

2



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Química

**OBTENCIÓN DE TALIDOMIDA
MEDIANTE
BIOTRANSFORMACIONES CON
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Q U Í M I C A
P R E S E N T A
LETICIA AGUILAR LEYTE



MÉXICO, D. F.



2002

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

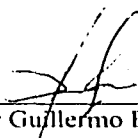
Jurado asignado:

Presidente	Prof.	JOSE MANUEL MENDEZ STIVALET
Vocal	Prof.	JOSE FEDERICO DEL RIO PORTILLA
Secretario	Prof.	HECTOR GUILLERMO BARRIOS LÓPEZ
1er Suplente	Prof.	MARTHA MENES ARZATE
2do Suplente	Prof.	DANIEL MENDEZ ITURBIDE

Sitio donde se desarrolló el tema:


Laboratorio de Bioquímica 1, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UNAM.

Asesor:



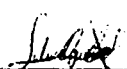
Dr. Héctor Guillermo Barrios López

Supervisor Técnico:



M.C. María del Consuelo Sandoval García

Sustentante:



Leticia Aguilar Leyte

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Esta es la parte mas difícil y fácil de la tesis ya que quieres mencionar a toda la gente que ha estado a tu alrededor en esta etapa..... y son demasiados y tal vez no mencione a alguno por olvido o prisas, tal vez el orden de mencionar sea importante para alguno para mi no.

Para no divagar tanto, esto difícil lo hago fácil y englobo todo lo que ha estado a mi alrededor en esta etapa de mi vida, a mi Universidad Nacional Autónoma de México, a mi asesor, a mi familia y a mis amigos que siempre han estado cerca de mi.

Gracias

INDICE GENERAL

1.0	Introducción	1
2.0	Antecedentes	4
2.1	Importancia de los seres vivos	4
2.2	Biotransformaciones	5
2.2.1	Seres vivos utilizados	7
2.2.2	Características de las reacciones de biotransformación	7
2.2.3	Ventajas y desventajas de las biotransformaciones	10
2.3	Enzimas	11
2.3.1	Clasificación de las enzimas	11
2.3.2	Mecanismos enzimáticos	12
2.3.2.1	Teoría llave-cerradura	13
2.3.2.2	Teoría complejo-sustrato	13
2.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.4.1	Generalidades	14
2.4.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como catalizador	15
2.4.3	Reacciones de ciclización con levaduras	16
2.4.3.1	Síntesis de imidazoles fusionados con quinazolininas mediante una doble ciclización con levaduras Baker	17
2.4.3.2	Eficiente ciclización enzimática de 2-(carbamoiloxi) y 2-(sulfamoiloxi)-benzonitrilos por levaduras Baker estimuladas mediante ultrasonido	18
2.4.3.3	Ciclización reductiva de o-nitrocinaldehidos en NaOH y levaduras Baker	19
2.4.3.4	Novedosa reducción biocatalítica de aril azidas. Síntesis quimioenzimática de los antibióticos pirrol-(2,1-c)(1,4)-benzodiazepina ..	20
2.5	Talidomida	21
2.5.1	Generalidades	21
2.5.2	Usos y propiedades	21
3.0	Discusión de Antecedentes	22
4.0	Objetivos	23
4.1	Objetivos generales	23
4.2	Objetivos específicos	23

5.0	Resultados	24
5.1	Síntesis de N-etoxicarbonil ftalimida 1	24
5.1.1	Caracterización de N-etoxicarbonil ftalimida 1	25
5.2	Síntesis de N-ftaloil-L-glutamina 2	26
5.2.1	Caracterización de N-ftaloil-L-glutamina 2	27
5.3	Obtención de Talidomida 3	29
5.3.1	Pruebas para obtener Talidomida	29
5.3.2	Condiciones de reacción	31
5.3.2.1	pH	31
5.3.2.2	Tiempo de incubación	32
5.3.2.3	Concentración de biocatalizador y sustrato	33
5.3.2.4	Elaboración de testigos o blancos	34
5.3.2.5	Identificación de 3 mediante HPLC	35
5.3.2.6	Cuantificación y caracterización de 3	36
5.4	Células inmovilizadas	37
6.0	Discusión	38
7.0	Conclusiones	39
8.0	Desarrollo experimental	40
8.1	Materiales	40
8.2	Desarrollo experimental	42
8.2.1	Obtención de N-etoxicarbonil ftalimida 1	42
8.2.2	Síntesis de N-ftaloil-L-glutamina 2	42
8.2.3	Biotransformación	42
8.2.2.1	Testigos	43
8.3	Espectroscopia	43
9.0	Bibliografía	45
10.0	Anexos Espectroscopia de los diferentes compuestos	48

1.0 INTRODUCCIÓN

El hombre desde tiempos muy remotos ha ocupado microorganismos para su beneficio, la utilización de estos microorganismos es conocida desde la antigüedad con la fermentación de azúcar por medio de levaduras para obtener etanol, así como en la obtención de pan por medio de estas mismas.¹

Un breve resumen histórico² acerca del descubrimiento de las enzimas se presenta a continuación:

- ❖ En 1783 Spallanzani nota que el jugo gástrico es el causante de realizar una buena digestión.
- ❖ Durante 1833 Payen y Presos aislaron la primera enzima (amilasa).
- ❖ En 1860 Berthelot obtuvo alcohol de una reacción de levaduras convirtiendo glucosa a fructosa. Obteniéndose así científicamente la primera fermentación.
- ❖ Para 1926 se cristalizó la ureasa, primera enzima reconocida o identificada como tal.
- ❖ A partir de 1950 gran cantidad de enzimas son descubiertas, purificadas y cristalizadas.
- ❖ En 1960 Hirs, Moore y Stein obtienen la secuencia de la enzima llamada ribonucleasa A. Teniendo solo 124 aminoácidos y un peso molecular de 13,680 daltones.

La utilización de microorganismos inicialmente se hacía de manera empírica. Sin embargo en la actualidad las investigaciones han dado gran importancia a esas prácticas, a tal grado que ahora se sabe que las responsables de lograr estas transformaciones son las enzimas que son proteínas y que pueden realizar conversiones químicas biocatalizadas. Por lo que se dice que cuando una reacción se lleva a cabo utilizando microorganismos en algún paso de la secuencia sintética, se realiza una biotransformación o bioconversión.

Existen varias teorías de como actúan las enzimas en este tipo de reacciones, la primer teoría fue la propuesta por Fischer en 1894. En esta se afirmaba que la enzima y el sustrato solo podían reconocerse si eran como la acción entre una llave y su cerradura. Esta teoría marcaba ciertos límites, siendo el más importante el que las enzimas solamente podían catalizar reacciones químicas metabólicas, es decir solo aquellas reacciones comprendidas en la biogénesis de los ciclos celulares, pero a lo largo de muchas investigaciones se ha demostrado que estas pueden actuar en infinidad de reacciones químicas con una gran diversidad de sustratos y en donde las diferencias estructurales con la enzima no impiden que se realice la reacción.

De hecho se menciona que por cada tipo de reacción química que existe en la química orgánica, las células poseen también enzimas que pueden realizar el mismo tipo de reacción.

En la industria se sintetizan muchos productos químicos, siendo los de mayor importancia en el ámbito de las biotransformaciones los de la industria farmacéutica. Estos normalmente son sintetizados mediante lo que se conoce como química orgánica tradicional y como en cualquier metodología ésta presenta algunos inconvenientes. Dentro de estos el más sobresaliente es el aspecto estereoquímico, particularmente la obtención de mezclas racémicas. En esta área de la industria, uno de los principales requisitos que deberían cubrir las reacciones es la de ser estereoselectivas, o sea obtener un solo enantiómero o al menos mayor porcentaje de uno de ellos, lo que se conoce como exceso enantiomérico. Esta consideración es debida a que por lo general sólo uno de los enantiómeros presentará la actividad biológica esperada, dando por resultado que los procesos de purificación sean muy tardados, costosos y con rendimientos bajos debido a la resolución enantiomérica.

En cambio, el trabajar con enzimas en este aspecto representa tener varias ventajas. Principalmente el que ellas efectúan reacciones estereoselectivas produciendo en muchas ocasiones un solo enantiómero y en la mayoría de los casos excesos enantioméricos significativos, con lo cual se reduce el tiempo y costo de una reacción.

Uno de los casos más trágicos en la utilización de fármacos como mezcla racémica se dio con la droga conocida como Talidomida, esta fue recetada a mujeres como sedativo o paliativo durante los años 60's para disminuir las molestias propias del embarazo. Cuando el fármaco fue suministrado en los primeros 3 meses de embarazo, causó efectos devastadores en los bebés al nacer estos deformes, principalmente con un desarrollo anormal de sus extremidades.³ Reconocido el problema, las investigaciones comprobaron que la actividad de la droga, denominada teratogenicidad, era realizada por el enantiómero de configuración (S). Esta tragedia se pudo haber evitado si de la síntesis o por resolución, solo se hubiera suministrado el enantiómero (R) cuyos efectos eran los benignos.⁴

Por este hecho lamentable, se prohibió el uso del fármaco, sin embargo estudios posteriores han demostrado que éste mismo fármaco tiene propiedades anticancerígenas aún administrado en su forma racémica, de donde la FDA hace unos años aprobó su uso, pero con otros fines. Esto es en su utilización para el tratamiento de personas con enfermedades resultantes o derivadas del SIDA, como cáncer en la piel, lepra, tuberculosis y otras.⁵

Por otra parte, en los últimos años se ha observado un aumento en la publicación de artículos científicos en donde se ocupan sistemas biológicos y donde se trata de tener rutas alternativas en la síntesis de fármacos.

El principal objetivo de este proyecto es el de realizar la síntesis de talidomida utilizando los sistemas enzimáticos contenidos en las células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Lo anterior genera una ruta alternativa de síntesis para este fármaco y corrobora así, la gran versatilidad que poseen las células en síntesis químicas, reforzando lo descrito en investigaciones recientes donde se ha probado que la aplicación de estos sistemas es muy extenso, de tal forma que pueden realizar hidroxilaciones, oxidaciones, reducciones de carbonilos, dobles ligaduras carbono-carbono, etc.

En esta tesis se realizó la biociclización de la N-ftaloil-L-glutamina utilizando *Saccharomyces cerevisiae* con la finalidad de obtener talidomida.

2.0 ANTECEDENTES

2.1 Importancia de los seres vivos.^{1a}

Se define como ser vivo toda ente capaz de realizar sus funciones metabólicas de reproducción y supervivencia por si solos, ejemplos de estos seres vivos son las células animales, células vegetales, hongos, bacterias, etc.

El uso de seres vivos para producir alimentos, antibióticos, fármacos, o para la agricultura y en procesos industriales y biotecnológicos es muy importante. La utilización de ellos para la obtención de productos en beneficio del hombre se inició de manera empírica. Pero los beneficios otorgados a la humanidad han hecho que los científicos investiguen a estos seres vivos, dando origen a la ciencia llamada biotecnología.

En un sentido amplio la biotecnología contempla el uso de sistemas enzimáticos de microorganismos, plantas, levaduras, etc., en procesos industriales a gran escala, también se extiende a la creación de nuevos sistemas capaces de sintetizar productos específicos de alto valor comercial.

En la vida diaria los seres vivos juegan un papel importante en la obtención de :

a) Antibióticos y fármacos

En la industria farmacéutica se aíslan diversos fármacos y antibióticos que provienen de las reacciones que se realizan en el metabolismo de bacterias, hongos etc.

b) Alimentos

Existen productos lácteos como la leche, queso, yogurth, etc. de alto valor comercial y en cuya manufacturación intervienen parcial, o totalmente, alguna actividad microbiana. Un ejemplo es la fermentación realizada para obtener cerveza mediante levaduras. El principal azúcar de muchos refrescos es la fructosa, que se produce del almidón de maíz por actividad microbiana.

c) Agricultura

Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia en el reciclaje de nutrientes que son importantes para los vegetales. Como el carbono, nitrógeno y azufre. Las actividades microbianas en el suelo y agua transforman estos elementos a sistemas que son fácilmente absorbidos por las plantas.

d) Energía y medio ambiente

Una gran parte del gas natural (metano) es un producto de la acción bacteriana sobre materiales orgánicos de desecho y su formación es debida a las bacterias conocidas como metanogénicas.

Los microorganismos pueden ser utilizados para ayudar a disminuir la polución creada por las actividades humanas, mediante el proceso llamado de biorremediación. Así mismo pueden ser parte importante en fuentes alternativas de energía, como se ha mencionado la biomasa microbiana y los materiales de desecho existentes como los desperdicios domésticos, los excedentes de cosechas y los residuos animales pueden ser convertidos en biocombustibles como metano y metanol por otros microorganismos.

2.1.2 Influencia de los microorganismos en la actividad humana.

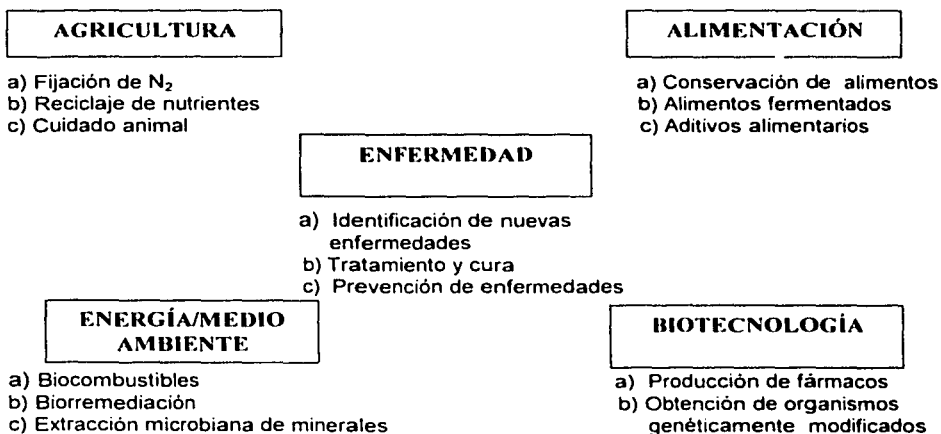


Fig. 1 ^(1b) Influencia de microorganismos en la actividad humana

2.1 Biotransformaciones

Los seres vivos antes mencionados participan en lo que se denominan biotransformaciones o bioconversiones, que en la literatura también se les describe o conoce como reacciones enzimáticas y/o de biocatálisis.

De tal manera que una biotransformación se define como todo cambio en la estructura de un compuesto químico realizada por seres vivos o parte de ellos. De hecho todas estas denominaciones a lo que realmente se refieren, es a las enzimas que existen en las células de los seres vivos antes mencionados.

Las enzimas son proteínas denominadas así por la capacidad que tienen de catalizar las reacciones metabólicas de los seres vivos para que estos mantengan sus sistemas reproductivos.

La gran importancia de esta línea de investigación es que las reacciones se realicen *in vitro*, en otras palabras que las enzimas puedan ejercer los mecanismos adecuados para realizar las biotransformaciones esperadas a diversos sustratos.

El que las enzimas realicen estas reacciones es conocido, pero el como las realizan no se ha explicado. Se han postulado algunas teorías para tratar de explicar el mecanismo de acción. Todas estas teorías coinciden en un punto que es la formación de un complejo enzima-sustrato.

