



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

REDUCCIÓN MICROBIANA DE
NITROACETANILIDAS SUSTITUIDAS Y
FENILNITROPROPANOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
RICARDO LÓPEZ MEJÍA



Tutor: DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE 2007



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.

REDUCCIÓN MICROBIANA DE NITROACETANILIDAS SUSTITUIDAS Y FENILNITROPROPANOS

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. Edmundo Castillo Rosales	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Guillermo Aguilar Osorio	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 algunos análisis de los productos.

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Francisco Ruiz Terán en la caracterización de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*, aislada en nuestro laboratorio de trabajo.

El proyecto fue apoyado parcialmente por PAPPIT IN219805-2.

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

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Ins. de Inv. Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Roberto A. Espinosa de los Monteros	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dr. José de Jesús García Valdés	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Guillermo Aguilar Osorio	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dr. Edmundo Castillo Rosales	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por brindarme, nuevamente, su confianza y apoyo en la realización de este proyecto.

A la Dra. Lilita Hernández V. por la ayuda brindada en la interpretación de los datos espectroscópicos de los productos obtenidos en esta investigación.

A Pancho por su colaboración en la realización de este proyecto.

A los miembros del comité por las sugerencias, opiniones y recomendaciones orientadas a la mejora de este documento.

A Conejo y Alix por la caracterización de la *Saccharomyces cerevisiae*.

A Lety García Gutiérrez por la ayuda proporcionada en todo momento.

Al personal de la USAI por la ayuda en los análisis de los sustratos y productos empleados en esta investigación.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera que hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Facultad de Química de la UNAM...

A los amigos y compañeros del 321, que “casi siempre” hicieron más llevadera mi estancia en este laboratorio.

A Fátima y Víctor por su ayuda y apoyo... muchas gracias.

DEDICATORIAS

A mis padres por su apoyo incondicional, por su confianza, por su paciencia, por su amor... Es por ustedes que he alcanzado una meta más, mis logros son suyos. Los amo con toda mi alma y mi corazón.

A mis hermanos, por estar siempre conmigo, gracias por su confianza y apoyo.

A la gran y muy hermosa familia en la que me toco vivir.

A los amigos que conocí en la mejor universidad de México.

A los compañeros del laboratorio 321 del conjunto "E" de la Facultad de Química.

A todos ustedes muchas gracias...

ÍNDICE GENERAL

Resumen

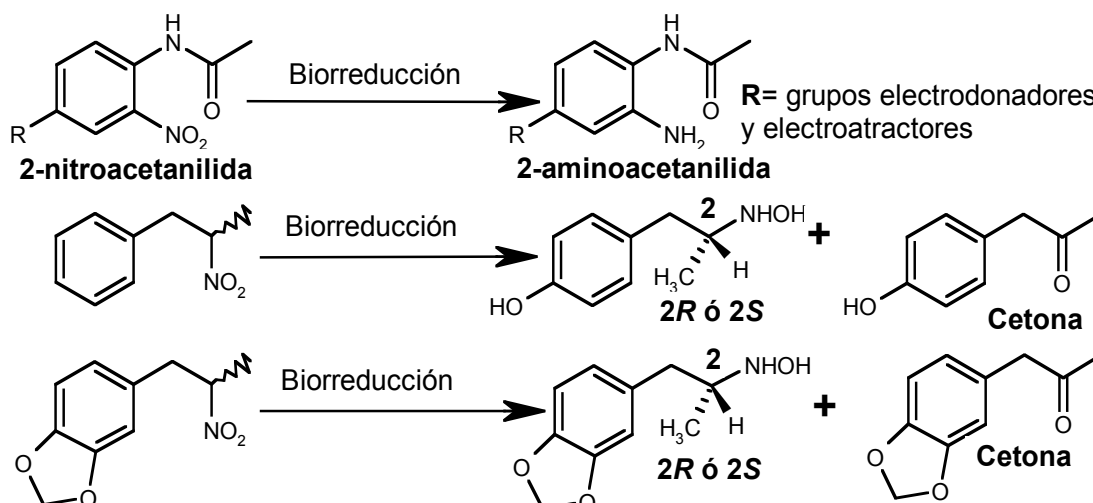
Resumen	I
Índice de figuras	II
Índice de tablas	III
Índice de abreviaturas	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de los Compuestos nitrados (CN)	2
1.1.1. Síntesis de los compuestos nitrados	2
1.2. Importancia de los compuestos aromáticos nitrados (CAN)	3
1.2.1. Síntesis de compuestos heterocíclicos a partir de los CAN	3
1.2.2. Bencimidazoles	4
1.2.3. Importancia de los bencimidazoles	5
1.3. Reducción química de compuestos aromáticos nitrados	6
1.3.1. Reducción de CAN a aminas aromáticas	6
1.3.2. Reducción regioselectiva de dinitroarenos	8
1.3.3. Limitaciones de la reducción química de los CAN	9
1.4. Los compuestos alifáticos nitrados (CALN)	9
1.4.1. Los nitro alquenos	9
1.4.2. Reducción química de nitro alquenos a nitro alcanos	10
1.4.3. Importancia de los nitro alcanos	11
1.5. Reducción química de compuestos alifáticos nitrados	11
1.5.1. Reducción de los CALN a aminas alifáticas	12
1.5.2. Importancia de las aminas alifáticas	12
1.5.3. Las anfetaminas	13
1.5.4. Importancia de la quiralidad en las moléculas	15
1.5.5. Problemas de la reducción de los CALN	16
1.6. Generalidades de las biotransformaciones	16
1.6.1. Ventajas y desventajas de las biotransformaciones con células completas	19
1.7. Biotransformaciones del grupo nitro	20
1.7.1. Hongos	20
1.7.2. bacterias o extractos crudos	21
1.7.3. Levaduras	23
1.7.4. Enzimas	24
1.8. Biorreducción de CAN en síntesis orgánica	26
1.8.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
1.8.2. Otros organismos usados en la reducción de CAN	28
1.8.3. Ventajas y desventajas de la reducción de CAN con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
1.8.4. Biorreducción de CAN para la síntesis de compuestos heterocíclicos.	29
1.9. Biotransformación de CALN en síntesis orgánica	30
1.9.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
2. HIPÓTESIS	33
3. OBJETIVOS	34
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	35
4.1. Materiales y equipos	35
4.2. Diagrama general de la investigación	36
4.3 Descripción de la metodología	37
4.4. Síntesis de los CAN	39
4.5. Síntesis de los CALN	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41

5.1. PARTE I: Obtención de las cepas microbianas	41
5.2. PARTE II: Síntesis de los sustratos nitrados	42
A) Obtención de la HNAC y MAC	42
B) Síntesis de los compuestos alifáticos nitrados	42
a) Obtención de los nitroalquenos	42
b) Obtención de los nitro alcanos	43
5.3. PARTE III: Pruebas de viabilidad en presencia de la HNAC	47
A) Levaduras	47
B) Bacterias	49
C) Hongos	51
5.3.1. Viabilidad en presencia de la MNAC	52
5.4. PARTE IV: Biorreducción de la HNAC en medio líquido	53
A) Levaduras	53
B) Bacterias	56
5.4.1 Reducción de los nitro alcanos	57
A) Biorreducción del NFPANO	58
B) Biorreducción del MDFNPANO	61
5.5. PARTE V: Biorreducción de la HNAC a escala preparativa	65
5.6. PARTE VI: Cinética de biorreducción de la HNAC	65
5.6.1. Comparación entre: <i>S. cerevisiae</i> (comercial), <i>E. coli</i> y la <i>S. cerevisiae</i> A	67
5.7. Reducción de otros CAN	68
6. CONCLUSIONES	71
7. PERSPECTIVAS	72
8. BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXO I: CURVAS PATRÓN	81
ANEXO II: VARIACIÓN DE LA BIOMASA DE LA <i>S. cerevisiae</i> A	83
ANEXO III: COMPARACIÓN ENTRE: <i>S. cerevisiae</i> A y <i>P. fluorescens</i> ZM2	84
ANEXO IV: DATOS ESPECTROSCÓPICOS	85

RESUMEN

Las aminas son materia prima muy importante para obtener productos con amplia actividad biológica. Éstas se pueden obtener por reducción química directa del grupo nitro. Sin embargo, en la reducción química de un compuesto alifático nitrado (CALN), se obtienen los enantiómeros *R* y *S*, implicando que se tengan que separar los isómeros. Esta reacción de reducción es realizada por una gran variedad de agentes, aunque es poco selectiva y genera derivados muy contaminantes. Por lo tanto, gran parte de la investigación al respecto, está enfocada a la búsqueda de reductores más selectivos y que formen un solo tipo enantiómeros. Una opción muy interesante y que cumple con los requisitos anteriores, al menos, hasta el momento, para compuestos aromáticos nitrados (CAN), es el uso de microorganismos.

Se sabe que *Saccharomyces cerevisiae* no reduce CAN sustituidos con grupos electrodonadores (**OH**, **OCH₃**, etc.), en este trabajo se evaluó la capacidad de una serie de microorganismos en la biorreducción de algunas nitroacetanilidas sustituidas, usando como sustratos modelo: la 4-hidroxi y la 4-metoxi-2-nitroacetanilida (HNAC y MNAC), con el objetivo de hallar alguna cepa capaz de reducir CAN sustituidos con grupos donadores de electrones. Se usó la misma colección de microbios en la transformación de dos 1-fenil-2-nitropropanos a manera de obtener las aminas quirales, pues hasta hoy no existe reporte de una biorreducción del grupo nitro de un CALN. Con los resultados obtenidos se demostró que de entre al menos dieciocho cepas evaluadas una *S. cerevisiae* produce el 83% de la amina a las 2 h de incubación, con una concentración de la HNAC de 0.5 mg/mL. Por otro lado, la bacteria *Escherichia coli* fue la única que transformó los CALN y produjo sólo un producto: las hidroxilaminas u oximas. Se identificaron como productos de oxidación a las cetonas derivadas.



ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1** Degradación parcial de algunos CAN realizada por diferentes cepas microbianas
- Fig. 2** Ejemplos de CALN y CAN
- Fig. 3** Utilidad de la reacción de Mitscherlich
- Fig. 4** Síntesis de algunos heterociclos a partir de CAN *orto*-sustituidos
- Fig. 5** Síntesis general de bencimidazoles
- Fig. 6** Diagrama general de síntesis de bencimidazoles en fase sólida
- Fig. 7** Síntesis de bencimidazoles en fase sólida sin grupos funcionales especiales de unión a la resina
- Fig. 8** Bencimidazoles, comerciales, con actividad biológica importante
- Fig. 9** Nitrobencimidazoles con actividad de antihipertensivo
- Fig. 10** Nitrobencimidazoles con actividad antitumoral
- Fig. 11** Síntesis de nitrobencimidazoles, mediante la nitración del bencimidazol
- Fig. 12** Síntesis de bencimidazoles nitrados, mediante el uso de la diamina nitrada
- Fig. 13** Productos e intermediarios de la reducción química de CAN
- Fig. 14** Ejemplo de síntesis de nitro alquenos
- Fig. 15** Esquema general de reducción de nitro alqueno a nitro alcano
- Fig. 16** Sililación de CALN para preparación de aminas
- Fig. 17** Síntesis de pirroles a partir de los CALN
- Fig. 18** Productos de la hidrogenación catalítica de un CALN
- Fig. 19** Preparación de aminas ópticamente activas
- Fig. 20** En la reducción química de un CALN se produce la mezcla racémica
- Fig. 21** Estructura de la anfetamina y sustancias relacionadas
- Fig. 22** Reducción química del 1-fenil-2-nitropropano
- Fig. 23** Isómeros estructurales de la talidomida
- Fig. 24** Enantiómeros de la carnitina
- Fig. 25** Enantiómeros del ibuprofeno
- Fig. 26** Características generales de una biotransformación
- Fig. 27** Biorreducción del 4-cloro-nitrobenzaldehido
- Fig. 28** Reducción del 1,3,5-trinitro-1,3,5- triazina al 1,3,5-triaamino-1,3,5-triazina, por extractos celulares de: *Clostridium acetobutylicum*
- Fig. 29** Mecanismo de biodegradación propuesto para tres mononitrofenoles, realizado por diferentes microorganismos, principalmente: cepas de *Pseudomonas*, *Ralstonia eutropha*, *Bacillus*, y *Arthrobacter*
- Fig. 30** Principales productos de transformación de DNT mediante *Lactococcus lactis*
- Fig. 31** Mecanismo de reducción de las NR insensibles al oxígeno
- Fig. 32** Mecanismo de reducción de las NR sensibles al oxígeno
- Fig. 33** Biotransformación de nitrobenzoceno por *S. cerevisiae*, reportada por Neuberger
- Fig. 34** Biorreducción parcial del *m*-dinitrobenzoceno por *S. cerevisiae*
- Fig. 35** Reducción del *o*-nitrobenzoceno nitrilo a la 2-aminoaminobenzamida
- Fig. 36** Influencia de los sustituyentes en la reducción de CAN por *S. cerevisiae*
- Fig. 37** Mecanismo propuesto para la reducción de nitrocianobencenos por *S. cerevisiae*
- Fig. 38** Sustratos modelo con grupos electrodonadores
- Fig. 39** CAN con grupos donadores de electrones empleados en esta investigación
- Fig. 40** Reducción de los 2-nitro-1-fenilpropenos con *S. cerevisiae*
- Fig. 41** Transformación de β -nitroestirenos con *S. cerevisiae*
- Fig. 42** Síntesis de nitro alcanos mediante reducción enzimática del nitro alqueno
- Fig. 43** Biotransformación de los 3-nitropropenonitrilos por *S. cerevisiae*
- Fig. 44** Biorreducción, de los CALN, esperada en esta investigación
- Fig. 45** Biorreducciones esperadas en esta investigación

- Fig. 46** Diagrama general de la investigación
- Fig. 47** Esquema de síntesis del FNPENO
- Fig. 48** Esquema de síntesis del MDFNPENO
- Fig. 49** Diagrama de reducción del FNPENO
- Fig. 50** Biorreducción del nitro alqueno mediante levaduras
- Fig. 51** Esquema de la reducción química del nitro alqueno al nitro alcano
- Fig. 52** CCF de la reducción química del FNPENO al FNPANO
- Fig. 53** Intermediario de reducción propuesto por Achintya y colaboradores
- Fig. 54** Diagrama de obtención del MDFNPANO mediante reducción química del MDFNPENO
- Fig. 55** CCF de la reducción química del MDFNPENO al MDFNPANO
- Fig. 56** Color del medio de cultivo con la HNAC, y tras la incubación con levaduras
- Fig. 57** Cambios en el color del medio de cultivo por incubación con levaduras. Concentración HNAC: 0.5 mg/mL
- Fig. 58** Comparación del cambio de color producido por las bacterias (cajas con rectángulo en negro), contra el precedente de la incubación con levaduras (cajas sin marca en negro)
- Fig. 59** Biotransformación de la MNAC por levaduras (K-1, XB5, LEM-1), *Bacillus sp.*, *megaterium*, y *P. fluorescens* PAs2. Concentración de 0.5mg/mL de la MANC
- Fig. 60** Biorreducción de la HNAC con levaduras. Concentración usada: 0.5 mg/mL
- Fig. 61** Diagrama de la biorreducción de la HNAC por levaduras
- Fig. 62** Biorreducción mediante la levadura **XL6** (*S. cerevisiae* A)
- Fig. 63** Biotransformación de la HNAC por las cepas de *Pseudomonas*
- Fig. 64** CCF de la transformación de la HNAC por bacterias
- Fig. 65** Esquema general de la biorreducción de la HNAC por bacterias
- Fig. 66** CCF de la biotransformación del FNPANO por *E. coli*. Concentración de sustrato: 0.3 mg/mL
- Fig. 67** Posible biotransformación del FNPANO por *E. coli*
- Fig. 68** Mecanismo propuesto para formación de la 1-(4-hidroxifenil)-2-propanona, partiendo de la oxima
- Fig. 69** Mecanismo propuesto para la formación de la 1-(3-hidroxifenil)-2-propanona, partiendo de la hidroxilamina
- Fig. 70** Productos de la biotransformación del MDFNOPANO seleccionados para la caracterización
- Fig. 71** Comparación productos de la biorreducción (*E. coli*), y la reducción química del MDFNPANO
- Fig. 72** Posible biotransformación del MDFNPANO por *E. coli*
- Fig. 73** Mecanismo propuesto para la formación de la 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-propanona, partiendo de la oxima
- Fig. 74** Mecanismo sugerido para la formación de la 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-propanona, a partir de la hidroxilamina
- Fig. 75** Cinética de biorreducción de la HNAC por la *S. cerevisiae* A
- Fig. 76** Reducción de la HNAC con *E. coli*, la *S. cerevisiae* A y la *S. cerevisiae* comercial
- Fig. 77** CAN sometidos a biorreducción con: *E. coli*, *P. fluorescens* Zm2 y *S. cerevisiae* A
- Fig. 78** Curva patrón de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida: HNAC
- Fig. 79** Curva patrón de la 4-hidroxi-aminoacetanilida: HAAC
- Fig. 80** Variación de la biomasa de la *S. cerevisiae* durante la cinética de reducción
- Fig. 81** Comparación de la biorreducción de la HNAC entre: *S. cerevisiae* A y *P. fluorescens* ZM2

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1** Reductores selectivos de la posición 2 de compuestos 2,4-dinitrosustituidos
- Tabla 2** Reductores selectivos de la posición 4 de compuestos 2,4-dinitrosustituidos
- Tabla 3** Hongos que reducen selectivamente el grupo nitro de CAN
- Tabla 4** Bacterias que efectúan la biorreducción de diferentes compuestos nitrados
- Tabla 5** Ventajas y desventajas de la reducción de CAN con *S. cerevisiae*
- Tabla 6** Reducción-ciclación de *o*-nitroacetanilidas por *S. cerevisiae*
- Tabla 7** Total de cepas microbianas empleadas en este trabajo
- Tabla 8** Rendimientos y puntos de fusión de la HNAC y MNAC
- Tabla 9** Resultados de la prueba de viabilidad de las levaduras. Concentración de la HNAC usada en el ensayo:0.8 mg/mL
- Tabla 10** Levaduras que desarrollaron en una concentración de 1mg/mL de la HNAC.
- Tabla 11** Resultados de la prueba de viabilidad de bacterias. 0.5mg/mL de la HNAC
- Tabla 12** Bacterias que desarrollaron en presencia de 1.0mg/mL de la HNAC
- Tabla 13** Cuantificación del crudo recuperado de la biotransformación del FNPANO
- Tabla 14** Cuantificación del crudo recuperado de la biotransformación del MDFNPANO
- Tabla 15** Resultados de la biorreducción a escala preparativa de la HNAC con *S. cerevisiae* A
- Tabla 16** Resultado de la cinética de biorreducción de la HNAC por *S. cerevisiae* A
- Tabla 17** Resumen de reducción de los CAN (figura 77), por la cepas de *E. coli*, *P. fluorescens* ZM2 y *S. cerevisiae* A
- Tabla 18** Datos de la curva patrón de la HNAC proporcionados por el programa del HPLC
- Tabla 19** Datos de la curva patrón de la HAAC suministrados por el HPLC

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

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

CALN	Compuestos alifáticos nitrados
CAN	Compuestos aromáticos nitrados
HNAC	4-hidroxi-2-nitroacetanilida
MNAC	4-metoxi-2-nitroacetanilida
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (comercial)
CN	Compuestos nitrados
TNT	2,4,6-trinitrotolueno
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
LiAlH₄	Hidruro de litio y aluminio
NaBH₄	Borohidruro de sodio
THF	Tetrahidro furano
MDA	Metilendioxiacetanilida
2A-DNT	2-amino-4,6-dinitrotolueno
4A-DNT	4-amino-2,6-dinitrotolueno
2,6DA-4-NT	2,6-diamino-4-nitrotolueno
2-HA-4,6DNT	2-hidroxilamino-4,6-dinitrotolueno
4-HA-2,6-DNT	4-hidroxilamino-2,6-dinitrotolueno
2-AT	2-aminotolueno
3-AT	3-aminotolueno
4-AT	4-aminotolueno
4-Afenol	4-aminofenol
NR	Nitrorreductasas
DANT	Diaminonitrotolueno
<i>P. chrysosporium</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum, casseliflavus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. fluorescens</i> KU-7	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KU-7
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
NR	Nitrorreductasas
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
FNPANO	1-fenil-2-nitropropano
MDFNPANO	1-(3,4-metilendioxiifenil)-2-nitropropano
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
CHCl₃	Cloroformo
CH₂Cl₂	Diclorometano
CCF o ccf	Cromatografía en capa fina
HPLC	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> : PAs2, PMs2, PMs3, PLe3 y ZM2
FNPENO	1-fenil-2-nitropropeno
MDFNPENO	1-(3,4-metilendioxiifenil)-2-nitropropeno
HAAC	4-hidroxi-2-aminoacetanilida

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos nitrados (CN), son producidos a escala masiva como precursores de síntesis de una gran diversidad de químicos como los pesticidas, herbicidas, pigmentos, plásticos, municiones y explosivos. No obstante, el uso excesivo de algunos de estos compuestos, así como su desecho en aguas residuales ha contribuido en aumentar la contaminación ambiental.

Debido a la distribución de los CN en la biosfera y a estudios de biorremediación de suelos y/o aguas contaminadas con estos productos, se demostró que existen microbios capaces de metabolizar parcial o totalmente estos compuestos. Los microorganismos que degradan parcialmente los CN (nitrofenoles, nitrotoluenos, TNT, etc.), son capaces de generar, de manera casi exclusiva, como productos finales de la transformación a las aminas derivadas y en ciertas ocasiones las hidroxilaminas (figura 1).

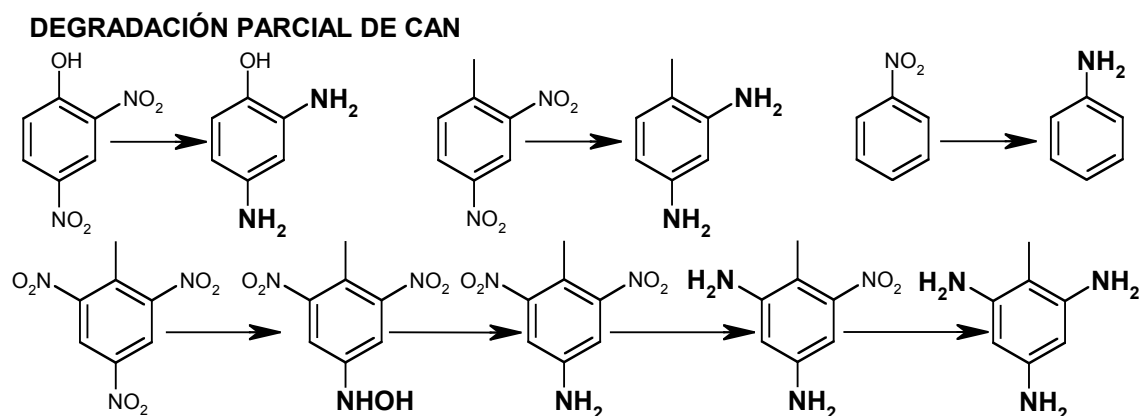


Figura 1: Degradación parcial de algunos CAN realizada por diferentes cepas microbianas

Entre los principales microorganismos que reducen selectivamente CN se hallan diversas cepas de: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Enterobacter sp*, *Azotobacter sp*, *E. coli*, algunos hongos como *Rhodosporidium sp*, y levaduras entre las que destaca *S. cerevisiae*, entre otros microbios más.

Publicaciones relacionadas con la biocatálisis, han reportado la reducción selectiva del grupo nitro de varios CAN, mediante el uso de microorganismos, principalmente *S. cerevisiae*. Esta levadura se ha empleado en la biotransformación de nitro alquenos, nitrosoarenos y N-óxidos y en estos estudios se demostró que *S. cerevisiae*, no reduce CAN sustituidos con grupos donadores de electrones (OH, SH, NH_2). Por otro lado, hasta donde se sabe, no existen reportes de la biorreducción del grupo nitro de un compuesto alifático nitrado (CALN). Esto ha despertado el interés de encontrar alguna cepa microbiana capaz de reducir CAN sustituidos con grupos donadores de electrones y compuestos alifáticos nitrados para obtener aminas o hidroxilaminas quirales.

1.1 GENERALIDADES DE LOS COMPUESTOS NITRADOS (CN)

El grupo nitro exhibe una gran diversidad de acciones químicas y biológicas. Este grupo tiene la capacidad de atraer a los electrones fuertemente y crear deficiencias electrónicas localizadas en diversos sitios de las moléculas^{1,2}.

Los CN reaccionan con sustancias biológicas tales como los aminoácidos, ácidos nucleicos, etc., y producen cambios biológicos generalmente muy dañinos. No obstante, este mismo grupo tiene un amplio uso en la industria farmacéutica, pues sus derivados actúan como antibióticos, herbicidas, antiparasitarios, tranquilizantes, insecticidas, entre otros. Algunos CN actúan como desacoplantes del transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa ($\text{ADP} + \text{fosfato} \Rightarrow \text{ATP}$), un ejemplo es el 2,4-dinitrofenol³.

En general, la química del grupo nitro es muy importante en la síntesis orgánica, pues se transforma fácilmente en otros grupos funcionales (por la formación de sales de diazonio, reacciones de acilación y alquilación⁴, hidrólisis oxidativa de los nitroalquenos para obtener aldehídos y cetonas⁵ y se usa para formar enlaces carbono-carbono). Los compuestos nitrados se pueden clasificar como: compuestos aromáticos nitrados (CAN) y compuestos alifáticos nitrados (CALN). En la figura 2, se muestran ejemplos de ambos tipos de compuestos nitrados.

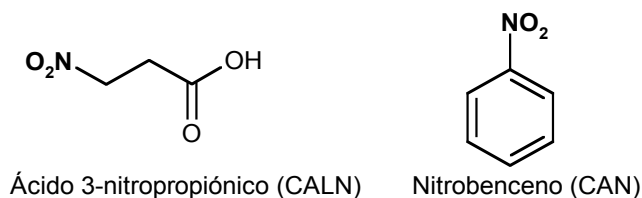


Figura 2: Ejemplos de CALN y de CAN

1.1.1. Síntesis de los compuestos nitrados

Los primeros CN fueron sintetizados por Mitscherlich en el año de 1834 al tratar hidrocarburos de alquitrán con una mezcla de ácido nítrico y sulfúrico. Esta reacción, con sólo ligeras modificaciones, es utilizada desde entonces en la preparación de una gran variedad de CN⁶ (figura 3).

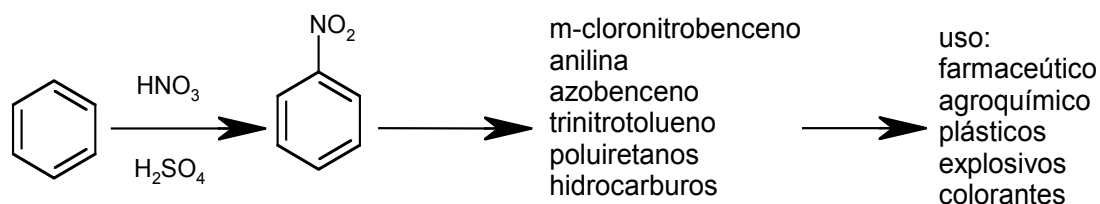


Figura 3: Utilidad de la reacción de Mitscherlich.

Obtención de diversos compuestos con átomos de nitrógeno, generalmente derivados del nitrobenzeno, de gran interés industrial

1.2. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS NITRADOS (CAN)

Los CAN, son muy usados como precursores de: explosivos, colorantes, alcaloides fármacos, agroquímicos y plásticos. A partir de los CAN, es posible obtener una amplia gama de productos derivados, entre los que destacan los compuestos heterocíclicos con átomos de nitrógeno⁷. No obstante, la principal reacción del grupo nitro es su reducción para formar aminas.

1.2.1 Síntesis de compuestos heterocíclicos a partir de los CAN

Una gran variedad de compuestos aromáticos nitrados que tienen los sustituyentes adecuados en la posición *orto*- son utilizados en la preparación de compuestos heterocíclicos con átomos de nitrógeno^{7,8,9} (figura 4).

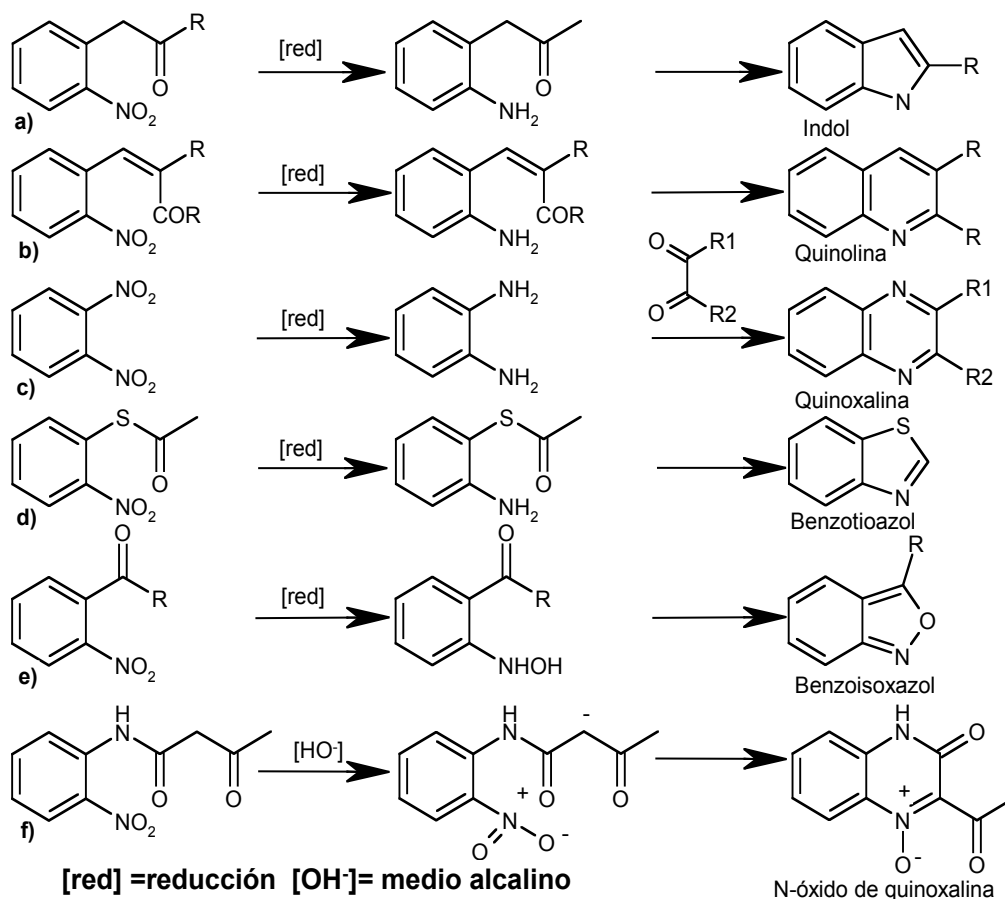


Figura 4: Síntesis de algunos heterociclos a partir de CAN *orto*-sustituidos

Estos heterociclos se han aprovechado como aditivos, abrillantadores, antioxidantes e intermediarios en síntesis orgánica, aunque su importancia en esta última área es menor⁹. La ruta de síntesis de estos compuestos normalmente involucra la reducción de un grupo nitro para tener la amina, la cual se utiliza para efectuar el cierre del anillo (figuras 3a-e). No obstante, algunas veces se usa una base fuerte y el mismo grupo nitro funciona como un electrófilo y provoca el cierre del anillo (figura 3f).

1.2.2. Bencimidazoles

Los bencimidazoles, compuestos heterocíclicos, se preparan a partir de CAN, son moléculas con gran potencial farmacológico y muy variada actividad biológica.

La síntesis clásica de los bencimidazoles normalmente involucra la formación de una *orto*-nitro-anilina y la posterior reducción para tener la diamina, la cual se condensa con un ácido aldehído u otro compuesto electrofílico. Finalmente, se realiza el cierre del anillo mediante ataque electrofílico intramolecular favorecido por un medio de reacción ácido y calentamiento. Esquema general de la síntesis de los bencimidazoles⁴ (figura 5).

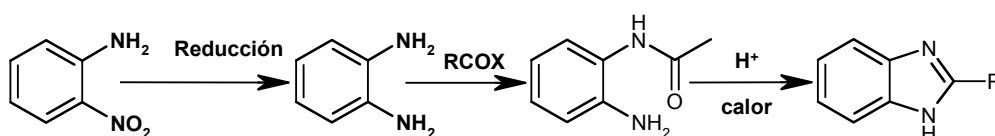


Figura 5: Síntesis general de los bencimidazoles

La relativa fácil síntesis de los bencimidazoles permitió preparar gran cantidad de estos compuestos, con el fin de investigar sus propiedades biológicas. La técnica usada para preparar estas moléculas se conoce como química combinatoria y comúnmente usan reacciones en fase sólida, ya que hay mayor control de la reacción¹⁰. En este tipo de técnicas, la reducción química de uno o dos grupos nitro para tener la “amina y/o la diamina” es un paso fundamental. Pues es la amina o la diamina, el grupo electrofílico que se condensa con los carbonilos, generalmente ácido y calor, para efectuar el cierre intramolecular y obtener el bencimidazol (figura 6). El primer método eficaz para sintetizar bencimidazoles en fase sólida apareció años atrás¹¹. Actualmente, existen más publicaciones sobre síntesis de bencimidazoles empleando esta técnica^{12, 13}.

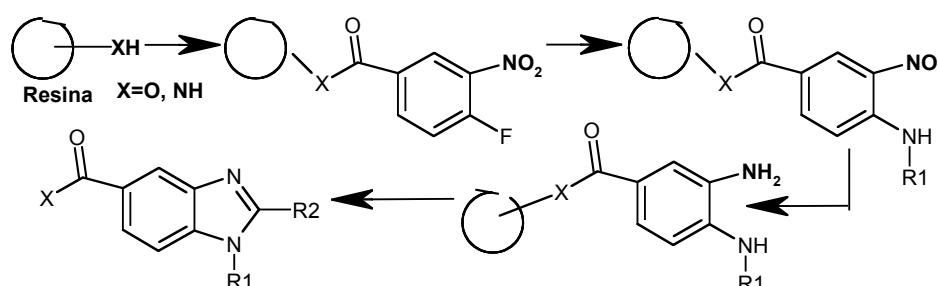


Figura 6: Diagrama general de síntesis de bencimidazoles en fase sólida

La principal variación a la técnica original es el uso de diferentes tipos de resinas, para evitar limitaciones en la variedad de moléculas sintetizadas¹⁴. Sin embargo, la reducción del grupo nitro es fundamental para la síntesis de estos compuestos (figura 7).

