
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

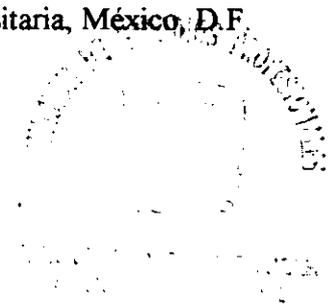
FACULTAD DE CIENCIAS

**BIOTRANSFORMACIÓN DE NITROALQUENOS CON *Saccharomyces cerevisiae* EN
MEDIOS ACUOSO Y ORGÁNICO.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A:
Daniel López González

Director de tesis: Dr. Arturo Navarro Ocaña

Cd. Universitaria, México, D.F.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

**Biotransformación de nitroalquenos con *Saccharomyces cerevisiae*
en medios acuoso y orgánico**

realizado por **Daniel López González**

con número de cuenta **9126785-6**, pasante de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario **Dr. Arturo Navarro Ocaña**

Propietario **Dr. Hector Guillermo Barrios López**

Propietario **M. en B. María Isabel Saad Villegas**

Suplente **M. en C. Aída Nelly García Argáez**

Suplente **Biól. Josefina Herrera Santoyo**

Edna María Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz

Esta tesis se realizó en el laboratorio 2 del **Instituto de Química** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** con asesoría del **Doctor Manuel Jiménez Estrada** y una beca otorgada por **Fundación UNAM** en el programa de **Iniciación Temprana a la Investigación y a la Docencia (PITID)** en sus etapas de la 4 a la 8

AGRADECIMIENTOS

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

Dr. Arturo Navarro Ocaña

Dr. Hector Guillermo Barrios López

M. en B. María Isabel Saad Villegas

M en C. Aída Nelly García Argáez

Biol. Josefina Herrera Santoyo

En especial al Dr. Arturo Navarro Ocaña por ser Director de tesis y también un buen amigo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 2 del Instituto de Química y del laboratorio 314 del Conjunto "E" de la Facultad de Química, ambos de la UNAM por su amistad y apoyo.

A mis padres...

Juan Salvador y Silveria Marina

A mis hermanos...

Patricia, Rosendo, Belem y Gaby

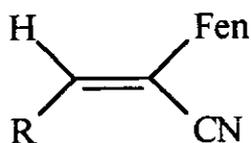
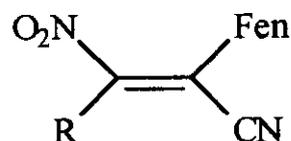
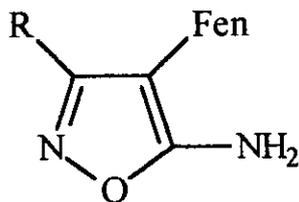
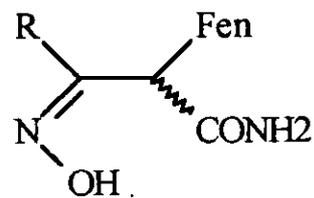
Con amor y cariño

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo es la biotransformación de los nitroalquenos (Z)-3-nitropropenenitrilos utilizando a la levadura de pan, *Saccharomyces cerevisiae*, como biocatalizador. Los (Z)-3-nitropropenenitrilos sustituidos se prepararon mediante una reacción de condensación y su nitración correspondiente con una mezcla de óxidos de nitrógeno NO_x .

El biocatalizador fue incubado con los 2,3-difenilpropenenitrilos tanto en un medio acuoso como orgánico obteniendo los 5-aminoisoxazoles y por sus bioaperturas *in situ* las oximas correspondientes.

Todos los compuestos fueron purificados en sílica gel y caracterizados por sus respectivas constantes fisicoquímicas, demostrándose así que *S. cerevisiae* tiene la capacidad de biorreducir a este tipo de compuestos.

*Propenenitrilo**(Z)-3-nitropropenenitrilo**5-aminoisoxazol**Oxima*

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de figuras	I
Índice de tablas	III
1.- Introducción	1
2.- Marco teórico	2
2.1.- Características de las biotransformaciones	2
2.2.- Metodología de las biotransformaciones	6
2.3.- Aplicación de las biotransformaciones	10
2.4.- Síntesis de los nitroalquenos	38
2.5.- Obtención y empleo de los 5-aminoisoxazoles	40
2.6.- Preparación y utilización de oximas	43
2.7.- Importancia de los nitroalquenonitrilos, 5-aminoisoxazoles y oximas	44
3.- Objetivos	45
3.1.- Objetivo general	45
3.2.- Objetivos particulares	45
4.- Material y métodos	46
4.1.- Síntesis de los alquenonitrilos	48
4.2.- Síntesis de los sustratos nitrados	49
4.3.- Biorreducción de los (Z)-3-nitro-2-fenil-3- aril o alquilpropenonitrilos en un medio acuoso con <i>S. cerevisiae</i>	51
4.4.- Biorreducción de los (Z)-3-nitro-2-fenil-3-aril o alquilpropenonitrilos en un medio orgánico con <i>S. cerevisiae</i>	53
4.5.- Demostración de las biorreducciones	55
5.- Resultados y discusión	57
5.1.- Preparación de los sustratos	58
5.2.- Nitración de los sustratos	59
5.3.- Biotransformación con <i>S. cerevisiae</i> de nitroalquenonitrilos en un medio acuoso	60
5.4.- Apertura biocatalizada de 5-aminoisoxazoles	62
5.5.- Biotransformación con <i>S. cerevisiae</i> de nitroalquenonitrilos en un medio orgánico	65
6.- Conclusiones	68
7.- Referencias	69
8.- Apéndice 1 Artículo Publicado	75
9.- Apéndice 2 Espectroscopia de los diferentes sustratos y productos	79

Índice de figuras

- Fig. 1. El sustrato ideal
- Fig. 2. Características generales de una biotransformación.
- Fig. 3. Glicosidación de la hidroquinona
- Fig. 4. Biorreducción de la acetofenona y la propiofenona
- Fig. 5. Biotransformación del ácido 2-metilcinámico por *Nicotiana tabacum*
- Fig. 6. Biotransformación de la cumarina por *C. roseus* y *Ruta sp.*
- Fig. 7. Biotransformación de esteroides con *M. polymorpha*
- Fig. 8. Desprotonización de benzoisoxazoles por albúmina sérica bovina
- Fig. 9. Hidroxilación de fenoles
- Fig. 10. Obtención del (+)-3s-(2-hidroxietil)ciclopentanona
- Fig. 11. Biorreducción del ácido cloropirúvico a D- y L- ácidos clorolácticos
- Fig. 12. Conversión enzimática del acrilonitrilo y metacrilonitrilo a ácido acrílico y metacrílico
- Fig. 13. Biosíntesis del índigo
- Fig. 14. Oxidación de la D-glucosa para producir D-fructosa
- Fig. 15. Obtención de la butanoilcastanospermina por *C. viscosum*.
- Fig. 16. Acilación regioselectiva de castanospermina en piridina
- Fig. 17. Biotransformación catalizada por la lipasa de *P. sp.*
- Fig. 18. Obtención de Biotina a partir de imidazolona con PLE
- Fig. 19. Cianohidrinás ópticamente activas
- Fig. 20. Conversión biocatalítica de acrilonitrilo y metacrilonitrilo con *R. rhodochrous*
- Fig. 21. Biosíntesis del óxido de propeno con *C. fumago* y *Flavobacterium*
- Fig. 22. Biosíntesis de la hidroquinona con *M. sp.*
- Fig. 23. Biooxidación de la cinerona a cinerolona
- Fig. 24. Biotransformación con *A. flavus*
- Fig. 25. Bioconversión de la progesterona a la testolactona
- Fig. 26. Reducción de cetoésteres investigada por Bennet.
- Fig. 27. Reducción de β -cetoésteres a sus correspondientes β -hidroxiésteres
- Fig. 28. Bioconversión de ácidos β -cetocarboxílicos
- Fig. 29. Biotransformación del α -(alcoxicarbonilamino) acetofenonas
- Fig. 30. Biorreducción del del biciclo-hept-3-en-6-ona metilsustituida utilizando *S. cerevisiae*
- Fig. 31. Biorreducción de 2-(2-nitroetil)ciclohexanona a sus nitroalcoholes
- Fig. 32. Adición de una unidad C₂ al etil- β -metil- γ -oxo-cronato con *S. cerevisiae*
- Fig. 33. Biorreducción del 2-metil-3-oxobutanoato
- Fig. 34. Biorreducción de cetolactonas.
- Fig. 35. Biotransformación de aldehídos y cetonas con *S. cerevisiae*
- Fig. 36. Obtención de (R)-(+)-citronelol a partir de una adición de Michael con *S. cerevisiae*
- Fig. 37. Obtención de la ribitilamina y *p*-toluidina con *S. cerevisiae*
- Fig. 38. Síntesis quimioselectiva de pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina
- Fig. 39. Reacción de Diels-Alder realizada con *S. cerevisiae*
- Fig. 40. Reacción de Baeyer-Villiger biocatalizada con *S. cerevisiae*
- Fig. 41. Biotransformación del metil-*para*-tolilsulfuro a su (R)-metil-*para*-tolilsulfóxido
- Fig. 42. Biorreducción de 5-acil-1,2,4-triazina a su alcohol quiral
- Fig. 43. Mecanismo de reacción propuesto por Davey para la biotransformación de 2-

nitrobenconitrilo.

- Fig. 44. Biotransformación de nitrocompuestos aromáticos propuesta por Baik.
- Fig. 45. Descubrimiento del intermediario azoxibenceno en la obtención de anilina
- Fig. 46. Desoxigenación reductiva del azoxibenceno y quinolina N-óxido por *S. cerevisiae*-NaOH
- Fig. 47. Bio-reducción del 2-nitrocinamaldehído con *S. cerevisiae* en un medio básico.
- Fig. 48. Biotransformación del *orto*- o *para*-acilnitrobencono con *S. cerevisiae*.
- Fig. 49. Biohidrogenación asimétrica de nitroolefinas con *S. cerevisiae*.
- Fig. 50. Biotransformación de nitropropenonitrilos a sus isoxazoles
- Fig. 51. Biorreducción de E-nitroestirenos con *S. cerevisiae*.
- Fig. 52. Nitración del acilonitrilo con cloruro de nitrosilo
- Fig. 53. Preparación de 1,2-cianonitrilos
- Fig. 54. Usos de los 3-nitropropenonitrilos
- Fig. 55. Métodos generales para la obtención de 5-aminoisoxazoles
- Fig. 56. Síntesis de 5-aminoisoxazoles por oximación de nitrilos
- Fig. 57. 5-aminoisoxazoles obtenidos por reacciones de cicloadición
- Fig. 58. Transformación térmica y fotoquímica de 5-aminoisoxazoles
- Fig. 59. Síntesis con 5-aminoisoxazoles
- Fig. 60. Ruta de síntesis propuesta
- Fig. 61. Ruta general de síntesis
- Fig. 62. Síntesis de los sustratos
- Fig. 63. Estructuras de los productos de la condensación de Knoevenagel
- Fig. 64. Estructura de Otha (a) y Ono (b)
- Fig. 65. Síntesis de 5-aminoisoxazoles con *S. cerevisiae*
- Fig. 66. Bioselección del sustrato con *S. cerevisiae* como biocatalizador
- Fig. 67. Biotransformación del 5-amino-3,4-difenilisoxazol a su oxima correspondiente
- Fig. 68. Biotransformación de **3b** a su oxima **3c**
- Fig. 69. Biotransformación del **2b** a **2c** con *S. cerevisiae*
- Fig. 70. Equilibrio de la oxima y la hidroxilamina
- Fig. 71. Biotransformación de **2b** a su oxima, **3c** en éter de petróleo

Índice de tablas

Tabla 1 Diferentes formas físicas, pros y contras en el uso de biocatalizadores

Tabla 2 Comparación de p.f., rendimientos, y Rf. de los productos de la reacción de Knoevenagel

Tabla 3 Comparación de p.f., rendimientos, y Rf. de los productos de nitración

Tabla 4 Datos espectroscópicos de los sustratos nitrados

Tabla 5 Comparación de p.f., rendimientos, y Rf. de los 5-aminoisoxazoles en medio acuoso

Tabla 6 Datos espectroscópicos de los 5-aminoisoxazoles

Tabla 7 Comparación de p.f., rendimientos, y Rf. de las oximas obtenidas en medio acuoso

Tabla 8 Comparación de p.f., rendimientos, y Rf. de los 5-amioisoxazoles en éter de petróleo

Tabla 9 Comparación de p.f., rendimientos, y Rf. de las oximas obtenidas en éter de petróleo

Tabla 10 Datos espectroscópicos de los 2,3-difenil-3-oximinopropanamida.

1.- Introducción

El uso de organismos vivos o parte de ellos para la transformación de compuestos orgánicos no es del todo nueva, pues se ha utilizado a lo largo de todo el siglo.¹ Un biocatalizador es todo aquel organismo vivo, o alguna parte de él, en el cual se lleva a cabo una reacción química. Es decir, los catalizadores biológicos son: la compleja maquinaria enzimática presente en las células de animales, vegetales, y microbianas que es utilizada de dos maneras: sin romper la integridad de la membrana celular o como un homogenado crudo.

Los biocatalizadores tienen propiedades quimio-, regio- y estereoselectivas, que están relacionadas con el tipo de biotransformación, además de tener la capacidad de modificar la velocidad de reacción y realizarla en condiciones suaves.

En la actualidad las técnicas de la Biología Molecular, en particular la Ingeniería Genética, ofrece la posibilidad de modificar el sitio activo de los biocatalizadores y lograr un panorama más amplio en la actividad biocatalítica, haciéndolo más selectivo para cierto tipo de sustratos.

La levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, ha sido utilizada durante mucho tiempo en la industria del pan y en los últimos 40 años, los científicos han puesto su interés en ella con la intención de ocuparla para sintetizar importantes intermediarios químicos.¹

Específicamente en el área de la biotecnología *S. cerevisiae* se ha usado para reducir grupos carbonilos a sus correspondientes alcoholes quirales, también es capaz de reducir dobles enlaces, lograr la interconversión de grupos funcionales con reactividad similar y sintetizar heterocícllos.

2.- Marco teórico

Una biotransformación es la reacción química catalizada por organismos activos o alguna parte constitutiva de ellos.

Al organismo vivo o alguna de sus partes se le denomina biocatalizador ya sean células vegetales, animales, microorganismos, enzimas (puras u homogenados crudos), anticuerpos biocatalíticos, péptidos catalíticos, enzimas semisintéticas y sintéticas que son las entidades más utilizadas. Como catalizadores aceleran la velocidad de reacción, son selectivos para la reacción y el sustrato en el que actúan, y están sujetos a regulación.⁴

Los procesos de biotransformación, se han realizado desde los primeros tiempos en los que el hombre utilizaba microorganismos como las levaduras y otros tipos de hongos para la elaboración de pan, productos lácteos y bebidas alcohólicas. En 1862, Pasteur realizó por primera vez una transformación biológica de manera metódica al obtener ácido acético de la oxidación de alcohol utilizando un cultivo de *Bacterium xylinum*; a este tipo de experimentos le siguieron la oxidación de glucosa a ácido glucónico por *Acetobacter aceti* y sorbitol a sorbosa por *Acetobacter sp.* Dumas en 1874, observó que al agregar polvo de azufre a una suspensión de *Saccharomyces cerevisiae* con glucosa se liberaba ácido sulfúrico.

La primera reducción fitoquímica mediado por estos microorganismos fue la transformación del furfural a alcohol furfurílico.² El primer uso bien documentado de una reacción biocatalítica fue la fermentación de azúcar a etanol, realizada por la levadura de pan antes mencionada que sentaría las bases para la fundación de la microbiología como ciencia.³

Muchas bioconversiones reportadas y revisadas se aplican actualmente de forma exitosa, ofreciendo así una alternativa favorable para la obtención de productos químicos puros.

2.1.- Características de las biotransformaciones

2.1.1.- El sustrato

Un requisito esencial para una biotransformación exitosa es el contacto entre el sustrato y el biocatalizador. El sustrato ideal deberá ser soluble en el medio que se trabaja y ser capaz de atravesar la membrana celular sin ejercer un efecto tóxico al biocatalizador⁵ (Fig. 1).



Fig. 1 El sustrato ideal

Se han utilizado varios métodos para la adición del sustrato al medio de reacción: en forma sólida o en solución; compuestos volátiles presentan dificultades en su biotransformación. Otra forma de adicionarlos es adsorbiendo al sustrato en un material inerte como resinas, arcillas o tierra de diatomeas, con lo que se promueve un alto nivel de dispersión.

Las sustancias solubles en agua con grupos funcionales hidrofílicos como los ácidos carboxílicos, aminas, alcaloides, alcoholes, azúcares y sustancias polifuncionales son fáciles de manipular, y pueden agregarse directamente a la mezcla de incubación a un tiempo apropiado.

Los sustratos, que no son fácilmente solubles en medios acuosos, se disuelven en un disolvente orgánico no tóxico y miscible con el agua, o se agregan agentes emulsificantes. Algunos de los disolventes más utilizados son el dimetil sulfóxido, dimetil formamida, etanol, metanol, acetona; así como el etilenglicol, acetato de etilo, cloroformo, éter y benceno que se usan de forma más limitada.⁶

Otros sustratos afectan el crecimiento y viabilidad de las células y se deben administrar sólo hasta después de una completa activación de las mismas, en tales casos, es preferible agregar pequeñas porciones de forma continua para que la concentración del sustrato permanezca baja y se pueda realizar la biotransformación.

El momento en que se agrega el sustrato al medio de reacción influye mucho en el rendimiento del producto, pues compuestos tóxicos como los antibióticos y antitumorales inhiben el crecimiento al

agregarse en el ciclo de activación. En otros casos, es ventajoso agregar pequeñas cantidades al comienzo de la fase de crecimiento para promover la producción del biocatalizador.

2.1.2.- Selección del biocatalizador

Generalmente los organismos vivos o parte de ellos son capaces de convertir un sustrato A al producto B. Estos deben de tener la capacidad de realizar la reacción deseada con un alto rendimiento en el producto.⁷ El compuesto a transformarse se agrega durante o después del crecimiento y se continúa la incubación por 1-7 días, se toman muestras y se analizan para observar la formación del producto.

Para realizar una buena biotransformación los biocatalizadores se seleccionan de los ya conocidos para el tipo de reacción que se necesita, con un sustrato relacionado estructuralmente. Lo que lleva a agruparlos en varias clases: los que biotransforman esteroides, compuestos cíclicos no esteroidales, alcanos, terpenos, compuestos acíclicos, antibióticos, alcaloides, compuestos xenobióticos activos, prostaglandinas, aminoácidos ópticamente activos y α -hidroxiácidos.⁸

La mayoría de los biocatalizadores son específicos en la naturaleza del sustrato y la reacción que catalizan. Esta especificidad puede ser relativa o absoluta para un tipo de reacción con un sólo compuesto.⁹ Esta misma especificidad puede ser su principal obstáculo pues tiene un importante papel fisiológico *in vivo*, pero limita el número de biotransformaciones posibles. Este hecho reduce el rango de sustratos a ser biocatalizados conforme las necesidades de la célula.

La selectividad que presenta un biocatalizador con respecto a su sustrato y la distinción entre diferentes configuraciones de éste, revela la estereoespecificidad que tienen. Por lo que son capaces de resolver racematos por la transformación exclusiva o preferente de un enantiómero. También reacciona con el sustrato de forma específica con respecto a la posición de un grupo funcional y se ha encontrado que puede distinguir entre varios grupos de reactividad equivalente o similar.

La forma física del biocatalizador utilizado para la biotransformación puede ser muy diverso. La decisión final de como será usado depende del tipo de reacción, si hay cofactores a ser reciclados y la escala a la que se lleva a cabo.

En la siguiente tabla se muestra las diferentes formas físicas, pros y contras en el uso de los biocatalizadores

Tabla 1. Las diferentes formas físicas, pros y contras en el uso de biocatalizadores

Biocatalizador	Forma	Pros	Contras
Células enteras	Cualquiera	No es necesario reciclar cofactores	Equipo caro, baja productividad debido a la baja concentración del sustrato, poca tolerancia a disolventes orgánicos
	Cultivos en crecimiento	Alta actividad	Gran biomasa, muchos subproductos, control del proceso difícil.
	Células en reposo	Pocos subproductos	Baja actividad
	Células inmovilizadas	Posible reuso	Baja actividad
Enzimas puras	Cualquiera	Aparatos simples, trabajo simple, mejor productividad debido a la alta concentración enzimática	Necesario reciclar cofactores
	Disueltos en agua	Alta actividad enzimática	Posible reacción de sustratos lipofílicos, insolubles, se requiere trabajo de extracción
	Suspendidos en disolventes orgánicos	Fácil de realizar, trabajar. Sustratos liofílicos solubles, factor de recuperación de la enzima	Baja actividad
	Inmovilizados	Fácil recuperación	Perdida de la actividad durante la inmovilización.

2.1.3.- Condiciones de reacción

Los biocatalizadores demuestran una alta actividad catalítica bajo condiciones suaves de reacción: como son un medio acuoso u orgánico, temperaturas por debajo de los 40 °C, pH cercano al neutro, agitación continua y presión normal. La energía de activación de las reacciones es más baja en las interacciones sustrato/biocatalizador.¹⁰

Por todo esto, la biotransformación de moléculas polifuncionales se puede realizar sin la descomposición del sustrato o la obtención de subproductos u otro tipo de productos diferentes a los esperados.

Esto produce varias desventajas: la biotransformación se realiza con material aislado y

generalmente puro, los tiempos de reacción son más largos, las concentraciones de sustrato/producto son bajas y la estabilidad del biocatalizador es limitada.

2.2.- Metodología de las biotransformaciones

A pesar de que muchas biotransformaciones son exitosas y algunos de los biocatalizadores se encuentran disponibles de forma comercial, su disponibilidad esta limitada y en muchos casos hay que buscar nuevos biocatalizadores por cuenta propia para realizar la reacción deseada.

En las biotransformaciones hay varios aspectos a tomar en cuenta como son: la adición del sustrato, la elección del biocatalizador, el medio de reacción y la extracción del producto.

La mayoría de los investigadores retardan la adición del sustrato hasta que el medio de reacción tiene su máximo crecimiento.⁹ Se agrega el compuesto en forma de polvo o en disolución, se debe de tener cuidado con el disolvente que se utiliza pues no tiene que ser tóxico al biocatalizador, si inhibe el crecimiento o es tóxico se agrega en pequeñas porciones durante la biotransformación para mantener una concentración baja que le permita ser transformado y no sea tan dañino a la célula. Además debe ser capaz de atravesar la membrana celular y llegar a la maquinaria enzimática para ser transformado y también tener la capacidad de salir de la célula al medio.

La elección del biocatalizador se hace inicialmente por analogía de una reacción o por un compuesto químico similar.¹¹ Hay varios métodos para llevar a cabo una biotransformación y a continuación se describen.

2.2.1.- Con cultivos en crecimiento. El sustrato se agrega al medio en crecimiento durante el momento de la inoculación o en el último estadio de crecimiento, esto significa que el crecimiento y la biotransformación se llevan a cabo simultáneamente. El momento más favorable para la adición del sustrato se determina experimentalmente.⁷

La principal ventaja de esta técnica es su fácil manipulación, la cual la hace apropiada para una gran cantidad de experimentos en serie. Los tiempos de incubación son relativamente cortos y hay potencial para la inducción de la actividad enzimática en presencia del sustrato. Las limitaciones de este método son: encontrar el biocatalizador que realice la biotransformación de forma eficiente; el requerir de equipo de agitación continua, incubadoras y equipo relacionado con la microbiología y la química orgánica.

2.2.2.- Con cultivos previamente crecidos. En este caso, el proceso de crecimiento de la biomasa y la biotransformación están separados. Los biocatalizadores primero se cultivan bajo óptimas condiciones de crecimiento y, posteriormente la biomasa se concentra por centrifugación o filtración, se resuspende la cantidad necesaria para llevar a cabo la biotransformación en un medio adecuado, constituido generalmente por una solución amortiguadora con un pH optimizado y el sustrato disuelto. Esta suspensión se mantiene incubada hasta obtener el máximo rendimiento del producto. Dicha técnica ofrece las siguientes ventajas: el crecimiento y la bioconversión pueden ser optimizados independientemente, los tiempos de incubación se reducen hasta un 75 %, los efectos inhibitorios del crecimiento se eliminan, la concentración del biocatalizador se ajusta a un número deseado, el riesgo de una contaminación del biocatalizador se reduce y el aislamiento del producto es fácil.¹²

2.2.3.- Con enzimas puras. Muchas enzimas purificadas están disponibles comercialmente y son muy útiles para reacciones biocatalíticas preparativas. Esto se debe a su alta actividad catalítica bajo condiciones suaves de reacción y su especificidad, lo que ha incrementado su uso en la química orgánica. Las enzimas pueden ser utilizadas para realizar reacciones en presencia de grupos polifuncionales, además, son altamente regioselectivas, estereoselectivas o ambas.

Algunas de las ventajas de este proceso son: las enzimas están siempre disponibles y no tienen que ser preparadas cada vez por cultivos en crecimiento, las reacciones se realizan en poco tiempo, se espera un lado de la reacción, la cantidad de sustrato puede variarse sin problemas de toxicidad como en el caso de células completas.⁵

Una de las desventajas de este proceso es: algunas enzimas dependen de la disponibilidad de cofactores como el NAD(H), NADP(H), FAD(H₂) o ADP/ATP para realizar su actividad catalítica, lo que hace poco costeable su uso.

2.2.4.- Con enzimas inmovilizadas. Generalmente hay tres inconvenientes con lo que respecta a las reacciones enzimáticas: las enzimas no son lo suficientemente estables bajo condiciones de operación; segundo, pueden perder su actividad debido a la oxidación, degeneración y desnaturalización por el disolvente; y por último las fuerzas mecánicas de agitación.

Las enzimas son moléculas solubles en agua y su uso repetido, el cual es importante para asegurar

un proceso económico, es problemático debido a que son difíciles de recobrar. La productividad de procesos industriales medida como el rendimiento tiempo-espacio es baja debido a la tolerancia limitada para altas concentraciones de sustratos y productos.⁶

Todos estos problemas se resuelven por inmovilización. En esta técnica se hace la inclusión de la enzima a un soporte sólido o ligamientos de unas moléculas a otras. Los biocatalizadores se pueden confinar a áreas restringidas las cuales no pueden dejar, pero permanecen catalíticamente activas.

Los métodos de inmovilización se clasifican en:

1) Entrampamiento que se lleva a cabo dentro de una rejilla de matriz polimérica como el gel de poliacrilamida, alginato, celulosa etc.

2) Adhesión a un material acarreador insoluble en agua como el DEAE-celulosa, concavalina A, resinas de intercambio iónico, adsorción física, enlaces iónicos o covalentes.

3) Agregación de agentes multifuncionales químicos o físicos como el glutaraldehído o poli(iminoetileno).

Es fácil remover al biocatalizador de la reacción una vez inmovilizado y se puede utilizar repetidamente o retenerlo, por esto, los procedimientos de inmovilización aumentan la estabilidad operacional del biocatalizador, pero se disminuye su actividad catalítica. El método más usado es por entrampamiento en materiales poliméricos.¹³

2.2.5.- Con sistemas líquidos de dos fases. Un biocatalizador demuestra su actividad en medios acuosos (medio natural) por lo que la biotransformación de sustratos lipofílicos está limitada por la solubilidad en el medio de reacción. Esta aumenta por el uso de emulsificantes o disolventes que pueden ser miscibles en agua. Sin embargo, altas concentraciones del sustrato solubilizado pueden inhibir o ser venenosas para el biocatalizador. Tales problemas se resuelven por la adición de una segunda mezcla miscible en agua y una alta solubilidad para el sustrato lipofílico. Así, el biocatalizador permanece en la fase acuosa mientras que la fase orgánica sirve como retén para el sustrato lipofílico y el producto.¹⁴

Otro tipo de biotransformación toma lugar ya sea en la fase acuosa donde la concentración del sustrato está determinada por su solubilidad en el agua como en la interface entre las dos fases. Un disolvente orgánico ideal para este propósito deberá ser inmisible en agua, exhibir una alta

solubilidad para el sustrato y producto en cuestión, y no inhibir la actividad del biocatalizador. Algunos ejemplos de este tipo son: los n-alcenos, ciclohexano, tolueno, benceno, éter de petróleo, cloroformo, tetracloruro de carbono, diclorometano, acetato de etilo, dietil o dibutil éter.¹³

En sistemas de dos fases, con un gran exceso de la fase orgánica, el equilibrio de reacción del biocatalizador hidrolítico puede ser llevado de la hidrólisis a la condensación. Esto ayuda a la formación de ésteres, amidas, péptidos, polimerizaciones de azúcares, nucleótidos.

Las biotransformaciones en sistemas líquidos de dos fases tienen las siguientes ventajas: 1. una alta concentración de sustrato/producto en la fase orgánica; 2. un ingreso continuo del sustrato a la fase acuosa y un desplazamiento del producto a la fase orgánica, manteniendo la biotransformación y minimizando los efectos inhibitorios en el biocatalizador; 3. una fácil separación de fases que ayudan a la recuperación del producto de la fase orgánica y un uso repetido del biocatalizador en la fase acuosa.⁸

2.2.6.- Extracción del producto. Los productos de biotransformación contenidos en el medio de reacción son recuperados del medio completo o del sobrenadante después de remover la biomasa por filtración o centrifugación. El primer paso del aislamiento ayuda a la concentración o fraccionamiento del producto.

Dependiendo de las propiedades físicas y químicas del producto a recuperar y de la composición química del medio de reacción, se deben considerar los siguientes métodos: extracción, adsorción en resinas poliméricas, precipitación, y destilación.

El producto resultante puede ser purificado por técnicas cromatográficas, destilación fraccionada, cristalización, decoloración y secado. Pequeñas cantidades pueden en muchos casos ser obtenidas por la aplicación de cromatografía de gases o HPLC.

Un resumen de las características generales de una biotransformación se presentan en la figura 2.

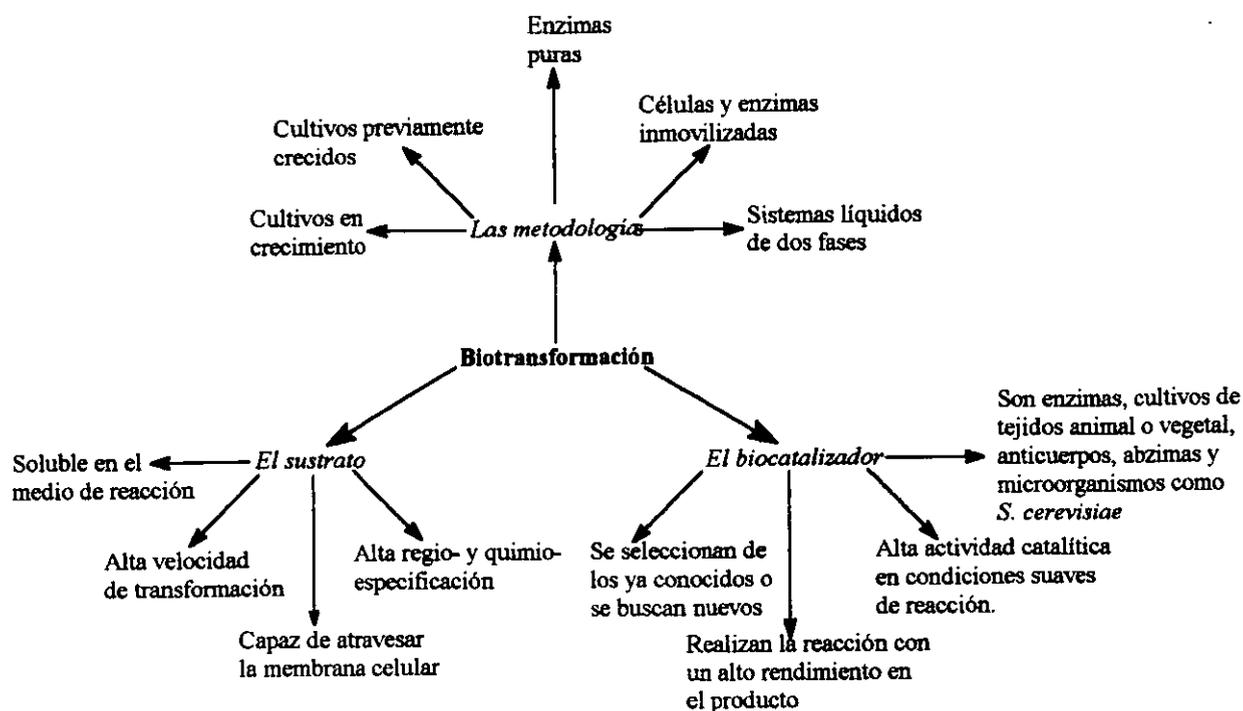


Fig. 2 Características generales de una biotransformación.

