

00551 25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO FACULTAD DE QUIMICA

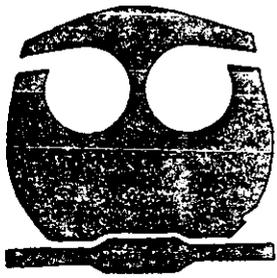
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

299/14

BIOCICLACION REDUCTIVA CON Saccharomyces cerevisiae DE GRUPOS NITRO AROMATICOS ACTIVADOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS) PRESENTA: Q. LUIS FERNANDO VOLGUIN CONTRERAS



MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Asesor: Dr. Arturo Navarro Ocaña.

Jurado Asignado:

Presidente	Dr. Agustín López-Munguía Canales
Vocal	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Suplente	Dr. José Alfredo Vázquez Martínez
Suplente	Dr. Rogelio Pereda Miranda

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 314, Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor **Arturo Navarro Ocaña** por haber dirigido este trabajo, por sus consejos, enseñanzas y confianza.

Al Doctor **Eduardo Bárzana García** por haberme permitido trabajar en su laboratorio, por los consejos y confianza

A la Doctora **Rachel Mata Essayag** y al Doctor **Agustín López Munguía-Canales** por sus valiosos comentarios durante los exámenes tutorales.

Al Doctor **Manuel Jiménez Estrada** por su ayuda.

Al Doctor **Hector Luna Contla** por haberme regalado varias de las 2,4-dinitroacilanilinas utilizadas en este trabajo.

A mi Mamá

a mi Papá y a mi Hermana,

a Nuria

a Arturo Romero

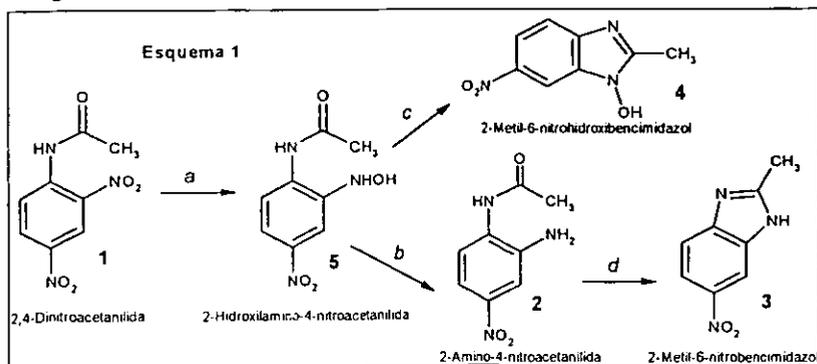
y a todos mis amigos y amigas.

(Arturo Limón Mauricio Torres, Andrea Pozas, Madeleine Sierra, Alfonso G., Emiliano M., Andrés C., Víctor G., Mariano M., Guillermo G., Pilar M., Gabriela S., Elizabeth E., Carlos T., Claudia, Dagoberto, Daniel L., Sergio A., Paola, Karla C., Raymundo P., Alberto P., Adrián P., Omar S., Eneas, Ana M., Paloma C., Gabriel G., Ivalú C., Acely G., Eva L., Carolina L., Estela M., Dulce V., Irene A., Enrique R.)

RESUMEN

En muchas de las metodologías descritas para la síntesis de bencimidazoles y de otros compuestos heterocíclicos con nitrógeno, la reducción de un grupo nitroaromático para formar una amina es un paso clave. Esta reacción, aunque se puede efectuar por una gran variedad de agentes reductores, es poco selectiva y afecta a otros grupos funcionales. Por lo tanto, gran parte de la investigación que se realiza al respecto, está enfocada a la búsqueda de reductores sin esa desventaja y, que además, sean baratos, sencillos de utilizar y que generen el mínimo de desechos tóxicos. Una alternativa interesante que parece cumplir con estos requisitos es el uso de microorganismos.

Saccharomyces cerevisiae es una levadura capaz de reducir químicamente y regioselectivamente grupos nitroaromáticos, por lo cual se decidió investigar sus aplicaciones en la síntesis de bencimidazoles. Se eligió a la 2,4-dinitroacetanilida (1) como un sustrato modelo de este tipo de reacción y se investigó su reducción por la levadura mencionada. Los primeros resultados indicaron que los productos de la biotransformación son la 2-amino-4-nitroacetanilida (2), el 2-metil-6-nitro-1-hidróxibencimidazol (3) y el 2-metil-6-nitrobencimidazol (4) (Esquema 1). Un análisis más detallado a tiempos cortos de reacción, nos permitió aislar y caracterizar al primer intermediario: la 2-hidroxilamina-4-nitroacetanilida (5). Al seguir la concentración de cada especie a lo largo de dos biotransformaciones a diferentes pHs, fue posible proponer el mecanismo del esquema 1. Los pasos *a* y *b* son catalizados por la levadura, mientras que los pasos *c* y *d* ocurren espontáneamente en el medio de reacción favorecidos por un medio ácido. De esta forma, se lograron inhibir los procesos de ciclación y dirigir la reacción hacia la formación mayoritaria de la 2-amino-4-nitroacetanilida (2) al realizar la biotransformación con un pH constante de 7.5. Utilizando el mismo procedimiento se probaron una serie de 2,4-dinitroacetanilinas con la levadura, obteniéndose las 2-amino-4-nitroacetanilidas correspondientes en rendimientos entre un 80 y 90%. Después se realizó la ciclación de estas aminas en ácido acético para formar los 2-alkil-6-nitrobencimidazoles con rendimientos muy parecidos. Esta metodología para producir precursores de bencimidazoles es novedosa, altamente regioselectiva, fácil de realizar en el laboratorio y no genera residuos tóxicos.



ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 COMPUESTOS AROMÁTICOS NITRADOS	1
1.2 SÍNTESIS DE COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS A PARTIR DE COMPUESTOS AROMÁTICOS NITRADOS	3
1.2.1 BENCIMIDAZOLES	3
1.3 REDUCCIÓN QUÍMICA DE GRUPOS NITROAROMÁTICOS	7
1.3.1 REDUCCIÓN DE GRUPOS NITROAROMÁTICOS A NITROSOAROMÁTICOS	8
1.3.2 REDUCCIÓN DE GRUPOS NITROAROMÁTICOS A HIDROXILAMINAS	9
1.3.3 REDUCCIÓN DE GRUPOS NITROAROMÁTICOS A GRUPOS AZOXI.....	11
1.3.4 REDUCCIÓN DE GRUPOS NITROAROMÁTICOS A GRUPOS AZO E HIDRAZO	11
1.3.5 REDUCCIÓN DE GRUPOS NITROAROMÁTICOS A AMINAS AROMÁTICAS (ANILINAS).....	12
1.3.6 REDUCCIÓN REGIOSELECTIVA DE DINITROARENOS	15
1.3.7 PROBLEMAS EN LA REDUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS NITRADOS.....	16
1.4 BIOTRANSFORMACIONES	17
1.5 BIOTRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS NITRADOS	18
1.5.1 NITRORREDUCTASAS.....	20
1.5.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS CON FINES DE SÍNTESIS ORGÁNICA	23
1.5.3 SÍNTESIS DE HETEROCICLOS A PARTIR DE LA REDUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS NITRADOS CON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	26
2 OBJETIVOS	28
3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	29
3.1 MATERIALES Y EQUIPOS	29
3.2 MÉTODOS	30

4 RESULTADOS	35
4.1 COMPORTAMIENTO DE LA 2,4-DINITROACETANILIDA FRENTE A LOS CONSTITUYENTES DEL MEDIO	35
4.2 PRODUCTOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE LA 2,4-DINITROACETANILIDA EN UN MEDIO SIN AMORTIGUADOR	35
4.3 CURSO DE LA REACCIÓN DE LA 2,4-DINITROACETANILIDA CON <i>S.CEREVISIAE</i> EN UN MEDIO SIN AMORTIGUADOR (PH = 3.5)	37
4.3.1 ESPECTROSCOPIA UV	37
4.3.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA EFICIENCIA (CCFAE) O HPTLC ("HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY")	38
4.4 REACCIONES NO ENZIMÁTICAS EN PH ÁCIDO.....	41
4.5 CURSO DE LA REDUCCIÓN DE LA 2,4-DINITROACETANILIDA CON <i>S. CEREVISIAE</i> A PH 7.5	44
4.6 REDUCCIÓN SELECTIVA DE LAS 2,4-DINITROACILANILINAS CON <i>S. CEREVISIAE</i> A PH 7.5	46
4.7 SÍNTESIS DE LOS 2-ALQUILBENCIMIDAZOLES (CICLACIÓN DE LAS 2-AMINO-4-NITROACILANILINAS)	47
4.8 DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS Y ASIGNACIÓN DE ESTRUCTURAS	48
4.8.1 2-AMINO-4-NITRO-ACETANILIDA (2)	48
4.8.2 2-METIL-6-NITROBENCIMIDAZOL (3)	51
4.8.3 2-METIL-6-NITRO-1-HIDROXIBENCIMIDAZOL (4)	52
4.8.4 IDENTIFICACIÓN DE LA 2-HIDROXILAMINA-4-NITROACETANILIDA	55
4.8.5 CARACTERIZACIÓN DE LA 2-HIDROXILAMINA-4-NITROACETANILIDA	58
4.8.6 DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LAS 2-AMINO-4-NITROACILANILINAS	59
4.8.7 DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS 2-ALQUIL-6-NITRO-BENCIMIDAZOLES	62
5 DISCUSIÓN	65
6 CONCLUSIONES	75
7 REFERENCIAS	76

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Compuestos Aromáticos Nitrados

Los primeros compuestos aromáticos nitrados fueron sintetizados en 1834 por Mitscherlich al tratar hidrocarburos del alquitrán con una mezcla de ácido nítrico y sulfúrico.¹ Desde entonces, esta reacción, con sólo ligeras modificaciones,² se utiliza para preparar de una manera muy sencilla una cantidad enorme de compuestos nitrados. El más importante de todos es el nitrobenzono, del cual se producen 1,980,000 toneladas cada año en todo el mundo (Figura 1).³

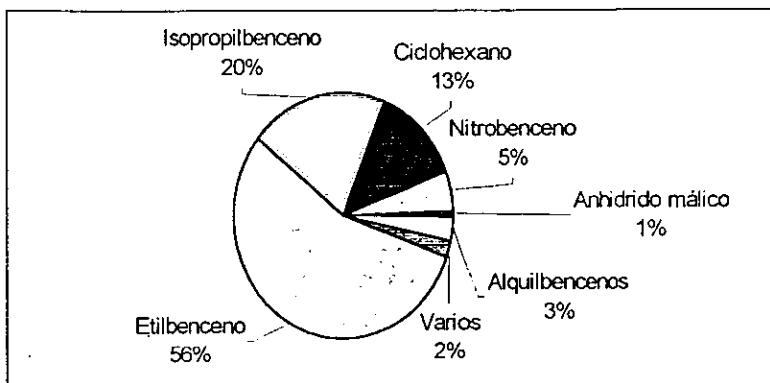


Figura 1. Principales productos secundarios del benceno.

Aunque el nitrobenzono se puede utilizar como disolvente, agente oxidante o transformarse a cloronitrobenzono o ácido nitrobenzensulfónico (intermediarios de gran utilidad en la fabricación de tintas, pesticidas y farmacéuticos), entre el 90 y 95% de su producción mundial se destina a la fabricación de anilina.³ Esto se debe a que la anilina es uno de los compuestos más importantes de la química aromática, ya que muchos productos químicos de primera necesidad se preparan a partir de ella. A nivel industrial sobresalen los isocianatos que son utilizados para producir poliuretanos y que consumen cerca del 50% de la producción mundial de este compuesto (Figura 2).³

Al igual que el nitrobenzono, muchos compuestos aromáticos nitrados tienen como principal destino la síntesis de aminas, ya que estos compuestos juegan un papel muy destacado en la industria de las tintas, pigmentos, fármacos y agroquímicos. Además, son

compuestos muy útiles en la síntesis orgánica porque pueden transformarse a muchos otros grupos funcionales, ya sea mediante la formación de sales de diazonio o por reacciones de acilación y alquilación, entre otras (Figura 2). Por estas razones, la reducción de grupos nitro a aminas es una reacción sumamente importante.

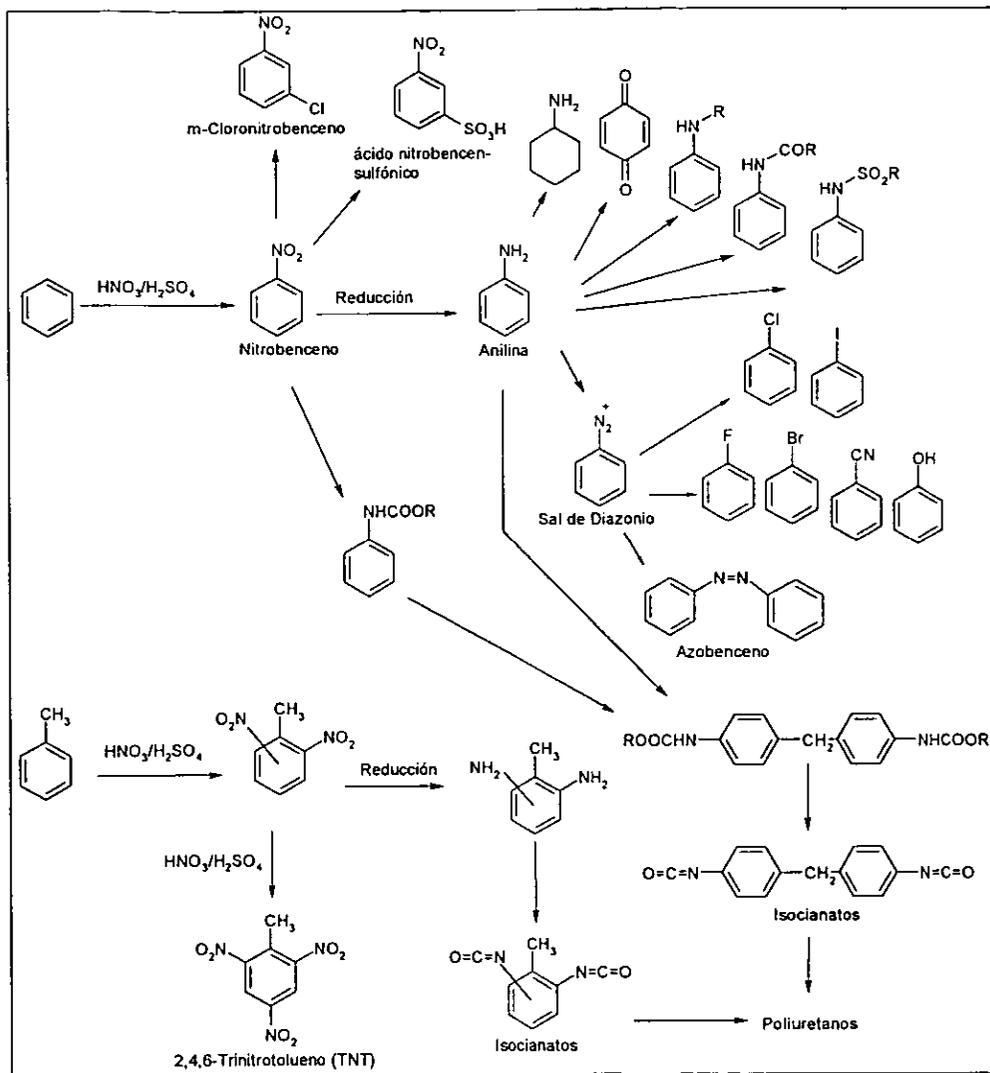


Figura 2. Algunos derivados del nitrobenenceno, el dinitrotolueno y la anilina.

1.2 Síntesis de Compuestos Heterocíclicos a Partir de Compuestos Aromáticos Nitrados

Diversos compuestos aromáticos nitrados que poseen sustituyentes adecuados en la posición *orto*, se utilizan en la preparación de compuestos heterocíclicos con átomos de nitrógeno (Figura 3).^{4,5,6} Este tipo de heterociclos son muy importantes porque forman parte de la estructura de una enorme cantidad de productos farmacéuticos, agroquímicos y de uso veterinario.⁶ También, algunos se han llegado a aprovechar como aditivos, abrillantadores, antioxidantes, colorantes e intermediarios en síntesis orgánica, aunque su importancia es menor en estas áreas.⁶ La ruta sintética de estos compuestos normalmente involucra la reducción del grupo nitro para formar una amina que después ayuda a cerrar el anillo (Figura 3a-e). Aunque algunas ocasiones se utiliza una base fuerte y el grupo nitro funciona como un electrófilo sobre el cual se cierra el anillo (Figura 3f). Nuevamente, en estos procesos la reducción del nitro juega un papel muy importante.

1.2.1 Bencimidazoles

Los bencimidazoles son un caso particular de heterociclos que normalmente se preparan a partir de compuestos nitrados (Figura 4).^{7,8,9} La síntesis comienza con la reducción de una *orto*-nitroanilina para formar una diamina, la cual se condensa con un ácido carboxílico u otro compuesto electrofílico. En el último paso se cierra el anillo mediante un ataque nucleofílico intramolecular favorecido por un medio ácido o calentamiento.

Los bencimidazoles han demostrado tener un potencial muy grande como moléculas con actividad biológica muy variada. Sobresalen algunos productos antiparasitarios,^{10,11} antihistamínicos,¹² antiulcerativos,¹³ antivirales,^{14,15} antiarrítmicos,¹⁶ cardiotónicos¹⁷ y contra la hipertensión¹⁸ y el asma¹⁹ (Figura 5).

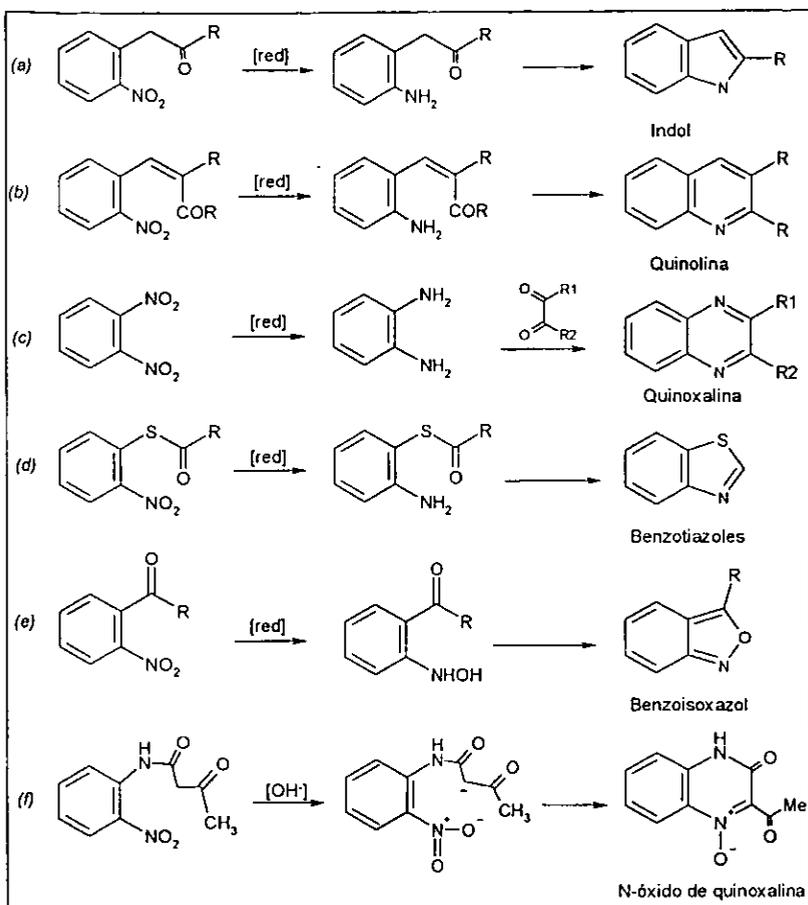


Figura 3. Síntesis de algunos heterociclos a partir de compuestos aromáticos nitrados *orto*-sustituidos.

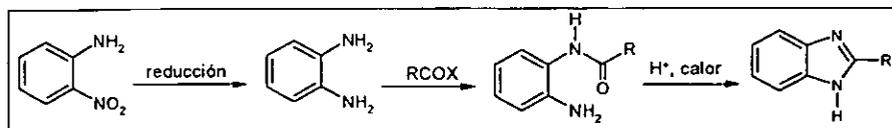


Figura 4. Síntesis de bencimidazoles.

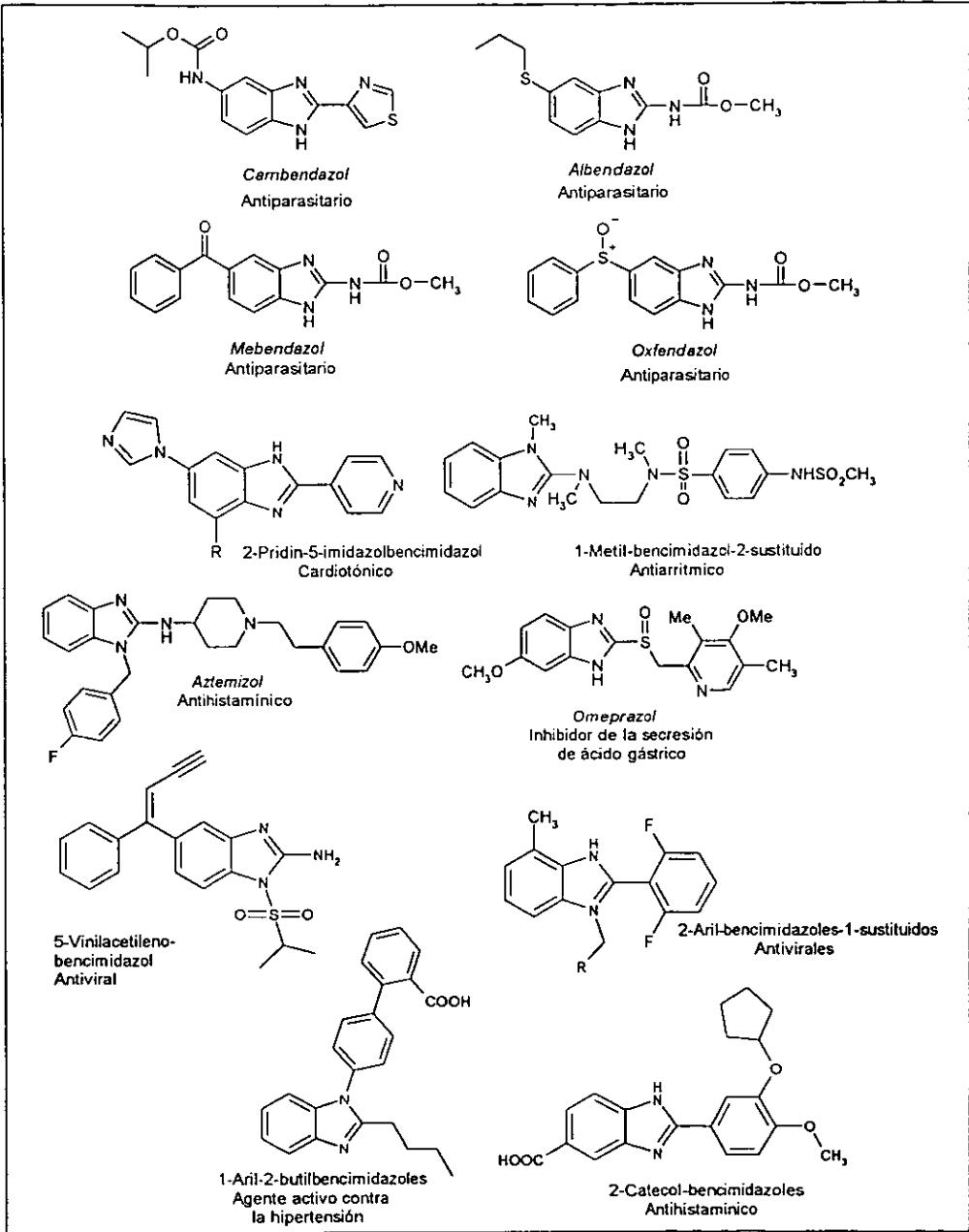


Figura 5. Algunos bencimidazoles comerciales y en fase de investigación con propiedades biológicas importantes.

Debido a que la síntesis de los bencimidazoles es relativamente sencilla y que además muchos de ellos se pueden emplear como productos farmacéuticos, en los últimos años se han preparado varias bibliotecas de estos compuestos con el fin de investigar sus propiedades biológicas. La metodología que se utiliza para producir muchos compuestos diferentes dentro de las bibliotecas, se conoce como química combinatoria y por lo general utiliza reacciones en fase sólida.²⁰ El primer método eficiente para preparar bencimidazoles con dicha técnica apareció hace cinco años (Figura 6).²¹ La síntesis comienza con un compuesto *orto*-fluoronitroaromático unido a una resina, el cual se hace reaccionar con una amina mediante una reacción de sustitución nucleofílica aromática. Después, se reduce el grupo nitro para tener una *orto*-diamina y se condensa con un derivado de un ácido carboxílico para formar el anillo. En el último paso, el compuesto se libera de la resina obteniéndose rendimientos crudos entre el 70 y 95%. Prácticamente bajo el mismo procedimiento se han fabricado ocho bibliotecas de bencimidazoles.²⁰

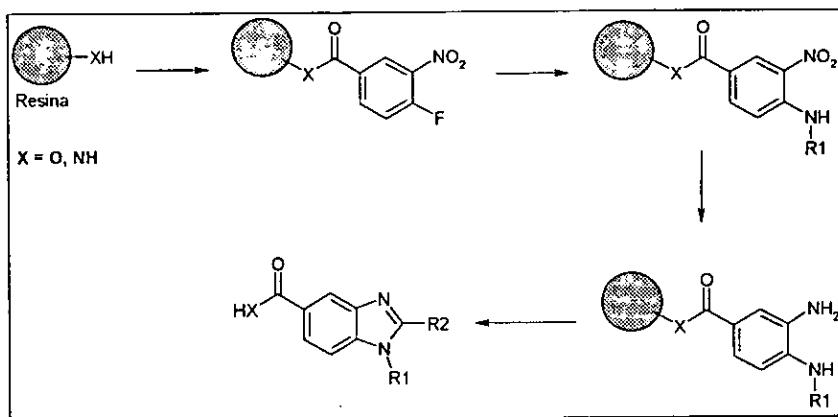


Figura 6. Síntesis de bencimidazoles en fase sólida.

Algunas nuevas variantes de este método utilizan otro tipo de resinas para evitar que los productos presenten los grupos funcionales mediante los cuales las materias primas se unen a la resina.^{22,23} Con esto ya no se limita la variedad de moléculas en las bibliotecas. A continuación se muestra un ejemplo de esta técnica (Figura 7).

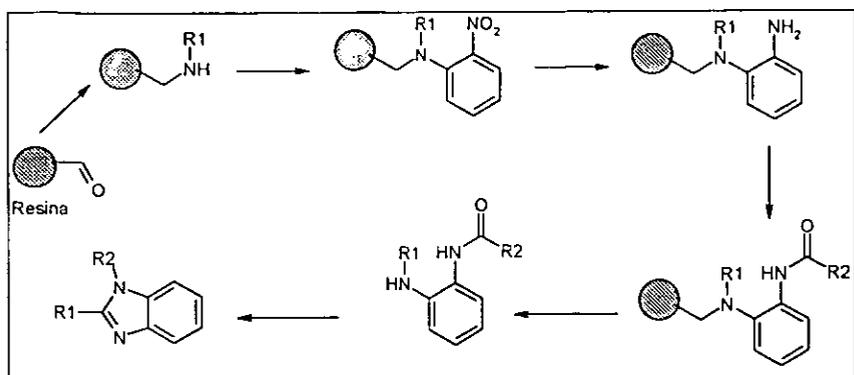


Figura 7. Síntesis de bencimidazoles en fase sólida que no contienen grupos funcionales especiales para unirse a la resina.

1.3 Reducción Química de Grupos Nitroaromáticos

La transformación más común y probablemente más importante de los grupos nitroaromáticos es su reducción para formar aminas. Es quizá también una de las reducciones más antiguas que se han realizado sobre compuestos orgánicos. Los primeros reportes que existen se remontan a 1854,¹ cuando se utilizó hierro y ácido clorhídrico para fabricar anilina a partir de nitrobeneno. Desde entonces, más de una centena de reactivos y técnicas han sido descritas en la literatura para efectuar esta reducción.^{24,25} Sin embargo, a pesar de la enorme cantidad de posibilidades que existen, la reacción sigue siendo objeto de diversos estudios (por ejemplo, en los últimos dos años se han publicado cerca de 20 artículos sobre el tema),^{2,26} la mayoría de ellos enfocados a encontrar nuevos agentes reductores o condiciones de reacción que sean capaces de reducir grupos nitro selectivamente y que, además, puedan hacerlo en procesos poco contaminantes.

El producto final de la reducción de compuestos nitroaromáticos es una amina, aunque en algunos casos se pueden aislar y utilizar con fines preparativos los intermediarios involucrados en el proceso tales como: nitroso, hidroxilamina, azoxi, azo e hidrazo (Figura 8).^{24,27}

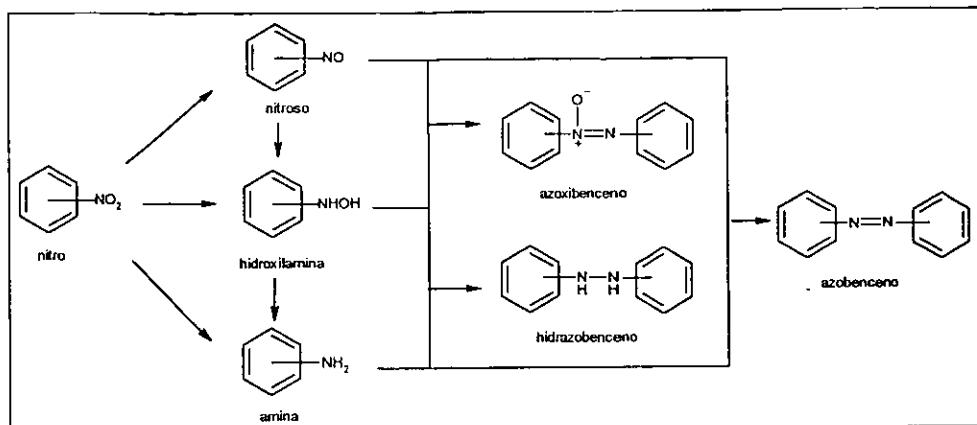


Figura 8. Productos de la reducción de los compuestos nitroaromáticos.

El mecanismo por el cual ocurren estas transformaciones ha sido poco estudiado,²⁷ pero se ha postulado que los grupos nitroso e hidroxilamina son dos intermediarios claves (Figura 8).^{24,27} Los compuestos azoxi, azo e hidrazo se forman a partir de la condensación de dos moléculas de los intermediarios, o de una de ellas con una amina (Figura 8).^{24,27} Generalmente, la formación de cualquiera de estos compuestos es una reacción colateral no deseada, aunque en algunas ocasiones y bajo condiciones especiales, se pueden obtener como productos principales.

