



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
"Francisco García Salinas"



Unidad Académica de Ciencias Químicas
Maestría en Ciencia y Tecnología Química

TESIS

**Síntesis de (\pm)-anatoxina-a derivatizada como potencial
hapteno para la producción de anticuerpos**

Para Obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología Química

Presenta:

Q.A. Cristóbal Espinosa De la Rosa

Director (es):

Dr. Guillermo Quiñones Reyes

Dra. Irma E. González Curiel

Diciembre 2019



DEDICATORIA

A mis hijos Regina, Renata y Amir.

A mi esposa Mónica.

A mis padres Ana María y Gerardo.

AGRADECIMIENTOS

Al fondo de reincorporación de ex becarios PRODEP-SEP por el financiamiento para la realización de este trabajo de tesis bajo convenio para el periodo Septiembre 2017-Septiembre 2019.

A la Unidad Académica de Ciencias Químicas, UAZ por las facilidades técnicas e instrumentales que fueron de gran aporte para el buen desarrollo de este proyecto.

A la Maestría en Ciencia y Tecnología Química por permitirme formarme académicamente dentro de sus aulas y laboratorios.

De manera especial al Dr Guillermo Quiñones Reyes director del Laboratorio de Síntesis de Bioconjugados lugar que se convirtió en mi refugio académico, por la confianza brindada para realizar esta investigación bajo su tutela. Además debo agradecer la orientación, recomendaciones, regaños y las frases de impulso que sirvieron como guía durante todo este satisfactorio pero arduo proceso, además agradezco las charlas donde compartimos experiencias y vivencias, que han fortalecido el vínculo maestro-alumno y ha llegado hasta el grado de considerarlo un gran amigo.

A la Dra. Irma E. González Curiel por su apoyo e incesante preocupación por mi buen accionar a través de mi trayecto estudiantil en esta Maestría.

Al Dr. Gustavo Ríos Moreno por la disposición para acceder a insumos y equipos bajo su resguardo, al Dr. Juan Alberto Ascacio Valdez (UAdeC) y al Dr. José Román Torres Lubián (CIQA) por las facilidades para realizar estancia de investigación que permitió la caracterización de los productos sintéticos.

De manera general quiero extender mis agradecimientos a los docentes de esta maestría que a través de sus clases, observaciones y aportaciones contribuyeron en mi formación en esta nueva etapa académica.

A mis amigos y compañeros de maestría Adriana, Ricardo, Felipe y Diego por su apoyo constante, que fue muy útil y necesario para retomar mi etapa estudiantil, después de años de abandono.

A mis compañeros e integrantes del Laboratorio de Síntesis de Bioconjugados: Fernando, Paulina y Juan Pablo, por los momentos alegres, divertidos y de retroalimentación que facilitaron las largas jornadas y sirvieron de bálsamo cuando las cosas no parecían ir de la mejor manera. Por todo y más Gracias amigos.

A mis hijos, mis más grandes tesoros fuente inagotable de motivación, por permitirme invertir tiempo que les pertenecía en mi formación académica, que espero pueda retribuirles.

A mi esposa Mónica mi punto de soporte. Gracias por estar siempre a mi lado, cargando con la responsabilidad del hogar durante este arduo periodo. Sin duda este logro es también tuyo.

A mi hermano, amigos, familiares y compañeros de la UACQ, que siempre me expresaron palabras de ánimo y motivación en esas charlas donde comentaba mi trayecto académico.

Finalmente, no puedo dejar de lado a mis padres, las personas que siempre han estado conmigo como promotores de mis sueños y proyectos, gracias por promover y desear en todo momento lo mejor para mi vida.

ÍNDICE

	página
	I
	ii
	iii
	1
	2
1.	3
1.1	6
1.2	8
1.3	10
1.3.1	10
2.	13
3.	15
4.	16
4.1	16
4.2	28
4.3	30
4.4	34
4.5	36
4.5.1	36
4.6	39
5.	40
6.	42
6.1	42
6.2	43
6.3	53
6.3.1	53
6.3.2	54
6.3.3	61
7.	66
	Anexos

Lista de figuras

- Figura 1.** Estructuras de las cianotoxinas de mayor ocurrencia
- Figura 2.** Molécula de anatoxina-a protonada.
- Figura 3.** Isómeros conformacionales, **a)** *s-trans* y **b)** *s-cis* de anatoxina-a.
- Figura 4.** Mecanismo de unión de la anatoxina-a al receptor nicotínico de acetilcolina
- Figura 5.** Productos de degradación de anatoxina-a
- Figura 6.** Intermedio estructural para el acceso a la molécula de anatoxina-a.
- Figura 7.** Esquema retrosintético para la formación del esqueleto azabíclico.
- Figura 8.** Producto secundario de la ciclación intramolecular en la obtención de anillo bíclico.
- Figura 9.** Cromatogramas de evolución de derivatización de anatoxina-a.
-

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Obtención de alcohol bencílico
- Esquema 2.** Obtención del amino-alcohol bencílico asistida por microondas.
- Esquema 3.** Transformación sintética para la obtención del amino-alcohol bicíclico.
- Esquema 4.** Desprotección-protección del nitrógeno puente del alcohol (6).
- Esquema 5.** Oxidación del Boc-alcohol.
- Esquema 6.** Estrategia para acceder de anatoxina-a a partir de la Boc-cetona.
- Esquema 7.** Obtención del enol triflato a partir del compuesto carboxílico (9).
- Esquema 8.** Obtención del enino conjugado trimetilsililado.
- Esquema 9.** Obtención del enino conjugado.
- Esquema 10.** Estrategia para acceder de anatoxina-a a partir del enino conjugado.
- Esquema 11.** Hidratación del enino conjugado empleando ácido fórmico.
- Esquema 12.** Hidratación del enino conjugado empleando el dímero de Zeise.
- Esquema 13.** Hidratación del enino conjugado empleando condiciones de Hennion-Nieuwland
- Esquema 14.** Obtención del trifluoroacetato de anatoxina-a.
- Esquema 15.** Derivatización de anatoxina-a en condiciones de laboratorio.
- Esquema 16.** Derivatización de anatoxina-a con reactivo de Sanger.
- Esquema 17.** Esquema de síntesis de la amina.
- Esquema 18.** Síntesis de aril sulfonamida.
- Esquema 19.** Síntesis del hapteno ATX-D como sal de ácido trifluoroacético.
- Esquema 20.** Intentos de activación del Hapteno ATX-D.
- Esquema 21.** Formación de la sulfonil-lactama.
- Esquema 22.** Ruta de síntesis para la obtención del hapteno ATX-Dc.
- Esquema 23.** Estrategia sintética para acceder a la (±)-anatoxina en forma de sal de ácido trifluoroacético.
-

Glosario de abreviaturas y acrónimos

OMS	<i>Organización Mundial de las Naciones Unidas</i>
FAN	<i>Florecimientos algales nocivos</i>
USEPA	<i>US Environmental Protection Agency</i>
EFSA	<i>Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria</i>
LD ₅₀	<i>Dosis letal media</i>
HPLC-UV	<i>Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta visible</i>
HPLC-FLD	<i>Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia</i>
ANTX-a	<i>Anatoxina-a</i>
O ₃	<i>Ozono</i>
AOPS	<i>Procesos de oxidación avanzada</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
Cl ₂	<i>Cloro</i>
NH ₂ Cl	<i>Cloramina</i>
ClO ₂	<i>Dióxido de Cloro</i>
GC	<i>Cromatografía de gases</i>
HPLC-MS	<i>Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas</i>
NBD-F	<i>4-flouoro-7-nitro-2,1,3-benzoxodiazol</i>
GC/ECD	<i>Cromatografía de gases con detector de electrones</i>
LC-ESI-MS/MS	<i>Cromatografía Líquida acoplada a masas/masas con ionización de electrospray</i>
ELISA	<i>Inmunoensayo enzimático en soporte sólido</i>
A	<i>Alpha</i>
B	<i>Beta</i>
µg/L.	<i>Microgramos /Litro</i>

S_N2	<i>Sustitución nucleofílica bimolecular</i>
RMN 1H	<i>Resonancia magnética nuclear de 1H</i>
RMN ^{13}C	<i>Resonancia magnética nuclear de ^{13}C</i>
GF	<i>Grupo funcional</i>
GP	<i>Grupo protector</i>
BNH_2	<i>Bencilamina</i>
h	<i>horas</i>
MeOH	<i>Metanol</i>
MW	<i>Microondas</i>
δ	<i>Desplazamiento</i>
ppm	<i>Partes por millón</i>
$AcOHg^+$	<i>Ion acetoxi-mercurinio</i>
$Hg(OAc)_2$	<i>Acetato mercúrico (II)</i>
THF/ H_2O	<i>Tetrahidrofurano/agua</i>
NaOH	<i>Hidróxido de sodio</i>
$NaBH_4$	<i>Borohidruro de sodio</i>
DMP	<i>Dess-Martin periodinano</i>
CH_2Cl_2	<i>Diclorometano</i>
$COCl_2$	<i>Cloruro de Oxalilo</i>
t.a.	<i>Temperatura ambiente</i>
<i>t-Boc</i>	<i>terc-butiloxicarbonilo</i>
$Pd(OH)_2$	<i>Hidróxido de paladio</i>
Boc_2O	<i>dicarbonato de di-terc-butilo</i>
AcOEt	<i>acetato de etilo</i>
atm	<i>Atmósfera</i>
KHMDS	<i>bis(trimetilsilil)amida potásica</i>
THF	<i>Tetrahidrofurano</i>
MHz	<i>Mega Hertz</i>
$PdCl_2(Ph_3)_2$	<i>Dicloruro de bis(trifenilfosfina) Paladio(II)</i>

CuI	<i>Yoduro cuproso</i>
Et ₃ N	<i>Trietilamina</i>
DMF	<i>N,N-Dimetilformamida</i>
t.a.	<i>Temperatura ambiente</i>
K ₂ CO ₃	<i>Carbonato potásico</i>
CH ₂ O ₂	<i>Ácido fórmico</i>
PtCl ₂	<i>Cloruro de Platino</i>
HgO	<i>Oxido de mercurio</i>
¹⁹ F	<i>Flúor-19</i>
δ	<i>delta</i>
s	<i>Singlete</i>
d	<i>Doblete</i>
dd	<i>doble de dobles</i>
ddd	<i>doble de dobles doblado</i>
t	<i>triplete</i>
dt	<i>Doble triplete</i>
c	<i>Cuartete</i>
quint	<i>quintuplete</i>
m	<i>multiplete</i>
CCF	<i>Cromatografía de capa fina</i>
nm	<i>Nanómetros</i>
Na ₂ SO ₄	<i>Sulfato de sodio</i>
AcOEt	<i>Acetato de etilo</i>
TFA	<i>Ácido trifluoroacético</i>
BF ₃ EtO	<i>Trifluoro Boro Eterato</i>
Cl ₃ CCO ₂ H	<i>Ácido tricloroacético</i>

RESUMEN

Una biotoxina de origen cianobacteriano de relevancia toxicológica es la anatoxina-a, esta puede ser producida por cianotoxinas tanto de agua dulce como salobre. En condiciones ambientales específicas, dichos organismos de tamaño microscópico tiene la capacidad de reproducirse de forma intensa, dando paso a fenómenos conocidos como floraciones o *blooms* cianobacterianos, derivando en la producción de esta potente neurotoxina en concentraciones elevadas. Existen numerosos reportes de eventos de intoxicación humana, así como de numerosas muertes de ganado, animales domésticos y salvajes, acontecidos en cuerpos de agua dulce contaminados con esta potente neurotoxina.

Esta investigación está orientado a generar por síntesis química anatoxina-a derivatizada como potencial hapteno para la generación de anticuerpos de mayor afinidad y especificidad que aquéllos de disponibilidad comercial, que permitan, por consiguiente, implementar métodos inmunoanalíticos de mayor sensibilidad para esta biotoxina. Esta investigación se elaboró bajo la hipótesis que la derivatización química de la anatoxina-a incrementa la posibilidad de obtener anticuerpos monoclonales con mayor afinidad por la biotoxina, en escala subnanomolar.

Para alcanzar los objetivos marcados en esta investigación, se partió de la experiencia generada por nuestro grupo de investigación hacia la síntesis de este tipo de toxinas. Por lo que el presente trabajo agrupa las transformaciones sintéticas para acceder a la (\pm)-anatoxina-a, así como su proceso de derivatización con el reactivo de Sanger y finalmente la obtención de un análogo estructural capaz de mimetizar a la biotoxina derivatizada, que eventualmente pudiera conducir a la obtención de anticuerpos con elevada afinidad y alta especificidad hacia la misma.

ABSTRACT

Anatoxin-a is a potent biotoxin of cyanobacterial origin, which is produced by both fresh and brackish water cyanotoxins. Under specific environmental conditions, these microscopic organisms have the capacity to reproduce in a massive way, giving way to phenomena known as cyanobacterial blooms, releasing concentrations of anatoxina-a of toxicological relevance. There are numerous reports of human poisoning events, as well as numerous deaths of livestock, domestic and wild animals, occurred in fresh water bodies contaminated with this powerful neurotoxin.

This research is aimed at obtaining by chemical synthesis anatoxin-a derivatized as a potential hapten for the generation of antibodies of greater affinity and specificity than those of commercial availability, and consequently could develop immuno-analysis methods of greater sensitivity for this cyanotoxin. This research was carried out under the hypothesis that the chemical derivatization of anatoxin-a increases the possibility of obtaining monoclonal antibodies with greater affinity for biotoxin, on a subnanomolar scale.

To achieve the objectives set in this research, we started from the experience generated by our research group towards the synthesis of this type of toxins. So the present project groups the synthetic transformations to access the (\pm) anatoxin a, as well as its derivatization process with the Sanger reagent and finally obtaining a structural analog capable of mimicking the derivatized biotoxin, which could eventually lead to the production of antibodies with high affinity and high specificity towards it.

1. INTRODUCCIÓN

Las biotoxinas son un amplio grupo de sustancias químicas de origen biológico, de tipo no infeccioso, producidas como metabolitos secundarios por la mayoría de los organismos vivos.¹ Representan un riesgo potencial para humanos y animales cuando están contenidas en alimentos, agua o piensos, lo que deriva en relevantes pérdidas económicas en la ganadería, agricultura y en el sector acuícola, lo que puede repercutir de manera severa en la sanidad del agua destinada al consumo humano. Las toxinas de origen biológico más relevantes debido a su toxicidad y prevalencia destacan las generadas como metabolitos secundarios por las cianobacterias.

Estos organismos procariotas, aeróbicos, foto autótrofos fueron inicialmente clasificados como algas debido a producen clorofila y/u otros pigmentos biológicos. Las cianobacterias están consideradas dentro de los organismos más antiguos presentes en nuestro planeta, su ascendencia se remonta a 3500 millones de años;² son organismos muy versátiles, capaces de proliferar en ambientes tanto terrestres como acuáticos, su presencia ha sido reportada en entornos extremos del planeta; como los polos árticos y desiertos.³ En presencia de condiciones ambientales favorables, las cianobacteria son capaces de reproducirse de manera exacerbada, dando lugar a eclosiones repentinas, conocidas en la literatura científica como floraciones masivas de algas. Estos afloramientos o *blooms cianobacterianos*, se presentan con elevada frecuencia y mayor intensidad en la actualidad debido al calentamiento global y a la eutrofización de los recursos hídricos consecuencia de la actividad humana.⁴ No obstante, se han registrado floraciones cianobacterianas altamente patógenas en determinados lagos alpinos, con aguas de carácter oligotrófico que presentan bajo contenido de nutrientes.⁵

Las cianobacterias poseen un metabolismo secundario muy activo, se han identificado hasta 300 compuestos bioactivos, de los cuales, de la mayoría se desconoce su función. De estos metabolitos secundarios, las cianotoxinas debido a su importancia toxicológica han recibido la mayor parte de la atención por diversos grupos de investigación.

Las cianotoxinas poseen estructuras químicas diversas, donde se agrupan alcaloides, péptidos cíclicos o aminoácidos no proteicos. Las cianotoxinas por el daño que ocasionan o el órgano diana que afectan en animales y humanos se clasifican en tres grandes grupos: neurotoxinas, hepatoxinas y dermatoxinas.⁶

La presencia de estas biotoxinas en cuerpos de agua destinados al abastecimiento público, áreas recreativas y uso agroindustrial, representan un riesgo sanitario potencial. En países desarrollados como Canadá, EUA, Nueva Zelanda, Australia e Italia, entre otros, destinan anualmente millones de dólares para tratar los recursos hídricos de abastecimiento de agua potable y/o uso recreativo por presencia de cianobacterias.⁷ La cantidad de naciones donde se ha registrado la presencia de cianobacterias, y por ende de cianotoxinas, es cada vez mayor. De los casos más notables, donde se han presentado intoxicaciones agudas o decesos, se tienen registrados en países como Portugal, Australia, China y Brasil. Por citar alguno de ellos, en Brasil, se documentaron 2 casos de intoxicación humana masiva por cianotoxina. En el primero, una cianotoxina hepática generada por *Anabaena* y *Microcystis*, desencadenó una epidemia gastrointestinal donde 2,392 personas resultaron intoxicadas, lo que derivó, en la muerte de 88 personas luego de ingerir agua que contenía esta toxina. El segundo evento, donde se suscitaron fatalidades humanas por *Microcystis* se presentó en la ciudad de Caruaru a mediados de los 90's, cuando pacientes con afecciones renales presentaron una intoxicación vía venosa mientras se sometían a un tratamiento de hemodiálisis.⁸

En México, la mayoría de las masa de agua dulce se encuentran eutrofizados, algunos en condición extrema, que favorecen la formación de florecimientos algales nocivos (FAN). En los últimos años, se han documentado eventos de FAN en diversos estados de la república principalmente en aquellos ubicados en el centro del país, como Michoacán, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí y el Estado de México, entre otros, en períodos que han coincidido con veranos muy calurosos. Las principales especies de cianobacterias reportadas en dichos eventos corresponden a los géneros de *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Phormidium*, *Planktothrix* y *Pseudanabaena*. Si bien es cierto, que se han identificado y documentado la presencia de

diversas especies en los eventos de FAN en el país, la identificación de cianotoxinas asociadas con tales florecimientos, es escasa o nula en la mayoría de los casos. Los eventos mejor documentados son los ocurridos en el sistema hidrológico del río Cutzamala en el 2007 y el del lago de Pátzcuaro Michoacán en el 2011, en donde se encontraron valores de *microcistinas-LR* y *cilindrospermopsina*, respectivamente, superiores a los recomendados por la OMS para cuerpos de agua destinados al consumo humano y uso recreativo.⁹

En lo general, en los países latinoamericanos incluido México, las investigaciones dirigidas a la detección de cianotoxinas, por el riesgo potencial que estas representan, son escasas y se precisa al respecto, orientar investigaciones en este rubro, sobre todo en regiones donde ya se han documentado muertes masivas de fauna silvestre, que probablemente tengan un origen cianotóxico.¹⁰

Del grupo de las cianotoxinas, tres de ellas destacan por su frecuencia de aparición en los afloramientos cianobacterianos nocivos, la *cilindrospermopsina*, las *microcistinas* y la *anatoxina-a* (**figura 1**).¹¹ En lo particular, dentro de este grupo, la anatoxina-a es una de las cianotoxinas de mayor ocurrencia en agua dulce destinada al consumo humano, lo que unido a criterios toxicológicos y epidemiológicos ha llevado a la US Environmental Protection Agency (USEPA) a considerarla como un contaminante prioritario, promoviendo estudios adicionales que permitan evaluar los riesgos y establecer regulaciones y directrices.¹²

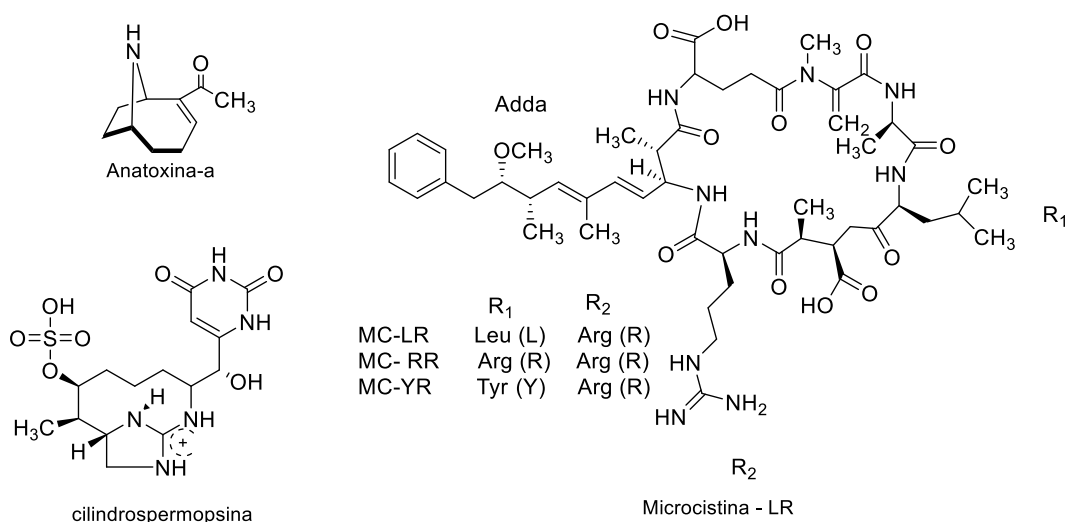


Figura 1. Estructuras de las cianotoxinas de mayor ocurrencia.

1.1 Anatoxina-a

La **anatoxina-a** (*2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno*) estructuralmente conformada por una amina bicíclica secundaria y un resto lateral metilcarbonílico α - β insaturado, es una molécula de bajo peso molecular (165.12g/mol), con un pK_a de 9.36, razón por la que, en los cuerpos de agua que esta presente, normalmente tienen un pH entre 6-9, la molécula protonada de la biotoxina es la forma predominante (**Figura 2**).

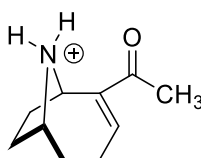


Figura 2. Molécula de anatoxina-a protonada.

La anatoxina-a presenta dos centros asimétricos en C(1) y C(6), pero sólo el enantiómero (+)-anatoxina-a ha sido encontrado en fuentes naturales, y además también se ha reportado que éste enantiómero presenta hasta 150 veces mayor potencia toxicológica que el enantiómero levógiro. La molécula de la anatoxina-a presenta isomería *cis-trans* asociada al libre giro en torno al enlace sencillo C(2)-C(10), presentando igualdad de población de ambos isómeros en disolución a temperatura ambiente (**Figura 3**).¹³

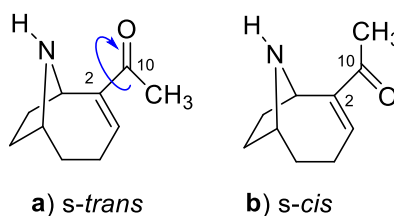


Figura 3. Isómeros conformacionales, a) *s-trans* y b) *s-cis* de anatoxina-a.

Las principales especies de cianobacterias productoras de anatoxina-a son las pertenecientes a los géneros *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Aphanizomenon* y *Cylindrospermum*.¹⁴ Los valores de anatoxina-a en aguas superficiales es baja, entre 0.1 y 10 $\mu\text{g/L}$. No obstante, debido a que la anatoxina-a es una endotoxina, estos valores se incrementan cuando las poblaciones de cianobacterias envejecen y mueren, condición que coincide hacia el final de los veranos calientes, en los meses de octubre y noviembre.¹⁵

Las rutas de exposición con mayor trascendencia para los humanos y la fauna a la anatoxina-a son por medio de agua con presencia de esta biotoxina, ya sea por ingesta voluntaria (agua potable de origen superficial) o accidental (actividades recreativas y deportivas). Un riesgo de exposición que se ha presentado recientemente, es el consumo de pescado y ostras desarrollados en masas de aguas afectadas por cianobacterias y por el consumo de suplementos alimenticios a base de algas, principalmente de *Spirulina* que, aunque está no ha sido reportada como productora de anatoxina-a, en el momento de la selección muy a menudo es confundida con el género *Arthrospira* potencial productora de esta potente neurotoxina.^{16,17}

El primer evento corroborado de envenenamiento con anatoxina-a se presentó en Canadá en la década de los 60's, cuando provocó el deceso de ganado bovino, y en ese momento, debido a su elevado poder toxico, se le llamo *VFDF (Factor de muerte muy rápida)*, debido a que después de ser administrada al ser aplicada intraperitonealmente en ratones, estos perecían en un lapso de tiempo menor a 5 minutos. Se ha determinado su potencia neurotóxica vía intraperitoneal en ratones (250 µg/kg), y esto es debido a que es un agonista del neurotransmisor acetilcolina, la anatoxina-a, se une al receptor nicotínico de acetilcolina y al no ser degradada por la enzima acetilcolinesterasa, bloque el canal de sodio y evita la relajación muscular, provocando sobre estimulación derivando en convulsiones, parálisis y por último la muerte por paro cardiaco (**Figura 4**).¹⁸

Existen registro de numerosos eventos de mortandad de animales domésticos, ganado y fauna salvaje que consumieron agua que contenían anatoxina-a, en las cuales se han llegado a encontrar concentraciones mayores a 1mg/L, concentraciones que son 100 veces mayores a las que recomiendan diversas instituciones oficiales.¹⁹ Un evento reportado en Canadá, hacia Julio de 2018, registró la muerte de 3 perros que después de estar cerca del río Saint John, presentaron síntomas característicos al envenenamiento con anatoxina-a, vómitos, convulsiones y finalmente muerte por paro cardiorrespiratorio, lo que posteriormente se confirmó tras el análisis forense en el Consejo Nacional de Investigación de dicho país.²⁰ En diversas zonas del planeta, la presencia de anatoxina-a en concentraciones de relevancia para la salud pública es recurrente y se repite cada año. No

obstante que no se cuenta con registros de fatalidades humanas, se conocen casos de cuadros clínicos incapacitantes graves con el riesgo potencial de intoxicación letal en poblaciones cuya principal fuente de abastecimiento de agua potable son masas de agua superficiales con problemas de eutrofización.²¹

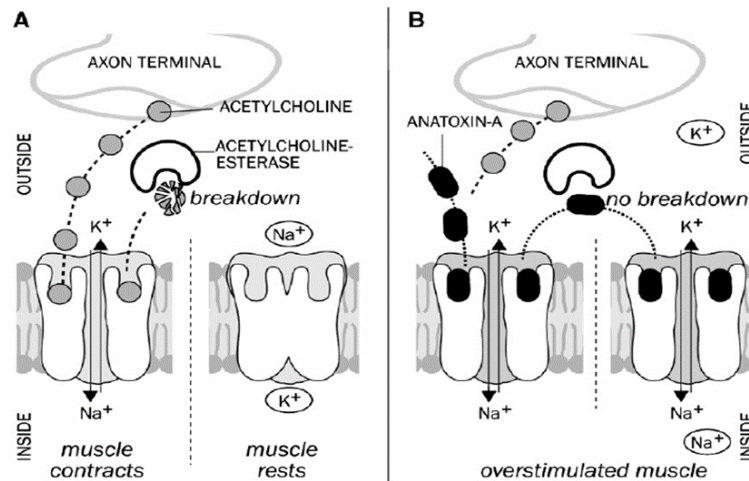
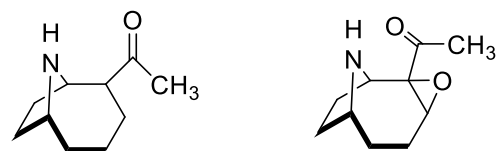


Figura 4. Mecanismo de unión de la anatoxina-a al receptor nicotínico de acetilcolina (recuperada de Osswald et al., 2007).

1.2 Estabilidad de la anatoxina-a

Los primeros estudios de la estabilidad de la anatoxina-a fueron realizados por Stevens y Krieger (1991), con el fin de comprender cómo esta potente biotoxina sería capaz de degradarse. Se conocen cuatro vías naturales de desintegración de esta biotoxina: dilución, la adsorción, la fotólisis y la descomposición no fotoquímica. Las primeras investigaciones concluyeron que la anatoxina-a es degradada fácilmente, especialmente en la luz solar y por efecto de un pH alto. Dependiendo de las condiciones, ésta cianotoxina puede ser parcial o totalmente convertida por degradación en sus metabolitos no tóxicos: dihidroanatoxina-a y epoxianatoxina-a (**Figura 5**). En este mismo estudio también los autores concluyeron que, la anatoxina-a en su forma libre presentaba una vida media de menos de 24 hrs.²²



Dihidroanatoxina-a

Epoxianatoxina-a

Figura 5. Productos de degradación de anatoxina-a

Sin embargo, trabajos posteriores indicaron que el tiempo de vida media de la descomposición de la biotoxina en valores de pH 8-10 en condiciones de fotoperiodo natural es de aproximadamente 14 días, otros estudios, reportaron estabilidad de la biotoxina en muestras mantenidas en la oscuridad a pH 6 durante 4 meses.

Dada la variabilidad de los resultados encontrados en las diversas investigaciones acerca de la estabilidad de anatoxina-a, el grupo de Kaminski retomó el tema evaluando los efectos producidos en la estabilidad por varios factores como pH, temperatura y luz. Encontrando que la estabilidad de la anatoxina-a es dependientes del pH. A valores de pH ácidos en periodos de hasta 9 semanas la concentración de ANTX-a solo disminuyó en un 3%; sin embargo, a pH neutros y alcalinos disminuyó la concentración de manera gradual a 63% y 52% del valor inicial.²³

Por otro lado, se han realizado investigaciones a nivel laboratorio orientadas al tratamiento de agua con presencia de anatoxina-a y que se emplean para el consumo humano. En éstas, a razón de degradar la cianotoxina, se utilizaron agentes oxidantes como permanganato, O₃, AOP, rayos UV, Cl₂, NH₂ y ClO₂. Los estudios concluyeron que, la anatoxina-a es degradada de manera eficiente por permanganato, ozono y por procesos de oxidación avanzada (AOP), pero resistente a los tratamientos con cloro y derivados, así como también a la luz ultravioleta. Procesos estos últimos, los más utilizados en muchos países como tratamientos de elección en la potabilización del agua.²⁴

1.3 Métodos de detección de anatoxina-a

Debido a la inestabilidad de la anatoxina-a y de otras biotoxinas en diversos ambientes, además de la dificultad de contar con estándares analíticos o materiales de referencia, y el requerimiento de detectar concentraciones muy bajas de la cianotoxina, derivado de las reglamentaciones impuestas por organismos internacionales debido a su toxicidad, el análisis de estas toxinas representa un reto importante.²⁵

Los métodos instrumentales de análisis, especialmente aquéllos basados en procedimientos cromatográficos, gracias a la incorporación de tecnologías mejoradas que han impactado positivamente en sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, han abordado este reto con excelentes resultados. Ello ha conducido a que estos procedimientos instrumentales, se elijan por organismos gubernativos como metodologías de referencia para monitorear a estas biotoxinas.

Las metodologías cromatográficas más empleadas para la detección de anatoxina-a son la cromatografía líquida de alta resolución (*HPLC*) con detector de UV o FL, la *cromatografía de gases* (*GC*) acoplada a espectrometría de masas (*MS*) o la *HPLC-MS*.²⁶

1.3.1 Derivatización química

A pesar de las excepcionales prestaciones analíticas que otorgan los novedosos equipos cromatográficos, las biotoxinas y principalmente la anatoxina-a presenta dificultad para ser analizada mediante estas técnicas debido a las características estructurales particulares de la molécula como su tamaño molecular pequeño, alta polaridad, ausencia de grupos cromóforos, estabilidad química y foto-térmica baja, entre otras. En este contexto, la derivatización química del analito podría proporcionar características que contrarresten aquéllas que afectan la estabilidad de la molécula y, además proporcionen elementos que coadyuven a mejorar la sensibilidad para detectar a la toxina por la incorporación de elementos que aporten propiedades de fluorescencia y/o incrementen su tamaño molecular.

En la siguiente tabla se mencionan algunas metodologías empleadas en la determinación de anatoxina-a, donde se emplea la derivatización de la cianotoxina, como una etapa previa para su análisis (**tabla 1**).

Tabla 1. Metodologías cromatográficas que emplean derivatización para detección de anatoxina-a.

Metodología	Tipo de muestra	Agente derivatizante	Referencia
HPLC/FLD	agua	NBDF	27
GC/ECD	agua	Ac. tricloroacético anhidro	28
GC-MS	agua	N-butilo	29
LC-ESI-MS/MS	agua Tejido muscular de pescado	Fluorenilmetil-cloroformiato	30

Aunque la derivatización de las biotoxinas, incluyendo la anatoxina-a, ha permitido mejoras notables en la identificación instrumental de éstas, aún se tiene que lidiar con procedimientos propios de éstas técnicas, en donde el tiempo que se emplea en cada análisis resulta importante. Ejemplo de ello, son el pretratamiento de la muestra (extracción, concentración y/o purificación), la limpieza de la columna cromatográfica entre cada análisis, el costo de operación de cada equipo y la necesidad de personal bien calificado para el manejo de los equipos.

Ante lo expuesto, existe la necesidad de acceder a métodos analíticos rápidos, económicos y fiables que permitan evaluar de manera eficaz y oportuna una eventualidad ambiental por la presencia cianotoxinas en agua de consumo; donde tanto personas como animales domésticos y/o fauna silvestre, se encuentren en riesgo inminente.

En este escenario, los métodos inmunoanalíticos se posicionan como una alternativa eficaz para la identificación de moléculas de tamaño molecular pequeño como la anatoxina-a. Son metodologías que se basan en el empleo de anticuerpos altamente sensibles y específicos, que compiten en tales rubros con aquéllos métodos de índole instrumental. Debido a alta sensibilidad de dichos anticuerpos, se han desarrollado diversas plataformas inmunoquímicas que se han convertido en opciones analíticas muy sensibles,

rápidas y confiables en la detección de toxinas, entre las que se encuentran los inmunoensayos enzimáticos en soporte sólido de tipo ELISA.^{31,32,33 34}

Los inmunoensayos ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) son técnicas sencillas y rápidas para la detección de analitos, donde la señal analítica es generada por una enzima marcada. Se han desarrollado inmunoensayos ELISA para un número considerable de analitos, convirtiéndose en una herramienta analítica para laboratorios de investigación, diagnóstico y control de calidad en diversas industrias.³⁵ En la actualidad existen en el mercado kits de Inmunodetección para un gran número de cianotoxinas, con sensibilidad y especificidad que compite con la que exhiben equipos instrumentales.

2. JUSTIFICACIÓN

De las numerosas biotoxinas cianobacterianas, la anatoxina-a debido a su toxicidad fue la primera de la cual se identificó su estructura química. Desde ese momento, las técnicas analíticas para su detección cada vez son más diversas y con mayor capacidad de detección. En este sentido, las técnicas instrumentales se han posicionado como las metodologías de referencia y han permitido que autoridades garanticen la salud de la población.³⁶ Son metodologías que tienen la capacidad de identificar múltiples analitos de interés a la vez, esto es posible ya que cada vez son más sensibles y selectivos, además que su capacidad de detección es inmejorable cuando se acoplan a detectores de masas.

Dada la polaridad que presentan casi todas las biotoxinas, la cromatografía de líquidos es la metodología, que ha sido utilizada con mayor frecuencia como estrategia química de identificación y separación, en comparación con otras técnicas cromatográficas, siendo la metodología de HPLC-MS/MS la que hasta el momento presenta mayor sensibilidad y debido a ello, ha sido aprobada y utilizada como procedimiento de detección oficial por la USEPA.³⁷

Aun con las formidables características de las novedosas técnicas instrumentales, la anatoxina-a es un compuesto que presenta dificultad para ser analizado. Esto se debe a las características propias de la molécula, como bajo peso molecular y ausencia de grupos fluorescentes, uno de los procesos analíticos que se utilizan para solventar esta problemática, es la derivatización de la anatoxina-a. La derivatización química de analitos, al objeto de facilitar o incrementar su detección, es amplia e intensamente utilizada en métodos instrumentales.^{38,39,40} Sin embargo, en los métodos biológicos o bioquímicos, basados en algún tipo de receptor celular, la derivatización de la molécula diana no es una práctica habitual, aunque los pocos casos documentados donde se ha derivatizado el analito para obtener anticuerpos altamente sensibles hacia éste han sido reportados como exitosos.⁴¹ Una posible razón a ello, pudiera ser que dirigir la generación de anticuerpos altamente específicos a través de haptenos derivatizados y los correspondientes

bioconjugados inmunizantes implica agregar una etapa previa de derivatización del analito en el desarrollo posterior de un inmunoensayo.

Existen algunos antecedentes para moléculas como la anatoxina-a que son relativamente pequeñas, de bajo perfil inmunogénico y difíciles de generar anticuerpos de alta especificidad, donde la derivatización del analito representó una alternativa viable en términos de la obtención anticuerpos de mayor especificidad y selectividad que aquéllos que reconocen directamente al analito.^{42,43,44,45} Ejemplo de lo anterior, fue la derivatización del glifosato, un herbicida del cual ya existía un inmunoensayo, pero que, gracias a su derivatización, permitió obtener anticuerpos con una sensibilidad de hasta 100 veces mayor que aquéllos que reconocían al analito sin derivatizar.⁴⁶

En este contexto, creemos que la derivatización química de la anatoxina-a es una estrategia factible para producir anticuerpos de mayor afinidad y selectividad que aquéllos anticuerpos que detectan al analito libre y que nuestro mismo grupo de investigación ha generado previamente.

3. OBJETIVOS

El presente proyecto de investigación se sitúa dentro de la línea de investigación denominada “Síntesis de moléculas con aplicaciones biotecnológicas y analíticas”, adscrita a la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. El propósito principal de este trabajo fue ***sintetizar (±)-anatoxina-a derivatizada como potencial hapteno para la generación de anticuerpos***, elemento clave que permita la implementación de métodos inmunoanalíticos para la identificación de esta cianotoxina.

Para conseguir lo anterior, se han establecido un conjunto de objetivos a cumplir, mismos que se enlistan a continuación:

1. Acceder por síntesis química a la (±)-anatoxina-a.
2. Explorar la reactividad química de la anatoxina-a hacia el reactivo de Sanger, a razón de evaluar las prestaciones analíticas que proporcionen el contexto del desarrollo posterior de un inmunoensayo.
3. Obtener por síntesis química un análogo estructural de la biotoxina modificada por derivatización como metodología principal permitiendo obtener anticuerpos con características analíticas superiores a aquéllos anticuerpos que reconocen al analito libre (sin derivatizar).

4. Resultados y Discusión

En el presente proyecto, el desarrollo de la síntesis química para construir la molécula de la cianotoxina anatoxina-a y su derivatización, se apegó al descrito por Quiñones y Cols (2016) a partir de la cual se ajustaron condiciones y concentraciones en las reacciones correspondientes a razón de reproducir la ruta de síntesis en nuestras instalaciones y recursos. En este sentido, las secciones siguientes describen el desarrollo de las reacciones y su caracterización química desde un escenario particular que aportó mejoras y perspectivas diferentes de abordaje químico para mejorar rendimientos de reacción. En todo momento se reconoció el antecedente ya descrito en la literatura con referencia a ésta línea de investigación de nuestro grupo de trabajo.^{47,48}

4.1 Etapas sintéticas para la obtención de (±)-anatoxina-a

Las características estructurales de la anatoxina-a, en conjunto con la importancia neurotóxica y las necesidades analíticas de contar con estándares analíticos de la mayoría de las cianotoxinas, han conducido al desarrollo de un vasto número de aproximaciones sintéticas reportadas en la literatura para su obtención. A la fecha, están disponibles dos importantes revisiones bibliográficas que describen diversas estrategias de síntesis para acceder a la construcción estructural de un aza-esqueleto bicíclico característico de la anatoxina-a. La primera compilación bibliográfica de métodos de síntesis dirigidas para la obtención de anatoxina-a tanto en su forma racémica como enantiomérica, además de incluir estrategias químicas para la adquisición de análogos estructurales de la misma, la reportó Mansell y Cols en 1996 y la amplió Brenneman y Cols en 2005 al objeto de describir una ruta enantiomérica de síntesis para la obtención de anatoxina-a vía metátesis de eninos por cierre de anillos.^{49,50}

En este sentido, el abordaje químico planteado para acceder a la biotoxina anatoxina-a, se basó en las diversas rutas reportadas en la literatura tanto para anatoxina-a, homoanatoxina-a y otros análogos estructurales.⁵¹ Una vez que se accedió sintéticamente a la (\pm)-anatoxina-a como sal de ácido trifluoroacético se exploró la derivatización de ésta, con 2,4-Dinitrofluorobenceno (Reactivo de Sanger) en presencia de buffer de boratos (pH 9.6) y acetonitrilo, condiciones que permitieron obtener la (\pm)-anatoxina-a derivatizada, proceso que fue verificado por HPLC. Finalmente se accedió sintéticamente a un hapteno de la anatoxina-a derivatizada, lo que permitió alcanzar los objetivos propuestos en la presente investigación.

A efecto de explicar el abordaje de la estrategia química y la ruta de síntesis empleada para acceder a la biotoxina anatoxina-a, inicialmente se planteó la construcción del sistema anular 9-azabicclico característico de la biotoxina, partiendo de la obtención de un compuesto clave formado por dicha estructura y una funcionalidad química idónea a partir de la cual, se pudieran realizar transformaciones subsecuentes que llevaran a la construcción final de la cianotoxina y eventualmente permitieran un punto de acceso químico para su derivatización (**Figura 6**).

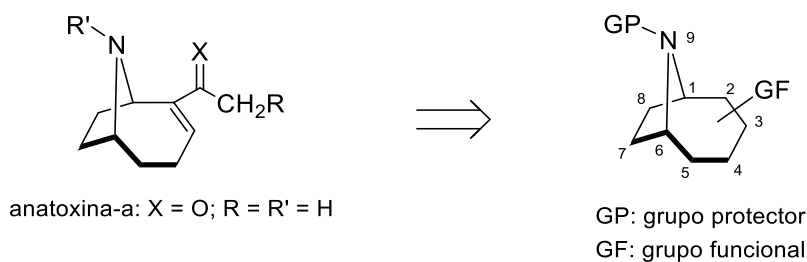


Figura 6. Intermedio estructural para el acceso a la molécula de anatoxina-a.

La idea anterior surgió del desarrollo de un análisis retrosintético de la molécula de anatoxina-a, a través del cual, la síntesis de la anatoxina-a podría ser viable partiendo de reactivos de fácil disposición comercial. Como se puede apreciar en la **figura 7**, la propuesta fue la construcción del anillo 9-azabíciclico (**1**) tomando como material de partida al 1,5-ciclooctadieno (**3**) o su derivado oxiránico que, por transformaciones posteriores, eventualmente podrían conducir a la formación de un aminoalcohol *N*-protegido (**2**) y a la construcción del sistema aminobíciclico buscado llevando a (**2**) por un proceso de ciclación intramolecular (**Figura 7**). Una vez accedido al anillo homotropánico buscado, este sería clave para continuar con la ruta sintética en la obtención de la cianotoxina.

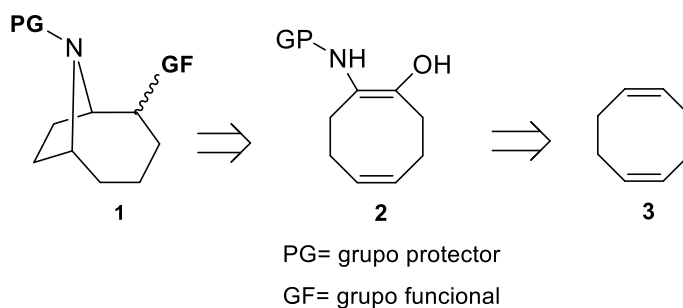
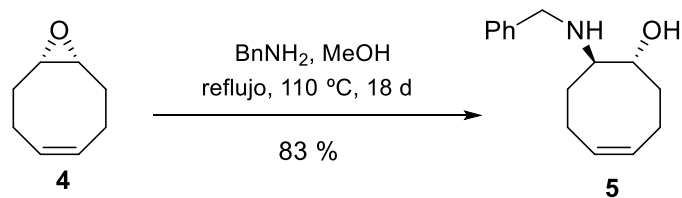


Figura 7. Esquema retrosintético para la formación del esqueleto azabíciclico.