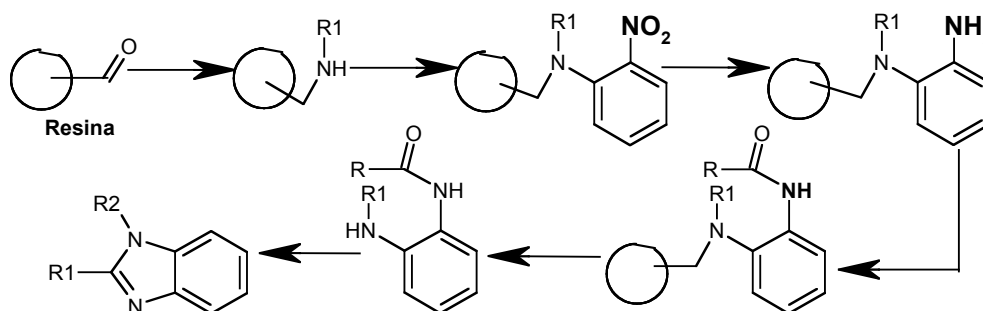


Figura 7: Síntesis de bencimidazoles en fase sólida sin grupos funcionales especiales de unión a la resina

1.2.3. Importancia de los bencimidazoles

Los bencimidazoles tienen actividad biológica muy variada son: antiparasitarios^{15, 16}, antivirales¹⁷, antihistamínicos¹⁸, contra la hipertensión¹⁹ y el asma²⁰. A continuación, se muestran dos estructuras químicas de bencimidazoles comerciales (figura 8).

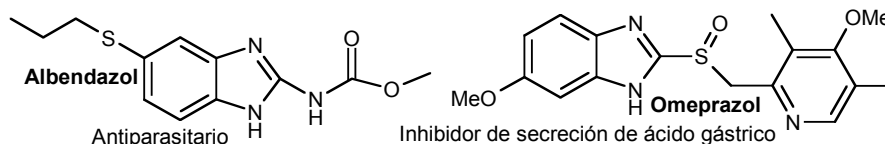


Figura 8: Bencimidazoles, comerciales, con actividad biológica importante

Por otro lado, estudios demostraron que nuevos nitrobencimidazoles podrían actuar contra la hipertensión en humanos (figura 9).

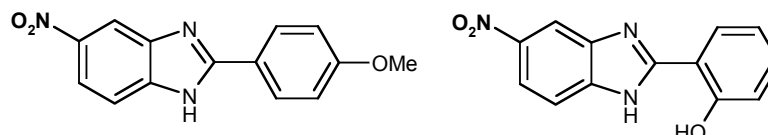


Figura 9: Nitrobencimidazoles con actividad de antihipertensivo²⁰

Se reportó también que algunos derivados del 2-metil-5(6)-nitrobencimidazol tienen actividad antitumoral contra el cáncer de mama²² (figura 10).

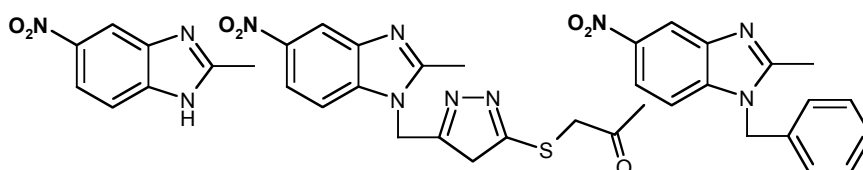


Figura 10: Nitrobencimidazoles con actividad antitumoral²¹

En otro estudio se publicó la transformación de nitrobencimidazoles a benzotriazoles como un intento por demostrar que esta reacción puede suceder, bencimidazol a benzotriazol, en las purinas del ADN después de que éste ha sido nitrado o aminado por agentes mutagénicos o carcinogénicos²³.

La síntesis de los nitrobencimidazoles se realiza principalmente de dos maneras. Una es sintetizar del núcleo bencimidazólico (con la gran cantidad de variantes que existen

para la síntesis de estos; ya sea en fase sólida¹⁰⁻¹⁴, síntesis combinatoria²⁴, mediante ayuda de microondas²⁵, síntesis tradicional⁴, mediante el uso de aire como oxidante²⁶, o por síntesis paralela²⁷), y la posterior nitración del anillo aromático, con una mezcla de ácido nítrico en sulfúrico^{22, 23} (figura 11).

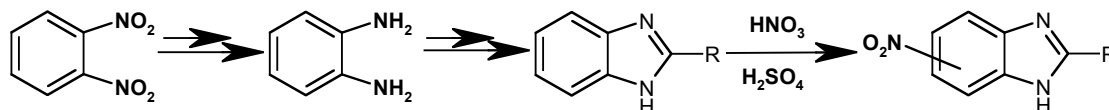


Figura 11: Síntesis de nitrobenzimidazoles, mediante la nitración del benzimidazol

Otra metodología de síntesis de los nitrobenzimidazoles es condensar la 4-nitrofenilendiamina con el carbonilo y usar microondas para acelerar la reacción²¹. Sin embargo, aún en las nuevas técnicas de síntesis de los benzimidazoles, las aminas y/o las diaminas continúan siendo intermediarios clave en la síntesis de estos compuestos (11 y 12), así como en la elaboración de otros heterociclos.

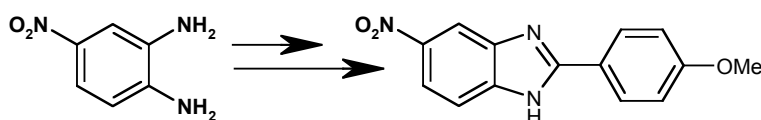


Figura 12: Síntesis de benzimidazoles nitrados mediante el uso de la diamina nitrada

1.3. REDUCCIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS AROMÁTICOS NITRADOS

La transformación más frecuente y quizás la más importante de los CAN, es la reducción del grupo nitro para formar aminas. Esta reacción es una de las reducciones más longevas reportadas sobre compuestos orgánicos. La primera se remonta al año de 1854, cuando se utilizó hierro y ácido clorhídrico para producir anilina a partir del nitrobenzeno²⁸. Desde entonces, más de una centena de reactivos y técnicas han sido descritas para llevar a cabo esta reacción⁴.

En la actualidad existen gran variedad de agentes reductores capaces de realizar la reacción, pero a pesar de la gran cantidad de reductores que existen para efectuar la reducción, esta reducción continua siendo objeto de diversos estudios, la mayoría de ellos enfocados a encontrar reductores mas selectivos y que efectúen la reacción en condiciones menos drásticas y con procesos menos contaminantes. Sin embargo, estas técnicas de reducción presentan desventajas que hasta la fecha no han sido totalmente superadas.

1.3.1. Reducción de CAN a aminas aromáticas

Las primeras reducciones de moléculas mono, dinitradas y trinitradas aromáticas se efectuaron con hierro en ácido clorhídrico. Hoy en día se conocen más de una centena

de reactivos y técnicas para realizar esta reducción. El producto final de la reducción de CAN es la amina, aunque siempre hay formación de subproductos, tales como: nitroso, hidroxilamina, azoxi e hidrazo, que bajo ciertas condiciones de reacción pueden ser aislados u obtenidos como productos principales de la reacción²⁹ (figura 13).

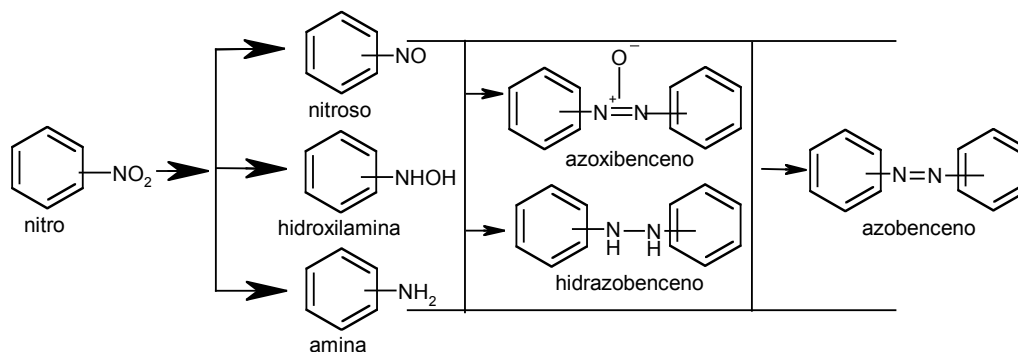


Figura 13: Productos e intermediarios de la reducción química de CAN

El método clásico de reducción es el uso de un metal (Fe, Sn, Zn) en medio ácido. El hierro se emplea por su bajo costo, además que no ataca otros grupos funcionales²⁹. No obstante, con el descubrimiento de la hidrogenación catalítica este método ha sido muy utilizado para reducir al grupo nitro. Las principales técnicas de hidrogenación catalítica emplean catalizadores como el Platino³⁰, el Rodio y el Níquel-raney^{29, 31}. No obstante, estas técnicas exhiben desventajas como: la generación de desechos tóxicos, emplean condiciones extremas de reacción, el equipo y las condiciones de seguridad a seguir, otra muy importante es que muchos grupos funcionales son atacados por el hidrógeno³².

En la reducción de CAN halógenados es frecuente que ocurra la sustitución de los halógenos por el hidrogeno, ésta reacción negativa depende de factores como: la posición del halógeno en el anillo aromático, la cual aumenta en el siguiente orden y con los siguientes halógenos: meta < para < orto y F < Cl < Br < I³³. No obstante, se continúan mejorando las técnicas para reducir CAN halógenados³⁴. Los principales catalizadores de este tipo de reacción de encuentran:

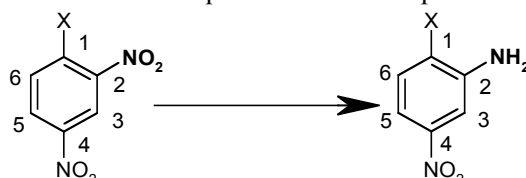
1. Derivados de Iridio: principalmente Ir/C, Ir-Fe-Cu/C e Ir-Fe/C.
2. Catalizadores de Platino: especialmente Pt-Cu/C, Pt/C + sal de formamidina, Pt-V/C, Pt-V-H₃PO₂/C
3. Derivados del Níquel-Raney (Ni-R): Ni-R/NH₄I, Ni-R/formamidina sal, Ni-R/V

Existen metodologías que tienen ventajas de selectividad a la hora de reducir ciertas moléculas nitradas con respecto a otra. Éstas utilizan hidruros metálicos, monóxido de carbono en agua catalizada por sustancias como el Ru(Co)₁₂, sulfuros, y polisulfuros y se probado, también, la reducción electroquímica³⁵.

1.3.2. Reducción regioselectiva de dinitroarenos

La mayoría de los procedimientos mencionados reducen compuestos polinitrados a polianilinas, sin embargo son pocos los reactivos que reducen selectivamente un grupo nitro en una molécula en la cual existen dos o más de éstos. Para la reducción regioselectiva del grupo nitro de la posición **2** de los compuestos **2,4**-dinitrosustituidos, existen relativamente pocos agentes capaces de llevar a cabo dicha reacción (tabla 1).

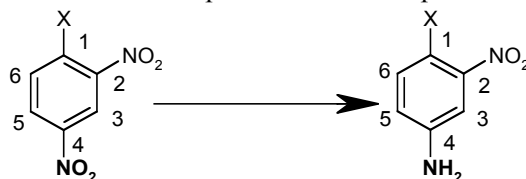
Tabla 1: Reductores selectivos de la posición **2** de compuestos 2,4-dinitrosustituidos



X	Agente reductor	Rendimiento (%)	Referencia
H	HCO ₂ H.Et ₃ N/Pd	77	36
H	Fe/AcOH	50	37
CH ₃	Fe/AcOH	71	37
CH ₃	H ₂ /RuCl ₂ (Pfen ₃) ₃	37	38
OH	HCO ₂ H.Et ₃ N/Pd	57	36
OH	Na ₂ S, NH ₄ OH	67	29
OCH ₃	HCO ₂ H.Et ₃ N/Pd	24	36
NH ₂	H ₂ /5%Rh(Al ₂ O ₃), NH ₄ OH	87	29
NH ₂	HCO ₂ H.Et ₃ N/Pd	49	36
NH ₂	N ₂ H ₄ ·H ₂ O/Ni-Raney	95	39
NH ₂	NaHS	80	40
NHCOCH ₃	HCO ₂ H.Et ₃ N/Pd	56	36
NMe ₂	SnCl ₂	72	29
CHO	TiCl ₃	50	29

No obstante, para llevar a cabo la reducción regioselectiva de la posición **4** de los compuestos 2,4-dinitro-sustituidos existe un número aún menor de reactivos (tabla 2).

Tabla 2: Reductores selectivos de la posición **4** de compuestos 2,4-dinitrosustituidos



X	Agente reductor	Rendimiento (%)	Referencia
CH ₃	HCO ₂ H-Et ₃ N/Pd	92	36
NH ₂	H ₂ /5%Pt(C)-HCl	70	29
CH ₃	Ni-Raney-PrOH, AcOH	93	41
CH ₃	Ni/Ac. Maleico, AcOH	80	42

De manera particular para CAN sustituidos con heteroátomos, la reducción se lleva a cabo con el siguiente complejo catalizador: HCOOH·Et₃N/Pd, los rendimientos son superiores al 70% en la reducción³⁶.

No obstante, y a pesar de la gran variedad de metodologías para la reducción de CAN no existe el agente reductor perfecto. Hasta el día de hoy, se han mejorado y se continúa con las mejoras a las técnicas, pero no pueden generalizarse y por ello existen una gran variedad de agentes reductores dependiendo del compuesto nitrado a reducir.

1.3.3. Limitaciones de la reducción química de los CAN

A pesar de la gran cantidad de metodologías desarrolladas para la reducción de grupo nitro, ésta área de la química sintética continúa en desarrollo debido a que aún no se ha encontrado el agente reductor ideal. La gran mayoría de estas técnicas presentan en mayor o menor grado las siguientes deficiencias:

1. Carecen de quimioselectividad. Es decir, reducen también: dobles y triples ligaduras, carbonilos, cetos y azidas, hidrolizan grupos ciano y amida, destruyen grupos protectores de aminas, carboxilos, e hidroxilos; eliminan halógenos y en algunos casos eliminan grupos metoxilo.
2. Generan como subproductos a los intermediarios de reducción: azo, azoxi, e hidrazo, en diferentes proporciones. Estos compuestos dificultan la purificación de las aminas y disminuyen los rendimientos de las reacciones.
3. Tienen baja regioselectividad, así que no discriminan entre dos grupos nitro presentes en una misma molécula.
4. Todas estas metodologías generan una cantidad importante de desechos tóxicos.
5. Uso de condiciones de reacción extremas y equipo especializado.

1.4. LOS COMPUESTOS ALIFÁTICOS NITRADOS (CALN)

El uso de los CALN en la síntesis orgánica es muy importante, especialmente los nitro alquenos y nitro alcanos, pues son versátiles bloques de construcción y materia prima versátil para la síntesis de algunos funguicidas y alcaloides, esteroides, sustancias con actividad farmacéutica, aminoácidos y derivados de aminoácidos, intermediarios de síntesis, inhibidores enzimáticos, y particularmente los nitro alquenos son materia prima para obtener los nitro alcanos, entre otras muchas aplicaciones más⁴³.

1.4.1. Los nitro alquenos

Las nitro alquenos son obtenidos frecuentemente vía eliminación de agua a partir del nitro alcohol formado por la condensación de aldehídos y cetonas con un nitro alcano usando la reacción de Henry⁴⁴. Existen otras técnicas para producirlos ejemplo: reacción de adición-eliminación utilizando β -nitro-vinil sulfoxidos⁴⁵, mediante nitración de

estirenos sustituidos con ioduro de nitrilo⁴⁶, vía condensación de aldehídos o cetonas con otros nitro alcanos^{43, 47}. La figura 14, muestra un ejemplo de la obtención de los nitro alquenos.

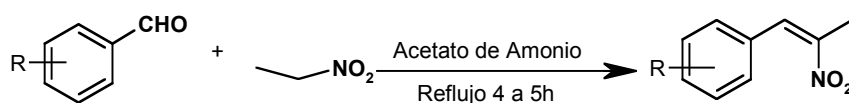


Figura 14: Ejemplo de síntesis de nitro alquenos

Los nitro alquenos son materia prima para síntesis de: cetiminas, hidroxilaminas, oximas, aldehídos y cetonas⁵⁸, y de nitro alcanos, los cuales se obtienen por la reducción del doble enlace, entre otras más aplicaciones⁴⁷.

1.4.2. Reducción química de nitro alquenos a nitro alcanos

Los nitro alcanos se pueden obtener a partir de los nitro alquenos, para ello se han desarrollado técnicas de reducción del doble enlace carbono-carbono. Los reductores más usados son: LiAlH_4 y NaBH_4 ; pero éstos deshalogenan y reducen carbonilos⁴⁴. Se han reportado varias técnicas para la reducción de nitro olefinas α,β -insaturadas, una de estas metodologías emula la actividad del NADPH, la reacción se realiza en solventes orgánicos y proporciona buenos resultados en presencia de silica gel en benceno⁴⁸. Esquema general de reducción de nitro alquenos a nitro alcanos (figura 15).

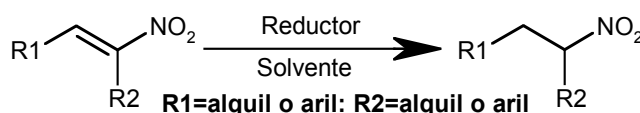


Figura 15: Esquema general de reducción de un nitro alqueno a nitro alcano

Se publicó la reducción de nitro alcanos mediante la formación *in situ* de la 2-fenilbencimidazolina a partir de la *o*-fenilendiamina y benzaldehído, no reportaron reacciones secundarias y se afirmó que produce altos rendimientos en tiempos de reacción cortos⁵⁰. En otro estudio hizo la reducción de fenilnitroetenos con borohidruro de sodio (NaBH_4), dioxano o tetrahidrofurano (THF), en solución etanólica. La reacción se lleva a cabo en condiciones suaves y reportan tiempos de reducción cortos y altos rendimientos⁵¹. Por otro lado, se hizo la misma reducción usando además del NaBH_4 , la silica-gel y cloroformo como auxiliares de reacción, debido a que los autores consideran que la reducción se optimiza en un solvente no polar aprótico, como el cloroformo, en presencia de una fase prótica insoluble como es la silica gel, la cual reduce la formación de los dímeros⁵².

1.4.3. Importancia de los nitro alcanos

Se conoce la versatilidad del grupo nitro para ser transformado en otros grupos funcionales como carbonilos, alcanos, alquenos y aminas¹, por ello los nitro alcanos son versátiles bloques de construcción y son considerados intermediarios de alto valor en la síntesis de compuestos como son los esteroides, alcaloides, inhibidores enzimáticos, aminoácidos, derivados de aminoácidos, y otros productos de interés⁴³.

La importancia de los compuestos alifáticos nitrados (CALN), en síntesis orgánica se incrementó con el desarrollo de la sililación y la subsiguiente formación de sililnitronatos para la reacción de cicloadición 1-3-dipolar, o mediante el empleo de los sililnitronatos como sustratos modificados para las reacciones de Henry (condensación nitro-aldol), Nef, Mannich y Michael⁵³. Finalmente, los sililnitronatos se transforman en aminas y/o derivados de éstas (figura 16).

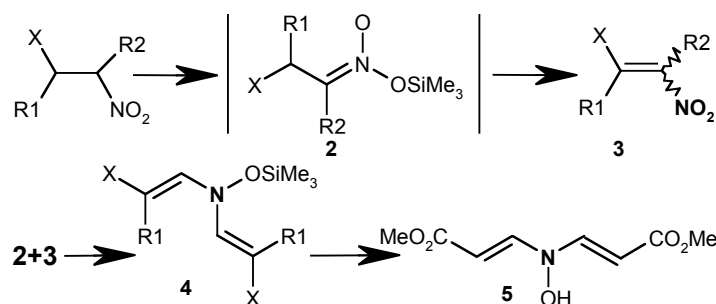


Figura 16: Sililación de CALN para preparación de aminas

La gran versatilidad de los CALN, les permite ser materias primas para una amplia gama de reacciones de síntesis para productos derivados como los pirroles, los cuales pueden ser usados como bloques de construcción en la síntesis de porfirinas y algunos derivados de éstos presentan actividad biológica⁵⁴ (figura 17).

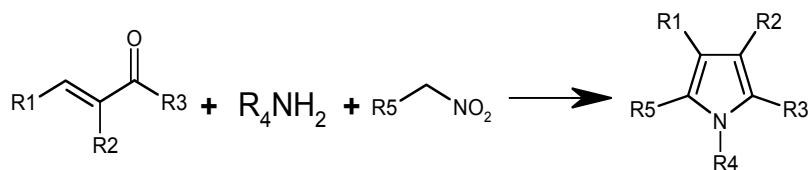


Figura 17: Síntesis de pirroles a partir de los CALN

Se mencionó la variedad de productos que se obtienen a partir de los CALN, pero creo que los principales derivados son las aminas quirales, a las que se les puede dar una gran cantidad de funcionalidades después de diversas reacciones de transformación⁵⁸.

1.5. REDUCCIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS ALIFÁTICOS NITRADOS

La reducción rápida y selectiva de los CALN, es muy para la elaboración de aminas, a nivel laboratorio, como industrial y concretamente cuando la molécula contiene

grupos susceptibles a ser reducidos. Muchos agentes han sido desarrollados para la reducción de CAN⁶¹, pero se ha puesto menos atención a la reducción de CALN^{59, 60}, los cuales habitualmente son reducidos por hidrogenación catalítica, uso alta presión y temperatura, y las reducciones son normalmente más lentas que las de los CAN⁶¹.

1.5.1. Reducción de los CALN a aminas alifáticas

Hay pocas técnicas de reducción de los CALN, en comparación con los CAN. La mayoría de éstas usan un metal y condiciones muy ácidas, otras utilizan la transferencia catalítica de hidrogeno, ya sea homogénea o heterogénea, se ha efectuado también la reducción electrolítica⁵⁹. Se reportó, la reducción de CALN y CAN, por complejos de titanio II en solución de THF/t-butanol y aseveraron obtener buenos rendimientos⁶². La hidrogenación catalítica con Ni-raney se usa para reducir selectivamente algunos CN, y ha sido objeto de varias innovaciones, pero continúan presentándose en menor o mayor grado los subproductos. La figura 18, se muestra las estructuras químicas de productos aislados de la hidrogenación catalítica de un CALN⁶¹. Los compuestos no deseados se presentan, en muchas ocasiones, en rendimientos mayores al de la amina, dificultan su purificación y hacen más costosa la reducción química.

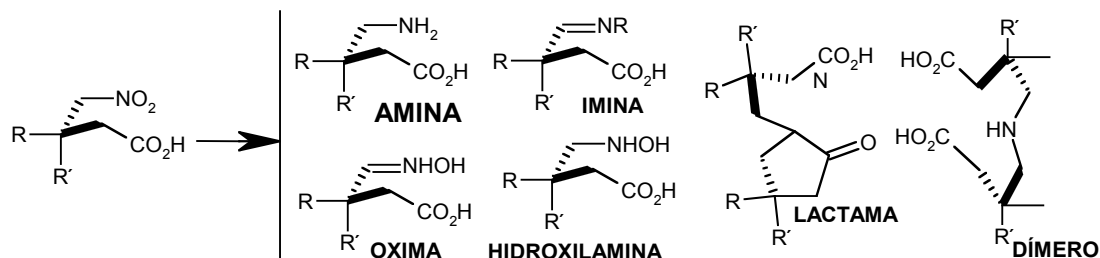


Figura 18: Productos de la hidrogenación catalítica de un CALN

Se han realizado modificaciones a la técnica original de hidrogenación catalítica, las más significativas son: adición monofornato de hidracina, como donador de hidrógeno, esto resultó en la reducción casi exclusiva del grupo nitro⁵⁹. La mezcla: formato de amonio-Ni-Raney reduce CALN y CAN⁶⁰. Otro estudio publicó la reducción de CALN con cloruro de níquel (NiCl_2), en concentración catalítica, combinado con borohidruro de sodio, como agente reductor, todo los reactivos solubilizados en metanol, en dicha solución acontece la formación *in situ* de Ni_2B , especie que es el catalizador activo⁶³.

1.5.2. Importancia de las aminas alifáticas

Las aminas alifáticas ópticamente activas, cuando el átomo de nitrógeno se encuentra unido aun centro estereogénico, tienen gran importancia ya que son compuestos con

actividad biológica, intermediarios de fármacos comerciales y de otros que están en desarrollo, son auxiliares quirales⁶⁴, en general, son precursores importantes en la química sintética⁶⁵. Las aminas alifáticas se pueden obtener por reducción del grupo nitro correspondiente⁵⁹⁻⁶³, o a partir de nitro alquenos⁶⁵ y existen una gran cantidad de aminas o diaminas derivadas (figura 19).

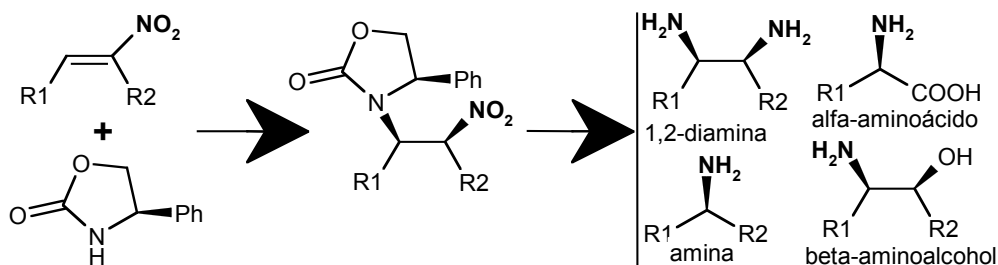


Figura 19: Preparación de aminas ópticamente activas⁶⁴

Una característica importante y particular de los CALN, es cuando el grupo nitro se encuentra unido a un átomo que es centro estereogénico, es decir “un centro quiral”. La reducción química del nitro unido al centro quiral origina la mezcla de los isómeros configuracionales de la amina (mezcla racémica). Esto puede acarrear consecuencias negativas para la salud humana cuando se trata de un medicamento, si los isómeros (*R* y *S*) presentan diferente actividad biológica. A continuación, se presenta un ejemplo de la reducción química del grupo nitro de un CALN, se observa que la reducción química casi siempre se produce los dos enantiómeros *R* y *S* (figura 20).

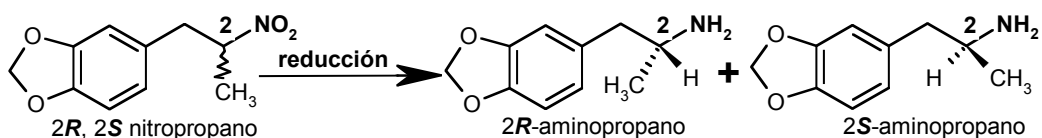


Figura 20: En la reducción química de un CALN se produce la mezcla racémica

1.5.3. Las anfetaminas

Serie aminas, algunas de las cuales pueden obtenerse de la reducción directa del grupo nitro de algunos CALN. En la figura 21, se muestran las principales drogas de este tipo.

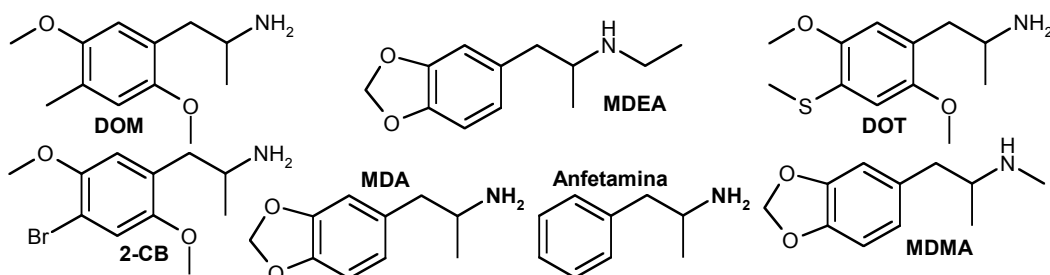


Figura 21: Estructura de la anfetamina y sustancias relacionadas

La anfetamina, es una droga estimulante que en su forma pura, es un cristal amarillento. En el año de 1927, se descubrió que ésta aumentaba la presión sanguínea, agrandaba los pasajes nasales y bronquiales y estimulaba el sistema nervioso central (SNC). En 1932, se comercializó con el nombre de Benzedrina. Las preparaciones anfetamínicas incluyen anfetamina sedativo; anfetamina tranquilizante y anfetamina analgésico. El uso de ésta fue regulado en los años '60. Actualmente se utiliza contra una enfermedad rara y seria conocida como Narcolepsia, en la cual sus víctimas padecen de sueño descontrolado⁶⁶.

Por otro lado, la metilendioxfanfetamina (MDA), también conocida como la droga del amor, fue sintetizada por primera vez en el año de 1910 en Alemania por Mannich y Jacobson, pero sus propiedades farmacológicas fueron estudiadas hasta el año de 1939. Comparte algunas propiedades similares con la anfetamina y en altas dosis provoca convulsiones. Fue patentada en el año de 1961, como supresor del apetito y contra otras enfermedades. Sus principales efectos consisten en incrementar las sensaciones táctiles, aumentar la percepción y provoca deseo de estar y conversar con la gente, sin distorsión de la realidad, ni de producir alucinaciones. Los efectos negativos de la MDA se presentan en dosis mayores de 1mg/100mL de sangre, y son los siguientes: aumenta el ritmo cardiaco, el paciente puede estar completamente sin razón, rigidez general, pupilas dilatadas, entre otras respuestas negativas más⁶⁷.

Si la anfetamina o la MDA, son obtenidas por reducción química del CALN, se originaría una mezcla racémica (contiene los isómeros *S* y *R*), ya que el grupo nitro esta en un carbono que es centro quiral. Esto se observa mejor en las figuras 20 y 22.

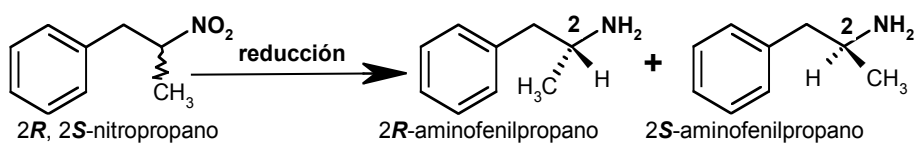


Figura 22: Reducción química del 1-fenil-2-nitropropano

Actualmente existen gran cantidad de publicaciones acerca de la MDA en las cuales estudiaron principalmente la separación y análisis en sangre de los enantiómeros debido a que éstos difieren en sus propiedades y es el enantiómero *S* el de mayor potencial farmacológico⁶⁸. En otro estudio, compararon la MDA contra la cocaína y descubrieron que dosis de la MDA de entre 1.25 y 1.5 mg/kg producen, en ratas, más del 80% de la respuesta que la cocaína causa cuando se administra en dosis de hasta 8 mg/kg⁶⁹.

Se mencionó que cuando se reduce químicamente un grupo nitro de un CALN unido a un centro estereogénico se origina la mezcla racémica y los enantiómeros pueden

presentar desigual actividad biológica, si no se tienen las reservas necesarias es probable que alguno de los isómeros pueda ser dañino a la salud humana, cuando se trate de un medicamento u otro producto de consumo humano, por ello es muy importante contar con metodologías que nos permitan preparar solo uno de los isómeros.

1.5.4. Importancia de la quiralidad en las moléculas

La importancia del estudio y conocimiento de la quiralidad se debe a los efectos que pueden pasar por administrar medicamentos que sean mezclas racémicas, cuando uno de los isómeros sea peligroso para la salud. Tal caso se dio en los cincuentas cuando se suministró a mujeres embarazadas un fármaco, una mezcla racémica de talidomida, al cabo de un tiempo nacieron bebés sin brazos, a éste grupo de personas se les nombró: la generación de la talidomida⁷⁰. Posteriormente, se demostró que el enantiómero **R** no causa problemas, mientras que el **S** tiene características teratogénicas (figura 23).

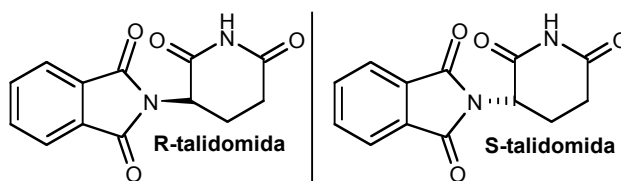


Figura 23: Isómeros estructurales de la talidomida

Esta misma particularidad se observa con la carnitina; pues el isómero **R** se usa contra enfermedades cardíacas, y el **S** es tóxico (figura 24).

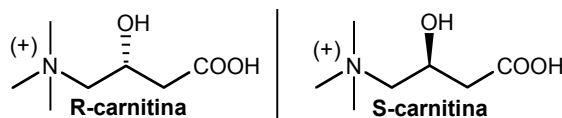


Figura 24: Enantiómeros de la carnitina

Pero, no en todos los casos uno de los isómeros es tóxico, puede simplemente no presentar el efecto deseado, tal es el caso del isómero **R** del ibuprofeno, que no es tóxico pero no presenta actividad, mientras que el isómero **S** es el activo (Figura 25).

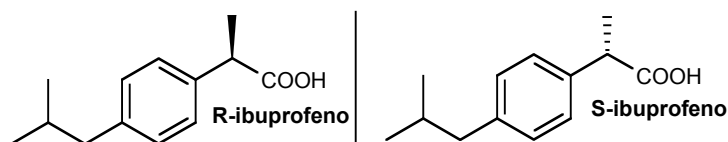


Figura 25: Enantiómeros del ibuprofeno

Esta desventaja de la producción de mezclas racémicas podría ser superada con el uso de biocatalizadores, debido a que las enzimas generalmente aceptan un solo tipo de configuración molecular y se podría obtener casi exclusivamente un estereoisómero.

1.5.5. Problemas de reducción de los CALN

A continuación, se mencionan algunas de las principales desventajas que presentan los métodos de reducción de los CALN ⁵⁹.

1. El sistema de reducción metal/ácido carece de selectividad y requiere medio fuertemente ácido para llevar a cabo la reacción.
2. La hidrogenación catalítica usa hidrogeno inflamable y equipos para alcanzar la alta presión, genera productos como: oximas, iminas, hidroxilaminas y dímeros de la mina. Algunas veces y dependiendo de otros grupos funcionales que pueda tener la molécula principal se pueden formar las lactamas (figura 18).
3. La reducción electrolítica requiere catalizadores complejos en condiciones ácidas o alcalinas, produce rendimientos bajos y necesita de equipo especial.
4. La transferencia catalítica homogénea de hidrogeno requiere complejos muy caros como catalizadores; la preparación y aislamiento de los productos es complicada.
5. La transferencia catalítica de hidrogeno heterogénea emplea metales caros como paladio, platino, rutenio, entre otros y para el soporte de estos catalizadores se requieren rigurosas precauciones, tienden a inflamarse en presencia de aire.

1.6. GENERALIDADES DE LAS BIOTRANSFORMACIONES

Una biotransformación se define como todo cambio en la estructura de un compuesto químico realizado por cultivos vivos o parte de ellos. A estos organismos o partes de ellos se les llama biocatalizadores y pueden ser: células vegetales, células animales, microorganismos, enzimas, anticuerpos biocatalíticos, etc. Estos catalizadores brindan ventajas en la producción de sustancias tradicionales o nuevas, respecto a la síntesis química: aceleran la velocidad de la reacción, las enzimas poseen alta especificidad (en términos de regio, quimio, y estereoespecificidad), con respecto a los sustratos sobre los que actúan. Las enzimas son específicas para un tipo de reacción, generalmente no requieren condiciones extremas de reacción, proveen altos rendimientos de productos enantioméricamente puros y son capaces de producir compuestos nuevos a partir de sustratos diferentes a los que suelen transformar a nivel celular⁷¹, pero su actividad está regulada por las propias moléculas cuyas reacciones catalizan⁷².