1.3.1 Reducción de grupos nitroaromáticos a nitrosoaromáticos

Debido a la gran reactividad del grupo nitroso, es muy difícil obtenerlo utilizando las condiciones en las que normalmente se lleva a cabo la reducción de los grupos nitro. En su lugar se han utilizado reacciones fotoquímicas para prepararlo (Figura 9).²⁸ Sin embargo, esta reacción no es de uso general para todos los compuestos nitrados y muchas veces el grupo nitro se elimina.²⁹

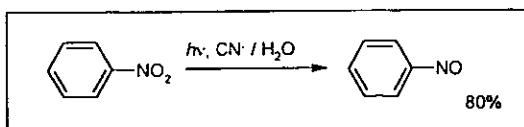


Figura 9. Fotorreducción del nitrobenzénico a nitrosobenzénico.

La formación de grupos nitroso a partir de nitros ha sido poco explorada porque los nitrosobencenos se pueden obtener fácilmente por métodos alternativos como la nitrosación directa^{30,31} y oxidación de hidroxilaminas.³² De hecho, a pesar de que se les considera como intermediarios en la reducción de grupos nitros, han sido muy pocas las veces que se han aislado de una reacción de reducción. Estos pocos ejemplos son referencias muy antiguas²⁸ e inclusive se ha demostrado que, en algunos casos, los intermediarios aislados no eran compuestos nitrosos.³³

1.3.2 Reducción de grupos nitroaromáticos a hidroxilaminas

Las hidroxilaminas han sido detectadas y caracterizadas como intermediarios en diversas reducciones de grupos nitro.³⁴ Esto se debe a que la reducción de las hidroxilaminas, es por lo general, más lenta que la de los grupos nitro y nitroso,³⁵ y a veces se acumulan antes de ser reducidas a las aminas correspondientes. Existen varios agentes reductores que permiten detener la reducción en este intermediario y obtener a las hidroxilaminas como producto único o principal (Tabla 1).

Tabla 1. Agentes reductores que se han reportado en la obtención de hidroxilaminas.

		
Agente reductor	Rendimientos %	Referencia
Zn, NH ₄ Cl, H ₂ O	12-73	36,37
N ₂ H ₄ , Ni Raney	55-88	38
N ₂ H ₄ ·H ₂ O, 5%Rh-C	75-85	39
N ₂ H ₄ /Pd-C/THF/EtOH	58-100	40,
NaH ₂ PO ₂ , Pd/C	82-91	41
H ₂ /Pd-C	80	24
NaBH ₄ , Te(cat)	63-92	42
NaBH ₄ /Sb(cat)	73-88	43
KBH ₄ /BiCl ₃	60-89	44
(Et ₄ N)[Fe(S ₂ -o-xylyl) ₂]	0-93	45

El procedimiento clásico es la reducción con zinc y cloruro de amonio,³⁶ sin embargo, los rendimientos son muy variables dependiendo del compuesto nitrado y del pH empleado.³⁷ Se han obtenido mejores resultados utilizando hidrazina con diferentes catalizadores,^{38,39} o bien hidrogenación con fosfito de sodio en paladio.^{40,41} El hidrógeno molecular produce buenos rendimientos para preparar la fenilhidroxilamina, pero se ha utilizado poco en compuestos con otros sustituyentes.²⁴ El uso de hidruros con un metal es una metodología más reciente en la cual también se han obtenido buenos resultados aun con la presencia de otros grupos funcionales susceptibles de hidrólisis o de reducción (CN, Cl, CO₂Et, NO₂).^{42,43}

Un método muy interesante es el uso de un complejo de hierro (III) y un ditiol que asemeja el sitio activo de la rubredoxina (proteína hierro-azufre sin grupo hemo) y que lleva a cabo la reducción de los nitros a las hidroxilaminas selectivamente (Figura 10).⁴⁵

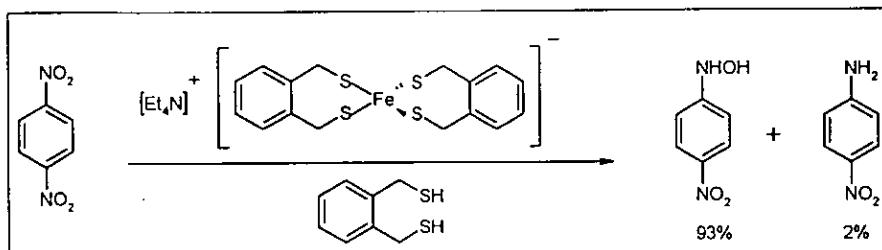


Figura 10. Reducción de compuestos aromáticos nitrados por o-xileno- α, α' -ditiol y un complejo de hierro (III).

Aunque la mayoría de las hidroxilaminas aromáticas pueden ser aisladas y caracterizadas por métodos espectroscópicos, no son compuestos muy estables y se pueden descomponer fácilmente con el oxígeno del aire a temperatura ambiente.³⁶⁻⁴⁴ Varias de las hidroxilaminas reportadas en la literatura se hicieron reaccionar con cloruros de ácido,^{38,39} o se oxidaron con aire para formar derivados más estables y así poder ser caracterizadas (Figuras 11 y 13).^{43,44}

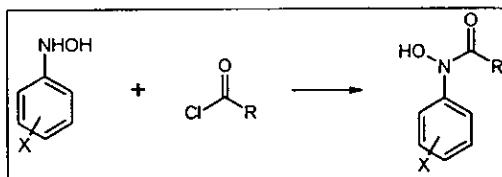


Figura 11. Derivatización de las hidroxilaminas inestables con cloruros de ácido.

1.3.3 Reducción de grupos nitroaromáticos a grupos azoxi

Los compuestos azoxi se obtienen generalmente a partir de la reducción de grupos nitro en medio básico. Una de las técnicas con mejores rendimientos y muy pocos subproductos es la reducción con glucosa en medio básico (Figura 12).³³

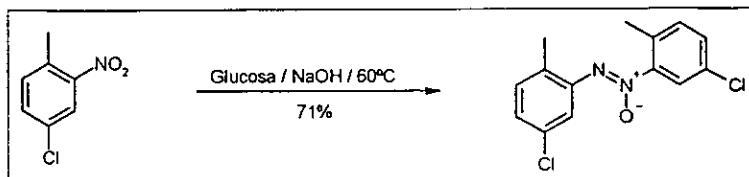


Figura 12. Síntesis de azoxibenceno con un carbohidrato y NaOH.

Otro método consiste en oxidar a las hidroxilaminas con oxígeno del aire al grupo nitroso en un medio básico. Bajo estas condiciones, conforme se produce el compuesto nitroso, se condensa rápidamente con la hidroxilamina restante para generar el compuesto azoxi (Figura 13).^{43,44,46}

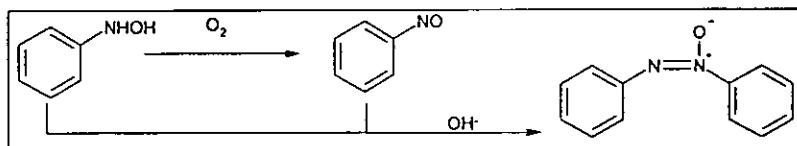


Figura 13. Formación de azobenceno a partir de fenilhidroxilamina y nitrosobenceno.

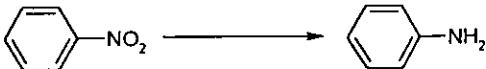
1.3.4 Reducción de grupos nitroaromáticos a grupos azo e hidrazo

La reducción con zinc en medio fuertemente básico produce una mezcla de los compuestos azo e hidrazobenceno, pero estos últimos se pueden reoxidar con el aire para dar un buen rendimiento final de los compuestos azo.^{24,33} Un mejor método para obtener los compuestos azos es utilizar hidruros de litio y aluminio.^{24,27} Un nuevo método para obtener hidrazoarenos en buenos rendimientos es con KOH y Al,²⁶ así como el uso de hidrogenación catalítica en condiciones controladas.²⁴

1.3.5 Reducción de grupos nitroaromáticos a aminas aromáticas (anilinas)

Existe una gran cantidad de agentes reductores para llevar a cabo esta reacción. En la tabla 2 se enlistan algunos de los ejemplos más representativos.

Tabla 2. Reducción de nitrobenzeno a anilina.

		
Agente Reductor	Rendimiento (%)	Referencia
Fe, H ₂ O / Fe, HCl	46-100	24,25,27,33
Zn, HCl	55	24,25,27,33
Sn, HCl	75	24,25,27,33
Sm, I ₂	56	47
H ₂ Pt	100	24,25,27,33
H ₂ Pd	90-100	24,25,27,33
H ₂ Ni Raney	95	25,27,33
H ₂ PtO ₂	100	24,25,27,33
H ₂ PtO ₂ -RhO ₂	100	24,25,27,33
Ciclohexeno/ Pd	90	48
N ₂ H ₄ /Ni Raney	95	24, 25
HCOOH 10%Pd-C	80-93	49
SnCl ₂	80-96	50
CO, H ₂ O, Ru ₃ (CO) ₁₂	99	51
NaBH ₄ -SnCl ₂	65-98	52
Na ₂ S, S, NH ₄ Cl	71	53
Tioles	40	54
Reducción Electroquímica	22-97	55
Reducción Enzimática	0-100	ver sección 1.5.2

Los métodos más antiguos y comunes son probablemente la utilización de un metal (Fe, Zn y Sn) en un medio ácido. El hierro se sigue utilizando por ser barato y porque no ataca muchos otros grupos funcionales²⁴. El zinc se utiliza más para formar compuestos azoxi o

hidroxilaminas, sin embargo, recientemente apareció un método en el cual se utiliza este metal y cloruro de amonio en agua a 80°C para reducir nitroaromáticos en altos rendimientos (81-97%),⁵⁶ también se ha empleado este metal con agua en estado supercrítico para realizar la reducción.⁵⁷ El estaño se ha sustituido completamente por el cloruro de estaño porque es más barato y fácil de conseguir, además de que la sal es soluble en mezclas de agua-alcohol que permiten llevar a cabo la reducción en un medio homogéneo.²⁴ El cloruro de estaño es el agente reductor que más se ha utilizado para sintetizar bencimidazoles en fase sólida.⁵⁸ En los últimos años se han introducido los siguiente metales a la lista de los que reducen grupos nitro: aluminio(0),⁵⁹ zirconio(IV),⁶⁰ indio(0)⁶¹ y samario(0).⁶² Este último en la presencia de un compuesto transportador de electrones, puede reducir químiomselectivamente una gran cantidad de grupos funcionales muy sensibles (Figura 14).

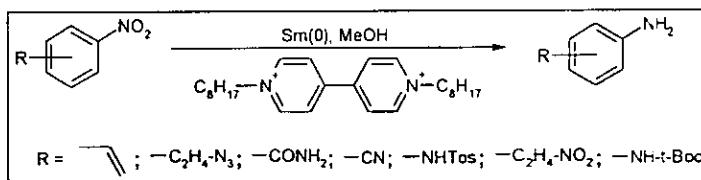


Figura 14. Reducción selectiva de compuestos aromáticos nitrados con Sm(0) y dibromuro de 1,1'-dioctil-4,4'-Bipiridinio.

Desde el descubrimiento de la hidrogenación catalítica a finales del siglo XIX,²⁴ este método se ha utilizado para reducir compuestos aromáticos nitrados. Entre los catalizadores más populares se encuentran: el platino o el PtO₂,³⁵ el Paladio,³⁵ el Rodio y el Niquel-Raney.^{24,34} En la industria se utiliza esta metodología para producir aminas aromáticas con algunos sustituyentes, pero se emplean catalizadores más baratos como NiS₂, Cu, Mn, Cr, Ba, Zn o Fe con diferentes soportes y pequeñas cantidades de otros metales.^{3,34}

El uso de hidrógeno molecular tiene dos desventajas. La primera es el equipo y las medidas de seguridad que se deben seguir para utilizarlo; la segunda y más importante, es que las condiciones en las que se lleva a cabo la reducción, deben de ser controladas cuidadosamente, ya que muchos otros grupos funcionales se pueden reducir antes o junto con el nitro. Por ejemplo en la hidrogenación catalítica de la 4-cloro-3-nitroacetofenona (Figura 15), el cloro se elimina, el nitro se reduce a la amina y el carbonilo se hidrogena al alcohol.⁵¹

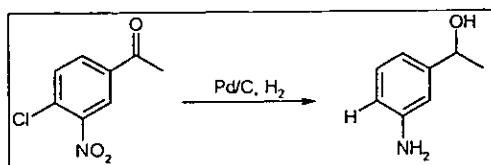


Figura 15. Hidrogenación catalítica de la 4-cloro-3-nitroacetofenona.

Para evitar los riesgos y problemas que tiene el hidrógeno molecular, se han investigado otros compuestos que puedan transferir hidrógeno a los grupos nitros utilizando los mismos catalizadores pero en condiciones más suaves y selectivas. La hidracina y el ácido fórmico son dos compuestos que permiten llevar a cabo la reducción en un medio homogéneo y a presión atmosférica., observándose en algunos casos una mayor selectividad.^{49,63}

Otra metodología importante para realizar la reducción de compuestos nitro aromáticos es el uso de monóxido de carbono y agua en la presencia de un catalizador, por ejemplo $\text{Ru}(\text{CO})_{12}$. Con este procedimiento se pueden producir quimioselectivamente anilinas, además de que en ciertos casos se pueden formar aminas sustituidas, amidas y ureas.⁵¹

El uso de hidruros metálicos para reducir grupos nitros produce generalmente una mezcla de compuestos azo e hidrazo,²⁷ sin embargo, cuando se utilizan en combinación con un metal ($\text{NaBH}_4\text{-SnCl}$) la reducción ocurre hasta las anilinas con buenos resultados y buena selectividad.⁵²

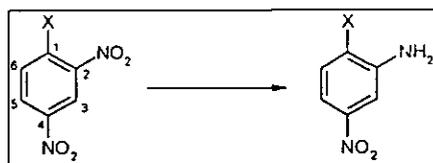
La reducción con sulfuros y polisulfuros se conoce desde hace mucho tiempo y por lo general, es una reacción noble con buena quimioselectividad.⁵³ También los ditioles que forman puentes de disulfuro se han utilizado para realizar la reacción.⁵⁴

La reducción electroquímica es un buen método para reducir grupos nitros,⁵⁵ sin embargo, como método preparativo no se utiliza mucho quizás porque requiere de equipo especializado para llevar a cabo la reacción.

1.3.6 Reducción regioselectiva de dinitroarenos

La mayoría de los reactivos mencionados anteriormente se pueden utilizar para reducir completamente compuestos polinitrados a poliaminas. Sin embargo, son pocos los adecuados cuando se quiere reducir selectivamente un grupo nitro en una molécula con dos o más de estos grupos funcionales. Por ejemplo, para los compuestos 2,4-dinitrosustituídos existen relativamente pocos compuestos capaces de reducir selectivamente el nitro en la posición dos (Tabla 3). Para la reducción selectiva en la posición cuatro, existe un número menor de reactivos (Tabla 4).

Tabla 3. Reducción regioselectiva del grupo nitro en la posición 2 de compuestos 2,4-dinitrosustituídos



X	Agente reductor	Rendimiento (%)	Referencia
H	HCO ₂ H·Et ₃ N/Pd	77	64
H	Fe/AcOH	50	65
CH ₃	Fe/AcOH	71	65
CH ₃	H ₂ /RuCl ₂ (Pfen ₃) ₃	37	66
OH	HCO ₂ H·Et ₃ N/Pd	57	64
OH	Na ₂ S, NH ₄ OH	67	24
OCH ₃	HCO ₂ H·Et ₃ N/Pd	24	64
NH ₂	H ₂ /5%Rh(Al ₂ O ₃), NH ₄ OH	87	24
NH ₂	HCO ₂ H·Et ₃ N/Pd	49	64
NH ₂	N ₂ H ₄ ·H ₂ O/Ni-Raney	95	67
NH ₂	NaHS	80	68
NHCOCH ₃	HCO ₂ H·Et ₃ N/Pd	56	64
NMe ₂	SnCl ₂	72	24
CHO	TiCl ₃	50	24

Tabla 4. Reducción regioselectiva del grupo nitro en la posición 4 de compuestos 2,4-dinitrosustituidos



X	Agente reductor	Rendimiento (%)	Referencia
CH ₃	HCO ₂ H·Et ₃ N/Pd	92	64
NH ₂	H ₂ /5%Pt(C) HCl	70	24
CH ₃	Ni-Raney-PrOH,AcOH	93	69
CH ₃	Ni/ Ac.maleico, AcOH	80	70

1.3.7 Problemas en la reducción de compuestos aromáticos nitrados

A pesar del gran número de reactivos que se han mencionado para reducir grupos nitro, esta área de la química sigue teniendo una investigación muy activa y se debe principalmente a que todavía no se cuenta con el reductor ideal. La mayoría de los agentes reductores que se conocen pueden presentar en mayor o menor medida los siguientes problemas:

- 1) Carecen de quimioselectividad. Además de reducir al grupo nitro, hacen lo mismo con dobles y triples ligaduras, carbonilos y azidas; hidrolizan los grupos ciano y amida; destruyen grupos protectores de aminas, carboxilos e hidroxilos; deshalogenan y en algunos casos eliminan al grupo metoxilo.
- 2) Generan como subproductos a los intermediarios de reducción, azo, azoxi, e hidrazo, en diferentes proporciones. Estos compuestos dificultan la purificación de los productos y bajan los rendimientos de las reacciones.
- 3) Muestran poca regioselectividad, así que no discriminan entre dos grupos nitro presentes en la molécula.
- 4) Son métodos que generan desechos tóxicos.

Por lo tanto, el desarrollo en esta área se enfoca al descubrimiento de nuevos agentes reductores o nuevas condiciones de reacción que resuelvan los cuatro problemas planteados anteriormente. Una opción que podría cumplir con estos requisitos y que ha sido poco explorada es la reducción de grupos nitros por biocatalizadores.

1.4 Biotransformaciones

Durante los últimos veinte años, los métodos tradicionales de síntesis orgánica se han enriquecido y complementado con la introducción de nuevas técnicas que utilizan catalizadores de origen biológico (enzimas, células completas, anticuerpos catalíticos o ribozimas) para transformar compuestos naturales o sintéticos.⁷¹ Estas metodologías conocidas como biocatálisis o biotransformaciones han tenido un impacto muy importante en la química orgánica. Por ejemplo, en 1991 el 8% de todos los artículos publicados en el área de síntesis orgánica contenían en algún paso una biotransformación⁷² y este porcentaje ha permanecido relativamente constante hasta 1999.¹²⁸ Inclusive, en algunas áreas la importancia que han adquirido es aun mayor, como es el caso de la síntesis asimétrica, donde cerca del 15% de los trabajos que son publicados utilizan un método biocatalítico.⁷¹

El éxito de las biotransformaciones radica en que pueden efectuar reacciones químicas que por los métodos tradicionales son difíciles de conseguir, por ejemplo, la generación de centros quirales, resolución de mezclas racémicas, funcionalización de un carbono no activado y conversiones selectivas de grupos funcionales de igual reactividad (Figura 16).⁷³

Además, los biocatalizadores tienen la ventaja de funcionar a presión y temperatura ambientes, ser compatibles entre ellos, tener por lo general una alta eficiencia, ser quimio, regio y estereo selectivos y ser biodegradables.⁷¹

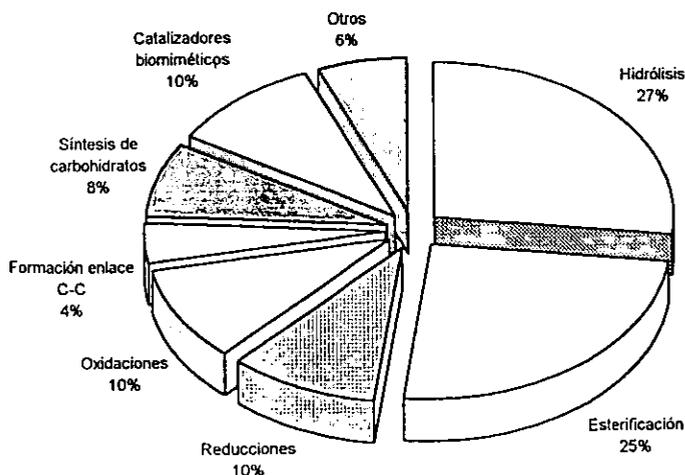


Figura 16. Investigación realizada en el campo de las biotransformaciones.

1.5 Biotransformación de compuestos aromáticos nitrados

Los compuestos aromáticos nitrados normalmente no se encuentran en contacto con los seres vivos, de hecho, sólo se conocen unas cuantas moléculas con este grupo funcional que sean de origen biológico. Los más importantes son el cloranfenicol, un antibiótico de amplio espectro que se aisló del hongo *Streptomyces venezuelae*,⁷⁴ los ácidos aristolóquicos purificados de las plantas del genero *Aristolochia*¹²⁷ y la 3-nitrotirosina, que se ha detectado en células humanas cuando hay un elevado nivel de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y del ión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Figura 17).⁷⁵

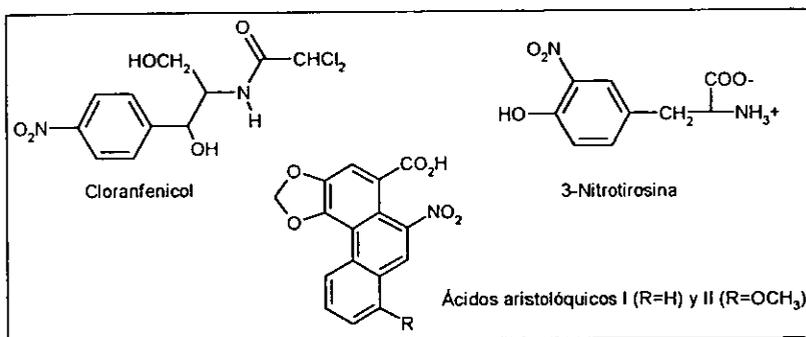


Figura 17. Compuestos aromáticos nitrados más importantes de origen natural.

A diferencia del medio ambiente natural, en las zonas pobladas por el hombre, los compuestos aromáticos nitrados de origen sintético se pueden encontrar en grandes concentraciones. Esto se debe principalmente a su uso intensivo en la fabricación de explosivos, tintas, plásticos, agroquímicos y farmacéuticos. Además, otro tipo de nitroaromáticos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos nitrados, se encuentran en las zonas urbanas debido a su formación espontánea en el aire a partir del dióxido de nitrógeno y compuestos provenientes de la combustión incompleta de carbón, diésel, cigarrillos, etc.^{76,77} La presencia de estas sustancias constituye un problema de contaminación muy grave porque son compuestos tóxicos con propiedades mutagénicas y carcinogénicas.⁷⁸

El estudio del mecanismo por el cual los compuestos nitroaromáticos ejercen su actividad citotóxica ha revelado que es necesario una biotransformación del grupo nitro para observar los efectos adversos. En la mayor parte de los organismos vivos, el primer paso de la activación es una reacción de reducción.⁷⁹ En este proceso se generan especies muy reactivas que son las causantes del daño, y aunque en la mayoría de los casos, la naturaleza exacta de los intermediarios se desconoce, se piensa que son los grupos nitroso e hidroxilamina. Este tipo de compuestos reacciona fácilmente con una variedad muy grande de materiales biológicos y pueden sufrir reacciones de condensación con ellos (Figuras 18 y 19),^{80,81} lo cual podría explicar su efecto tóxico y mutagénico.

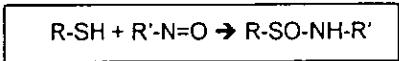


Figura 18. Reacción entre un grupo nitroso y un tiol de una proteína para formar una sulfinamida.

Además de la formación de grupos nitrosos e hidroxilaminas, en muchos organismos aerobios, la reducción de los compuestos nitrados interfiere con el metabolismo del oxígeno y genera aniones superóxidos (O_2^-),⁸³ los cuales son especies muy dañinas para las células. El mecanismo a través del cual se generan los intermediarios nitroso e hidroxilamina, así como los radicales libres, tiene que ver con el tipo de enzimas que intervienen en la activación del grupo nitro.

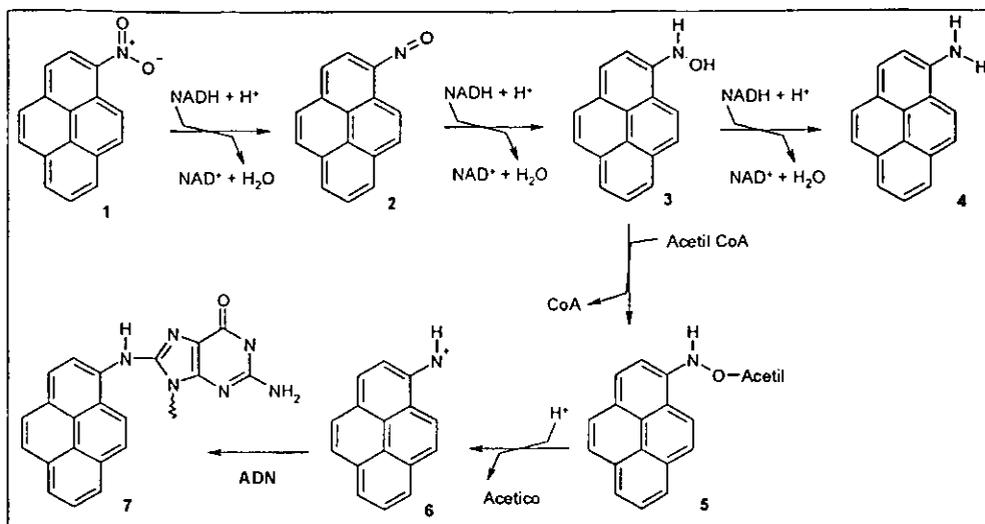


Figura 19. Mecanismo propuesto para la formación de aductos entre compuestos aromáticos nitrados y el ADN, basado en el aislamiento de un aducto entre el nitropireno marcado radioactivamente (1) y el ADN. Este mecanismo podría explicar la forma en que los compuestos aromáticos nitrados ejercen sus efectos mutagénicos y carcinogénicos. Los primeros pasos implican la reducción del grupo nitro para formar una hidroxilamina (3), que después se acetila y forma un ácido hidroxámico (5) el cual puede ser transformado a un ión nitrenio (6) en un medio ácido. Este intermediario electrofílico puede reaccionar con la posición 8 de una guanidina par formar un aducto (7).

1.5.1 Nitrorreductasas

Las enzimas que catalizan la reducción de nitroaromáticos se denominan nitrorreductasas, y prácticamente todas las que se han estudiado a la fecha son flavoproteínas que utilizan nucleótidos de piridina reducidos (NADH o NADPH) como fuente de electrones.⁸² La clasificación que se ha hecho de estas enzimas esta basada en la sensibilidad que tienen al oxígeno cuando realizan la reducción (Tabla 5).

Tabla 5. Enzimas que pueden reducir grupos nitroaromáticos.

Sensibles al oxígeno	Insensibles al Oxígeno.
Citocromos	Nitrorreductasas (NR) Bacterianas
Citocromo c reductasa	NR de <i>Escherichia coli</i>
NADPH:citocromo P-450 (oxido) reductasa	NR de <i>Salmonella typhimurium</i>
NADPH-b5 oxidoreductasa.	NR de <i>Vibrio harveyi</i>
	NR de <i>Bacillus subtilis</i>
Ferredoxinas	NAD(P)H NR de <i>Enterobacter cloacae</i>
Ferredoxina:NADP+ reductasa	NAD(P)H flavin oxidorreductasa de <i>Vibrio fischeri</i>
Ferredoxina Piruvato: oxido reductasa	NAD(P)H flavin oxidorreductasa de <i>Haemophilus influenza</i>
Otras	DrgA (<i>Synechocystis sp.</i>)
Xantina Oxidasa/deshidrogenasa	Thermus NADH oxidasa (<i>Thermus thermophilus</i>)
Tiorredoxina.	
Aldehido oxidasa	NAD(P)H-Quinona oxidoreductasa de mamíferos (aislada de rata, humano, cerdo y vaca).
Glutation reductasa	
Succinato deshidrogenasa	
NADH:ubiquinona reductasa	

Nitrorreductasas sensibles al Oxígeno

Estas enzimas catalizan la reducción de los nitroaromáticos mediante la donación progresiva de electrones simples (Figura 20). En el primer paso se genera un anión radical $\text{NO}_2^{\cdot-}$, el cual ha sido posible detectar y caracterizar por experimentos de resonancia del espín electrónico.^{83,84} En los siguientes pasos el anión continúa reduciéndose por la transferencia de electrones simples hasta la formación de una amina.⁸¹ Este proceso ocurre siempre y cuando no haya la presencia de oxígeno, de lo contrario, el radical $\text{NO}_2^{\cdot-}$ se oxida rápidamente al grupo nitro original y el oxígeno se reduce a un ión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$).^{83,84} Bajo tales circunstancias, el compuesto nitrado funciona solamente como un catalizador para transferir los electrones del NAD(P)H al oxígeno y no se reduce.

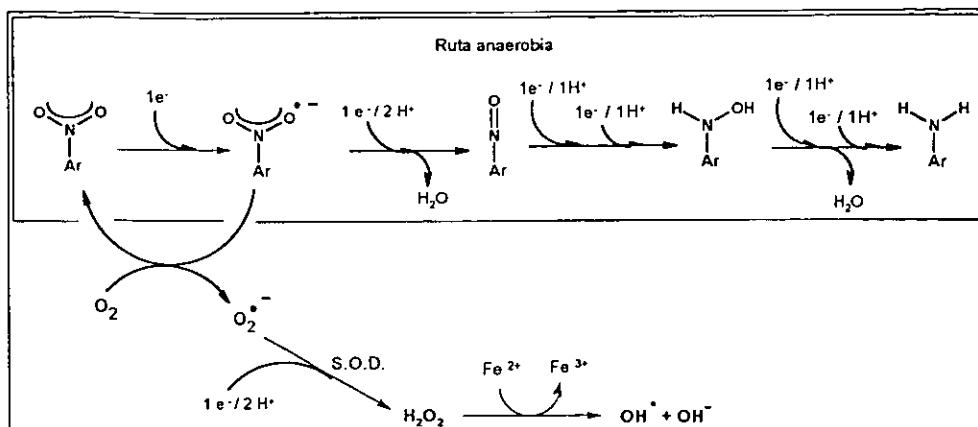


Figura 20. Mecanismo de reducción por las nitrorreductasas sensibles al oxígeno.

Los superóxidos que se forman cuando hay oxígeno son especies muy reactivas que generan daños en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Estos procesos destructivos pueden ser controlados por la presencia de una superóxido dismutasa que transforman al superóxido en agua oxigenada,⁸³ la cual a su vez puede ser dismutada por la catalasa. Sin embargo, si la acumulación de este último compuesto es grande, forma otras especies como el radical OH[•] que son igualmente dañinas.⁸³

Las nitrorreductasas sensibles al oxígeno son enzimas que por lo general catalizan reacciones redox que involucran sustratos relevantes en el metabolismo primario (Tabla 5), por lo cual, la reducción de los nitro parece ser una reacción fortuita que resulta de interacciones no específicas.⁸² La eficiencia con la cual se lleva a cabo esta reducción depende del potencial de reducción de electrón simple de los sustratos en agua a pH fisiológico.⁸⁵

Nitrorreductasas insensibles al Oxígeno

Las enzimas insensibles al oxígeno catalizan la reducción de los grupos nitro mediante un proceso forzoso de dos electrones⁸² (Figura 21). En estos casos no hay evidencia de la formación de un radical NO₂^{•-} y las enzimas pueden funcionar en condiciones aerobias o anaerobias. El mecanismo involucra como intermediarios a los grupos nitroso e hidroxilamina, aunque solamente el último ha podido ser detectado.⁷⁹

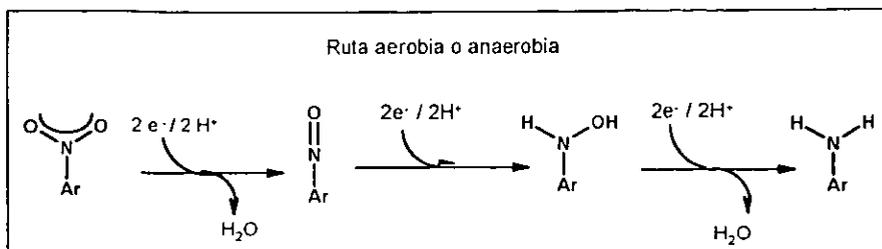


Figura 21. Enzimas insensibles al oxígeno.