Para llegar a utilizar el término de biotransformación así como su significado, han tenido que pasar bastantes años de investigación. De entre los trabajos clave en este tipo de investigaciones, se encuentran:

“El descubrimiento de las bacterias” (1684) por Antonie Leewenhoek

“Microbiología de la fermentación láctica y papel de las levaduras en la fermentación alcohólica” realizada por Louis Pasteur (1857-1860).

Actualmente la importancia de las reacciones realizadas por seres vivos en síntesis orgánica es tan grande que, en los últimos 10 años el número de artículos publicados en donde se realiza mediante alguna biotransformación, se ha incrementado considerablemente.

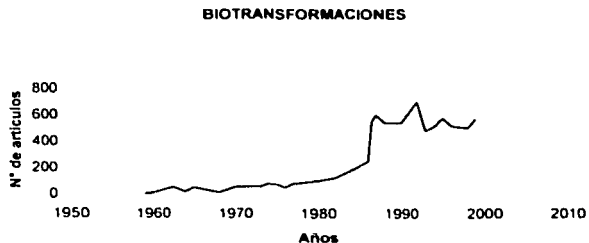


Fig. 2 Publicaciones anuales en biotransformaciones de compuestos no naturales⁶

2.2.1 Seres vivos utilizados

Existe una gran variedad de reactivos biológicos que se utilizan en la industria farmacéutica, alimenticia, en investigación científica, etc, para obtener productos mediante biotransformaciones, estos "reactivos" se pueden encontrar como:

- Células vegetales
- Células animales
- Bacterias
- Hongos (los más conocidos y comúnmente llamados levaduras)
- Virus
- Enzimas purificadas de alguno de los seres vivos antes mencionados.

2.2.1 Características de las reacciones de biotransformación.

A lo largo de diversos estudios se ha llegado a la conclusión de que para que una reacción de biotransformación logre un resultado exitoso, deberá cumplir con algunos requisitos que aunque no son absolutos o generales, si son necesarios y en este sentido aún se debe investigar, ya que es sabido que el cambio de algunas variables dentro de un mismo tipo de reacción, puede aportar productos con características muy diferentes. Así, dentro de las condiciones que se deben satisfacer están:

❖ Sustrato:

Liámese así al compuesto químico que se desea transformar, el sustrato y el biocatalizador deberán estar en contacto entre sí, para lo cual el sustrato deberá ser soluble en el medio en que se trabaja, este puede ser acuoso u orgánico y en algunos casos se han utilizado cosolventes y hasta disolventes inmiscibles o sea en sistemas bifásicos donde se dice que la biotransformación se realiza en la interfase. El hecho de trabajar con células completas, implica que las enzimas que realizan la biotransformación. Pueden encontrarse en el interior de la célula por lo cual el sustrato deberá atravesar la membrana celular, o bien que estas enzimas puedan encontrarse en las paredes extracelulares o ser liberadas al medio de reacción. De cualquier forma el contacto entre el sustrato y las enzimas deberá llevarse a efecto.⁷

❖ Temperatura y pH.

Las reacciones de biotransformación se realizan bajo condiciones suaves de reacción esto es a temperaturas por debajo de los 40 ° C y un pH cercano al neutro ya que casi todos los seres vivos normalmente crecen y se reproducen en estas condiciones, además de una agitación orbital continua y presión normal.

❖ Disolventes:

Como se ha mencionado anteriormente, el biocatalizador deberá estar en contacto con el sustrato por lo que generalmente se utilizan medios acuosos de reacción aunque se ha descrito el uso de muchos disolventes orgánicos. Los disolventes más utilizados son la dimetil formamida, etanol, dioxano, metanol, acetona, cloroformo, acetato de etilo, dimetil sulfóxido. El disolvente no necesariamente debe ser miscible con agua.

❖ Biocatalizador:

La parte de los seres vivos llamados enzimas, son las responsables de transformar un compuesto A al producto B. Existe una gran cantidad de enzimas que realizan reacciones muy diversas y específicas, una serie de las enzimas más utilizadas en síntesis orgánica se presenta en la tabla 1.

ENZIMAS COMUNMENTE USADAS EN SÍNTESIS ORGÁNICA		
No requieren cofactores	No requieren la adición de cofactores poseen los cofactores necesarios	Requieren cofactores
1) Enzimas Hidrolíticas: Esterasas	1) Flavoenzimas: Glucosa Oxidasa	1) Quinasas-ATP 2) Oxidoreductasas-NAD(P)(H)
Lipasas	Amino acido oxidasas	
Amidasas	Diaforasa	3) Metil transferasas-SAM
Fosforilasas	2) Piridoxal fosfato enzimas:	
Epóxido Hidrasas	Transaminasas	4) CoA-requieren enzimas
Nucleósido Fosforilasa	Tirosinasa	
SAM Sintetasa	δ-Aminolevulinata Dihidratasa	5) Sulfuriliasas-PAPS
	Cistationina sintetasa	
2) Isomerasas y Liasas:	3) Metaloenzimas:	
Glucosa isomerasa	Galactosa oxidasa	
Aspartasa	Monooxigenasas	
Fenilalanina amonio liasa	Dioxigenasas	
Fumarasa	Peroxidasas	
Cianohidrina sintetasa	Hidrogenasas	
	Enoato reductasas	
3) Aldolasas	Aldolasas	
	Carboxilasas	
4) Glicosil tranferasas	Nitrilo hidrasa	
	4) Tiamin pirofosfato enzimas dependientes:	
5) Glicosidasas	Transquelotasas	
	Decarboxilasas	
6) Oxinitilasa	5) Otras	
	SAH Hidrolasa	
	B ₁₂ Enzimas dependientes	
	PQQ(Metoxatin) enzimas	

Tabla 1 ⁽⁸⁾

2.2.3 Ventajas y desventajas de las biotransformaciones.

El impacto que han tenido las biotransformaciones en la síntesis orgánica se debe a que tienen ciertas ventajas sobre la síntesis orgánica tradicional.^{9,10,11}

Ventajas

- El poder catalítico de las enzimas es impresionante, estas incrementan la velocidad de las reacciones químicas de 10^8 a 10^{20} veces.
- A diferencia de muchos catalizadores químicos donde se utilizan metales pesados los biocatalizadores se degradan siendo compatibles con el medio ambiente.
- Las enzimas actúan bajo condiciones suaves de reacción, en un intervalo de pH de 5-8 a una temperatura de 20-30° C. Se ha encontrado que esto minimiza las reacciones de descomposición, isomerización, o racemización que se presentan en la síntesis orgánica tradicional.
- Las enzimas actúan en muy diferentes tipos de reacciones químicas y posiblemente existe una bio-reacción por cada reacción utilizada en síntesis orgánica.
- Los biocatalizadores son quimiosselectivos, por lo que actúan sobre un solo grupo funcional.
- Los biocatalizadores son regioselectivos ya que pueden distinguir entre dos grupos funcionales en la molécula del sustrato. También pueden ser diastereoselectivos.
- Los biocatalizadores son enantioselectivos, cuando se tiene un centro quiral en un sustrato sintetiza excesos enantioméricos de hasta 99.9% del enantiomero requerido, evitando así la resolución del producto.
- El costo económico y ecológico al utilizar biocatalizadores es menor que si se utilizara síntesis tradicional orgánica.

Desventajas

- Las condiciones en las que se trabaja este tipo de reacciones normalmente deben de ser "suaves", esto para no desnaturalizar las proteínas que actúan como reactivos. Pero existen las extremozimas, que pueden biocatalizar reacciones en condiciones de pH extremas o de salinidades o temperaturas altas, aunque estas reacciones han sido muy poco investigadas.
- Se trabaja en el sistema de prueba y error por ser la biocatálisis una técnica que necesita de mucha investigación, ya que la estructura de los "reactivos biológicos" no se conoce.
- Al trabajar con todo tipo de seres vivos, la purificación del producto a veces no puede ser tan fácil utilizando solo técnicas de purificación de síntesis orgánica tradicional.
- La utilización de enzimas puras.

2.3 Enzimas

La mayoría de las reacciones realizadas con seres vivos no ocurrirían a velocidad apreciable sin catalisis. Los catalizadores de las reacciones biológicas son proteínas llamadas enzimas.

Cada organismo produce una gran variedad de enzimas y el organismo las produce porque están involucradas en reacciones metabólicas. Existen microorganismos que producen enzimas en grandes cantidades y en lugar de mantenerlas dentro de la célula las excretan al medio. Por lo regular las enzimas extracelulares son capaces de digerir o degradar materiales insolubles transportando los productos de la digestión dentro de la célula, en donde son utilizados como nutrientes para el crecimiento de la misma.

En la actualidad se utilizan las enzimas extracelulares en las industrias alimentaria, farmacéutica y textil y se producen en gran cantidad mediante biosíntesis microbiana. Comercialmente se producen enzimas procedentes de bacterias y hongos. Generalmente las enzimas se producen en pequeñas cantidades durante la fase activa de crecimiento y en la fase estacionaria de crecimiento.

Existe un número infinito de enzimas y hasta la actualidad se han clasificado en 6 grupos específicos y la nomenclatura que se les asigna les denomina el nombre según el sustrato al que se unen o según la reacción que catalizan adicionando la terminación -asa.

2.3.1 Clasificación de las enzimas.

1.- Oxidorreductasas.

Participan en reacciones de oxido-reducción de todos los tipos y son dependientes de cofactores, reducción de aldehídos, cetonas, epoxidación, oxidación Baeyer-Villiger, hidroxilaciones, etc.

2.- Transferasas.

Estas enzimas participan en reacciones que implica la transferencia de un grupo intacto de átomos de una molécula dadora a otra aceptora, como por ejemplo la transferencia glicosilica.

3.- Hidrolasas.

En este tipo de reacciones se presentan rupturas hidrolíticas de enlaces químicos tales como C-O, C-N, C-C, las reacciones pueden presentarse en la formación o hidrólisis de ésteres, en aminólisis, o hidrólisis de ámidas, epóxidos, halógenos, o de fosfatos, además de glicosilaciones y síntesis de péptidos.

4.- Liasas.

Participan en reacciones que implican la ruptura de C-O, C-N, C-C, y otros enlaces por otros enlaces diferentes a la hidrólisis u oxidación, formación de cianohidras, acilinas y reacciones aldólicas.

5.- Isomerasas.

Este tipo de reacciones que implican cualquier tipo de isomerización, tales como racemización, epimerización e isomerización cis-trans, rearrreglos tipo Claissen, isomerización de carbohidratos, racemización y copolimerización.

6.- Ligasas

Participan en reacciones que implican la formación de un producto mediante la condensación de dos moléculas diferentes acopladas a la ruptura de una unión pirofosfórica del ATP.

ENZIMAS DE USO FRECUENTE EN BIOCATALISIS

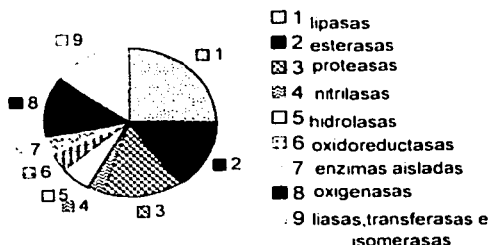


Fig.3 (9a) Uso de enzimas en biocatálisis

2.3.2 Mecanismos enzimáticos.

Como ya se mencionó, las enzimas son proteínas con capacidades específicas dentro de los seres vivos para que estos mantengan sus funciones.

La importancia en las biotransformaciones son las reacciones *in vitro* que pueden realizar las enzimas con sustratos químicos.

Hasta el presente se conoce solo superficialmente, en algunas enzimas, la forma en la que realizan estas reacciones.¹²

Los mecanismos de reacción de las enzimas en las reacciones de biotransformación aún no se han explicado en su totalidad. Solo se han explicado mecanismos enzimáticos de algunas reacciones metabólicas. Existen por lo menos 21 diferentes hipótesis^{2a} de cómo una enzima cataliza una reacción, aquí solo mencionaremos dos que son muy importantes.

2.3.2.1 Teoría llave-cerradura

El descubrimiento de Emil Fischer en 1894 en donde las enzimas glucolíticas pueden distinguir entre los azúcares estereoisómeros, condujo a la formulación de su hipótesis de la cerradura y la llave. " la especificidad de una enzima (la cerradura) por su sustrato (la llave) procede de sus formas complementarias geométricamente". Esto es que la forma geométrica resultante de la estereoquímica de la parte reaccionante del sustrato, debería encajar en una cavidad de forma similar presente en la enzima.

Esta teoría supone que las enzimas solo podían catalizar las reacciones químicas de las vías metabólicas en las que estaban involucradas y en las que se presentaba siempre el mismo tipo de sustrato.

2.3.2.2 Teoría complejo-sustrato

Esta teoría es la mas conocida y aceptada en la actualidad. Esta relacionada con la estructura tridimensional de la molécula enzimática, ya que la enzima se combina temporalmente con el reactivo o sustrato formando, un complejo. A medida que la reacción procede, el producto se libera y la enzima vuelve a su estado original.



Fig. 4 ^(9b) Teoría de complejo sustrato

Las enzimas son generalmente mucho más grandes que el sustrato. Hasta la actualidad solo se conoce que se forma el complejo enzima-sustrato mediante interacciones dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, enlaces covalentes, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, aún no se explica como se forma y se libera el producto. El sitio donde se une el sustrato a la enzima se denomina sitio activo.

Para catalizar una reacción siguiendo el mecanismo de complejo-sustrato se propone que la enzima debe hacer dos cosas:

- 1.- Unirse al sustrato correcto.
- 2.- Situar el sustrato en el centro activo.

La unión del sustrato a la enzima que produce el complejo citado, se realiza de tal manera que forma enlaces específicos entre el sustrato y la enzima. Esto conduce a una reducción de la energía de activación lo que da por resultado la consiguiente conversión del sustrato en producto.

2.4 *Saccharomyces cerevisiae*.

2.4.1 Generalidades.¹³

Los hongos de *Saccharomyces cerevisiae* son células eucariotas mejor conocidas como levaduras. Estos son los microorganismos más utilizados en la industria. Las células de levadura se utilizan en la fabricación de pan y como complemento alimenticio. La fermentación a gran escala por la levadura es la responsable de la producción de alcohol empleado para fines comerciales. No obstante, se le conoce mejor en la elaboración de cerveza, licores y vinos.^{1c}

En los últimos 40 años los científicos han puesto interés en las levaduras para utilizarse como reactivo en la síntesis de productos químicos mediante biotransformaciones, utilizandolas como células completas o más específicamente utilizando alguna de sus enzimas aisladas ya reconocidas y estudiadas.

A continuación se muestra los usos industriales de la levadura y productos que de ella se obtienen:

Producción de células de levadura

- Levadura de panadería para producción de pan
- Levadura desecada como suplemento alimenticio
- Levadura desecada para alimento de animales

Productos de la levadura

- Extracto de levaduras para medios de cultivo
- Vitaminas B, Vitamina D
- Enzimas para la industria alimentaria; invertasa, galactidasa etc. y biotransformaciones
- Productos para la investigación bioquímica; ATP, NAD⁺, RNA

Productos de la fermentación de la levadura

- Etanol para alcohol industrial
- Glicerol
- Bebidas alcohólicas
- Cerveza
- Vino

Bebidas destiladas.

- Whisky
- Brandy
- Vodka
- Ron

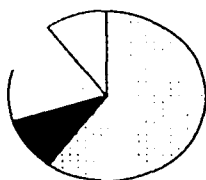
2.4.1 *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalizador.