Las biotransformaciones se han realizado desde que el hombre comenzó a emplear levaduras y hongos, en la fabricación de pan, cerveza, vinos y algunos productos lácteos. No obstante, la primera biotransformación formal fue estudiada en el año de

1862 por Pasteur, cuando usó la bacteria *Bacterium xylunum* para oxidar etanol y obtener ácido acético. Posteriormente, biotransformó la glucosa en ácido glucónico con *Acetobacter acety* y la de sorbitol a sorbosa mediante *Acetobacter sp*⁷².

Las principales características de una biotransformación son: el tipo de sustrato, el biocatalizador, condiciones de reacción, la técnica de biotransformación y el proceso de extracción del producto y se detallan brevemente a continuación⁷².

1. **SUSTRATO:** debe ser soluble en el medio de reacción, sin ejercer efecto tóxico al biocatalizador, se adiciona en solución o adsorbido en algún material inerte como las arcillas. Éste influye en el rendimiento final, ya que compuestos tóxicos inhiben desarrollo del biocatalizador.
2. **BIOCATALIZADOR:** debe de efectuar la reacción deseada. Se seleccionan de los conocidos, de acuerdo a la reacción a ejecutar y relacionado estructuralmente con el sustrato. La forma física del catalizador influye en el rendimiento. Como será usado depende del tipo de reacción, proceso a seguir, al uso de cofactores, el reciclaje de los mismos y la escala en la que se lleva a cabo la transformación.
3. **CONDICIONES DE REACCIÓN:** los biocatalizadores poseen alta actividad catalítica en condiciones de reacción suaves (medio acuoso u orgánico, temperaturas alrededor de 40°C, pH cercano a la neutralidad y presión normal).
4. **METODOLOGÍA:** técnicas para llevar a cabo una biotransformación:
 - a. **Cultivos en crecimiento:** el sustrato se adiciona al biocatalizador en crecimiento, ya sea al momento de la inoculación o en la última fase de desarrollo. Ventajas: la manipulación, además permite experimentos en serie, tiempos de incubación relativamente cortos e inducción de la o las enzimas por el sustrato.
 - b. **Cultivos previamente crecidos:** el biocatalizador es previamente incubado en condiciones óptimas hasta obtener la biomasa suficiente, se concentra y resuspende en medio adecuado y después se añade el sustrato. Ventajas: el crecimiento y bioconversión se optimizan de modo independiente, el tiempo de incubación se reduce hasta 5%, se eliminan los efectos inhibitorios del crecimiento y se puede ajustar la concentración del catalizador hasta un valor óptimo deseado.
 - c. **Enzimas purificadas:** se limita a enzimas comerciales y útiles en reacciones a escala preparativa. Usadas con grupos polifuncionales, son altamente regio, y estereoselectivas o ambas. Siempre disponibles, las

reacciones se efectúan en poco tiempo, la concentración del sustrato puede variarse sin problemas de toxicidad.

- d. **Enzimas inmovilizadas:** la enzima se fija en un soporte sólido, y se confinan en áreas restringidas de las que no escapan, pero persisten activas. Ventajas: facilidad para remover el biocatalizador una vez inmovilizado. La inmovilización de las enzimas aumentan la estabilidad operacional del catalizador, pero disminuyen su actividad catalítica.
- e. **Sistemas de dos fases:** el biocatalizador permanece en la fase acuosa, y la fase orgánica sirve como almacén de sustrato y producto. En sistemas con exceso de fase orgánica el equilibrio de una reacción hidrolítica puede ser llevado de la hidrólisis a la condensación. Ventajas: alta concentración de sustrato/producto en fase orgánica, incorporación continua del sustrato a la fase acuosa y desplazamiento del producto a la fase orgánica manteniendo la transformación y restando los efectos de inhibición sobre el catalizador, mejor recuperación del producto de la fase orgánica y a un continuo uso del biocatalizador en la fase acuosa.

5. **Extracción del producto y purificación:** los productos se obtienen tras separar al catalizador. Acorde a las propiedades fisicoquímicas del producto y medio de reacción, se usaran las técnicas de: extracción, precipitación, centrifugación y destilación. Los productos se purifican por técnicas de cromatografía, destilación fraccionada y recristalización.

A continuación, en la figura 26, se resumen las características generales de una biotransformación.

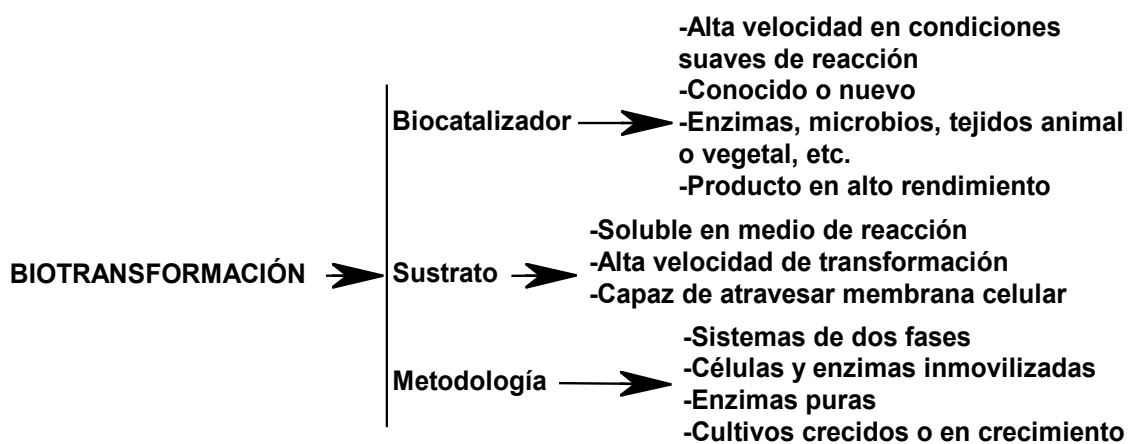


Figura 26: Características generales de una biotransformación

Se conoce la capacidad de ciertos microbios para metabolizar total o parcialmente diferentes CN, y usarlos como fuentes únicas de carbono y/o nitrógeno. No obstante, algunos microbios efectúan la transformación selectiva de un grupo funcional, es decir no afectan otros grupos susceptibles, sin necesidad de aislar la enzima responsable.

1.6.1. Ventajas y desventajas de las biotransformaciones con células completas

El impacto que han tenido las biotransformaciones en la síntesis orgánica se debe a que los biocatalizadores tienen ciertas ventajas sobre la síntesis orgánica tradicional, pero al igual que la química sintética tradicional éstos también presentan desventajas⁷³.

Ventajas

- El poder catalítico de los biocatalizadores incrementa la velocidad de las reacciones químicas entre 10^8 a 10^{20} veces.
- Los biocatalizadores se degradan siendo compatibles con el medio ambiente.
- Actúan bajo condiciones suaves de reacción, en un intervalo de pH de 5 a 8 a una temperatura de 20 a 37°C, y en ciertas ocasiones a temperaturas superiores.
- Realizan diferentes tipos de reacciones químicas y muy posiblemente existe una bio-reacción por cada reacción usada en la síntesis orgánica.
- Muchos microbios son quimioselectivos, actúan sobre un solo grupo funcional.
- Las células microbianas son enantioselectivas, y son empleadas para realizar la catálisis bioselectiva y conversiones asimétricas.
- No están restringidos a sus sustratos naturales, la mayoría de ellos realizan reacciones específicas, pero aceptan una amplia variedad de sustratos.
- El costo económico y ecológico de los biocatalizadores es menor al de la síntesis tradicional.
- Las células completas principalmente no requieren de cofactores adicionales.

No obstante, el uso de biocatalizadores también presenta desventajas que de alguna u otra manera complican el llevar a cabo una biotransformación de manera más eficiente.

Desventajas

- La biomasa necesaria es mucho mayor al rendimiento del producto a obtener.
- En biotransformaciones en medios no acuosos, el pueden tener baja estabilidad en los solventes orgánicos.
- Algunos microorganismos se inhiben con el producto final o intermediarios.
- La dificultad para realizar la purificación de los productos.

- Los microorganismos pueden proporcionar más de un producto partiendo de un mismo sustrato.

En las siguientes secciones se mencionan los principales trabajos realizados para reducir los grupos nitro de diversas moléculas, principalmente TNT, y nitrotoluenos, con microorganismos (levaduras, bacterias y hongos), extractos crudos y enzimas aisladas.

1.7. BIOTRANSFORMACIONES DEL GRUPO NITRO

Los compuestos nitrados son producidos a escala masiva, son materia prima para la fabricación de plásticos, municiones, tintes para textiles, fármacos, químicos para la agricultura, y otros productos más.

La gran mayoría de los CN son liberados a la biosfera por la combustión incompleta de gasolinas, explosivos y como subproductos de reacciones químicas; lo anterior explica el hecho de que se encuentren en el medio ambiente como contaminantes. Estos compuestos tienen un alto nivel de toxicidad para los seres vivos. Sin embargo, en la naturaleza la mayoría de los CN son degradados por los seres vivos. No obstante, el hecho de que muchos de los ambientes contaminados tienen más de un CN dificulta la biorremediación natural. Esto trajo como consecuencia la realización de estudios que tienen por objetivo llevar a cabo la eliminación total de los CN del medio ambiente.

Mediante ensayos de biodegradación en los cuales los CN, son usados como fuente única de carbono, nitrógeno y energía^{74, 75, 76}, se sabe de microorganismos capaces de efectuar la biorreducción selectiva del grupo nitro de una gran variedad de compuestos nitrados, sin que ocurra la mineralización del sustrato inicial.

Por otro lado, la primera biorreducción formal del grupo nitro fue publicada por Neuberg, año de 1914, al transformar el nitrobenceno en anilina con la levadura *S. cerevisiae*. Tiempo después, en los 80's, se retomaron estas investigaciones y se reportaron microorganismos capaces de reducir selectivamente los grupos nitros del TNT y producir las aminas correspondientes.

1.7.1. Hongos

Existen hongos que reducen selectivamente el grupo nitro de CN, principalmente TNT, nitrotoluenos y otros pesticidas nitrados. Sin embargo, en ciertas ocasiones, los hongos efectúan la hidroxilación del anillo aromático y la posterior acetilación de la amina⁷⁷ (figura 27). La biotransformación de compuestos nitrados con hongos no ha

sido tan estudiada como con levaduras o bacterias, y estos eucariotes se usan esencialmente para la biorremediación de suelos contaminados con diversos compuestos nitrados ya que la gran mayoría de los hongos son capaces de mineralizar totalmente dichos compuestos.

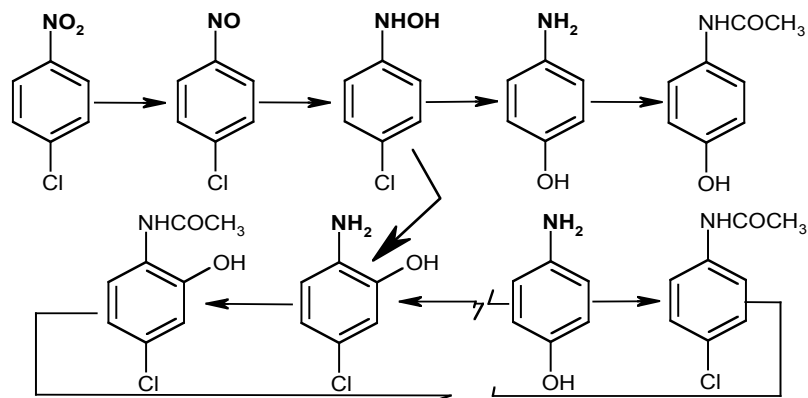


Figura 27: Biorreducción del 4-cloro-nitrobenzaldehído

La tabla 3, refiere a los principales hongos reportados con la capacidad de actuar como biocatalizadores en la reducción de compuestos nitrados, principalmente TNT, dinitrotoluenos, y dinitroroluenos clorados.

Tabla 3: Hongos que reducen selectivamente el grupo nitro de CAN

Hongo	Sustratos	Productos	Referencia
<i>Rhodosporium sp.</i> , <i>Arthrobacter sp.</i>	4-cloro-nitrobenzoceno	4-Cl-nitroanilina, 4-Cl-bencen-hidroxilamina, 4-Cl-2-hidroxianilina, 4-Cl-2-hidroxiacetanilida, 4-hidroxiacetanilida, 4-Afenol	[77]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1,3-DNB, 2,4-DNT, 1-Cl-2,4-DNT y 2,4-dicloro-1-NB	Las aminas o hidroxilaminas	[78]
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	TNT	2ADNT	[79]
<i>Phlebia radiata</i>	TNT	2A-DNT, 4A-DNT, 2,6DA-4-NT	[80]

Como puede observarse en la tabla 3, la mayoría de los hongos reportados reducen únicamente un grupo nitro del TNT y producen las aminas o las hidroxilaminas, pero *Phlebia radiata*, resultó ser el mejor hongo reportado hasta el momento, ya que reduce selectivamente dos de los tres grupos nitro del TNT⁸⁰.

1.7.2. Bacterias o extractos crudos

Las cepas bacterianas y algunos extractos de las mismas también han sido empleadas en la biorreducción de CN y prueba de ello es que cepas: *E. coli*, *Helicobacter pilory*, *Enterobacter cloacae*, y varias cepas de *Salmonella* y de *Pseudomonas*, han sido empleadas para la reducción de diversos sustratos nitrados.

En la tabla 4, se presentan algunas de las biorreducciones más importantes realizadas por bacterias, los sustratos, los productos y la referencia de donde fueron obtenidas.

Tabla 4: Bacterias que realizan la biorreducción de diferentes compuestos nitrados

Microorganismo	Sustratos	Productos	Referencia
<i>Azotobacter agilis</i>	4-cloronitrobenzoceno	4-cloronitroanilina	[74]
Microorganismo aislados de tierra contaminada	TNT	2-ADNT, 4-ADNT, 2,6-DA-4NT, y 3, 4-DNT	
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazina	1, 3, 5-triaamino-1, 3, 5-triazina	[81]
<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	metronidazol	Ácido N-2(hidroxietyl)-oxámico	[82]
Microorganismos del rumen de bovinos	TNT	2-HA-4, 6-DNT, 4-HA-2, 6-DNT, 2-HA-4, 6-DNT, 4-ADNT,	[83]
<i>P. aeruginosa</i>	TNT	4-HADNT, 4-ADNT	[84]
<i>P. fluorescens</i> KU-7	2-nitrobenzoato	Ácido 2-amino 3-hidroxibenzoico	[85]
<i>P. putida</i>	TNT	2-ADNT, 4-ADNT,	[76]
<i>P. putida</i> OU83	Nitro toluenos	2-AT, 3-AT, 4-AT	[86]
<i>Ralstonia</i> sp, SJ98	Ácido O-nitrobenzoico	Ácido antranílico	[87]

En comparación con los hongos, las bacterias tienen mejor capacidad para reducir los CN y en general son capaces de reducir dos de los tres grupos nitro del TNT y hasta tres de estos grupos como es el caso de *Clostridium acetobutylicum* que reduce al 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina a 1,3,5-triaamino-1,3,5-triazina⁸¹ (figura28).

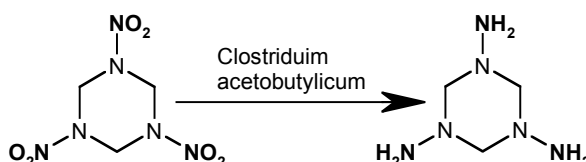


Figura 28: Reducción del 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina al 1,3,5-triaamino-1,3,5-triazina, por extractos celulares de: *Clostridium acetobutylicum*⁸³

Existen géneros bacterianos que se distinguen en cuanto a la capacidad de reducción de diversos CN, el principal es el de las *Pseudomonas*. Estas bacterias son las más utilizadas en trabajos de biorremediación de suelos contaminados con CN. Ciertas cepas de éstas efectúan la reducción exclusiva de uno o dos de los tres grupos nitro del TNT, la reducción de nitrobenzoatos, nitrobenzoceno, nitrofenol y nitrotolueno. Sin embargo, los productos finales del metabolismo de los sustratos anteriores dependen del tipo de incubación, aerobia o anaerobia, del microorganismo y/o de las enzimas empleadas para dicha transformación. En la figura 29, se presenta el esquema de la transformación aeróbica de dos diferentes nitrofenoles⁸⁸.

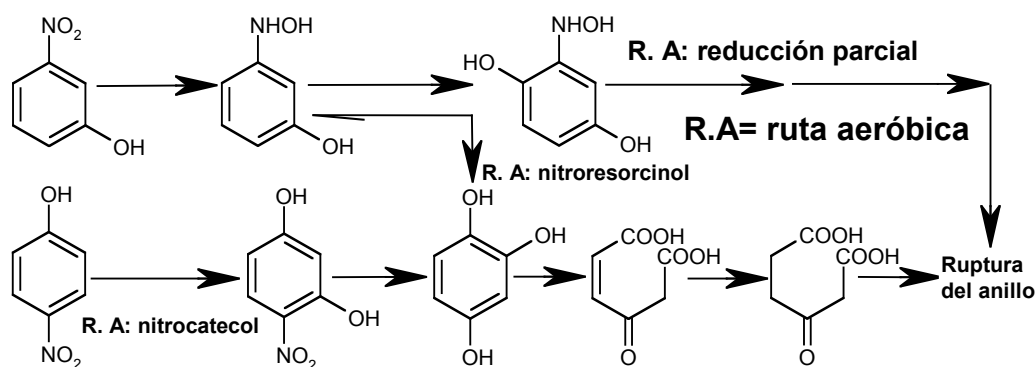


Figura 29: Mecanismo de biodegradación propuesto para tres mononitrofenoles, realizado por diferentes microorganismos, principalmente: cepas de *Pseudomonas*, *Ralstonia eutropha*, *Bacillus*, y *Arthrobacter*

Se reportaron bacterias que mineralizan el 4-nitrobenzoato: *Burkholderia cepacia* PB4 y *Ralstonia paucula* SB4; primero hidroxilan el anillo aromático, luego reducen el grupo nitro a la amina y finalmente efectúan la mineralización del sustrato⁸⁹. Por otro lado, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain 27 se usó en la transformación anaeróbica de varios isómeros del dinitrotolueno y los productos resultantes de la transformación son los diaminotoluenos y diversos dinitroazoxitoluenos⁹⁰ (figura 30).

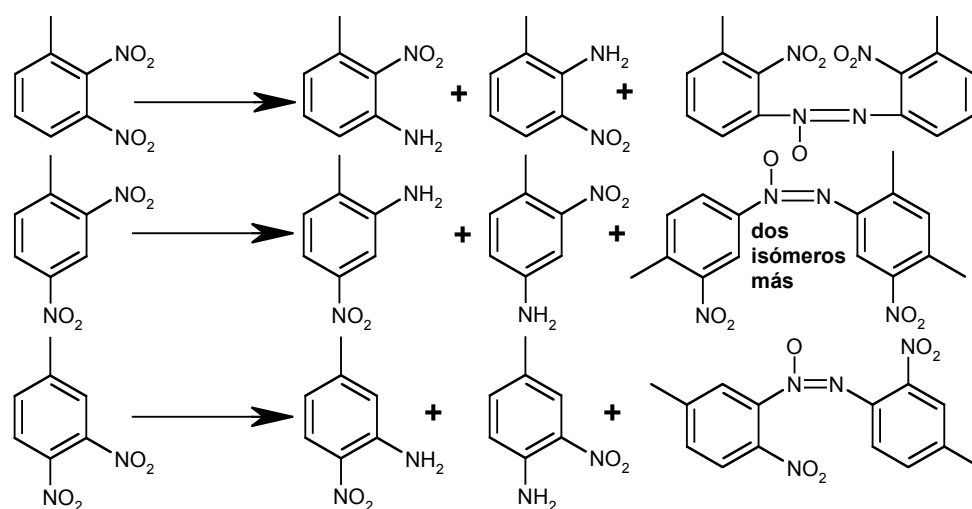


Figura 30: Principales productos de transformación de DNT mediante *Lactococcus lactis*

1.7.3. Levaduras

La biorreducción de compuestos nitrados con de levaduras, ha sido más estudiado que con bacterias y hongos. De éstas, la más empleada es *S. cerevisiae*^{91, 92}, de la cual se han reportado varias cepas⁷⁴. Se han usado también cepas de *Candida sp.* AN-L13⁹³. En otras publicaciones se hace mención a la biorreducción de CN con levaduras sin señalar el nombre de las mismas⁹⁴. Se reportó la reducción del TNT mediante el empleo de: *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. Esta levadura marina crece en medio con TNT como única fuente de nitrógeno y energía y produce el derivado aminodinitrotolueno⁹⁵.

1.7.4. Enzimas

Las enzimas que catalizan la reducción selectiva del grupo nitro se denominan nitrorreductasas (NR), y se identificaron como proteínas que conferían resistencia a los antibióticos: nitrofurazona, nitrofurantoína y nitrofurano⁹⁶. Las NR, tienen alrededor de 217 residuos de aminoácidos por cadena, exhiben actividad de oxido-reductasa⁹⁷, son flavo/proteínas que usan nucleótidos de piridina reducidos (NADH, NADPH), como fuente de electrones⁹⁸. Estas proteínas se han descubierto en trastornos pulmonares, procesos neuro-degenerativos, y enfermedades cardiovasculares humanas⁹⁹. Debido a que todas las NR, son muy parecidas en la secuencia de aminoácidos y a que no comparten características con otras flavo/reductasas, se clasificaron en una única familia de nitro/Flavinreductasas¹⁰⁰, la tipificación se basa en la sensibilidad que tienen al oxígeno cuando realizan la reducción.

Nitrorreductasas del tipo I o insensibles al oxígeno: Las NR insensibles al oxígeno catalizan la reducción de CAN en presencia de oxígeno y mediante un proceso obligado de donación de dos electrones^{98,101} (figura 31).

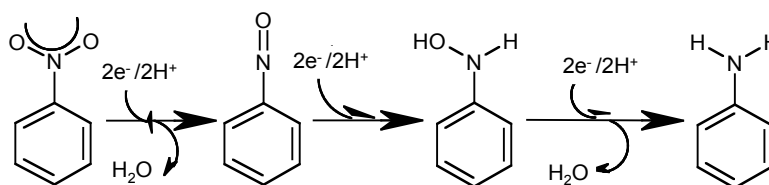


Figura 31: Mecanismo de reducción de las NR insensibles al oxígeno

Este tipo de NR puede transformar el grupo nitro en aminas o hidroxilaminas en presencia y ausencia de oxígeno. El mecanismo involucra como intermediarios a los grupos nitroso e hidroxilamina, no obstante, exclusivamente el último ha podido ser caracterizado¹⁰², debido a que el intermediario nitroso es muy reactivo e inestable¹⁰³.

Las NR insensibles al oxígeno más conocidas son las bacterianas. De entre ellas sobresale la NfsA de *E. coli*, que fue la primera en ser identificada⁹⁸, y es a la que más se le han realizado estudios, ya sea de estructura¹⁰⁰, regulación¹⁰⁴, y función¹⁰⁵. Otras NR no menos importantes son las de *S. typhimurium*¹⁰⁶, *E. cloacae*¹⁰⁰. En los últimos años se han descubierto y caracterizado nitrorreductasas en bacterias como: *H. pylori*¹⁰⁷, *P. aeruginosa*¹⁰⁸, y en hongos^{78, 80}. Actualmente se ha reportado, *in vivo* e *in vitro*, actividad de NR en tejidos de mamíferos (ratas, conejos, cerdos y humanos), sin embargo no son clasificadas como NR verdaderas, pues más bien son los citocromos y algunas monooxigenasas las proteínas que realizan la reducción¹⁰⁹. En eucariotes se ha identificado una NR insensible al oxígeno: la DT-diaforasa o NAD(P)H:quinona

reductasa de mamíferos. Esta flavoproteína cataliza el paso de dos electrones provenientes de las quinonas a las hidroquinonas, por un mecanismo de ping-pong, usando NADH o NADPH¹¹⁰. Esta función ayuda a evitar que las quininas sean reducidas por enzimas sensibles al oxígeno que generen especies muy reactivas de oxígeno¹¹¹. A diferencia de las NR bacterianas, la DT-diaforasa une FAD como grupo prostético, mientras que las de bacterias utilizan FMN¹¹².

Nitrorreductasas del tipo II o sensibles al oxígeno: Estas enzimas catalizan la reducción de CAN en un proceso en el cual está implicado un único electrón. En el primer paso del mecanismo de éstas se genera un anión radical $\text{NO}_2^{\cdot-}$; el cual ha sido ya caracterizado mediante experimentos de resonancia del espín electrónico^{113, 114}. En los pasos siguientes el anión es reducido por la transferencia de un electrón hasta la formación de la amina⁹¹. Estas enzimas son las únicas que llevan a cabo la reducción completa del grupo nitro a la amina (figura 32).

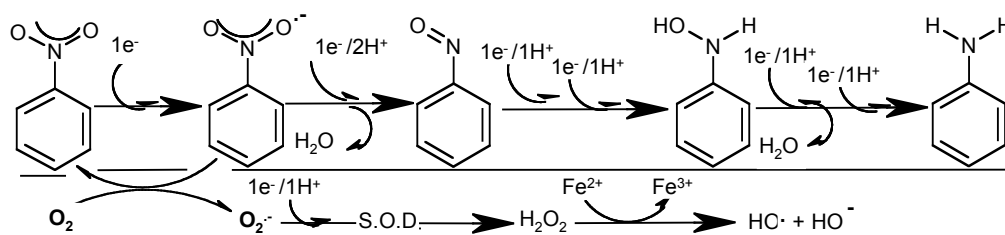


Figura 32: Mecanismo de las NR sensibles al oxígeno

El proceso de la figura anterior ocurre siempre y cuando no exista oxígeno, de lo contrario el radical $\text{NO}_2^{\cdot-}$ se oxida rápidamente al grupo nitro original y el oxígeno se reduce al ión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)^{113, 114}. En presencia de oxígeno el compuesto nitrado funciona únicamente como catalizador para transferir los electrones del NAD (P)H al oxígeno y el nitro no se reduce. La producción del ión superóxido es controlada por la presencia de una superóxido dismutasa, enzima que transforma éste ión en agua oxigenada⁹⁹, la cual a su vez es dismutada por la catalasa.

Las NR sensibles al oxígeno generalmente catalizan reacciones redox que involucran sustratos relevantes en el metabolismo primario y la reducción de los nitro parece ser más bien una reacción fortuita que resulta de interacciones no específicas⁹⁸.

La facilidad de reducción del grupo nitroaromático depende de la existencia otros sustituyentes en el anillo aromático y de la naturaleza de los mismos, además de que influye el potencial del medio ambiente. Los grupos electroattractores activan la molécula y facilitan la reducción del nitro, mientras que los grupos electrodonadores dificultan la reducción del grupo nitro.

Las primeras NR sensibles al oxígeno se identificaron en: hígado de rata¹¹⁷, *Neurospora crassa*¹¹⁶, y chicharos¹¹⁷. Años antes, Westfall encontró que el TNT fue reducido por una preparación de la succinato dehidrogenasa del corazón de ternera¹¹⁸. Las flavoenzimas de microsomas, la NADPH-Citocromo C reductasa y la NADH-Citocromo B5 reductasa, cuya finalidad es catalizar la reducción de las quinonas a sus semiquinonas, son las responsables de la reducción de grupos nitro de CAN a las aminas correspondientes⁷². Existen complejos enzimáticos que se encuentran tanto en eucariontes como en procariotes que reducen al TNT, específicamente el complejo tio-redoxiana-NADPH tioredoxinreductasa de *Arabidopsis thaliana* que producen DANT a partir del TNT⁷⁸. Un complejo similar pero de *Micobacterium tuberculosis* es capaz de transformar al 2,4-dinitrotolueno y al 2,4-dinitroclorobenceno¹¹⁹.

1.8. BIOTRANSFORMACIÓN DE CAN EN SÍNTESIS ORGÁNICA

Muchos microorganismos han sido utilizados para reducir los CAN, sin embargo existen pocos trabajos de aplicación de esta reacción con fines de síntesis orgánica⁹².

1.8.1 *Saccharomyces cerevisiae*

La biotransformación de CAN a escala preparativa y con fines de síntesis orgánica se ha estudiado principalmente con *S. cerevisiae*. Esta levadura, es usada por el hombre desde hace mucho tiempo en la elaboración de productos fermentados y fue por ello uno de los primeros organismos unicelulares estudiado de manera científica. Se puede decir que este microorganismo fue el pionero de los biocatalizadores en la síntesis orgánica.

El creciente interés en la obtención de moléculas con formas enantioméricas puras, la reducción selectiva de dobles enlaces y de otros grupos funcionales, entre ellos el grupo nitro, y la síntesis de heterociclos promovió el desarrollo de la biocatálisis y de las reacciones mediadas principalmente por *S. cerevisiae*.

La primera biorreducción del grupo nitro fue publicado en 1914 por Neuberg. En el ensayo el nitrobenzeno fue reducido a anilina¹²⁰ (figura 33).

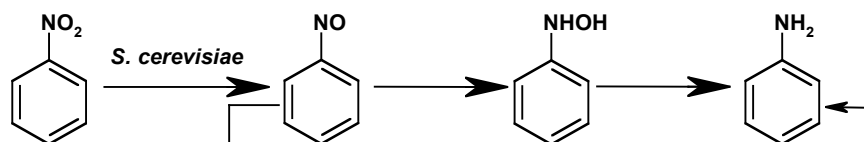


Figura 33: Biotransformación de nitrobenzeno por *S. cerevisiae*, reportada por Neuberg

En trabajos posteriores él mismo Neuberg¹²¹, observó que al someter a biorreducir la *m*-dinitrobenzeno se obtenía como producto a la parcial *m*-nitroanilina (figura 34).

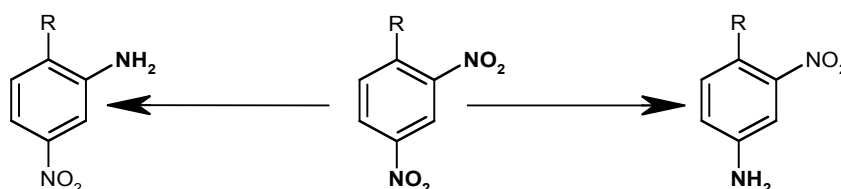


Figura 34: Biorreducción parcial del *m*-dinitrobenzono por *S. cerevisiae*

Pero, fue hasta el año de 1994 cuando Davey retomó el estudio de las reducciones con *S. cerevisiae*¹²². Este autor sometió a biotransformación el *o*-nitrobenzocarbonitrilo y obtuvo la 2-aminoaminobenzamida, la cual resultó de la reducción parcial del nitro a la hidroxilamina, la posterior ciclación a la benzoisoxazolidina, finalmente la hidrólisis del ciclo da el producto aislado (figura 35).

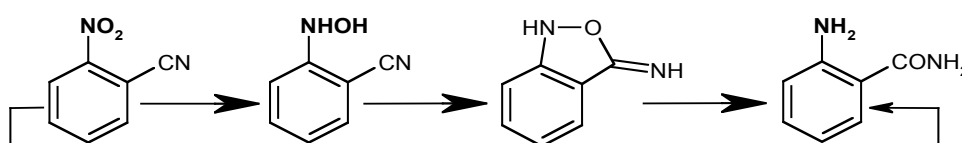


Figura 35: Reducción del *o*-nitrobenzocarbonitrilo a la 2-aminoaminobenzamida

La capacidad de la *S. cerevisiae* para reducir CAN fue estudiada por Takeshita. Este autor publico una serie de trabajos en los que reporta la reducción de varios CAN con diferentes sustituyentes en el anillo aromático¹²³, de N-óxidos¹²⁴ y la reducción de heteroaromáticos sustituidos¹²⁵. En todos los ensayos publicados Takeshita investigo la influencia de los grupos sustituyentes en la reacción de reducción.

Takeshita concluyó que en la reducción de CAN con *S. cerevisiae*, depende de los sustituyentes en el anillo, pues si éste está sustituido con grupos donadores de electrones como: OH, NH₂, SH; la reducción no procede o se obtienen rendimientos muy bajos (0-15%). No obstante, cuando el anillo aromático está sustituido con grupos atractores de electrones como: Cl, Br, CN, CF₃, COOH, COOEt, NO₂, la reacción ocurre en altos rendimientos (80-100%). La reducción de grupos con polaridad intermedia (CH₃, OCH₃, H, NHCOR, SOCH₃), se da en tiempos largos de incubación y con rendimientos moderados (20-60%). En la figura 36, se muestra la influencia de los sustituyentes en la reducción de CAN por la *S. cerevisiae*.

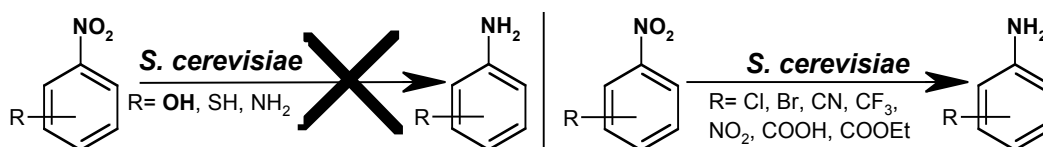


Figura 36: Influencia de los sustituyentes en la reducción de CAN por *S. cerevisiae*

Respecto a la posición de los sustituyentes en el anillo aromático parece no ser tan claro, pues mientras algunos como: NO₂, CF₃, y Br; favorecen la reducción si se están

en posición *orto*- respecto al nitro; algunos como el CN lo hacen si se encuentran en la posición *meta*-, y otros como el grupo COOEt la favorecen si están en posición *para*⁴.

En cuanto al mecanismo de reducción del grupo nitro a la amina por *S. cerevisiae*, se propuso la formación de los intermediarios: nitroso e hidroxilamina, ya que estos son reducidos por levaduras⁹¹. La hidroxilamina se ha propuesto como el intermediario más probable, pues explica la formación de amidas y aminoisoxazoles en la reducción de *o*-nitrocianobencenos¹²⁶ (figura 37).

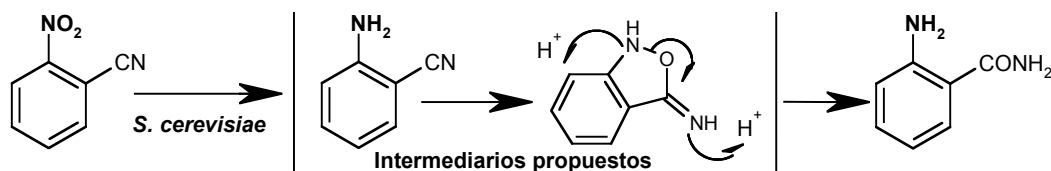


Figura 37: Mecanismo propuesto para la reducción de nitrocianobencenos por *S. cerevisiae*

En general la reducción de CAN con *S. cerevisiae* es quimioselectiva para la mayoría de los grupos funcionales no afecta nitrilos, halógenos, y metoxilos. Pero, produce enzimas que reducen cetonas^{123, 124}. La reducción es regioselectiva, pues en compuestos dinitrados hay preferencia por algún grupo nitro¹²² y en todos los casos estudiados la selectividad mostrada es mayor a la de los métodos químicos de reducción¹²⁶.