Las nitrorreductasas insensibles al oxígeno más conocidas son las bacterianas. Entre ellas sobresale la nitroreductasa NfsA de *Escherichia. coli*, que fue la primera en ser identificada⁸² y de la que más se ha estudiado su estructura,⁸⁶ regulación⁸⁷ y función.⁸⁸ Otras nitrorreductasas importantes se han encontrado en *Salmonella thyphimurium*⁸⁹ y *Enterobacter cloacae*.⁹⁰ En los últimos años, se han descubierto nitrorreductasas en muchas otras bacterias (Tabla 5) y todas comparten características muy similares en su secuencia de aminoácidos. Por esta razón y porque no comparten características con otras flavorreductasas⁸⁹ se han clasificado como una familia especial de nitro/flavin reductasas.⁸⁶

En los eucariontes, solamente se ha identificado una nitrorreductasa insensible al oxígeno: la DT-diaforasa o NAD(P)H:quinona reductasa de mamíferos. Esta flavoproteína normalmente cataliza la reducción de dos electrones de las quinonas a las hidroquinonas por un mecanismo ping-pong utilizando NADH o NADPH.⁹¹ Esta función ayuda a evitar que las quinonas sean reducidas por enzimas sensibles al oxígeno que generen especies muy reactivas de oxígeno.⁹² A diferencia de las nitrorreductasas bacterianas, la DT-diaforasa une FAD como grupo prostético, mientras que las bacterias utilizan FMN.⁸²

1.5.2 Biotransformación de compuestos nitroaromáticos con fines de síntesis orgánica

a) *Saccharomyces cerevisiae*

La biorreducción de compuestos nitroaromáticos a escala preparativa ha sido estudiada principalmente con *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura es un microorganismo que ha servido al hombre desde hace muchísimo tiempo para fabricar pan y cerveza y fue uno de los primeros organismos unicelulares que fue estudiado de manera científica. Por lo cual, no es

sorprendente que los primeros reportes sobre la reducción del nitrobenzeno con esta levadura sean de 1914.⁹³ Sin embargo, es hasta 1989 cuando se retoma el tema y se estudia de una manera más sistemática esta biotransformación.⁹⁴ Hasta el momento se han publicado tres artículos más sobre el tema.^{95,96,99}

La capacidad de reducción de compuestos nitroaromáticos de esta levadura se encuentra muy influenciada por el tipo de sustituyentes que tenga el anillo aromático (Figura 22).^{94,96,99} Cuando existen grupos electroattractores (CN, COOH, COOEt, Cl, CF₃, Br, NO₂) la reacción ocurre con muy buenos rendimientos (80-100%), pero cuando el anillo tiene grupos electrodonadores (OH, NH₂, SH), la reducción de los grupo nitros se da en rendimientos muy pobres (0-15%). Algunos otros grupos se encuentran entre estos dos (CH₃, OCH₃, H, NHCOR, SOCH₃) y la reacción suele ocurrir en tiempos largos y con moderados rendimientos (20-60%).

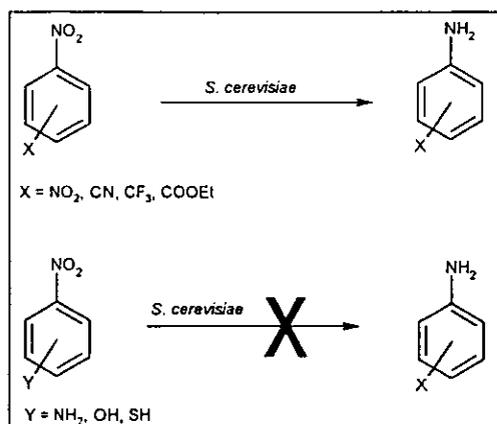


Figura 22. Influencia de los sustituyentes en la reducción de nitrobenzenos por *S. cerevisiae*.

a los grupos nitrilo, halogenos, metoxilos, etc. Sin embargo, la presencia de grupos cetónicos se afecta debido a la presencia de enzimas capaces de reducir a estos grupos funcionales.^{94,98} La reacción es también regioselectiva, pues en compuestos dinitrados hay una preferencia sobre algún grupo nitro.⁹⁶ En los casos estudiados la selectividad mostrada es mucho más alta que los métodos químicos que hay en la literatura.⁹⁷

En lo que toca a la posición de los sustituyentes con respecto a los grupo nitro no parece haber un patrón claro, algunos (NO₂, CF₃ y Br) favorecen la reducción si están en la posición *orto* respecto al nitro, pero otros como el CN lo hacen si se encuentra en *meta* y otros más como el COOEt si están en *para*.^{94-96,99}

La reducción de nitroaromáticos con *S. cerevisiae* es quimioselectiva para la mayoría de los grupos funcionales que muchas veces se ven afectados en los procesos clásicos de reducción. No afecta

La levadura de pan es también capaz de reducir N-óxidos de diversos heterociclos con rendimientos moderados.⁹⁸ Otros grupos como el azoxi no son susceptibles de sufrir la reducción.⁹⁹

En lo que respecta al mecanismo por el cual *S. cerevisiae* reduce los grupos nitro a las aminas correspondientes, se ha propuesto la formación de grupos nitroso e hidroxilamina como intermediarios.⁹⁹ Se sabe que estos compuestos preparados químicamente se reducen por cultivos de levaduras,⁹⁹ pero hasta la fecha no han sido aislados de una reacción. La hidroxilamina se ha propuesto como un intermediario más probable ya que explica la formación de amidas y aminoisoxazoles en la reducción de *orto*-nitro cianobencenos (Figura 23 a)⁹⁷ y nitroalquenos (Figura 23 b)¹⁰⁸ respectivamente.

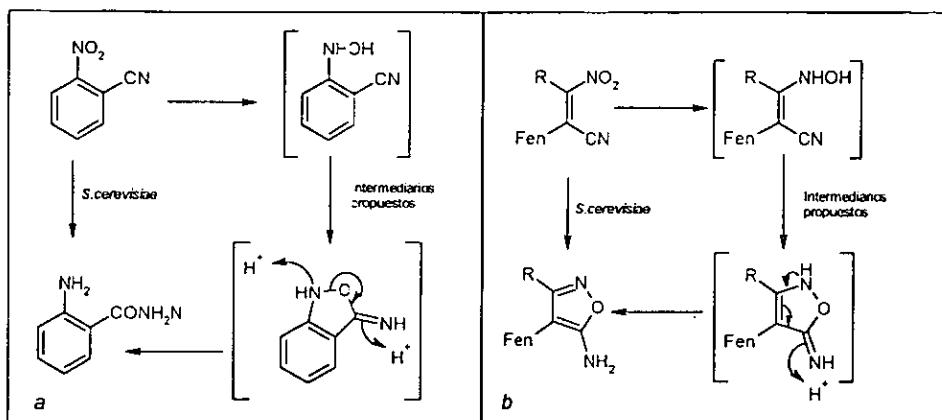


Figura 23. Mecanismos propuestos en la reducción de grupos nitro por *S. cerevisiae*.

b) Falsas biotransformaciones de nitroaromáticos con *S. cerevisiae*

El grupo de investigación encabezado por W. Baik publicó una serie de 5 artículos¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ en los cuales redujeron grupos nitro aromáticos utilizando *S. cerevisiae* en condiciones extremas (pH = 14.0; Temperatura: 70-80 °C o reflujo. Medio: Metanol / Etanol – Agua).¹⁰¹ Sin embargo, se demostró posteriormente⁹⁹ que esta metodología no es una biotransformación, sino una reducción química hecha por carbohidratos y NaOH (ver 1.3.6 síntesis de azobencenos). Las características que deben tener los sustratos para ser reducidos por la levadura, no se cumplen en este tipo de reacciones, en las cuales es posible reducir

moderadamente a nitroaromáticos con electrodoondas.¹⁰⁰ Además, los azobencenos se obtuvieron como subproductos o intermediarios en estas reacciones^{102,103} y pueden ser reducidos por las levaduras bajo estas condiciones.¹⁰⁴ Otro inconveniente es que se pierde la regioselectividad.¹⁰⁴

c) Otros organismos utilizados en la biorreducción de Ar-NO₂ con fines de síntesis.

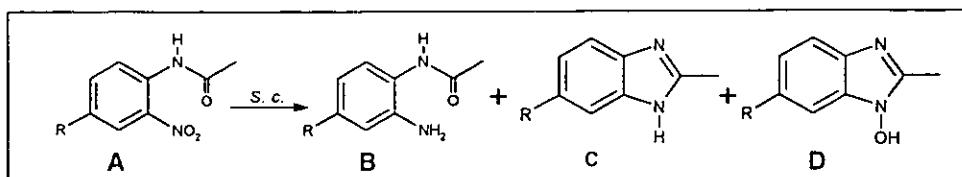
Otros biocatalizadores empleados en la reducción de grupos nitroaromáticos han sido la fracción microsomal de hígado de ratón,¹⁰⁵ células de *E. coli*¹⁰⁶ y una nitrorreductasa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes*.¹⁰⁷ Estos trabajos, aunque han demostrado la viabilidad de la reacción con otros sistemas biocatalíticos, son trabajos aislados y sólo se han probado con pocos compuestos.

1.5.3 Síntesis de heterociclos a partir de la reducción de compuestos aromáticos nitrados con *Saccharomyces cerevisiae*

Como se había mencionado antes, una aplicación importante de las aminas generadas a partir de grupos nitro es la formación de compuestos heterocíclicos. El grupo de investigación al que pertenezco ha estado interesado en este tipo de reacciones pero utilizando *S. cerevisiae* para llevarlas a cabo.¹⁰⁸ En experimentos previos,¹⁰⁹ se investigó la reducción de *orto*-nitroacetanilidas con esta levadura para preparar 2-metilbencimidazoles (Tabla 6). Al realizar la biotransformación encontramos tres productos diferentes: aminas, bencimidazoles e hidroxibencimidazoles y se observó que los mejores rendimientos se obtenían cuando había un grupo electroatractor poderoso en el anillo aromático (Tabla 6, sustratos *f* y *g*).

Los tres productos obtenidos son sustancias de gran interés,¹¹⁰ sin embargo, sería ideal conocer las condiciones para dirigir la reacción hacia cada producto en forma mayoritaria. Con esta idea se planteó como proyecto de esta tesis estudiar el mecanismo de la biotransformación con *S. cerevisiae* de la 2,4-dinitroacetanilida (Tabla 6, sustrato *f*) como sustrato modelo y evaluar cuales son los principales factores que determinan la distribución de los productos. Además, se investigó los alcances de esta biotransformación probándola con una serie de sustratos distintos.

Tabla 6. Biotransformación de 2-nitroacetanilidas-4-substituidas (A) con *S. cerevisiae* para producir 2-amino acetanilidas (B), 2-metilbencimidazoles (C) y 1-hidroxi-2-metilbencimidazoles (D).



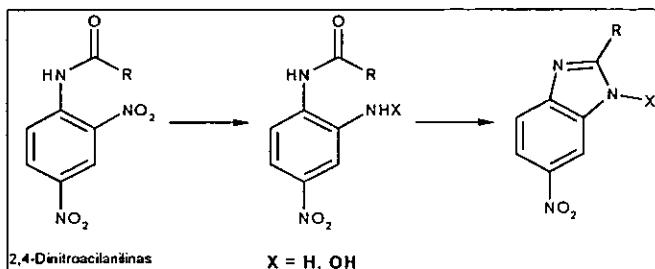
Sustrato A	R	Bioproductos			Recuperado A (%)
		B (%)	C (%)	D (%)	
a	CH ₃	-	-	-	92
b	H	-	8	-	80
c	Cl	20	-	-	54
d	Br	26	-	-	38
e	CF ₃	10	48	-	20
f	NO ₂	-	67	26	-
g	CN	-	30	58	-

Esta metodología es novedosa en la producción de estos compuestos y ofrece una alternativa limpia, barata y selectiva. Además, el estudio del mecanismo de la reacción ayudará a entender mejor las biorreducciones del grupo nitro con *S. cerevisiae*, en especial las enfocadas a la producción de compuestos heterocíclicos.

2 OBJETIVOS

General

Estudiar la biotransformación con *Saccharomyces cerevisiae* de varias 2,4-dinitroacilanilinas y su aplicación en la síntesis de bencimidazoles.



Particulares

- 1.- Identificar a los productos e intermediarios de la reducción de la 2,4-dinitroacetanilida (sustrato modelo) con *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2.- Identificar el mecanismo de reacción.
- 3.- Estudiar la influencia del pH en el rendimiento y tipo de productos de la biotransformación.
- 4.- Diseñar una metodología que favorezca la selectividad de la reacción.
- 5.- Aplicar esta metodología a una serie de 2,4-dinitroacilanilinas para probar su generalidad en la síntesis de bencimidazoles.

3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiales y Equipos

Compuestos químicos

La 2,4-dinitroanilina con la que se prepararon todos los substratos es de Eastman-Kodak. Los anhídridos y todos los demás compuestos utilizados son de marcas comerciales grado analítico. Todos los disolventes utilizados para el aislamiento de los productos e intermediarios, así como los utilizados en cromatografía en capa fina son grado analítico. Los solventes utilizados para la cromatografía en capa fina de alta eficiencia (CCFAE o HPTLC) fueron grado HPLC.

Cromatografía

En los análisis de cromatografía en capa fina se utilizaron cromatofolios de aluminio con gel de sílice 60/UV₂₅₄ marca Macherey-Nagel. En la cromatografía en columna se utilizó gel de sílice G-60 de la misma marca y para la CCFAE se utilizaron cromatoplasmas de vidrio cubiertas con gel de sílice (tamaño de partícula: 2-10 μm) de 10x10 cm y 0.2 mm de espesor también de la marca Macherey-Nagel. El equipo de CCFAE utilizado para leer las placas fue un CAMAG Scan 3.

Soluciones cromógenas

Sulfato cérico: 12.0 g de sulfato de cerio IV, 22.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 350 g de hielo. Las aminas dan un color rojo o violeta al contacto con el revelador. Bajo calentamiento, los compuestos nitro generan manchas amarillas. Otros compuestos de las levaduras dan manchas cafés por calentamiento.

Reactivo de Dragendorff: Solución 1: 0.255 g de nitrato de bismuto, 12 mL de agua y 3 mL de ácido acético. Solución 2: 2.4 g de yoduro de potasio y 6 mL de agua. Se mezclan las soluciones 1 y 2 para formar el revelador que dura varias semanas en el refrigerador. Los compuestos heterocíclicos nitrogenados producen un color naranja.¹²⁹

Cloruro de Trifeniltetrazolio/NaOH: Solución 1: 0.83 g de cloruro de 2-H-2,3,4-trifeniltetrazolio y 25 de etanol al 70%. Solución 2: hidroxido de sodio 2 molar. Par revelar se aplica la solución 1 y en seguida la 2. Las hidroxilaminas dan un color rojo intenso, otros grupos funcionales con nitrógeno (nitro, nitroso, amina o azoxibenceno) no generan la coloración.³⁷

Puntos de fusión y técnicas espectroscópicas

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fischer-Jones y se reportan sin corregir. Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 283 y Nicolet FT-IR 55X. La absorbancia de infrarrojo se reporta en cm^{-1} . Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) y de carbono 13 (^{13}C) se obtuvieron en un aparato Varian Gemini-200 y Varian Gemini-300 a una frecuencia de 200 MHz y 300 MHz para el hidrógeno y 75 Mhz para el carbono. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón y las constantes de acoplamiento (J) en hertz (Hz). Se asignaron las siguientes abreviaturas: s = singulete, d = doblete, dd = doblete doble, t = triplete, cuad = cuadruplete, quin = quintuplete, sex = sextuplete y m = multiplete. Los espectros de masas de impacto electrónico se hicieron por introducción directa en un aparato JEOL JMS-AX505 HA a 70 eV. Los estudios de difracción de rayos-X se hicieron en un equipo Siemens P4/PC.

3.2 Métodos

Síntesis de la 2,4-dinitroacetanilida

2.25 g (0.01 moles) de 2,4-dinitroanilina se calentaron a reflujo con 20 mL de anhídrido acético y dos gotas de H_2SO_4 concentrado. Cuando ya no se observó materia prima por cromatografía en capa fina (CCF), la mezcla de reacción se dejó enfriar y con agitación constante se le agregaron lentamente 20 mL de agua. La agitación se continuó durante dos horas. El precipitado se filtró y se lavó tres veces con agua. Después se recristalizó con acetona y carbón activado para dar 2.10 g (93%) de un sólido amarillo claro con un $R_f = 0.65$ (hexano:acetato de etilo = 7:3); pf. 122-124°C (lit. 125-126°C¹¹¹); RMN ^1H : δ 10.62 (s, 1H, NH), 9.13 (d, $J=2.7$, 1H, arom), 9.10 (d, $J=9.5$, 1H, arom), 8.48 (dd, $J=9.5$, 2.7, 1H, arom), 2.38 (s, 3H, CH_3). IR (KBr) 3330, 1710, 1501, 1341 cm^{-1} . EM m/z (intensidad relativa) 225 (19) [M^+], 183 (89) [M-OCCH_2] $^+$, 43 (100) [OCCH_3] $^+$.

Biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida en un medio sin amortiguador

En un matraz erlenmeyer de 500 mL se colocaron 5.0 g de levadura de pan liofilizada (marca Saf-instant), 5.0 g de sacarosa y 100 mL de agua destilada. Esta mezcla se colocó en una incubadora orbital a 30 °C y 150 rpm durante 60 min (activación). Después, 0.5 mmoles (113 mg) de 2,4-dinitroacetanilida disueltos en 5.0 mL de acetona se agregaron al cultivo. La mezcla

resultante se regresó a la incubadora bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación y se dejó por 48 hrs. El progreso de la reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina. Para este propósito, cada 12 horas se tomaron alícuotas de 0.5 mL que se mezclaron con igual cantidad de acetato etilo y se centrifugaron por 3 min a 14,000 rpm. La fase orgánica se utilizó para correr las cromatoplasmas con un sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}:\text{MeOH}$ 95:3:2. La detección de los compuestos se hizo mediante luz UV a 254 nm, vapores de I_2 y los agentes cromógenos descritos en el inciso superior.

Aislamiento de productos

Después de 48 horas, la biotransformación se sacó de la incubadora, se saturó con cloruro de sodio (38 g), se agregaron 100 mL de acetato de etilo y se agitó durante 10 minutos. A continuación la mezcla se filtró al vacío poniendo una cama de celita con un espesor aproximado de 1.5-2.0 cm. El residuo sólido y el filtrado se extrajeron con acetato de etilo (3 x 100 mL c/u). Las fracciones orgánicas se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron hasta obtener una resina color café. Para obtener mayor cantidad de los productos se juntaron las resinas de tres reacciones de biotransformación. Antes de purificar los productos, las resinas se dejaron a temperatura ambiente por un día. La purificación se realizó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice y como sistema de elución mezclas de polaridad creciente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (100:0 \rightarrow 98:2 \rightarrow 95:5). Se obtuvieron tres compuestos que por orden de elución fueron: 2-amino-4-nitro-acetanilida (2), 2-metil-6-nitrobencimidazol (3) y 2-metil-6-nitro-1-hidroxibencimidazol (4). La espectroscopia de los tres se encuentra en la sección de resultados.

Aislamiento de intermediarios

En el primer intento por aislar a la 2-hidroxi-amino-4-nitroacetanilida (5) se hizo una biotransformación sin amortiguador y se detuvo a los 90 minutos. Se siguió el mismo procedimiento que para el aislamiento de productos, pero el compuesto nuevo que se obtuvo comenzó a descomponerse rápidamente. Los experimentos de espectroscopia que se realizaron mostraron una mezcla compleja de compuestos. Por tal motivo, se decidió realizar una reacción de derivatización con cloruro de bencilo^{38,39} en la mezcla de reacción antes de introducirla a la columna, pero tampoco se obtuvieron buenos resultados. Se decidió entonces oxidar la hidroxilamina al azoxibenceno.^{43,44}

Síntesis del azoxibenceno

La biotransformación se realizó bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente en el aislamiento de productos, pero se utilizó un buffer de fosfatos 0.5M de pH=7.5 en lugar de agua destilada. Después de la activación, se utilizó NH_4 al 10% para ajustar el pH nuevamente a 7.5. A los 60 minutos de iniciada la reacción, la mezcla se sacó de la incubadora y se siguió el mismo procedimiento que para el aislamiento de los productos, pero se utilizó diclorometano en lugar de acetato de etilo para hacer las extracciones. La mezcla resultante de la extracción del medio de cultivo se disolvió en el mínimo de acetato de etilo (aprox. 7 mL) y se agregó hexano hasta la formación de un precipitado naranja (aprox. 75 mL). La mezcla se dejó en el congelador (-20°C) por media hora. El precipitado se decantó y se disolvió en 10 mL de etanol, después se agregaron 4 mL de una solución saturada de NaHCO_3 y se agitó vigorosamente por 30 minutos a 30°C . El etanol se evaporó en un rotaevaporador y la mezcla restante se extrajo con diclorometano (5X50 mL). Las fases orgánicas se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron. La mezcla resultante fue separada por cromatografía en columna con gel de sílice utilizando como eluyentes Hexano:AcOEt (2:1). El 5,5'-diN-acetil-3,3'-dinitroazoxibenceno (6) (Figura 29) se identificó por sus constantes espectroscópicas (ver resultados).

Aislamiento de la 2-hidroxilamino-4-nitroacetanilida

Se siguió el mismo procedimiento utilizado para la preparación del azoxibencimidazol, pero una vez que se reunieron las fases orgánicas de la extracción del medio de cultivo, se concentraron casi a sequedad y se agregaron 75 mL de hexano. Esta mezcla se dejó por dos horas en el congelador (-20°C). El precipitado que se forma se decantó y se purificó por cromatografía en columna utilizando, CH_2Cl_2 :MeOH:AcOEt (97:2:1 \rightarrow 94:4:2 \rightarrow 91:6:3). El compuesto se identificó por sus constantes espectroscópicas (ver resultados).

Curso de la biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida

Procedimientos analíticos

Se utilizó un equipo de CCFAE CAMAG-Scan 3 para medir la concentración de cada compuesto durante la biotransformación. En primer lugar se hicieron curvas patrón con concentraciones conocidas (10-650 μM) de cada uno de los compuestos puros. En el caso de la 2-hidroxilamina-4-nitroacetanilida además de su curva patrón, se hizo otra con su producto de oxidación, el 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazoxibenceno. Después, se monitoreó el curso de la

biotransformación tomando alícuotas de 0.25 mL del medio de reacción a diferentes tiempos, las cuales se extrajeron dos veces con 1.0 mL de una mezcla AcOEt:CH₂Cl₂ (9:1). En cada ocasión, las mezclas se centrifugaron a 14,000 rpm x 5 min para separar rápidamente las fases. Las fracciones orgánicas se juntaron, se aforaron a 2 mL y se aplicaron 20 µL de esta solución a las placas de nanocromatografía. Las placas se eluyeron dos veces. La primera con CH₂Cl₂, para cuantificar el sustrato y, la segunda, con una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH:AcOEt (92:5:3) para leer los demás compuestos. La cuantificación se realizó interpolando los resultados del monitoreo en las curvas patrón.

Durante el proceso de extracción cierta cantidad de la 2-hidroxilamina-4-nitroacetanilida se oxidó a el 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazobenceno, por lo cual se sumaron los moles de estos dos compuestos para conocer la concentración real de la 2-hidroxilamina-4-nitroacetanilida. Para hacer el calculo se tomó en cuenta que un mol de azobenceno se forma a partir de dos moles de hidroxilamina (Figura 29). Debido a que resultó más fácil obtener mayor cantidad y con mayor pureza al azobenceno que a la hidroxilamina, se diseñó un procedimiento para oxidar cuantitativamente a la hidroxilamina en la mezcla de reacción sin afectar a los demás compuestos, y así solo medir el azobenceno. El procedimiento consistió en agregar alumnia básica al extracto orgánico, agitar vigorosamente por 5 min y dejar reposar la mezcla por 30 min.

Biotransformaciones a diferentes pHs

Para llevara a cabo las biotransformaciones a diferentes pHs se siguió el procedimiento mencionado con anterioridad, pero se utilizaron los siguientes buffers a una concentración de 0.5 M: pH = 3.0, Ac. cítrico-citrato; pH = 4.0, ac. acético-acetato de sodio; pH=5.0, ac. acético-acetato de sodio; pH = 6.0, KH₂PO₄ / K₂HPO₄; pH = 7.0, KH₂PO₄ / K₂HPO₄; pH = 8.0, TRIS ó KH₂PO₄ / K₂HPO₄ y pH = 9.0, NaHCO₃ / Na₂CO₃.

Síntesis de las 2,4,dinitroacilanilinas

Compuestos 1a-1j. *Procedimiento general:* 0.01 moles de 2,4-dinitroanilina se pusieron a reflujo con 20 mL del anhídrido correspondiente y dos gotas de H₂SO₄ conc. Cuando ya no se observó materia prima por cromatografía en capa fina, la mezcla de reacción se dejó enfriar y con agitación constante se le agregaron 20 mL de agua. La agitación se continuó durante dos horas. El precipitado que se forma se filtró y se lavó tres veces con agua. Después se recrystalizó con acetona y carbón activado para dar rendimientos entre el (90-95%).

2,4-dinitroformanilida: 5.6 mL (0.15 moles) de ácido fórmico al 90% y 10.3 mL (0.11 moles) de anhídrido acético se calentaron a 75°C por 3 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se enfrió y se le agregaron 2 g (0.011 moles) de 2,4-dinitroanilina. La mezcla de reacción se tapó y se agitó durante 3 días a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó y el precipitado se recrystalizó de EtOH-agua. El rendimiento obtenido fue de 87%.

Compuestos 1h-1k. Estos compuestos fueron preparados a partir de la 2,4-dinitroanilina y los cloruros de los ácidos correspondientes siguiendo los procedimientos descritos en la literatura.¹¹²

Compuestos 1l-1m. *Procedimiento general*: 20 mmoles del anhídrido y 2.5 mmoles de la anilina se pusieron a calentar en un matraz hasta la formación de una mezcla líquida (80-120°C), después se les agregó 1 o 2 gotas de H₂SO₄ conc. y se agitó durante 5 horas. Después de enfriar la mezcla se disolvió con acetona caliente y se agregó carbón activado. Después de eliminar el carbón activado el compuesto se recrystalizó de acetona-agua. Los rendimientos fueron entre el (75-90%).

Biotransformaciones de las 2,4-dinitroacilanilinas

Se siguió el mismo procedimiento que para la 2,4-dinitroacetanilida pero utilizando un buffer de fosfatos 0.5 M de pH = 7.5. La reacción se dejó por 20 horas y se siguió por CCF.

Aislamiento e identificación de los productos

Se siguió el mismo procedimiento que para los productos de la 2,4-dinitroacetanilida pero en la purificación en cromatografía en columna se utilizó CH₂Cl₂, AcOEt y MeOH como eluyentes (100:0:0 → 98:1.2:0.8 → 96:2.4:1.6 → 95:3:2).

Síntesis de los 2-alkil-6-nitrobencimidazoles

Procedimiento general. 10 mL de ácido acético glacial y 0.5 mmoles de las aminas **2** se agitaron durante 4 horas a 60°C. El ácido se evaporó con vacío para dar lugar a los bencimidazoles **3**. En algunos casos los compuestos se recrystalizaron de acetona-H₂O. Los compuestos se analizaron por IR, EM y RMN ¹H y ¹³C y los datos se muestran en tablas en la sección de resultados.

4 RESULTADOS

4.1 Comportamiento de la 2,4-dinitroacetanilida frente a los constituyentes del medio

En algunas biotransformaciones de compuestos aromáticos nitrados con microorganismos, se ha observado que ciertas sustancias presentes en los medios de cultivo pueden reaccionar con los grupos nitros y reducirlos. Por ejemplo: hierro (II),¹¹³ titanio (III),¹¹⁴ otros metales,¹¹³ o compuestos reducidos de azufre, entre ellos la cisteína.¹¹⁴ En el caso específico de la biotransformación de compuestos orgánicos con *S. cerevisiae*, algunas veces se han reportado como biotransformaciones, reacciones que son llevadas a cabo por los constituyentes del medio.^{100-104,115} Para eliminar la posibilidad de que la reducción de la 2,4-dinitroacetanilida fuera un proceso no enzimático, se observó el comportamiento de este compuesto en las siguientes condiciones:

- 1.-Medio líquido sin levadura.
- 2.-Levadura inactivada por temperatura.
- 3.-Sobrenadantes obtenidos por centrifugación de cultivos de levadura con una, seis y doce horas de incubación.
- 4.-Medio líquido sin levadura con cisteína.

En todos los casos se utilizó una concentración 5 mM del sustrato y se analizaron alicuotas por cromatografía en capa fina durante las primeras 24 horas. En ningún caso se observó alguna modificación de la 2,4-dinitroacetanilida.

4.2 Productos de la biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida en un medio sin amortiguador

Las biotransformaciones de grupos nitroaromáticos con *S. cerevisiae*, se han realizado tradicionalmente con levadura liofilizada, agua destilada o de la llave y a veces sacarosa. Estos tres ingredientes se dejan "activar" por un tiempo entre 30 minutos a 3 horas y después se agrega el sustrato. Con esta metodología ha sido posible reducir un gran número de

compuestos. Sin embargo, como no se utiliza un buffer, el pH del medio disminuye rápidamente debido al metabolismo de las levaduras.

En nuestro caso se utilizó esta técnica para biotransformar a la 2,4-dinitroacetanilida utilizando un medio con azúcar y uno sin azúcar. Encontramos que el pH del medio con azúcar disminuyó hasta 3.6 durante la primera hora de incubación y hasta 5.0 cuando no se utilizó sacarosa (Figura 24). A tiempos mayores de 12 horas los valores de pH que se alcanzaron fueron de 3.5 y 4.0 respectivamente, y se mantuvieron constantes. A las 24 horas de iniciadas las reacciones, solamente la biotransformación con azúcar mostraba en cromatografía por capa fina que ya no había sustrato, la otra reacción todavía tenía materia prima sin reaccionar. Por esta razón, todos los experimentos posteriores se hicieron utilizando un medio con sacarosa.

