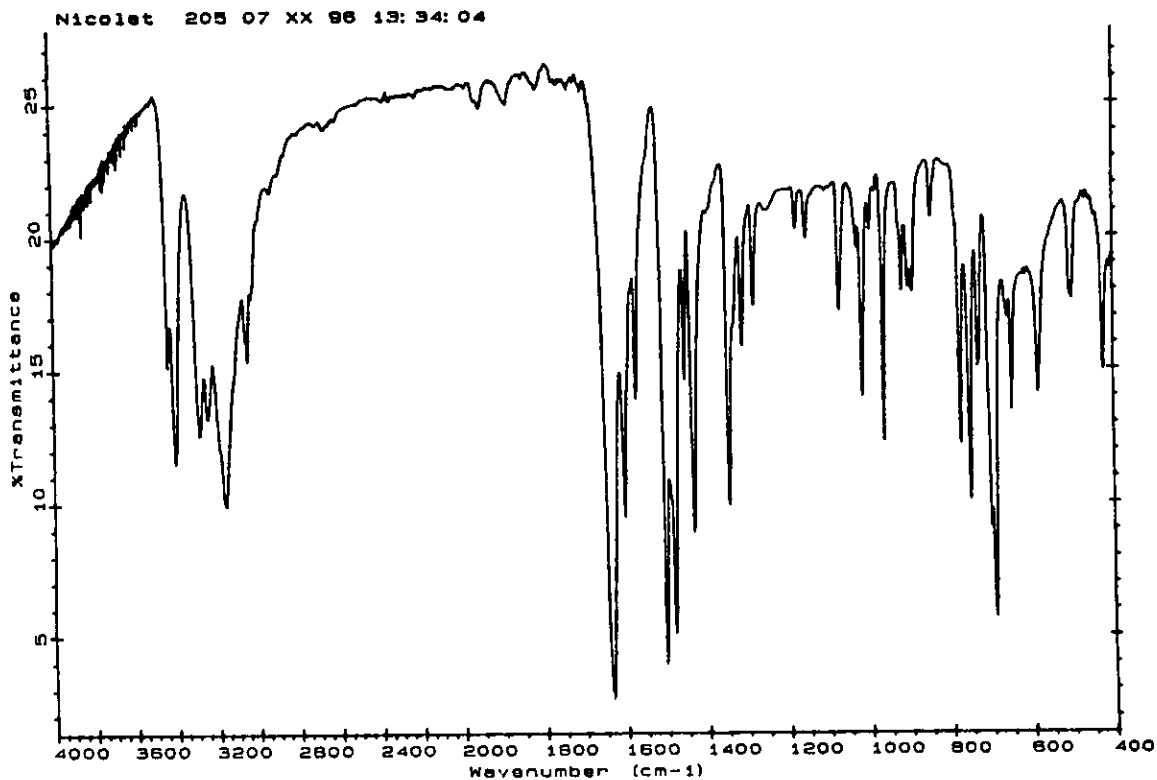
7.- 2-Fenil-3-oximinobutanamida (4g)