No obstante, no todas las divulgaciones de reducción de CN con *S. cerevisiae*, fueron realmente ciertas, debido a que se publicó una serie de trabajos en los cuales se atribuyó falsas biorreducciones a la levadura. En los estudios, que fueron realizados por Baik¹²⁷⁻¹³¹ y colaboradores, y reportaron la reducción de grupos nitro aromáticos utilizando *S. cerevisiae* en condiciones de reacción extremas (pH = 14, temperatura de reflujo: 70 a 80°C; fase: Metanol/Etanol-Agua). Sin embargo, posteriormente, se demostró que lo divulgado en estos trabajos no fue una biorreducción, sino más bien una reducción química llevada a cabo por los carbohidratos y el NaOH en las condiciones empleadas⁹¹.

1.8.2. Otros organismos usados en la reducción de CAN

Se han reportado otros organismos que reducen CAN, pero la mayoría de ellos se enfocan en terapia génica^{96, 98} y sólo algunos se han para la reducir grupos nitro de CAN. Entre estos se han publicado: la fracción microsomal del hígado de ratón¹³², la bacteria *E. coli*¹³³, una nitrorreductasa extraída de *P. pseudoalcaligenes* JS45¹³⁴.

1.8.3. Ventajas y desventajas de la reducción de CAN con *Saccharomyces cerevisiae*

En la tabla 5, se hace una recapitulación de las principales ventajas y desventajas de la reducción de compuestos aromáticos nitrados utilizando la levadura *S. cerevisiae*.

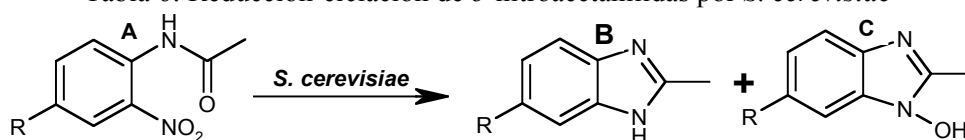
Tabla 5: Ventajas y desventajas de la reducción de CAN con *S. cerevisiae*

Reducción de CAN con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
VENTAJAS	DESVENTAJAS
Condiciones de reacción neutras o casi neutras	NO REDUCCIÓN de CAN sustituidos con grupos: OH, SH, NH₂
Temperatura de alrededor de los 30°C.	Produce enzimas que reducen cetonas
No afecta: nitrilos, halógenos, metoxilos, etc.	Uso de células completas dificulta la purificación.
Reducción regioselectiva en compuestos dinitrados.	Baja estabilidad del biocatalizador en solventes orgánicos.
Biotransformación mucho más barata.	Se obtiene más de un producto a partir de un mismo sustrato

1.8.4. Biorreducción de CAN para la síntesis de compuestos heterocíclicos

Los compuestos heterocíclicos con átomos de nitrógeno pueden obtenerse a partir de compuestos aromáticos nitrados que posean sustituyentes adecuados en posición *orto*-, tras la reducción química o microbiana del grupo nitro. Nuestro grupo de trabajo está interesado, desde hace varios años, en la obtención de compuestos heterocíclicos con el uso de levadura *S. cerevisiae*, principalmente^{92, 135, 136}.

Los antecedentes inmediatos de este trabajo refieren a la biorreducción de 2-*orto*-nitroacetanilidas para obtener 2-metilbencimidazoles⁹², usando como catalizador a la *S. cerevisiae*. En esa investigación se encontraron las aminas, los bencimidazoles y los hidroxibencimidazoles como productos de la biotransformación, estos son compuestos de gran interés por la actividad biológica que pueden tener.

Tabla 6: Reducción-ciclación de *o*-nitroacetanilidas por *S. cerevisiae*⁹⁴

Sustrato	R	B (%)	C (%)	Recuperado de A %
a	OH	-	-	100
b	OCH ₃	-	-	100
c	H	9	-	84
d	Cl	63	16	11
f	Br	67	12	13
g	NO ₂	64	32	-
h	CF ₃	28	53	10
i	CN	32	58	-

En la tabla 6, se resumen los datos de la reducción de varias 2-*orto*-nitroacetanilidas con *S. cerevisiae*⁹². La levadura no fue capaz de biorreducir CAN sustituidos con grupos electrodonadores, específicamente **OH**, **CH₃O**, de acuerdo con la literatura^{91, 92, 123-125}.

Entonces como objetivo de esta investigación se planteó con encontrar algún microorganismo capaz de reducir CAN sustituidos con grupos electrodonadores y para

ello se propusieron los siguientes sustratos modelo: **la 4-metoxi-2-nitroacetanilida (MNAC)** y **la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida (HNAC)**. Un sustrato sustituido con un grupo totalmente electrodonador la HNAC y el otro con un grupo de menor capacidad donante MNAC (figura 38).

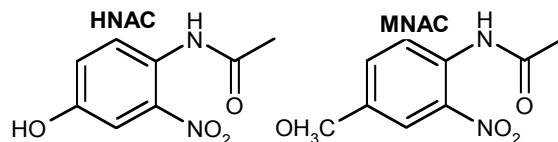


Figura 38: Sustratos modelo con grupos electrodonadores

El hecho de encontrar algún microorganismo capaz de biorreducir a la HNAC y MANC, significaría un avance en la biocatálisis ya que quizás este microbio, en caso de poder encontrarlo, sea posible que efectúe la misma reacción en CAN sustituidos con grupos electrodonadores, los cuales no son transformados por la *S. cerevisiae* comercial. No obstante, los sustratos de la figura 38, no fueron los únicos propuestos para esta investigación, pero quizás sí los más relevantes en cuanto al tipo de sustituyentes del anillo aromático. En la figura 39, se muestran dos CAN sustituidos con grupos donadores de electrones empleados en este estudio.

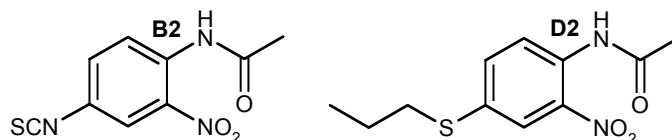


Figura 39: CAN con grupos donadores de electrones empleados en esta investigación

1.9. BIOTRANSFORMACIÓN DE CALN EN SÍNTESIS ORGÁNICA

Se mencionó que los CALN son intermediarios de alto valor en la preparación de muchos compuestos con actividad biológica⁴³. Por otro lado, se sabe que las levaduras reducen grupos carbonilo, se usan en la resolución de alcoholes quirales, reducen dobles enlaces carbono-carbono, entre otras reacciones más. La gran capacidad de actuar como biocatalizador de *S. cerevisiae*, ha sido un factor para que esta levadura sea usada en la biotransformación de compuestos aromáticos y alifáticos nitrados.

1.9.1. *Saccharomyces cerevisiae*

La capacidad de *S. cerevisiae* para hidrogenar dobles enlaces carbono carbono, ha sido estudiada y es una nueva técnica para obtener nitro olefinas asimétricas. Existen varias publicaciones acerca de la biorreducción selectiva de 2-nitrofenilpropenos^{43, 137-141}, en las que obtuvieron los nitro alcanos correspondientes, en moderado rendimiento, a partir del nitro alqueno correspondiente, con la levadura *S. cerevisiae* (figura 40).



Figura 40: Reducción de los 2-nitro-1-fenilpropenos con *S. cerevisiae*

Cuando un β -nitroestireno es biotransformado con la *S. cerevisiae* se obtiene el nitro alcano. Pero, cuando el anillo de benceno contiene un grupo nitro, se lleva a cabo una biorreducción selectiva, formándose primero el nitro alcano y posteriormente la reducción del grupo nitro del anillo de benceno¹⁴² (figura 41).

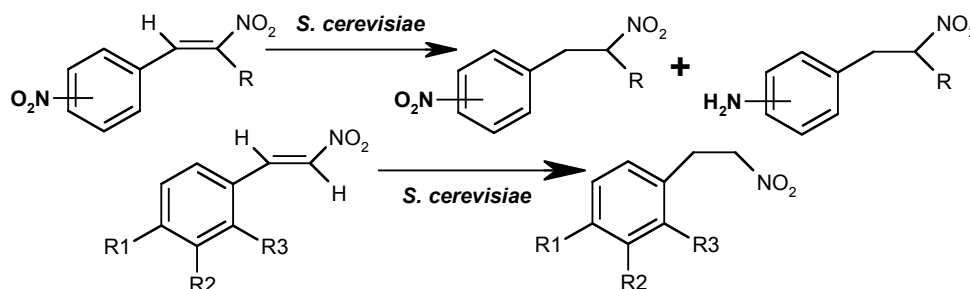


Figura 41: Transformación de β -nitroestirenos con *S. cerevisiae*

No obstante, el uso de enzimas aisladas proporciona mayores ventajas que el empleo de células completas. Por ello, se estudió la reducción de nitro alcanos a partir de nitro alquenos, con la enzima “nitro alqueno reductasa” aislada de levaduras¹⁴³ (figura 42).

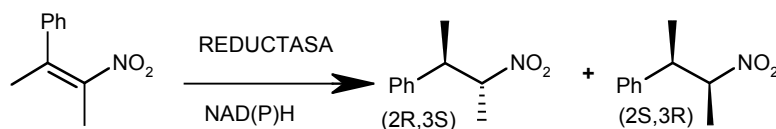


Figura 42: Síntesis de nitro alcanos mediante reducción enzimática del nitro alqueno

Por otro lado, también se han realizado biotransformaciones de propenonitrilos con la misma levadura, sin embargo los productos obtenidos no son los propanonitrilos, sino los isoxazoles correspondientes¹³⁵, en este caso, no ocurre la saturación del doble enlace como se había reportado en otros ensayos^{43, 137-141, 143}. En la figura 43, se muestra el esquema de la biotransformación de los propenonitrilos por *S. cerevisiae*¹³⁵.

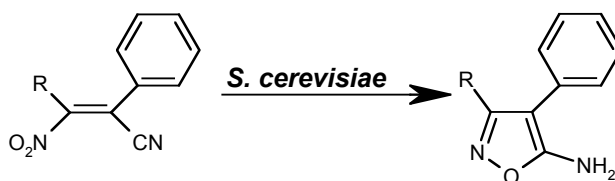


Figura 43: Biotransformación de los 3-nitropropenonitrilos por *S. cerevisiae*

Debido a la capacidad de algunos microorganismos para la biotransformación de los CAN y a la de *S. cerevisiae* para transformar de CALN, específicamente nitro alquenos. Se planteó encontrar alguna cepa microbiana capaz de reducir el grupo nitro de dos

CALN y obtener las aminas quirales derivadas. Para ello se propusieron los siguientes sustratos: 1-fenil-2-nitropropano (FNPNANO) y 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-nitropropano (MDFNPNANO). En la figura 44, se muestra el bosquejo de la biorreducción esperada en este trabajo de investigación.

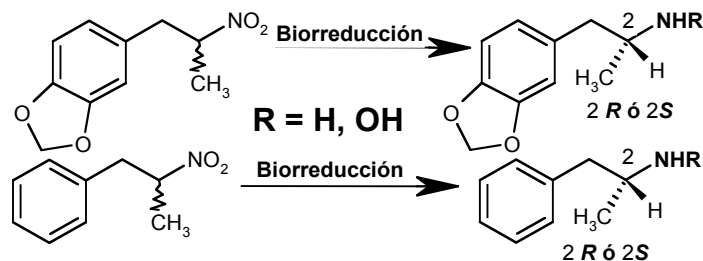


Figura 44: Biorreducción, de los CALN, esperada en esta investigación

Sin embargo, se mencionó, que hasta el momento no existe en la literatura una publicación acerca de la reducción propuesta en la figura 47, y sería de gran relevancia que alguno de los microorganismos con los que se cuenta para este trabajo la llevará a cabo, ya que se tendría con una nueva metodología para obtener las aminas o las hidroxilaminas quirales.

2. HIPÓTESIS

Usando microorganismos de géneros similares, a los reportados en la literatura, de los cuales se sabe que reducen selectivamente el grupo nitro de compuestos nitrados, se podrá efectuar la biorreducción del grupo nitro de: la 4-hidroxi, la 4-metoxi-2-nitroacetanilida y de otras nitroacetanilidas sustituidas, así como del 1-fenil-2-nitropropano y del 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-nitropropano, y se logrará obtener las aminas o las hidroxilaminas correspondientes.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar la biorreducción selectiva de la 4-hidroxi, la 4-metoxi-2-nitroacetanilida y de otras nitroacetanilidas sustituidas, así como del 1-fenil-2-nitropropano y de 1-(3,4-metilendioxifenil)-2-nitropropano mediante microorganismos para obtener las aminas o las hidroxilaminas correspondientes.

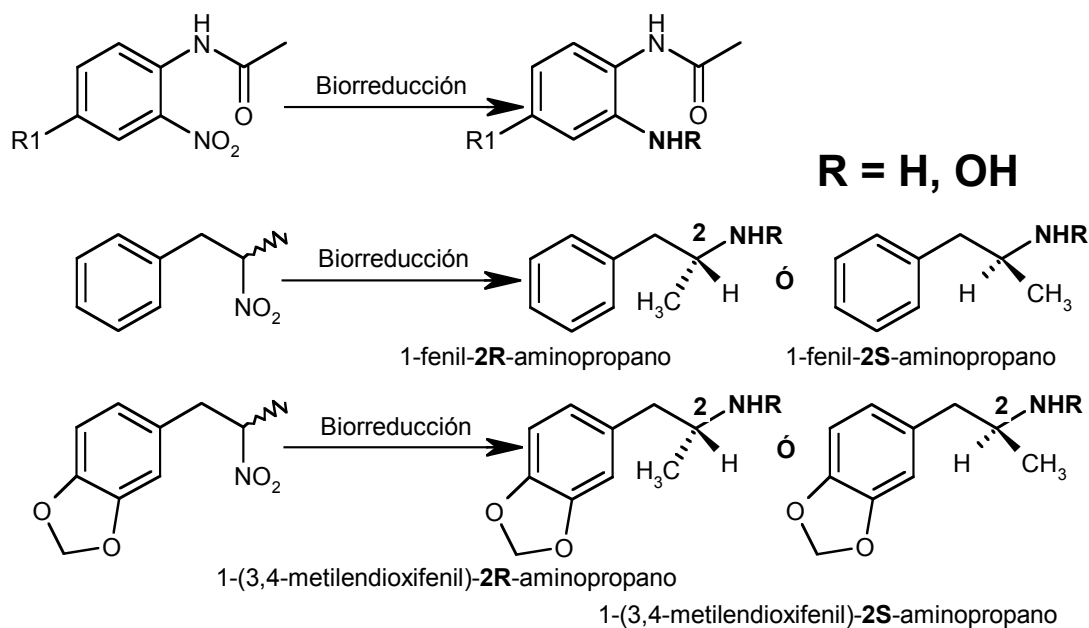


Figura 45: Biorreducciones esperadas en esta investigación

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la tolerancia de las cepas a diferentes concentraciones de los sustratos.
2. Seleccionar a la cepa con la mayor capacidad para reducir la 4-hidroxi y la 4-metoxi-2-nitroacetanilidas y desarrollar el trabajo a escala preparativa.
3. Efectuar la cinética de biorreducción de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida y de la 4-metoxi-2-nitroacetanilidas.
4. Seleccionar la mejor cepa de la reducción del 1-fenil-2-nitropropano y del 1-(3,4-metilendioxifenil)-nitropropano para realizar el ensayo a escala preparativa.
5. Emplear las cepas que aportaron los mejores resultados, en la reducción de los sustratos principales, para la reducción de otros compuestos nitrados de interés farmacéutico.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Materiales y equipos

En esta parte únicamente se hace referencia a los equipos externos empleados en la identificación de los productos de la biorreducción de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida, (HNAC), y de los dos 1-fenil-2-nitro propanos; mientras que los materiales y equipos empleados directamente en la investigación se mencionarán en la descripción de cada técnica empleada en este trabajo.

- Espectrómetro de Masas (EM) Hewlett-Packard 5945 A, JMS-SX102A Jeol y LMSAX505.
- Espectrómetro de RMN-¹H Varian Gemini.

Se usaron las siguientes soluciones reveladoras:

- ✓ **Sulfato cérico:** Se disuelven 12 g de sulfato cérico IV, en 350 g de hielo y 22.5 mL de H₂SO₄ concentrado. Se calentó, con agitación magnética constante, hasta disolución total. Las aminas dan color rojo a violeta al contacto con el revelador, los grupos nitro dan manchas color amarillas después de un ligero calentamiento.
- ✓ **Ninhidrina.** Se disuelven 0.2g de este compuesto en 100mL de etanol. La cromatoplaca es asperjada con esta solución y las aminas revelan en un color rojo-violeta después de calentar alrededor de los 110°C.

Se empleo la levadura comercial *S. cerevisiae* (marca Saft-Instant, Saf Products, Mineapolis, MN. 55415), en un ensayo de biotransformación

Para la síntesis de los sustratos se emplearon materias primas de la marca Aldrich y de grado reactivo a analítico. Los solventes empleados en la cinética de biorreducción fueron del grado HPLC.

Para cumplir con este trabajo la metodología se dividió en siete secciones, las cuales se describirán inmediatamente después de la figura 46, que es el diagrama general con el que se desarrollo la investigación.

METODOLOGÍA

4.2. Diagrama general de la investigación

A continuación, se presenta el diagrama general de la investigación, el cual se aplicará en la biorreducción de las 2-nitroacetanilidas y de los 1-fenil 2-nitro propanos, con la finalidad de obtener los derivados aminas correspondientes.

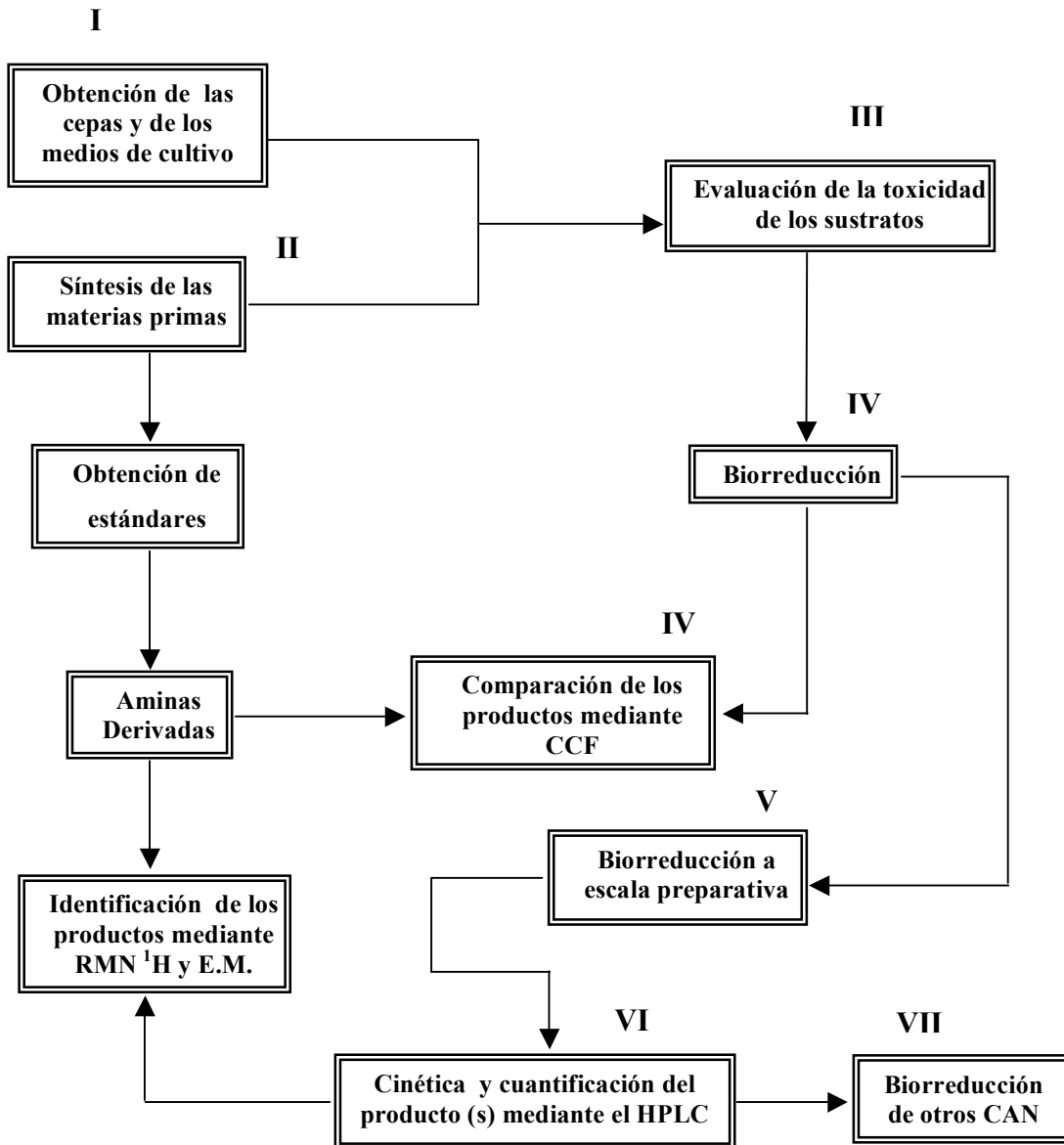


Figura 46: Diagrama general de la investigación

4.3. Descripción de la metodología

- 1. Obtención de las cepas:** Las cepas microbianas se obtuvieron de laboratorios relacionados con la UNAM. Para este trabajo, se contaron con cepas de levaduras, bacterias y hongos. Los medios de cultivo utilizados fueron: caldo YM acidificado (glucosa 10g/L, peptona 7g/L, extracto de levadura 5g/L), para levaduras⁹⁰. Agar papa dextrosa (PDA) para hongos, caldo MRS para lactobacilos¹⁴¹, agar nutritivo (AN) para los bacilos, *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas*¹⁴⁷, medio libre de nitrógeno para *Azotobacter sp*¹⁴² y medio Luria (L-B) para la cepa *E. coli*⁹⁶.
- 2. Síntesis de materias primas:** Se realizó la síntesis de la HNAC, la MNAC y de los 1-fenil-2-nitropropanos. El resto de las nitroacetanilidas ya se tenían en el laboratorio. Las metodologías empleadas en la síntesis de los sustratos se presentan en una sección posterior a la descripción de la metodología.
- 3. Pruebas de toxicidad:** Se llevaron a cabo en cajas petri (60 X 15mm), con medio de cultivo rico para cada género microbiano, que contenían diferentes concentraciones del compuesto nitrado: 0.05, 0.1, 0.5, 0.8 y 1.0 mg/mL. Se sembró, mediante estría, por triplicado, cada cepa a diferentes concentraciones de sustrato y se incubaron durante 24 h y 37°C las bacterias, 24 h, 30°C las levaduras, mientras que hongos y la cepa de *Azotobacter sp* se mantuvieron durante de 48-72 h a temperatura ambiente. Finalmente se seleccionaron las cepas capaces de crecer en la mayor concentración del sustrato.
- 4. Biorreducción en medio líquido:** Del ensayo anterior, se obtuvo la concentración a manejar en 10mL de medio de cultivo para la biotransformación. Se estandarizó la biomasa en 10mL de caldo de cultivo (se utilizaron matraces Erlen-meyer de 25 mL), bajo las condiciones más adecuadas para cada microorganismo (se usó una incubadora de agitación orbital marca Lab-Line con ajuste de temperatura y velocidad), hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0 (leída a 580 nm para levaduras y 540 nm para bacterias⁸⁸), de este cultivo se tomaron 0.2 mL que se incubaron en un matraz con medio nuevo en las mismas condiciones, durante 24 h, excepto *Azotobacter sp*. Con la biomasa similar en los matraces se adicionó el sustrato solubilizado en 200 ó 300 µL de acetona y se continuó con la incubación durante 18-24h más. Pasado este tiempo se compararon los productos de la transformación con estándares mediante cromatografía en capa fina (ccf), para ello se usaron cromatófolios de ALUGRAMISIL-UV254 de 0.25 mm de espesor, una fase móvil de Acetato de etilo: hexano, en relación de 6:4 (para los CAN). Para la comparación de los CALN se uso una fase móvil de:

diclorometano:hexano en una razón de 7:1. En ambos casos se empleó revelador de sulfato cérico. Para los CALN usó además revelador de ninhidrina. Todo se efectuó por triplicado. **Nota:** Condiciones de biorreducción, para *Pseudomonas*: temperatura de 30°C y 180 rpm por 24h. Para *E. coli*, *E. aerogenes* y bacilos: 37°C, 180 rpm por 24 h. Para *Azotobacter sp*: 180 rpm, temperatura ambiente por 48-72 h para crecer biomasa y de 24 h de incubación para la biotransformación.

- 5. Biorreducción a escala preparativa:** Se hizo con las cepas que dieron los mejores resultados (rendimiento y selectividad en la reacción). Los sustratos transformados fueron: la HNAC y los dos 1-fenil-2-nitropropenos. La metodología se desarrolló de la siguiente forma: se colocaron 4 matraces de 1 L con un volumen de 500mL de medio de cultivo en los cuales se creció la cepa microbiana por tiempo de 18-24 h, después se añadió el sustrato solubilizado en acetona y se continuó incubando bajo las condiciones más favorables para cada microorganismo hasta que no se observó sustrato, por comparación mediante ccf. Extracción y purificación de los productos: se eliminaron las células mediante centrifugación (12000 rpm /10 min, temperatura de 4°C), inmediatamente se juntó el sobrenadante (2 L) y se procedió a extraer el producto mediante fracciones de acetato de etilo en embudos de separación (a razón de 3x150 mL de acetato de etilo por litro de medio libre de células). Se juntaron, secaron y se concentraron las fracciones extraídas usando un rotavapor. Finalmente, se purificaron los productos con una columna cromatográfica de gel de sílice y se calculó el rendimiento de los productos puros.
- 6. Cinética de biorreducción de la HNAC:** Con la cepa seleccionada en la prueba de viabilidad, se hizo la cinética de biorreducción de la HNAC. Se estandarizó la biomasa para obtener resultados comparables. La meta fue, la óptima cuantificación del o los productos usando el HPLC, saber el tiempo y la concentración máxima obtenida en la transformación. El muestreo se realizó a diferentes tiempos (2, 4, 6, 8, 10, 12 h y más en caso de ser necesario), de iniciada la reacción y consistió en tomar 500µL del medio de reacción (en los tiempos antes mencionados), y someterlo a centrifugación, filtración y sonicación para la eliminación del aire, con la finalidad de evitar interferencias al inyectarse en el HPLC. Las condiciones de operación del cromatógrafo Watters 1525, de doble bomba: columna C-18 (3.9 X 300mm) la cual mantuvo una temperatura de 45°C, con un flujo de 1 mL/min, se usó un detector de doble luz UV Watters 2487, que trabajó a una longitud de onda de 270 nm, la fase

móvil fue una mezcla de Agua:Metanol:ácido acético 70:30:1. **Nota:** Tanto la biotransformación como las inyecciones en el HPLC se hicieron por triplicado.

7. **Biorreducción de otros CAN de interés farmacéutico:** Se hizo la transformación de otros CAN (figura 70, capítulo de resultados), con las cepas que exhibieron la mejor capacidad en la reducción selectiva del grupo nitro de los sustratos modelo. La biotransformación fue de la siguiente manera: se sembraron las cepas microbianas, antes seleccionadas, en las mejores condiciones para su desarrollo (medio de cultivo, temperatura, agitación y tiempo de incubación), y tras alcanzar 24 h de incubación se adicionaron los sustratos solubilizados en acetona (concentración 0.5 mg/mL), se continuó con la incubación por 24h más. Pasado este tiempo se tomaron muestras y se verificó mediante ccf la aparición de productos coloridos en una tonalidad rojo a violeta luego de calentar el cromatofolio antes asperjado con la solución de sulfato cérico.

4.4. Síntesis de los CAN

A) La 4-hidroxi-2-nitroacetanilida (HNAC): Se colocaron a reflujo: 0.01mol de 4-amino-3-nitrofenol, 20mL de anhídrido acético y dos gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). La reacción fue abortada cuando ya no se observó la materia prima en la ccf. Luego se dejó enfriar la mezcla de reacción y con agitación constante se adicionaron 20mL de agua fría. Pasadas 2 h, el precipitado formado se lavó varias veces con agua fría. Finalmente, el compuesto obtenido se recristalizó con acetona y carbón activado y se obtuvo un sólido color amarillo claro con un rendimiento del 95%. Un $R_f = 0.67$, un $pf=124-125^\circ C$.

2B) La 4-metoxi-2-nitroacetanilida (MNAC): La síntesis de la MNAC se realizó de la misma manera que la HNAC, sólo se cambió el 4-amino-3-nitrofenol por el 4-metoxi-3-nitrofenol. Se obtuvo un sólido amarillo fuerte con un rendimiento del 93%. El compuesto presentó un $R_f=0.65$ y un $pf= 99-100$.

4.5. Síntesis de los CALN

Síntesis de los 1-fenil-2-nitropropanos: Para sintetizar los 1-fenil-2-nitropropanos, fue necesario obtener primero el nitroalqueno y posteriormente efectuar la reducción del doble enlace para obtener el nitropropano.

A) 1-fenil-2-nitroalqueno: Se colocaron a reflujo 20 mmol de benzaldehído con 20 mmol de acetato de amonio en 40mL de nitrometano. La reacción se detuvo cuando ya no

se observó materia prima, esto se verificó por cromatografía en capa fina (ccf). Luego, se eliminó el exceso de solvente mediante evaporación a vacío, posteriormente la materia orgánica se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con solución salina y se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4). Finalmente, la evaporación del acetato dio el producto crudo el cual se purificó por recristalización de etanol. El producto obtenido fue un sólido color amarillo crema y se obtuvo un rendimiento promedio del 70%. $R_f=0.85$, con $pf=62-63^\circ\text{C}$.

B) 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-nitropropeno: El procedimiento de síntesis de los dos nitroalquenos fue exactamente el mismo, la única diferencia la hizo el aldehído usado. Para este sustrato se usó el 3,4-metilendioxi-benzaldehído. El producto obtenido fue un sólido color amarillo y se obtuvo un rendimiento promedio del 70%. $R_f=0.83$, con $pf=75-76^\circ\text{C}$.

Síntesis de los CALN: Con los nitro estirenos en la mano se procedió a llevar a cabo la reducción del doble enlace: la primera técnica utilizada fue la reportada por Anup Bhattacharjya y colaboradores 1985⁵¹, debido a que se obtuvieron resultados negativos se intentó con lo publicado por Yasushi Kawai y colaboradores⁴³, pero finalmente se logró obtener los sustratos alifáticos nitrados mediante la metodología reportada por Achintya y colaboradores, 1985⁵².

A) 1-fenil-2-nitroalcano: Se colocaron 4mmol de NaBH_4 por 1mmol del nitro estireno, en una mezcla con 8 mL de CHCl_3 , 1 g de gel de sílice y 1.5 mL de 2-propanol en agitación constante y a temperatura ambiente. El NaBH_4 se adicionó en porciones de alrededor de 40mg cada 15min, la mezcla se mantuvo en agitación hasta que el color amarillo debido al nitro estireno desaparece. El exceso del NaBH_4 se eliminó con la adición de HCl diluido, después la mezcla se filtró. El crudo de reacción se extrajo de la parte acuosa con CH_2Cl_2 y se lavó con solución salina, luego se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Finalmente, se evaporó el solvente y se obtuvo un aceite ligeramente amarillo. El rendimiento fue del 55%. $R_f=0.88$.

B) 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-nitropropano: Al igual que el 1-fenil-2-nitropropano se empleó la técnica publicada por Achintya y colaboradores, 1985⁵². Como resultado final se obtuvo un aceite amarillo, con un rendimiento final del 40%, $R_f=0.83$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PARTE I: Obtención de las cepas microbianas

Para esta investigación se usaron levaduras, bacterias, hongos y bacilos lácticos (tabla7), para la biotransformación de los sustratos propuestos: la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida (HNAC), la 4-metoxi-2-nitroacetanilida (MNAC), otras nitroacetanilidas sustituidas, y los dos: 1-fenil-2-nitropropanos.

Tabla 7: Total de cepas microbianas empleadas en este trabajo

Levaduras	Bacterias	Bacterias lácticas	Hongos
XL3	<i>E. coli</i>	A 36202	<i>P. chrysosporium</i> A 594
XL4	<i>E. aerogenes</i>	A 452121	<i>P. chrysosporium</i> H 278
XL5	<i>B. sp</i>	A 56203	
XL6	<i>B. megaterium</i>	A 57103	
XL7	<i>B. subtilis</i>	A 57206	
XB5	<i>Azotobacter sp</i>	Lilys 9	
XB7	XL2	Lilys 32	
L-8	XB1	Lilys 39	
L-10	XB3	Lilys 42	
LEM1	XB4	5T 2001	
<i>R. mucilaginosa</i> (Rh m)	Cinco cepas de <i>P. fluorescens</i> : PAs2, PMs2, PMs3, PLe3 y ZM2	50	
L-3V		25124	
K-1		47 amil	
<i>S. cerevisiae</i>		25Sn C	

Las cepas: XL3-7, XB5-7, L-8, L-10, L-3V y K-1, son levaduras. De las cepas XB1, XB2, XB3, XB4 y XL2: lo único que sabemos es que son bacilos gram negativos y al igual que las levaduras éstos fueron aislados en nuestro laboratorio. Sin embargo, a excepción de la cepa XL6, el resto de éstas aún no se han caracterizado. Los bacilos lácticos tampoco han sido caracterizados, por parte del grupo que los aisló y nos los facilitó.

Se usaron los siguientes medios de cultivo de acuerdo con la literatura: medio PDA para los ensayos de viabilidad con hongos. Agar PDA acidificado o medio YM sólido para prueba de viabilidad de levaduras⁹⁰, caldo YM para transformación en medio líquido por levaduras⁹⁰; agar y caldo nutritivo para las pruebas de viabilidad y biotransformación en medio líquido para todas las *Pseudomonas*¹⁴¹ y el resto de las bacterias de la tabla anterior excepto *E. coli*, pues se empleo medio L-B para la cepa esta cepa⁹⁶, así como también se ocupó medio libre de nitrógeno para la cepa de *Azotobacter sp*¹⁴² y finalmente medio MRLS para bacterias lácticas¹⁴¹.

5.2. PARTE II: Síntesis de los sustratos nitrados

A) Obtención de la HNAC y MNAC: Para sintetizar la HNAC y MNAC se usó la técnica reportada por Olgún-Contreras, L. F¹. La diferencia en la síntesis de estas sustancias fue el empleo del 4-amino-3-nitrofenol para la HNAC y del 4-metoxi-3-nitrofenol para obtener la MNAC. En la tabla 8, se muestran los datos de punto de fusión de la HNAC y MNAC, y el rendimiento obtenido en la síntesis de estas dos materias primas.

Tabla 8: Rendimientos y puntos de fusión de la HNAC y MNAC

Compuesto	Punto de fusión	Rendimiento
HNAC	124-125°C	95%
MAC	99-100°C	93%

Los rendimientos obtenidos en la síntesis de las materias primas de carácter aromático fueron muy buenos, mayores al 90% y comparable a los obtenidos por Olgún-Contreras, 2001⁴. No se hallaron datos en la literatura para comparación de los puntos de fusión.

B) Síntesis de los compuestos alifáticos nitrados

Para preparar al 1-fenil-2-nitropropano y al 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-nitropropano), se sintetizó primero a los nitro alquenos, para esta reacción, se utilizó la técnica publicada por Yasushi Kawai y colaboradores⁴³. Posteriormente, se hizo la reducción del doble de los nitro alquenos para finalmente tener los alcanos nitrados.

a) Síntesis de los nitro alquenos: Para la síntesis del 1-fenil-2-nitropropeno (FNPENO) se empleó la técnica descrita por Yasushi Kawai y colaboradores⁴³. Diagrama general de preparación de los nitro alquenos (figura 47).