2.3.- Aplicaciones de las biotransformaciones

Los biocatalizadores se han utilizado de forma exitosa en los siguientes problemas:

Introducción de un centro quiral a una molécula, se lleva a cabo por un biocatalizador que realiza la bioconversión de un sustrato proquiral a un producto quiral.

Resolución de racematos, usando la capacidad de los catalizadores para discriminar entre enantiómeros de una mezcla racémica. Tarea difícil de llevar por métodos químicos. El rendimiento máximo del enantiómero deseado en un proceso de resolución está limitado al 50%, como esto no es aceptable el compuesto no deseado se recicla por racemización.

Conversión quimioselectiva de un grupo funcional entre varios grupos con reactividad similar, los biocatalizadores pueden diferenciar entre varios grupos funcionales de reactividad similar dentro de la misma molécula, se convierte quimioselectivamente uno de los grupos funcionales disponibles produciendo un producto homogéneo.

En biocatálisis se han utilizado enzimas, células vegetales, animales y microorganismos para llevar a cabo todas estas aplicaciones a continuación se describen las más importantes de cada una de ellas.

2.3.1- Biotransformaciones con células vegetales

El uso de cultivos de células vegetales se ha incrementado en ésta última década debido a su capacidad para producir metabolitos secundarios (alcaloides, terpenos, esteroides y fenoles)¹⁵ y de realizar la bioconversión de compuestos orgánicos que son de interés.

Compuestos sintéticos análogos a intermediarios metabólicos, los cuales no están normalmente disponibles en la planta, se pueden utilizar como sustratos y posiblemente se obtengan productos con nuevas propiedades químicas y biológicas.¹⁶

Los cultivos de células vegetales crecen en agar sólido o en medios líquidos. El primer método se utiliza para iniciar y subcultivar tejidos, mientras que los segundos son preferibles para estudios biosintéticos y de biotransformaciones por su fácil manejo, mejores tasas de crecimiento y la posibilidad de obtener grandes cantidades de células.

Algunas biotransformaciones realizadas con cultivos de tejidos vegetales se presentan a continuación:

Las células vegetales son capaces de glicosidar los sustratos agregados. Tal es el caso de la glicosidación de varios fenoles, como la hidroquinona a arbutina, reportada por Pilgrim en 1970¹⁷ (fig. 3).

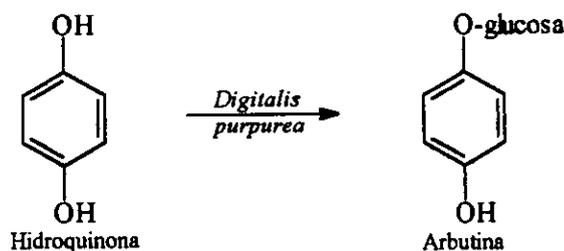


Fig. 3 glicosidación de la hidroquinona

Otra biorreducción es la llevada a cabo por células inmovilizadas de *Daucus carota* para convertir la acetofenona y la propiofenona en sus (S)-alcoholes aromáticos respectivamente después de 5 días de reacción dando rendimientos entre un 54 y 63% y un ee. del 99%¹⁸ (fig. 4).

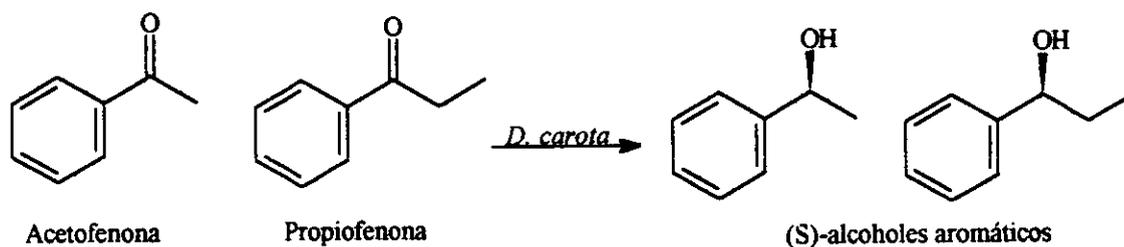


Fig. 4 Biorreducción de la acetofenona y la propiofenona

Los análogos de metabolitos de plantas son transformados de acuerdo a la ruta biosintética normal, como en la bioconversión del ácido 2-metilcinámico por células de *Nicotiana tabacum* al ácido 3-(4,5-dihidroxi-2-metilcinamoil)-quinico y ácido 3-(4-hidroxi-2-metilcinamoil)-quinico¹⁶ (fig. 5).

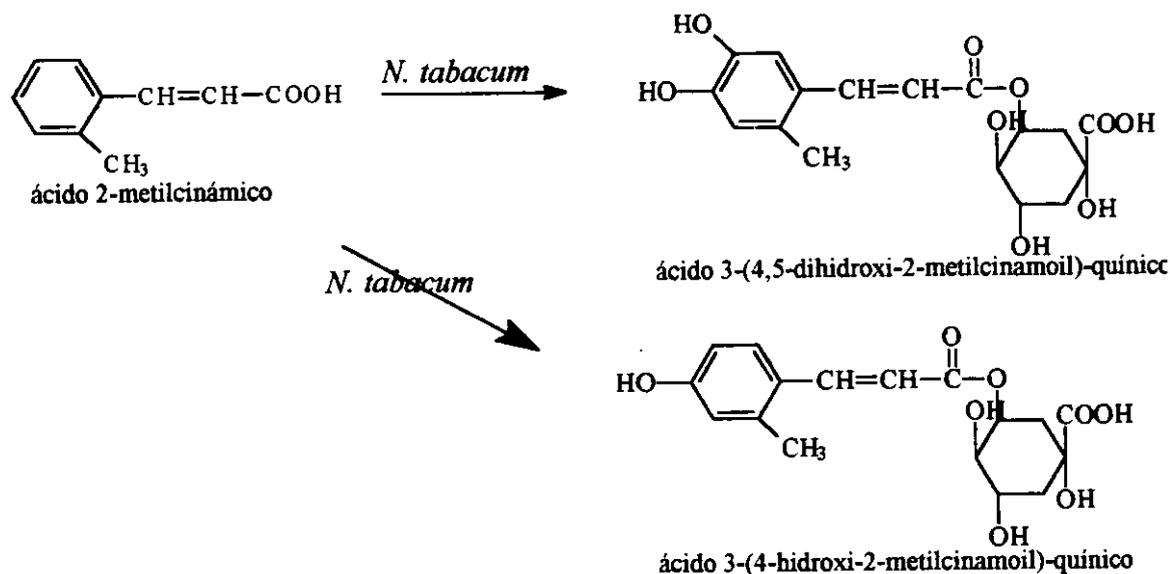


Fig. 5 Biotransformación del ácido 2-metilcinámico por *Nicotiana tabacum*

Se ha encontrado que la cumarina es hidroxilada por cultivo celular de *Catharanthus roseus*, a 7-hidroxicoumarina, y el cultivo celular de *Ruta sp.* utiliza a este compuesto como precursor de herniarina, marmesina y psoraleno¹⁶ (Fig. 6).

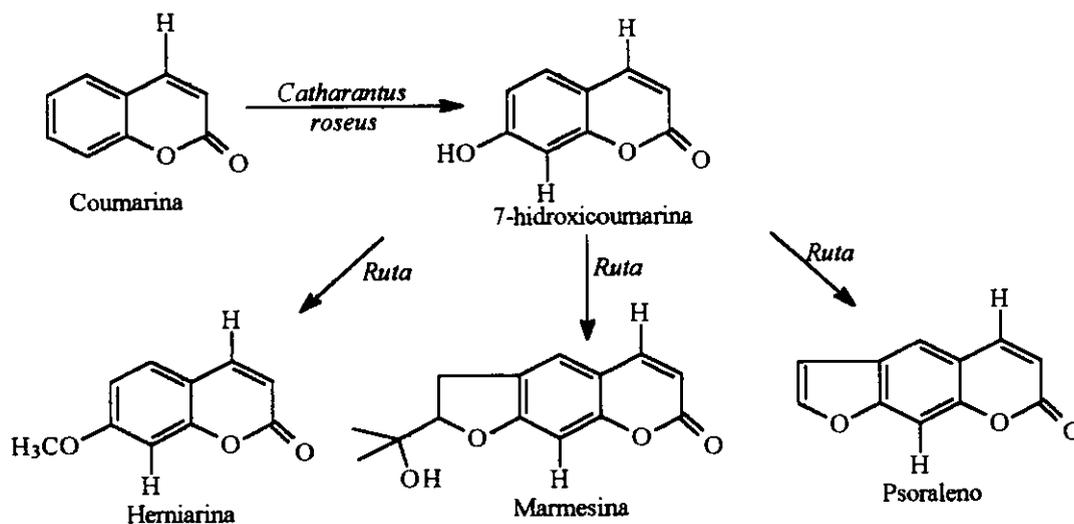


Fig. 6 Biotransformación de la cumarina por *C. roseus* y *Ruta sp.*

La mayor parte de biotransformaciones con cultivos de células vegetales se han enfocado al área

de los esteroides como el estudio que realizó Furuya¹⁹ en la bioconversión de la progesterona con varios tipos de cultivos vegetales mediante la reducción de los grupos 3-ceto y 20-ceto para dar la formación de palmitatos, glúcidos e hidroxilaciones.

Homogenados de *Cheiranthus cheiri* transforman el colesterol a Δ^4 -colestén-3-ona, el cual se metaboliza a su vez por homogenados de *Digitalis purpurea*, *C. cheire* *Strophanthus sarmentosus* y *Dioscorea deltoidea*, igual que con cultivos celulares de *Brassica hapius* y *Glycine max* a 5 α -colestán-3-ona.

Marchantia polymorpha se ha utilizado para la biotransformación de esteroides como la 1,4-androstadién-3,17-diona a 17 β -hidroxi-1,4-androstadién-3-ona, 4-androstan-3,17-diona y testosterona²⁰ (fig. 7).

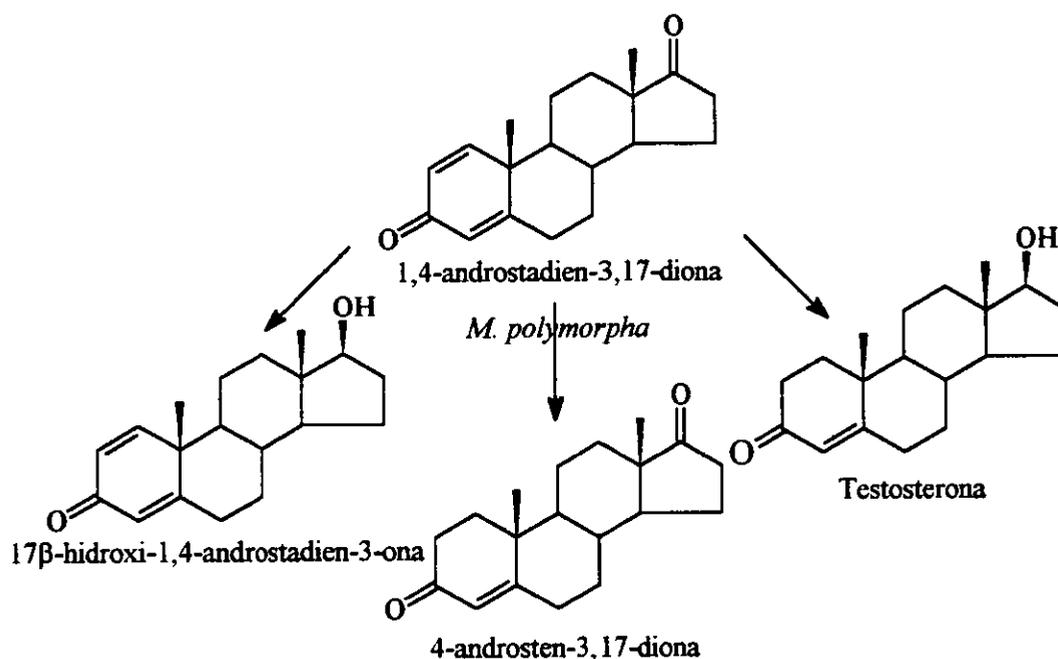


Fig. 7 Biotransformación de esteroides con *M. polymorpha*

La familia Podofilotoxina ha sido bien estudiada por Kutney²¹ en su química y biosíntesis. Estos estudios resaltaron las propiedades farmacológicas de esta planta en la que se descubrió una sustancia anticancerosa; el etósido. La ruta de obtención de este compuesto requiere el aislamiento de la podofilotoxina de *Podophyllum peltatum* y su utilización como materia prima para proporcionar el etósido.

La aplicación del cultivo de células vegetales de forma industrial se ha limitado por varios factores como son las consideraciones económicas, fisiológicas y la magnitud del tiempo requerido para

obtener la suficiente biomasa para realizar la bioconversión.²²

2.3.2.- Biotransformaciones con células animales

En la actualidad, las biotransformaciones con cultivos de células animales han sido muy poco estudiadas. Generalmente se utilizan extractos, homogenados crudos o la enzima purificada para realizarlas, motivo por el cual éste apartado se estudiará de forma conjunta con las bioconversiones con enzimas.

2.3.3.- Biotransformaciones con biomoléculas sintéticas

En años recientes, el amplio conjunto de disciplinas como la ingeniería genética, biología molecular y la química orgánica han dado lugar a la aparición de un nuevo tipo de biocatalizadores: los sintetizados de forma parcial o total en el laboratorio, tal es el caso de los anticuerpos biocatalíticos, enzimas modificadas y enzimas semisintéticas.

Anticuerpos biocatalíticos.- el sistema inmunológico produce proteínas específicas que protegen a los vertebrados de infecciones o enfermedades provocadas por bacterias, virus, y células cancerígenas. Estos anticuerpos tienen la capacidad de discernir lo propio de lo no propio, son proteínas grandes de 150,000 Daltones aproximadamente y consisten en 4 cadenas de polipéptidos; dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras.

Los anticuerpos son excelentes herramientas en la detección, aislamiento y análisis de material biológico y son el elemento clave de nuevos procedimientos de diagnóstico. Sin embargo, su potencial no está limitado a la biología y la medicina pues también poseen potencial como biocatalizadores.²³

El protocolo general para obtener anticuerpos catalíticos (abzimas) es el siguiente: después de determinar el estado de transición de la reacción a ser catalizada (hapteno), un compuesto de estado de transición similar se sintetiza. Este modelo se utiliza como antígeno para inducir anticuerpos. Si se requiere, este último se puede modificar química o genéticamente por adición de un grupo reactivo o un cofactor en función de catalizar otro tipo de reacciones.²⁴

La mayoría de los experimentos realizados con anticuerpos catalíticos se elaboran con anticuerpos monoclonales pues simplifica la cinética y mecanismo de reacción, la caracterización estructural y permite la reproducción en grandes cantidades de estas proteínas para su caracterización.

Estos biocatalizadores se utilizan para catalizar una amplia variedad de reacciones químicas que van desde la hidrólisis de ésteres y amidas, transferencias de grupos acilo, lactonizaciones, reacciones de eliminación, reducción, formación y rompimiento de enlaces carbono-carbono, reacciones fotoquímicas, así como rearrreglos tipo Claisen y reacciones de Diels-Alder.

En la revisión que hizo Roberts²⁵ en 1998 se mencionan varios ejemplos de reacciones con anticuerpos unidos a diferentes tipos de haptenos, los cuales catalizan reacciones de hidrólisis, como la de la cocaína, derivados de aminoácidos, ésteres, acetales, que dan una alta enantioselectividad a estos anticuerpos.

Los pros de utilizar abzimas son que ofrecen un único acervo de catalizadores artificiales y son capaces de catalizar reacciones en las cuales no hay una contraparte equivalente dentro del arsenal de enzimas naturales.

La construcción de estas proteínas tienen una preferencia estereoquímica. La eficiencia catalítica es baja en comparación con las enzimas naturales, principalmente porque el estado de transición que se utiliza para producir el anticuerpo sólo actúa como patrón o plantilla para el verdadero estado de transición.

Enzimas modificadas. - se han encontrado dos tipos de modificaciones para las enzimas, el primer tipo es por enzimas solubles en disolventes orgánicos y el segundo tipo es por *Bio-imprinting*

Las enzimas solubles en disolventes orgánicos actúan en disolventes orgánicos anhidros de sistemas heterogéneos. Para poder llevarlos a un sistema homogéneo, las enzimas deben modificarse de manera que sean solubles en este tipo de disolventes, y se puede realizar por uniones covalentes de polímeros anfipáticos como el polietilenglicol (PEG) a la superficie de las enzimas.

Las ventajas y desventajas de las enzimas modificadas con PEG son: que se disuelven en disolventes orgánicos, sus propiedades como la estabilidad, actividad y especificidad se pueden alterar debido a la solubilidad que presentan en varios disolventes orgánicos, los estudios espectroscópicos se han simplificado. Principalmente este tipo de enzimas modificadas se utilizan en la síntesis de ésteres, poliésteres, amidas y péptidos

El otro tipo de modificación es por *bio-imprinting*, en donde se dan los cambios conformacionales en disolventes orgánicos lipofílicos, es decir, la estructura de las enzimas parece estar "congelada" en medios orgánicos pero es flexible en agua.

En solución acuosa, para el sitio activo de la enzima se le agrega un sustrato similar (ligando quiral) que forma un complejo parecido al de la enzima-sustrato. Este proceso está muy relacionado con pequeños cambios conformacionales. Cuando el complejo se coloca en un disolvente orgánico anhidro, el ligando se lava, pero la enzima es incapaz de adoptar su conformación original debido al bajo contenido de agua en el sistema. Como consecuencia, la estructura tridimensional de la enzima permanece "congelada", como si recordara la estructura del ligando.

Enzimas semisintéticas.- Además de variar las propiedades fisicoquímicas de la enzima también se ha intentado alterar sus propiedades. Por esto, se modifica el sitio activo de la enzima semisintética, la cual frecuentemente no tiene mucho en común con su antecesor natural, por ejemplo, el grupo hidroxilo de un residuo de serina en la subtilisina se puede transformar a su análogo sulfuro o selenio. Convirtiéndose la serinohidrolasa en cisteinohidrolasa.

El intercambio del grupo reactivo no da una mejor enzima sino una enzima diferente, considerando su actividad y especificidad. Los estudios de enzimas semisintéticas se han hecho principalmente para obtener el mecanismo catalítico de las enzimas que permitan la creación de biocatalizadores sintéticos para uso de tipo preparativo.

Algunos ejemplos de biotransformaciones con biomoléculas sintéticas son:

- El uso de polileucina para la epoxidación asimétrica de α,β -cetonas insaturadas. Algunos de los epóxidos ópticamente activos derivados de esta metodología se utilizan para preparar heterociclos que contienen oxígeno, como el trans- y cis-dihidroflavonoles.²⁶
- La albúmina sérica bovina (BSA) reconoce diferentes enantiómeros de materiales racémicos y ha sido utilizada como un buen soporte para la resolución de enantiómeros por cromatografía. Se ha demostrado que liga la forma P del heliceno racémico 2-hidroximetiltieno[3,2-e:4,5-e']di-[1]benzotiofeno. También se ha demostrado que promueve la desprotonación de benzoisoxazoles.²⁷

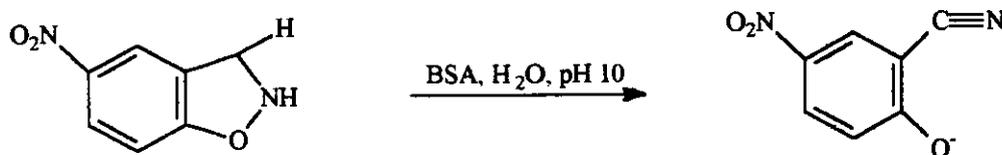


Fig. 8 Desprotonización de benzoisoxazoles por albúmina sérica bovina

- El polipéptido poli(Asp-Leu-His-Leu-Ser-Leu) se ha construido simulando una triada presente en las serin-proteasas. El polímero hidroliza el éster de p-nitrofenil de la fenilalanina con una modesta enantioselectividad.²⁸
- La selenoenzima artificial, selenosubtilisina. El efecto de este cambio es que el intermediario acilenzima es considerablemente más reactivo hacia las aminas en agua, por lo que se transforma de una proteasa a una aciltransferasa.²⁹

2.3.4.- Enzimas

Una de las características más importantes de las reacciones que ocurren en una célula viva es la participación de proteínas biocatalíticas llamadas enzimas, y tienen las siguientes propiedades: aumentan la velocidad de reacción, son los catalizadores más eficientes conocidos hasta ahora por el hombre; se distinguen por su especificidad de acción, su actividad está sujeta a regulación cuyo agente o estímulo regulatorio puede ser intracelular o extracelular.

Las enzimas se clasifican en seis principales clases con base en el tipo de reacción química que catalizan.³⁰

1. **Oxidoreductasas** (reacciones de óxido-reducción de todos los tipos y son dependientes de cofactores), reducción de aldehidos, cetonas, enolatos, biohidroxilación, sulfoxidación, epoxidación, oxidación Baeyer-Villiger, dihidroxilaciones
2. **Transferasas** (reacciones que implican la transferencia de un grupo intacto de átomos de una molécula dadora a otra aceptora), transferencia glicosilica.
3. **Hidrolasas** (reacciones que implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos, tales como C-O, C-N, C-C), formación de ésteres, aminólisis, hidrólisis de ésteres, amidas, epóxidos, halógenos, fosfatos, además de glicosilaciones, y síntesis de péptidos.
4. **Liasas** (reacciones que implican la ruptura de C-O, C-N, C-C y otros enlaces por otros métodos fuera de hidrólisis u oxidación), formación de cianohidrinas, aciloinas y reacciones aldólicas.
5. **Isomerasas** (reacciones que implican cualquier tipo de isomerización, tales como racemización, epimerización e isomerización *cis-trans*), rearrreglos tipo Claisen, isomerización de carbohidratos, racemización y copolimerización
6. **Ligasas** (reacciones que implican la formación de un producto que resulta de la condensación

de dos moléculas diferentes, acopladas a la ruptura de una unión pirofosfórica del ATP. Actualmente se conocen más de 2000 tipos diferentes de enzimas y muchas de ellas están disponibles de forma comercial. A continuación se exponen algunos experimentos ordenados por el tipo de enzima que realiza la biotransformación.

Las deshidrogenasas como las esteroides deshidrogenasas, catalizan la reducción de compuestos carbonilos no esteroidales, y se les ha encontrado aplicación en la síntesis quimioenzimática de las muscarinas. La glicerol deshidrogenasa purificada de *Geotrichum candidum*, se utiliza para la reducción asimétrica de cetoésteres. Las aminoácido deshidrogenasas catalizan la formación de cetoácidos de α -aminoácidos quirales y son dependientes de cofactores.³¹

La formato deshidrogenasa dependiente de NADPH se modificó para trabajar con una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Lactobacillus sp.* para reducir (R)-1-fenil etanol a partir de acetofenona²⁶

La polifenol oxidasa se utiliza para la hidroxilación de fenoles³² como se observa en la figura 9.

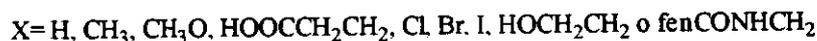
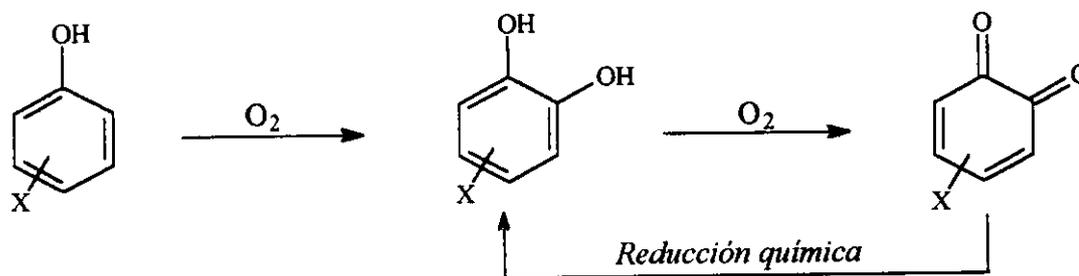


Fig.9 Hidroxilación de fenoles

La alcohol deshidrogenasa del hígado del caballo (HLADH) oxida el *cis*-3-(2-hidroxi-etil)ciclopentanol a (+)-3s-(2-hidroxi-etil)ciclopentanona con un 97% de ee. (fig. 10).

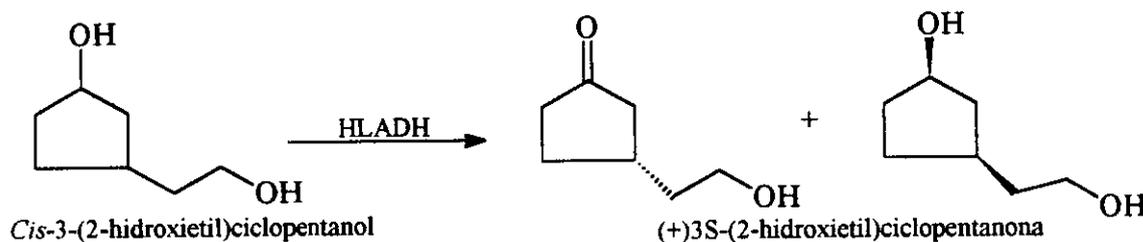


Fig. 10 obtención del (+)-3S-(2-hidroxi-etil)ciclopentanona

La D- y L- deshidrogenasa láctica reduce el ácido cloropirúvico a D- y L-ácidos clorolácticos y

estos a su vez pueden ser convertidos a ácidos epoxiacrílicos (fig. 11).

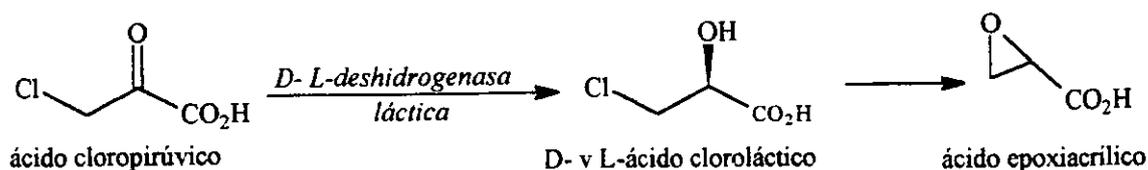


Fig. 11 Bioreducción del ácido cloropirúvico a D- y L- ácidos clorolácticos

Nagasawa y colaboradores³³ han desarrollado la conversión enzimática del acrilonitrilo y metacrilonitrilo en ácido acrílico y ácido metacrílico respectivamente utilizando hexano- δ -lactasa inducida en *R. Rhodochrous* J1 (fig. 12).

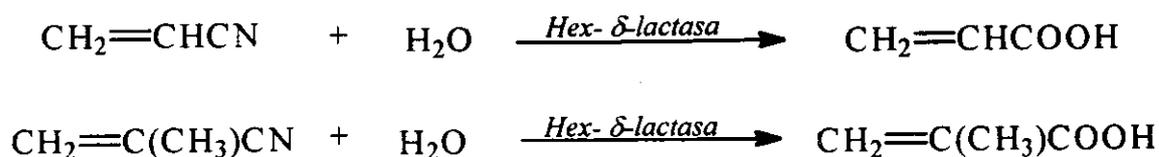


Fig. 12 Conversión enzimática del acrilonitrilo y metacrilonitrilo a ácido acrílico y metacrílico

El equipo de Ensley³⁴ descubrió que la expresión del sistema de la naftalendioxigenasa de *Pseudomonas* en *Escherichia coli* pueden sintetizar el indigo, pigmento azul ampliamente utilizado en la industria textil, ya que cataliza la oxidación del indol para formar éste colorante (fig. 13). El indol se produce a partir del triptofano en *E. coli* por la acción de la triptofanasa. Tal combinación de reacciones microbiológicas pueden dar al desarrollo de una táctica muy útil para obtener el producto en cuestión.

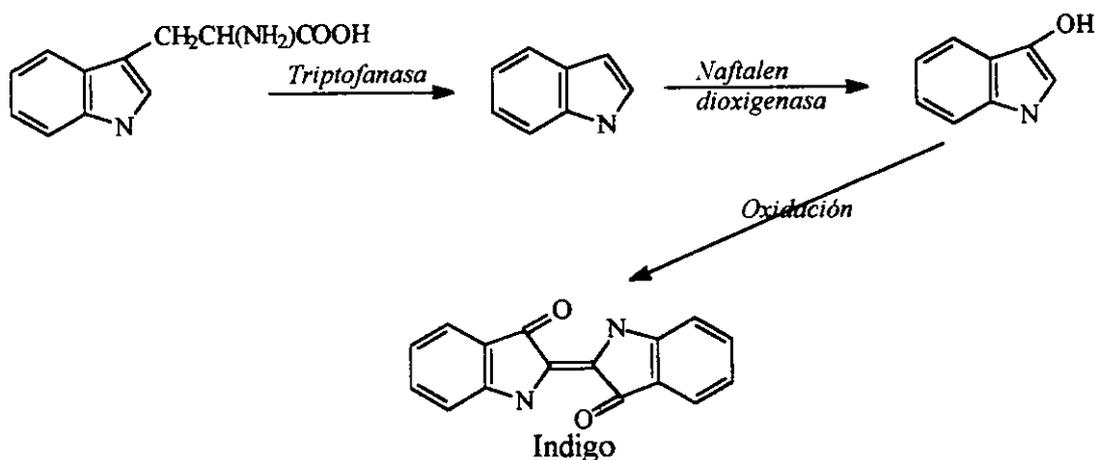


Fig. 13 Biosíntesis del indigo

La oxidación de la D-glucosa en el C-2 catalizada por la piranosa-2-oxidasa da como producto la

L-glucosona, que se convierte por reducción química a la D-Fructosa y es importante comercialmente (fig. 14).

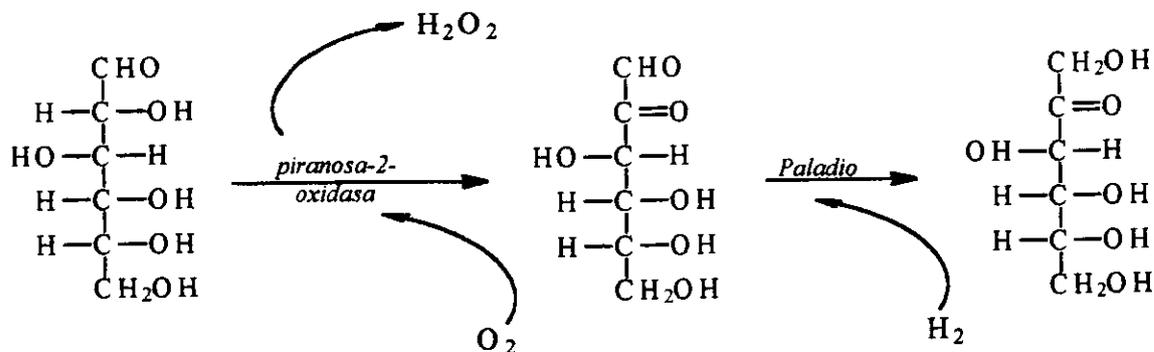


Fig. 14 Oxidación de la D-glucosa para producir D-fructosa

Las glicosidasas son responsables del rompimiento hidrolítico de oligo y polisacáridos, pero la reacción reversa, la glicosidación; que tiene importancia en la síntesis enzimática se ha investigado mucho. Las β -glicosidasas y las β -galactosidasas de diferentes fuentes son las enzimas de elección para la preparación de alquil o hidroxialquil gluco o galactopiranósidos. Algunos resultados se han obtenido utilizando una preparación cruda de β -galactosidasa de *Sulfolobus solfataricus*.³⁵

Las enzimas hidrolíticas no necesitan cofactores para su catálisis y algunas de ellas se producen en buena cantidad como las hidrolasas, lipasas, proteasas y penicilin acilasa.