La gran diversidad de reacciones que se pueden obtener mediante biotransformaciones con esta levadura, han hecho de ella un biocatalizador muy versátil, así se encuentra que puede realizar reacciones de reducción de grupos carbonilo, reducción de enlaces carbono-carbono, síntesis de heterociclos, hidrólisis de ésteres, reducción de grupos nitro y otros tipos de reacciones como ciclizaciones; además es económica y fácil de obtener ya que no necesita factores de crecimiento muy complejos.¹⁴

A continuación se muestran dos gráficos de reacciones que realiza *Saccharomyces cerevisiae*, especificando que el primer gráfico es obtenido de manera personal (año 2000) en la revisión bibliográfica realizada para esta tesis y el segundo gráfico es obtenido de una revisión de artículos publicados sobre transformación de grupos funcionales por *S. cerevisiae* hecha por Servi,S. (1990)¹⁵ y Csuk Glazner (1991).¹⁶

Como se puede observar la tendencia de reacciones que se llevan a cabo por el biocatalizador no tiene un cambio considerable.

Reacciones que se llevan a cabo con *Saccharomyces cerevisiae* según revisión bibliográfica



- 1 Reducciones (16)
- 2 Formación de C-C (1)
- 3 Hidrólisis (3)
- ▨ 4 Oxidaciones (1)
- ▩ 5 Ciclizaciones (5)

() = al número de artículos

Fig.5⁽¹⁷⁾ Reacciones realizadas por levaduras

Saccharomyces cerevisiae en las biotransformaciones según referencia bibliográfica

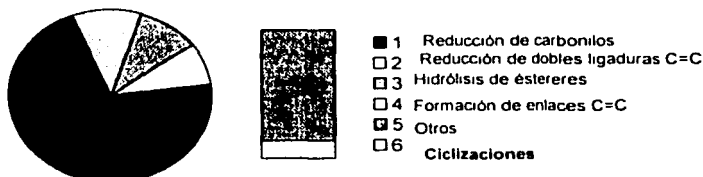
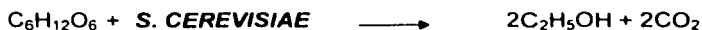


Fig.6 (16a) Reacciones que realiza *Saccharomyces cerevisiae*

Las reacciones en las que más frecuentemente se ha utilizado *Saccharomyces cerevisiae* biotransformando un sustrato, es en la obtención de alcoholes mediante la reducción de grupos carbonilo.

La reacción tradicional que se ha realizado desde tiempos remotos, es el proceso de fermentación mediante glucosa y *S. cerevisiae* para obtener etanol.



2.4.2 Reacciones de ciclización con levaduras.

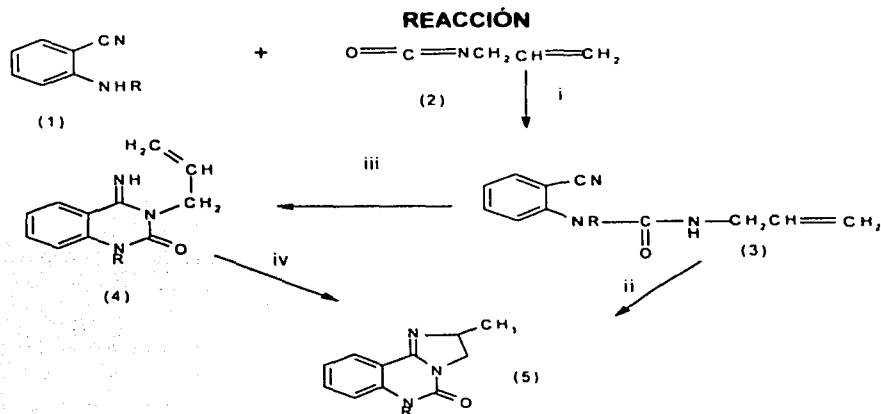
Como se ha mencionado el biocatalizador *Saccharomyces cerevisiae* es empleado de manera considerable en reacciones de reducción. Sin embargo, en la presente investigación se utilizó para una reacción de ciclización que es poco común para este biocatalizador y que respalda su versatilidad en otro tipo de reacciones.

A continuación se describen algunos de los reportes descritos en la literatura donde se realizan ciclizaciones y que sirvieron de referencia para realizar este trabajo:

2.4.3.1 Síntesis de Imidazoles fusionados con Quinazolininas mediante una doble ciclización con levaduras Baker.¹⁸

El precursor N-alilcarbamoylantranilonitrilo (3) es preparado mediante la reacción de antrantrilos (1) con isocianato de alilo (2).

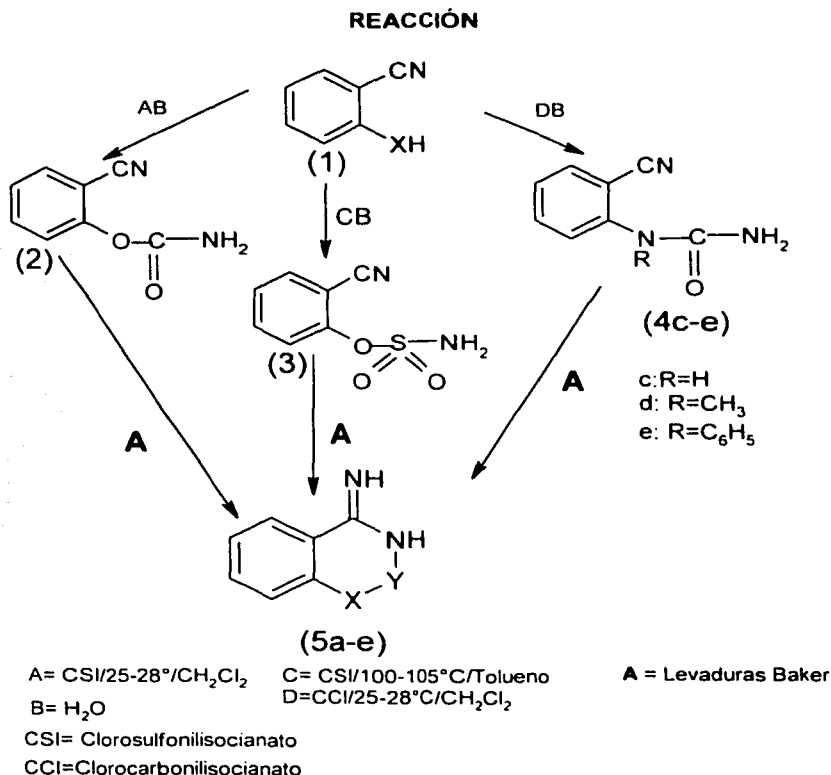
La formación de la imidazoquinazolina (5) se realiza mediante una doble ciclización vía el intermediario (4) y posterior utilización de la levadura. Este mecanismo se observó al realizar un control en el tiempo de incubación con la levadura, donde la obtención de (5) y (4) al primer día de incubación fue de 20% y 75% respectivamente, después de 60 horas de incubación la formación de ambos fue en cantidades equivalentes y en el quinto día la formación de (5) fue del 70% y de (4) del 20%.



2.4.3.2 Eficiente ciclización enzimática de 2-(carbamoiloxi) y 2-(sulfamoiloxi)-benzonitrilos por levaduras Baker estimuladas mediante ultrasonido.¹⁹

En el trabajo realizado por A. Kamal se demostró el uso de *Saccharomyces cerevisiae* en las ciclizaciones enzimáticas de 2-carbamoiloxi, 2-sulfamoiloxi y 2-ureidibenzonitrilos.

La aportación de esta ciclización enzimática muestra la activación de las células mediante ultrasonido, que según los autores facilita las reacciones de este tipo de ciclización en donde el 0-sulfamoilbenzonitrilo (3) y las 2-benzonitril ureas (4c-e) se obtienen con buenos rendimientos.



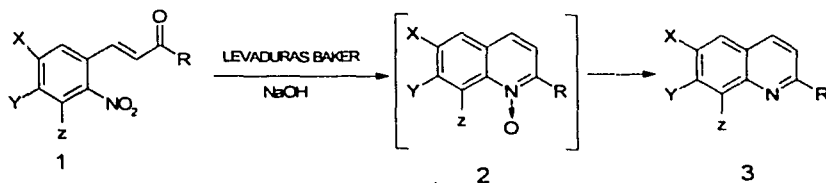
2.4.3.3 Reducción y ciclización de o-nitrocinnaldehydos en NaOH y levaduras Baker.²⁰

La reducción de nitroalquenos con levaduras Baker en el doble enlace carbono-carbono, aporta los correspondientes nitroalcanos. Sin embargo, también el grupo nitro, en el caso de (Z)-3- nitropropenonitrilos, es reducido y ciclizado para dar los isoxazoles correspondientes.²¹

Se ha encontrado que la reducción de nitroarenos puede realizarse en solución de NaOH para dar las correspondientes anilinas con excelentes rendimientos y con una alta selectividad cuando se encuentran presentes grupos carbonilo y/o otros sustituyentes lábiles.

También el uso del sistema de levaduras Baker - Hidróxido de sodio se ha aplicado en la reducción de una serie de o-nitrocinnaldehydos. En este trabajo se describe que el sistema es un procedimiento selectivo en la preparación de quinolinas y otros N-óxidos. El compuesto 2- Nitrocinnaldehydo con levaduras Baker y NaOH producen la quinolina con un 91% de rendimiento. La reducción al o-amonocinnaldehydo y la formación del alcohol no es observada.

La reducción de 1 a 3 procede mediante la formación de un intermediario N-oxido (2).



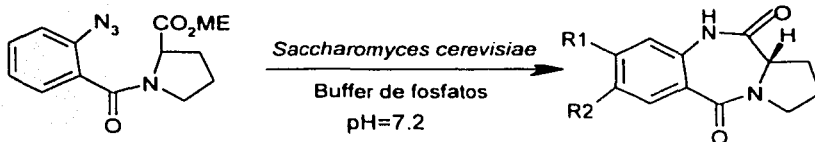
En resumen se encontró que las levaduras Baker en presencia de NaOH realizaron una ciclización reductiva en o-nitrocinnaldehydos para dar N-óxidos de quinolinas.

2.4.3.4 Novedosa reducción biocatalítica de aril azidas. Síntesis quimioenzimática de los antibióticos pirrol [2,1-c] [1,4] benzodiazepina.²²

Otra interesante biociclización realizada por las levaduras Baker se describe en el trabajo de A. Kamal.(1997)

Se trata de la formación de un anillo de diez miembros a partir de uno de siete resultante de la unión enzimática de las levaduras en un proceso de reducción azido-reductivo:

REACCIÓN



2.5 Talidomida ^{23,24,25,26,27}

2.5.1 Generalidades

La talidomida, químicamente denominada 2-(2,6-dioxo-3-piperidil)isoindolin-1,3-diona, es un fármaco muy conocido por sus efectos teratogénicos.

Como se observa en su estructura (ver figura 7), esta posee un grupo succinimido y un H ácido en el único centro estereogénico haciendo que el fármaco se racemice .

En 1991 se reportó que la talidomida es un inhibidor selectivo del tumor de necrosis factor- α y en recientes investigaciones se ha comprobado que este fármaco con la estructura de la figura 7 es un buen antiinflamatorio, utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades y particularmente de cáncer en la piel, lepra y lesiones del esófago de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Se tienen teorías de cómo podría actuar la talidomida en las diferentes enfermedades en donde se utiliza, mas no se han comprobado.

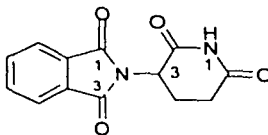


Fig. 7 Estructura de talidomida

2.5.2 Usos y Propiedades

- Tratamiento de eritema nodosum leprosum (ENL), es una manifestación de la lepra y el fármaco desvanece los nódulos formados en la piel.
- Poderoso antiinflamatorio en este caso inhibe la producción de α -TNF (factor alfa del tumor de necrosis citosina) que es un potente estimulador de inflamación.
- Agente anticancerígeno que es utilizado en el tratamiento de úlceras en la garganta en pacientes con VIH.
- Se sintetiza la mezcla racémica, al separar los 2 isómeros y probar su actividad biológica se comprobó que solo uno el (-)- S es teratogénico.
- Los enantiómeros de la talidomida son compuestos inestables ya que en su centro quiral poseen un hidrógeno ácido que fácilmente se intercambia, haciendo difícil la resolución de la mezcla.

3.0 DISCUSIÓN DE LOS ANTECEDENTES

En los últimos años la preocupación por no contaminar más el medio ambiente, ha generado el descubrimiento y uso de nuevas herramientas en la investigación para obtener alimentos, fármacos y sustancias químicas en general. Esto en beneficio de la sociedad sin dañar demasiado el medio ambiente. Es por esto que en la obtención de fármacos surge una ruta alternativa de síntesis que comprende la llamada biotransformación o biocatálisis y donde utilizamos como "reactivos" enzimas provenientes de nuestro entorno ya sea de células vegetales, animales o microorganismos.

La Food and Drugs Administration (FDA) aprobó el uso de la talidomida debido a la gran importancia que representa en el tratamiento de muchos padecimientos diferentes para los que fue creada en los años 60's. De ahí la importancia generada en la obtención y donde el aprovechamiento de las técnicas de biocatálisis pueden ser aplicadas.

Dentro de estos esquemas biosintéticos aplicados el fármaco se obtuvo mediante una biotransformación que es una ruta donde se utilizan condiciones suaves de reacción utilizando para ello las células de *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalizador. Siendo este biocatalizador de un costo muy bajo, fácil de manipular y que no necesita medios sofisticados para crecer, representa una alternativa en la síntesis de talidomida.

Por otra parte se obtiene una reacción muy limpia sin subproductos donde la materia prima que no fue transformada se recupera. Aunque el tiempo de investigación no fue suficiente para mejorar rendimientos, el costo de la reacción al no contaminar el medio ambiente debido a la biocompatibilidad del catalizador es muy bueno.

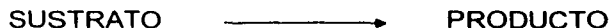
4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivos Generales.

La investigación realizada en el presente trabajo se enfoca a la obtención de sistemas biológicos vegetales y a la utilización de estos para realizar biotransformaciones en la obtención de fármacos.

Así como la síntesis de sustratos sintéticos por medio de síntesis orgánica tradicional

BIOTRANSFORMACIÓN



4.2 Objetivos Específicos.

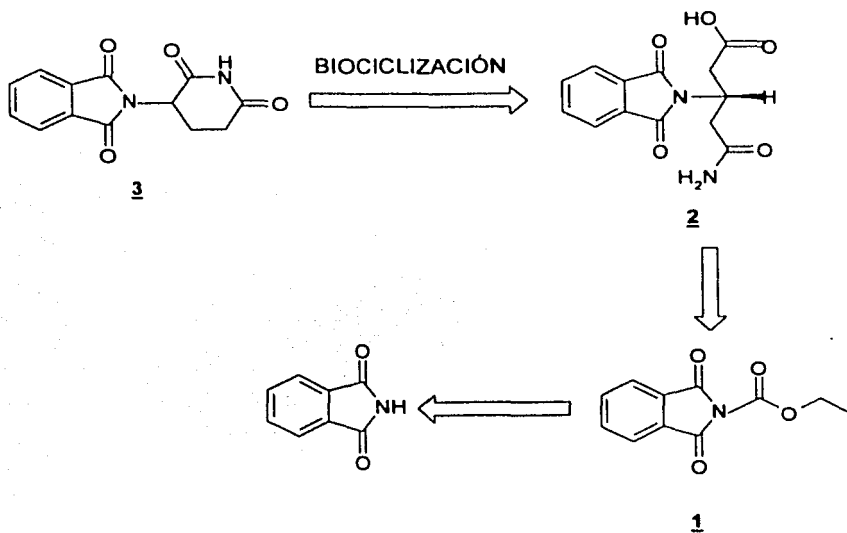
- Sintetizar el sustrato (N-ftaloil-L-glutamina) a partir de N-etoxicarboxibonilftalimida y caracterizar ambos intermediarios.
- Realizar la biotransformación del sustrato N-ftaloil-L-glutamina para obtener talidomida.
- Obtener las variables óptimas de la biotransformación.
- Determinar la importancia e influencia de estas variables en el rendimiento y pureza del producto.