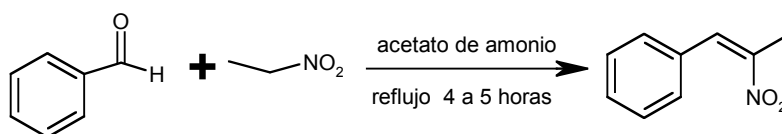


Figura 47: Esquema de síntesis del FNPENO

La reacción ocurre en un tiempo aproximado de 4 a 5 horas y aporta un rendimiento promedio del 70% del producto puro, luego de una recristalización simple de etanol.

El rendimiento obtenido en nuestro laboratorio fue superior al publicado por Yasushi Kawai y colaboradores⁴³. En ese trabajo lograron un rendimiento de la recristalización del 67%. Esto se debe, principalmente, a que mientras ellos dejaban la reacción durante una noche completa. En nuestro estudio se encontró que la reacción ocurre en tiempo promedio

de 4-5h. Para ello, se verificó el consumo del aldehído mediante ccf, aunque el tiempo en completarse la síntesis dependió de cantidad de materia prima para la síntesis.

La elaboración del segundo sustrato se hizo de la misma manera que para el FNPENO. La diferencia fue el aldehído usado el 3,4-metilendioxi benzaldehído “piperonal”. Diagrama de síntesis del 1-(3,4-metilendioxi fenil)-2-nitropropeno, MDFPENNO (figura 48).

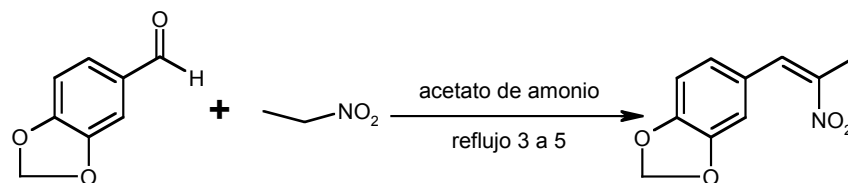


Figura 48: Esquema de síntesis del MDFPENNO

El rendimiento del compuesto fue del 70%, en promedio. No existe referencia para comparación del rendimiento logrado. Pero en general se obtuvieron buenos rendimientos para ambos compuestos alifáticos nitrados. Sin embargo, los sustratos propuestos en este trabajo de biocatálisis fueron los nitro alcanos: 1-fenil-2-nitropropano (FNPANO) y 1-(3,4-metilendioxi fenil)-2-nitropropano (MDFNPANO). Para ello, se hizo la reducción selectiva del doble enlace de los nitro alquenos con la finalidad de obtener los nitro alcanos.

B) Obtención de los nitro alcanos

La reducción del doble enlace se realizó primero con la técnica descrita por Anup Bhattacharjya y colaboradores⁵¹ (figura 49).

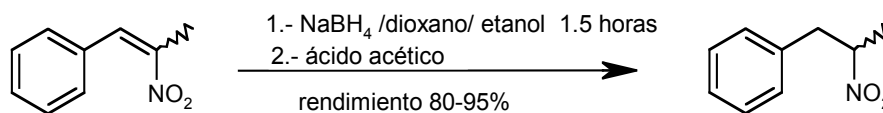


Figura 49: Diagrama de reducción del FNPENO

No obstante, con esta metodología no se obtuvo el compuesto de interés, a pesar de que los autores reportaron rendimientos mayores al 80%, aún cuando se hicieron alteraron las condiciones de reacción de la técnica original: temperatura, tiempo, disolvente, cantidad de materia prima, forma de extracción, el resultado fue el mismo. Esta reducción originó una mezcla de productos entre los cuales probablemente se encontraba el nitro alqueno, pero no pudo ser aislado, ya que el crudo obtenido presentó insolubilidad a los solventes orgánicos más comunes (acetato de etilo, acetona, diclorometano, cloroformo, etanol), y fue soluble solamente en agua. La reacción se realizó repetidas veces variando las condiciones, no obstante el resultado fue siempre el mismo. Creemos que el compuesto insoluble en

solventes orgánicos se obtuvo debido a que probablemente la reacción no se llevo a cabo completamente, además en ninguna de las ocasiones que se realizó la reacción desapareció el color amarillo que provenía del nitro alqueno y el cual debería desaparecer después de completada la reacción de reducción⁵².

Debido al resultado negativo se opto por efectuar una biorreducción selectiva del doble enlace de acuerdo con Yasushi Kawai y colaboradores⁴³. A continuación, se presenta el diagrama de la biorreducción (figura 50). Se utilizó la cepa comercial de *S. cerevisiae*.

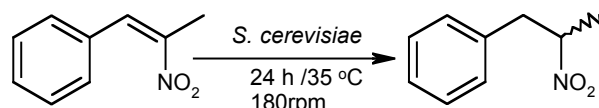


Figura 50: Biorreducción del nitro alqueno mediante levaduras

Con esta técnica se obtuvo el alcano saturado, pero tiene el inconveniente que está en muy baja concentración, ya que desde la extracción del crudo de reacción se recupera únicamente alrededor del 50% en relación al sustrato inicial. Además, existe la desventaja de que se producen muchos compuestos más y se le suma el inconveniente que en la separación se extraen ceras de la levadura que complicaron la purificación del alcano y fue imposible aislarlo y caracterizarlo. Probablemente, esto se deba a que nosotros usamos la *S. cerevisiae* comercial, mientras que Yasushi Kawai y colaboradores⁴³, manipularon una levadura japonesa. Tampoco esta técnica proporcionó los compuestos de interés, y se uso nuevamente una técnica de reducción química.

Después de varios intentos fallidos en la reducción del doble enlace C-C, se intentó con otra técnica la empleada por Achintya y colaboradores⁵², en la cual además de cambiar el solvente y el alcohol usados (se usa isopropanol, las técnicas anteriores usaban metanol), se emplea una fase estacionaria sólida, el gel de sílice, la cual, según los autores del trabajo, tienen la finalidad de disminuir la formación del dímero durante la reacción. Diagrama de reducción según Achintya y colaboradores⁵² (figura 51).

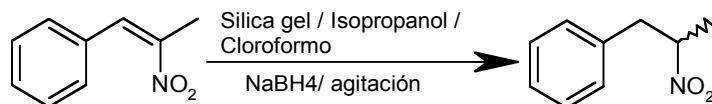


Figura 51: Esquema de la reducción química del nitro alqueno al nitro alcano⁵²

Con esta técnica, finalmente, se obtuvo el nitro alcano. El rendimiento fue del 55%, muy por debajo del rendimiento reportado por Achintya y colaboradores⁵², pues estos autores

reportaron un rendimiento del 93%. En la figura 52, se muestra una ccf de la reducción del 1-fenil-2-nitropropeno (FNPENO) al 1-fenil-2-nitropropano (FNPAÑO).



Figura 52: CCF de la reducción química del FNPENO al FNPAÑO

Los carriles **1** y **2**: son la materia prima y los últimos tres son las diferentes técnicas de reducción empleadas, el carril **3** es la metodología finalmente usada, por ser la única en la cual se pudo recuperar el producto de reacción en rendimiento moderado. Es mencionar que tanto el FNPENO, tanto como el FNPAÑO fueron totalmente caracterizados.

La variación en resultados puede ser debida al gel de sílice, los autores no mencionan número de malla, ni pureza de la fase sólida. Nosotros usamos gel de sílice MN-Kieselgel G para cromatografía en capa fina, la cual contenía $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$. Los autores proponen que las cargas positivas de la sílice estabilizan las cargas del intermediario lo que se ve influido en la disminución de reacciones secundarias y en el aumento del producto principal de la reducción, el nitro alcano (figura 53).

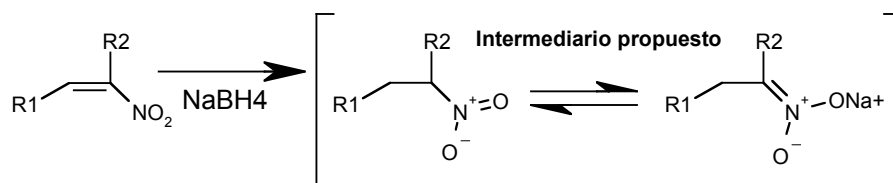


Figura 53: Intermediario de reducción propuesto por Achintya y colaboradores⁵²

El volumen de partícula del gel de sílice, pudo influir en el tamaño de la superficie de contacto, pues la misma cantidad en gramos no significa la misma superficie de contacto, es decir, si hay mayor tamaño de partícula existe una menor área de contacto y viceversa y en consecuencia si hay una menor área de contacto existen menos cargas disponibles para la estabilización del intermediario propuesto (figura 53). Por otro lado, la influencia del $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$, está directamente relacionada con la desestabilización del intermediario, lo puede ocurrir es una competencia por las cargas del gel de sílice entre el sulfato de calcio

hidratado el intermediario lo que causa la desestabilización del último, lo que conlleva a la formación de subproductos durante la reacción de reducción.

Con la misma técnica (publicada por Achintya y colaboradores⁵²), se hizo la reducción del doble enlace del 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-nitropropano (MDFNPENO), pero con una modificación: el uso de temperatura alrededor de los 45°C, ya que cuando se usó la técnica tal cual está reportada, reducción a temperatura ambiente, no hubo reacción. Finalmente se obtuvo el 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-nitropropano (MDFNPANO) (figura 54).

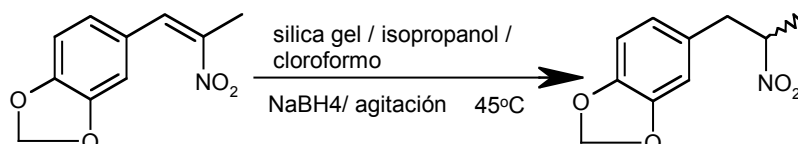


Figura 54: Diagrama de obtención del MDFNPANO mediante reducción química del MDFNPENO

En la figura 55, se muestran una ccf, de la reducción del MDFNPENO al MDFNPANO mediante la técnica reportada por Achintya y colaboradores⁵².

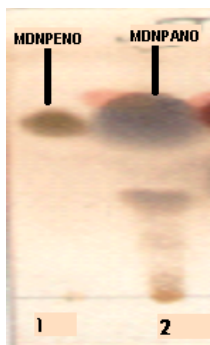


Figura 55: CCF de la reducción química del MDNPENO al MDNPANO

Donde: el compuesto del carril **1** es el MDFNPENO y el carril **2** son los productos de la reducción química (MDFNPANO). El producto principal es la mancha color gris-negro que está en mayor proporción.

El rendimiento promedio de la reducción del MDFNPENO fue menor, al obtenido en la reducción FNPENO, y fue del 40%. El menor rendimiento puede atribuirse igualmente al gel de sílice y a otro factor que aunque ayudo a que ocurriera la reacción, también hizo que disminuyera el rendimiento del alcano y a que se formaran subproductos, me refiero a la temperatura de reducción la cual estuvo alrededor de los 45°C.

Con los sustratos sintetizados se procedió a realizar la última parte del proyecto, la cual consistió en efectuar la biorreducción de estos CN, mediante las cepas obtenidas para este trabajo de investigación.

5.3. PARTE III: Pruebas de viabilidad presencia de la HNAC

Para estos ensayos, fue necesario tener un cultivo iniciador de cada cepa. Se sembró e incubó cada una de las cepas, en los medios de cultivo antes elegidos, en las mejores condiciones de desarrollo para cada género microbiano (medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación.). Posteriormente, las cepas crecidas se resembraron, por triplicado, en medio sólido el cual contenía una de las siguientes concentraciones de sustrato: 0.01, 0.1, 0.5 y 0.8 mg/mL.

A) Levaduras: Casi todas las levaduras crecieron en presencia de 0.01 y 0.1 mg/mL del sustrato. Sin embargo, la levadura *R. mucilaginosa* (Rh m), fue la única que no desarrolló en presencia del compuesto. Cuando se utilizó 0.5 mg/mL de la HNAC, crecieron menos levaduras, pero fueron las mismas que prosperaron en la prueba con 0.8 mg/mL de la HNAC. En la tabla 9, se enlistan las claves de las levaduras que crecieron con 0.8 mg/mL del sustrato, y que además causaron el cambio de color del medio de cultivo.

Tabla 9: Resultados de la prueba de viabilidad de las levaduras. Concentración de la HNAC usada en el ensayo: 0.8 mg/mL

Clave de la levadura	Color del medio de cultivo	Intensidad del cambio de color
XL3	Rojo	+++++
XL6	Amarillo-paja	+
XB7	naranja	+++
L-8	Amarillo-naranja	++
L-10	Amarillo-naranja	++
L-3V	Amarillo-naranja	++
K-1	Amarillo-naranja	++
XB6	naranja	+++++

Se observó un cambio de color en el medio de cultivo después de 24 h de incubación con los microorganismos que desarrollaron en el mismo. Este cambio de color se evaluó por observación directa de las cajas inoculadas y por comparación entre las mismas con la placa blanco. La caja petri que se usó de blanco no tenía inóculo alguno, pero se incubó bajo las mismas condiciones en las que fueron incubadas las placas que contenían cada uno de los diferentes géneros microbianos. El medio de cultivo que contenía el sustrato (HNAC), tenía un color amarillo paja, el cual mantuvo después de la incubación.

En la figura 56, se comparan los colores del medio de cultivo con el sustrato, la HNAC, después de ser inoculado e incubado 24 h con cepas de levaduras. La concentración del sustrato usada fue de 0.5 mg/mL

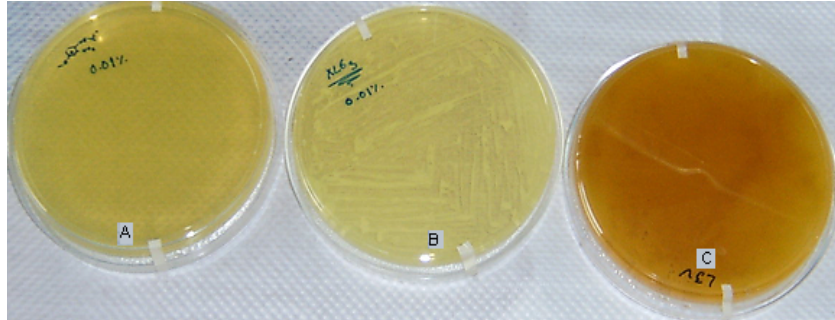


Figura 56: Color del medio de cultivo con la HNAC, y tras la incubación con levaduras

La caja con la letra **A** es el blanco, las cajas con las letras **B** y **C**, son los cambios de color producidos por las levaduras **XL6** y **L3V** respectivamente. En la figura 56, se nota claramente el cambio de color producido por efecto del desarrollo de la cepa microbiana, ya que la caja blanco (sin microorganismo), permanece prácticamente sin cambio alguno.

En la figura 57, se observa mejor el cambio de color producido en el medio de cultivo por la incubación de las levaduras. La imagen fue tomada de la prueba de viabilidad de las levaduras con 0.5 mg/mL de la HNAC. Similares cambios de color se observaron en las placas petri en las que se realizaron pruebas de viabilidad, con la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida, y en las que los diferentes microorganismos fueron capaces de crecer.

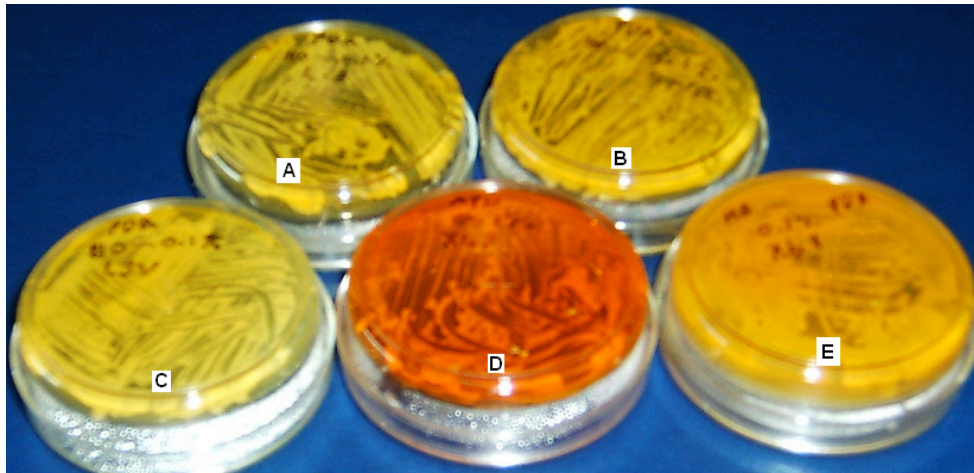


Figura 57: Cambios de color del medio de cultivo por acción de levaduras. Concentración HNAC: 0.5 mg/mL

El cambio de color producido en la placa marcada con la letra **A**, fue realizado por la cepa **L-8**, en las cajas **B**, **C**, **D** y **E**, se inocularon e incubaron por 24 h las levaduras: **L-10**, **L-3V**, **XL7** y **XB7** respectivamente. El cambio de color producido por la incubación con las diferentes levaduras nos hizo suponer que el sustrato era probablemente transformado por éstas. La comprobación de esta hipótesis llegó con la prueba de biorreducción en medio líquido de la HNAC.

Debido a que las levaduras no tuvieron problemas para desarrollar con 0.8 mg/mL del sustrato, se hizo una prueba empleando una cantidad más alta de sustrato (1.0 mg/mL). Las cepas que desarrollaron en esta concentración se enlistan en la tabla 10.

Tabla 10: Levaduras que desarrollaron en una concentración de 1.0 mg/mL de HNAC

Levaduras	Tiempo de incubación
XB6	24 h
XL6	24 h

En la tabla anterior se presentan las claves de las levaduras que fueron capaces de crecer en presencia de 1.0 mg/mL de la HNAC.

Lo destacado de esta prueba fue que se encontraron varias levaduras, aisladas a partir de mostos mezcaleros, capaces de crecer en presencia de 1 mg/mL del sustrato la HNAC. Aunque las mejores cepas de levaduras para desarrollar en presencia de este sustrato fueron las cepas **XB6** y **XL6** ya que crecieron en la concentración máxima usada tras 24 h. Respecto a los cambios de color en el medio de cultivo se pudo observar que la cepa **XB6**, producía una coloración más mucho más roja a la producida por la cepa **XL6**, lo que nos hizo pensar que quizás esta cepa era la mejor en realizar la biotransformación de la HNAC, lo cual se refutó con la prueba de biorreducción en medio líquido posteriormente realizada.

B) Bacterias: Las bacterias que crecieron y produjeron un cambio de color en el medio de cultivo, tras 24 h, en presencia de 0.5 mg/mL del sustrato, se enlistan a continuación.

Tabla 11: Resultados de la prueba de viabilidad de bacterias con 0.5 mg/mL de la HNAC

Bacteria	Color del medio de cultivo	Intensidad del cambio de color
<i>E.aerogenes</i>	Color café claro	++
<i>B. sp</i>	Color tamarindo	+++
<i>B. megaterium</i>	Amarillo-café claro	+
<i>B. subtilis</i>	Color tamarindo	+++
<i>Azotobacter sp</i>	Amarillo –café claro	+
<i>P. fluorescens</i> PMS2	Color café	++++
<i>P. fluorescens</i> : PMS3, PLe3, ZM2	Amarillo- naranja	++
<i>P. fluorescens</i> PAs2	Naranja	++++
XB1	Café claro	+
XB3	Amarillo-naranja	+++
XB4	Café claro	+

Para las bacterias no se efectuó ensayo con la concentración de 0.8 mg/mL de la HNAC. Sin embargo, si se hizo con la concentración de 1.0 mg/mL, los resultados se presentan en la tabla 12.

Tabla 12: Bacterias que desarrollaron en presencia de 1.0 mg/mL de la HNAC

Bacterias	Tiempo de incubación
<i>P. fluorescens</i> PMs3	24 horas
<i>P. fluorescens</i> Ple3	24 horas
<i>P. fluorescens</i> PZm2	24 horas
XB4	24 horas
XL2	24 horas
<i>B. subtilis</i>	24 horas
<i>B. sp</i>	24 horas

Como se observa en la tabla 12, son más las cepas bacterianas capaces de crecer con la concentración de 1.0 mg/mL de sustrato que las levaduras. No obstante, es preciso señalar que los cambios de color producidos por bacterias fueron más intensos que los derivados de la incubación con levaduras, dado que mientras las levaduras producían un color naranja, la mayoría de las bacterias cambiaron el color del medio de cultivo de amarillo paja a café.

A continuación, se comparan los cambios de color en el medio de cultivo realizados por las levaduras (cajas sin marca alguna), con los producidos por las bacterias (cajas petri con un rectángulo en negro), después de 24 h de incubación. La caja con un recuadro en blanco y negro es la usada de blanco. Se notan las diferentes tonalidades de color en las cajas petri, las más oscuras fueron inoculadas con bacterias (c, g y h, cepas *B. sp*, XB-4 y XL-2 respectivamente) mientras que los colores claros fueron producidos por las cepas de levaduras: L-8, XL-3, L-10, L-3V y XL6; a, b, d, e y f respectivamente (figura 58).

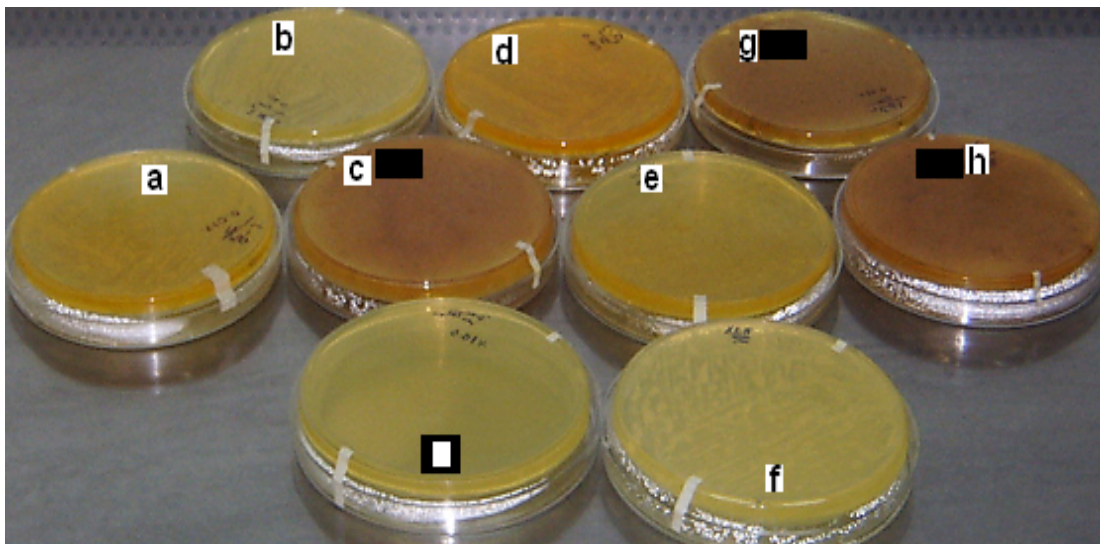


Figura 58: Comparación del cambio de color producido por las bacterias (cajas con rectángulo en negro), contra el procedente de la incubación con levaduras (cajas sin marca en negro)

En la figura 58, la caja con el recuadro negro y blanco es medio de cultivo no inoculado, pero incubado bajo las mismas condiciones de incubación que las levaduras y/o bacterias.

C) Hongos: De las dos cepas del hongo *P. chrysosporium* obtenidas, sólo una de estas fue capaz de crecer con la concentración de 0.1mg/mL del sustrato y no desarrolló en la concentración de 0.5 mg/mL. La cepa A 594, dio cambio de color en el medio de cultivo hasta los 7 días después de su inoculación en el medio sólido, lo que hizo que se descartará por emplear demasiado tiempo, en comparación con levaduras y bacterias.

De los resultados obtenidos fue muy interesante observar como casi la totalidad de las cepas manejadas en este trabajo fueron capaces de crecer en presencia de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida, un sustrato fuertemente donador de electrones, en la literatura no existen estudios acerca de la viabilidad de los microorganismos con este sustrato u otros similares para poder hacer una comparación entre estos y las concentraciones empleadas.

La prueba anterior fue necesaria para poder manejar una concentración que no resultará tóxica para el microorganismo, pero que al mismo tiempo nos permitiera evaluar la capacidad de los microorganismos en la biotransformación de este sustrato.

Para poder continuar con la siguiente parte del trabajo, la reducción en medio líquido, se tuvieron que elegir las cepas que produjeron el menor número de compuestos al término de la biotransformación de la HNAC. La manera como se verificó este punto fue con la ayuda de una lámpara de luz ultravioleta de doble longitud de onda (254 nm y 366 nm) marca CAMAG, pues inmediatamente después de eluir la ccf con la fase móvil se observaron los compuestos producidos en la biotransformación bajo la luz ultravioleta. Y se encontraron dos microorganismos con la capacidad de desarrollar en la concentración más alta del sustrato manejada en estas pruebas (1 mg/mL), y en 24 h de incubación, además de que produjeron el menor número de productos, las cepas elegidas fueron: la levadura **XL6** y la bacteria *P. fluorescens* **PZm2**.

Aunque en este trabajo no se evaluó la tasa de mortalidad de los microorganismos en presencia del sustrato y únicamente se valoró de manera cualitativa la viabilidad de los microorganismos en presencia de los sustratos, es muy importante mencionar que a excepción de un trabajo en el cual manipulan una concentración de 10 mM de 2-nitrobenzoato⁸², el resto de los estudios utilizaron concentraciones mucho más bajas del sustrato que es TNT principalmente.

Por ello, es de destacar que en este ensayo se usaron concentraciones de la HNAC entre 2 y hasta 6 veces mayores a las empleadas en otros estudios, sobre todo de biorremediación de TNT, — y aunque desafortunadamente no se cuenta con la comparación de la toxicidad entre HNAC y el TNT en un mismo microorganismo, sí se sabe que hay una gran cantidad de microbios que pueden realizar la biorreducción o la biodegradación total de este explosivo, contrario a lo poco que se conoce sobre la biotransformación de la HNAC por levaduras, y de hecho este sustrato y otros CAN sustituidos con grupos electrodonadores no son reducidos o lo son en muy bajo rendimiento bajo las condiciones publicadas en los estudios de biorreducción^{88,89}—, de ahí la importancia de este estudio.

Las concentraciones más altas de los CN empleadas en los trabajos de biorremediación encontrados en la literatura hasta estos momentos corresponden a Yoshie Hasegawa, y colaboradores, 2000⁸², ya que en su artículo publicaron la biodegradación de una concentración 10 mM de 2-nitrobenzoato. Por otro lado, Jain, M. R, y colaboradores, 2004⁹², usaron una cantidad diez veces menor 1mM de TNT, en otros ensayos usaron concentraciones menores (0.44 mM) tal es el caso de Zaripov S. A. y colaboradores, 2002⁹⁰. En general en la mayoría de los ensayos usan una cantidad promedio de 0.5 mM. Sin embargo para este trabajo se llegó a manipular una concentración máxima de 5.1 mM (1 mg/mL), con algunas cepas que fueron capaces de desarrollar en esta cantidad de sustrato. Pero la concentración usada en el ensayo, 2.55 mM, para la biorreducción en medio líquido de fue al menos mas de dos veces mayor a las empleadas en otros estudios.

5.3.1. Viabilidad en presencia de la MNAC

A excepción de la levadura RhM (*R. mucilaginosa*), el resto de las cepas microbianas (bacterias, hongos y levaduras), desarrollaron hasta una concentración de 0.5 mg/mL de la MNAC, pero no se observó cambio de color alguno en el medio de cultivo, como fue el caso de la HNAC. Luego, cuando se hizo la biotransformación sólo algunas cepas fueron capaces de llevar a cabo.

El resultado de la transformación se presenta en la figura 59. No obstante, ninguno de los productos de la reacción desarrolló un color que pudiera indicarnos la presencia de la amina o de la hidroxilamina, después de rociar el cromatofolio con solución de sulfato cérico. Los colores son indicadores posibles de aminas e hidroxilaminas al revelar la

cromatografía en capa fina (ccf), con solución de sulfato cérico van desde naranja, rojo y tonalidades de violeta. Los colores obtenidos en la ccf fueron varias tonalidades de café.

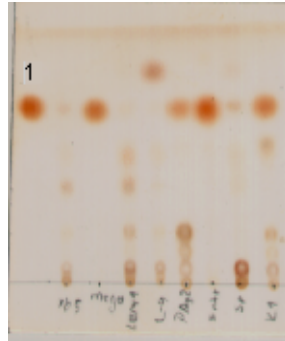


Figura 59: Biotransformación de la MNAC por levaduras (K-1, XB5, LEM-1), *Bacillus sp.*, *megaterium*, y *P. fluorescens* PAs2. Concentración de 0.5mg/mL de la MANC

En la figura 59, el carril número 1, representa el sustrato la MNAC, el resto de las aplicaciones son los productos obtenidos de la biotransformación por las únicas cepas, de las que se contó para este trabajo, capaces de transformar este sustrato. Debido a que los resultados obtenidos no fueron los esperados ya no fue necesario realizar la cinética de biorreducción de este sustrato aromático. Hay que aclarar que sí existió biotransformación de la MANC por ocho cepas microbianas, levaduras y bacilos principalmente, pero no hubo indicios de una biorreducción del grupo nitro (al revelar con sulfato cérico no se presentó la coloración que nos indicará la presencia de la amina o hidroxilamina).

5.4. PARTE IV: Biorreducción de la HNAC en medio líquido

La transformación con levaduras y bacterias se hizo con 0.5 mg/mL del compuesto nitrado. Esta prueba se hizo para saber si el cambio de color en el medio de cultivo estaba dado por el metabolismo del sustrato nitrado y para conocer si alguna cepa era capaz de realizar la reducción selectiva del grupo nitro de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida.

A) Levaduras: La biotransformación en medio líquido se efectuó con una concentración del sustrato de 0.5 mg/mL en un volumen de 10 mL. Para ello fue necesario normalizar la biomasa. Después, con la cantidad biomasa equivalente en los 3 matraces, se adicionó el sustrato y se continuó con la incubación bajo las mismas condiciones por 24 h más.

Cumplidas las 24 h de biotransformación, se procedió a identificar los productos de la transformación mediante comparación con estándares por la técnica de cromatografía en capa fina (figura 60).

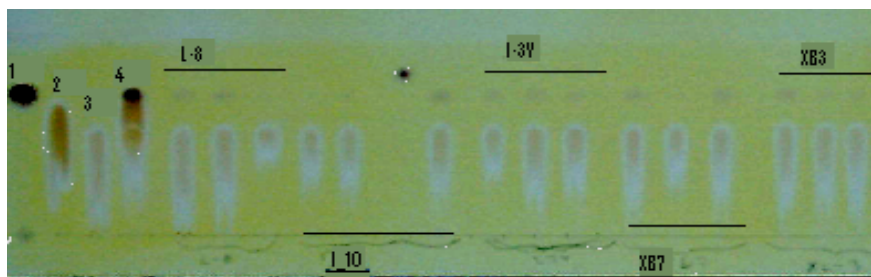


Figura 60: Biorreducción de la HNAC con levaduras. Concentración usada: 0.5 mg/mL

En la figura 60, se compararon de los productos de la biorreducción por levaduras (**L-8**, **L-10**, **L-3V**, **XB7** y **XB3**), con los estándares. En el carril **1**, es la aplicación del 4-amino-3-nitrofenol (precursor de la HNAC). El numero **2** es la HNAC. En el carril numero **3**, está aplicada la 4-hidroxi-2-aminoacetanilida (HAAC). La amina está totalmente caracterizada mediante las técnicas de RMN¹H, E M. El numero **4**, es la mezcla de los 3 compuestos juntos para verificar su desplazamiento en un mismo carril de aplicación. El resto de las aplicaciones observadas en la CCF, son los productos resultados de la biorreducción realizada por las levaduras. No obstante, se observa con claridad dos productos derivados de la biotransformación. El producto principal, la amina, y un segundo compuesto, el cual no ha sido caracterizado, en la parte superior del producto principal de la reducción. Al final de la biorreducción con las levaduras se propuso el siguiente esquema general de la transformación (figura 61).

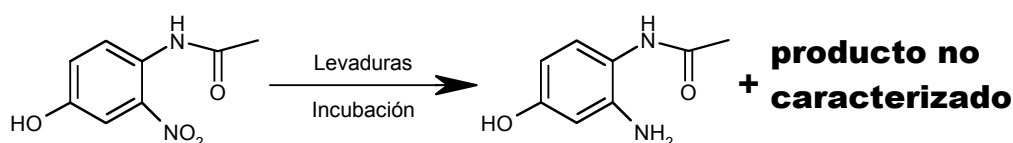


Figura 61: Diagrama de la biorreducción de HNAC por levaduras

Diagrama general de la biorreducción efectuada por las levaduras. El resultado: un producto principal, la amina derivada, y un segundo producto el cual varió su concentración de acuerdo con cada cepa de levadura.

De este primer ensayo de reducción con las levaduras se pudo seleccionar una cepa que tiene la clave **XL6**, posteriormente caracterizada como *S. cerevisiae* **A** (la letra **A** es para diferenciarla de la *S. cerevisiae* comercial) y que fue la propuesta para llevar a cabo la cinética de biorreducción de la HNAC. Esta cepa de *S. cerevisiae* **A**, se prefirió sobre el resto de las levaduras ya que al término de la transformación esta levadura produjo prácticamente un único producto, como puede observarse en la figura 62.

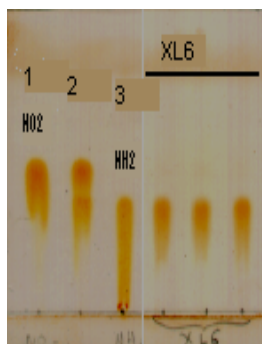


Figura 62: Biorreducción mediante la levadura **XL6** (*S. cerevisiae* A)

En la figura 62, se compararon los estándares (los números representan los carriles de aplicación de los estándares): HNAC en el carril **1**, mezcla del nitro (la HNAC) y la amina (HAAC), en el carril **2**, mientras que en el número **3** se encuentra únicamente la HAAC. Las tres aplicaciones restantes corresponden a la amina producida por la biorreducción con la mejor cepa de levadura encontrada en este trabajo.

Este resultado fue muy importante ya que al parecer la mayoría de las levaduras, con las que se contó para este trabajo, fueron capaces de hacer la biorreducción del grupo nitro de la HNAC, aún cuando algunas de estas produjeron un segundo producto, hasta el momento no identificado, pues es bien sabido por la literatura^{93,94} que hasta el día de hoy no existe un microorganismo capaz de llevar a cabo una buena biorreducción de CAN sustituidos con grupos electrodonadores y estas nuevas levaduras, aisladas a partir de mostos mecaleros, tienen la capacidad de hacerlo.