Las lipasas se han desarrollado rápidamente en una clase de enzimas extremadamente útiles. Tienen una alta estabilidad y tolerancia a la variación en la estructura del sustrato, además de que los compuestos usados no requieren ser solubles en agua, pues pueden operar mejor en interfaces acuoso-orgánicas y se ha demostrado que retienen un alto grado de actividad en deshidrataciones fuertes y en disolventes orgánicos.

Las reacciones más representativas realizadas con lipasas son las siguientes: la lipasa de *Chromobacterium viscosum*, realiza reacciones que generalmente obtienen un rendimiento del 80% en 1,6- y 1,7-diésteres. Estos diésteres tienen interesantes propiedades, pero también pueden servir como sustratos para la hidrólisis enzimática (fig. 15).

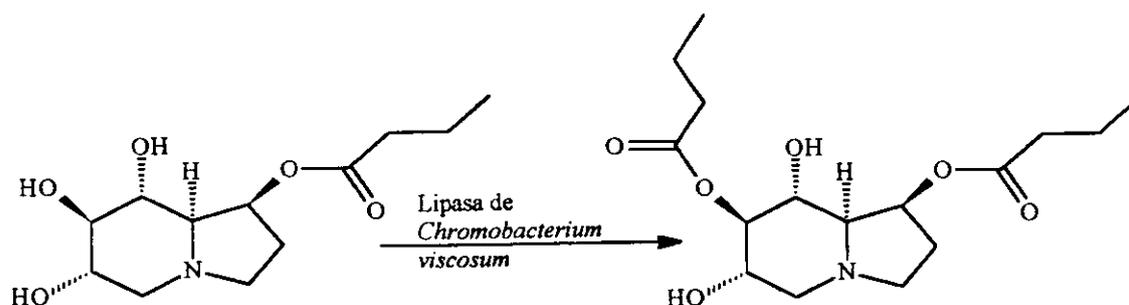


Fig. 15 Obtención de la butanoilcastanospermina por *C. viscosum*.

El alcaloide castanospermina que es de importancia clínica como agente anticancerígeno y especialmente como medicamento en el tratamiento del SIDA, tiene varios O-acil derivados que son 20 veces más activos inhibiendo la replicación del VIH. Esta transesterificación se biocataliza con una proteasa, la subtilisina^{32 y 36} que en piridina anhidra se ha encontrado que funciona como lipasa (fig. 16).

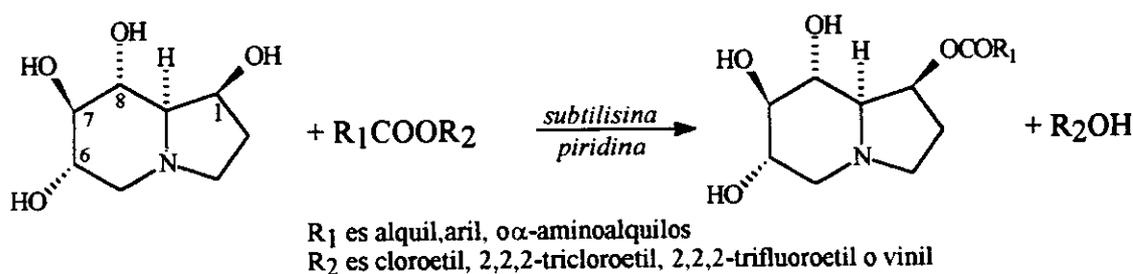


Fig. 16 Acilación regioselectiva de castanospermina en piridina

La resolución cinética de 2-bencilpropanol catalizada por la lipasa de *Pseudomonas sp.* se realiza en *tert*-butilmetileter, que a pesar de la proximidad entre el hidroxilo primario y el centro quiral de esta molécula, la lipasa exhibe una alta estereoespecificidad (fig. 17).

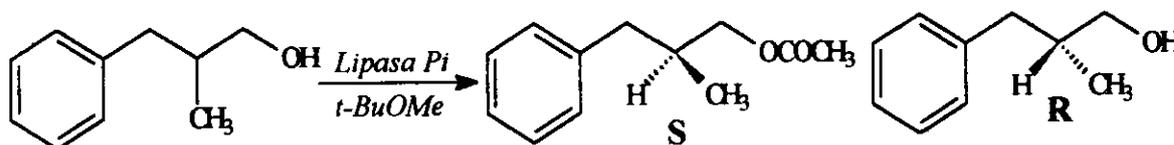


Fig. 17 Biotransformación catalizada por la lipasa de *P. sp.*

Los grupos de Yamada³⁷ y Gutman³⁸ han descrito el uso de lipasas en disolventes orgánicos anhidros para la producción de lactonas, incluyendo cetonas quirales para metilésteres de hidroxiácidos. Por otra parte Cesti y colaboradores³⁹ demostraron una alta monoacilación regioselectiva de varios glicoles en etil carboxilatos, catalizados por la lipasa pancreática porcina.

Las halogenasas se usan para el reemplazo de halógenos con un hidroxilo. Aunque estos biocatalizadores podrían tener un gran potencial sintético, no están ampliamente distribuidas en la naturaleza y la mayoría de los estudios se refieren a la degradación de xenobióticos. Por otro lado, la eliminación de un haluro de hidrógeno de una halohidrina bajo catálisis de una halohidrina epoxidasa da como resultado un epóxido⁴⁰

Las proteasas, se han aplicado en muchos procesos sintéticos y el más importante es la síntesis de enlaces peptídicos y semisíntesis de proteínas, aunque también se han utilizado en la síntesis de ésteres.

Las esterasas se utilizan en la hidrólisis estereo y regioselectiva de ésteres, en la preparación de ésteres quirales, ácidos y alcoholes. Como uno de los ejemplos está la esterasa del hígado de cerdo (PLE) se usa en la hidrólisis selectiva del dietil-β-metilglutarato a su éster, así como en la resolución de imidazolona a la (+)-biotina (fig. 18)

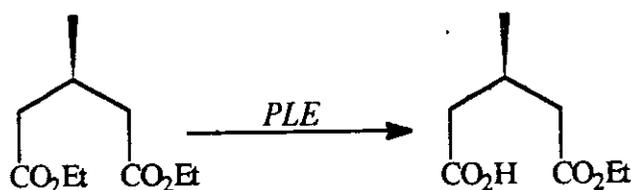


Fig. 18 Obtención de Biotina a partir de imidazolona con PLE

Las amidasas se han utilizado para la resolución de aminoácidos y la formación de enlaces amido en polipéptidos y proteínas, como en la síntesis de insulina humana a partir de insulina porcina. Otras aplicaciones son la resolución de aminas, producción de di- u oligopéptidos, en reacciones que se llevan a cabo en medios orgánicos o miscelas reversas y en la modificación postranslacional de proteínas obtenidas de una fuente natural por tecnología de ADN recombinante.

Las nitrilasas hidrolizan compuestos aromáticos, nitrilos heteroaromáticos, mientras que los compuestos alifáticos son transformados por la vía de los dos pasos, en la que se encuentra una formación intermedia de la carboxamida, que es biocatalizada por una nitrilo hidratasa y una amidasa, respectivamente.

Las hidroxinitriloliasas catalizan la formación asimétrica de cianohidrinas en HCN y a partir de un aldehído y menos común la cetona. Esta última es materia prima para la síntesis de muchos tipos de compuestos tal como los α-hidroxiácidos o ésteres, aciloinas o 1,2-dioles, etanolaminas así como aminonitrilos y aziridinas. Sin embargo, algunas cianohidrinas quirales constituyen el alcohol

quiral de insecticidas comerciales como los piretroides.

La adición enantioselectiva de ácido cianhídrico a varios aldehídos, catalizado por la mandelonitrila liasa dan las cianohidrinas R ópticamente activas⁴¹ (fig. 19).



Fig. 19 Cianohidrinas ópticamente activas

Las aldolasas realizan reacciones biocatalíticas que se llevan a cabo en soluciones acuosas a pH neutro sin la necesidad de una metodología de protección excesiva. En general las aldolasas son muy fieles con sus donadores, pero poseen una relajada especificidad para el aceptor. Catalizan condensaciones aldólicas reversibles de azúcares y exhiben una alta especificidad para las dihidroxicetonas fosfato, toleran también aldehídos. Ejemplos de éste tipo de enzimas son la farnesilpirofosfato sintetasa que se usa en la síntesis asimétrica de isoprenoides.

La L-fenilalanina se sintetiza por adición de amonio marcado isotópicamente con ácido cinámico por la fenilalanina amonio liasa. Otro grupo muy útil de enzimas hidrolíticas son las nitrilohidratatas, las cuales catalizan la hidrólisis de acrilonitrilo.

Las isomerasas no requieren la adición de cofactores y varias aplicaciones se han revisado, tal es el caso de las glicosidasas en la conversión de harina de maíz a glucosa. La glucosa isomerasa cataliza el equilibrio de glucosa a fructosa. El ácido aspártico se separa por la adición de amonio al ácido fumárico en una reacción biotransformada por la aspartasa, el ácido málico por la hidratación del ácido fumárico biocatalizada por la fumarasa.

Las reductasas purificadas generalmente se utilizan para propósitos sintéticos, tienen la desventaja de que necesitan cofactores como el NADH y el NADPH y aunque varios métodos para la reutilización de las coenzimas se han encontrado, este complicado problema parece ser el principal obstáculo para el uso más general de estos biocatalizadores.³⁵

Dentro de las reacciones realizadas por las enzimas están las reacciones multienzimáticas en las cuales se usan más de una enzima para la síntesis de un compuesto dado. Un ejemplo de una biotransformación multienzimática podría ser el uso de algunas enzimas compatibles en secuencia para una síntesis de multipasos. Típicamente, puede ser la búsqueda de varios biocatalizadores en

orden de encontrar las condiciones más precisas para llevar a cabo la biotransformación con el máximo exceso enantiomérico.²⁵

La síntesis de 1,5-ribulosa-difosfato, un importante sustrato en bioquímica vegetal, a pesar de su aparente complejidad es actualmente sencilla y varios cientos de gramos de este compuesto se preparan en el curso de varias reacciones desarrolladas por este método.

2.3.5.- Microorganismos

Los microorganismos se utilizan para efectuar transformaciones químicas, esto es, cuando el producto deseado no es un metabolito de la célula pero es producido como resultado de la conversión enzimática de un sustrato inusual agregado al medio de cultivo. De esta manera se ha logrado la producción de una amplia variedad de compuestos de bajo peso molecular como son: antibióticos (ciclosporinas, inmunosupresores, inhibidores para la síntesis del colesterol, alcaloides) vitaminas, aminoácidos y esteroides.

A continuación se exponen algunos ejemplos de biotransformaciones hechas con microorganismos.

En lo que respecta a las cetonas el hongo *Yarrowia lipolytica* las reduce a su correspondiente (R)-alcohol. Por otro lado la levadura *Pichia farinosa* también reduce cetonas a su respectivo (R)-alcohol, además de que reduce dionas acíclicas a dioles.²⁶

Por su parte los β -cetoésteres pueden ser reducidos por *Geotrichum candidum*, el cual da como resultado hidroxiésteres ópticamente activos. Los resultados obtenidos de la reducción de los β -cetoésteres con levaduras dependen del origen y tipo de estas. Células de *Proteus vulgaris* son muy eficientes en la reducción estructural de 2-oxoácidos a (R)-2-hidroxiácidos con un resultado satisfactorio y completa estereoselectividad. La oxidación estereoselectiva de Baeyer-Villiger de ciclohexanonas usando *Acinetobacter* TD63 y una monooxigenasa dependiente de NADPH de *Pseudomonas* NCIMB 9872 se han comparado y ambos sistemas dan lactonas ópticamente activas con un buen exceso enantiomérico.³⁸

La hidrólisis regioselectiva de un grupo nitrilo es generalmente imposible utilizando la catálisis tradicional la cual da a la formación de mezclas complejas, pero el cultivo de células microbianas es efectivo para este propósito.⁴²

Se ha realizado la conversión enzimática de acrilonitrilo y metacrilonitrilo en ácido acrílico y ácido

metacrílico respectivamente usando hexano- δ -lactona inducido por *Rhodococcus rhodochrous* J1⁴³ (fig. 20).

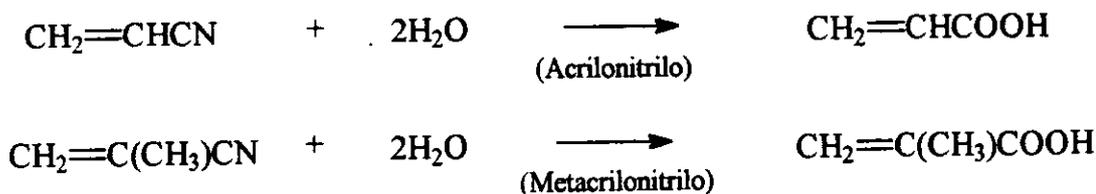


Fig. 20 Conversión biocatalítica de acrilonitrilo y metacilonitrilo con *R. rhodochrous* J1

La propeno halohidrina se sintetiza a partir del propeno usando *Caldariomyces fumago* cloroperoxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno. La halohidrina es posteriormente convertida a óxido de propeno por *Flavobacterium* halohidrin epoxidasa. El peróxido de hidrógeno se administra a través de la reacción de oxidación de glucosa por la glucosa-2-oxidasa⁴³ (fig. 21).

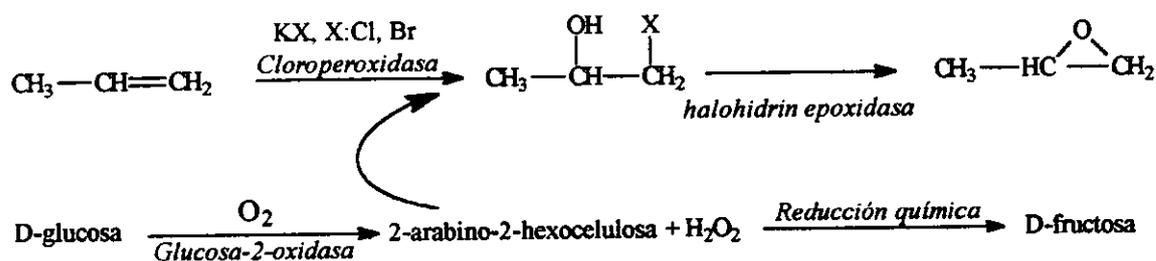


Fig. 21 Biosíntesis del óxido de propeno con *C. fumago* y *Flavobacterium*

La hidroquinona se sintetiza por medio de procesos químicos y se usa en la industria fotográfica, Yoshida⁴⁴ y colaboradores han elaborado un proceso microbiano con *Mycobacterium sp.* B-394 que cataliza la posición específica de la hidroxilación del fenol por lo que se ha utilizado como biocatalizador (fig. 22).

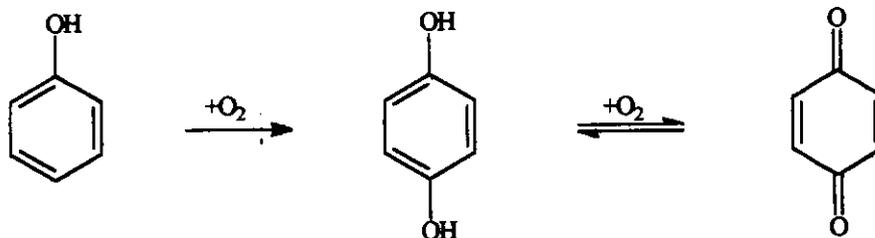


Fig. 22 Biosíntesis de la hidroquinona con *M. sp.*

El hongo *Aspergillus niger*, puede oxidar la cinerona a cinerolona⁴³ (fig. 23).

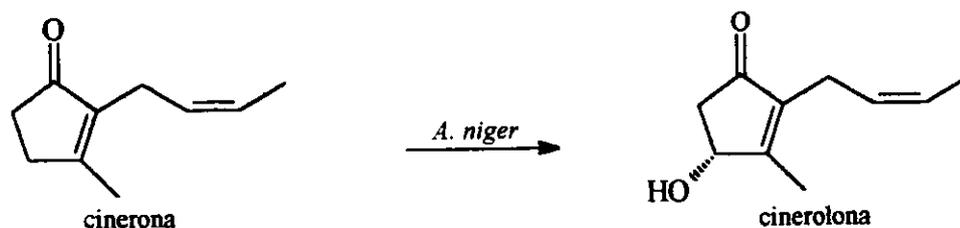


Fig. 23 Biooxidación de la cinerona a cinerolona

Los productos naturales como el larixol y el taxano son hidroxilables utilizando *Mucor plumbeus* y *Cunninghamella echinulata* respectivamente. El principal problema con respecto a las reacciones de hidroxilación son su impredecibilidad del sitio de hidroxilación.

Aspergillus niger es el organismo que generalmente se utiliza para obtención de ácido cítrico y otras levaduras como *Candida lipolytica* y *Yarrowia lipolytica*. Estas levaduras producen cantidades significativas de este ácido en medios que contienen carbohidratos. Cerca del 70% del ácido cítrico se utiliza en la industria alimenticia como acidulante, saborizante, preservador, antioxidante, estabilizador, amortiguador, etc. cerca del 10% en cosméticos, farmacia y el remanente en diversos propósitos industriales.⁴⁵

La hidroxilación de progesterona en la 11 α -posición por *Rhizopus arrhizus* o *Aspergillus niger* hacen aproximadamente la mitad de los 37 pasos de la síntesis química convencional y la 11 α -hidroxiprogesterona hace disponibles estos compuestos para fines terapéuticos a costos razonables.⁴⁶

Aspergillus flavus convierte el 17 α -etnil-3,17-estradiol en tres productos monohidroxilados como el 17 α -etnil-10 β ,17 β -dihidroxi-4-estren-3-ona (30%) (fig. 24).

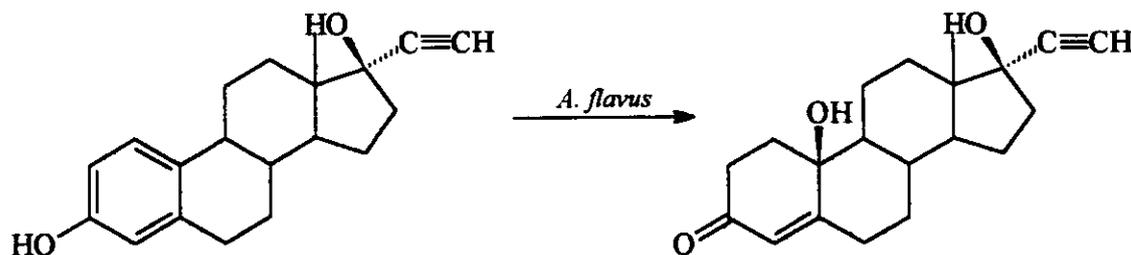


Fig. 24 Biotransformación con *A. flavus*

Cylindrocarpon radicolica y *Streptomyces sp.* convierten la progesterona a la lactona antitumoral, testolactona con un rendimiento del 85%⁴⁴ (fig. 25).

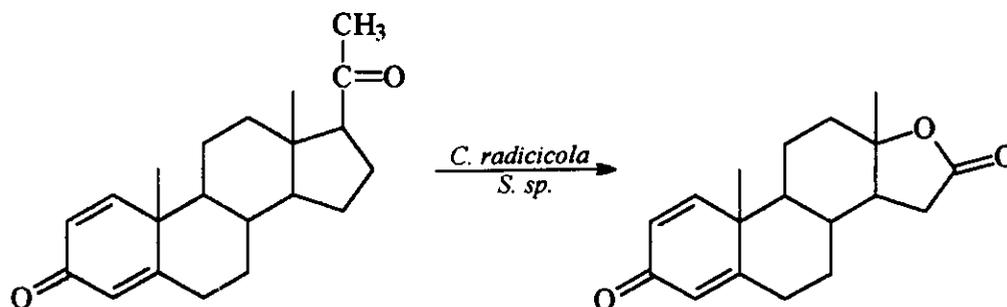


Fig. 25 Bioconversión de la progesterona a la testolactona

2.3.6.- *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura de pan, *Saccharomyces cerevisiae*, se ha utilizado en la industria del pan durante mucho tiempo. Su proceso está registrado en las antiguas escrituras y representa uno de los primeros aprovechamientos que hace el hombre de este organismo.

El primer uso bien documentado de una biotransformación es el de la fermentación de azúcar a etanol realizada por *S. cerevisiae*, un proceso que probablemente sentó las bases para la fundación de la microbiología como ciencia.³

A continuación se presentan las generalidades y características del grupo al que pertenece.

Clasificación taxonómica⁴⁷

Reino:	Fungi
División:	Eumycota
Subdivisión:	Ascomycotina
Clase:	Hemiascomycetes
Orden:	Endomycetales
Familia:	Saccharomycetaceae
Género:	<i>Saccharomyces</i>
Especie:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

El carácter esencial de este tipo de hongos es la formación de esporangios especiales, característicos de su estado de reproducción sexual, llamados ascas o ascos en cuyo interior se generan las esporas denominadas ascosporas. El talo puede ser unicelular, pero generalmente está constituido por un micelio bien desarrollado con hifas ramificadas y septadas, cuyas células poseen de uno a varios núcleos. En su mayoría son hongos eucárpicos, aunque los hay holocárpicos. Tienen reproducción sexual y asexual. La reproducción sexual termina con la formación de ascas y ascosporas.⁴⁸

Los ascomicetes son cosmopólitas y constituyen el grupo mayor de hongos, por lo que respecta al número de géneros y especies; tienen diversas formas de vida como saprobios, parásitos, simbioses y son de enorme importancia científica y práctica.

Los hemiascomicetes son los ascomicetes más primitivos. Con frecuencia el micelio falta por completo o está muy poco desarrollado, pero también hay formas con pseudomicelios o con micelios típicos abundantes, aunque es común que los talos de los representantes de esta clase estén reducidos a simples células de diversas formas, predominando las esféricas, ovoides o elípticas.⁴⁹

En el orden endomicetales las ascas se forman directamente en los cigotos, que provienen de la fecundación de dos células o por partenogénesis de una.

Saccharomyces, es el género más importante de las levaduras, desde el punto de vista económico, pues sus especies son las más utilizadas en la industria de la fermentación alcohólica, en la elaboración de pan y como complemento alimenticio del hombre y de los animales domésticos.

Saccharomyces cerevisiae es una especie muy versátil que puede desarrollarse en muchos sustratos, tiene cambios en su morfología y efectuar diversas actividades químicas.

En los últimos 40 años, los científicos han puesto su interés en este microorganismo con la intención de utilizarlo para sintetizar importantes intermediarios químicos, ya que tiene un gran potencial en las biotransformaciones, además de ser barata y fácil de obtener y generalmente las mezclas de reacción no requieren complementos como nutrientes o factores de crecimiento.⁵⁰

S. cerevisiae es capaz de realizar diferentes tipos de reacciones químicas, como la reducción de grupos carbonilos, reducción de dobles enlaces, la interconversión de grupos funcionales con actividad similar y la síntesis de heterociclos⁵¹

Una de las reacciones más simples efectuadas con *S. cerevisiae* es la de cetoésteres a sus hidroxiésteres como la que muestra Bennet con un rendimiento del 70% y una pureza del 78%⁵² (fig. 26).



Fig. 26 Reducción de cetoésteres investigada por Bennet.

También se han realizado reducciones con β -cetoésteres a sus correspondientes β -hidroxiésteres, ejemplo de este tipo de reducciones son la biotransformación del acetoacetato de etilo a su β -hidroxiéster S(+)-3-hidroxiбутаноato de etilo con un rendimiento del 70% y un exceso enantiomérico del 90%, compuesto muy útil en la química sintética (fig. 27).



Fig. 27 Reducción de β -cetoésteres a sus correspondientes β -hidroxiésteres

En la bioconversión de ácidos β -cetocarboxílicos, como en la obtención del ácido (+)-(2R,3R)-corimonicílico, un constituyente de la pared celular de *Corynebacterium sp.* requiere la reducción del ácido 3-óxido-octadecanoico, resultando un (R)-3-hidroxiácido en los primeros pasos de la síntesis con rendimiento del 40% y un ee. del 98% (fig. 28).

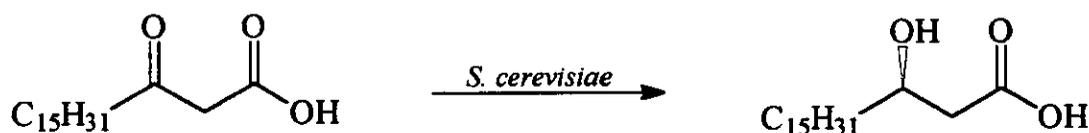


Fig. 28 Bioconversión de ácidos β -cetocarboxílicos

En el campo de las cetonas Izumi y colaboradores⁵³ reportaron la reducción de las α -(alcoxicarbonilamino) acetofenonas, utilizando *S. cerevisiae* en forma libre e inmovilizada (fig. 29).

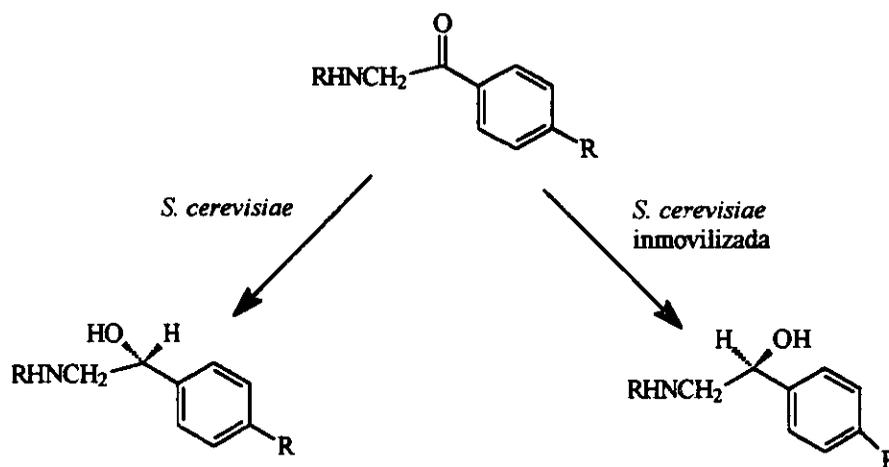


Fig. 29 Biotransformación del α -(alcoxicarbonilamino) acetofenonas

Fantin⁵⁴ logró la biorreducción del biciclo-hept-3-en-6-ona metil-sustituída utilizando *S. cerevisiae* y otros hongos como *Yarrowia lipolytica*, *Fusarium sp.*, y *Penicillium roqueforti*, el sustrato inicial de la reacción es el 1,4-dimetil-biciclo[3.2.0]hept-3-en-6-ona para dar los correspondientes, (-)-(1R, 5S, 6S)-endo- y el (+)-(1S, 5S, 6S)-exo alcoholes (fig. 30).

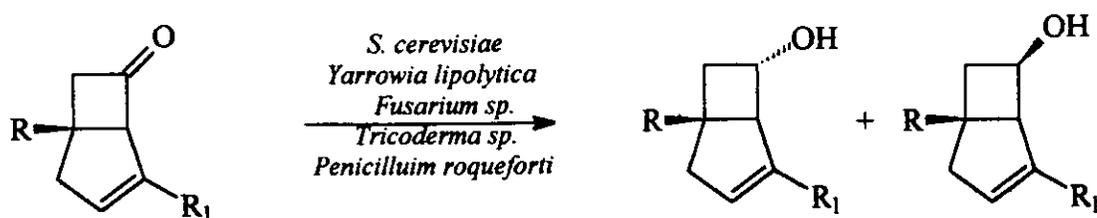


Fig. 30 biorreducción del biciclo-hept-3-en-6-ona metilsustituída utilizando *S. cerevisiae*

La biorreducción de 2-(2-nitroetil)ciclohexanona da los correspondientes nitroalcoholes con buenos rendimientos y con un alto grado de exceso enantiomérico. Una vez obtenidos estos compuestos se hace la protección del grupo hidroxilo con DHP (dihidrofurano), seguido por la oxidación del grupo nitrometilénico en un medio básico, para dar las γ -lactonas, posteriormente a la desprotección del grupo y la ciclización⁵⁵ (fig. 31).

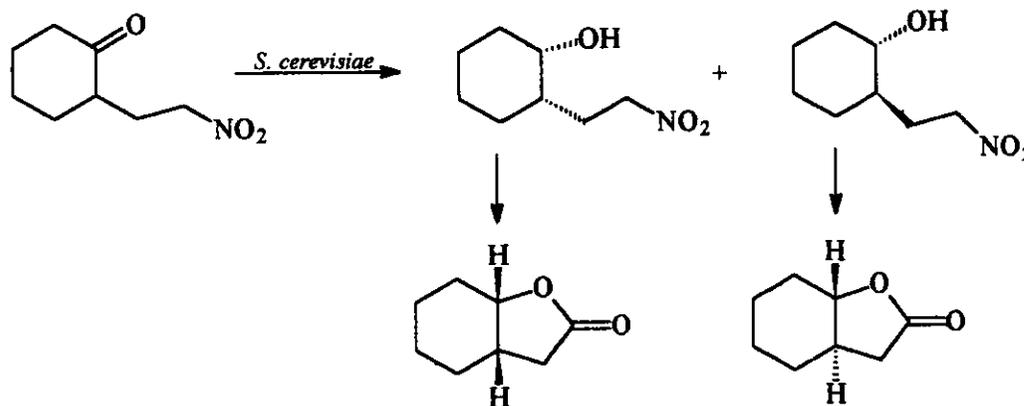


Fig. 31 Biorreducción de 2-(2-nitroetil)ciclohexanona a sus nitroalcoholes

El β -metil- γ -oxo-cronato de etilo puede captar una unidad C_2 originado de la descarboxilación del piruvato dando su correspondiente diol con un rendimiento del 35%⁵⁶ (fig. 32).

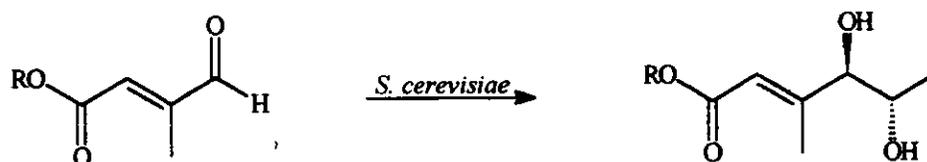


Fig. 32 Adición de una unidad C_2 al β -metil- γ -oxo-cronato de etilo con *S. cerevisiae*

La biorreducción de 2-metil-3-oxobutanoato demuestra una alta diastereoselectividad cuando el grupo R es $n\text{-C}_8\text{H}_{17}$ y baja diastereoselectividad cuando el grupo R es $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (fig. 33).

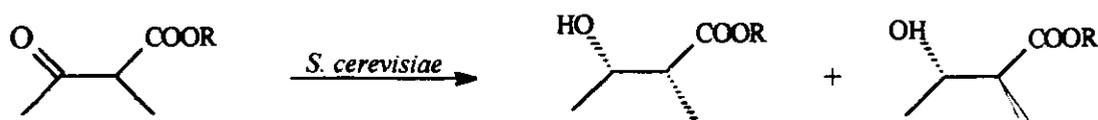


Fig. 33 Biorreducción del 2-metil-3-oxobutanoato

S. cerevisiae también realiza la conversión biocatalítica de 17-cetoesteroides, como en la conversión de andros-4-ene-3,17-diona a testosterona. Otro ejemplo es la reducción de la cetopantoil lactona a pantoil lactona teniendo un rendimiento del 90-93 %⁵⁶ (fig. 34).

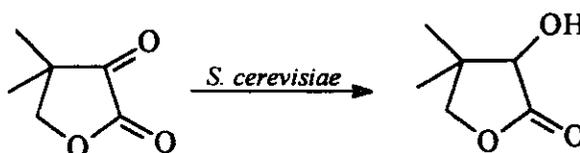


Fig. 34 Biorreducción de cetolactonas.