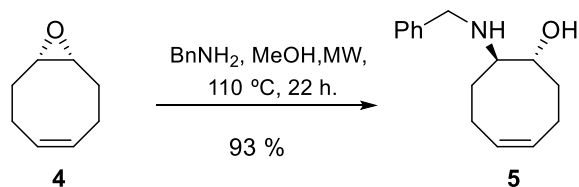
A continuación, se describen las etapas sintéticas desarrolladas en la obtención de anatoxina-a racémica, su posterior proceso de derivatización y la obtención del hapteno de la biotoxina derivatizada; se expone en perspectiva cada etapa sintética.

La primera transformación química, consistió en realizar una apertura nucleofílica tipo S_N2 del anillo oxiránico (**4**) con dos equivalentes de bencilamina en MeOH en condiciones de reflujo a 110°C para obtener el *trans*-amino-alcohol (**8**) con un rendimiento del 83% luego de 18 días de reacción. La purificación del producto obtenido se realizó de manera sencilla por recristalización de hexano del crudo de reacción.



Esquema 1. Obtención de alcohol bencílico.

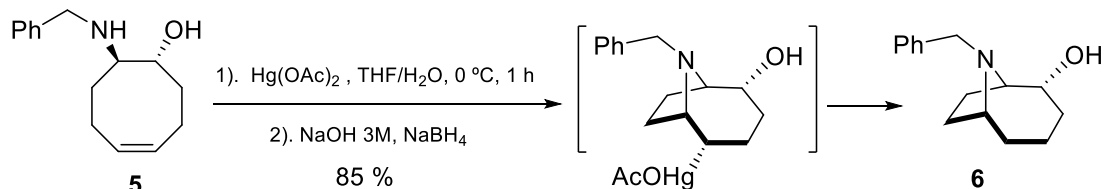
Con el propósito de disminuir el tiempo de reacción, ésta se montó bajo condiciones similares, pero ahora el reflujo fue asistido por microondas. El resultado fue un incremento del rendimiento un 93% con la reducción significativa de tiempo de reacción a 22h (**Esquema 2**).



Esquema 2. Obtención del amino-alcohol bencílico asistida por microondas (**5**).

La obtención del amino-alcohol por las dos distintas metodologías se confirmó después de someterlo a Resonancia de Carbono y protón y ensayos 2D-RMN. En el espectro de protón se presentó un multiplete a campo bajo del espectro típico de núcleos bencénicos hacia 7.35 ppm, dos conjuntos de señales de los protones correspondientes al doble enlace a δ 5.66 y 5.66 ppm respectivamente, y la señal correspondiente los hidrógenos del metileno unido al grupo bencilo hacia δ 3.82 ppm, presentando un sistema de acoplamiento tipo AB.

La segunda transformación química, consistió en generar el anillo 9 azabicyclo[4.2.1]nonano perseguido, se realizó mediante una oximercuración con $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, a temperatura baja, seguida de una reducción del intermedio organomercúrado con NaBH_4 , procedimiento que permitió la obtención del alcohol aza-bicíclico (**6**) (**Esquema 3**).



Esquema 3. Transformación sintética para la obtención del amino-alcohol bicíclico (**6**).

Es importante resaltar que en esta etapa de reacción, cuando se utilizaron las condiciones antes mencionadas no se formó otro producto de reacción en cantidades de relevancia, caso que si se sucedió cuando los tiempos de reacción eran mayores, lo que se explicó gracias a la revisión de procedimientos descritos en la literatura para estrategias químicas semejantes.^{52,53,54} Particularmente, cuando la reacción de ciclación intramolecular se realizó a temperaturas superiores a la antes descrita o por tiempos de reacción más largos, se obtuvo el hidroxí-acetato (**7**) (**Figura 8**) en concentraciones variables, hasta llegar a ser mayoritario, cuando el proceso de ciclación se mantiene por un lapso de tiempo suficiente, esto ha sido observado en procesos de ciclación semejantes, la formación de este compuesto es posiblemente debido al rompimiento del grupo aceto en el producto organomercurado formado al inicio de esta reacción de mercurización.^{55, 56}

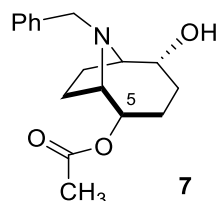


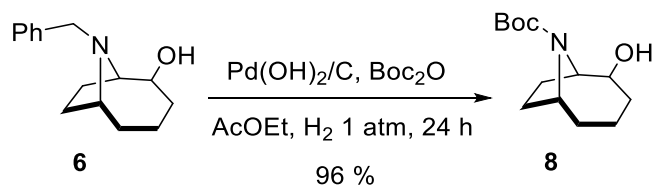
Figura 8. Producto secundario de la ciclación intramolecular en la obtención de anillo bicíclico.

Los datos espectroscópicos de RMN ^1H y la correlación mostrada con algunos experimentos bidimensionales confirmaron la obtención del alcohol azabíclico (**6**).

Por RMN de protón, se encontró a un desplazamiento de 3.86 ppm un sistema de picos desdoblados como un *ddd* correspondientes al protón geminal con el hidroxilo en C-2; un sistema complejo de acoplamiento de spins a campo alto correspondientes a los protones alifáticos de la molécula. Adicionalmente, se observó dos sistemas de picos atribuibles a los protones aromáticos y diastereotópicos del metileno bencílico descritos en la molécula de partida y retenidas en el producto de ciclación (**6**).

La adquisición de (**6**), que contenía el esqueleto hidrocarbonado característico de alcaloides homotropánicos que comparte con anatoxina-a, ya disponía de una funcionalidad química adecuada que permitiera continuar con las transformaciones necesarias para la formación del sistema estructural de la molécula buscada. Por una parte, el grupo amino puente se encontraba protegido por una agrupación bencilo, y por otro lado, se contaba con un grupo hidroxilo en C-2, que permitió la formación del resto metil carbonílico característica de la biotoxina.

De cara que sería necesaria la eliminación del grupo protector del grupo amino casi al final de la ruta sintética, y dado a que este proceso se llevaría a cabo ya formada la insaturación entre los carbonos C2 y C3 del anillo bicíclico característico de la biotoxina, se decidió realizar un intercambio del grupo protector del átomo de nitrógeno en el alcohol azabíclico (**6**), el grupo bencil, por una funcionalidad que su eliminación, se realizara bajo condiciones que no alteren el doble enlace presente en la molécula. Se decidió emplear el grupo *terc*-butiloxicarbonilo. De esta forma, la etapa siguiente implicó la N-desbencilación del alcohol bicíclico (**6**) y reprotcción del grupo nitrógeno puente con un grupo *terbutoxicarbonilo* (*t-Boc*) mediante una hidrogenólisis, empleando H₂ con presión de 1 atmósfera, en presencia de hidróxido de Paladio ($Pd(OH)_2$) soportado sobre carbono, cantidades equimolares Boc₂O (*dicarbonato de di-terc-butilo*) y el alcohol (**6**) empleando acetato de etilo como disolvente.



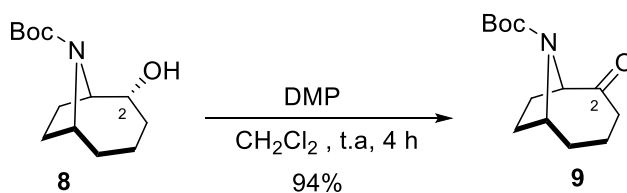
Esquema 4. Desprotección-protección del nitrógeno puente del alcohol (**6**).

Las condiciones antes mencionadas, son habitualmente empleadas en procesos análogos para moléculas que tienen características química parecidas al producto de partida (bajo peso molecular y alta inestabilidad), inicialmente se produce el rompimiento del enlace C-N dejando al Nitrógeno puente susceptible a un ataque electrofílico por parte del Dicarbonato de diterbutilo (Boc_2O), permitiendo acceder al N-Boc alcohol (**8**) a partir

del alcohol biciclo (**6**) mediante una sola etapa sintética con un rendimiento del 96% del producto cromatográfico de purificación.

El intercambio de grupo protector del nitrógeno bicíclico se corroboró después de analizar sus espectros de *RMN de ¹H* del Boc-alcohol (**8**), donde se apreció la ausencia del multiplete que correspondía al grupo *N*-bencilo y la presencia de las señales esperadas del actual grupo protector (*t*-Boc); las señales atribuibles a los rotámeros correspondientes al grupo Boc hacia 1.47/1.45 ppm, además de las señales de los protones cabeza de puente y las correspondientes a los protones alifáticos conservadas del producto de partida.

Así pues, toda vez que se purificó el Boc-alcohol (**8**) se procedió a la transformación de éste en su correspondiente producto de oxidación, un grupo carbonílico en C2. Tal cual se muestra en el **Esquema 5**, la oxidación del grupo hidroxilo del alcohol (**8**), se llevó a cabo empleando el Dess-Martin periodinano (*DMP*) como agente oxidante, este procedimiento permitió acceder a la cetona bicíclica (**9**) con rendimientos excepcionales del orden del 94%.^{57,58}

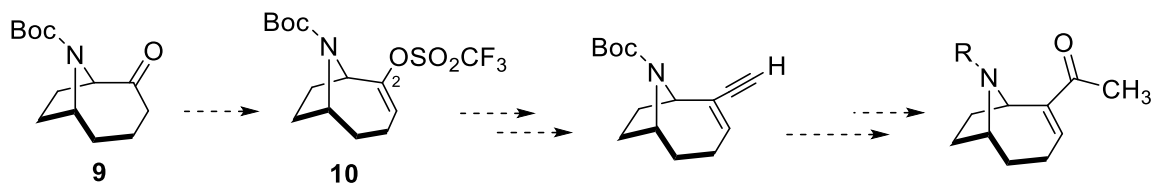


Esquema 5. Oxidación del Boc-alcohol (**8**).

La obtención de la Boc-cetona (**9**), se confirmó por *RMN de ¹H* y ¹³C; es relevante destacar que la el compuesto, se encontró en disolución como una combinación de rotámeros en relación de 2:1, esto se logró apreciar después de analizar la dualidad de señales presentes en los experimentos de *RMN* realizados, donde se observan las señales pertinentes a los protones del grupo *OCMe₃* del grupo protector *N*-Boc de cada rotámero *RMN ¹H* a 1.49/1.42 ppm y al desplazamiento a 215.3 ppm del carbono carbonílico (*C*-*C*=*O*) y 80.4/80.12 y 28.75/28.61 ppm del grupo *OCMe₃* en el espectro de ¹³C *RMN*.

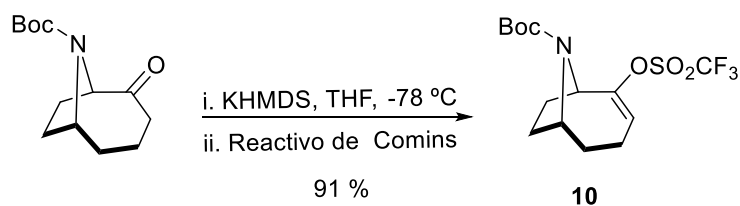
Después de la obtención de la Boc-cetona (**9**), se procedió a realizar la obtención de un enol triflato, transformación que previó la introducción en el esqueleto bicíclico de un excelente grupo saliente, como lo es el grupo trifluorometanosulfonato o triflato. Proceso

al que se abordó con la formación de un enolato en condiciones básicas aprovechando los hidrógenos α al carbonilo cetónico en (**9**), seguido de la adición de una fuente de triflatos.^{59,60} Toda vez conseguida la formación de un sistema olefínico en C2-C3 conjugado al triflato, podría ser viable en etapas posteriores, la formación de un sistema enínico α, β -insaturado.



Esquema 6. Estrategia para acceder de anatoxina-a a partir de la Boc-cetona (**9**).

Una vez que se disponía de la cetona bicyclica (**9**), sometió a un tratamiento químico empleando 2.1 equivalentes molares de bis(trimetilsilil) amida de potasio (*KHMDS*) y tetrahidrofurano como disolvente a $-78^\circ C$ en baño de hielo seco/acetona, para formar un enolato de potasio intermedio, posteriormente se adicionaron a la reacción 3 equivalentes molares de [N-(5-cloro-2-piridinil)bis(trifluorometanosulfonamida)] con agitación continua a temperatura ambiente por 2 h, condiciones empleadas y reportadas en la literatura para la formación de enol triflatos teniendo como material partiendo una cetona (**Esquema 7**).^{61,62,63}



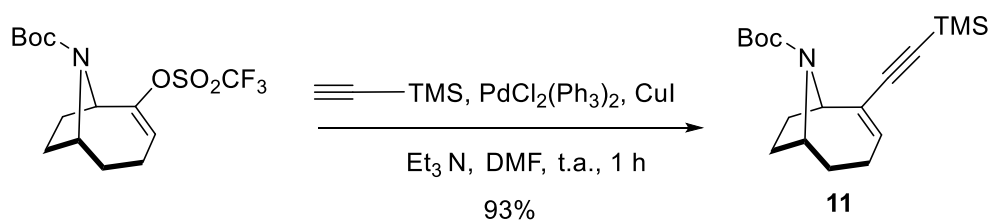
Esquema 7. Obtención del enol triflato a partir del compuesto carboxílico (**9**).

La formación del enol triflato (**10**) se logró con excelentes rendimientos, superiores al 90% al final del proceso cromatográfico de purificación. La formación del enol triflato (**10**) se verificó favorablemente después de analizar sus datos espectroscópicos de RMN, donde resalta la presencia de las señales respectivas del protón del doble enlace conjugado al grupo triflato a un desplazamiento de δ 5.78/5.74 ppm en el espectro de 1H , la formación del triflato buscado se confirmó realizando de manera adicional un experimento

desacoplado de RMN ^{19}F donde se logró apreciar una señal hacia δ -74.6 ppm, correspondiente al átomo de flúor del grupo triflato.^{64,65}

Toda vez caracterizado el enol triflato (**9**), se procedió a continuar con la incorporación del resto metilcarbonílico de la anatoxina-a, y la etapa sintética siguiente fue la introducción de una funcionalidad química que permitiera continuar con ese fin. Existen en la literatura diversas estrategias sintéticas para alcanzar dicho fin, se seleccionó una estrategia química que se basa en el remplazo del grupo triflato por un grupo acetileno terminal; proceso sintético bastante explotado en la síntesis orgánica debido a que, una vez incorporado el brazo alquinílico a través de la formación de un nuevo enlace C-C, la hidratación de éste conduciría eventualmente al deseado grupo acetilo característico de la biotoxina.

La incorporación del grupo etinilo implicó dos etapas. La primera de estas consistió en realizar un acoplamiento químico entre enol-triflato (**10**) y el alquino terminal trimetilsilil acetileno, con cantidades catalíticas $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ como fuente de Pd(0) y Ioduro de Cobre como cocatalizador.^{66,67} La reacción se montó empleando trietilamina como base nitrogenada y dimetilformamida (DMF) como medio de reacción a temperatura ambiente, condiciones que favorecen la formación de un enlace carbono-carbono entre un alqueno y un acetileno terminal.⁶⁸ La condiciones de reacción se mantuvieron durante 1 h, procedimiento que permitió obtener el enino trimetilsililado (**11**) con excelentes rendimiento del orden del 93%.



Esquema 8. Obtención del enino conjugado trimetilsililado (**11**).

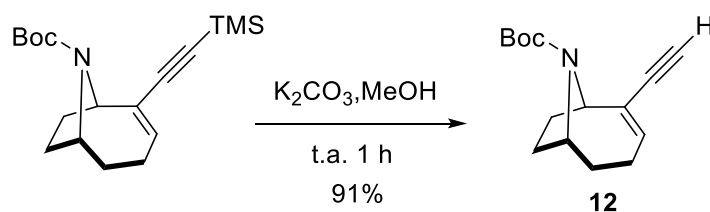
Los espectros de RMN realizados al producto obtenido de esta etapa sintética, corroboran la obtención del alquino esperado, destacándola señal observada en el espectro de ^1H correspondiente al protón olefínico conjugado hacia 6.13 ppm y el singulete a δ 0.17 ppm de los 9 protones equivalentes del grupo trimetilsililo de la molécula,

adicionalmente las señales a 106.4 y 92.4 ppm correspondientes a los carbonos del triple enlace en el espectro de RMN de ^{13}C .

Una vez alcanzada la obtención del alquino trimetilsililado (**11**), la introducción del grupo etinilo se completó sometiendo al compuesto (**11**) a un proceso de desililación. Para ello, existen diversas estrategias reportadas en la literatura, que emplean bases fuertes o sales de plata.^{69,70,71}

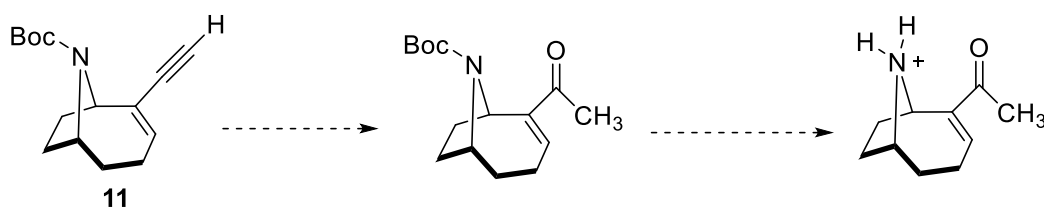
El proceso de desililación se realizó por hidrólisis alcalina empleando una solución metanólica de K_2CO_3 a temperatura ambiente; condiciones de reacción suaves que dieron lugar al enino conjugado (**12**) con rendimientos casi estequiométricos luego de 1h de reacción (**Esquema 9**).^{72,73}

El espectro de RMN de ^1H del enino conjugado (**12**), evidenció la ausencia de la señal de los protones correspondiente a los metilos del grupo trimetilsililo del producto de partida, y la aparición de una nueva señal que integró a un protón hacia δ 2.86-2.89 ppm del protón del alquino terminal.



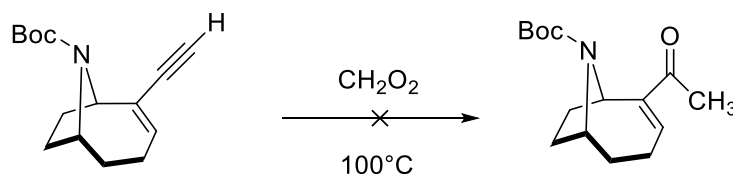
Esquema 9. Obtención del enino conjugado (**12**).

En concordancia con el **esquema 10** planteado para la obtención de la biotoxina, la etapa de síntesis siguiente consistió en llevar al enino conjugado (**12**) a una reacción de hidratación del enino terminal y completar la formación de la *Boc*-anatoxina-a predecesora de la anatoxina-a.



Esquema 10. Estrategia para acceder de anatoxina-a a partir del enino conjugado (**12**).

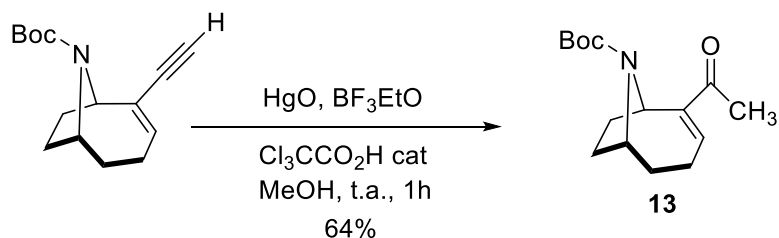
Para llevar a cabo la etapa de hidratación antes mencionada, se aplicaron varios procedimientos descritos en la literatura para la formación regioselectiva del sistema metilcarbonílico α , β -insaturado; entre éstas se ensayó la hidratación del triple enlace de (**12**), mediante metodologías reportadas en la literatura que permiten formar metilcetonas de alquinos terminales.^{74,75} La primera aproximación se realizó sometiendo a un tratamiento al enino conjugado (**11**) con ácido fórmico a una temperatura de 100°C, donde el ácido fórmico seco actúa como disolvente a temperatura de reflujo y a la vez como donador de una molécula de agua, procedimiento que debería conducir a la hidratación del acetileno terminal del enino (**11**) accediendo a un enol formiato (**Esquema 12**).^{76,77}



Esquema 11. Hidratación del enino conjugado (**12**) empleando ácido fórmico.

Sin embargo, para nuestro caso, los diferentes ensayos realizados bajo el procedimiento descrito, no fructificaron; apenas sí se observaba por cromatografía de capa fina, la formación incipiente de un posible producto de hidratación.

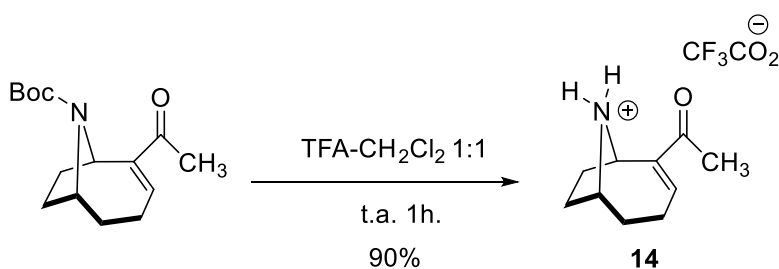
Finalmente, la hidratación del enino conjugado (**12**) que permitiría la construcción del brazo lateral metilcarbonílico α , β -insaturado característico de la anatoxina-a, se consiguió a través del empleo de sales de mercurio en condiciones ácidas (Método de Hennion-Nieuwland).^{78,79} El producto de partida, se trató con una mezcla metanólica de HgO y BF₃EtO con cantidades catalíticas de ácido tricloroacético a temperatura ambiente durante 1 hora de reacción. El rendimiento alcanzado para la generación del producto de hidratación, la Boc-anatoxina-a (**13**), fue del orden del 64%.



Esquema 13. Hidratación del enino conjugado (**12**), empleando condiciones de Hennion-Nieuwland

La formación del resto metil carbonílico característico de biotoxina en (**13**) se corroboró mediante experimentos de RMN de ^1H de la molécula, donde el protón olefínico presentó un desplazamiento a δ 6.83 ppm, debido al desapantallamiento derivado del sistema π conjugado que presenta la molécula; adicionalmente se constataron las señales a δ 142.4 y 141.1 ppm, asignadas a los carbonos vinílicos del biciclo (C2 y C3) y hacia δ 197.6 ppm la señal del carbono carbonilo buscado, en los experimentos de RMN de ^{13}C .

Con la Boc-anatoxina-a (**13**) en mano, se estuvo en condición de acceder a la cianotoxina racémica realizando un proceso de desprotección del grupo amino puente por eliminación del grupo Boc. El tratamiento para ello, consistió en realizar una hidrólisis ácida del grupo Boc protector, empleando una disolución equimolar de ácido trifluoroacético y CH_2Cl_2 a temperatura ambiente durante 60 min de reacción.^{81,82} La obtención del racemato de la sal anatoxina-a (**14**) se consiguió con un rendimiento del 90% (**Esquema 14**).



Esquema 14. Obtención del trifluoroacetato de anatoxina-a (**14**).

La obtención del trifluoroacetato de anatoxina-a (**14**) se corroboró, mediante el análisis de sus espectros de RMN de ^1H , donde se constató la desaparición de los singletes de los metilos del grupo Boc hacia campos altos del espectro y la conservación de los sistemas de acoplamiento característicos de la molécula se apreció el desdoblamiento de los protones

del metilo lateral como un singlete hacia 2.29 ppm. Adicionalmente se observó la señal conservada hacia a 196.8 ppm del carbono carbonílico en los experimentos de RMN de ^{13}C .

4.2 Ensayos de derivatización de la (\pm)-anatoxina-a

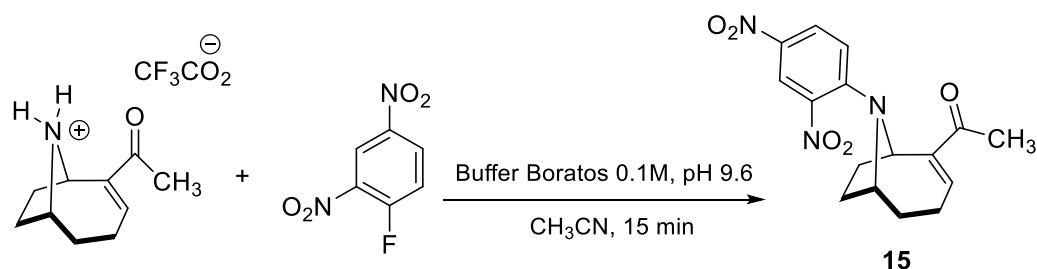
En el momento de planear un análogo estructural (hapteno) de la anatoxina-a para emplearlo para la generación de anticuerpos hacia la biotoxina, se tomaron en cuenta los diversos reactivos que han sido utilizados como agentes derivatizantes en técnicas espectroscópicas como el HPLC y GC, y que han sido mencionados con anterioridad. Uno de ellos y que ha sido utilizado mayor número de veces para dicho proceso en la biotoxina es el 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (*NBD-F*), su alta eficacia como agente derivatizante de esta biotoxina se debe a que es altamente reactivo hacia aminas primarias y secundarias, dando paso a la formación de compuestos derivados capaces de fluorescer.^{83,84} Tomando en cuenta la reactividad, un reactivo muy relacionado con *NBD-F* es el 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (*2,4-FDNB*) conocido como reactivo de Sanger, este tiene la capacidad de reaccionar con aminas como es el caso de la anatoxina-a.⁸⁵

Aunque el reactivo de Sanger no ha sido empleado como agente derivatizante de anatoxina-a en metodologías cromatográficas, creímos sería idóneo como agente derivatizante en el ámbito de la implementación de un inmunoensayo hacia un análogo estructural de la biotoxina.

Con el objetivo de estimar la efectividad del reactivo de Sanger para derivatizar a la anatoxina-a en fase acuosa, se llevaron a cabo reacciones preliminares para evaluar comportamiento del *2,4-FDNB* hacia la biotoxina en condiciones de laboratorio.

En las pruebas iniciales de derivatización se sometió a reaccionar al trifluoroacetato de anatoxina-a (**14**), con 5.0 equivalentes molares del reactivo de Sanger en buffer de boratos 0.1 M a pH 9.6 a temperatura ambiente, monitoreándose el desarrollo de la derivatización por HPLC de fase inversa, tal como se precisa en el apartado experimental (**sección 6.3.1**). Las condiciones antes mencionadas permitieron acceder al compuesto AN-DNB (**15**), como producto de la reacción tipo SNA entre la sal de anatoxina-a y el *2,4-FDNB*, con el inconveniente de llevarse a cabo de manera lenta. Con la finalidad de incrementar la velocidad de la reacción, se sustituyó el medio de reacción por una mezcla 1:1 de tampón

boratos y acetonitrilo, lo que permitió que la reacción se completara prácticamente en 15 minutos (**Esquema 15**).

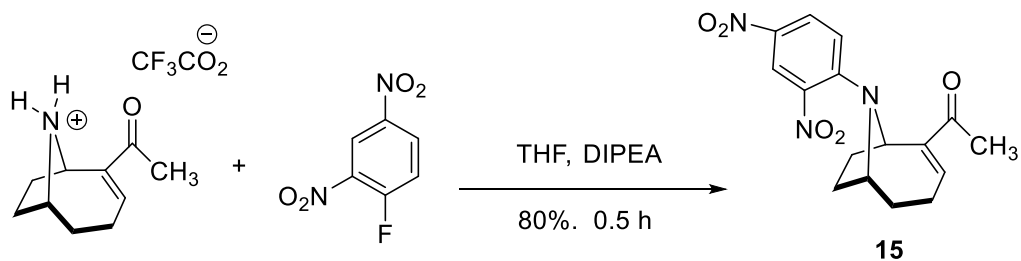


Esquema 15. Producto de derivatización AN-DNB (**15**).

Pruebas adicionales expusieron que era posible disminuir hasta un 10% la cantidad de acetonitrilo empleado en el medio de reacción sin que se presentaran cambios significativos en los tiempos de reacción. Esto último es especialmente importante, debido a que bajo dichas condiciones es posible solubilizar anticuerpos y proteínas y por tanto, se pueden emplear para la implementación de un inmunoensayo sin tener que someter a dilución la muestra problema.

Como consecuencia de los ensayos de derivatización de la anatoxina-a con el 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno, se concluyó que este reactivo podría ser viable como agente derivatizante en la implementación de un inmunoensayo de anatoxina-a que se basaría en la previa derivatización de la biotoxina.

Ahora bien, el paso siguiente consistió en derivatizar la sal de anatoxina-a en fase orgánica con el objetivo de tener producto AN-DNB (**15**) para su caracterización. Esta etapa consistió en efectuar una reacción de Sustitución Nucleofílica Aromática (S_NA) por tratamiento de la sal de anatoxina-a (**13**) con DIPEA a 0°C empleando THF anhidro como disolvente. Luego de liberar la amina secundaria libre del material de partida, se adicionaron 1.4 equivalentes del reactivo DNFB. El seguimiento de la reacción por CCF indicó que en escasos 15 a 20 minutos, la reacción había finalizado con un rendimiento del 80% de producto purificado (**Esquema 16**).



Esquema 16. Derivatización de anatoxina-a en condiciones de laboratorio.

La caracterización espectroscópica del producto AN-DNB (**15**) por RMN de ^1H mostró el desdoblamiento como un doblete del protón aromático H3 a δ 8.49 ppm con una $J = 2.8$ Hz característica de un acoplamiento en *meta* con H5. A su vez, H5 a δ 8.11 ppm se desdobló como un doblete por su acoplamiento en *orto* con H6 y *meta* con H3 con $J = 9.5$ y 2.7 Hz, respectivamente. El doblete de H6 se encontró ligeramente a campo más alto, δ 6.79 ppm, con la $J = 9.7$ Hz por su acoplamiento en *orto* con H5.

4.3 Síntesis de hapteno de anatoxina-a derivatizada

4.3.1 Síntesis del hapteno ATX-d

Con base en los resultados anteriores, estimamos que era posible obtener anticuerpos apropiados para la identificación del derivado AN-DNB (**15**) empleando como hapteno una molécula que comparta características estructurales con este, la cual se muestra en la **Figura 9**, hapteno ATX-d. Es evidente que la estructura molecular del hapteno ATX-d, que está conformado por las agrupaciones nitrobenzono y sulfonamida, sería capaz de inducir respuesta inmune hacia el derivado AN-DNB y en consecuencia tendría la capacidad de incitar la producción de anticuerpos con alta especificidad y selectividad por este.

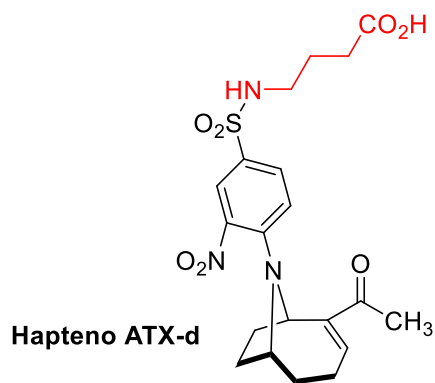
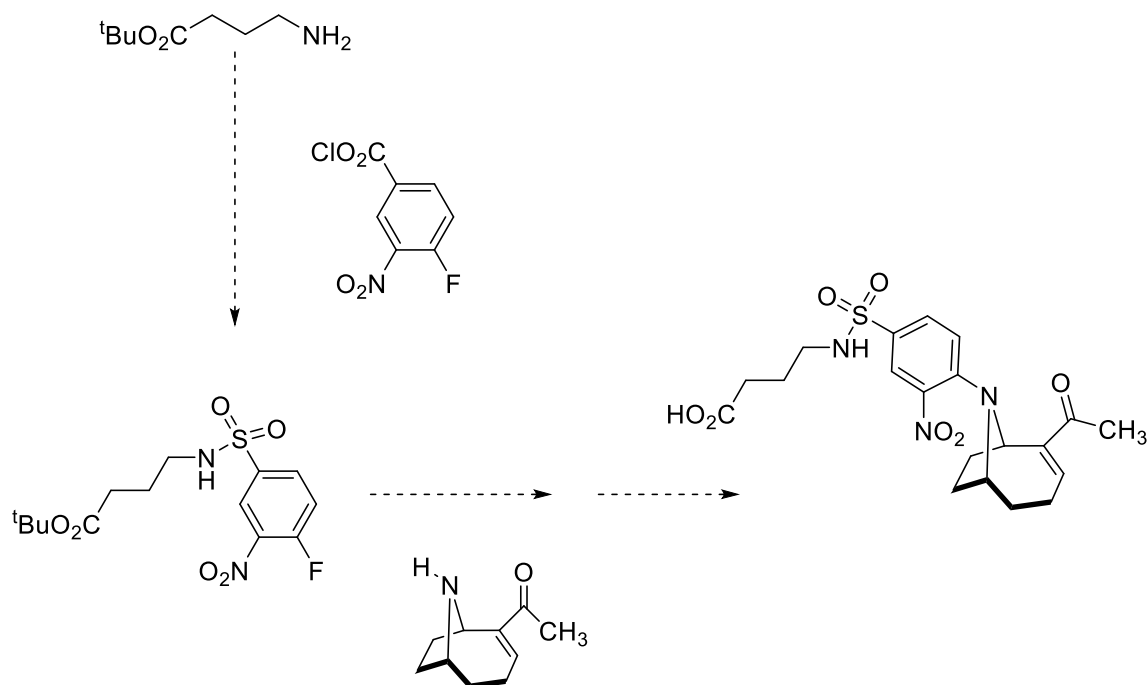


Figura 9. Hapteno ATX-d, análogo estructural de la anatoxina-a derivatizada con el reactivo de Sanger.

La obtención del hapteno ATX-d, se fundamentó en la obtención de una sulfonamida de arilo que estructuralmente estaría conformada por una cadena hidrocarbonada con un grupo carboxilato terminal y un grupo funcional adecuado en el anillo aromático que permita la unión en la estructura de la biotoxina en el nitrógeno del anillo bicíclico mediante una reacción SNA (**Esquema 17**).

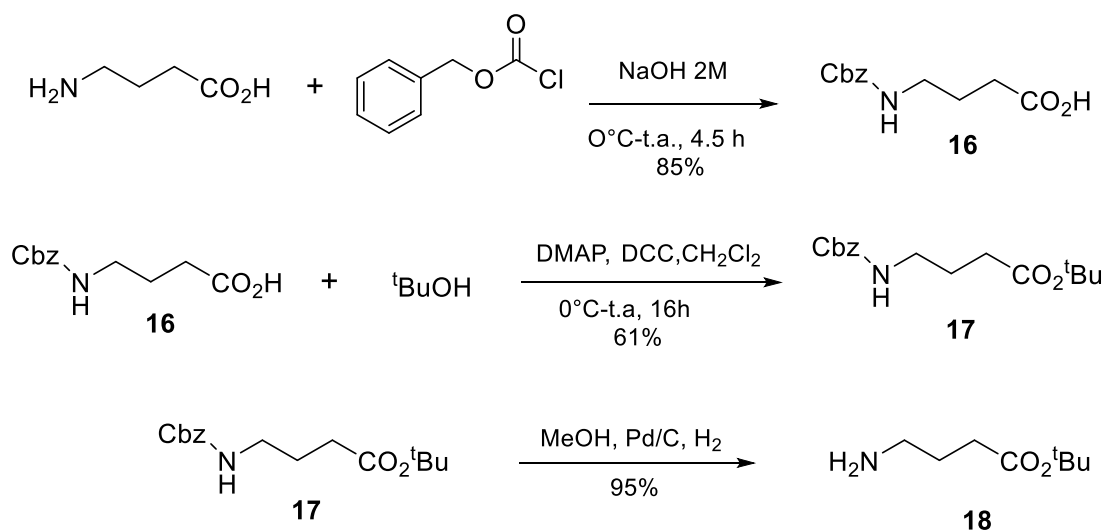


Esquema 10. Esquema de síntesis para acceder al hapteno de anatoxina-a derivatizada (ATX-D).

La obtención de dicha sulfonamida se realizaría luego de una reacción de amidación del 4-fluoro-3-nitrobenzensulfonilo comercial y un derivado del ácido 4-aminobutírico.

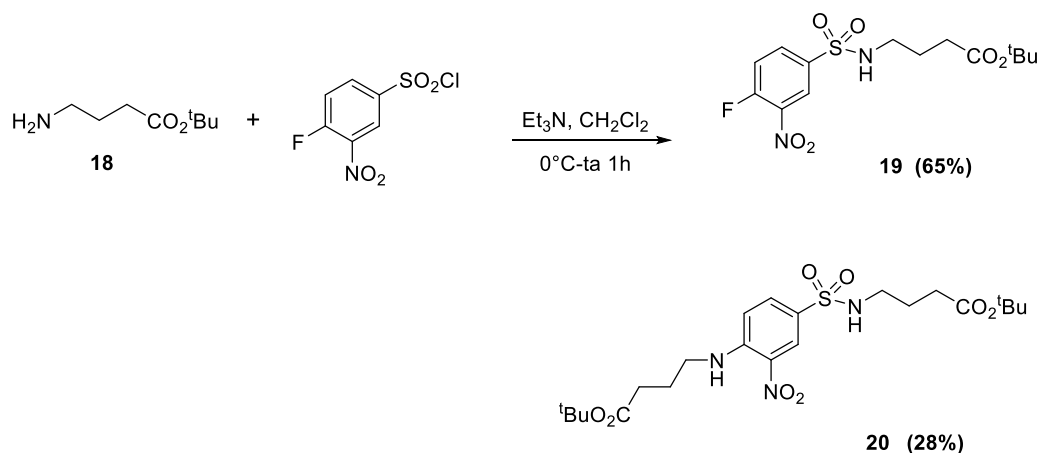
La preparación de la aril-sulfonamida comenzó con la elaboración del brazo hidrocarbonado funcionalizado con un carboxilato del hapteno ATX-d buscado. El brazo lateral se buscaría a través del ácido γ -aminobutírico debido a que por un lado presenta el carboxilato y por otro, un grupo amino libre que eventualmente puede formar la sulfonamida aromática. El acondicionamiento del brazo lateral, inició con la protección del carboxilato del ácido 4-aminobutírico en forma de un éster *tert*-butílico (**ver esquema 17**). Para ello, se precisó primero proteger el grupo amino libre del ácido 4-aminobutírico de partida con un grupo carboxibencilo (Cbz); se empleó cloroformiato de bencilo y una disolución cáustica de NaOH 2 M a 0 °C. Después de 4.5 h de reacción se generó el producto

N-Cbz protegido del ácido (**16**) con un rendimiento del 85%. Luego, el carboxilato de (**16**) se llevó a esterificación con el alcohol *terc*-butílico empleando la carbodiimida DCC para activar el carboxilato bajo catálisis alcalina promovida por el empleo de DMAP en CH₂Cl₂. El correspondiente éster *t*-butílico N-Cbz protegido (**17**) se generó después de 16 h de reacción con un rendimiento del producto purificado del orden del 61%. Finalmente, la eliminación del grupo protector Cbz del amino terminal en el éster *terc*-butílico (**17**) se realizó por hidrogenólisis catalítica empleando Pd/C en disolución metanólica y generar el producto (**18**) con un 95% de rendimiento.



Esquema 17. Preparación del brazo espaciador del hapteno ATX-d.

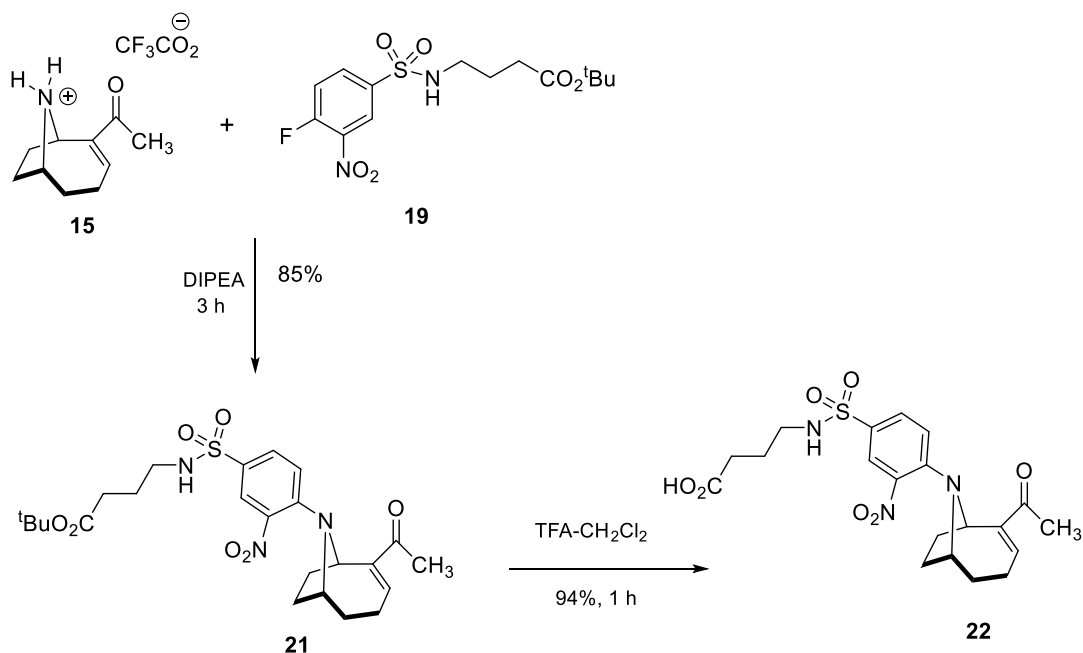
El acceso químico a la aril-sulfonamida (**19**), tal como se ilustra en el **esquema 18**, se llevó a cabo mediante la preparación de una disolución de la amina (**18**) y el cloruro de 4-fluoro-3-nitrobenzenosulfonilo en medio básico a 0°C, condiciones que proporcionaron la sulfonamida (**19**) como producto principal con 65% de rendimiento. Adicional a la sulfonamida aromática (**19**), también se formó un de competencia como producto secundario de adición-eliminación en el anillo aromático por desplazamiento del flúor en porcentaje cercano al 28% del producto ya purificado (**20**); reacción que se ha reportado como fácil de suscitarse con sustratos con características estructurales susceptibles de ataques nucleofílicos sobre la misma molécula.^{86,87}



Esquema 18. Línea sintética para acceder a la sulfonamida aromática precursora del hapteno ATX-d.

Obtenido el precursor estructural (**19**) del hapteno ATX-d planteado, se buscó ahora, acoplar por medio de una reacción tipo SNA por desplazamiento del átomo de flúor del derivado (**19**) con la amina secundaria puente de la anatoxina-a en condiciones básicas de reacción (**Esquema 19**)^{88,89}.

La síntesis del hapteno ATX-d se completó por tratamiento de la sal del ácido trifluoroacético de la anatoxina-a (**14**) y la arilsulfonamida (**19**) con *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) como base nitrogenada para liberar de la anatoxina-a el grupo amino nucleofílico. Esta reacción se montó en tetrahidrofurano anhidro por 3 h a temperatura ambiente, para que finalmente se obtuviera el hapteno ATX-d con el carboxilato del brazo espaciador protegido como un éster *terc*-butílico (**21**) con rendimiento del orden del 85%.



Esquema 19. Síntesis del hapteno ATX-d como sal de ácido trifluoroacético.

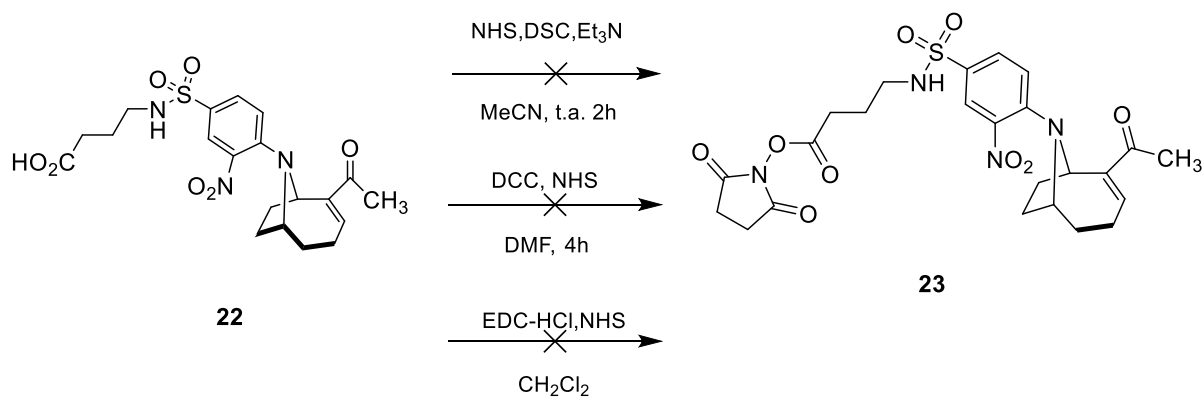
Tal como se ilustra en el **esquema 19**, acceder al hapteno derivatizado ATX-d (**22**), solo requirió la hidrólisis ácida para la remoción del grupo éster *terc*-butílico por tratamiento de (**21**) con una solución equimolar de TFA y CH₂Cl₂ a temperatura ambiente y agitación suave; procedimiento que arrojó un rendimiento del 94% del hapteno ATX-d (**22**). El rendimiento sintético global para la obtención del hapteno ATX-d (**22**) a partir del amino-éster (**18**) en tres etapas sintéticas subsecuentes descritas fue del 57%.

4.4 Activación de hapteno de anatoxina-a ATX-d

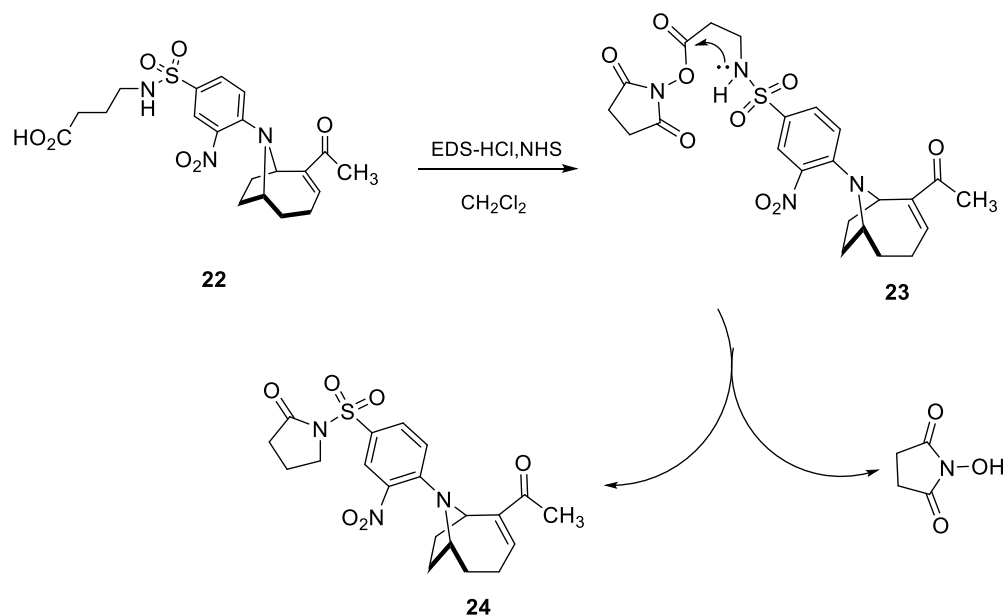
Toda vez sintetizado el hapteno ATX-d que mimetiza a la biotoxina derivatizada con el FDNB (reactivo de Sanger) y en función que, dicho hapteno se conjugaría eventualmente de manera covalente a los grupos –NH₂ de las proteínas formando una amida, se decidió activar el grupo carboxilo terminal presente en la estructura del hapteno. La activación del carboxilato por el método de formación de un éster activo, es una estrategia química que incrementa la electrofilia del carbono carbonílico del carboxilato por la incorporación de una funcionalidad química más electronegativa, adyacente al carbono electrofílico que, arrastra la densidad electrónica hacia ella y favorece así la entrada de una especie nucleofílica.^{90,91,92}

Algunos de los procesos más utilizados para este fin emplean un agente activante, que comúnmente es una carbodiimida como la DCC (*N,N'*-diciclohexilcarbodiimida), la EDC-HCl (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) o bien, empleando una carbodiimida con la capacidad de disolverse en medio acuoso, en sinergia con la *sulfo-NHS*.⁹³

La síntesis del éster activo del hapteno ANTX-D (**22**) se abordó empleando diferentes carbodiimidas, como se muestra en el **Esquema 20** procesos que de manera desafortunada no condujeron a la formación del éster activo buscado, en lugar de este se formó un compuesto por reacción intramolecular, una lactama sulfonilica (**Esquema 21**), la cual se confirmó tras analizar sus espectros de RMN en los que se presentan las señales que corresponden a los métenos del anillo lactámico hacia δ 3.86 ppm del NCH₂, δ 2.45 ppm del OCH₂ y δ 2.09 ppm del OCH₂N.



Esquema 20.- Procedimientos de activación del hapteno ATX-d



Esquema 21. Formación de la sulfonil-lactama

La propuesta de formación de la lactama (**24**) en la estrategia sintética de activación, se debe a que inicialmente se formó un éster de N-hidroxisuccinimidilo (**23**), este sufre una reacción intramolecular, debido a que el carbonilo del éster activo experimenta un ataque nucleofílico por el nitrógeno del grupo sulfonamida, procedimiento favorecido por las condiciones básicas de reacción. Fenómeno que se ha observado en sistemas funcionalmente relacionados.^{94,95,,}

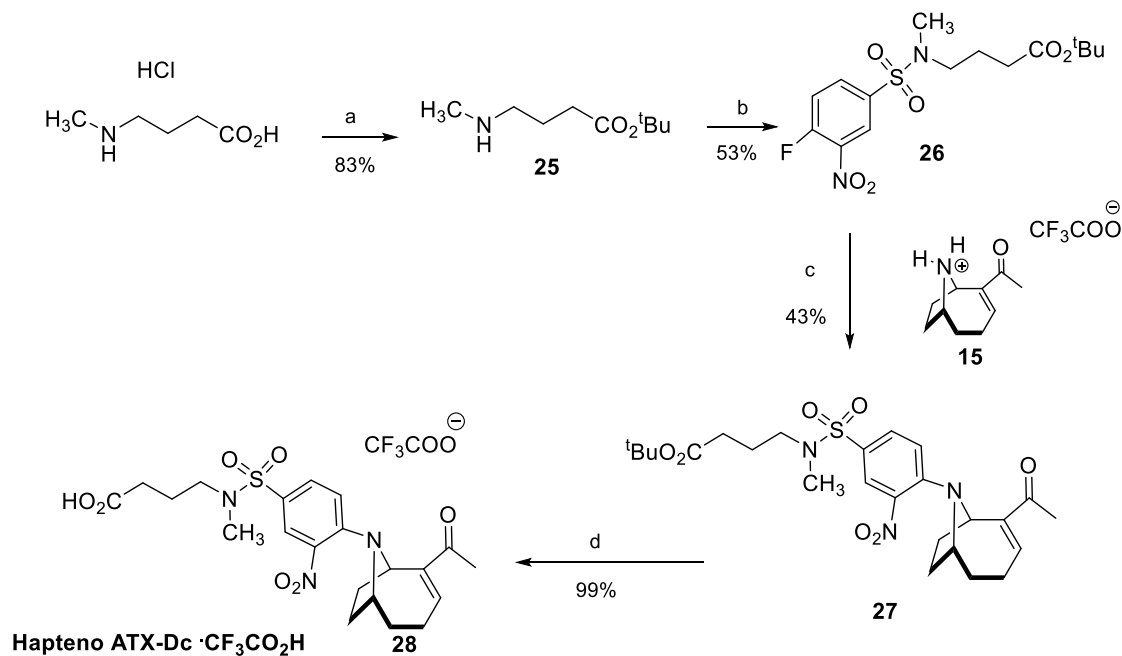
4.5 Preparación del nuevo hapteno de anatoxina-a derivatizada.

4.5.1 Síntesis del hapteno ATX-dc

Ante la problemática para acceder al éster activo del hapteno (**22**), se decidió retomar la formación del hapteno modificándolo de manera estructural, que permita su activación. La estrategia planteada para dicho fin, consistió en obtener un producto N-metilado (**23**), con un cambio conformacional, que no comprometería el potencial del hapteno de imitar a la biotoxina derivatizada con el NBDF, a la vez que impediría el proceso de reacción intramolecular observado previamente al disminuir la nucleofilia del nitrógeno sulfonamídico.

La estrategia química para acceder al nuevo hapteno de la anatoxina derivatizada, el hapteno ATX-dc (**25**), se realizó de manera similar a la planteada para obtener el hapteno ATX-d (**22**), solo que partiendo de un aminoácido N-metilado (**Esquema 21**).

Para alcanzar dicho fin, se usó como material de partida el reactivo comercial al clorhidrato del ácido 4-(N-metilamino) butanoico, el cual se sometió a reacción con trifluoroboroeterato ($BF_3 \cdot Et_2O$) y acetato de *tert*-butilo en exceso por 1 h, proceso que derivó en el correspondiente éster *tert*-butílico. El resto de las transformaciones que dieron lugar al hapteno ATX-dc, se realizaron de manera idéntica a la síntesis anteriormente descrita de ATX-d. El rendimiento global del hapteno ATX-dc fue del 18% en cuatro etapas sintéticas partiendo del N-metil aminoácido comercial de partida.



(a) $\text{CH}_3\text{CO}_2^t\text{Bu}$, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, 9°C , 1h; (b) FNBSO_2Cl , Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C -t.a.;
(c) DIPEA ; THF , t.a., 5h; (d) $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1, t.a. 1h.

Esquema 22. Ruta de síntesis para la obtención del hapteno ATX-dc.

Los datos espectroscópicos de RMN hapteno ATX-dc (**28**), mostraron características señales prácticamente idénticas a las registradas para el hapteno ATX-d (**22**), con excepción de una señal que presenta un desplazamiento a δ 2.79 ppm en RMN de ^1H y a δ 34.8 ppm en RMN de ^{13}C , atribuible al grupo metilo sobre el nitrógeno de la agrupación sulfonamida.

La obtención del hapteno ATX-dc (**28**), análogo estructural de la anatoxina-a derivatizada con el reactivo de Sanger, cierra la primera etapa de investigación conducente a la obtención de anticuerpos de alta sensibilidad hacia anatoxina-a derivatizada en matrices acuosas.

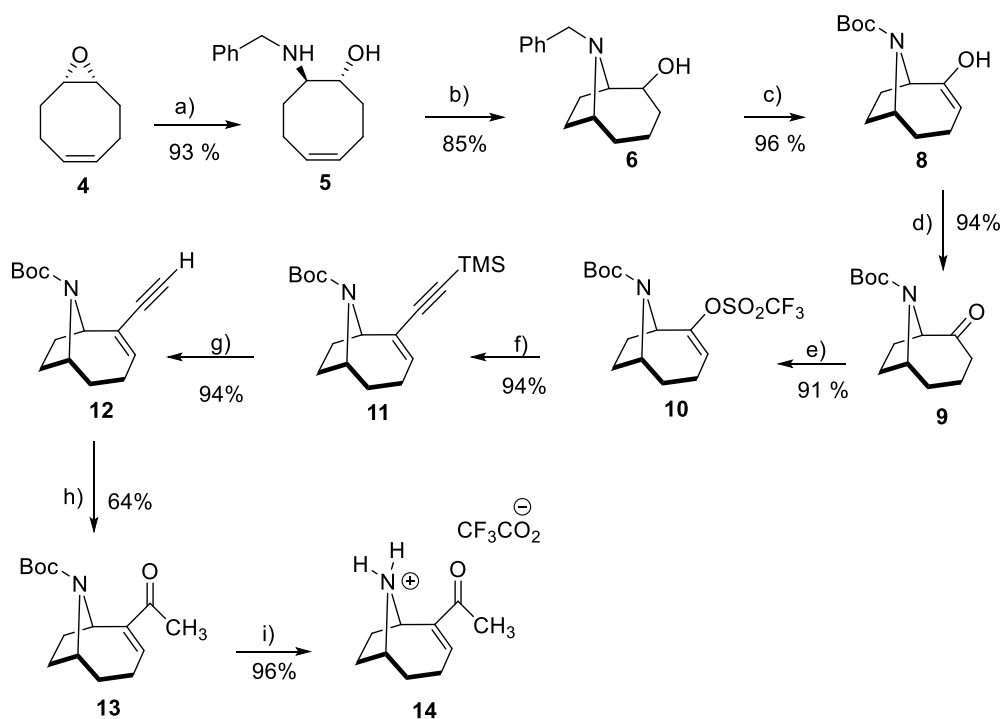
4.6. Perspectiva de trabajo

Toda vez que se alcanzaron los objetivos del primer ciclo de trabajo, dirigido a la obtención de anticuerpos de alta sensibilidad hacia un analito derivatizado, la cianotoxina anatoxina-a; se pretende obtener bioconjugados proteicos, inmunorreactivos esenciales que conducirán a realizar, por un lado, un protocolo de inmunización en animales de experimentación que, eventualmente permitirá acceder a sueros policlonales, y por aplicación de tecnología de generación de hibridomas, a anticuerpos monoclonales. Por otro lado, los bioconjugados proteicos también se emplearán como inmunorreactivos para el desarrollo de una plataforma inmunoanalítica del tipo ELISA.

5. CONCLUSIONES

Este trabajo de investigación fue orientado a obtener un análogo estructural o hapteno de la biotoxina anatoxina-a sometida a un proceso de derivatización, meta a la cual se logró acceder través de los siguientes objetivos particulares logrados:

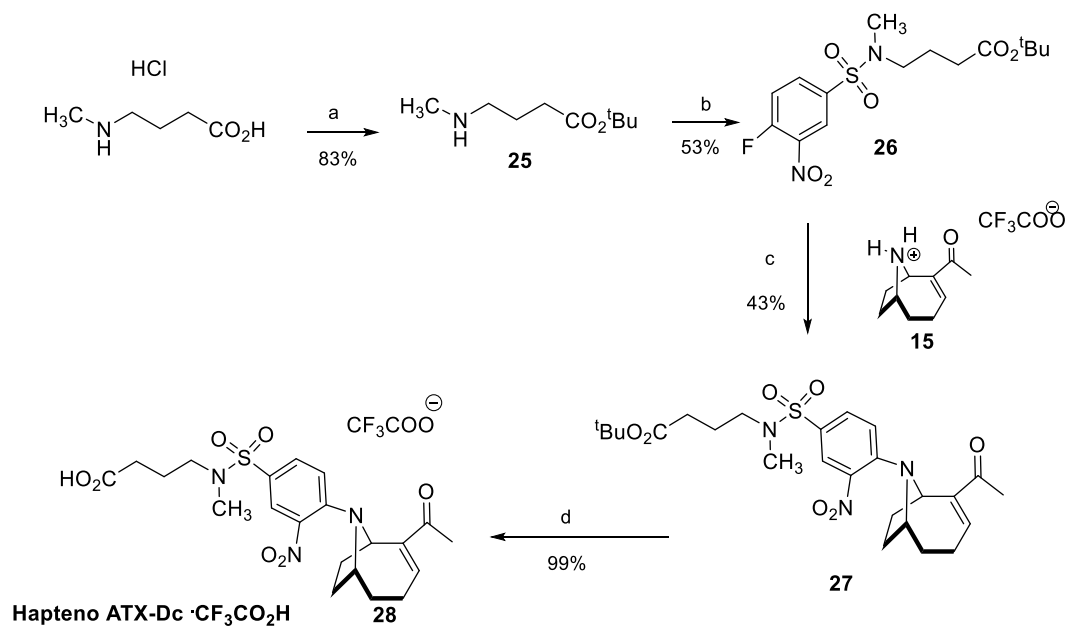
- a) La obtención de anatoxina-a racémica como sal del ácido trifluoroacético, se llevó a cabo en 9 etapas sintéticas obteniendo un rendimiento global alrededor del 32%, todos los compuestos intermedios obtenidos así como la (\pm)-anatoxina-a se caracterizaron por RMN ^1H , ^{13}C y experimentos de 2D-RMN.



a) BnNH_2 , MeOH, MW, 110 °C, 22 h. b) i) $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, THF/ H_2O , 0 °C, 1 h; ii) NaOH 3M, NaBH_4 c) $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, Boc_2O , AcOEt, H_2 24h
 d) DMP, CH_2Cl_2 , t.a., 4h. e) i. KHMDS, THF, -78 °C; ii. Reactivo de Comins f) Trimetilsililacetileno, $\text{PdCl}_2(\text{Ph}_3)_2$, CuI, Et_3N , DMF, t.a., 1 h.
 g) K_2CO_3 , MeOH, t.a. 1h. h) HgO , BF_3EtO , $\text{Cl}_3\text{CCO}_2\text{H}$ cat, MeOH, t.a., 1h. i) TFA- CH_2Cl_2 1h., t.a. 1h.

- b) El proceso de derivatización de la anatoxina-a con el 1-fluoro-2,4-dinitrobeneno, resultó en ésta etapa de investigación ser una estrategia exitosa. El proceso permitió la obtención de la biotoxina derivatizada con rendimientos del orden del 80% en periodos de reacción relativamente cortos de alrededor de 30 minutos. Lo que concluye que el reactivo de Sanger es altamente reactivo e idóneo como agente derivatizante hacia la biotoxina.

c) La obtención del hapteno ATX-dc, se preparó en cuatro etapas de sintéticas con un rendimiento global alrededor del 18.7 %.



(a) CH₃CO₂^tBu, BF₃·Et₂O, 9°C, 1h; (b) FNBSO₂Cl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C-t.a.;
 (c) DIPEA; THF, t.a., 5h; (d) TFA/CH₂Cl₂ 1:1, t.a. 1h.

6. EXPERIMENTAL

6.1 Reactivos, aparatos y técnicas generales

A los compuestos sólidos que se obtuvieron se les determinó el punto de fusión (Pf) empleando un equipo Mel-Temp marca Thermo Scientific y se reportan sin corrección.

Los espectros IR-ATR de los productos obtenidos se realizaron en un espectro Varian Modelo 640 FT-IR. Su intensidad se definió como *d* (débil), *m* (media) y *f* (fuerte).

La confirmación de cada uno de los productos sintéticos se realizó por Resonancia magnética nuclear (RMN ^1H , RMN ^{19}F y RMN ^{13}C), empleando disolventes deuterados. El desplazamiento químico (δ) se expresa en ppm relativas al TMS en ^1H y ^{13}C y en relación al CFCl_3 para ^{19}F , se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Avance DRX-400MHz. La asignación de señales de ^1H y ^{13}C de cada producto se atribuyeron gracias a experimentos 2-D RMN. Los patrones de acoplamiento se asignaron como: *singulete* (*s*), *doblete* (*d*), *doble de dobles* (*dd*), *doble de dobles doblado* (*ddd*), *triplete* (*t*), *doble triplete* (*dt*), *cuartete* (*c*), *quintuplete* (*quint*), *multiplete* (*m*).

La masa de los productos de cada reacción se determinó por espectrometría de masas de alta resolución en un espectrómetro de masas con trampa de iones marca Varian modelo 500-MS. Los resultados obtenidos se expresaron como relación masa/carga (*m/z*).

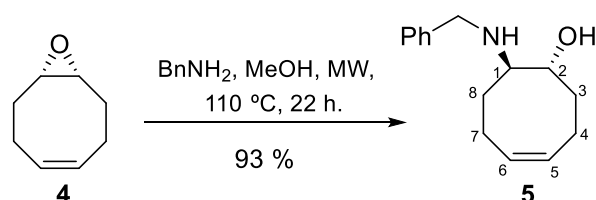
A los solventes orgánicos utilizados en cada una de las reacciones se les eliminó la humedad antes de emplearlos según los procedimientos rutinarios de laboratorio. Los reactivos empleados fueron marca Sigma Aldrich. La manipulación de reactivos sensibles al aire y/o humedad se realizó con atmósfera controlada de N_2 anhidro, las cánulas, el material de vidrio y las jeringas utilizadas fueron secados en estufa a $130\text{ }^\circ\text{C}$.

Las reacciones que necesitaron asistencia de microondas se llevaron a cabo en un reactor de microondas marca Anton Paar™ modelo Monowa Edu.

La evolución de las diferentes reacciones se monitorearon por CCF empleando placas de gel de sílice con indicador de fluorescencia Merck 60 F254 de 0.25 mm. Para observar los productos en CCF se utilizaron reveladores como: molibdato cérico amónico acuoso, solución etanólica de ácido fosfomolibdico y empleando lámpara de luz UV de 254nm.

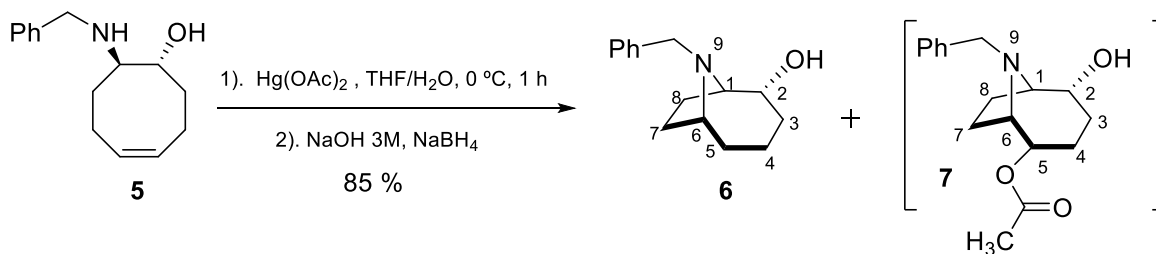
La separación y purificación de los productos de cada reacción se hizo por columna cromatográfica en columna tipo flash con gel de sílice Merck 60 (230-400 mesh) como fase estacionaria, utilizando mezcla de solventes indicada según el caso, como fase móvil.

6.2 Síntesis de anatoxina-a



***rac*-(1*R*,8*R*,*Z*)-8-(Bencilamino)ciclooct-4-enol(5)**. Se preparó una disolución de 303 μ L (2.4mmol) del epóxido **4** y 534 μ L (4.89 mmol) de bencilamina en 4.46 mL de MeOH con agitación y asistida por microondas. La reacción se mantuvo por un periodo de tiempo de 22 h a 110 °C. Concluyendo el tiempo señalado, se le retiro el disolvente y el residuo obtenido fue sometido a un proceso de cristalización en frio con 15 mL Hexano, proceso =que proporciono un sólido de color blanco. El amino-alcohol (**5**) se obtuvo por filtración (359 mg, 70%). Al sobrenadante obtenido del filtrado se le eliminó el disolvente y se purificó mediante columna cromatográfica, con una mezcla eluyente de CHCl₃ y 5% de metanol, esto permitió obtener amino-alcohol (**5**) adicional como un sólido blanquecino (522 mg, 23%), proceso permitió elevar el rendimiento de (**5**) hasta un 93%.

Datos espectroscópicos de 5: pf 71°C, IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3281d, 300d,2939d, 2907d, 2838d,1644d, 1497d, 1449m, 1012m, 973m,877d, 735.2f,696f, RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ =7.41–7.20 (*m*), 5.66 y 5.51 (*m*), 3.81 y 3.67 (*m*), 3.35 (*ddd*), 2.62 (*ddd*), 2.39–2.09 (*m*), 2.24 (*m*), 2.16–1.44 (*m*), 2.05-1.41 (*m*); RMN-¹³C (75 MHz) δ =140.1, 130.7, 128.8, 128.2, 128.0, 127.3, 72.1 , 60.4, 53.1, 34.6, 32.7, 23.4, 23.1 **EMAR** (ES) *m/z* calculada de C₁₅H₂₁NO [M+H]⁺ 231.16, encontrada 231.19.



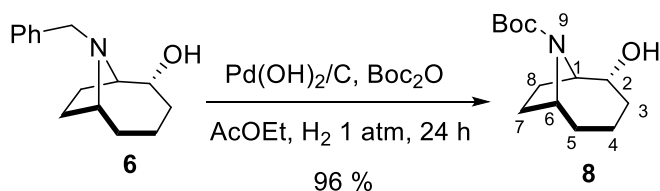
***rac*-(1*R*,2*R*,6*R*)-9-Bencil-9-azabicyclo[4.2.1]nonan-2-ol(6).** Se pesaron 164mg (0.5146mmol) de Hg(OAc)₂ posteriormente se adicionaron 2.6mL de una disolución THF-H₂O (1:1) a una temperatura de 0°C con agitación constante. Posteriormente sobre la mezcla de reacción se adicionó lentamente por goteo una disolución de 100 mg (0.434 mmol) del alcohol (5) en 857µL de tetrahidrofurano. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 20 min, una vez transcurrido dicho tiempo se adicionaron 512 µL de una disolución 3 M de hidróxido de sodio, en seguida se agregó una disolución de 19.7 mg (0.519 mmol) de NaBH₄ en 1.1 mL de NaOH 3 M. Las condiciones de reacción se mantuvieron por 15 min controlando la temperatura a 0°C y 15 min adicionales a temperatura ambiente. Una vez se corroboró el término de la reacción por CCF y se procedió a procesar el crudo de reacción. El cual comenzó separando la fase acuosa-orgánica del mercurio metálico formado por decantación, posteriormente se le realizaron extracciones con Et₂O. Los volúmenes de disolvente orgánico recuperados se trataron con solución de NaCl saturada, se secaron con Na₂SO₄ y se les eliminó el disolvente.

El crudo procesado se purificó por columna cromatográfica, empleando como fase móvil CHCl₃, proceso que permitió acceder al amino alcohol bicyclico (6) como un aceite (84.91 g, 84%).

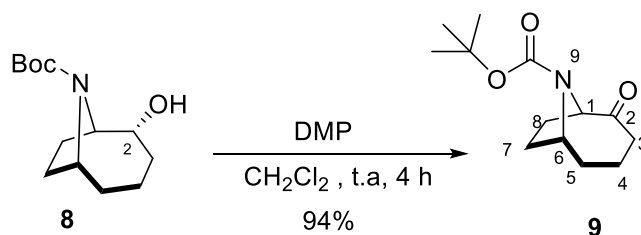
Datos espectroscópicos de 6: IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3341m, 2925f, 1491d, 1452m, 1302d, 1053m, 1026m, 704m, *RMN*⁻¹*H* (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.46–7.12 (*m*), 3.86 (*ddd*), 3.77 y 3.69 (*m*), 3.33–3.20 (*m*), 2.31 y 1.46 (*m*), 1.95-1.68 (*m*), 1.62-1.45 (*m*), 1.33-1.24 (*m*). *RMN*⁻¹³*C* (75 MHz) δ = 141.6, 128.7, 126.8, 73.5, 68.6, 61.4, 61.2, 36.2, 33.5, 32.6, 22.5, 19.7 EMAR (ES) *m/z* calculada para C₁₅H₂₁NO [*M+H*]⁺ 231.16, encontrada 231.09.

Continuando con la elución se obtuvo el hidroxil-acetato (**7**) como producto secundario de reacción (4.5 mg, 4%).

Datos espectroscópicos de 7: RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.34-7.18 (m), 5.23 (dt), 4.08 (ddd), 3.97 y 3.91 (m), 2.83 (m), 2.65 (m), 1.94 (s), 1.96 y 1.78 (m), 1.98 y 1.83 (m), 1.96 y 1.74 (m), 1.88 y 1.77 (m); RMN-¹³C (75 MHz) δ= 170.9, 139.7, 128.3, 128.2, 127.3, 70.15, 68.5, 56.4, 54.5, 52.1, 29.8, 26.5, 21.6, 21.50, 19.5

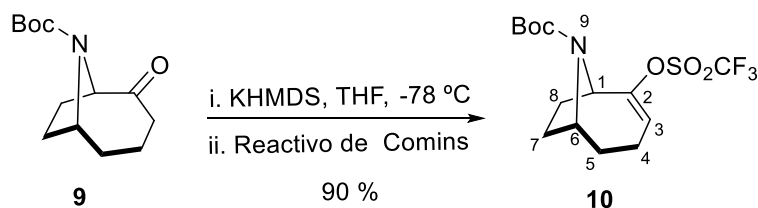


rac-(1R,6R)-2-ol-azabicyclo[4.2.1.]nonano-9-carboxilato de terc-butilo(8). A una mezcla preparada con 131 mg (0.0567 mmol) del alcohol bicíclico (**3**) y 1.6 mL de Acetato de etilo, se le adiciono 26.2 mg de Pd(OH)₂ sobre carbono, seguido de la adición de 1.13 equivalentes (148 mg, 0.624 mmol) de Boc₂O bajo presión de H₂ de 1 atmosfera con agitación vigorosa, la condiciones de reacción mencionadas se mantuvieron durante 1 día. Concluyendo éste tiempo, la mezcla se diluyó con acetato de etilo y se filtró sobre tierra diatomeas. El sobrenadante se procesó con 15 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio, posteriormente con salmuera y se secó con Na₂SO₄, seguido de la eliminación del disolvente para su posterior purificación. Esta se realizó por columna cromatográfica, con mezcla eluyente Cloroformo-Metanol 9:1, proceso que permitió alcanzar como un aceite al alcohol N-boc protegido (**8**) (123.8 mg, 96%).



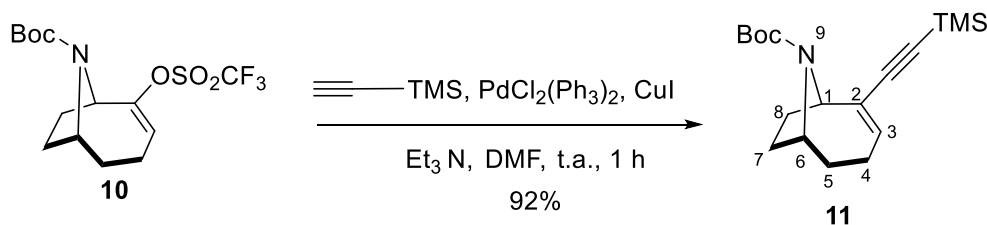
rac-(1R,6R)-2-Oxo-9-azabicyclo[4.2.1]nonano-9-carboxilato de terc-butilo(9). Se preparó una disolución de 2 equivalentes molares (283 mg, 0.667) Periodinano Dess-Martin comercial en 2.5 ml de diclorometano seco en atmosfera inerte de nitrógeno, con agitación vigorosa a una temperatura de 0°C, a la que posteriormente se adicionó una mezcla de 80.5 mg (0.452 mmol) del alcohol N-boc (**8**) y 2.5 mL de diclorometano, la mezcla de reacción se retiró del baño frío y se mantuvo por 4 h en agitación a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo se adicionaron 4.1mL de disolución saturada de NaHCO₃ y 4.1mL de disolución de Na₂S₂O₃ para detener la reacción llevando la temperatura a 0°C, estas condiciones se mantuvieron por 20 min. A continuación, la mezcla de reacción se le agregó 20 mL de agua para diluirla y realizarle extracciones empleando diclorometano, los volúmenes conjuntados se procesaron con solución saturada de NaCl, se secaron con Na₂SO₄ y se les retiro el disolvente a presión reducida, el crudo de reacción procesado se purificó por cromatografía en columna tipo flash, utilizando una disolución de Hexano-acetato de etilo 9:1 como eluyente, obteniéndose la cetona (**9**) como un aceite (75.3mg, 94%).

Datos espectroscópicos de 9: IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2965d, 169m, 1688f, 1393f, 1345m, 1237d, 1168f, 101f, 926d, 771m, RMN-¹H(400 MHz, CDCl₃) δ = 4.56-4.16 (m), 2.57-2.45 (m), 2.40-2.25 (m), 2.25-2.06 (m), 1.96-1.86 (m), 1.81-1.61 (m), 1.47-1.45 (s). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ = 215.3, 153.4, 80.4, 65.2, 56.5, 41.9, 33.1, 30.1, 28.7, 26.6, 19.5. EMAR (ES) m/z calculada para C₁₃H₂₁NO₃ [M+H]⁺ 239.15, encontrada 229.28



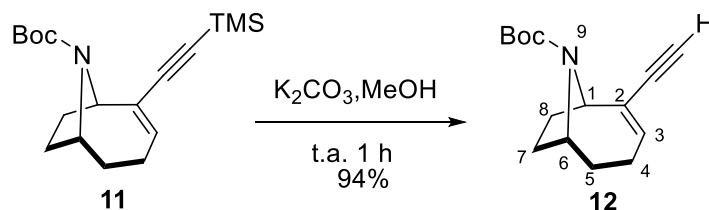
***rac*-(1*R*,6*R*)-2-(((Trifluorometil)sulfonil)oxi)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno-9-carboxilato de *tert*-butilo (10).** Se preparó una mezcla de reacción con 108.6 mg (0.441 mmol) del compuesto carboxílico (9) y 5.7 mL de tetrahidrofurano como disolvente en atmosfera de nitrógeno. La mezcla se llevó a una temperatura de -78°C empleando baño de hielo seco/acetona para adicionarle por goteo lento 2.1 equivalentes molares (1.77 mL, 0.882 mmol) de KHMDS 0.5 M en tolueno; se mantuvieron las condiciones de reacción durante 1.5 h y después se agregaron 2.4 equivalentes molares de (432 mg, 1.1025) del reactivo de Comins disueltos en 0.5 mL de tetrahidrofurano. La mezcla de reacción se agitó por 60 min manteniendo las condiciones de reacción señaladas con anterioridad. Con el objeto de detener la reacción la mezcla de reacción se llevó a una temperatura de 0°C y se adicionaron 1.5 mL de una disolución saturada de NH_4Cl frío (0°C), posteriormente se le agregaron 15 mL de agua para diluirla mezcla de reacción y facilitar las extracciones con Acetato de etilo realizadas a continuación, las fases orgánicas resultantes se procesaron con solución saturada de NaCl , se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se les eliminó el disolvente, el crudo procesado fue purificado por cromatografía en columna tipo flash, empleando como mezcla de elución hexano–AcOEt 8:2, para conseguir el triflato (10) (148.3mg, 91%) con consistencia aceitosa.

Datos espectroscópicos de 10: IR (ATR) $\text{vmax}/\text{cm}^{-1}$ 2925d, 2354m, 1693m, 1415m, 1246d, 1167d, 1140m, 1024d, 527f, RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 5.78-5.74 (m), 4.56 (m), 4.43-4.21 (m), 2.23(m), 2.22-1.65 (m), 2.05 (m), 2.03-1.68(m), 1.46 (s); NMR- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 154.5, 153.3, 120.4, 116.3, 80.2, 58.7, 54.6, 32.5, 31.2, 30.6, 28.2, 19.4 ; RMN- ^{19}F (282 MHz, CDCl_3) δ -74.6 (s). EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{NO}_5\text{S}$ $[M+H]^+$ 371.10, encontrada 371.04



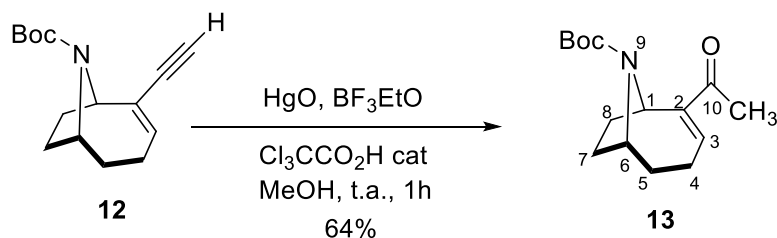
***rac*-(1*R**,6*R**)-2-((Trimetilsilil)etnil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno-9 carboxilato de *tert*-butilo(11).** Se preparó una disolución con 72.4 mg (0.194mmol) del enol triflato (**10**), 13.6 mg (0.094 mmol, 10% mol) de cloruro de paladio bistrifenilfosfina ($\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$) y 1.84 mg (0.0097 mmol, 5% mol) de ioduro cúprico (*CuI*) como cocatalizador y 1 mL de dimetilformamida (*DMF*) como medio de reacción bajo atmosfera de N_2 , a la que posteriormente se le adicionaron 4.1 equivalentes molares (109 μL , 0.776 mmol) de trimetilsililacetileno comercial, la mezcla de reacción se sónico para desgasificar con corriente de N_2 , posteriormente se le agregaron 3 equivalentes (84 μL) de trietanolamina como base nitrogenada, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 1h. El término de la reacción se confirmó por CCF, al crudo de reacción se le agregaron 10 mL de agua y se le sometió a un proceso de extracción con éter etílico, las fases orgánicas resultantes fueron procesadas con cloruro de litio acuoso al 1.5%, disolución acuosa saturada de *NaCl* y se secaron con Na_2SO_4 . El crudo procesado se le eliminó el solvente y se purificó por cromatografía en columna tipo flash, utilizando como mezcla eluyente hexano-AcOEt 8:2, para acceder al enino trimetilsililado (**11**) (61 mg, 92%) como un aceite.

Datos espectroscópicos de **11**: RMN^{-1}H (400 MHz, CDCl_3) δ = 6.13 (m), 4.57 (m), 4.41-4.09 (m), 2.25–2.14 (m), 2.22–1.87 (m), 2.16–1.62 (m), 2.11-1.73 (m), 1.48 (s), 0.17(s); NMR^{-13}C (75 MHz, CD_3Cl) δ =153.5, 138.1, 131.6, 106.4, 92.4, 79.5, 59.6, 55.5, 31.6, 31.2, 28.7, 28.3, 24.4, 0.16



***rac*-(1*R*,6*R*)-2-Etini-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ene-9-carboxilato de terc-butilo(12).** Se preparó una disolución con 5.0 equivalentes (216 mg, 1.569 mmol) K_2CO_3 y de 3.9 mL de MeOH y se agregaron al matraz de reacción que contenía 100.8 mg (0.314 mmol) del compuesto trimetilsililado (**11**) en presencia de atmósfera de nitrógeno, esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y el desarrollo de la misma se siguió por CCF. Una vez transcurrieron 60 minutos se observó el término de la misma, a la mezcla de reacción se le agregaron 30 mL de agua, para posteriormente realizar extracciones utilizando diclorometano, las fases orgánicas se procesaron con solución saturada de NaCl , se secaron con Na_2SO_4 y se les elimino el disolvente, el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna tipo flash, utilizando como mezcla eluyente hexano-AcOEt 8:2, proceso que permitió acceder al enino (**12**) (73.5mg, 94%) como un aceite amarillo claro.

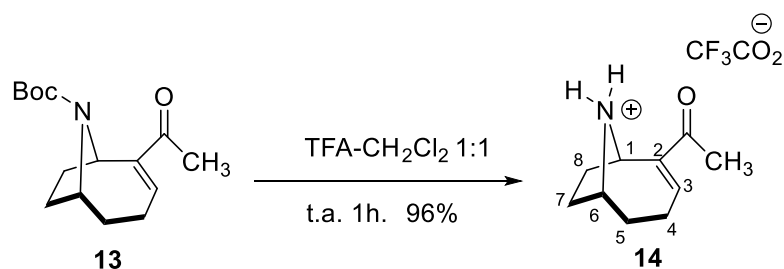
Datos espectroscópicos de **12**: $\text{RMN-}^1\text{H}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.15 (*dd*), 4.57 (*m*), 4.41-4.16 (*m*), 2.89-2.86 (*s*), 2.26 (*m*), 2.21-2.14 (*m*), 1.93-1.83(*m*), 1.72-1.61 (*m*), 1.45 (*s*); $\text{NMR-}^{13}\text{C}$ (75 MHz, CD_3Cl) δ = 155.5, 138.4, 130.2, 85.1, 79.6, 76.2, 60.2, 55.4, 31.7, 31.1, 29.3, 28.5, 24.5.



rac-(1R,6R)-2-Acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de terc-butilo(13).

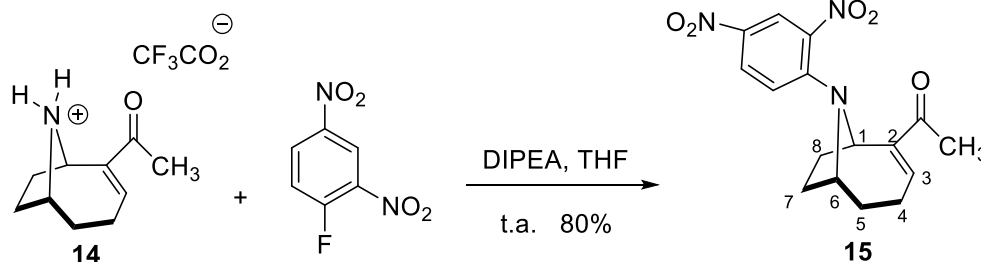
A una disolución preparada con 76 mg (0.1464 mmol) del enino conjugado (**12**) y 0.5 equivalentes de *HgO* (15.8 mg, 0.073 mmol) en 642 μL de *MeOH* anhidro utilizando N_2 para generar atmósfera inerte, se le adicionó por goteo lento una mezcla preparada con 1.4 mg de $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$, 35 μL de eterato de trifluoruro de boro en 1,9 mL de metanol. La mezcla de reacción resultante se mantuvo a temperatura ambiente y con agitación por 1 h. Al transcurrir este tiempo se agregaron a la mezcla de reacción 310 μL de agua destilada y se mantuvo la agitación por 15 min más. Concluyendo el tiempo mencionado, sobre la mezcla de reacción se vertieron 10 mL de agua fría y 5 mL de disolución saturada de NaHCO_3 , para posteriormente realizar extracciones con diclorometano, las fases orgánicas resultantes se procesaron con solución de *cloruro de sodio* saturada, se secaron con Na_2SO_4 y se les eliminó el disolvente proporcionando un residuo aceitoso que fue purificado por columna cromatográfica, utilizando Hexano–AcOEt 8:2 como mezcla eluyente, proporcionando la anatoxina-a N-Boc protegida (**13**) (24.3 mg, 64%) como un aceite .

Datos espectroscópicos de 13: IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2978.2d, 2925.6d, 2853.5d, 1690.7m, 1662.8m, 1404.6m, 1390.2m, 1363.2m, 1337.4m, 1231.2m, 1168.3m, 1108.2m, 991.4d; NMR- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = 6.83 (m), 5.14 (m), 4.47–4.26 (m), 2.55–2.41 (m), 2.26 (s), 2.21–2.2 (m), 1.65–1.61 (m), 1.35 (s); RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 197.6, 150.4, 142.4, 141.0 (C-3), 79.8, 55.8, 53.0, 31.4, 30.4, 29.4, 28.7 y 28.4, 25.2, 24.1.



Trifluoroacetato de *rac*-(1*R*,6*R*)-2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-*io*(14). La mezcla de reacción preparada con 18.0 mg (0.0678 mmol) de anatoxina-a N-Boc protegida (**13**) y 1.1 ml de una disolución 1:1 de TFA-CH₂Cl₂ con atmosfera de Nitrógeno se agitó a temperatura ambiente, el desarrollo de la reacción se siguió por CCF, se determinó el final de esta después de 1 h de reacción para así eliminar el exceso de disolvente, procedimiento que permitió acceder a la sal de anatoxina-a del ácido trifluoroacético (**14**) (25.3 mg, 96%).

Datos espectroscópicos de **14**.- IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2956.8d, 2924.1d, 1664d, 2337.4d, 1429d, 1362d, 1134f, 796m, 706m, 709m; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ =7.14 (m), 5.28–5.15 (m), 4.29 (m), 2.64–2.51 (m), 2.51–2.33 (m), 2.29 (s), 2.24–2.12 (m), 2.0–1.78 (m); RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ = 196.8, 161.2, 146.2, 144.3, 58.8, 52.5, 30.3, 27.9, 27.6, 25.1, 23.3.



rac-1-((1R,6R)-9-(2,4-dinitrofenil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-il) etan-1-ona(16). Se preparó una disolución con 13 mg (0.0429 mmol) de la sal de anatoxina-a (**15**) y 1 mL de tetrahidrofurano anhidro a 0°C en atmosfera inerte de N₂, a la que se le adicionaron lentamente por goteo 1.1 equivalentes de diisopropilamina (8.26 µL, 0.0472 mmol), con agitación continua. Transcurridos 5 min, el matraz de reacción se llevó a temperatura ambiente y a la mezcla de reacción se le adicionaron 1.4 equivalentes (7.6 µg, 0.061 mmol) del agente derivatizante *FDNB*, en continua agitación por 30 min. Al matraz de reacción se le agregaron 10 ml de agua y se realizaron extracciones utilizando diclorometano, los volúmenes de disolvente colectados se trataron con disolución de NaCl saturada, se secaron utilizando Na₂SO₄ como agente desecante y se les retiro el disolvente, el producto residual se purificó por columna cromatográfica, empleando como mezcla eluyente hexano-AcOEt 8:2, para dar lugar a la anatoxina-a N-dinitroaril (**15**) (11.4 mg, 80%) como un aceite amarillento.

Datos espectroscópicos de 15: IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 292.4d, 1652.2m, 1601f, 1577.7m, 1526.1m, 1496.4f, 1316.3f, 1285.1m, 1265m, 1255.2m, 1227.4m, 1144.7m, 950.1m, 909.5m, 829.3m, 742.4f; *RMN*⁻¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.49 (d), 8.11 (dd), 6.93 (m), 6.79 (d), 5.33 (aparente d), 4.32 (m), 2.42–2.26 (m), 2.34 (s), 2.35 y 1.83 (m), 2.31 y 1.75 (m), 1.86–1.74 (m); *RMN*⁻¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ = 198.4, 145.2, 144.1, 136.4, 136.2, 127.6, 123.4, 118.3, 58.6, 57.7, 31.3, 30.8, 28.9, 25.3, 24.7

6.3 Síntesis del hapteno de anatoxina-a derivatizada

6.3.1. Ensayos de derivatización de anatoxina-a con el reactivo de Sanger

Los ensayos de derivatización se realizaron con anatoxina-a como sal del ácido trifluoroacético (120 ppm) en medio acuoso amortiguado por Buffer de Boratos 0.1 M a pH 9.6, 5.0 equivalentes de reactivo de Sanger y Acetonitrilo 50%, la reacción se monitoreo empleando un Cromatografo Líquido HPLC Shimadzu modelo LC20-AT. Se empleó una columna Ultra C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m de tamaño de partícula) de Restek y la fase móvil consistió en acetonitrilo: agua (80:20). El volumen de inyección fue 20 μ L y un flujo de 0.8mL/min; tras transcurrir 15 min de reacción se consumió casi en su totalidad la sal de anatoxina-a.

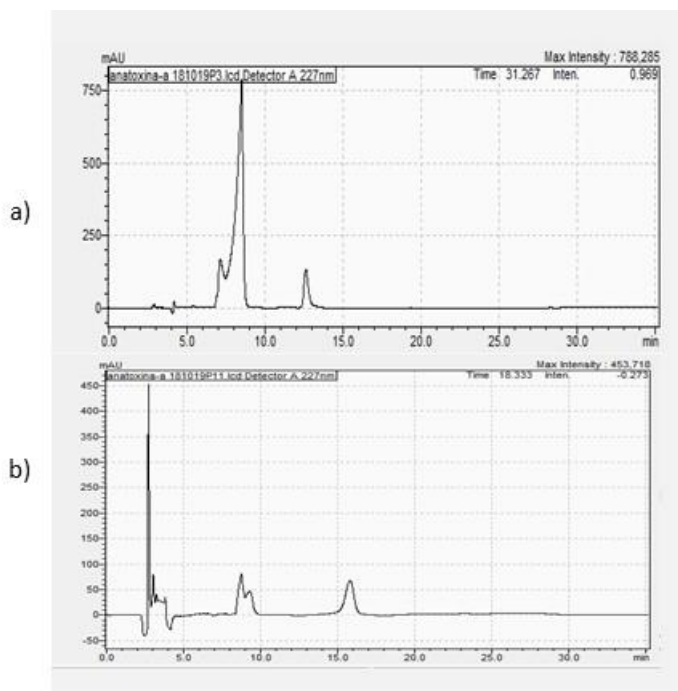
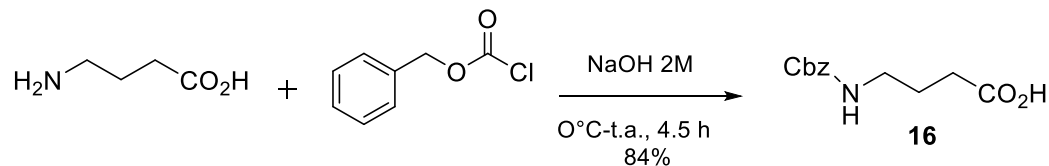
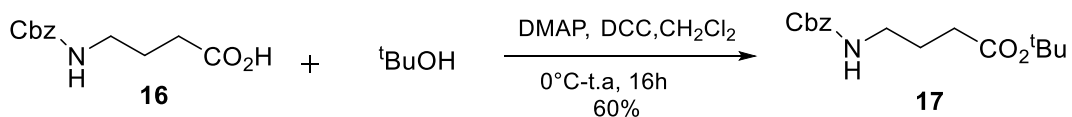


Figura 10. Cromatogramas de evolución de derivatización de anatoxina-a, **a)** inicio de reacción y **b)** final de reacción de derivatización

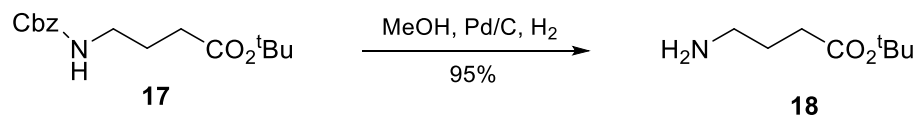
6.3.2 Síntesis del hapteno ATX-d



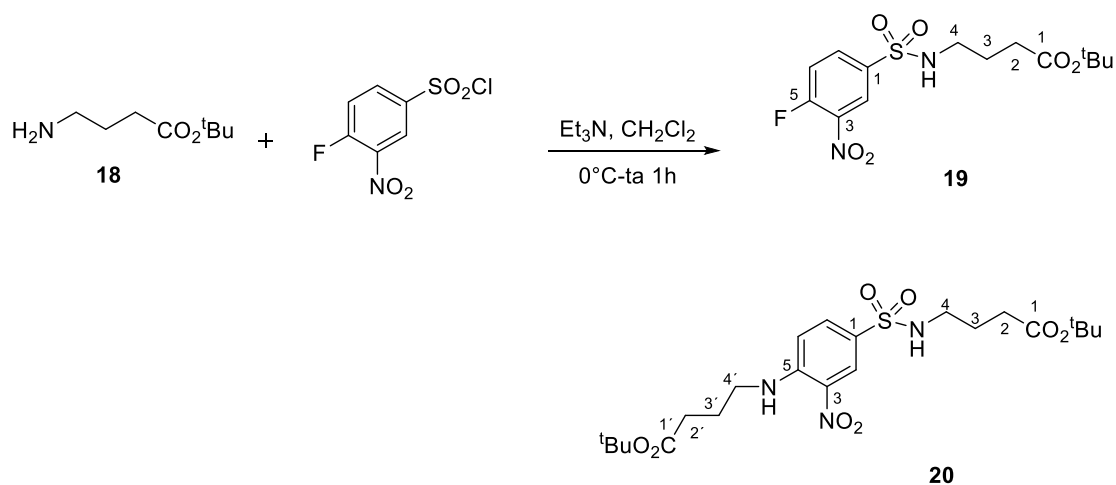
ácido 4-(((benciloxi)carbonil)amino)butanoico(16). Se colocaron 521 mg (4.87 mmol) de ácido γ -aminobutírico comercial en matraz de reacción a 0°C , posteriormente se adicionaron por goteo lento 2.6 mL de una disolución 2 M de hidróxido de sodio manteniendo agitación. En seguida, se adiciono 1.2 equivalente (767 μL , 5.34 mmol) de cloroformiato de bencilo lentamente manteniendo baja la temperatura en el medio de reacción. Durante los primeros 15 min de reacción el pH se mantuvo con un valor cercano a 10 mediante la adición de NaOH en solución 3M. Cuando el pH se mantuvo constante, la reacción se llevó a temperatura ambiente por un lapso de tiempo de 4.5 h. Una vez transcurrió el tiempo mencionado, a la mezcla de reacción se le realizaron 2 extracciones con Et_2O y la fase acuosa obtenida se llevó a 0°C , llevándola a valores de pH entre 1-2, empleando una disolución de HCl 6M. A la suspensión ácida obtenida se le agregó NaCl hasta su saturación y posteriormente se le realizaron extracciones con AcOEt; las fases orgánicas obtenidas se procesaron con salmuera, Na_2SO_4 y se les retiro el disolvente, al producto resultante se le hicieron lavados con éter dietílico, como resultado de este procedimiento se obtuvo el ácido N-Cbz protegido (**16**) como un sólido blanquecino (976 mg, 84%). Las propiedades físicas y datos espectroscópicos del compuesto generado concuerdan con los reportados con anterioridad (CAS No. 5105-78-2).^{96,97}



4-(((Benciloxi)carbonil)amino)butanoato de terc-butilo(17). A una disolución preparada a partir de 934 mg (3.88 mmol) del aminoácido (**16**) y 0.14 equivalentes molares (59 mg, 0.466 mmol) de DMAP y 5.3 mL de diclorometano anhidro, se le agregaron 3.5 equivalentes (1.3 mL, 13.9 mmol) del alcohol terc-butílico en atmosfera de N₂. La mezcla de reacción resultante se llevó a 0°C con baño de hielo, para agregarle posteriormente lentamente por goteo y en presencia de agitación vigorosa, 4.2 mL de una mezcla preparada con 1.15g (1.4 equivalentes, 5.8 mmol) de DCC y CH₂Cl₂. Las condiciones antes mencionadas se mantuvieron por 0.5 h para posteriormente llevarla a temperatura ambiente para que procediera por 15 h adicionales, el final de la reacción se comprobó por CCF. Una vez terminada la reacción, esta se filtró para la separación un sólido formado, empleando diclorometano para realizar varios lavados, el filtrado posteriormente se lavó con 25 mL HCl 1 M frío, seguido de un lavado una disolución de NaCl saturada, uno más con disolución de NaHCO₃ al 5% y finalmente uno más con salmuera. Por último la mezcla anterior se secó con Na₂SO₄ anhidro y se le retiro el disolvente a baja presión. El producto resultante se purificó en cromatografía en columna tipo flash, hexano–AcOEt (8:2) como fase móvil, proceso que permitió acceder el éster (**17**) (686.0 mg, 60%). El producto fue caracterizado por RMN y los datos obtenidos concuerdan con los reportados con anterioridad en la literatura para este compuesto (CAS No. 5105-79-3).^{96,97}



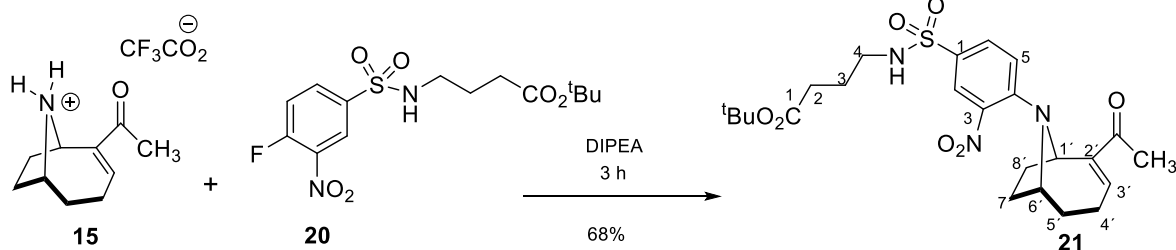
4-Aminobutanoato de terc-butilo (18). Se preparó una mezcla de reacción entre 44 mg de Pd/C al 10% como catalizador, 403.2 mg (1.34 mmol) del éster (**17**), y 3.7 mL de MeOH como medio de reacción, bajo presión de 1 atmósfera de H₂ a temperatura ambiente, la evolución de la reacción se monitoreó por CCF, donde se apreció el término de la misma después de 1 h. Una vez la reacción llegó a su término, se filtró a través de diatomita para retirar el catalizador y al filtrado se le eliminó el disolvente a vacío, con cuidado de no evaporar la amina, procedimiento que permitió acceder a la amina libre (**18**) (202.8 mg, 93%). Debido a que la amina resultante, presenta alto grado de inestabilidad, se empleó en la siguiente etapa sintética sin realizarle algún proceso de purificación. Sus datos espectroscópicos concuerdan con los previamente reportados en la literatura (CAS No. 50479-22-6).^{96,97}



4-((4-Fluoro-3-nitrofenil)sulfonamido)butanoato de terc-butilo (19). Se preparó una disolución entre 103 mg (0.635 mmol) éster terc-butílico (**18**) y 1.4 equivalentes (168 mg, 0.645 mmol) del Cloruro de 4-cloro-3-nitrobenceno-1-sulfonilo en Diclorometano a temperatura de 0 °C, para posteriormente adicionar lentamente por goteo 1.3 equivalentes (96 µL, 0.649 mmol) de Et₃N en presencia de atmósfera inerte de nitrógeno. La reacción transcurrió por 15 min a 0°C y el tiempo restante a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción lo cual se comprobó por CCF, a la reacción se le agregaron 20 ml de agua y se le realizaron extracciones con Acetato de etilo, para después a los volúmenes de disolvente colectados procesarlas con salmuera, Na₂SO₄ y finalmente eliminarles el disolvente por evaporación a vacío. Dicho proceso proporciono un residuo amarillo que fue purificado por cromatografía en columna tipo flash, la mezcla eluyente utilizada fue hexano-AcOEt 8:2. Todo lo anterior permitió acceder a la amida sulfónica (**19**) (138 mg, 63%) como un sólido amarillento, además del compuesto formado por reacción de sustitución doble (**20**) (58 mg, 26%).

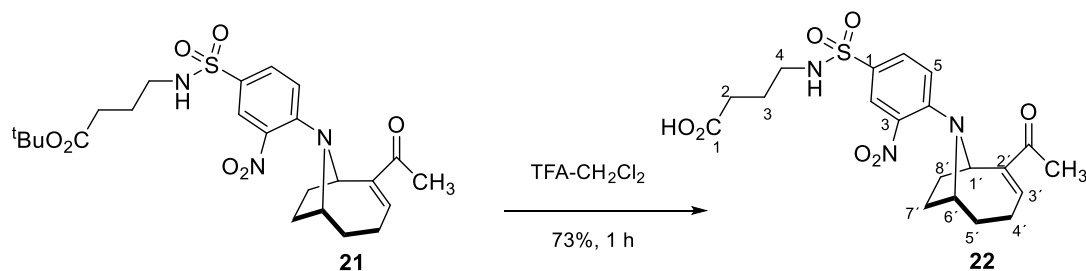
Datos espectroscópicos de **19**: RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ= 8.53 (dd), 8.15 (ddd), 7.47 (dd), 5.43 (t), 3.1 (td), 2.27 (t), 1.79 (quint), 1.41 (s); RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ= 173.4, 159.5, 155.6, 137.5, 137.5, 134.5, 120.0, 81.4, 42.6, 32.5, 28.1, 24.4; RMN-¹⁹F (282 MHz, CDCl₃) δ -110.73 (s).

Datos espectroscópicos de **20**: RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ= 8.65 (d), 8.44 (t), 7.84 (dd), 7.03 (d), 4.85 (t), 3.44 (m), 3.03 (td), 2.37 (t), 2.3 (t), 2.02 (dt), 1.75 (dt), 1.45 y 1.41 (s); RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ= 172.4 y 172.3, 147.6, 133.7, 131.2, 127.4, 126.6, 114.8, 81.3 y 81.4, 42.6, 42.5, 32.6, 32.5, 28.1 y 28.4, 24.7, 24.3.



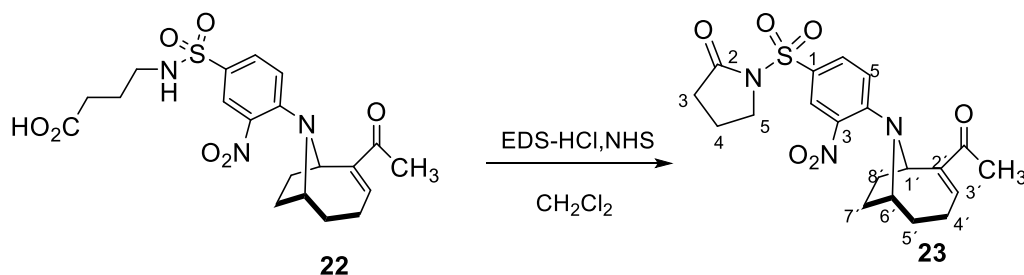
rac-4-((4-((1R,6R)-2-Acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)-3-nitrofenil)sulfonamido)-butanoato de terc-butilo (21). Se montó en un matraz de reacción una solución de 1.1 equivalente (66.5 mg, 0.246 mmol) anatoxina (**15**) como sal y 1.6 mL de Tetrahidrofurano a temperatura baja con baño de hielo y atmosfera inerte de N₂, a esta se le adicionaron por goteo lento 1.2 equivalentes (49 µL, 0.274 mmol) de DIPEA. La mezcla de reacción resultante se agito durante 5 min manteniendo la temperatura antes mencionada, posteriormente se agregó lento manteniendo agitación vigorosa una mezcla formada de 1.5 equivalentes (116 mg, 0.352 mmol) del éster (**20**) y 1.6 mL de THF. La reacción anterior finalizó en 3 h comprobándose por CCF. El crudo de la reacción se le retiro el disolvente y se le agrego 10 mL de una mezcla de diclorometano y agua, posteriormente se le realizaron extracciones con el mismo solvente orgánico, las fases orgánicas fueron colectadas y tratadas con salmuera, Na₂SO₄ para en seguida eliminar el disolvente con rotavapor a baja presión, resultando un aceite amarillo, el cual se purificó por columna cromatográfica, con hexano–AcOEt (8:2) como mezcla eluyente, permitiendo acceder al derivado de anatoxina-a (**21**) como un aceite amarillento (74.6 mg, 68%).

Datos espectroscópicos de 21: RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ= 8.04 (d), 7.65 (dd), 6.96 (t), 6.77 (d), 5.26 (m), 4.87 (t), 4.25 (m), 2.96 (td), 2.49–2.36 (m), 2.33 (s), 2.31 y 1.80 (m), 2.25 (t), 2.25 y 1.77 (m), 1.84-1.72 (m), 1.76 (m), 1.39 (s); RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ= 198.3, 173.5, 145.4, 144.2, 141.4, 137.2, 131.2, 126.7, 126.3, 119.2, 81.2, 58.4, 57.5, 42.6, 31.4, 31.0, 30.6, 28.1, 28.6, 25.5, 24.6, 24.3



trifluoroacetato del ácido rac-4-((4-((1R,6R)-2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)-3-nitrofenil)sulfonamido)butanoico (Hapteno ATX-d, 22). Se preparó una mezcla de reacción a partir de 32 mg (0.062 mmol) del derivado de anatoxina(21) y 1.2 mL de una disolución 1:1 de ácido trifluoroacético- CH_2Cl_2 , la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación continua, el final de la reacción se comprobó por CCF después de 1 h, a la mezcla de reacción se le retiro el exceso de ácido trifluoroacético y el disolvente a baja presión, permitiendo alcanzar el derivado carboxílico de anatoxina-a (22) con consistencia aceitosa de color café (23.1 mg, 73%).

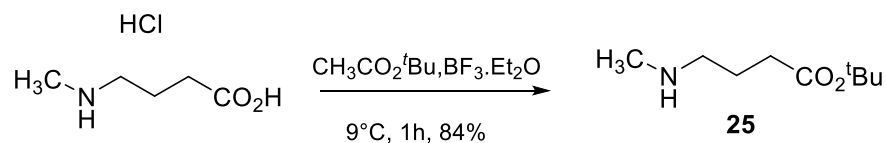
Datos espectroscópicos de 22: $\text{RMN-}^1\text{H}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.04 (d), 7.64 (dd), 6.92 (t), 6.79 (d), 5.23 (m), 4.21 (m), 3.11 (t), 2.48-2.33 (m), 2.37 (t), 2.35 (s), 2.33 y 1.89 (m), 2.24 y 1.73 (m), 1.83-1.77 (m), 1.81 (m); $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ (75 MHz, CDCl_3) δ = 199.1, 178.0, 145.2, 144.6, 141.5, 137.6, 131.3, 126.5, 126.2, 119.0, 58.3, 57.2, 42.3, 31.3, 30.7, 30.6, 28.6, 25.5, 24.4, 24.3; $\text{RMN-}^{19}\text{F}$ (282 MHz, CDCl_3) δ -76.6.



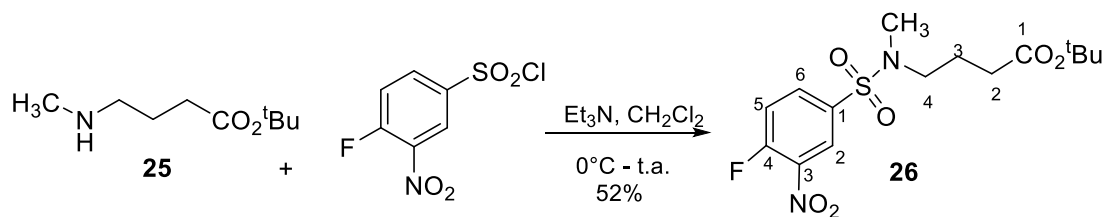
rac-1-((4-((1R,6R)-2-Acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)-3 nitrofenil)sulfonil)pirrolidin-2-ona(23). Se preparó una mezcla de reacción con 1.6 eq (5.1 mg, 0.047 mmol) de NHS, 1.6 eq. (8.22 mg, 0.047 mmol) de EDC·HCl en 816 μ L de diclorometano y 14 mg (0.028 mmol) del ácido de anatoxina-a (**22**) en presencia de atmosfera de Nitrógeno con agitación continua a temperatura ambiente. El final de la reacción se confirmó por CCF en 17 h, a la mezcla de reacción se le adiciono CH_2Cl_2 como diluyente, para posteriormente tratar con 2.5 mL de solución sobresaturada de NH_4Cl para realizarle extracciones utilizando diclorometano. Las fases orgánicas recuperadas se trataron salmuera, Na_2SO_4 como agente desecante y se les eliminó el disolvente dando como resultado un aceite incoloro, que fue purificado en columna cromatográfica con cloroformo como eluyente, para alcanzar N-acilsulfonamida de anatoxina-a (**23**) (8.6 mg, 84%)

Datos espectroscópicos de 23: RMN^{-1}H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (d), 7.86 (dd), 6.89 (t), 6.74 (d), 5.23 (m), 4.25 (m), 3.86 (t), 2.44 (t), 2.42–2.25 (m), 2.35 (s), 2.30–1.85 (m), 2.27–1.75 (m), 2.07 (quint), 1.81–1.75 (m); RMN^{-13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 198.1, 173.5, 145.3, 144.4, 142.5, 137.1, 132.5, 127.4, 124.3, 118.2, 58.2, 57.3, 47.6, 32.1, 31.3, 31.2, 28.2, 25.6, 24.3, 18.1

6.3.3 Síntesis del hapteno ATX-dc

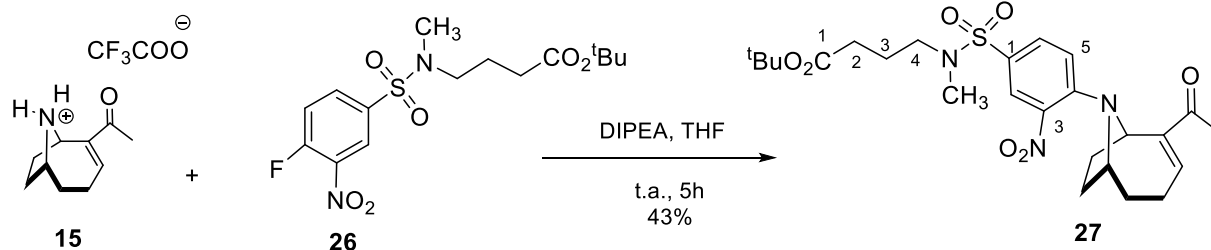


4-(Metilamino)butanoato de terc-butilo(25). Se preparó una disolución con 1.2 g (7.81 mmol) del reactivo comercial clorhidrato del ácido 4-(metilamino)butírico y 19 equivalentes (16.8 mL, 119.52 mmol) de acetato de terc-butilo en atmosfera de Nitrógeno. La disolución de reacción se enfrió a 10°C. Después, se agregó por goteo lento y manteniendo agitación 6.1 equivalentes (5.6 mL, 39.57 mmol) de BF₃·Et₂O, la reacción se monitoreo por CCF y se apreció el consumo el producto de partida después de 1 h. Una vez terminada la reacción se diluyo con 15 ml de agua, se separaron la fase la orgánica y acuosa a esta se realizaron 2 extracciones con volúmenes de 15 mL de agua respectivamente. Las fases acuosas fueron colectadas y llevadas a pH básico por adición de 15 mL de una solución de Hidróxido de sodio 5M. Enseguida se le realizaron 3 extracciones con Diclorometano, las fases orgánicas colectadas se sometieron a un tratamiento con salmuera, Na₂SO₄ y se les retiro cuidadosamente el disolvente para evitar la volatilización del producto, obteniendo el éster de la N-metilamina (**25**) (941. mg, 84%) como un aceite amarillento y sus respectivos datos espectroscópicos concuerdan con los reportados con anterioridad en la literatura (CAS No. 1246527-48-9).⁹⁶



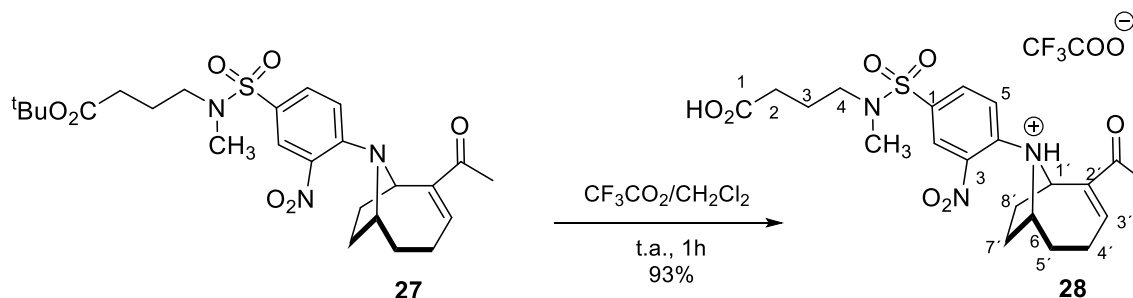
4-((4-Fluoro-N-metil-3-nitrofenil)sulfonamido)butanoato de terc-butilo(26). En un matraz de reacción se preparó una mezcla entre 74.6 mg (0.428mmol) de la metil amina (**25**) y 1.2 eq (123 mg, 0.453 mmol) del 4-cloro-3-nitrobenceno-1-sulfonilo y 1.5 mL de diclorometano en baño de hielo a 0°C en atmosfera de nitrógeno, a la mezcla anterior se le agregaron por goteo lento 8.4 μ L (0.63 mmol, 1.4 equivalentes) de trietanolamina (Et_3N). Después de 15 min de reacción, la temperatura de la misma se llevó a temperatura ambiente para que continuara la reacción, el final de la misma se verificó después de 1 h con CCF, la mezcla de reacción se le agregó agua para diluirla y se le realizaron 3 extracciones con 15mL de Acetato de Etilo. Los volúmenes de disolvente conjuntados se trataron con salmuera, secaron sobre Na_2SO_4 y se les retiró el disolvente a baja presión, el residuo, se purificó por cromatografía en columna tipo flash, utilizando como mezcla eluyente hexano-AcOEt 8:2, lo que permitió acceder la sulfonamida de terc-butilo (**26**) (82 mg, 52%) como un sólido amarillento.

Datos espectroscópicos de **26**: RMN - 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.44 (dd), 8.06 (ddd), 7.46 (dd), 3.13 (t), 2.76 (s), 2.30 (t).



rac-4-((4-((1R*,6R*)-2-Acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)-N-metil-3-nitrofenil)sulfonamido)butanoato de terc-butilo(27). Se preparó una disolución con trifluoroacetato de anatoxina-a (**15**) y 600 μL de Tetrahidrofurano bajo atmosfera de nitrógeno a 0°C , a la que se le agregó por goteo lento 16 μL de DIPEA (0.092 mmol, 1.2 equivalentes). Posteriormente el matraz de reacción se retiró del baño frío para adicionarle por goteo lento 1.5 eq (39.86 mg, 0.112 mmol) de la sulfonamida (**26**) en 500 μL de THF. El término de la reacción se alcanzó después de 5 h y se verificó con CCF, a la mezcla de reacción se le retiró el disolvente y el producto resultante se purificó por columna cromatográfica, con una mezcla eluyente de hexano–AcOEt 8:2, lo que permitió recuperar por orden de elución el compuesto (**26**) sin reaccionar, seguido de la anatoxina-a sulfonamídica (**27**) (16.4 mg, 43%) como un producto aceitoso amarillento.

Datos espectroscópicos de 27: RMN^{-1}H (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.96 (d), 7.54 (dd), 6.95–6.98 (m), 6.73 (d), 5.23 (d), 4.23 (m), 3.01 (t), 2.71 (s), 2.42–2.26 (m), 2.35 (s), 2.32–2.27 (m), 2.30 y 1.85 (m), 2.27 y 1.76 (m), 1.85–1.77 (m) 1.81–1.75 (m), 1.43 (s); RMN^{-13}C (75 MHz, CDCl_3) δ = 198.1, 172.4, 145.3, 144.6, 141.4, 137.5, 131.2, 126.3, 125.2, 119.3, 80.6, 58.1, 57.3, 49.5, 34.7, 32.4, 31.6, 30.7, 28.6, 28.1, 25.7, 24.5, 23.1



trifluoroacetato del ácido rac-4-((4-((1R*,6R*)-2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)-N-metil-3-nitrofenil)sulfonamido)butanoico(hapteno ATX-dc 28). Se preparó una mezcla de reacción entre 23.4 mg (0.031 mmol) de la sulfonamida de anatoxina-a (**27**) y 1.2 mL de una disolución 1:1 de TFA:CH₂Cl₂ a temperatura de laboratorio con agitación continua en presencia de atmosfera de Nitrógeno, la evolución de la reacción se monitoreo por CCF, donde se logró apreciar el final de la reacción en tan solo una hora. La mezcla del ácido y CH₂Cl₂ fueron retiradas de la mezcla de reacción con rotavapor y baja presión, permitiendo la obtención de la anatoxina-a derivatizada (**28**) como sal, como un aceite de color marrón (16.3 mg, 93%).

Datos espectroscópicos de 28: *RMN*^{-1H} (400 MHz, CDCl₃) δ= 7.95 (*d*), 7.54 (*dd*), 6.97-6.91 (*m*), 6.76 (*d*), 5.23 (*d*), 4.23 (*m*), 3.05 (*t*), 2.72 (*s*), 2.45 (*t*), 2.42–2.26 (*m*), 2.35 (*s*), 2.32 y 1.84 (*m*), 1.91–1.74 (*m*), 1.84-1.71 (*m*); *RMN*^{-13C} (75 MHz, CDCl₃) δ= 198.3, 182.2, 145.7, 144.2, 141.5, 137.3, 131.2, 126.4, 125.1, 119.2, 58.2, 57.3, 49.6, 34.8, 31.2, 30.7, 30.5, 28.6, 25.5, 24.4, 22.5; ¹⁹F-*RMN* (282 MHz, CDCl₃) δ= -76.32 (*s*).

Declaratoria de Conflicto de Intereses.

El presente proyecto se ha desarrollado con fines meramente académicos a objeto de aplicar el método científico. Se declara no existir intereses financieros y de cualquier otra índole a la vez que, se reconoce la autoría en cada cita textual al autor de origen.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Pita, R. A.-L. (2003). Neurotoxinas con Actividad anticolinesterasa y su posible uso. *Med. Cli.*, 511-517.
2. Roset, J., Aguayo, S., & Muñoz, M. J. (2001). Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología*, 18(2).
3. Funari, E., Manganelli, M., Buratti, F. M., & Testai, E. (2017). Cyanobacteria blooms in water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing and recreational activities. *Science of the Total Environment*, 598, 867-880.
4. Carmichael, W. W., & Boyer, G. L. (2016). Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. *Harmful algae*, 54, 194-212.
5. Mez K, Beattie KA, Codd GA, Hanselmann K, Hauser B, Naegeli H and Preisig HR (1997): Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *European Journal of Phycology* 32, 111-117.
6. Cirés, S., Casero, M. C., & Quesada, A. (2017). Toxicity at the Edge of Life: A Review on Cyanobacterial Toxins from Extreme Environments. *Marine drugs*, 15(7), 233.
7. Loftin, K. A., Graham, J. L., Hilborn, E. D., Lehmann, S. C., Meyer, M. T., Dietze, J. E., & Griffith, C. B. (2016). Cyanotoxins in inland lakes of the United States: Occurrence and potential recreational health risks in the EPA National Lakes Assessment 2007. *Harmful Algae*, 56, 77-90.
8. Lucena, E. (2008). Aspectos sanitarios de las cianotoxinas. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 8, 291-302.
9. Vasconcelos, V., Martins, A., Vale, M., Antunes, A., Azevedo, J., Welker, M.,... & Montejano, G. (2010). First report on the occurrence of microcystins in planktonic cyanobacteria from Central Mexico. *Toxicon*, 56(3), 425-431.
10. Pérez-Morales, A., Olivos-Ortiz, A., Quijano-Scheggia, S. I., Espinosa-Rodríguez, C. A. y Jiménez-Santos, M. A. (2016). Estado actual del estudio de cianobacterias dulceacuícolas formadoras de florecimientos en el centro de México. p. 408-421.
11. Vasas, G., Borbely, G., Nanasi, P., & Nanasi, P. P. (2010). Alkaloids from cyanobacteria with diverse powerful bioactivities. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 10(10), 946-955.
12. Hudnell, H. K. (Ed.). (2008). Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs (Vol. 619). *Springer Science & Business Media*.

13. Koskinen, A. M. P. and Rapoport, H. (1985) Synthetic and Conformational Studies on Anatoxin-a: A Potent Acetylcholine Agonist. *J. Med. Chem.*, 28, 1301-1309.
14. Sivonen, K., & Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*, 1, 43-112.
15. Ibelings, B. W., & Chorus, I. (2007). Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: a review. *Environmental pollution*, 150(1), 177-192.
16. Miller, M. A., Kudela, R. M., Mekebri, A., Crane, D., Oates, S. C., Tinker, M. T. & Hardin, D. (2010). Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PLoS One*, 5(9), e12576.
17. Rellán, S., Osswald, J., Saker, M., Gago-Martinez, A., & Vasconcelos, V. (2009). First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2189-2195.
18. Rodgers, K. J., Main, B. J., & Samardzic, K. (2018). Cyanobacterial Neurotoxins: Their Occurrence and Mechanisms of Toxicity. *Neurotoxicity research*, 33(1), 168-177.
19. Trainer, V. L., & Hardy, F. J. (2015). Integrative monitoring of marine and freshwater harmful algae in Washington State for public health protection. *Toxins*, 7(4), 1206-1234.
20. <https://atlantic.ctvnews.ca/toxic-blue-green-algae-killed-three-new-brunswick-dogs-health-officials-1.4039997> (consulta, Noviembre de 2018).
21. Miller, T. R., Beversdorf, L. J., Weirich, C. A., & Bartlett, S. L. (2017). Cyanobacterial Toxins of the Laurentian Great Lakes, Their Toxicological Effects, and Numerical Limits in Drinking Water. *Marine drugs*, 15(6), 160.
22. Stevens, D. K., & Krieger, R. I. (1991). Stability studies on the cyanobacterial nicotinic alkaloid snatoxin-A. *Toxicon*, 29(2), 167-179.
23. Kaminski, A., Bober, B., Lechowski, Z., & Bialczyk, J. (2013). Determination of anatoxin-a stability under certain abiotic factors. *Harmful Algae*, 28, 83-87.
24. Vlad, S., Anderson, W. B., Peldszus, S., & Huck, P. M. (2014). Removal of the cyanotoxin anatoxin-a by drinking water treatment processes: a review. *Journal of water and health*, 12(4), 601-617.
25. Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., & Vasconcelos, V. (2007). Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment international*, 33(8), 1070-1089.

-
26. Roset, J., Aguayo, S., & Muñoz, M. J. (2001). Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología*, 18(2).
 27. Namera, A., So, A., Pawliszyn, J. (2002) Analysis of anatoxin-a in aqueous samples by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and on-fiber Derivatization. *J. Chromatogr. A*, 963, 295-302.
 28. Stevens, D. K., & Krieger, R. I. (1988). Analysis of Anatoxin-a by GCIECD. *Journal of analytical toxicology*, 12(3), 126-131.
 29. Zotou, A., Jefferies, T. M., Brough, P. A., & Gallagher, T. (1993). Determination of anatoxin-a and homoanatoxin in blue—green algal extracts by high-performance liquid chromatography and gas chromatography—mass spectrometry. *Analyst*, 118(7), 753-758.
 30. Takino, M., Daishima, S., Yamaguchi, K. (1999). Analysis of anatoxin-a in freshwaters by automated on-line Derivatization-liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 862, 191-197.
 31. Tang, X., Zhang, Q., Zhang, Z., Ding, X., Jiang, J., Zhang, W., & Li, P. (2019). Rapid, on-site and quantitative paper-based immunoassay platform for concurrent determination of pesticide residues and mycotoxins. *Analytica Chimica Acta*.
 32. Fang, Q., Zu, Q., Hua, X., Lv, P., Lin, W., Zhou, D., & Cao, H. (2019). Quantitative Determination of Acetamiprid in Pollen Based on a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Molecules*, 24(7), 1265.
 33. Pérez-Fernández, B., Mercader, J. V., Checa-Orrego, B. I., de la Escosura-Muñiz, A., & Costa-García, A. (2019). A monoclonal antibody-based immunosensor for the electrochemical detection of imidacloprid pesticide. *Analyst*, 144(9), 2936-2941.
 34. Venkataramana, M., Rashmi, R., Uppalapati, S. R., Chandranayaka, S., Balakrishna, K., Radhika, M., ... & Batra, H. V. (2015). Development of sandwich dot-ELISA for specific detection of Ochratoxin A and its application on to contaminated cereal grains originating from India. *Frontiers in microbiology*, 6, 511.
 35. Lin, A. V. (2015). Indirect ELISA. In ELISA (pp. 51-59). *Humana Press*, New York, NY.
 36. Dimitrakopoulus, I. K., Kaloudis, T. S., Hiskia, A. E., Thomaidis, N. S., Koupparis, M. A. (2010). Development of a fast and selective method for the sensitive determination of anatoxin-a in lake waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and phenylalanine-d5 as internal standard. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397 (6), 2245-2252.
-

-
37. Zotou, A., Jefferies, T. M., Brough, P. A., Gallagher, T. (1993). Determination of anatoxin-a and homoanatoxin in blue—green algal extracts by high-performance liquid chromatography and gas chromatography—mass spectrometry. *Analyst*, 118 (7), 753-758.
38. Gao, S., Zhang, Z. P., Karnes, H. T. (2005). Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. *Journal of Chromatography B*, 825 (2), 98-110.
39. Rodríguez, V., Yonamine, M., Pinto, E. (2006). Determination of anatoxin-a in environmental water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of separation science*, 29 (13), 2085-2090.
40. Ciriacks Klinker, C., Bowser, M. T. (2007). 4-Fluoro-7-nitro-2, 1,3-benzoxadiazole as a fluorogenic labeling reagent for the in vivo analysis of amino acid neurotransmitters using online microdialysis–capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*, 79 (22), 8747-8754.
41. Luo, L., Wei, X. Q., Jia, B. Z., Yang, J. Y., Shen, Y. D., Hammock, B., ... & Xu, Z. L. (2019). Modulating Linker Composition of Haptens Resulted in Improved Immunoassay for Histamine. *Biomolecules*, 9(10), 597
42. Matsushita, M., Hoffman, T. Z., Ashley, J. A., Zhou, B., Wirsching, P., Janda, K. D. (2001). Cocaine catalytic antibodies: the primary importance of linker effects. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11 (2), 87-90.
43. Ino, A., Dickerson, T. J., Janda, K. D. (2007). Positional linker effects in haptens for cocaine immunopharmacotherapy. *Bioorganic & medicinal chemistry Letters*, 17 (15), 4280-4283.
44. Carroll, F. I., Abraham, P., Gong, P. K., Pidaparathi, R. R., Blough, B. E., Che, Y., Owens, S. M. (2009). The synthesis of haptens and their use for the development of monoclonal antibodies for treating methamphetamine abuse. *Journal of medicinal chemistry*, 52 (22), 7301-7309.
45. Luo, L., Lei, H. T., Yang, J. Y., Liu, G. L., Sun, Y. M., Bai, W. D., & Xu, Z. L. (2017). Development of an indirect ELISA for the determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine. *Analytica chimica acta*, 950, 162-169.
46. Thurman, E. M. (2002). Linker-assisted immunoassay and liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of glyphosate. *Analytical chemistry*, 74(19), 4937-4943.
47. Quiñones Reyes, G. (2016). Síntesis de haptenos y bioconjugados de anatoxina-a para el desarrollo de métodos inmunoquímicos.
-

-
48. Addante-Moya, L. G., Agullo, C., Quinones-Reyes, G., Mercader, J. V., Abad-Fuentes, A., & Abad-Somovilla, A. (2018). A unified approach to the synthesis of both enantiomers of anatoxin-a and homoanatoxin-a cyanotoxins. *Tetrahedron*, 74(38), 5022-5031.
49. Mansell, H. L. (1996). Synthetic Approaches to Anatoxin-a. *Tetrahedron*, 52, 17, 6025-6061.
50. Brenneman, J. B., Machauer, R., Martin, S. F. (2004). Enantioselective synthesis of (+)-Anatoxin-a via enine metathesis. *Tetrahedron*, 60, 7301-7314.
51. Kanne, D. B., Ashworth, D. J., Cheng, M. T., Mutter, L. C., & Abood, L. G. (1986). Synthesis of the first highly potent bridged nicotinoid 9-azabicyclo [4.2. 1] nona [2, 3-c] pyridine (pyrido [3, 4-b] homotropene). *Journal of the American Chemical Society*, 108(24), 7864-7865.
52. Forró, E., Árva, J., and Fülöp, F. (2001). (1S, 8R)-9-azabicyclo[6.2.0]dec-4-en-10-one: potential starting compounds for the synthesis of anatoxin-a. *Tetrahedron: Asymmetric*, 12,643-649.
53. Muller, T. E., Hultsch, K. C., Yus, M., Foubelo, F., & Tada, M. (2008). Hydroamination: direct addition of amines to alkenes and alkynes. *Chemical reviews*, 108(9), 3795-3892.
54. Toshimitsu, A., Terao, K., and Uemura, S. (1986). Intramolecular Amidoselenation of N-Alkenylamides: Formation of Nitrogen Heterocycles. *J. Org. Chem.*, 51, 1724-1729.
55. Carroll, I. F., Hu, X., Navarro, H. A., Deschamps, J., Abdrakhmanova, G. R., Damaj, M. I., Martin, B. R. (2006). Synthesis and pharmacological characterization of nicotinic acetylcholine receptor properties of (+)- and (-)- pyrido- [3.4-b]homotropenes. *J. Med. Chem.*, 49, 3244–3250.
56. Barrell, M., and Appar, M. (1977). Aminomercuration intramoléculaire d'aziridines cycloocténiques set de leurs Aminoalcools Precurseurs. *Tetrahedron*, 33, 1309 1319.
57. Evans, G. B., Furneaux, R. H., Greatrex, B., Murkin, A. S., Schramm, V. L., Tyler, P. C. (2008). Azetidine Based Transition State Analogue Inhibitors of N-Ribosyl Hydrolases and Phosphorylases. *J. Med. Chem.*, 51, 948–956.
58. Sanichar, R., Carroll, C., Kimmis, R., Reiz, B., & Vederas, J. C. (2018). Dess–Martin periodinane oxidative rearrangement for preparation of α -keto thioesters. *Organic & biomolecular chemistry*.
59. Gupta, M. K., Li, Z., & Snowden, T. S. (2012). One-Pot Synthesis of Trichloromethyl Carbinols from Primary Alcohols. *The Journal of organic chemistry*, 77(10), 4854-4860.
60. Babinski, D., Soltani, O., & Frantz, D. E. (2008). Stereoselective Synthesis of Acetoacetate-Derived Enol Triflates. *Organic letters*, 10(13), 2901-2904.
-

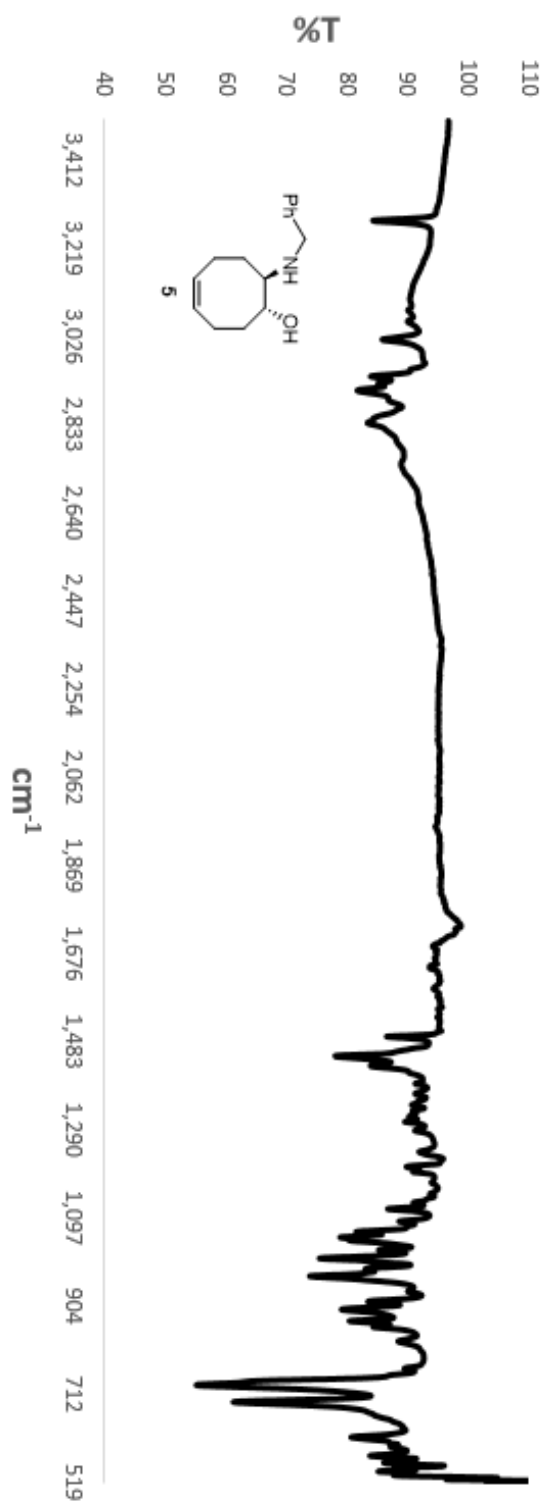
-
61. Hynes, J., Nasser, T., Overman, L. E., & Watson, D. A. (2002). Preparation of α -Sulfenyl Enones by Thermal Fragmentation of β -Sulfenyl Enol Triflates. *Organic letters*, 4(6), 929-931.
62. Stang, P. J. (1978). Vinyl Triflate Chemistry: Unsaturated Cations and Carbenes. *Acc. Chem. Res.*, 11, 107-114.
63. Arcadi A., Cacchi S., Marinelli, F. (1993). The conversion of vinyl triflates into γ' -hydroxy- α,β -enones. *Tetrahedron*, 49, 4955-4964.
64. Babinski, D. J., Aguilar, H. R., Still, R., & Frantz, D. E. (2011). Synthesis of substituted pyrazoles via tandem cross-coupling/electrocyclization of enol triflates and diazoacetates. *The Journal of organic chemistry*, 76(15), 5915-5923.
65. Marcovici-Mizrahi, D., Gottlieb, H. E., Marks, V., Nudelman, A. (1996). On the Stabilization of the Syn-Rotamer of Amino Acid Carbamate Derivatives by Hydrogen Bonding. *J. Org. Chem.*, 61, 8402-8406.
66. Moraczewski, A. L., Banaszynski, L. A., From, A. M., White C. E., Smith B. D. (1998). Using Hydrogen Bonding to Control Carbamate C-N Rotamer Equilibria, *J. Org. Chem.*, 63, 7258-7262.
67. Chinchilla, R., Najera, C. (2007). The Sonogashira reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. *Chem Rev.*, 107, 874-922
68. Enquist, J. A., Virgil, S. C., Stoltz, B. (2011). Total synthesis of cyanthiwiggins B, F, and G. *Chem.Eur. J.* 36, 9957-9969.
69. Caporale, A., Tartaglia, S., Castellin, A., & De Lucchi, O. (2014). Practical synthesis of aryl-2-methyl-3-butyn-2-ols from aryl bromides via conventional and decarboxylative copper-free Sonogashira coupling reactions. *Beilstein journal of organic chemistry*, 10(1), 384-393.
70. Kim, S., Kim, S., Lee, T., Ko, H., & Kim, D. (2004). A new, iterative strategy for the synthesis of unsymmetrical polyynes: application to the total synthesis of 15, 16-dihydrominiquartynoic acid. *Organic letters*, 6(20), 3601-3604.
71. Kim, S., Lee, Y. M., Kang, H. R., Cho, J., Lee, T., & Kim, D. (2007). Synthesis of novel polyene analogues of sphingoid base via an iterative acetylene homologation sequence. *Organic letters*, 9(11), 2127-2130.
72. Pasquini, C., & Bassetti, M. (2010). One-Pot Desilylation/Dimerization of Terminal Alkynes by Ruthenium and Acid-Promoted (RAP) Catalysis. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 352(14-15), 2405-2410.
-

-
73. Patent U.S. 6426364, **30 Julio 2002**.
74. S.Caddick, V.M.Delisser, V.E.Doyle, S.Khan (**1999**), Deprotection of trimethylsilyl group of an alkyne; enynes *Tetrahedron*, 2737-2754.
75. A Hintermann, L., & Labonne, A. (**2007**). Catalytic hydration of alkynes and its application in synthesis. *Synthesis (08)*, 1121-1150.
76. Hartman, J. W., Hiscox, W. C., & Jennings, P. W. (**1993**). Catalytic hydration of alkynes with platinum (II) complexes. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(26), 7613-7614
77. Menashe, N., Reshef, D., Shvo, Y. J. (**1991**). The reaction of alkynes and formic acid. *J. Org. Chem.*, 56, 2912.
78. Hennion, G. F., & Nieuwland, J. A. (**1934**). The Addition of Some Organic Acids to Alkyl Acetylenes. *Journal of the American Chemical Society*, 56(8), 1802-1803.
79. Hennion, G. F., Vogt, R. R., & Nieuwland, J. A. (**1936**). A Proposed Mechanism for Mercury Catalysis in Acetylene Addition Reactions. *The Journal of Organic Chemistry*, 1(2), 159-162.
80. Patent WO2010026121, 11 **Marzo 2010**.
81. Chappie, T. A., Helal, C. J., Kormos, B. L., Tuttle, J. B., & Verhoest, P. R. (**2014**). Imidazo-triazine derivatives as PDE10 inhibitors. *WO Patent WO*, 2014177977, A1.
82. Srinivasan, N., Yurek-George, A., & Ganesan, A. (**2005**). Rapid deprotection of N-Boc amines by TFA combined with freebase generation using basic ion-exchange resins. *Molecular diversity*, 9(4), 291-293.
83. Gatti, R., Andreatta, P., & Boschetti, S. (**2013**). An high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous analysis of acetylcarnitine taurinate, carnosine, asparagine and potassium aspartate and for the analysis of phosphoserine in alimentary supplements. *Journal of Chromatography A*, 1298, 95-102.
84. Zhang, X., Zhao, T., Cheng, T., Liu, X., & Zhang, H. (**2012**). Rapid resolution liquid chromatography (RRLC) analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography B*, 906, 91-95.
85. Jalalizadeh, H., Raei, M., Fallah Tafti, R., Farsam, H., Kebriaeezadeh, A., & Souri, E. (**2014**). A stability-indicating HPLC method for the determination of memantine hydrochloride in dosage forms through derivatization with 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene. *Scientia pharmaceutica*, 82(2), 265-280.
86. Riva, R., Banfi, L., Basso, A., Zito, P. (**2011**) A new diversity oriented and metal-free approach to highly functionalized 3H-pyrimidin-4-ones. *Org. Biomol. Chem.*, 9, 2107-2122.
-

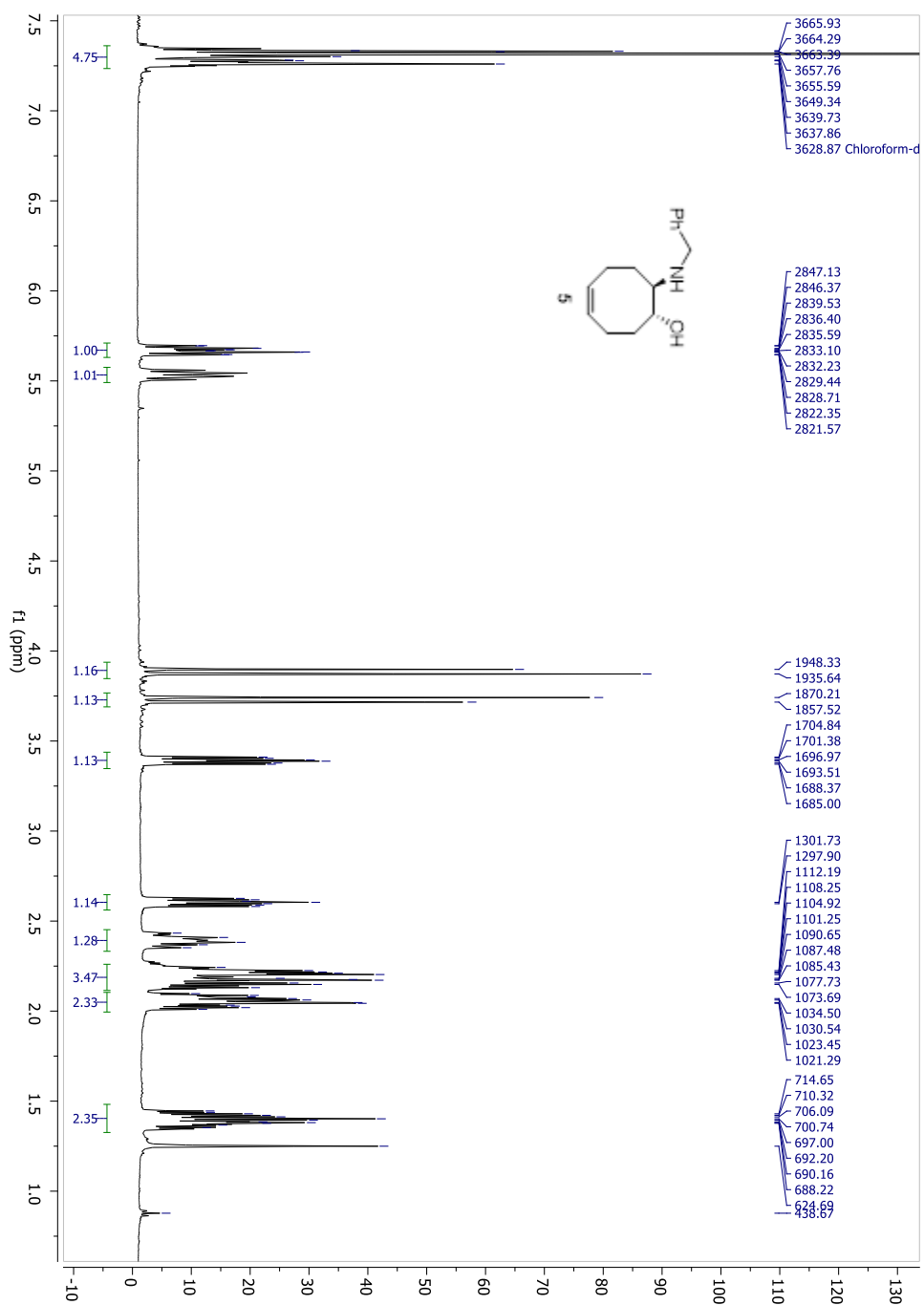
-
87. Pescatore, G., Kinzel, O., Atteni, B., Cecchetti, O. (2008) Optimization of a series of potent and selective ketone histone decetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 5528-5532.
 88. Nigeri, R., Shinde, A., Daulatabad, A. Design, (2012) Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Piperidin-4-yl amino aryl sulfonamides: Novel, Potent, Selective, Orally Active, and Brain Penetrant 5-HT₆ Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.*, 55, 9255–9269.
 89. Lagone, J., Vunaski, V. (1982) Radioimmunoassay of Nicotine, Cotine, and Gamma-(3-Pyridyl)-Gamma-Oxo-N-Methylbutyramide. *Methods Enzymol.*, 84, 628–640.
 90. Tanner, D. and Somfai, P. (1988) A mild efficient method for the preparation of N-tosyl amides and lactams. *Tetrahedron*, 44, 613–18.
 91. Zareef, M., Iqbal, R., Khan, K. M., Zaidi, J. H., Arfan, M. (2009) A convenient synthesis of p-substituted 1-arylsulfonyl-pyrrolidin-2-ones. *Nat. Prod. Res.*, 23, 485–488.
 92. Hermanson, G. T. (2013). Bioconjugate techniques. Academic press.
 93. Miron, T., & Wilchek, M. (1993). A simplified method for the preparation of succinimidyl carbonate polyethylene glycol for coupling to proteins. *Bioconjugate chemistry*, 4(6), 568-569.
 94. Boal. W. B., Schammuel, A. W., Garg, N. K. (2009) An Interrupted Fisher Indolization Approach toward Fused Indoline-Containing Natural Products. *Org. Lett.*, 11, 3458-3461.
 95. Mercader, J. V., Suárez-Pantaleón, C., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., Abad-Fuentes, A. (2008) Hapten Synthesis and Monoclonal Antibody–Based Immunoassay Development for the Detection of the Fungicide Kresoxim-methyl. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 1545-1552.
 96. Chen, T. Y., Tsutsumi, R., Montgomery, T. P., Volchkov, I., and Krische, M. J. (2015) Ruthenium-Catalyzed C-C Coupling of Amino Alcohols with Dienes via Transfer Hydrogenation: Redox-Triggered Imine addition and Related Hydroaminoalkylations. *J. Am. Chem. Soc.*, 137, 1798-1801.
 97. Kuethe, J. T., Marcoux, J. F., Wong, A., Wu, J., Hillier, M. C., Dormer, I. W., and Hughes, D. L. (2006). Stereoselective-Based NK1 Receptor Antagonist Bearing an Unsymmetrically substituted sec-sec ether. *J. Org. Chem.*, 71, 7378-7390.

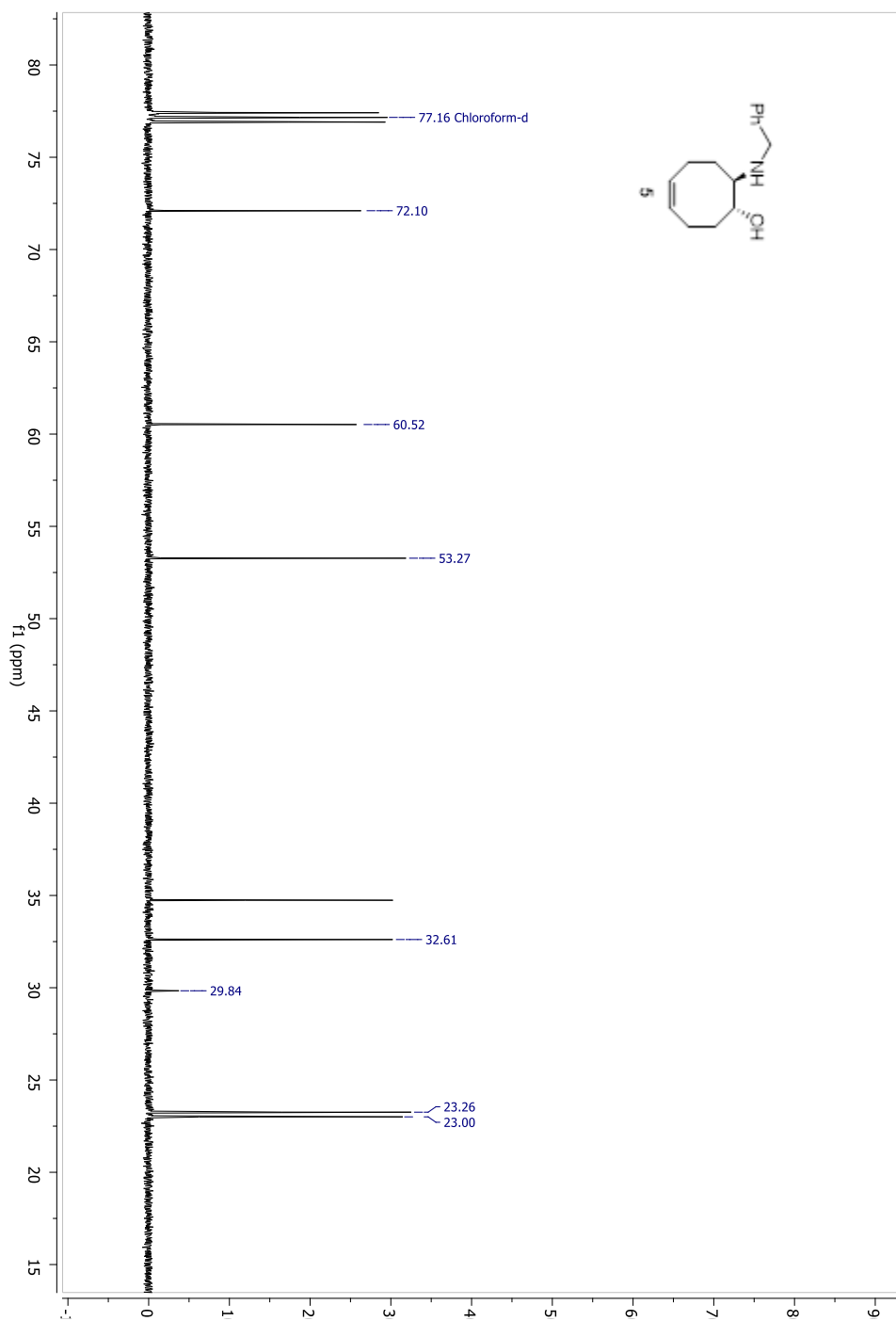
ANEXOS

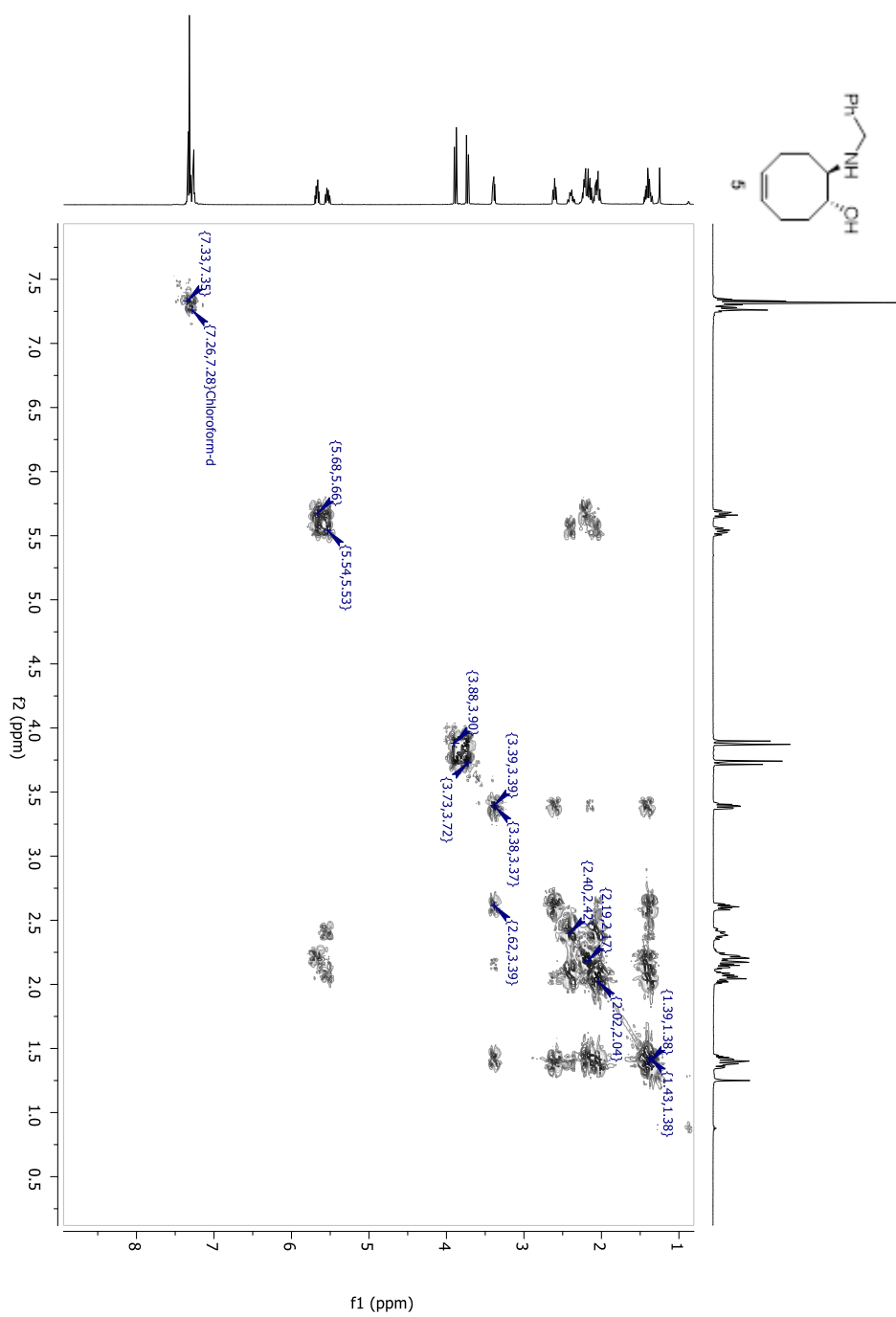
IR (ATR)



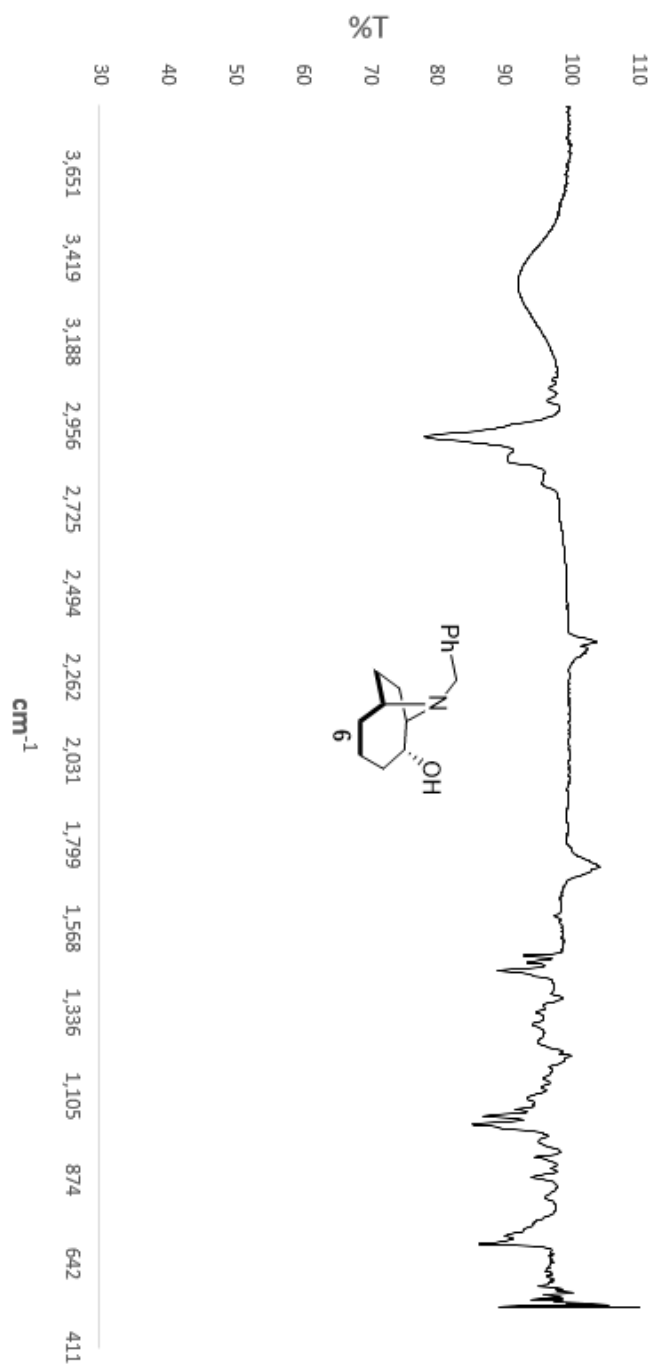
(¹H-RMN, 300 MHz CDCl₃)



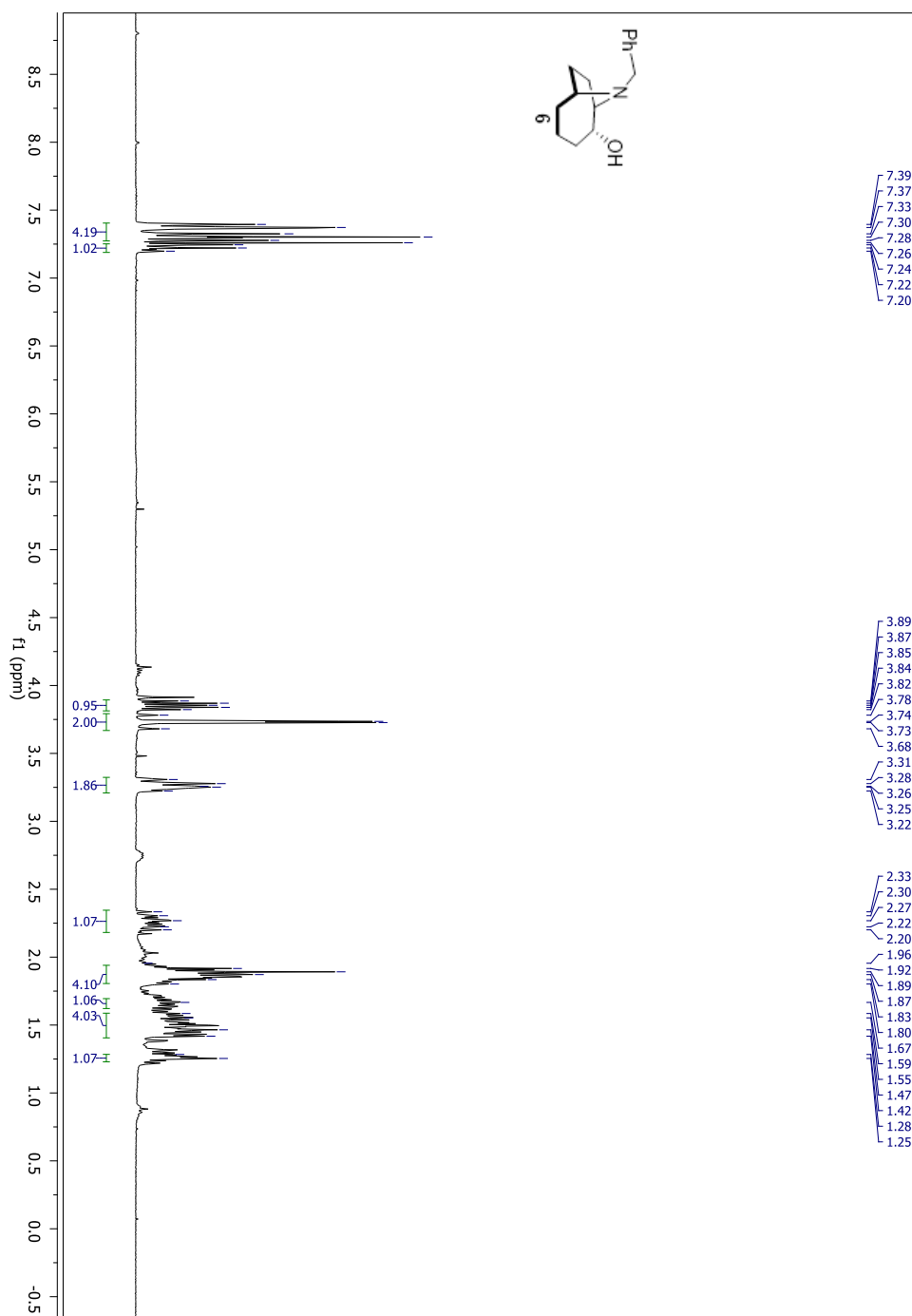
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

(COSY, 300 MHz CDCl₃)

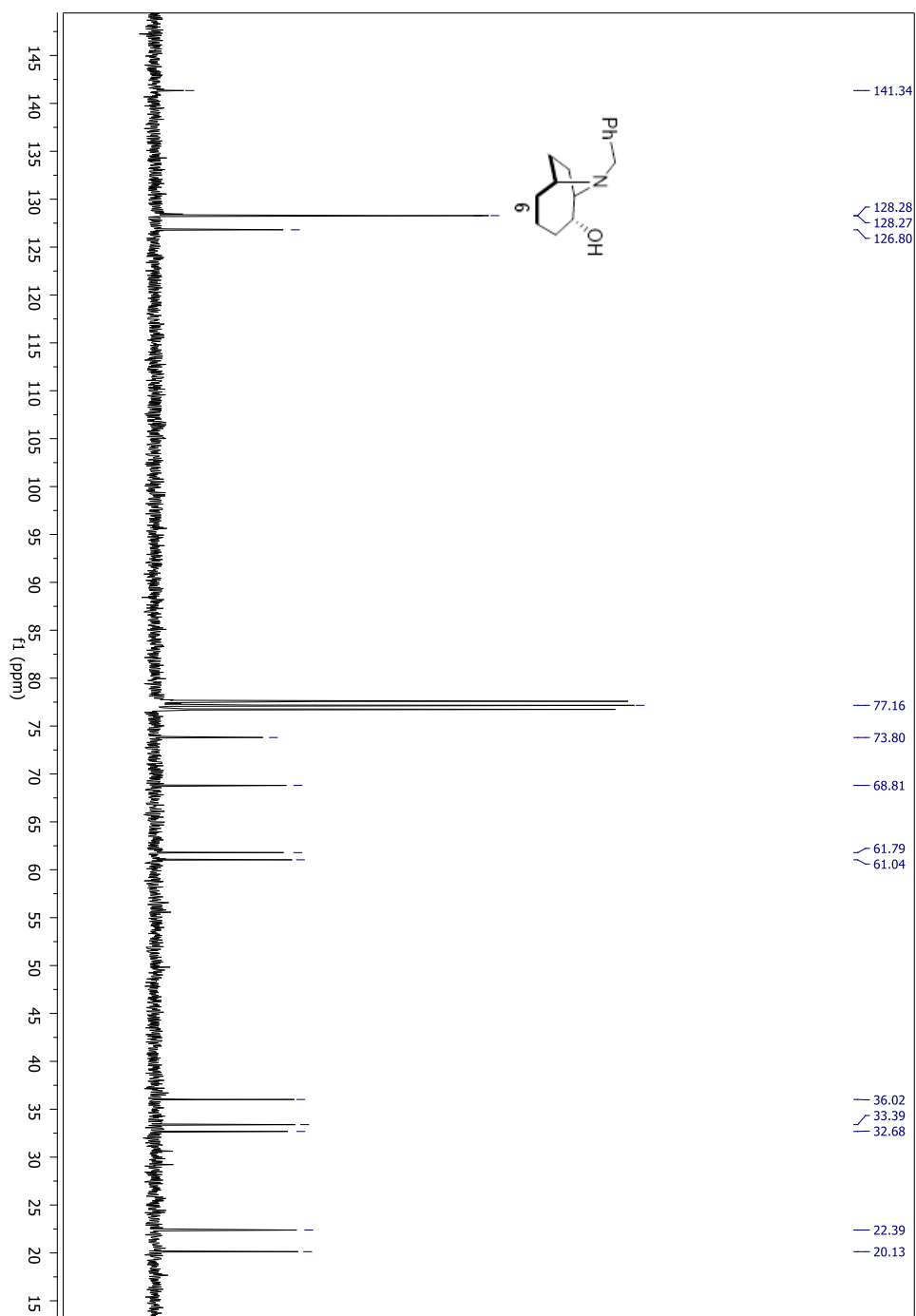
IR (ATR)

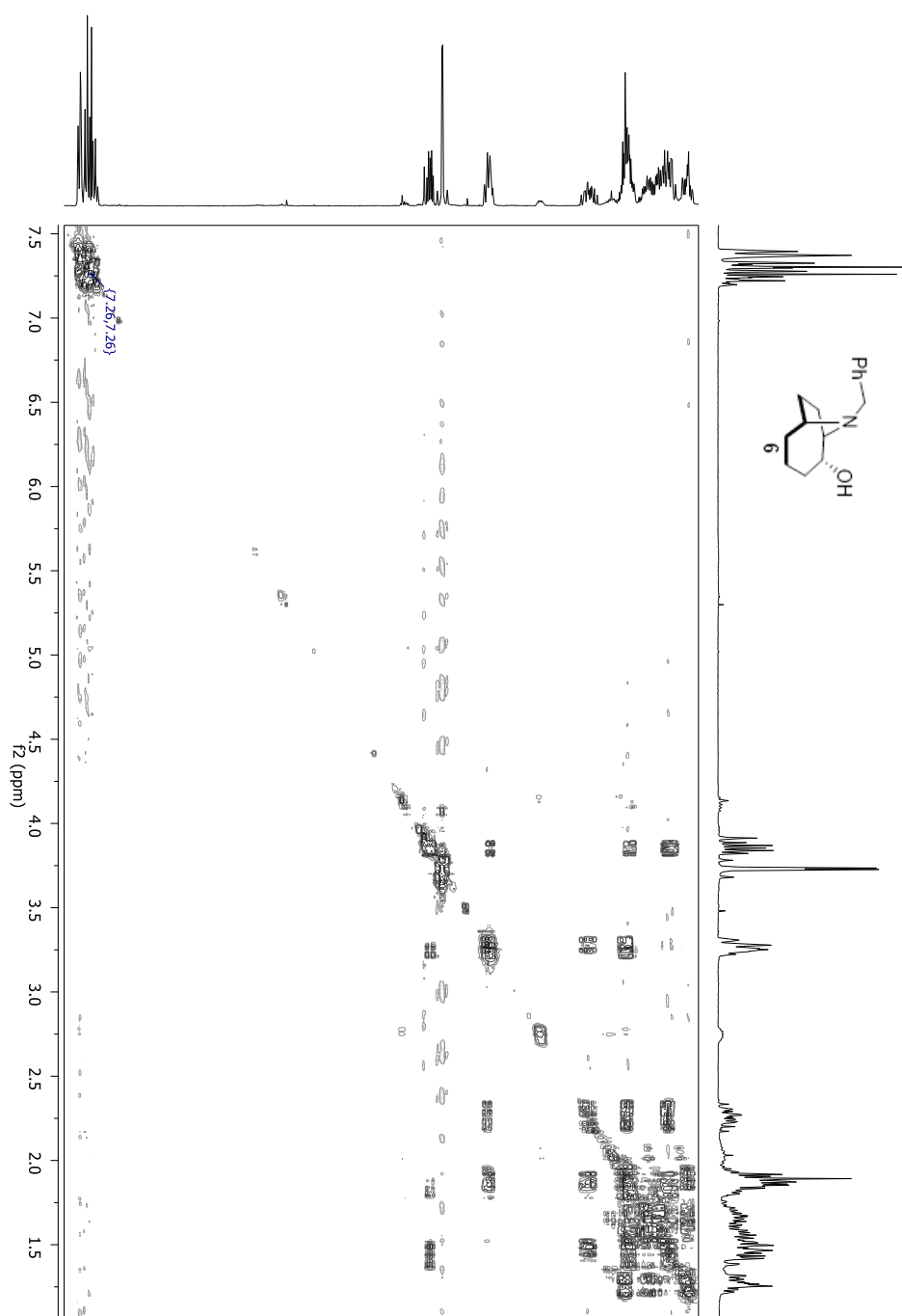


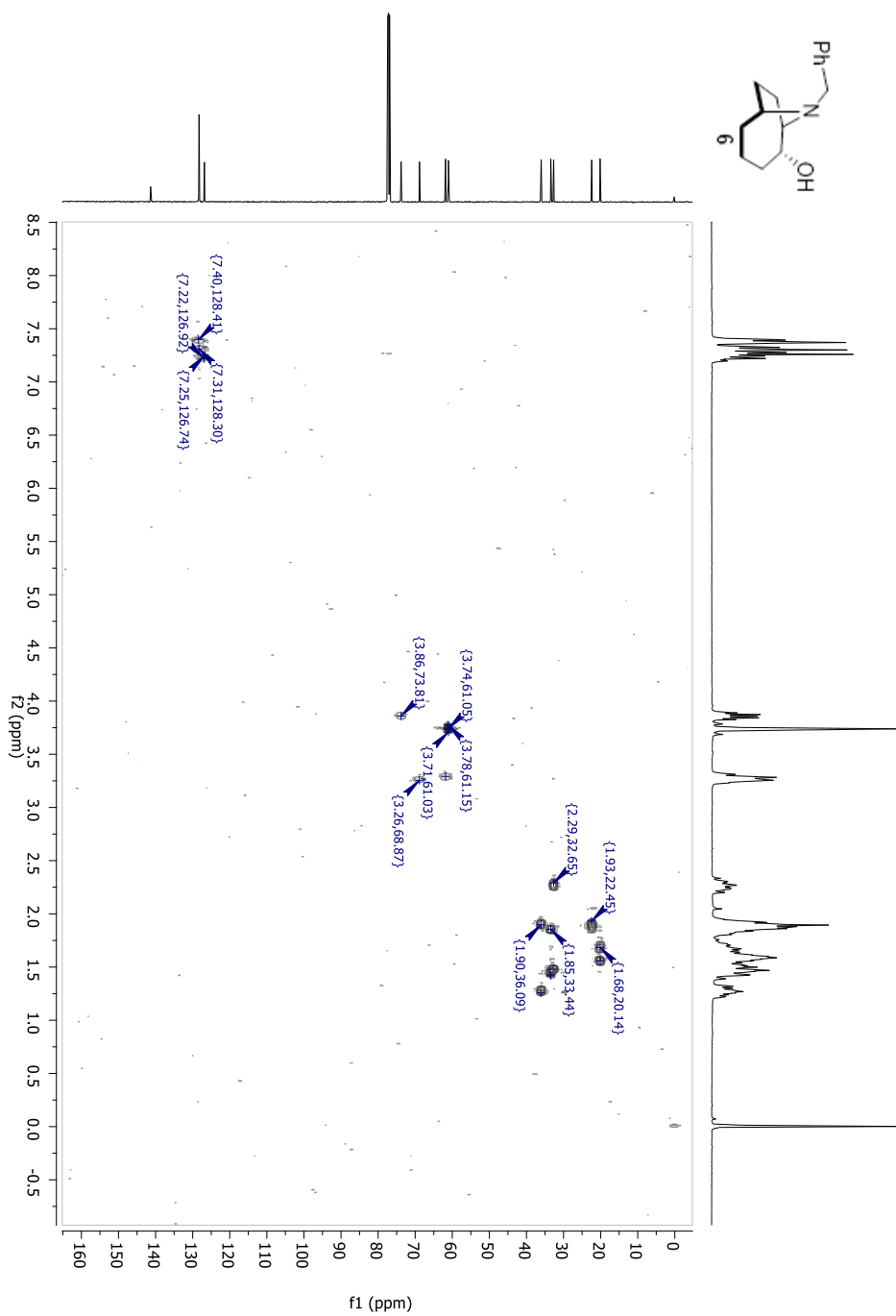
(¹H-RMN, 300 MHz CDCl₃)

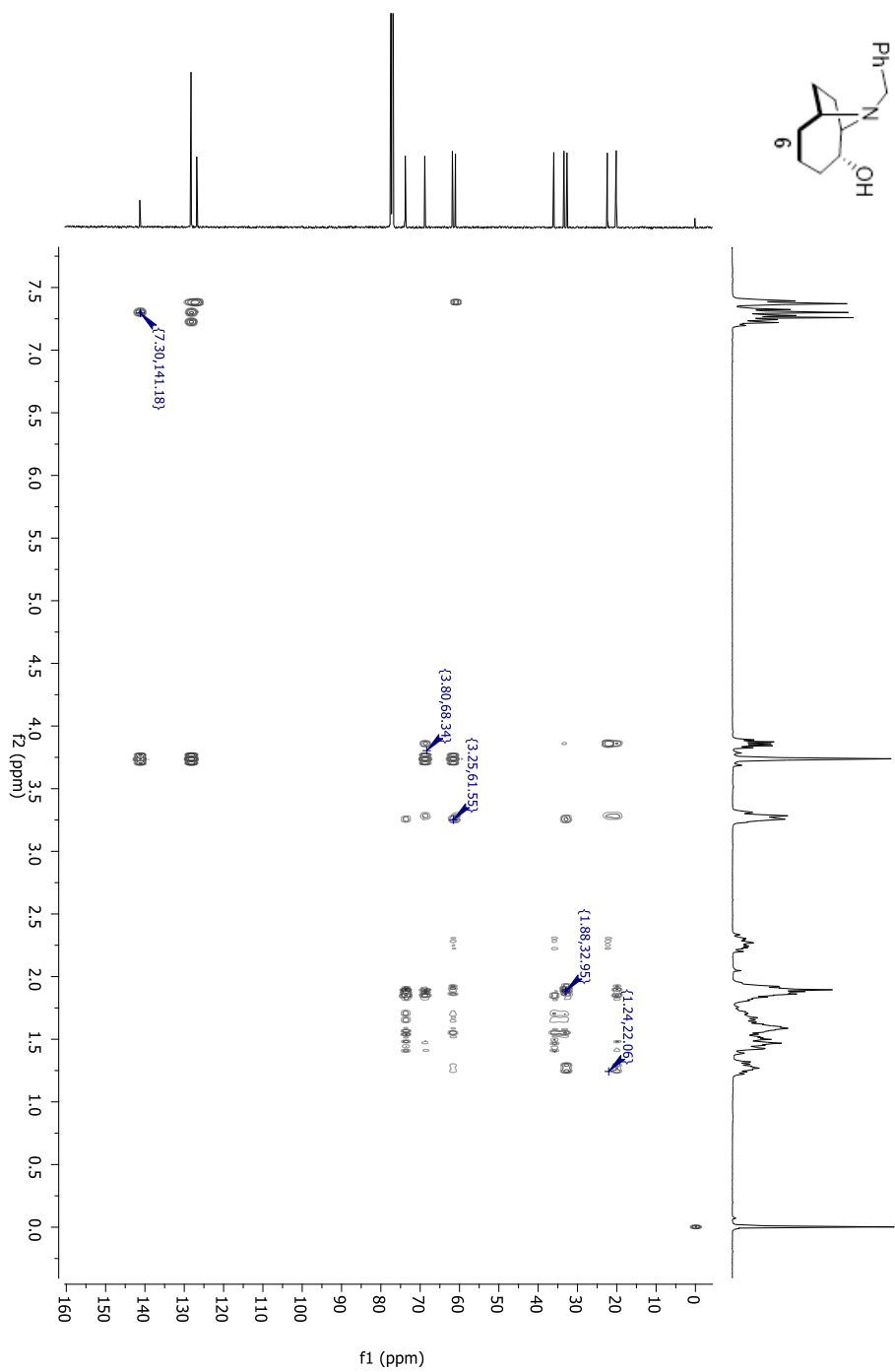


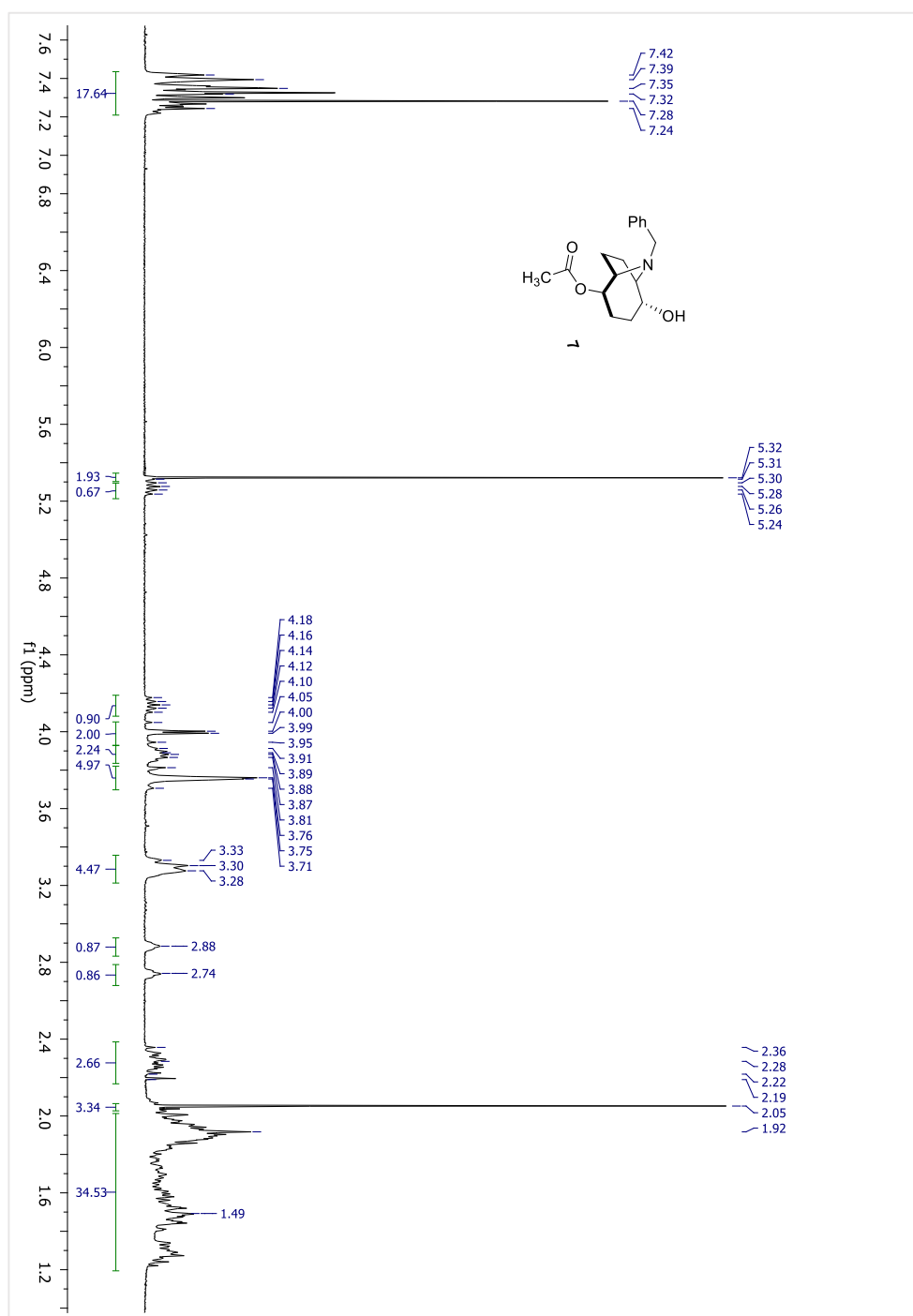
(^{13}C -RMN, 75 MHz CDCl_3)

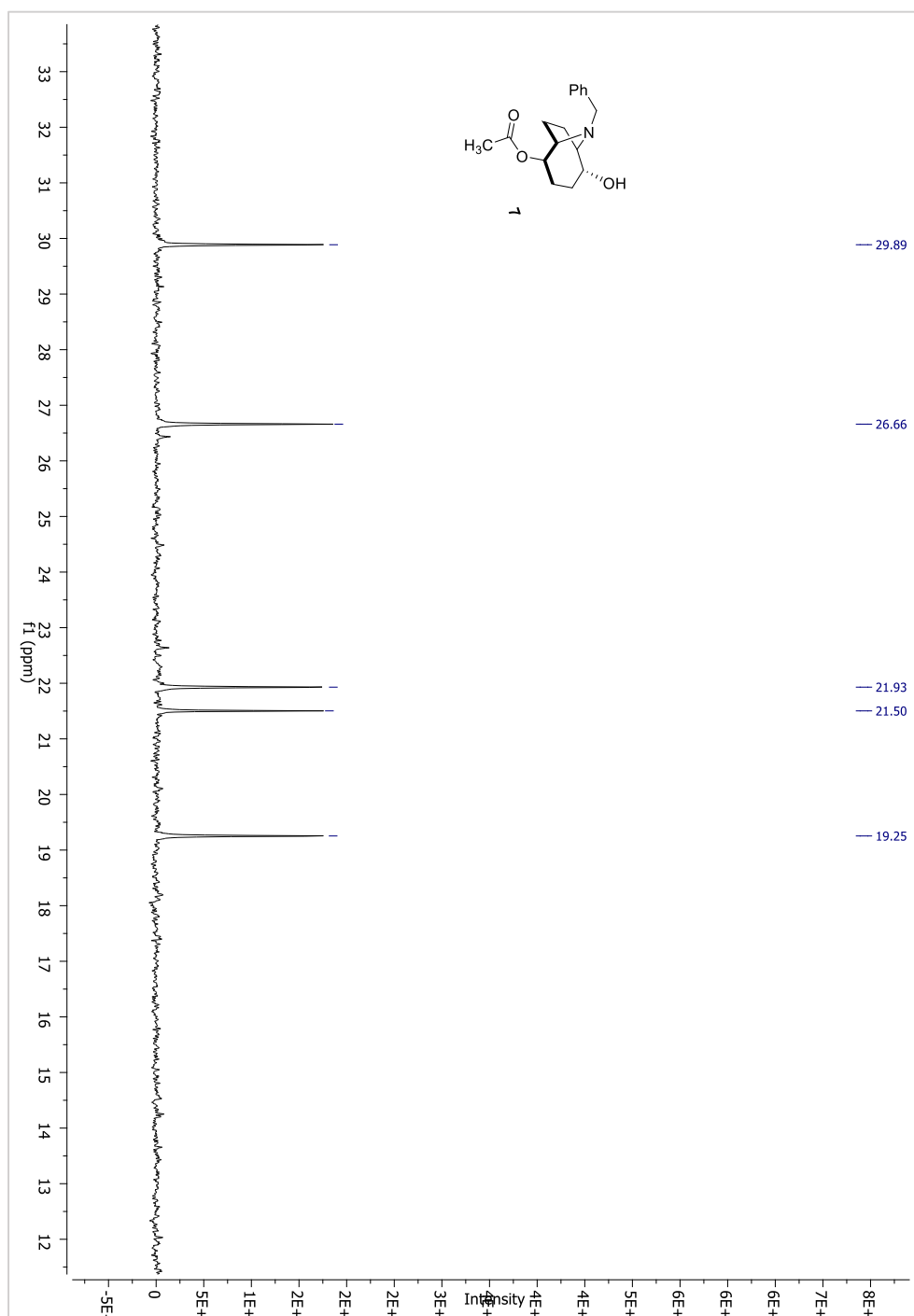


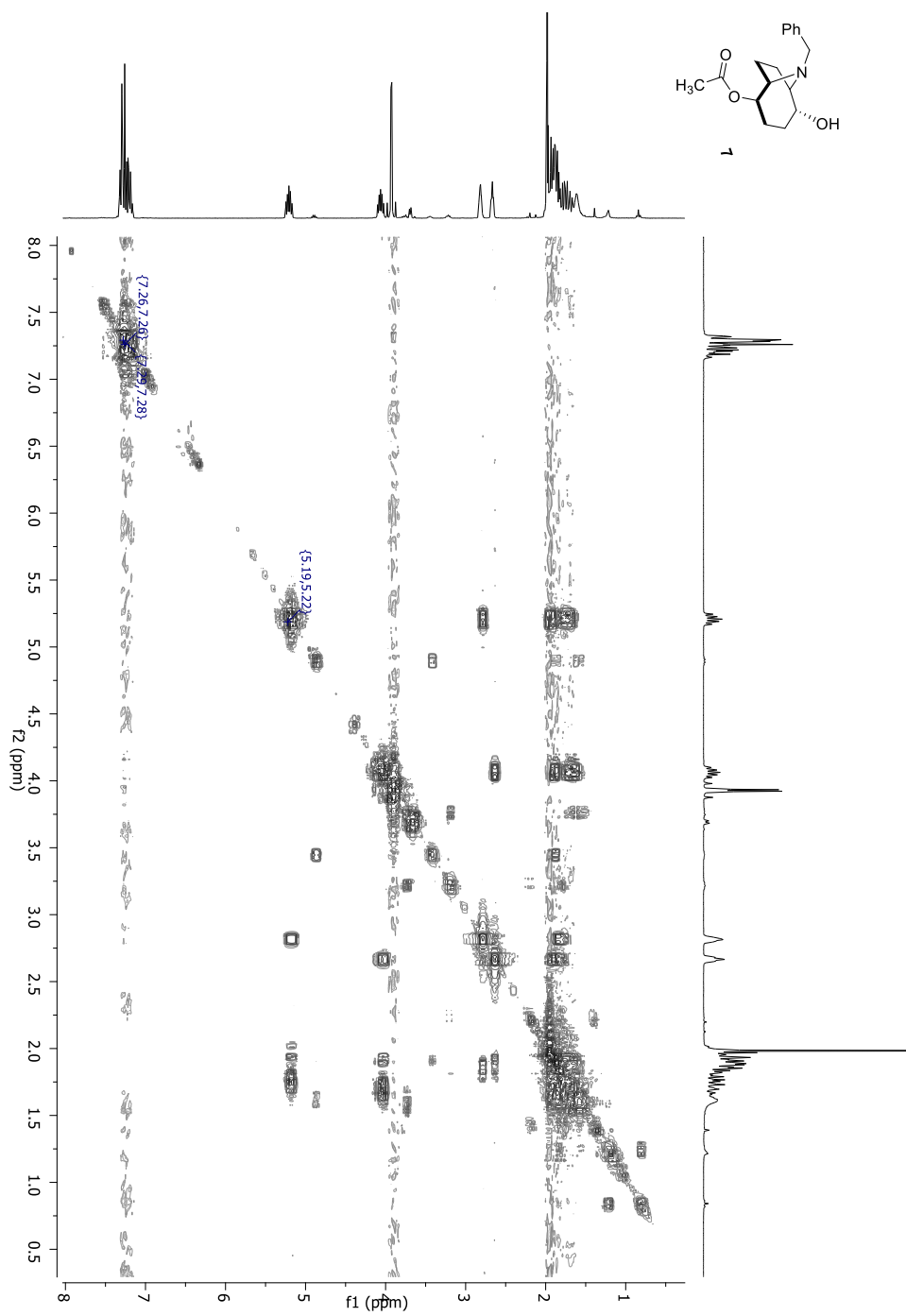
(COSY, 300 MHz CDCl₃)

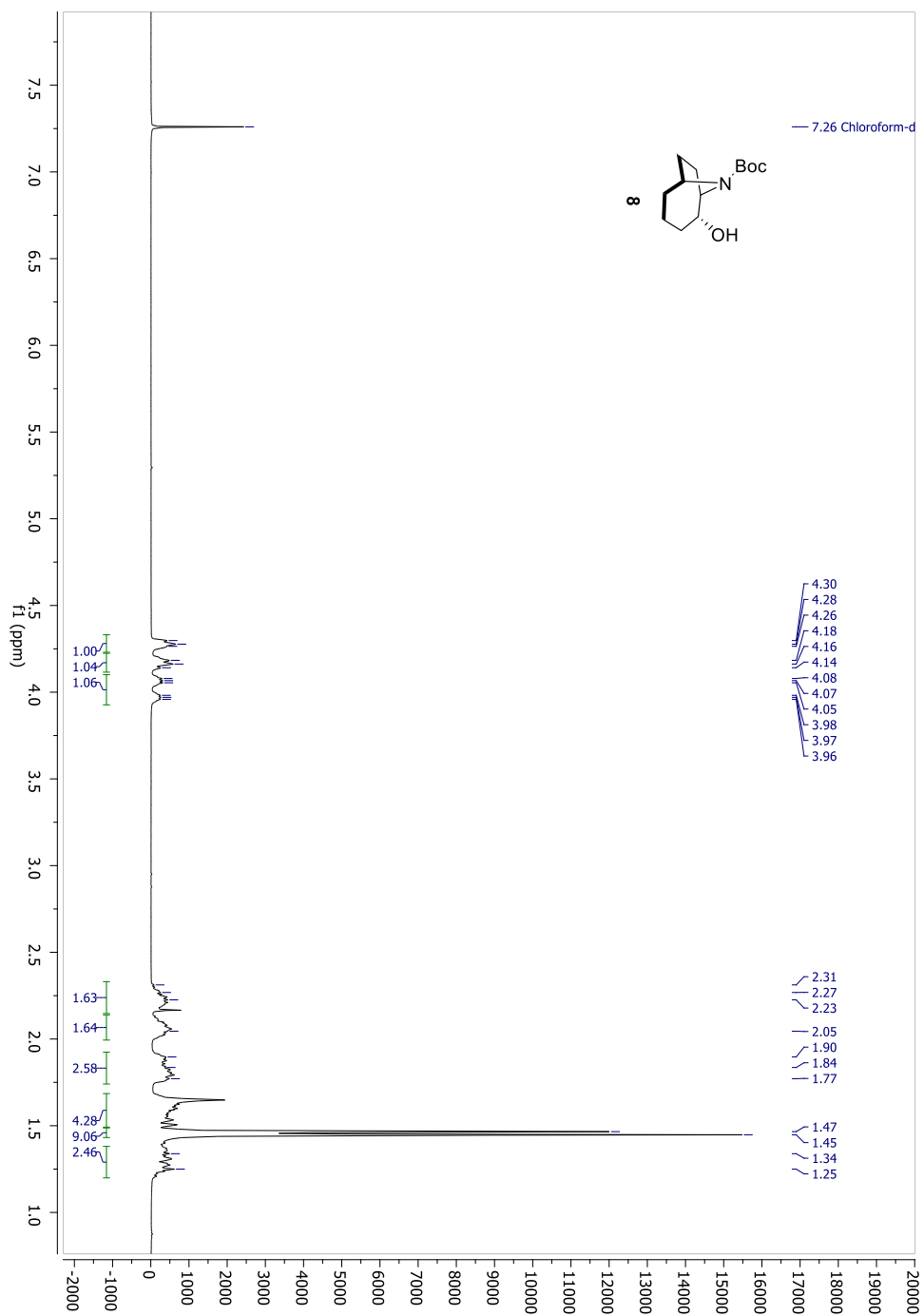
(HSQC, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ CDCl_3)

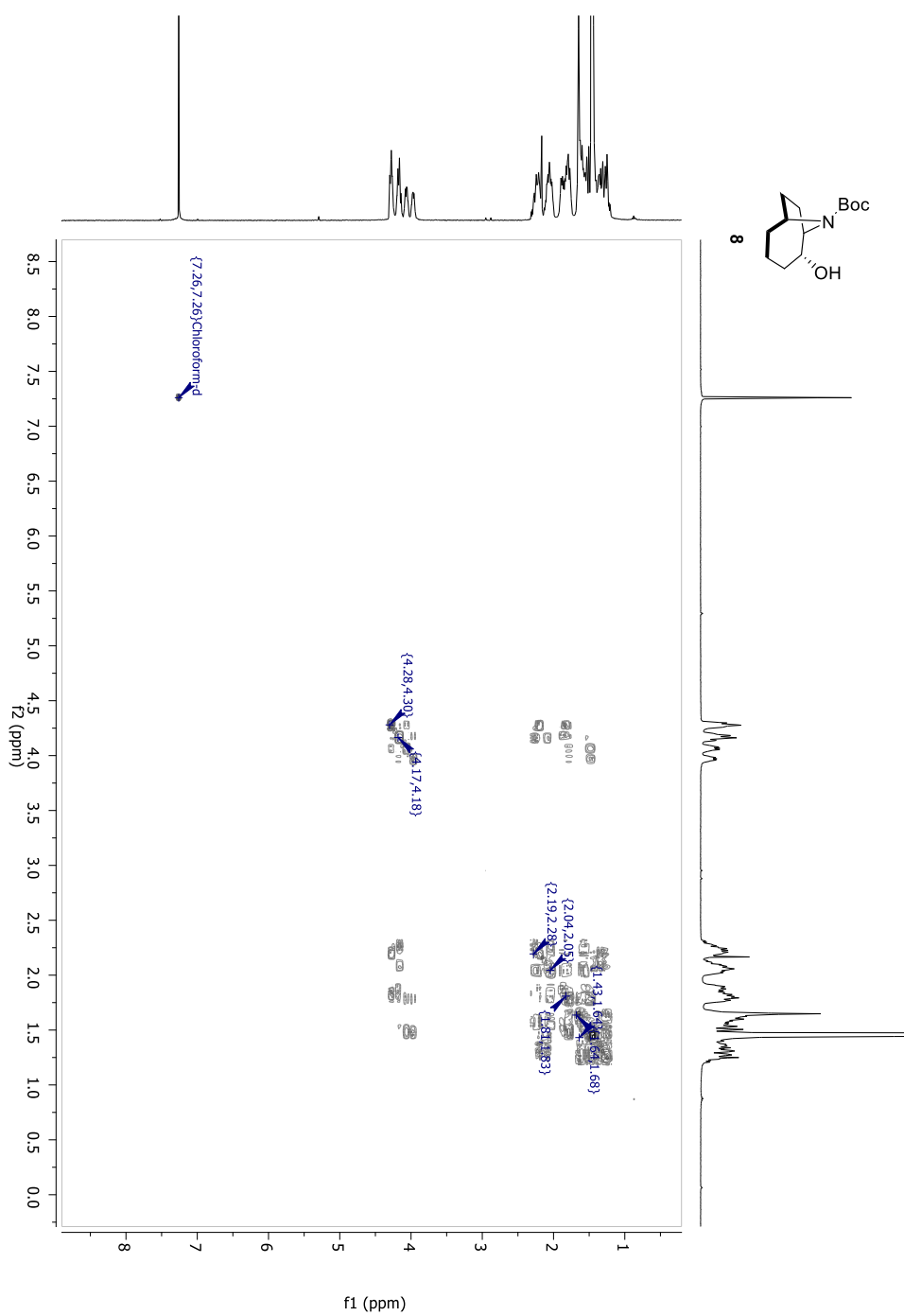
(HMBC, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ CDCl_3)

^1H -RMN, 300 MHz CDCl_3 

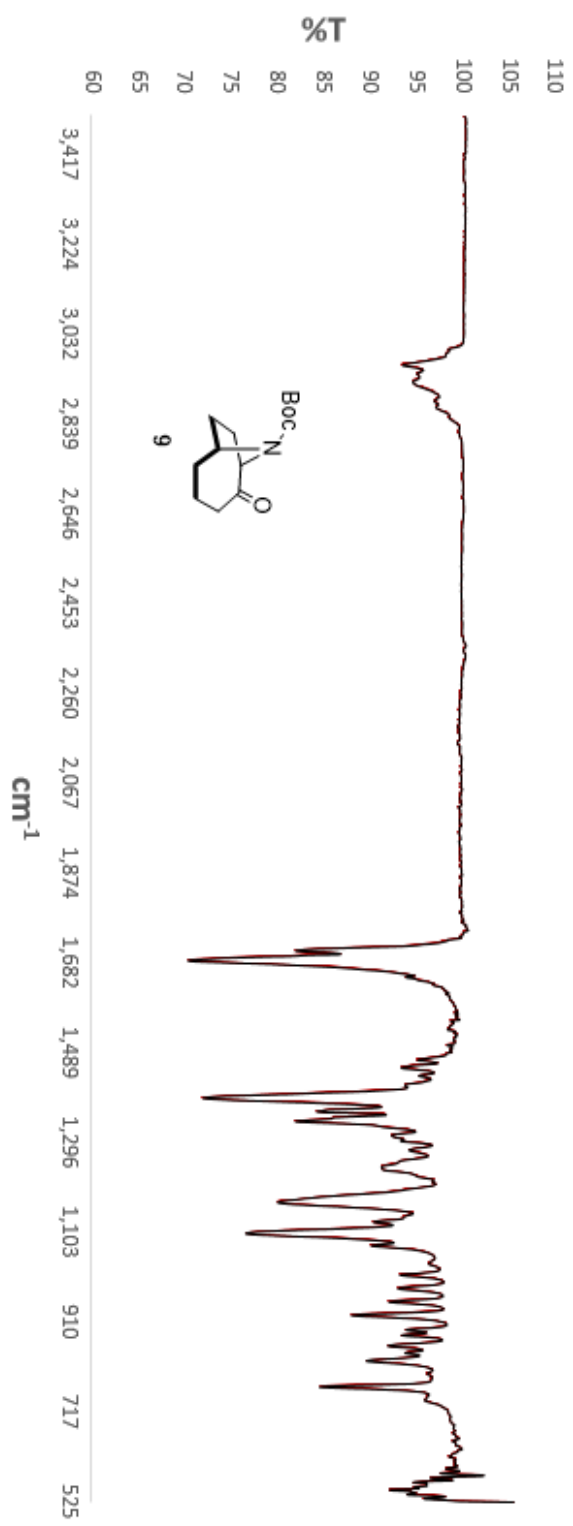
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

(COSY, 300 MHz CDCl₃)

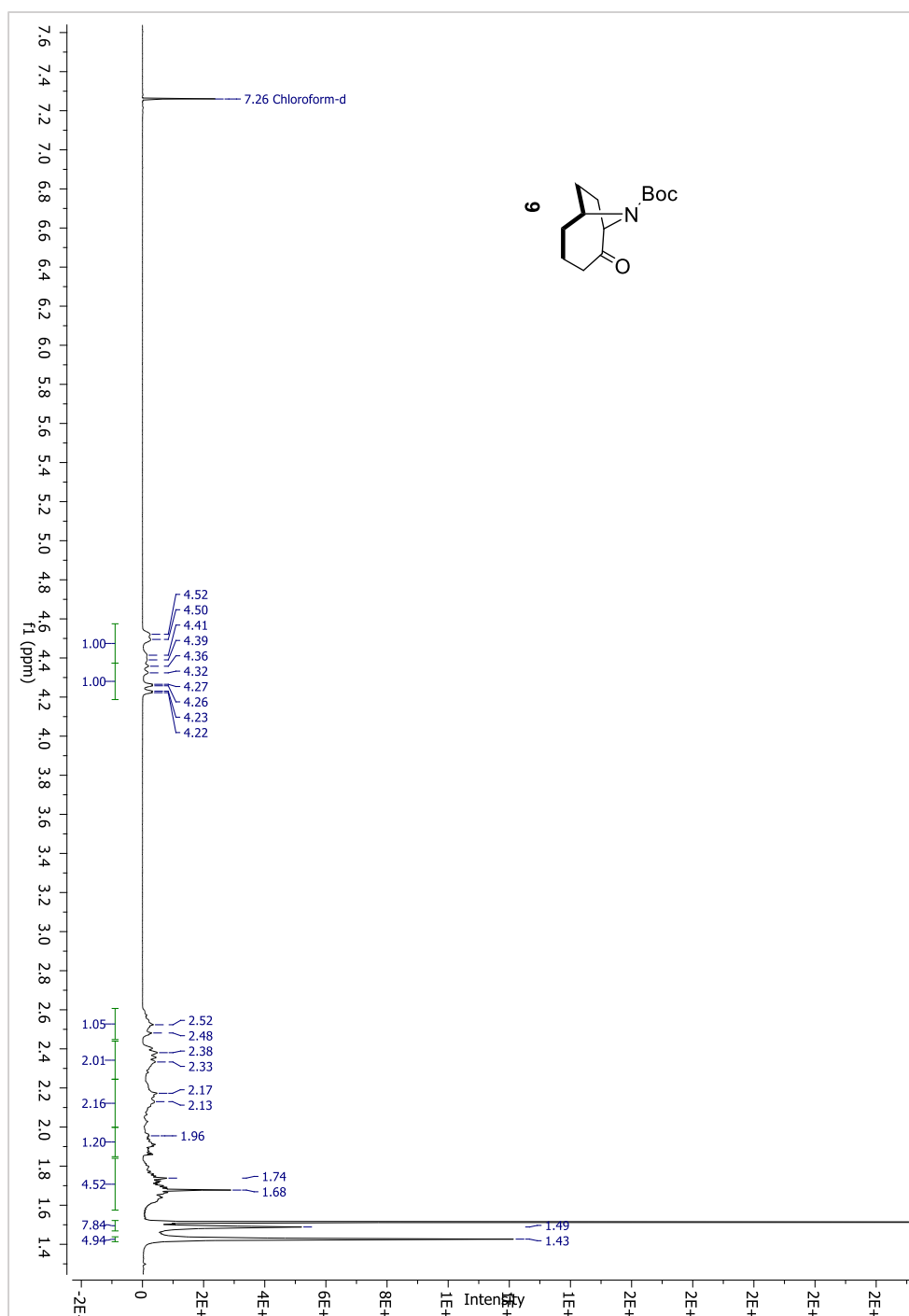
^1H -RMN, 300 MHz CDCl_3 

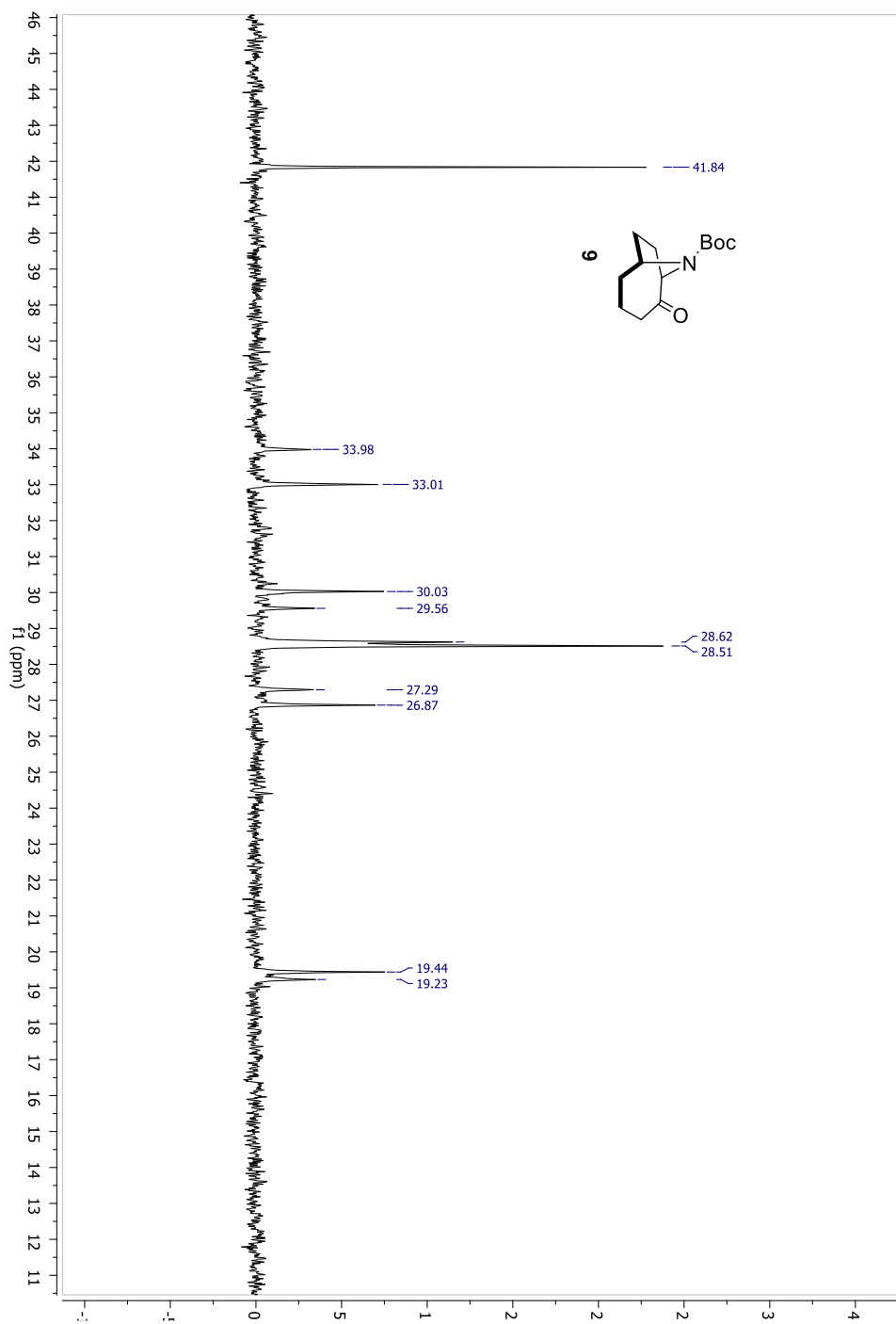
(COSY, 300 MHz CDCl₃)

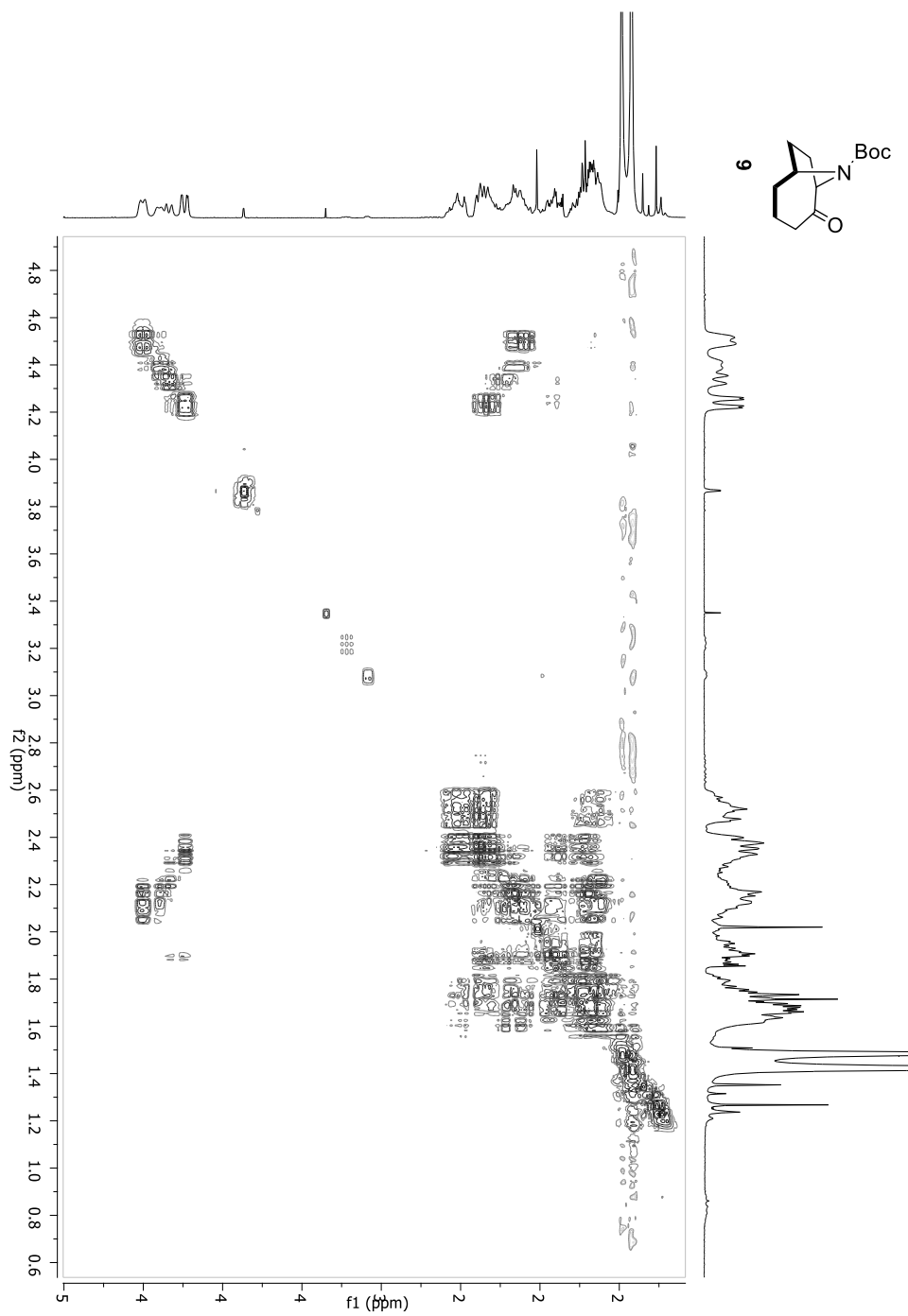
IR (ATR)

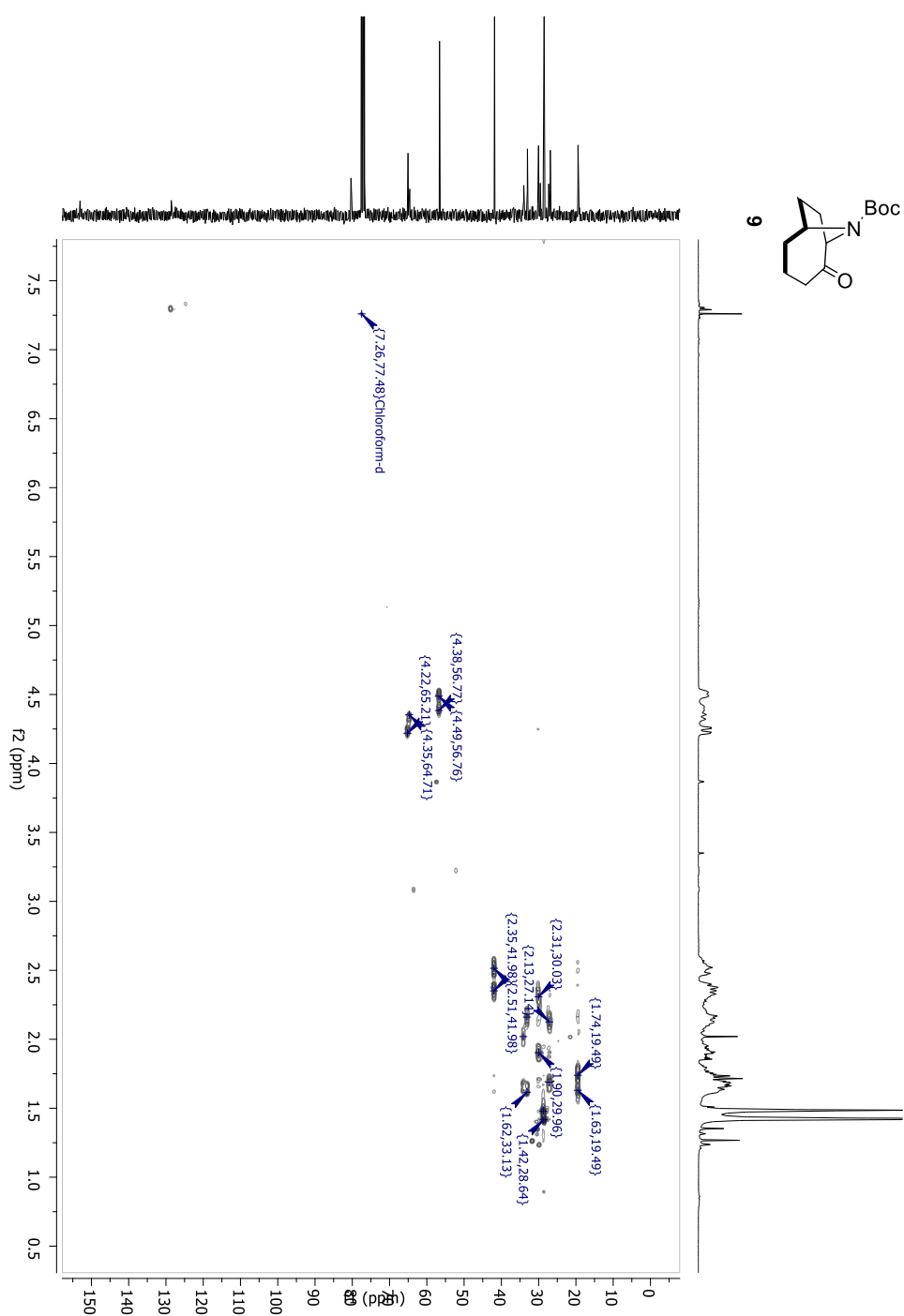


(¹H-RMN, 300 MHz CDCl₃)

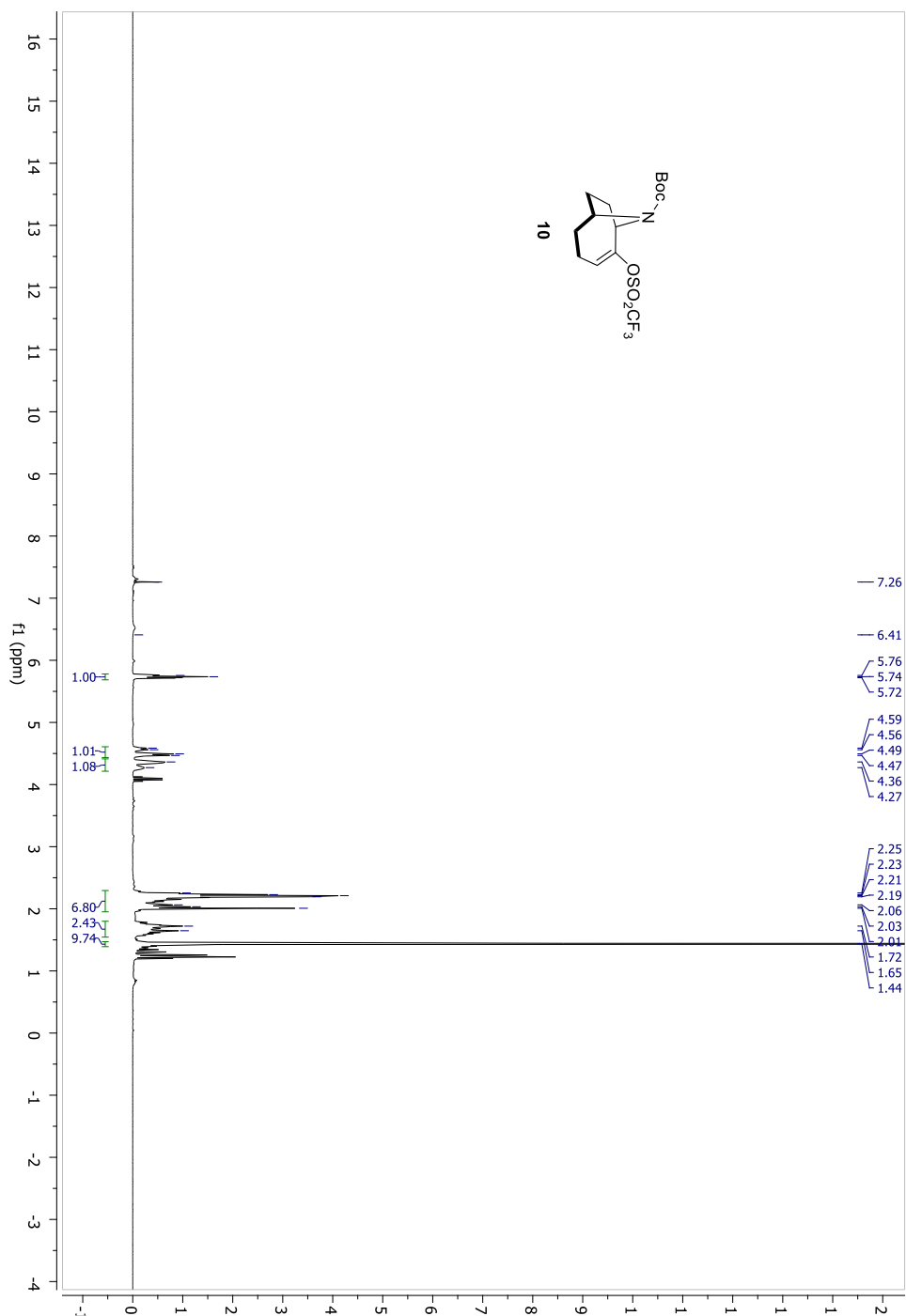


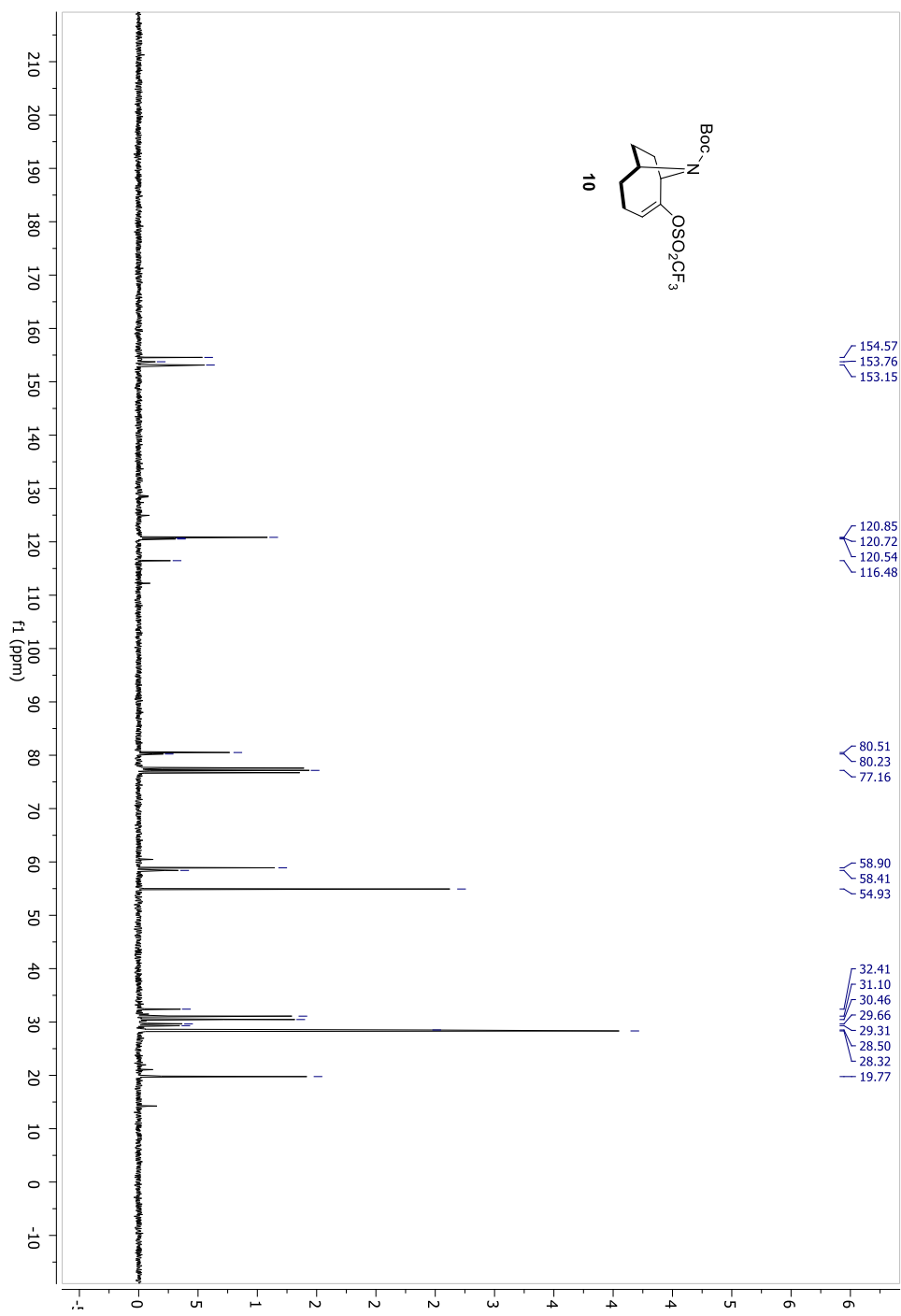
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

(COSY, 300 MHz CDCl₃)

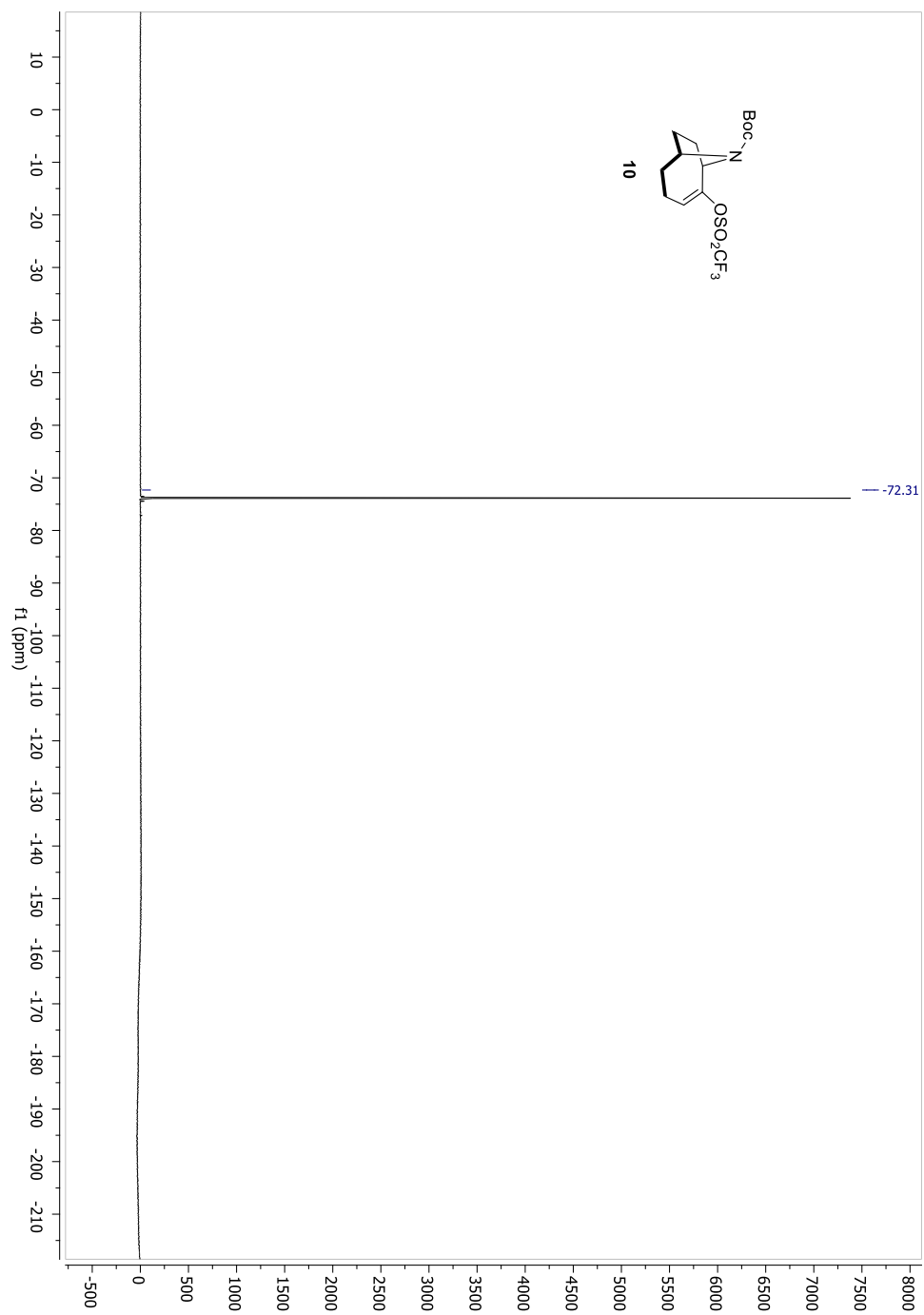
(HSQC, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ CDCl_3)

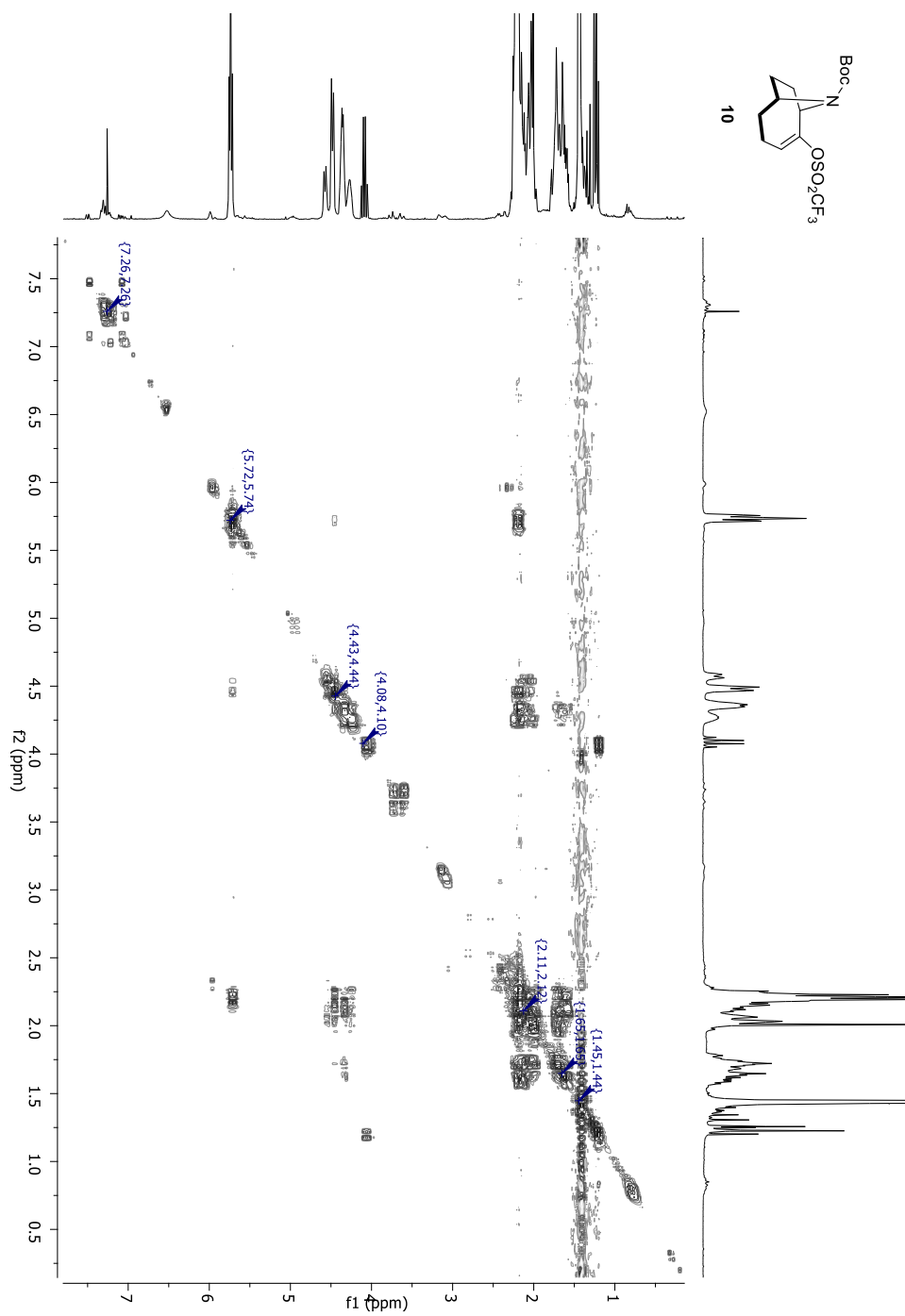
(¹H-RMN, 300 MHz CDCl₃)

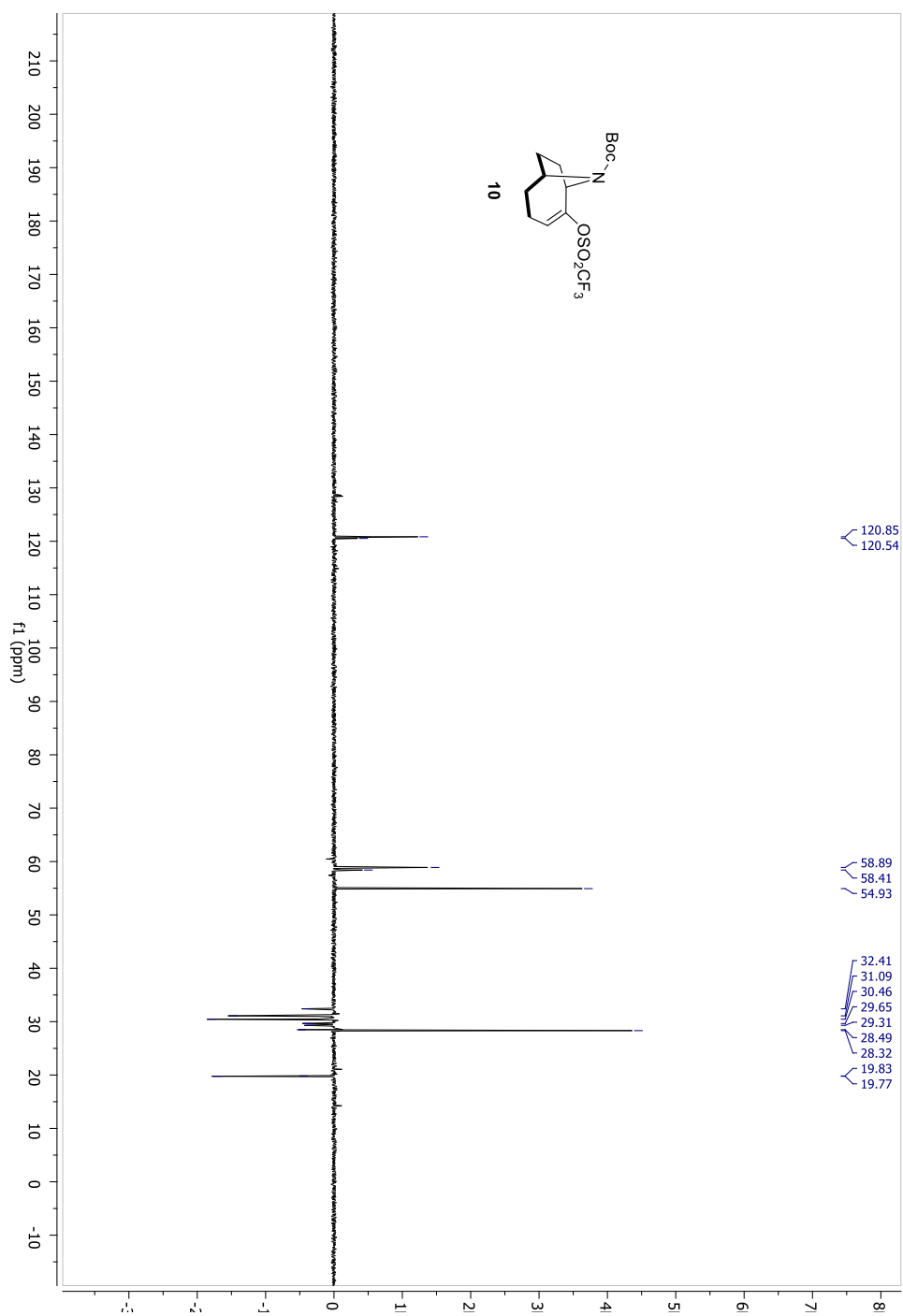


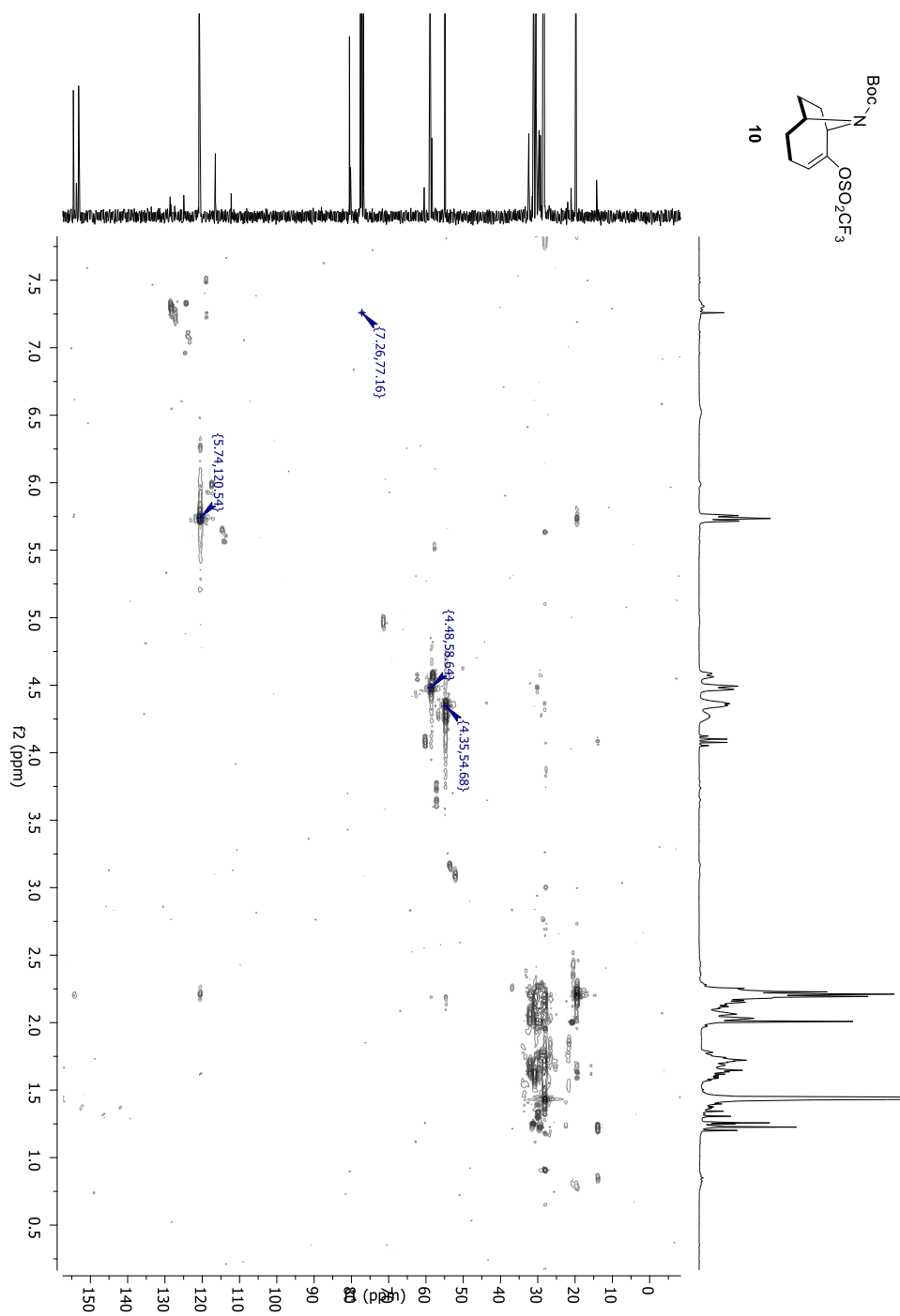
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

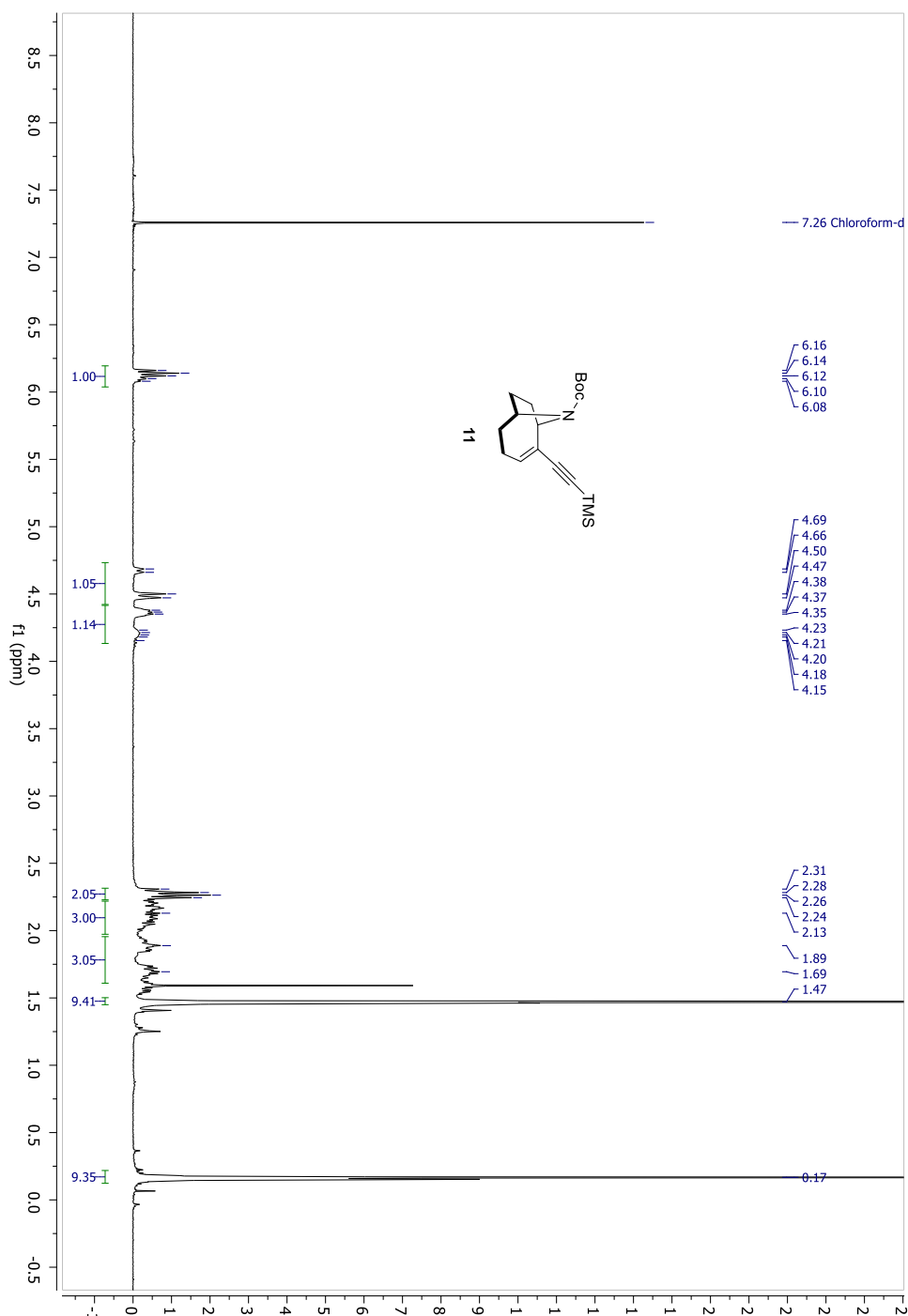
(^{19}F -RMN, 282 MHz CDF_3)



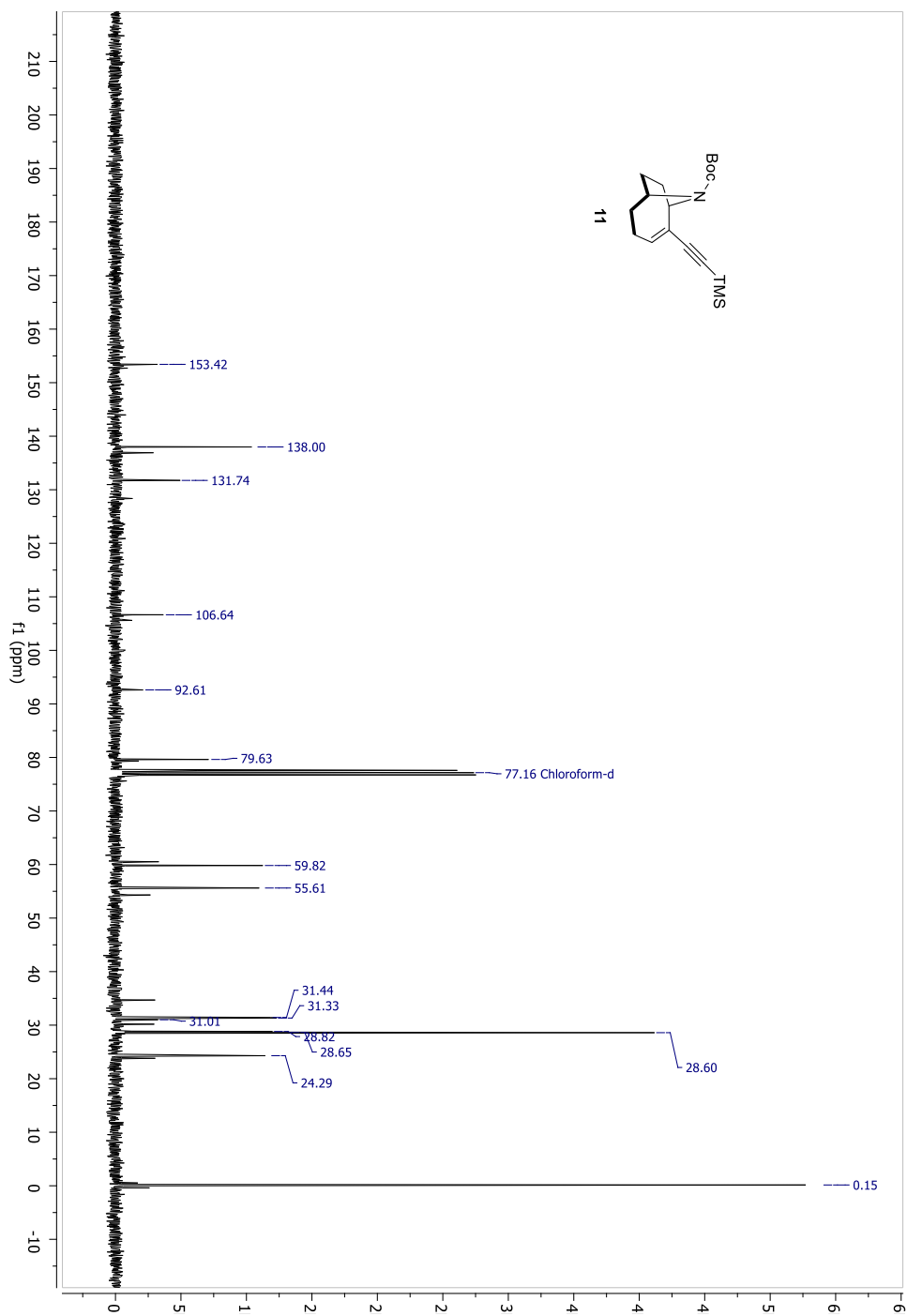
(COSY, 300 MHz CDCl₃)

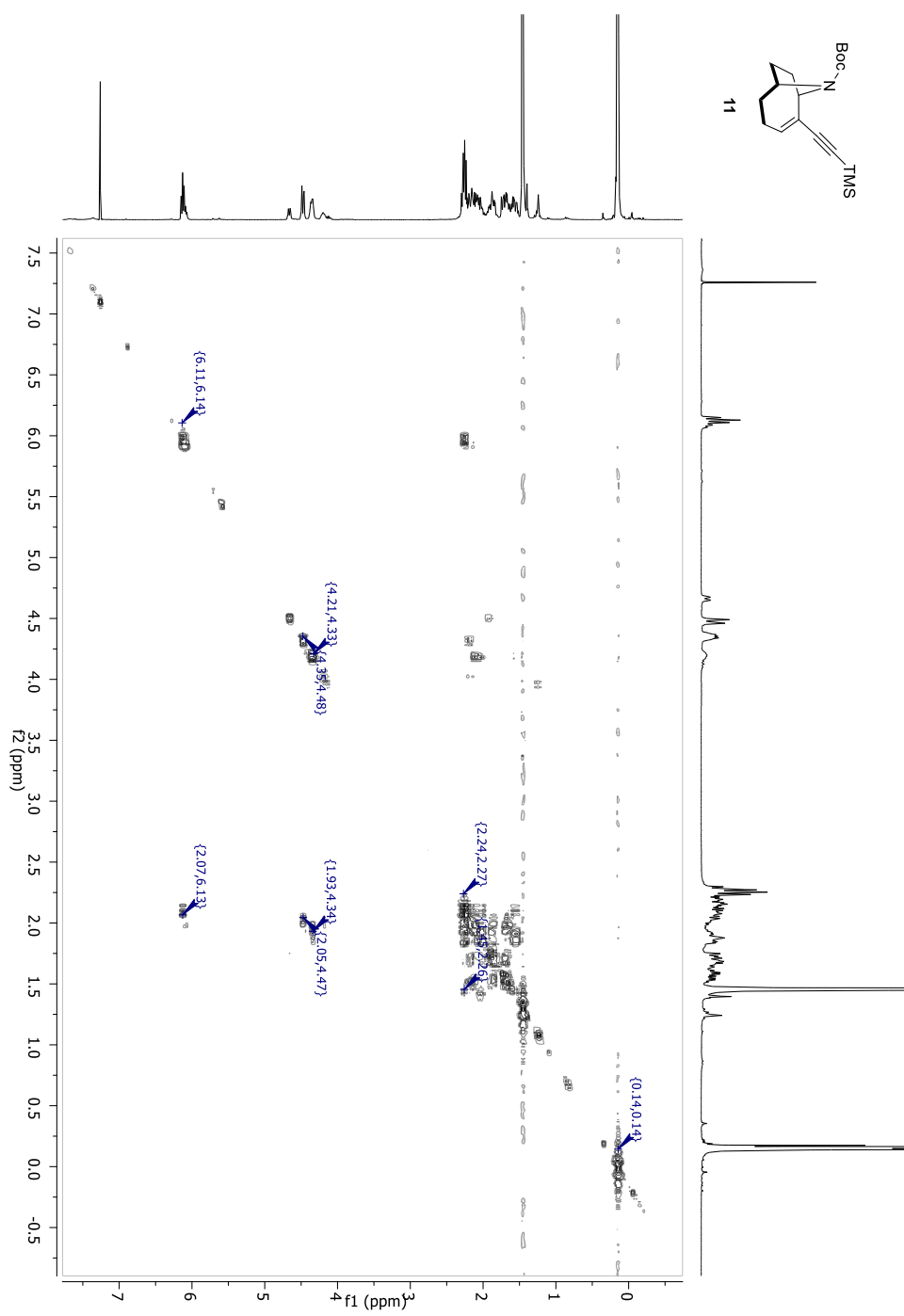
(DEPT, 75 MHz CDCl₃)

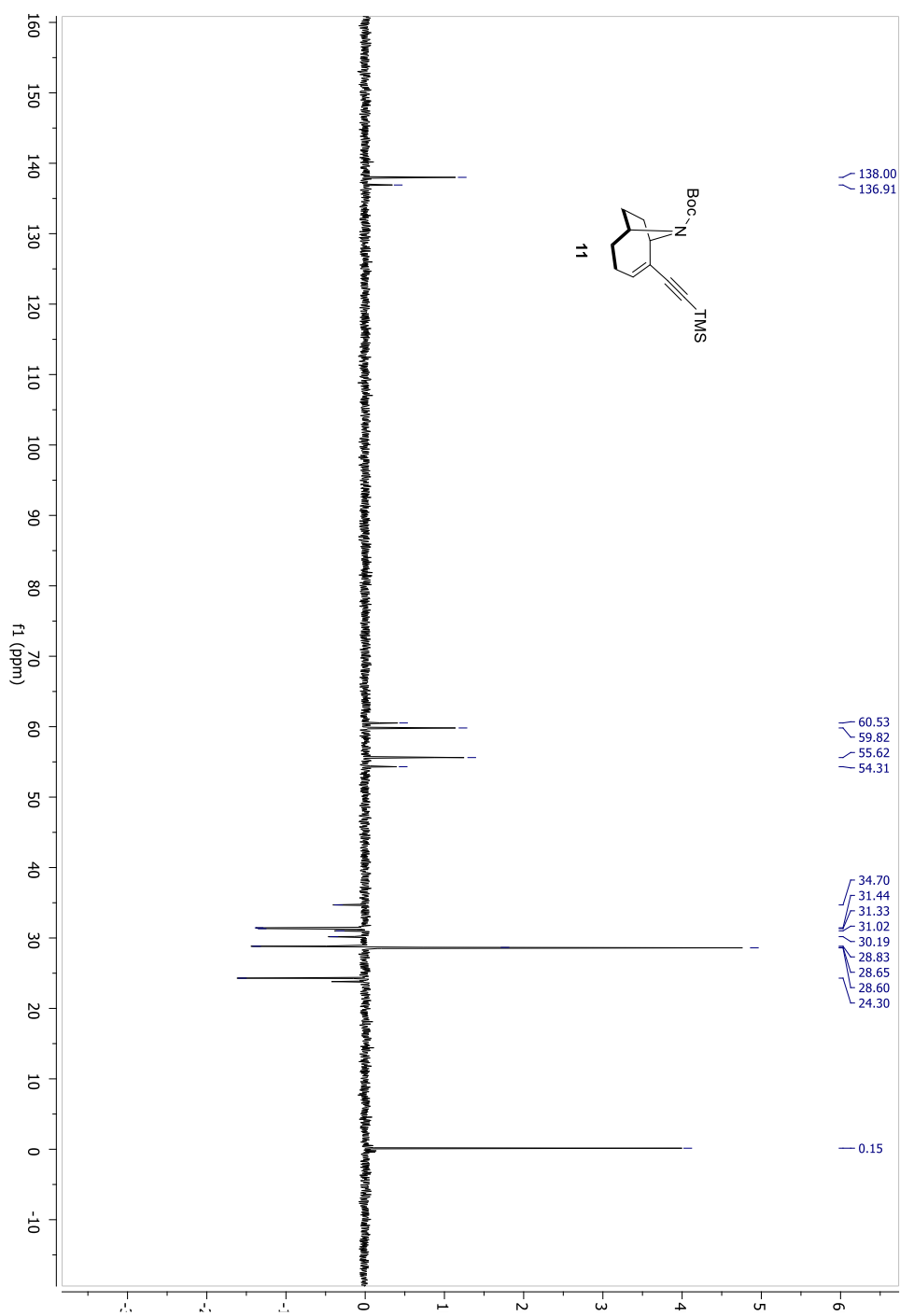
(HSQC, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ CDCl_3)

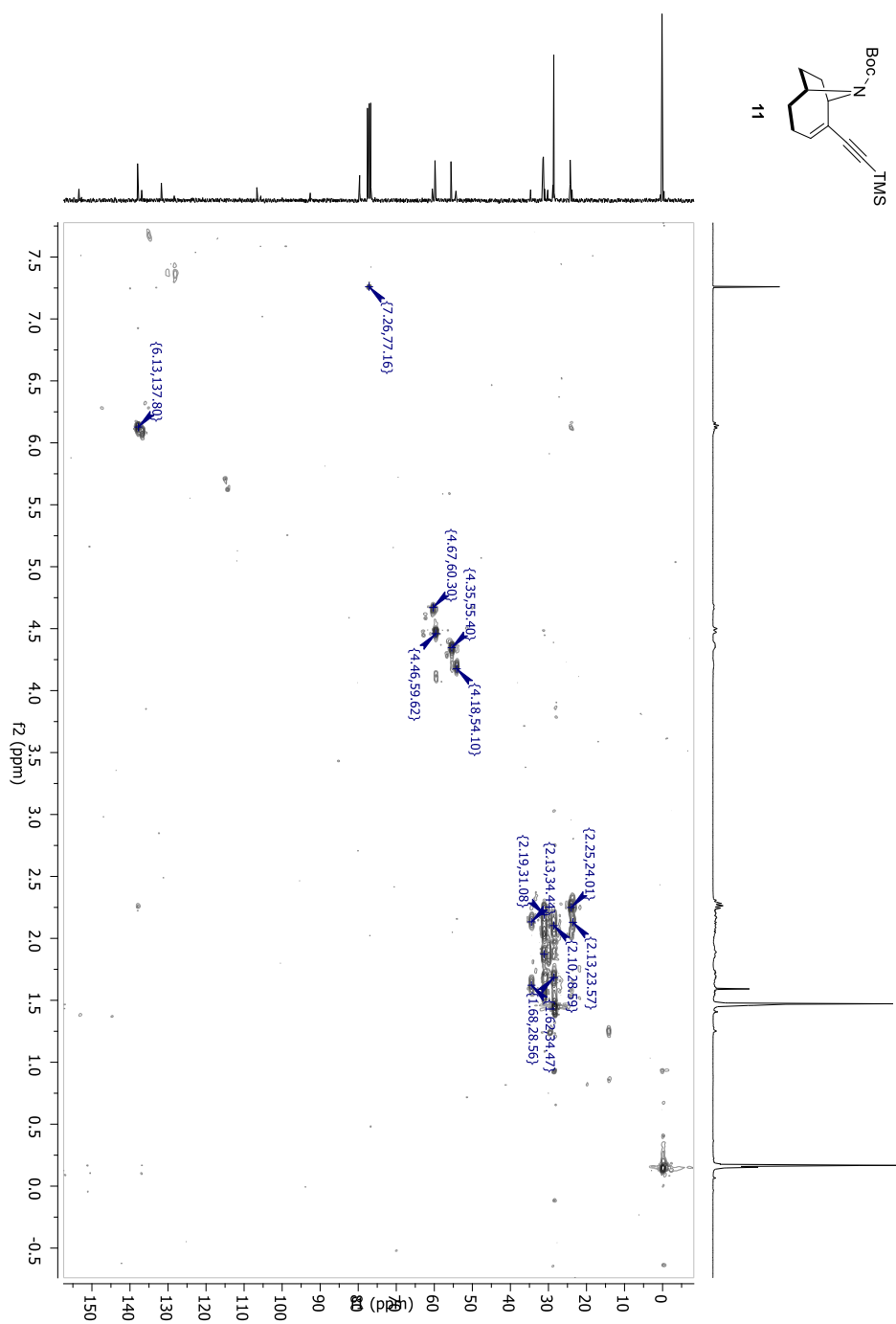
^1H -RMN, 300 MHz CDCl_3 

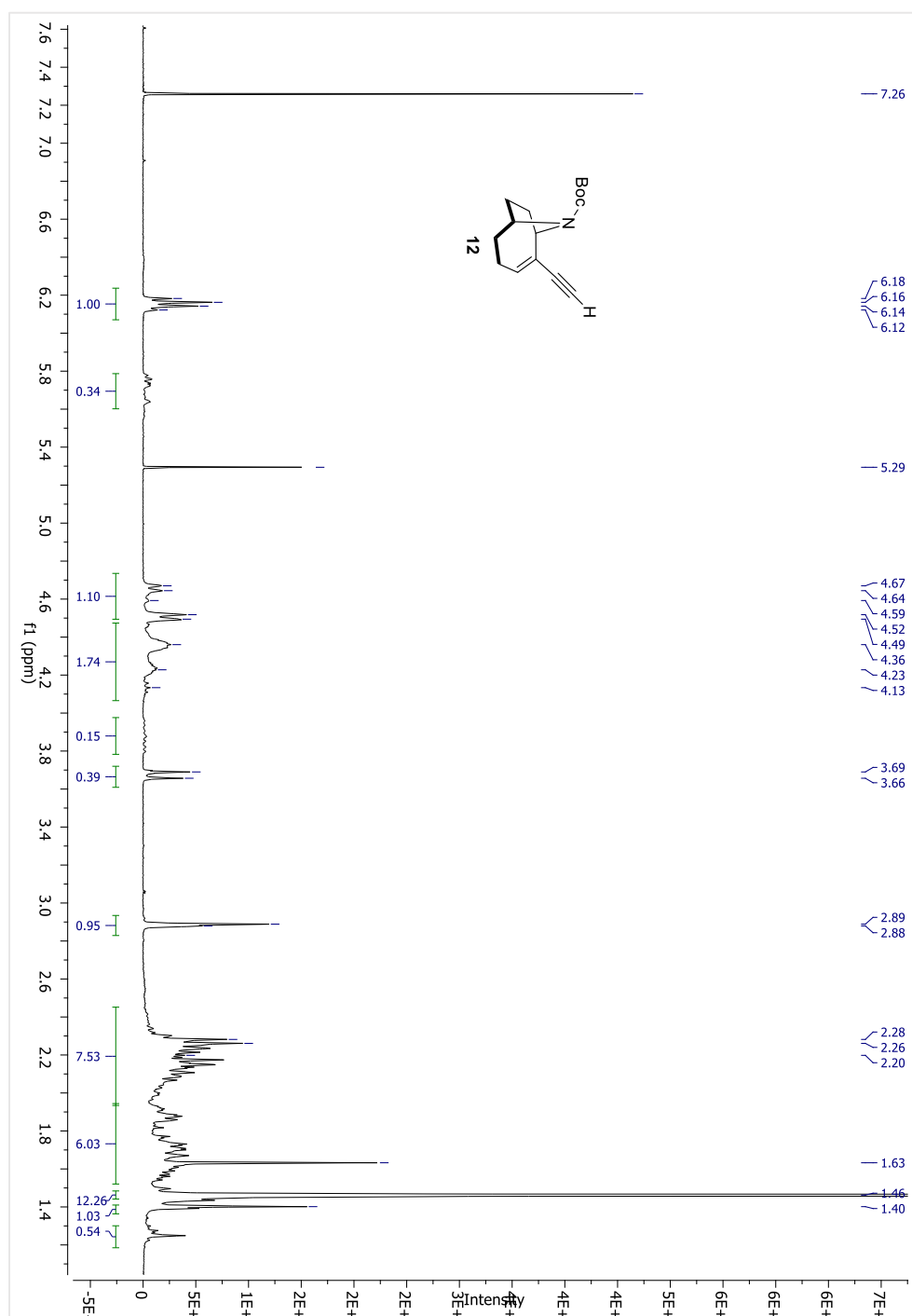
(^{13}C -RMN, 75 MHz CDCl_3)

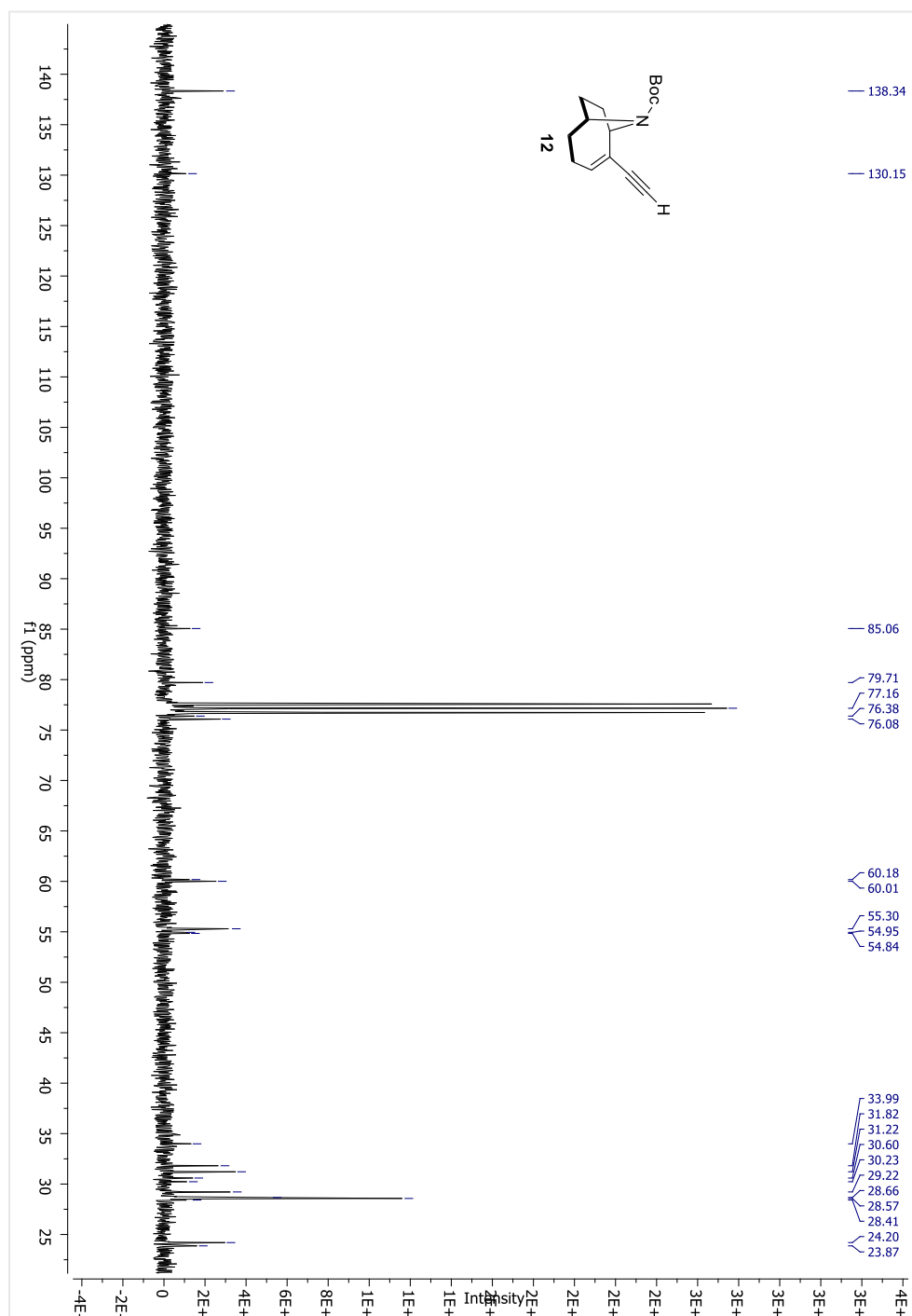


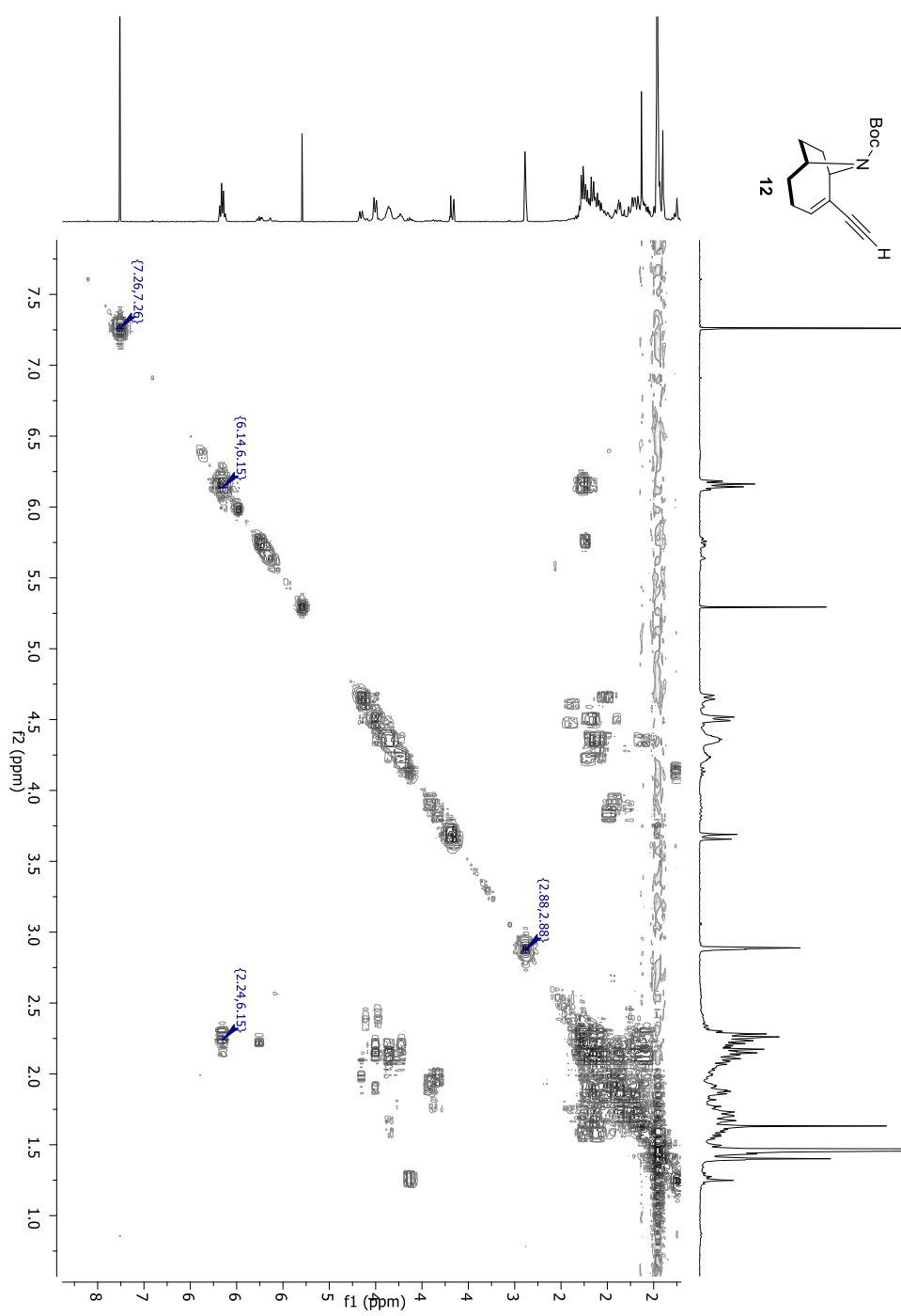
(COSY, 300 MHz CDCl₃)

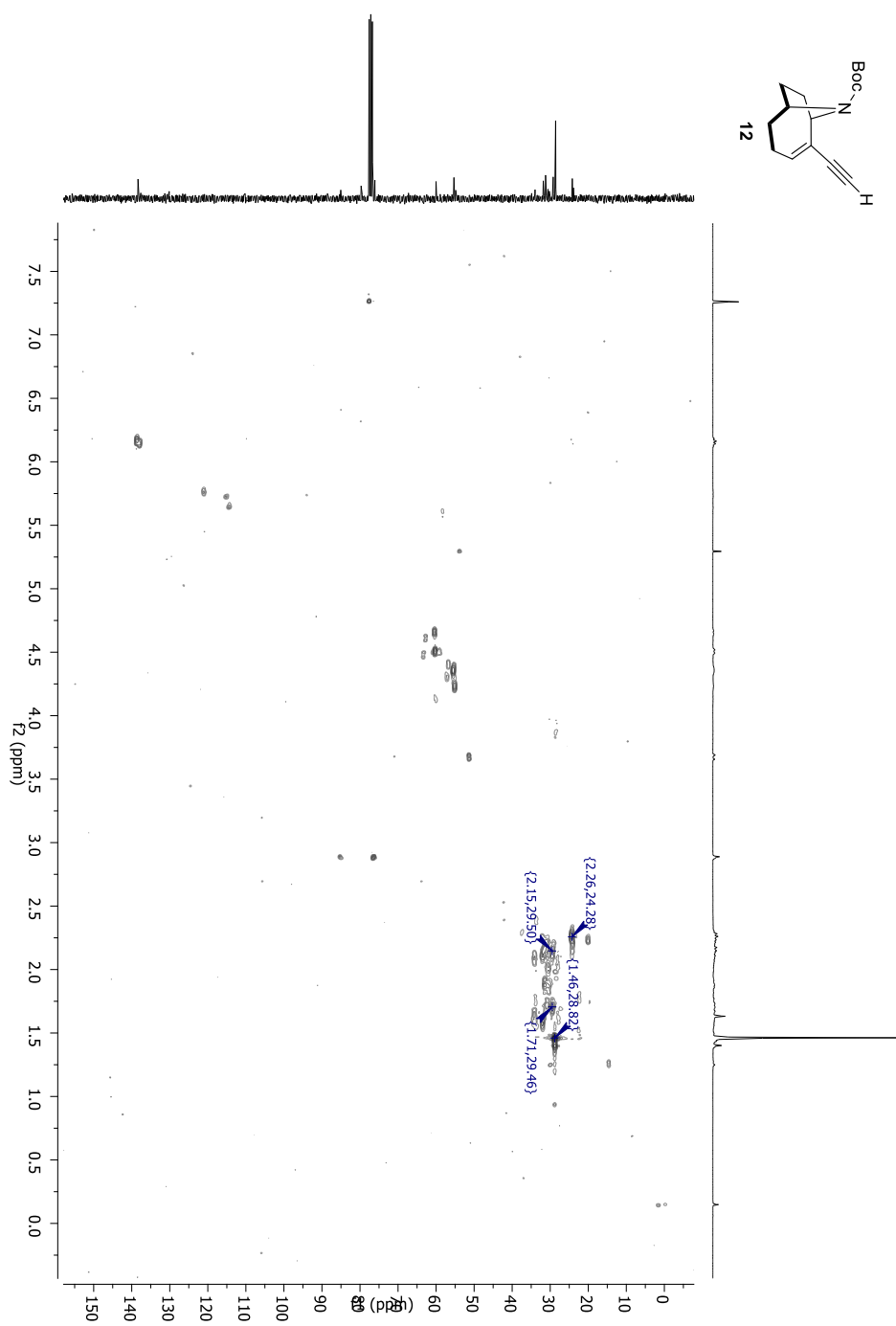
(DEPT, 300 MHz CDCl₃)

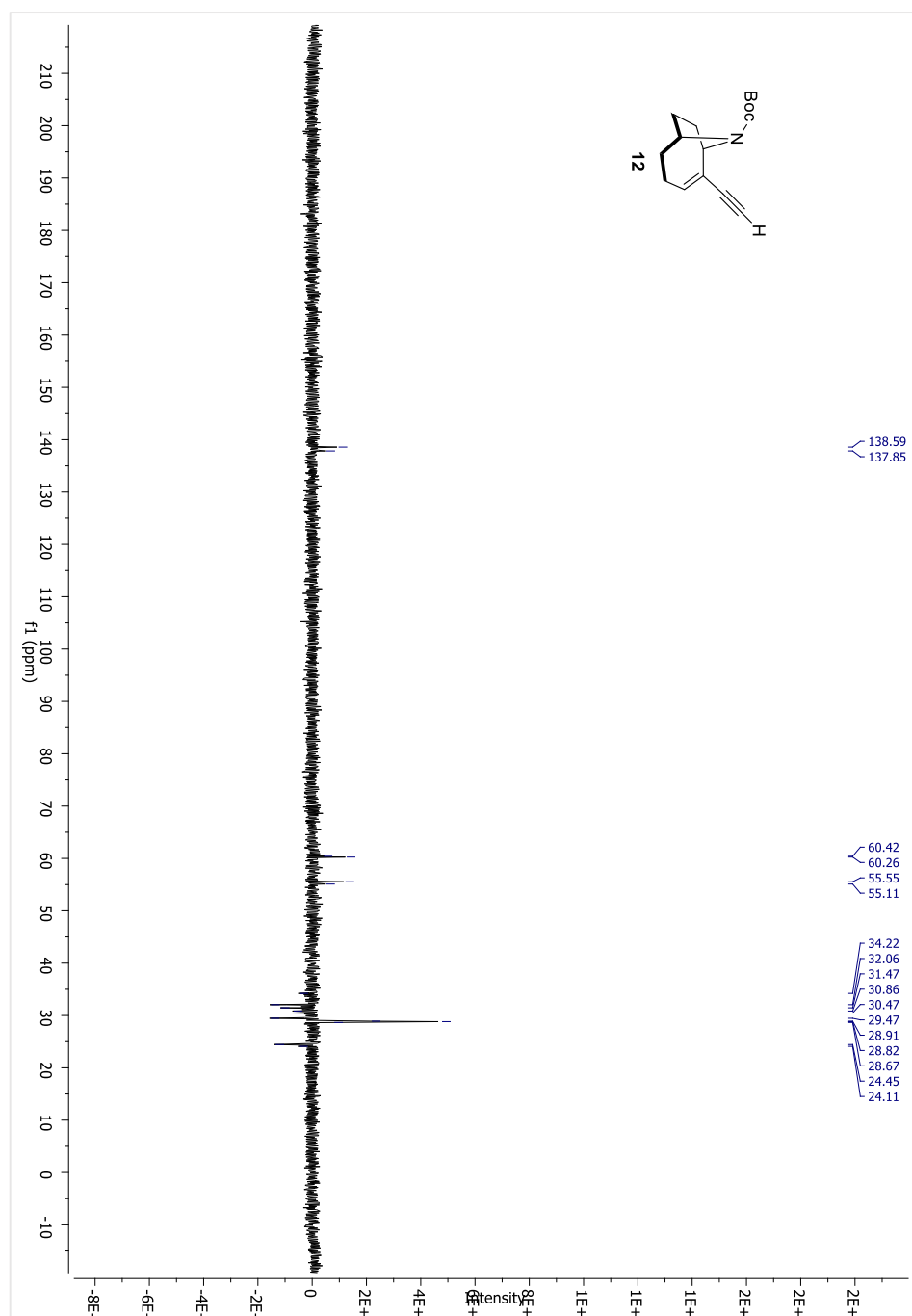
(HSQC, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ CDCl_3)

^1H -RMN, 300 MHz CDCl_3 

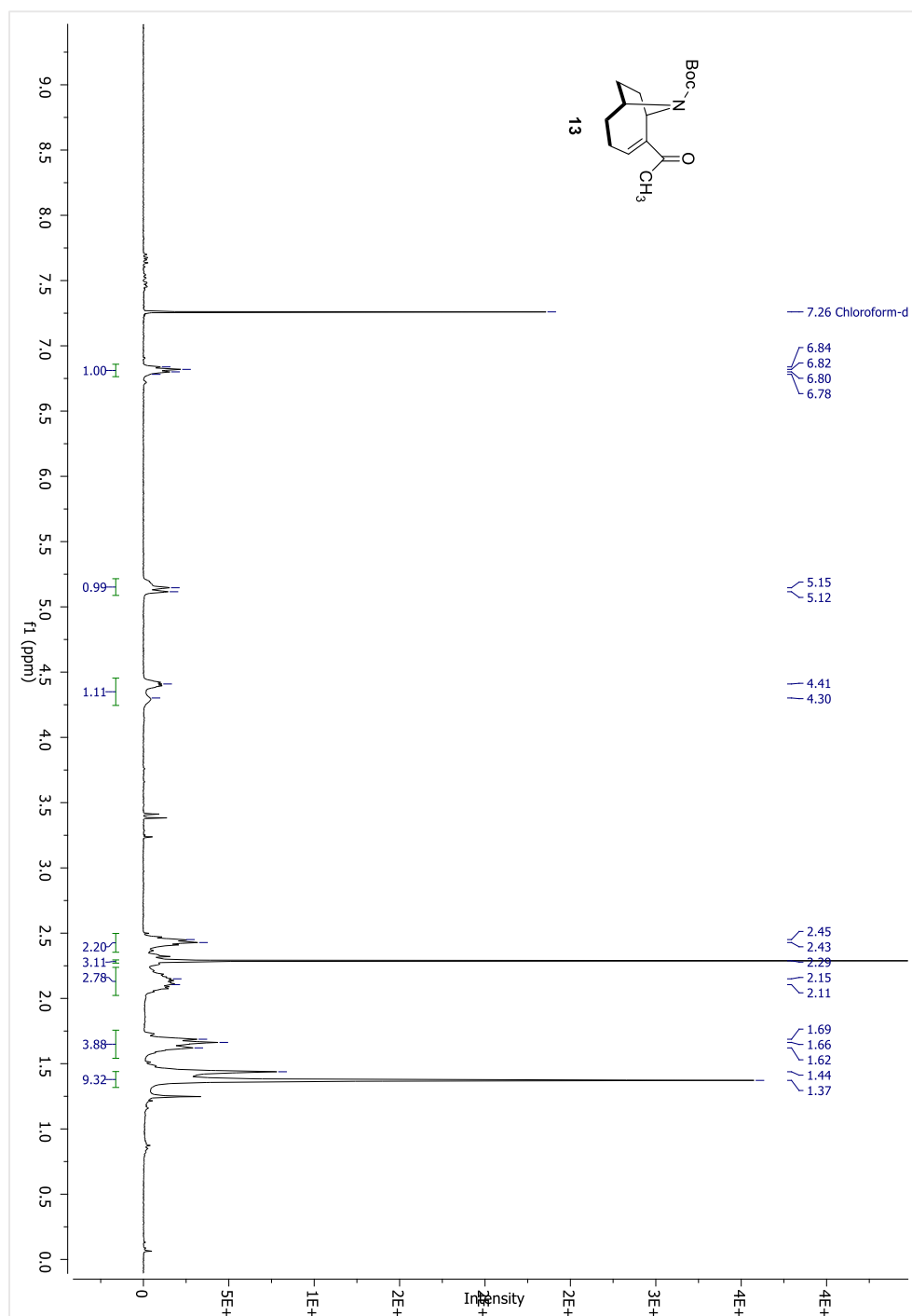
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

(COSY, 300 MHz CDCl₃)

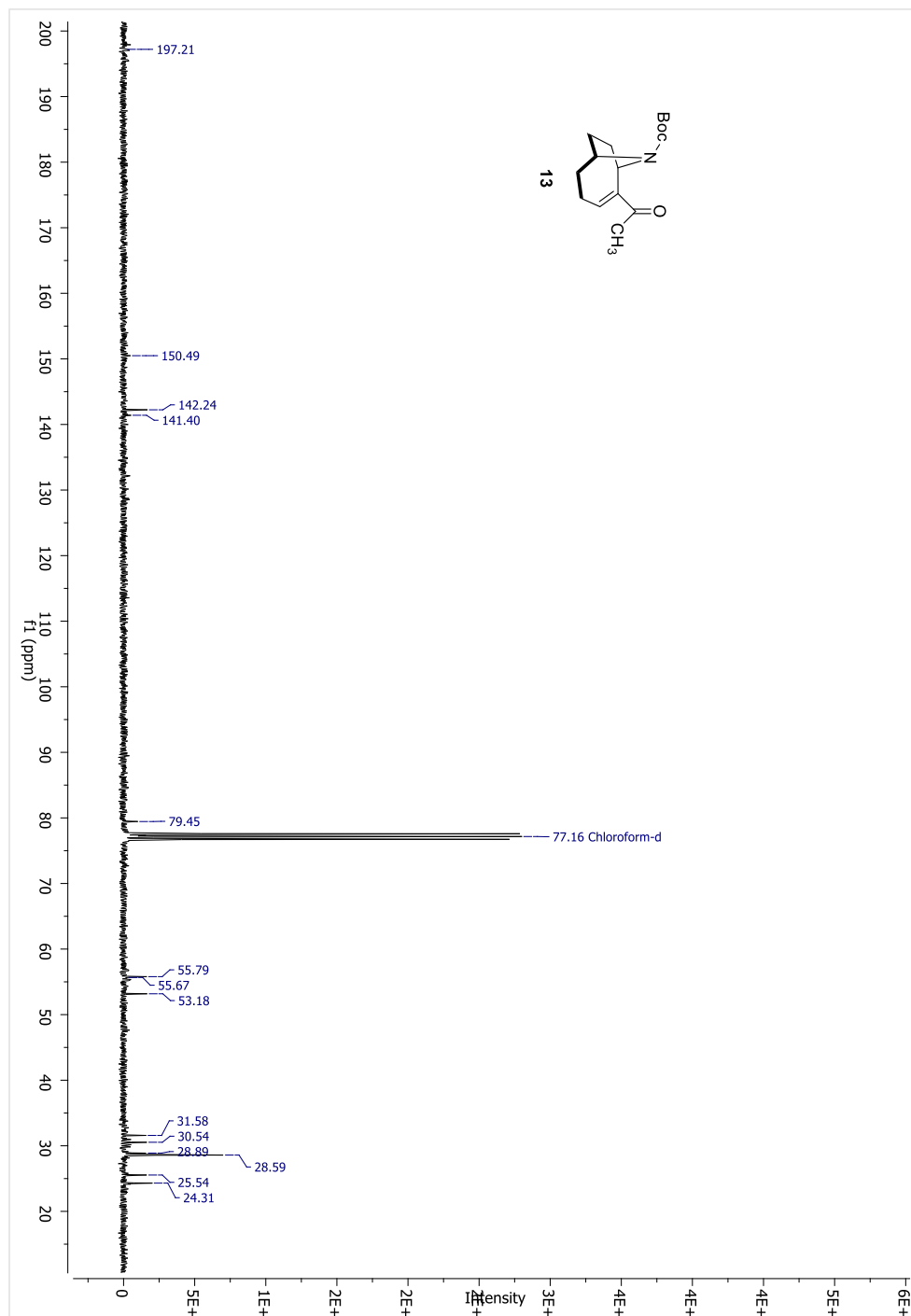
(HSQC, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ CDCl_3)

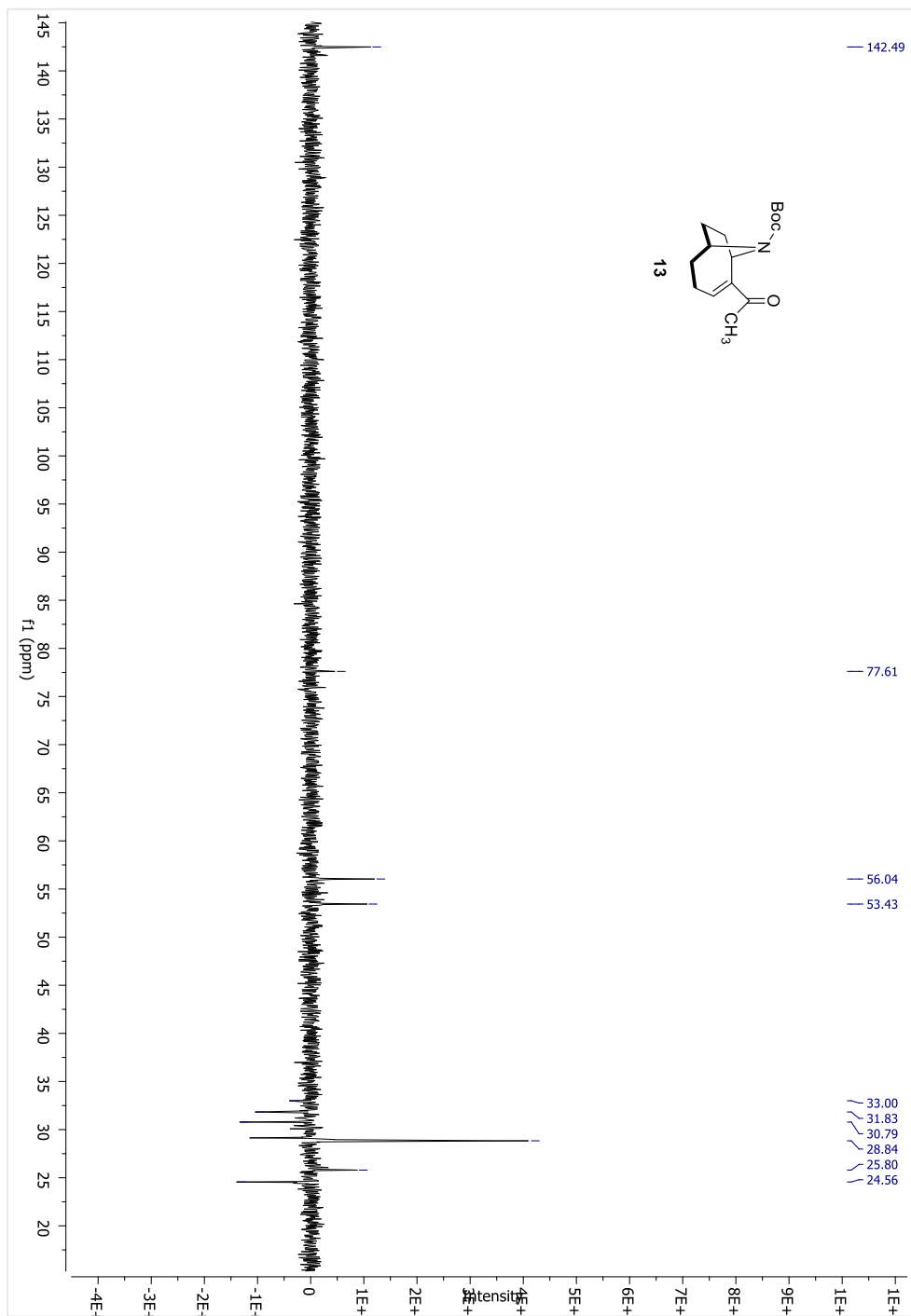
(DEPT, 75 MHz CDCl₃)

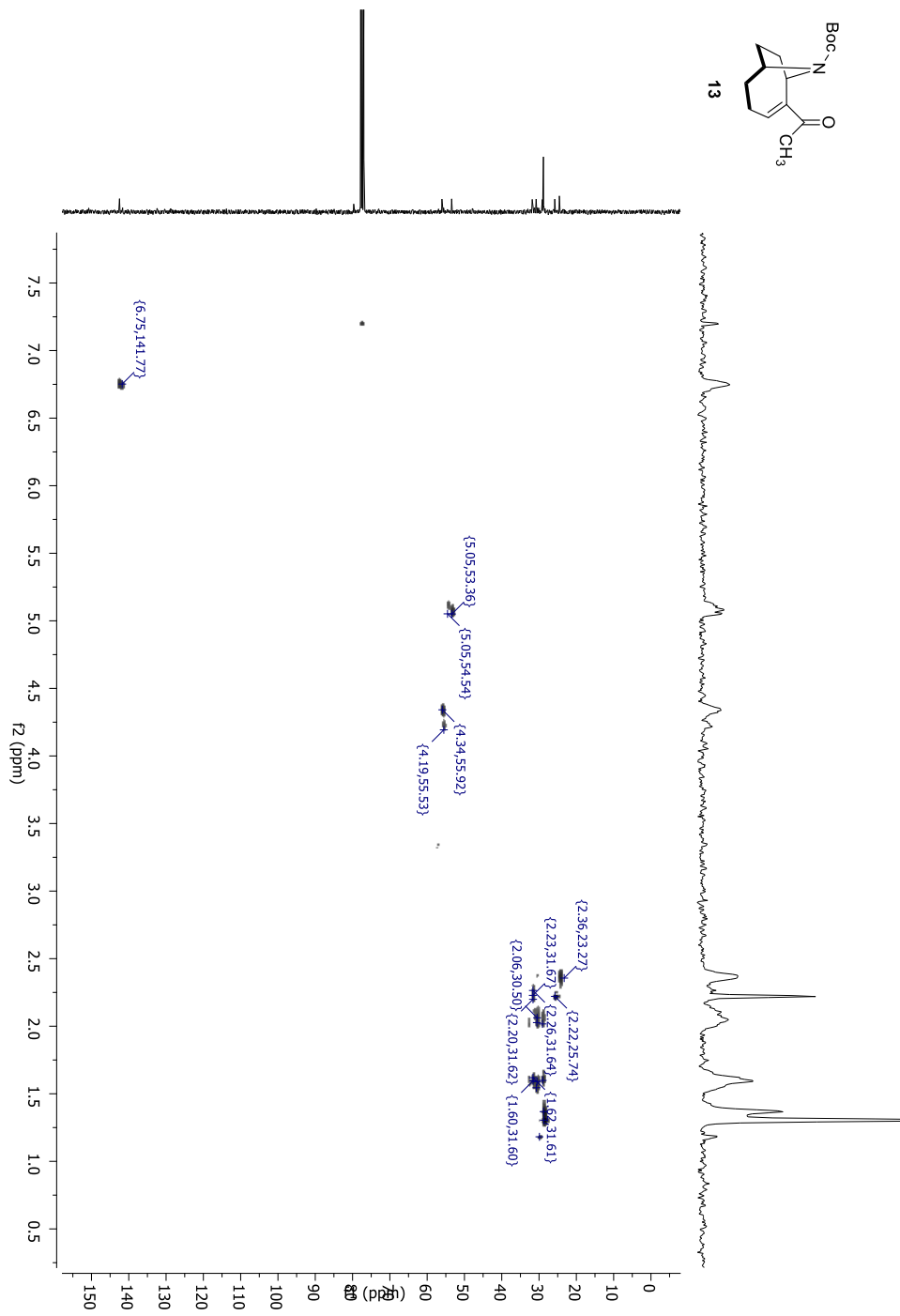
(¹H-RMN, 300 MHz CDCl₃)



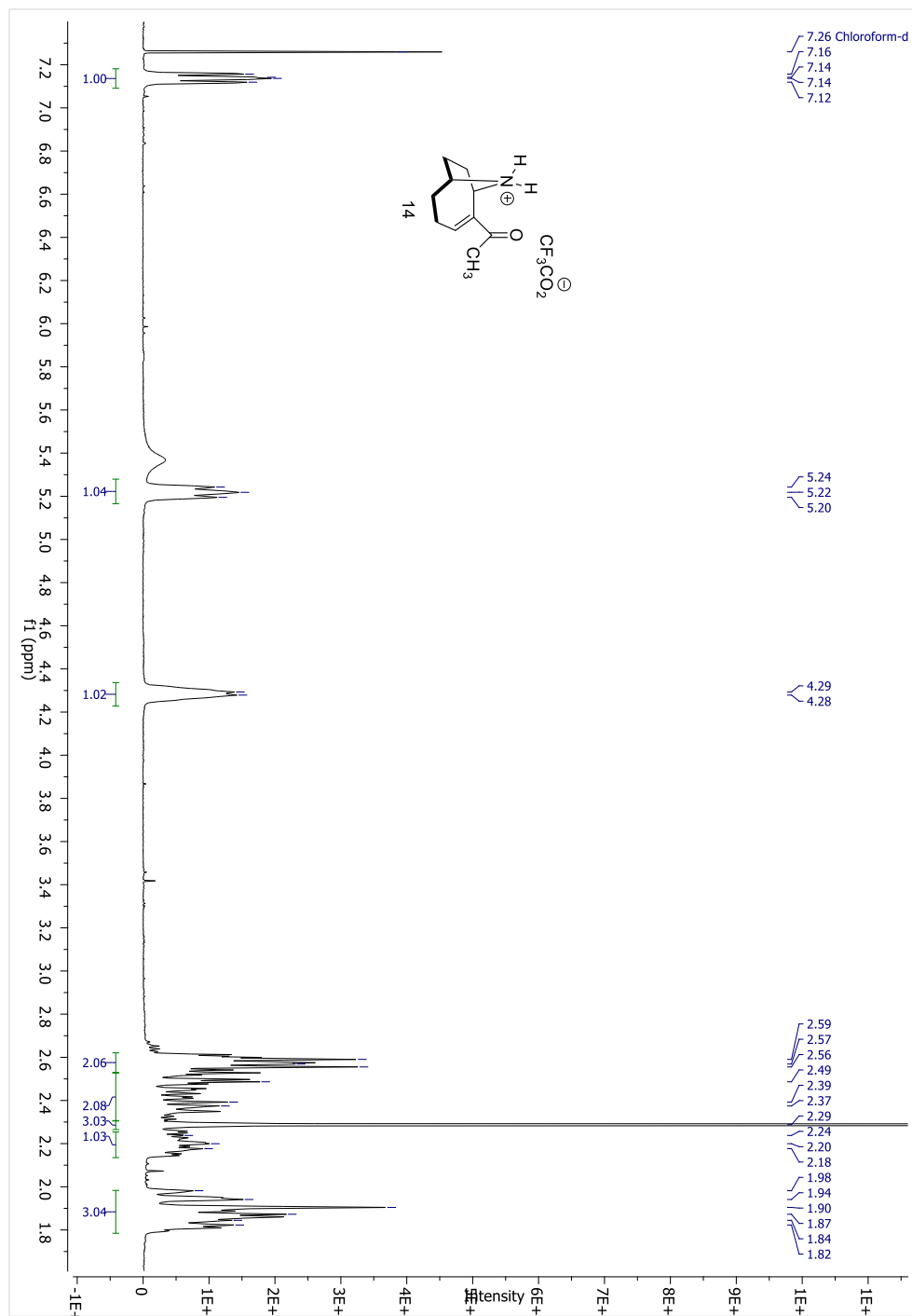
(^{13}C -RMN, 75 MHz CDCl_3)



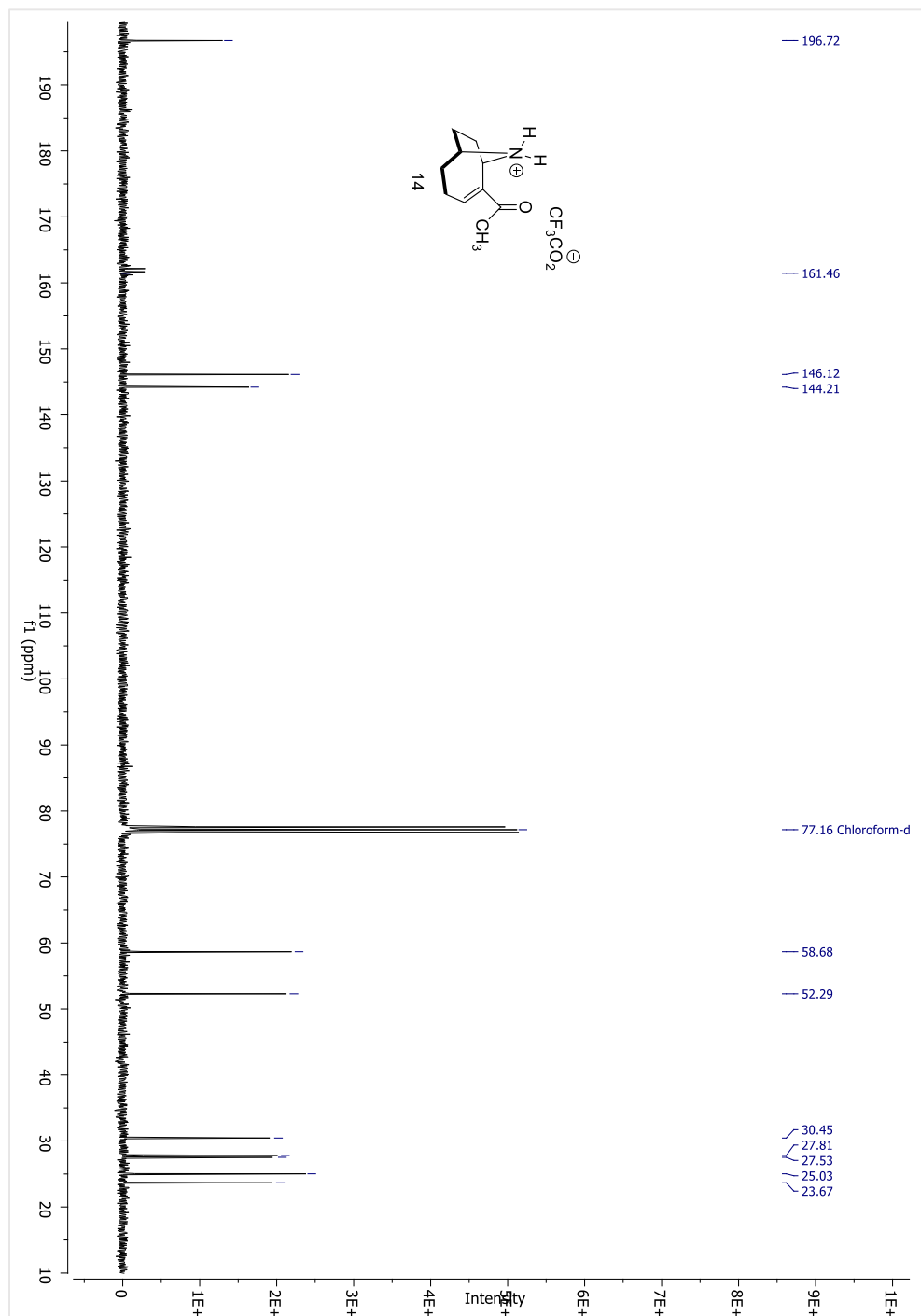
(DEPT, 75 MHz CDCl₃)

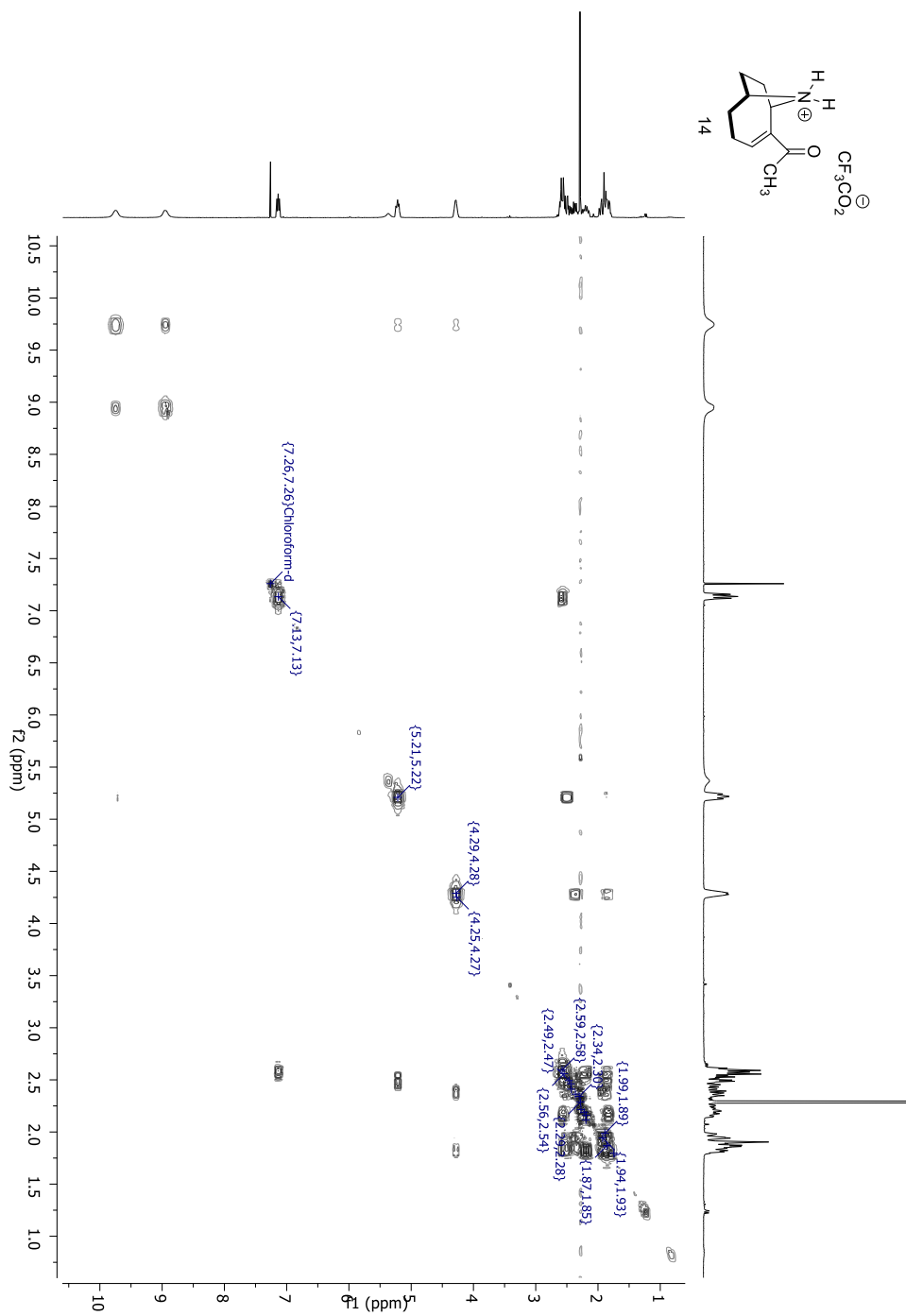
(HSQC, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ CDCl_3)

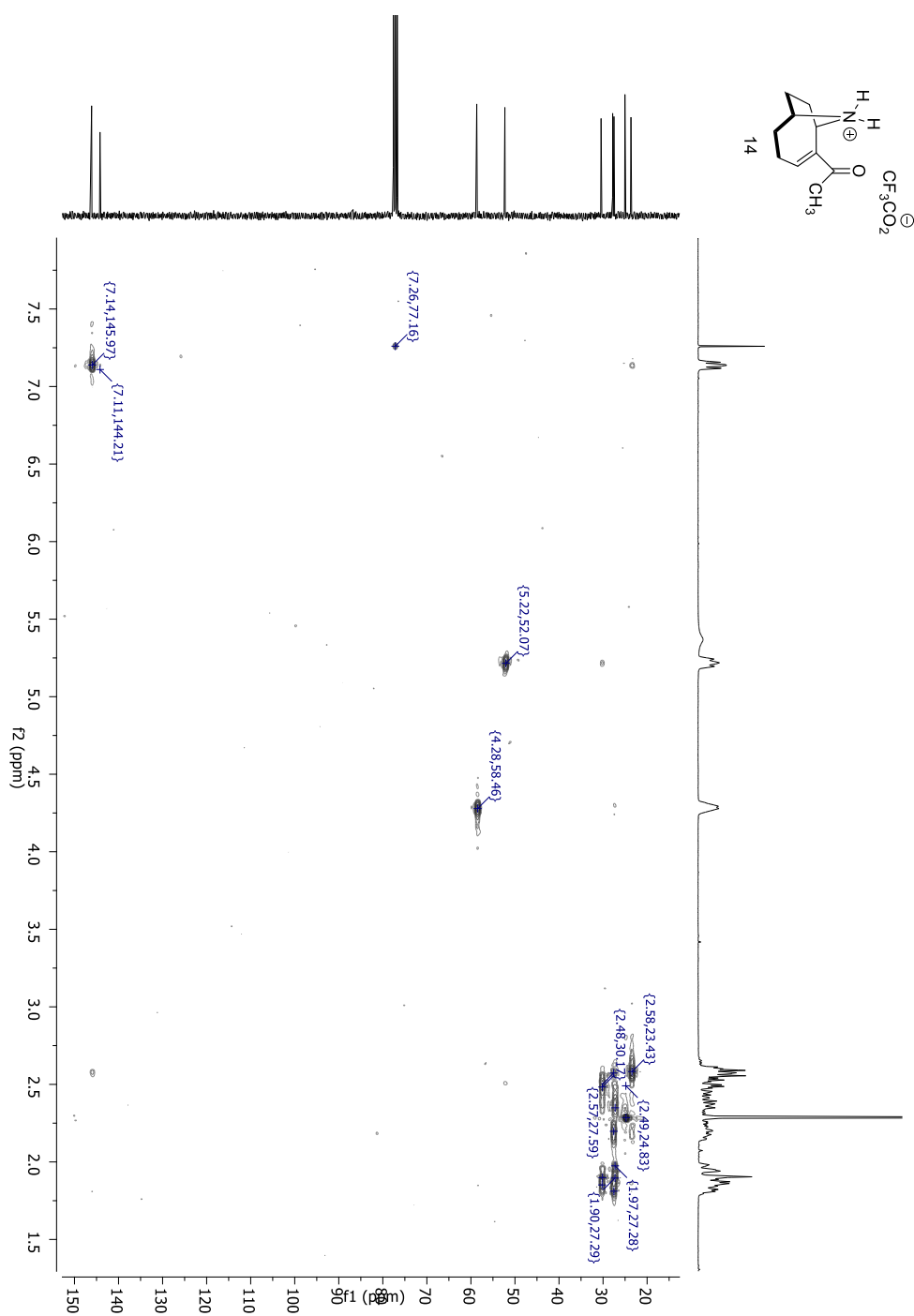
(¹H-RMN, 300 MHz CDCl₃)



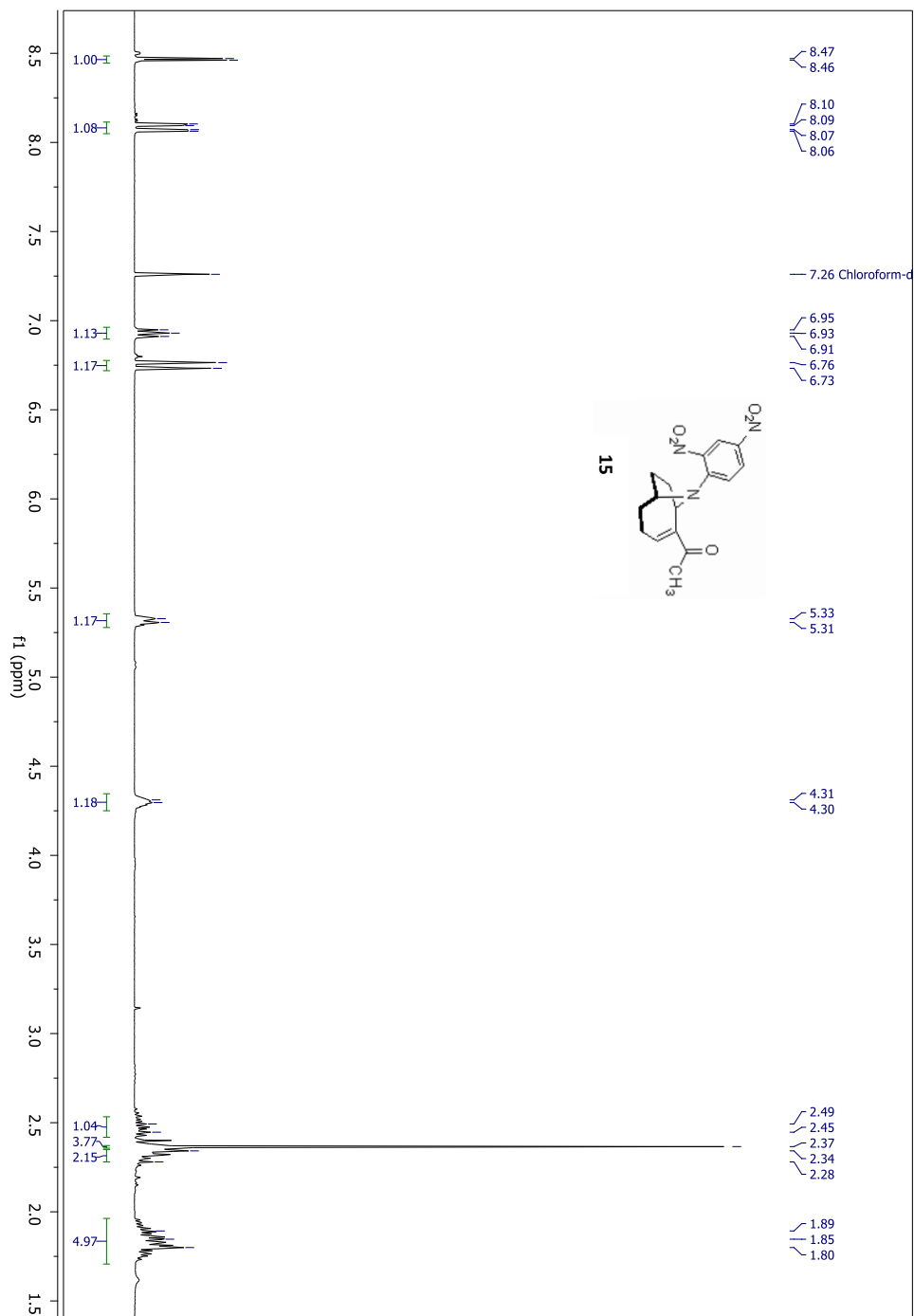
(^{13}C -RMN, 75 MHz CDCl_3)

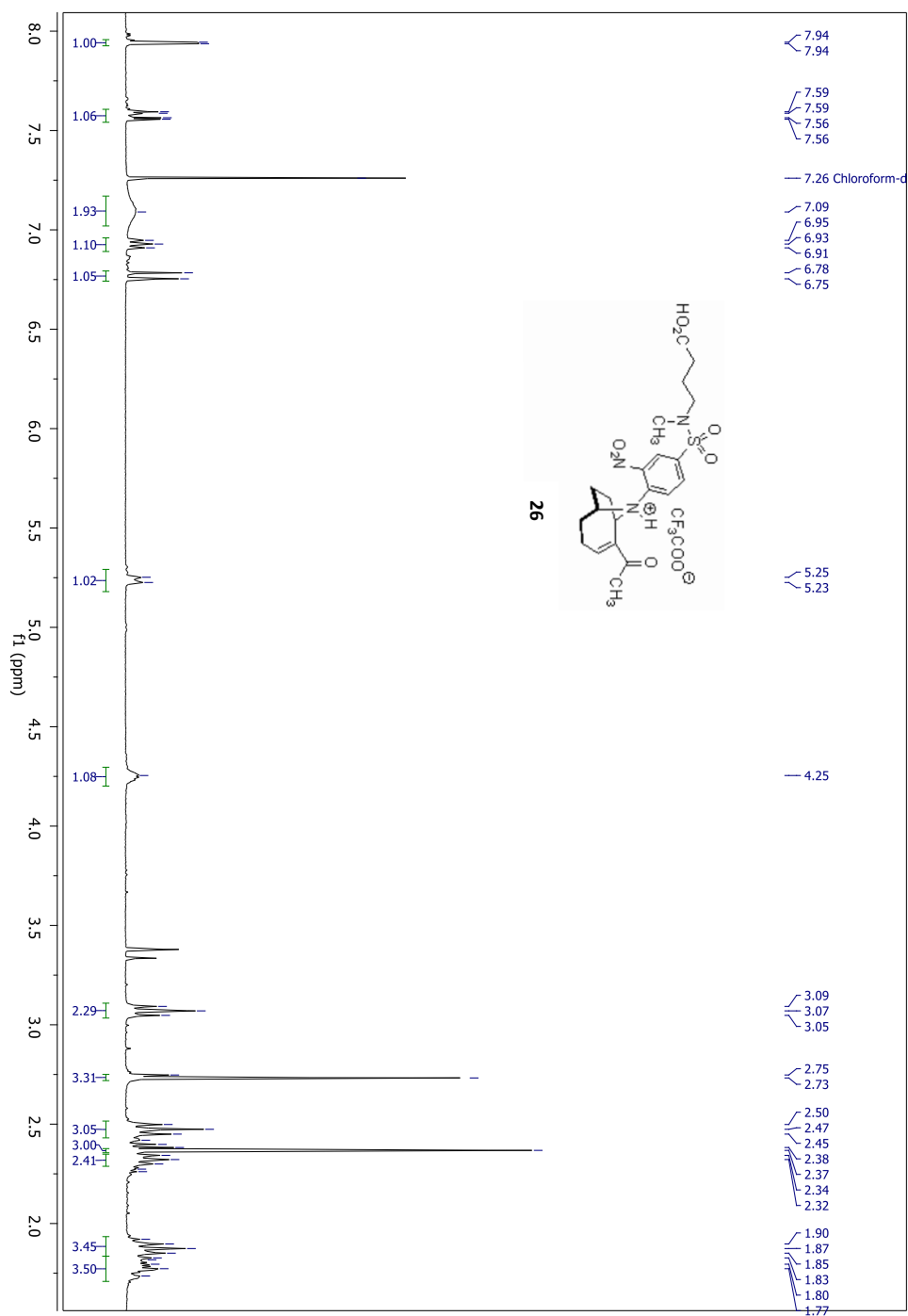


(COSY, 300 MHz CDCl₃)

(HSQC, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ CDCl_3)

(¹H-RMN, 300 MHz CDCl₃)



^1H -RMN, 300 MHz CDCl_3 

$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 