5.0 RESULTADOS

Análisis retrosintético descrito²⁸

A continuación se muestra el esquema retrosintético y el paso de la biotransformación para obtener la Talidomida **3**.

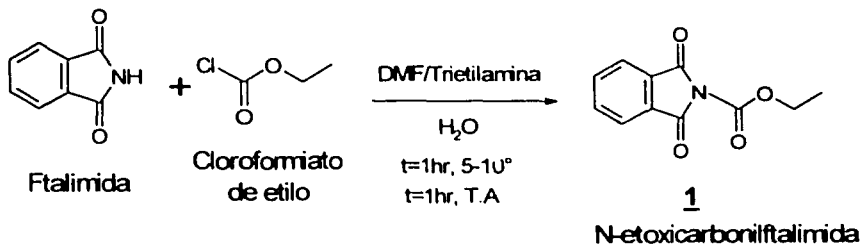
5.1 Síntesis de N-Carboetoxifalimida **1**

(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-carboxilato de etilo).²⁹

Se sabe que las imidas que poseen un hidrógeno en el átomo de nitrógeno pueden reaccionar con una base para producir el correspondiente anión, de esta manera la ftalimida fácilmente asequible, en presencia de trietil amina puede realizar la sustitución del cloro en el cloroformiato de etilo para dar el producto **1**. Esta reacción es la utilizada en la síntesis de Gabriel³⁰ para la obtención de aminas.

La carboetoxifalimida se sintetizó partiendo de ftalimida y cloroforniato de etilo en presencia de trietilamina y dimetilformamida como disolvente. El producto crudo obtenido, directamente se cristaliza de etanol o isopropanol.

Reacción de Síntesis de **1**



5.1.1 Caracterización de N-Etoxicarbonil-ftalimida **1**

El producto **1** después de purificado y cuantificado, fue caracterizado a través de las diferentes técnicas espectroscópicas como son infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

La caracterización se realizó mediante la comparación de los valores obtenidos en los espectros de la literatura con los obtenidos de manera experimental. Siendo los resultados congruentes con la estructura de la muestra.

Con la finalidad de obtener una cantidad razonable del compuesto **1**, la reacción fue repetida en varias ocasiones. A continuación se describen los resultados experimentales de esas reacciones y se comparan contra los datos descritos en la literatura.

COMPUESTO	% RENDIMIENTO REPORTADO ^{29a}	% RENDIMIENTO EXPERIMENTAL	PUNTO DE FUSIÓN (°C) REPORTADO ^{29b}	PUNTO DE FUSIÓN (°C) EXPERIMENTAL
1	86	46	80	76-79
		62		78-81
		78		78-80
		80		80-81

Tabla 2


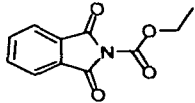


IR(cm ⁻¹) KBr/Pastilla	Grupo Funcional	Estructura de <u>1</u>
C=O en 1810 y en 1768		
C=O en 1719 C-O-C en 1178		
3095, 1603, 748		
C-C en 1392 C-H en 2969	-CH ₃	
C-H en 2998 C-C en 1469	-CH ₂	

Tabla 3. Espectroscopia de IR del compuesto 1 ^{31a}

Espectroscopia de RMN¹H de 1

El espectro de RMN¹H presenta las señales características para el grupo etiloxi esto es, en 1.4 ppm el triplete que por acoplamiento con el metileno da el metilo, quien a su vez presenta el cuarteto en 4.5 ppm. Por otra parte, las señales propias de los protones aromáticos aparecen en 7.8 y 8.0 ppm para los protones meta y orto respectivamente.

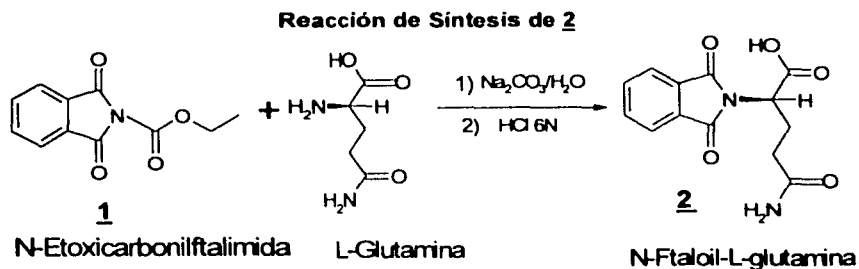
Espectrometría de Masas de 1.

La masa molecular del compuesto queda establecida por la señal de relación m/z: M⁺ = 219, que concuerda con la masa molecular de 1, el pico base de este patrón de fragmentación aparece a una relación m/z = 174.

5.2 Síntesis de N-ftaloil-L-glutamina 2

Acido 4-carbamoiil-2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)butirico. ^{28a}

La reacción de síntesis para la obtención de 2 se realiza utilizando la N-Etoxicarbonil-ftalimida 1 anteriormente preparado y L-glutamina en solución de carbonato de sodio. Cabe mencionar que la utilización de la glutamina quiral en el carbono 2 no es necesaria, ya que el producto de la biociclización posterior será racémico, esto debido a la naturaleza ácida del protón de esa posición cuando se ha formado la talidomida.






5.2.1 Caracterización de N-Ftaloil-L-Glutamina 2

La caracterización de 2 se llevó a cabo de la misma forma que 1 mediante la comparación de sus propiedades con las descritas en la literatura.

A continuación se muestran los valores obtenidos en la cuantificación y caracterización del compuesto 2, después de realizar varias experiencias. En los que se obtuvieron los mejores resultados en % de rendimiento y pureza.

COMPUESTO	%) RENDIMIENTO REPORTADO ^{28b}	%) RENDIMIENTO EXPERIMENTAL	PUNTO DE FUSIÓN (°C) REPORTADO ^{28c}	PUNTO DE FUSIÓN (°C) EXPERIMENTAL
<u>2</u>	67	46	169-171	172-174
		58		170-173
		73		169-172

Tabla 4

IR(cm^{-1}) KBr/Pastilla	Grupo Funcional	Estructura de <u>2</u>
O-H en 3000-2500 C=O en 1771	-COOH	
C-H en 2998	-CH ₂	
C=O en 1651 N-H en 3332 y 3276		
3030, 1601, 958, 717, 746		
C=O en 1771 C-N en 1710		
C-C en 2940 C-H en 1394	-CH	

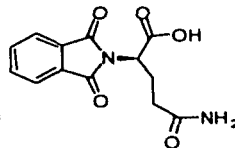


Tabla 5 Espectroscopia de IR del compuesto 2 ^{31b}

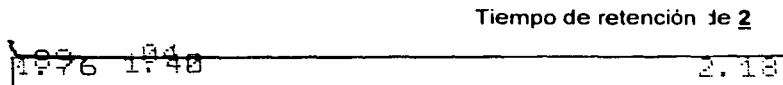
(δ , ppm)	Señales
2.5	m, 4H, -CH ₂
4.8	m, H, -CH
6.6	s, H, -NH ₂
7.2	s, H, -NH ₂
7.9	m, 4H, Aromático
13.0	s, 1H, -OH

Tabla 6 Espectroscopia de RMN¹H del compuesto 2

Espectrometría de Masas 2

Se observó que la relación m/z del ion molecular M^+ = 276 corresponde a la masa molecular del compuesto, su pico base de relación m/z = 173 corresponde a la masa molecular de la N-vinil ftalimida resultante de la pérdida-reacomodo de la parte glutamínica.

La caracterización inicial de este compuesto se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Obteniendo el siguiente cromatograma representativo.



5.3 Obtención de talidomida **3**

5.3.1 Ensayos para obtener talidomida

Como se mencionó anteriormente en la obtención de la talidomida **3** se realizó una biociclización, en la que se utilizó como "reactivo" biológico a los hongos denominados *Saccharomyces cerevisiae*. El sustrato utilizado fue la N-ftaloil-L-glutamina **2**. Sintetizado según lo descrito anteriormente.

Se realizaron alrededor de 60 reacciones de biotransformación, esto con la finalidad de lograr las óptimas condiciones en las que se obtuviera el mejor rendimiento del producto deseado, la talidomida **3**.

A continuación se muestra una tabla con las condiciones de reacción más representativas que se realizaron en este trabajo.

No. de REACCION	CANTIDAD DE levaduras (g)	CANTIDAD DE SUSTRATO (mg)	TIPO	DISOLVENTE	TIEMPO DE REACCION (dias)	BIOTRANSFORMACION
1	1.0 Baker	30	libres	H ₂ O	6	X
2	1.0 Baker	50	libres	H ₂ O	6	X
3	5.0 Baker	30	libres	Buffer pH=7.4	4	X
4	10 Baker	100	inmovilizadas	Buffer pH=7.4	6	X
5	11.0 levadura casera	100	libres	Buffer pH=7.4	5	X
6	10 levadura casera	100	libres	H ₂ O	5	X
7	10 Baker	50	libres	Buffer pH=7.4	4	X
8	10 Baker	100	libres	Buffer pH=5.4	4	X
9	10 Baker	100	libres	Buffer pH=7.4	6	X
10	10 Baker	200	libres	Buffer pH=7.4	2	X
11	10 Baker	150	libres	Buffer pH=7.4	2	X
12	10 Baker	100	libres	Buffer pH=5.4	2	X
13	10 Baker	100	libres	Buffer pH=5.4	6	X
14	1 Baker	100	libres	Buffer pH=7.4	10	X
15	5 Baker	100	libres	Buffer pH=7.4	6	X
16	1 Baker	100	libres	Buffer pH=5.4	10	X
17	5 Baker	300	libres	Buffer pH=7.4	8	X
18	5 Baker	300	inmovilizadas	Buffer pH=7.4	8	X
19	10 Baker	250	libres	Buffer pH=7.4	4	X
20	5 Baker	50	inmovilizadas	H ₂ O	4	X
21	10 Baker	100	libres	Buffer pH=5.6	10	X
22	10 Baker	100	libres	Buffer pH=7.4	10	X
23	10 Baker	100	libres	Buffer pH=7.4	2	X
24	10 Baker	100	libres	Buffer pH=7.4	4	X
25	10 Baker	100	libres	Buffer pH=7.4	10	X
26	10 Baker	100	libres	Buffer pH=5.6	2	X
27	10 Baker	100	libres	Buffer pH=5.6	4	X

Tabla 7

Todas las reacciones anteriores se incubaron mediante agitación orbital a 120 r.p.m. y temperatura ambiente.

La reacción marcada con la entrada 5 de la tabla 7, se sometió a un tratamiento de activación de las células mediante ultrasonido^{19a} antes de colocarlas en el medio de reacción.

5.3.2 Condiciones de reacción

Con la finalidad de obtener los mejores resultados como ya se ha mencionado, se combinaron una serie de variables que son fundamentales para las bioconversiones, en este sentido de entre las mas importantes encontramos:

- ❖ pH
- ❖ Tiempo de reacción
- ❖ Concentración de *Saccharomyces cerevisiae*
- ❖ Concentración de sustrato

Con la cuantificación de varias biotransformaciones en las que se cambiaron los valores de las diferentes variables, se logró el desarrollo del método general mencionado para realizar una biotransformación.

5.3.2.1 pH

Manteniendo constantes: tiempo de incubación, concentración de levaduras, concentración de sustrato y variando el pH, se tienen los siguientes resultados:

No. de REACCIÓN	pH	% RENDIMIENTO
21	5.6	30.99
22	7.4	17.10

Tabla 8

En las reacciones anteriores se colocaron 10g de levaduras, 100mg de sustrato durante 10 días de reacción y se varió el pH utilizando una solución reguladora de fosfatos 0.1M con un pH = 7.4^{32a} y una solución reguladora de citratos 0.1M^{32b} con un pH = 5.6.

5.3.2.2. Tiempo de incubación

Manteniendo constantes las variables de pH, concentración de células y concentración de sustrato. Se varió el tiempo de reacción entre 2, 4, 6, 8 y 10 días. Obteniendo los siguientes mejores resultados:

No. de REACCIÓN	TIEMPO DE REACCIÓN (DÍAS)	% RENDIMIENTO
23	2	1.0689
24	4	1.0689
25	10	14.9652
26	2	13.8957
27	4	3.2068
21	10	30.99

Tabla 9

Las condiciones de reacción para las reacciones marcadas con los números 23, 24 y 25 son: Levaduras 10g, sustrato 2 (100 mg), pH = 7.4 . Para 26, 27 y 21: Levaduras 10g, sustrato 2 (100mg), pH = 5.6.

Con los resultados de las reacciones anteriores se obtiene la siguiente gráfica:

GRÁFICA COMPARATIVA DEL % DE RENDIMIENTO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE TALIDOMIDA

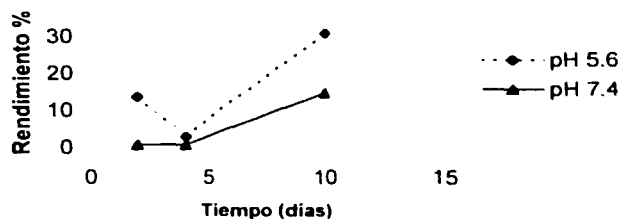


Fig. 8

Se puede observar que los mejores resultados obtenidos en la cuantificación se llevan a cabo cuando el tiempo de reacción es de 10 días a un pH de 5.6. Esto no significa que sean las mejores variables dado que no se conoce el mecanismo de reacción que estos microorganismos realizan al momento de la biociclización.

5.3.2.2 Concentración de biocatalizador y sustrato

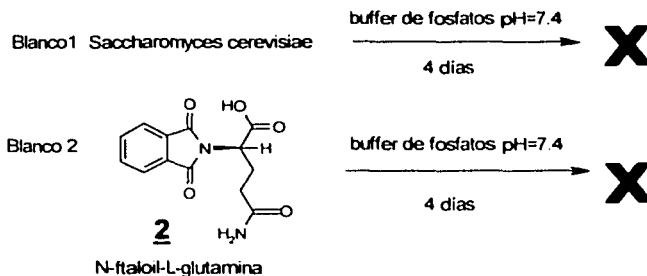
Con respecto a la concentración del biocatalizador para la reacción, la cantidad de levaduras escogida es en función de las diferentes pruebas en las que se varía la cantidad de estas y se comparan los resultados mediante análisis de HPLC. En los cromatogramas correspondientes de estas pruebas se observan los picos más definidos. Siguiendo la misma metodología se definió la cantidad de sustrato. Al final la relación observada de biocatalizador/sustrato es de 100 a 1.

5.3.2.3 Elaboración de testigos o blancos.

Se realizaron dos experimentos control:

- ❖ Blanco 1: La reacción de biotransformación sin sustrato **2**, bajo las mismas condiciones de agitación, tiempo de reacción, pH y concentración de levaduras.
- ❖ Blanco 2: La reacción de biotransformación con sustrato **2**, pero sin levaduras y bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

En ninguno de los casos se encontró alguna señal del bioproducto.



