



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DEL MECANISMO DE LA
REDUCCIÓN DE NITROALQUENOS A SUS
OXIMAS CON *Saccharomyces cerevisiae*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
DANIEL LÓPEZ GONZÁLEZ



Tutor: DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

MÉXICO, D. F.

JUNIO 2006



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.

ESTUDIO DEL MECANISMO DE LA REDUCCIÓN DE NITROALQUENOS A SUS OXIMAS CON *Saccharomyces cerevisiae*

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Arturo Navarro Ocaña en el laboratorio 321 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Arturo Navarro Ocaña	Facultad de Química, UNAM
Dr. Agustín López-Munguía Canales	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Francisco Ruiz Terán	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Manuel Jiménez Estrada, del Instituto de Química de la UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo la extracción y el análisis químico de los compuestos obtenidos.

Se reconoce la colaboración del Dr. Eduardo Barzana García, del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo algunas de las biotransformaciones.

Durante los estudios de Maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Ins. de Inv. Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Agustín López-Munguía Canales	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. Francisco Lara Ochoa	Instituto de Química, UNAM
Suplente	Dr. Edmundo Castillo Rosales	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dr. Guillermo Aguilar Osorio	Facultad de Química, UNAM

Índice General

Resumen

Índice de Figuras	I
Índice de Tablas	II
Índice de Abreviaturas	III
Introducción	1
1. Marco Teórico	2
1.1. Aspectos generales de los compuestos nitrados	3
1.1.1. Síntesis de compuestos nitrados	3
1.1.2. Reducción química de los compuestos nitrados	5
1.2. Aspectos generales de los isoxazoles	6
1.2.1. Síntesis de los isoxazoles	7
1.2.2. Transformación de los isoxazoles	10
1.3. Aspectos generales de las oximas	11
1.4. Generalidades de las Biotransformaciones	13
1.5. Transformación del grupo nitro	17
1.5.1. Transformación del grupo nitro con organismos enteros o extractos crudos	17
1.5.2. Transformación del grupo nitro con enzimas parcialmente puras	22
1.5.3. Transformación del grupo nitro con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2. Objetivos	30
3. Procedimiento Experimental	31
3.1. <i>Material y equipo</i>	31
3.2. <i>Metodología</i>	32
3.2.1. Síntesis de los (Z)-3-nitro-alkil o aril-propenonitrilos	32
3.2.2. Transformación de los (Z)-3-nitro-alkil o aril-propenonitrilos en agua	33
3.2.3. Seguimiento del curso de reacción	33
3.2.4. Aislamiento y purificación de productos	34
3.2.5. Determinación de la influencia de <i>S. cerevisiae</i> en la reacción	34
3.2.6. Implementación del método de análisis y determinación cuantitativa	36

del curso de reacción.	
3.2.7. Influencia del pH en la biotransformación del (Z)-3-nitro-alquil o aril-propenenitrilos	37
4. Resultados y discusión	38
4.1. Síntesis de los (Z)-3-nitro-alquil o aril-propenenitrilos	38
4.2. Identificación de los bioproductos de la transformación de los 3-nitropropenenitrilos.	39
4.3. Influencia de <i>S. cerevisiae</i> en la reducción de los 3-nitropropenenitrilos a sus oximas correspondientes	41
4.4. Estabilización del pH durante la reacción de los 3-nitropropenenitrilos	47
4.5. Implementación de un método de análisis de reactivos y productos para seguir el curso de reacción.	48
4.6. Determinación del curso de la reacción	49
4.6.1. Transformación de los 3-nitropropenenitrilos a los 5-aminoisoxazoles	49
4.6.2. Transformación en presencia y ausencia de levadura de pan.	51
4.6.3. Transformación con levadura inactivada por metanol y temperatura	51
4.6.4. Transformación con extracto crudo de levadura fresca	52
4.7. Influencia del pH en el rendimiento de los productos de la transformación	53
4.7.1. Influencia del pH 7 en el rendimiento de los bioproductos	53
4.7.2. Influencia del pH 5 en el rendimiento de los bioproductos	55
4.7.3. Influencia del pH 8 en el rendimiento de los bioproductos	57
4.7.4. Comparación del porcentaje de moles totales del 5-aminoisoxazol y la oxima correspondiente	58
5. Conclusiones	61
6. Referencias	62
7. Apéndice	69

Índice de Figuras

- Fig. 1** Utilidad de la reacción de Mitscherlinch
Fig. 2 Diferentes métodos de nitración para compuestos alifáticos
Fig. 3 Mecanismo de hidrogenación del grupo nitro
Fig. 4 Obtención de isoxazoles por oximación
Fig. 5 Obtención de isoxazoles por cicloadición
Fig. 6 Obtención de los 5-aminoisoxazoles por oximación
Fig. 7 Obtención de los 5-aminoisoxazoles por cicloadición.
Fig. 8 Síntesis de los 5-aminoisoxazoles por métodos biocatalíticos con *S. cerevisiae*
Fig. 9 Transformación de la zonizamida a un conjugado glucorónido en metabolismo de ratas
Fig. 10 Apertura del anillo de isoxazol con *S. cerevisiae*
Fig. 11 Características generales de una biotransformación
Fig. 12 Reducción del TNT por varias vías metabólicas y por diferentes microorganismos
Fig. 13 Reducción realizada por microsomas de hígado de rata y de mosca doméstica
Fig. 14 Mineralización y transformación de nitroaromáticos en un reactor UASB
Fig. 15 Degradación aerobia del nitrocatecol, nitrofenol, o-nitrobenzoato y ácido o-nitrobenzoico
Fig. 16 Biorreducción realizada por Neuberg
Fig. 17 Reducción del m-dinitrobenceno a la m-nitroanilina
Fig. 18 Reducción del o-nitrobencenonitrilo a la 2-aminobenzamida
Fig. 19 Reducción de compuestos nitroaromáticos con varios sustituyentes en el anillo de benceno
Fig. 20 Reducción de grupos nitro utilizando a *S. cerevisiae* en condiciones extremas
Fig. 21 Reducción de los 2-nitro-1-fenilpropenos con *S. cerevisiae*
Fig. 22 Transformación de β -nitroestirenos con *S. cerevisiae*
Fig. 23 Transformación de los 3-nitropropenonitrilos con *S. cerevisiae*
Fig. 24 Mecanismo propuesto para la transformación de nitroalquenos
Fig. 25 Ruta de síntesis de los (Z)-3-nitro-alquil o aril-propenonitrilos
Fig. 26 Estructuras químicas de los sustratos empleados y sus bioproductos correspondientes
Fig. 27 Estabilización del pH a 5, 7 y 8
Fig. 28 Reducción del FCNN a su 5-aminoisoxazol
Fig. 29 Curso de reacción de la biotransformación de los (Z)-3-nitro-3-alquil o aril-2-fenil-propenonitrilos a sus oximas correspondientes
Fig. 30 Determinación cuantitativa del curso de reacción de los 3-nitropropenonitrilos a pH 7
Fig. 31 Determinación cuantitativa del curso de reacción de los 3-nitropropenonitrilos a pH 5
Fig. 32 Determinación cuantitativa del curso de reacción de los 3-nitropropenonitrilos a pH 8
Fig. 33 Producción del 5-aminoisoxazol a los diferentes pH
Fig. 34 Producción de la oxima a los diferentes pH.

Índice de Tablas

- Tabla 1** Comparación de los puntos de fusión (p.f.) y rendimientos (Ren) de los productos de la reacción de Knoevenagel.
- Tabla 2** Comparación de los puntos de fusión (p.f.) y rendimientos (Ren) de los productos de nitración.
- Tabla 3** Sistemas ensayados para determinar la influencia de *S. cerevisiae* en la reacción de reducción de los 3-nitropropenonitrilos.
- Tabla 4** Rendimiento del 5-aminoisoxazol y su oxima correspondiente de los 3-nitropropenonitros a pH 7.
- Tabla 5** Rendimiento del 5-aminoisoxazol y su oxima correspondiente de los 3-nitropropenonitros a pH 5.
- Tabla 6** Rendimiento del 5-aminoisoxazol y su oxima correspondiente de los 3-nitropropenonitrilos a pH 8.

Índice de Abreviaturas

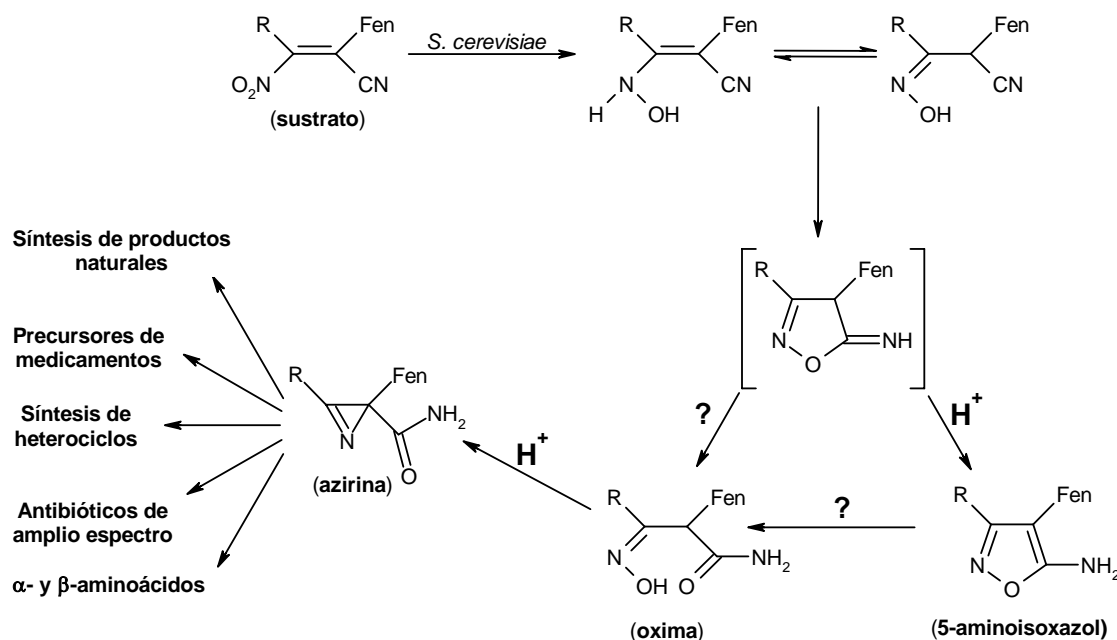
El orden de las abreviaturas está dado según su aparición en el texto.

TNT	2,4,6-trinitrotolueno
ADNT	Aminodinitrotoluenos
DANT	Diaminonitrotoluenos
2A4,6DNT	2-amino-4,6-dinitrotolueno
4A2,6DNT	4-amino-2,6-dinitrotolueno
2,4A6NT	2,4-diamino-6-nitrotolueno
2,6DA4NT	2,6-diamino-4-nitrotolueno
TAT	triaminotolueno
PNP	p-nitrofenol
HQ	Hidroquinona
NC	4-nitrocatecol
FCN	2,3-difenil-propenonitrilo
PhCROTO	2-fenil-butenonitrilo
metoxiFCN	2-fenil-3-(4-metoxifenil)propenonitrilo
cloroFCN	2-fenil-3-(4-clorofenil)propenonitrilo
FCNN	3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo
PhCRONO₂	3-nitro-2-fenil-butenonitrilo
4-metoFCNN	3-nitro-2-fenil-3-(4-metoxifenil)propenonitrilo
4-CIFCNN	3-nitro-2-fenil-3-(4-clorofenil)propenonitrilo
FCNN-isox	5-amino-3,4-difenilisoxazol
PhCRONO₂-isox	5-amino-3-metil-4-fenilisoxazol
4-metoFCNN-isox	5-amino-3-(4-metoxifenil)-4-fenilisoxazol
4-CIFCNN-isox	5-amino-3-(4-clorofenil)-4-fenilisoxazol
FCNN-oxim	2,3-difenil-3-oximino-propanamida
PhCRONO₂-oxim	2-fenil-3-oximino-butanamida
4-metoFCNN-oxim	2-fenil-3-(4-metoxifenil)propanamida
4-CIFCNN-oxim	2-fenil-3-(4-clorofenil)propanamida

Resumen

En los últimos 40 años se ha tenido un creciente interés en la utilización de *Saccharomyces cerevisiae* para sintetizar intermediarios químicos, reducir grupos carbonilos, dobles enlaces, lograr la interconversión de grupos funcionales y sintetizar heterociclos, además de ser barata y fácil de obtener.

La capacidad de *S. cerevisiae* para efectuar la reducción de grupos nitroaromáticos, se reportó por primera vez hace 80 años y salvo algunos artículos publicados en el transcurso de los últimos 10 años, se conoce poco de este tipo de biotransformaciones. Por lo que existe el interés de conocer el mecanismo de reacción de los nitroalquenos con un grupo nitro en la posición 3 utilizando a la levadura de pan como biotacalizador para dar la formación de la oxima correspondiente y optimizar sus rendimientos en medios acuosos a diferentes pH.



Introducción

La levadura de panificación, *Saccharomyces cerevisiae*, se ha utilizado en reacciones de reducción de grupos carbonilos, dobles enlaces y en la interconversión de grupos funcionales con reactividad similar y en la síntesis de heterociclos.

También se ha reportado la utilización de *S. cerevisiae* en la reducción de grupos nitroaromáticos, nitroarenos, nitroalquenos, nitrosoarenos y N-óxidos. Este tipo de compuestos nitrados son intermediarios importantes porque se pueden convertir a aminas, anilinas, carbonilos e hidrocarburos.

En 1914, Neuberg dedujo que el nitrobenceno es reducido al nitrosobenceno y después a la hidroxilamina que es la que se transforma a la anilina. Ochenta años después, Davey realiza de nuevo la biorreducción del nitrobenceno, además de biotransformar el *o*-nitrobencenonitrilo a su bioproducto, la 2-aminobenzamida.

Takeshita y colaboradores reportan la reducción de compuestos nitroaromáticos en un anillo de benceno como el *o*-, *p*- acilnitrobenceno, que da la aminoacetona correspondiente.

Por otra parte, las oximas son un importante grupo funcional utilizado comúnmente para proteger al grupo carbonilo, caracterizar aldehídos y cetonas, preparar amidas y mediante su reducción obtener las azirinas y de éstas las aziridinas correspondientes. Éstas últimas, son clave en la síntesis de otros heterociclos, de antibióticos de amplio espectro y citotoxinas, como agentes alquilantes para el tratamiento del cáncer y como intermediarios para la preparación de un amplio rango de compuestos quirales como los α - y β -aminoácidos.

Los procedimientos para la síntesis química de las oximas están bien establecidos, pero hasta la fecha no se ha descrito el uso de 3-nitropropenonitrilos o de los 5-aminoisoxazoles para este fin.

Por lo que existe el interés de conocer la reducción de los 3-nitroalquenos con un grupo nitro en la posición 3 utilizando a *S. cerevisiae* y averiguar si el producto oxima se forma directamente a partir del nitroalqueno, del 5-aminoisoxazol o de algún intermediario común de esta reacción.

1. Marco Teórico

Los compuestos nitrados son importantes intermediarios químicos porque se pueden convertir a aminas, anilinas, anilidas, carbonilos e hidrocarburos y pueden ser utilizados en las industrias farmacéutica, agroquímica, de plásticos, tintes y explosivos¹.

El uso de organismos vivos y su maquinaria enzimática para la transformación de compuestos orgánicos no es del todo nuevo, pues se ha utilizado durante la mayor parte de la historia de la humanidad. La aplicación específica de las levaduras en diferentes sustratos fue fundamental en la identificación de nuevas actividades enzimáticas y en la determinación de su especificidad².

En los últimos 40 años se ha incrementado el uso de *S. cerevisiae* para sintetizar intermediarios químicos, reducir grupos carbonilo y dobles enlaces, lograr la interconversión de grupos funcionales con reactividad similar y sintetizar heterociclos, además de ser barata, fácil de obtener, de conservar y ser compatible con el medio ambiente³.

La capacidad de *S. cerevisiae* para efectuar la reducción de grupos nitro se reportó por primera vez hace 80 años y, salvó algunos artículos publicados en el transcurso de los últimos 10 años, se conoce poco del mecanismo de transformación⁴.

Por ello existe el interés de conocer el curso de reacción para la reducción de nitroalquenos con un grupo nitro en la posición tres utilizando a este microorganismo y averiguar si el producto oxima se forma a partir del nitroalqueno, de su producto el 5-aminoisoxazol o algún intermediario común a esta reacción de reducción.

1.1. Aspectos generales de los compuestos nitrados

El grupo nitro es un grupo funcional con gran diversidad de acciones químicas y biológicas. Es un electrón-atractor muy fuerte con capacidad de crear deficiencias electrónicas localizadas en diversos sitios de las moléculas⁵⁻⁶.

Cuando los compuestos nitrados interactúan con sistemas vivos pueden reaccionar con una gran variedad de nucleófilos biológicos intra y extracelulares como las proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas, etc., para producir cambios biológicos los cuales pueden ser útiles o muy dañinos.

Los cambios biológicos que resultan de la reducción del grupo nitro en muchos casos son de toxicidad; estos pueden resultar venenosos para bacterias, parásitos y tumores cerebrales, por lo que se dice que es una toxicidad selectiva⁷.

El uso farmacológico del grupo nitro incluye antineoplásicos, antibióticos, antiparasitarios, así como tranquilizantes, fungicidas, insecticidas, herbicidas, entre otros.

También puede actuar como compuesto desacoplante de la cadena de transporte de electrones donde se realiza la fosforilación ($\text{ADP} + \text{fosfato} \rightarrow \text{ATP}$). El resultado es la oxidación de alimentos sin la formación de ATP. Un ejemplo clásico de esto, es la acción del 2,4-dinitrofenol⁸.

Los compuestos nitrados tienen una gran importancia en el área industrial, principalmente aquellos que incluyen anillos aromáticos que se utilizan en la fabricación de colorantes, fármacos, agroquímicos, explosivos y plásticos.

1.1.1. Síntesis de compuestos nitrados

Según Booth, la primera síntesis de compuestos nitrados fue realizada por Mitscherlinch con compuestos aromáticos en 1834 al tratar los hidrocarburos del alquitrán con una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico⁹. Desde entonces, esta reacción se utiliza con ligeras modificaciones para preparar de una manera sencilla una cantidad enorme de compuestos nitroaromáticos¹⁰ como se observa en la figura 1.

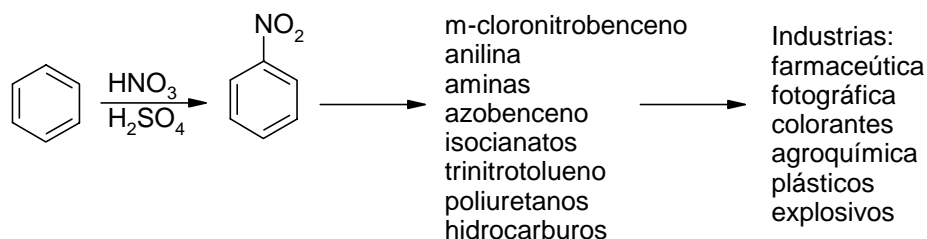


Fig. 1 Utilidad de la reacción de Mitscherlinch

Por su parte la química de compuestos nitrados alifáticos es importante en la síntesis orgánica debido a tres aspectos:

- 1) Se dispone de varios métodos para prepararlos.
- 2) Se pueden interconvertir en todos los grupos funcionales.
- 3) Pueden formar enlaces carbono-carbono.

Específicamente, la preparación de nitroalquenonitrilos ha sido poco estudiada y el método más común consiste en la nitración con óxidos de nitrógeno o bien con agentes nitrantes derivados de estos. Algunos ejemplos se presentan a continuación:

El 3-nitropropenonitrilo se ha preparado mediante la nitración del acrilonitrino con cloruro de nitrilo (NO_2Cl) con buenos rendimientos¹¹.

Los 3-nitro-3-alquil-2-arylpropenonitrilos sustituidos se han sintetizado con dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2=\text{N}_2\text{O}_4$) a bajas temperaturas (de 0 a 5°C)¹².

Los 3-nitro-3-fenil o aril-propenonitrilos se han obtenido a partir de un método desarrollado por Navarro-Ocaña¹³ en el cual se utiliza una mezcla de monóxido y dióxido de nitrógeno en presencia de Yodo y tetracloruro de carbono a -5°C .

La representación de estos tres métodos de nitración se muestran en la figura 2.

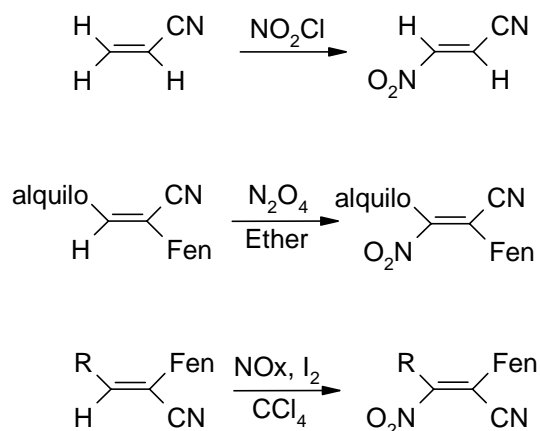


Fig. 2 Diferentes métodos de nitración para compuestos alifáticos

1.1.2. Reducción química de los compuestos nitrados

La reducción de compuestos nitrados a las correspondientes aminas es de utilidad industrial porque son ampliamente usados como colorantes, fármacos, agroquímicos, productos fotográficos y antioxidantes¹⁴.

Tanto el grupo nitro como el grupo amino son relativamente estables en sistemas biológicos, pero la interconversión entre los dos grupos incluye la producción de intermediarios nitroso e hidroxilamino los cuales son muy reactivos y son mucho más tóxicos que sus moléculas de origen¹⁵⁻¹⁶. El mecanismo para la hidrogenación de grupos nitro está demostrado en la figura 3:

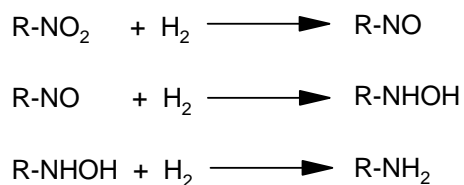


Fig. 3 Mecanismo de hidrogenación del grupo nitro

El primer paso es la reducción del grupo nitro al intermediario nitroso que es extremadamente reactivo. El segundo paso consiste en la interconversión del intermediario nitroso a la hidroxilamina que es tóxica e inestable, o también puede formar los productos azo y azoxi¹⁷⁻¹⁹. El tercer paso es la reducción de la hidroxilamina a la amina.

La reducción química es obtenida por una transferencia de hidrógeno, que es fácil, segura y altamente selectiva utilizando Fe, Sn, Sn(II), Zn, Ti(III), Pt/Cd, Pd/Cd o Raney-Niquel²⁰⁻²¹. También se puede realizar con hidrazina hidratada como donador de hidrógeno en presencia de Raney-Niquel, de CeO₂, de hidrotalcitos activados de FeMe y Me₃SiSSi o MeS-SiMe₃²²⁻²⁹.

1.2. Aspectos generales de los isoxazoles

Los compuestos orgánicos que contienen anillos aromáticos de 5 miembros están ampliamente distribuidos en la naturaleza y frecuentemente juegan un papel importante en varios procesos bioquímicos. Algunos de estos heterociclos contienen dos heteroátomos y representan un grupo grande y diverso. La mayoría de estos sistemas de anillos son formalmente derivados del pirrol, furano y tiofeno por reemplazo de uno de los metino (-CH) por un átomo de nitrógeno³⁰.