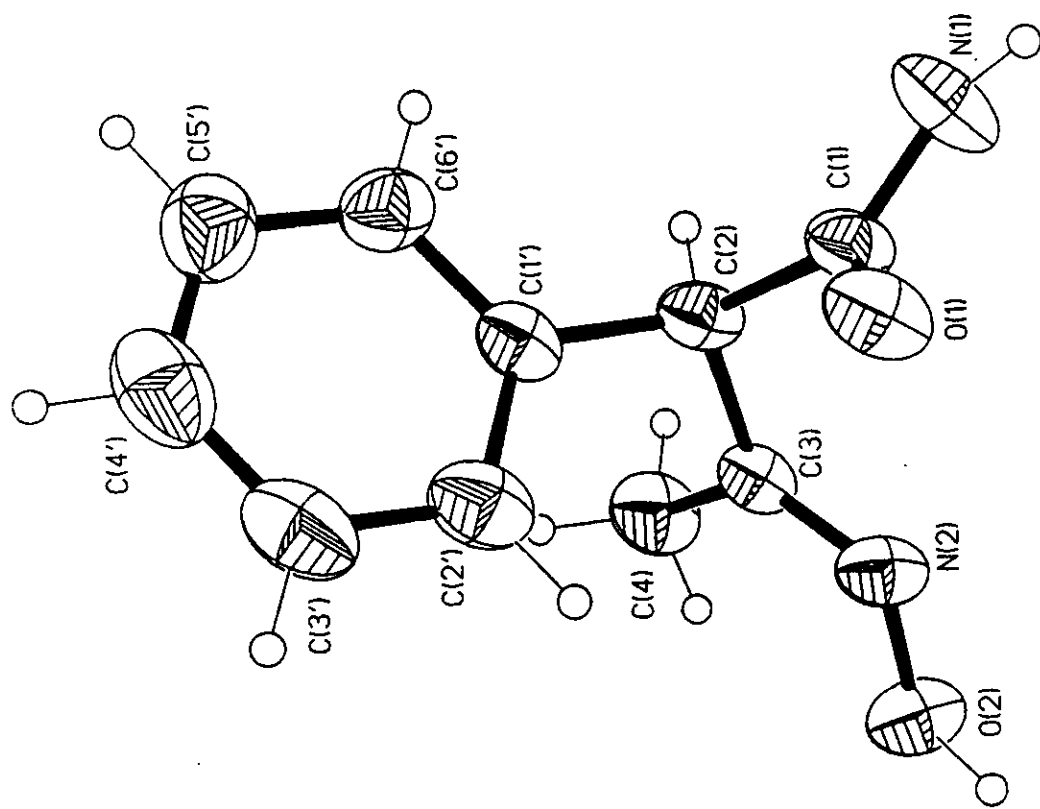
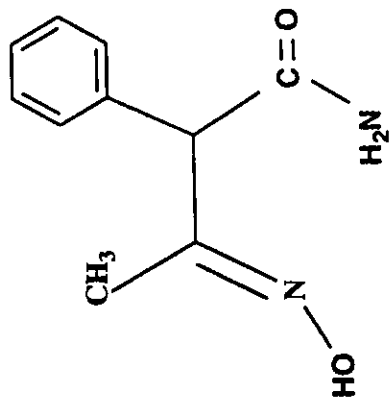