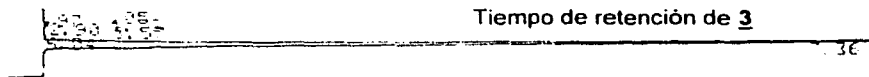
Una vez realizadas las reacciones de biotransformación, siempre se purificó el producto aislandolo primeramente mediante centrifugación y posteriormente liofilizando la solución acuosa. Según lo mencionado anteriormente el residuo fue analizado por HPLC y caracterizado mediante las diferentes técnicas espectroscópicas

5.3.2.5 Identificación de talidomida mediante HPLC

La técnica en general consiste en la preparación de los estándares tanto de la materia prima como del producto puro. Para obtener los tiempos de retención en las condiciones de análisis. De esta manera se corrió una muestra del sustrato 2 de concentración conocida y una muestra de Talidomida 3 pura comprada comercialmente para tenerla como referencia.

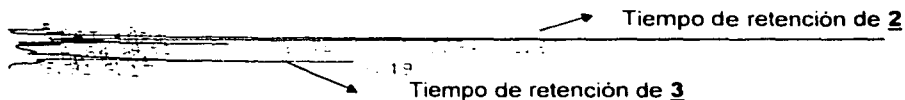
Condiciones de operación del equipo:**Columna:** C-18 de Fase Reversa.**Eluyente:** 70% H₂O / 20% MeCN**Flujo** = 0.9 ml/min**Detección:** Lámpara UV = 220nm.

Cromatograma del estándar de 3 :



Utilizando las mismas condiciones en las que se corrieron las muestras de referencia de 2 y 3 para identificar sus tiempos de retención, se corrieron las muestras obtenidas en las diferentes reacciones de biotransformación. Solo cambió la proporción del eluyente a (80:20).

Obteniendose el siguiente cromatograma representativo .



Se observa que los tiempos de retención de los productos **2** y **3** de referencia y los de las muestras obtenidas experimentalmente son muy parecidos, no así el tamaño de los picos. Con referencia a las diferencias en los tiempos de retención que se muestran, estos son debidos a que el equipo utilizado no esta automatizado, y la sensibilización de este no es tan grande. El tamaño de los picos se debe a que la concentración del estandar y las muestras es diferente.

La comprobación de la presencia de talidomida en el cromatograma se realizó mediante una pequeña contaminación o envenenamiento de la muestra analizada con producto puro, notando el incremento de la señal asignada en la muestra de reacción.

5.3.2.6 Cuantificación y caracterización de **3**

De entre las reacciones realizadas, se eligió una para ser representativa de las diferentes condiciones de ensayo de la biotransformación; se determinó, identificó y cuantificó.

COMPUESTO	% RENDIMIENTO REPORTADO ^{28d}	% RENDIMIENTO EXPERIMENTAL	P DE FUSIÓN °C REPORTADO ^{28e}	P DE FUSIÓN °C EXPERIMENTAL
3	91	8.6727 10.3854	274-276	271-273 272-273

Tabla 10


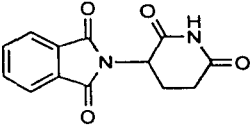


IR(cm ⁻¹)KBr/ Pastilla	Grupo Funcional	Estructura de 3
C=O en 1709, C-N en 1700		
C-H en 3096, 730-724		
C-H en 2896, 1388	CH	
C-H en 2912 y 1470	CH ₂	
C=O en 1709, C-N en 1700		

Tabla 11 Espectroscopia de IR del compuesto **3**^{31c}

(δ , ppm)	Señales
2.9	m, 2H -CH ₂
2.5-2.7	m, 1H -CH ₂
2.1	m, 1H -CH ₂
5.2	d,d, 1H -CH
7.9	m, 4H, Aromático
11.1	s, 1H, imida

Tabla 12 Espectroscopia de RMN¹ H del compuesto 3

La espectrometría de masas presentó el ion molecular: $M^+ = 258$ y el pico base $m/z = 173$

5.4 Células inmovilizadas

Generalmente la utilización de células en reacciones de biotransformación, suelen utilizarse en dos diferentes ambientes, esto es suspendidas o inmovilizadas. Las reacciones descritas anteriormente fueron realizadas con células suspendidas. Sin embargo el estrés producido en las células cuando se encuentran en un sistema de inmovilización, en ocasiones modifica los resultados que se obtienen, de donde se realizaron varias pruebas-ensayo tratando de obtener mejores resultados.

En la técnica de inmovilización de células se hace una inclusión de la misma a un soporte sólido oligomérico. Los biocatalizadores se pueden confinar a áreas restringidas en las cuales permanecen catalíticamente activas.³³

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* fueron inmovilizadas con alginato de calcio y suspendidas en solución reguladora de fosfatos 0.1M, esto es en las mismas condiciones de la reacción general antes mencionada. En estas condiciones la purificación consiste solo en filtrar liofilizar y extraer el bioproducto. Obteniendo por este método el producto **3** que se caracterizó por las diferentes técnicas espectroscópicas que se muestran en el anexo de esta tesis y en las condiciones mostradas en la tabla 6.

6.0 DISCUSIÓN

La síntesis que se describe, en la que se combina el uso de reactivos químicos y biocatálisis, es uno de tantos ejemplos en los que se refleja la utilidad que se puede dar a las células de organismos vivientes. Si bien es cierto que, aún esta tecnología en muchos casos no compite con la síntesis establecidas a nivel industrial, si se pone de manifiesto tanto la facilidad y limpieza con la que se realiza, como la carencia de investigación en esta área. Es fácil darse cuenta que, el uso de variables correctas puede cambiar y mejorar los resultados que se obtienen y en este contexto es que se realizan una gran cantidad de pruebas sin poder concluir que las descritas sean las óptimas. De hecho una de las variables que no se investigó, radica en el uso de disolventes orgánicos, con los que se ha comprobado que en algunos casos los rendimientos aumentan.

Uno de los problemas encontrados en este trabajo que merecer ser expuestos en forma particular son las emulsiones formadas al momento de extraer el material orgánico de la solución acuosa. Además de que el filtrado previo se debe realizar a través de una capa de celita, ya que de otra forma los poros se tapan.

Trabajar con células inmovilizadas facilita la tarea de aislamiento del producto. Según lo observado, una vez que se realiza la biotransformación ya sea en el interior de la célula o mediante las enzimas de la pared celular exterior, el producto se encuentra en la solución. El uso de esta técnica no reflejó una mejoría en los rendimientos, pero si una mejor purificación del producto.

En general se tiene un campo amplio de investigación, ya que está descrito que con el mismo biocatalizador se pueden tener diferentes reacciones, aún con un mismo sustrato y tan solo cambiando las variables de reacción.

7.0 CONCLUSIONES

- ✓ Es posible obtener talidomida mediante una reacción de biotransformación.
- ✓ Se demostró que el fármaco objetivo de esta tesis se puede sintetizar mediante síntesis orgánica tradicional y catálisis enzimática.
- ✓ Se encontraron las condiciones específicas para que los grupos funcionales carboxilo y amida reaccionen para dar la biociclización.
- ✓ Se encontró que la N-ftaloil-L-glutamina es reconocida como sustrato por el sistema presente en *Saccharomyces cerevisiae*.
- ✓ La reacción de biociclización que se presenta, amplía las aplicaciones catalíticas de estas levaduras.
- ✓ La biotransformación obtenida es un ejemplo de nuevas rutas sintéticas "alternativas" para preparar fármacos o productos sintéticos en general.
- ✓ El sustrato que no es biociclizado, no sufre ningún cambio y se puede reutilizar.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

8.0 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

8.1 MATERIALES

Los puntos de fusión que se presentan fueron obtenidos en un aparato Fisher Jones, están dados en grados centígrados (°C) y no están corregidos.

Los estudios de Espectroscopia se realizaron en el Instituto de Química de la UNAM utilizando los siguientes instrumentos:

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Utilizado para identificar la N-ftaloil-L-glutamina y el producto de la reacción de biotransformación). Marca Varian 5000, con detector de Ultravioleta, y columna C₁₈ de fase reversa.

HPLC

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Utilizado para cuantificar el producto de biotransformación). Marca Waters, Modelo Delta con detector de Ultravioleta de arreglo de diodos. Waters Modelo 486.
Programa Millenium.
Columna Phenomex, tipo Luna 5 micrones
Fase reversa, C₁₈ de 150x4.60mm.

IR

- En la Espectroscopia de Infrarrojo se utilizaron un Espectrofotómetro NICOLET FX-SX o un NICOLET 55X, con celdas de cloruro de sodio o utilizando la técnica de pastilla con KBr.

- RMN
 - Los espectros de RMN¹H fueron determinados en los equipos VARIAN GEMINI 200 (200 MHz), UNITY 300 (300 MHz), utilizando cloroformo deuterado (CDCL₃) como disolvente y tetrametilsilano como señal de referencia. Los desplazamientos (δ), se dan en partes por millón y las constantes de acoplamiento J, en Hz.

- EM
 - En la Espectrometría de masas se utilizaron los espectrómetros JEOL JMS-SX-102A (FAB) y JEOL JMS-AX-HA (EI)

- CCF
 - El curso de las reacciones se siguió mediante Cromatografía en capa Fina en placas de Silica Gel 60 Merck F-254, con indicador de fluorescencia, utilizando como reveladores una lámpara de luz ultravioleta y/o vapores de yodo.

- Centrifuga Beckman Model J2-21

8.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los compuestos **1** y **2**, se obtuvieron empleando métodos descritos en la literatura, mediante los siguientes procedimientos.

8.2.1 Obtención de N-etoxicarbonilftalimida **1**

En un matraz bola de 1000 ml equipado con una trampa de drierita y embudo de adición, se colocan 14.5 g (98.63mmol) de ftalimida y se disuelven en 50 ml de dimetilformamida, se agregan 14 ml de trietilamina y se enfria la mezcla a 5-10° C manteniendo agitación constante. Se adicionan 10 ml de cloroformato de etilo mediante agitación vigorosa y se deja durante 45 minutos en estas condiciones.

Se agita por 1 hora más a temperatura ambiente manteniendo las condiciones anhidras.

A la solución amarillo-café se le adiciona 300ml de agua destilada con lo que se forma un precipitado cristalino. Se filtran al vacío los cristales formados, haciendo varios lavados con agua destilada y se colocan en el desecador con vacío sobre ácido sulfúrico, se decoloran con carbón activado y se recristalizan de etanol al 96 % o con isopropanol. Rendimiento 96%. El punto de fusión de producto blanco es de 80°C.

8.2.2 Síntesis de N-Ftaloil-L-Glutamina **2**

En un vaso de precipitados de 250 ml, se colocan (4.3 , 30 mmol) de L- glutamina y (3.34g , 31.5mmol) de Na₂CO₃ en 75ml de agua e inmediatamente se añaden (6.58 g ,30 mmol) de N-carboetoxiftalimida **1**. Se agita fuertemente durante 1 hora y se filtra para remover la materia prima que no reaccionó.

El pH del filtrado se ajusta entre 3-4 con HCl 6N entonces se siembra una semilla y cristaliza el producto ajustando el pH=1-2, agitando por 1 hora. Se filtra la solución y el sólido se lava con abundante agua y se seca al vacío a 60° C. < 1mmHg Rendimiento 67 %, cristales blancos con punto de fusión 169-171°C.

8.2.3 Biotransformación

La reacción marcada con el Número 9 en la tabla 7 es escogida como representativa de la biotransformación. En un matraz erlenmeyer de 500 ml se colocaron 10 g de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* marca Baker (tipo Brewers), y 50 ml de solución reguladora de fosfatos 0.1M pH=7.4

Esta mezcla se colocó en un agitador orbital a 25°C y 120 r.p.m. en la oscuridad durante 30 minutos (activación). Se agregaron al cultivo(100mg 0.362 mmoles) del sustrato **2** disueltos en 2 ml de dioxano

La biotransformación se dejó durante 10 días en el agitador orbital bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación. Pasado el tiempo de reacción (10 días), se centrifugó a 10 000 r.p.m. durante 25 minutos, las fases sólida y líquida se secaron y liofilizaron respectivamente y se extrajeron con dioxano, el extracto ya concentrado se inyectó al cromatografo de HPLC para identificación y cuantificación del producto 3.

8.2.2.1 TESTIGOS

Blanco1: En un matraz de 500 ml se colocaron 10 g de levaduras marca Baker (tipo Brewers) y 50 ml de solución reguladora de fosfatos 0.1M pH =7.4.

Blanco2: En un matraz de 500 ml se colocaron 50ml de buffer de fosfatos 0.1M pH = 7.4 y 0.362 mmoles de sustrato 2.

En ambos casos se agitó durante 4 días en el agitador orbital a 25°C, 120 r.p.m. y se dejó los 10 días de incubación. Transcurrido el tiempo de reacción se centrifugó, se liofilizó, se extrajo con dioxano y se analizó por HPLC.

8.3 Espectroscopia

Todos los espectros de infrarrojo se corrieron en pastilla de KBr y las bandas de absorción están reportadas en cm^{-1} . La espectroscopia de masas se realizó por impacto electrónico de baja resolución. La resonancia magnética nuclear de ^1H , se corrió a 200MHz en CDCl_3 y para 3 a 300MHz en DMSO-d_6 .

Abreviaturas: s = singulete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto m = multiplete. Los puntos de fusión están sin corregir.

Compuesto 1 (N-Carboetoxifalimida): IR (cm^{-1}) pastilla: 1810, 1798, 1603, 768, 1392, 2969, 718, 2998, 1719. RMN^1H (ppm): 1.4 (t, 3H), 4.5 (q, 4H), 7.8 (m, 2H aromático meta), 8.0 (m, 2H aromático orto). **Espectrometría de masas** (m/z): M^+ = 219 y pico base m/z= 174, así como los siguientes fragmentos, 192, 160, 146, 130, 118, 104, 76.

Compuesto 2 (N-Ftaloil-L- Glutamina) : IR (cm^{-1}) pastilla: 3000,2500, 1771, 746, 29998, 1651, 3332, 3276, 1601, 958, 717, 746, 1771, 1710, 2940, 1394. RMN^1H (ppm): 2.5 (m, 4H), 4.8 (m, 1H), 6.6(s, 1H), 7.2 (s, 1H), 7.9 (m, 4H), 13.0 (s, 1H).

Espectrometría de masas (m/z): M^+ = 276 y pico base m/z = 173, así como los siguientes fragmentos, 259, 258, 230, 214, 215, 186, 130, 172.

Compuesto **3** (talidomida): **IR** (cm^{-1}) pastilla: 1709, 1700, 3096, 730, 724, 2896, 1388, 2912, 1709, 1700. **RMN¹H**(ppm): 2.5 (m, 4H), 5.2 (q, 1H), 7.9 (m, 4H), 11.1 (s, 1H).

Espectrometría de masas (m/z): M^+ = 258 y pico base m/z = 173, así como los siguientes fragmentos, 230, 213, 202, 169, 111, 104, 76.

10.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Madigan M. **Brock Biología de los Microorganismos**. Prentice Hall . Madrid ,1999 pág. 456-469.
 - 1a. Ibid, pág. 1-20
 - 1b. ibid, pág. 18
 - 1c. Ibid, pág. 456-463
2. Silverman R. **The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions** Academic Press. Estados Unidos. Pág. 1-38.
 - 2a. Ibid , pág. 2.
3. Stirling. D. **Potential Use of thalidomide in HIV/AIDS**. Annual Reports in Medicinal Chemistry-30. Academic Press. Estados Unidos, 1995, 32, 319-327.
4. Thalidomide. **The Journal of the American Medical Association**. JAMA HIV/AIDS. Information Center-Thalidomide. <http://www.ama-assn.org/special/hiv/newsline/briefing/thalidomide.htm>
5. Stolberg, Sg., **Drug That Caused Birth Defects in 1960s Is Close To Approval by the FDA**. The New York Times, Estados Unidos, 1997,pag A1, A12.
6. Faber, K., **Pure Appl. Chem.**, 1997,69, 1614
7. Hurtado, V. H. **Cultivo de Tejidos Vegetales** . México 1994 ,pág 44-95.
8. C.H. Wong. **Enzymes in Synthetic Organic Chemistry**. Presos. Estados Unidos, 1994 (1), pág.2
9. Faber, K., **Biotransformations in Organic Chemistry**. Alemania 2000, pag 1-9a. Ibid, pág. 378
 - 9b. Ibid, pág. 19
10. Rozzell David J. **Biocatalysis at commercial scale: Myths and realities**. Biotech Forum .Chimica Oggi, USA, Mayo-Junio, 2000,42.

11. Chassin Claude. **Biocatalysis for fine chemicals-Past achievements, current successes and future challenges**. Biotech Forum. Chimica 0661, Switzeland Mayo-Junio 2000, 48.
12. Voet. D. **Bioquímica**. Estados Unidos, 2000, pág 343
13. Yeast Virtual Library. What are yeasts?. [http://www.virtual library:yeast](http://www.virtuallibrary:yeast).
14. Wyeast Lab, Inc Laboratories, Inc. **Yeast History**. USA. 1997. <http://www.wyeastlab.com>
15. Servi, S., **Synthesis**, 1990, 1
16. Csuk, R. Y y Glazner, B.I., **Chem. Rev.**, 1991, 91, 49.
- 16a. *Ibid*, pág. 49
17. Medina J., Kyler, S., **J. Am. Chem. Soc.** 1998, 110, 4818-4821
Dahl, A.C., Madsen, T.Q, **Asymmetry**, 1998, 9, 4395-4417.
Long, A. ward, O.P, **Biotechnology and Bioengineering**, 1989, 34, 933-941-
Crocq V. Masson C. Winter J. Richard C. Lemaitre Q., **Organic Process Research and Development**, 1997, 1, 13
Badan s.; deol, damon D., **J. Chem.**, 1976, 29, 2459-67.
Bhalerao ,U.T., Chandraprakash, Y., **Synthetic Communications**, 1993, 23(9), 1201-1208.
Woonphil Baik, Jong Uk Rhee, **Tetrahedron Letters**, 1995, (1) ,36, 2793-2794.
Stewart Jon D., Kieth W. r., Kayser M., **J. Chem.**, Perkin Trans. 1, 1996
18. Kamal A., Sattur, P. Chem. Soc., **Chem. Commun**, 1989, 835.
19. Kamal, A., Raa, V. M., Rao, A., **Heterocycles**, 1990, 31, 577.
- 19a. *ibid* , pag. 579
20. Baik, W., Kim, D., Lee, H., Kim, B., Lee, **Tetrahedron Letters**, 1997, 38, 4579-4580.
21. Navarro-Ocaña, A., Jimenez Estrada, M., **Synlett**, 1996, 695
22. Kamal, A., Damayanthi, D., Reddy, B.S., Lakminarayana, B., Reddy, B.S., **Chem. Commun**, 1997, 1015.
23. Muller, G., Chen, R., **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 1999, 9, 1625-1630.

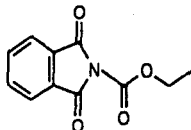
27. Thalidomide Victims Association, Canada, 2000. <http://www.thalidomide.ca>
28. Muller, G., Konnecke, W., Smith, A., Khetani, V., **Organic Process Research & Development**, 1999, 3, 139.
- 28a. *ibid*, pág. 140
- 28b. *ibid*, pág. 140
- 28c. *ibid*, pág. 140
- 28d. *ibid*, pág. 140
29. Nefkens, G., Tesser, G., Nivard, R., **Recuil**, 79, 1960, 688-695.
- 29a. *ibid*, pag.695
- 29b. *ibid*, pág, 695
30. McMurry, I., **Química Orgánica**, Editorial Iberoamericana, E.U., 1992, pág 946-50.
31. Nakanishi, Koji, **Infrared Absorption Spectroscopy**, San Francisco, E.U., 1962, pág . 20-47
- 31a. *ibid*, pág. 20-47
- 31b. *ibid*, pág. 20-47
- 31c. *ibid*, pág. 20-47
- 32a. Sydney P., Colowick and Nathan O. Kaplan. **Method in Enzimology**. Volume I. Academic Press inc, Publishers. New York. 1995, pp, 143
- 32b. *ibid*, pág. 141
33. López González Daniel, **Biotransformación de nitroalquenos con *Saccharomyces cerevisiae*** en medios acuosos y orgánico,1999, Tesis de Licenciatura, Fac. Ciencias. U.N.A.M.

11.0 ANEXO

1. Espectro de IR de N-Carboetoxifalimida 1
2. Espectro de RMN¹H de 1
3. Espectro de masas de 1
4. Espectro de IR de N-Ftaloil-L-Glutamina 2
5. Espectro de RMN¹H de 2
6. Espectro de RMN¹H de 2 + D₂O
7. Espectro de masas de 2
8. Espectro de IR de talidomida 3
9. Espectro de RMN¹H de 3
10. Espectro de masas de 3
11. Cromatograma representativo de cuantificación de 3

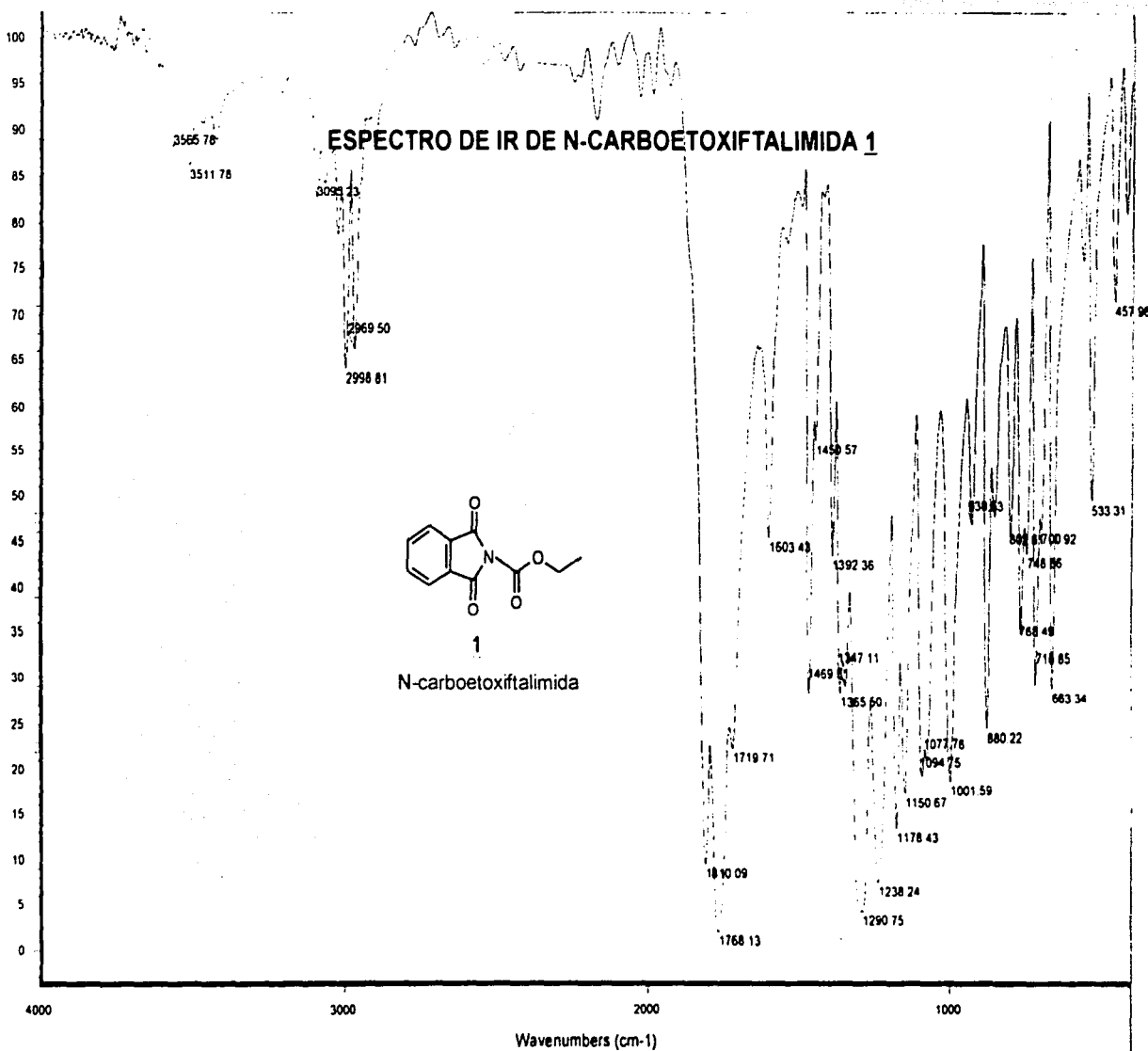
ESPECTRO DE IR DE N-CARBOETOXIFTALIMIDA 1

% Transmittance



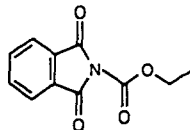
1

N-carboetoxiftalimida



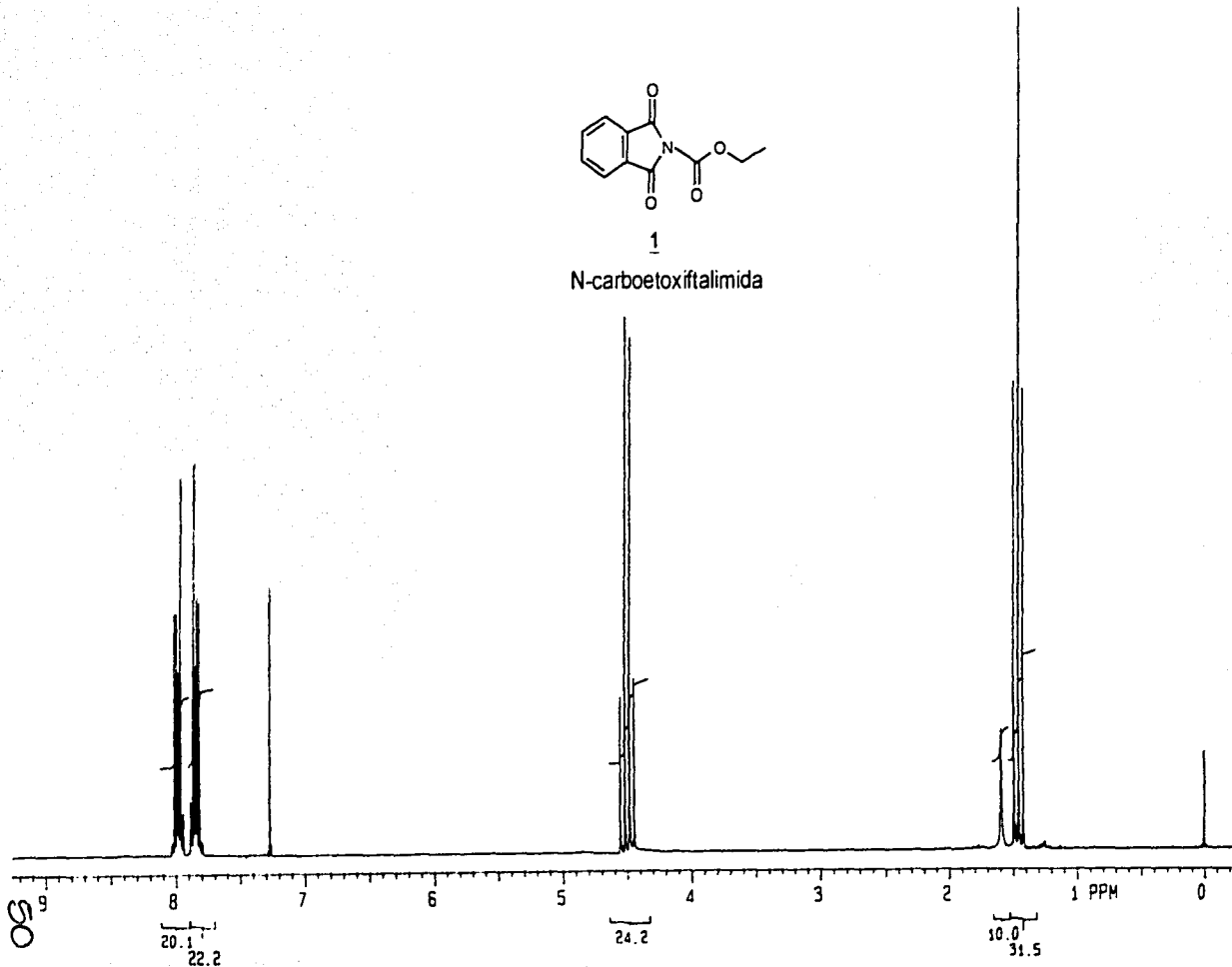
69

ESPECTRO DE RMN¹H DE N-CARBOETOXIFTALIMIDA 1

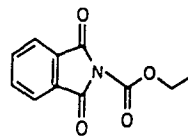
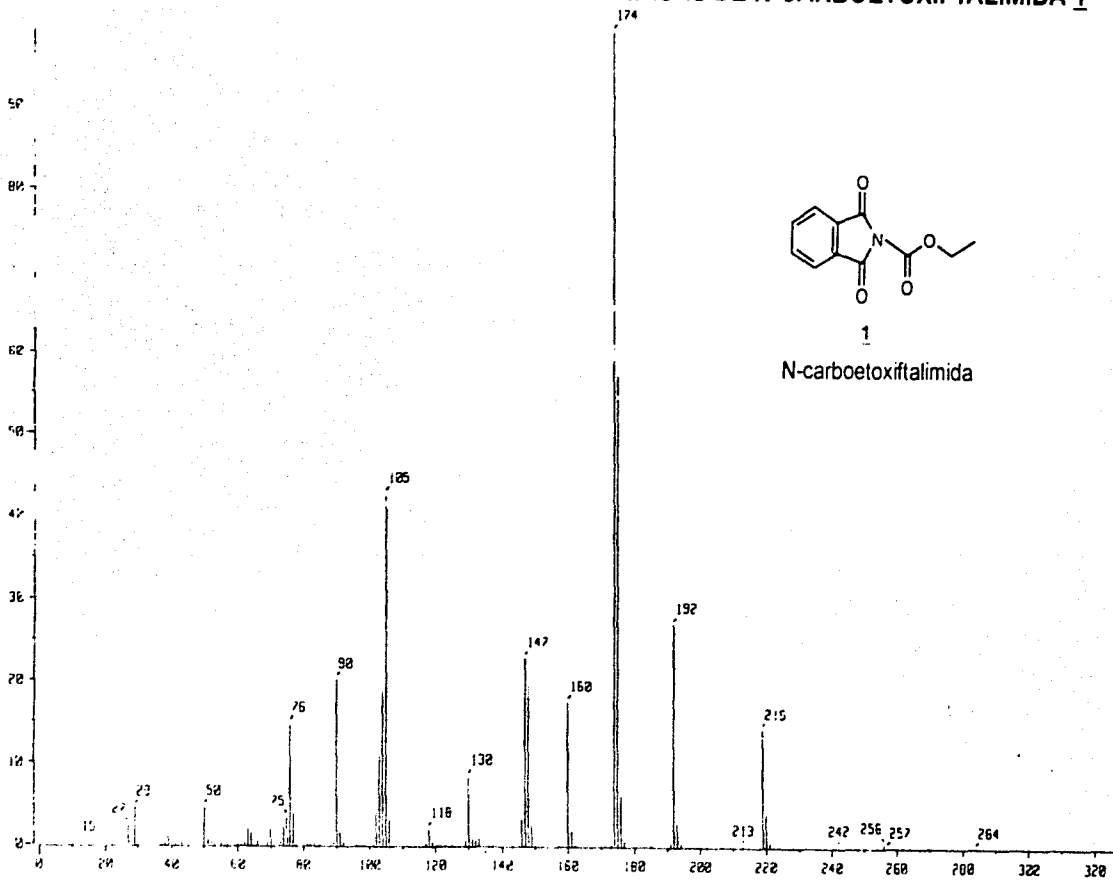


1

N-carboetoxiftalimida



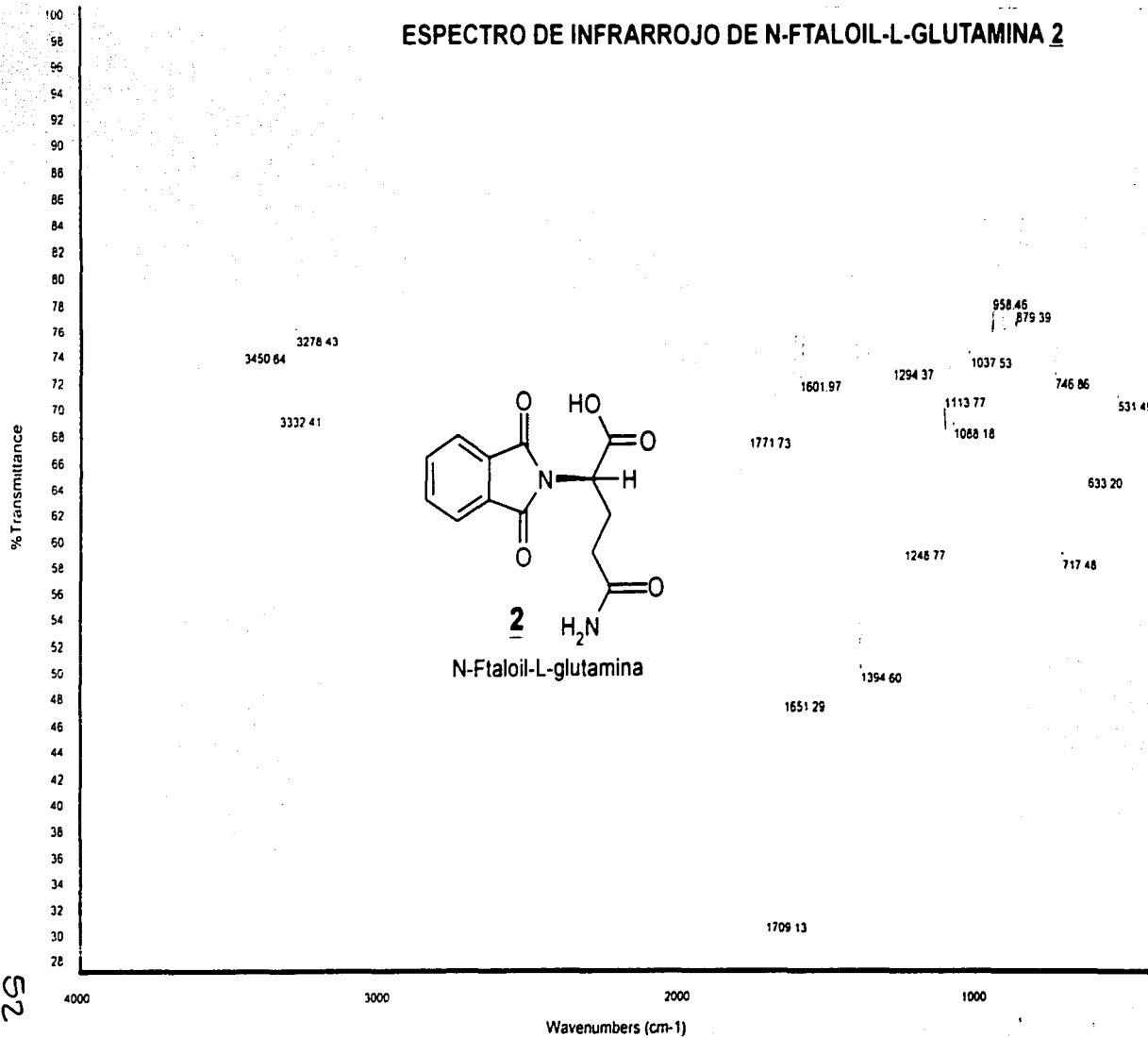
EPECTRO DE MASAS DE N-CARBOETOXIFITALIMIDA 1



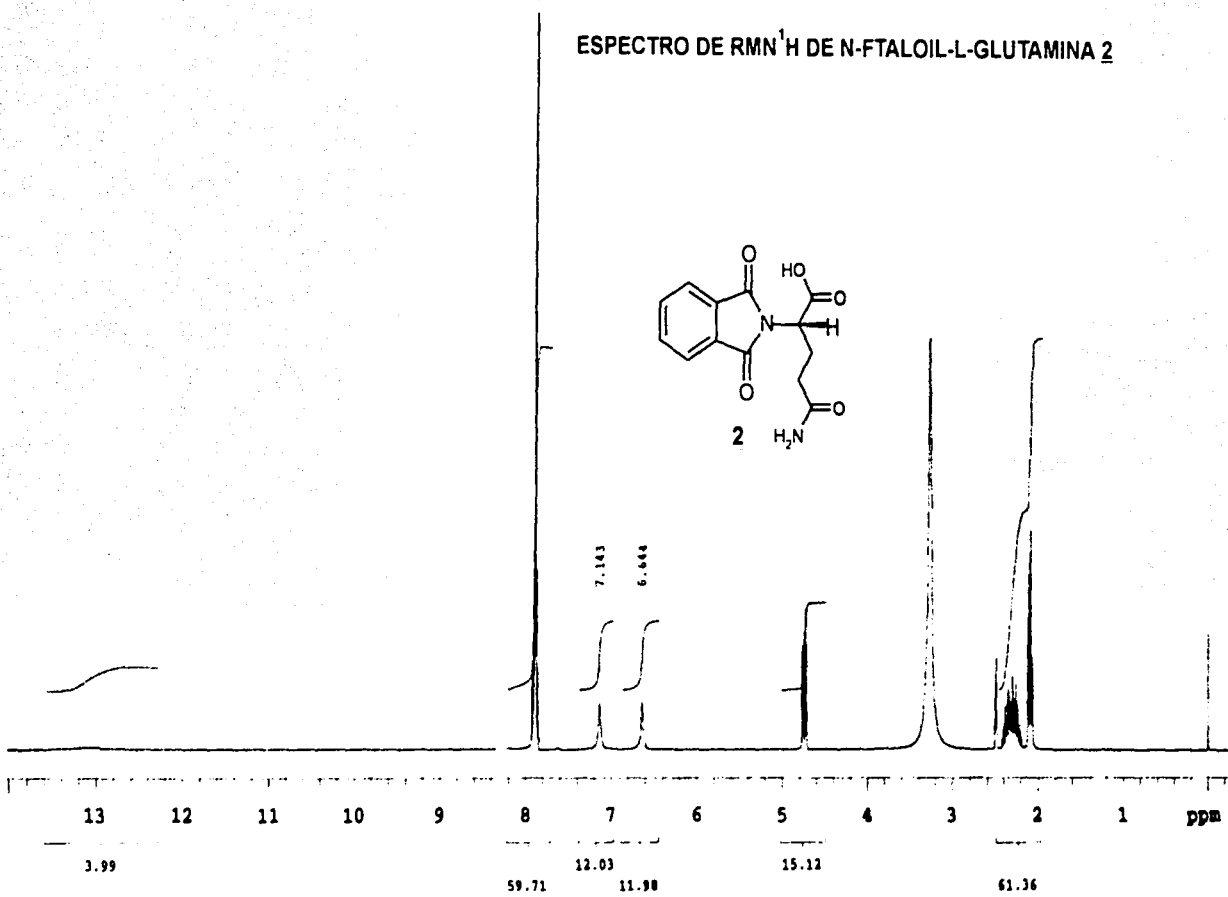
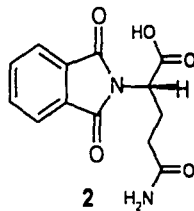
1

N-carboetoxifitalimida

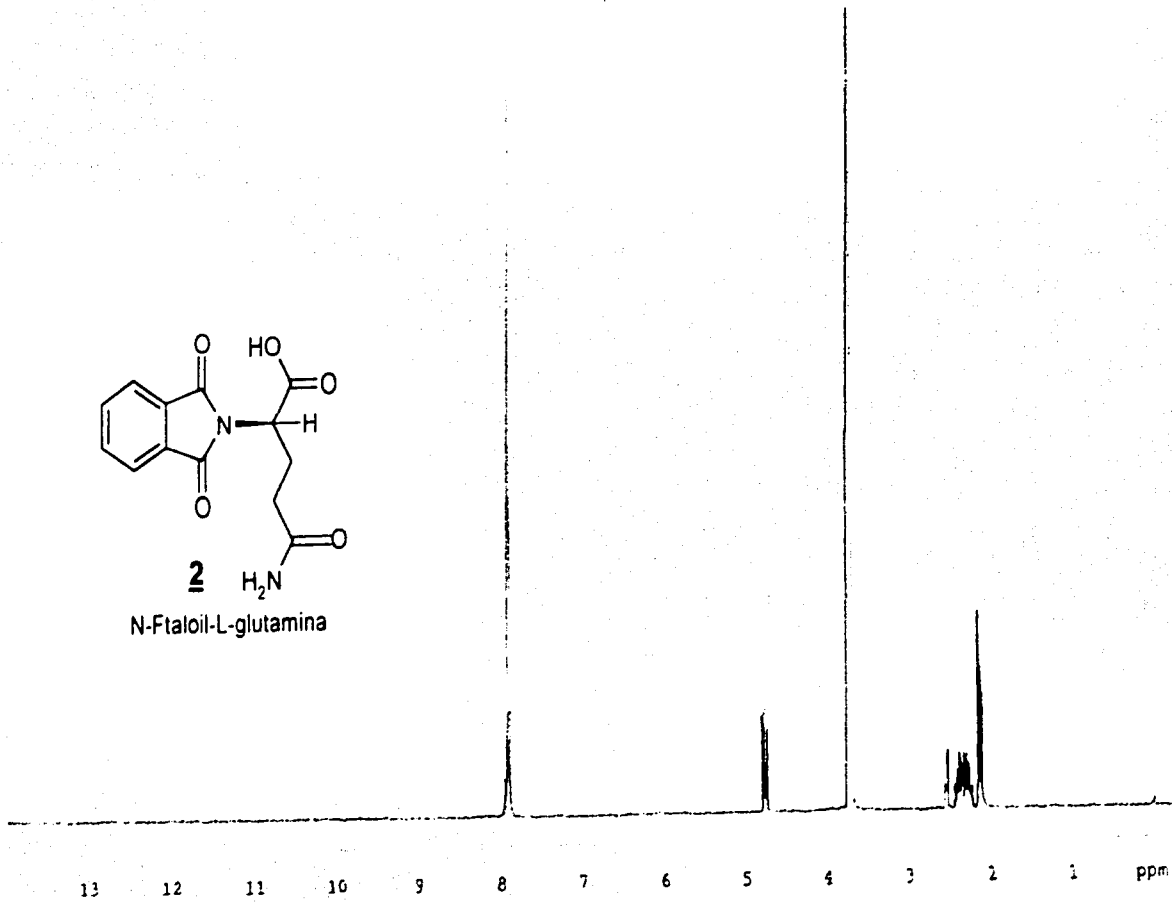
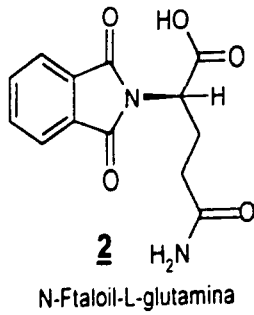
ESPECTRO DE INFRARROJO DE N-FTALOIL-L-GLUTAMINA 2



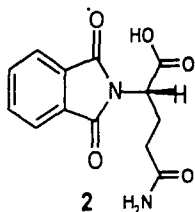
ESPECTRO DE RMN¹H DE N-FTALOIL-L-GLUTAMINA 2



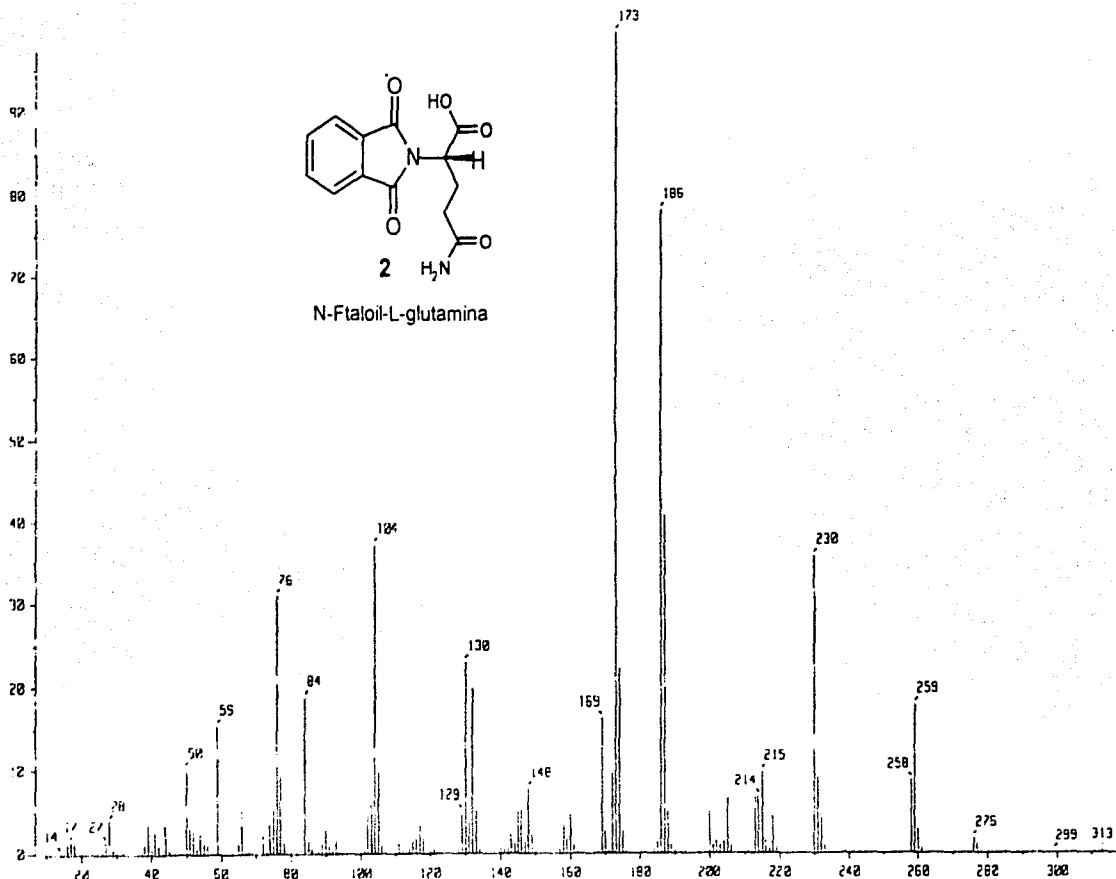
ESPECTRO DE RMN¹H DE N-FTALOIL-L-GLUTAMINA + D₂O



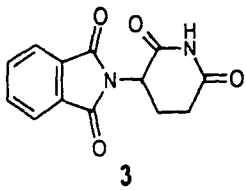
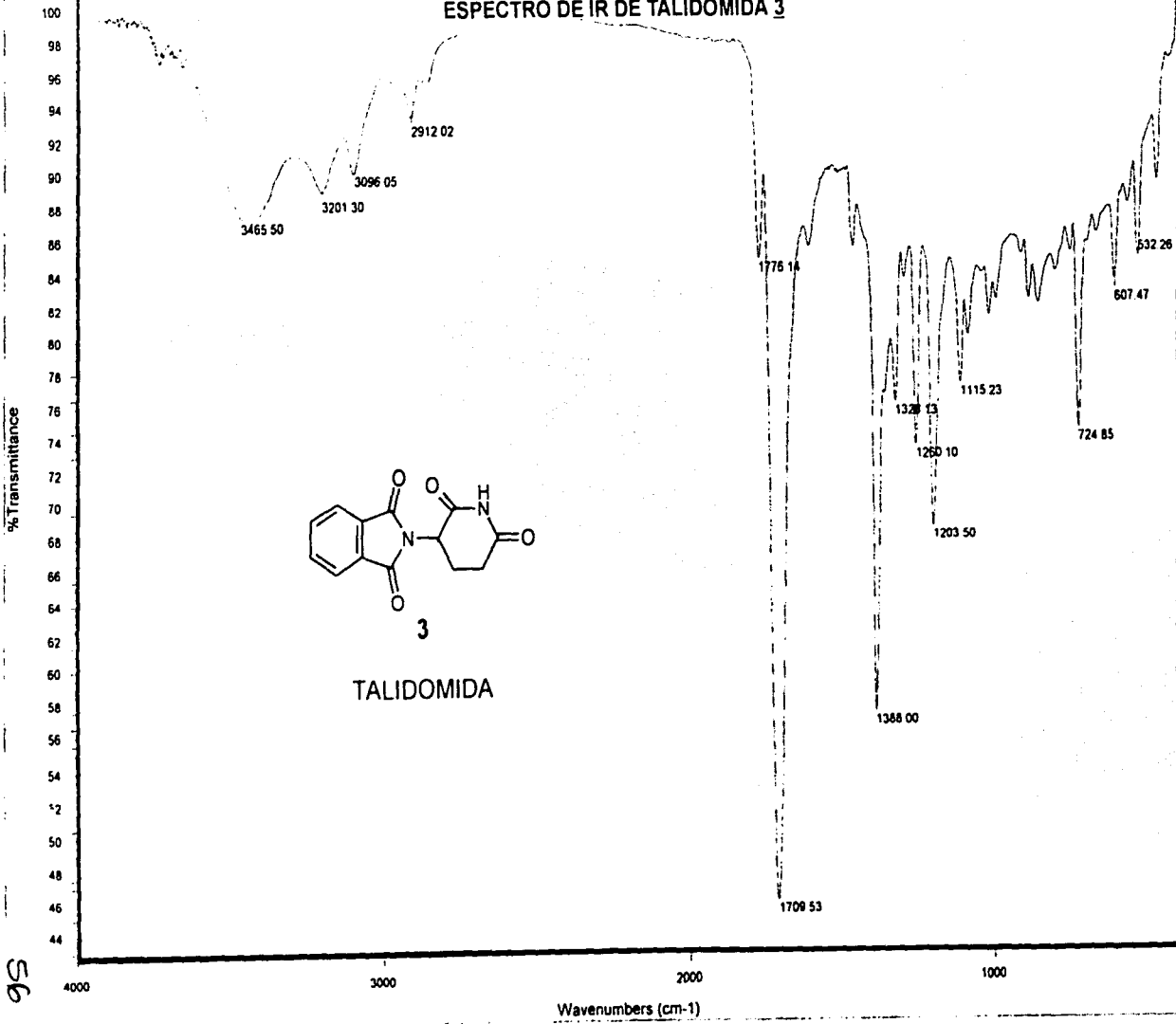
ESPECTRO DE MASAS DE N-FTALOIL-L-GLUTAMINA 2



2
N-Ftaloyl-L-glutamina



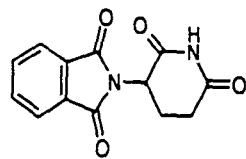
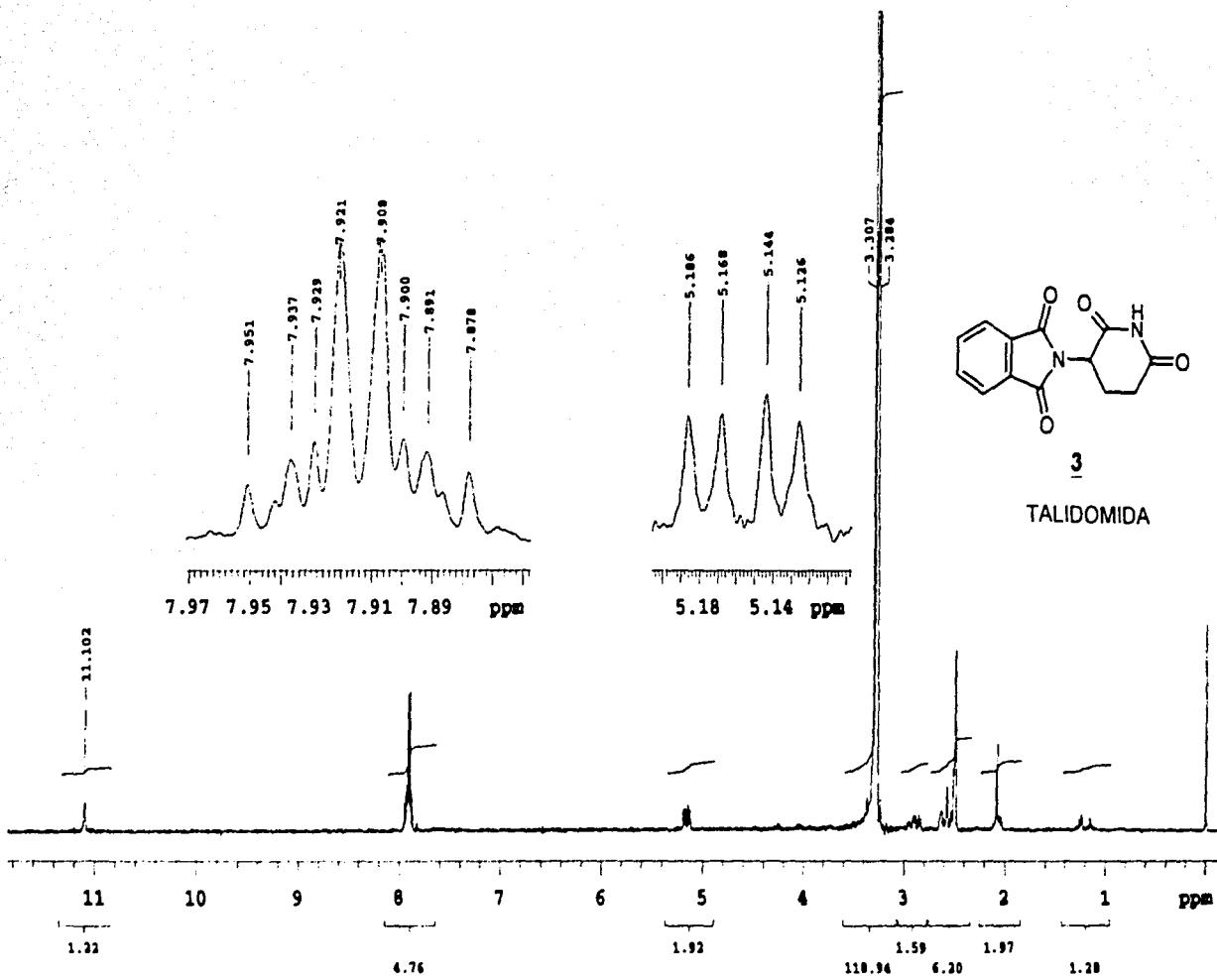
ESPECTRO DE IR DE TALIDOMIDA 3



TALIDOMIDA

ESPECTRO DE RMN¹H DE TALIDOMIDA 3

Chemical shift (ppm) vs. Integration

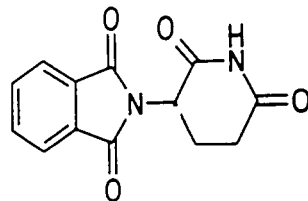


3

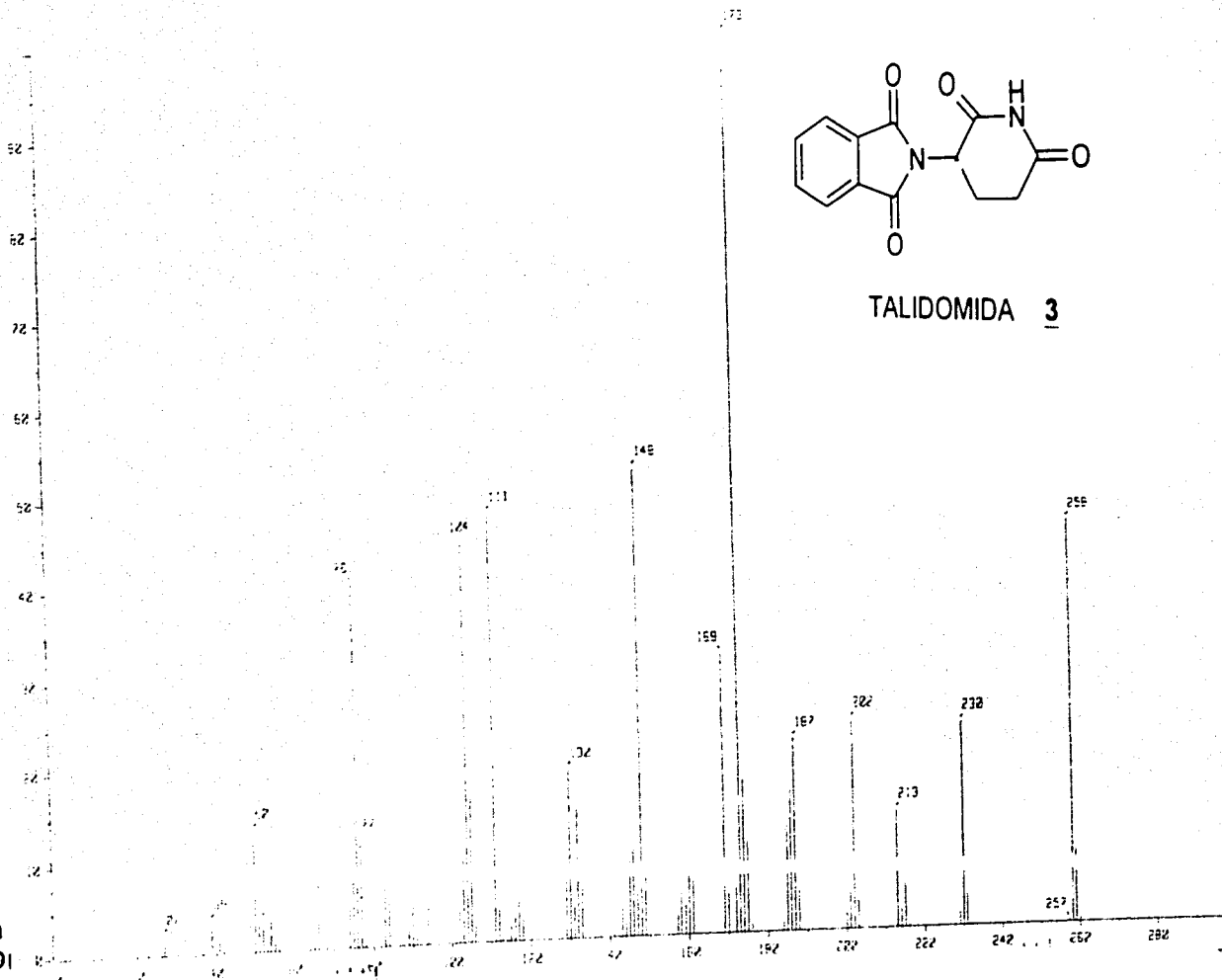
TALIDOMIDA

57

ESPECTRO DE MASAS DE TALIDOMIDA 3



TALIDOMIDA 3

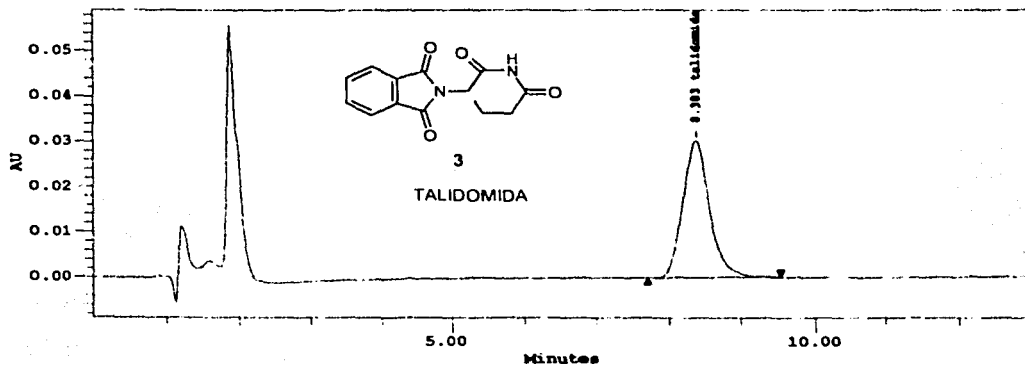


CROMATOGRAMA DE CUANTIFICACION DE TALIDOMIDA 3

Millennium Results Report		Printed: January 4, 1980		Page: 1 of 1	
Report Method: Default		Version: 2.00			
For Sample: std 1/5	Vial: 12	Injection: 4	Channel: 486		
Proc Chan: 486	Processed: 04/01/80 07:01 PM				
Channel Descr:					

Millennium Sample Information

Project Name:	doamiluno	Sample Type:	Standard
Sample Name:	std 1/5	Volume:	10.00
Vial:	12	Run Time:	13.0 min
Injection:	4	Date Processed:	04/01/80 07:01 PM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	04/01/80 08:35 PM		
Scale Factor:	1.00		
Acq Meth Set:	talidomida		
Processing Method:	leticia		



Peak Results

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1	talidomida	8.383	783569	30465	0.020	BB