Los isoxazoles se encuentran en compuestos derivados de productos naturales y en moléculas biológicamente activas, juegan un papel importante en la industria farmacéutica y agroquímica, además, de que son precursores de varios grupos funcionales por su modificación y apertura por lo que se ha estimado la necesidad de hacer una ruta eficiente para su síntesis.

1.2.1. Síntesis de los isoxazoles

Los isoxazoles pueden ser preparados por la reacción de 1,3-dicarbonilos con hidroxilamina, seguida por la ciclización deshidratativa del intermediario monoxima (oxidación, figura 4).

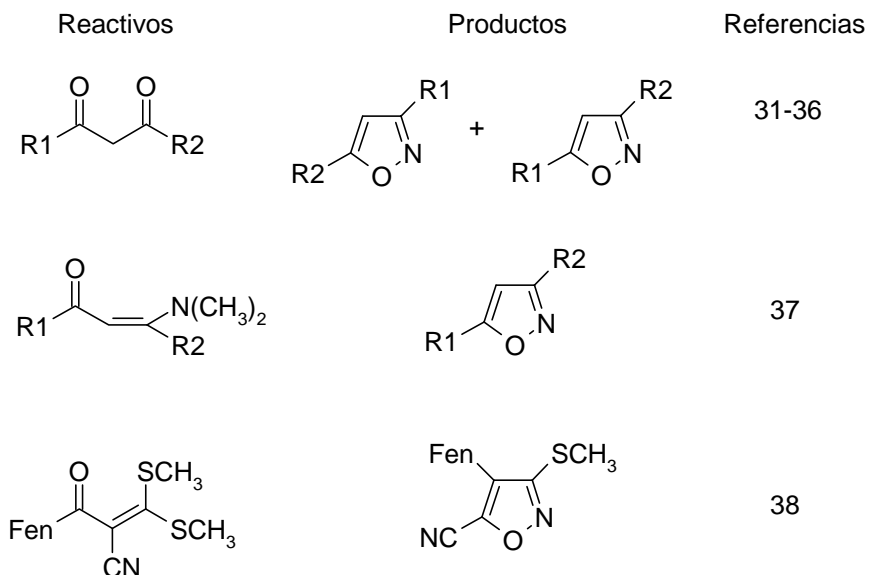


Fig. 4 Obtención de isoxazoles por oximación

Un segundo método para la síntesis de estos compuestos es la cicloadición de óxidos de nitrilo a acetilenos. Sin embargo, sólo el nitrilo aromático oxidado es estable, pues los no aromáticos son inestables y derivan a furoxanos. Los precursores más comunes de los óxidos de nitrilo son los hidroximoilcloruros que son irritantes severos de la piel (figura 5).

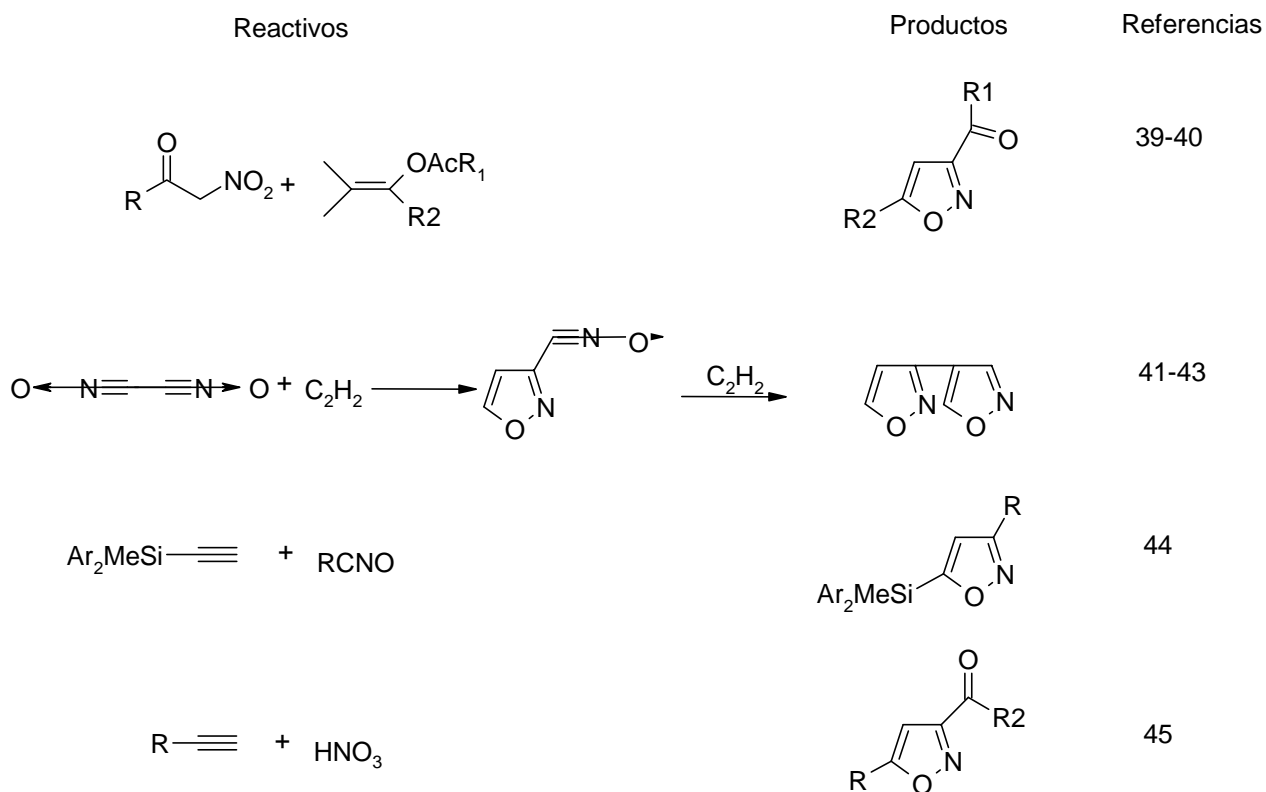


Fig. 5 Obtención de isoxazoles por cicloadición

En particular, los 5-aminoisoxazoles son importantes intermediarios debido a que son precursores de algunos fármacos como la zonisamida (anticonvulsionante), risperidona y la iloperidona (agentes antipsicóticos), y de otras moléculas con propiedades biológicas como la vitamina B₁₂, algunas pirimidinas y derivados de furano⁴⁶⁻⁴⁷.

Al igual que los isoxazoles, los 5-aminoisoxazoles se obtienen por las reacciones de oximación y cicloadición. A continuación se mencionan algunos ejemplos:

Métodos de oximación (figura 6):

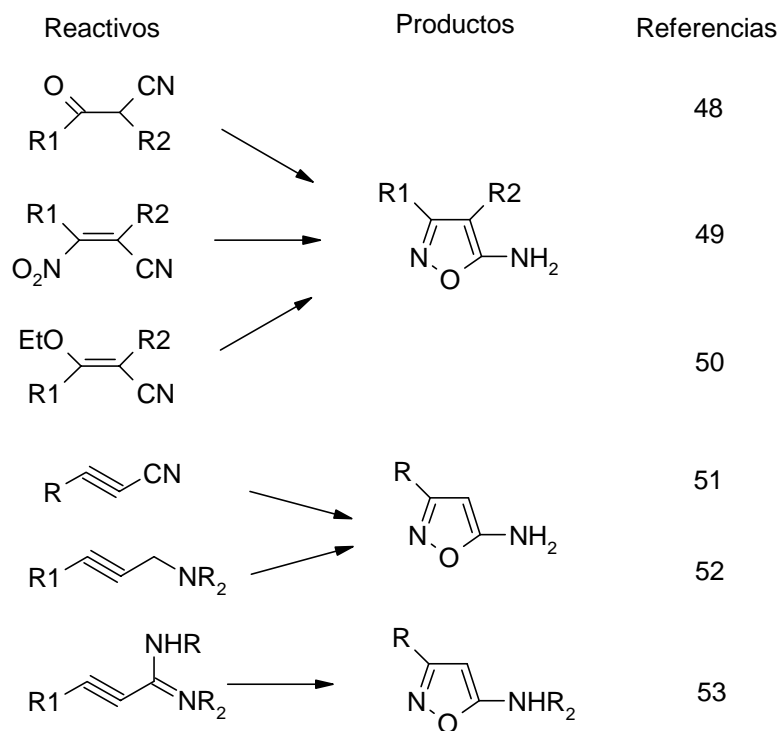


Fig. 6 Obtención de los 5-aminoisoxazoles por oximación

Métodos de cicloadición (figura 7):

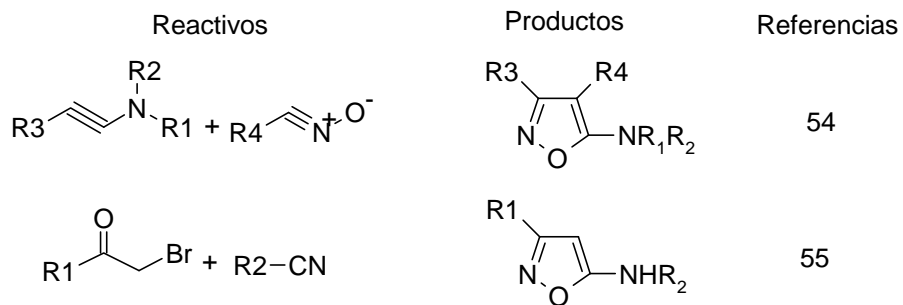


Fig. 7 Obtención de los 5-aminoisoxazoles por cicloadición.

1.2.2. Transformación de los isoxazoles

La transformación de los anillos de los isoxazoles permite proveer de materia prima a la síntesis de moléculas más complejas porque existen métodos sencillos y eficientes para prepararlos y pueden ser modificados a otras estructuras más simples, pero más funcionales.

Las reacciones que más se han estudiado con los isoxazoles son las de apertura y reducción que se han hecho de manera química, térmica y fotoquímica⁵⁶⁻⁶².

La biotransformación de los anillos de isoxazol resulta en una apertura del anillo. Los isoxazoles tienen rompimiento reductivo, esto debido a la gran electronegatividad del oxígeno adyacente al nitrógeno en el anillo.

El grupo más extensamente estudiado de fármacos que contienen isoxazol son los anticonvulsivos como la zonizamida. En ratas, la zonizamida es metabolizada a 2-(sulfamoilacetil)-fenol y es eliminado como conjugado glucorónido en la orina⁶³ como se muestra en la figura 9.

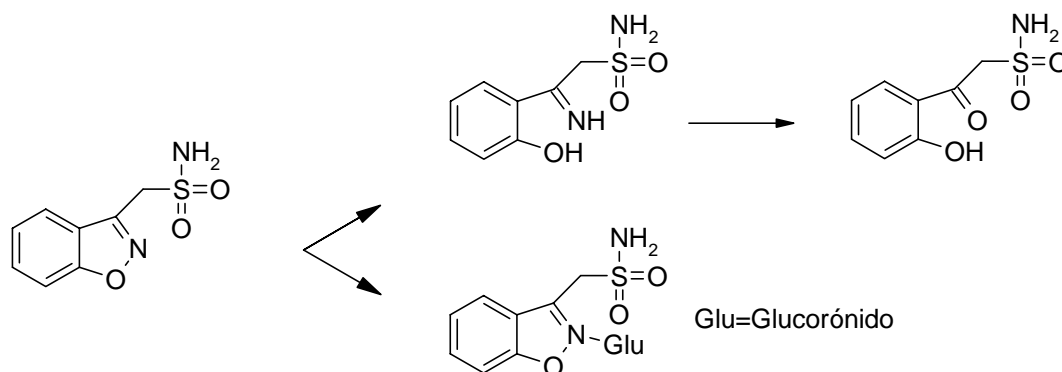


Fig. 9 Transformación de la zonizamida a un conjugado glucorónido en metabolismo de ratas

Por su parte, Easton⁶⁴ realiza la biotransformación del anillo de isoxazol en presencia de *S. cerevisiae* porque esta levadura cataliza el rompimiento de un anillo aromático, con la apertura del anillo de 4-acil y alcoxicarbonil isoxazoles. Parece ser que esta reacción ocurre vía un proceso de transferencia de electrones, análogo al que

se lleva a cabo en la reducción de aldehídos y cetonas con este mismo microorganismo (figura 10).

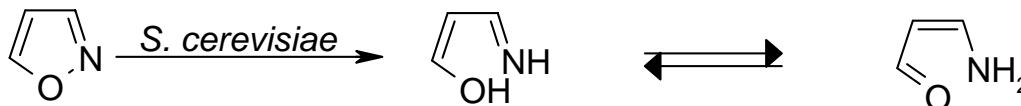


Fig. 10 Apertura del anillo de isoxazol con *S. cerevisiae*

1.3. Aspectos generales de las oximas

Las oximas son un importante grupo funcional utilizado generalmente para proteger grupos carbonilo, y como intermediarios en la reacción de Beckman⁶⁵. Para su preparación se utilizan básicamente dos metodologías:

1. La primera en la que se hace uso de un grupo carbonilo (cetona o aldehído).
2. En la segunda de un compuesto no carbonílico (generalmente un compuesto nitrado en forma de nitroso o nitro) que puede ser o no saturado⁶⁵⁻⁶⁶.

Aunque se dispone de varias rutas para la síntesis de oximas, no se ha descrito la utilización de los 3-nitropropenonitrilos o de los 5-aminoisoxazoles para su síntesis. Sólo el trabajo de Colau propone a la oxima del 3-(4-nitrofenil)-3-nitro-2-fenilpropenonitrilo como intermediario de la hidrogenólisis de los α -ciano- β -nitroestilbenos⁶⁷.

En cuanto a su uso, por décadas se han empleado para caracterizar aldehídos y cetonas, en la determinación de grupos carbonilos⁶⁶, y su protección⁶⁸, en la preparación de amidas tanto cíclicas como alicíclicas⁶⁹.

En la actualidad se ha retomado el interés por las oximas, pues su reducción a altas temperaturas resulta en las azirinas y las aziridinas correspondientes. Este par de compuestos son importantes debido a su potencial sintético para la transformación a

otros sistemas de heterociclos y por su incorporación en compuestos con ciertas funciones deseables.

Las azirinas y las aziridinas se utilizan en la preparación de indoles, antibióticos, citotoxinas, inhibidores del crecimiento de bacterias gram positivas y gram negativas, intermediarios clave para la preparación de aminoderivados como los α - y β -aminoácidos.

Una vez mencionadas las diferentes características generales; la síntesis, las transformaciones químicas y los usos de los compuestos nitrados, los isoxazoles y las oximas, a continuación se explican las transformaciones de estos compuestos por acción de las biotransformaciones.

1.4. Generalidades de las Biotransformaciones

Una biotransformación es una reacción catalizada por un organismo activo o alguna parte constitutiva de él. A estos organismos activos o partes constitutivas de ellos se les denominan biocatalizadores y pueden ser células animales, células vegetales, microorganismos, enzimas, anticuerpos biocatalíticos, péptidos catalíticos, enzimas semisintéticas. Como catalizadores, aceleran la velocidad de reacción, son específicas para un tipo de reacción y su actividad está regulada por las propias moléculas cuyas reacciones catalizan⁷⁰.

Los procesos de transformación se han realizado desde los primeros tiempos en que el hombre utilizaba microorganismos, como levaduras y hongos, para la elaboración de pan, bebidas alcohólicas y productos lácteos.

Pasteur, en 1862, realizó la primera biotransformación de manera metódica al obtener ácido acético de la oxidación del alcohol utilizando a *Bacterium xylinum*. Posteriormente hizo la conversión de glucosa a ácido glucónico con *Acetobacter acety* y la de sorbitol a sorbosa con *Acetobacter sp.*⁷¹

En cuanto a las características principales que debe seguir una biotransformación para que sea exitosa son: el tipo de sustrato, la selección del catalizador, las condiciones de reacción, la metodología de biotransformación y el procedimiento de extracción del producto. Todos estos aspectos se detallan brevemente a continuación:

El sustrato.- Éste debe ser soluble en el medio en que se trabaje y ser capaz de atravesar la membrana celular sin ejercer un efecto tóxico al biocatalizador⁷². Por lo que el sustrato se puede agregar en solución o adsorbido en algún material inerte como las resinas o arcillas. El momento en que se agrega al medio de reacción influye mucho en el rendimiento del producto pues los compuestos tóxicos inhiben el crecimiento a la hora de activar al biocatalizador.

El biocatalizador.- Debe tener la capacidad de realizar la reacción deseada con un alto rendimiento en el producto⁷³. Para una buena biotransformación, los

catalizadores se seleccionan de los ya conocidos para el tipo de reacción que se necesita, con un sustrato relacionado estructuralmente⁷⁴⁻⁷⁶. La forma física del catalizador también influye en el rendimiento del producto. La decisión final de cómo será usado depende del tipo de reacción, el proceso a seguir, si hay cofactores que reciclar y la escala en la que se lleva a cabo.

Condiciones de reacción.- Los catalizadores demuestran una alta actividad catalítica bajo condiciones suaves de reacción, como son un medio acuoso u orgánico, temperaturas por debajo de los 40°C, pH cercano al neutro, agitación continua y presión normal⁷⁷.

Metodología de biotransformación.- Hay varios métodos para llevar a cabo una biotransformación; a continuación se describen:

- *Cultivos en crecimiento.*- El sustrato se agrega al medio en crecimiento al momento de la inoculación o en el último estadio de crecimiento, por lo que el crecimiento y la biotransformación se llevan a cabo al mismo tiempo⁷³. Su principal ventaja es su fácil manipulación y permitir realizar una gran cantidad de experimentos en serie. Tiempos de incubación relativamente cortos y posible inducción enzimática en presencia del sustrato.
- *Cultivos previamente crecidos.*- El proceso de crecimiento de la biomasa y la biotransformación están separados. El biocatalizador primero se cultiva en condiciones óptimas, se concentra, se resuspende en un medio adecuado y se agrega al sustrato. Las ventajas de esta técnica son: el crecimiento y la bioconversión se optimizan de manera independiente, los tiempos de incubación se reducen hasta un 75%, se eliminan los efectos inhibitorios de crecimiento, la concentración del biocatalizador se ajusta a un valor deseado.
- *Enzimas purificadas.*- Se limita a las enzimas disponibles comercialmente y son muy útiles para realizar reacciones biocatalíticas preparativas. Pueden ser

utilizadas para realizar reacciones en presencia de grupos polifuncionales; además, son altamente regioselectivas, estereoselectivas o ambas. Algunas de sus ventajas son que están siempre disponibles, no tienen que ser preparadas por cultivos en crecimiento⁷⁸. Las reacciones se realizan en poco tiempo, la concentración del sustrato puede variarse sin problemas de toxicidad⁷².

- *Enzimas inmovilizadas.*- En esta técnica, se hace la inclusión de la enzima en un soporte sólido o ligamientos de unas moléculas a otras. Los biocatalizadores se pueden confinar en áreas restringidas que no pueden dejar, pero permanecen catalíticamente activos. Las ventajas de esta técnica son: es fácil remover el biocatalizador de la reacción una vez inmovilizado, los procedimientos de inmovilización aumentan la estabilidad operacional del biocatalizador, pero disminuyen su actividad catalítica⁷⁹.
- *Sistemas líquidos de dos fases.*- El biocatalizador permanece en la fase acuosa, mientras que la orgánica sirve como almacén para el sustrato y el producto. En sistemas de dos fases con un gran exceso de la orgánica, el equilibrio de reacción del biocatalizador hidrolítico puede ser llevado de la hidrólisis a la condensación. Las ventajas de esta técnica son: una alta concentración del sustrato/producto en la parte orgánica; un ingreso continuo del sustrato a la acuosa y un desplazamiento del producto a la orgánica, manteniendo la biotransformación y minimizando los efectos inhibidores del biocatalizador; una fácil separación de fases que ayuda a la recuperación del producto de la orgánica, y un uso repetido del biocatalizador en la parte acuosa⁸⁰.

Extracción del producto.- Los productos de biotransformación contenidos en el medio de reacción son recuperados del medio completo o del sobrenadante después de remover la biomasa por filtración o centrifugación. Dependiendo de las propiedades físicas y químicas del producto a recuperar y de la composición química del medio de reacción, se deben considerar métodos como la extracción, adsorción en resinas poliméricas, precipitación y destilación.

El producto resultante puede ser purificado por técnicas cromatográficas, destilación fraccionada y cristalización. Pequeñas cantidades pueden ser purificadas por cromatografía preparativa.

En la figura 11 se resumen las características generales de una biotransformación:

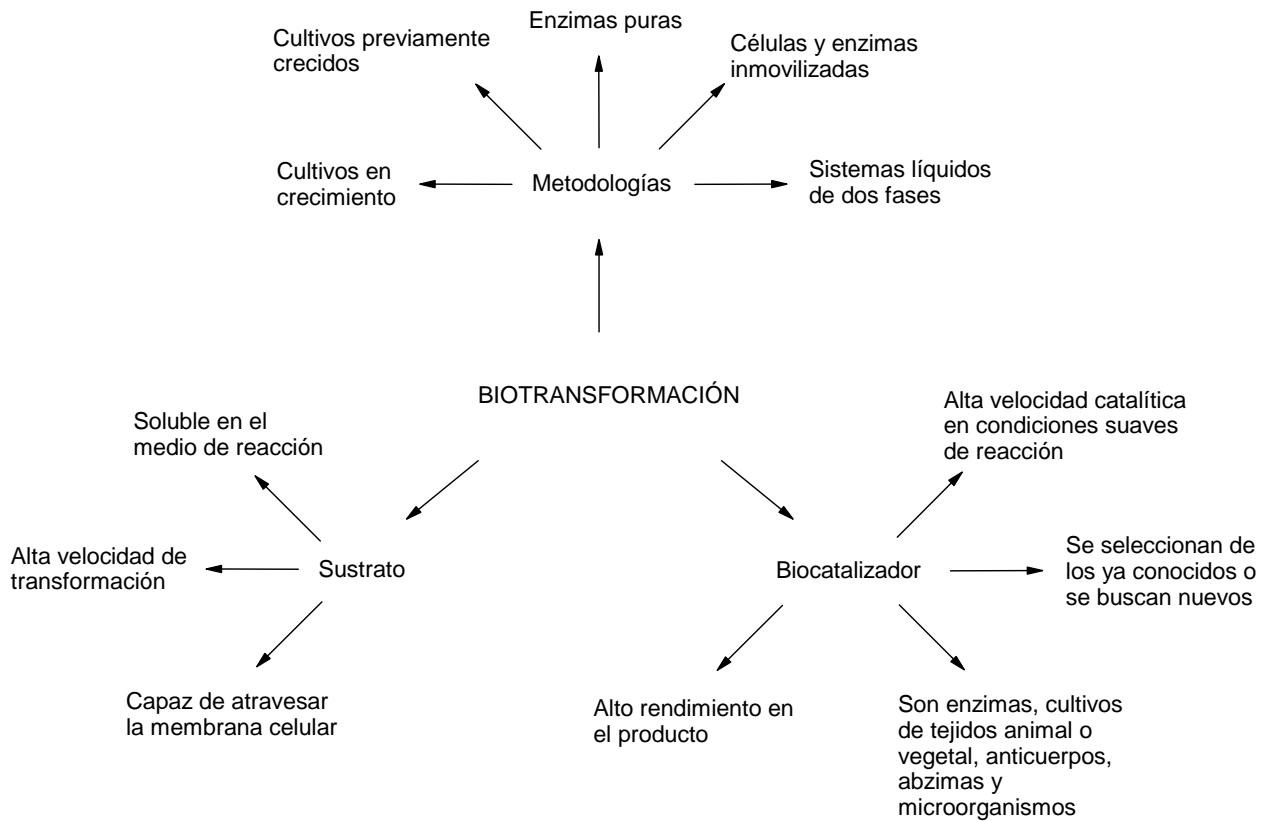


Fig. 11 Características generales de una biotransformación

En las siguientes secciones se mencionan las transformaciones que se han realizado para reducir los grupos nitro con microorganismos, extractos crudos y con *S. cerevisiae*.

1.5. Transformación del grupo nitro

Los compuestos nitrados son liberados a la biosfera casi exclusivamente por fuentes antropogénicas, algunos de ellos son producidos por la combustión incompleta de gasolinas; otros son utilizados como intermediarios sintéticos, colorantes, pesticidas y explosivos. Sólo unos pocos compuestos nitrados se encuentran en la naturaleza como la nitrosporina y la pirolnitrina⁸¹.

Varias investigaciones han revelado sistemas microbianos, extractos crudos y enzimas puras capaces de transformar a este tipo de compuestos, principalmente para degradarlos por varios mecanismos según se citan a continuación.

1.5.1. Transformación del grupo nitro con organismos enteros o extractos crudos

La primera reducción del grupo nitro a su amina fue inicialmente realizada por Neuberger en 1914 con *S. cerevisiae*, donde el nitrobenzeno fue reducido a su anilina y es hasta la década de 1980, cuando se retoman estas investigaciones con el fin de encontrar organismos capaces de transformar a los compuestos nitrados como el 2,4,6-trinitrotolueno en sus aminas correspondientes.

El 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) es el primer explosivo utilizado en la producción de municiones y es encontrado como contaminante en aguas y suelos de fábricas de explosivos y lugares de procesamiento. El TNT es tóxico y mutagénico y relativamente estable en el ambiente⁸²⁻⁸⁵.

Muchos estudios se han realizado para examinar la factibilidad de remover el TNT de aguas y suelos por medio de tratamientos microbianos, incluyendo compostas, lodos activados y reactores de movimiento continuo. El resultado usual de la transformación parcial del TNT son los aminodinitrotoluenos (ADNT), los diaminonitrotoluenos (DANT) y los azoxitetranitrotoluenos⁸⁶⁻⁸⁷. Algunos ejemplos de la remoción del TNT con microorganismos se presentan a continuación:

Jones⁸⁸ y Duque⁸⁹ aislaron a *Pseudomonas sp.*, de una muestra de suelo para degradar bajas concentraciones de TNT, pero sólo productos parcialmente reducidos

fueron identificados. Naumora⁹⁰ cultivó a *Pseudomonas fluorescens* que utiliza a los DANT como fuente de nitrógeno.

Funk estudió la transformación del TNT por *Streptomyces chronofuscus* A11 y encontró intermediarios reductivos, pero los productos terminales no fueron determinados. Por su parte, Past-Gragshy empleó *Streptomyces sp.*, observando que no hay resistencia significativa a la inhibición del crecimiento por el TNT⁹¹.

La mayoría de los hongos pueden catalizar la reducción de al menos un grupo nitro del TNT.⁹² El hongo *Phanerochaete chrysosporium*⁹³⁻⁹⁷ y *Phlebia radiata*⁹⁸ han sido estudiados por su capacidad de degradar TNT y sus principales productos de reducción (2A4,6DNT; 4A2,6DNT; 2,4DA6NT; 2,6DA4NT).

Otra de las formas de reducir aeróbicamente a este tipo de compuestos es por la mineralización del anillo aromático⁹⁹⁻¹⁰². Esto no se observa rutinariamente y muchas de las condiciones ambientales y metabólicas requeridas permanecen desconocidas. A este respecto, se reporta el aislamiento de *Pseudomonas sp.*, el cual utiliza el TNT como fuente de nitrógeno en presencia de glucosa.¹⁰³

La mineralización bajo condiciones aerobias y la aparición de productos indeseables del TNT han promovido la investigación de procesos anaerobios como una alternativa de la remediación.

En sistemas anaerobios, la degradación del TNT es más eficiente, pues es reducido al 2,4,6-triaminotolueno (TAT), un intermediario rico en electrones y por lo tanto inestable. Algunos ejemplos se citan a continuación.

Krumholz¹⁰⁴ y colaboradores reportan que el TNT es reducido a TAT con lodos metanogénicos activados. Por su parte, Khan¹⁰⁵, Angermainer¹⁰⁶, McCormick¹⁰⁷, Preuss¹⁰⁸, Regan¹⁰⁹ y Huges¹¹⁰ reportan la reducción de TNT y nitrotoluenos relacionados, por *Clostridium acetobutylicum*.

En la figura 12 se muestra de manera integrada la degradación del TNT por las diferentes vías antes mencionadas.

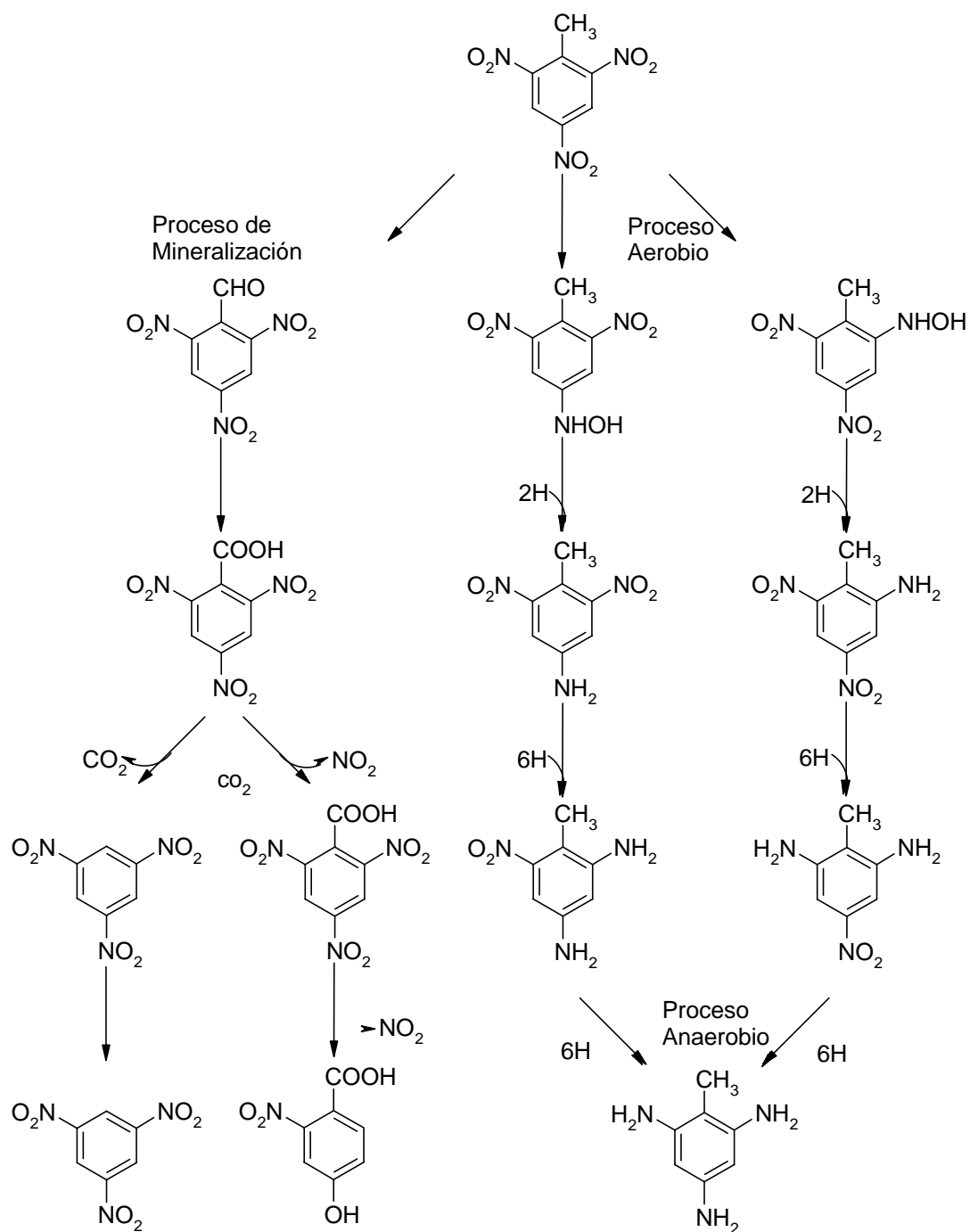


Fig. 12 Reducción del TNT por varias vías metabólicas y por diferentes microorganismos

Otras reducciones con grupos nitro son las realizadas por microsomas de mamíferos que reducen compuestos de tipo azo y nitro¹¹¹⁻¹¹²; los microsomas de hígado de rata y de abdomen de mosca doméstica reducen el ácido *p*-nitrobenzoico y el colorante 1,2,-dimetil-4(*p*-carboxifenilazo)-5-hidroxibenceno¹¹³ (figura 13).

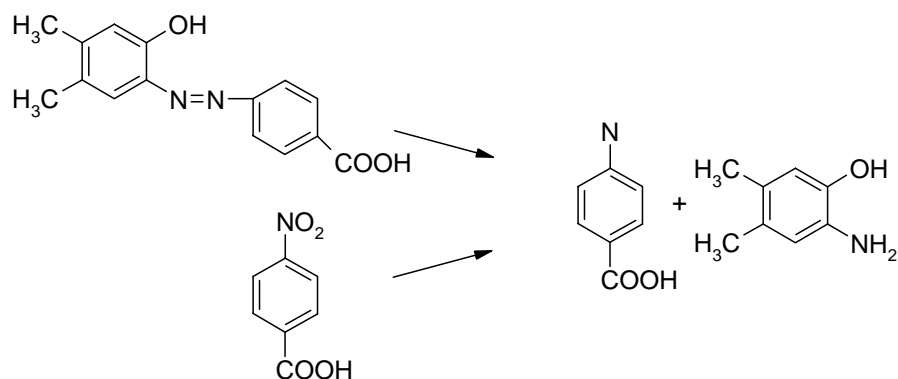


Fig. 13 Reducción realizada por microsomas de hígado de rata y de mosca doméstica

Razo-Flores¹¹⁴ evaluó la reducción de algunos compuestos nitroaromáticos, principalmente el 5-nitrosalicilato (5NSA), 4-nitrobenzoato (4NBt), 2,4-dinitrotolueno (2,4DNT), y el nitrobenceno (NB), en un reactor UASB de operación continua. Todos estos compuestos fueron transformados a sus correspondientes aminas aromáticas y en algunos casos a su completa mineralización como la del 5NSA y 4NBt (figura 14).

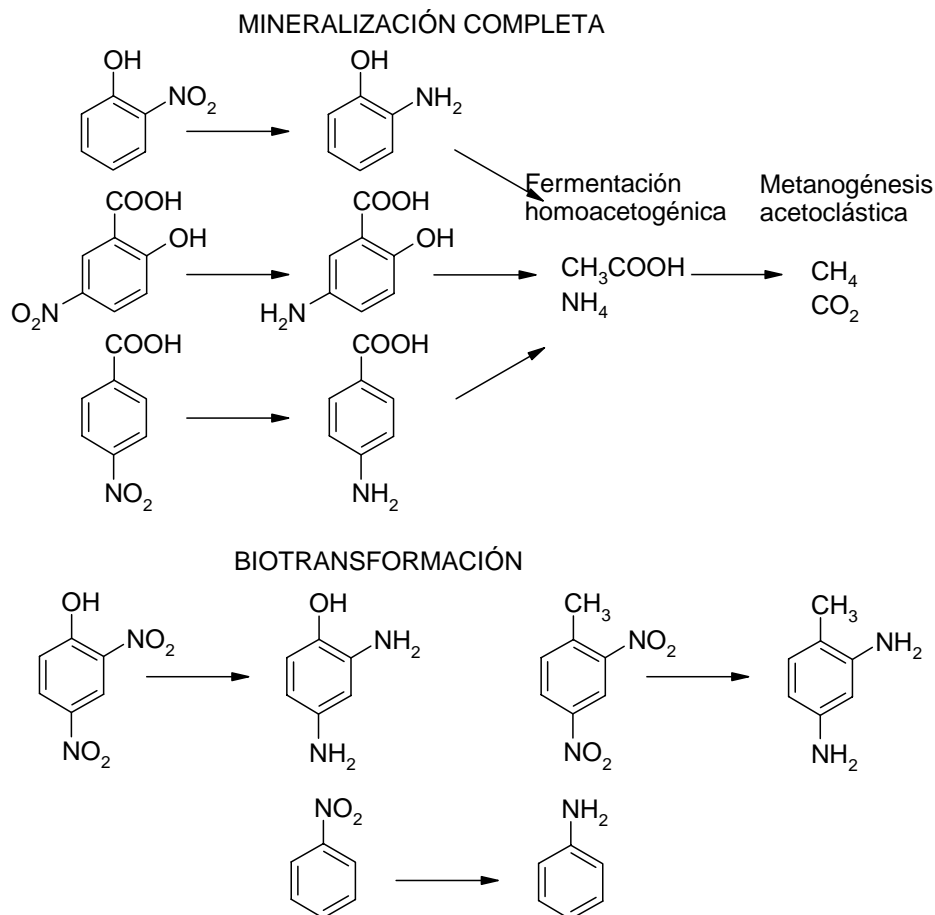


Fig. 14 Mineralización y transformación de nitroaromáticos en un reactor UASB

La degradación aeróbica del nitrofenol (PNP) puede ser iniciada por la formación de la hidroquinona (HQ) o del 4-nitrocatecol (NC), dependiendo del microorganismo. *Moraxella sp.* y *Pseudomonas sp.* convierten el PNP a HQ¹¹⁵⁻¹¹⁷, mientras que *Arthrobacter sp.*, *Flavobacterium sp.* y *Rhodococcus sp.* degradan el PNP vía la formación del NC¹¹⁸⁻¹²², en ambos procesos. Otro intermediario de la ruta, el ácido antranílico, también forma parte de la degradación del o-nitrobenzoato por *Arthrobacter protophormiae*¹¹⁷. Otro organismo que puede utilizar estos compuestos nitrados como fuente de nitrógeno es *Ralstonia sp.* SJ98. El mecanismo de reacción que integra todas estas transformaciones se presenta en la figura 15.

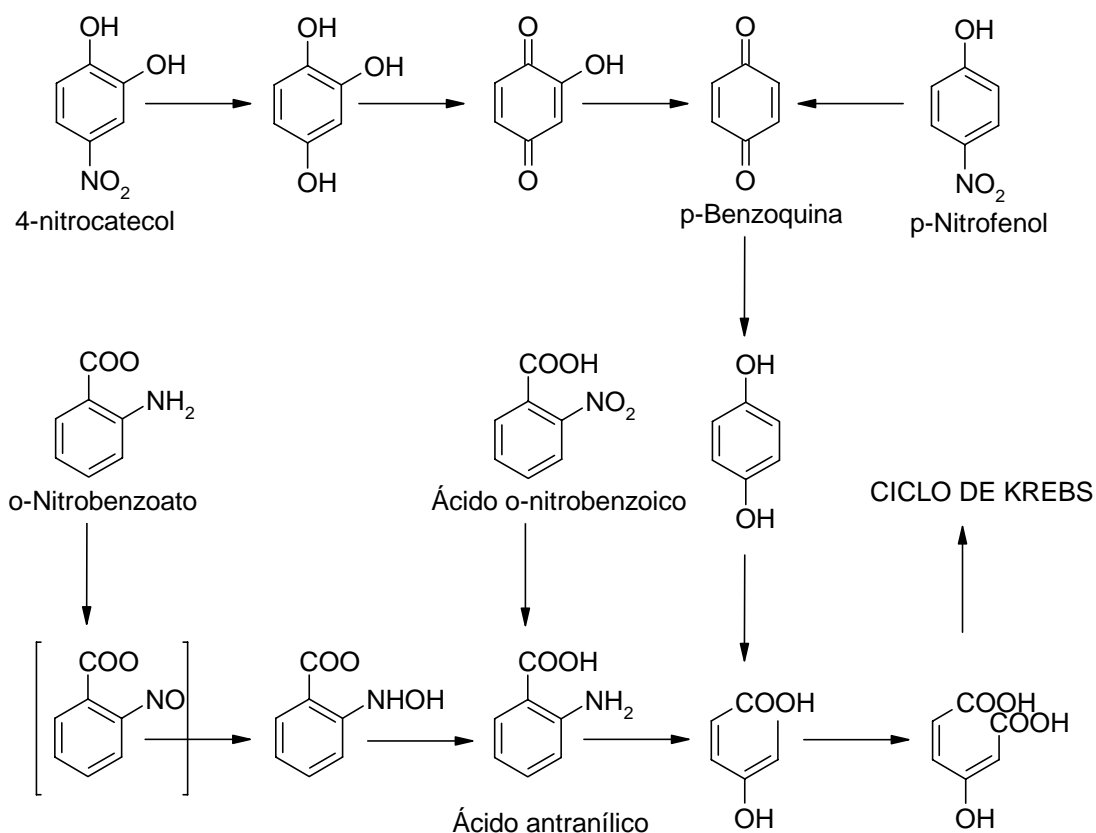


Fig. 15 Degradación aerobia del nitrocatecol, nitrofenol, o-nitrobenzoato y ácido o-nitrobenzoico

En las últimas dos décadas se han hecho esfuerzos por buscar a las enzimas que realizan la transformación de grupos nitro. Algunos ejemplos se exponen a continuación.

1.5.2. Transformación del grupo nitro con enzimas parcialmente puras

Muchos de los organismos vivientes contienen enzimas que pueden catalizar la transformación de grupos nitroaromáticos. Los ejemplos más comunes son una amplia variedad de enzimas de tipo de las oxidoreductasas¹²³. Menos comunes son las enzimas o rutas metabólicas completas que permiten a los organismos utilizar los compuestos nitroaromáticos como fuentes de nitrógeno o de carbono para su crecimiento.

Las enzimas que son capaces de reducir grupos nitro en compuestos nitroaromáticos son llamadas nitroreductasas. Estas enzimas son clasificadas por su relativa sensibilidad al oxígeno en:

Nitroreductasas insensibles al oxígeno o de tipo I, utilizan el mecanismo de reducción de dos electrones y son capaces de reducir grupos nitro bajo condiciones aerobias¹²⁴⁻¹²⁵. Las nitroreductasas de este tipo convierten al grupo nitro en hidroxilamina o aminas por la adición de pares de electrones donados por piridín nucleótidos reducidos. La ruta de reacción incluye derivados nitroso, pero éstos son difíciles de detectar porque son muy reactivos e inestables¹²⁶. Este tipo de nitroreductasa ha sido descrita en muchas bacterias, particularmente enterobacterias^{123, 127-130}.

Nitroreductasas sensibles al oxígeno o de tipo II, reducen los grupos nitro en un proceso de un sólo electrón, formando un radical nitroanión. En presencia de oxígeno, el radical nitroanión puede ser oxidado y dar de nuevo el grupo nitro y un anión superóxido^{124,131}. Las nitroreductasas del tipo II son las únicas que dan la reducción completa del grupo nitro a su amina.

La facilidad de reducción del grupo nitroaromático depende de la naturaleza de los otros sustituyentes en el anillo y el potencial de reducción del ambiente en el que se encuentre. Los grupos electrón-atrayentes activan la molécula para la reducción del grupo nitro, mientras que los grupos electrón-donadores hacen al anillo más susceptible

de ataques electrofílicos. Algunos ejemplos de reducción de grupos nitro por diferentes enzimas se presentan a continuación.

Las primeras nitroreductasas fueron identificadas en hígado de rata¹³², *Neurospora crassa*¹³³, y chícharos¹³⁴. Westfall¹³⁵ encontró que el TNT también puede ser reducido por la preparación de la succinato deshidrogenasa del corazón de ternera.

Las flavoenzimas de diversos microsomas, las NADPH-Citocromo C reductasa y la NADH-Citocromo B5 reductasa catalizan la reducción de quinonas a sus semiquinonas y son las responsables de la reducción de nitroaromáticos a sus productos aminados¹³⁶⁻¹³⁷.

Una nitroreductasa dependiente de NADPH, detectable en extractos de *P. chrysosporium*, es capaz de reducir TNT a sus DANT, pero se cree que esta nitrorreducción está dada por varios pasos y que más de una enzima puede estar incluida en la ruta para la total reducción a amina, aunque algunas nitroreductasas de bacterias son aparentemente el único componente del sistema¹³⁸.

El complejo tio-redoxiana-NADPH tioredoxinreductasa presente en procariontes y eucariontes y específicamente en *Arabidopsis thaliana* reducen el TNT por la vía de un electrón dando como producto final las DANT¹³⁹. Otro ejemplo de tioredoxina es la NADPH-tioredoxinreductasa de *Mycobacterium tuberculosis*¹⁴⁰ que es capaz de transformar el 2,4-dinitroclorobenceno y el 2,4-dinitrotolueno.

Pseudomonas pseudoalcaligenes JS45 puede transformar nitroarenos a o-aminofenoles utilizando dos enzimas, una nitro reductasa y una hidroxilaminobenceno mutasa¹⁴¹⁻¹⁴⁵. La nitrobenceno reductasa reduce el nitrobenceno a la hidroxilamina correspondiente y una mutasa la rearregla a un o-aminofenol.

En cuanto a la reducción de grupos nitro con *S. cerevisiae*, se ha observado que a diferencia de otros organismos que realizan la degradación de los nitrocompuestos, esta levadura los utiliza para la síntesis de otros compuestos como se presenta en la siguiente sección.

1.5.3. Transformación del grupo nitro con *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae ha el organismo pionero en la introducción de los biocatalizadores en síntesis orgánica. Al final del siglo XIX, los microorganismos en general y la levadura de pan en particular fueron utilizados para la producción de reacciones de hidrólisis que fueron aplicadas en la modificación estructural de polisacáridos.

El creciente interés en la síntesis de moléculas en sus formas enantioméricas puras, la reducción de dobles enlaces y diversos grupos funcionales (como el grupo nitro en compuestos aromáticos y alifáticos) y la síntesis de heterociclos ha promovido el desarrollo de la biocatálisis y de las transformaciones mediadas por *S. cerevisiae*.

La reducción del grupo nitro a la correspondiente amina fue inicialmente realizada por Neuberg¹⁴⁶ en 1914 (figura 16), donde el nitrobenceno es inicialmente reducido al nitrosobenceno, después a la fenilhidroxilamina y posteriormente a la anilina.

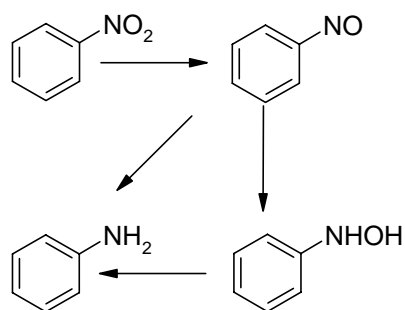


Fig. 16 Biorreducción realizada por Neuberg

En trabajos posteriores, Neuberg y Reinfurth¹⁴⁷ observan la reducción del m-di nitrobenceno, obteniendo como producto parcial a la m-nitroanilina. Esta reacción fue investigada de nuevo por Davey¹⁴⁸ en 1994 (figura 17).

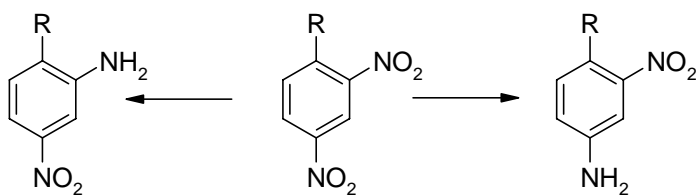


Fig. 17 Reducción del m-dinitrobenceno a la m-nitroanilina

En el mismo trabajo, Davey realizó la reducción del o-nitrobencenonitrilo a la 2-aminobenzamida. Este producto resultó de la reducción inicial de la anilina a su derivado hidroxilamina, ciclizado a la benzoisoxazolidina y después al producto aislado (figura 18).

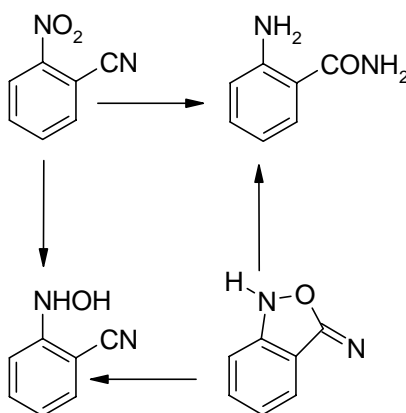


Fig. 18 Reducción del o-nitrobencenonitrilo a la 2-aminobenzamida

Takeshita en una serie de trabajos reporta la reducción de compuestos nitroaromáticos con varios sustituyentes en el anillo de benceno¹⁴⁹, N-óxidos¹⁵⁰ y la reducción de compuestos heteroaromáticos sustituidos¹⁵¹. Además, investigó la influencia de sustituyentes en tales reducciones.

En estos experimentos encontró que la reacción de reducción depende de la naturaleza de los sustituyentes en el anillo aromático. Cuando se encuentra con grupos electrón donadores tales como NH₂, OH, SH, CH₃ o BR, la reacción no procede o el rendimiento es muy bajo. En contraste, cuando el grupo es electrón atractor tal como NO₂, CN, CF₃ o COOEt la reducción se da con buenos rendimientos (figura 19).

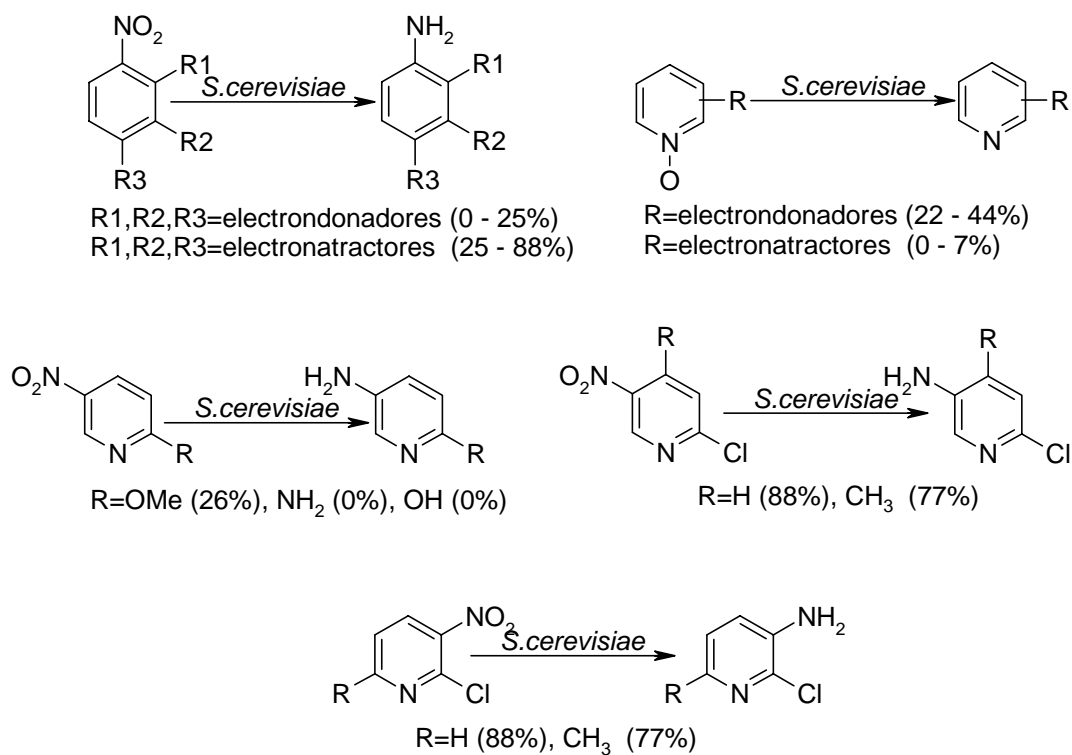


Fig. 19 Reducción de compuestos nitroaromáticos con varios sustituyentes en el anillo de benceno

Baik¹⁵²⁻¹⁵⁶ publicó una serie de artículos en los cuales se reporta la reducción de grupos nitroaromáticos utilizando *S. cerevisiae* en condiciones extremas (pH 14, 70 – 80°C, a reflujo, Metanol/Etanol:Agua). Sin embargo, se demostró posteriormente que esta metodología no es una transformación, sino una reducción química hecha por los productos de reacción de los carbohidratos y el NaOH¹⁵⁷. La característica 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 electrondonadores. Además, los azoxibencenos se obtuvieron como subproductos o intermediarios en estas reacciones y pueden ser reducidos por las levaduras bajo estas condiciones (figura 20).

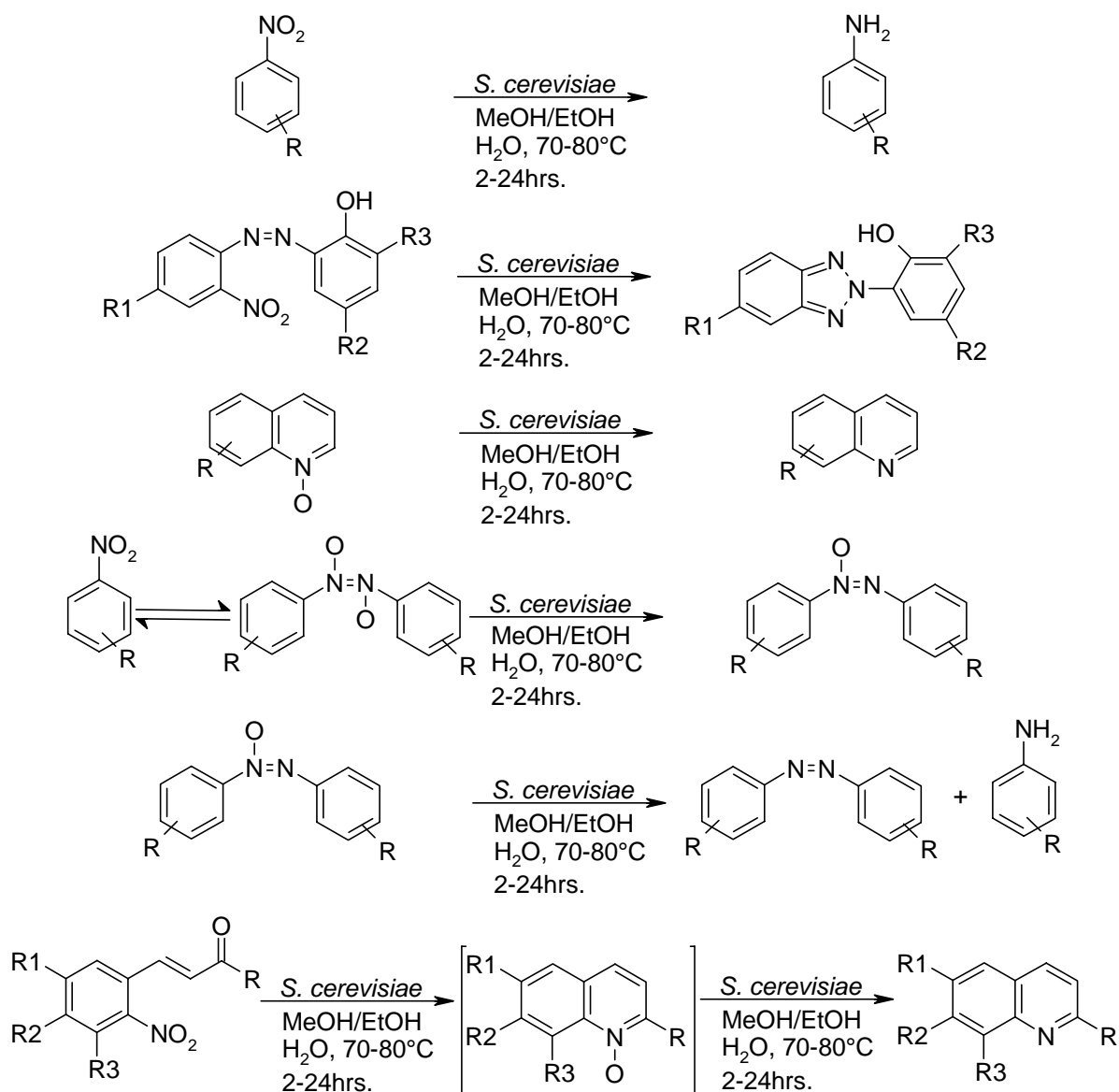


Fig. 20 Reducción de grupos nitro utilizando a *S. cerevisiae* en condiciones extremas

Por su parte Eichberger¹⁵⁸ redujo las nitroacetofenonas a las correspondientes aminofeniletanidas. Las β -, γ -nitrometilcetonas alifáticas han sido reducidas dando los correspondientes nitroalcoholes¹⁵⁹.

Los compuestos nitroalifáticos son considerados intermediarios valiosos para la preparación de compuestos biológicamente activos tal como los alcaloides, esteroides, derivados de aminoácidos, inhibidores de enzimas, entre otros. En cuanto a la

reducción de nitroalquenos (nitro olefinas, y β -nitroestirenos), se conoce que *S. cerevisiae* tiene la capacidad de hidrogenar dobles enlaces C=C que son deficientes de electrones, dando así un método para la hidrogenación asimétrica de nitro olefinas. Este tipo de sustratos deben tener sólo un hidrógeno en la posición α , de otra manera el nitrocompuesto saturado podrá sufrir una racemización bajo condiciones suaves.

Ohta¹⁶⁰⁻¹⁶¹, Kawai¹⁶²⁻¹⁶³, McAnda¹⁶⁴, reportan la reducción selectiva de los 2-nitro-1-fenilpropenos dando los nitroalcanos correspondientes incubados con *S. cerevisiae* con rendimientos moderados como se muestra en la figura 21.

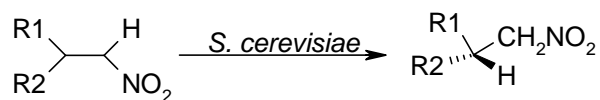


Fig. 21 Reducción de los 2-nitro-1-fenilpropenos con *S. cerevisiae*

La transformación de β -nitroestirenos con *S. cerevisiae* a 31-32°C por 24 hrs., da los nitroalcanos correspondientes. Cuando un grupo nitro está sustituido en el anillo de benceno, se realiza una reducción selectiva, formando primero el nitroalcano acompañado con los amino derivados¹⁶⁵ (figura 22).

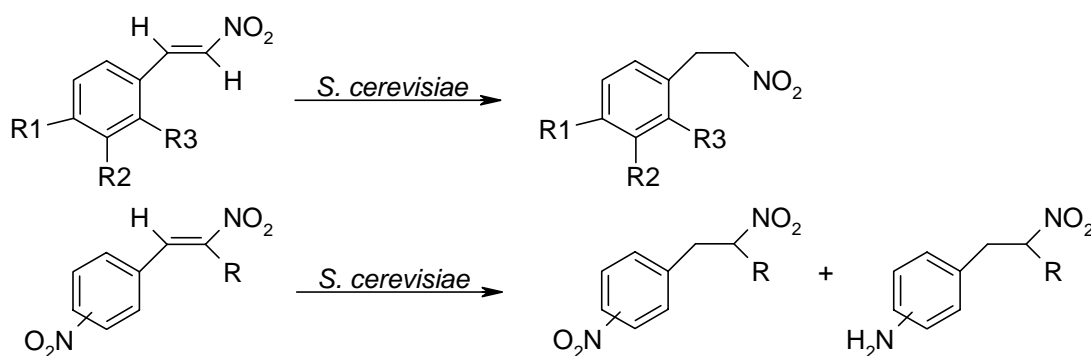


Fig. 22 Transformación de β -nitroestirenos con *S. cerevisiae*

Navarro-Ocaña⁵⁶ reporta la reducción de los 3-nitropropenonitrilos con *S. cerevisiae* obteniendo los isoxazoles correspondientes y no la reducción del doble

enlace como se había reportado. Además, obtuvo otro compuesto denominado oxima (figura 23).

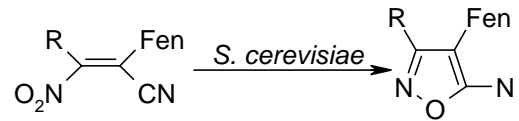


Fig. 23 Transformación de los 3-nitropropenitrilos con *S. cerevisiae*

2. Objetivos

Objetivo general

Estudiar la biotransformación de los nitroalquenos (Z)-3-nitro-3-alkil o aril-2-fenilpropenonitrilos a sus oximas correspondientes por la acción de la levadura de pan *S. cerevisiae*, proponiendo el siguiente mecanismo de reacción:

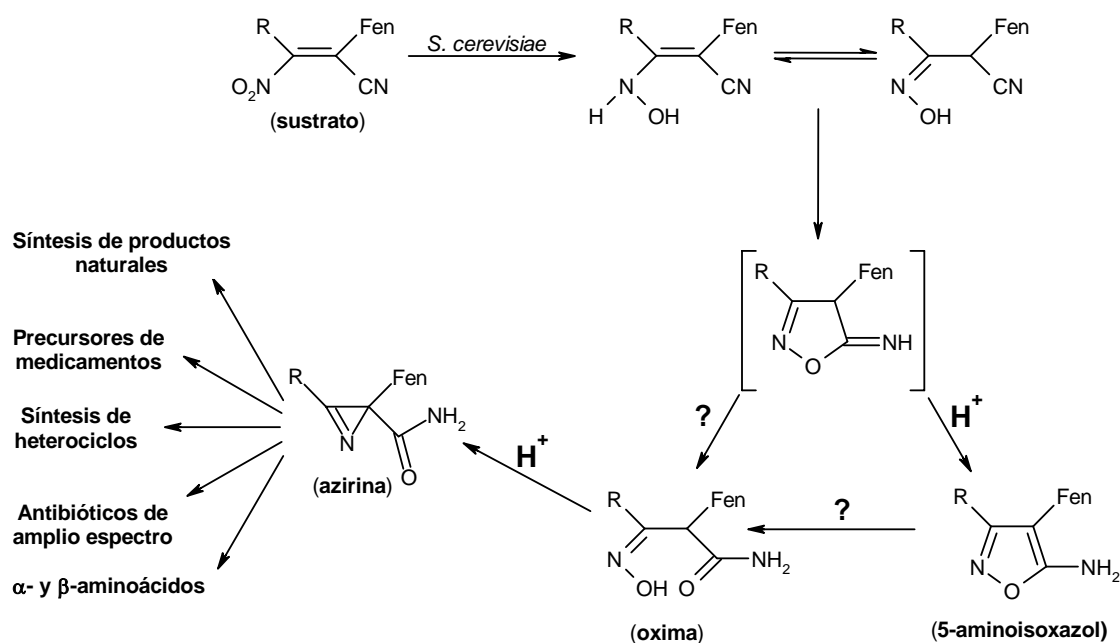


Fig. 24 Mecanismo propuesto para la transformación de nitroalquenos.

Objetivos particulares

- Identificar los productos e intermediarios de la reducción de los nitroalquenos (Z)-3-nitro-3-alkil o aril-2-fenilpropenonitrilos con *S. cerevisiae*.
- Determinar que la reducción de los nitroalquenos (Z)-3-nitro-3-alkil o aril-2-fenilpropenonitrilos a sus oximas correspondientes, sucede por la acción de la levadura de pan, *S. cerevisiae*.
- Identificar el mecanismo de reacción
- Estudiar la influencia del pH en el rendimiento de los productos de la reducción.

3. Procedimiento Experimental

3.1. Material y equipo

El fenilacetnitrilo con el que se prepararon todos los sustratos es de Eastman-Kodak. Los aldehídos sustituidos y los demás compuestos son de marcas comerciales de grado analítico, así como los disolventes utilizados tanto para el aislamiento de productos, cromatografías en capa fina y HPTLC.

Para los análisis cromatográficos en capa fina se utilizaron cromatoplasmas de aluminio con gel de sílice G-60/UV₂₅₄ de Macherey-Nagel. La sílica gel utilizada para la cromatografía en columna es de la misma marca con un tamaño de malla de 70-230 y de 230-400. Las cromatoplasmas para HPTLC son de vidrio, cubiertas con gel de sílice de 0.2 mm de espesor, con un tamaño de 10X10 cm. El densitómetro utilizado en la técnica de CP o CCFAR es CAMAG3 Scan.

Las soluciones reveladoras utilizadas fueron:

- **Sulfato Cérico.** 12 g de sulfato cérico 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.
- **Yodo** (Vapores). Es un revelador universal para muchos compuestos orgánicos.
- **Permanganato de potasio.** Reactivo universal para compuestos orgánicos. Se rocía con una solución de 1.6% de permanganato de potasio en ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente se calienta a 180°C durante 15-20 minutos.
- **Ninhidrina.** Se utiliza para la detección de aminoácidos, aminas, aminoazúcares, se rocía con una solución de 0.2 g de ninhidrina en 100 mL de etanol y se calienta a 110°C hasta que aparecen manchas rojizas.

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fischer-Jones y se reportan sin corregir. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN ¹H y ¹³C) se

determinaron en espectrómetros Varian Gemini y Varian VXR-300s, empleando CDCl₃ y DMSO-d₆ como disolventes. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Los espectros de masas (EM) se elaboraron en un equipo Hewlett-Packard modelo 5945 A, JMS-SX102A JEOL y JMS-AX505, mediante técnicas de impacto electrónico o por ionización química. Los espectros de infrarrojo (IR) se llevaron a cabo en espectrofotómetros PERKIN-ELMER 283 y NICOLET FT-IR 55X, la absorbancia de infrarrojo se reporta en cm⁻¹.

Las biotransformaciones se efectuaron en un equipo INNOVA 4330 con agitación y ajuste de temperatura constante. El material biológico utilizado en las biotransformaciones fue levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae* comercial, Saft-Instant, SAF Products, Minneapolis, MN. 55415.

3.2. Metodología

3.2.1. Síntesis de los (Z)-3-nitro-alkil o aril-propenonitrilos.

Como ejemplo se ilustra la preparación del (Z)-3-nitro-2,3-difenilpropenonitrilo. Se mezclaron 7.02 g (60 mmol) de fenilacetoneitrilo, 6.36 g de benzaldehído (60 mmol) y 40 mL de etanol al 95 %. A esta mezcla se le agregaron lentamente y con agitación vigorosa 3 mL de NaOH al 40 % y se continuo la agitación hasta la solidificación completa.

El sólido formado se colectó por filtración al vacío, se lavó con 12 mL de agua helada y 3 mL de etanol frío. El sólido se cristalizó en etanol al 80% evaporándose parte del disolvente hasta la saturación. Se obtuvieron 9.96 g (80.62%) de cristales blancos con punto de fusión de 85-87 °C y R_f de 0.415 en Hex:AcOEt 9:1. Los datos espectroscópicos concuerdan con los publicados¹⁶⁷. Este se nitró para obtener el sustrato deseado como se indica a continuación.

Se colocaron 2.05 g de (Z)-2,3-difenilpropenonitrilo, en un matraz bola de 250 mL disuelto en 50 mL de tetracloruro de carbono y se le adicionaron 0.2 g de yodo como

catalizador; se agitó y se enfrió a 0°C de manera continua y se le añadieron gases nitrantes de la siguiente manera:

A 5 mL de THF en un matraz bola de 500 mL se le adicionaron lentamente 15 mL de ácido nítrico al 75%, este proceso se repite nueve veces. Los gases nitrantes obtenidos se burbujearon al matraz de reacción hasta saturación y se mantuvieron así hasta la reacción total del sustrato, la cual se monitoreo por CCF. Terminado la reacción, se le extrajo el exceso de óxidos nitrantes mediante una bomba de vacío y se le adicionaron 100 mL de tiosulfato de sodio al 20% para eliminar el Yodo. Se separó la fase orgánica de la acuosa; la fase orgánica se concentró en un rotaevaporador y a la fase acuosa se le hicieron tres extracciones de 50 mL cada uno con acetato de etilo, el cual también se concentró. Los concentrados finales se juntaron y se cristalizaron en etanol caliente. Se obtuvieron 1.78 g (72%) de cristales en forma de agujas color amarillo con p.f. 94-96 °C y un R_f de 0.465 en Hex: AcOEt 8:2. Los datos fisicoquímicos concuerdan con los publicados¹¹⁰.

3.2.2. Transformación de los (z)-3-nitro-alkil o aril propenonitrilos en agua

A seis gramos de levadura *S. cerevisiae*, 6 g de sacarosa y 100 mL de agua destilada se les colocaron en un matraz Erlen Meyer. Esta mezcla se puso en un agitador orbital de temperatura controlada a 30 °C y 150 rpm durante 30 minutos (periodo de activación). Después, 1 mmol de sustrato disueltos en 6 mL de acetona se adicionaron a la mezcla que se conservó en las mismas condiciones de temperatura y agitación por un periodo de 24 horas.

3.2.3. Seguimiento del mecanismo de reacción

El mecanismo de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina, tomando alícuotas de 2 mL a las cuales se les agregó 2.5 mL de acetato de etilo, se mezclaron y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos, se separó la fase orgánica y se repitió una vez más el procedimiento para obtener un volumen aproximado de 5 mL de la fase orgánica que se utiliza en la realización de las cromatoplas en un sistema de

hexano:acetato de etilo 8:2. La detección de los compuestos se hizo mediante luz UV, y las soluciones reveladoras antes descritas.

3.2.4. Aislamiento y purificación de productos

Después de 24 horas, la biotransformación se sacó de la incubadora, se saturó con cloruro de sodio (20 g), se le adicionaron 100 mL de acetato de etilo, 20 g de celita y se agitó durante 10 minutos. La mezcla se filtró al vacío poniendo una cama de celita de 20 g. Al residuo sólido y la fase acuosa se les hicieron tres lavados a cada una con 100 mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron, obteniendo un concentrado de color rojizo. Para obtener una buena cantidad de los productos, se juntaron los concentrados de 3 biotransformaciones.

La purificación se realizó mediante cromatografía en columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de polaridad creciente de hexano:acetato de etilo (1:0, 9:1, 8:2, 7:3 y 1:1). Se obtuvieron 2 compuestos que por orden de elusión fueron el 5-amino-alquil o aril-4-fenilisoazol y los 2-fenil-alquil –aril-3-oximinopropanamidas. Los datos espectroscópicos se muestran en el apéndice 1.

3.2.5. Determinación de la influencia de *S. cerevisiae* en la reacción

Para determinar que la reacción de reducción de los (Z)-3-nitropropenonitrilos a sus oximas correspondientes es de carácter enzimático, se realizaron los siguientes procedimientos.

Medio líquido de reacción

50 mL de agua y 3 g de sacarosa se colocaron en un matraz Erlen Meyer y se llevaron a un agitador orbital a 30°C y 150 rpm durante 30 minutos. Al terminar el tiempo de activación, se agregaron 0.5 mmol del sustrato disuelto en 3 mL de acetona y se siguió el curso de reacción durante 24 horas.

Levadura inactivada por temperatura

En un matraz Erlen Meyer se colocaron 50 mL de agua, 3 g de sacarosa, 3 g de lavadura de pan; y se colocó en un agitador orbital a 30°C y 150 rpm durante 30 minutos. Después del tiempo de activación, el matraz de reacción se dejó en un baño María a 80°C por 30 minutos. Posteriormente, se regresó al agitador orbital y hasta que la temperatura se estabilizó en 30°C, se agregaron 0.5 mmol de sustrato disueltos en 3 mL de acetona y se monitoreó el curso de reacción durante 24 horas. Cabe destacar que para demostrar que las levaduras se inactivaron, se tomó una muestra del medio de reacción antes de agregar el sustrato y se cultivaron en agar PDA (Agar papa dextrosa) por tres días, revisando las cajas a los 3, 5 y 7 días.

Levadura inactivada por metanol

3 g de sacarosa, 3 g de *S. cerevisiae* y 50 mL de agua se colocaron en un matraz Erlen Meyer de 250 mL. La mezcla se activó en un agitador orbital a 150 rpm, a 30°C durante 30 minutos. Al término de la activación, la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm, se separó el sobrenadante y la biomasa se resuspendió en 50 mL de metanol.

Esta nueva mezcla se dejó en el agitador orbital durante 30 minutos con las condiciones antes mencionadas y, al término, se centrifugó para separar el metanol de la levadura y se resuspendió con el sobrenadante acuoso. La mezcla se dejó estabilizar durante 30 minutos y se le agregaron 0.5 mmol de sustrato disueltos en 3 mL de acetona.

Para verificar que *S. cerevisiae* estuviese inactiva, se tomó una muestra del medio de reacción y se cultivó en placas de agar PDA.

Sobrenadante de activación y levadura resuspendida en agua

La mezcla de activación se preparó como se explica en los apartados anteriores, sólo que después del periodo de activación, la mezcla se centrifugó y el sobrenadante resultante se utilizó como medio de biotransformación bajo las condiciones antes mencionadas.

La levadura que quedó como botón se resuspendió en agua destilada, se llevó al agitador orbital y se dejó incubar a 30°C y 150 rpm por 30 minutos, y se agregó 0.5 mmol de sustrato.

Extracto crudo de la levadura en el medio de reacción

Una vez activada la mezcla de reacción (3 g de *S. cerevisiae*, 3 g de sacarosa, 50 mL de agua a 30°C y 150 RPM durante 30 minutos), ésta se centrifugó, separando el sobrenadante y la levadura; a la levadura se le agregaron 50 mL de nitrógeno líquido y se maceraron por 5 minutos. La operación se realizó una vez más y la levadura se resuspendió en su sobrenadante; se llevó de nuevo a periodo de incubación y al término de éste se le agregaron 0.5 mmoles de sustrato. Se tomaron alícuotas para seguir el curso de reacción.

Para verificar que la levadura está inactiva, pero no su maquinaria enzimática se cultivó un poco de este medio de reacción en agar PDA y se verificó el crecimiento del microorganismo a los 3, 5 y 7 días.

3.2.6. Implementación del método de análisis y determinación cuantitativa del mecanismo de reacción

Se utilizó un equipo de CP o CCFAR (cromatografía planar o cromatografía en capa fina de alta resolución) CAMAG-Scan3 para medir la concentración de sustrato y productos de la biotransformación. Primeramente, se hicieron curvas patrón de cada uno de los compuestos puros a concentraciones conocidas (2.0 – 50 μmol).

Después se monitoreó el mecanismo de la biotransformación, tomando alícuotas de 2 mL del medio de reacción a diferentes tiempos que se extrajeron dos veces cada una con 2.5 mL de acetato de etilo. En cada ocasión, las mezclas se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos para separar rápidamente las fases. Las fracciones orgánicas se juntaron, se aforaron a 5 mL y se aplicaron 10 μL de esta solución a las placas de sílica gel. Las placas se eluyeron dos veces, la primera con hexano:acetato de etilo 8:2 para cuantificar el sustrato y el 5-aminoisoxazol, y la segunda con

hexano:acetato de etilo 1:1 para cuantificar a la oxima. La cuantificación se realizó interpolando los resultados del monitoreo en las curvas patrón.

3.2.7. Influencia del pH en la transformación del (Z)-3-nitro-2,3,-difenilnitropropenonitrilo

En un matraz Erlen Meyer se adicionaron 3 g de sacarosa, 3 g de levadura y 50 mL de buffer de fosfatos a pH 7. La mezcla de reacción se activó en un agitador orbital a 30°C y 150 rpm durante 30 minutos. Al término de la activación se ajustó el pH a 5, 7 u 8 durante 15 minutos (con una solución de hidróxido de amonio al 10% y una solución de ácido acético al 10%, que son una base y un ácido débil). Ajustado el pH, se agregaron 0.5 mmol del sustrato disuelto en 3 mL de acetona y se siguió el curso de reacción.

4. Resultados y Discusión

4.1. Síntesis de los (Z)-3-nitro-alquil o aril-propenenitrilos

La obtención de los (Z)-3-nitro-alquil o aril-propenenitrilos se realizó con la siguiente ruta de síntesis:

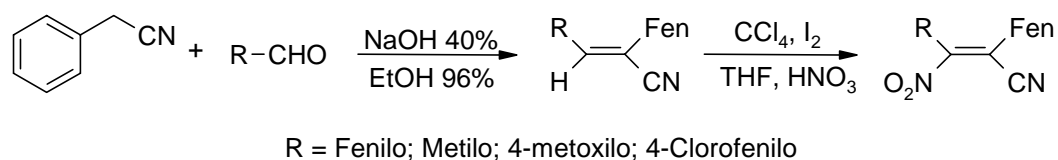


Fig. 25 Ruta de síntesis de los (Z)-3-nitro-alquil o aril-propenenitrilos.

En la primera fase se prepararon los (Z)-2-fenil-3-aril o alquil-propenenitrilos que son la materia prima de los productos nitrados. Estos preestratos se sintetizan mediante la reacción de condensación de Knoevenagel en la que se hacen reaccionar un aldehído sustituido con el fenilacetnitrilo en presencia de una base utilizando etanol como disolvente¹⁶⁸. Estos compuestos fueron caracterizados y comparados con los descritos en la literatura por su punto de fusión y R_f , como se muestran en la tabla 1. Las constantes espectroscópicas se describen en el apéndice.

Tabla 1. Comparación de los puntos de fusión (p.f.) y rendimientos (Ren) de los productos de la reacción de Knoevenagel

Compuesto	p.f. ^a (°C)	p.f. ^b (°C)	Ren ^a (%)	Ren ^b (%)	Referencia
FCN	85-87	85-86.5	80.62	80-90	167 y 169
PhCROTO	99-101	100-103	31.80	40	167 y 169
metoxiFCN	93-95	93.5-94.5	80.43	80-90	167 y 169
cloroFCN	100	100-101.5	82.00	80-90	167 y 169

^a= experimental; ^b= publicado.

La segunda fase fue la introducción del grupo nitro en los preestratos antes mencionados en la posición 3 y del mismo lado del nitrilo. El agente nitrante utilizado fue el desarrollado por Navarro-Ocaña¹³.

Estos compuestos fueron comparados y caracterizados con los descritos en la literatura. Las constantes espectroscópicas se muestran en el apéndice.

En la tabla 2 se muestran los puntos de fusión y rendimientos obtenidos de la reacción de nitración mediante la cual se prepararon los sustratos que se reducirán con *S. cerevisiae*.

Tabla 2. Comparación de los puntos de fusión (p.f.) y rendimientos (Ren) de los productos de nitración

Compuesto	p.f. ^a (°C)	p.f. ^b (°C)	Ren ^a (%)	Ren ^b (%)	Ref.
FCNN	94-96	95.5	71	92	13
PhCRONO ₂	114-116	115	64.71	75	13
4-metoFCNN	91-94	92	72.24	90	13
4-CIFCNN	115-117	116	84.78	90	13

^a= experimental; ^b= publicado.

4.2. Identificación de los bioproductos de la transformación de los 3-nitropropenonitrilos.

Las transformaciones realizadas con *S. cerevisiae* utilizan a la levadura liofilizada, solución amortiguadora a pH 7, y una fuente de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa e incluso se ha utilizado glicerol)¹⁷⁰. Estos ingredientes se mezclan en un matraz Erlen Meyer y se colocan en un agitador orbital a 150 rpm y 30°C durante 30 minutos o hasta 1 hora. A esta etapa del proceso se le denomina tiempo de activación.

Pasada esta primera etapa se agrega el sustrato a ser transformado, se calcula el tiempo de reacción y se extrae el producto del medio de reacción. Con esta metodología es posible transformar un gran número de compuestos, que pueden ir desde la reducción de dobles enlaces, reducción de grupos carbonilos, interconversión de grupos funcionales con reactividad similar, síntesis de heterociclos y específicamente para el objetivo principal de este trabajo la reducción del grupo nitro.

La reducción de los 3-nitropropenonitrilos se realizó de la siguiente manera: en un matraz Erlen Meyer se colocaron 1.5 g de levadura liofilizada, 1.5 g de sacarosa y 25 mL de solución amortiguadora a pH 7. Todo esto se colocó en un agitador orbital a 150 rpm, a 30°C durante 30 minutos. Después del tiempo de activación se agregaron 0.25 mmol del sustrato modelo (3-nitro-2,3-difenil-propenonitrilo, **FCNN**) disuelto en 3 mL de acetona, y se dejó reaccionar por 12 horas.

Después de transcurrir el tiempo antes mencionado, la reacción se detuvo, obteniendo después de aislar y purificar dos productos: el 5-aminoisoxazol (**FCNN-isox**) y la oxima correspondiente (**FCNN-oxim**).

Ambos productos de la reacción fueron caracterizados por sus constantes fisicoquímicas junto con las constantes de los otros tres sustratos nitrados biotransformados y se muestran en el apéndice 1. Las reacciones de transformación se muestran en la figura 26.

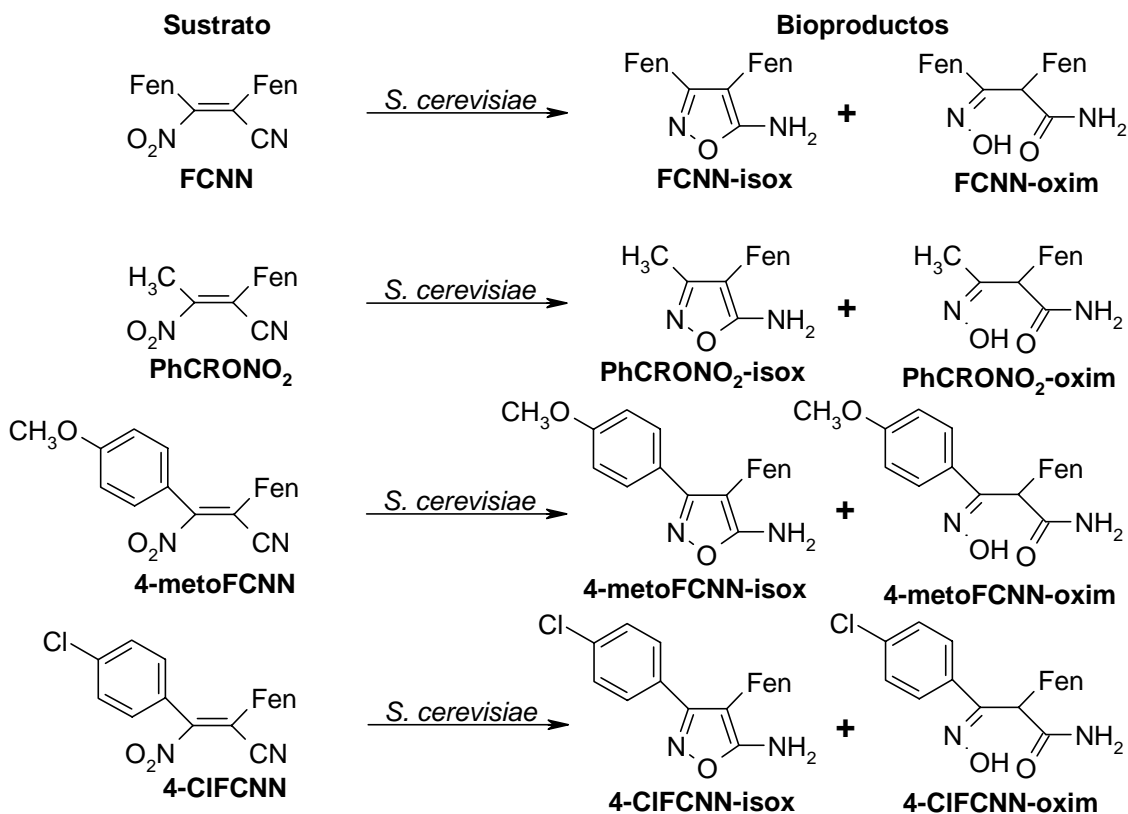


Fig. 26. Estructuras químicas de los sustratos empleados y sus bioproductos correspondientes

4.3. Influencia de *S. cerevisiae* en la reducción de los 3-nitropropenonitrilos a sus oximas correspondientes

Varios autores^{157, 171-174} proponen que cuando se utiliza una gran cantidad de biomasa por gramo de sustrato (relación 30:1) en las reacciones con *S. cerevisiae* existe la posibilidad de que la reducción sea química, pues se encuentran cantidades estequiométricas de compuestos reductores de bajo peso molecular como carbohidratos, compuestos reducidos como la cisteína y en casos más específicos la realización de las reacciones a altas temperaturas, pH por arriba de 12 y la presencia de cosolventes como el metanol en el medio de reacción¹⁵²⁻¹⁵⁶.

Ante estos antecedentes se procedió a determinar la acción de *S. cerevisiae* en la transformación de los 3-nitro-alquil o aril-propenonitrilos mediante la realización de varios ensayos.

Las transformaciones se realizaron en un agitador orbital de temperatura controlada a 30°C y 150 rpm durante 24 horas tomando alícuotas a los 0, 30 y 60 minutos y posteriormente a las 2, 4, 8, 18 y 24 horas.

Las cantidades de los reactivos que se utilizaron son: 25 mL de solución amortiguadora a pH 7, 1.5 g de levadura y 1.5 g de sacarosa y según el caso 1.5 g de albúmina, 50 mg de cisteína. La mezcla de reacción se activa por 30 minutos y se le agrega 0.25 mmol de sustrato disuelto (sustrato modelo, **FCNN**) en 1.5 mL de una solución de acetona:etanol 1:1. La aparición de productos se observó por cromatografía en capa fina (CCF). Los resultados de los ensayos realizados se presentan en la tabla 3.

Tabla. 3 Sistemas ensayados para determinar la influencia de *S. cerevisiae* en la reacción de reducción de los 3-nitropropenonitrilos.

Sistema	Sol. Amortiguadora a pH 7	Sacarosa	Levadura	Sustrato	Sustrato recup (%)	Productos
A	X	X		X	92	
B	X	X	X			
C	X	X	X ^A	X	93	
D	X	X	X ^B	X	90	
E	X	X	X ^C	X	49	1,2
F	X	X	X ^D	X		1, 2
G	X		X ^E	X	95	
H	X	X	X ^F	X		1,2
I	X	X	X	X		1, 2
J	X		X	X	53	1,2
K	X	X	3	X	89	
L	X	X	4	X	91	

1: 5-aminoisoxazol; 2: Oxima; 3: Cisteína; 4: Albúmina; ^A Levadura inactivada por altas temperaturas (80 °C); ^B Levadura inactivada por metanol; ^C Levadura inactivada por bajas temperaturas; ^D Extracto crudo de levadura; ^E Sobrenadante de la fase de activación; ^F Levadura centrifugada del medio de activación y resuspendida en solución amortiguadora.

Transformación en ausencia de *S. cerevisiae* (sistema A) y en ausencia de sustrato (sistema B)

En el caso del sistema A (solución amortiguadora a pH 7 y sacarosa), al agregar el sustrato modelo (**FCNN**) después de la fase de activación y durante 24 horas de monitoreo, no se observó la formación de algún producto de reacción. De la extracción de la mezcla total de reacción se obtuvo el 92 % de sustrato recuperado, el 8% restante probablemente se perdió durante la manipulación de la muestra al tomar las diferentes alícuotas y en la extracción misma de la reacción. De este experimento se puede mencionar que la interacción de la solución amortiguadora a pH 7 y de la sacarosa con el 3-nitropropenonitrilo no lleva a la obtención de los productos ya descritos ni a la obtención de algún otro producto.

Para descartar que tanto el 5-aminoisoxazol y la oxima fueran productos del metabolismo de la sacarosa en presencia de *S. cerevisiae* (sistema B), se procedió a monitorear esta reacción y no se observó la presencia de alguno de estos dos compuestos, por lo que los sistemas A y B demuestran que tanto el 5-aminoisoxazol y la oxima son productos de la transformación de los 3-nitropropenonitrilos por la acción de la levadura de pan activada y no por los constituyentes del medio de reacción

Transformación con *S. cerevisiae* inactivada (sistemas C, D y E)

Para comprobar que la reducción del grupo nitro y por consiguiente la obtención del 5-aminoisoxazol y la oxima se realiza por la acción de *S. cerevisiae* activa y que es de naturaleza enzimática se procedió a inactivar a la levadura de pan por tres mecanismos:

En el primer mecanismo (**sistema C**), después de la activación de la mezcla de reacción, ésta se llevó a 60°C durante una hora y posteriormente se dejó que se estabilizara a los 30°C. Se le agregó 0.25 mmol del sustrato modelo (**FCNN**) y se monitoreo la reacción durante 24 horas. Durante el monitoreo no se observó la aparición de los dos productos ya identificados. Una variante de este ensayo fue realizar la transformación a 60°C durante 24 horas y tampoco se observaron el 5-aminoisoxazol y la oxima correspondientes.

Para comprobar que la levadura estaba inactiva se tomó una muestra y se cultivó en placas de agar papa-dextrosa. Después de una semana de incubación no se observó crecimiento de la levadura de pan.

Como segundo mecanismo (**sistema D**), al terminar el periodo de activación, se le agregaron 10 mL de metanol y después de una hora, se le adicionó 0.25 mmol de sustrato modelo (**FCNN**). Durante el seguimiento de la reacción no se observó ninguno de los bioproductos. De igual manera que en el primer mecanismo de inactivación se tomó una muestra y se cultivó en placas de agar papa-dextrosa y no se observó crecimiento del microorganismo.

Un tercer mecanismo (**sistema E**) fue la inactivación de la levadura a bajas temperaturas de la siguiente manera: al término del tiempo de activación de la mezcla de reacción, ésta se centrifugó y se separaron las células y el sobrenadante. Las levaduras centrifugadas se resuspendieron en un poco agua y se les colocó en un baño de metanol y hielo seco por una hora. Posteriormente, se les agregó de nuevo el sobrenadante y se llevaron a 30°C y se les adicionó el sustrato. Después de 24 horas se observó la presencia del sustrato (49%) y ambos productos. Al cultivar las células en

placas de agar papa-dextrosa durante una semana no se observó crecimiento de las levaduras.

De estos experimentos se puede decir que para que la reacción ocurra se necesita que la levadura este activa, para que puedan producir la cantidad necesaria de cofactores para la reducción de los grupos nitro. Cabe recordar que como se mencionó en el marco teórico, la reducción del grupo nitro es un proceso de tipo redox y que las enzimas que pueden estar involucradas en este proceso necesitan la presencia de NADH o NADPH como cofactores.

Transformación con extracto crudo fresco de *S. cerevisiae* (ensayo F)

Un ensayo que permite determinar la característica enzimática de la reducción de los 3-nitropropenonitrilos es el realizar la transformación de este tipo de compuestos con un extracto crudo fresco de la levadura de pan. El extracto se preparó de la siguiente manera: una vez terminada la fase de activación, la mezcla de reacción se colocó en un baño de sonicación en 3 periodos de 5 minutos cada uno. Posteriormente, se agitó la mezcla de reacción durante 20 minutos con microesferas de vidrio para terminar de romper a las células. Al término de este proceso se separaron las microesferas de vidrio, se colocó la mezcla de reacción a 30°C y se agregó el sustrato modelo (FCNN). La reacción se monitoreo a los tiempos anteriormente establecidos y se detecto la presencia del 5-aminoisoxazol y la oxima correspondiente.

Para comprobar que las levaduras estaban rotas, pero funcional la maquinaria enzimática se cultivó parte del extracto en placas de agar papa-dextrosa. Después de una semana de incubación no se observó crecimiento. Además, al observar una muestra de las placas de cultivo al microscopio no se observaron levaduras completas.

Transformación con el sobrenadante de activación (sistema G) y con la levadura resuspendida (sistema H)

Una vez realizada la activación de la mezcla de reacción se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante al cual se le agregaron 0.25 mmol del sustrato modelo (FCNN). La reacción se monitoreo en los tiempos establecidos y después de los cuales no se encontró ninguno de los productos de la transformación.

Con este ensayo se comprueba que el medio de reacción no interviene en la transformación de los 3-nitropropenonitrilos, por lo que es importante tener a *S. cerevisiae* activa y presente para que se lleve a cabo esta reducción catalítica.

En cuanto al botón de levaduras que quedó después de la centrifugación se resuspendió en igual cantidad de solución amortiguadora a pH 7 y se le agregó la misma cantidad del sustrato modelo (**FCNN**), la reacción se monitoreo durante 24 horas y al término de este lapso se encontraron los productos, el 5-aminoisoxazol y la oxima y no se detecto sustrato.

De estos experimentos se puede concluir que se necesita la presencia de *S. cerevisiae* activa y lo que realiza la transformación es la maquinaria enzimática presente en la levadura y no es el medio de reacción o algo excretado por las levaduras de pan.

Transformación con la mezcla de reacción completa (sistema I) y en ausencia de sacarosa (sistema J)

Terminada la fase de activación (sistema I) se agregó el sustrato (**FCNN**) y se monitoreo la reacción en los tiempos establecidos anteriormente. Al término de la transformación sólo se observó la presencia del 5-aminoisoxazol y de la oxima. Cabe destacar que el sustrato ya no se observó en la reacción después de las 8 horas de reacción.

En el sistema J, realizado sólo con solución amortiguadora a pH 7 y levadura de pan, después del tiempo de activación se agregó el sustrato y se monitoreo la reacción. A las 18 horas de reacción todavía se detectó la presencia de sustrato junto con los dos productos.

La rapidez en la que el sustrato es transformado en el ensayo I y la demora en el experimento J hace suponer que la sacarosa es una fuente de carbono altamente asimilable por las levaduras, y al ser colocada en el medio de reacción, permite al organismo sintetizar la cantidad suficiente de cofactores e incluso permitir su crecimiento.

Transformación con mercaptanos (sistemas K y L)

En otros ensayos para descartar que la presencia de mercaptanos podrían realizar la transformación, se sustituyó a *S. cerevisiae* por cisteína (sistema K) y en otro por albúmina de huevo (sistema L), pues se conoce que la cisteína tiene un grupo tiol y la albúmina de huevo también los tiene en su estructura proteica que junto con fuerzas débiles les ayuda a mantener la estabilidad de la proteína y en algunos casos se encuentra en los sitios catalíticos.

En cada uno de los ensayos no se logró la reducción del sustrato después de 24 horas de reacción.

A manera de conclusión de esta sección, se menciona que la reducción de los 3-nitropropenonitrilos se da por la acción de *S. cerevisiae* activa y no es debida al medio de reacción, pues sólo se logró obtener la transformación del sustrato cuando hay la presencia de la levadura, ya sea, en células enteras o en extracto crudo; cuando se ha llevado la fase de activación o sin ella y en presencia o ausencia de la fuente de carbono (sacarosa).

Cabe destacar que cuando la levadura se activa con la sacarosa como fuente de carbono, la reacción se realiza en menos tiempo y se obtienen los productos de reacción antes mencionados.

4.4. Estabilización del pH durante la reacción de los 3-nitropropenonitrilos

Como se mencionó en los objetivos particulares de este trabajo, uno de los puntos clave es determinar cómo influye el pH en el rendimiento de los dos bioproductos de la transformación, se buscó un método eficaz para controlarlo a pH 5, 7 y 8.

El método que mejor se adecuó a la investigación fue el siguiente: En un matraz Erlen Meyer se adicionaron 1.5 g de sacarosa, 1.5 g de levadura liofilizada, 25 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH 7, se colocaron en un agitador orbital de temperatura controlada a 150 rpm, 30°C, durante 30 minutos. Después del tiempo de activación se ajustó el pH como se muestra a continuación:

pH	ácido o base	Observaciones
5	2 mL de ácido acético al 10%	<i>Para cada uno de los pH que se requieren el ácido o la base se agregan lentamente.</i>
7	2 mL de hidróxido de amonio al 10%	
8	6 mL de hidróxido de amonio al 10 %	

Pasados los 15 minutos de la estabilización en los diversos pH se adicionaron 0.25 mmol del sustrato (**FCNN**) disueltos en 3 mL de acetona y se midió el pH a los diferentes intervalos de tiempo, dando como resultado la figura 27.

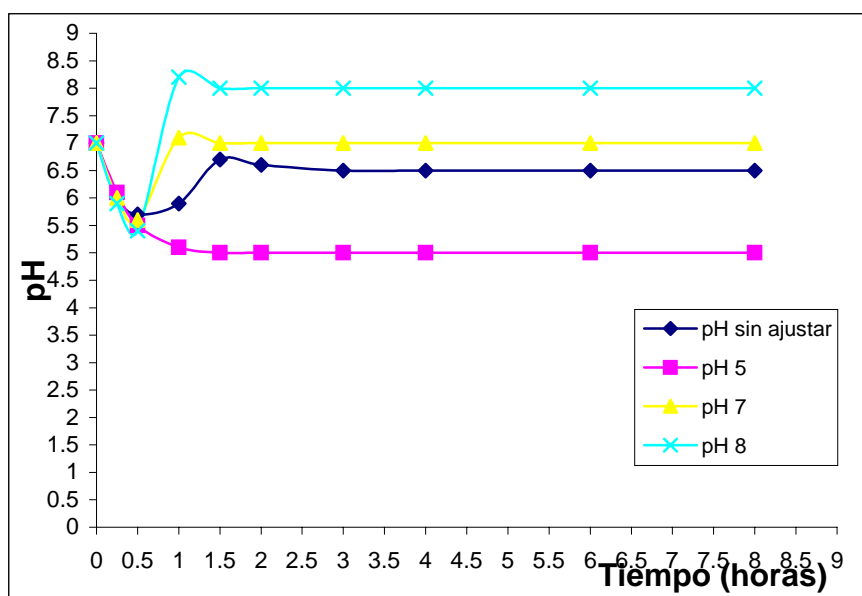


Fig 27. Estabilización del pH a 5, 7 y 8

Después del tiempo de activación de la levadura en una solución amortiguadora a pH 7, esta se ajustó al pH deseado, permitiendo que se estabilizara y, posteriormente, se adicionó el sustrato. El pH se monitoreo durante toda la reacción, observando que éste se mantenía en el pH requerido para la reacción de los 3-nitropropenonitrilos.

Al identificar el número de productos en cada uno de los pH revisados después de las 8 horas de reacción se observó que en todos los casos son el 5-aminoisoxazol y la oxima.

4.5. Implementación de un método de análisis de reactivos y productos para seguir el curso de reacción

Para determinar de manera cuantitativa la reducción de los 3-nitropropenonitrilos por *S. cerevisiae* se procedió a implementar un método de análisis para cuantificar los reactivos y los productos de la reacción. La técnica a emplear se basa en el HPTLC (High Planar Thin Layer Chromatography o cromatografía en capa fina de alta resolución), en la cual se cuantifica la absorción de cada una de las manchas en cada uno de los carriles deseados.

Al sustrato modelo, y a los productos, el 5-aminoisoxazol y la oxima, se les identificó la longitud de onda de máxima absorción obteniendo los siguientes resultados para cada uno de ellos:

- Sustrato modelo (**FCNN**) $\lambda_{\text{max abs.}}$: 300 nm.
- 5-aminoisoxazol (**FCNN-isox**) $\lambda_{\text{max abs.}}$: 265 nm.
- Oxima (**FCNN-oxim**) $\lambda_{\text{max abs.}}$: 247 nm.

Una vez obtenidos estos datos se procedió a realizar las soluciones estándares de cada uno y realizar las curvas patrón para cada uno de los compuestos. De las curvas patrón se obtuvieron sus ecuaciones a partir de una regresión lineal por mínimos cuadrados.

- Sustrato modelo (**FCNN**): $y = 499282954.007X$ con una $R^2 = 0.924$.
- 5-aminoisoxazol (**FCNN-isox**): $y = 297775507.257X$ con una $R^2 = 0.876$.
- Oxima (**FCNN-oxim**): $y = 300481650.215X$ con una $R^2 = 0.914$.

Cabe destacar que las longitudes de máxima absorción para los otros sustratos y sus bioproductos junto con sus ecuaciones se presentan en el apéndice 1. A partir del método de análisis que se ha implementado se continuó con la determinación del curso de reacción de los 3-nitropropenonitrilos a sus oximas.

4.6. Determinación del curso de la reacción

La determinación del curso de reacción se realizó con el sustrato modelo (**FCNN**) a pH 7 con la metodología de activación, estabilización de pH y los tiempos de monitoreo anteriormente establecidos. El curso de reacción se siguió mediante cromatografía en capa fina (CCF).

4.6.1. Transformación de los 3-nitropropenonitrilos a los 5-aminoisoxazoles

Durante el curso de reacción se observó que después de agregar el sustrato (**FCNN**) (15 segundos) se da la transformación, apareciendo el 5-aminoisoxazol (**FCNN-isox**) y otro compuesto al que se le denominó intermediario (**Interm.**), el cual desaparece a los 30 minutos. A los 5 minutos se nota ya la presencia del segundo producto, la oxima (**FCNN-oxim**).

El FCNN reacciona totalmente a los 120 minutos, mientras que el 5-aminoisoxazol y la oxima permanecen en el medio de reacción incluso hasta después de 24 horas.

Para averiguar si el compuesto intermediario, **interm**, es el que da origen al 5-aminoisoxazol o a la oxima, se trato de aislar y purificar, obteniéndose unos cuantos

miligramos de un polvo blanco que al estar en solución con acetato de etilo se convirtió al FCNN-isox y no se encontró algún otro compuesto.

El compuesto intermediario no pudo ser identificado dada su alta inestabilidad en el disolvente de extracción y en otros disolventes que se probaron como fue el metanol, hexano, acetona y diclorometano. Sólo cuando fue rociado con una solución de ninhidrina como agente revelador para aminas, hidroxilaminas y aminoácidos da un color rojizo, por lo que se podría intuir de que se trata de la hidroxilamina.

Esto se puede mencionar porque se ha citado en la literatura¹¹²⁻¹¹³ que la reducción del grupo nitro en sistemas biológicos va del grupo nitro al nitroso y posteriormente al grupo hidroxilamino, ambos compuestos son mucho más tóxicos e inestables que la molécula de origen, y esta acción la realizan las enzimas del tipo de las nitroreductasas, donando pares de electrones a partir de pirimidín nucleótidos reducidos⁷⁹⁻⁸⁶.

Una vez obtenido el grupo hidroxilamino, podría ocurrir un ataque al grupo nitrilo (CN) formando un segundo intermediario (**interm2**) el cual por la pérdida de un protón forma el 5-aminoisoxazol (**FCNN-isox**). Como se observa en la figura 28.

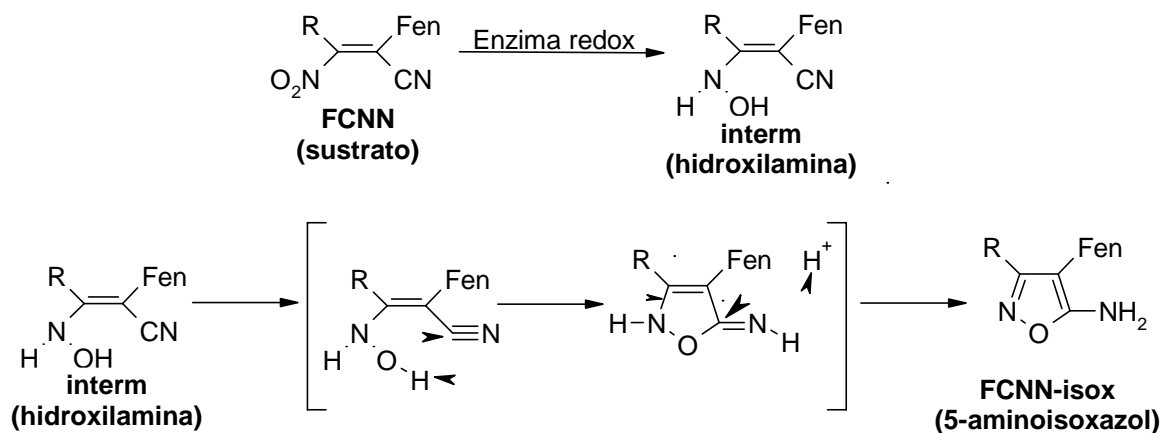


Fig. 28 Reducción del FCNN a su 5-aminoisoxazol.

El siguiente paso a seguir para determinar el curso de reacción es conocer si la oxima es proveniente del 5-aminoisoxazol o de alguno de los intermediarios, para lo

cual se realizó la transformación con el 5-aminoisoxazol (**FCNN-isox**) ahora como sustrato bajo las siguientes condiciones:

- Biotransformación en ausencia y presencia de *S. cerevisiae*.
- Biotransformación con levadura inactivada por metanol y temperatura (80 °C).
- Biotransformación con extracto crudo de levadura fresca.

Para cada uno de los puntos se utilizó la metodología explicada en la parte experimental y el curso de reacción se siguió por cromatografía en capa fina.

4.6.2. Transformación en presencia y ausencia de levadura de Pan

Cuando la reacción se realiza en presencia de *S. cerevisiae* y al tomar una muestra inmediatamente después de agregar el 5-aminoisoxazol que ahora es el sustrato de la reacción, no se observaron otros compuestos. Al pasar los primeros cinco minutos de la reacción es cuando se detectó la presencia de la oxima (**FCNN-oxim**) y hasta las 24 horas que duró la transformación se detectaron ambos compuestos.

Al realizar la reacción con la ausencia de la levadura de pan *S. cerevisiae* y el 5-aminoisoxazol, después de 24 horas sólo se detectó la presencia del sustrato. Este resultado sugiere que la levadura de pan es responsable de la biotransformación.

4.6.3. Transformación con levadura inactivada por metanol y temperatura (80 °C)

Cuando la biotransformación se realiza con la levadura inactivada, ya sea, por metanol o por altas temperaturas. Después de 24 horas de reacción no se detectó la presencia de otro compuesto a parte del 5-aminoisoxazol. Esto indica que no sólo se necesita la presencia de la levadura de pan para realizar la reacción, también se requiere que la levadura esté activa para que se dé la transformación. Estos resultados indican por lo tanto que la levadura además de estar presente, su maquinaria enzimática debe de estar activa para que se lleve a cabo la reacción.

4.6.4. Transformación con extracto crudo de levadura fresca

Cuando la transformación se realizó con el extracto crudo se observó la formación del compuesto que denominamos oxima a los 10 minutos. Cabe destacar que en este experimento tanto el 5-aminoisoxazol y la oxima de detectaron durante todo el tiempo que duro la reacción.

Los resultados anteriormente descritos demuestran que el 5-aminoisoxazol es transformado a su oxima correspondiente por la levadura de pan. Además la levadura debe de estar activa, lo que indica fuertemente que la reacción puede ser enzimática y no es producida por el medio de reacción o alguna sustancia excretada por la levadura al medio. Por lo que el curso de reacción se muestra en la figura 29.

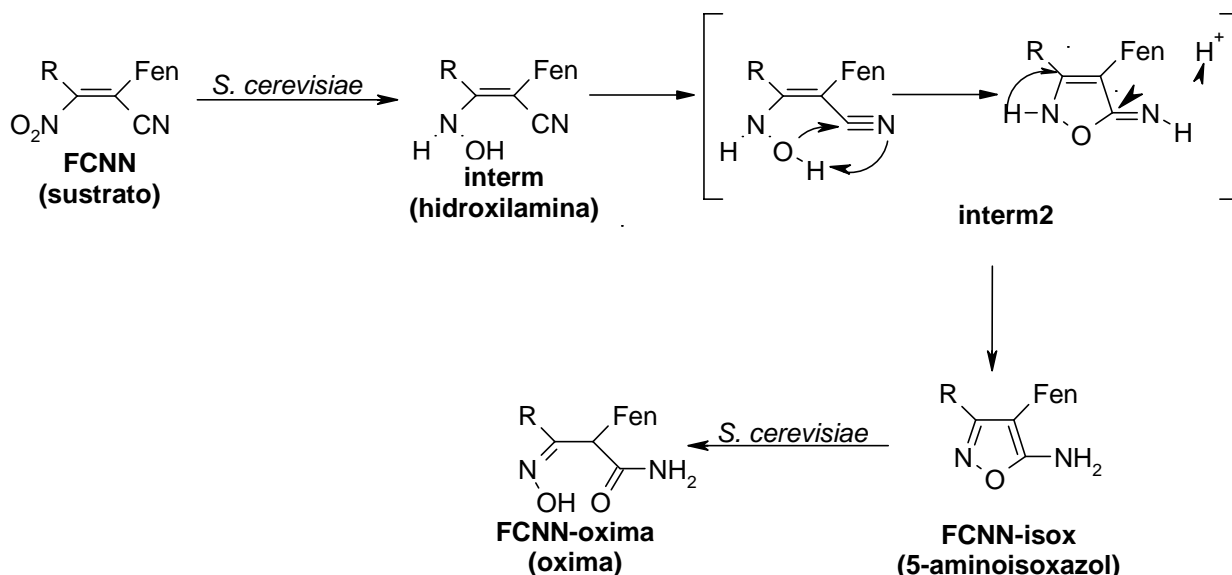


Fig. 29 Curso de la reacción de la transformación de los (Z)-3-nitro-3-alkil o aril-2-fenil-propenenitrilos a sus oximas correspondientes.

Una vez encontrado el curso de la reacción se procedió a determinar como influye el pH en el rendimiento de los bioproductos.

4.7. Influencia del pH en el rendimiento de los productos de la transformación

Una vez conocido el curso de la reacción de los (Z)-3-nitro-3-alkil o aril-2-fenil-propenonitrilos a sus oximas correspondientes se procedió a determinar la influencia del pH sobre el rendimiento de los productos de la transformación como a continuación se indica.

4.7.1. Influencia del pH 7 en el rendimiento de los bioproductos

La primera determinación que se hizo fue a pH 7, la fase de activación, de ajuste del mismo y el seguimiento del curso de la reacción se realizó como anteriormente se ha mencionado. Después del análisis de las muestras por cromatografía de capa fina de alta resolución se construyó la siguiente gráfica (figura 30):

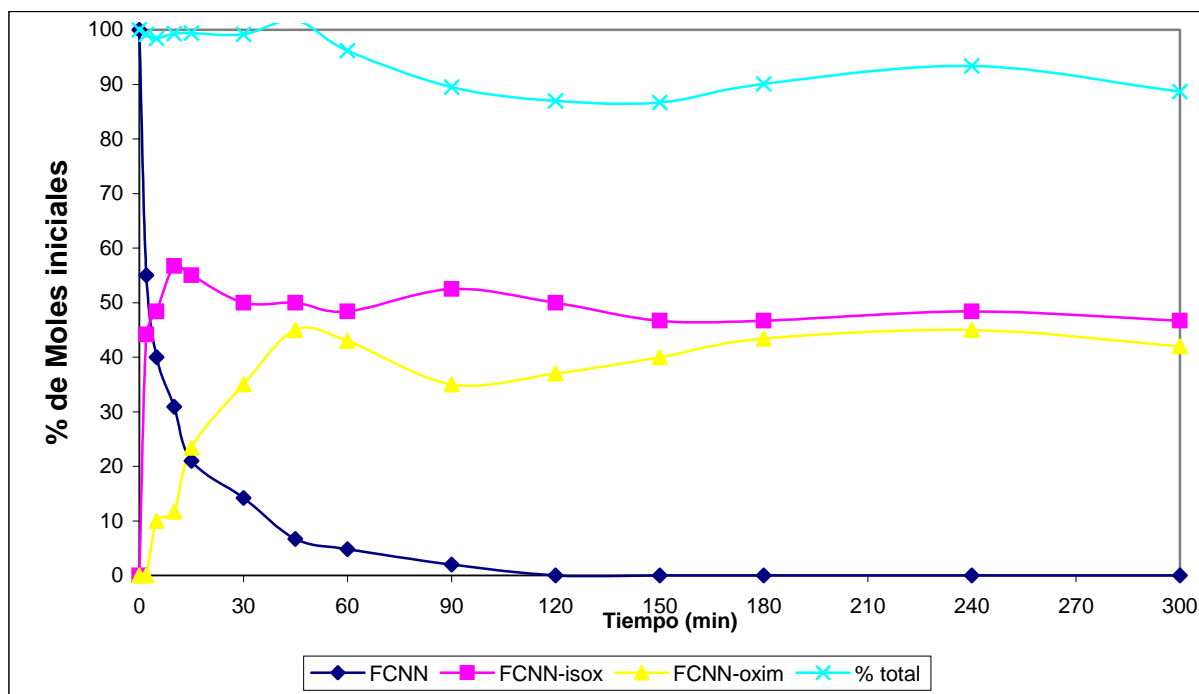


Fig. 30 Determinación cuantitativa del curso de reacción de los 3-nitropropenonitrilos a pH 7.

Cuando la transformación se realiza a pH de 7 prácticamente después de agregar el sustrato modelo (FCNN), ya se detecta la presencia del 5-aminisoxazol (FCNN-isox) en un 44 %, su mayor concentración se da a los 10 minutos y posteriormente se mantiene hasta que la reacción se detiene con un porcentaje que oscila entre un 46 y 48 %.

La oxima (FCNN-oxim) se detecta hasta pasados los primeros cinco minutos con una concentración de 10% incrementándose hasta llegar a un máximo de 45 % y conservando esta concentración durante toda la reacción.

El sustrato se detecta en concentraciones menores conforme pasa el tiempo de reacción, siendo transformado totalmente a los 120 minutos.

La proporción del 5-aminoisoxazol y de la oxima a pH 7 se mantienen prácticamente en una razón de 1:1 pues el rendimiento final de ambos compuestos es de un 46 % y 43 % respectivamente, dando una eficiencia del 89%.

Cuando se probaron los otros tres sustratos a este pH se encontró que el comportamiento de los sustratos es parecido al que mostró con el sustrato patrón y es ilustrado en la tabla 4 en donde se ubican los tiempos de reacción (transformación total del sustrato), porcentaje de 5-aminoisoxazol y de la oxima a ese tiempo y el porcentaje total de moles de la reacción.

Tabla 4 . Rendimiento del 5-aminoisoxazol y su oxima correspondiente de los 3-nitropropenonitros a pH 7.

Sustrato	T. de reacción	5-aminoisoxazol (%)	Oxima (%)	moles totales (%)
FCNN	120	46	43	89
PhCRONO2	90	36	41	77
4-metoFCNN	120	40	38	78
4-CIFCNN	180	39	41	80

Como se muestra en los datos obtenidos los tiempos de reacción varían de 90 minutos para el **PhCRONO2** a 180 minutos para el **4-CIFCNN**, la proporción de los rendimientos entre el 5-aminoisoxazol y la oxima se conserva en 1:1 y el porcentaje de moles totales es moderadamente bueno.

4.7.2. Influencia del pH 5 en el rendimiento de los bioproductos

Cuando la transformación se realizó bajo las mismas condiciones de activación, ajustando el pH a 5, tomando muestras a los tiempos ya definidos y analizándolas por la técnica antes mencionada se construyó la siguiente gráfica (figura 31):

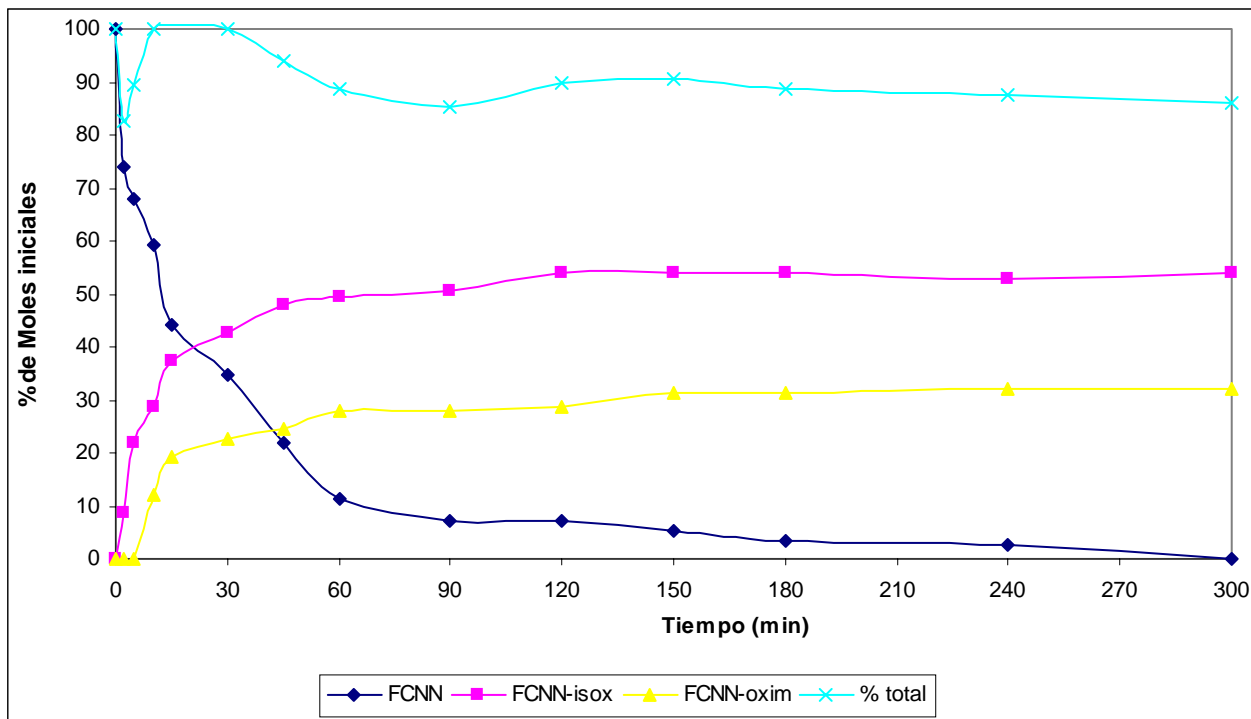


Fig. 31 Determinación cuantitativa del curso de reacción de los 3-nitropropenonitrilos a pH 5

Al minuto de agregar el sustrato se observa la formación de 5-aminoisoxazol con un 8.7 % y su porcentaje va en aumento hasta que se mantiene a los 120 minutos con un 54 %.

En cuanto a la oxima esta aparece hasta los 10 minutos con un porcentaje de alrededor del 12 % que va en aumento llegando hasta un 32 %, el cual también se mantiene constante durante todo el tiempo en el que se llevó a cabo la reacción.

El sustrato a su vez va disminuyendo poco a poco hasta ser transformado totalmente a los 300 minutos, tiempo en el cual la reacción se da por terminada.

Las proporciones del FCNN-isox y la FCNN-oxim se mantienen incluso hasta después de las 24 horas, siendo el 5-aminoisoxazol el que presenta el mayor

rendimiento con un 54%, y la oxima un poco más de la mitad de éste con un 32 %. Esto nos da una proporción de 1.7:1 respectivamente.

Dado este resultado se puede mencionar que la obtención del 5-aminoisoxazol se ve favorecida a pH ácido obteniéndose en mayor cantidad, mientras que la oxima se da en menores rendimientos.

El curso de reacción presentado con el sustrato modelo se ve respaldado por la transformación que se realizó al mismo pH con los otros tres sustratos propuestos como se observa en la tabla 5:

Tabla 5 . Rendimiento del 5-aminoisoxazol y su oxima correspondiente de los 3-nitropropenonitros a pH 5.

Sustrato	T. de reacción	5-aminoisoxazol (%)	Oxima (%)	moles totales (%)
FCNN	300	54	32	86
PhCRONO2	540	50	36	86
4-metoFCNN	540	44	33	77
4-CIFCNN	480	45	34	79

El rendimiento global de las transformaciones va de moderadamente bueno a bueno (77-86 %), en ninguno de los casos el rendimiento de 5-aminoisoxazol va por debajo del 40, y el rendimiento de la oxima no sobrepasa el 37%. Lo que indica que el 5-aminoisoxazol se ve favorecido a este pH.

Los tiempos de reacción son cortos pues se llevan a cabo en cuestión de horas teniendo registros de 6 horas como en el caso del **FCNN** a 9 horas como en el **PhCRONO2** y **4-metoFCNN**.

4.7.3. Influencia del pH 8 en el rendimiento de los bioproductos

Al realizar la transformación a pH 8 y siguiendo el curso de reacción se construyó la siguiente gráfica (figura 32) con los datos obtenidos:

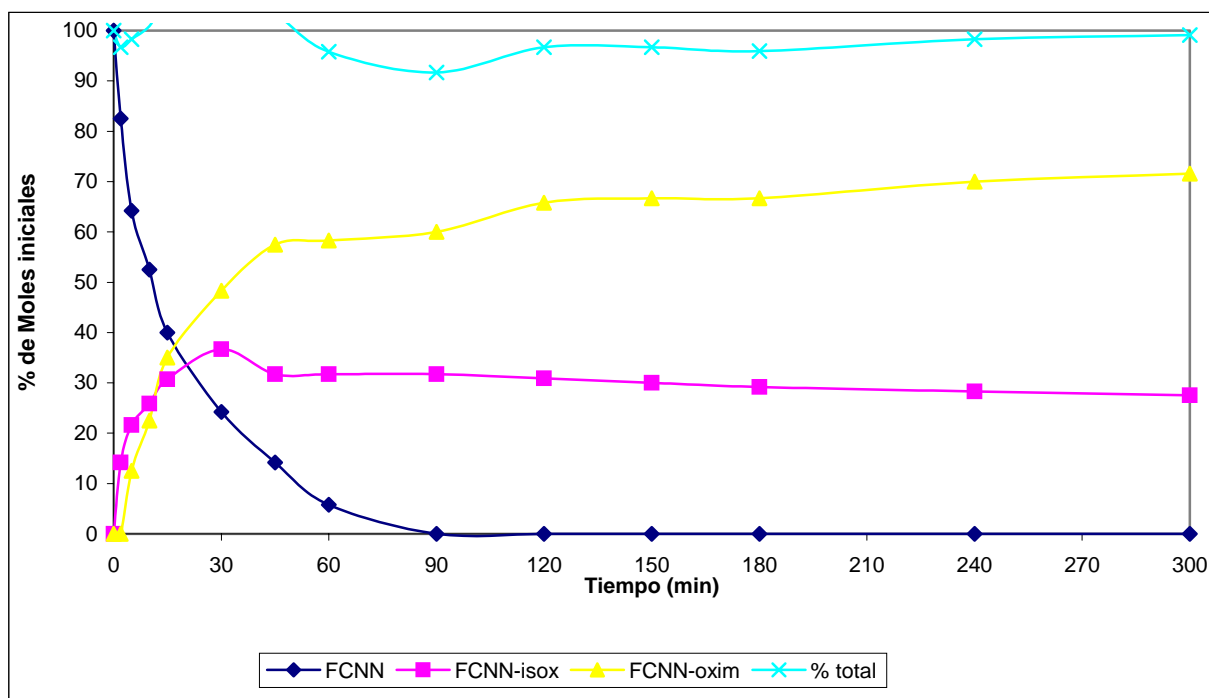


Fig. 32 Determinación cuantitativa del curso de reacción de los 3-nitropropenonitrilos a pH 8.

En el caso de la reacción a pH 8, el sustrato es totalmente transformado a los 90 minutos. El 5-aminoisoxazol aparece al primer minuto después de que el FCNN es agregado a la mezcla de reacción presentado un 14 %, el cual va incrementando hasta llegar a un 36 % a los 30 minutos y a partir de ese momento comienza a disminuir su concentración hasta un 27% a partir del cual se mantiene durante todo el tiempo de transformación.

La oxima (**FCNN-oxim**) aparece hasta los primeros cinco minutos con un rendimiento del 12.5% el cual va incrementando poco a poco hasta llegar a un porcentaje del 70 %.

Cuando la reducción se realiza a pH 8 se nota claramente que la oxima se ve favorecida por la modificación de este parámetro, pues es la que se encuentra en mayor proporción (2.4 veces mas aproximadamente) y el 5-aminoisoxazol se encuentra

en menor proporción. Los resultados de los demás sustratos analizados se presentan a continuación:

Tabla 6 . Rendimiento del 5-aminoisoxazol y su oxima correspondiente de los 3-nitropropenonitrilos a pH 8.

Sustrato	T. de reacción	5-aminoisoxazol (%)	Oxima (%)	moles totales (%)
FCNN	90	27	70	97
PhCRONO2	30	34	51	85
4-metoFCNN	60	26	63	89
4-CIFCNN	90	38	55	93

En todos los casos se observa que efectivamente la oxima es favorecida a pH 8, y la proporción que guardan el 5-aminoisoxazol y la oxima es de 1:2 aproximadamente, en cuanto a los tiempos de reacción son cortos, incluso más que los encontrados en los otros pH, siendo el más corto el de la transformación del **PhCRONO2** y el más largo el del **FCNN** y el **4-CIFCNN**. El rendimiento de la oxima se considera bueno pues va de un 51 a un 70 %, por lo que este método puede ser una buena opción para sintetizar este tipo de compuestos a partir de 3-nitropropenonitrilos o de 5-aminoisoxazoles.

4.7.4. Comparación del porcentaje de moles totales del 5-aminoisoxazol y la oxima correspondiente

Determinados los cursos de reacción a los pH 5, 7 y 8 se compararon los tiempos de transformación del sustrato junto con los tiempos de aparición y rendimientos de los productos:

El mayor rendimiento del 5-aminoisoxazol se obtiene a pH 5 con un rendimiento del 54 %, después le sigue la biotransformación a pH 7 con un 46 % y, por último, cuando la reacción se lleva a cabo a pH 8 con un rendimiento del 27 %. Todos estos resultados se presentan en la siguiente gráfica (figura 33):

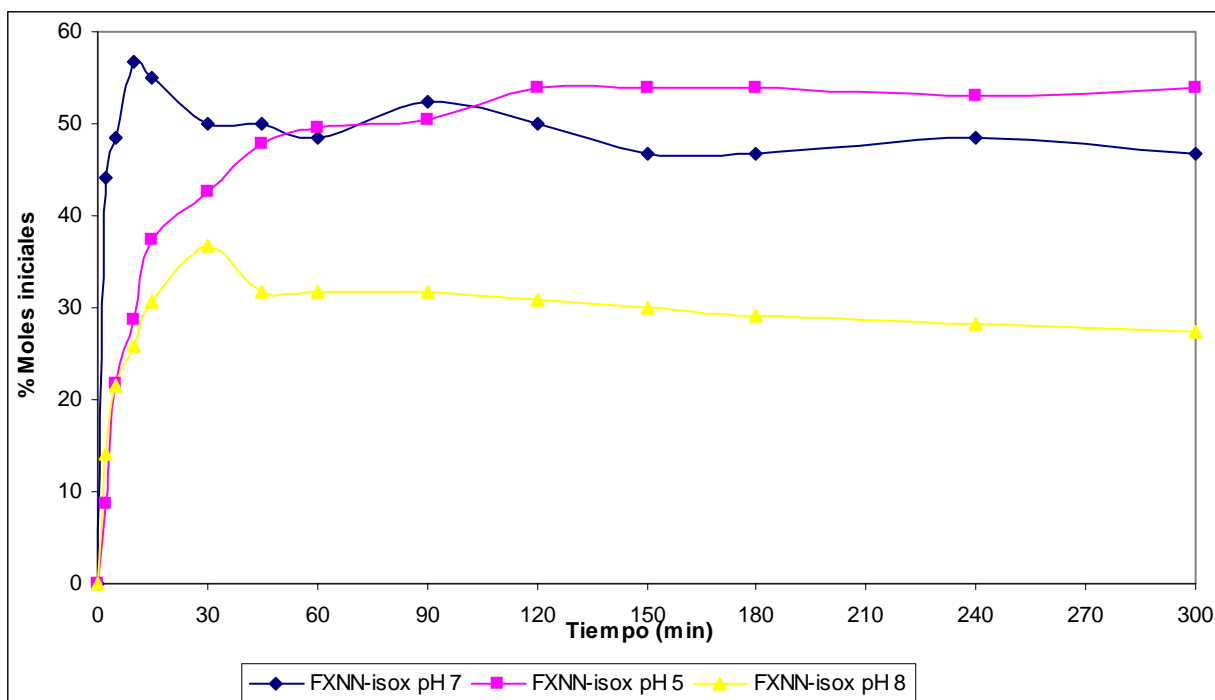


Fig. 33. Producción del 5-aminoisoxazol a los diferentes pH.

Cabe destacar que los rendimientos encontrados son buenos e incluso mejores a los que se han reportado en la literatura¹⁵³, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* por lo que se comprueba que éste es un método fácil de utilizar, de bajo costo y compatible con el medio ambiente.

Cuando se compara la obtención de la oxima de la misma manera como se hizo con el 5-aminoisoxazol, se obtiene el siguiente gráfico (figura 34):

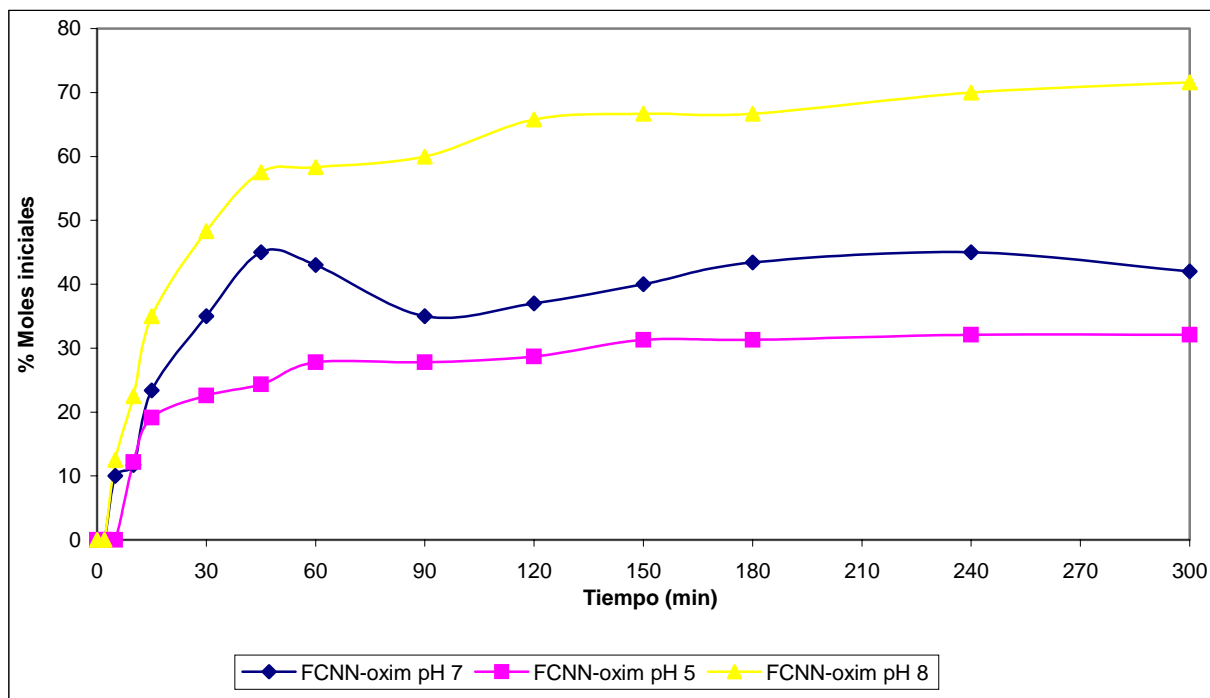


Fig. 34. Producción de la oxima a los diferentes pH.

En el caso de la oxima su mayor rendimiento es a pH 8 con un 70%, le sigue el pH 7 con una rendimiento del 45 % y, al final, la transformación a pH 5 con un 32 %. Lo que indica que la obtención de la oxima se ve favorecida a pH alcalino.

Otro parámetro que se ve afectado al realizar la reducción es el tiempo de reacción siendo el menor de ellos a pH 8 con 90 minutos, le sigue el pH 7 con 120 minutos y al final el pH 5 con 300 minutos

Como conclusión a esta sección del trabajo se puede mencionar que:

- El rendimiento del 5-aminoisoxazol y/o la oxima correspondiente se varían dependiendo del pH utilizado siendo favorecido el primero a pH ácido y el segundo a pH alcalino.

5. Conclusiones

Como conclusiones del trabajo aquí realizado podemos mencionar:

- Se determinó que la presencia de *S. cerevisiae* activa es necesaria para la reducción de los (Z)-3-nitro-alkil o aril-propenonitrilos a sus isoxazoles y sus oximas correspondientes.
- No se logró la obtención del compuesto denominado intermediario debido a su inestabilidad pero hay indicios de que se trata de una hidroxilamina.
- Se demostró que el compuesto llamado intermediario da origen a los 5-aminoisoxazoles.
- Se determinó que el curso de la reacción va de los (Z)-3-nitro-alkil o aril-propenonitrilos a sus 5-aminoisoxazoles y de éstos a sus oximas correspondientes y ambos procesos se realizan en presencia de *S. cerevisiae* activa.
- Se implementó un método de análisis de reactivos y productos para seguir del curso de la reacción.
- Se determinó que el pH afecta al rendimiento de los dos productos
- El producto 5-aminoisoxazol es favorecido a pH ácido teniendo un rendimiento de hasta el 55 %.
- El producto oxima es favorecido a pH alcalino teniendo un rendimiento de hasta un 75 %.

6. REFERENCIAS

- 1 Morrison, R.T., R.N. Boyd, (1990), *Química Orgánica*, 5ta. ed. Addison-Wesley Iberoamericana, E.U., 515, 921-926, 959.
- 2 Fukui, S. y A. Tanaka, (1985), *Endeavour, New Series*, **9**:1, 10.
- 3 Ward, P., C.S. Young, (1991), *Enzime Micro technol.*, **12**, 482.
- 4 Stewart, J.D., K.W. Reed, M.M. Kayser, (1996), *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 755.
- 5 Fuji, K., M. Node, (1991), *SYNLETT*, 603.
- 6 Ho, T.L., (1977), *J. Org. Chem.*, **42**:23, 3775.
- 7 Albert, A., "Selective Toxicity", Wiley, New York, (1964).
- 8 Strauss, M.J., (1979), *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **18**:3.
- 9 Booth, G., (1991), *Nitrocompounds, Aromatic*. en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, VCH, V. A17, 411-412.
- 10 Adams, J., J.R. Paterson, (2000), *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 3695.
- 11 Schechter, H., F. Conrad, A. Daulton, R.B. Kaplan, (1952), *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3052.
- 12 Deswarte, P.M., C.J. Viel, (1979), *J. Heterocyclic Chem.*, **16**, 1611.
- 13 Navarro-Ocaña, A., E. Barzana, D. López-González, M. Jimenez-Estrada, (1999), *OPPIBRIEFS*, **31**:1, 117-119.
- 14 Joshi, M.V., D. Mukesh, (1997), *J. Catal*, **16**:8, 273.
- 15 Beland, F.A., R.H. Helich, P.C. Howard, P.P. Fu, (1985), *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis*, ACS Symposium, 371, Washintong D.C., Am. Chem. Soc.
- 16 Fu, P.P. (1990), *Drug. Metab. Rev.*, **22**, 209.
- 17 Girgis, M.J., C.A. Kissk, J. Prashad, D. Har, R. Yoskowitz, B. Basso, T.J. Blacklock, R.N. Landau, (1997), *Org. Process. Res. Dev.*, **1**, 339.
- 18 Bauneister, P., H.N. Blaster, M. Studer, (1997), *Catal. Lett.*, **49**, 219.
- 19 Kosak, J.R., (1988), *Catal Org. Reac.*, **18**, 135.
- 20 Johnstone, R.A., A.H. Wilby, I.D. Entwistle, (1985), *Chem. Rev.*, **85**, 129.
- 21 Furst, A., R.E. Berlo, S. Hooton, (1965), *Chem. Rev.*, **65**, 51.
- 22 Ayyangor, N.R., A.G. Lugade, P.U. Nitran, V.K. Shama, (1981), *Synthesis*, 640.
- 23 Ayyangor, N.R., K.C. Brahme, U.R. Kalkote, K.V. Srinivasan, (1984), *Synthesis, Nov.* 938.
- 24 Jyothi, T.M., R. Rajagopul, K. Sreekumar, M.B. Talamar, S. Sygunan, B.S. Rao, (1999), *J. Chem. Res. (S)*, 674-675.
- 25 Kumbhar, P.S., J. Sanchez Valente, J.M.N. Millet, F. Figueras, (2000), *J. Cat.*, **191**, 467-473.
- 26 Hwu, J.R., S.C. Tsay, (1990), *Tetrahedron*, **46**, 7413.
- 27 Tsui, F.P., T.M. Vogel, G.L. Zon, (1975), *J. Org. Chem.*, **40**, 761.
- 28 Hwu, J.H., F.F. Wong, M.J. Shiao, (1992), *J. Org. Chem.*, **57**, 5254.
- 29 Kumbher, P.S., J. Sanchez Valente, J.L. Figueras, (1998), *Chem. Commun.*, 535.

- 30 Dalvie, D.K., A.S. Kalgutkur, S.C. Khojastch-Bakht, R.S. Obach, J.P. O'Donell, (2002), *Chem Res. Toxicol.*, **15:3**, 270-299.
- 31 Beam, C.F., C.D. Morgan, R.A. Schwarz, C.R. Hauser, (1970), *J. Org. Chem.*, **5:6**, 1806-1810.
- 32 Guilico, A., (1962), "The Chemistry of Heterocyclic Compounds", Vol. 17, New York, Chap 1.
- 33 Johnston, K.M., R.G. Schotter, (1968), *J. Chem. Soc.*, **C**, 1774.
- 34 Barnes, R.A., (1957), "*Heterocyclic Compounds*", Vol 5, R.C. Elderfield ed., John Wiley & Sons, New York, 454.
- 35 Teurk, U., H. Behrenger, (1965), *Chem Ber.*, **98**, 3020.
- 36 Katritzki, R., M. Wang, S. Zhang, M.V. Varonkov, (2001), *J. Org. Chem.*, **67**, 6787.
- 37 Lin, Y., S.A. Lang, (1980), *J. Org. Chem.*, **45**, 4857.
- 38 Dieter, R.K., H.J. Chang, (1989), *J. Org. Chem.*, **54**, 1088-1092.
- 39 Kochetkov, N.K., S.D. Solokov en "*Advances in Heterocyclic Chemistry*", Vol 2, A. Press, New York, 1963, 375.
- 40 Micetech, R.G., (1970), *Can. J. Chem.*, **48**, 467.
- 41 Weygand, C., E. Bauer, (1927), *Ann*, **459**, 123.
- 42 Craner, R., W.R. Mclellan, (1961), *Gazz. Chim. Ital.*, Aug, **26**, 2976.
- 43 Rodd, E.H., *Chemistry of the Carbon Compounds*, Elsevier, New York, (1951), **Vol IV**, 336.
- 44 Lukevies, E., P. Arsenyan, I. Shestakva, (2000), *Chem. Heterocyclic Comp.*, **36:10**, 1226.
- 45 Gasparrini, F., M. Giovannoli, D. Misiti, G. Natile, G. Palmieri, L. Maresca, (1993), *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4401.
- 46 Kozikowski, A.P., in "*Comprehensive heterocyclic Chemistry*", Ed. Katriski A.R., C.W. Rees, Pergamon Press, Oxford, (1984), **226**, 324.
- 47 Meyers, A.I., in "*Heterocycles in Organic Synthesis*", Wiley, New York, 1974.
- 48 Uno, H.M., Kurotawa, H. Nishimura, (1976), *Chem. Pharm. Bull*, **24**, 624.
Nishiwaki, T., K.J. Kondo, (1972), *J. Chem. Soc., Perkin 1*, 90.
Chem ABSTR, (1982), **97**, 72372.
Chem ABSTR, (1982), **96**, 181-272.
Chem ABSTR, (1947), **42**, 4202.
Chem ABSTR, (1956), **50**, 214.
- 49 Harsanyl, K., K. Takacs, K. Hovath, (1974), *Chem. Ber*, **107**, 2563.
- 50 Kampe, K. D., (1982), *Angew. Chem. INT. Ed.*, **21**, 540.
- 51 Moureu, J., C. Lazennec, (1907), *Bull, Soc. Chim. Fr.*, 1709.
- 52 Harki, E., Y. Hirai, I. Imoto, T. Ichii, (1968), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **41**, 267.
- 53 Fujita, R. Endo, A. Oayama, T. Ichii, (1972), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **45**, 1846.
- 54 Himbert, G., H. Khun, M. Barz, (1990), *Liebigs Ann. Chem.*, 403.
- 55 Buron, C., L.E. Kaim, A. Uslu, (1997), *Tetrahedron Lett*, **38**, 8027.
- 56 Navarro-Ocaña, A., M. Jimenez-Estrada, M.B. González-Paredes, E. Barzana, (1996), *SYNLETT*

- (LETTERS), 695.
- 57 Mc Gregor, D.N., U. Corbin, J.E. Swigor, E. Cheney, (1969), *Tetrahedron*, **25**, 389.
 - 58 Bianchi, G., M.J. De Amici, (1978), *J. Chem. Soc. Commun.*, 962.
 - 59 Aurichio, S., S. Morrocchi, A. Ricca, (1974), *Tetrahedron Lett.*, 2793.
 - 60 Stork, G., S. Danishefski, M. Ohashi, (1967), *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5459.
 - 61 Khurana, A.L., A.M. Unrau, (1975), *Can. J. Chem.*, **53**, 3011.
 - 62 Surov, I., H. Lund, (1986), *Acta Chem Scand.*, **B40**, 831.
 Nitta, M., T. Kobayashi, (1982), *J. Chem. Soc. Commun.*, 877.
 Nitta, M., T. Kobayashi, (1982), *Tetrahedron Lett.*, 3925.
 Natale, N.R., (1982), *Tetrahedron Lett.*, 5009.
 Kijima, M., Y. Nambu, T. Endo, (1985), *J. Org. Chem.*, **50**, 1140.
 - 63 Stiff, D.D., M.A. Zemaitis, (1990), *Drug. Metab. Dispos.*, **18**, 880.
 - 64 Easton, C.G., G.A. Heath, C.M.M. Hughes, C.K.Y. Lee, G.P. Savage, G.W. Simpson, E.R.T. Tiekink, G.J. Vuckovia, (2001), *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 1168.
 - 65 Kabalka, G.W., R.S. Varma, in "Comprehensive Organic Synthesis", Trost, B.M., I. Fleming Eds., Pergamon Press, Oxford, 1991, **Vol 8**, 363.
 - 66 Winterfeldt, in "Comprehensive Organic Synthesis", Trost, B.M., I. Fleming Eds., Pergamon Press, Oxford, 1991, **Vol 6**, 675.
 - 67 Colau, R., C. Viel, *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1979), II-363.
 - 68 Sandler, S.R., W. Caro, in "Organic Functional Group Preparation", A. Press, New York, 1972.
 - 69 Donaruma, G., W. Hedt. in "organic Reactions", Kende, A.S. Ed., John-Wiley, New York, 1960, **Vol. 11**.
 - 70 Whitesides, G.M., C.H. Wong, (1985), *Angew. Chem. Int. de Engl.*, **24**, 617-638 .
 - 71 Olivo, H.F. (1992) "Studies on stereo and regioselectivity of (4+2)cycloaddition of nitroso compounds to chiral holobenzanediols. Total synthesis of licoricide". Tesis para obtener el grado de Dr. En Filosofía, Virginia Polytechnic Institute an State University.
 - 72 IUPAC; (1990) *Pure&Appl. Chem.*, 754-762.
 - 73 Perlman, D., (1976), *Procedures useful in studying microbial transformations of organic compounds*. En J.B. Jones, C.J. Sih y D. Perlman (Eds) *Techniques of Chemistry*. Vol 10 part 1, John Wiley and sons, 47-69.
 - 74 Hanc, O.F., (1975), *J. Indian Chem Soc.* **LII:Jan**, 4-16.
 - 75 Wong, C.H., G.M. Whitesides, (1994) *Enzymes in Synthesis Organic Chemistry*. Pergamon, Oxford University.
 - 76 Jones, J.B., (1986), *Tetrahedron*, **42:13**, 3351.
 - 77 Creighton, T.E., (1983), *Proteins: Structures and moleculars properties*, 2da ed., W.H. Freeman and Co. New York.
 - 78 Faber, K., (1998), *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3ra ed. Springer, New York.

- 79 IUPAC, (1993) *Pure & Appl. Chem.*, 346-376.
- 80 Nikolova, P. y O.P. Ward (1993), *J. Ind. Microbiol.*, **12**, 76-86.
- 81 Kaplan, D.L., (1992), *Curr. Opin. Biotechnol.*, **3**, 253-260.
- 82 Kaplan, D.L. y A.M. Kaplan, (1982), *Environ. Sci. Technol.*, **16**, 566-571.
- 83 Dzyzyga, O., T. Gorantzy, A. Schmidt, K.H. Bloteuogel, (1995), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 229-235.
- 84 Won. W.D., L.H. Disalvo, J. Nag, (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 576-580.
- 85 El, T., C. Ho, W.H. Griest, R.L. Tyndall, (1992), *J. Tox. Environ. Health*, **36**, 165-175.
- 86 Ramos, J.L., H. Haidour, O. Delgado, E. Duque, M. Faudila, M. Gil, G. Piñar, (1995) en: *Biodegradation of nitroaromatic compounds* (Spain, J.C. Ed.) 53-68, Plenum Press, New York.
- 87 Lewis, T.A., M.M. Ederer, R.L. Crawford, D.L. Crawford, (1996), *J. Ind. Microbiol.*, **18**, 89-96.
- 88 Jones, A.M, C.W. Grier, G.A. Ampleman, S. Thiboutot, J. Lauigne, J. Halawari, (1995), En *Bioremedations of Recalcitrant Organics* (Hinchee R.E., R.E. Hoepfel, D.B. Anderson eds.) 251-258.
- 89 Duque, E., A. Haidour, F. Godoy, J.L. Ramos (1993), *J. Bacteriol.* **175**, 2278-2283.
- 90 Naumora, R.P., S.Y. Selivanouskaya, F.A. Mingatina (1988) *Microbiologia*, **57**, 218-222.
- 91 Lewis, T.A., M.M. Ederer, R.L. Crawford, D.L. Crawford, (1997), *J. Ind. Microbiol. Technol*, **18**, 89-96.
- 92 Parrish, F.W., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 232.
- 93 Fernando, T., J.A. Bumpus, S.D. Aust, (1990), *Appl Environ Microbiol.* **56**, 1661-1671.
- 94 Bumpus, J.A., M. Tien, D. Wright, S.A. Aust, (1985), *Science*, **228**, 1434-1436.
- 95 Spiker, J.K., D.L. Crawford, R.L. Crawford (1992), *Appl Environ Microbiol.*, **58**, 3199-3202.
- 96 Hawakari, J., A.M. Halasz, S. Beardet, L. Paquet, G. Ampleman, S. Thihoutot, (1999), *Appl. Environ Microbiol*, **65:7**, 2977-2986.
- 97 Rho, D., J. Hodgson, S. Thihoutot, G. Ampleman, J. Hawakari, (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, **73:4**, 271-281.
- 98 Aken, B.V., M. Hoffrichter, K Scheibner, A.J. Hatakka, H. Naveau, S.N. Agathos, (1999), *Biodegradation*, **10**, 83-91.
- 99 Boopathy, R., M. Wilson, C.D. Montenegro, J.F. Manning, C.F. Kulpa (1994), *Biores. Technol.*, **47**, 19-24.
- 100 Braddley, P.M., F.H. Chapelle (1994), *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2170-2175.
- 101 Terracciano, J.S., E.R. Kashket (1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 86-91.
- 102 Stahl, J.D., S.D. Aust, (1995), en: *Biodegradation of nitroaromatic compounds* (Spain, J.C. ed.), 117-133, Plenum, New York.
- 103 Estevez-Nuñez, A., J.L. Ramos, (1998), *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 3802-3808.
- 104 Krumholz, R.L., J. Li, W.W. Clarkson, G.G. Wilber, J.M. Suflita, (1997), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 161-169.

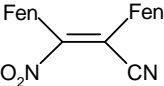
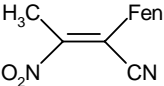
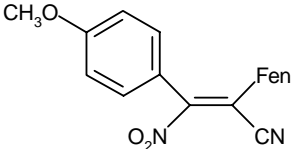
- 105 Khan, T., R. Bhadra, J. Hughes, (1997), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 198-203
- 106 Argermainer, L., F. Hein, H. Simon, (1981), in *Biology of nitrogen y sulfur* (Bothe, H., A. Trebst eds.) 226-275, Springer, Berlin.
- 107 McCormick, N.G., F.E. Fechary, H.S. Levinson, (1976), *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 949-958.
- 108 Preuss, A., J. Fimpel, G. Diekert, (1993), *Arch. Microbiol.* **159**, 345-353.
- 109 Regan, K.M., R.L. Crawford, (1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 1081-1086.
- 110 Hughes, J.B., C.Y. Wang, C. Zhang, (1999), *Environ Sci. Technol.*, **33**, 1065-1070.
- 111 Fouts, J.R., B.B. Brodie, (1957), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **119**, 197.
- 112 Hernandez, P.H., J.R. Gillette, P. Mazel, (1967), *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 1977.
- 113 Shargel, I., S. Akov, P. Mazel, (1972), *J. Agr. Food Chem.*, **20:1**, 27-29.
- 114 Razo-Flores, E., G. Lettinga, J.A. Field, (1999), *Biotechnol. Prog.*, **15**, 358-365.
- 115 Prakash, D., A. Chauhan, R.K. Jain (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**, 375-381.
- 116 Spain, J.C., D.T. Gibson, (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 812-819.
- 117 Chauhan, A., A.K. Chakraborti, R.K. Jain, (2001), *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **270:3**, 733-740.
- 118 Dreisbach, J.H., S. Nilsen, C. Shelley, J.C. Spain, (1996), Abstract K110, 96th, ASM General Meeting.
- 119 Jain, R.K., J.H. Dreisbach, J.C. Spain, (1994).
- 120 Kadiyala V., J.C. Spain, (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2479-2484.
- 121 Raymond D.G.M., M. Alexander (1971), *Pest. Biochem. Physiol.*, **1**, 123-255.
- 122 Schafer, A., H. Hamms, A.J.B. Zehnder, (1996), *Biodegradation*, **7**, 249-255.
- 123 Bryant, C., M. DeLuca, (1991), *J. Biol. Chem.*, **266**, 4119.
- 124 Peterson, F.J., R. Mason, R.P. Housepian, J.L. Holtzman, (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4009-4014.
- 125 Wenzhong, L., Y. Ping, Y. Vanxi, (1987), *Acta Microbiol Sin.*, **27**, 257-263.
- 126 Weisburger, E.K., (1978), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **18**, 395.
- 127 Brenner, D.J., (1984), In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **1**, Williams and Wilkins Co. USA.
- 128 Cartwright N.J., R.B. Cain, (1959), *Biochem J.*, **73**, 305-314.
- 129 Kinovchit, Y., Ohnisihi, (1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 596-604.
- 130 Mori, M., T. Miyahara, Y. Hasegawa, Y. Kudo, H. Kozuka, (1984), *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4070-4075.
- 131 McCalla, D.R., A. Reuiers, C. Kaiser, (1970), *J. Bacteriol.*, **104**, 1126-1134.
- 132 Egami, F., H. Itahishi, (1951), *J. Biochem.*, **38**, 329.
- 133 Little, H.N., (1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 347.
- 134 Little, H.N., (1957), *J. Biol. Chem.*, **229**, 231.
- 135 Westfall, B.B., (1943), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **79**, 257.
- 136 Mason, R.P., J.L. Holtzman, (1975), *Biochemistry*, **14:8**, 1626-1632.

- 137 Rafi, I., W. Franklin, R.H. Heflicj, C.E. Cerniglia, (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 962-968.
- 138 Rieble, S., D.K. Joshi, M.H. Gold, (1994), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205:1**, 298-304.
- 139 Miskiniere, V., J. Sallauskas, J.P. Jacqout, N. Cenas, (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, 275-283.
- 140 Zhang, Z.X., P.J. Hillas, P.R. Ortíz de Montellano, (1999), *Arch Biochem Biophys.*, **36:1**, 19-26.
- 141 Nadeau, L.J., Z. He, J.C. Spain, (2000), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 301-305.
- 142 Katscucla, E, V. Wray, P.H Prepar, R.M. Wittich, (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1405-1412.
- 143 Nishino, S.F., J.C. Spain, (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2520-2525.
- 144 Shanzle, A., H. Lenke, P. Fischer, P.A. Williams, H.J. Knackmuss, (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1421-1427.
- 145 Spiess, T., F. Desiere, P. Fischer, J.C. Spain, H.J. Knackmuss, Y.H. Lenke, (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 446-457.
- 146 Neuberg, C., E. Welde, (1914), *Biochem Z.*, **60**, 472.
- 147 Neuberg, C., E. Reinfurth, (1923), *Biochem Z.*, **139**, 561.
- 148 Davey, C.L., L.W. Powell, N.T. Turner, A. Wells, (1994), *Tetrahedron Lett.*, **35**, 7867.
- 149 Takeshita, M., S. Yoshida, R. Kiya, N. Higuchi, Y. Kobayashi, (1989), *Chem Pharm. Bull.*, **37**, 615.
- 150 Takeshita, M., S. Yoshida, (1990), *Heterocycles*, **30:2**, 871-874.
- 151 Takeshita, M., S. Yoshida, (1990), *Heterocycles*, **31:12**, 2201-2204.
- 152 Baik, W., J.L. Han, K.C. Lee, N.H. Lee, B.H. Kim, J.T. Hahn, (1994), *Tetrahedron Lett.*, **35:23**, 3965-3966.
- 153 Baik, W., T.H. Park, (1995), *J. Org. Chem.*, **60**, 5683-5685.
- 154 Baik, W., J.V. Rhee, S.H. Lee, N.H. Lee, B.H. Kim, K.S. Kim (1995), *Tetrahedron Lett.*, **36:16**, 2793-2794.
- 155 Baik, W., D.I. Kim, S. Koo, J.V. Rhee, S.E. Shin, B.H. Kim, (1997), *Tetrahedron Lett.*, **38:5**, 845-848.
- 156 Baik, W., D.I. Kim, H.J. Lee, W.J. Chung, B.H. Kim, S.W. Lee, (1997), *Tetrahedron Lett.*, **38:26**, 4579-4580.
- 157 Blackie, J.A., N.J. Turner, A.S. Well, (1997), *Tetraedron Lett.*, **38:17**, 3043-3046.
- 158 Eichberger, G., K. Faber, H. Griengl., *Monatsh. Chem.*, **116**, 1233.
- 159 Nakamura, K., Y. Inove, J. Shibahara, (1988), *Tetrahedron Lett.*, **29**, 4769.
- 160 Ohta, H., K. Ozaki, T. Tsuchihushi, (1987), *Chem. Lett.*, **29**, 191.
- 161 Ohta, H., N. Kobayashi, K. Ozaki, (1989), *J. Org. Chem.*, **54**, 1802-1804.
- 162 Kawai, Y., K. Saitou, K. Hida, D. Dao, A. Ohno, (1996), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 2633-2638.
- 163 Kawai, Y., Y. Inaha, N. Tokitch, (2001), *Tetrahedron Asim.*, **12**, 309-318.
- 164 McAnda, A.F., K.D. Roberts, A.J. Smallridge, A. Ten, M.A. Trehwella, (1998), *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 501-504.
- 165 Takeshita, M., S. Yoshida, Y. Kohna, (1994), *Heterocycles*, **37:1**, 553-562.

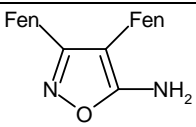
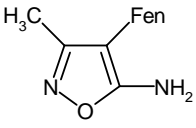
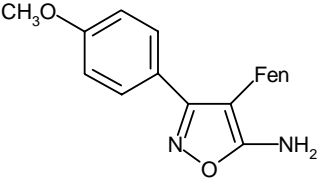
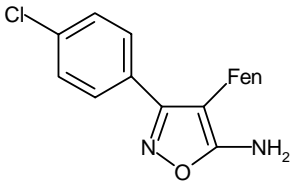
- 166** Navarro-Ocaña, A., M. Jiménez-Estrada, M.B. González-Paredes, E. Barzana, (1996), *SYNLETT*, 695.
- 167** Navarro-Ocaña, A. (1986), Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
- 168** Jones, G., "Organic Reactions", A.C. Cope de., John, New York, 1967, 15, 204.
- 169** Colau, R., C. Viel (1980), *Bull Chem Soc. Chim. Fr.*, 3-4, 163.
Belec, C., D. Bertin, R. Colau, S. Deswarte, P. Maitte, C. Viel., (1979), *J. Heterocyclic Chem.*, 16, 1161.
Deswarte, S., C. Bellec, J. Puchealt, C. Ferradini. L. Giles, (1980), *J. Heterocyclic Chem.*, 17, 981.
- 170** Croq, V., Ch. Masson, J. Winter, Ch. Richard, G. Lemaitre, J. Lenay, M. vivat, J. Buendia, D. Prat, (1997), *Org. Proc. Res. Dev.*, 1 :1, 2-13.
- 171** Fantin, G., M. Fogagnolo, M.E. Guerzoni, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli, (1994), *J. Org. Chem.*, 59, 924-925.
- 172** Spain, J.C., (1995), *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 523-555.
- 173** D'arrigo, P., G. Pedrocchi-Fantoni, S. Servi, (1997), *Adv. Appl. Microbiol.*, 44, 81-123.
- 174** Gorontzy, T., J. Kuver, K-H Blotevogel, (1993), *J. Gral. Microbiol.*, 139, 1331-1336.
- 175** Frey, C. N., G. W. Kirby, A. Schultz, (1936), *Ind. and Engin. Chem.* 28:8, 879-884.
- 176** Deindoerfer, F.H. y B. L. Wilker, (1957), *Ferm. equip. and design*, 49:8, 1223-1226.

7. Apéndice

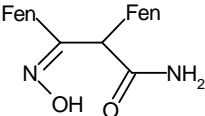
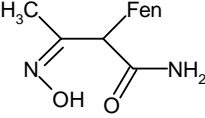
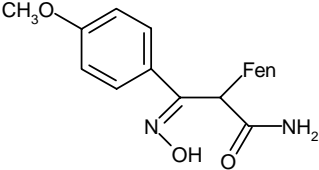
Datos espectroscópicos de los sustratos nitrados

Sustrato (Compuesto Nitrado)	IR (cm ⁻¹)	EM m/z (intensidad relativa)	RMN ¹ H (δ, ppm; Hz)
 <p>FCNN</p>	3061, 2931, 2220, 1591, 1543, 1332	250 (M ⁺ , 18), 204 (100), 203 (84), 176 (60)	7.40 (br,s, 10H)
 <p>FCNN</p>	2885, 2220, 1630 1536, 1333	280 (M ⁺ , 1), 115 (100), 140 (59), 103 (52)	7.51 (m, 5H), 2.41 (s, 3H)
 <p>PhCRONO₂</p> <p>4-metoFCNN</p>	3119, 2862, 2223, 1603, 1540, 1352	280 (M ⁺ , 50), 234 (100), 238 (95), 219 (40), 190 (62), 77 (17)	δ8.19 (d, J=8.9, 2H), 7.45 (d, J=8.9 2H), 7.28 (m, 5H)

Datos espectroscópicos de los 5-aminoisoxazoles

5-aminoisoxazol	IR (cm ⁻¹)	EM m/z (intensidad relativa)	RMN ¹ H (δ, ppm; Hz)
 <p>FCNN-isox</p>	3490, 3394, 1637, 1603, 1502, 1477, 1431	236 (M ⁺ ,100), 208 (62), 89 (47)	δ 7.49(m,10H,arom), 4.53 (s, 2H, NH ₂), 4.53 (intercambio D ₂ O)
 <p>PhCRONO₂-isox</p>	3310, 2924, 2853, 1656, 1606, 1507, 1460, 1436	174 (M ⁺ , 35), 158 (5), 146 (25), 130 (16), 115 (11), 89 (33), 77 (54)	δ 2.5 (s, 3H, Me), 4.5 (s,2H, NH ₂), 7.35 (m, 5H, arom), 4.5 (intercambio D ₂ O).
 <p>4-metoFCNN-isox</p>	3465, 3323, 3170, 2925, 2851, 1638, 1611, 1503	266 (M ⁺ , 55), 238 (15), 222 (10), 135 (100), 134 (90), 105(22), 77(21).	δ 3.76 (s, 3H, OCH ₃), 4.60 (s, 2H, NH ₂), 6.80 (d, J=8.7Hz 2H, arom), 7.35 (d, J=8.7 Hz, 2H), 7.22 (m,5H, arom), 4.60 (intercambio D ₂ O)
 <p>4-CIFCNN-isox</p>	3492, 3396, 3010, 2927, 1602, 1500	270 (M ⁺ , 100), 269 (20), 242(25), 235(22), 207(25), 139(100), 89(38), 77(25)	δ 4.55 (s, 2H, NH ₂), 7.31 (m, 9H, arom), 4.55 (intercambio D ₂ O)

Datos espectroscópicos de los 2,3-difenil-3-oximinopropanamida

5-aminoisoxazol	IR (cm ⁻¹)	EM m/z (intensidad relativa)	RMN ¹ H (δ, ppm; Hz)
 <p>FCNN-oxim</p>	3390, 3190, 1748, 1659, 1597, 1453, 1398.	236 (M ⁺ , -H ₂ O, 10), 208 (25), 192 (7), 105 (100), 89 (18), 77 (20), 63 (12)	δ 7.80 (m, 2H, arom), 7.3 (m, 8H, arom), 6.30 (amplio, 1H, CONH ₂), 5.80 (an, 1H, CONH ₂), 4.20 (s, 1H, C-H), 6.30 y 5.80 (intercambio D ₂ O)
 <p>PhCRONO₂-oxim</p>	3467.6, 3411.2, 3207.9, 1693.1, 1651.9, 1600.8, 1398.4, 1012.5, 700.1	192 (M ⁺ , 3), 175(M ⁺ , -H ₂ O, 7), 149 (100), 132 (75), 117(44), 90 (15), 57 (14).	δ 10.5 (s, 1H, =NO-H), 7.20 (m, 5H, arom), 7.30 (am, 1H, CONH ₂) 6.89 (an, 1H, CONH ₂), 4.40 (s, 1H, C-H), 1.70 (s, 3H, C-CH ₃ =, 7.30 y 6.89 (intercambio D ₂ O).
 <p>4-metoFCNN-oxim</p>	3446, 3338, 2924, 1747, 1670, 1602, 1575, 1508	284 (M ⁺ , 2), 266 (M ⁺ , -H ₂ O, 10), 135 (100), 97(5), 57 (12)	δ 7.94 (d, J= 9 Hz, 2H, arom), 6.90 (d, J= 9 Hz, 2H, arom), 7.30 (m, 5H, arom), 5.8 (s, amplio, 1H, CONH ₂), 5.6 (s, amplio, 1H, CONH ₂), 5.5 (s, 1H, C-H), 3.8 (s, 3H, O-CH ₃), 5.8 y 5.6 (intercambio D ₂ O)