La biotransformación de aldehídos como el benzaldehído a alcohol bencílico con un rendimiento del 50% y la condensación del acetaldehído y benzaldehído resultando en el L-fenilacetilcarbinol son otras reacciones catalizadas por *S. cerevisiae*. A su vez, la biotransformación del 2'-bromoacetofenona a su S-alcohol enantioméricamente puro con un rendimiento del 70%⁵⁷ (fig. 35)

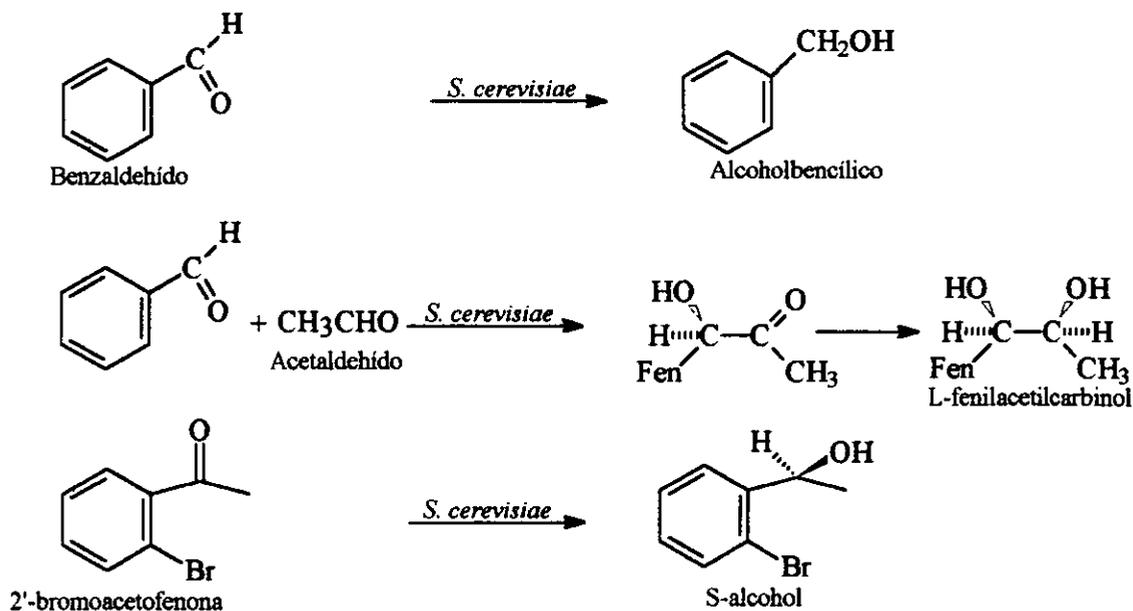


Fig.35 Biotransformación de aldehídos y cetonas con *S. cerevisiae*

Otra transformación de grupo funcionales catalizada por *S. cerevisiae* es la reducción de dobles enlaces C=C, C=O. Como regla los dobles enlaces necesitan ser activados por un grupo electroattractor para tener buenos rendimientos.³⁶

El (R)-(+)-citronelol se obtuvo de la reducción del geraniol producto de una reacción de adición de Michael llevándose a cabo con células inmovilizadas (fig. 36).



Fig. 36 Obtención de (R)-(+)-citronelol a partir de una adición de Michael con *S. cerevisiae*

La ribitilamina, un intermediario de la riboflavina, se sintetizó mediante la biorreducción del 1-desoxi-1-(2-amino-4,5-dimetil)-anilino-D-ribitol utilizando *S. cerevisiae*. Otras reacciones llevadas a cabo por este mismo método son la biotransformación del 1-desoxi-1-*p*-toluidin-D-fructosa dando la *p*-toluidina⁵⁸ (fig. 37).

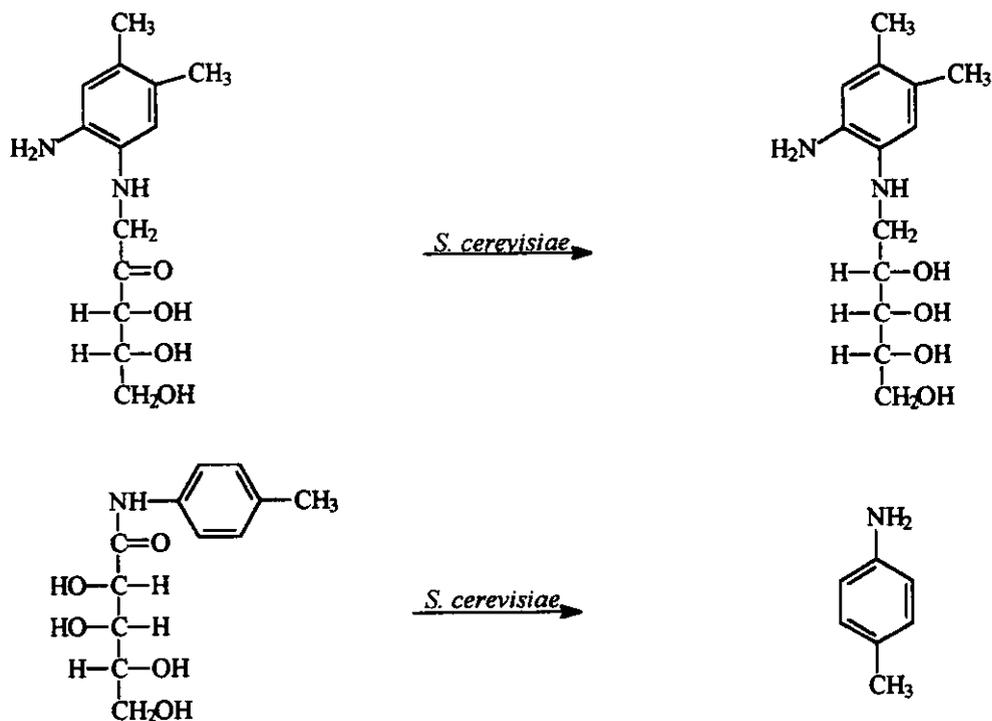


Fig. 37 Obtención de la ribitilamina y *p*-toluidina con *S. cerevisiae*

La reducción biocatalítica empleando *S. cerevisiae* se ha extendido a la síntesis quimioselectiva de DNA-enlazado a pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina (PBD) de antibióticos, antitumorales, etc.

Aunque los PBDs con una amina secundaria o amida funcional en N₍₁₀₎-C₍₁₁₎ ya se sintetizan, la introducción de una imina o amino alcohol en esta posición es problemática debido a la reactividad de estos grupos funcionales. El estudio inicial se realizó con el éster metil(2S)-N-(2-nitrobenzoyl)pirrolidina-2-carboxilato, que se hizo reaccionar con NaN₃ dando la azida derivada, se biotransformó con *S. cerevisiae*, obteniendo el PB en rendimientos cuantitativos⁵⁹ (Fig. 38).

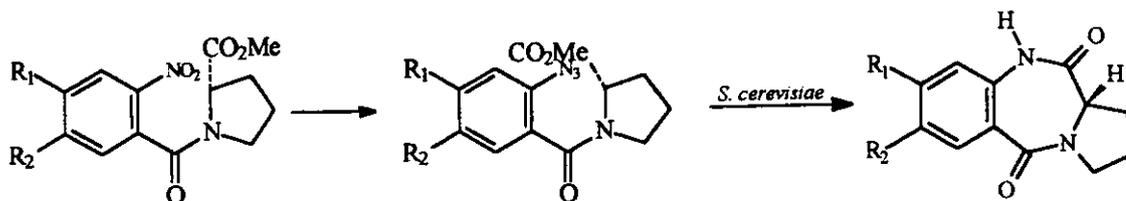


Fig. 38 Síntesis quimioselectiva de pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina

Kakulapati y colaboradores reportan por primera vez la reacción de Diels-Alder realizada con *S. cerevisiae* al transformar la piridazinona con dietil azodicarboxilato⁶⁰ (fig. 39).

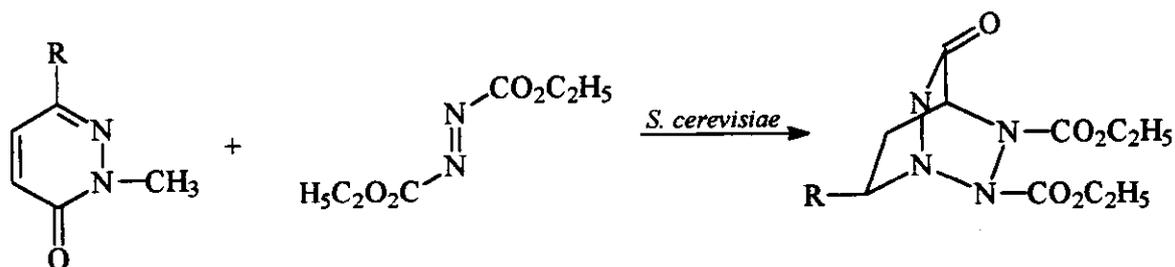


Fig. 39 Reacción de Diels-Alder realizada con *S. cerevisiae*

Por su parte Stewart y colaboradores⁶¹ fueron los primeros en investigar la oxidación Baeyer-Villiger biocatalizada con *S. cerevisiae* (modificada genéticamente) a partir de la ciclohexanona para dar la hexano-6-lactona (fig. 40).



Fig. 40 Reacción de Baeyer-Villiger biocatalizada con *S. cerevisiae*

La biooxidación del metil-*para*-tolilsulfuro a su correspondiente (R)-sulfóxido utilizando levaduras de pan, se realizó con células enteras teniendo un rendimiento del 60% y un ee del 92%. El

sulfóxido quiral ((R)-metil-*para*-tolilsulfóxido) obtenido de esta forma se utilizó como un auxiliar en la síntesis de intermediarios en la preparación de agentes hipocolestémicos como el ácido mevalónico⁶² (Fig. 41).

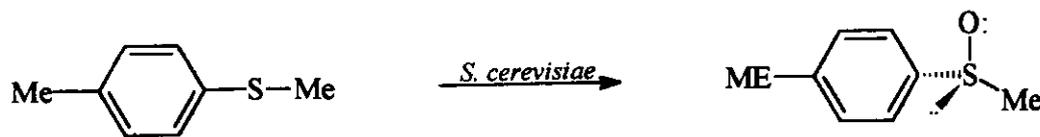


Fig. 41 Biotransformación del metil-*para*-tolilsulfuro a su (R)-metil-*para*-tolilsulfóxido

La reducción del 5-acil-1,2,4-triazinas o sus oximas da como resultado la obtención de alcoholes quirales (S-isómeros), cuando se realiza con *S. cerevisiae*⁶⁵ (fig. 42).

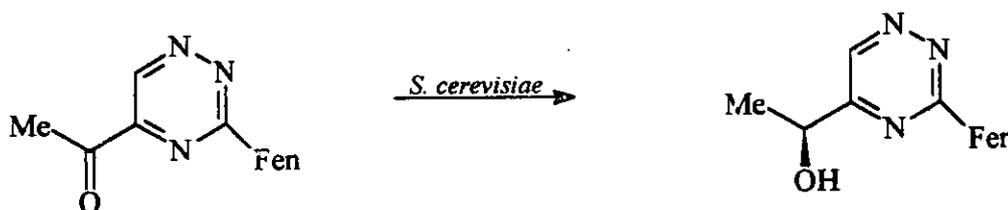


Fig. 42 Biorreducción de 5-acil-1,2,4-triazina a su alcohol quiral

La capacidad de *S. cerevisiae* para efectuar la reducción de grupos nitroaromáticos, se reportó por primera vez hace 80 años y salvo algunos artículos recientes, se conoce poco de este tipo de biotransformaciones.⁶³

Los nitrocompuestos orgánicos son importantes intermediarios porque se pueden convertir fácilmente a aminas, anilinas, carbonilos e hidrocarburos, así los nitrocompuestos ópticamente activos se pueden utilizar como bloques de construcción quiral para la síntesis asimétrica. Algunos ejemplos de biotransformaciones de nitrocompuestos se presentan a continuación.

El uso de nitroalcoholes quirales como precursores para la síntesis de heterociclos permite extender la reducción de *S. cerevisiae* para diferentes γ -nitrocetonas proquirales aromáticas y alifáticas. En particular, la biorreducción de nitrocetonas para obtener nitroalcoholes para la síntesis de heterociclos quirales a través de la manipulación de grupos nitro.⁶⁴

La exposición del 2-nitrobenzonitrilo con *S. cerevisiae* es biotransformado a la 2-cianoanilina. Sin embargo, Davey y colaboradores⁶³ aislaron como producto primordial la 2-aminobenzamida y solamente una pequeña parte de la anilina. Extendiendo los tiempos de reacción lograron obtener la 2-metil-2,3-dihidro-(1H)-quinazolin-4-ona, resultando de la reacción de la 2-aminobenzamida

con derivados del acetaldehído que surgen de la oxidación del etanol utilizado como disolvente. El mecanismo de bioconversión de estos productos propuesta por este grupo es el siguiente (fig. 43):

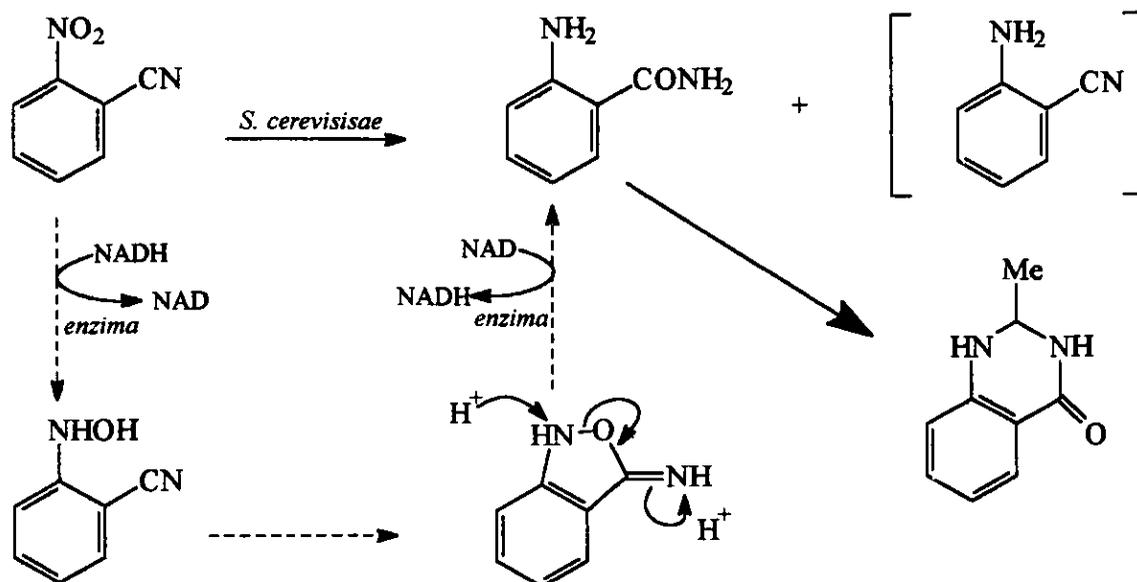


Fig. 43 Mecanismo de reacción propuesto por Davey para la biotransformación de 2-nitrobenzonitrilo.

Baik y colaboradores^{66, 67}, reportan la reducción rápida, simple y selectiva de compuestos nitroaromáticos (nitroarenos halógeno sustituidos) a sus correspondientes amino derivados utilizando levadura de pan en una solución básica como biocatalizador. Las ventajas de este método según el investigador son: la reducción selectiva de nitrocompuestos aromáticos en presencia de otros grupos reducibles, una reacción rápida, uso de pequeñas cantidades del biocatalizador, y altos rendimientos de las anilinas sustituidas (fig. 44).

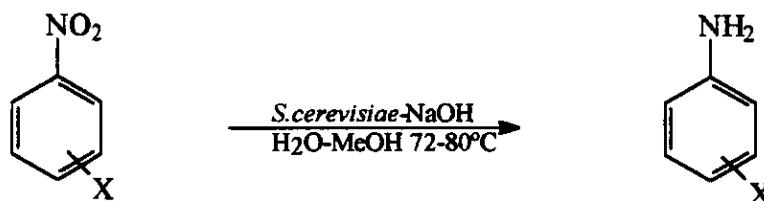


Fig. 44 Biotransformación de nitrocompuestos aromáticos propuesta por Baik.

Este mismo autor en 1995⁶⁸ reporta la bio-reducción selectiva de compuestos nitrosoaromáticos a sus correspondientes anilinas utilizando a *S. cerevisiae* como agente reductor. El nitrosobenceno al ser tratado con el biocatalizador en una solución acuosa con metanol a 80°C durante 8 horas da la anilina correspondiente con altos rendimientos, descubriendo la formación de un intermediario,

el azoxibenceno (fig. 45).

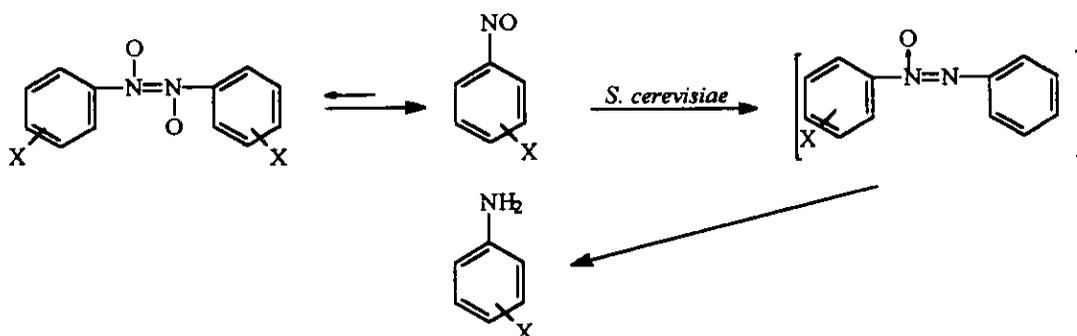


Fig. 45 Descubrimiento del intermediario azobenceno en la obtención de anilina

El grupo de trabajo de Baik⁶⁹ llevó a cabo la desoxigenación de una serie de compuestos N-óxido aromáticos y heteroaromáticos, variando el ambiente químico. Cuando se obtiene el azoxibenceno es tratado con *S. cerevisiae* y NaOH, en etanol y agua a reflujo, resultando el azobenceno exclusivamente. En la mayoría de los casos, la completa reducción de azoxibenceno a anilinas se observó en pocas cantidades. Otro reactivo que respondió a este tratamiento fue la quinolina N-óxido dando lugar a las quinolinas con un alto rendimiento químico (fig. 46).

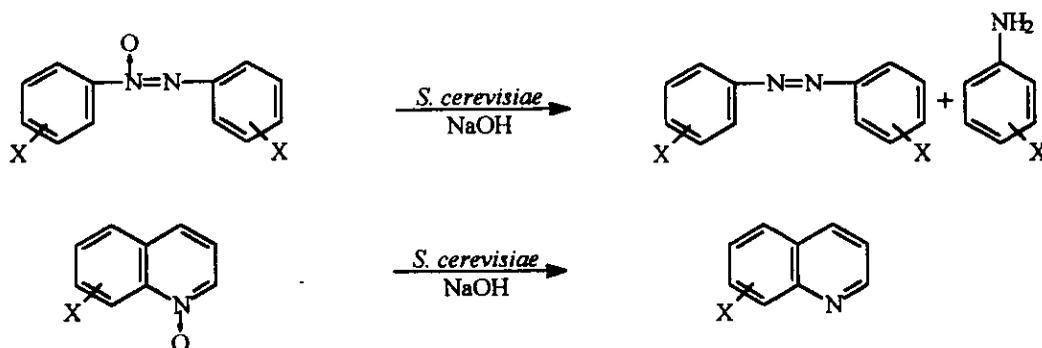


Fig. 46 Desoxigenación reductiva del azoxibenceno y quinolina N-óxido por *S. cerevisiae*-NaOH

El 2-nitrocinamaldehído da la quinolina N-óxido en un 91 % cuando es biotransformada por *S. cerevisiae* en un medio básico, pero en esta reacción no se observa la reducción a *o*-aminocinamaldehído ni a su alcohol⁷⁰ (Fig. 47).

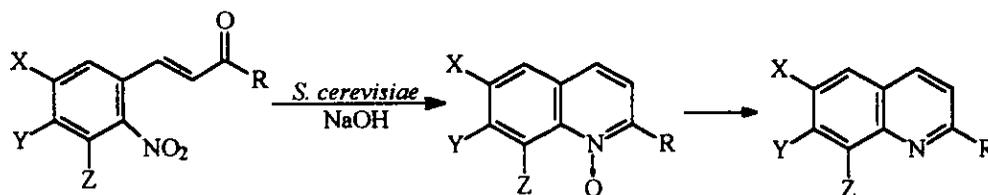


Fig. 47 Biorreducción del 2-nitrocinamaldehído con *S. cerevisiae* en un medio básico.

Takeshita y colaboradores,^{71, 72, 73} reportan el efecto del sustituyente en la reducción de compuestos nitroaromáticos en un anillo de benceno. Tal es el caso de los *orto*- o *para*-acilnitrobenzenos, que después de 72-108 hrs a 32-33 °C dan las aminocetonas correspondientes, sobre los nitroalcoholes (fig. 48).

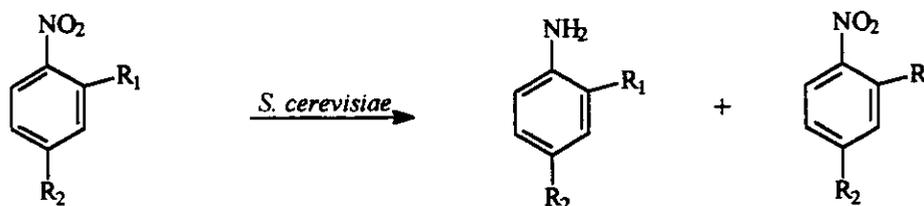


Fig. 48 Biotransformación del *orto*- o *para*-acilnitrobenzeno con *S. cerevisiae*.

Ohta y colaboradores,⁷⁴ han demostrado que *S. cerevisiae*, tiene la capacidad de hidrogenar enlaces carbono-carbono deficientes de electrones como en la biohidrogenación asimétrica de nitroolefinas, pero esta reacción sólo se lleva a cabo en la posición α . La incubación de nitroolefinas con *S. cerevisiae* da el 1-nitro-2-fenilpropano con rendimientos moderados (fig. 49).

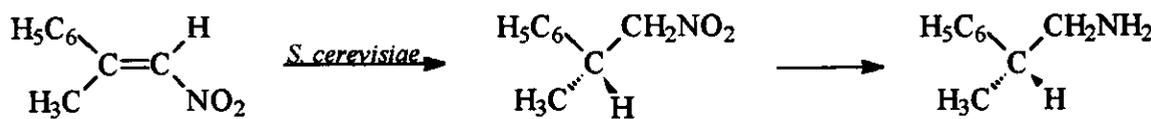


Fig. 49 Biohidrogenación asimétrica de nitroolefinas con *S. cerevisiae*.

Poca atención se ha puesto en la preparación de heterociclos utilizando *S. cerevisiae* y Navarro-Ocaña¹¹⁸ reporta en 1996 la reducción de (*Z*)-3-alkuil-3-nitro-2-fenilpropenonitrilos con *S. cerevisiae* para obtener los isoxazoles correspondientes, siendo esta la primera vez que se obtienen este tipo de compuestos mediante una biotransformación con microorganismos (fig 50).

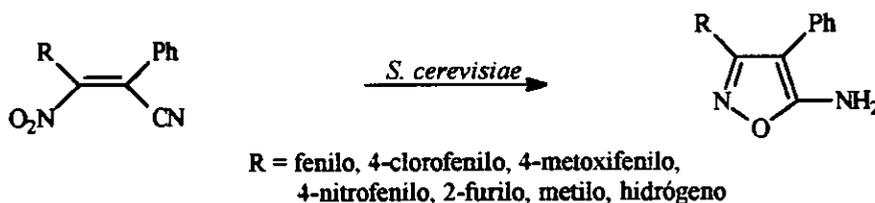


Fig. 50 Biotransformación de nitropropenonitrilos a sus isoxazoles

Takeshita y colaboradores,⁷⁵ reportan la reducción quimioselectiva de nitroalquenos heteroaromáticos con *S. cerevisiae*. Como lo muestran en la reducción de derivados de *E*- β -nitroestireno dando los nitroalcanos correspondientes (fig. 51).

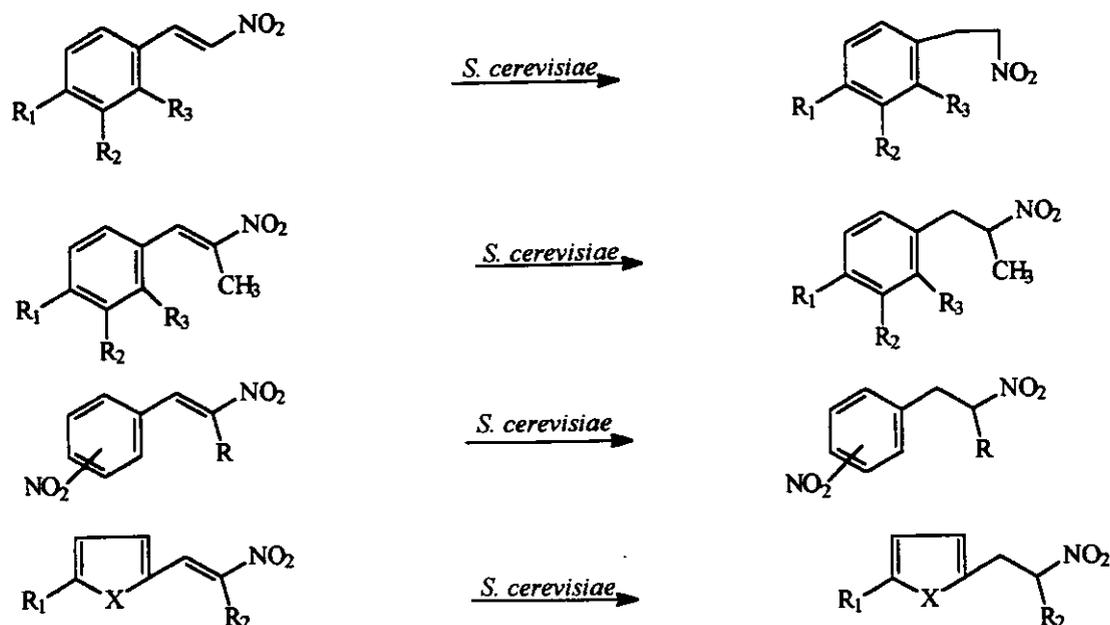


Fig. 51 Biorreducción de *E*-nitrostirenos con *S. cerevisiae*.

El grupo de McAnda⁷⁶ ha estudiado también las biorreducciones de nitrostirenos utilizando las levaduras tanto en medios acuoso y orgánico, en todos los casos, la biorreducción de este compuesto con sustituyentes en la posición β dan productos racémicos, mientras que se observa una reducción estereoselectiva en nitrostirenos α -sustituídos. Para realizar estas investigaciones han elaborado las biotransformaciones con sustratos deuterados o trititados, para así observar el mecanismo de reacción.

2.4.- Síntesis de los nitroalquenonitrilos

Los productos nitrados son escasos como material biológico, y la actividad que se les conoce es: bactericida, fungicida, herbicida o de defensa contra insectos.⁷⁷ Por otro lado los compuestos nitrados tienen una gran importancia en el área industrial, principalmente aquellos que incluyen anillos aromáticos que se utilizan en la fabricación de colorantes, fármacos y agroquímicos.⁷⁸

Los compuestos nitrados alifáticos son muy importantes para la síntesis de moléculas más complejas, pudiéndose preparar por varias rutas, se pueden interconvertir en casi todos los grupos funcionales y además pueden formar enlaces carbono-carbono en una gran variedad de formas.⁷⁹

La preparación de los nitroalquenonitrilos ha sido poco estudiada y el método más común consiste en la nitración de alquenos con óxidos de nitrógeno o agentes nitrantes derivados de éste.

El 3-nitropropenenitrilo se preparó por la nitración con cloruro de nitrosilo (NOCl) para formar primero el cloronitroalcano, el cual por tratamiento con acetato de sodio forma el 3-nitropropenenitrilo⁸⁰ (fig. 52).

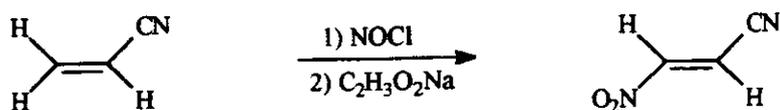


Fig. 52 Nitración del acrilonitrilo con cloruro de nitrosilo

Los 3-nitro-3-alkil-2-arylpropenenitrilos sustituidos son otro tipo de nitroalquenos que se pueden sintetizar a partir de los 3-alkil-2-arylpropenenitrilos⁸¹ mediante la nitración con dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2=\text{N}_2\text{O}_4$) a -5°C .

Otros compuestos que contienen la estructura de los 3-nitropropenenitrilos son los 2-nitro-1-benzonitrilos sustituidos que se han preparado ya sea por la nitración directa de los benconitrilos o por la adición del ion cianuro a compuestos heterocíclicos nitrados⁸² (fig. 53).

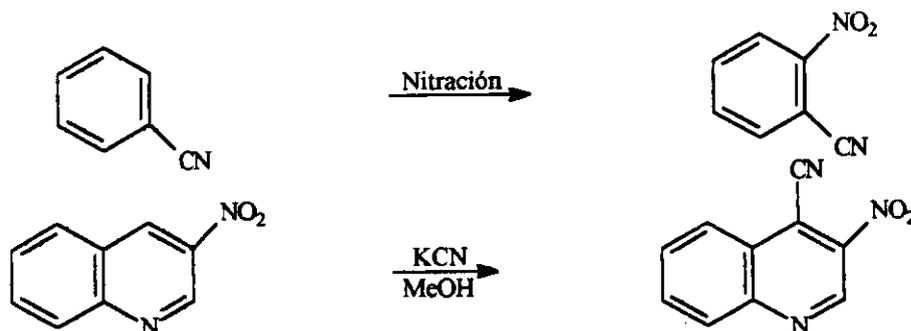


Fig. 53 Preparación de 1,2-cianonitrilos

De forma general podemos mencionar que los usos más importantes de los 3-nitropropenenitrilos incluyen la preparación de 5-aminoisoxazoles,⁸³ pirazolinás,⁸⁴ β -lactamas,⁸⁵ isoxazolidinas.⁸⁶ Otros compuestos que se han preparado son los heterociclos oxazinomicina,⁸⁷ y 3 alquilpiridinas⁸⁸ (fig. 54).

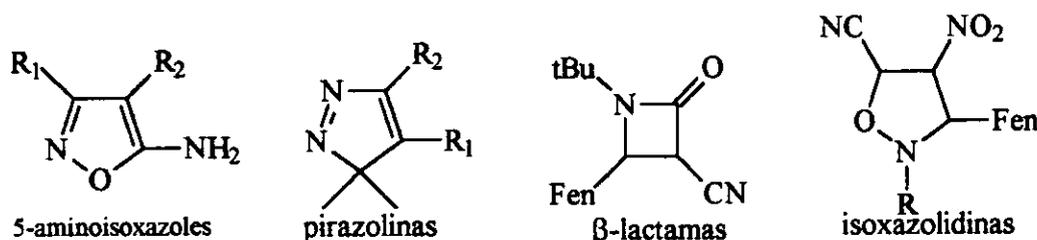


Fig. 54 Usos de los 3-nitropropenenitrilos

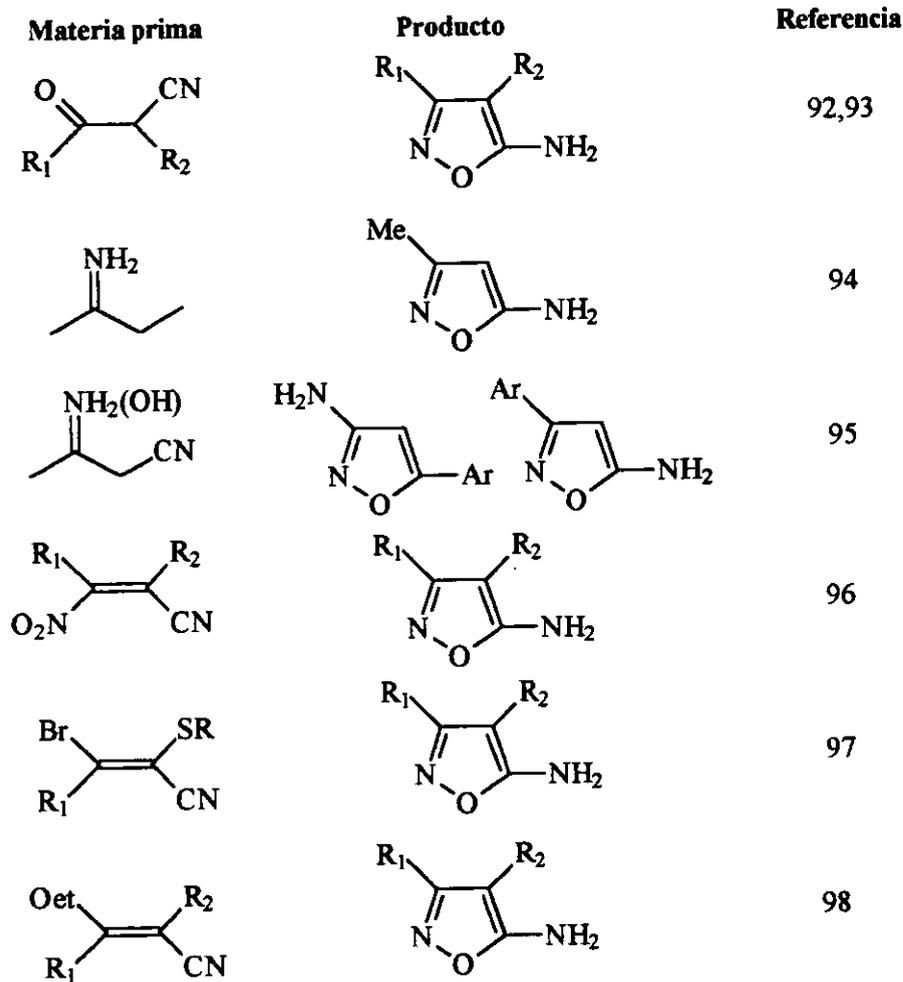


Fig. 56 Síntesis de 5-aminoisoxazoles por oximación de nitrilos

Otros de los métodos para la síntesis de 5-aminoisoxazoles es mediante la reacción de cicloadición

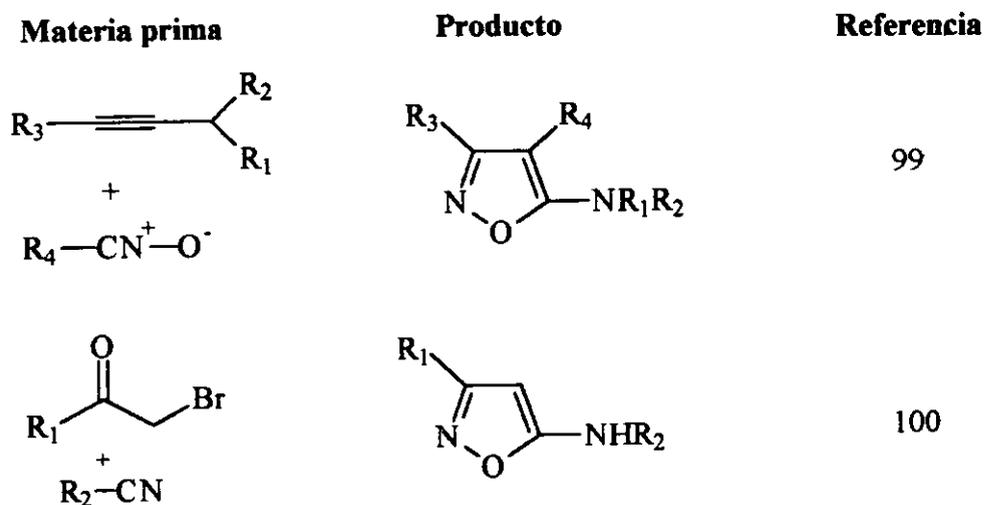


Fig. 57 5-aminoisoxazoles obtenidos por reacciones de cicloadición.

La modificación del anillo de los isoxazoles permite proveer de materias primas para la síntesis de moléculas complejas. Los isoxazoles son importantes porque existen métodos sencillos y eficientes para prepararlos, pueden ser modificados convenientemente a otras estructuras más simples pero muy funcionalizadas y la presencia de sustituyentes adecuados hacen que el anillo se conserve en una gran variedad de condiciones de reacción, mientras que otras partes de la molécula se puedan modificar con cierta facilidad. En este sentido la labilidad nitrógeno-oxígeno a las reducciones químicas o catalíticas permite obtener otras funcionalizaciones.

La reacción que más se ha estudiado para hacer útiles a los isoxazoles es la de apertura, que se ha hecho tanto en forma química, térmica o fotoquímica. Hoy en día no se dispone de un método general para la apertura directa de los 5-aminoisoxazoles; sin embargo, en los últimos años estos se han empleado quizá de manera no tan intensiva como los isoxazoles sustituidos, en la preparación de algunos grupos de moléculas importantes.

El uso más común de los 5-aminoisoxazoles es en la preparación de 1-azirinas sustituidas o de sus derivados empleados como materias primas para la síntesis de las aziridinas las cuales tienen importantes propiedades biológicas.¹⁰¹

Los 5-aminoisoxazoles se transforman de manera térmica o fotoquímica a las 2-carboxamidas-2H-azirinas, tanto sustituidos como libres, bajo condiciones controladas¹⁰² (fig. 58).

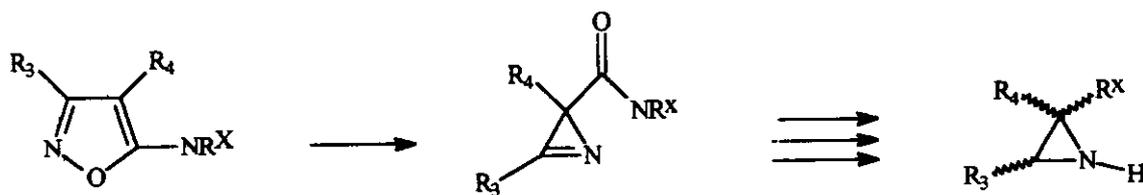


Fig. 58 Transformación térmica y fotoquímica de 5-aminoisoxazoles

Otros estudios que se han hecho con los 5-aminoisoxazoles son los siguientes (fig. 59):

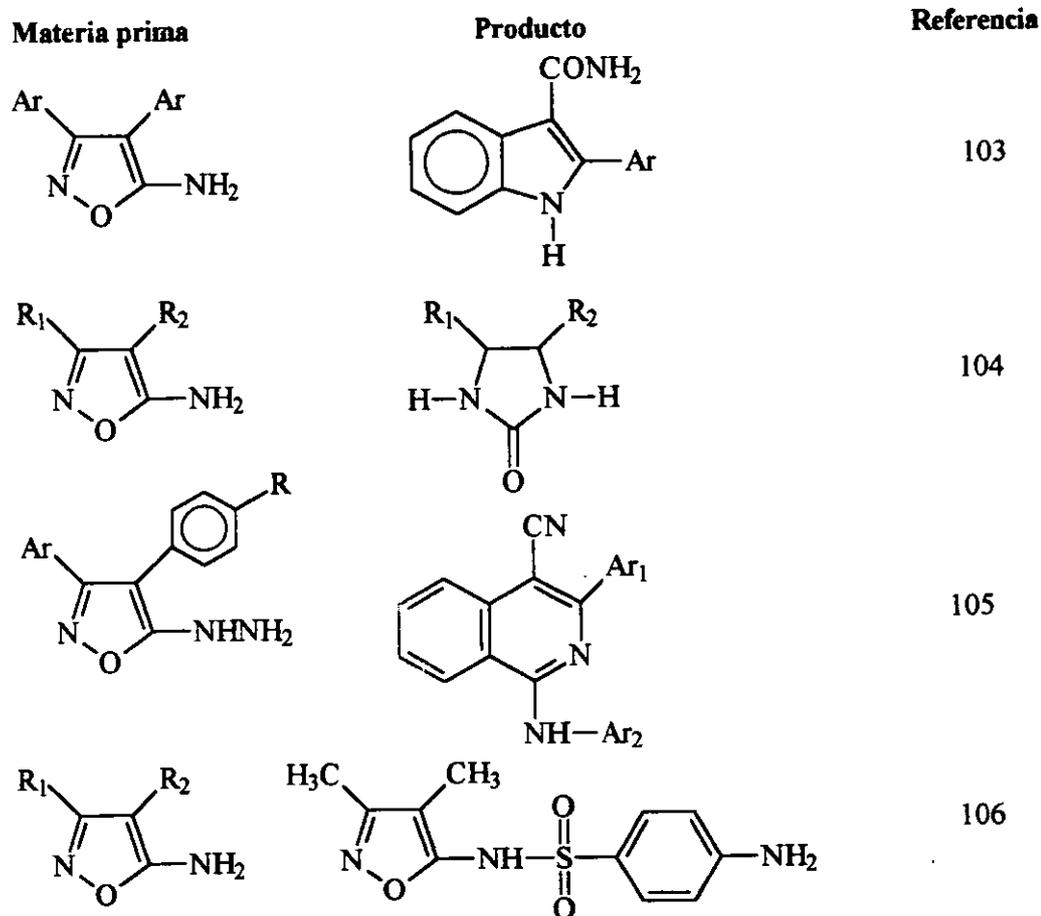


Fig. 59 Síntesis con 5-aminoisoxazoles

De toda la literatura consultada para preparar 5-aminoisoxazoles y su empleo como materias primas para la síntesis de otras moléculas, encontramos que todos los métodos se basan en procesos químicos y ninguno en métodos biocatalíticos. Por lo que el presente trabajo ofrece la oportunidad de desarrollar y difundir la utilización de biocatalizadores para la síntesis de este tipo de compuestos.

2.6.- Preparación y utilización de oximas

Las oximas son un importante grupo funcional comúnmente usadas para proteger al grupo carbonilo e intermediarios en la reacción de Beckman. Hay dos procedimientos generales para su preparación: el primero hace uso de un grupo carbonilo (aldehído o cetona) y el segundo de un compuesto no carbonilo. Este último generalmente es un compuesto nitrado (nitroso o nitro) el cual puede estar o no saturado.¹⁰⁷

Los procedimientos para la síntesis de oximas están bien establecidos y existen numerosas revisiones que describen ampliamente estos métodos.¹⁰⁸ No obstante, no se ha desarrollado la utilización de 3-nitropropenonitrilos ó 5-aminoisoxazoles para su síntesis.

Por décadas, las oximas y cetonas, sirven para preparar amidas cíclicas o alicíclicas,¹⁰⁹ así como en la determinación cuantitativa de grupos carbonilos¹⁰⁸ como intermediarios en la transposición de Beckman, síntesis de heterociclos y reacciones de Neber.¹⁰⁵

Pero a pesar de todas estas rutas de síntesis de oximas no se ha descrito ninguna que utilice los 5-aminoisoxazoles o los 3-nitropropenonitrilos con algún tipo de biocatalizador como *Saccharomyces cerevisiae*.

2.7.- Importancia de los nitroalquenonitrilos, 5-aminoisoxazoles y oximas

Los compuestos nitroalquenonitrilos alifáticos son escasos como productos naturales, encontrándose únicamente en angiospermas como las leguminosas. La actividad biológica de los pocos compuestos que se conocen son como bactericidas, fungicidas, herbicidas, o compuestos de defensa contra insectos.

A pesar de su presencia limitada en la naturaleza, son un grupo importante de compuestos orgánicos en diferentes industrias. Por ejemplo en la industria farmacéutica se emplean por sus propiedades fisiológicas, como en los antibióticos: nistatina y griseofulvina que son los más potentes que se conocen además de ser compuestos nitrados α, β -no saturados.

También tienen aplicaciones en la industria espacial (propelentes), militar (explosivos), alimentación (colorantes), farmacéutica (antitumorales, antivirales, bactericidas, citotóxicos, fungicidas, herbicidas, nematocidas, etc.)

A los isoxazoles se les han encontrado diferentes usos en medicina, agricultura y química cuantitativa, se han empleado como alucinógenos y para el estudio de los mecanismos de la interacción con el sistema nervioso central. De igual manera, se ha encontrado que inhiben la diferenciación en células tumorales. Sus derivados son usados para mejorar la fluorescencia en el estudio de las membranas, así como relajantes musculares, y para el tratamiento de la hipercolesteremia, arterioesclerosis e hiperlipidemia.

Los isoxazoles sustituidos se han utilizado como insecticidas y para la conservación de semillas como la de *Avena fatua*.

3.- Objetivos.

3.1.- Objetivo general.

Dando continuidad a los estudios realizados por Navarro-Ocaña, el presente trabajo tiene como objetivo principal el usar a la levadura de pan *S. cerevisiae* como biocatalizador para preparar las oximas a partir de los nitroalquenos y 5-aminoisoxazoles preparados *in situ* en un medio acuoso y en un medio orgánico.

3.2.- Objetivos particulares

- Optimizar la preparación de los nitroalquenos: (Z)-3-nitropropenonitrilos sustituidos.
- Utilizar a *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalizador para biotransformar los (Z)-3-nitropropenonitrilos sustituidos a sus isoxazoles correspondientes en medios acuoso y orgánico.
- Realizar la bioapertura de los isoxazoles a sus oximas en medios acuoso y orgánico.
- Definir las principales condiciones fisicoquímicas del medio para la biotransformación en medios acuoso y orgánico.

4.- Material y métodos

Las biotransformaciones se efectuaron en un equipo Innova 4330 con agitación constante y un agitador orbital. Las biorreducciones fueron seguidas por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios ALUGRAMSILG-UV254 de 0.25 mm de espesor. Se utilizaron como reveladores luz ultravioleta y solución de sulfato cérico al 1% en H₂SO₄ 2N.

Los productos se purificaron por cristalización y cromatografía. Para las cromatografías en columna se utilizó gel de sílice 60 MERCK (35-70 mallas ASTM). Las cromatografías de placa preparativa se efectuaron en cromatoplasmas de gel de sílice 60F-254 de 2 mm de espesor. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher Johns y no están corregidos.

Los rendimientos se reportan del material purificado y pesado.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN H¹) se determinaron en los espectrómetros Varian Gemini-200 y Varian VXR-300s, empleando CDCl₃ y DMSO-d₆ como disolventes.

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

Los espectros de Infrarrojo (IR) se llevaron a cabo en los espectrofotómetros PERKIN-ELMER 283 y NICOLET FT-IR 55X.

Los desplazamientos químicos se dan en ppm asignándoseles las siguientes abreviaturas: s=singulete, d=doblete, dd=doble doblete, t=triplete, m=multiplete y sextuplete, am=amplia. Las constantes de acoplamiento están dadas en Hertz (Hz).

El material biológico utilizado en las biotransformaciones fue la levadura de pan, *Saccharomyces cerevisiae* de dos tipos:

1. *S cerevisiae* tipo II de ALDRICH
2. *S cerevisiae* comercial, Saf-Instant, SAF Products Corporation, Mineapolis, MN. 55415

Finalmente, se decidió utilizar el segundo tipo de levadura ya que no cambiaron de forma significativa los rendimientos y era de menor costo.

La ruta general de síntesis a seguir es la siguiente (fig. 60):

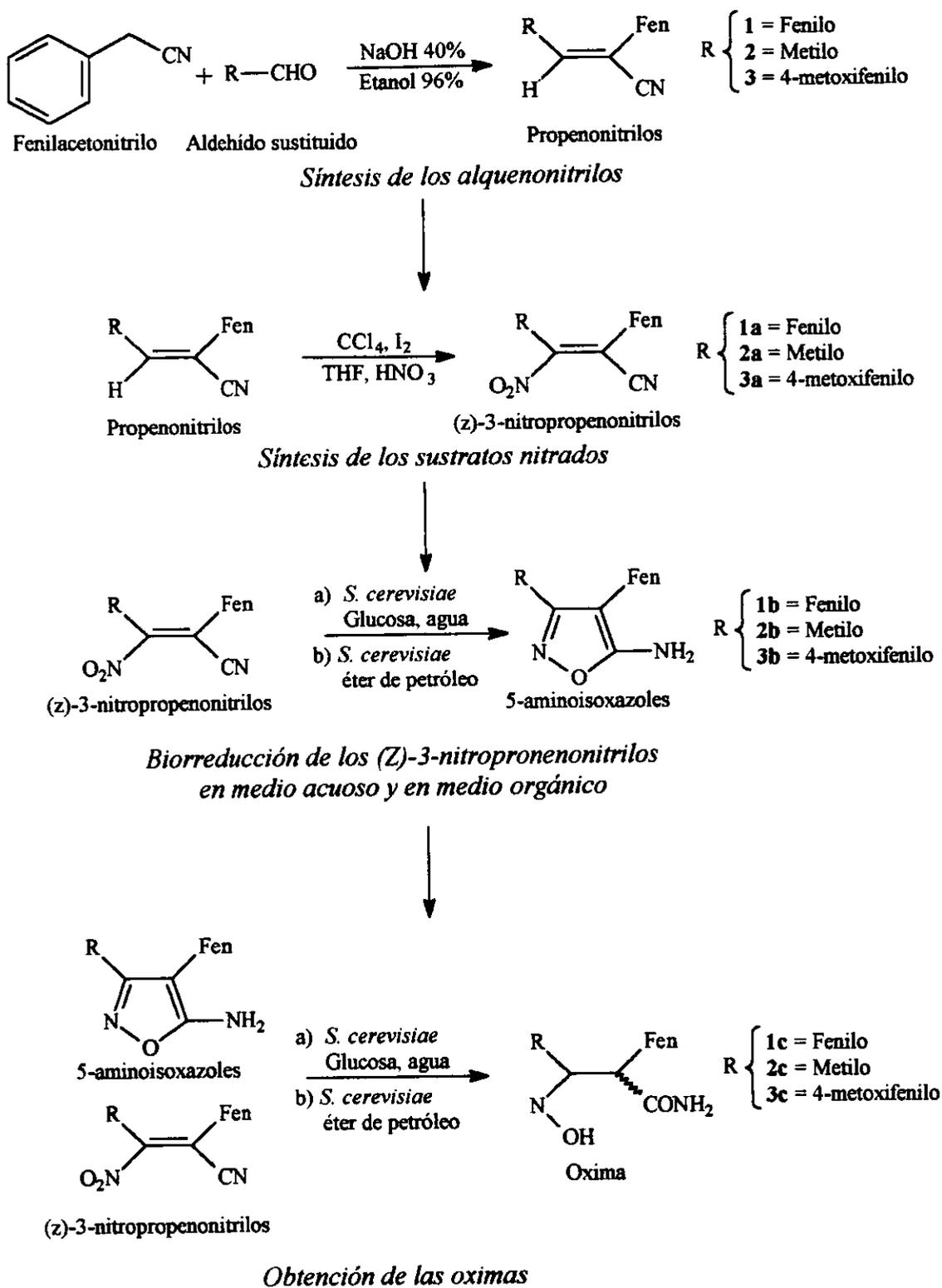


Fig. 60 Ruta de síntesis propuesta

4.1.- Síntesis de los alquenonitrilos

4.1.1.- Procedimiento general para la preparación de los 2-fenil-3-aryl o alquil propenonitrilos.

Se prepararon mediante la reacción del fenilacetnitrilo con el benzaldehído sustituido correspondiente, catalizándolo con una base (hidróxido, etóxido o metóxido de sodio).

4.1.2.- Preparación del (Z)-2,3-difenilpropenonitrilo (1)

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se colocaron 6.36 g (60 mmol) de benzaldehído y 7.02 g (60 mmol) de fenilacetnitrilo junto con 40 mL de etanol al 95 %. A esta mezcla se le adicionó lentamente, y con agitación vigorosa, 3.0 mL de NaOH al 40% se continuó la agitación hasta la solidificación completa.

Se colectó el sólido por filtración al vacío, lavando con 12 mL de agua helada y 3 mL de etanol frío. Posteriormente, se recristalizó en etanol al 80% evaporándose parte del disolvente hasta la saturación. Al enfriarse se obtuvieron 9.96 g (80.62%) de cristales blancos, con un punto de fusión de 85-87 °C y un $R_f = 0.415$ en hexano:acetato de etilo 9:1 Todos los datos espectroscópicos concuerdan con los publicados.

4.1.3.- Preparación del (Z)-2-fenil-2-butenonitrilo (2)

A una solución de fenilacetnitrilo 31.86 g (272 mmol), 50 g de etanol absoluto y 17.60 g (400 mmol) de acetaldehído a -5 °C se le agregó lentamente 3.0 mL de etóxido de sodio al 20% recién preparado, cuidando que la temperatura no rebasara los 0 °C. La solución amarillo-rojiza que se formó se deja en refrigeración a 0 °C por un día. Transcurrido el tiempo se le adicionaron 2.0 g de acetaldehído y se congela a 4 °C por 16 horas.

Una vez hecho lo anterior se le agregó 60 mL de agua a la mezcla, la capa aceitosa se separó y se lavó con otros 60 mL de agua, dicha capa con un poco de olor se destiló dando 28.08 g (71.80%). El aceite destilado es incoloro, pero puede ponerse amarillento, por lo que se recomienda guardarlo en un frasco ámbar ya que se descompone con la luz, ebulle a 244 °C con un $R_f = 0.66$ en hexano: acetato de etilo 8:2, los datos espectroscópicos concuerdan con los publicados¹¹⁷.

4.1.4.- Preparación del (Z)-2-fenil-3-(4-metoxifenil)propenitrilo (3)

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 9.97 g (60 mmol) de 4-metoxibenzaldehído, 7.04 g (60 mmol) de fenilacetnitrilo con 40 mL de etanol al 95 %. A esta mezcla se le adicionó poco a poco y con agitación vigorosa 4 mL de hidróxido de sodio al 40% continuando con la agitación hasta que se forme un sólido. Posteriormente se colectó el sólido por filtración con vacío; se lavó con 15 mL de agua helada y 5 mL de etanol frío. El sólido se recrystalizó en etanol al 80%, se evaporó el disolvente hasta saturación y al enfriarse se obtuvieron 11.35 g (80.43%) con un punto de fusión de 93-95 °C y un $R_f = 0.372$ en hexano:acetato de etilo 8:2.

4.2.- Síntesis de los sustratos nitrados

Todos los (Z)-3-nitro-2-fenil-3-aryl o alquil propenitrilos se sintetizaron mediante la nitración con óxidos de nitrógeno (NO_x), como ejemplo de este procedimiento es la síntesis del (Z)-3-nitro-2,3-difenilpropenitrilo (1a).

En un matraz bola de 250 mL se colocaron 2.05 g (10 mmol) de 1 disuelto en 50 mL de tetracloruro de carbono; a esta solución se le adicionaron 0.2 g de Iodo como catalizador, se agitó y enfrió a 0 °C. Se le añadieron los gases nitrantes que se prepararon de la siguiente manera:

En un matraz bola de 500 mL, se colocaron 5 mL de THF y se adicionaron lentamente 10 mL de HNO_3 al 75%. Esta operación se repitió varias veces. Los gases nitrantes (NO_x) así obtenidos se burbujearon lentamente con agitación continua en el matraz de reacción hasta saturación de la solución (10-15 min.). La reacción se mantuvo así hasta la transformación total del reactivo, lo cual se comprobó por cromatografía en capa fina. Finalmente se procedió a la purificación del producto obtenido. A la mezcla de reacción se le adicionaron 100 mL de tiosulfato de sodio al 20% para la eliminación del Iodo; se separó la fase orgánica de la acuosa y el disolvente orgánico se concentró en un rotavapor, el residuo se disolvió en etanol caliente, se concentró hasta obtener una solución saturada que se enfrió cristalizando así el producto nitrado. Por otra parte a la fase acuosa se le hicieron 3 extracciones con 50 mL de acetato de etilo, las cuales se concentraron y el residuo también se recrystalizó en etanol caliente. Se obtuvieron 1.78 g (70.95%) de cristales en forma de agujas de color amarillo canario con un p.f. 94-96 °C y con un $R_f = 0.465$ en hexano:acetato de etilo 8:2.

Datos espectroscópicos para 1a:

IR (cm^{-1}) 3061, 2931, 2220, 1591, 1543, 1332

EM m/z (intensidad relativa) 250 (M^+ , 18), 204(100), 203(84), 176 (60)

RMN¹H 7.40 (br,s,10H)

Para la obtención del (Z)-3-nitro-2-fenil-2-butenonitrilo (**2a**) se utilizó **2** como sustrato inicial y se obtuvieron 3.65 g (64.71%). Esto a partir de 5.0 g (30 mmol) de **2**, 0.2 g de Iodo, y 50 mL de tetracloruro de carbono. Teniendo un p.f. de 114-116 °C y un $R_f = 0.302$ en hexano:acetato de etilo 8:2.

Sus datos espectroscópicos son los siguientes:

IR (cm^{-1}) 2885, 2220, 1630, 1536, 1333

EM m/z (intensidad relativa) 280 (M^+ , 1), 115 (100), 140 (59), 103 (52)

RMN¹H 7.51 (m, 5H), 2.41 (s, 3H)

Para el (Z)-3-nitro-2-fenil-3-(4-metoxi)fenilpropenonitrilo (**3a**) se obtuvieron 1.62 g (72.24%) a partir de 2.35 g (10 mmol) de **3**, 0.2 g de Iodo y 50 mL de tetracloruro de carbono. presenta un p.f. de 91-94 °C y un $R_f = 0.581$ en hexano:acetato de etilo 8:2.

Datos espectroscópicos de 3a:

IR (cm^{-1}) 3119, 2862, 2223, 1603, 1540, 1352

EM m/z (intensidad relativa) 280(M^+ ,50), 234(100), 238(95), 219(40), 190(62), 77(17)

RMN¹H δ 8.19 (d, J=8.9,2H), 7.45 (d, J=8.9 2H), 7.28 (m, 5H)

4.2.1.- Preparación del (E)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo

La preparación de este compuesto se hizo por dos métodos:

Método 1. Se utilizó la misma metodología que para la obtención del (Z)-3-nitropropenonitrilo, variando únicamente la temperatura, pues en este caso se realizó a temperatura ambiente (25 °C), obteniéndose una mezcla de las dos configuraciones, (E) y (Z)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo. Esta mezcla se sometió a la biorreducción (como se explica en el siguiente apartado) con *S. cerevisiae* obteniendo después de 2 horas, una mezcla de bioproductos que en su mayor parte es (E)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo y el 5-amino-3,4-difenilisoxazol (**1b**), logrando con esto una separación selectiva de los isómeros.

Para la purificación del bioproducto y del isómero que no reaccionó se llevo a cabo en una

columna cromatográfica "flash", eluyendo primero el isómero (E) que después de cristalizarse en etanol al 96% da un sólido color amarillo claro con un p.f. de 103-105 °C, un R_f de 0.66 en hexano/acetato de etilo 8:2 y un rendimiento del 60% (150 mg).

Método 2. se dejó de 12 a 15 horas una solución 50 mmol del (Z)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo en 200 mL de etanol, en un lugar con bastante iluminación natural. Posteriormente se evaporó el etanol y se recrystalizó el sólido en etanol al 85 % dando el isómero (E)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo con un p.f. de 104-105 °C un R_f de 0.65 en hexano/acetato de etilo 8:2 y un rendimiento del 85 %.

Las constantes espectroscópicas para éste compuesto son:

RMN¹H (CDCl₃); δ 7.75(m, 4H, arom), 7.50(m, 6H).

RMN¹³C (CDCl₃); δ 132.5 (C, arom), 130.9(C, arom), 129.6(C, arom), 129.4(C, arom), 129.3(C, arom), 128.2(C, arom), 127.7(C, arom), 115.9(C, C=C), 109.9(C, C=C).

IR (CHCl₃); ν 3066, 2879, 2222, 1533, 1496, 1355 cm⁻¹

4.3.- Biorreducción de los (Z)-3-nitro-2-fenil-3-aryl o alquil propenonitrilos en medio acuoso con *Saccharomyces cerevisiae*

En este procedimiento se realizó la biotransformación de los (Z)-3-nitro-2-fenil-3-aryl o alquil propenonitrilos en un medio acuoso.

4.3.1.- Preincubación

Se colocaron 100 mL de agua a 35 °C en un matraz de fermentación de 500 mL, al que se agregó 5.0 g de glucosa y 10 g de *S. cerevisiae* para una relación 1:40 sustrato/biocatalizador; se tapó y se dejó en agitación 30 minutos a 125 r.p.m. y 30 °C.

4.3.2.- Biotransformación

Después de realizar la preincubación se agregaron 250 mg del sustrato disuelto en 10 mL de una solución 1:1 de acetona/etanol. Se agitó la mezcla por 24 horas; el tiempo necesario para la biotransformación total del sustrato en las mismas condiciones, el curso de la biotransformación se siguió por cromatografía en capa fina.

4.3.3.- Purificación

A la mezcla de biorreacción obtenida se le agregó NaCl hasta saturación y 20 g de celita, 150 mL de acetato de etilo, la mezcla se dejó en agitación constante por 30 minutos. Posteriormente se filtró, se separó la fase acuosa de la orgánica y se le hicieron tres extracciones con 100 mL de acetato de etilo a la fase acuosa y el residuo de la reacción se lavó tres veces con 50 mL de acetato de etilo. Los filtrados y las extracciones se juntaron, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se concentraron en un rotaevaporador. El concentrado se llevó posteriormente a sequedad total mediante una bomba de alto vacío.

El concentrado totalmente libre de disolvente se pesó y se preparó para la purificación en cromatografía en columna.

De la separación cromatográfica se obtuvo un sólido que se recrystalizó en etanol formándose cristales en forma de agujas de color amarillo claro que se caracterizaron como los heterociclos 5-amino-3,4-difenilisoxazoles ya conocidos. Para el isoxazol derivado de **1a** se obtuvieron 187 mg (75%) con un p.f. de 158-161 °C y un $R_f=0.457$ utilizando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo 7:3 y se caracterizó como el 5-amino-3,4-difenilisoxazol (**1b**). A partir del **2a** se obtuvieron 195 mg (80%), que se cristalizaron en etanol con un p.f. 69-71 °C y un $R_f=0.37$ (hexano/acetato de etilo 8:2) obteniéndose el 5-amino-4-fenil-3-metilisoxazol (**2b**). Del compuesto **3a** de igual forma produjo 164 mg (70%) de 5-amino-3-(4-metoxifenil)-4-difenilisoxazol, (**3b**) que se cristalizaron de etanol dando un sólido amarillo claro con un p.f. 133-135 °C y un $R_f=0.40$ (hexano/acetato de etilo 7:3).

En el caso de la obtención de la oxima en medio acuoso fue necesario purificar los 5-aminoisoxazoles y realizar nuevamente las biotransformaciones con los respectivos sustratos (**1b,2b,3b**) en las mismas condiciones en las que se obtuvieron estos productos y así después de 48 horas de biotransformación se obtuvieron las correspondientes oximas teniendo los siguientes datos:

Para el sustrato **1b** después de la biotransformación con las levaduras y de su purificación se obtuvieron 115 mg (31%) de la 2,3-difenil-3-oximinopropanamida (**1c**) que es un compuesto sólido blanco con un p.f. de 162 °C y un $R_f=0.355$ en hexano/acetato de etilo 1:1.

Después de la purificación de la 2-fenil-3-metil-3-oximino-butanamida (**2c**) se obtuvieron 107 mg (32%), con un p.f. 142 °C y un $R_f=0.46$ en hexano/acetato de etilo 1:1. Todo esto a partir de **2b**

como sustrato inicial.

De la biotransformación y purificación del 2-fenil-3-(4-metoxifenil)-3-oximinopropanamida (**3c**) se obtuvieron 113 mg (34%), con un p.f. de 170 °C y un $R_f = 0.28$ en hexano/acetato de etilo 1:1. Este se logró por la bioconversión de **3b**.

4.4.- Biorreducción de los (Z)-3-nitro-2-fenil-3-aryl o alquil propenonitrilos en medio orgánico con *Saccharomyces cerevisiae*

En este procedimiento se realizó la biorreducción de los (Z)-3-nitro-2-3-aryl o alquil propenonitrilos en un medio orgánico.

4.4.1.- Preincubación

Se colocaron 15 mL de agua a 35 °C en un matraz de fermentación de 500 mL, 18 g de levaduras *S. cerevisiae*, se mezclaron bien y la mezcla se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

4.4.2.- Biotransformación

Después de realizar la preincubación se agregaron 20 mmoles de sustrato, 150 mL de éter de petróleo, el sustrato previamente disuelto en 10 mL de una solución 1:1 de acetona/etanol. Se agitó por 72 horas para la biotransformación total del sustrato en agitación continua y temperatura ambiente (25 °C), el curso de la biotransformación se siguió por cromatografía en capa fina.

4.4.3.- Purificación

La mezcla de biorreacción obtenida, se filtró a vacío; al residuo, y a las levaduras, se les hicieron tres extracciones con acetato de etilo caliente y agitación. El filtrado y los extractos se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se concentraron en un rotaevaporador. Al concentrado se le eliminaron los restos del disolvente mediante una bomba de alto vacío y se pesó el extracto. Éste se purificó por medio de una cromatografía en columna "flash" con hexano/acetato de etilo 6:4 como eluyente. El isoxazol se recrystalizó de etanol obteniéndose cristales en forma de agujas de color amarillo claro y para la oxima en metanol, obteniéndose cristales en forma de agujas de color blanco.

De la cromatografía se obtuvieron 86.90 mg del compuesto **1b** (18.4%) con un p.f. de 158 °C y un

$R_f = 0.472$ en hexano/acetato de etilo 7:3 y 177.10 mg de la oxima **1c** (35%) con un p.f. de 161 °C y un R_f de 0.355 en hexano/acetato de etilo 1:1.

Datos espectroscópicos de **1b** y **1c**:

1b

IR (cm^{-1}) 3490, 3394, 1637, 1603, 1502, 1477, 1431

EM m/z (intensidad relativa) 236 (M^+ , 100), 208 (62), 89 (47)

RMN ^1H (δ , ppm; Hz) δ 7.49(m, 10H, arom), 4.53 (s, 2H, NH_2), 4.53 (intercambio D_2O)

1c

IR (cm^{-1}) 3390, 3190, 1748, 1659, 1597, 1453, 1398.

EM m/z (intensidad relativa) 236 (M^+ , $-\text{H}_2\text{O}$, 10), 208 (25), 192 (7), 105 (100), 89 (18), 77 (20), 63 (12)

RMN ^1H (δ , ppm; Hz) δ 7.80 (m, 2H, arom), 7.3 (m, 8H, arom), 6.30 (amplio, 1H, CONH_2), 5.80 (an, 1H, CONH_2), 4.20 (s, 1H, C-H), 6.30 y 5.80 (intercambio D_2O)

Después de la extracción y purificación de la bioconversión de **2a**, se tienen los siguientes resultados: 61.5 mg (17.6%) de **2b** con un p.f. de 72 °C y un $R_f = 0.382$ en hexano/acetato de etilo 8:2 y 147.8 mg (38.6%) de **2c** con un $R_f = 0.445$ en hexano/acetato de etilo 1:1. y un p.f. de 142 °C.

Datos espectroscópicos de **2b** y **2c**:

2b

IR (cm^{-1}) 3310, 2924, 2853, 1656, 1606, 1507, 1460, 1436

EM m/z (intensidad relativa) 174 (M^+ , 35), 158 (5), 146 (25), 130 (16), 115 (11), 89 (33), 77 (54)

RMN ^1H (δ , ppm; Hz) δ 2.5 (s, 3H, Me), 4.5 (s, 2H, NH_2), 7.35 (m, 5H, arom), 4.5 (intercambio D_2O).

2c

IR (cm^{-1}) 3467.6, 3411.2 3207.9, 1693.1 1651.9, 1600.8, 1398.4, 1012.5, 700.1

EM m/z (intensidad relativa) 192 (M^+ , 3), 175(M^+ , $-\text{H}_2\text{O}$, 7), 149 (100), 132 (75), 117(44), 90 (15), 57 (14).

RMN ^1H (δ , ppm; Hz) δ 10.5 (s, 1H, =NO-H), 7.20 (m, 5H, arom), 7.30 (am, 1H, CONH_2) 6.89 (am, 1H, CONH_2), 4.40 (s, 1H, C-H), 1.70 (s, 3H, C- CH_3), 7.30 y 6.89 (intercambio D_2O).

En la purificación de la biotransformación de **3a**, se obtuvieron los siguientes resultados: el compuesto presentó un rendimiento de 59.8 mg (18%) del isoxazol **3b** con un p.f. de 137 °C y un $R_f = 0.432$ en hexano/acetato de etilo 7:3 y para la oxima **3c** 162.5 mg (31%) con un $R_f = 0.33$ en hexano/acetato de etilo 1:1 y un p.f. de 173 °C

La espectroscopia de **3b** y **3c**:

3b

IR (cm⁻¹) 3465, 3323, 3170, 2925, 2851, 1638, 1611, 1503

EM m/z (intensidad relativa) 266 (M⁺, 55), 238 (15), 222 (10), 135 (100), 134 (90), 105(22), 77(21).

RMN ¹H (δ, ppm; Hz) δ 3.76 (s, 3H, OCH₃), 4.60 (s, 2H, NH₂), 6.80 (d, J=8.7Hz 2H, arom), 7.35 (d, J=8.7 Hz, 2H), 7.22 (m, 5H, arom), 460 (intercambio D₂O)

3c

IR (cm⁻¹) 3446, 3338, 2924, 1747, 1670, 1602, 1575, 1508

EM m/z (intensidad relativa) 284 (M⁺, 2), 266 (M⁺, -H₂O, 10), 135 (100), 97(5), 57 (12)

RMN ¹H (δ, ppm; Hz) δ 7.94 (d, J= 9 Hz, 2H, arom), 6.90 (d, J= 9 Hz, 2H, arom), 7.30 (m, 5H, arom), 5.8 (s, amplio, 1H, CONH₂), 5.6 (s, amplio, 1H, CONH₂), 5.5 (s, 1H, C-H), 3.8 (s, 3H, O-CH₃), 5.8 y 5.6 (interambio D₂O)

4.5.- Demostración de las biorreducciones

4.5.1.- Inactivación del biocatalizador por temperatura

Se colocaron en un matraz de fermentación de 500 mL, 100 mL de agua a 35 °C con 2.5 g de fuente de carbono (glucosa), así como 5 g de *S. cerevisiae*, esta mezcla se calentó a 75 °C durante 30 minutos.

4.5.2.- Preincubación

El matraz de reacción se tapó y agitó durante 30 minutos a 125 r.p.m. y 30 °C terminada la preincubación se agregó el sustrato **1a** 250 mg (1 mmol) disuelto previamente en 10 mL de una solución 1:1 de acetona/etanol, esta mezcla se agitó durante 2 horas más en las mismas condiciones.

4.5.3.- Purificación

Al matraz de reacción se le agregaron 20 g de celita así como NaCl a saturación. Se filtró, y el residuo obtenido se lavó con 3 porciones de 100 mL de acetato de etilo; al filtrado se le realizaron 3 extracciones sucesivas con 25 mL. con el mismo disolvente. El lavado y la fase orgánica se juntaron, esta solución se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró en un rotaevaporador.

El residuo se purificó por cromatografía en columna usando como eluyente una mezcla de

hexano/acetaio de etilo 9:1. De la cual se recuperó el 90% de la materia prima.

4.5.4.- Experimento de la influencia del biocatalizador

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

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

Como resultado de la purificación se obtuvo el 96% de materia prima recuperada. Es importante mencionar que a todos los sustratos que se biotransformaron con *S. cerevisiae* se les realizó el presente experimento.

5.- Resultados y discusión

La ruta general de síntesis que se propuso para la preparación y obtención de las oximas es la siguiente:

1. Preparación de los sustratos 3-nitropropenonitrilos sustituidos mediante la reacción de condensación para obtener los α y β -nitrilos no saturados y la nitración de estos compuestos.
2. La biotransformación con *Saccharomyces cerevisiae* de los nitroalquenos preparados anteriormente en medio acuoso y orgánico, dando los 5-aminoisoxazoles correspondientes
3. La interconversión de los 5-aminoisoxazoles a sus oximas mediante la utilización del biocatalizador *S. cerevisiae* en medios acuoso y orgánico.

La ruta general de síntesis se resume en la siguiente figura:

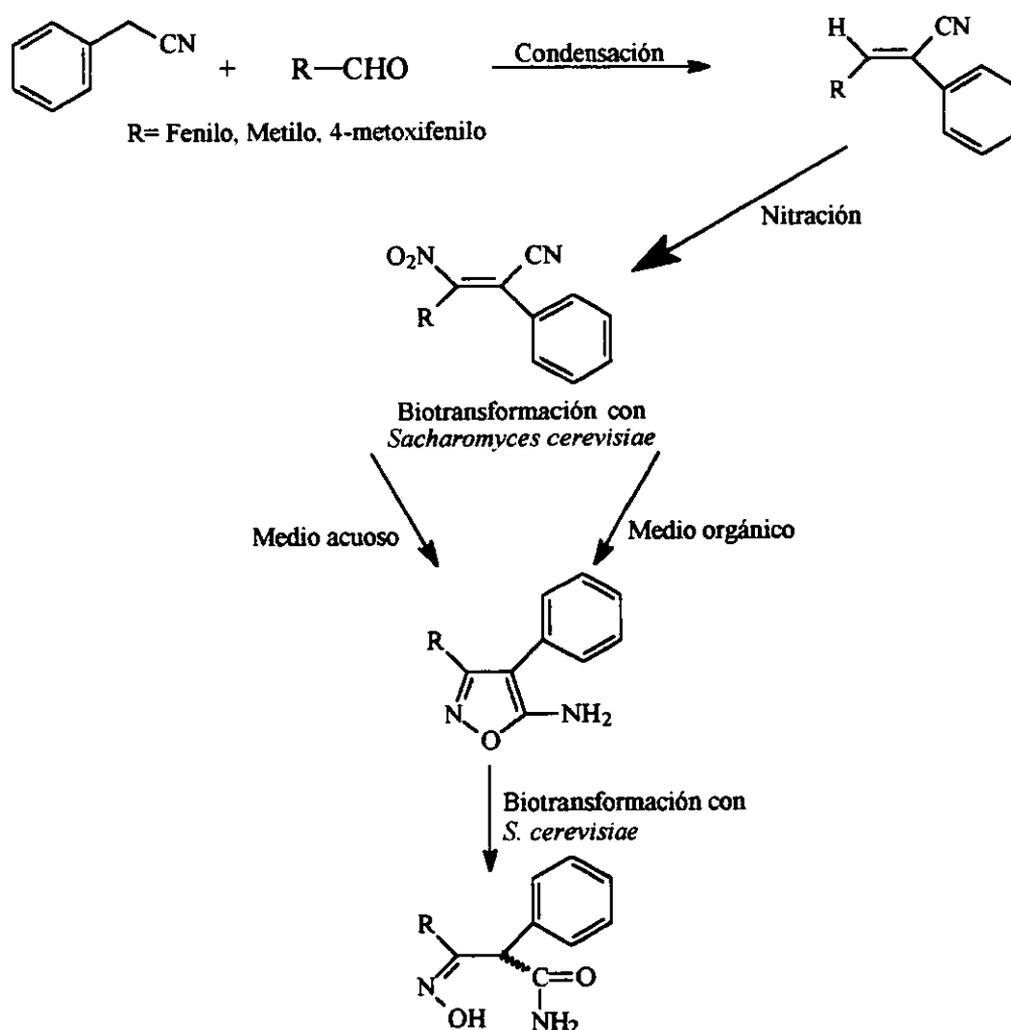


Fig. 61 Ruta general de síntesis

Los pasos importantes en esta ruta de síntesis son: la biotransformación de los propenenitrilos para obtener los 5-aminoisoxazoles y la biorreducción de estos a sus oximas, tanto en un medio acuoso y orgánico. A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos para cada una de las etapas de síntesis.

5.1. Preparación de los sustratos

Los (Z)-2-fenil-3-aril o alquil propenenitrilos que son las materias primas de esta ruta de síntesis, se sintetizan mediante una condensación de Knoevenagel.¹¹¹ En este procedimiento se hace reaccionar el aldehído sustituido con fenilacetoneitrilo en presencia de una base, usando como disolvente etanol al 96%.

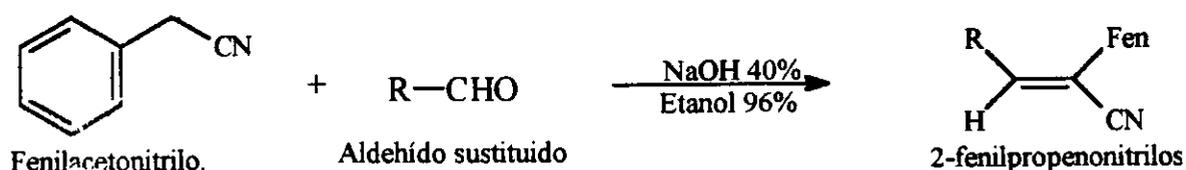


Fig. 62 Síntesis de los sustratos

En la figura 63 se presentan las estructuras de los productos de esta reacción de condensación. Cabe mencionar que se caracterizaron por su punto de fusión, factor de retención (R_f) y sus constantes espectroscópicas (IR, EM, RMN ^1H)

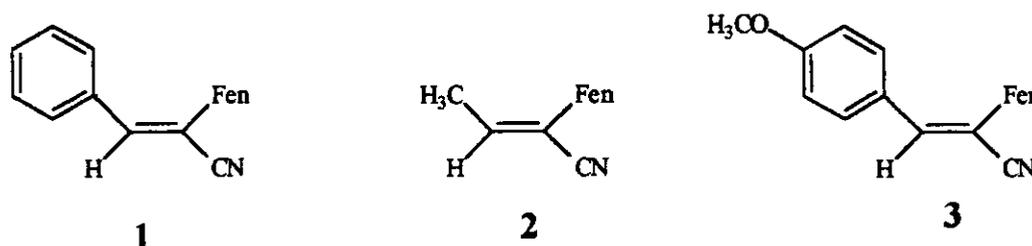


Fig. 63 Estructuras de los productos de la condensación de Knoevenagel

Los datos generados se compararon con los descritos en la literatura para estos compuestos como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2 comparación de p.f., rendimientos, y R_f de los productos de la reacción de Knoevenagel

Compuesto	p.f. pub. (°C)	p.f. exp. (°C)	Ren. pub (%)	Ren. exp. (%)	Referencia
1	85-86.5	85-87	80-90	80.62	116
2	100-103	99-101	40	31.80	117
3	93.5-94.5	93-95	80-90	80.43	116

pub = publicado; exp. = experimental; Ren = rendimiento. Estas reacciones se realizaron en orden de centimoles

Al comparar los resultados obtenidos con los publicados se nota que los rendimientos y puntos de fusión son comparables, además de que se tienen en cantidades suficientes para realizar el siguiente paso de la síntesis: la nitración.

5.2.- Nitración de los sustratos

La introducción del grupo nitro en los compuestos 1, 2 y 3 ocurre en la posición 3 y del mismo lado que el nitrilo (β y cis). La forma (Z) es la configuración requerida para las biotransformaciones de acuerdo a modelos previamente elaborados y se diseñaron de acuerdo a una revisión bibliográfica^{112, 116} de reducciones biocatalíticas.

Los sustratos con los requisitos anteriores se prepararon por la reacción de nitración de los (Z)-2-fenil-3-aryl o alquil propenonitrilos. El agente nitrante empleado se desarrolló en nuestro laboratorio.

Este se preparó mediante la reacción de oxidación del THF (tetrahidrofurano) con HNO₃. La reacción produce una mezcla de gases, siendo el monóxido y el dióxido de nitrógeno (NO/NO₂) los principales componentes. Esta mezcla de óxidos sirve para nitrar en una forma fácil y rápida dobles enlaces C-C y algunos compuestos heterocíclicos.

Cuando los propenonitrilos se hacen reaccionar con el NO_x se obtienen los nitroalquenos con el arreglo espacial requerido para poder ser biotransformados con *S. cerevisiae*.

En la siguiente tabla (tabla 3) se presentan los puntos de fusión y rendimientos obtenidos para la reacción de nitración mediante la cual se prepararon los sustratos que reúnen las características estereoquímicas para la biorreducción.

Tabla. 3 Comparación de p.f., rendimientos, y Rf. de los productos de nitración

Compuesto	p.f. pub. (°C)	p.f. exp. (°C)	Ren. pub (%)	Ren. exp. (%)	Referencia
1a	95.5	94-96	92	71	113
2a	115	114-116	75	64.71	113
3a	92	91-94	90	72.24	113

El uso de éste agente nitrante permitió preparar los sustratos con los requerimientos estereoquímicos exigidos para la reacción de biohidrogenación con *S. cerevisiae*, según el modelo previamente diseñado por Navarro-Ocaña.¹¹⁶ Es importante mencionar que los rendimientos y la estructura de los productos nitrados son comparables con los obtenidos con el novedoso agente

nitrante. La utilidad de dicho método queda validada y justificada a partir de su fácil manejo, bajo costo, rapidez y limpieza.

Los datos espectroscópicos de los sustratos sintetizados se muestran a continuación:

Tabla 4 Datos espectroscópicos de los sustratos nitrados

Prod.	IR (cm ⁻¹)	EM m/z (intensidad relativa)	RMN ¹ H (δ, ppm; Hz)
1a	3061, 2931, 2220, 1591, 1543, 1332	250 (M ⁺ , 18), 204 (100), 203 (84), 176 (60)	7.40 (br,s, 10H)
2a	2885, 2220, 1630 1536, 1333	280 (M ⁺ , 1), 115 (100), 140 (59), 103 (52)	7.51 (m,5H), 2.41 (s, 3H)
3a	3119, 2862, 2223, 1603, 1540, 1352	280 (M ⁺ , 50), 234 (100), 238 (95), 219 (40), 190 (62), 77 (17)	δ 8.19 (d, J=8.9,2H), 7.45 (d, J=8.9 2H), 7.28 (m, 5H)

Se obtuvieron los sustratos nitrados en buenas cantidades para el siguiente paso que es la biotransformación de estos productos con *S. cerevisiae* en un medio acuoso.

5.3.- Biotransformación con *S. cerevisiae* de los nitroalquenonitrilos en un medio acuoso

Al analizar la bibliografía referente a las biorreducciones de dobles enlaces C-C activados con grupos nitro, se encontró que los modelos propuestos por Otha¹¹⁴ (a) y Ono¹¹⁵ (b) serían de mucha utilidad.



Fig. 64 Estructuras de Otha (a) y Ono (b)

Estos modelos como demostró Navarro-Ocaña¹¹⁶ en su tesis doctoral, (los 3-nitropropenonitrilos) son reconocidos como sustratos del sistema biocatalítico presente en *S. cerevisiae*. Además, determinó los requisitos estereoquímicos que deben cumplir los nitroalquenos sustituidos para ser biorreducidos por este microorganismo, los cuales indican que la presencia del doble enlace esté activado, es decir, que tenga enlazados por lo menos un grupo electroattractor entre los siguientes: ácidos carboxílicos y sus derivados, nitrilos, nitros, sulfóxidos, sulfonas, carbonilos (aldehídos y cetonas), etc.

Cuando los (Z)-3-nitro-2-fenil-3-alkil o aril propenonitrilos se hicieron reaccionar con *S. cerevisiae* se obtuvieron como bioproductos los 5-amino-3-alkil o aril fenilisoxazoles. Como se esperaba se realiza la reducción del grupo nitro, corroborando y dando seguimiento a la biorreducción de un grupo de este tipo sobre un enlace C-C con *S. cerevisiae*.

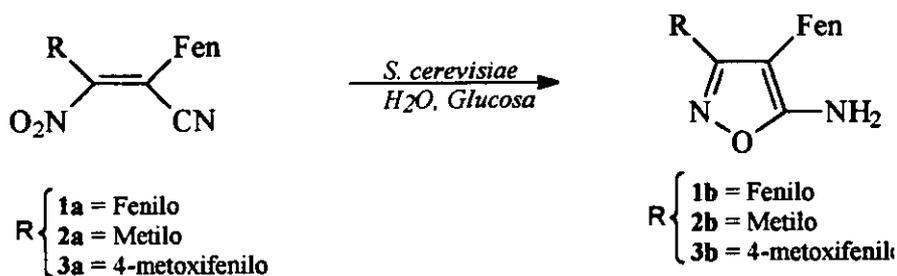


Fig. 65 Síntesis de 5-aminoisoxazoles con *S. cerevisiae*

Cuando el compuesto **1a**, con la configuración (Z) se hizo reaccionar con la Levadura de pan, ésta ocurrió rápidamente, sin embargo, cuando el compuesto **1a** en su configuración (E) se sometió a las mismas condiciones de reacción, el compuesto se recuperó totalmente. Esto indica que cuando los grupos nitro y nitrilo están en configuración (Z) hay biohidrogenación, resultado que fue confirmado con los sustratos restantes, que a su vez produjeron los 5-aminoisoxazoles correspondientes al someterse a la biotransformación. Los rendimientos son moderados y no hay formación de subproductos.

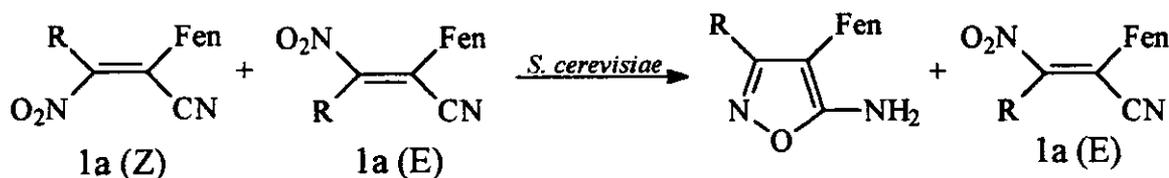


Fig. 66 Bioselección del sustrato con *S. cerevisiae* como biocatalizador

A continuación se presentan los datos referentes al p.f., rendimientos y R_f de los 5-aminoisoxazoles obtenidos.

Tabla. 5 Resultados de p.f., rendimientos, y R_f de los 5-aminoisoxazoles en medio acuoso

Compuesto	p.f. exp. (°C)	Ren. exp (%)	R_f exp.
1b	158-161	75	0.457 hex:acOEt 7:3
2b	69-71	80	0.37 hex:acOEt 8:2
3b	133-135	70	0.40 hex:acOEt 7:3

Ren = rendimiento. Estas reacciones se realizaron en orden de centimoles

Los datos espectroscópicos se presentan en la tabla 6.

Tabla 6 Datos espectroscópicos de los 5-aminoisoxazoles

Prod.	IR (cm ⁻¹)	EM m/z (intensidad relativa)	RMN ¹ H (δ, ppm; Hz)
1b	3490, 3394, 1637, 1603, 1502, 1477, 1431	236 (M ⁺ , 100), 208 (62), 89 (47)	δ 7.49(m, 10H, arom), 4.53 (s, 2H, NH ₂), 4.53 (intercambio D ₂ O)
2b	3310, 2924, 2853, 1656, 1606, 1507, 1460, 1436	174 (M ⁺ , 35), 158 (5), 146 (25), 130 (16), 115 (11), 89 (33), 77 (54)	δ 2.5 (s, 3H, Me), 4.5 (s, 2H, NH ₂), 7.35 (m, 5H, arom), 4.5 (intercambio D ₂ O).
3b	3465, 3323, 3170, 2925, 2851, 1638, 1611, 1503	266 (M ⁺ , 55), 238 (15), 222 (10), 135 (100), 134 (90), 105(22), 77(21).	δ 3.76 (s, 3H, OCH ₃), 4.60 (s, 2H, NH ₂), 6.80 (d, J=8.7Hz 2H, arom), 7.35 (d, J=8.7 Hz, 2H), 7.22 (m, 5H, arom), 4.60 (intercambio D ₂ O)

Los resultados hasta aquí descritos, permiten formular las siguientes conclusiones: se validó de forma experimental un modelo de sustrato para la biohidrogenación con *S. cerevisiae*, con características estereoquímicas previamente diseñadas, lo que permitió desarrollar un nuevo método de síntesis de 5-aminoisoxazoles sustituidos que tiene ventaja sobre los anteriores métodos al hacer uso de un reactivo biológico con los siguientes beneficios: barato, simple y más compatible con el medio ambiente.

Cuando las biotransformaciones tuvieron mayor tiempo de reacción se observó la formación de otro compuesto, por lo cual se procedió a realizar la bioapertura de los 5-aminoisoxazoles y saber cual era este nuevo producto.

5.4.- Apertura biocatalizada de 5-aminoisoxazoles

Cuando la biorreducción de 1a se prolongó más allá de la formación del 5-amino-3,4-difenilisoxazol, se observó mediante cromatografía en capa fina la formación de otro producto y la desaparición de este compuesto.

En esta segunda biotransformación, se demostró primero el origen del segundo bioproducto con el siguiente experimento. Se llevo a cabo la biotransformación bajo las mismas condiciones para el 5-aminoisoxazol, sólo que se uso el 5-amino-3,4-difenilisoxazol como sustrato en presencia de *S. cerevisiae*. Después de trabajar la reacción se detectó por cromatografía en capa fina un producto

similar al obtenido en la reacción prolongada del 2,3-difenil-3-nitropropenonitrilo. Este resultado sugirió que el segundo bioproducto resultó de la acción de *S. cerevisiae* sobre el 5-amino-3,4-difenilisoxazol.

Como control para esta reacción se repitió este procedimiento pero sin biocatalizador y al término del mismo se detectó que sólo había materia prima (5-amino-3,4-difenilisoxazol) lo que indica que *S. cerevisiae* es la responsable de la biotransformación de éste.

Una vez que se comprobó que se realizó esta biotransformación se buscaron las mejores condiciones. En este caso únicamente se varió la relación sustrato:biocatalizador hasta alcanzar el 30% del rendimiento del producto, recuperándose el sustrato.

Después de obtener el bioproducto en forma pura se determinaron las constantes fisicoquímicas encontrando que presentaba un p.f. de 161-163 °C, mientras que los espectros de IR, RMN¹H, ¹³C y EM, sugieren una oxima cuya estructura se presenta en la figura 67.

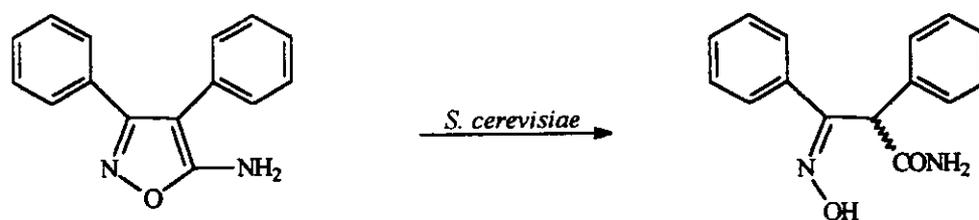


Fig. 67 Biotransformación del 5-amino-3,4-difenilisoxazol (**1b**) a su oxima correspondiente (**1c**)

Es importante mencionar que es la primera vez que se describe la formación de una oxima a partir de 5-aminoisoxazoles empleando catalizadores biológicos.

Otros 5-aminoisoxazoles que se hicieron reaccionar con *S. cerevisiae* son el 5-amino-3-(4-metoxifenil)-4-fenilisoxazol (**3b**) y el 5-amino-3-metil-4-fenilisoxazol (**2b**).

Cuando **3b** se hizo reaccionar en las mismas condiciones que **1b**, se obtuvo un sólido amarillo paja con un p.f. de 170-172 °C y los datos espectroscópicos concuerdan con las señales características de este tipo de compuestos.

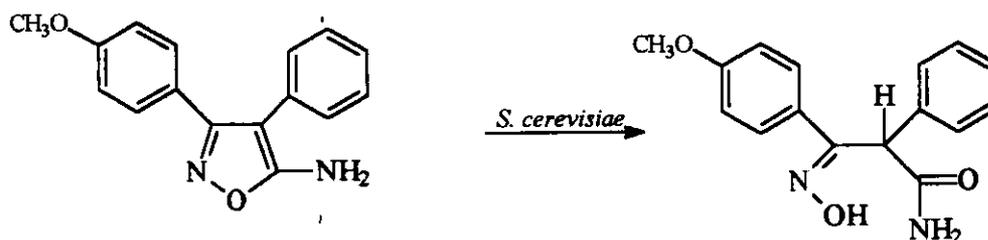


fig. 68 Biotransformación de **3b** a su oxima **3c**

Otro isoxazol que también dio la reacción de apertura fue 5-amino-3-metil-4-fenilisoxazol, **2b**, dando como producto la oxima **2c**, figura 69

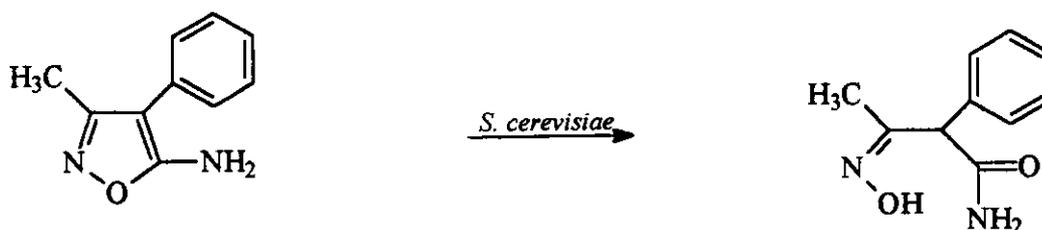


Fig 69. Biotransformación del **2b** a **2c** con *S. cerevisiae*

Esta oxima se caracterizó por medio de sus propiedades fisicoquímicas y constantes espectroscópicas (p.f., EM, IR, RMN ^1H y ^{13}C).

Por otro lado, se esperaba que estas reacciones de bioapertura dieran productos quirales por ser sintetizados por enzimas, cuando se determinó la rotación óptica de las oximas **1c**, **2c**, y **3c** estas fueron de cero, lo que indica que estos compuesto se encuentran como mezcla racémica. Esto se puede explicar en que la reacción se realiza en un medio acuoso y además existe un protón ácido en la molécula, que se puede intercambiar con el agua como se observa en la figura 70.

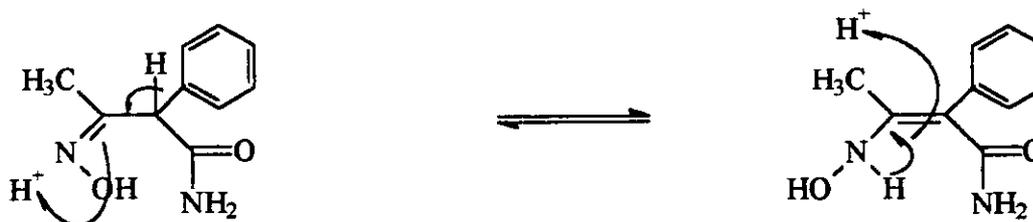


Fig. 70 Equilibrio de la oxima y la hidroxilamina

Tabla. 7 Resultados de p.f., rendimientos, y R_f de las oximas obtenidas en medio acuoso

Compuesto	p.f. exp. (°C)	Ren. Exp (%)	R_f exp.
1c	161-163	31	0.355 hex:acOEt 1:1
2c	141-143	32	0.43 hex:acOEt 1:1
3c	170-172	34	0.28 hex:acOEt 1:1

Es importante destacar que al ocurrir la racemización de las oximas no fue posible preparar bloques de construcción quirales con algún grado de inducción de exceso diastereomérico (e.d.), sin embargo, los resultados obtenidos son muy alentadores ya que se logró la formación de productos con un centro estereogénico. Se sabe que las modificaciones fisicoquímicas ofrecen la posibilidad de obtener buenos excesos enantioméricos (ee.) y moléculas parecidas a las oximas

obtenidas. Una posible opción para evitar la racemización sería empleando medios orgánicos para la biotransformación.

En resumen se pueden enumerar las siguientes conclusiones: se demostró que el empleo de compuestos nitrados (3-nitropropenonitrilos sustituidos) en conjunto con el sistema biocatalítico que provee *S. cerevisiae* representan una buena y promisoría fuente de intermediarios, para la síntesis de objetos moleculares con diversos usos, además de destacar que la metodología utilizada es una alternativa más compatible con el ambiente que las descritas en la literatura para la obtención de este tipo de bloques de construcción así como otros objetos moleculares.

5.5.- Biotransformación con *S. cerevisiae* de nitroalquenonitrilos en un medio orgánico.

Debido a que en las anteriores biotransformaciones no se logró obtener algún grado de inducción quiral, atribuido a que las reacciones se realizaron en un medio acuoso se decidió realizar estas mismas biotransformaciones en un medio orgánico.

Al igual que en las biotransformaciones anteriores se revisó en la bibliografía el medio orgánico más adecuado para realizar las reacciones químicas, encontrando que los mejores disolventes son el hexano, cloroformo y éter de petróleo.

En este nuevo tipo de reacciones se activa a *S. cerevisiae* con 0.8 mL de agua por gramo de levadura utilizada, mezclándose bien para que logre la activación. Una vez que se tienen activadas las células, se agrega el disolvente y posteriormente el sustrato a ser biocatalizado.

Las primeras biorreducciones que se elaboraron con los diferentes disolventes se notó que el mejor medio de reacción es el éter de petróleo ya que ni el cloroformo ni el hexano mostraron ser buenos medios de reacción. Esto es debido a que con cloroformo y hexano no se logra una homogenización del medio, se forman aglutinamientos de células, mientras que cuando se hace la biotransformación con éter de petróleo, se logra esta fase homogénea.

Cuando el (Z)-3-nitro-2-fenil-2-butenonitrilo **2a** se puso a biohidrogenar con *S. cerevisiae* en éter de petróleo se obtuvo el 5-amino-3-metil-4-fenilisoxazol, **2c**, con un rendimiento del 85% que comparado con los rendimientos alcanzados en medios acuosos, son mejores debido a que con este tipo de medios tenemos un mejor método de extracción y purificación, ya que no interviene el agua en gran cantidad como en la biotransformación en medios acuosos, que dificulta la extracción

y purificación de los productos. Los restantes propenonitrilos también se hicieron reaccionar con esta levadura dando los correspondientes 5-aminoisoxazoles **1b** y **3b**. Las constantes físicas y espectroscópicas de estos compuestos concuerdan con los logrados en un medio acuoso.

Los datos físicos se presentan a continuación.

Tabla. 8 P.f., rendimientos, y Rf de los 5-aminoisoxazoles en éter de petróleo

Compuesto	p.f. exp. (°C)	Ren. exp (%)	Rf. exp.
1b	158-160	80	0.46 hex:acOEt 7:3
2b	70-73	78	0.39 hex:acOEt 8:2
3b	133-135	81	0.41 hex:acOEt 7:3

Por otra parte, cuando el 5-amino-3-metil-4-fenilisoxazol **2b**, preparado *in situ*, se biohidrogenó con *S. cerevisiae* en éter de petróleo se obtuvo la oxima **2c** en un 38% de rendimiento, que es mayor al que se generó en un medio acuoso, esto dado a que el método de extracción en medios orgánicos es más sencillo y efectivo. Los datos espectroscópicos se compararon con los anteriormente obtenidos.

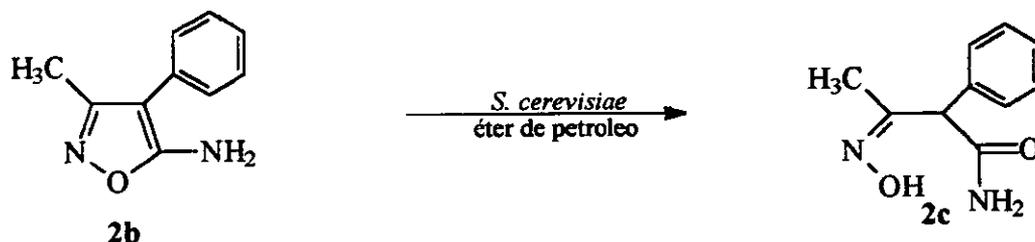


Fig. 71 Biotransformación de **2b** a su oxima, **2c** en éter de petróleo

Otros 5-aminoisoxazoles preparados *in situ* (**1b** y **3b**) que dieron la bioapertura cuando se hicieron reaccionar con *S. cerevisiae* en éter de petróleo, originaron los productos **1c** y **3c** que se identificaron por sus constantes fisicoquímicas como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla. 9 P.f., rendimientos, y Rf de las oximas obtenidas en éter de petróleo

Compuesto	p.f. exp. (°C)	Ren. exp (%)	Rf. exp.
1c	160-162	38	0.36 hex:acOEt 1:1
2c	142-145	37	0.43 hex:acOEt 1:1
3c	167-169	40	0.30 hex:acOEt 1:1

Los datos de la espectroscopia realizada a esos compuestos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 10 Datos espectroscópicos de los 2,3-difenil-3-oximinopropanamida.

Prod.	IR (cm ⁻¹)	EM m/z (intensidad relativa)	RMN ¹ H (δ, ppm; Hz)
1c	3390, 3190, 1748, 1659, 1597, 1453, 1398.	236 (M ⁺ , -H ₂ O, 10), 208 (25), 192 (7), 105 (100), 89 (18), 77 (20), 63 (12)	δ 7.80 (m, 2H, arom), 7.3 (m, 8H, arom), 6.30 (amplio, 1H, CONH ₂), 5.80 (an, 1H, CONH ₂), 4.20 (s, 1H, C-H), 6.30 y 5.80 (intercambio D ₂ O)
2c	3467.6, 3207.9, 1651.9, 1398.4, 700.1	3411.2 192 (M ⁺ , 3), 175(M ⁺ , -H ₂ O, 7), 149 (100), 132 (75), 117(44), 90 (15), 57 (14). 1600.8, (14). 1012.5,	δ 10.5 (s, 1H, =NO-H), 7.20 (m, 5H, arom), 7.30 (am, 1H, CONH ₂), 6.89 (an, 1H, CONH ₂), 4.40 (s, 1H, C-H), 1.70 (s, 3H, C-CH ₃ =, 7.30 y 6.89 (intercambio D ₂ O).
3c	3446, 3338, 2924, 1747, 1670, 1602, 1575, 1508	284 (M ⁺ , 2), 266 (M ⁺ , -H ₂ O, 10), 135 (100), 97(5), 57 (12)	δ 7.94 (d, J= 9 Hz, 2H, arom), 6.90 (d, J= 9 Hz, 2H, arom), 7.30 (m, 5H, arom), 5.8 (s, amplio, 1H, CONH ₂), 5.6 (s, amplio, 1H, CONH ₂), 5.5 (s, 1H, C-H), 3.8 (s, 3H, O-CH ₃), 5.8 y 5.6 (intercambio D ₂ O)

Al hacer los análisis de rotación óptica a estos compuestos dieron un valor de cero lo que indica que se trata de mezclas racémicas. La explicación de este resultado es que las reacciones se realizan en un medio orgánico que contiene una mínima cantidad de agua necesaria para la activación y supervivencia del organismo biocatalítico por lo que ocurre una reacción de isomerización por la presencia de agua, no lográndose la inducción asimétrica deseada, lo que da origen a una mezcla de diastereoisómeros en vez de la oxima quiral, producto que se esperaba obtener ya que la reacción se hizo con un biocatalizador quiral.

Los resultados obtenidos tanto en las biotransformaciones en un medio acuoso, como en el orgánico hasta el momento indica que no se ha logrado alcanzar un grado de inducción asimétrica, sin embargo, dan pauta para diseñar nuevos experimentos tendientes a obtener algún grado de inducción. Las condiciones óptimas encontradas para las reacciones biotransformadas en un medio acuoso son: temperatura 30 °C, 150 r.p.m. en agitación orbital continua, 48 hrs de incubación, glucosa o sacarosa como fuente de carbono y agua como medio de reacción; para las biotransformaciones en medio orgánico son: temperatura 30 °C, 150 r.p.m. de agitación orbital continua, 72 hrs de incubación, éter de petróleo como medio de reacción.

6.- Conclusiones

- Se logró obtener un nuevo método de nitración mediante óxidos nitrantes que es fácil, rápido, eficiente, limpio y económico para nitrar diversos tipos de sustratos.
- Se demostraron los requisitos estereoquímicos que deben cumplir los nitropropenonitrilos para ser biocatalizados por *Saccharomyces cerevisiae*.
- Se demostró que los (Z)-3-nitropropenonitrilos son compuestos reconocidos como sustratos por *S. cerevisiae* en medios acuoso y orgánico.
- Se elaboraron dos nuevos métodos de síntesis de 5-aminoisoxazoles con *S. cerevisiae* en medio acuoso y medio orgánico
- Se encontraron dos nuevas rutas de síntesis de oximas ya sea a partir de su compuesto (Z)-3-nitrofenilpropenonitrilo y su 5-aminoisoxazol en medios tanto acuoso como orgánico
- No se obtuvo grado de inducción asimétrica de las oximas en medios acuoso y orgánico

7.- Referencias

1. Fukui, S. y A. Tanaka., *Endeavour, New Series*, **1985**, 9:1, 10-17
2. Csuk, R. y B.I. Glanzer. *Chem Rev.* **1991**, 91, 49
3. Olivo, H.F., **1992**, *Studies on stereo and regioselectivity of (4+2) cycloaddition of nitroso compounds to chiral halobenzenediols. Total synthesis of lycoricidine*. Tesis para obtener el grado en Dr. en filosofía, Virginia Polytechnic Institute and State University.
4. Whitesides, G.M. y C.H. Wong. *Angew Chem Int. De. Engl.* **1985**, 24, 617-638
5. IUPAC, *Pure & Appl. Chem.* **1990**, 754-768
6. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*. 3ra ed. completamente revisada, editorial Springer, New York. **1998**
7. Perlman, D. **1976**. *Procedures useful in studying microbial transformations of organic compounds*, pp. 47-68. En J.B. Jones, C.J. Sih y D. Perlman (ed.) *Techniques of chemistry*, vol 10, parte 1. Jhon Wiley & Sons, New York.
8. Hanc, O.F. *J. Indian Chem. Soc.* **1975**, LII:Jan., 4-16.
9. Wong, C.H., G.M. Whitesides. **1994**. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*. Pergamon, Harvard University.
10. Creighton, T.E. **1993**. *Proteins: Structures and Molecular Properties*. 2da. edic. W.H. Freeman and Company, New York .
11. Jones, J.B. *Tetrahedron* **1986** 42:13, 3351-3403
12. Goodhue, C.T., J.P. Rosazza, y G.P. Peruzzotti. **1982**, *Microbial transformation of bioactive compounds*, pp 97-122. en CRC-Press, Boca Raton/Florida.
13. IUPAC, *Pure & Appl. Chem.* **1993**, 346-376
14. Nikolova, P. y O. P. Ward, *Journal of Industrial Microbiology*, **1993**, 12:76-86.
15. Steck, W., E. Constabel, *Lloydia*, **1974**, 37:2
16. Wilhelm, A. y E. Reinhard., *Bull. Soc. Chim. Fran.*, **1980**, 12:II, 35-44
17. Pilgrim, H. *Pharmazie*, **1970**, 25, 568
18. Naoshima, Y. y Y. Akakabe, *Phytochemistry*, **1991**, 30:11, 3595-3597
19. Furuya, T.M., Hirotsu y T. Shinohara, *Chem. Pharm. Bull.* **1970** 18:1080
20. Hamada, H., S. Naka, y H. Kurban., *Chem Lett.* **1993**, 2112-2113

21. Kutney, J.P. *Acc Chem. Res.* **1993**, 26, 559-566
22. Cormier, F. y C. Ambid., *Plant Cell Reports*, **1987**, 6:427-430
23. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 3ra ed. completamente revisada, editorial Springer, New York. 1998
24. Lerner, R.A., S.J. Benkovic, y P.G. Schultz, *Science*, 252, 3 may **1991**, 659-667
25. Roberts, S.M. *J. Chem Soc. Perkin Trans*, 1, **1998**, 157-166
26. Rensburg, H.V., P.S. van Heerden, B.C. B. Bezuidenhoudt y D.Ferreira, *Chem. Commun.*, **1996**, 2747
27. Yamada, K., R. Ishii, H. Nakagawa y H. Kawazura, *Tetrahedron: Asymm.*, **1996**, 7, 737.
28. Fukushima, Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1996**, 69, 2269
29. Wu, Z.P. y D. Hilvert, *J. Am Chem. Soc.*, **1989**, 111, 4513
30. Bohinski, R.C. **1991**, *Bioquímica*, 5ta edición, Addison-Wesley Iberoamericana, 737 p.
31. Davies, H.G., R.H. Green, D.R. Kelly, y S.M. Roberts. **1989**. *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry*. Academic Press. EEUU.
32. Kazandjian, R.Z.; A.M. Klibanov, *J. Am. Chem Soc.* **1985**, 107, 5448-5450.
33. Nagasawa, T. Y H. Yamada, *Pure & Appl. Chem.* **1995**, 667:7, 1241-1256
34. Ensley, B. D., B. J. Ratzkin, T.D. Osslund, M.J. Simon, L.P. Wackett y D.T. Gibon. *Science*, **1983**, 222:167-169
35. Santaniello, E., P. Ferraboschi, P. Grisenti y A. Manzocchi. *Chem Rev.* **1992**, 92, 1071-1140.
36. Margolin, A.L. *Chemtech*, **1991**, march, 160-167
37. Yamada, Y., Makita, A., Nihira, T., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 805-808
38. Gutman, A.L., K. Zuobi., A. Boltanski, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 280, 3861-3864
39. Cesti, P. A. Zaks, A. M. Klivanov, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1985**, 11:401
40. IUPAC. *Pure and Applied Chemistry*. **1997**, 69, 1613-1632
41. Klibanov, A.M. *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 14-120.
42. Price, N.C., L. Stevens. **1989**. *Fundamentals of Enzymology*. 2da edic., Oxford University Press. EEUU.
43. IUPAC, *Pure and Applied Chemistry*, **1995**, 67, 7, 1241-1256
44. Yoshida, S. A. Yoshikawa, Y. Terao, *J. Biotechnol.*, **1990**, 14: 195-202
45. Bigelis, R. *Biotechnol Prod. Alim.*, **1990**, 165-166

46. Davies, H.G., R.H. Green, D.R. Kelly y S.M. Roberts, 1989, *Biotransformations in preparative organic Chemistry*. Academic Press. EEUU:
47. Herrera, T. y M. Ulloa. 1990 *El Reino de los Hongos.*, 1ra ed. Instituto de Biología (UNAM)- Fondo de Cultura Económica. México.
48. Bold, H.C. 1990. *Morphology of Plants and Fungi*. 4ta. ed. Harper-row, New York
49. Webster, J. 1980. *Introduction to Fungi*. 2da ed. Cambridge, Cambridge University
50. Ward, P., C.S. Young. *Enzyme Micro Technol*, 1990, 12, 482.
51. Turner, N.J. Biocatalytic Reductions. 1994 *SCI, Reductions, March* 625-628
52. Bennet, F., S. B. Redford, D. W. Knight y D. Shaw, *Ind. J. Chem.*, 1992, 31B: december, 844-845
53. Izumi, T. K. Satou y K. Ono, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1996, 66, 233-242
54. Fantin, G., M. Fogagnulo, A. Medici, P. Pedrini, *Tetrahedron: Asymm.*, 1996, 47:1, 277-282
55. Forzato, C., P. Nittr, G. Pitacco y E. valentin, *Tetrahedron: Asymm.*, 1997, 8:11, 1811-18220
56. Fronza, G., C. Fuganti, P. Grasselli, G. Pedrocchi y S. Servi, *Ind J. Chem.*, 1993, 32B: January, 163-166
57. Resnick, S. M., D. S. Torok y D. T. Gibson, *J. Org Chem.*, 1995, 60, 3546-3549
58. Akamanchi, K. G., R. Meenaskshi y K. J. Ranbhan, *Ind. J. Chem.*, 1992, 31B: 908-910
59. Kamal, A., Y. Damayanthi, B. S. Narayan, B. Lakminarayana y B. S. Praveen, *Chem. Commun.*, 1997, 1015-1016
60. Kakulapati, R., B. Nanduri, V. D. N. Yadaualli, y N. S. Trichinapally, *Chemistry Letters*, 1992, 2059-2060
61. Stewart, J. D., K. W. Reed y M. M. Kayser, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 1996, 755-757
62. Tang, J., Y. Brackendridge, S. M. Roberts, J. Beecker y A. J. Willets, *Tetrahedron*, 1995, 51: 48, 13217-13238
63. Davey, C. L., L. W. Powell, N. J. Turner, *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35:42, 7867-7870
64. Guarna, A., E. G. Occhiato, L. M. Spiretti, M. E. Vallecchi y D. Scarpi, *Tetrahedron*, 1995, 51:6, 1775-1788
65. Rykowski, A. Lipinskat, E. Guzik, A. M. Olender, *Polish J. Chem*, 1997, 71:1. 69-76
66. Baik, W., J. Lim Han, K. Chang Lee, N. Ho Lee, B. Hyo Kim y J-T Hahn, *Tetrahedron Lett.*,

- 1994, 35:23, 3965-3966
67. Baik, W., y T. H. Park, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 5683-5685
68. Baik, W., J. U. Rhee, S. H. Lee, N. H. lee, B. H. Kim, y K. S. Kim, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36:16, 2793-2794
69. Baik, W., D. Y. Kim, S. Koo, J. U. Rhee, S. H. Shin, y B. H. Kim, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38:5, 845-848
70. Baik, W., D. Y. Kim, H. U. J. Lee, W-J Chung, B. H. Kim, y Scok W. Lee, *Tetrahedron lett.*, **1997**, 38:26, 4579-4580
71. Takeshita, M. S. Yoshida, R. Kiya, N. Higuchi y Y. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37:3, 615-617
72. Takeshita, M. y S. Yoshida, *Heterocycles*, **1990**, 30:2, 871-874
73. Takeshita, M. y S. Yoshida, *Heterocycles*, **1990**, 31:12, 2201-2204
74. Ohta, H., N. Kobayashi, K. Ozaki, *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 1802-1804
75. Takeshita, M., S. Yoshida, y V. Kohno, *Heterocycles*, **1994**, 37:1, 553-562
76. McAnda, A. F., K. D. Roberts, A. J. Smallridge, A. Ten y M. A. Trehwella, *J. Chem. Soc., Perkin Trans*, **1998**, 1, 501-504
77. Fuji, K., M. Node. *Synlett* **1991**, 603
78. Orthmer, K. **1981**. *Encyclopedia of Chemical Technology*, vol 15b, 3ra. ed., editorial Wiley, New York.
79. Olah, G. A., R. Malhotra y S.C. Narang. **1989**. *Nitration: Methods and Mechanisms*, VHC Publishers.
80. Schechter, H. F. Conrad, A.L. Daulton, y R.B. Kaplan. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3052
81. Deswarte, P.M., C.J. Viel. *J. Heterocyclic Chem.* **1974**, 9, 666
82. Okamoto, T., I. Takahashi. *Chem Pharm Bull.* **1968**, 16, 1700
83. Colau, R. y C. Viel. *Bull Soc Chim Fr.* **1980** 3-4, 163.
84. Franck-Neumann, M. y M. Miesch. *Tetrahedron.* **1983**. 39, 1254.
85. Padwa, A. *J. Sm. Chem. Soc.* **1981**, 103, 4974.
86. Padwa, A., L. Fisera, K.F. Koeehler, A. Rodriguez y G.S.K. Wong. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 276.
87. DeBernardo, S. y M. Weigele. *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 109.

88. Yamamori, T. y Y. Hiramatu. *Tetrahedron*, **1985**, 41, 913
89. Navarro-Ocaña, A., E. Barzana, D. López-González, M. Estrada, *OPPI BRIEFS*, **1999**, Vol 31, No. 1, 117-119
90. Kozikowski, A.P. in: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Eds. Katrisky, A.R. y C.W. Rees., Pergamon Press, Oxford, **1984**, 1, 453.
91. Meyers, A.I. *Heretocycles in Organic Synthesis*, Wiley. New York, **1974**
92. Obregia, A. *Ann. chem.* **1981**, 266, 324.
93. Dines, M. y Scheinbaum. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 4817.
94. Takeda, K., Tokuyama, K. *J. Pharm. Soc. Japan.* **1956**, 76-77
95. Uno, H., M. Kurotawa y H. Nishimura. *Chem. Pharm Bull.* **1976**, 24, 624.
96. Harsányi, J., K. Takacs, y K. Horváth. *Chem. Ber.* **1974**, 107, 2563.
97. Pochat, P. *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21:4974
98. Kampe, K.D. *Angew Chem., Int. ed.* **1982**, 21, 540.
99. Himbert, G., H. Machleidt. *Ann. Chem.* **1970**, 738, 60.
100. Buron, C., L.E. Kaím y A. Uslu. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8027.
101. Katritzki, A.R. y C.W. Rees. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Pergamon Press, New York, **1995**, vol. 6, Part B.
102. Nishiwaki, T. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 26, 2049.
103. Nishiwaki, T. K. Azechi y F. Fujiyama. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1974**, 1967.
104. *Chem Abstr.* **1952**, 46, 11180.
105. Nishiwaki, T., F. Fujiyama. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. Y.* **1973**, 817.
106. Katritzki, A.R. y C.W. Rees. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Pergamon Press, New York, **1995**, 6:B.
107. Sandler, S.R. y W. Caro. *Organic Functional Group Preparation*. Academic Press, New York, **1972**, 372.
108. Winterfeldt, E. *Comprehensive Organic Synthesis*. Trost, B.M., Fleming, I. eds. Pergamon Press, **1991**, 6, 675-763.
109. Donaruma, G. y W.Z. Hedt. *Organic Reactions*, eds. Kende, A.S., John Wiley, New York, **1960**, vol 11.
110. O'Brien, C. *Chem Rev.* **1964**, 64, 81.

111. Jones, G., "*Organic Reactions*", A. C. Cope de.; John, New York, 1967, 15, 204.
112. Servi, S., *Synthesis*, 1990, 1 y referencias ya citadas: 2, 38,51
113. Deswarte, S., C. J. Bellec, *Heterocyclic Chem*, 1980, 17, 891
Bellec, C., D. Bertin, R. Colau, S. Deswarte, P. Maitte, C. Viel, *J. Heterocyclic Chem.*, 1979, 16, 1611
Colau, R., Viel, C., *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1980, 3-4, 163
114. Otha, H., N. Kobayashi, K. Ozaki, *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 1802.
115. Ono, N., A. J. Kaji, *Syn Org. Chem., Japan*, 1980, 38, 155
116. Navarro-Ocaña, A. 1986, *Tesis de licenciatura*, Facultad de Química, UNAM, México.
117. Kulp, S.S., Caldwell, C.B., *J. Org.Chem.*, 1980, 45, 171
118. Navarro-Ocaña, A., M. Jiménez-Estrada, M.B. González-Paredes y E. Barzana., *SYNLETT*, 1996, 7, 695-696

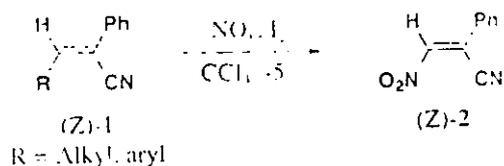
Apendice 1

THE REGIOSELECTIVE NITRATION OF α,β -UNSATURATED NITRILES WITH NITROGEN OXIDES

Submitted by Arturo Navarrete-Ocaña¹, Eduardo Barzana¹, Daniel López-González^{1*}
(04/06/98), and Manuel Jimenez-Estrada^{2*}

*Dept. Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, D. F. 04510, Coyoacán, MÉXICO D.F.
¹Instituto de Química*

The understanding of the chemistry of nitroalkenes has evolved rapidly since the 1980's based on their wide use for the synthesis of a variety of compounds: they are readily available, facilitate the formation of C-C bonds, and efficient methods are known for their transformation into other functional groups. It is also well known that nitration of alkenes (and aromatic compounds) can be performed with nitrogen monoxide or nitrogen dioxide.¹ However, a mixture of NO/NO₂ (NO_x) has not been investigated as a nitrating agent. This mixture would have the advantage of being easily generated² without the need for further purification or handling of costly cylinders which are subject to stringent import regulation in some countries. Herein we report an alternative and convenient procedure for the nitration at low temperatures of (*Z*)-3-R-alkyl-2-phenylpropenenitriles **1**.³ When such compounds were treated with NO_x in the presence of iodine,³ the corresponding nitroalkenes were obtained, some of these nitro compounds are available by nitration with NO.⁴ The NO_x mixture was easily prepared by the procedure of Schmid (H₂O and HNO₃).⁵ Substituted 3-nitropropenenitriles are the starting material for a new synthesis of 5-aminisoxazoles,⁶ which are interesting heterocyclic compounds with important biological properties.⁷



When the 3-alkyl-2-phenylpropenenitrile **1a** was treated with NO_x in the presence of iodine in carbon tetrachloride at -5°, the (*Z*)-3-nitro-2-phenylpropenenitrile **2a** was obtained in 90% yield. Application of this nitration procedure to other alkenenitriles **1b-h** resulted in the formation of the corresponding conjugated nitro olefins listed in Table I.

The products were obtained exclusively with (*Z*)-geometry of double bond and no contamination with the corresponding (*E*)-isomers was detected. Yields were comparable to those reported for NO.⁴ In addition to compounds **2e** and **2f** this is the first example of synthesis with nitrogen oxides and in particular with NO_x.

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

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

Product	R	mp (°C) [Lit. mp.]	Yield (%) [Lit. %]
2a	Phenyl	95-96[95-5]	60[59]
2b	4-Chlorophenyl	116[116]	85[85]
2c	4-Methoxyphenyl	92[92]	90[90]
2d	4-Nitrophenyl	92[92]	75[70]
2e	2-Phenyl	90 ^a	75
2f	Styryl	oil ^b	80
2g	H	72[72]	75[80]
2h	Methyl	115[115]	80[75]

a) Only the (Z) products were obtained, identified spectroscopically and mixture mps with known compounds. b) Uncorrected. c) Unstable solid; HRMS m/z ($M + 1$) 256.0296 (Calcd for $C_{11}H_{11}N_2O_2S$, 256.0306). d) Unstable oil; HRMS m/z ($M + 1$) 276.0891 (Calcd for $C_{17}H_{17}N_2O_2$, 276.0899).

TABLE. Spectral Data of Compounds 2

Prod.	IR (cm ⁻¹)	EM m/z (Relative intensity)	¹ H NMR (δ , ppm; <i>J</i> , Hz)
2a	3061, 2931, 2220, 1592, 1543, 1332	250 (M^+ , 18), 204 (100), 203 (84), 176 (60)	7.40 (br. s, 10H)
2b	3061, 2931, 2220, 1592, 1543, 1332	284 (M^+ , 22), 254 (25), 238 (95), 203 (100), 77 (20)	7.34 (d, <i>J</i> = 8.9, 2H), 7.33 (m, 5H), 7.19 (d, <i>J</i> = 8.9, 2H)
2c	3119, 2862, 2223, 1603, 1540, 1352	280 (M^+ , 50), 234 (100), 238 (95), 219 (40), 190 (62), 77 (17)	d 8.19 (d, <i>J</i> = 8.9, 2H), 7.45 (d, <i>J</i> = 8.9, 2H), 7.28 (m, 5H)
2d	2935, 2219, 1604, 1538, 1333, 1260	280 (M^+ , 50), 234 (100), 238 (95), 219 (40), 190 (62), 77 (17)	7.31 (m, 5H), 7.14 (d, <i>J</i> = 9.0, 2H), 6.80 (d, <i>J</i> = 9.0, 2H), 3.79 (s, 3H)
2e	3040, 2932, 2255, 1602, 1545, 1331	256 (M^+ , 50), 210 (100), 177 (35), 164 (55), 77 (37)	7.03 (t, <i>J</i> = 5.9, 3.8, 1H), 7.17 (dd, <i>J</i> = 3.8, 1.1, 1H), 7.50 (br. s, 5H), 7.63 (dd, <i>J</i> = 5.9, 1.1, 1H)
2f	3100, 2225, 1638, 1517, 1346, 1317	276 (M^+ , 20), 230 (100), 203 (98), 101 (30), 77 (45)	7.45 (m, 8H) 7.56 (br. s, 1H), 7.68 (m, 2H), 8.35 (br. s, 1H)
2g	3030, 2925, 2239, 1529, 1448, 1348	174 (M^+ , 30), 126 (100), 99 (65), 77 (50)	7.40 (br. s, 5H), 7.85 (s, 1H)
2h	2885, 2220, 1630, 1536, 1333	280 (M^+ , 1), 115 (100), 140 (59), 103 (52)	7.51 (m, 5H), 2.41 (s, 3H)

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

EXPERIMENTAL SECTION

Melting points were determined using a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were measured with a Nicolet FT-IR 55X instrument. Proton NMR spectra were obtained on a Varian

VXR-300S, 200 MHz spectrometer using 1MS as an internal standard. Low-resolution mass spectra were recorded on a Hewlett-Packard 5985-B (-70 eV) mass spectrometer.

Typical Procedure.—A stirred solution of 2.05 g (10 mmol) of 1a and 0.10 g of iodine in 100 mL of carbon tetrachloride was cooled in an ice bath (±5 °C). The mixed oxides (NO_x)⁺ gas was passed into the solution over 2 hours. After gas addition, stirring was continued for one hour in the cold at -5 °C. The reaction mixture was extracted with 10% sodium thiosulfate solution until disappearance of the iodine color, washed with a saturated sodium hydrogen carbonate solution and water, and dried over sodium sulfate. The residue obtained on evaporation of the organic solvent was recrystallized from ethanol to give 2.24 g (90%) of 2a, mp. 95-96 °C. The progress of the reaction was monitored by TLC.

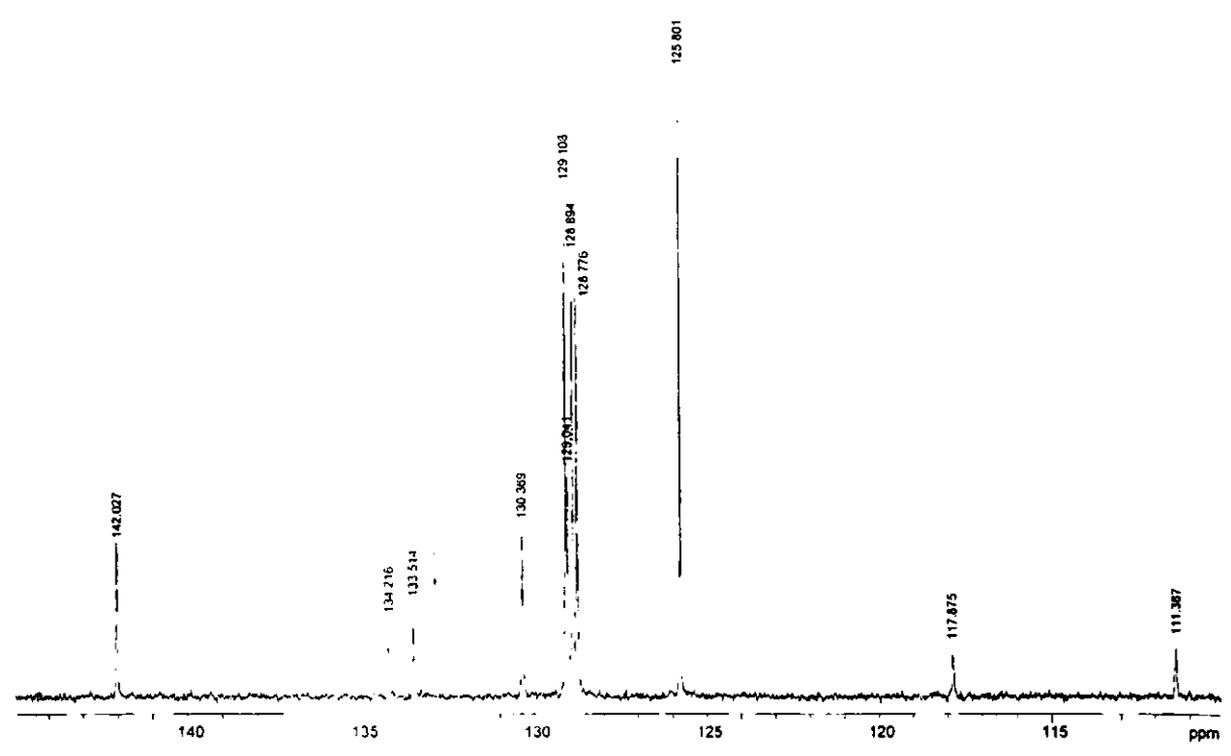
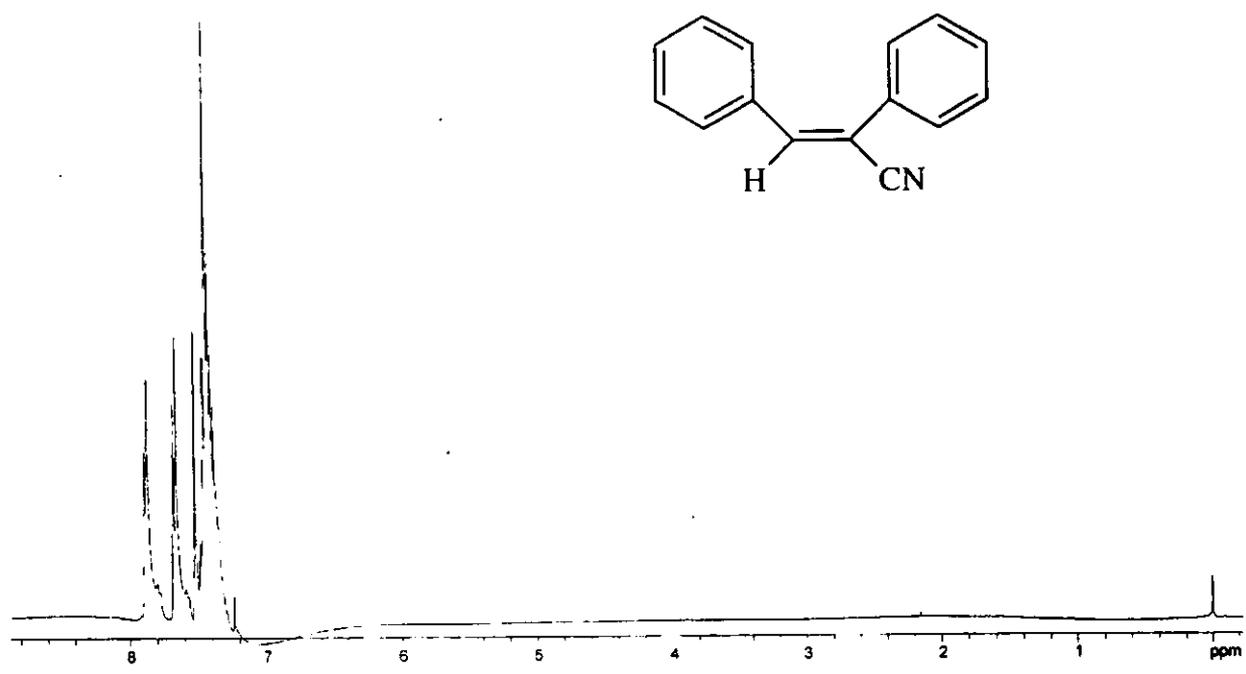
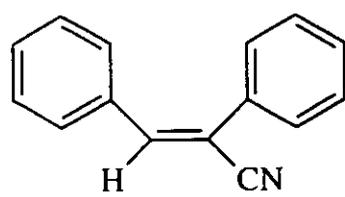
Acknowledgment - We acknowledge partial financial support from CONACYT and DGAPA-UNAM No. IN214996. We also thank L. Velasco Ibarra and F. Javier Pérez Flores for technical support.

REFERENCES

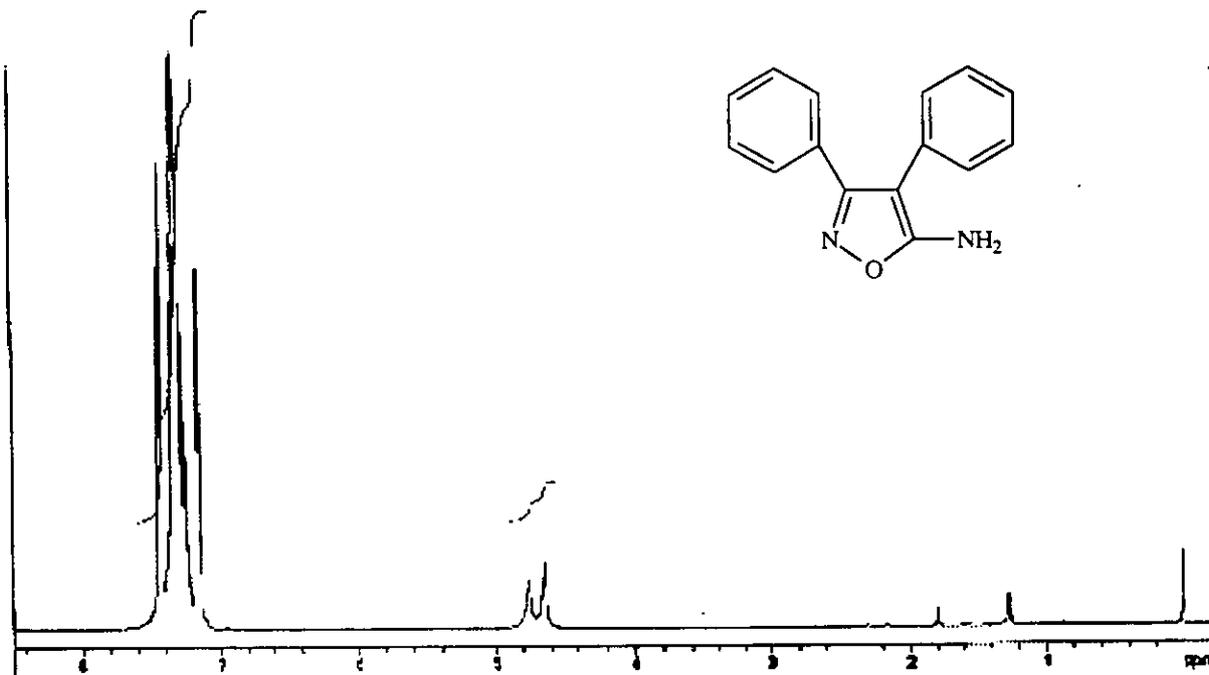
1. For reviews on the preparation and use of nitroalkenes in organic synthesis, see: D. Seebach, E.W. Colvin and T. Weller, *Chimia*, **33**, 1, (1979); A. G. M. Barret and G. G. Graboski, *Chem. Rev.*, **86**, 751, (1986); K. Fuji and M. Node, *Synlett*, 603, (1991); A.G.M. Barret, *Chem. Soc. Rev.*, **20**, 95, (1991); R. Tamura, A. Kamimura and N. Ono, *Synthesis*, 423, (1991); R. A. Karakhanov, V. I. Kelarev and Y. N. Polivin, *Russ. Chem. Rev.*, **993**, 725, (1993); V. F. Rudchenko, *Chem. Rev.*, **62**, 169, (1993); K. Bott, "Methoden der Organischen Chemie", Vol E15/1, pp 1129-1200. (Houben-Weyl), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1993.
2. E. S. Perkalin, E. S. Lipina, V. M. Berestovitskaya and D. A. Efremov, "Nitroalkenes: Conjugated Nitro Compounds", Wiley, Chichester, UK, 1994.
E. Hata, T. Yamada and T. Mukaiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 3629, (1995) and references cited therein.
3. H. Schmid, A. Maschka and H. Frauenshull, *Monatsh. Chem.*, **80**, 671, (1949).
4. S. S. Kulp and C. B. Caldwell, *J. Org. Chem.*, **45**, 171, (1980).
5. V. Jäger and H. J. Günther, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **16**, 246, (1977).
6. J. C. Doré and C. Viel, *Eur. J. Med. Chem.*, **9**, 673, (1974); C. Bellec, D. Bertin, R. Colau, S. Deswarte, P. Maitte and C. Viel, *J. Heterocyclic Chem.*, **16**, 1611, (1979).
7. A. Navarro-Ocaña, M. Jiménez-Estrada, M. B. González-Paredes and E. Barzana, *Synlett*, 695, (1996).
8. J. Rouchoud, F. Gustin and C. Moulard, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **102**, 543, (1993).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Apendice 2

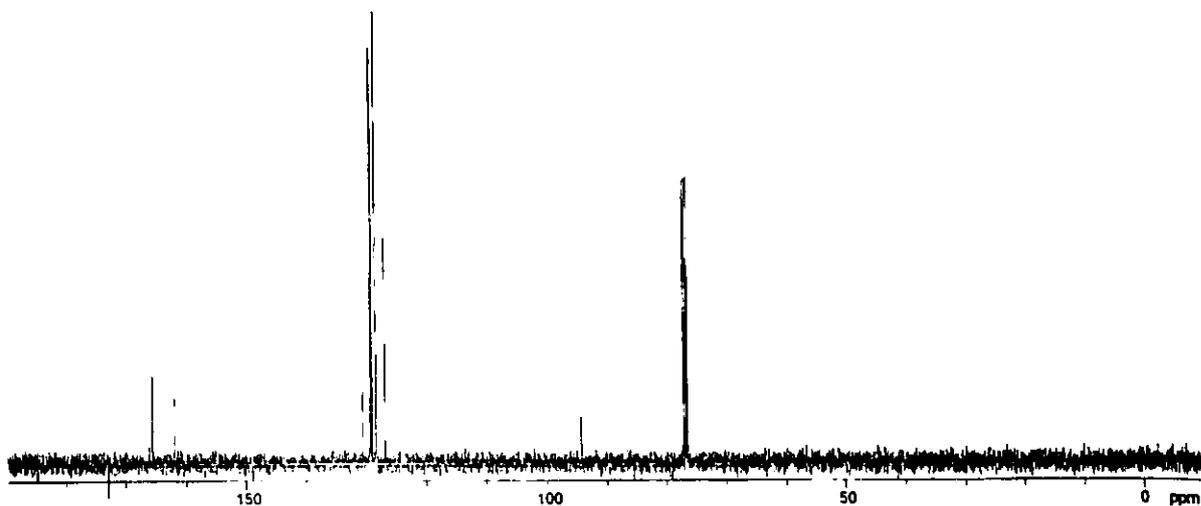


(Z)-2,3-difenilpropenonitrilo (1)

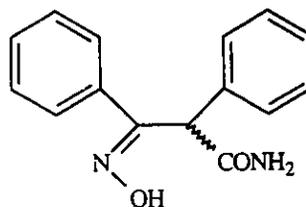
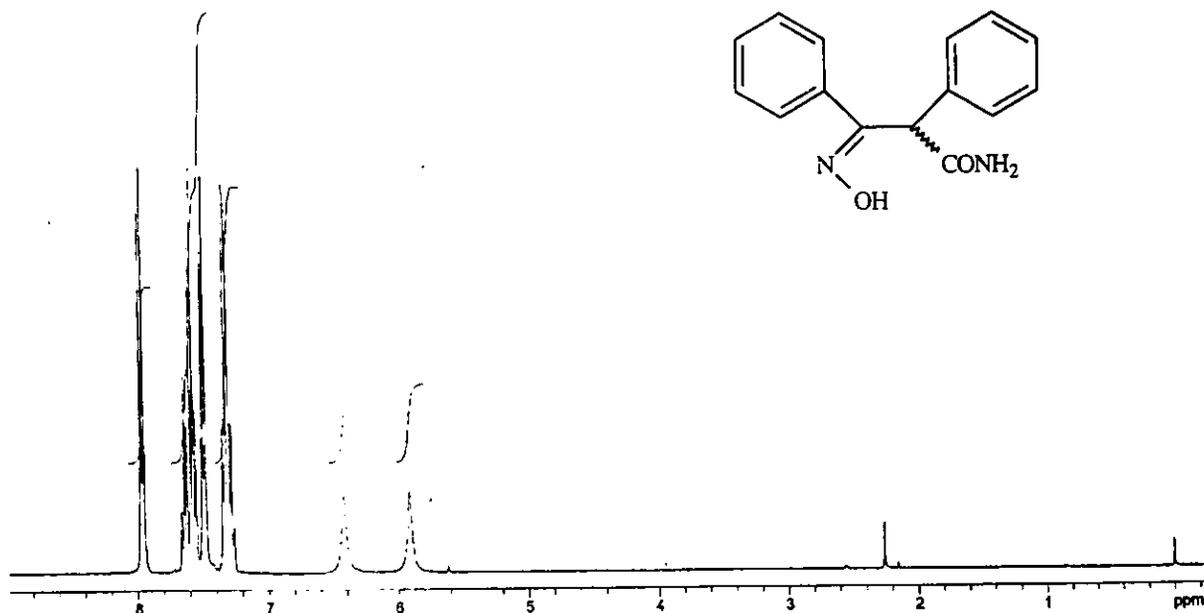


Interpolated Peak Listing

PEAK	POINT	HEIGHT	REL. HT	H2	PPM
1	15660	-15042208	7.32	15660.32	172.920
2	17496	37308K	18.16	14996.94	165.593
3	18405	28027K	13.64	14663.17	161.907
4	26209	31413K	15.29	1327.79	130.600
5	26511	27861K	13.56	11718.10	129.389
6	26537	80262K	39.07	11708.52	129.283
7	26579	179280K	87.27	11693.25	129.114
8	26620	177608K	86.46	11678.42	128.950
9	26771	177454K	86.38	11623.57	128.345
10	26783	195171K	95.01	11619.24	128.297
11	27132	96717K	47.09	11492.55	126.898
12	35277	19205K	9.35	8533.21	94.222
13	39483	118918K	57.89	7005.14	77.349
14	39570	119192K	58.02	6973.51	77.000
15	39659	120190K	58.51	6941.19	76.643

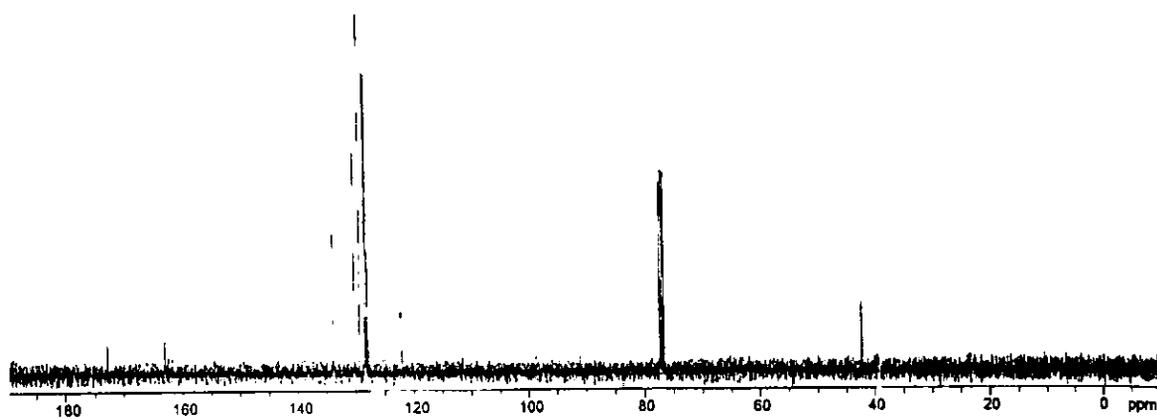


5-amino-3,4-diphenylisoxazol (1b)

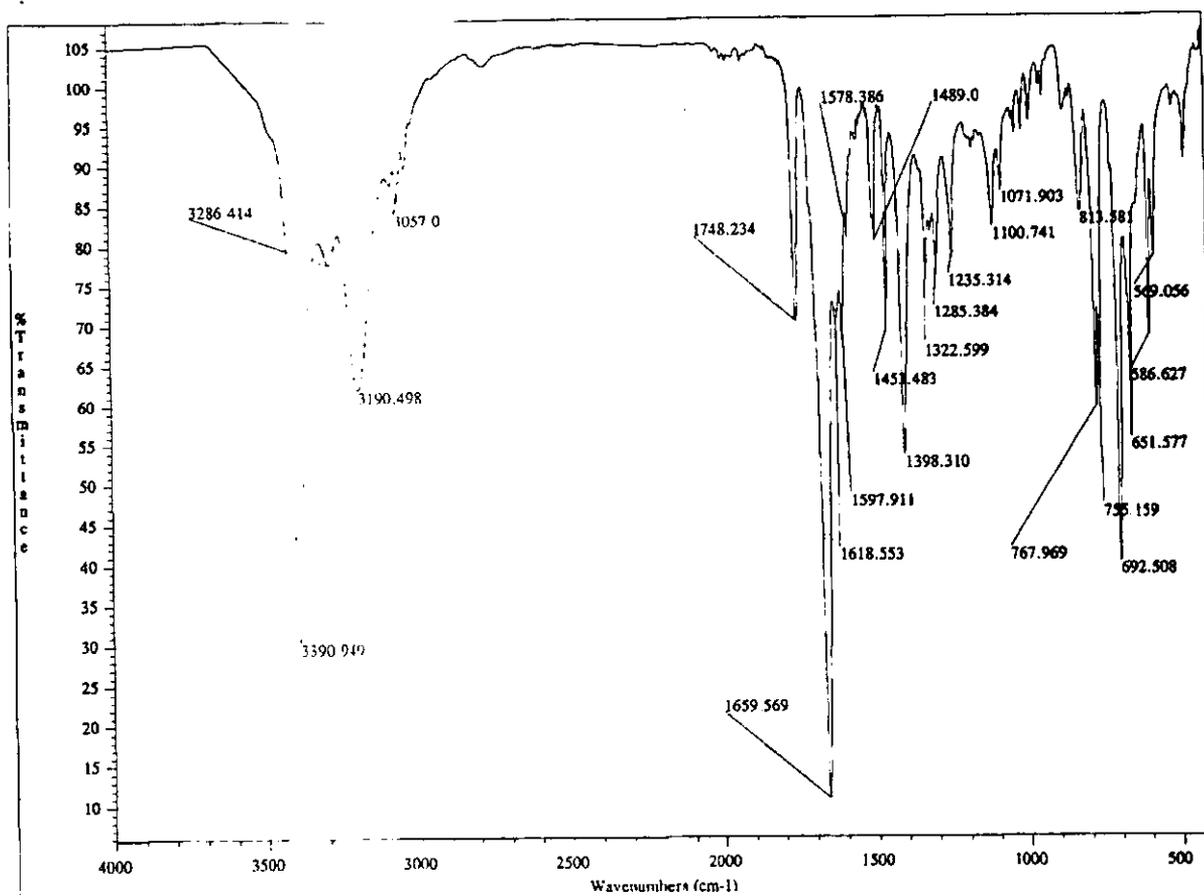
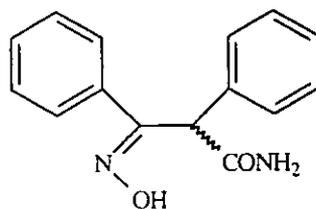


Interpolated Peak Listing

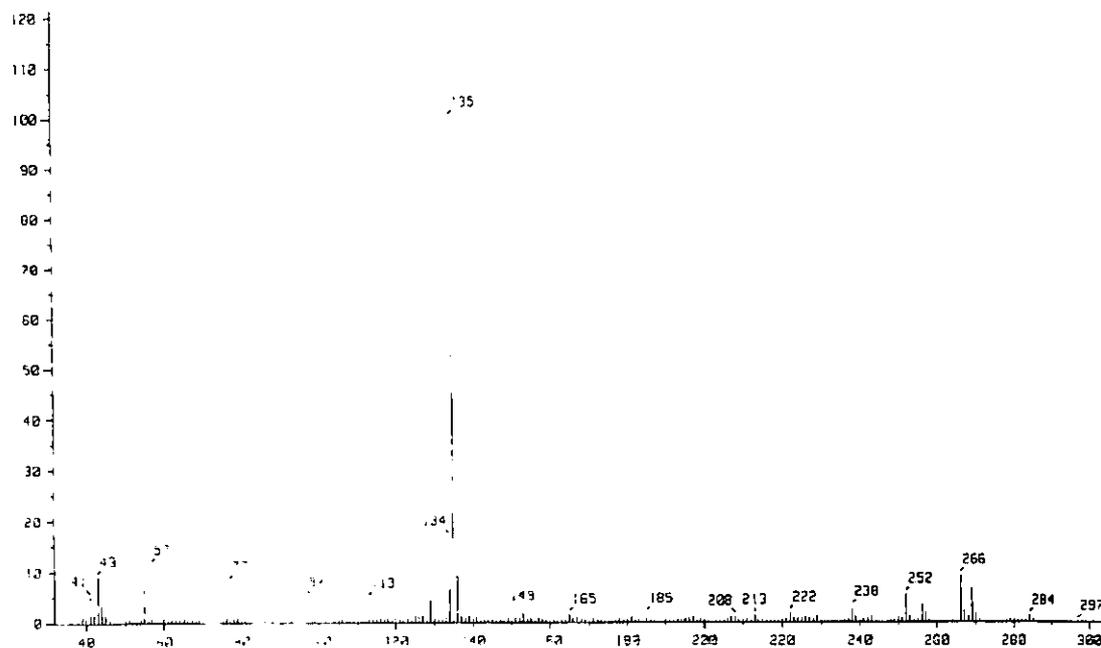
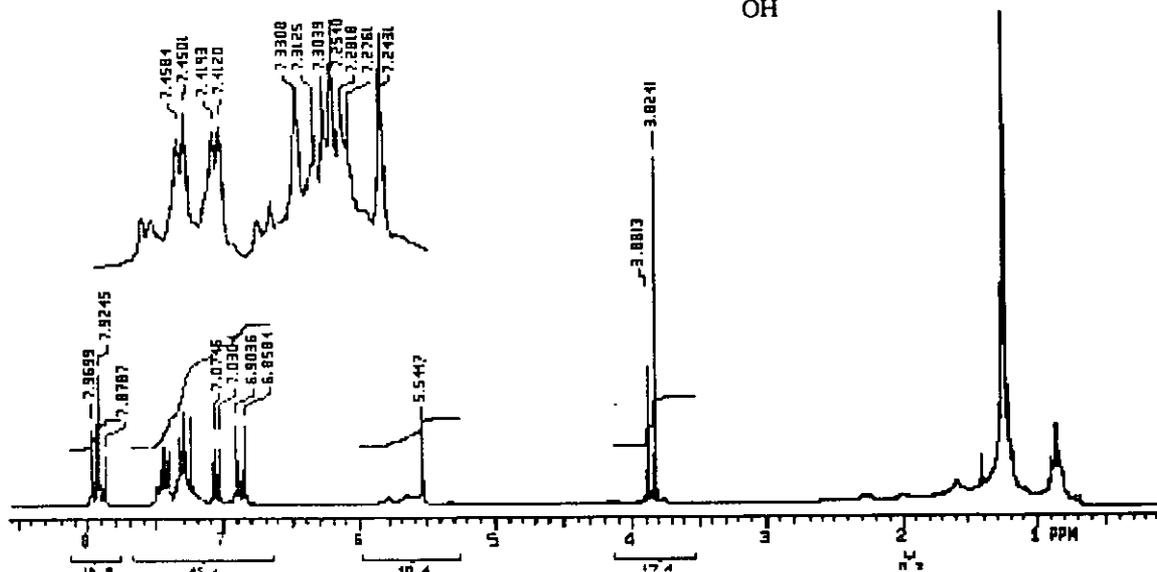
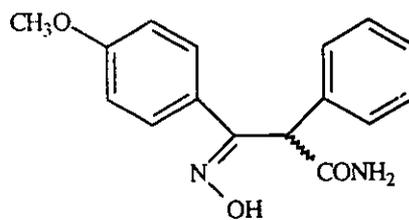
PEAK	POINT	HEIGHT	REL. INT	HZ	PPM
1	7834	171579K	14.34	15651.03	172.815
2	9062	114915K	9.61	14758.35	162.958
3	12351	196576K	16.43	12369.12	136.577
4	12685	445530K	37.24	12126.38	133.897
5	13137	1026M	85.77	11797.89	130.270
6	13256	1292M	108.02	11711.45	129.315
7	13368	1084M	90.60	11630.06	128.416
8	13398	1088M	90.92	11608.02	128.173
9	13434	430121K	35.95	11581.78	127.883
10	14161	126292K	10.66	11253.27	122.048
11	19732	595041K	49.74	7635.33	77.351
12	19776	667485K	55.79	6773.52	77.000
13	19820	652975K	54.58	6741.66	76.648
14	24097	207029K	17.50	3134.19	42.336



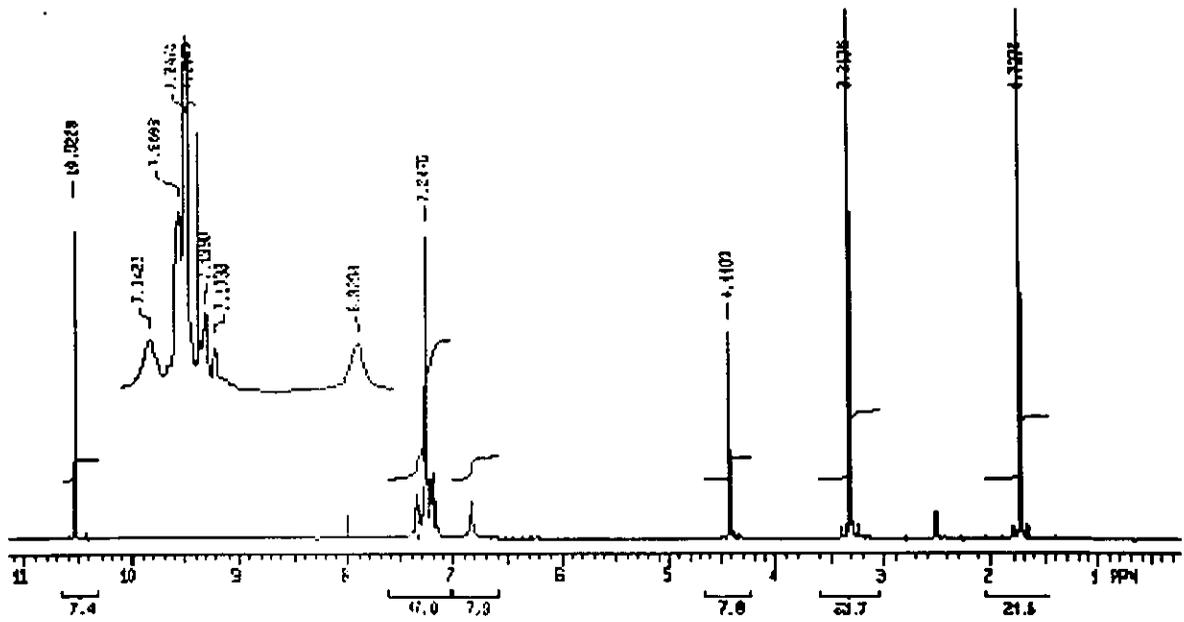
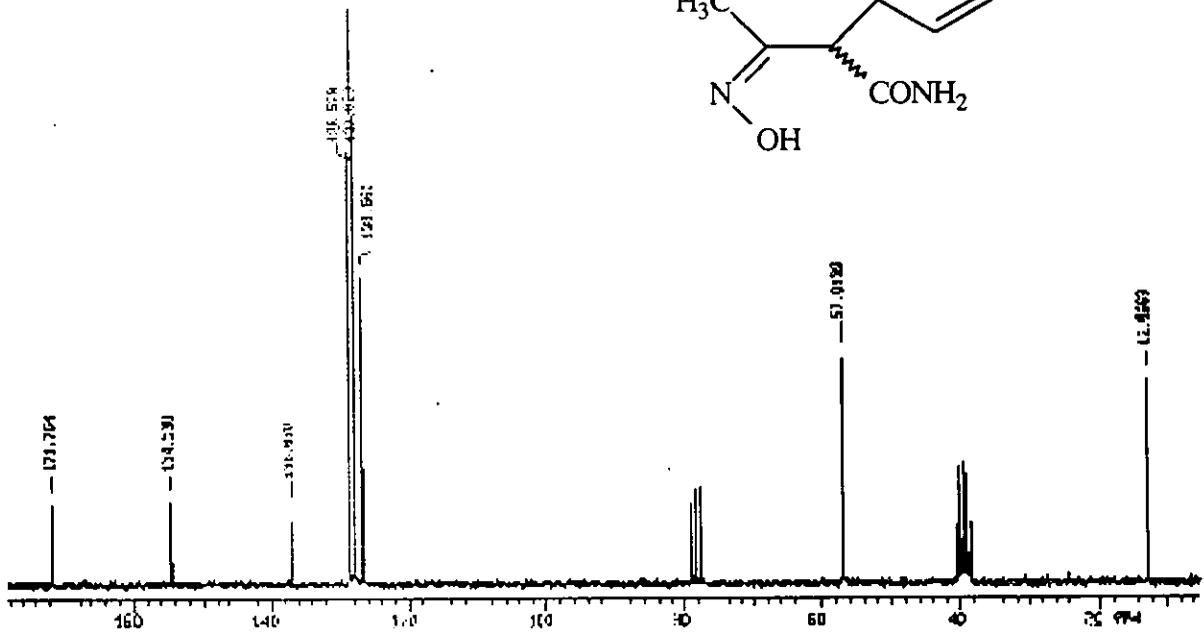
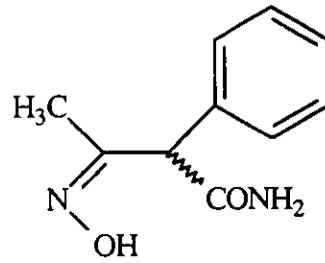
2,3-difenil-3-oximinopropanamida (1c)



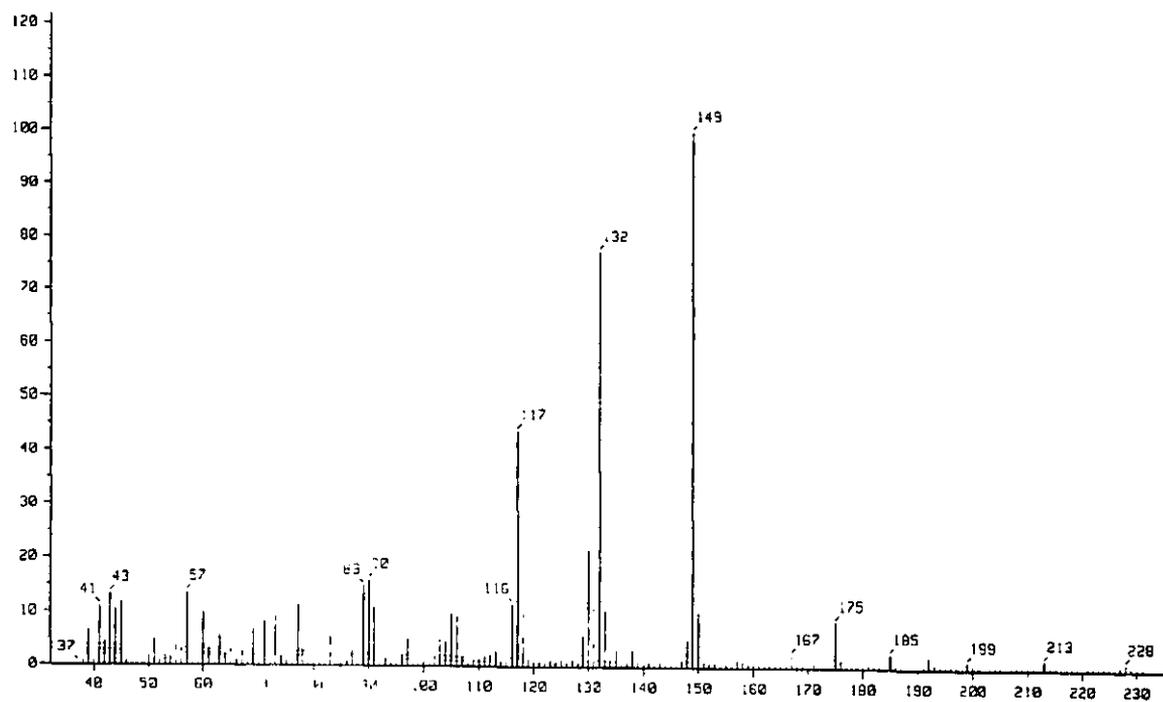
2,3-difenil-3-oximinopropanamida (1c)



2-fenil-3-(4-metoxifenil)-3-oximinopropanamida (3c)



2-fenil-3-oximinobutanamida (2c)



2-fenil-3-oximinobutanamida (2c)