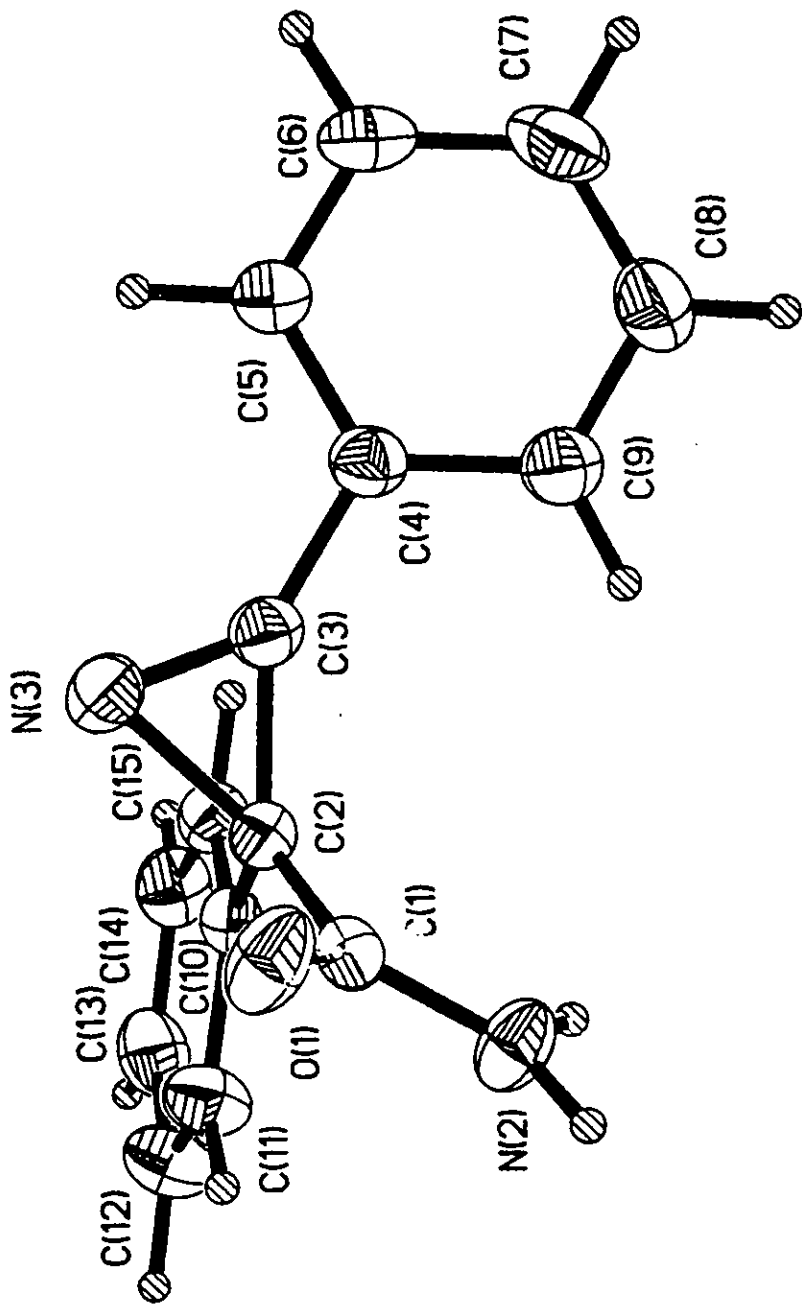
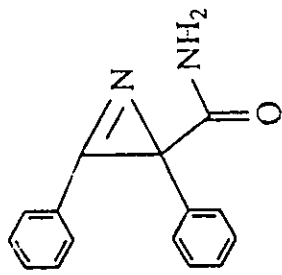
Mass Spectrum 1  
 Date : 19-Apr-95 09:19  
 Sample : PAMJEBIOPHCRO  
 Note : On-Manual-J-RXS05  
 Inlet : Direct  
 Ion Mode : EI+  
 Spectrum Type : Regular (MF-Linear)  
 RT : 0.95 min Scan# : 20 Temp : 35.7 deg.C  
 BP : m/z 149.0000 Int. : 351.70  
 Output m/z range : 33.0000 to 235.3900 Cut Level : 0.00 %  
 1486517











**REPRINT**

**SYNLETT**

**Accounts and  
Rapid Communications in  
Synthetic Organic Chemistry**

**1996  
No. 7  
July**

---

*With Compliments of the Author.*

GEORG THIEME VERLAG · STUTTGART · NEW YORK

# Synthesis of Substituted Isoxazoles from (Z)-3-Alkyl-3-Nitro-2-Phenylpropenenitriles using Baker's Yeast

Arturo Navarro-Ocaña,<sup>a</sup> Manuel Jiménez-Estrada,<sup>a</sup> M. Beatriz González-Paredes,<sup>a</sup> Eduardo Bárzana<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Química. <sup>b</sup>Dept. Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, D.F. 04510, Coyoacán, México, D.F.