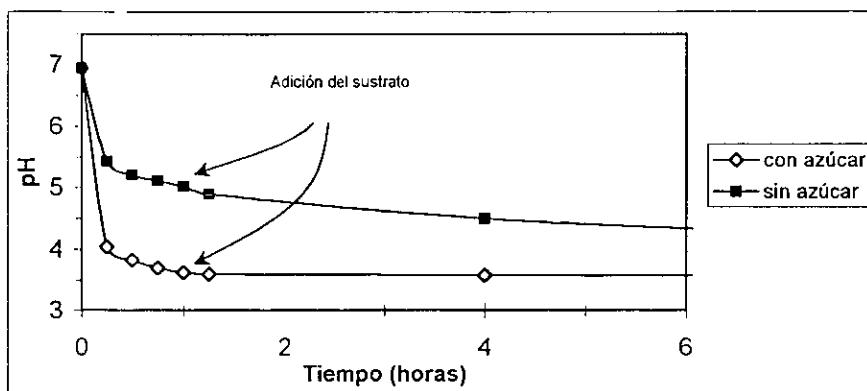
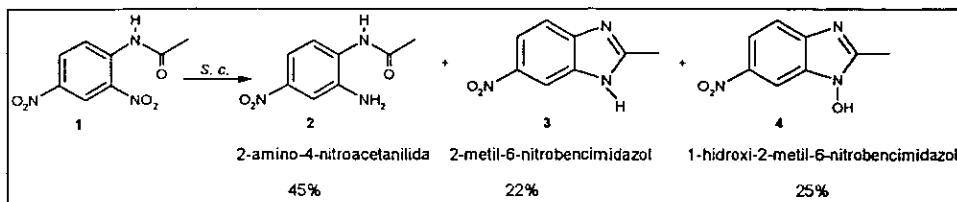


Figura 24. Variación del pH durante una biotransformación utilizando un medio no tamponado.

De la biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida se aislaron y purificaron los tres productos que se muestran a continuación*. Todos fueron caracterizados por espectroscopia de infrarrojo, masas, resonancia magnética de ^1H y de ^{13}C y punto de fusión. Los datos de estos estudios se encuentran en la última sección de resultados (sección 4.8).



* El 8% restante se pierde durante el proceso de aislamiento y purificación.

4.3 Curso de la reacción de la 2,4-dinitroacetanilida con *S.cerevisiae* en un medio sin amortiguador (pH = 3.5)

Los tres productos obtenidos de la biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida son sustancias de gran interés. Sin embargo, sería ideal que la reacción se pudiera dirigir hacia la formación mayoritaria de cada uno de ellos. Para conseguir este objetivo, era necesario establecer un mecanismo de la reacción y evaluar cuales eran los principales factores que determinaban la distribución de los productos. Con esta idea seguimos el curso de la reacción (la concentración de cada una de las especies involucrada a lo largo de la biotransformación) y vimos que relación había entre ellas.

4.3.1 Espectroscopia UV

En un primer intento por describir el curso de la reacción se pensó en seguir la reacción por espectroscopia de UV. Sin embargo, esta idea pronto se abandonó porque los compuestos involucrados absorben en regiones muy cercanas (Figura 25).

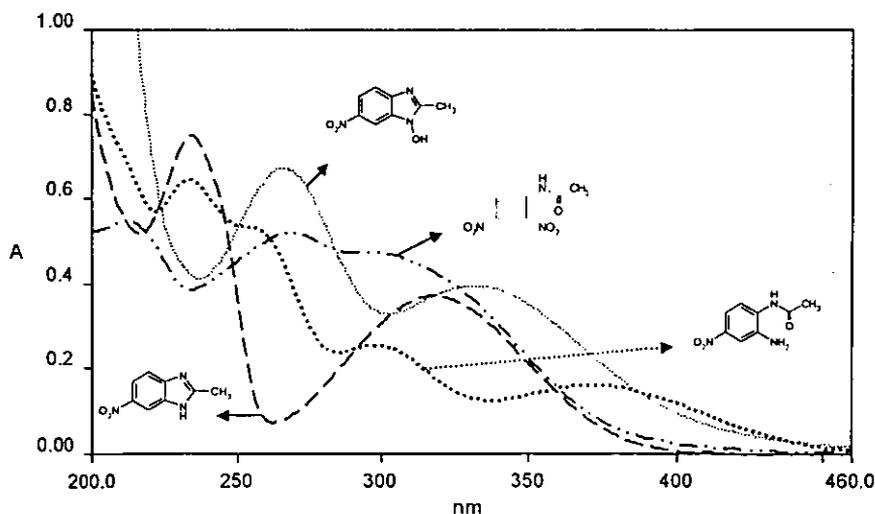


Figura 25. Espectros UV de la 2,4-dinitroacetanilida y sus productos de reducción con la levadura a una concentración 0.13 mM.

De manera cualitativa se puede seguir el curso de la reacción en las primeras horas y ver que hay una disminución de la absorbancia en la región de 340 nm correspondiente a la desaparición del substrato y un aumento en la zona en la cual absorben los productos (220-230

nm); (Figura 26), pero después hay un aumento paulatino desde los 200 a 400 nm y no se pudo determinar como se encontraba la concentración de un producto respecto a los otros.

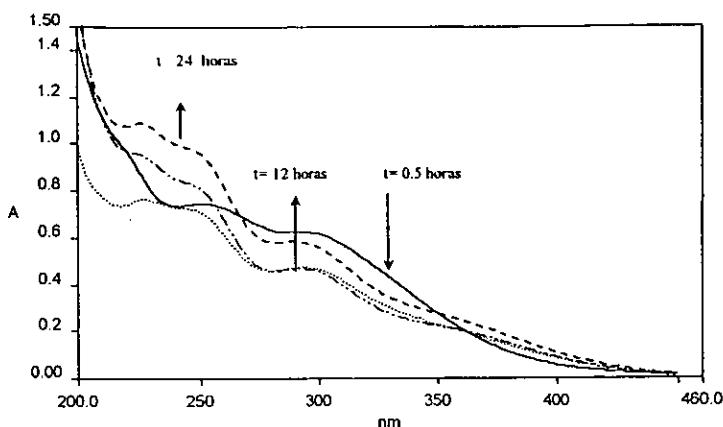


Figura 26. Biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida a diferentes tiempos.

4.3.2 Cromatografía en capa fina de alta eficiencia (CCFAE) o HPTLC (“high performance thin layer chromatography”)

Con este método la mezcla de compuestos de la biotransformación fue separada en una placa especial de cromatografía en capa fina y después cada compuesto se cuantificó con la ayuda de un densitómetro y las curvas patrón correspondientes. Los resultados obtenidos del muestreo de la reacción se encuentran en la figura 27.

Se puede observar que la 2,4-dinitroacetanilida se reduce rápidamente para dar lugar a la 2-amino-4-nitroacetanilida y el hidroxibencimidazol. Después de cuatro horas, el sustrato apenas es detectado. El bencimidazol durante el inicio de la reacción no se encuentra presente, pero después de una hora aumenta su concentración lentamente. Después de transcurridas diez horas los cambios en las concentraciones de los compuestos fueron poco apreciables, pero si la reacción se deja por varios días, se observa un aumento en la concentración del bencimidazol y una disminución de la amina (Figura 28). La cantidad de hidroxibencimidazol permanece constante.

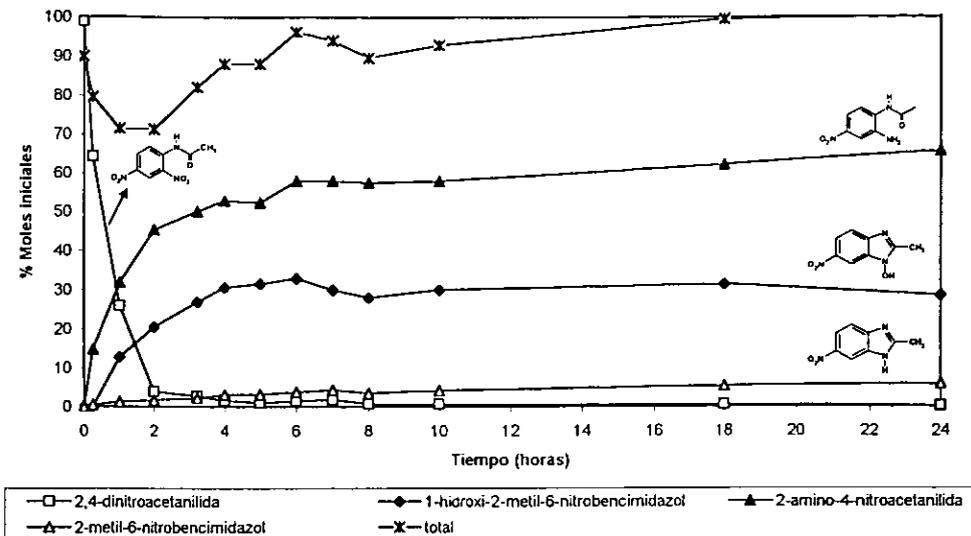


Figura 27. Biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida (sustrato) con *S. cerevisiae* a pH = 3.5. Monitoreo del sustrato y productos durante las primeras 24 horas.

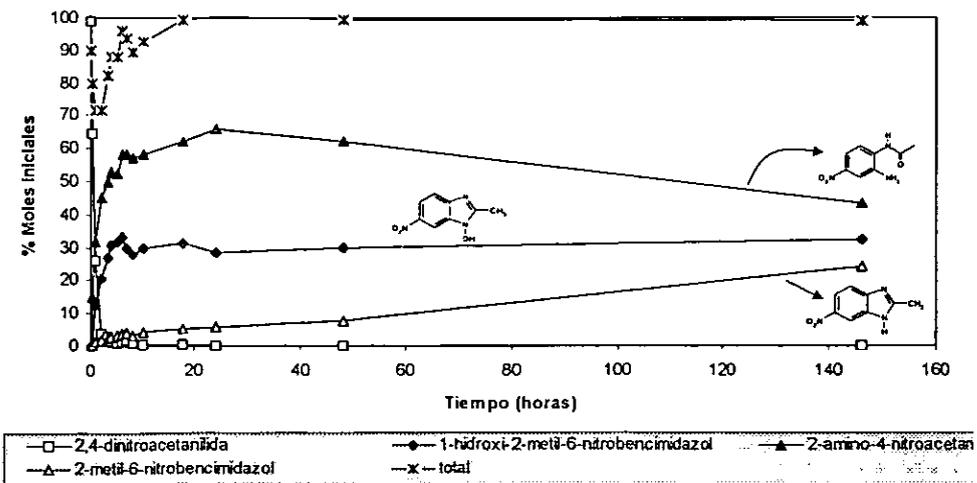


Figura 28. Biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida (sustrato) con *S. cerevisiae* a pH = 3.5. Monitoreo del sustrato y productos durante las primeras 148 horas.

Al realizar el balance total de materia para cada tiempo, fue notorio que en las primeras ocho horas de la reacción, había un porcentaje menor de recuperado (60-80 %) de lo que se obtuvo después de este tiempo y hasta el final de la biotransformación (80-95%). Este hecho nos llevó a analizar con mayor detalle las fracciones obtenidas en las primeras horas con el fin de encontrar algún intermediario. Probando con diferentes sistemas de disolventes, logramos observar en cromatografía en capa fina un compuesto nuevo que absorbía intensamente en la región de UV. La purificación de esta nueva sustancia fue muy difícil porque se descomponía rápidamente, por lo que se procedió a preparar un derivado: el 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazoxibenceno (Figura 29). Este compuesto se forma fácilmente en las muestras extraídas de la biotransformación, por lo cual sirvió para identificar y cuantificar al compuesto original: la 2-hidroxilamino-4-nitroacetanilida (Figura 29). En experimentos posteriores ya fue posible aislar y caracterizar por técnicas espectroscópicas a la hidroxilamina.

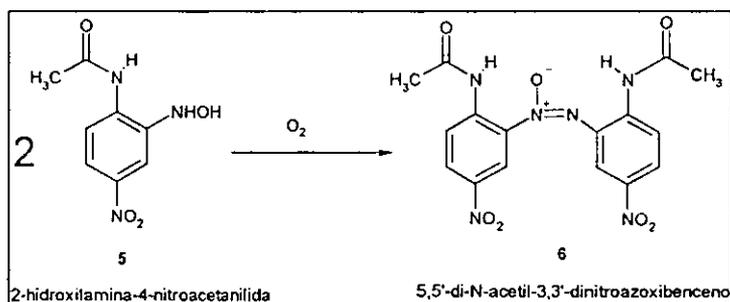


Figura 29. 2-Hidroxilamina-4-nitroacetanilida y su producto de oxidación

El curso de la biotransformación se volvió a seguir, pero ahora cuantificando también al compuesto nuevo. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la figura 30.

El sustrato desapareció en las primeras 4 horas y desde los primeros minutos fue posible detectar a la hidroxilamina, la amina y al hidroxibencimidazol. La concentración máxima de la hidroxilamina se alcanzó a los 90 minutos (38%), y después disminuyó lentamente mientras se observaba la acumulación de la amina y el hidroxibencimidazol. Este último alcanzó una concentración máxima de 33% a las 16 horas que coincide con la desaparición total de la hidroxilamina. En tiempos mayores, su concentración no varió.

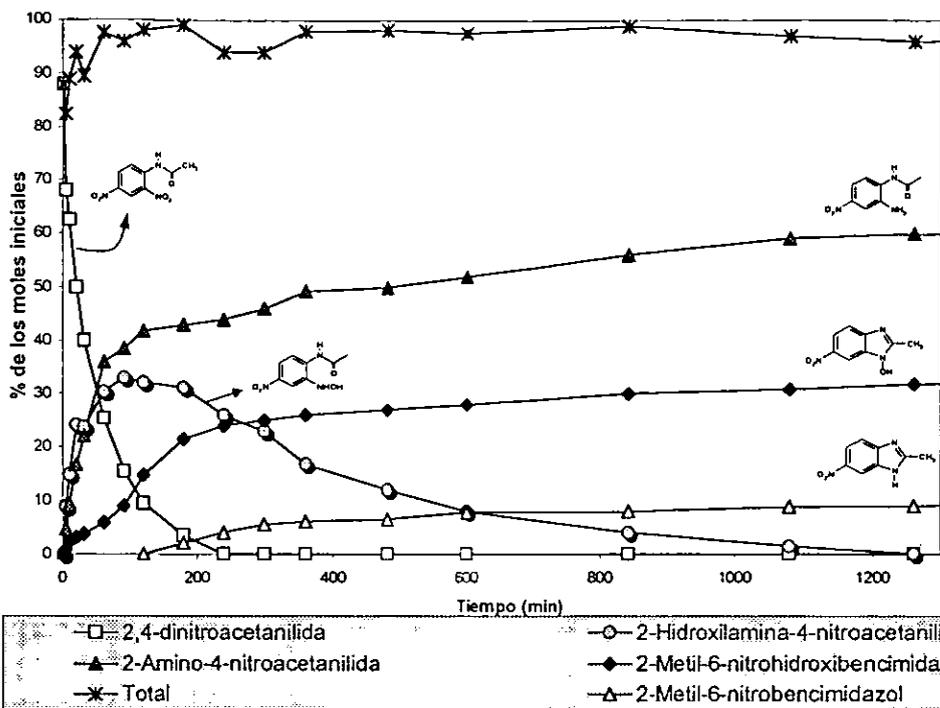


Figura 30. Biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida (sustrato) con *S. cerevisiae* a pH = 3.5. Monitoreo del sustrato, productos e intermediario (2-hidroxilamina-4-nitroacetanilida).

La amina también alcanzó una concentración máxima a las 16 horas y solamente después, de manera muy lenta, disminuyó. Esta disminución corresponde a un aumento en la concentración del benzimidazol. Cuando la reacción se deja por más de cuatro días, la concentración del benzimidazol llega a ser de 25% y la de la amina de 35%.

4.4 Reacciones no enzimáticas en pH ácido

Debido a que muchas reacciones de ciclación, entre ellas la síntesis de benzimidazoles, ocurren espontáneamente en un medio ácido, se decidió ver que le ocurría a la 2-hidroxilamino-4-nitroacetanilida y a la 2-amino-4-nitroacetanilida en el medio de cultivo ácido que se estaba utilizando, pero sin levadura. La figura 31 presenta un esquema de estos resultados:

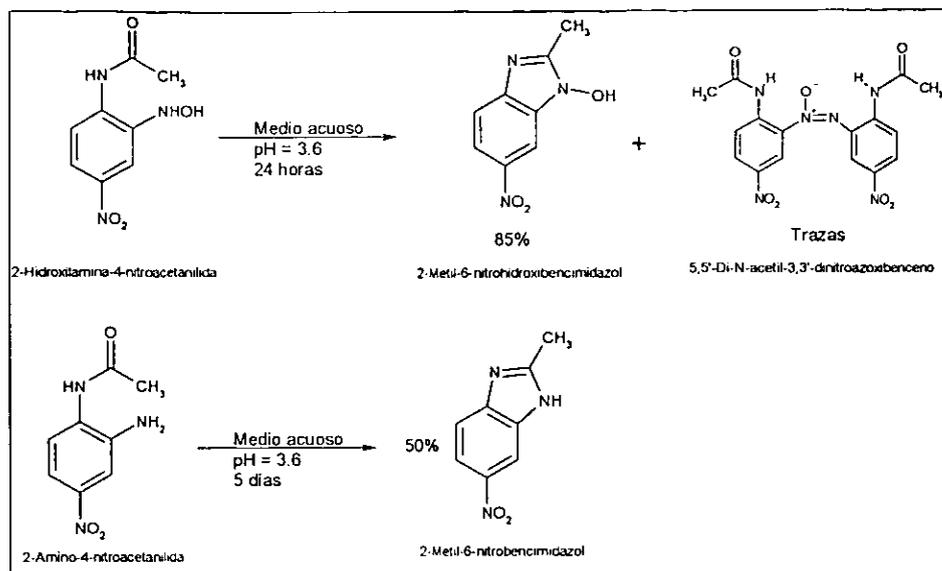


Figura 31. Transformaciones químicas de la 2-hidroxi-4-nitroacetanilida y de la 2-amino-4-nitroacetanilida en un medio sin levadura a pH 3.6.

La 2-hidroxi-4-nitroacetanilida en un medio acuoso ácido se cicla al 2-metil-6-nitrohidroxi-benzimidazol en un 85 % de rendimiento, mientras que la 2-amino-4-nitroacetanilida se transforma al benzimidazol en un 50%. De manera cualitativa se observó que estas dos reacciones de ciclación ocurren a diferentes velocidades, siendo la primera más rápida que la segunda. En el caso de la ciclación de la hidroxilamina, se llegó a observar otro compuesto en una pequeña cantidad, el cual podría ser el azobenceno porque las propiedades de ambos compuestos en cromatografía en capa fina coincidían.

También se realizaron pruebas con levadura fresca, para ver si en un cultivo nuevo la 2-amino-4-nitroacetanilida pudiera ser modificada, por ejemplo en el segundo grupo nitro (Figura 32). El muestreo de la biotransformación por cromatografía en capa fina en las primeras horas no mostró ningún cambio. Después de doce horas se observó la formación del benzimidazol en pequeña cantidad.

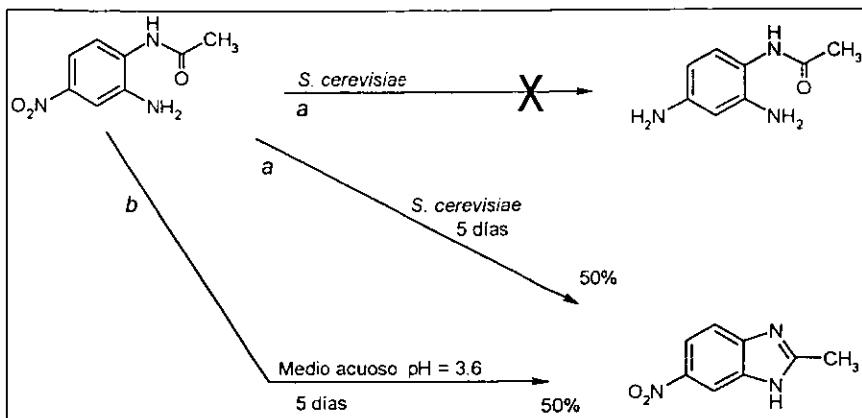


Figura 32. Transformaciones químicas de la 2-amino-4-nitroacetanilida en un medio con levadura a pH 3.6 (a) y en un medio sin levadura a pH 3.6 (b).

El hidroxibencimidazol es un compuesto que en solución está en equilibrio tautomérico con el N-óxido del bencimidazol¹²⁰ (Figura 33) y debido a que los N-óxidos de algunos heterociclos han sido reducidos con levadura de pan,⁹⁸ se realizó el experimento anterior pero ahora con el hidroxibencimidazol (Figura 33). No se observó la formación de bencimidazol o de algún otro producto.

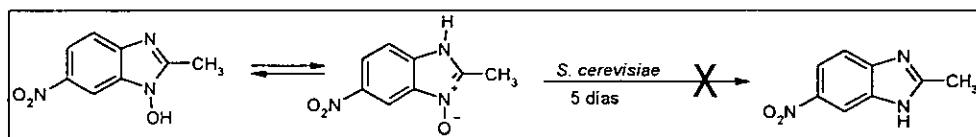


Figura 33. Nula biotransformación del 1-hidroxi-2-metil-6-nitrobencimidazol con *S. cerevisiae*.

También el azoxibenceno se probó con la levadura y no fue transformado en algún otro compuesto. La ausencia de este compuesto al final de la biotransformación indicaba que sólo estaba siendo producido durante el manejo de la muestra y no en el medio de cultivo, de lo contrario, la levadura no hubiera podido transformarlo y se observaría al final.

4.5 Curso de la reducción de la 2,4-dinitroacetanilida con *S. cerevisiae* a pH 7.5

Como los procesos de ciclación están favorecidos por un pH ácido, se decidió realizar la biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida a pHs cercanos a la neutralidad y ligeramente alcalinos. Después de 20 horas de reacción se midió la concentración de cada producto en el medio y se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 34.

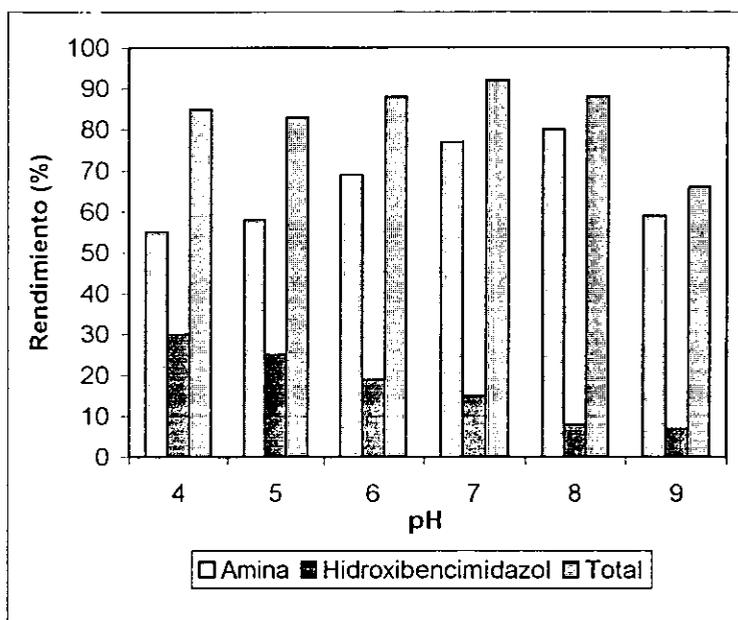


Figura 34. Efecto del pH sobre el rendimiento y distribución de los productos de la biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida con *S. cerevisiae*.

Se puede observar como a pHs ácidos hay una mayor cantidad de hidroxibencimidazol, que en los pHs básicos. Con el bencimidazol ocurre algo parecido pero la cantidad que se forma es mucho menor. Por el contrario, la cantidad de amina formada es mayor a pHs básicos, sin embargo a partir de pH 9.0, se observó hidrólisis de la materia prima y la formación de otros subproductos en pequeñas cantidades. Se decidió efectuar la biotransformación a pH 7.5 y monitorearla por CCF AE, obteniéndose los resultados de la figura 35.

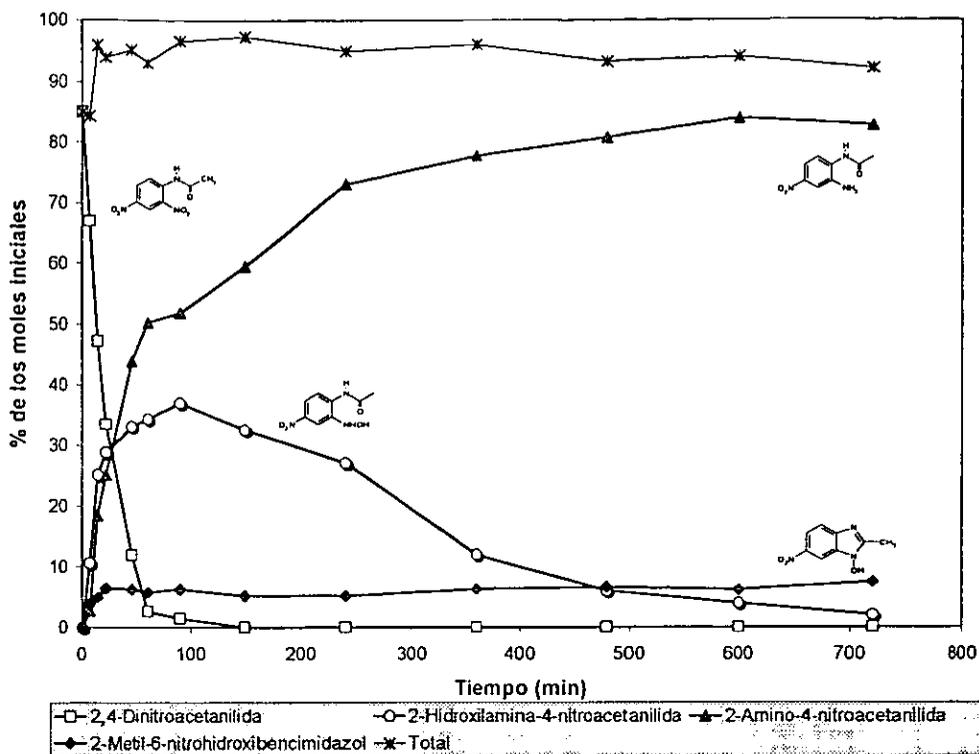


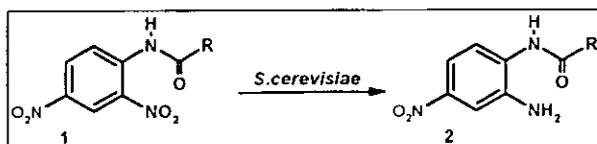
Figura 35. Biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida (sustrato) con *S. cerevisiae* a pH = 7.5. Monitoreo del sustrato, productos e intermediario (2-hidroxilamina-4-nitroacetanilida).

En este caso la reducción del sustrato fue más rápida que a pH ácido (en dos horas desaparece). La máxima concentración de la hidroxilamina se detectó también a los 90 minutos, pero su desaparición fue más rápida. A este nuevo pH la mayor parte de este compuesto se redujo a la amina y fue muy poca la que se cicló al hidroxibencimidazol (8%). La concentración de la amina llegó al final hasta un 85%, y el bencimidazol no se detectó.

4.6 Reducción selectiva de las 2,4-dinitroacilanilinas con *S. cerevisiae* a pH 7.5

Con la información acerca de la influencia del pH en el curso de la reacción, se aplicó la metodología que utiliza un buffer de pH=7.5 para sintetizar 6-nitro-bencimidazoles-2-sustituidos a partir de 2,4-dinitroacilanilinas (Tabla 7). Con estos sustratos se estudió también la regioselectividad y el efecto del sustituyente del grupo acilo en el rendimiento de la reacción.

Tabla 7. Biotransformación de las 2,4-dinitroacilanilinas a pH 7.5.



Sustrato 1			Sustrato 1		
R	Amina (2) (%)	Reactivo recuperado (1) (%)	R	Amina (2) (%)	Reactivo recuperado (1) (%)
a H	40 ^a	0	g Heptil	79	12
b Me	82	0	h CF ₃	36 ^a	0
c Et	84	0	i CH ₂ Cl	47 ^a	0
d Pr	85	0	j CH ₂ CH ₂ COOH	86	0
e Bu	90	0	k Fenil	0	92
f Pentil	83	0	l CH=C(CH ₃) ₂	0	87

a. Rendimiento crudo

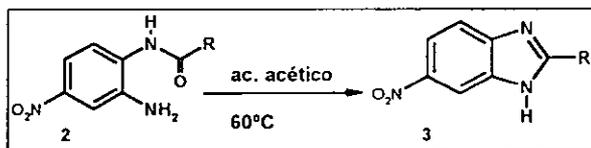
Los resultados de la tabla 7 señalan que los sustratos 1b-1f y 1j se redujeron en muy buenos rendimientos y con una alta regioselectividad a las 2-amino-4-nitroacilanilinas correspondientes 2b-2f y 2j. En ningún caso se detectó materia prima ni tampoco reducción en la posición cuatro. Los compuestos 1g, 1k y 1l tuvieron bajos o nulos rendimientos. Una explicación es que estos sustratos se encuentran poco accesibles a las células debido a su baja solubilidad, aunque no se podría descartar totalmente la influencia de efectos estéricos y

quizá electrónicos. Los compuestos **1a**, **1h** y **1i** se hidrolizaron parcialmente a la 2,4-dinitroanilina en el medio de cultivo y se obtuvieron mezclas complejas de diferentes subproductos que hasta el momento no han sido caracterizados.

4.7 Síntesis de los 2-alkilbencimidazoles (ciclación de las 2-amino-4-nitroacilanilinas)

La tabla 8 muestra que las aminas **2b - 2g** y **2j** se ciclaron a los correspondientes bencimidazoles **3b - 3g** y **3j** utilizando ácido acético glacial y calentando a 60°C durante 6 horas. Los rendimientos de esta reacción fueron mayores al 86% en todos los casos.

Tabla 8. Ciclación de las 2-amino-4-nitro-acilanilinas

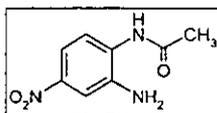


Amina 2	Bencimidazol 3 (%)	Amina 2	Bencimidazol 3 (%)
R		R	
b Me	92	f Pentil	93
c Et	94	g Heptil	86
d Pr	91	j CH ₂ CH ₂ COOH	94
e Bu	90		

4.8 Datos espectroscópicos de los compuestos obtenidos y asignación de estructuras

4.8.1

2-Amino-4-nitro-acetanilida (2)



Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo con punto de fusión de 200-202°C (lit: 204-205°C¹¹⁶) y fue caracterizado mediante experimentos de infrarrojo, masas y resonancia magnética nuclear (tablas 9-12).

Tabla 9. IR de la 2-amino-4-nitroacetanilida (2).

IR (KBr/pastilla) ν max (cm ⁻¹):	3450 (Ar-NH ₂); 3317, 3258 (-NH-); 2925, 2865
Espectro 1	(CH ₃); 1656 (-CO-); 1494; 1347 (Ar-NO ₂).

Tabla 10. EM de la 2-amino-4-nitroacetanilida (2).

EM IE, m/z (int, rel):	195 [M ⁺] (75), 153 [M-CH ₂ CO] ⁺ (100), 107 [153-NO ₂] ⁺ (32),
Espectro 2	80 [107-HCN] ⁺ (15), 43[OCCH ₃] ⁺ (29).