Es necesario aclarar que el procedimiento manejado en este trabajo para realizar la reducción fue diferente a los usados en la literatura. En la técnica publicada para hacer la biorreducción de CAN lo que generalmente se realiza es disolver 0.5 mmol del sustrato en acetona o acetona-etanol y se agrega a 10 g de levadura comercial previamente activada. La levadura habitualmente es liofilizada. La activación de la levadura se efectúa mezclándola con una solución amortiguadora (o simplemente agua destilada), y una fuente de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa) en una incubadora con agitación orbital a 150 rpm y 30°C, durante una hora. Esta desigual metodología, es quizás la diferencia entre reducción de un CAN con un grupo electrodonador como el $-\text{OH}$ y la no reducción. Pues mientras por un lado, se conoce la etapa de desarrollo del microorganismo, ya que fuimos nosotros quienes seleccionamos la edad en la que levadura realizaría la biorreducción. Por otro lado, no se conoce la etapa del desarrollo en la cual fue liofilizada la cepa y ello pudo haber influido

en cuanto a la maquinaria enzimática que presentó el microorganismo en la reacción, aún cuando el microbio liofilizado sea activado con una fuente de carbono de fácil asimilación como la glucosa o sacarosa.

B) Bacterias: Al igual que con las levaduras, fue necesario estandarizar la biomasa de las bacterias para la transformación y se realizó de la misma manera que se hizo con las levaduras, cambiando únicamente condiciones de incubación y medio de cultivo.

A continuación, se presentan los resultados de la transformación con las diferentes cepas de *Pseudomonas*, éstas fueron incubadas en medio líquido con una concentración de 0.5 mg/mL del sustrato (por triplicado), y una biotransformación con una concentración de 0.8 mg/mL del sustrato, el resultado es prácticamente el mismo al proporcionado por las levaduras, un producto principal la 4-hidroxi-2-aminoacetanilida (HAAC), y más derivados en menor concentración (figura 63).

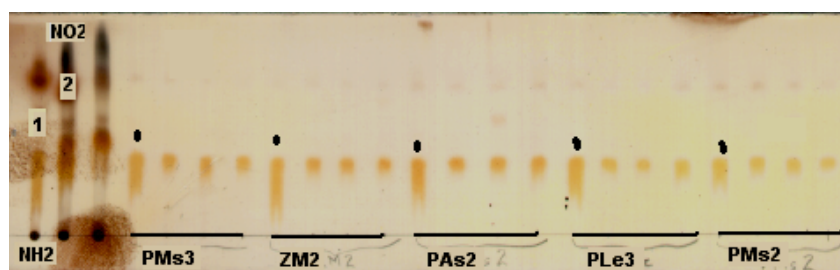


Figura 63: Biotransformación de la HNAC por las cepas de *Pseudomonas*

La figura 63, muestra los productos de la biotransformación con las diferentes cepas de *P. fluorescens*. El carril marcado con NH_2 y el numero **1**, representa la amina estándar, la marca de NO_2 y el numero **2**, es la HNAC y el resto de las aplicaciones corresponden a cada una de las cepas. Las aplicaciones un punto en negro, corresponden a la transformación con 0.8 mg/mL de la HNAC, el resto fue 0.5 mg/mL. Al igual que las levaduras las *Pseudomonas* producen un segundo sustrato el cual se puede observar en la parte superior de la ccf.

En la figura 64, se presentan los resultados de la biotransformación por las siguientes cepas bacterianas: *Bacillus sp*, *megaterium*, *subtillis*, *E. cloacae*, *Azotobacter sp* y Xb1. La concentración de la HNAC manejada para prueba fue de 0.5 mg/mL.

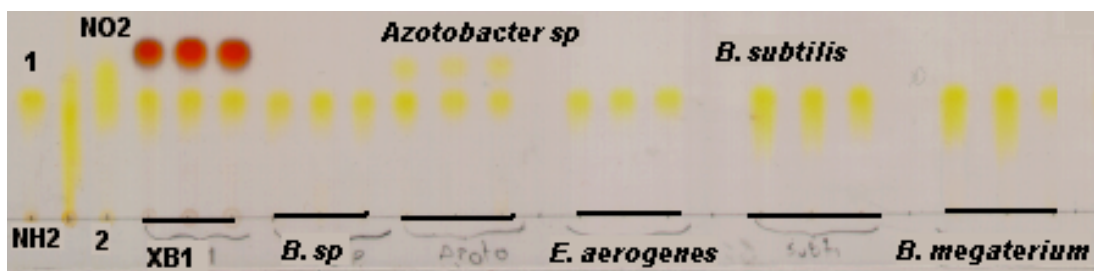


Figura 64: CCF de la transformación de la HNAC por cepas de bacterias

Donde: el carril marcado con **NH₂** y el número **1**, es la aplicación de la amina (HAAC), el marcado con el número **2** y **NO₂**, es el sustrato la HNAC, posteriormente se presentan las aplicaciones de los resultados de la biotransformación con las cepas bacterianas.

Las bacterias, al igual que las levaduras, efectuaron la reducción de la HNAC y además producen un segundo sustrato después de 24 h de incubación. Este segundo producto puede observarse claramente con las cepas XB1 y *Azotobacter sp* y es menos visible con los bacilos. En general las bacterias aparentemente efectuaron la misma biotransformación que las levaduras y por ello se propuso el siguiente esquema general de biorreducción de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida (figura 65), el cual es prácticamente el mismo al propuesto para las levaduras (figura 61).

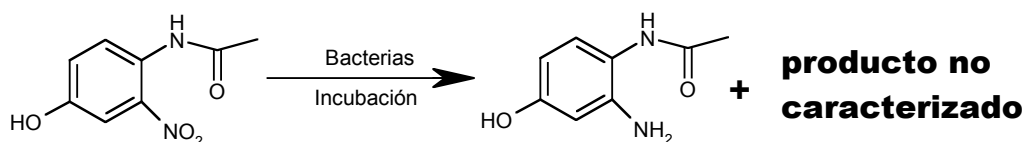


Figura 65: Esquema general de biorreducción de la HNAC por bacterias

De todas las cepas, finalmente, bacterianas se eligió, la *P. fluorescens* **ZM2**, por producir el menor número de productos a las 24 h de iniciada la incubación y además por ser capaz de desarrollar en la concentración de 1.0 mg/mL.

Al terminó de esta prueba ya se tienen seleccionadas las que podrían ser las mejores cepas para efectuar la biorreducción de la HNAC: la *S. cerevisiae* **A** y la *P. fluorescens* **ZM2**. Para poder afirmar lo anterior es necesario llevar a cabo la cinética de biorreducción y saber finalmente cual de las cepas es la mejor para biorreducir la HNAC.

5.4.1. Biorreducción de los nitro alcanos

Con la materia prima disponible se procedió a evaluar los microorganismos para saber cual o cuales de ellos serían capaces de efectuar la biorreducción de estos CALN. Sin embargo, debido al tiempo ya no se realizaron pruebas de viabilidad a ninguna de las cepas

microbianas y se optó por realizar directamente las pruebas de biorreducción con todas las cepas con las que se contaba para este trabajo. Las bacterias lácticas no fueron empleadas para la biorreducción de los CAN, debido a que no fueron obtenidos a tiempo y únicamente se emplearon la biorreducción de los CALN, y no biotransformaron a estos sustratos.

Es importante mencionar que el pH del medio de cultivo (medio L-B), en el cual se hizo la biotransformación era inicialmente neutro, pero después de crecer la bacteria, alrededor de 24 h, el pH aumentaba cerca de dos unidades hasta un pH final de 9, determinado únicamente con papel para la determinación del pH.

A) Biorreducción del FNPANO

Se emplearon dos concentraciones del FNPANO para la biorreducción, la primera fue de 0.5 mg/mL y la segunda prueba se hizo con la concentración de 0.3 mg/mL, pero ninguna de las levaduras, ni las bacterias, fueron capaz de realizar modificación alguna al sustrato, excepto la cepa de *E. coli*, que fue la única en dar resultado positivo en la transformación. Se usó una concentración de 0.3 mg/mL y después de 48 h se produce 1 producto principal y otros productos secundarios derivados de la oxidación del primero (figura 66).

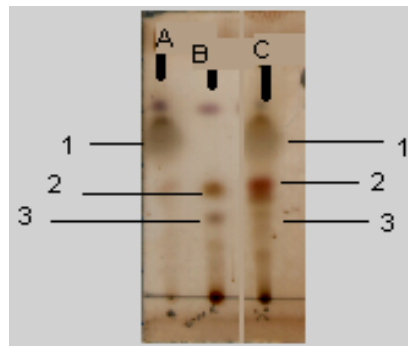


Figura 66: CCF de la biotransformación del FNPANO por *E. coli*. Concentración de sustrato: 0.3 mg/mL

Donde: el carril marcado con la letra **A**, representa la materia prima FNPANO (señalado con el número **1**). El carril **C**, es una muestra tomada después de 24 h de biotransformación, se pueden observar dos productos, principalmente, indicados con los números **2** y **3**, y el sustrato (número **1**), finalmente, el carril **B** es la biotransformación después de 48 h, en este carril ya no se observa materia prima y se distinguen 2 productos (**2** y **3**). El producto principal de la biorreducción es el que se indica con el número **3**, mientras que el producto **2**, proviene de la oxidación del primero.

Se efectuó el ensayo de biorreducción de 600 mg del FNPANO con la cepa de *E. coli*, y el resultado se presenta en la tabla 13.

Tabla 13: Cuantificación del crudo recuperado de la biotransformación del FNPANO

Cepa	mg FNPANO	Tiempo de incubación	Crudo recuperado	Rendimiento (%)
<i>E. coli</i>	600 mg	48 h	225 mg	37.5%

Después de obtener el crudo de la transformación se procedió a realizar la purificación de los 2 productos principales de la reacción (figura 66). La separación se efectuó en una cromatografía en capa fina preparativa y se obtuvieron finalmente 100 mg del producto marcado en la figura 66, con el número 2 y 120 mg del producto 3.

Por los resultados de las espectroscopias: se puede afirmar que hubo reducción parcial del grupo nitro del FNPANO, así como una hidroxilación del anillo aromático por parte de la cepa de *E. coli*. Probablemente, el principal producto de la biotransformación sea la hidroxilamina o la oxima, cual sea de los dos productos está hidroxilado (figura 67).

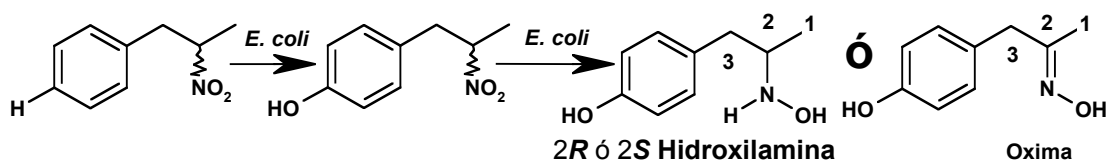


Figura 67: Posible biotransformación del FNPANO por *E. coli*

La bacteria *E. coli* inicia la transformación con la hidroxilación del anillo aromático en la posición 4 (-para), respecto a la cadena del hidrocarburo nitrado, y posteriormente lleva a cabo la reducción parcial del grupo nitro.

En el caso de que el producto principal fuera la oxima, no se logró obtener las aminas o hidroxilaminas aquirales, pues como se observa en la figura 67, la oxima tiene una doble ligadura entre el nitrógeno y carbono, esto hace que el carbono de la cadena alifática no sea un carbono quiral o centro estereogénico.

No obstante, se aislaron dos productos de la biotransformación del FNPANO con *E. coli*. El mejor identificado, es la 1-(4-hidroxifenil)-propanona, la cual es un subproducto que se forma por la oxidación química de la oxima o de la hidroxilamina.

A continuación, se presenta el mecanismo propuesto para la formación de la 1-(4-hidroxifenil)-2-propanona (FenCeto) partiendo de la oxima (figura 68).

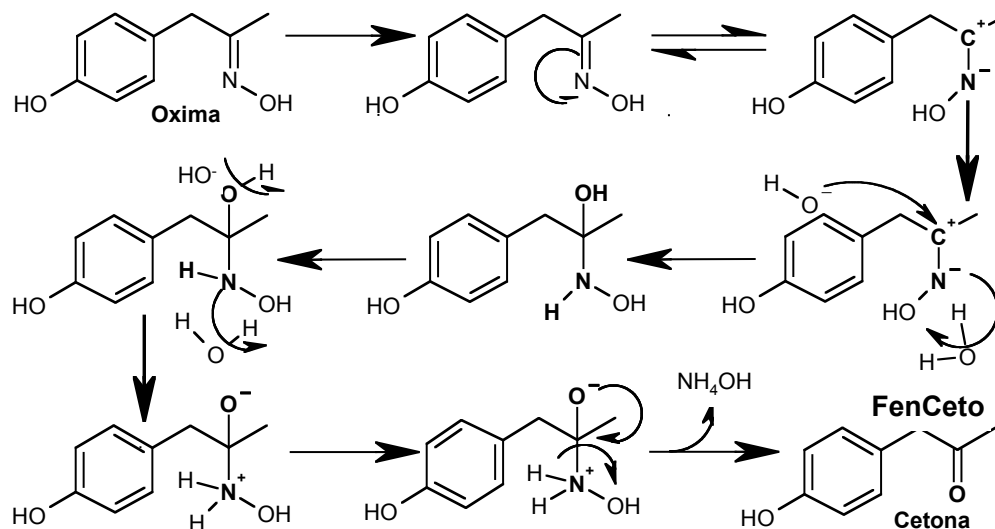


Figura 68: Mecanismo propuesto para formación de la 1-(3-hidroxifenil)-2-propanona, partiendo de la oxima

Por otro lado, en el caso de que el producto de la biorreducción sea la hidroxilamina, sería un avance muy importante en la biocatálisis, específicamente en la obtención de aminas o hidroxilaminas quirales a partir de reducción de grupos nitro de CALN, pues siendo este el caso, si se logró obtener la hidroxilamina quiral. Sin embargo, debido a la inestabilidad del mismo, las hidroxilaminas son muy inestables, no fue posible realizar una caracterización óptima del producto, ya que una vez purificado éste se oxidaba fácilmente y no se corroboró que fuera la hidroxilamina. En seguida se presenta el mecanismo propuesto para la formación de la **1-(4-hidroxifenil)-2-propanona (FenCeto)**, partiendo de la hidroxilamina (figura 69).

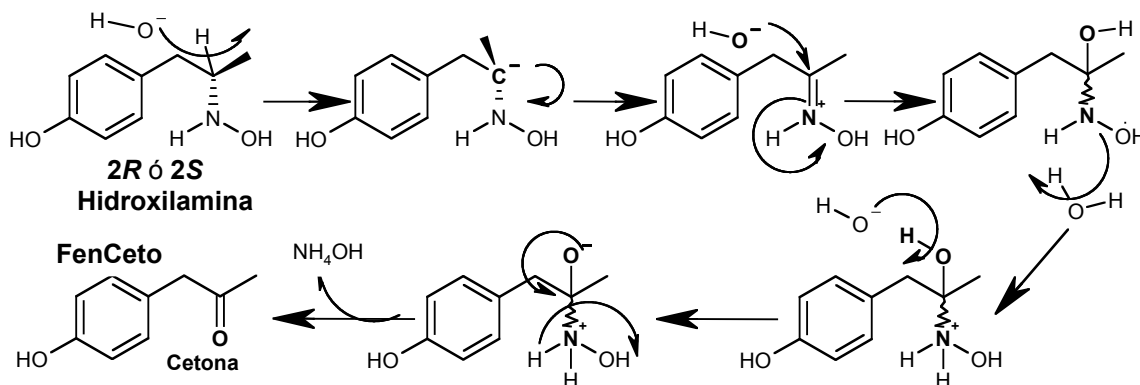


Figura 69: Mecanismo propuesto para la formación de la 1-(3-hidroxifenil)-2-propanona, partiendo de la hidroxilamina

B) Biorreducción del MDFNPANO

Al igual que el FNPANO, con el MDFNPANO se procedió inmediatamente a realizar la biorreducción con las cepas microbianas, sin hacer las pruebas de viabilidad. El resultado fue que a excepción de la bacteria *E. coli*, ninguna de las levaduras, ni el resto de las bacterias fueron capaces de hacer modificación alguna a éste sustrato.

La biorreducción se llevó a cabo con una concentración de 0.5 mg/mL del sustrato. Los productos de transformación después de 24 h, se presentan en siguiente ccf (figura 70).

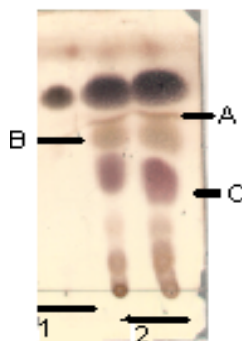


Figura 70: Productos de la biotransformación del MDFNPANO seleccionados para la caracterización

En la figura 70: el primer carril es el MDFNPANO, los carriles siguientes pertenecen a los productos de la biotransformación parcial. El compuesto **C**, es el principal y los señalados con las letras **A**, **B** provienen de la oxidación del primero.

Se realizó la biotransformación a una mayor escala con la finalidad de poder caracterizar los productos principales, para ello se empleo la misma concentración (0.5 mg/mL), y se incubó durante 48 h. En la figura 71, se comparan los compuestos producidos, tanto por reducción química, como por biotransformación del MDFNPANO.

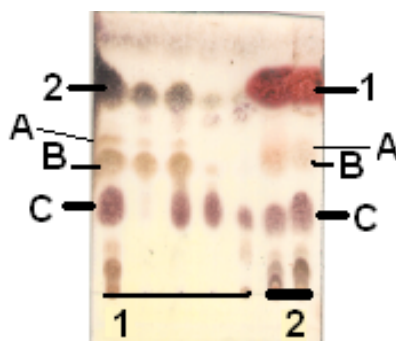


Figura 71: Comparación de productos de la biorreducción (*E. coli*), y la reducción química del MDFNPANO

En la figura 71, se observa, que ambas reducciones son muy similares, no obstante en las últimas 2 aplicaciones se observa claramente el compuesto producido de manera natural

por la bacteria. Los carriles marcados con la línea negra y el número **1**, pertenecen a la reducción química, mientras que los señalados con la línea negra más delgada y el **2**, corresponden a la biorreducción con la cepa de *E. coli*. Los números **1** y **2** que señalan directamente sobre los compuestos del primer y último carril representan: el metabolito producido por *E. coli* y al MDNPANO respectivamente; las letras **B** y **C** son los productos principales de ambas reacciones y como se observa presentan prácticamente las mismas características en el análisis cromatográfico.

En la tabla 14, se presenta los datos obtenidos de la cuantificación del crudo recuperado de la biotransformación del MDNPANO. Se empleó una cantidad de 600 mg del sustrato.

Tabla 14: Cuantificación del crudo recuperado de la biotransformación del MDNPANO

Cepa	mg MDNPANO	Tiempo de incubación	Crudo recuperado	Rendimiento (%)
<i>E. coli</i>	600mg	48 h	375mg	73.5%

Después de extraer el crudo de la transformación se procedió a realizar la purificación de los 3 productos principales de la reacción (figura 70). La separación se efectuó en una cromatografía en capa fina preparativa y se obtuvieron 35 mg del producto marcado con la letra **A**, 200 mg del producto **B** y 120 mg del compuesto **C** señalado en la figura 70.

Con los resultados de las espectroscopias: se puede afirmar que hubo reducción parcial del grupo nitro del MDNPANO, y se obtiene un único producto de la biotransformación, con la bacteria *E. coli*, la hidroxilamina o la oxima (figura 72).

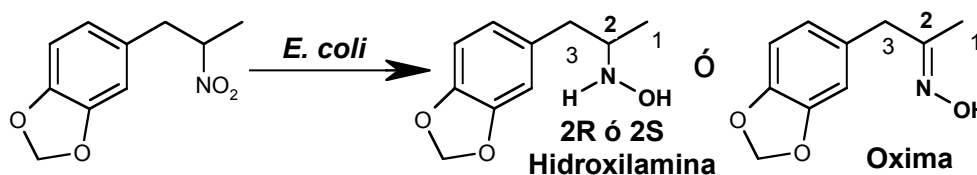


Figura 72: Posible biotransformación del MDNPANO por *E. coli*

Es muy importante mencionar que para este sustrato, la bacteria *E. coli* no realizó más que la biorreducción selectiva y parcial del grupo nitro del MDNPANO —pues para el FNPANO hizo la hidroxilación de la posición 4 del fenilo—, quizá porque la posición 4 del anillo aromático está siendo usada por el –metilendioxi- que ocupa los lugares 3 y 4 del anillo aromático.

Como resultado de la biotransformación del 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-nitropropano (MDFNPANO), al igual que para el FNPANO, también se tienen dos posibilidades de producto obtenido tras la incubación: la hidroxilamina o la oxima.

En el primer caso que el producto principal fuera la oxima: no se logró el objetivo de efectuar la resolución del centro quiral “carbono 2” (figura 72), ya que la oxima tiene una doble ligadura entre el nitrógeno y el carbono, esto hace que no sea carbono quiral.

No obstante, de la biotransformación del MDFNPANO con *E. coli*, se aislaron tres productos principales. —Por los resultados de la espectrometría de masas se descarto inmediatamente el producto A (figura 70), ya que tiene un peso molecular muy lejano al de la oxima e hidroxilamina—. Hasta ahora el compuesto mejor identificado, es la **1-(3,4-metilendioxfenil)-2-propanona** (producto B de la figura 70), la cual se sabe que es un subproducto que se forma por la oxidación química de la hidroxilamina o de la oxima.

A continuación, se presenta el mecanismo propuesto para la formación de la **1-(3,4-metilendioxfenil)-2-propanona**, partiendo de la oxima (figura 73).

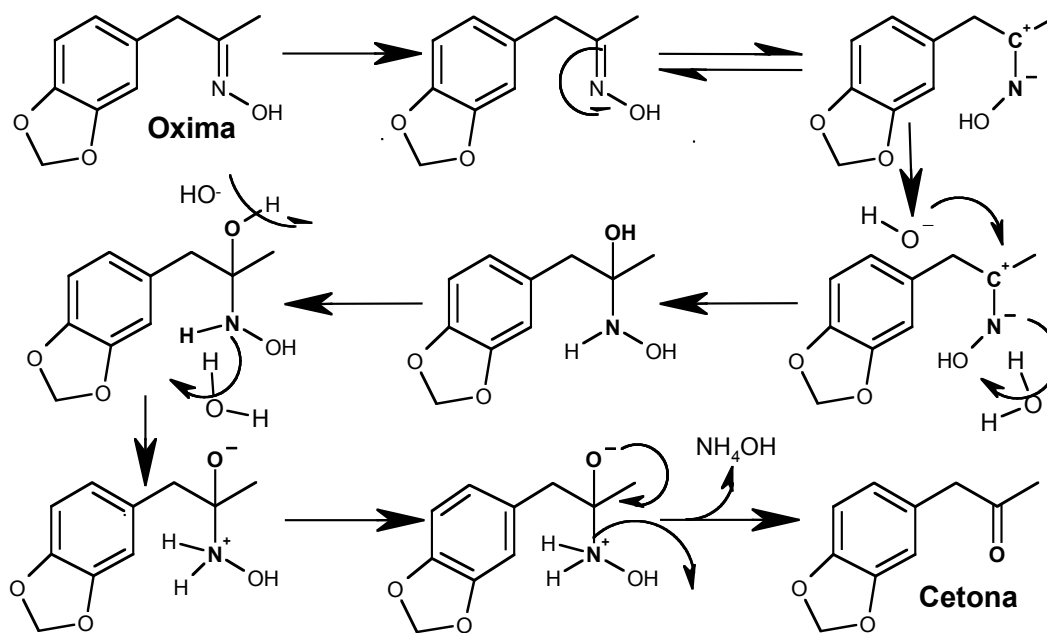


Figura 73: Mecanismo propuesto para la formación de la 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-propanona, partiendo de la oxima

En el segundo resultado, posible, de la transformación del MDFNPANO con *E. coli*, en el caso de que el producto sea la hidroxilamina, si se logró hacer la resolución del carbono 2 del MDFNPANO (figura 73). Sin embargo, al igual que en el primer sustrato, a

la inestabilidad del producto obtenido, las hidroxilaminas son muy inestables, no fue posible realizarle una caracterización óptima, ya que una vez purificado éste se oxidaba rápidamente y no se corroboró que fuera la hidroxilamina, e impidió realizar estudios posteriores a la misma molécula (experimentos de rotación óptica para saber si el isómero conformacional producido era el *R* o el *S*). En la figura 74, se presenta el mecanismo sugerido para formar la 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-propanona, a partir de la hidroxilamina.

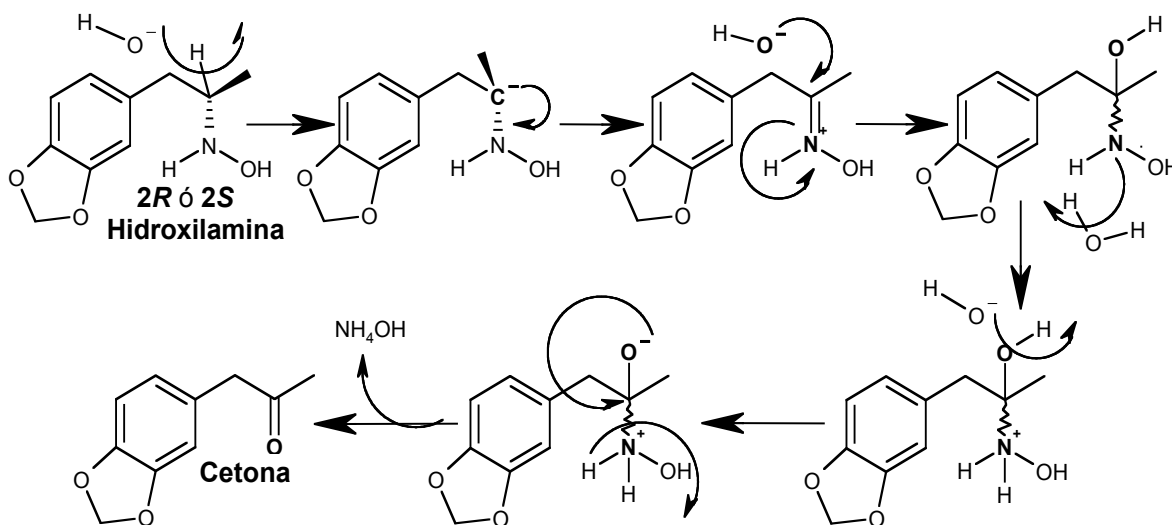


Figura 74: Mecanismo sugerido para la formación de la 1-(3,4-metilendioxfenil)-2-propanona, a partir de la hidroxilamina

El bajo rendimiento obtenido del producto principal en ambas biorreducciones se debe que se produjeron compuestos muy inestables, muy probablemente la hidroxilamina. Con base en lo publicado en la literatura, podemos proponer que la enzima que realizó la reducción parcial del grupo nitro de los sustratos alifáticos es una nitrorreductasa tipo I o de las insensibles al oxígeno, ya que estas enzimas producen tanto la hidroxilamina como la amina⁹⁹, además se sabe que la bacteria *E. coli*, produce este tipo de enzimas, de hecho, en este microorganismo se identificó la primer nitrorreductasa sensible al oxígeno⁹⁵.

El resultado alcanzado es muy alentador, y aporta una nueva alternativa a la reducción química de los compuestos nitrados y es muy posible que pronto se encuentre algún microorganismo capaz de efectuar la reducción selectiva del grupo nitro de los compuestos alifáticos nitrados.

5.5. PARTE V: Biorreducción de la HNAC a escala preparativa

Antes de realizar la biorreducción a escala preparativa se llevo a cabo un estudio simple de reducción de la HNAC mediante las cepas: *S. cerevisiae* A y la bacteria *P. fluorescens* ZM2, ver anexo III, las cuales demostraron en la prueba de reducción en medio líquido, producir el menor número de productos tras 24 h de incubación. El resultado de este ensayo fue que la *S. cerevisiae* A, resulto ser el mejor microorganismo para la reducción de la HNAC ya que no continúa con el metabolismo del producto principal, la amina (HAAC). La finalidad de este ensayo fue conocer la mejor cepa para realizar de manera más científica la cinética de reducción y se encontró que la cepa de levadura aislada y caracterizada en el laboratorio de trabajo fue la que presento las mejores características, — ya que produjo el menor numero de productos y no continuó con la degradación de la amina —, para efectuar de manera más controlada la cinética de reducción de la HNAC.

Con el microorganismo seleccionado, la cepa de levadura XL6, y caracterizada como *S. cerevisiae* A, se procedió a realizar la biotransformación a escala preparativa de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida. Los resultados se presentan en la tabla 15.

Tabla 15: Resultados de la biorreducción a es cala preparativa de la HNAC con *S. cerevisiae* A

Cepa	Sustrato (g)	Producto (g)	Rendimiento (%)
<i>S. cerevisiae</i> A	1.6g	1.106	85

La tabla 15, muestra los resultados de la biorreducción de 1.6 g de la HNAC con la cepa de *S. cerevisiae* A, aislada e identificada en nuestro laboratorio. Este microorganismo produjo un rendimiento del 85% del producto completamente puro.

5.6. PARTE VI: Cinética de biotransformación de la HNAC

Al igual que en la biotransformación a escala preparativa, para poder llevar a cabo la cinética de biorreducción nos basamos en el ensayo de reducción con las cepas *S. cerevisiae* A y la bacteria *P. fluorescens* ZM2, ver anexo III. Una vez seleccionada la cepa de trabajo y con la finalidad de conocer el tiempo y concentración final de la amina, se realizó la cinética de biotransformación de la HNAC, mediante la levadura recién caracterizada en nuestro laboratorio de trabajo como: *S. cerevisiae* A (se le adicionó la letra A al final del nombre únicamente para diferenciarla de la cepa comercial).

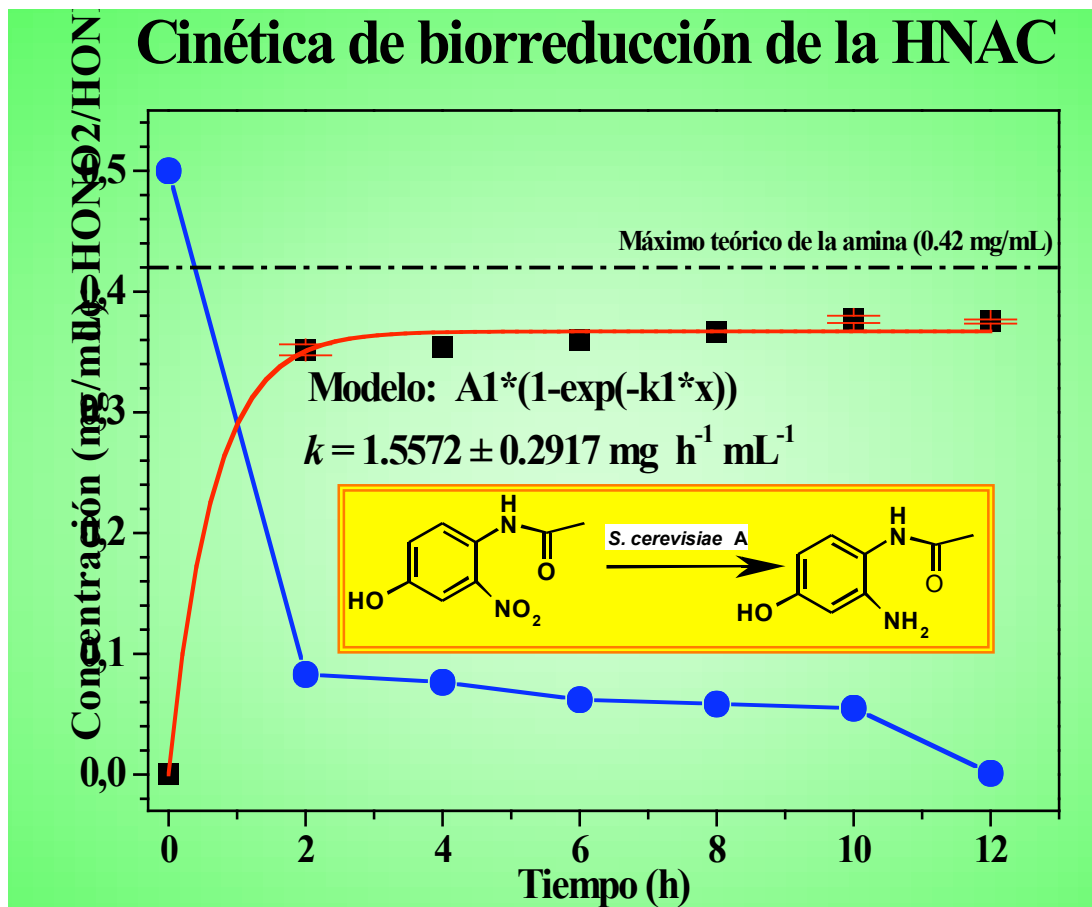


Figura 75: Cinética de biorreducción de la HNAC por la *S. cerevisiae* A

En la figura 75, se muestra el gráfico de la cinética de reducción de la HNAC con la *S. cerevisiae* A. Cada punto, en negro, es la concentración del producto la 4-hidroxi-2-aminoacetanilida (HAAC), en miligramos (mg), a cada turno de muestreo. Se determinó también el número de microorganismos presentes en cada muestra analizada, ver anexo II.

Para la cuantificación de la amina se realizó una curva patrón previamente en la cual se graficó la concentración de la amina contra la respuesta en el HPLC, para ver las curvas ir al anexo I. La cantidad del producto en cada tiempo de muestreo y la concentración final total fue calculada mediante la ecuación proporcionada por el programa del equipo HPLC, después del ajuste lineal de los datos obtenidos de la cinética. A continuación, se presenta la curva patrón con la que se calculó la 4-hidroxi-2-aminoacetanilida (HAAC), en cada punto del muestreo en la cinética: $Y = 2,21e+007 X + 9,71e+004$, $R: 0,999212$.

En la tabla 16, se muestra el resultado de la cinética de reducción de la HNAC, el cálculo teórico de los miligramos de la amina a alcanzar y la cantidad real obtenida en porcentaje y en miligramos calculadas mediante ayuda del HPLC.

Tabla 16: Resultado de la cinética de biorreducción de la HNAC por *S. cerevisiae* A

Cepa	mg de HNAC a biorreducir	Tiempo de incubación	mg teóricos del producto	mg reales calculados (HPLC)	Rendimiento máximo (%)
<i>S. cerevisiae</i> A	0.5 mg/mL	2 h	0.42	0.351	83.7
		26 h		0.387	91.4

Los resultados obtenidos de la cinética son muy importantes, la reacción ocurre con una constante de velocidad calculada en: 1.557 ± 0.221 mg/h·mL, con la *S. cerevisiae* A, y para las 2 h de incubación se tiene ya el 83.7% de la amina, cuando se usa una concentración de 0.5 mg/mL. Es necesario considerar que esta cinética fue casi tan rápida como las obtenidas en otros trabajos de investigación⁶⁹, efectuados en el mismo laboratorio de trabajo, pero esta *S. cerevisiae* A produce mayor rendimiento del producto.

Por otro lado, la diferencia de este estudio, con otras pruebas de biotransformación está dada por usar el microorganismo previamente crecido y no levadura liofilizada activada, lo que puede significar mayor ventaja, debido a la maquinaria enzimática activa, a la hora de la biotransformación, —esto puede influir, también, en porqué en las transformaciones reportadas en la literatura, la levadura *S. cerevisiae* no reduce CAN sustituidos con grupos electrodonadores—, además de que la levadura utilizada fue aislada y caracterizada por el equipo de trabajo y puede presentar diferencias genéticas respecto a la comercial, lo cual se podría comprobar mediante estudios de biología molecular.