Received 19 March 1996

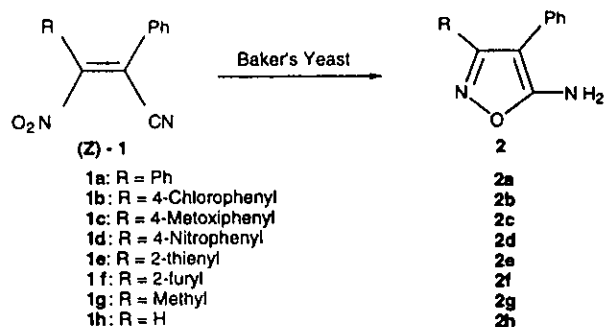
**Abstract:** (Z)-3-Aryl- and (Z)-3-Alkyl-2-phenyl-3-nitropropenenitriles were biohydrogenated with baker's yeast to 5-Amino-3-aryl- and 5-Amino-3-alkyl-4-phenylisoxazoles in good to moderate yields.

Isoxazole structures are widely found in many naturally occurring and some medicinal compounds. In particular, 5-aminoisoxazoles have been used as intermediates for the synthesis of molecules with antihistaminic, analgesic, antibacterial, insecticidal, and antiviral activity.<sup>1</sup>

Usually 5-aminoisoxazoles are synthesized by the condensation of hydroxyl-amine and  $\beta$ -ketonitriles;<sup>2</sup> although several other approaches are also reported in the literature.<sup>3</sup> On other hand, little attention has been paid to the use of baker's yeast for the preparation of heterocycles. Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) has been used to conduct useful reactions such as condensations, hydrolyses, sulfoxidations and reduction of carbon-heteroatom double bonds.<sup>4</sup> Reduction of carbonyl groups is perhaps the most outstanding application of such biotransformations. However, reduction with baker's yeast has been attempted with poor success with other functional groups.<sup>5</sup> To date the most studied bioreductions of nitrogen-containing functional groups are those of nitroso and aromatic nitrocompounds rather than nitroaliphatic ones.<sup>6</sup> Nitroalkene bioreduction studies have shown that the alkene double bond is reduced preferentially.<sup>7</sup>

Herein we report a novel and efficient synthesis of the substituted isoxazoles **2a-h** (Scheme 1) mediated by baker's yeast.

Presumably this reaction proceeds through the hitherto unprecedented initial reduction of vinylic nitro functions (*vide infra*).



Scheme 1

Compounds **1a-h** reacted in the presence of baker's yeast leading to the corresponding 3-Alkyl- and 3-Aryl-4-aryl-5-aminoisoxazoles. The products **2a-h** were easily purified by chromatography on silica gel and their structures were confirmed on the basis of spectral data. Yields were moderate to good as described in Table 1.

It is worthy of note that all compounds (Z)-**1a-h** reacted readily (Scheme 1); however, when compound (E)-**1a** was subjected to analogous reaction conditions it was completely recovered.

Table 1. Yeast-mediated reduction of **1a-h**

Substrate(1)	Reaction time (h)	Product <sup>a</sup> (2)	Yield <sup>b</sup> (%)
<b>1a</b>	2	<b>2a</b>	75
<b>1b</b>	.	<b>2b</b>	82
<b>1c</b>	.	<b>2c</b>	70
<b>1d</b>	.	<b>2d</b>	74
<b>1e</b>	.	<b>2e</b>	52
<b>1f</b>	.	<b>2f</b>	50
<b>1g</b>	6	<b>2g</b>	80
<b>1h</b>	.	<b>2h</b>	75

a) All compounds exhibited spectral data consistent with the assigned structure.

b) Yields refer to isolated products previously purified by column chromatography. Reactions were carried out in the mmol scale.

In conclusion, a new and simple procedure for the preparation of 5-aminoisoxazoles from substituted (Z)-3-nitropropenenitriles using baker's yeast has been carried out. We are currently investigating the generality of this process by testing a wide variety of substrates.

## Typical procedure

Baker's yeast was obtained from commercial suppliers and from the food market (saf-instant or Fleischmann's). Dry activated baker's yeast was used to obtain the best results.

6 g of commercial baker's yeast, 3 g of glucose and 100 ml of phosphate buffer solution (pH=6) were placed in a flask. The suspension was stirred in an incubator at 30 °C for 30 min. Then 250 mg (1.6 mmol) of substrate **1a** previously dissolved in 5 ml acetone were added to the flask and stirred for 2 h. The suspension was mixed with 25 gr celite and saturated with NaCl to stop the reaction.

The mixture was filtered and the supernatant was extracted thrice with ethyl acetate; the solid retained in the filter was washed thrice with 50 ml each of ethyl acetate. The extracts were combined and dried (sodium sulfate) followed by concentration under vacuum yielding a light brownish oil which was purified by column chromatography (silica gel, Hexane:Et-OAc, 9:1) to afford 187 mg (75 %); mp 160 °C (from EtOH; lit.<sup>3</sup> mp 160 °C); TLC  $R_f$  0.45 (Hexane/EtOAc, 7/3, v/v) of compound **2a**.

Selected spectroscopic data for **2a**: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200Mhz):

$\delta$  = 4.53 (s, D<sub>2</sub>O, 2H, NH<sub>2</sub>); 7.49 (m, 10H, arom); <sup>13</sup>C NMR (75 Mhz, CDCl<sub>3</sub>-[D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  = 166.44, 161.21, 130.54, 129.41, 128.74, 128.68, 128.30, 127.86, 127.81, 126.02, 92.29;<sup>8</sup> MS: (70 ev) m/z (%) = 236 (M<sup>+</sup>, 100), 208 (62.9), 89 (47.7). IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3487, 3396, 1952, 1886, 1810, 1634, 1502, 1430, 1341, 1283.

**Acknowledgements.** This work has been financially supported in part by CONACYT (53175) and PADEP-UNAM (30405).



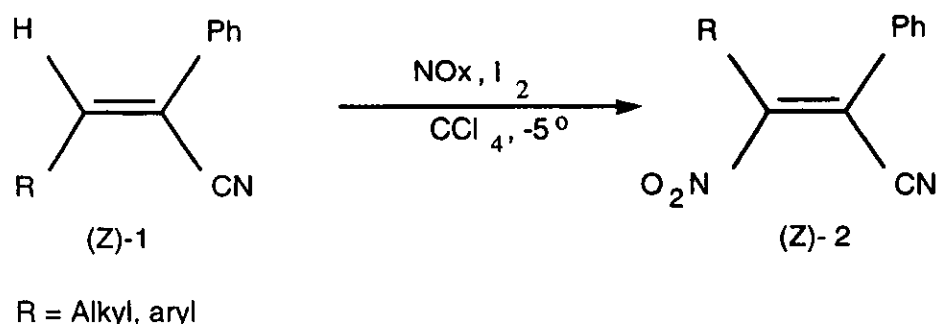
## THE REGIOSELECTIVE NITRATION OF $\alpha,\beta$ -UNSATURATED NITRILES WITH NITROGEN OXIDES

Arturo Navarro-Ocaña †, Eduardo Barzana † \*, Daniel López-González # and Manuel Jiménez-Estrada #

#Instituto de Química. †Dept. Alimentos y Biotecnología., Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Cd Universitaria, D.F. 04510, Coyoacán, México, D.F.

The understanding of the chemistry of nitroalkenes has evolved rapidly since the 1980's based on their wide use for the synthesis of a variety of compounds. Nitroalkenes are considered versatile building blocks and intermediates in many organic synthesis. In addition, they are readily available, facilitate the formation of C-C bonds, and efficient methods are known for their transformation into other functional groups.<sup>1</sup> It is also well known that nitration of alkenes (and aromatic compounds) can be performed with nitrogen monoxide or nitrogen dioxide.<sup>2</sup> However, a mixture of NO/NO<sub>2</sub> (NO<sub>x</sub>) has not been investigated as a nitrating agent. This mixture would have the advantage of being easily generated in the lab<sup>3</sup> without the need for further purification or handling of costly cylinders which are subject to stringent import regulation in some countries. Herein we report an alternative and convenient procedure for the nitration at low temperatures of (Z)-3-R-alkyl-2-phenylpropenenitriles **1**.<sup>4</sup> When such compounds were treated with NO<sub>x</sub> in the presence of iodine,<sup>5</sup> the corresponding nitroalkenes were obtained; some of these nitro compounds are available by nitration with NO<sub>2</sub>.<sup>6</sup> The NO<sub>x</sub> mixture was easily prepared by the procedure of Schmid (THF and HNO<sub>3</sub>).<sup>3</sup> Substituted 3-