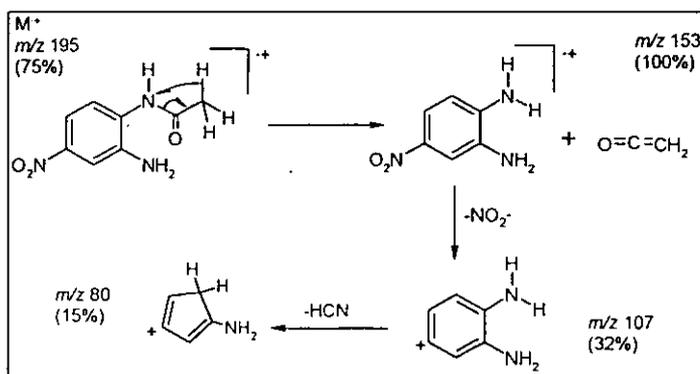


Tabla 11. R.M.N. de ^1H de la 2-amino-4-nitroacetanilida (2) (300MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_6\text{-DMSO}$)

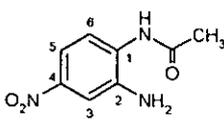
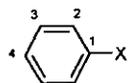
 Espectro 3					
DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS (ppm).					
Constantes de acoplamiento J (Hertz)					
NH (s)	H_6 (d) J_{6-5}	H_3 (d) J_{3-5}	H_5 (dd) $J_{5-6}; J_{5-3}$	NH_2 (s)	CH_3 (s)
9.20	7.71 $J = 8.7$	7.65 $J = 2.7$	7.50 $J = 8.7; 2.7$	4.48	2.20

Tabla 12. R.M.N. de ^{13}C de la 2-amino-4-nitroacetanilida (2) (300MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_6\text{-DMSO}$)

 Espectro 4							
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).							
C7	C4	C2	C1	C6	C3	C5	C8
168.82	144.20	139.66	129.68	123.06	112.14	110.30	23.21

Para asignar las señales de ^{13}C de C5, C6 y C7 se realizó un experimento HETCOR (Espectro 5), las otras asignaciones se hicieron con base en el cálculo teórico de los desplazamientos químicos tal como se muestra a continuación.¹¹⁷



$$\delta_{\text{Cl}} = 128.5 + Z_i$$

Substituyente X	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4
-NHCOCH ₃	9.7	-8.1	0.2	-4.4
-NH ₂	18.2	-13.4	0.8	-10.0
NO ₂	19.9	-4.9	0.9	6.1

Ejemplo:

C-4	Valor base	128.5
	Z_1 (NHCOCH ₃)	9.7
	Z_2 (NH ₂)	-13.4
	Z_4 (NO ₂)	6.1
	Estimado	130.9
	Experimental	129.7

Para corroborar que esta interpretación era correcta y que no se trataba del isómero 4-amino-2-nitroacetanilida, se decidió sintetizar químicamente este compuesto a partir de la materia prima original utilizando limadura de hierro en ácido acético (Figura 36).¹¹⁸ Por este método se aislaron tres compuestos principales de la mezcla de reacción. Se purificaron por cromatografía (hexano-AcOEt 1:1) y se identificaron por espectroscopía como la 2-amino-4-nitroacetanilida (24%), la 4-amino-2-nitroacetanilida (15%) y el 2-metil-6-nitrobenzimidazol (10%). La diferencia entre los isómeros *orto* y *para* se basó en la diferencia que muestran estos compuestos en R.M.N. de ¹H (Figura 37).

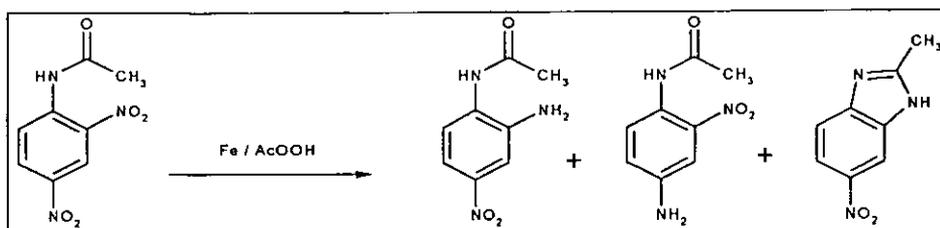


Figura 36. Reducción química de la 2,4-dinitroacetanilida con hierro (0) en ácido acético.

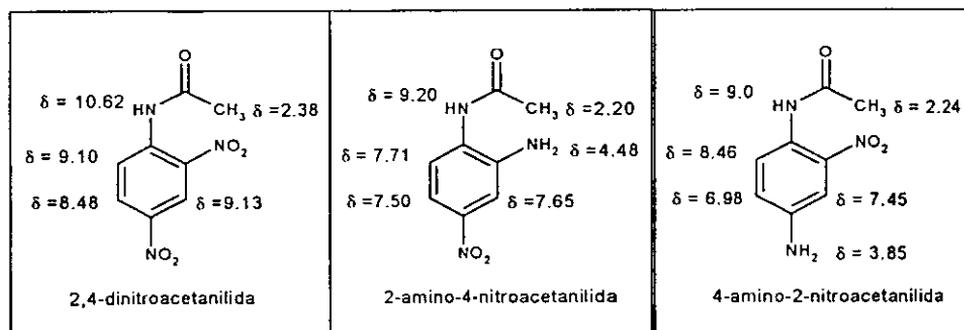


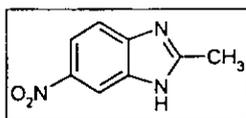
Figura 37. Desplazamientos químicos de los hidrógenos (δ) en ppm de la 2,4-dinitroacetanilida y los dos isómeros obtenidos por su reducción con Fe(0).

En ambos casos las señales se desplazan a campo alto respecto de la materia prima, lo que coincide con la reducción de un grupo nitro, pero en el caso de la 2-amino-4-nitroacetanilida, las señales de los protones aromáticos aparecen más juntas, posiblemente porque los grupos amino y acetanilida son más parecidos entre ellos. Un hecho adicional que ayudó a su identificación fue que la 2-amino-4-nitroacetanilida formó el benzimidazol calentándolo en condiciones ácidas, mientras que la 4-amino-2-nitroacetanilida no formó el

bencimidazol. La 2-amino-4-nitroacetanilida es un sólido amarillo con punto de fusión 190-192°C mientras que la 4-amino-2-nitroacetanilida es un sólido rojo con punto de fusión 165°C.

4.8.2

2-metil-6-nitrobencimidazol (3)



Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo muy pálido con punto de fusión de 214-215°C (lit¹¹⁹ 221°C) y fue caracterizado mediante experimentos de infrarrojo, masas y resonancia magnética nuclear (tablas 13 -16).

Tabla 13. IR del 2-metil-6-nitrobencimidazol 3.

IR (KBr/pastilla) ν max (cm ⁻¹):	3566, 3330, 2926, 2819, 1516, 1472, 1337, 830
--	---

Tabla 14. EM IE del 2-metil-6-nitrobencimidazol 3.

EM IE, m/z (int, rel):	177 (M ⁺ ,100); 161 (4); 147 (25); 131 (45); 119 (13);
Espectro 6	104 (17).

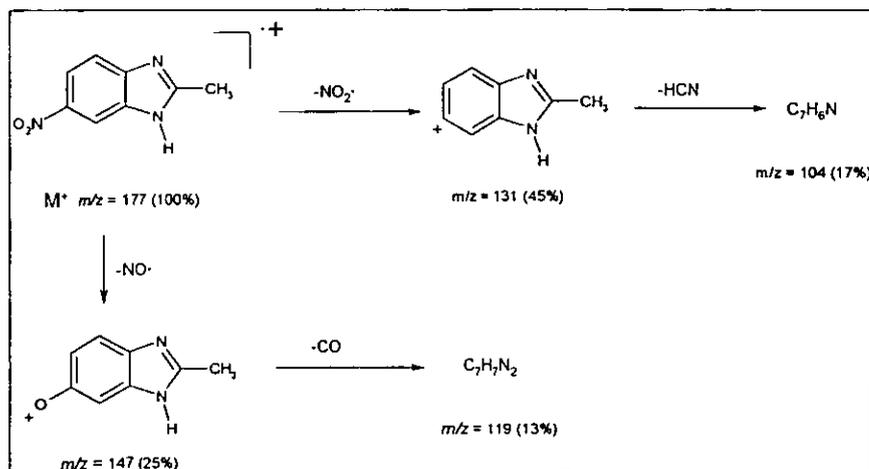


Tabla 15. R.M.N. de ^1H del 2-metil-6-nitrobencimidazol 3. (300MHz, CDCl_3 - d_6 -DMSO)

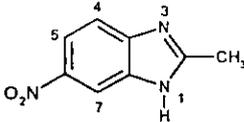
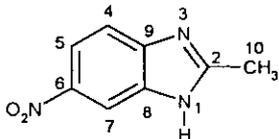
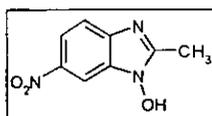
				
Espectro 7				
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).				
Constantes de acoplamiento J (Hertz)				
NH (s)	H-4 (d) J_{4-5}	H-5 (dd) $J_{5-4}; J_{5-7}$	H-7 (d) J_{7-5}	CH ₃ (s)
12.17	8.43 $J = 9.0$	8.10 $J = 8.9, 2.1$	7.54 $J = 2.1$	2.65

Tabla 16. R.M.N. de ^{13}C del 2-metil-6-nitrobencimidazol 3. (75 MHz, CDCl_3 - d_6 -DMSO).

							
Espectro 8							
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).							
C10	C2	C9	C4	C5	C6	C7	C8
15.53	155.73	142.42	113.31	116.95	142.32	110.92	138.45

4.8.3

2-metil-6-nitro-1-hidroxibencimidazol (4)



Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo pálido que descompone a 290°C (lit¹¹⁹ 290-294°C desc), y fue caracterizado mediante experimentos de infrarrojo, masas y resonancia magnética nuclear (tablas 17 -20).

Tabla 17. IR del 1-hidróxi-2-metil-6-nitro-bencimidazol 4.

IR (KBr/pastilla) v max (cm ⁻¹):	3447, 3078, 2410, 1606, 1524, 1349, 1301, 1270,
Espectro 9	122, 1158, 887, 734.

Tabla 18. EM IE del 1-hidróxi-2-metil-6-nitro-bencimidazol 4.

EM IE, m/z (int, rel):	193 (M ⁺ , 100); 177(6); 163(7); 147(13); 130 (22).
Espectro 10	

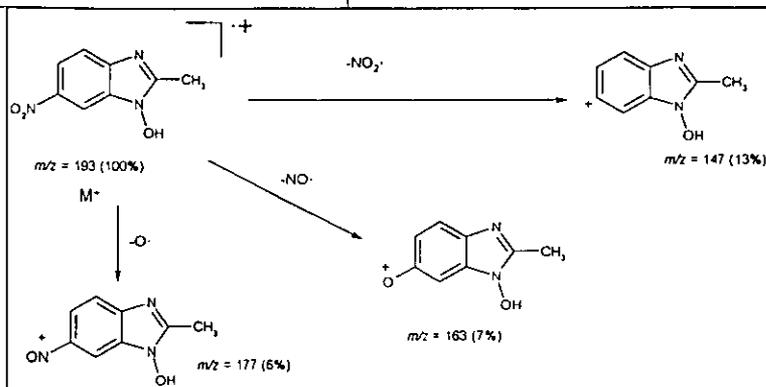
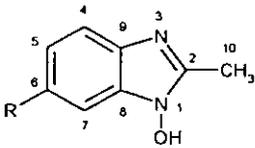


Tabla 19. R.M.N. de ¹H del 1-hidróxi-2-metil-6-nitro-bencimidazol 4 (300MHz, CDCl₃-d₆-DMSO)

Espectro 11				
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).				
Constantes de acoplamiento J (Hertz)				
OH (s)	H-7 (d) $J_{7,5}$	H-5 (dd) $J_{5,4} ; J_{5,7}$	H-4 (d) $J_{4,5}$	CH ₃ (s)
12.3	8.19 $J = 2.3$	8.02 $J = 8.86, 2.32,$	7.65 $J = 8.9$	2.54

Tabla 20. R.M.N. de ^{13}C del 1-hidróxi-2-metil-6-nitro-bencimidazol 4 (75 MHz, CDCl_3 - d_6 -DMSO).

							
Espectro 12							
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).							
C10	C2	C9	C4	C5	C6	C7	C8
12.07	153.57	142.07	116.61	118.66	142.31	104.82	131.27

El 2-metil-6-nitro-1-hidroxibencimidazol es un compuesto que en solución se encuentra en un equilibrio tautomérico con el correspondiente N-óxido (Figura 38).¹²⁰ Sin embargo, la difracción de R-X muestra que es el hidroxibencimidazol el compuesto que se encuentra en estado sólido (figura 39).

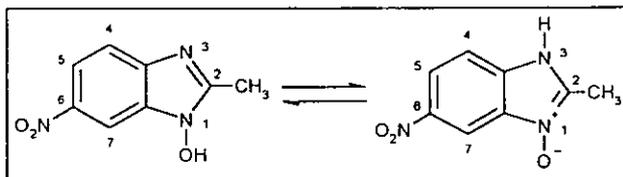


Figura 38. Equilibrio tautomérico entre el hidroxibencimidazol y el N-óxido de bencimidazol

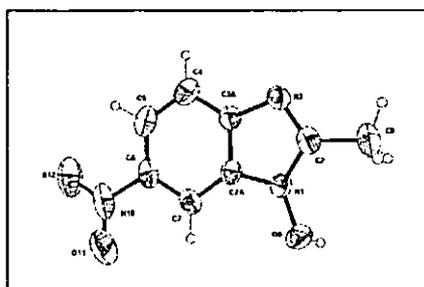
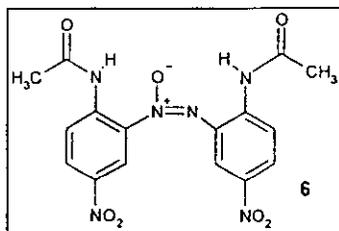


Figura 39. Estructura del 1-hidroxí-2-metil-6-nitrobencimidazol obtenida por difracción de rayos X.

4.8.4 Identificación de la 2-hidroxilamina-4-nitroacetanilida

Los primeros intentos de purificar a la 2-hidroxilamina-4-nitroacetanilida por cromatografía flash no fueron exitosos ya que en pocos minutos las fracciones que tenían al compuesto puro se descomponían. Se probaron dos métodos descritos en la literatura para acilar hidroxilaminas^{38,39}, pero tampoco se obtuvieron los resultados deseados. Finalmente, se hizo una reacción de oxidación utilizada para detectar hidroxilaminas muy inestables con oxígeno en un medio básico^{43,44}. De esta forma fue posible acilar e identificar por métodos espectroscópicos al 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazobenceno (6)

4.8.4.1 Caracterización del 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazobenceno (6)



Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo que descompone a 265°C y fue caracterizado mediante experimentos de infrarrojo, masas y resonancia magnética nuclear (tablas 19 -22).

Tabla 21. IR del 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazobenceno.

IR (KBr/pastilla) ν max (cm ⁻¹):	3293, 1700, 1598, 1512, 1492, 1340, 1280, 721.
Espectro 13	

Tabla 22. E.M. del 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazobenceno.

EM IE, m/z (int, rel):	402 M+(75%), 386 (M-O) (15%); 360 (M-OCCH ₂) (100%) 318 (M-OCCH ₂ -OCCH ₂) (40%) 301(318-NH ₃) (65%).
Espectro 14	

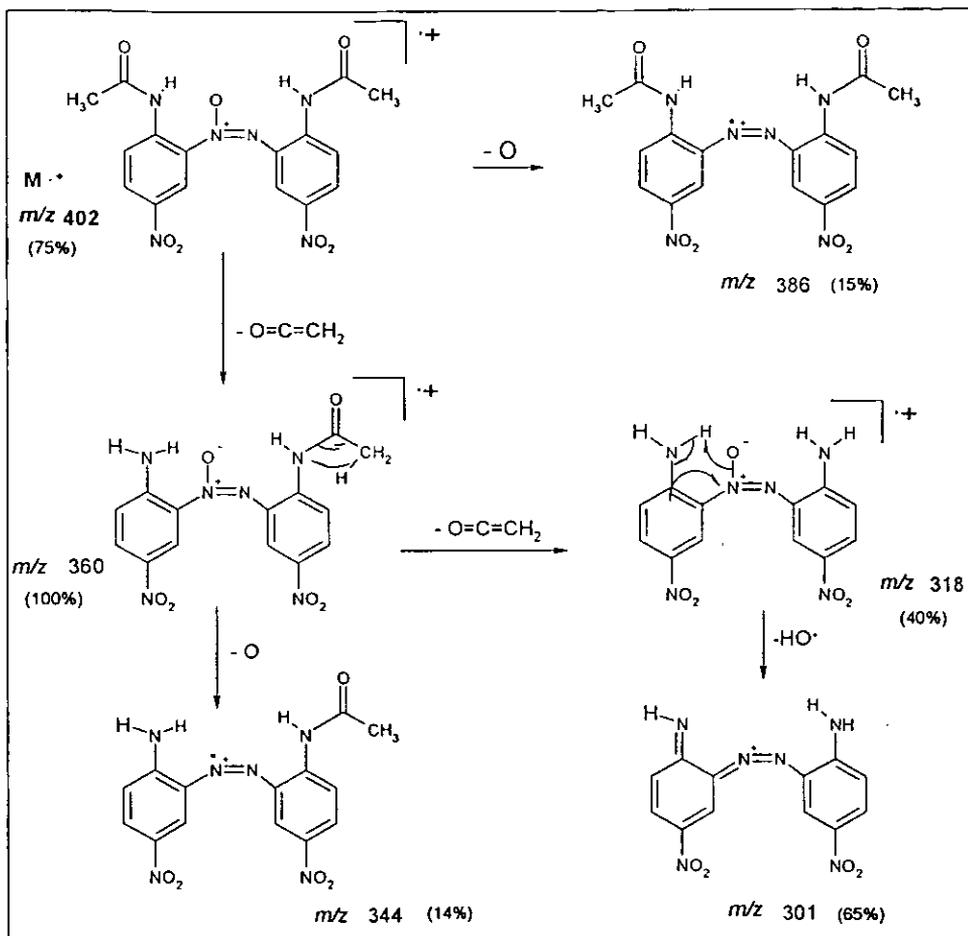
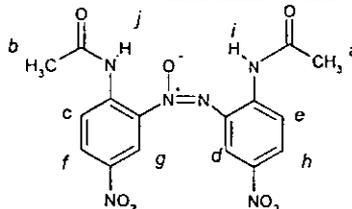


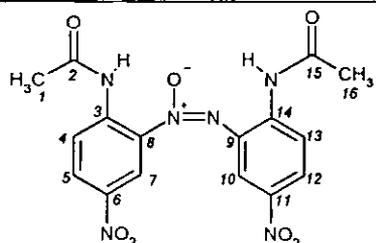
Tabla 23. R.M.N. de ^1H del 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazoxibenceno. (300MHz, d_6 -DMSO)



Espectro 15

DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).				
Constantes de acoplamiento J (Hertz)				
H-j (s)	H-c (d) J _{c-f}	H-g (d) J _{g-f}	H-f (dd) J _{f-c} ; J _{f-g}	3 H - b (s)
10.61	8.12 J = 9.1	8.93 J = 2.7	8.47 J = 9.1; 2.8	2.13
H-i (s)	H-h (m)	H-d,e (m)		3 H - a (s)
9.96	9.12	8.30		2.19

Tabla 24. R.M.N. de ^{13}C del 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazoxibenceno. (75MHz, d_6 -DMSO)



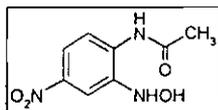
Espectro 16

DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).							
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
24.12	169.36	139.50	124.43	126.61	142.57	121.59	139.26
C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16
137.03	122.09	142.03	118.09	124.84	133.07	169.29	23.86

Para asignar las señales de ^1H y ^{13}C se realizaron experimentos de COSY (Espectro 17) y HETCOR (Espectro 18).

4.8.5 Caracterización de la 2-hidroxilamina-4-nitroacetanilida

2-Hidroxilamino-4-nitro-acetanilida (5)



Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo con punto de fusión 143-145°C y fue caracterizado mediante experimentos de infrarrojo, masas y resonancia magnética nuclear (tablas 25 -28).

Tabla 25. IR.de la 2-hidroxilamino-4-nitroacetanilida (5)

IR (KBr/pastilla) ν max (cm^{-1}):	3293, 3264, 3207, 1663, 1519, 1342, 1287, 744, 716.
Espectro 19	

Tabla 26. E.M. de la 2-hidroxilamino-4-nitroacetanilida (5).

EM IE, m/z (int, rel):	211 (M^+ , 2), 209 (21), 195 (60), 177(49), 167, (68), 153 (100),
Espectro 20	137(24), 131(25), 107 (30), 90(17), 80 (15), 63(15), 43(38).

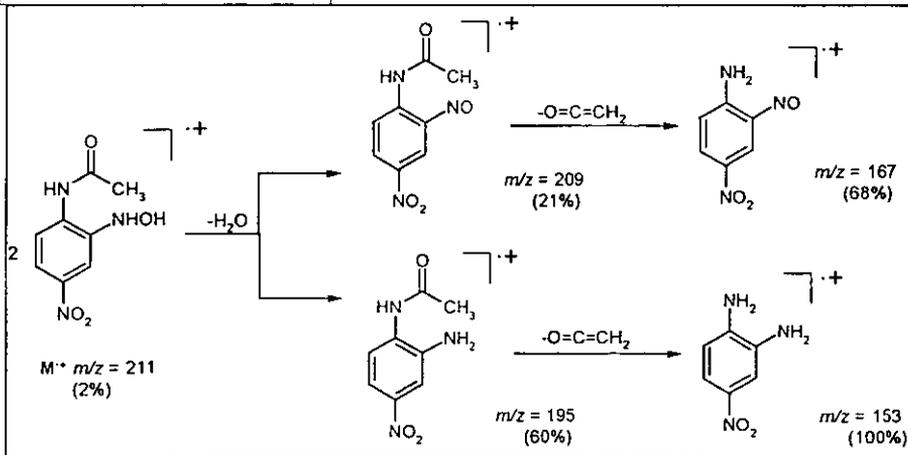


Tabla 27. R.M.N. de ^1H de la 2-hidroxilamino-4-nitroacetanilida (5). (300MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_6\text{-DMSO}$)

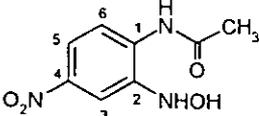
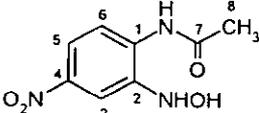
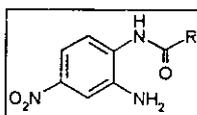
					
Espectro 21					
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).					
Constantes de acoplamiento J (Hertz)					
NH (s)	H-3 (d) J_{3-5}	H-6 (d) J_{6-5}	H-5 (dd) $J_{5-6}; J_{5-3}$	NHOH (s)	CH_3 (s)
9.07	8.15 $J = 2.8$	7.82 $J = 8.8$	7.74 $J = 8.8; 2.8$	8.35	2.20

Tabla 28. R.M.N. de ^{13}C de la 2-amino-4-nitroacetanilida (2). (300MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_6\text{-DMSO}$)

							
Espectro 22							
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).							
C7	C4	C2	C1	C6	C3	C5	C8
168.91	144.27	142.49	130.49	122.09	115.82	109.89	23.54

4.8.6 Datos espectroscópicos de las 2-amino-4-nitroacetanilinas



Todos estos compuestos son sólidos amarillos con los siguientes puntos de fusión

Tabla 29. Puntos de fusión de las 2-amino-4-nitroacilanilinas

R	p.f. (°C)	R	p.f. (°C)
Et	132-134	Pen	115-116
Pr	133-135	Hep	114
Bu	123-125		

Todos los espectros de infrarrojo de las 2-amino-4-nitroacilanilidas son muy similares y muestran las bandas de la tabla 30. Solamente las bandas de 2916 y 2847 correspondientes a la región de metilenos aumento de intensidad a medida que la cadena hidrocarbonada creció.

Tabla 30. IR de las 2-amino-4-nitroacilanilinas.

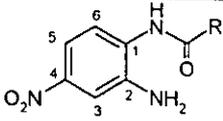
IR (KBr/pastilla) v max (cm ⁻¹):	3452(Ar-NH ₂); 3374; 3255(-NH-); 2916; 2847(CH ₂ , CH ₃); 1653 (CO); 1501; 1347(Ar-NO ₂); 876; 738 (NH ₂ , anillo)
--	--

En espectrometría de masas en todos los casos se observó el ión molecular, pero el pico base en todos los casos fue m/z = 153, correspondiente a la diamina que se obtiene al romperse el enlace N-CO de la amida.

Tabla 31. E.M. de las 2-amino-4-nitroacilanilinas

R	M ⁺ m/z (int. rel)	otros fragmentos m/z (int. rel)
-CH ₂ -CH ₃	209 (52)	191(19); 180(26); 153(100); 107(20); 57(38)
-(CH ₂) ₂ -CH ₃	223 (40)	180(14); 153(100); 107(15); 71(34); 43(49)
-(CH ₂) ₃ -CH ₃	237 (40)	180(12); 177(29); 153 (100); 107(12); 85(25); 57(35)
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	251 (36)	233(4); 221(3); 190(12); 177(20); 153 (100); 131(7); 123(6); 107(9); 99(20); 71 (14); 43(18)
-(CH ₂) ₆ -CH ₃	279 (28)	261(5); 249 (5); 232(8); 190 (15); 177(24); 153(100); 127(18); 107(9); 57(28)

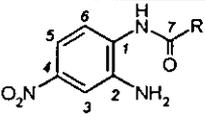
Tabla 32. R.M.N. de ¹H de las 2-amino-4-nitroacilanilinas. (300MHz, CDCl₃-d₆-DMSO)



DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS (ppm).
Constantes de acoplamiento J (Hertz)

R	NH (s)	H-6 (d) J ₆₋₅	H-3 (d) J ₃₋₅	H-5 (dd) J ₅₋₆ ; J ₅₋₃	NH ₂ (s)							
						CH ₂	CH ₃					
Et	8.93	7.71 J=8.7	7.64 J=2.7	7.55 J=8.7 J=2.7	4.38	-	-	-	--	--	2.47 (cuad)	1.23 (t)
Pr	9.01	7.72 J=8.8	7.66 J=2.8	7.56 J=8.8 J=2.7	4.45	-	-	-	-	2.43 (t)	1.75 (sex)	1.01 (t)
Bu	9.14	7.73 J=9.0	7.65 J=2.7	7.47 J=9.0 J=2.7	5.05	-	-	-	2.44 (t)	1.69 (quin)	1.38 (sex)	0.95 (t)
Pe	8.94	7.70 J=8	7.64 J=2.8	7.56 J=8.8 J=2.8	4.86	-	-	2.44 (t)	1.73 (quin)	1.36 (m)	1.36 (m)	0.92 (t)
Hep	8.98	7.70 J=8.8	7.64 J=2.5	7.55 J=8.8 J=2.5	4.54	2.44(t)	1.72 (quin)	1.34 (m)	1.34 (m)	1.34 (m)	1.34 (m)	0.92 (t)

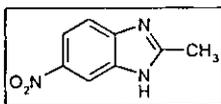
Tabla 33. R.M.N. de ¹³C de las 2-amino-4-nitroacilanilinas. (75MHz, CDCl₃-d₆-DMSO)



R	C7	C4	C2	C1	C6	C3	C5
Me	168.82	144.20	139.66	129.68	123.06	112.14	110.30
Et	172.69	144.38	139.61	130.11	123.20	112.79	110.77
Pr	171.90	144.28	139.47	130.11	123.19	112.79	110.81
Bu	172.00	144.17	140.11	129.78	123.03	111.83	110.171
	-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CH ₃			
Me				23.21			
Et			29.35	27.87			
Pr		38.15	18.47	13.19			
Bu	35.92	27.14	21.75	13.33			

4.8.7

Datos espectroscópicos de los 2-alkil-6-nitro-bencimidazoles



Todos estos compuestos son sólidos blancos-amarillos con los siguientes puntos de fusión

Tabla 34. Puntos de fusión de los 2-alkil-6-nitro-bencimidazoles

R	p.f. (°C)	R	p.f. (°C)
Et	166-168	Pen	128
Pr	163-135	Hep	124
Bu	134-135		

Todos los espectros de infrarrojo de los 2-alkil-6-nitro-bencimidazoles son muy similares y muestran las siguientes bandas.

Tabla 35. IR de los 2-alkil-6-nitro-bencimidazoles.

IR (KBr/pastilla) ν max (cm ⁻¹):	3430(N-H); 3000-2800 ancha(NH, Puente de H); 2980; 2930 (CH ₂ , CH ₃); 1626 (anillo aromático); 1592, 1472, 1452 y 1418 (C=N y C=C) 1514 y 1341(Ar-NO ₂); 825; 734 (anillo Ar.)
--	--

Tabla 36. E.M. de los 2-alkil-6-nitro-bencimidazoles

R	M ⁺ m/z (int. rel)	otros fragmentos m/z (int. rel)
-CH ₂ -CH ₃	191 (100)	190(73); 176 (5); 161(12); 145(45); 144(38); 130(9)
-(CH ₂) ₂ -CH ₃	205 (49)	204(24); 190(66); 177(100); 158(32);144(37); 131(73)
-(CH ₂) ₃ -CH ₃	219 (6)	218(1); 204 (5); 190(24); 177(100); 158(7);144(10); 131(32)
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	233 (25)	218(1); 204 (19); 190(66); 177(100); 158(7);144(12); 131(32)
-(CH ₂) ₆ -CH ₃	261 (26)	246 (4); 232(26); 218(14); 204 (8); 190(66); 177(100); 158(6);144(12); 131(29)

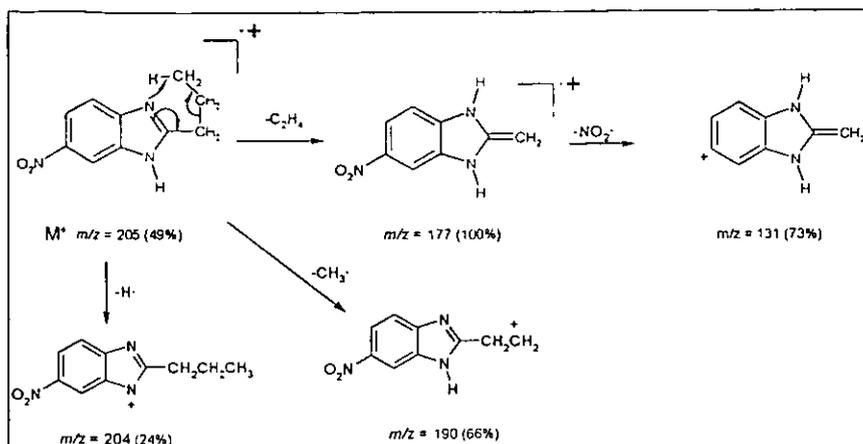


Tabla 37. R.M.N. de ^1H de los 2-alkil-6-nitro-benzimidazoles. (300MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_6\text{-DMSO}$)

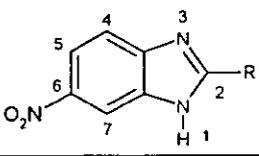
											
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).											
Constantes de acoplamiento J (Hertz)											
R	NH (s)	H-4 (d) $J_{4,5}$	H-5 (dd) $J_{5,4}; J_{5,7}$	H-7 (d) $J_{7,5}$	CH ₂	CH ₃					
Et	12.17	7.56 $J = 8.8$	8.11 $J = 8.8, 2.2$	8.45 $J = 2.2$		-	-	-	-	2.98 (cuad)	1.46 (t)
Pr	12.10	7.56 $J = 9.0$	8.11 $J = 9.0, 2.1$	8.45 $J = 2.1$		-	-	-	2.92 (t)	1.91 (sex)	1.04 (t)
Bu	12.14	7.60 $J = 8.8$	8.19 $J = 8.8, 2.0$	8.50 $J = 2.0$			-	3.00 (t)	1.89 (quin)	1.46 (sex)	0.96 (t)
Pe	12.17	7.60 $J = 8.8$	8.18 $J = 8.8, 2.1$	8.49 $J = 2.1$			-	3.00 (t)	1.90 (quin)	1.36 (m)	1.36 (m)
Hep	12.12	7.60 $J = 8.8$	8.19 $J = 8.8, 2.1$	8.49 $J = 2.1$	2.99(t)	1.90 (quin)	1.32 (m)	1.32 (m)	1.32 (m)	1.32 (m)	0.85 (t)

Tabla 38. R.M.N. de ^{13}C de los 2-alkil-6-nitro-bencimidazoles. (75MHz, CDCl_3 - d_6 -DMSO)

R	C2	C9	C4	C5	C6	C7	C8
Me	155.73	142.42	113.31	116.95	142.32	110.92	138.50
Et	160.74	142.47	113.36	116.95	142.25	111.10	138.37
Pr	159.39	142.51	113.24	116.68	142.40	110.79	138.35
Bu	159.59	142.50	114.44	118.48	143.57	111.56	138.41
	-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CH ₃			
Me				14.53			
Et			22.15	11.36			
Pr		30.56	20.39	12.91			
Bu	29.95	29.21	22.42	13.69			

5 DISCUSIÓN

La biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida (1) con *S. cerevisiae* dio como resultado la formación de tres compuestos: la 2-amino-4-nitroacetanilida (2), el 2-metil-6-nitrobencimidazol (3) y el 2-metil-6-nitrohidróxibencimidazol (4). Un cuarto compuesto se aisló al detener la reacción en las primeras horas y se identificó como la 2-hidroxilamina-4-nitroacetanilida (5). A partir de las gráficas de la concentración de cada uno de los compuestos a diferentes tiempos, fue posible proponer el siguiente mecanismo (Figura 40).