Con el antecedente de que la cepa comercial de *S. cerevisiae*, no reduce compuestos aromáticos nitrados sustituidos con grupos donadores de electrones, se procedió a realizar una comparación entre este microorganismo, la *S. cerevisiae* A, aislada y caracterizada en nuestro laboratorio y la bacteria *E. coli*.

5.6.1. Comparación entre: *S. cerevisiae* (comercial), *E. coli* y la *S. cerevisiae* A

De la literatura se conocen los siguientes antecedentes:

1. *E. coli*, tiene la capacidad de producir enzimas nitrorreductasas (NR), y por lo tanto es muy probable que realizará la reducción de la HNAC.
2. *S. cerevisiae* comercial no realiza la reducción de compuestos aromáticos nitrados sustituidos con grupos electrodonadores^{88,89}.

Para llevar a cabo la prueba de comparación con estos microorganismos (*S. cerevisiae* y *E. coli* y la *S. cerevisiae* A) fue necesario manejar condiciones similares con las que se

venían manejando en este estudio. Se emplearon: medio YM y L-B, para levaduras y la bacteria respectivamente. Luego entonces, fue necesario sembrar a la cepa comercial en medio YM, esperar a que desarrollara durante 24 h. Posteriormente, se resembró una vez más la cepa en medio de cultivo nuevo y se procedió a la estandarización de la biomasa para continuar con la biotransformación en sí.

Con la biomasa de las tres cepas estandarizadas se adiciono 0.8 mg/mL del sustrato y se comprobó a las 24 h de incubación. Los resultados se presentan a continuación (figura 76).

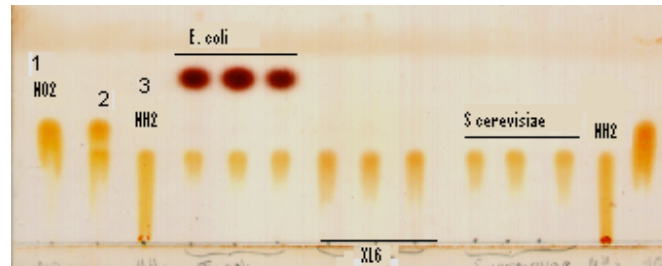


Figura 76: Reducción de la HNAC con *E. coli*, la *S. cerevisiae* A y la *S. cerevisiae* comercial

Donde: el número 1 pertenece a la aplicación de la HNAC, el numero 2 a mezcla de la HNAC y HAAC, el número 3 corresponde a la amina (HAAC). El resto de las aplicaciones son los triplicados de la biorreducción por la *E. coli*, la cepa *S. cerevisiae* A y la levadura comercial *S. cerevisiae*.

Como se observa en la figura 76, en contraste a lo reportado por A. Blackie Josie y colaboradores⁸⁸ y Navarro-Ocaña y colaboradores⁸⁹, la cepa comercial de *S. cerevisiae* reduce a un CAN sustituido con un grupo fuertemente electrodonador. No obstante, hay que aclarar que las condiciones utilizadas en la publicación no fueron las mismas a las empleadas en esta investigación. Es necesario recordar que existen diferencias en cuanto al estado viable entre la levadura utilizada en este ensayo y la empleada en otras pruebas^{93, 94}, porque fue la misma cepa comercial que en estudios anteriores no hizo la reducción. Este nuevo resultado obtenido de la “*S. cerevisiae* comercial” puede ser atribuido al hecho de haber revitalizado la levadura mediante la resiembra, pues muy seguramente este proceso implicó la activación total de su metabolismo y esto se reflejó en la reducción de la HNAC, y esto no ocurre cuando la cepa es activada, durante 1 h, para efectuar la biotransformación.

5.7. Reducción de otros CAN

Esta parte del trabajo se dejo al final debido ya que fue necesario contar con las mejores cepas para no tener que hacer una nueva selección de los microorganismos. Por ello, con

los mejores microbios seleccionados las cepas de: *E. coli*, *S. cerevisiae* A, y *P. fluorescens* Zm2, se hizo la prueba de biotransformación de los siguientes compuestos nitrados, ver figura siguiente.

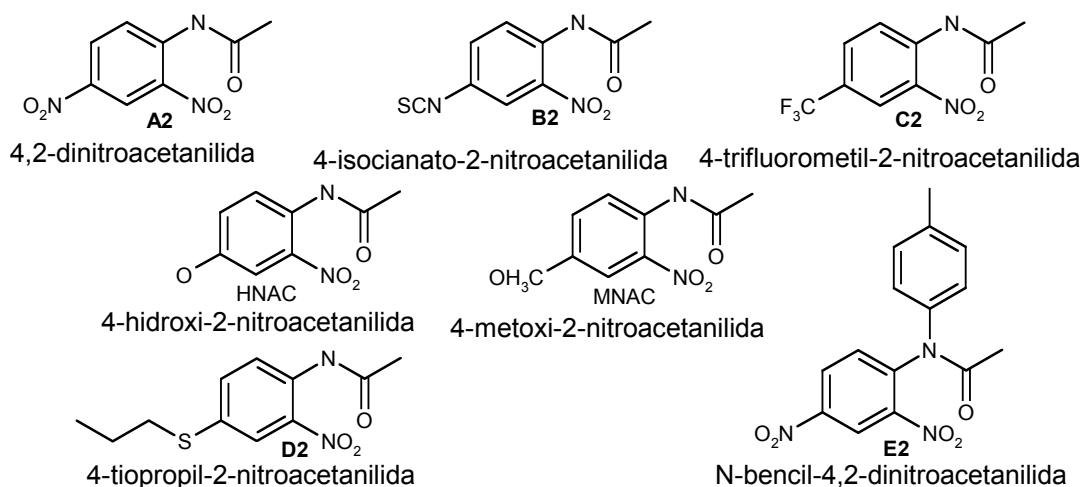


Figura 77: CAN sometidos a biorreducción con: *E. coli*, *P. fluorescens* Zm2 y *S. cerevisiae* A

La figura 77, muestra las estructuras químicas de los CAN sometidos a transformación con las cepas microbianas de *E. coli*, *S. cerevisiae* A y *P. fluorescens* Zm2. En todas las pruebas se empleó una concentración de los sustratos de 0.5mg/L y fue llevada a cabo en un volumen de 10 mL y durante 24 h de incubación en condiciones controladas, todos estos ensayos se hicieron por duplicado, los resultados se resumen en la tabla 17.

Tabla 17: Resumen de reducción de los CAN (figura 77), por las cepas de *E. coli*, *P. fluorescens* Zm2 y *S. cerevisiae* A

Microorganismo	A2	B2	C2	D2	E2	G2	HNAC	MNAC
<i>E. coli</i>	No	Si	Si	Si	No	No	Si	--
<i>S. cerevisiae</i> A	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
<i>P. fluorescens</i> Zm2	No	--	No	--	no	No	Si	Si

Como se puede observar en la tabla 17, la cepa de levadura aislada y caracterizada en nuestro laboratorio, *S. cerevisiae* A, fue la que al final aportó los mejores resultados en cuanto a la reducción de compuestos aromáticos nitrados, pues hizo la reducción de 6 de los 7 compuestos con los que se probó, mientras que la segunda mejor *E. coli*. Y finalmente, la bacteria *P. fluorescens* ZM2, que únicamente fue capaz de reducir a la HNAC, no obstante si transformó a la MNAC, sin que conozcamos exactamente el derivado de esta reacción,

debido a que no se continuó con el estudio de este sustrato. Lo importante de este ensayo es que tanto la *E. coli*, como la de *S. cerevisiae* A, fueron capaces de reducir a los CAN sustituidos con grupos donadores de electrones D2. El rendimiento de la biorreducción para este sustrato fue del 50%, el resultado es similar y no mejor, desafortunadamente, a los divulgados en la literatura para cuando existen este tipo de sustituyentes en el anillo aromático¹²⁰⁻¹²². En la literatura mencionan tiempos de reacción hasta de 48 h y los rendimientos que se obtienen generalmente son menores⁸⁴, cuando se usa la *S. cerevisiae* comercial. En nuestro caso el tiempo de incubación fue únicamente de 24 h y el rendimiento fue muy similar a los publicados en la literatura. Sin embargo, una vez más aclaramos la diferencia principal en las metodologías usadas para realizar las reacciones de biotransformación: en las publicaciones usan levadura liofilizada la cual activan 1 h antes de adicionar el sustrato a transformar; en nuestro trabajo se utilizó la cepa con 24 h de crecimiento previo, lo cual implica que la maquinaria enzimática presente en el microorganismo, sea más activa que la presente en la cepa reactivada, a la hora de efectuar la biotransformación, y desde luego, esto se demuestra con los resultados obtenidos.

Este ensayo nos permitió encontrar al menos 3 cepas, dos bacterias y una levadura, capaces de realizar la biorreducción de la HNAC, y de otros compuestos aromáticos nitrados sustituidos, con rendimientos superiores al 50% de la amina, cuando se utiliza una concentración de sustrato de 0.5 mg/mL. Pero, por los resultados de las pruebas de viabilidad y el ensayo previo de biorreducción las cepas de *P. fluorescens* ZM2 y la *S. cerevisiae* A, son aptas para efectuar la reducción de una concentración a mayor 0.5 mg/mL de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida.

Se caracterizó levadura capaz de efectuar la biorreducción selectiva de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida en tiempo de 2 h y suministrando el 83.7% de la amina, cuando se maneja una concentración del sustrato de 0.5 mg/mL. Fue posible comprobar que la levadura comercial *S. cerevisiae*, bajo las condiciones empleadas en este estudio, es capaz de llevar a cabo la reducción selectiva de una concentración de 0.8 mg/mL de un CAN sustituido con un grupo fuertemente donador de electrones: la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida.

Se encontró también que la bacteria *E. coli* fue la única que transformó los compuestos alifáticos nitrados (1-fenil-2-nitropropano y 1-(3,4-metilenedioxifenil)-2-nitropropano.

6. Conclusiones

- ✓ Todas las cepas, a excepción de *R. mucilaginosa*, desarrollaron en presencia de 0.5 mg/mL de la HNAC.
- ✓ Se demostró que la mayoría de las cepas empleadas en este trabajo fueron capaces de realizar la biorreducción selectiva del grupo nitro de la HNAC.
- ✓ La *S. cerevisiae* A, aislada y caracterizada en nuestro laboratorio, fue la mejor cepa para la biorreducción de los compuestos aromáticos nitrados propuestos.
- ✓ La *S. cerevisiae* A, efectuó la reducción de una concentración de 0.5mg/mL de la HNAC con una constante de velocidad de 1.557 mg/mL·h.
- ✓ La bacteria *E. coli* fue el único microorganismo, de los que se obtuvieron para este ensayo, capaz de biotransformar los compuestos alifáticos nitrados.
- ✓ No se logró caracterizar al compuesto directo de la biotransformación de los CALN con la *E. coli*, pero los indicios encontrados nos indican que se trata de la oxima o de la hidroxilamina.
- ✓ La *E. coli*, realizó la hidroxilación del anillo aromático en la posición *para*- respecto a la cadena alifática y la reducción parcial del grupo nitro del 1-fenil-2-nitropropano.
- ✓ Las cetonas identificadas en la transformación de los CALN, provienen de la oxidación del producto directo de la biotransformación.
- ✓ La reducción de los sustratos aromáticos nitrados sustituidos con grupos donadores de electrones no tiene un patrón a seguir (como el caso de nitro aromático sustituido con grupos atractores de electrones). Es decir, es necesario realizar una selección de los microorganismos para cada uno de los sustratos.
- ✓ La cepa de levadura *S. cerevisiae* A, tiene mayor capacidad de reducción de sustratos nitrados aromáticos con electrodonadores que las cepas de: *E. coli*, *P. fluorescens* Zm2.

7. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

- ✓ Efectuar un estudio más preciso de la biotransformación de la 4-metoxi-2-nitroacetanilina (MNAC).
- ✓ Estudiar la enzima o enzimas, presentes en la *S. cerevisiae* A, responsables de la reducción de la HNAC.
- ✓ Confirmar si la bacteria *E. coli*, realiza la biorreducción de otros compuestos alifáticos nitrados y buscar la o las enzimas que llevan a cabo la reducción.
- ✓ Investigar la manera de estabilizar el producto de la biorreducción de los nitro alcanos, para evitar su oxidación, e identificarlos completamente.
- ✓ Realizar la biotransformación de los nitro alcanos en diferentes condiciones, extractos bacterianos, anaerobiosis, y utilizar microorganismos, diferentes a los usados, para efectuar la biorreducción.

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Fuji K., M. Node. *Synlett*, **1991**, 603-610.
- [2] Ho T. L. *J. Org. Chem.* **1977**, 42:23, 3775.
- [3] Strauss M. J. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **1979**, 18:3 158. TECHNICAL REVIEW.
- [4] Olguín-Contreras, L. F. **2001**. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM, México.
- [5] Prasun K., Pradhan, Sumit Dey, Parasuraman Jaisankar, and Venkatachalam, S. Giri. *Synth. Commun.* **2005**, 35, 913-922.
- [6] Adams J., J. R. Paterson. *J. Chem. Soc. PerkinTrans. 1.* **2000**, 3695-3705
- [7] Kozikowski, A.P., **1996**, in "Comprehensive heterocyclic chemistry", Katritzky, A. R., C. W. Rees, Eds Pergamon Press, Oxford, Vol 1, 2 y 3.
- [8] Preston, P N., and Tennant, G. *Chem. Rev.* **1972**, 72, 627.
- [9] Mundla, S. R. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 4277-4279.
- [10] Frazén, R. G. *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 195-214.
- [11] Phillips, G. B. and Wei G.P. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 4887-4890.
- [12] P. Kilburn John, J. Lau & C. F. J. Raymond. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 5419-5421.
- [13] Wlin Huang and Robert M. Scarborough. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 2665-2668.
- [14] Mazurov A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 67-70
- [15] Wolff M. E **1997**. Nematode diseases and drugs active against them. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. 5^a ed., John Wiley and sons inc. V. 4, 400-402.
- [16] Navarrete-Vásquez G., Cedillo R., Hernández-Campos A., Yépez L., Hernández-Luis F., Valdez J., Morales R., Cortés R., Hernández M and Castillo R. *Bioorg. Medic. Chem. Lett.* **2001**, 11, 187-190.
- [17] Tebbe M. J., Spitzer W. A., Victor F., Miller S., Lee C. C., Sattelberg T. R., McKinney E. and Tang J. J. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3937-3946.
- [18] Hong Y., Tanoury G. J., Wilkinson H. S., Bakale R. P., Wald S. and Senanayake C. H. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5607-5610.
- [19] Kubo K., Inada Y., Kohara Y., Sugiura Y., Ojima M., Itho K., Furukawa Y., Nishikawa K. and Naka T. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 1772-1784.
- [20] Cheng J. B., Cooper K., Duplantier A., Egglar J., Kraus K., Marshall S., Marfat A., Masamune H., Tickner J., Umland J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 1969-1972.

- [21] Estrada-Soto Samuel, Rafael Villalobos-Medina, Francisco Aguirre-Crespo, Jorge Vergara-Galicia, Hermenegilda Moreno-Díaz, Mariana Torres-Piedra, Gabriel Navarrete-Vázquez. *Life Sci.* **2006**, 79, 430-435.
- [22] Ramla M. Mostafa, Mohamed A. Omar, Abdel-Momen M., El-Khamry and Hoda I. El-Diwani. *Bioorg Med. Chem.* **2006**, 14, 7324-7332.
- [23] Kaiya Toyo, Kei Nakamura, Masaru Tanaka, Naoki Miyata and Kohfuku Kohda. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52 (5), 570- 576.
- [24] Wen-Bing Yeh, Mei-Jung Lin and Chung-Ming Sun. *Comb. Chem. & Throughput Screening.* **2004**, 7, 251-255.
- [25] S. Van Valliet David, Paul G., and Jan J. S. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 6741-6743.
- [26] Songnian Lin and Lihu Yang. *Tretrahedron Lett.* **2005**, 46, 4315-4319.
- [27] Chen-Hao Wu and chung-Ming Sun. *Tretrahedron Lett.* **2006**, 47, 2601-2604.
- [28] Booth G., **1991**, *Nitrocompounds, Aromatic*. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. VCH, V. A17, pp. 411-412.
- [29] Hudlicky M. *Reductions in organic chemistry. Am. Chem.Soc.* **1999**, 91-101.
- [30] Wilkinson, H. S., Hett, R., Tanoury, G. J: Senanayake, C. H. and Wald, S.A. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, 4, 567-570.
- [31] Studer, M. Neto, S. and Blazer, H. U. *Top. Catal.* **2000**, 13, 205-212.
- [32] Tafesh A. M. and Weiguny J. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2035-2052.
- [33] J. R Kosak, in: W. H Jones (ed), *Catalysis in Organic Synthesis*, Academic Press, New York, **1980**, p, 107.
- [34] B. Chen, U. Dingerdissen, J. G. E. Krauter, H. G. J. Lansink Rotgerink, K Möbus, D.J. Ostgard, P. Pansterm, T. H. Riermier, S. Seebald, T. Tacke, H. Trauthwein. *Appl. Catal. A* **2005**, 280, 17-46.
- [35] Yasuhara A., Kasano A. and Sakamoto T. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 2301-2303
- [36] Marc O. Terpkko and Richard F. Heck. *J. Org.Chem.* **1980**, 45, 4992-4993.
- [37] Wulfman D. S., and Cooper C. F. *Synth.* **1978**, 924-925.
- [38] Knifton J. F. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 1200-1206.
- [39] Ayyangar N., Kalkote U. R., Lugade A. G., Nikrad P. V. and Sharma V. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, 56, 3159-3164.

- [40] Porter H. K. *Org. Reac.* **1973**, 20, 455-481.
- [41] Ono A., Terasaaki S and Tsuruoka Y. *Chem. Ind.* **1983**, 477-478.
- [42] Ono A. and Kitazawa Y. *Chem. Ind.* **1983**, 826.
- [43] Yasushi K., Yoshikazu I and Norihiro T. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2001**, 12, 309-318.
- [44] Anil K. Saika, Nabin C. Barua, R.P. Sharma, Anil C. Ghosh. *Synth.* **1944**, 785-786.
- [45] Manabu Node, Akichika Itoh, Kiyoharu Nishide, Hitoshi Abe, Takeo Kawabata, Yukio Masaki, Kaoru Fuji. *Synth.* **1992**, 1119-1124.
- [46] Wing –Wah Sy, and Arnold W. By. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1193-1196.
- [47] Hitomi Suzuki and Tadashi Mori.. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6498-6502.
- [48] Sag-sup J., Hee-doo K., Young-sang C. and Chae-ho C. *Chem. Lett.* **1986**, 1747-1748.
- [49] Kaoru Nakamura, Masayuki Fujii, Shinzaburo Oka, Atsuyoshi Ahno. *Chem. Lett.* **1985**, 523-526.
- [50] Hidenori C., Yasuhiro M. and Kazuyoshi I. *Synth. Commun.* **1985**, 15 (6), 527-533.
- [51] Anup Bhattacharjya, Ranjan M., Satyesh C. Pakrashi. *Synth.* **1985**, 886-887.
- [52] Achintya K Sinhababu & Ronald T. B. *Tetrahedron Lett*, **1983**, 24, 3, 227-230.
- [53] Sema L. Ioffe, Il'ya M. Lyapkalo, Alexander A. Tishkov, Vitaliy M. Danilenko, Yuri A. Strelenko and Vladimir A. T. *Tetrahedron*, **1997** Vol. 53, No. 38, pp. 13085-13098.
- [54] Brindaban C. Ranu and Alakananda Hajra. *Tetrahedron*. **2001**, 57, 4767-4773.
- [55] Sadri A. Said and Anne Fiksdahl. *Tetraedron Asymmetry*. **2001**, 12, 1947-1951.
- [56] Shankare Gowda and D. Channe Gowda. *Tetrahedron*. **2002**, 58, 2211-2213.
- [57] Siya Ram and Richard E. Ehrenkauffer. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 3415-3418.
- [58] Hoogenraad Marcel, Johannes B. Van der Linden, and Alan Smith. *Org. Proc. Res. Dev.* **2004**, 8, 469-476.
- [59] James George and S. Chandrasekaran. *Synth. Commun.* **1983**, 13 (6), 495-499.
- [60] Osby O. John and Bruce Ganem. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 52, 6413-6416.
- [61] Gutman L. Arie, Marina Etinger, Gennady Nisnevich and Felix Polyak. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1998**, 9, 4369-4379.
- [62] Leroux Mary-Lorène, Thierry Le Gall and Charles Miokowski. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2001**, 10, 1817-1823.

- [63] Brailowsky, S. *Las sustancias de los sueños: neuropsicofarmacología* **1995**. Colección la Ciencia desde México, núm. 130, Fondo de Cultura Económica-SEP-Conacyt, México, pp. 190, 196, 206.
- [64] K. M. Hegadoren, G. B. Baker, M. Bourin. *Neurosci and Biobehavioral Rev.* **1999**, 23, 539-553.
- [65] Louise B. Rasmussen, Kristine Hoje Olsen, Sys Stybe Johansen. *J. Chromatogr.* **2006**.
- [69] Richard Young and Richard A. G. *Pharmacol Biochem. Behav.* **1997**, 57, 115-118.
- [67] Pérez Mendoza Francisco. Tesis de Maestría en Ingeniería bioquímica. **2002**. Instituto Tecnológico de Veracruz, México.
- [68] In-Young Lee, Timothy G. Volm, and John P. N. Rozzasa. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, 23, 261-266.
- [69] López González Daniel. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas **2006**. Facultad de Ciencias, UNAM, México
- [70] López Mejía Ricardo. Tesis de licenciatura Químico de Alimentos. **2005**. Facultad de Química UNAM.
- [71] Higson K. Frank. **1992**. Microbial degradation of nitroaromatic compounds. *Adv. Appl. Microbiol.* Vol 37, 1-19.
- [72] Tharakan P John. *Chemosphere*, **1999**, 38, 6, 1323-1330.
- [73] Chulhwan Park, Tak-Hyum Kim, Sangyong Kim, Seung-Wook Kim, Jinwon Lee and Sun Hwan Kim. *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, 95, 567-571.
- [74] Kurt Faber. *Biotransformations in Organic Chemistry*. **1999**. Textbook 4th edition. Ed Springer.
- [75] Rieble Siegfried, K. Dinesh Joshi and H. Gold Michael. *Biomchem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 205, 298-304.
- [76] Esteve-Núñez Abraham, Antonio Caballero and Juan L. Ramos. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, 335-352.
- [77] Aken B. V., M. Hofrichter, K. Scheibner, A. J. Hatakka, H. Naveau, S. N. Agathos, *Biodegradation*. **1999**, 10, 83-91.
- [78] Chunlong Zhang, Joseph B. Hughes. *Chemosphere*. **2003**, 50, 665-671.
- [79] Fatemeh Rafii, Rebecca Wynne, Thomas M. Heinze, Donald D. Paine. *FEMS Microbiol Lett.* **2003**, 225, 95-200.

- [80] Thomas J. Fleischmann, Karen C. Walker, Jim C Spain, Joseph B. Hughes and Morrie Craig. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 314. pp 957-963.
- [81] B. -T., G. Sarath, P.J, Shea. *Soil Biol. Biochem.* **2001**, 33. pp 875-881.
- [82] Yoshie Hasegawa, Takamichi Muraki, Tai Tokuyama, Hiroaki KU-7, Michiaki, Peter C.K. Lau. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 190. pp 185-190.
- [83] Satish K. W, S. Ali-Sadat, and G. Rasul C. *Pest. Biochem. Physiol.* 2003, 76, 73-81.
- [84] Samanta , K. Sudip, Bhushan Bharat, Chauhan Ashvini and Jain K. Rakesh. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 269, 117-123.
- [85] Jing Ye, Ajay Singh and Owen P. W. *W. J. Microbiol Biotechnol.* **2004**, 20, 117-135.
- [86] M. Peres Carolina, Rainer Russ, Hiltrud Lenke and Spiros N. Agathos. *FEMS Microbiol Ecol.* **2001**, 37, 151-159.
- [87] Kwang-Hee Shin, Yoongho Lim, Joong-Hoon Ahn, Jinmo Khil. Chang-Joon and Hor-Gil Hur. *Chemosphere.* **2005. Article in press.**
- [88] A. B. Josie, J.T. Nicholas and S. W. Andrew. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3043-3046.
- [89] Navarro-Ocaña A., Olguín L F., Luna H., Jiménez-Estrada M. and Bárzana E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, 1, 2754-2756.
- [90] S.A. Zaripov, A.V Naumov, J. F Abdrakhmanova, A.V Garusov, R.P Naumova. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, 217. 213-217.
- [91] Neidleman L. Saul, Laskin I. Allen. *Advances in Applied Microbiology.* **1997** Cap. 2. Academic press, vol 44.
- [92] Jain, M. R., Zinjarde. S.S., Deobagkar, D.D., Deobagkar, D. N. *Mar. Pollut. Bull.* **2004. Article in press.**
- [93] L. Lovering Andrew, Eva I. hyde, Peter F. Searle and Scott A. White. *J. Mol. Biol.* **2001**, 309, 203-2013.
- [94] Bryant C., and Peluca M. *J. Biol.Chem.* **1991**, 266, 4119-4125.
- [95] Bryant, C. and McElroy, W. D. Nitroreductases. **1999.** (Muller, F. ed), CRC press, Vol. II pp.291-303.
- [96] T. Lightfoot Richard, David Shuman and Harry Ischiropoulos. *Free Rad. Biol Med.* **2000**, 28, 1132-1136.
- [97] Kobori, T., Sasaki, H., Lee, W. C. Zenno, S., Sayo, K., Murphy, M. E, and Tanokura M. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 2816-2823.

- [98] L. Koder Ronald and Anne Frances Millar. *Protein Exp. Pur.* **1998**, 13, 53-60.
- [99] Spain, J. C. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 523-555.
- [100] Weisburger E. K. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1978**, 18, 395-415.
- [101] Liochev, S. I., Hausladen A and Fridovich I. *Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96, 3537-3539.
- [102] Whiteway J., Koziarz P., Veall, J., Sandhu N., Kumar P., Hoecher B., and Lambert I. *B. J. Bacteriol.* **1998**, 180, 5529-5539.
- [103] Watanabe M., Nishino T., Takio K., Sofuni T. and Nohmi T. *J. Biolog. Chem.* **1998**, 273, 23922-23928.
- [104] A. Jorgensen Margaret, Mark A. Trend, Stuart L. Hazell and George L. Mendz. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, 392, 180-191.
- [105] B. T. Oh, G Sarta and P. J. Shea. *Soil Biol. Biochem.* **2001**, 33, 875-881.
- [106] Clement Bernard, Detlef Behrens, Wenke Möller and Jhon R. Cashman. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13, 1037-1045.
- [107] Rieble Sigfried, Dinesh K. Jhosi and Michael H. Golg. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 205, 298-304.
- [108] Saraluskas J., Dickancaite, E. Nemeikaite, A. Anusevicius Z., Z. Nivinskas, H Segura-Aguilar J. and Cénas N. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 346, 219-229.
- [109] A. Anusevicius Z., Soffers, A., Cénas N., Saraluskas J., Segura-Aguilar J. and Rietjens I. *FEBS.* **1998**, 427, 325-329.
- [110] ViodéC., Bettache, N., Cenas, N., Kraunth-Siegel, I., Chaauiere, G., Bakalara, N. and Perié, J. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 549-557.
- [111] Krinev A.G, Williams T.D. and Bigelow D.J. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11, 495-502.
- [112] Egami F. and H Itahishi. *J. Biochem.* **1951**, 38, 329.
- [113] Little H. N. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 347-358.
- [114] Little H. N. *J. Biol. Chem.* **1957**, 229, 231-238.
- [115] Westfall B. B. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **1943**, 79, 23-26.
- [116] Zhang Z., P. J. Hillas and P. R. Ortíz de Montellano. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 36, 19-26.
- [117] Neuberg C and Welde E. *Biochem. Z.*, **1914**, 60, 472-479.
- [118] Neuberg C and Reinfurth E. *Biochem. Z.* **1923**, 139, 561.

- [119] Davey, C. L., Powell, L., W., Turner, N., J. and Wells, A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 7867-7870.
- [120] Takeshita, M., Yoshida, S., Kiya, R., Higuchi, N. And Kobayashi Y. *Chem. Pharmacol. Bull.* **1989**, 37, 615-617.
- [121] Takeshita M. and Yoshida S. *Heterocycles.* **1990**, 30, 871-874.
- [122] Takeshita M. and Yoshida S. *Heterocycles.* **1990**, 31, 2201-2204.
- [123] Davey, C. L., Powell, L., W., Turner, N. J. and Wells. (1994). A Regioselective reduction of substituted dinitroarenes using baker's yeast in *Preparative Biotransformations*. Roberts, S. M. editor, John Wiley and Sons. 2:8.9.
- [124] Baik W., Han J. L., Lee K. C., Lee N. H., Kim B. H., and Hahn J-T. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 3965-3966.
- [125] Baik W., Park T. H., Kim B. H. and Yun Y. M. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5683-5685.
- [126] Baik W., Rhee J. U., Lee S. H., Lee N. H., Kim B. H. and Kim K. S. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2793-2794.
- [127] Baik W., Kim D. I., Lee H. J., Chung W. J., Kim B. H. and Lee S. W. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4579-4580.
- [128] Baik W., Kim D. I., Koo S., Rhee J. U., Shin S. H. and Kim B. H. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 845-848.
- [129] Kamal A. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2237-2240.
- [130] Davidenko T. I. and Bondarenko G. I. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2000**, 36, 74-79.
- [131] Nadeau L. J., He Z. and Spain J. C. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 24, 301-305.
- [132] Navarro-Ocaña A., Jiménez-Estrada M., González-Paredes M. B. and Bárzana E. *Sinlett.* **1996**, 695-696.
- [133] Navarro-Ocaña A., Bárzana E., López-González D., Jiménez-Estrada M. *OPPIBRIEFS.* **1999**, 31:1, 117-119.
- [134] Otha H., Ozaki K. and Tsuchihushi T. *Chem. Lett.* **1987**, 29, 191
- [135] Otha H., Kobayashi N. and Ozaki K. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 1802-1804.
- [136] Kawai Y., Saito K., Hida K., Dao D. and Ohno A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, 69, 2633-2638.
- [137] Kawai Y., Inaha Y. and Tokitch N. *Tetrahedron Asymmetry.* **2001**, 12, 309-318.

- [138] McAnda A. F., K. D. Roberts, A. J. Smallridge and A. Ten M.A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1998**, 1, 501-504.
- [139] Takeshita M., Yoshida S. and Kohna Y. *Heterocycles.* **1994**, 37:1, 553-562.
- [140] Yasushi Kawai, Yoshikazu Inaba, Motoko Hayashi and Norihiro Tokitoh. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 3367-3368.
- [141] Phillip Gerard. **AÑO** Methods for general and molecular bacteriology. A.S.M. R. G. E, Murray, Willis A. Wood, Noel R. Krieg, Editors. Pag 155-178.
- [142] Zhixian Huang, Larry Dostal and Jhon P. N. Rosazza. *Appl. Environm Microbiol.* **1993**, 59, 2244-2250.

ANEXO I: CURVAS PATRÓN

La figura 78, muestra la curva patrón de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida HNAC, tal y como fue calculada por el programa del HPLC.

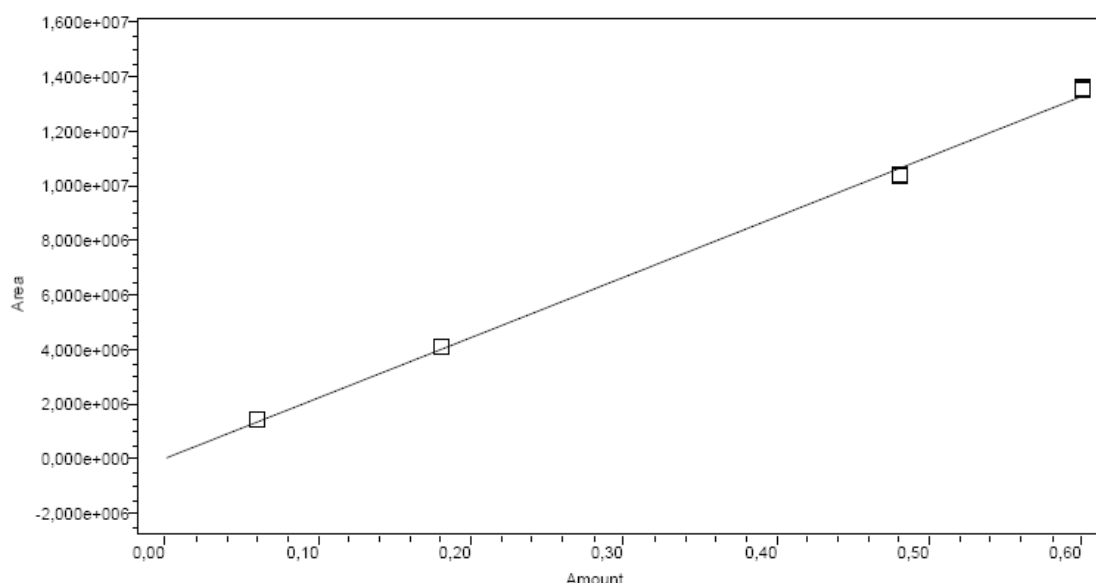


Figura 78: Curva patrón de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida: HNAC

Name: HONO2 Time: 9,532 Fit Type: Linear (1st Order) **R: 0,999212 R†: 0,998425**
Equation: Y = 2,21e+007 X +9,71e+004. Los datos anteriores corresponden al gráfico, se presentan la ecuación correspondiente y los coeficientes de la misma.

Tabla 18: Datos de la curva patrón de la HNAC proporcionados por el programa del HPLC

Peak: HONO2

	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	,06mg/mL	HONO2		0,060	1,439e+006	0,060677	1,129	No	No
2	,06mg/mL	HONO2		0,060	1,430e+006	0,060293	0,489	No	No
3	,06mg/mL	HONO2		0,060	1,429e+006	0,060237	0,395	No	No
4	,18mg/mL	HONO2		0,180	4,139e+006	0,182797	1,554	No	No
5	,18mg/mL	HONO2		0,180	4,155e+006	0,183507	1,948	No	No
6	,18mg/mL	HONO2		0,180	4,162e+006	0,183822	2,124	No	No
7	,48mg/mL	HONO2		0,480	1,046e+007	0,468669	-2,361	No	No
8	,48mg/mL	HONO2		0,480	1,038e+007	0,465083	-3,108	No	No
9	,48mg/mL	HONO2		0,480	1,039e+007	0,465372	-3,048	No	No
10	,6mg/mL	HONO2		0,600	1,354e+007	0,607886	1,314	No	No
11	,6mg/mL	HONO2		0,600	1,364e+007	0,612585	2,097	No	No
12	,6mg/mL	HONO2		0,600	1,356e+007	0,609071	1,512	No	No

La tabla 18, presenta los datos de la curva patrón de la HNAC empleada para calcular la disminución del sustrato nitrado en la cinética de biorreducción de la HNAC.