nitropropenenitriles are the starting material for a new synthesis of 5-aminoisoxazoles,<sup>7</sup> which are interesting heterocyclic compounds with important biological properties.<sup>8</sup>



When the 3-alkyl-2-phenylpropenenitrile **1a** was treated with NO<sub>x</sub> in the presence of iodine in carbon tetrachloride at -5 °C, the (Z)-3-nitro-2-phenylpropenenitrile **2a** was obtained in 90% yield. Application of this nitration procedure to other alkenenitriles **1b-h** resulted in the formation of the corresponding conjugated nitro olefins listed in Table 1.

**TABLE 1.** Nitration of Alkenenitriles by Mixed Oxides of Nitrogen in the Presence of Iodine

Product <sup>a</sup>	R	mp (°C) <sup>b</sup> [Lit.mp]	Yield (%) [Lit.] <sup>6</sup>
<b>2a</b>	Phenyl	95-96[95.5]	90[89]
<b>2b</b>	4-Chlorophenyl	116[116]	85[85]
<b>2c</b>	4-Methoxyphenyl	92[92]	90[90]
<b>2d</b>	4-Nitrophenyl	92[92]	75[70]
<b>2e</b>	2-Thienyl	90 <sup>c</sup>	75
<b>2f</b>	Styryl	oil <sup>d</sup>	80
<b>2g</b>	H	72[72]	75[80]
<b>2h</b>	Methyl	115[115]	80[75]

a) Only the (Z) products were obtained, identified spectroscopically and mixture mps with known compounds. b) Uncorrected. c) *Anal. Calc.* for C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S: C, X.XX%; H, X.XX Found: C, X.XX; H, X.XX. d) Unstable oil

The products were obtained exclusively with (Z)-geometry of double bond and no contamination with the corresponding (E)-isomers was detected. Yields were comparable to those reported for NO<sub>2</sub>. In addition, for compounds **2e** and **2f** this is the first example of synthesis with nitrogen oxides and in particular with NO<sub>x</sub>.

In conclusion, the use of mixed oxides as a nitrating agent for the synthesis of conjugated nitroolefins from olefins is a comparable alternative to the existing procedures with the advantage of a facile implementation.

## EXPERIMENTAL SECTION

Melting points were determined using a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were measured with a Nicolet FT-IR 55X instrument. Proton NMR spectra were obtained on a Varian VXR-300S, 200MHz spectrometer using TMS as an internal standard. Low-resolution mass spectra were recorded on a Hewlett-Packard 5985-B (70 ev) mass spectrometer.

**Typical Procedure.**- A stirred solution of 0.205 g. (1mmol) of **1a** and 0.010g. of iodine in 100 ml. of carbon tetrachloride was cooled in an ice-bath ( $-5^{\circ}$ ). The mixed oxides ( $\text{NO}_x$ )<sup>3</sup> gas was passed into the solution over 2 hours. After gas addition, stirring was continued for one hour in the cold at  $-5^{\circ}$ . The reaction mixture was extracted with 10% sodium thiosulfate solution until disappearance of the iodine color, washed with sodium hydrogen carbonate solution and water, and dried over sodium sulfate. The residue obtained on evaporation of the organic solvent was recrystallized from ethanol to give 0.224 g (90%) of **2a**, mp  $95-96^{\circ}$ . The progress of the reaction was monitored by TLC.

TABLE. Spectral data of Compounds **2**

Prod.	IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	EM $m/z$ (Relative intensity)	$^1\text{H}$ NMR ( $\delta$ , ppm; $J$ , Hz)
<b>2a</b>	3061, 2931, 2220, 1592, 1543, 1332	250 ( $M^+$ , 18), 204 (100), 203 (84), 176 (60);	7.40 (br, s 10H)
<b>2b</b>	3061, 2931, 2220, 1592, 1543, 1332	284 ( $M^+$ , 22), 254 (25), 238 (95), 203 (100), 77 (20);	7.34 (d, $J = 8.9$ , 2H), 7.33 (m, 5H), 7.19 (d, $J = 8.9$ , 2H)
<b>2c</b>	3119, 2862, 2223, 1603, 1540, 1352	280 ( $M^+$ , 50), 234 (100), 238 (95), 219 (40), 190 (62), 77(17);	$\delta$ 8.19 (d, $J = 8.9$ , 2H), 7.45 (d, $J = 8.9$ , 2H), 7.28 (m, 5H)
<b>2d</b>	2935, 2219, 1604, 1538, 1333, 1260	280 ( $M^+$ , 50), 234 (100), 238 (95), 219 (40), 190 (62), 77(17);	7.31 (m, 5H), 7.14 (d, $J = 9.0$ , 2H), 6.80 (d, $J = 9.0$ , 2H), 3.79 (s, 3H)
<b>2h</b>	2885, 2220, 1630, 1536, 1333	280 ( $M^+$ , 1), 115 (100), 140 (59), 103 (52).	7.51 (m, 5H), 2.41 (s, 3H)

Compounds **2e**, **2f** and **2g** were characterized by spectroscopic means (IR, mass and NMR).

**Acknowledgment.**- We acknowledge partial financial support from CONACYT and DGAPA-UNAM No.: IN214996.

## REFERENCES

1. For reviews on the preparation and use of nitroalkenes in organic synthesis, see: D. Seebach, E.W. Colvin and T. Weller, *Chimia*, **33**, 1, (1979); A. G. M. Barret and G. G. Graboski, *Chem. Rev.*, **86**, 751, (1986); K. Fuji and M. Node, *Synlett*, 603, (1991); A.G.M. Barret, *Chem. Soc. Rev.*, **20**, 95, (1991); R. Tamura, A. Kamimura

- and N. Ono, *Synthesis*, 423, (1991); R. A. Karakhanov, V. I. Kelarev and Y. N. Polivin, *Russ. Chem. Rev.*, **993**, 725, (1993); V. F. Rudchenko, *Chem. Rev.*, **62**, 169, (1993); K. Bott, "*Methoden der Organischen Chemie*", Vol E15/1, pp 1129-1200, (Houben-Weyl), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1993.
2. E. S. Perekalin, E. S. Lipina. V. M. Berestovitskaya and D. A. Efremov, "*Nitroalkenes: Conjugated Nitro Compounds*", Wiley, Chichester, UK. 1994.  
E. Hata, T. Yamada and T. Mukaiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 3629, (1995) and references cited therein.
  - 3.- H. Schmid, A. Maschka and H. Frauenschill, *Monatsh. Chem.*, **80**, 671, (1949).
  - 4.- S. S. Kulp and C. B. Caldwell, *J. Org. Chem.*, **45**, 171, (1980).
  - 5.- V. Jäger and H. J. Günther, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **16**, 246, (1977).
  - 6.- J. C. Doré and C. Viel, *Eur. J. Med. Chem.*, **9**, 673, (1974). C. Bellec, D. Bertin, R. Colau, S. Deswarte, P. Maitte and C. Viel, *J. Heterocyclic Chem.*, **16**, 1611, (1979).
  - 7.- A. Navarro-Ocaña, M. Jiménez-Estrada, M. B. González-Paredes and E. Barzana, *Synlett*, 695, (1996).
  - 8.- J. Rouchaud, F. Gustin and C. Moulard, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **102**, 543, (1993).