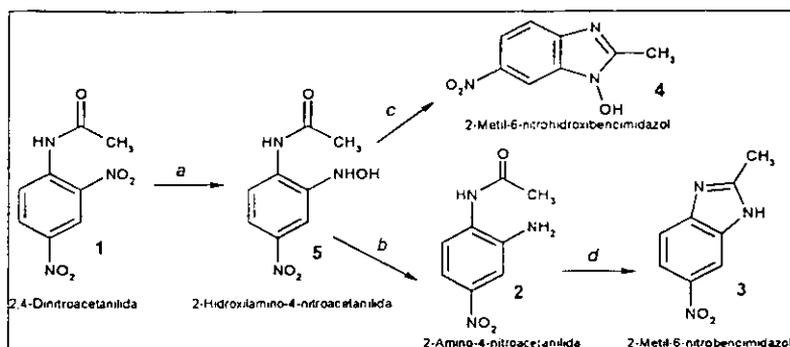


Figura 40. Mecanismo de la biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida.

Inicialmente el sustrato (1) es reducido por la levadura en la posición dos para formar una hidroxilamina (5). Este hecho se puede observar en los primeros minutos de la biotransformación cuando la hidroxilamina tiene una concentración más alta que cualquiera de los otros productos. Después, la hidroxilamina es reducida de nuevo por la levadura para formar la amina (2). Además de reducirse, la hidroxilamina se puede ciclar espontáneamente para formar el hidróxibencimidazol (4). Este último paso es más rápido en un medio ácido que en uno neutro.

La amina (2) no es biotransformada posteriormente por acción de la levadura, sin embargo, en un medio ácido también se cicla lenta y espontáneamente al bencimidazol (3). Si la reacción se lleva a cabo a pH neutro, no se observa la formación de bencimidazol.

Otro hecho que se observó al hacer este estudio, es que en cualquiera de los dos pHs estudiados, la rapidez a la cual se reduce el sustrato, es mayor que la rapidez a la cual se reduce la hidroxilamina. Gracias a esto, la hidroxilamina se acumula y puede ser aislada e identificada. El mismo fenómeno se ha observado en la hidrogenación catalítica de compuestos aromáticos nitrados^{35,35} y en algunas reducciones efectuadas por microorganismos.¹²¹ En ambos casos la velocidad de reducción de la hidroxilamina a la amina es el paso limitante de la reacción. Una explicación que se ha encontrado es que la hidrogenación de la hidroxilamina tiene una entalpía de casi el doble de lo que tiene la hidrogenación del nitro o nitroso (Figura 41).

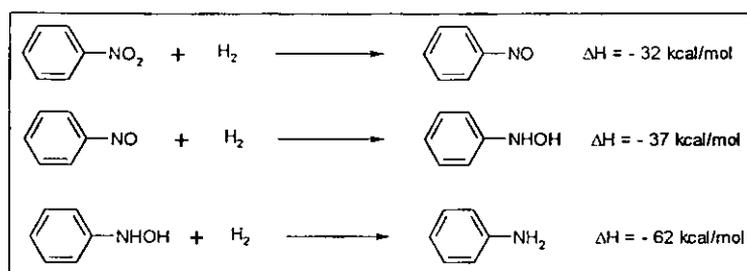


Figura 41. Entalpías de hidrogenación del nitrobenzeno y dos intermediarios.

El mismo fenómeno se puede explicar también desde el punto de vista del potencial redox de los compuestos. Por ejemplo, en la reducción del trinitrotolueno, a medida que los grupos nitro se van transformando a aminas, el potencial de reducción estándar disminuye (Figura 42), lo que significa que el agente reductor tendrá mayor dificultad para seguir reduciendo al compuesto.

Como resultado de estos factores, la conversión de la hidroxilamina a la anilina además de ser el paso limitante de la reacción, es el que tiene mayores problemas de quimioselectividad porque requiere de condiciones más drásticas para efectuarse. Lo anterior puede afectar a otros grupos funcionales en la molécula, por ejemplo algunos compuestos dinitrados en vez de ser reducidos totalmente a la amina en un solo grupo, son reducidos a las di-hidroxilaminas como ocurre al biotransformar 2,6-dinitrotolueno con *Clostridium acetobutylicum* (Figura 43).

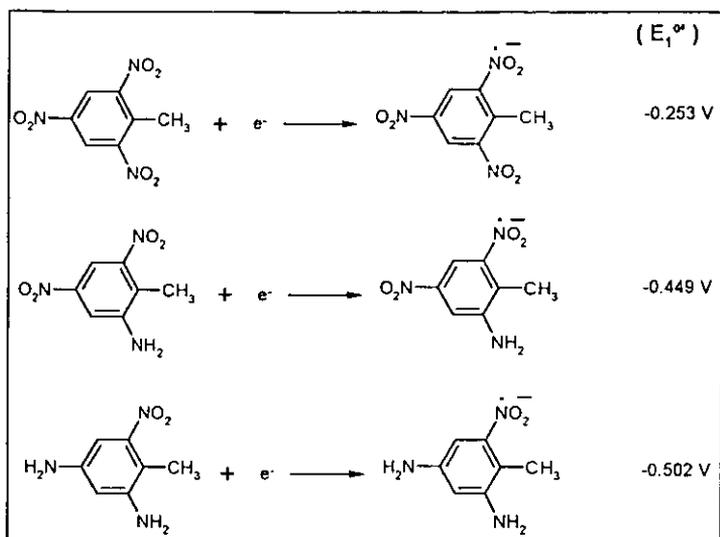


Figura 42. Potenciales de reducción estándar de electrón simple a pH 7.0 del trinitrotolueno y dos intermediarios de su reducción.

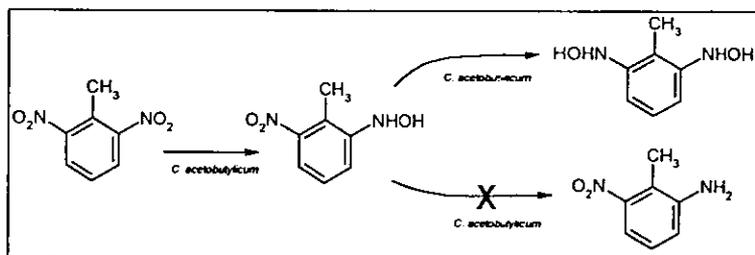


Figura 43. Biotransformación del 2,6-dinitrotolueno por *Clostridium acetobutylicum*

El hecho de que la hidroxilamina permanezca tanto tiempo en el medio de reacción tiene ventajas y desventajas. Por un lado, son indeseables porque son compuestos inestables que se pueden oxidar,⁴³⁻⁴⁶ desproporcionar²⁴ o sufrir reordenamientos (reacción de Bamberger).¹⁰⁷ En nuestro caso, quizás porque se utilizan condiciones suaves de reacción y quizá porque no hay mucho oxígeno disuelto en el medio, no observamos la formación de ningún subproducto de esas reacciones (la formación del azoxibencimidazol se dió solamente cuando se tomaron las alícuotas y se les hizo una extracción vigorosa). La única reacción colateral de las hidroxilaminas que se observó fue la formación del hidroxibencimidazol, la cual se pudo

controlar variando el pH. Otra desventaja que podría existir es la toxicidad que tienen las hidroxilaminas sobre los organismos vivos,⁸⁰⁻⁸² lo cual podría inhibir de alguna forma su propia reducción.

Desde el otro punto de vista, la acumulación de las hidroxilaminas en el medio puede ser provechosa. En primer lugar porque existen pocos métodos para sintetizarlas y si se varían las condiciones de esta biotransformación (acidez, medios orgánicos, relación sustrato :levadura, tiempo, etc.), se podría contar un método nuevo y eficiente para prepara estos compuestos. En segundo lugar, las hidroxilaminas se pueden utilizar en la preparación de heterociclos N-hidroxilados. Un ejemplo de esta reacción es la formación de hidroxibencimidazoles que se presentó en este trabajo. Los hidroxibencimidazoles son un tipo de compuestos raros en la literatura, porque los métodos para sintetizarlos son muy limitados⁷ y, por lo tanto, su química se ha investigado escasamente y aun no se les conocen aplicaciones comerciales. Sin embargo, en uno de los pocos trabajos que se han hecho al respecto, se ha encontrado que pueden tener un potencial enorme como sustancias con actividad biológica, por ejemplo, como fármacos contra el VIH.¹¹⁰

Como se ha mencionado antes, las principales diferencias que se observan entre la reacción llevada a cabo en un medio sin amortiguador y uno a pH 7.5, son los procesos de ciclación de la hidroxilamina y la amina. Este fenómeno puede ser importante en las biotransformaciones de compuestos nitroaromáticos con sustituyentes en la posición *orto* que sean capaces de formar heterociclos como los aquí estudiados. El pH en estas reacciones puede ser modificado para dirigir o no la reacción hacia la síntesis de heterociclos.

Otra diferencia muy importante entre las biotransformaciones a los dos diferentes pH es la velocidad a la cual ocurre la reducción del sustrato. En la reacción a pH 7.5, la 2,4-dinitroacetanilida fue reducida más rápido que en la reacción a pH 3.5 (Figura 44). En ambos casos los datos experimentales se ajustan a la ecuación integrada para una reacción de primer orden (Figura 45).¹³⁰ Las constantes de velocidad obtenidas por este procedimiento son 0.017 min⁻¹ cuando el pH de la biotransformación es 3.5 y de 0.048 min⁻¹ cuando el pH es 7.5. Sin embargo, sería muy adecuado hacer mediciones sobre la velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato para compara esos resultados con los aquí obtenidos.¹³⁰

En las biotransformaciones de grupo nitros con *S. cerevisiae* reportadas en la literatura⁹⁴⁻⁹⁹ nunca se ha controlado el pH por considerar que no es un factor determinante, pero los resultados encontrados en este trabajo señalan que si se cuida esta variable tan sencilla, se podrían mejorar los rendimientos, así como ahorrar tiempo y energía.

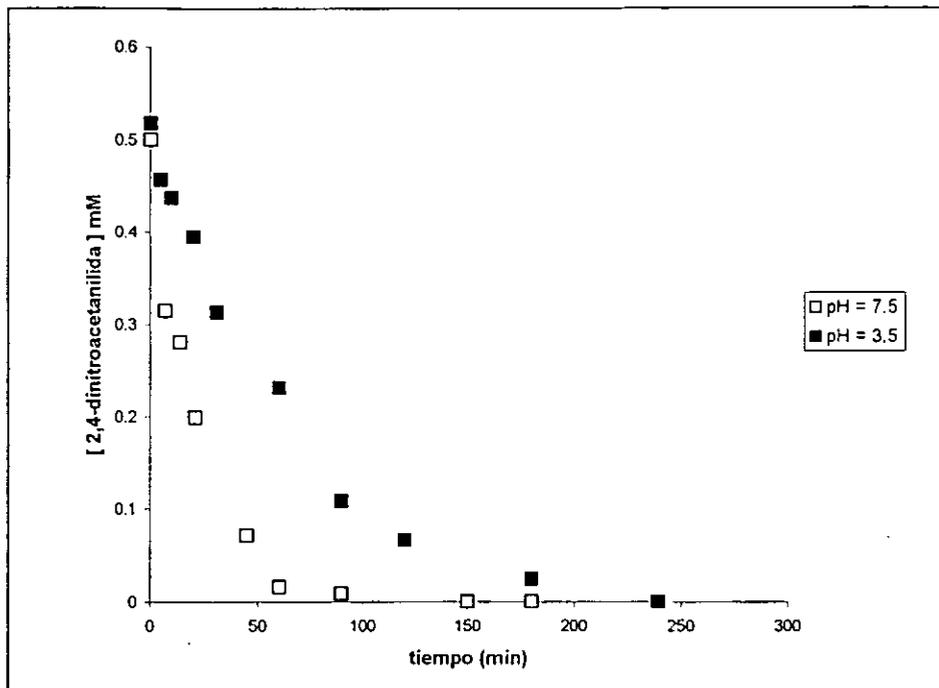


Figura 44. Desaparición de la 2,4-dinitroacetanilida (sustrato) a los dos diferentes pHs

Ecuación de velocidad de una reacción de primer orden con respecto a la 2,4-dinitroacetanilida (2,4-DNA)

$$[2,4-DNA] = [2,4-DNA]_0 e^{-k t}$$

$[2,4-DNA]$ = Concentración de la 2,4-DNA a cualquier tiempo

k = constante de velocidad de primer orden

$[2,4-DNA]_0$ = Concentración inicial de la 2,4-DNA

t = tiempo

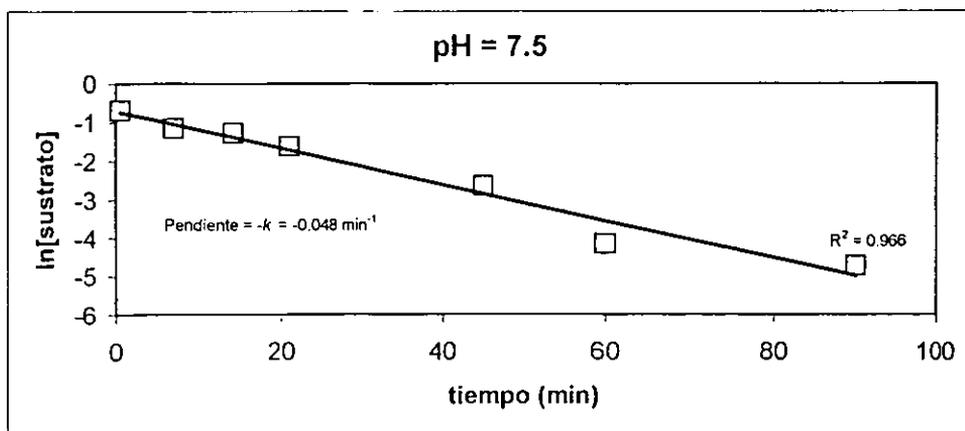
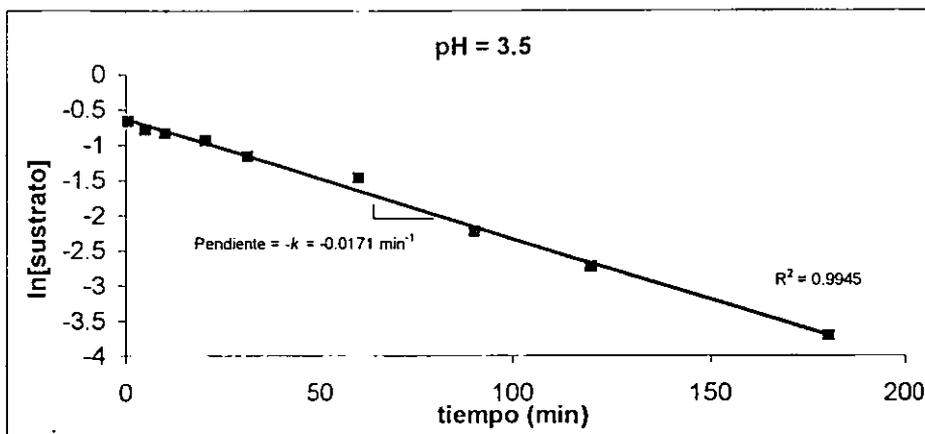


Figura 45. Análisis gráfico de los resultados de la desaparición de la 2,4-dinitroacetanilida para una reacción de primer orden a dos diferentes pHs.

En todos los sustratos que fueron reducidos por la levadura de pan, el único grupo nitro que se redujo fue el de la posición dos y con muy buenos rendimientos. Este resultado es inusual tanto en las reducciones químicas (ver introducción) como en sistemas biológicos, pues por lo general, las bacterias atacan indistintamente a los diferentes grupos nitros de un compuesto o reducen a todos.⁷⁹ La alta selectividad encontrada es un caso muy importante porque no hay muchos métodos con tan altos rendimientos. Sin embargo, estos resultados alentadores deben de ser tomados con precaución ya que en otros compuestos dinitrados reducidos con esta misma levadura no se obtuvieron tan buenos resultados.⁹⁶

Una hipótesis sobre la selectividad de la reducción en compuesto 2,4-dinitrosustituídos con *S. cerevisiae* propone que la presencia de un par de electrones libres en el sustituyente favorece la reducción del nitro en la posición *orto* mientras que cuando hay impedimento estérico en el sustituyente, se favorece la formación de la amina en *para* (Figura 46). En nuestro caso se tiene el par de electrones libres, lo que favorecería la reducción en *orto*, pero a pesar de que se probaron sustituyentes "voluminosos" (cadenas de cinco y siete átomos de carbono), no observamos la formación de amina en la posición *para*.

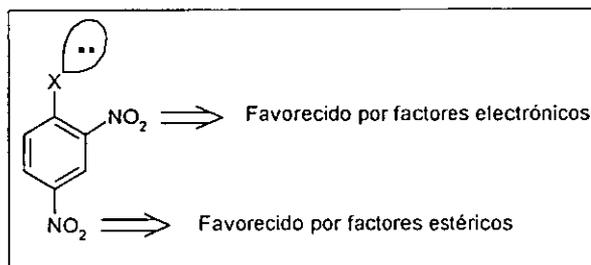


Figura 46. Modelo propuesto para la reducción regioselectiva de grupos nitro aromáticos con *S. cerevisiae*.⁹⁶

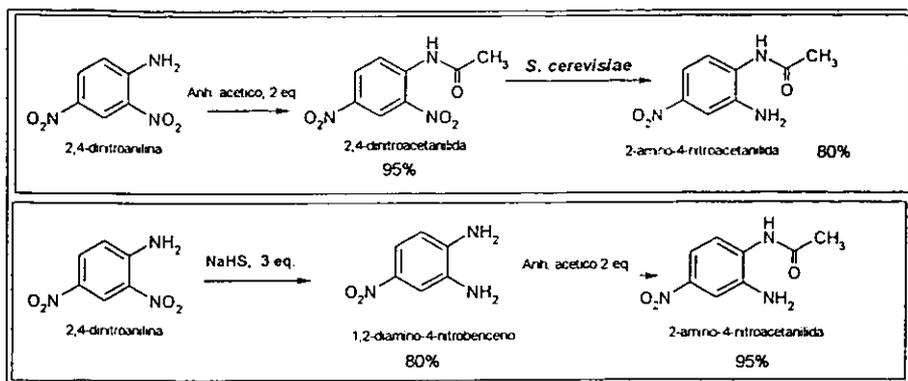
Esta reducción regioselectiva es una herramienta muy útil para enfrentar problemas difíciles de síntesis, así como sustituir procesos que se utilizan actualmente y son contaminantes y con reactivos no renovables. Otra ventaja adicional que mostró esta reacción es que no se aisló ningún subproducto (grupos azo, hidrazo o azoxi) de los que con frecuencia se forman en la reducción química de grupos nitroaromáticos.

Dos de las 2,4-dinitroacilanilinas probadas en la biotransformación, son muy poco solubles en el medio acuoso y precipitan. Este problema puede llegar a ser una limitante de esta técnica sobre todo si se piensa en que muchos compuesto orgánicos podrían presentar las mismas dificultades. Algunas alternativas para evitar este problema son el uso de surfactantes o bien utilizar medios no acuosos para realizar la reducción.¹²²

La hidrólisis de algunos de algunos sustratos en la biotransformación parece ser un ejemplo de la principal desventaja que se tiene al trabajar con células completas: la acción de otra enzima sobre los sustratos. Aunque todavía hace falta realizar otros experimentos para comprobar esta idea, se podría pensar también en utilizar inhibidores¹²³ o medios orgánicos para realizar la reacción.¹²²

El tipo de nitrobenzimidazoles que se sintetizaron en este proyecto son compuestos que podrían servir como fármacos selectivos contra células de algunos tipos de tumores⁹² y normalmente se obtienen fácilmente a partir de la 1,2-diamino-4-nitrobenzoceno y los anhídridos o cloruros de ácido correspondientes. Estas dos materias primas son baratas y la reacción generalmente ocurre con buenos rendimientos. Sin embargo, las ventajas que presenta la biotransformación con *S. cerevisiae* radican en que es un método limpio, que no genera residuos tóxicos, es fácil de realizar y que utiliza condiciones suaves de reacción. Una comparación de los costos aproximados entre los dos métodos se muestra en la figura 47.

Algunos otros métodos recientes en la literatura han utilizado esta misma ruta sintética para producir benzimidazoles y los rendimientos que se obtienen son más o menos comparables (Figura 48). Sin embargo, si se aplicaran a la reducción de las 2,4-dinitroacilanilinas, seguramente no mostrarían una selectividad tan alta.



Síntesis Química	Cantidad	Costo ¹³¹ (pesos)	Síntesis Biocatalítica	Cantidad	Costo ¹³¹ (pesos)
2,4-Dinitroanilina	100 g	56.40	2,4-Dinitroanilina	100 g	56.40
NaHS	92 g	140.60	Anhídrido acético	112 g	30.00
Anhídrido acético	112 g	30.00	<i>S. cerevisiae</i>	2.5 kg	115.00
	Total	227.00		Total	201.40

Figura 47. Costos aproximados para preparar 95 g de 2-amino-4-nitroacetanilida por dos métodos diferentes.

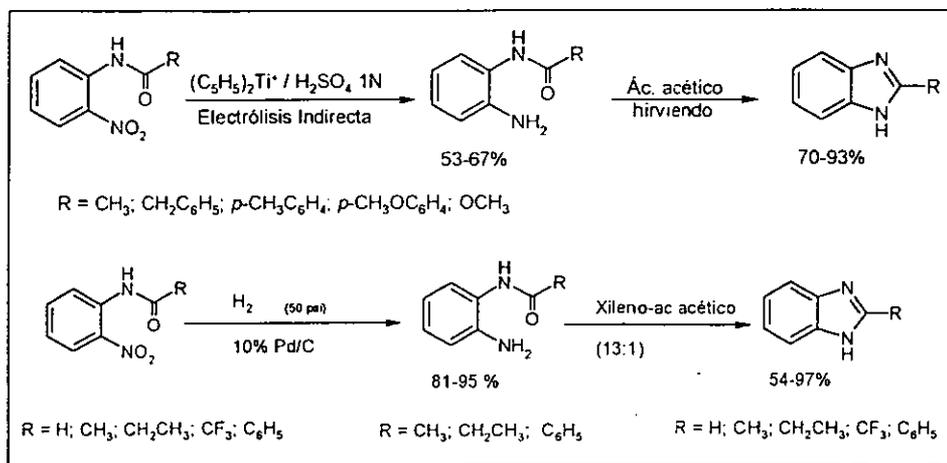


Figura 48. Algunos métodos para sintetizar benzimidazoles.^{124, 125}

Es difícil en este momento hacer alguna suposición sobre cual o cuales podrían ser las enzimas responsables de la biotransformación observada ya que no se hizo ningún experimento al respecto. Sin embargo, en la búsqueda bibliográfica se ha encontrado que algunos citocromos de la levadura utilizada han sido probados y reducen algunos compuestos nitrados.⁹² Estas enzimas y otras del tipo "sensibles al oxígeno" podrían encontrarse presentes en las levaduras, pero sería muy interesante descartar la posibilidad de que existan otras enzimas "insensibles al oxígeno", ya que en eucariontes existen muy pocos ejemplos de este tipo de enzimas.

Finalmente se podría mencionar que para mejorar los rendimientos y eficiencia de la biotransformación estudiada, se podrían investigar posteriormente algunas otras variables como:

1) La concentración de sustrato: Realizar experimentos sobre velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato. Ver los rendimientos en cada caso.

2) La cantidad y el tipo de carbohidrato que se utiliza. Aunque de forma cualitativa se ha visto que la biotransformación puede ocurrir sin agregar un carbohidrato, el sustrato no es reducido en un 100%, sin embargo, sería muy interesante conocer realmente cuanto azúcar se está consumiendo.

3) La cantidad de oxígeno en el medio. Si este parámetro se puede medir en la biotransformación se podrían hacer algunas conclusiones sobre el tipo de enzimas que utiliza la levadura para llevar a cabo la reacción.

4) Temperatura. Algunas biotransformaciones con esta levadura han probado tener sus condiciones óptimas a temperaturas cercanas a los 40 °C, mientras que otras han sido llevadas a cabo con éxito a 4°C.¹²⁶

5) Cantidad de levadura y la relación sustrato:levadura

6) Otras especies de levaduras o microorganismos.

6 CONCLUSIONES

El estudio de la biotransformación de la 2,4-dinitroacetanilida con *S. cerevisiae* permitió identificar como intermediario de la reacción a la 2-hidroxiilamina-4-nitroacetanilida. Con este resultado, se propuso un mecanismo en el cual la levadura reduce al sustrato en el grupo nitro de la posición *orto*, para formar primero una hidroxiilamina y después una amina. Ambos compuestos se pueden ciclar espontáneamente en el medio, preferentemente cuando es ácido, para dar lugar a un hidroxibencimidazol y un bencimidazol, respectivamente.

Cuando el pH de la biotransformación se mantuvo en 7.5 fue posible inhibir la formación de heterociclos y, por lo tanto, se favoreció la síntesis de la 2-amino-4-nitroacetanilida de manera casi exclusiva. Esta misma técnica se aplicó a una serie de sustratos relacionados (2,4-dinitroacetanilinas) y se comprobó que la reducción es regioselectiva en todos los casos y que se puede dirigir hacia la formación de las aminas correspondientes en buenos rendimientos. Estas aminas se ciclaron a los respectivos bencimidazoles con ácido acético a 60°C.

Las biotransformaciones que se investigaron son una nueva ruta para formar hidroxibencimidazoles y aminas que después se pueden ciclar fácilmente para generar bencimidazoles. Además, es una reacción regioselectiva, barata, sencilla y no genera desechos tóxicos.

Las condiciones de reacción pueden ayudar a predecir el tipo de compuestos que se obtendrán a partir de compuestos aromáticos nitrados con sustituyentes en la posición *orto* y en cierta medida dirigir la reacción hacia la formación mayoritaria de alguno de ellos. Esta metodología permitirá sintetizar heterociclos de nitrógeno por una ruta novedosa.

7 REFERENCIAS

- ¹ Booth, G., Nitro Compounds, Aromatic. En *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH, 1991, V. A17, pp. 411-412.
- ² Una revisión sobre nuevos métodos selectivos de nitración es: Adams, J., Paterson J.R., Nitro and Related Compounds. *J.Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2000, 3695-3705.
- ³ Weissermel, K. y Arpe, H. J., Benzene Derivatives. En *Industrial Organic Chemistry*, VCH, 1997, pp.371-383.
- ⁴ Preston, P. N., y Tennant, G., Synthetic Methods involving Neighboring Group Interaction in *ortho*-Substituted Nitrobenzene Derivatives, *Chem Rev.*, 1972, 72, 627.
- ⁵ Mundla, S.R., Regioselective synthesis of 4-halo *ortho*-dinitrobenzene derivatives. *Tetrahedron letts.*, 2000, 41, 4277-4279.
- ⁶ *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, (Katritzky, A., Rees, C. y Scriver, E., eds), 1996, Vol. 1, 2 y 3.
- ⁷ Smith, D.H., Benzimidazoles. En *Benzimidazoles and Congeneric Tricyclic Compounds*, (Preston, P.N. ed.), John Wiley & Sons, 1981, col. The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Parte 1, pp 28-37; 66-80: 287-329.
- ⁸ Ross, M., Imidazoles, en *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, (Katritzky, A., Rees, C. y Scriver, E. eds.), 1996, Vol. 3, pp. 183-220.
- ⁹ Preston, P.N., Synthesis, Reactions and Spectroscopic Properties of Benzimidazoles. *Chem Rev.*, 1974, 74, 279-314.
- ¹⁰ Nematode diseases and Drugs Active Against them. En *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*, (Wolff, M. E. ed.), 5ª ed., John Wiley and Sons Inc., 1997 Vol. 4 pp.400-402.
- ¹¹ Navarrete-Vásquez, G., Cedillo, R., Hernandez-Campos, A., Yépez, L., Hernandez-Luis, F., Valdez, J., Morales, R., Cortés R., Hernandez M. y Castillo, R., Synthesis and antiparasitic Activity of 2-(trifluoromethyl)-benzimidazole Derivatives. *Bioorg. Medic. Chem. Letts.*, 11, 2001, 187-190.
- ¹² Hong, Y., Tanoury, G.J., Wilkinson, H.S., Bakale, R.P., Wald, S. y Senanayake, C.H., Palladium Catalyzed Amination of 2-Chloro-1,3-Azole Derivatives: Mild Entry to Potent H₁-Antihistaminic Norastemizole. *Tetrahedron Letts.*, 1997, 38, 5607-5610.
- ¹³ Deng, J., Chi, Y., Fu, F., Cui, X., Yu, K, Zhu, J,y Jiang, Y., Resolution of Omeprazole by inclusion Complexation with a Chiral host BINOL. *Tetrahedron Asymm.*, 2000, 11, 1729-1732.
- ¹⁴ Roth, T., Morningstar, M. L., Boyer, P. L., Hughes, S. H., Buckheit, W. y Michejda, C., Synthesis and Biological Activity of Novel Nucleoside Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase. 2-Aryl-Substituted Benzimidazoles. *J. Med. Chem.*, 1997, 40, 4199-4207.

- ¹⁵ Tebbe, M. J., Spitzer, W. A., Victor, F., Miller, S., Lee, C.C., Sattelberg, T. R., McKinney, E. y Tang, J., Antirrhino/Enteroviral Vinylacetylene Benzimidazoles: A Study of their Activity and Oral Plasma Levels in Mice. *J. Med. Chem.*, 1997, 40, 3937-3946.
- ¹⁶ Ellingboe, J.W., Spinelli, W., Winkley, M.W., et. al., Class III Antiarrhythmic Activity of Novel Substituted 4-[(Methylsulfonyl)amino]benzamides and Sulfonamides. *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 705-716.
- ¹⁷ Gungör, T., Fouquet, A., Teulon, J., Provost, D., Cazes, M. y Cloarec, A., Cardiotonic Agents, Synthesis and Cardiovascular Properties of Novel 2-Arylbenzimidazoles and Azabenzimidazoles. *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 4455-4463.
- ¹⁸ Kubo, K., Inada, Y., Kohara, Y., Sugiura, Y., Ojima, M., Itoh, K, Furukawa, Y, Nishikawa, K y Naka, T., Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonist. Synthesis and Biological Activity of Benzimidazoles. *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 1772-1784.
- ¹⁹ Cheng, J.B., Cooper, K., Duplantier, A., Egger, J., Kraus, K., Marshall, S., Marfat, A., Masamune, H., Shirley, J., Tickner, J., Umland, J.P., Synthesis and In Vitro Profile of a Novel Series of Catechol Benzimidazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995, 5, 1969-1972.
- ²⁰ Franzén, R. G., Recent Advances in the Preparation of Heterocycles on Solid Support: A Review of the Literature, *J. Comb. Chem.*, 2000, 2, 195-214.
- ²¹ Phillips, G. B. y Wei, G. P., Solid-phase Synthesis of Benzimidazoles, *Tetrahedron Letts.*, 1996, 37, 48887-4890.
- ²² Mazurov, A., Traceless Synthesis of Benzimidazoles on solid Suport. *Biorg. & Medic. Chem. Letts.*, 2000, 10, 67-70.
- ²³ Tumelty, D., Cao, K., Holmes, C.P., Traceless Solid-Phase Synthesis of Substituted Benzimidazoles via a Base-Cleavable Linker, *Org. Letts.*, 2000, 3, 83.86.
- ²⁴ Hudlicky, M., Reduction of Nitro, Nitroso, Diazo and Azido Derivatives of Hydrocarbons and Basic Heterocycles. En *Reductions in Organic Chemistry*, American Chemical Society, 1999, pp. 91-101.
- ²⁵ Larock, R.C., *Comprehensive Organic Transformations: a Guide to Functional Group Preparations*, VCH, 1989, pp.411-415.
- ²⁶ Adams, J., Paterson J.R., Nitro and Related Compounds, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, 1999, 749-746.
- ²⁷ March, J., *Advanced Organic Chemistry*, 4ª ed., John Wiley and Sons, 1992, pp. 1216-1233.
- ²⁸ Boyer, J.H., Formation of the Nitroso Group and its Reactions. *The Chemistry of the Nitro and Nitroso Groups*, 1969, (S. Patai ed.), Wiley-Interscience, parte 1, pp.244-249.
- ²⁹ Petersen, W.C y Letsinger, R.L., Photoinduced Reactions of Aromatic nitro Compounds With Borohydride and Cyanide, *Tetrahedron Lett.*, 1971, 24, 2197-2200.

-
- ³⁰ Williams, D.H.H., *Nitrosation*, Cambridge University Press, 1988, p.58.
- ³¹ Atherton, J. H., Moodie, R. B., Noble, D. R. y O'Sullivan, B., Nitrosation of *m*-xylene, anisole, 4-nitrophenyl phenyl ether and toluene in trifluoroacetic acid or in acetic-sulfuric acid mixtures, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1997, 663-664.
- ³² Davey, M. H., Lee, V. Y., Miller, R. D. y Marks, T. J., Synthesis of Aryl Nitroso derivatives by *ter*-Butyl Hypochlorite Oxidation in Homogeneous Media. *J. Org. Chem.*, 1999, 64, 4976-4979
- ³³ Kabalka, G. W., Reduction of Nitro and Nitroso Compounds en *Comprehensive Organic Synthesis*, 1991, Trost, B. editor, Pergamon Press, V.8, pp. 364-379.
- ³⁴ Studer, M. Neto, S. y Blazer, H. U., Modulating the hydroxylamine Accumulation in the Hydrogenation of substituted Nitroarenes Using Vanadium-Promoted RNi Catalysts., *Topics Cata.*, 2000, 13, 205-212.
- ³⁵ Wilkinson, H. S., Hett, R., Tanoury, G. J., Senanayake, C. H. y Wald, S. A., Modulation of Catalyst Reactivity for the Chemoselective Hydrogenation of a functionalized Nitroarene, *Org. Process Res. Dev.*, 2000, 4, 567-570.
- ³⁶ Kamm, O. β -Phenylhydroxylamine, *Org. Synth. Coll.* 1941, V.1, 445-447.
- ³⁷ Patrick, T. B., Schield, J. A. y Kirchner, D. G., Synthesis of Fluoroaromatic Amines, *J. Org. Chem.*, 1974, 39, 1758-1761.
- ³⁸ Ayyangar, N. R., Brahme, K. C. Kalkote, U. R., Srinivasan, K. V. Facile Transfer-Reduction of Nitroarenes to N-Arylhydroxylamines with hydrazine in the Presence of Raney Nickel. *Synthesis*, 1984, 938.
- ³⁹ Oxley, P. W., Adger, B. M., Sasse, M. J. y Forth, M.A., N-Acetyl-N-Phenylhydroxylamine via Catalytic Transfer Hydrogenation of Nitrobenzene using Hydrazine and Rhodium on Carbon, *Org. Syn*, 1989, 67, 187-192.
- ⁴⁰ Rondestvedt, Jr., C.S. y Johnson, Rapid Preparation of Chloroarylhydroxylamines by Hydrazine-Palladium Reduction of Chloronitroarenes, *Synthesis*, 1977, 850-851.
- ⁴¹ Entwistle, I.D., Gilkerson, T, Jhonstone, R. A. y Telford, R. P. Rapid Catalytic Transfer Reduction of Aromatic nitro Compounds to hydroxylamines, *Tetrahedron*, 1978, 34, 213-215.
- ⁴² Uchida, S., Yanada, K., Yamaguchi, H. y Meguri, H, Synthesisi of N-Arylhydroxylamines by Tellurium-Catalized Reduction of Aromatic Nitro Compounds, *Chem. Lett.*, 1986, 67, 187.
- ⁴³ Ren, P., Dong, T. y Wu, S. Sintesis of N-Arylhydroxylamines by Antimony-Catalysed Reduction of Nitroarenes. *Synth. Commun.*, 1997, 27, 1547-1552.
- ⁴⁴ Ren, P.-D., Pan, X.-W., Jin, Q.-H. y Yao, Z.-P. Reduction of Nitroarenes to N-Arylhydroxylamines with $\text{KBH}_4/\text{BiCl}_3$ System., *Synth. Comunn.*, 1997, 27, 349-3503.

- ⁴⁵ Yanada, K, Nagano, t. y Hirobe, M., Rubredoxin Model Complex (Et₄N)[Fe(S₂-o-xyI)₂] as a Catalyst in the Reduction of Aromatic Nitro Compounds to Hydroxilamines., *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27,5113.
- ⁴⁶ Pizzolatti, M. C. y Yunes, R. A., Azoxybenzene Formation from Nitrosobenzene and Phenylhydroxylamine. A Unified View of the Catalysis and Mechanism of the Reaction, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1990, 759-764.
- ⁴⁷ Wang, L., Zhou, L y Zhang, Y., Reduction of Aromatic Nitro Compounds using Samarium Metal in the Presence of a Catalytic Amount of Iodine under Aqueous media, *Synlett*, 1999, 7,1065-1066.
- ⁴⁸ Johnstone, R. A. W. y Wilby, A.H., Heterogeneous Catalytic Transfer Hydrogenation and Its Relation to Other Methods for Reduction of Organic Compounds, *Chem. Rev.*, 1985, 129-170.
- ⁴⁹ Gowda, D.C. y Gowda, S., Formic acid with 10% Palladium on Carbon: a Reagent for Selective Reduction of Aromatic Nitro Compounds, *Indian J. Chem.*, 2000, 39, 709-711.
- ⁵⁰ Manjarrez, N., Luna, H.M., Perez, H.I. y Soria, O., Obtención de o-Fenilenediaminas Sustituidas con Cloruro Estanoso en Medios no Acuosos. *Rev. Soc. Quím. Mex.*, 1986, 30, 52-54.
- ⁵¹ Tafesh, A.M. y Weiguny J. A., Review of the Selective Catalytic Reduction of Aromatic Nitro Compounds into Aromatic Amines, Isocyanates, Carbamates and Ureas Using CO. *Chem. Rev.*, 1996, 96, 2035-2052.
- ⁵² Satoh, T, Mitsuo, N., Nishiki, M., Inoue, Y. y Ooi Y., Selective Reduction of Aromatic Nitro compounds with sodium Borohydride-Stannous Chloride, *Chem. Pharm. Bull.*, 1981, 29, 1443-1445.
- ⁵³ Porter, H. K., The Zinin Reduction of Nitroarenes, *Org. React.*, 1973, 20, 455-81.
- ⁵⁴ Kijima, M., Nambu, Y., Endo, T. y Okawara, M., Selective Reduction of Monosubstituted Nitrobenzenes to anilines by Dihydrolipoamide-Iron (II), *J. Org. Chem.*, 1984, 49, 1434-1436.
- ⁵⁵ Yasuhara, A., Kasano A. y Sakamoto, T., Convenient Reduction of Nitrobenzenes to Anilines Using Electrochemically Generated Nickel, *J. Org. Chem.*, 1999, 64, 2301-2303.
- ⁵⁶ Tsukinoki, T. y Tsuzuki, H., Organic Reaction in Water. Part 5. Novel synthesis of Anilines by zinc metal-mediated Chemoselective Reduction of Nitroarenes. *Green Chem.*, 2001, 3, 37-38.
- ⁵⁷ Boix, C. y Poliakoff, A., Selective Reductions of Nitroarenes to anilines Using Metallic Zinc in Near-Critical Water, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1999, 1487-1490.
- ⁵⁸ Wu, Z., Rea, P. y Wickham, G., 'One-Pot Nitro Reduction-Cyclisation solid Phase Route to Bencimidazoles, *Tetrahedron Letts.* 2000, 41, 9871-9874.
- ⁵⁹ Nagaraja, D. y Pasha, M.A., Reduction of Aryl Nitro Compound with Aluminium/NH₄Cl: Effect of ultrasound on the rate of the reaction, *Tetrahedron Letts.*, 1999, 40, 7855-7856.

- ⁶⁰ Chary, K. P., Ram, S. R. y Iyengar, D.S., Reductions using ZrCl₄/NaBH₄: A Novel and Effective Conversion of Aromatic, Aliphatic Nitro Compounds to Primary amines, *Synlett*, 2000, 5, 683-6845.
- ⁶¹ Lee, J. G., Choi, K. I., Koh, H. Y., Kim, Y., Kan, Y y Cho, Y. S., Indium Mediated Reduction of Nitro Azide Groups in the Presence of HCl in aqueous Media., *Synthesis*, 2001, 1, 81-84.
- ⁶² Yu, C., Liu, B. Y Hu, L., Smarium (0) and 1,1'-Dioctyl-4,4'-Bipyridinium Dibromid: A novel Electron Transfer System for the Chemoselective Reduction of Aromatic Nitro Groups. *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 919-924.
- ⁶³ Kumbhar, P. S., Sánchez-Valente, J., Millet, J. M. M. y Figueras, F., Mg-Fe Hydrocalcite as a Catalyst for the Reduction of Aromatic Nitro Compounds with Hydrazine Hydrate, *J. Catal.*, 2000, 191, 467-473.
- ⁶⁴ Terpko, M.O. y Heck, R. F., Palladium-Catalyzed Triethylammonium Formate Reductions 3. Selective Reduction of Dinitroaromatic Compounds, *J. Org. Chem.*, 1980, 45, 4993.
- ⁶⁵ Wulfman, D.S. y Cooper, C.F., Monoreduction of Dinitroarenes with Iron/Acetic Acid., *Synthesis*, 1978, 924-925.
- ⁶⁶ Knifton, J.F., Homogeneous Catalized Reduction of Nitro Compounds IV. Selective and Secuencial Hydrogenation of Nitroaromatics, *J. Org. Chem.*, 1976, 41, 1200-1206.
- ⁶⁷ Ayyangar, N., Kalkote, U. R., Lugade, A. G., Nikrad, P. V. y Sharma, V., Partial Reduction of Dinitroarenes to Nitroanilines with Hydrazine Hydrate, *Bull. Chem. Soc., Jpn.*, 1983, 56, 3159-3164.
- ⁶⁸ Porter, H. K., The Zinin Reduction of Nitroarenes, *Org. React.*, 1973, 20, 455-81.
- ⁶⁹ Ono, A, Terasaaki, S. y Tsuruoka, Y. Selective reduction of Dinitrobenzenes, *Chem. Ind.*, 1983, 477-478.
- ⁷⁰ Ono, A. y Kitazawa, Y., Selective reduction of 2,4-Dinitrotoluene to 4-Methyl -3-nitroaniline with nickel Metal/Maleic acid and acetic acid system. *Chem. Ind.*, 1983, 826.
- ⁷¹ Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3^a ed., Springer, 1997, pp. 377-381, V-VI
- ⁷² Faber, K., Biotransformation of Non-Natural Compounds: State of the Art and Future Development, *Pure Appl. Chem.*, 1997, 69,1614.
- ⁷³ Roberts, S. M., Preparative Biotransformations, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2000, 611-633.
- ⁷⁴ Dax, S. L., *Antibacterial Chemotherapeutic Agents*, 1997, Blackie Academic and Professional, pp.361-371.
- ⁷⁵ Krainev, A. G., Williams, T. D. y Bigelow, D. J., Enzymatic Reduction of 3-Nitrotyrosine Generates Superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 1998, 11, 495-502.

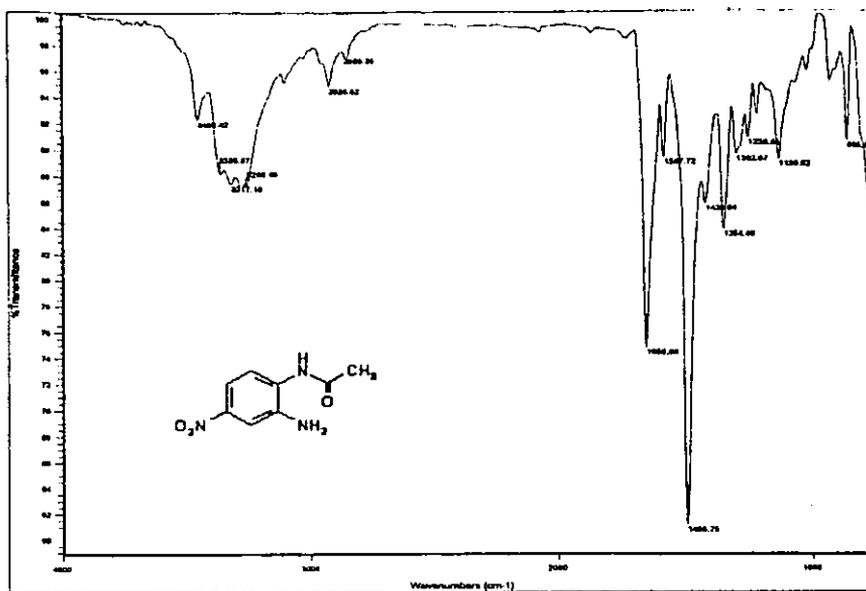
- ⁷⁶ Pitts, J. N., Van Cauwenberghe, K. A., Grosjean, D., Schmitd, J.P., Fritz, D. R., Bleser, W., Kunson, G. B. y Hynds, P.M., Atmospheric Reactions of Polycyclic aromatic Hydrocarbons: Facile Formation of Mutagenic Nitro Derivatives, *Science*, 1978, 202, 515.
- ⁷⁷ Rosenkranz, H. S., McCoy, E. C., Sanders, D. R., Butler, M., Kiriazades, D. K., y Mermelstein, R., Nitropyrene: Isolation, Identification and Reduction Mutagenic Impurities in Carbon Black and Toners, *Science*.1980, 209, 1039.
- ⁷⁸ Jung, h., Shaikh, A.U., Heflich, R.H. y Fu, P.P., Nitro Group Orientation, Reduction Potencial and Direct-Acting Mutagenicity of Nitro-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Environ. Mol. Mutagen.*, 1991, 17, 169-80.
- ⁷⁹ Spain, J.C., Biodegrataion of Nitroaromatic Compounds, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, 49, 523-555.
- ⁸⁰ Topinka J., Schwarz, L.R., Kiefer, F., Wiebel, F.J., Gajados, O., Vidoya, P., Dobias, L., Freid, M., Sram, R.J. y Wolf, T., DNA Adduct Formation in Mammalian Cell Cultures by Polycyclic aromatic Hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in Coke Oven Extract, *Mutat. Res.*, 1998, 419, 91-105.
- ⁸¹ Testa, B., *The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics, Biochemistry of Redox Rections*, 1995, Academic Press, pp. 417-447.
- ⁸² Bryant, G. y McElroy, W. D., Nitroreductases, en *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, (Muller, F. ed.),CRC press,. 1999. Vol. II, pp. 291-303
- ⁸³ViodéC., Bettache, N., Cenas, N., Kraunth-Siegel, L., Chauviere, G., Bakalara, N. y Perié, J., Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles, *Biochemical Pharmacology*, 1999, 57, 549-557.
- ⁸⁴ Krainev, A. G., Williams, T. D. y Bigelow, D. J., Enzymatic Reduction of 3-Nitrotyrosine Generates Superoxide, *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, 11, 495-502.
- ⁸⁵ Orna, M. V. y Mason, R. P., Correlation of Kinetic Parameters of Nitroreductase Enzimes with Redox Properties of Nitroaromatic Compounds, *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 12379, 12384.
- ⁸⁶ Kobori, T., Sasaki, H., Lee, W. C., Zenno, S., Sayo, K., Murphy, M. E. y Tanokura, M., Structure and site direct Mutagenesis of a Flavoprotein fron E. coli that Reduces Nitrocompounds, *J.boil. Chem.*, FALTA.
- ⁸⁷ Liochev, S.I., Hausladen, A. y Fridovich, I., Nitroreductase A is Regulated as a Member of the soxRS regulon of *Esterichia coli*, *Prs. Natl. Acad. Sci.*, 1999, 96, 3537-3539.
- ⁸⁸ Whiteway, J., Koziarz, P., Veall, J., Sandhu, N., Kumar, P., Hoecher, B.y Lambert, I.B., Oxigen -insensitive nitroreductases: Analysis of the Roles of *nfsA* and *nfsB* in Development of Resistance to 5-Nitrofuran Derivatives in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 1998, 180, 5529-2239.
- ⁸⁹ Watanabe, M., Nishino, T, Takio, K., Sofuni, T y Nohmi, T., Purification and Characterization of wild -type and Mutant "Classical" Nitroreductases of *Salmonella typhimurum*, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 23922-23928.

- ⁹⁰ Bryant, C. y DeLuca, M., Purification and Characterization of an Oxygen-insensitive NAD(P)H Nitroreductase from *Enterobacter cloacae*, 1991, 266, 4119-4125.
- ⁹¹ Anusevicius, Z., Soffers, A., Cėnas, N., Saraluskas, J., Segura-Aguilar, J. y Rietjens, I., Quantitative structure activity Relationships for the Conversion of Nitrobenzimidazoleones and Nitrobenzimidazoles by DT-diaphorase: implications for the Kinetic Mechanism, *FEBS*, 1998, 427, 325-329.
- ⁹² Saraluskas, J., Dickancaite, E., Nemeikaite, A., Anusevicius, Z., Nivinskas, H., Segura-Aguilar, J. y Cėnas, N., Nitrobenzimidazoles as Substrates for DT-Diaphorase and Redox Cycling compounds: Their Enzymatic Reactions and Cytotoxicity, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, 346, 219-229.
- ⁹³ Neuberg, C. y Welde, E., *Biochem. Z.*, 1914, 60, 472. Citado en la referencia 47.
- ⁹⁴ Takeshita, M., Yoshida, S., Kiya, R., Higuchi, N. y Kobayashi, Y., Reduction of Aromatic Nitro Compounds with Baker's Yeast., *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, 37, 615-617.
- ⁹⁵ Takeshita, M., Yoshida, S., Reduction of Hetero-Aromatic Nitro Compounds with Baker's yeast., *Heterocycles*, 1990, 31, 2201-2204.
- ⁹⁶ Davey, C. L., Powell, L. W., Turner, N. J. y Wells, A., Regioselective Reduction of substituted dinitroarenes Using Baker's Yeast, *Tetrahedron Letts.*, 1994, V 35, pp.78676-7870.
- ⁹⁷ Davey, C. L., Powell, L. W., Turner, N. J. y Wells, A., Regioselective Reduction of substituted dinitroarenes Using Baker's Yeast, en *Preparative Biotransformations*, Roberts, S. M. editor, John Wiley and Sons, 1994, 2:8.9.
- ⁹⁸ Takeshita, M., y Yoshida, S., Reduction of N-Oxide with Baker's Yeast, *Heterocycles*, 1990, 30, 871-874.
- ⁹⁹ Blackie, J.A., Turner, N.J. y Wells, A. S., Concerning the Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Mediated Reduction of Nitroarenes and other N-O Containing Functional Groups., *Tetrahedron Letts.*, 1997, 38, 3043-3046.
- ¹⁰⁰ Baik, W., Han, J. L., Lee, K. C., Lee, N. H., Kim, B. H., Hahn, J-T., Selective Reduction of Aromatic Nitro Compounds to Aromatic Amines by Baker's Yeast in Basic Solution, *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35, 3965-3966.
- ¹⁰¹ Baik, W., Park, T.H., Kim, B.H. y Jun, Y.M., Reductive Cyclization of o-Nitrophenylazo Dyes Using Baker's Yeast in NaOH Solution. A new Synthesis of 2-Aryl-2H-benzotriazoles and their 1-Oxides, *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 5683.
- ¹⁰² Baik, W., Rhee, J. U., Lee, S. H., Lee, N. H., Kim, B. H. y Kim, K. S., Selective Reduction of Aromatic Nitroso Compounds with Baker's Yeast Under Neutral Conditions, *Tetrahedron Letters*, 1995, 36, 2793-2794.
- ¹⁰³ Baik, W., Kim, D. I., Lee, H.J., Chung, W. J., Kim, B. H., Lee, S.W., Baker's Yeast Reduction of Nitroarenes in NaOH Media 5. Reductive Cyclization of o-Nitrocinnamaldehydes, *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38, 4579.

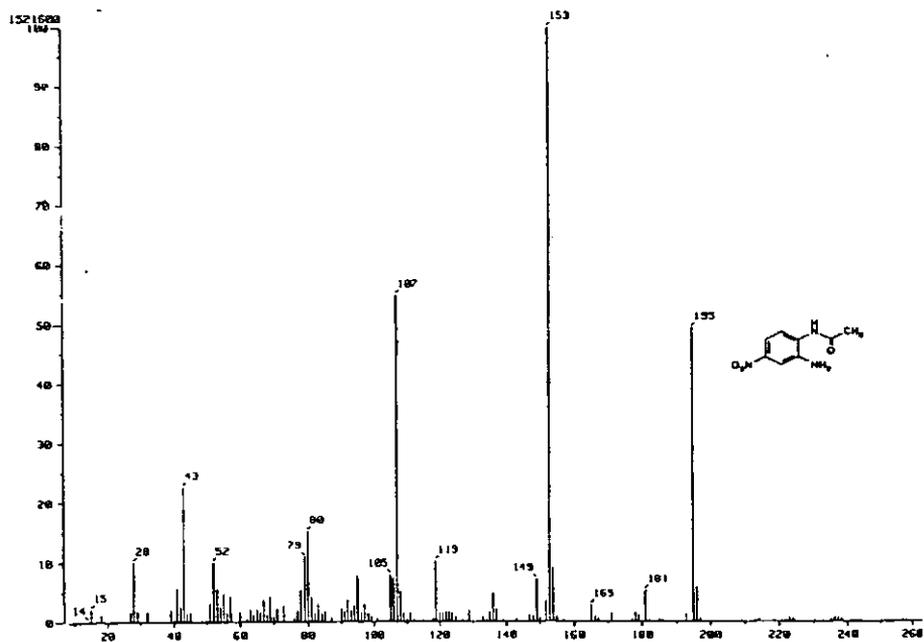
- ¹⁰⁴ Baik, W., Kim, D. I., Koo, S., Rhee, J. U., Shin, S. H. y Kim, B. H., Microbial Deoxygenation of N-Oxides with Baker's Yeast-NaOH, *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38, 845-848.
- ¹⁰⁵ Kamal, A., Enzymatic Approach to the Synthesis of the Pyrrolo 2-(1,4-benzodiazepine Antibiotics., *J. Org. Chem.*, 1991, 56, 2237-2240.
- ¹⁰⁶ Davidenko, T. I. y Bondarenko, G. I., Reduction of Nitro-Substituted Compounds by Native and Immobilized *Escherichia coli* Cells, *Appl. Biochem. and Microbiol., English trans.*, 2000, 36,74-79.
- ¹⁰⁷ Nadeau, L. J., He, Z. y Spain, J.C., Production of 2-Amino-5-phenoxyphenol from 4-Nitrobiphenyl Ether Using Nitrobenzene Nitroreductase and Hydroxylaminobenzene Mutase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45, *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 2000, 24, 301-305.
- ¹⁰⁸ Navarro-Ocaña, A., Jiménez-Estrada, M., González-Paredes, M. B. y Bárzana, E., Synthesis of Substituted Isoxazoles from (z)-3-Alkyl-3-Nitro-2-Phenylpropenenitriles using Baker's Yeast, *Synlett*, 1996, 695-696.
- ¹⁰⁹ Navarro-Ocaña, A., Olgúin, L. F., Luna H., Jiménez-Estrada, M. y Bárzana, E., Reductive Cyclization with Baker's Yeast of 4-Alkyl-2-nitroacetanilides to 6-Alkylbenzimidazoles and 1-Hydroxy-2-methyl-6-alkylbenzimidazoles, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2001, 2754-2756.
- ¹¹⁰ Gardiner, J. M., Loyns, C. R., Schwalbe, C. H., Barrett, G. C. y Lowe, P. R., *Tetrahedron*, 1995, 51, 4101.
- ¹¹¹ Lide, D. y Frederikse, H. P. R., (eds.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 74ªed., CRC Press, 1993.
- ¹¹² Pizey, J.S., *Synthetic Reagents*, John Wiley and Sons Inc., Vol I, 1974, p. 321.
- ¹¹³ Dunnivant, F. M. y Schwarzenbach, R. P., Reduction of Substituted Nitrobenzenes in Aqueous Solutions Containing Natural Organic Matter, *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 2133-2141.
- ¹¹⁴ Gorontzy, T., Küver, J., Blotevogel, K-H., Microbial Transformation of Nitroaromatic Compounds Under Anaerobic Conditions, *J. Gen. Microbiol.*, 1993, 139, 13331-1336.
- ¹¹⁵ Easton, C. J., Merricc, C., Hughes, M., Tiekink, T., Aryl Nitrile Oxide Cycloaddition Reactions in the Presence of Baker's Yeast and β -Cyclodextrin, *Tetrahedron Letts.*, 1995, 36, 629-632.
- ¹¹⁶ Terpko, M.O. y Heck, R. F., Palladium-Catalyzed Triethylammonium Formate Reductions 3. Selective Reduction of Dinitroaromatic Compounds, *J. Org. Chem.*, 1980, 45, 4993.
- ¹¹⁷ Pretsch, E., Bühlmann, P., Affolter, C., *Structure Determination of Organic Compounds, tables of Spectral data*, Springer, 2000, 71-160.
- ¹¹⁸ Wulfman, D. S., y Cooper, C. F., Monoreduction of Dinitroarenes with Iron/Acetic Acid, *Synthesis*, 1978, 924-925.
- ¹¹⁹ Bukingham, J., (editor), *Dictionary of Organic Compounds*, 5ªed., Chapman and Hall, 1982.

-
- ¹²⁰ Takahashi, S. y Kano, H., Benzimidazole N-Oxides I. The Structure of Benzimidazol N-Oxides and Synthesis of its Derivatives, *Chem. Pharm. Bull.*, 1963, 11, 1375-1381.
- ¹²¹ Hughes, J.B., Wang, C. Y., y Zhang, C., Anaerobic biotransformtion of 2,4-Dinitrotoluene and 2,6-Dinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum*: A pathway trough Dihidroxilamino Intermediates, *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 1065-1070.
- ¹²² McAnda, A.F., Roberts, K.D., Smallridge, J., Ten A. y Trehwella, M. A., Mechanism of the Yeast Mediated Reduction of Nitrostyrenes in Light Petroleum., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1998, 501-504.
- ¹²³ Ushio, K., Ebara K. y Yamashita, T., Selective inhibition of R-Enzymes by simple Organic acids in yeast-catalysed reduction of ethyl 3-oxobutanoate, *Enzyme Microb. Technol.*, 1999, 13, 834-839.
- ¹²⁴ Jan, T., Floner D., y Moinet, C., Indirect Electroreduction of nitrobenzenes *ortho*,-substituted by Ester, Carbonate , Amide or Carbamate Groups, *Electrochimica Acta*, 1997, 42, 2075-2079.
- ¹²⁵ Fonseca, T., Gigante, B. y Gilchrist, L., A., Short Synthesis of Phenanthro[2,3-d+imidazoles From Dehydroabiatic Acid. Application of the Methodology as a Convenient Route to Benzimidazoles, *Tetrahedron*, 2000, 57, 1793-1799.
- ¹²⁶ Florey, P., Smallridge, J., Ten, A. y Trehwella, M. A., Chemo- and Stereoselective Reduction of an α -Cyanoketone by baker's Yeast at Low Temperature, *Org. Letts.*, 1999, 1, 1879-1880.
- ¹²⁷ Hashimoto, K., Higuchi, M., Makino, B., Sakaibara, I., Kubo, M., Komatsu, Y., Maruno, M. y Okada, M., Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds, contained in some medicinal plants, *J. Ethnopharm.*, 1999, 64, 185-189.
- ¹²⁸ Roberts, S. M., Preparative Biotransformations, *J. Chem Soc. Perkin Trans. 1*, 2001, 1475-1499.
- ¹²⁹ Wagner, H., *Plant Drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer, 1984, p. 320.
- ¹³⁰ Laidler, K.J., *Chemical Kinetics*, 3^aed., Harper Collins Publishers, 1987, pp. 18-31.
- ¹³¹ Aldrich-Manual de Productos Químicos finos y Equipo de Laboratorio, México, 2000-2001.

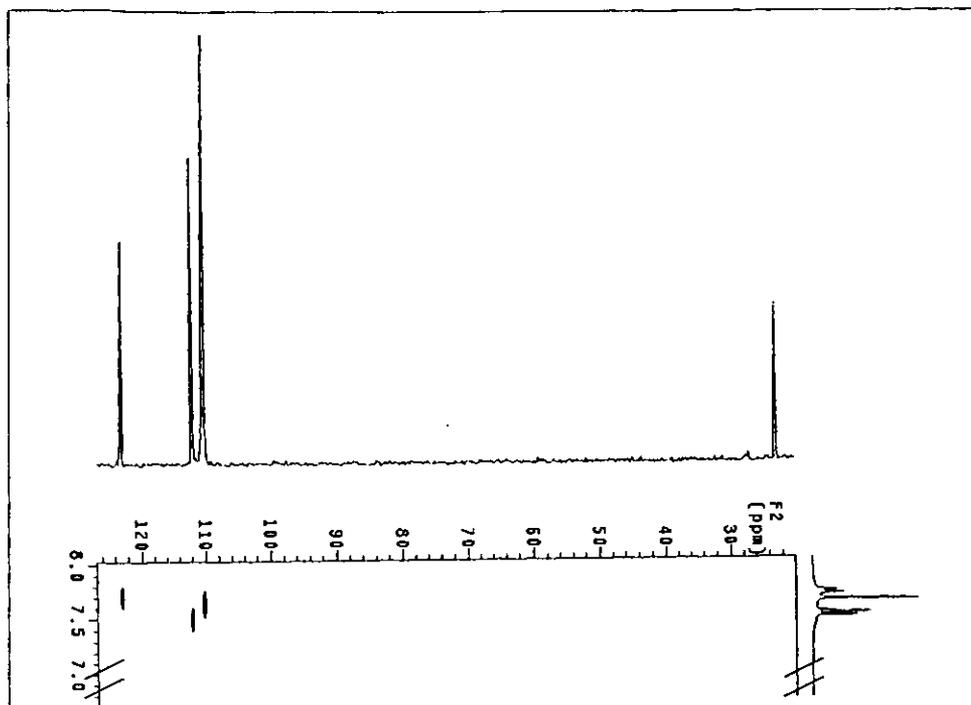
APÉNDICE
ESPECTROS
SELECTOS



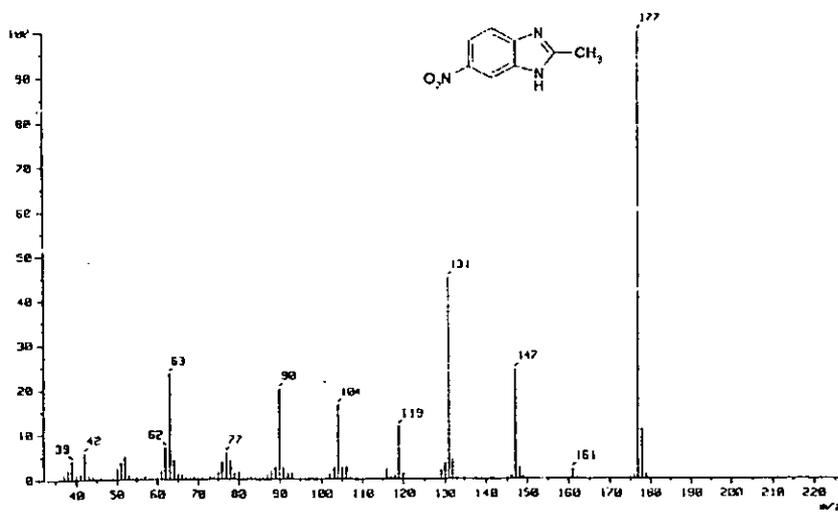
Espectro 1. IR de la 2-amino-4-nitro-acetanilida (2).



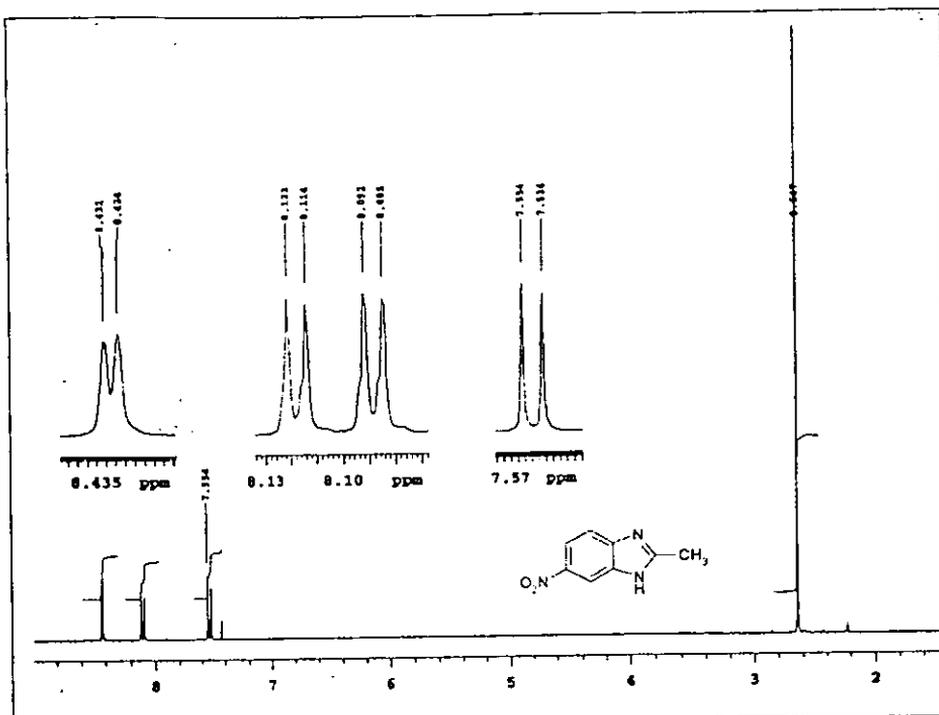
Espectro 2. EM IE de la 2-amino-4-nitro-acetanilida (2).



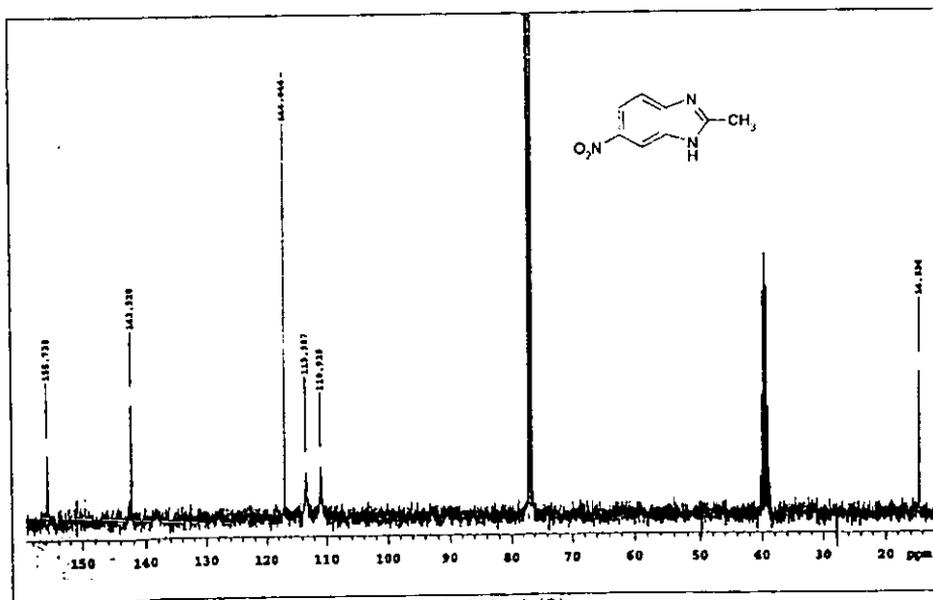
Espectro 5. Espectro HETCOR de la 2-amino-4-nitro-acetanilida (2).



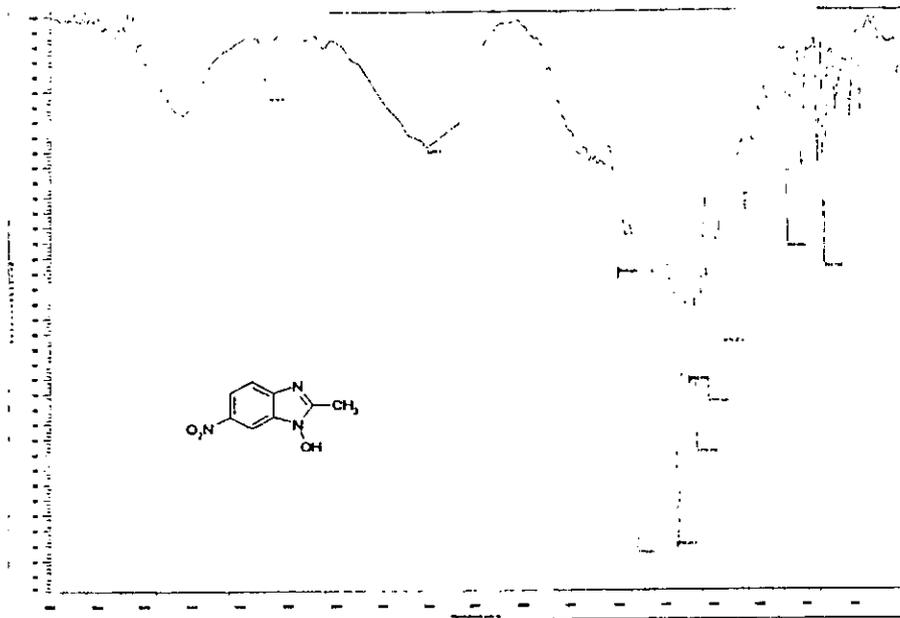
Espectro 6. EM IE del 2-metil-6-nitrobenzimidazol (3).



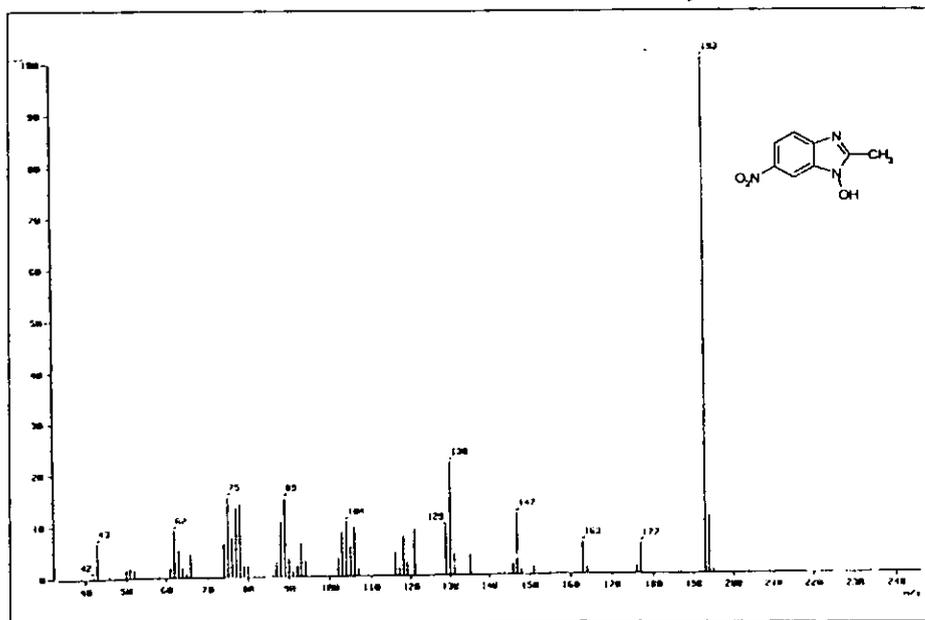
Espectro 7. R.M.N. ^1H 2-metil-6-nitrobencimidazol (3).



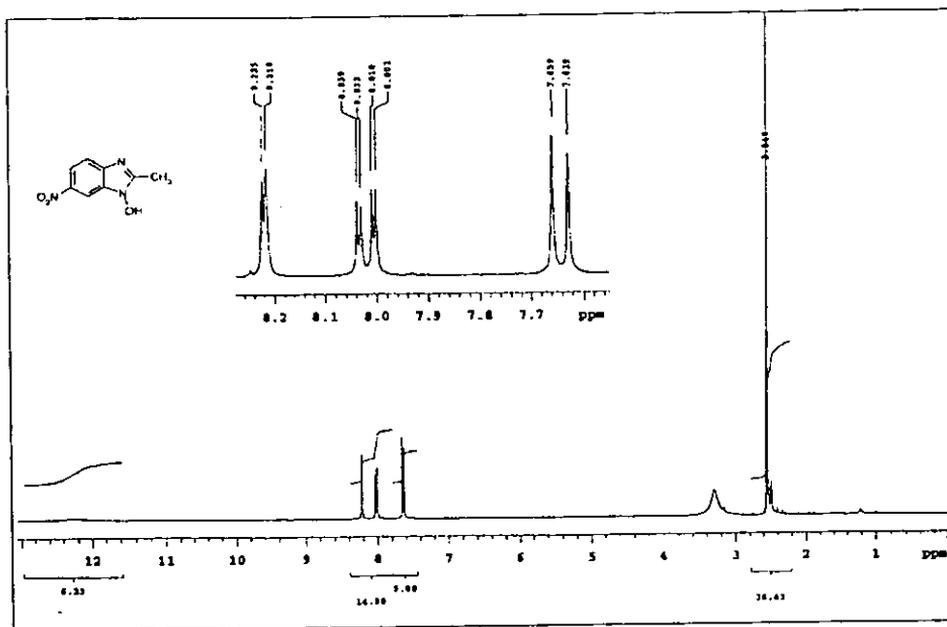
Espectro 8. R.M.N. ^{13}C 2-metil-6-nitrobencimidazol (3).



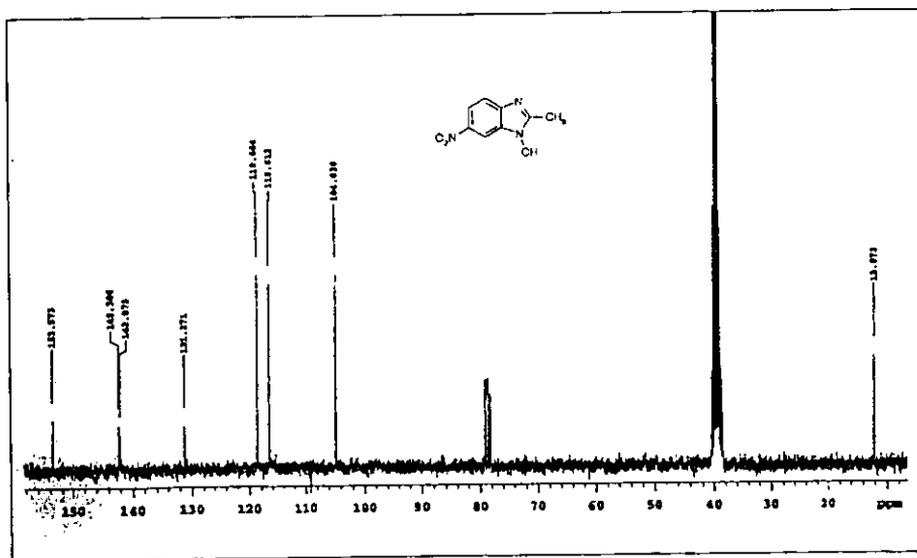
Espectro 9. IR del 1-hidróxi-2-metil-6-nitro-bencimidazol 4.



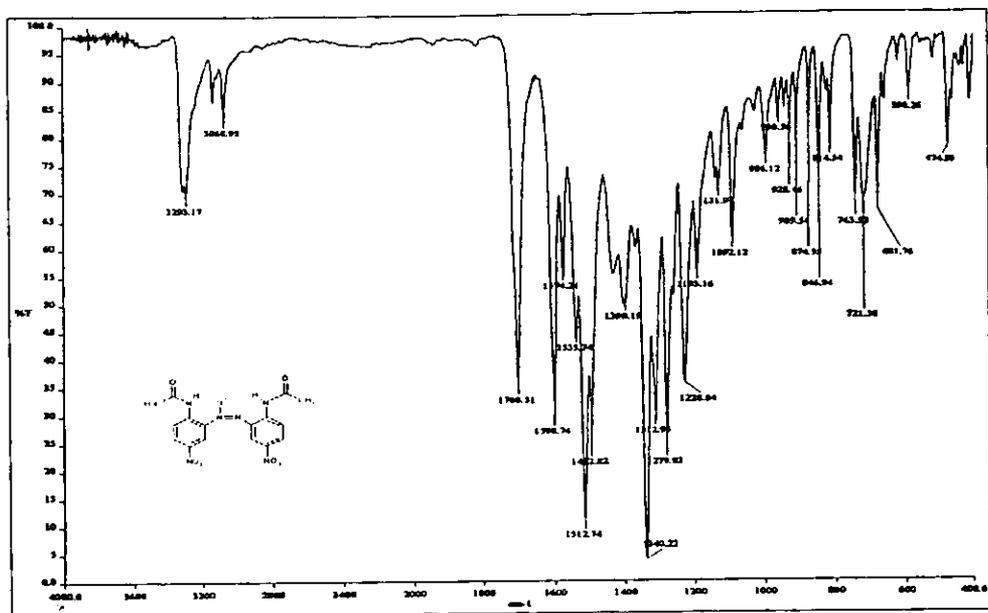
Espectro 10. EM IE del 1-hidróxi-2-metil-6-nitro-bencimidazol 4.



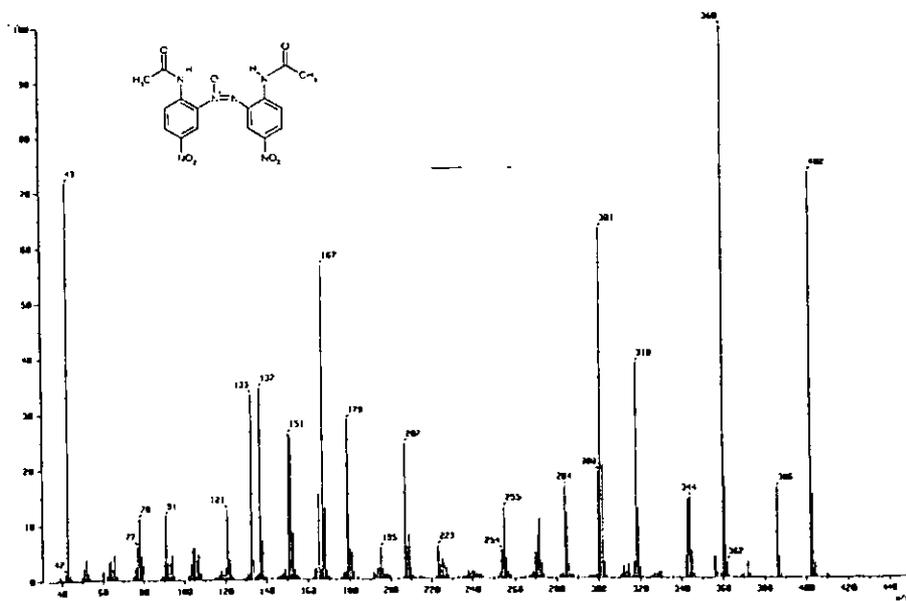
Espectro 11. R.M.N. ¹H del 1-hidròxi-2-metil-6-nitro-bencimidazol 4.



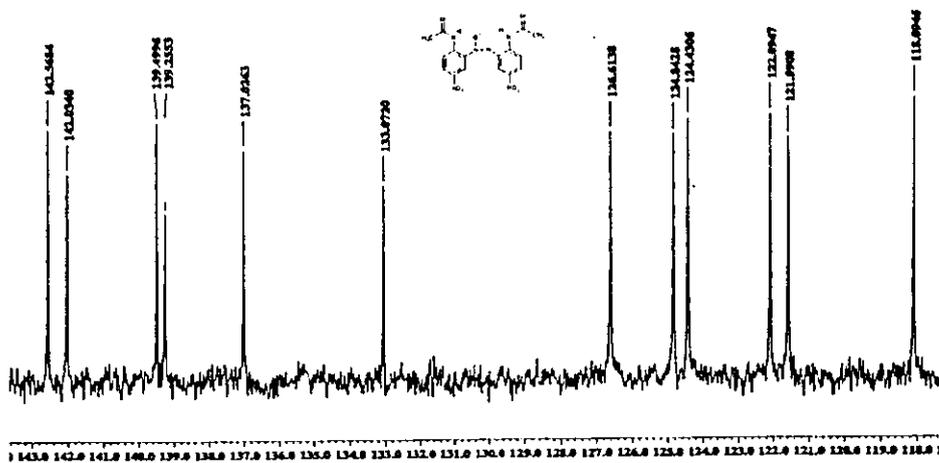
Espectro 12. R.M.N. ¹³C del 1-hidròxi-2-metil-6-nitro-bencimidazol 4.



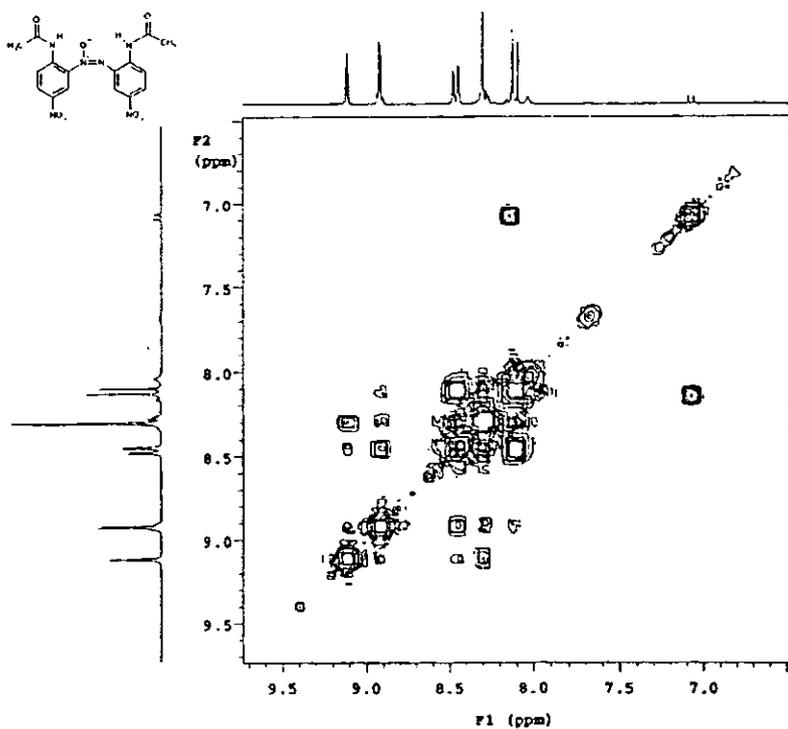
Espectro 13. IR del 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazobenceno.



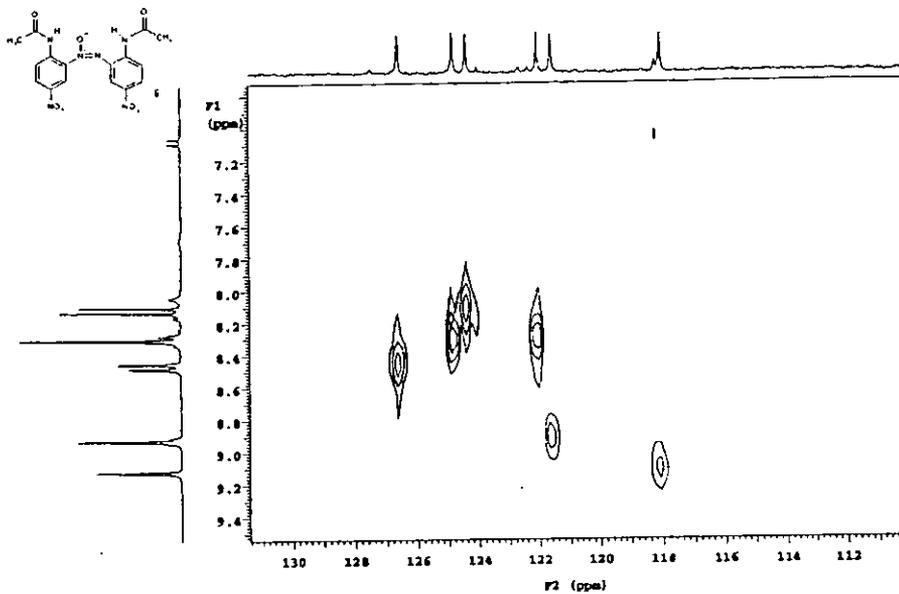
Espectro 14. EM IE del 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazobenceno.



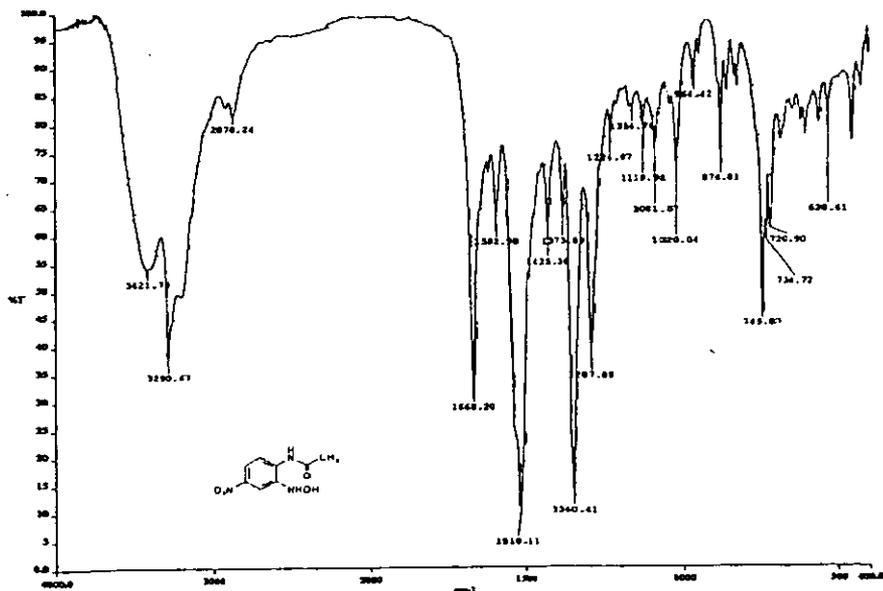
Espectro 16. R.M.N. ^{13}C del 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazobenceno.



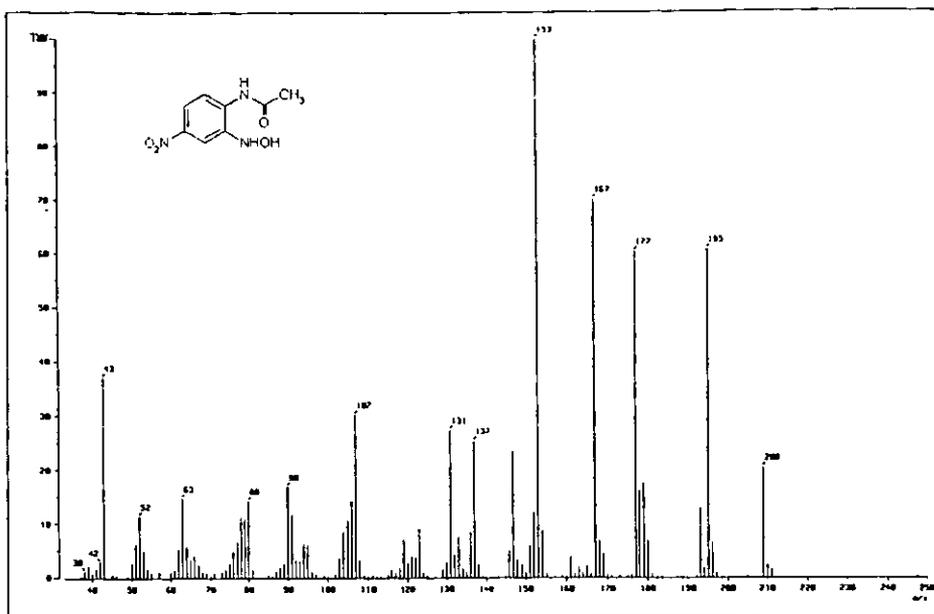
Espectro 17. R.M.N. ^1H -COSY del 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazobenceno.



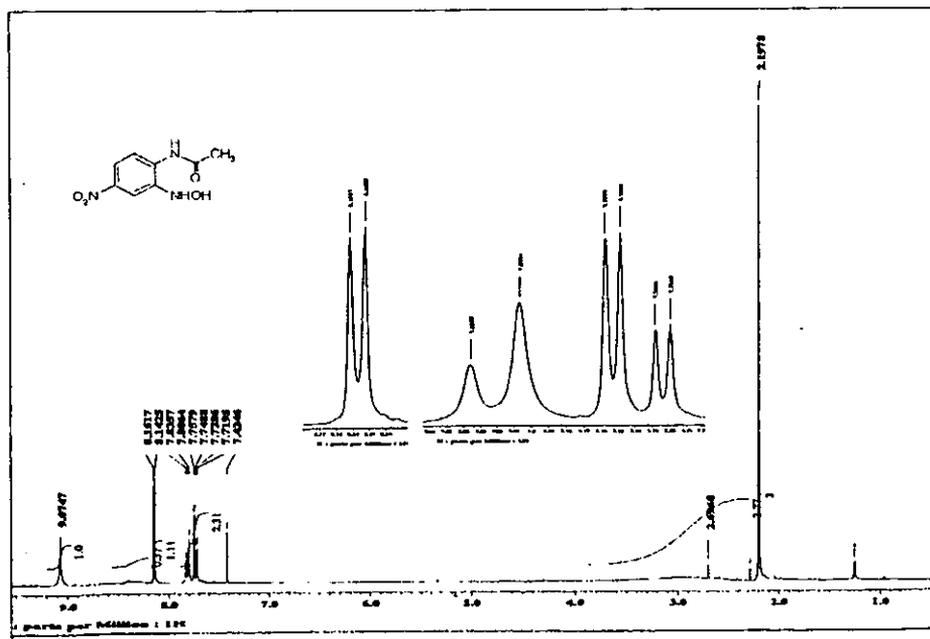
Espectro 18. R.M.N. ^1H - ^{13}C HETCOR del 5,5'-di-N-acetil-3,3'-dinitroazobenceno.



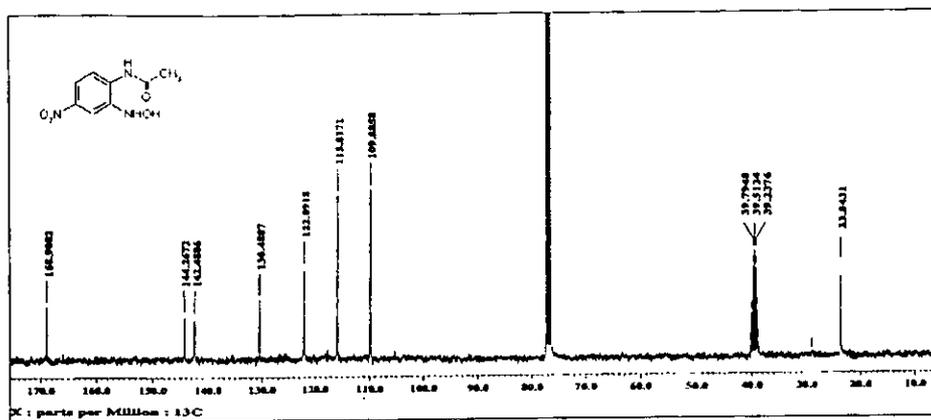
Espectro 19. IR de la 2-hidroxilamino-4-nitroacetanilida (5).



Espectro 20. EM IE de la 2-hidroxilamino-4-nitroacetanilida (5).



Espectro 21. R.M.N. ¹H de la 2-hidroxilamino-4-nitroacetanilida (5).



Espectro 22. R.M.N. ^{13}C de la 2-hidroxilamino-4-nitroacetanilida (5).