La figura siguiente es la curva patrón de la amina (4-hidroxi-2-aminoacetanilida) derivada de la reducción de la HNAC

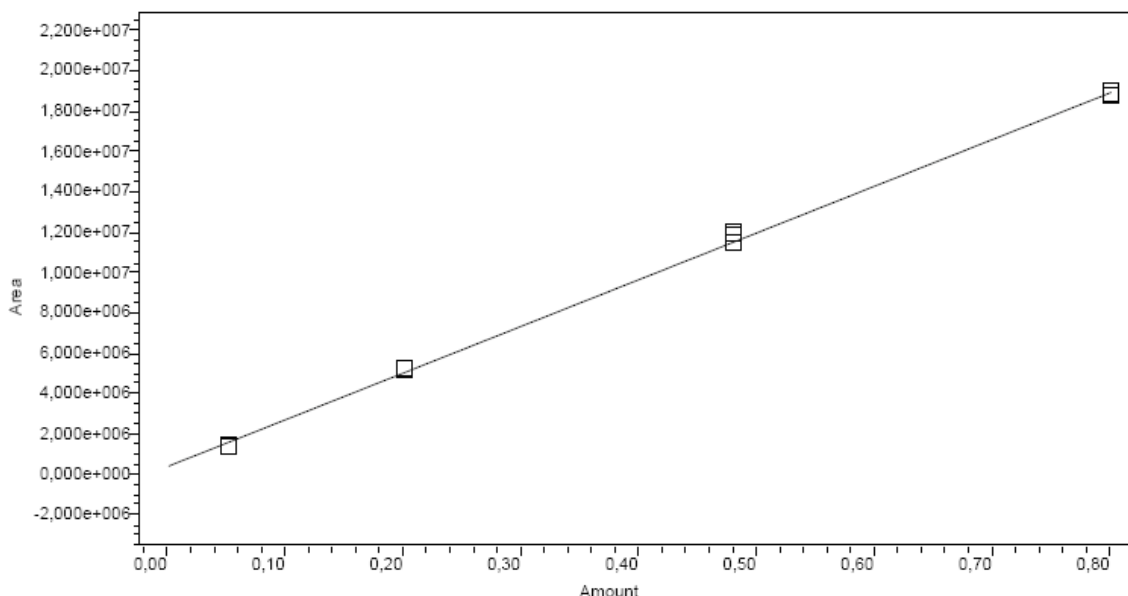


Figura 79: Curva patrón de la 4-hidroxi-aminoacetanilida: HAAC

Name: HONH2 Time: 4,286 Fit Type: Linear (1st Order) **R: 0,999442 R†: 0,998884**
Equation: $Y = 2,31e+007 X + 4,66e+005$. Los datos anteriores corresponden al gráfico de la curva patrón de la amina. Se presentan: la ecuación y los coeficientes de la misma.

Tabla 19: Datos de la curva patrón de la HAAC suministrados por el HPLC

Peak: HONH2

	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	0,051mg/mL	HONH2		0,051	1,438e+006	0,042045	-17,560	No	No
2	0,051mg/mL	HONH2		0,051	1,446e+006	0,042389	-16,885	No	No
3	0,051mg/mL	HONH2		0,051	1,426e+006	0,041527	-18,574	No	No
4	0,2mg/mL	HONH2		0,200	5,197e+006	0,204640	2,320	No	No
5	0,2mg/mL	HONH2		0,200	5,240e+006	0,206534	3,267	No	No
6	0,2mg/mL	HONH2		0,200	5,261e+006	0,207421	3,710	No	No
7	0,48mg/mL	HONH2		0,480	1,146e+007	0,475424	-0,953	No	No
8	0,48mg/mL	HONH2		0,480	1,195e+007	0,496751	3,490	No	No
9	0,48mg/mL	HONH2		0,480	1,194e+007	0,496249	3,385	No	No
10	,8mg/mL	HONH2		0,800	1,874e+007	0,790558	-1,180	No	No
11	,8mg/mL	HONH2		0,800	1,892e+007	0,798075	-0,241	No	No
12	,8mg/mL	HONH2		0,800	1,876e+007	0,791387	-1,077	No	No

Los datos presentados en la tabla 19, son de concentración y respuesta de la amina usados para la curva patrón empleada para calcular la concentración de la amina durante la biorreducción de la HNAC.

ANEXO II: VARIACIÓN DE LA BIOMASA DE LA *S. cerevisiae* A

El siguiente grafico muestra la variación de la biomasa de la levadura *S. cerevisiae* durante la cinética de biorreducción de la HNAC. Como se puede observar existe gran variación del número de microorganismos durante los diferentes tiempos de muestreo, sin embargo si tomamos en cuenta que a las 2h de iniciada la biotransformación se tiene ya más del 80% del producto, el que la biomasa aumente después de este tiempo ya no tiene mucho sentido pues si fuera el caso a las 2h se puede dar por terminada la biotransformación.

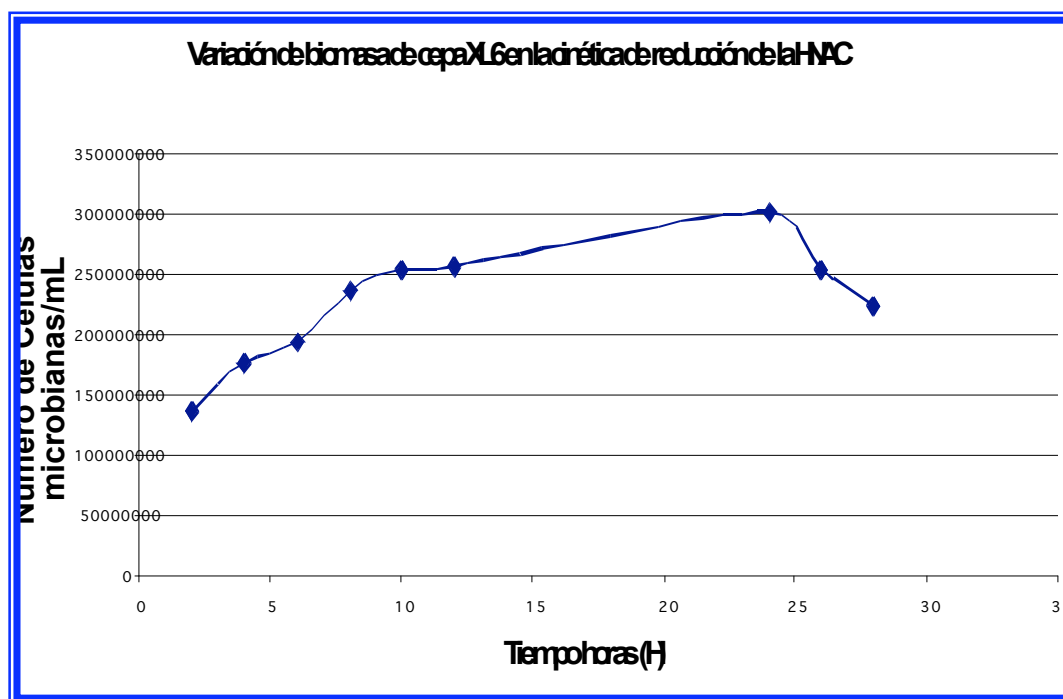


Figura 80: Variación de la biomasa de la *S. cerevisiae* durante la cinética de reducción

ANEXO II: VARIACIÓN DE LA BIOMASA DE LA *S. cerevisiae* A

El siguiente grafico muestra la variación de la biomasa de la levadura *S. cerevisiae* durante la cinética de biorreducción de la HNAC. Como se puede observar existe gran variación del número de microorganismos durante los diferentes tiempos de muestreo, sin embargo si tomamos en cuenta que a las 2h de iniciada la biotransformación se tiene ya más del 80% del producto, el que la biomasa aumente después de este tiempo ya no tiene mucho sentido pues si fuera el caso a las 2h se puede dar por terminada la biotransformación.

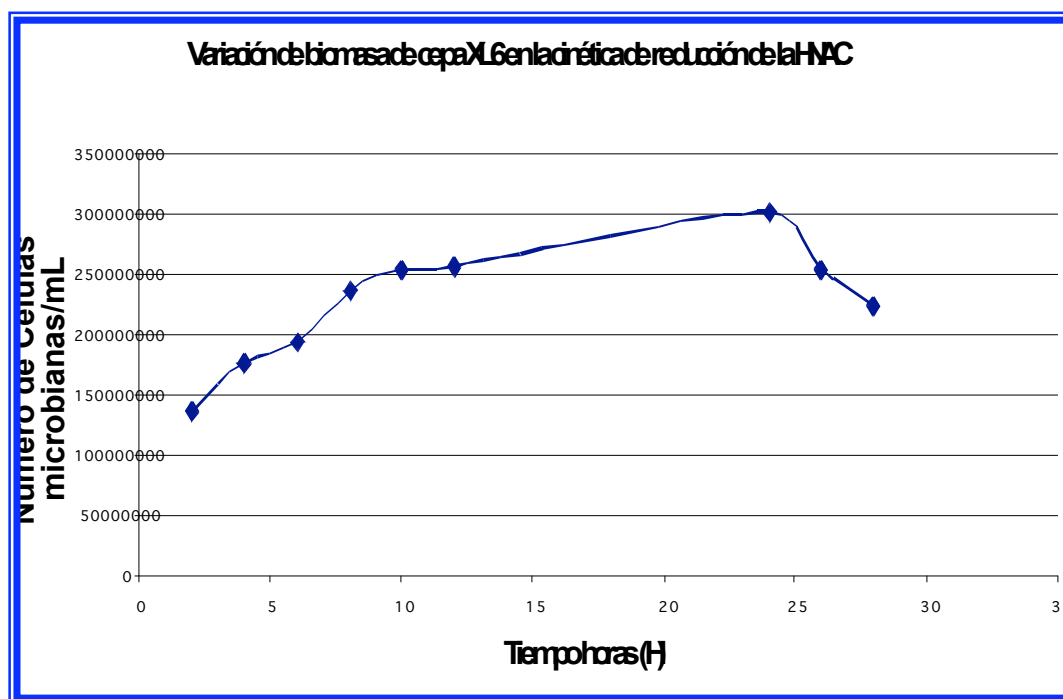


Figura 80: Variación de la biomasa de la *S. cerevisiae* durante la cinética de reducción

ANEXO III: COMPARACIÓN ENTRE: *S. cerevisiae* A y *P. fluorescens* ZM2

Ensayo de cinética de biorreducción de la 4-hidroxi-2-nitroacetanilida mediante las cepas microbianas de: *S. cerevisiae* A y *P. fluorescens* Zm2. En el gráfico se puede observar como la cepa bacteriana de *P. fluorescens* Zm2, después de 10h de incubación inicia la degradación del producto de interés y continúa hasta la degradación total de este producto. Por lo que para los experimentos restantes de reducción a escala preparativa y para la cinética de biorreducción se empleó únicamente la *S. cerevisiae* A aislada y caracterizada en el laboratorio de trabajo.

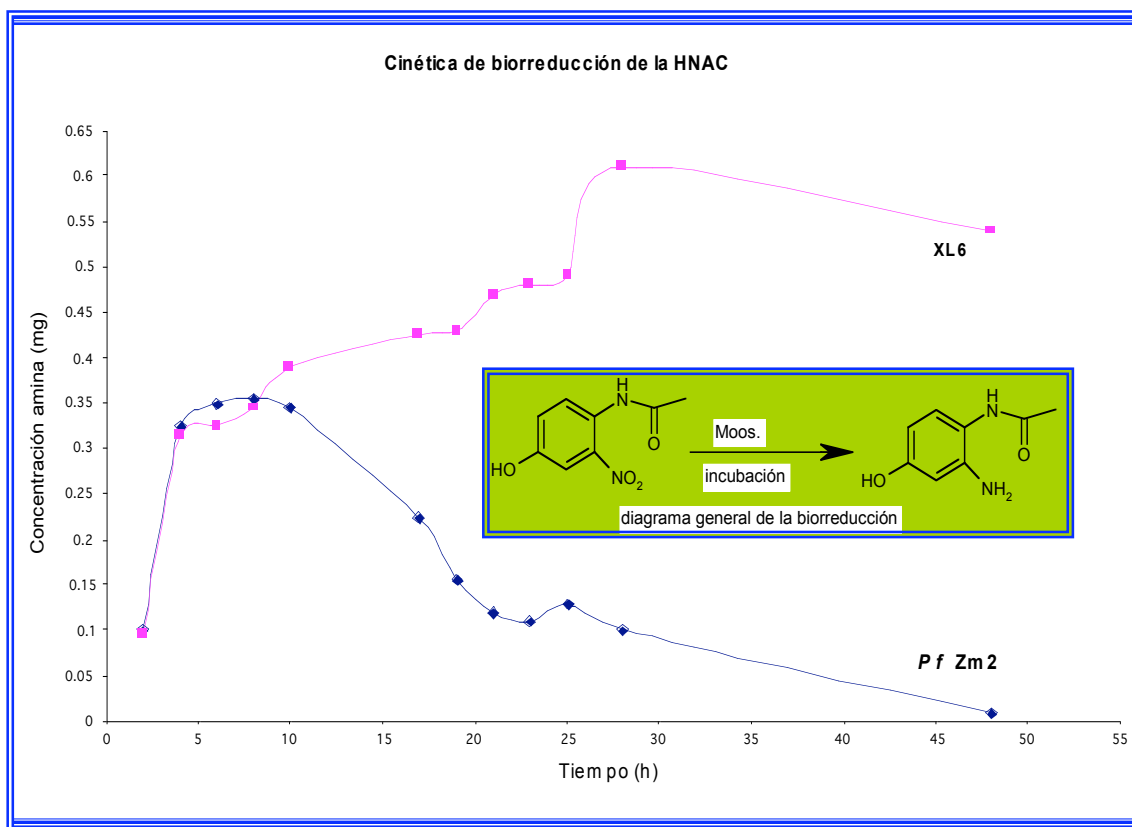
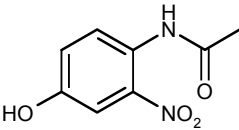
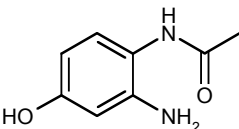
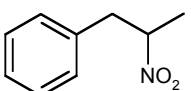
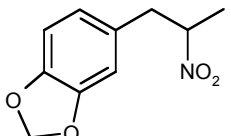
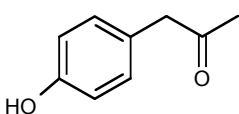
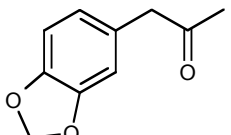


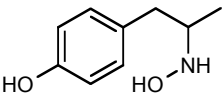
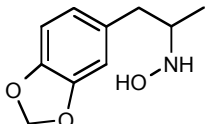
Figura 81: Comparación de la biorreducción de la HNAC entre: *S. cerevisiae* A y *P. fluorescens* ZM2

ANEXO III: DATOS ESPECTROSCÓPICOS

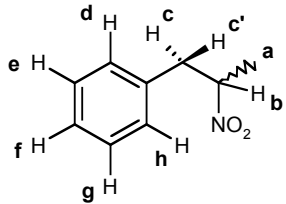
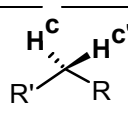
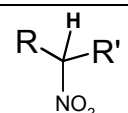
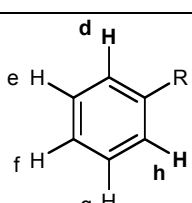
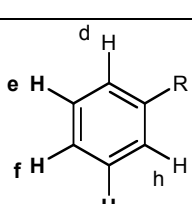
Datos de IR (cm^{-1}), y EM m/z (Intensidad relativa).

COMPUESTO	IR (cm^{-1})	EM m/z (Intensidad relativa)
HNAC 	No se realizó experimento	196 (M^+ 18), 154 (100), 109 (4), 94 (4), 42 (2)
HAAC 	No se realizó experimento	166 (M^+), 124 (3), 108 (49), 94 (4), 78 (3)
FNPANO 	3087, 2991, 1605, 1549, 1496, 1453, 1388, 1369, 855, 751, 700	165 (M^+ 5), 118 (100), 103 (6), 91 (43), 79 (2)
MDFNPANO 	2991, 1608, 1549, 1491, 1444, 1389, 1359, 1249, 1124, 1039, 930,	209 (M^+ 100), 163 (28), 147 (21), 133 (50), 121 (10), 105 (59), 89 (19), 77 (92), 63 (41)
FenCeto 	3416, 2991, 2856, 1714, 1617, 1455, 1352, 1277, 743	150 (M^+ 11), 132 (3), 104 (9), 71 (18), 57 (30)
MDCeto 	2905, 2855, 1711, 1603, 1479, 1447, 1251, 1038, 926	178 (M^+ 50.5), 162 (4), 135 (100), 91(35), 77 (73)

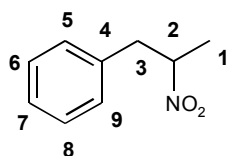
Datos obtenidos de los probables productos principales de la biorreducción de los nitro alcanos con la cepa de *E. coli*.

COMPUESTO	EM m/z (Intensidad relativa)
	167 (M^+ 12), 149 (37), 134 (6), 108 (7), 78 (4), 57 (52), 18 (51)
	195 (M^+ 0.2), 194 (2), 179 (2), 163(2), 146 (7), 117 (98), 103 (10), 77 (7), 18 (8)

Datos RMN¹H (300MHz, CDCl₃), del FNPANO:

				
H	δ	Tipo de señal	J (Hz)	Tipo de hidrógeno
a	1.55	d	6.6	R-CH₃
c	3.01	dd	4.5, 13.8	
c'	3.33	dd	7.2, 13.8	
b	4.78	sext	6.9, 13.8	
d y h	7.17	dd	1.8, 8.1	
e, f, y g	7.30	m	-----	

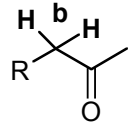
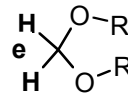
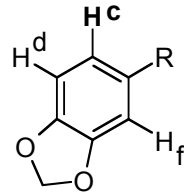
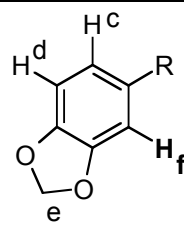
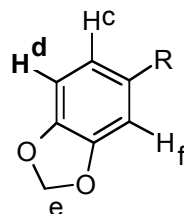
Datos RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) del FNPANO: δ (Tipo de carbono, asignación)



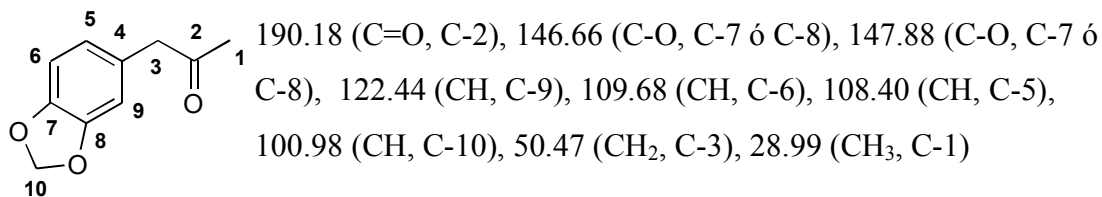
135.47 (CH, C-4), 128.96, 128.80, 127.39 (CH, C-9, C-8, C-7, C-6, C-5), 84.41 (CH-NO₂, C-2), 41.14 (CH₂, C-3), 18.78 (CH₃, C-1)

Datos de RMN¹H de la 1-(3,4-METILENDIOXIFENIL)-2-PROPANONA

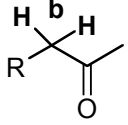
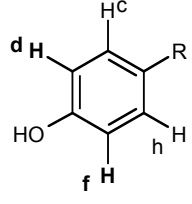
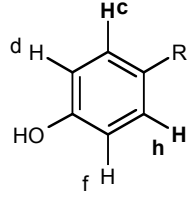
(MDCeto): 300MHz, CDCl₃

H	δ	Tipo de señal	J (Hz)	Tipo de hidrógeno
a	2.15	s	---	R-CH ₃
b	3.60	s	---	
e	5.94	s	----	
c	6.64	dd	1.5, 7.8	
f	6.68	dd	0.3, 1.5	
d	6.77	d	7.8	

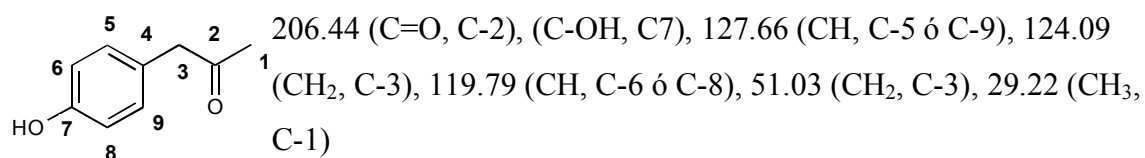
Datos RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) DE LA 1-(3,4-METILENDIOXIFENIL)-2-PROPANONA (MDCeto): (δ (Tipo de carbono, asignación))



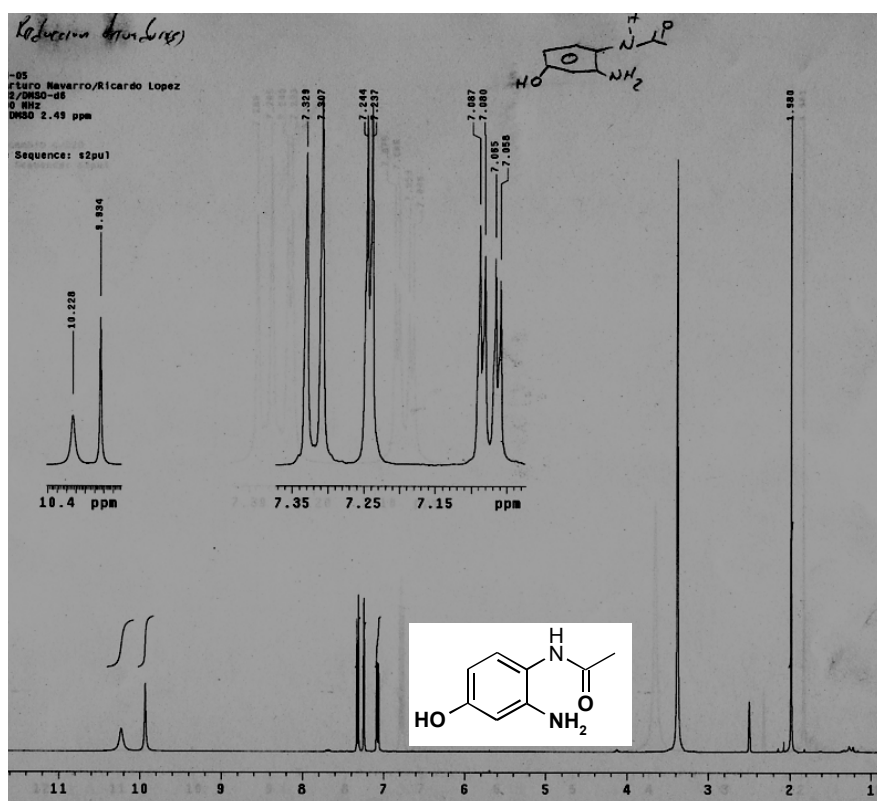
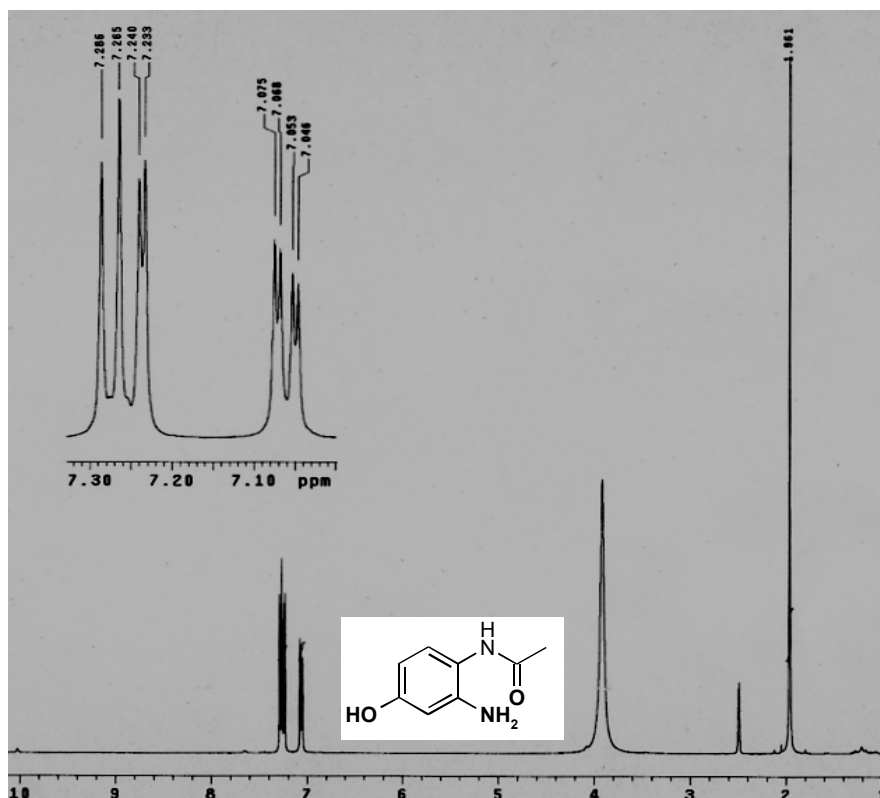
Datos de RMN¹H (300MHz, CDCl₃), de la 1-(3-hidroxifenil)-2-propanona:

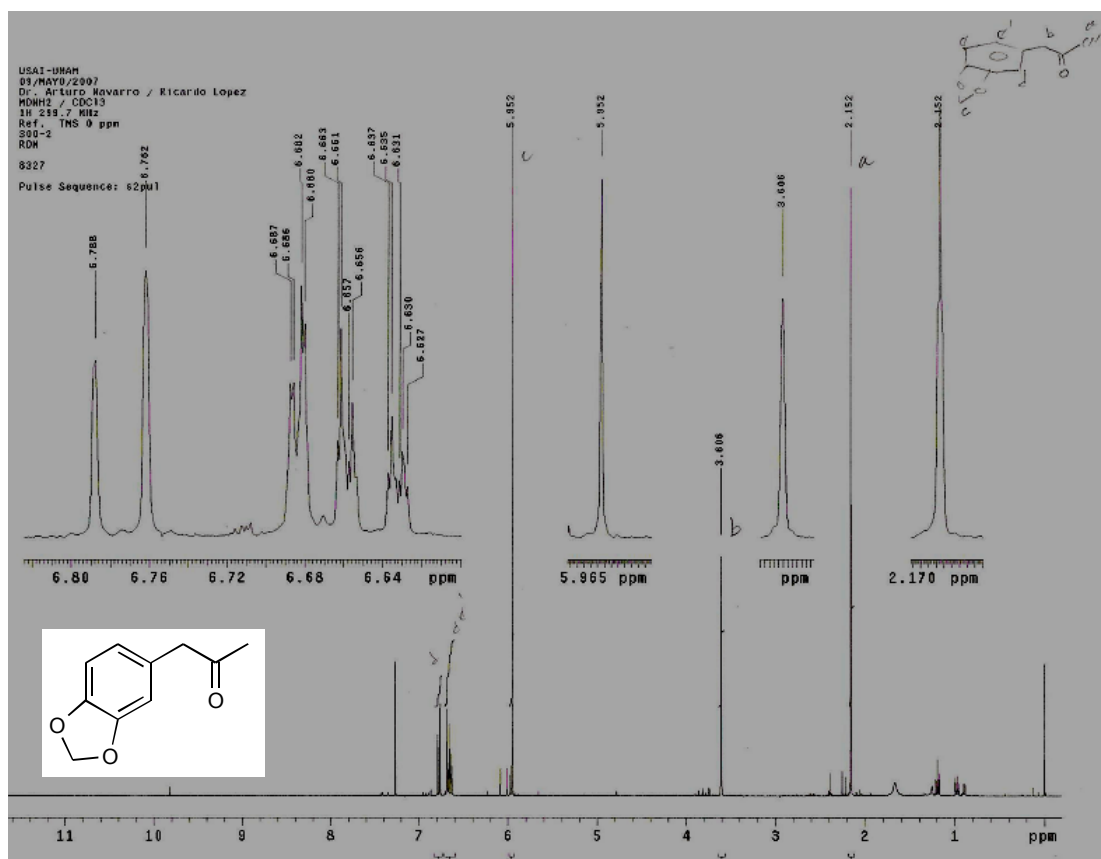
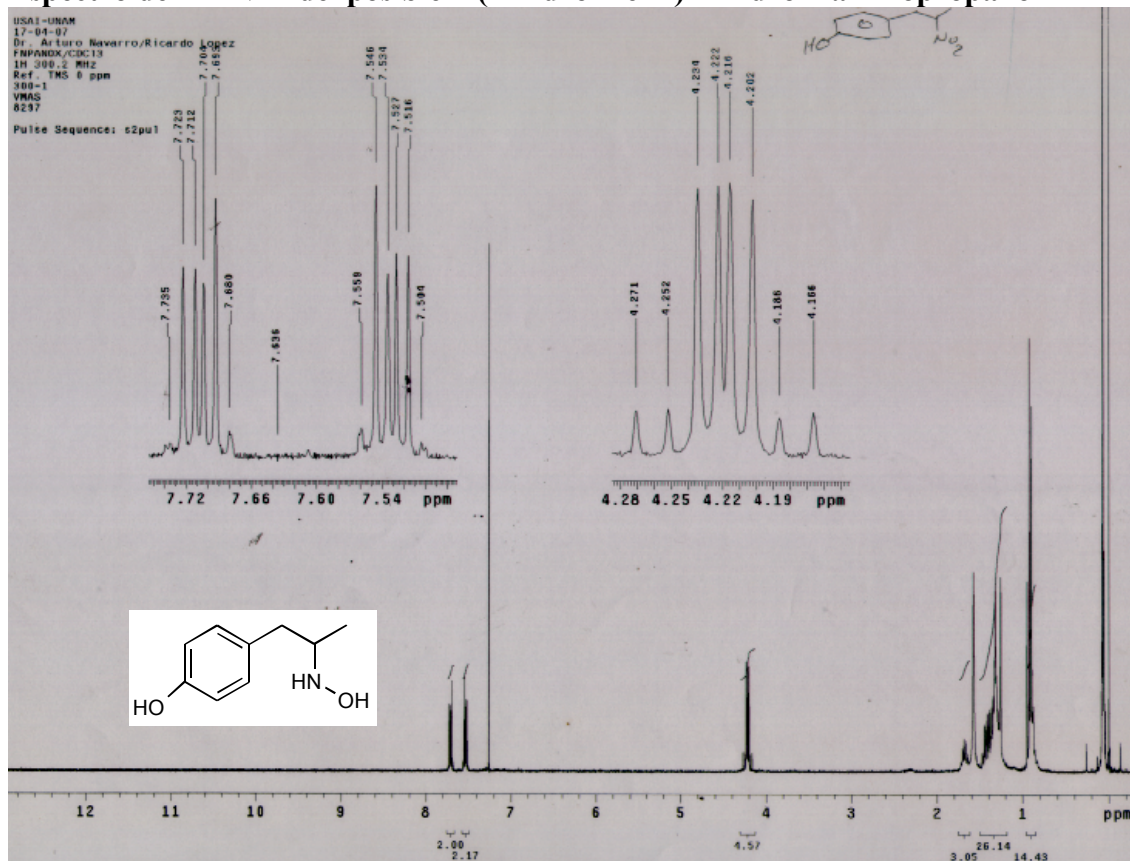
H	δ	Tipo de señal	<i>J</i> (Hz)	Tipo de hidrógeno
a	1.75	s	---	R-CH₃
b	3.68	s	---	
d y f	7.53	dd	3.3, 5.7	
c y h	7.71	dd	3.3, 5.7	

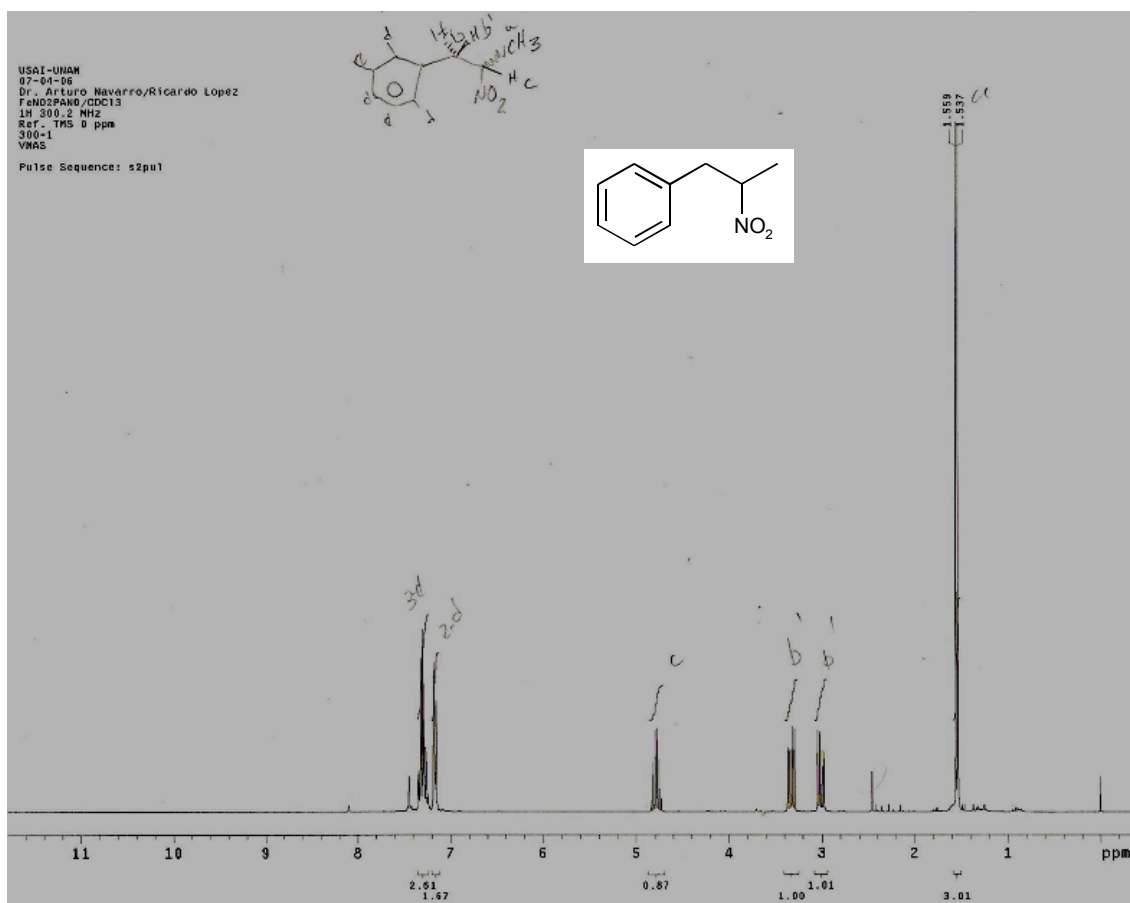
Datos RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) del FNPANO: δ (Tipo de carbono, asignación)



ESPECTROS SELECCIONADOS

Espectro de RMN¹H de la HAACEspectro de RMN¹H de la HAAC (intercambio con D₂O)

Espectro de RMN¹H de la MDCeto:Espectro de RMN¹H del posible 1-(4-hidroxifenil)-2-hidroxi laminopropano

Espectro de RMN¹H de la FNPANO:Espectro de RMN¹H de la MDFNPANO: