

22
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES INTER-REGIONALES
FAC. DE QUIMICA

BIOHIDROGENACION DE 2-NITROACETANILIDAS-4-SUBSTITUIDAS CON *Saccharomyces cerevisiae*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C O
P R E S E N T A :
LUIS FERNANDO OLGUIN CONTRERAS



MEXICO, D. F.

1999

271745

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

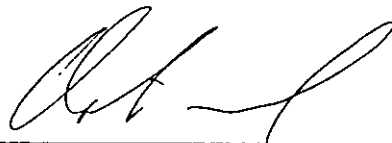
Presidente: Prof. Lilia Vierna García.
Vocal: Prof. Ernestina Cervera Flores.
Secretario: Prof. Arturo Navarro Ocaña.
1er. Suplente: Prof. Fernando León Cedeño.
2o. Suplente: Prof. Blás Flores Pérez.

Sitio donde se desarrolló el tema:

- Laboratorio 2-10 Instituto de Química, UNAM.
- Laboratorio 314, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

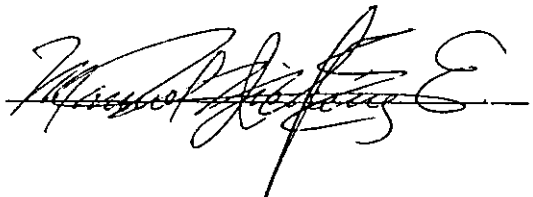
Asesor del Tema

Dr. Arturo Navarro Ocaña.



Asesor Técnico

Dr. Manuel Jiménez Estrada.



Sustentante

Luis Fernando Olguín Contreras



AGRADECIMIENTOS

Quiero darle las gracias al Doctor Arturo Navarro Ocaña por haber dirigido esta tesis y por sus valiosos comentarios y sugerencias durante el desarrollo experimental y la realización del manuscrito.

Agradezco también a los Doctores Manuel Jiménez E. y Eduardo Bárzana G. por sus comentarios y el apoyo que me brindaron al realizar este trabajo en sus laboratorios.

Al Dr. Héctor Luna Contla por su ayuda y a los miembros del jurado por sus comentarios para la presentación de este documento.

A mi Padre

... y a todas y todos los demás también.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
<i>I. Biotransformaciones.....</i>	<i>2</i>
<i>II. Saccharomyces cerevisiae en las biotransformaciones.....</i>	<i>4</i>
<i>III. Reducción de compuestos nitrados por Saccharomyces cerevisiae.....</i>	<i>5</i>
<i>IV. Reducción química de compuestos nitroaromáticos.....</i>	<i>8</i>
<i>V. Síntesis química de los bencimidazoles y de los N-óxidos del bencimidazol.....</i>	<i>9</i>
OBJETIVOS.....	13
RESULTADOS.....	14
<i>I- Síntesis de sustratos.....</i>	<i>14</i>
<i>II- Caracterización de sustratos.....</i>	<i>15</i>
<i>III- Biotransformación de sustratos con Saccharomyces cerevisiae.....</i>	<i>17</i>
<i>IV. Elaboración de testigos.....</i>	<i>19</i>
<i>V. Caracterización de productos.....</i>	<i>19</i>
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES.....	44
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	46
<i>I. Materiales.....</i>	<i>46</i>
<i>II. Métodos.....</i>	<i>46</i>
<i>III. Espectroscopía.....</i>	<i>48</i>
BIBLIOGRAFÍA.....	51
ESPECTROS SELECCIONADOS.....	55

INTRODUCCIÓN.

Desde sus orígenes el hombre ha utilizado a los microorganismos para su beneficio. El ejemplo más antiguo y extendido en todo el mundo es la fermentación del azúcar para producir alcohol. Sin embargo, fue hasta hace poco cuando se logró conocer la estructura y el funcionamiento de las sustancias responsables de estas transformaciones: las enzimas.

El primer modelo que trató de explicar el mecanismo de la acción enzimática lo elaboró E. Fisher en 1894. Él afirmaba que un sustrato y una enzima solo podían reconocerse, si eran como una llave y su cerradura¹. Este modelo creó la idea de que las enzimas solamente podían catalizar las reacciones químicas de las vías metabólicas en las que estaban involucradas. No obstante, las evidencias experimentales acumuladas a lo largo de los últimos cien años apunta en sentido contrario: las enzimas no solo transforman a los sustratos naturales, sino también a un gran número de compuestos que no lo son y que tienen diferencias estructurales.

Durante los años ochenta, científicos innovadores comenzaron a estudiar en forma sistemática la modificación selectiva de compuestos sintéticos y naturales por microorganismos. Los buenos resultados propiciaron que se creara toda una disciplina dentro de la química orgánica dedicada al desarrollo de estas nuevas metodologías, así como a la búsqueda de otros biocatalizadores con propiedades interesantes.

Entre otros microorganismos capaces de realizar bioconversiones, *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de pan) se ha utilizado principalmente por su capacidad de generar centros quirales al reducir selectivamente dobles enlaces C=O y C=C⁹. Otro grupo funcional que puede ser reducido por esta levadura es el nitro⁸. En los últimos nueve años se han publicado una docena de artículos al respecto, pero se ha explorado muy poco su potencial en la síntesis de compuestos heterocíclicos. En esta tesis se realizó la biotransformación de 2-nitroacetanilidas-4-sustituidas utilizando *S. cerevisiae* con la finalidad de sintetizar bencimidazoles.

ANTECEDENTES.

I. Biotransformaciones.

Las biotransformaciones son reacciones químicas de compuestos naturales o sintéticos las cuales se llevan a cabo por algún tipo de biocatalizador. Los más comunes son las enzimas purificadas, las que se encuentran dentro de una célula, los anticuerpos catalíticos (abzimas), el ácido ribonucleico (ARN) y las enzimas artificiales (sinzimas)².

El impacto de las biotransformaciones en la síntesis orgánica moderna ha sido muy importante. En un estudio realizado por Faber en 1997³ (Fig.1), se muestra como a partir de los años ochenta el número de artículos publicados al respecto creció exponencialmente. En 1991, el 8% de los trabajos en síntesis orgánica contenía en algún paso una biotransformación.

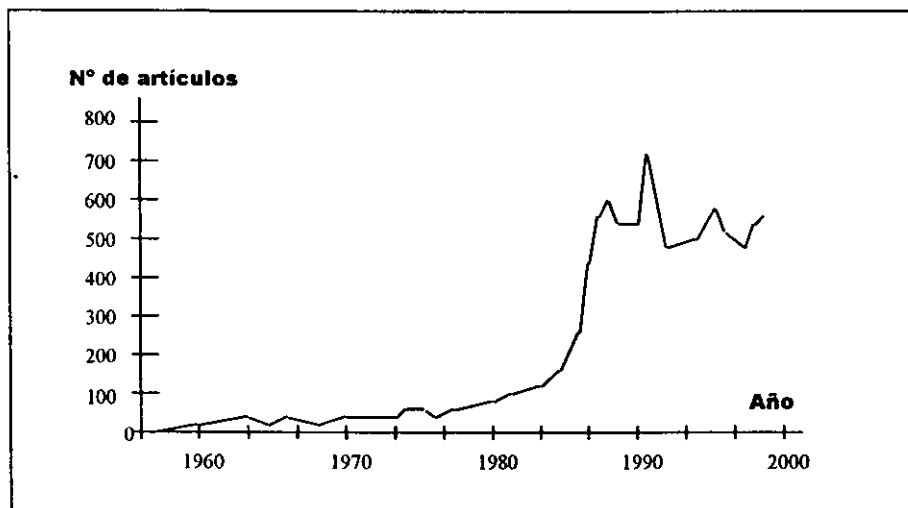


Fig. 1. Publicaciones anuales en biotransformaciones de compuestos no naturales.

La razón de este rápido crecimiento se debe a que estas reacciones ofrecen ciertas ventajas sobre los métodos químicos convencionales. Entre las más destacadas se encuentran:

1. Los biocatalizadores son muy eficientes. Pueden incrementar la velocidad de una reacción hasta en 10^{10} veces ².
2. Los biocatalizadores actúan bajo condiciones suaves de reacción: generalmente a pH 7, a temperaturas entre los 20 y 40 °C y sin metales pesados o cualquier otro material asociado comúnmente a la catálisis química ²⁻⁴.
3. Los biocatalizadores pueden llevar a cabo una gran variedad de reacciones. Prácticamente existe un equivalente para cada tipo de reacción orgánica ².
4. Los biocatalizadores exhiben una gran quimioselectividad, por lo que solo actúan sobre un cierto grupo funcional ²⁻⁵.
5. Los biocatalizadores son regioselectivos, ya que son capaces de distinguir entre dos grupos funcionales idénticos en una misma molécula ²⁻⁵.
6. Los biocatalizadores son enantioselectivos. Cuando se crea un centro quiral, prácticamente solo uno de los isómeros (R)- o (S)- se forma, evitando las dificultades que se tienen para resolver las mezclas racémicas ²⁻⁵.
7. A diferencia de muchos catalizadores químicos, los biocatalizadores son compatibles con el medio ambiente ²⁻⁵.
8. Como la mayoría de los biocatalizadores funcionan bajo las mismas condiciones, y no se afectan unos a otros ⁸, es posible que en un solo paso y en el mismo matraz, se realicen varias transformaciones en un sustrato.

Tres de las últimas revisiones que se han hecho sobre biotransformaciones exploran los avances más recientes ^{7, 54} y hacen una reflexión sobre el presente y el futuro de este campo ³.

II. *Saccharomyces cerevisiae* en las biotransformaciones.

Saccharomyces cerevisiae es un microorganismo con muchas aplicaciones en la industria, la ciencia y el hogar. Es uno de los biocatalizadores más útiles, no solo por ser barato, fácil de obtener y no requerir nutrientes complejos o factores de crecimiento^{5, 8}, sino además por la versatilidad de las reacciones en que puede participar (ver Fig. 2).

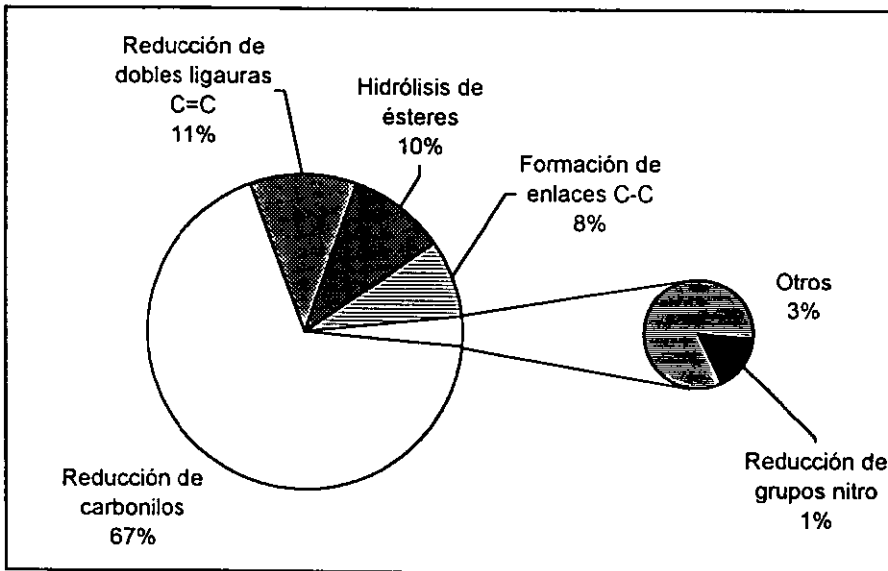


Fig. 2. Estudios realizados sobre transformación de grupos funcionales por *S. cerevisiae*. Fuente: Servi (1990)⁸ y Csuk y Glazner (1991)⁹

La revisión de los artículos publicados en los últimos ocho años sobre biotransformaciones con *S. cerevisiae*⁵¹, indica que la reducción de carbonilos a alcoholes quirales sigue siendo muy importante. Inclusive ya se han aislado y purificado reductasas de levadura para incrementar el rendimiento y la enantioselectividad de ciertas reacciones⁴.

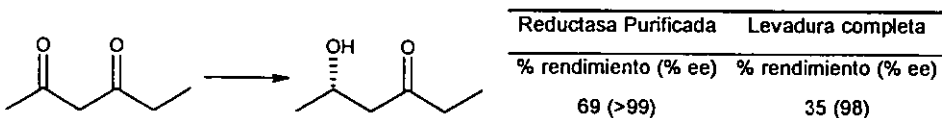


Fig. 3. Reducción asimétrica de carbonilos utilizando una enzima purificada y la célula completa de *S. cerevisiae*.

También la transformación de nuevos grupos funcionales está en aumento. Dos ejemplos relevantes se muestran a continuación^{10, 11}:

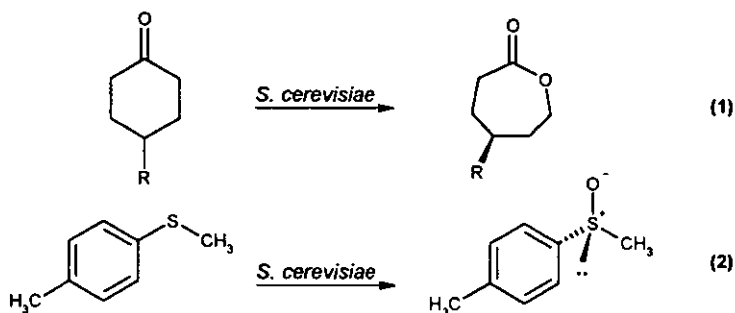


Fig. 4. Biotransformación de otros grupos funcionales con *S. cerevisiae*. (1) Reacción de Baeyer-Villiger. (2) Oxidación de tioéteres a sulfóxidos quirales.

III. Reducción de compuestos nitrados por *Saccharomyces cerevisiae*.

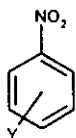
A pesar de que existen reportes desde principios de siglo¹² sobre la reducción del grupo nitro con *S. cerevisiae*, fue hasta 1989 cuando apareció un estudio más detallado sobre esta reacción. A continuación se describen brevemente los artículos publicados al respecto en los últimos diez años. Es importante destacar que en todos los trabajos, a excepción de uno¹³, se incluyen solamente ejemplos de compuestos nitroaromáticos.

1989. Se lleva a cabo la reducción de nitrobenenos monosustituidos con *S. cerevisiae*. En todos los casos los productos fueron las aminas correspondientes¹⁴ (Fig. 5). Se observa que los compuestos con sustituyentes electroattractores son reducidos con buenos rendimientos (35-85 %), pero los que tienen grupos electrodonadores, no reaccionan o lo hacen pobremente (0-20 %).

1990. Se lleva a cabo la reducción de compuestos heterocíclicos nitrados (nitropiridina, nitroquinolina y nitropiridona) con *S. cerevisiae*. Los productos son las aminas correspondientes¹⁵. Se investiga también la reducción de N-óxidos de diferentes heterociclos (piridina, quinolina e isoquinolina) para producir los derivados desoxigenados¹⁶.



X = NO₂, CN, CF₃, COOEt



Y = NH₂, OH, SH, CH₃, OCH₃

X

Fig. 5. Reducción de nitrobenzenos con *S. cerevisiae*.

1994. Reducción de nitroaromáticos monosustituidos a las aminas correspondientes con *S. cerevisiae* en presencia de hidróxido de sodio¹⁷. Estudio sobre la regioselectividad de la reducción de *m*-dinitrobenzenos sustituidos. Se plantea un modelo para explicar la selectividad de esta reacción¹⁸.

1995. Primer trabajo sobre síntesis de heterociclos a partir de compuestos nitrados utilizando *S. cerevisiae* en presencia de NaOH (fig. 6)¹⁹. Reducción del nitrosobenceno a anilina con *S. cerevisiae*²⁰.

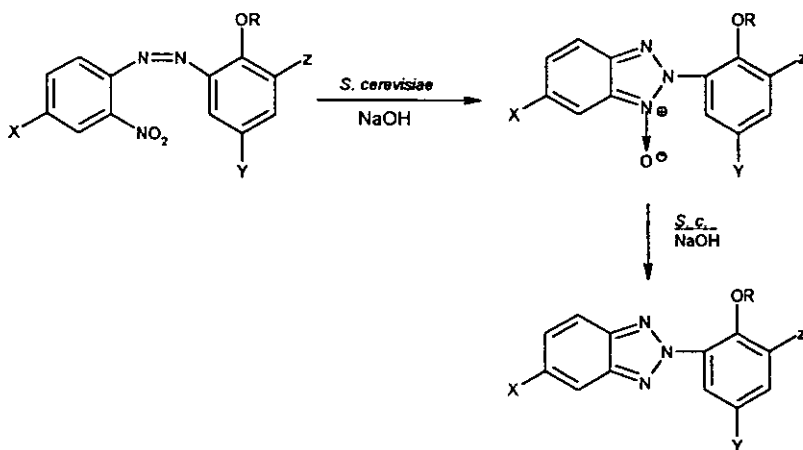


Fig. 6 Síntesis de los 2-aryl-2H-benzotriazoles con *S. cerevisiae* y NaOH

1996. Primer ejemplo sobre la reducción de un grupo nitro no aromático con *S. cerevisiae*¹³ (Fig. 7).

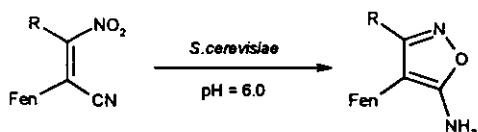


Fig. 7. Reducción de (Z)-3-nitropropenonitrilos a 5-aminoisoxasoles con *S. cerevisiae*.

1997. Reducción de N-óxidos y de azobenceno con *S. cerevisiae* y NaOH²¹. Reducción de 4-(2'nitrofenil)-3-buten-2-ona para formar quinolinas²² (Fig. 8).

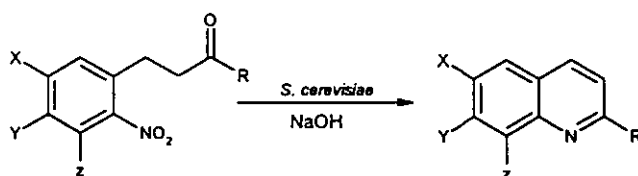


Fig. 8. Síntesis de quinolinas con *S. cerevisiae* y NaOH.

Se trata de establecer un mecanismo general para la reducción de grupos nitro con *S. cerevisiae*²³, y se discute sobre las dos metodologías que se han empleado hasta el momento (Tabla 1). Se demuestra que el método A explota la maquinaria enzimática de la levadura para efectuar la reducción, es decir, una biotransformación; mientras que el método B, al realizarse bajo condiciones extremas, es una transformación no enzimática.

Tabla 1. Diferencias entre los métodos utilizados en la reducción de grupos nitro con *S. c.*

Método	Condiciones de reacción	Observaciones	Ref.
A	pH = 5.5-6.0 Temperatura: 30-35°C Medio: Agua.	No hay formación de azobenceno. Se requieren sustituyentes electroattractores para la reducción.	13, 14, 15, 16, 18, 20 y 23
B	pH = 14.0 Temperatura: 70-80 °C o reflujo. Medio: Metanol / Etanol - Agua	Formación de azobenceno como intermediario. Es posible la reducción con sustituyentes electrodonadores.	17, 19, 21 y 22

IV. Reducción química de compuestos nitroaromáticos.

Los compuestos nitrados pueden reducirse de dos formas generales²⁴: (a) por hidrogenación catalítica o (b) por reducción química (habitualmente con un metal y un ácido). Debido a la importancia de esta reacción, existen muchas variantes y numerosos reactivos para llevarla a cabo^{25, 24}. La reducción de estos compuestos a aminas puede ser detenida en algún intermediario si se utilizan agentes reductores especiales²⁶ (Fig.9). Sin embargo, la reducción con metales en ácido mineral no puede ser detenida y siempre se produce la amina. El mecanismo de esta reacción no ha sido estudiado extensivamente, pero se sabe que los compuestos nitrosos y las hidroxilaminas son los intermediarios²⁶.

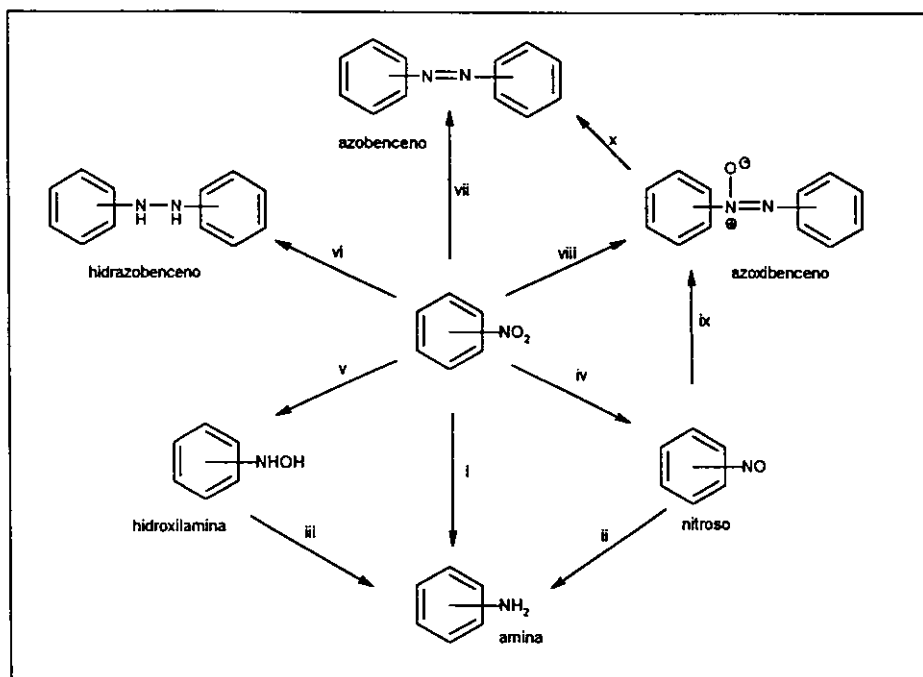


Fig. 9. Reducción del nitrobenzénico a diferentes compuestos²⁶. i) = ii) = iii) Zn/HCl ; iv) hv, $\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$; v) $\text{Zn}/\text{H}_2\text{O}$; vi) Zn/NaOH ; vii) LiAlH_4 ; viii) glucosa/ NaOH ; ix) EtOH/NaOH ; x) NaBH_4 .

V. Síntesis química de los bencimidazoles y de los N-óxidos del bencimidazol.

1.- Bencimidazoles.

Los bencimidazoles son heterociclos de cinco miembros benzofusionados (Fig. 10). Este sistema anular se encuentra en algunos sistemas biológicos como la vitamina B-12. En el mercado se existen diversos bencimidazoles con actividad farmacológica sobre humanos y animales domésticos, así como actividad fungicida.

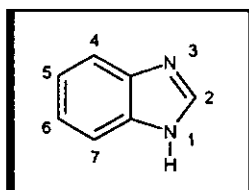


Fig. 10. Estructura del bencimidazol.

El método preferido para su síntesis es a partir del 1,2-diaminobenceno^{27, 28, 35} (Fig. 11). Este compuesto reacciona con una gran variedad de ácidos carboxílicos u otros compuestos electrofílicos, para formar bencimidazoles sustituidos en la posición dos, generalmente con buenos rendimientos.

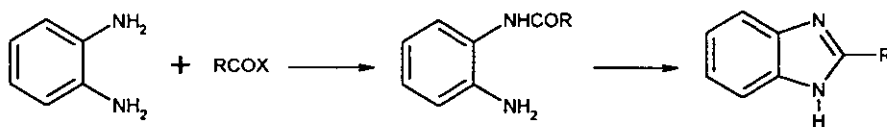


Fig. 11. Síntesis general de los bencimidazoles.

La mayoría de los bencimidazoles comerciales se preparan por esta ruta, bajo procedimientos patentados²⁹. Recientemente han aparecido en la literatura diversos bencimidazoles sintetizados por este método pero en fase sólida^{30, 31}.

Un método alternativo es la ciclización de *o*-nitroanilinas *N*-sustituidas^{27, 35}. Esta reacción se puede efectuar por fotólisis, termólisis, o bien mediante agentes reductores como zinc en ácido acético o hidrogenación catalítica. En general los rendimientos obtenidos por estos métodos son bajos²⁷.

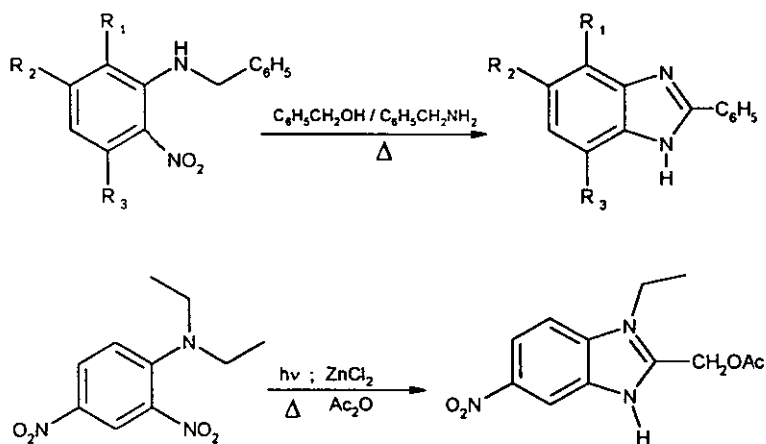


Fig. 12. Otros métodos de síntesis para los bencimidazoles.

2.- *N*-Óxidos del bencimidazol.

Aunque en la literatura estos compuestos siempre se encuentran con el nombre de *N*-óxidos del bencimidazol, se ha demostrado que en solución se encuentran en equilibrio tautomérico con los hidróxibencimidazoles (Fig. 13). El equilibrio se puede desplazar hacia uno de los lados dependiendo del disolvente³². En algunos casos, parece ser que el hidróxibencimidazol es el único de los tautómeros presentes³³.

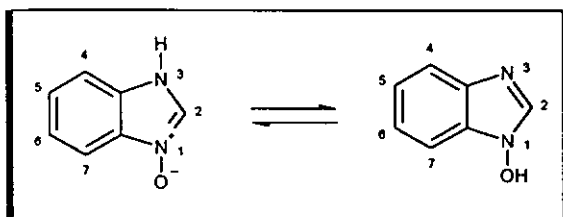


Fig. 13. Equilibrio tautomérico entre el *N*-óxido del bencimidazol y el hidróxibencimidazol

A diferencia de otros sistemas heterocíclicos de igual basicidad (piridina o quinolina), los bencimidazoles no se oxidan a los correspondientes N-óxidos, aún tratándolos con peroxiácidos³⁴. Por lo tanto, prácticamente todas las rutas sintéticas involucran la ciclización de un compuesto nitroaromático en donde se forma el enlace C2-N1. Los tres métodos generales para su síntesis son:^{27, 34, 35, 36, 37}

A) Condensación de un carbonilo amídico con una hidroxilamina.

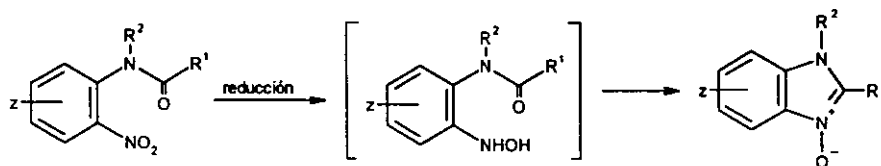


Fig. 14. Reducción de *o*-nitroacetanilidas

Aunque existen muchos agentes reductores para llevar a cabo esta reacción³⁴, ninguno es enteramente satisfactorio como un método general. Los principales problemas son que muchas veces la reducción se va hasta las aminas y no hay ciclización, o bien, que los productos principales son los bencimidazoles³⁸.

B) Interacción de un carbono azometínico con un grupo nitroso

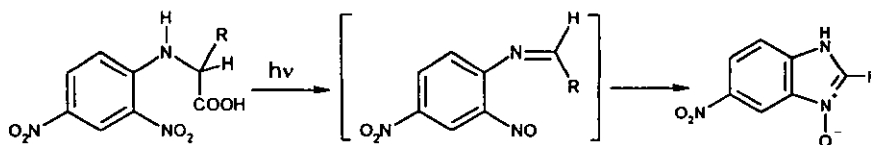


Fig. 15. Fotólisis de los 2,4-dinitrofenil- α -aminoácidos.

No solo los derivados de los 2,4-dinitrofenil α -aminoácidos dan esta reacción de fotólisis, existen un número importante de compuestos³⁴ que también forman los N-óxidos del bencimidazol por este método. Sin embargo, son ejemplos aislados en los que a veces la materia prima es difícil de preparar, o se obtienen rendimientos muy pobres³⁶. El intermediario común que se ha planteado para estas reacciones (un carbono azometínico con un grupo nitroso) es motivo todavía de controversia³⁴.

C) Una ciclización del tipo aldólica de un metileno con un grupo nitro.

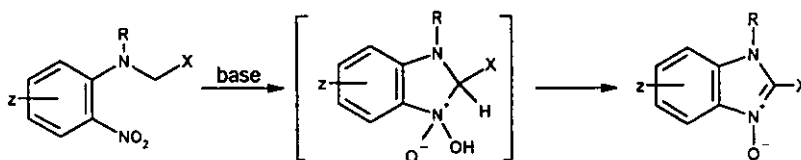
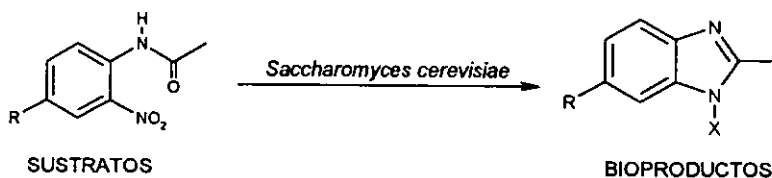


Fig. 16. Ciclización de *o*-nitroanilinas *N*-sustituidas en presencia de una base.

Esta es la reacción más estudiada en los últimos años y que ha demostrado ser probablemente la más útil³⁷. Para que se lleve a cabo es necesario tener grupos electroattractores en X. Los rendimientos son variables y dependen de la naturaleza de R, X y en algún grado del sustituyente(s) presente(s) en el anillo^{34,39}.

OBJETIVOS.

El grupo de investigación al que pertenezco, ha estado interesado en la síntesis de diversos heterociclos utilizando las biotransformaciones con *Saccharomyces cerevisiae*. El objetivo de esta tesis es el estudio de la biohidrogenación de *o*-nitroacetanilidas para su aplicación en la síntesis de compuestos heterocíclicos.



Objetivos particulares:

- Sintetizar los sustratos (2-nitroacetanilidas-4-substituidas) y caracterizarlos.
- Realizar la biohidrogenación de los sustratos con *Saccharomyces cerevisiae*.
- Identificar y caracterizar los bioproductos.
- Determinar la influencia del sustituyente en la posición 4 (*para* a la amida) en el rendimiento, tiempo de reacción y tipo de bioproducto.

RESULTADOS.

I- Síntesis de substratos.

Se prepararon siete diferentes 2-nitroacetanilidas-4-substituidas, **2**, a partir de las correspondientes anilinas, **1**. La reacción de acetilación se efectuó con anhídrido acético y unas gotas de agua⁴⁰ (Fig. 17). Los productos se recrystalizaron de etanol-agua y los rendimientos se muestran en la siguiente tabla.

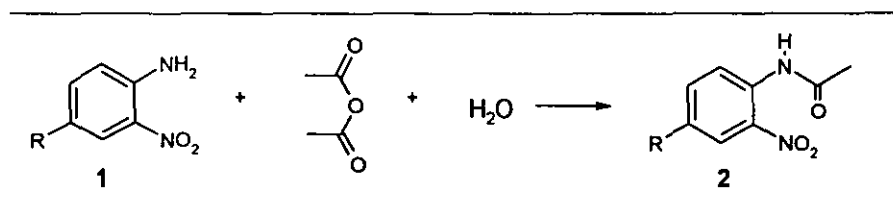


Fig. 17. Síntesis de los substratos

Tabla 2: Acetilación las 2-nitroanilinas-4-substituidas (1a-g).

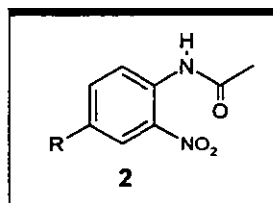
Nitroanilina	R	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento de las nitroacetanilidas 2 (%)
1a	CH ₃	ya se tenía	
1b	H	1.2	93
1c	Cl	3.5	88
1d	Br	3.2	85
1e	CF ₃	3.0	95
1f	NO ₂	2.5	91
1g	CN	3.0	76

II- Caracterización de substratos.

Las *o*-nitroacetanilidas, **2**, fueron caracterizadas por espectroscopia de infrarrojo, masas, resonancia magnética nuclear de ^1H y punto de fusión. La espectroscopia es congruente con las estructuras propuestas y se muestran a continuación en forma de tablas.

Tabla 3. Espectroscopia IR de las 2-nitroacetanilidas-4-substituidas.

Nitroacetanilida	R	IR (cm ⁻¹) KBr/pastilla		
		R-NH-	-CO-	Ar-NO ₂
2a	CH ₃	3382 3362	1719	1518, 1343
2b	H	3373	1710	1343
2c	Cl	3367	1714	1487, 1338
2d	Br	3366	1712	1485, 1337
2e	CF ₃	3382	1714	1530, 1323
				R-CF ₃ 1126
2f	NO ₂	3330	1710	1501, 1341
2g	CN	3267	1709	1498, 1351
				R-CN 2235

Tabla 4. Espectroscopia de masas de las 2-nitroacetanilidas-4-substituidas, **2**^a.

Nitroacetanilida	R	[M ⁺]	[M ⁺ -42]	[M ⁺ -88]
2a	CH ₃	194 (41)	152 (100)	106 (51)
2b	H	180 (24)	138 (100)	92 (29)
2c	Cl	216, M+2 (9)	172 (100)	126 (26)
		214 (25)		
2d	Br	260, M+2 (25)	216 (100)	170 (28)
		258 (26)		
2e	CF ₃	248 (44)	206 (95)	160 (46)
2f	NO ₂	225 (19)	183 (89)	137 (04)
2g	CN	205 (25)	163 (100)	117 (18)

^a Entre paréntesis se indica la abundancia relativa.

Tabla 5. Resonancia Magnética Nuclear de ¹H de las 2-nitroacetanilidas-4-sustituidas 2.

Substrato	R	DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm). Constantes de acoplamiento J (hertz)					
		NH (s)	H-3 (d) J ₃₋₅	H-5 (dd) J ₅₋₆ ; J ₅₋₃	H-6 (d) J ₅₋₆	CH ₃ (s)	
2a	CH ₃	10.20	8.01 J=1.3	7.45 J=8.4, 2.1	8.63 J=8.6	2.28 2.38 (s, 3H, CH ₃ -fen)	
2b	H	10.32	H-3 (dd) 8.77 J=8.6, 1.9	H-6 (dd) 8.21 J=8.5, 1.6	H-5 (m) 7.65	H-4 (m) 7.18	2.30
2c	Cl	10.25	8.21 J=2.5	7.60 J=9.2, 2.6	8.79 J=9.2	2.30	
2d	Br	10.23	8.35 J=2.4	7.73 J=9.1, 2.3	8.72 J=9.1	2.29	
2e	CF ₃	10.48	8.50 J=2.0	7.87 J=8.9, 2.1	9.00 J=9.0	2.34	
2f	NO ₂	10.62	9.13 J=2.7	8.48 J=9.5, 2.3	9.10 J=9.5	2.38	
2g	CN	10.54	8.56 J=2.0	7.88 J=9.0, 2.0	9.03 J=8.9	2.35	

Tabla 6. Puntos de fusión de las 2-nitroacetanilidas-4-sustituidas.

Substrato	R	p.f. °C sin corregir	p.f. reportado °C	referencias
2a	CH ₃	91-93	96	52
2b	H	90-92	94	52
2c	Cl	100-102	104	52
2d	Br	101-103	--	
2e	CF ₃	99-102	--	
2f	NO ₂	120-122	125-126	52
2g	CN	86-88	--	

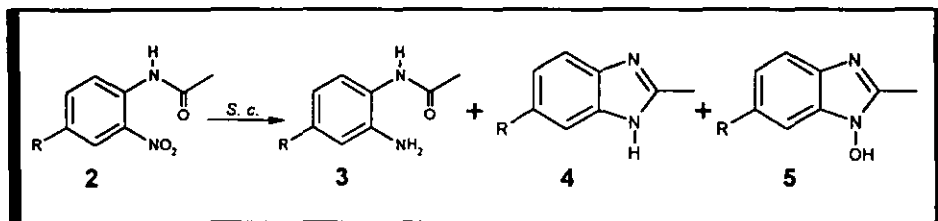
III- Biotransformación de sustratos con *Saccharomyces cerevisiae*.

Para llevar a cabo la biotransformación de los sustratos (2a-g), la levadura de pan liofilizada (15 g) se suspende en una solución de sacarosa (15 g) en agua (100 mL) y se incubaba durante 30 minutos a 30 °C y 150 r.p.m. Enseguida, se adiciona al medio de cultivo la *o*-nitroacetanilida 2a-g (0.5 mmol) disuelta en 5 mL de una mezcla acetona-etanol y se mantienen las condiciones de la incubación. La reacción se sigue por cromatografía en capa fina (ccf) y cuando no se observan cambios aparentes, los bioproductos se recuperan del medio de cultivo por una extracción con acetato de etilo. Su purificación se hace por cromatografía en columna con sílica gel, y la caracterización por sus constantes físicas (p.f.) y espectroscópicas (IR, EM, RMN ¹H y ¹³C). A continuación se mencionan los productos y los rendimientos obtenidos para cada sustrato:

Cuando la 4-metil-2-nitroacetanilida, 2a, se puso a biotransformar, no se obtuvo ningún producto y fue recuperada casi en su totalidad después de nueve días (Tabla 7).

Los mismos resultados ocurrieron con la 2-nitroacetanilida 2b. Sin embargo, Takeshita y Yoshida¹⁴ habían reportado que este compuesto era reducido a la 2-aminoacetanilida en un 25%. Se decidió entonces aumentar la cantidad de biocatalizador (50 g) para tener la misma relación sustrato/levadura con la que ellos trabajaron. Después de transcurridos los tres días en que debía llevarse a cabo la reducción, no se observó por cromatografía en capa fina, la formación de producto alguno, por lo que la reacción se dejó cinco días más. El producto que se obtuvo entonces fue el 2-metilbencimidazol, 4b, con rendimientos de un 8% (Tabla 7).

Las acetanilidas con cloro y bromo como sustituyentes, 2c y 2d, fueron biohidrogenadas a las aminas correspondientes, 3c y 3d, en bajos rendimientos y tiempos de reacción largos (Tabla 7).

Tabla 7. Productos de la biotransformación de 2-nitroacetanilidas-4-substituidas **2a-g**

Substrato	R	Tiempo (días)	Bioproductos			Recuperado 2 (%)
			3 (%) ^a	4 (%) ^a	5 (%) ^a	
2a	CH ₃	9	-	-	-	92
2b	H	8	-	8 ^b	-	80
2c	Cl	8	20	-	-	54
2d	Br	8	26	-	-	38
2e	CF ₃	2	10	48	-	20
2f	NO ₂	1	-	26	67	-
2g	CN	1	-	-	88	-

^a Todos los rendimientos se calcularon a partir de la cantidad en mmoles de bioproductos purificados por cromatografía en columna.

^b Se obtuvo cuando la cantidad de levadura utilizada fue tres veces mayor.

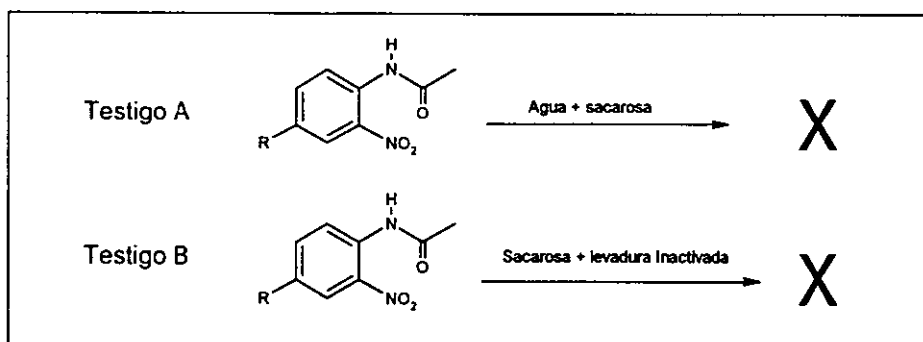
Las otras tres acetanilidas, **2e**, **2f** y **2g**, a diferencia de las anteriores, fueron biohidrogenadas con mejores rendimientos y en tiempos de reacción cortos. El compuesto trifluorado (**2e**) se redujo a la amina **3e** y al benzimidazol **4e** con rendimientos moderados. Los substratos con NO₂ y CN como sustituyentes (**2f** y **2g**) dieron con buenos rendimientos los 1-hidróxi-2-metilbenzimidazoles **5f** y **5g**. La acetanilida **2f** también formó el 2-metil-6-nitrobenzimidazol **4f** con bajos rendimientos.

IV. Elaboración de testigos.

Se hicieron dos experimentos control. *Testigo A*: consistió en poner al sustrato, (2c y 2f) solamente con sacarosa y agua bajo las mismas condiciones de temperatura, agitación y tiempo. *Testigo B*: se puso el sustrato (2c y 2f) con levadura inactivada y azúcar bajo las mismas condiciones.

En ninguno de los testigos se observó la formación de los productos obtenidos cuando se trabajó con *S. cerevisiae* (Tabla 8).

Tabla 8. Testigos.



Testigo	Sustrato	R	Tiempo (días)	3 (%)	4 (%)	5 (%)	Recuperado 2 (%)
A	2c	Cl	8	--	--	--	92
A	2f	NO ₂	9	--	--	--	89*
B	2c	Cl	8	--	--	--	74
B	2f	NO ₂	8	--	--	--	81

* Se observó por cromatografía en capa fina una pequeña cantidad de 2-4-dinitroanilina. La identificación de este compuesto se hizo por ccf comparando una muestra del compuesto puro en diferentes sistemas de elución.

V. Caracterización de productos.

Los productos fueron caracterizados por espectroscopía de infrarrojo, masas, resonancia magnética nuclear de ¹H (en algunos casos ¹³C) y punto de fusión. La espectroscopía es congruente con las estructuras propuestas y se muestran a continuación en forma de tablas.

1) 2-Aminoacetanilidas-4-substituidas 3c, 3d y 3e.

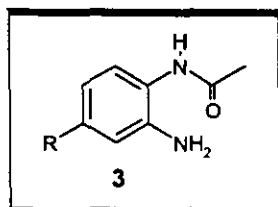


Tabla 9. Espectroscopía IR de las 2-aminoacetanilidas-4-substituidas 3c, 3d y 3e.

Aminoacetanilida	R	IR (cm ⁻¹) KBr/pastilla			
		Ar-NH ₂	R-NH-	-CO-	Núcleo del fenilo
3c	Cl	3439	3321 3231	1631	1495
3d	Br	3421	3352	1694	--
3e	CF ₃	3412	3347	1653	1516 CF ₃ 1028

Tabla 10. Espectroscopía de masas de las 2-aminoacetanilidas-4-sustituidas 3c, 3d y 3e.

Aminoacetanilida	R	[M ⁺]	[M ⁺ -42]	[M ⁺ -70]
3c	Cl	186 M+2 (23) 184 M+ (71)	142 (100)	114 (92)
3d	Br	230 M+2 (61) 228 M+ (63)	186 (100)	158 (14)
3e	CF ₃	218 (50)	176 (100)	130 (02)

^a Entre paréntesis se indica la abundancia relativa.

Tabla 11. R.M.N. de ^1H de las 2-aminoacetanilidas-4-substituidas 3c, 3d y 3e.

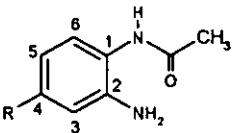
							
	R	DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).					
		Constantes de acoplamiento J (Hertz)					
		NH (s)	H-3 (d) J_{3-5}	H-5 (dd) $J_{5-6}; J_{5-3}$	H-6 (d) J_{6-5}	NH ₂ (s)	CH ₃ (s)
3c	Cl	8.90	6.75 $J=2.3$	6.63 $J=8.4; 2.3$	7.16 $J=8.4$	4.35	2.14
3d	Br	7.81	6.92 $J=2.2$	6.85 $J=8.5; 2.1$	7.03 $J=8.4$	4.11	2.17
3e	CF ₃	9.08	7.12 $J=2.0$	6.99 $J=8.1; 2.0$	7.29 $J=8.1$	4.46	2.23

Tabla 12. Puntos de fusión de las 2-aminoacetanilidas-4-substituidas 3c, 3d y 3e.

Producto	R	p.f. °C sin corregir	p.f. reportado °C	referencias
3c	Cl	134-136	--	
3d	Br	134-135	--	
3e	CF ₃	128-131	--	

2) 2-Metilbencimidazoles-6-sustituidos 4b, 4e y 4f.

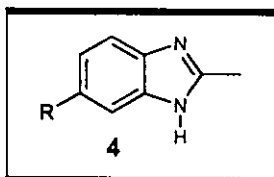


Tabla 13. Espectroscopia IR de los 2-metilbencimidazoles-6-sustituidos 4b, 4e y 4f.

Bencimidazol	R	IR (cm ⁻¹) KBr/pastilla		
		-NH	C=C y C=N	
4b	H	3462 ; 2937	1542 ; 1454 1404	-CH 1271,909
4e	CF ₃	3489 ; 3278	1524 ; 1492	CF ₃ 1126
4f	NO ₂	3566 ; 3330 2819 ; 2926	1516 ; 1472	NO ₂ 1337

Tabla 14. E. M. de los 2-metilbencimidazoles-6-sustituidos 4b, 4e y 4f.

Bencimidazol	R	[M ⁺]	[M+ -1]	[M+ -28]	[M+ -55]
4b	H	132 (100)	131 (70)	104 (7)	77(3)
4e	CF ₃	200 (100)	199 (45)	172 (4)	131 (13)
4f	NO ₂	177 (100)	[M+ - 30]	[M+ -46]	[M+ - 73]
			147 (25)	131 (45)	104 (17)

* Entre paréntesis se indica la abundancia relativa.

Tabla 15. R.M.N. de ^1H de los 2-metilbencimidazoles-6-sustituídos 4b, 4e y 4f.

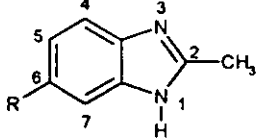
						
	R	DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).				
		Constantes de acoplamiento J (Hertz)				
		NH (s)	H-4 (d) J_{4-5}	H-5 (dd) $J_{5-4} ; J_{5-7}$	H-7 (d) J_{7-5}	CH ₃ (s)
4b	H	–	7.54(m,2H, arom) 7.22 (m, 2H, arom)			2.63
4e	CF ₃	12.06	7.42 $J=8.4$	7.51 $J=8.4, 1.3$	7.81 $J=1.4$	2.61
4f	NO ₂	12.17	7.54 $J=9.0$	8.10 $J=8.9, 2.1$	8.43 $J= 2.1$	2.63

Tabla 16. R.M.N. de ^{13}C de los 2-metilbencimidazoles-6-sustituídos 4b y 4f.

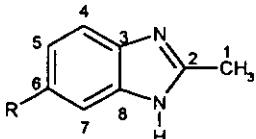
									
	R	DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).							
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
4b	H	14.96	150.92	138.47	114.49	122.32	122.32	114.49	138.47
4f	NO ₂	15.53	155.73	142.32	110.92	113.31	142.32	116.95	142.32

Tabla 17. Puntos de fusión de los 2-metilbencimidazoles-6-sustituídos 4b, 4e y 4f.

Producto	R	p.f. °C sin corregir	p.f. reportado °C	referencias
4b	H	162-166	176-177	52
4e	CF ₃	178-181	–	
4f	NO ₂	214-215	221	53

3) 1-hidróxi-2-metilbencimidazoles-6-sustituídos.

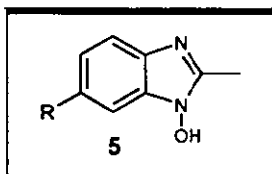


Tabla 18. Espectroscopía IR de los 1-hidróxi-2-metilbencimidazoles-6-sustituídos 5f y 5g.

Hidroxi-bencimidazol	R	IR (cm ⁻¹) KBr/pastilla		
		-OH	C=C y C=N	-CH
5f	NO ₂	3447, 3078, 2410	1606, 1524,	1270, 1220, 1158, 887, 734
				NO ₂ 1349
5g	CN	3425, 3012, 2412	1453	1287, 1233, 1185, 815
				CN 2228,

Tabla 19. E. M. de los 1-hidróxi-2-metilbencimidazoles-6-sustituídos 5f y 5g.

	R	[M ⁺]	[M ⁺ -16]	[M ⁺ -17]	[M ⁺ - 30]	[M ⁺ -46]	[M ⁺ - 63]
5f	NO ₂	193 (100)	177 (6)	176 (1)	163 (6)	147 (12)	130(22)

	R	[M ⁺]	[M ⁺ -16]	[M ⁺ -17]	[M ⁺ - 42]	[M ⁺ - 43]
5g	CN	173 (85)	157 (100)	156 (56)	131 (48)	130 (23)

° Entre paréntesis se indica la abundancia relativa.

Tabla 20. R.M.N. de ^1H de los 1-hidróxi-2-metilbencimidazoles-6-sustituídos 5f y 5g.

		DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm). Constantes de acoplamiento J (Hertz)				
	R	OH (s)	H-7 (d) $J_{7,5}$	H-5 (dd) $J_{5,4} ; J_{5,7}$	H-4 (d) $J_{4,5}$	CH_3 (s)
5f	NO_2	12.3	8.19 $J = 2.3$	8.02 $J = 8.86, 2.32,$	7.65 $J = 8.9$	2.54
5g	CN	12.05	7.97 $J = 1.34$	7.53 $J = 8.36, 1.54$	7.68 $J = 8.48$	2.52

Tabla 21. R.M.N. de ^{13}C del 1-hidróxi-2-metilbencimidazol-6-sustituído 5f.

		DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm).							
	R	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
5f	NO_2	12.07	153.57	131.27	104.82	116.61	142.31	118.66	131.27

Tabla 22. Puntos de fusión de los 1-hidróxi-2-metilbencimidazoles-6-sustituídos 5f y 5g.

Producto	R	p.f. $^{\circ}\text{C}$ sin corregir	p.f. reportado $^{\circ}\text{C}$	referencias
5f	NO_2	290 desc.	290-4 desc.	53
5g	CN	260-265 desc.	—	—

Difracción de Rayos X

Al recrystalizar los 1-hidroxi-2-metil-6-substituidos 5f y 5g en DMSO-cloroformo y metanol respectivamente se pudo obtener cristales adecuados para difracción de R-X.

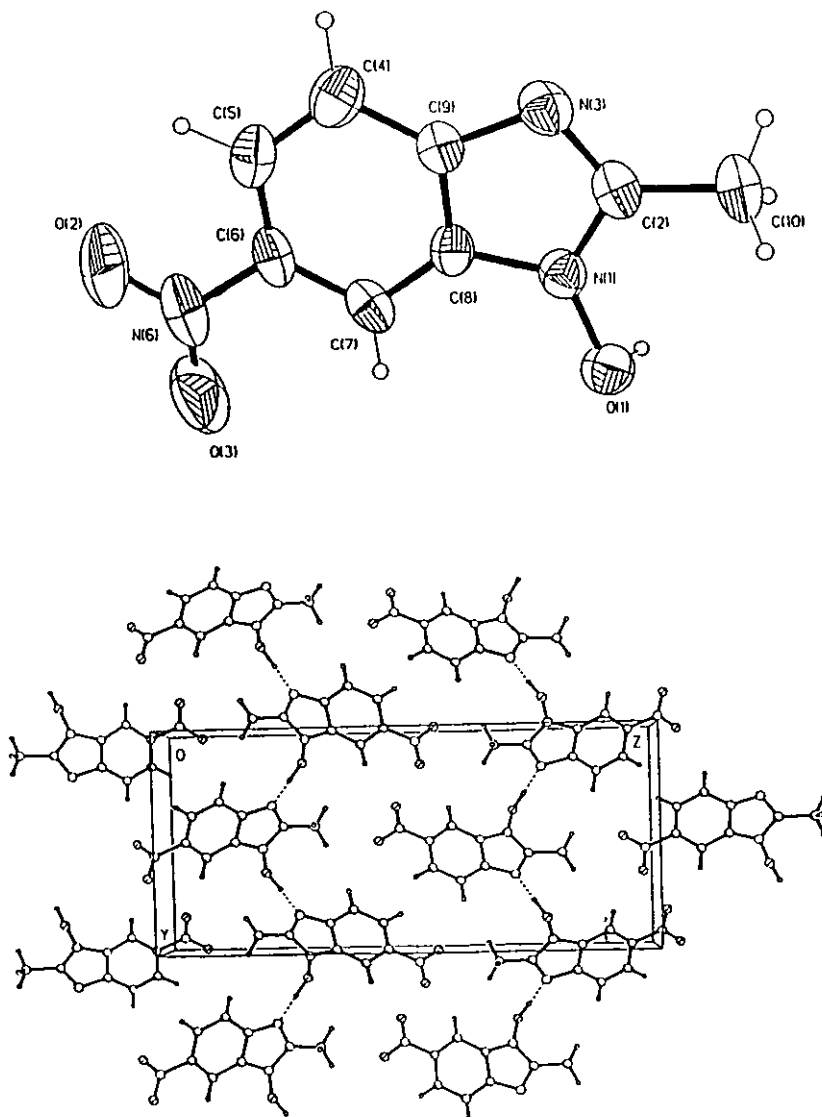


Fig. 18. Difracción de R-X del 1-hidroxi-2-metil-6-nitrobenzimidazol.

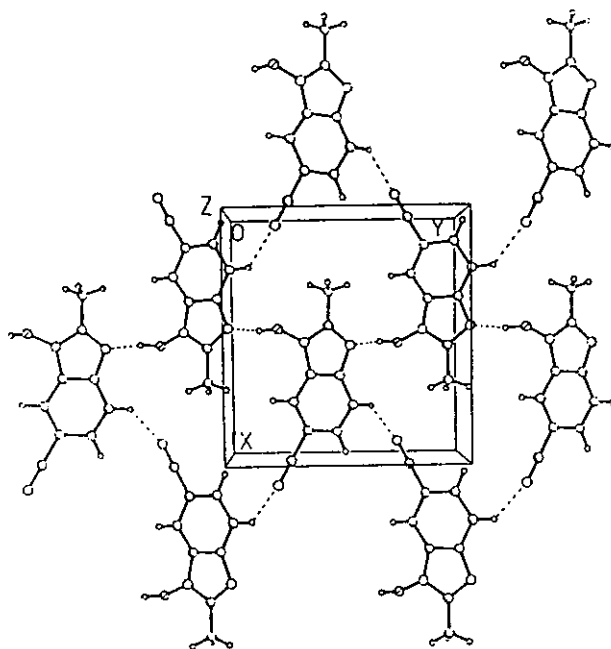
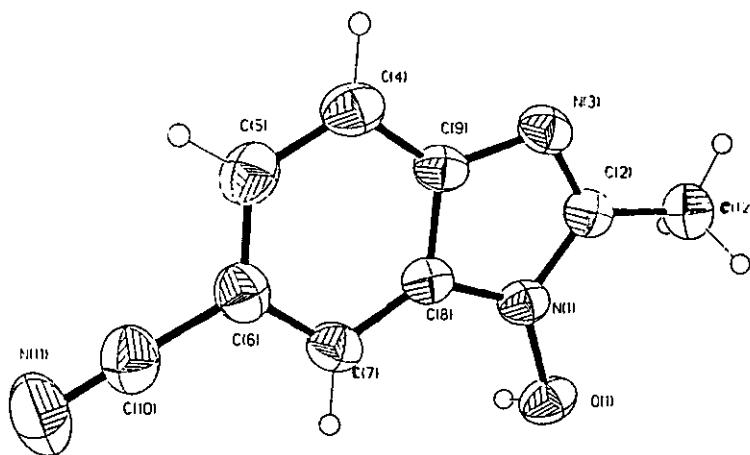


Fig. 19. Difracción de R-X del 6-ciano-1-hidroxi-2-metilbenzimidazol.

DISCUSIÓN.

Las aminas primarias aromáticas son compuestos muy importantes. Principalmente porque pueden convertirse sin problemas en sales de diazonio, un grupo funcional que se reemplaza fácilmente por otros grupos (F, Cl, Br, I, CN, OH, H, Ar, OR, SH, SR, NCS, NCO, PO₃H₂, As₃H₂, Sb₃H₂)²⁴. A su vez, la mejor forma de obtener las aminas primarias aromáticas es por reducción directa de los nitrocompuestos. Por lo tanto, esta última reacción es de gran relevancia en la síntesis orgánica. Entre los numerosos métodos que se encuentran en la literatura para llevarla a cabo²⁵, *Saccharomyces cerevisiae* ofrece la posibilidad de no utilizar ningún metal y utilizar condiciones muy suaves de reacción. Además se ha demostrado que, en ciertos casos, es más selectiva y mejor reductor que los agentes químicos conocidos⁴¹. A pesar de estas características, apenas se sabe un poco sobre los alcances de esta biotransformación, por lo cual la investigación que se haga al respecto puede ser de gran ayuda para desarrollar esta metodología.

Con respecto a la química heterocíclica, los compuestos nitroaromáticos con cadenas laterales en la posición *orto*, tienen un valor sintético importante para producir heterociclos con átomos de nitrógeno²⁷. Un modo de conseguir la ciclización de estos compuestos, es a través de una reacción de reducción (Fig. 20). Para que esto ocurra, además de tener un agente reductor adecuado, se requiere la presencia de un grupo electrofílico en la cadena lateral que reaccione con algún intermediario de la reducción (una hidroxilamina por ejemplo) o con la amina que se forma.

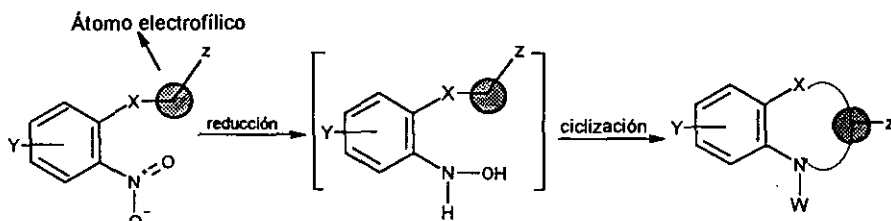


Fig. 20. Ciclización de compuestos nitroaromáticos.

El centro electrofílico es generalmente un carbono con hibridación sp_2 deficiente en densidad electrónica (un carbonilo, un doble enlace con sustituyentes electroattractores, etc.). "X" puede ser un heteroátomo, una cadena de hasta dos carbonos o combinaciones

de estos, pero no debe haber más de dos átomos porque difícilmente se forma el heterociclo²⁸. Por lo tanto se pueden formar compuestos de cinco y seis miembros benzofusionados.

En base a estos requerimientos, se estableció que las *o*-nitroacetanilidas cumplen con los requisitos para formar los bencimidazoles como se muestra en la figura 21. El agente reductor sería la levadura de pan.

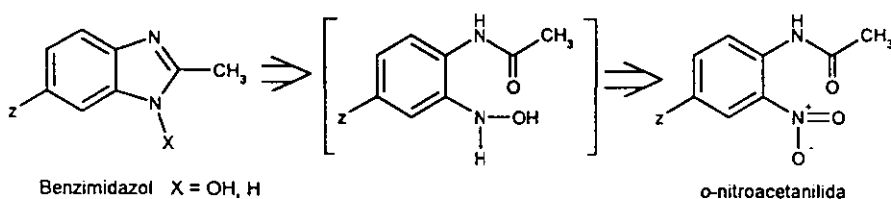


Fig. 21 Análisis retrosintético de la síntesis del anillo del bencimidazol.

• Preparación de las *o*-nitroacetanilidas.

Las *o*-nitroacetanilidas (2) no se encuentran disponibles comercialmente, pero se prepararon fácilmente al acetilar las anilinas correspondientes (1) (Fig. 22). Este método fue sencillo y los rendimientos que se obtuvieron (para casi todos los casos > 88%) son comparables con los reportados en la literatura⁴⁰.

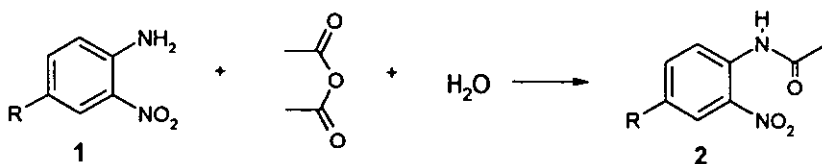


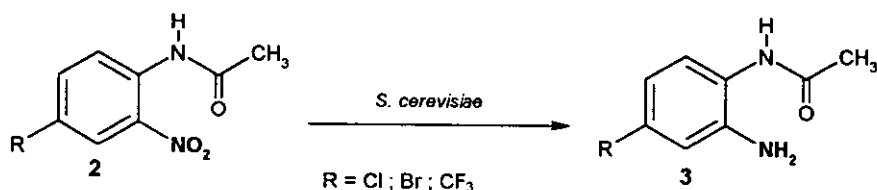
Fig. 22 Acetilación de las *o*-nitroanilinas.

La identificación de las amidas, 2, se basó en las siguientes observaciones. En IR todas muestran una banda mediana alrededor de 3350 cm^{-1} del enlace N-H. La banda de absorción del carbonilo entre 1720 y 1710 cm^{-1} las distingue fácilmente de las anilinas. De las bandas del grupo nitro, se observa la de 1350 - 1320 cm^{-1} . Por espectroscopía de masas en todos los casos se obtuvo el ión molecular (M^+), pero el pico base siempre fue la señal de $M^+ - 42$. Esta señal corresponde al rompimiento del enlace del nitrógeno

con el carbonilo y es característica de estos compuestos. La siguiente pérdida de 46 unidades de masa se atribuye a la ruptura del grupo nitro del anillo aromático. En el caso de las acetanilidas con Cl y Br aparecen los picos de (M+2) con relación 3:1 y 1:1 con respecto al ión molecular respectivamente. Finalmente, en R.M.N. de ^1H todos los espectros (a excepción de la *o*-nitroacetanilida (R=H)) muestran un patrón de sustitución 1, 2, 4. Los desplazamientos químicos de los protones del anillo aromático son mayores (se desplazan a campo bajo) según aumenta el carácter electroattractor del sustituyente en *para* (Tabla 5, pag. 16). Las constantes de acoplamiento *orto* (8.4 - 9.5 Hz) y *meta* (2.1 - 2.5 Hz) que se observan están de acuerdo con las estructuras propuesta.

■ Biohidrogenación de los sustratos

- Formación de las 2-aminoacetanilidas-4-sustituidas (3c-e).



La bioreducción de tres sustratos (2c, 2d y 2e) con *S. cerevisiae* dio como productos las aminas correspondientes (3c-e) en bajos rendimientos (10-26%). Esta reacción se ha observado también para la *orto*-nitroacetanilida utilizando la misma levadura y con rendimientos muy parecidos¹⁴. En general, para todas las reducciones de grupos nitroaromáticos con este microorganismo, el factor más importante para tener buenos rendimientos, es el carácter electroattractor de los sustituyentes. En este caso, el cloro y el bromo a pesar de que atraen electrones por inducción, son capaces de liberarlos por efecto de resonancia²², lo que explica los bajos rendimientos. En el caso del trifluorometil (un grupo más electroattractor) el rendimiento tan pobre (10%) se puede deber a que la mayor parte de este compuesto siga reaccionando para formar el bencimidazol (ver formación del bencimidazol).

El mecanismo por el cual ocurre la reducción de los grupos nitros con levadura de pan esta muy poco estudiado. Sin embargo se ha sugerido que probablemente los intermediarios de reacción sean el grupo nitroso y la hidroxilamina^{18, 23}. En nuestro caso no se logró identificar ninguno de estos intermediarios. Tampoco se sabe con certeza cual es el agente reductor presente en las levaduras responsable de la reducción, pero seguramente se trata de un proceso catalizado enzimáticamente. Esta idea se encuentra basada en que bajo las condiciones de pH y temperatura utilizadas (5.5 y 30 °C) los compuestos químicos reductores que se encuentran en abundancia, como los azúcares, no pueden efectuar la reducción de los grupos nitro como se demostró con el testigo A. Además es necesario que el metabolismo de las células se encuentra activo para que la reacción ocurra (testigo B).

Un mecanismo que se propone para explicar la formación de las aminoacetanilidas (3), se muestra en la figura 23. El primer paso es la reducción del grupo nitro (2) a nitroso (I). La reducción continúa a la hidroxilamina (II) y termina en la amina (3). Cada uno de estos pasos podría ser efectuado por una o varias enzimas.

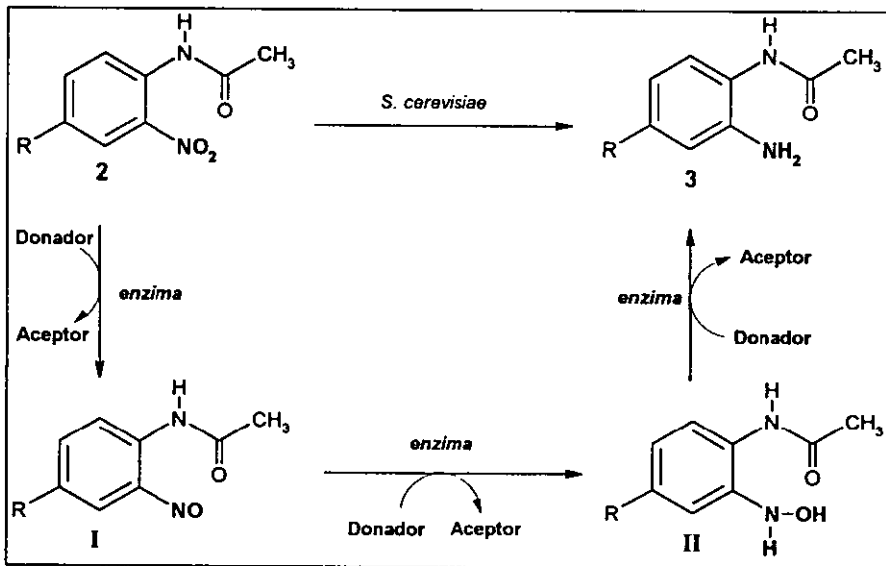
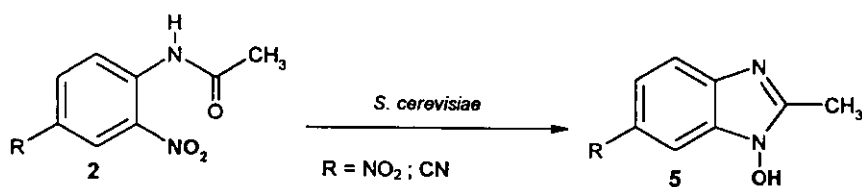


Fig. 23. Mecanismo propuesto para la formación de las 2-aminoacetanilidas-4-substituidas (3c-e).

La identificación de las *o*-aminoacetanilidas **3c**, **3d** y **3e** se hizo a través de las siguientes observaciones: en IR desaparece la banda del grupo nitro de los 1320-1350 cm^{-1} ; la banda de las aminas se hace más intensa y la señal del carbonilo aparece a frecuencias más bajas (1630-1700 cm^{-1}). El espectro de masas muestra un ión molecular de 30 unidades de masas menor que los productos, lo que concuerda con la reducción del nitro a la amina. Además se observa la pérdida de 28 unidades de masa característico de las anilinas ($\text{HCN} + \text{H}$) y el pico base sigue siendo la señal de $\text{M}^+ - 42$. En R.M.N. de ^1H se sigue observando el patrón de sustitución 1, 2, 4, pero las señales están desplazadas a campo alto, lo que sugiere la transformación del grupo nitro a la amina. También aparece una señal en 4.1 – 4.5 ppm que integra para dos protones y que desaparece con agua deuterada (Ar-NH_2).

- Formación de los hidroxibencimidazoles (**5f-g**).



Cuando los sustituyentes en *para* son electroattractores fuertes (NO_2 y CN) el producto principal de la reacción es el hidróxibencimidazol (**5**). Los rendimientos de esta reacción fueron los más altos (67-88%) y los tiempos de reacción los más cortos (24 h.). Estos grupos además del efecto inductivo que tienen, pueden estabilizar por resonancia una carga negativa, por lo que su poder electrotractor es mayor que el del resto de los sustituyentes (como da la reducción química con estos R).

En este caso, se propone un mecanismo en el cual el grupo nitro se reduce hasta la hidroxilamina (II) (Fig. 23), pero en vez de seguirse reduciendo, el nitrógeno realiza un ataque nucleofílico intramolecular al carbonilo para dar el intermediario (III), que fácilmente se deshidrata para formar el hidroxibencimidazol **5**.

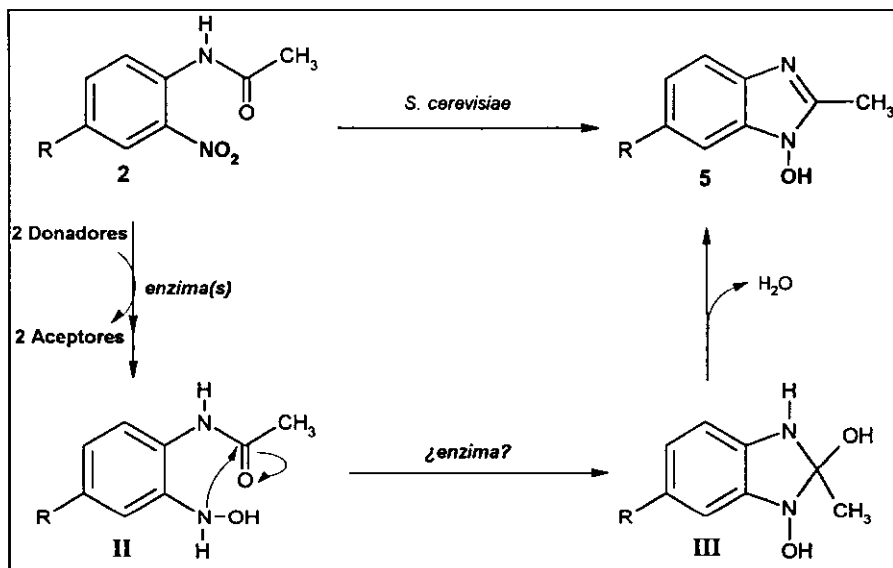


Fig. 23. Mecanismo propuesto para la formación de los 1-hidróxi-2-metil-benzimidazoles-6-substituidos (**5f** y **5g**).

Una hipótesis de por qué algunas hidroxilaminas forman los heterociclos y otras se reducen, se basa en las estructuras de resonancia de los compuestos que se cicizaron (Fig. 24). Los grupos electroattractores nitro y ciano, son capaces de soportar una carga negativa por resonancia, y por lo tanto el par de electrones libre del nitrógeno de la amida estaría "comprometido" con el anillo aromático, dejando al carbonilo más susceptible del ataque nucleofílico.

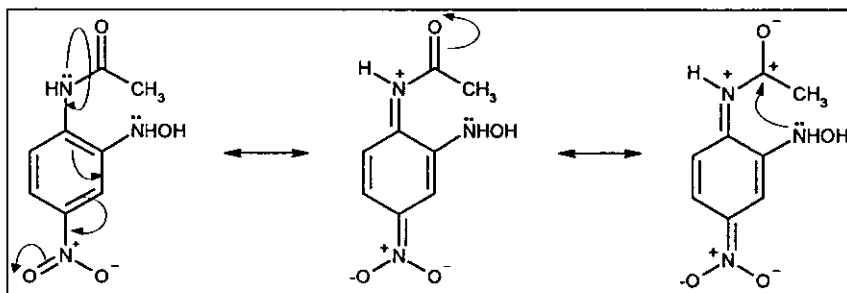


Fig. 24. Estructuras de resonancia de uno de los posibles intermediarios en la formación de los 1-hidróxi-2-metil-benzimidazoles-6-substituidos (**5f** y **5g**).

Cuando no se cuenta con un sustituyente de esta naturaleza en el anillo, o incluso es un grupo electrodonador, el par de electrones libre del nitrógeno "protege" al carbonilo de un ataque nucleofílico (Fig. 25), no ocurre la ciclización y la hidroxilamina se reduce hasta la amina.

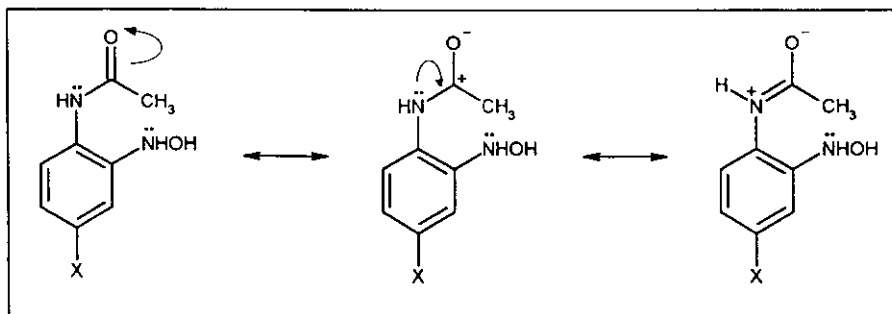


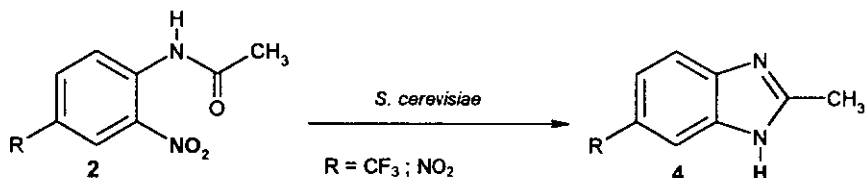
Fig. 25. Estructuras de resonancia de o de los posibles intermediarios en la formación de las 2-aminoacetanilidas-4-sustituidas (3c-e).

Dos experimentos que ayudarían a comprobar estas ideas serían cambiar el sustituyente a la posición *meta* (aunque esto también tendría consecuencias en la facilidad con que el grupo nitro se reduce) y modificando el sustituyente de la amida por algún sustituyente que atraiga densidad electrónica.

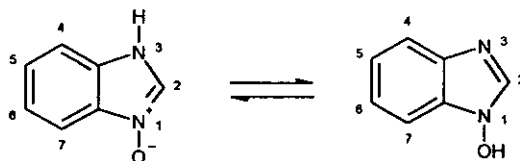
La identificación de los 1-hidróxi-2-metil-bencimidazoles-6-sustituidos 5f y 5g se hizo a través de las siguientes observaciones: en IR desaparece la banda de 1320-1350 cm^{-1} del grupo nitro (excepto en $\text{R} = \text{NO}_2$). Alrededor de los 3435 cm^{-1} hay una banda débil y ancha que corresponde a los grupos OH. En masas el pico base corresponde al ión molecular. Su valor es 30 unidades menor que el del sustrato, pero a diferencia de las aminas (3c-e) que también presentan esta señal, no se observa la pérdida de 42 unidades. El pico M-16/17 unidades de masa del ión molecular es característico tanto de los hidroxibencimidazoles como de los N-óxidos del bencimidazol. En R.M.N. de ^1H las señales también se desplazan a alto campo (desaparición del grupo nitro), se sigue mostrando el sistema trisustituido y no aparece la señal en 4.1-4.5 ppm que se había observado en las aminas. Las constantes de acoplamiento son congruentes con este sistema. La R.M.N. de ^{13}C muestra en 150 ppm al carbono unido a los dos nitrógenos. Los otros desplazamientos químicos se encuentran en la región de los carbonos aromáticos.

Como existe un equilibrio tautomérico de estos compuestos con sus N-óxidos, la asignación definitiva de una estructura para los compuestos en fase sólida, se consiguió solamente a través de los estudios de R-X.

- Formación de los bencimidazoles (4e y 4f).



Los bencimidazoles 4 se obtuvieron con rendimientos moderados cuando $\text{R} = \text{NO}_2$ y mayoritariamente cuando $\text{R} = \text{CF}_3$. En el primer caso se puede sugerir un mecanismo en el cual los hidroxibencimidazoles se reducen para generar los bencimidazoles (Fig. 26), ya que se ha demostrado que los N-óxidos (tautómeros de los hidroxibencimidazoles), son reducidos por las levaduras en las condiciones empleadas¹⁵.



Un experimento que ayudaría a comprobar esta hipótesis, sería poner a biotransformar los hidroxibencimidazoles con la levadura.

Otra opción que explica la formación de los bencimidazoles, es que el grupo nitro se reduzca hasta la amina, y que entonces ésta realice el ataque nucleofílico sobre el carbonilo (Fig. 26). Esta última reacción se puede llevar a cabo químicamente con un ácido como catalizador³²; por lo que no se descarta la intervención en este último paso de una enzima. De igual forma esta última ciclización se vería favorecida por un sustituyente electroatractor en posición *para* con respecto a la acetamida (como en el caso del $\text{R} = \text{CF}_3$ o NO_2).

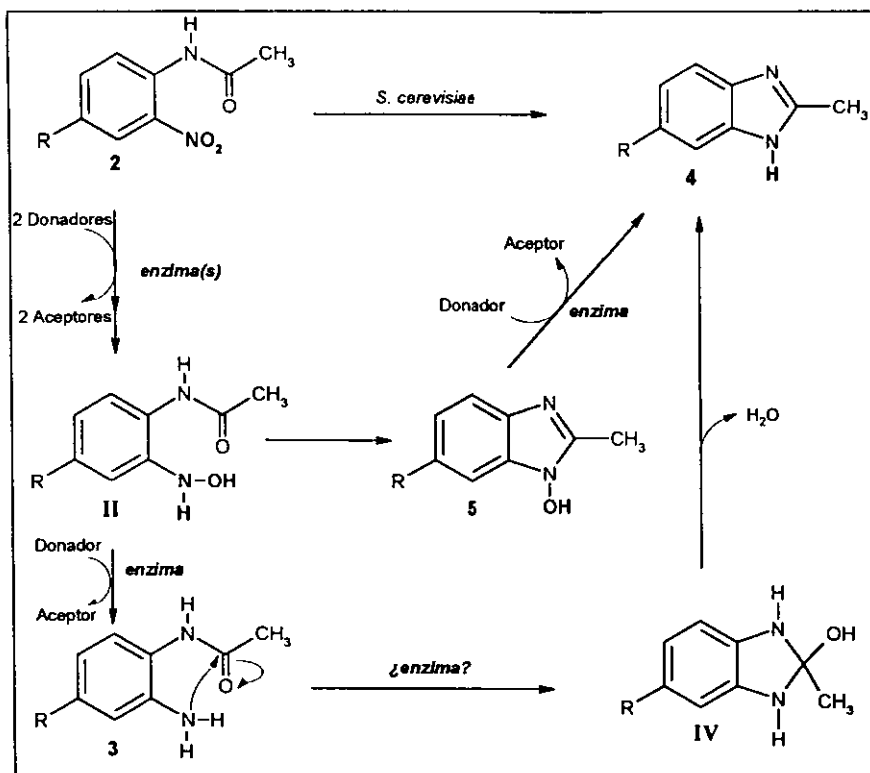


Fig. 26. Mecanismo propuesto para la formación de los 2-metil-benzimidazoles-6-sustituídos.

La identificación de los 2-metilbencimidazoles **4b** y **4e** se hizo con base a las siguientes observaciones: en IR desaparece la banda de los 1320-1350 cm^{-1} del grupo nitro (excepto en $R = NO_2$). En masas el pico base corresponde al ión molecular. Su valor es 48 unidades más pequeño que el sustrato, congruente con la formación del bencimidazol. Además, ya no se observa la pérdida de 42 unidades de masa. En el caso del 2-metilbencimidazol (**4b**) se observa un pico de $M^+ - 1$ ($H\cdot$) y después la pérdida de HCN ($M^+ - 28$) característicos de este compuesto. En el bencimidazol que tiene un grupo nitro como sustituyente (**4f**), se encontraron picos en m/z 147 y 131 ($M-30$ y $M-46$) que resulta de la eliminación de una molécula neutra de NO y de un radical de NO_2 . En R.M.N. de 1H cuando $R=H$, las señales de los hidrógenos aromáticos que integran para 4 protones, se desplazan a alto campo. Se forma un sistema AA'BB' característico de este compuesto ya que en solución los nitrógenos del bencimidazol son equivalentes por el equilibrio tautomérico que existe entre ellos. En los otros dos casos, las señales también

se desplazan a alto campo (desaparición del grupo nitro), se sigue mostrando el sistema trisustituido y no aparece la señal en 4.1-4.5 ppm que se había observado en las aminas. Las constantes de acoplamiento son congruentes con este sistema. La R.M.N. de ^{13}C muestra en 150 ppm al carbono unido a los dos nitrógenos. Los otros desplazamientos químicos se encuentran en la región de los carbonos aromáticos.

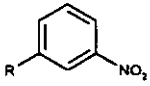
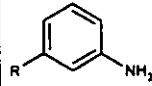
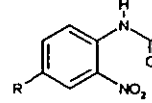
- Los sustratos que no reaccionaron (2a y 2b)

La acetanilida con sustituyente electrodonador ($\text{R} = \text{CH}_3$) no reaccionó. Este resultado se ha observado en otros compuestos con el mismo tipo de sustituyentes, pero hace falta más investigación al respecto para poder dar una conclusión que explique esta observación. La acetanilida sin sustituyentes ($\text{R} = \text{H}$) tampoco reaccionó cuando se utilizaron las mismas condiciones de todos los demás sustratos. El carácter electrodonador de la amida puede ser la responsable de este efecto. Solamente cuando la biotransformación se realizó con tres veces más de levadura, se encontró el bencimidazol (4b). Este resultado es diferente al que se reportó en la literatura, en el cual solo se observó la reducción del grupo nitro a la amina (sin ninguna ciclización). Una explicación es que aunque se trabajó con la misma relación sustrato / levadura, el experimento se hizo a una escala 10 veces menor, lo que pudo haber dificultado la observación de la amina a los tres días y que al dejarla más tiempo esta pasara a formar el bencimidazol.

En resumen, se ha comprobado que la naturaleza del sustituyente en la posición *para* de las *o*-nitroacetanilidas, es determinante en el rendimiento, el tiempo de reacción y el tipo de producto de la biotransformación.

Al comparar los rendimientos obtenidos con los reportados para los mismos compuestos pero sin el sustituyente amida^{14, 23} (Tabla 23), parece que la influencia de este grupo en la reducción del grupo nitro, no fue significativa en la mayoría de los casos; a pesar de ser un grupo electrodonador débil. Inclusive podría pensarse que el par de electrones libre del nitrógeno, *orto* al nitro, favorece la reacción¹⁸.

Tabla 23. Biotransformación de diferentes sustratos con *S. cerevisiae*.

Substrato	Producto (% rendimiento)	Tiempo de reacción (h)	Substrato	Producto (% rendimiento)	Tiempo de reacción (h)
				① Aminas ② Bencimidazoles ③ Hidróxibencimidazoles	
R			R		
H	(--)	168	H	② (8) ①(25)	192 / 72
Br	(42)	119	Br	① (26)	192
CF ₃	(55)	94	CF ₃	② + ① (58)	48
NO ₂	(66)	99	NO ₂	② + ③ (88)	24
CN	(88)	20	CN	② + ③ (90)	24

La selectividad mostrada por la levadura hacia la reducción de los grupos nitroaromáticos con sustituyentes electroattractores es congruente con trabajos anteriores^{14-16,18,23}. La misma tendencia se ha reportado en la reducción química de nitrobenzenos *p*-sustituídos con SnCl₂ en solución ácida, NaBH₄-SnCl₂ en etanol y NaBH₄-CoCl₂ en metanol⁴²; así como en la ciclización térmica de N-bencil-*o*-nitroanilina. Estos resultados se han interpretado en términos de parámetros fisicoquímicos⁴², pero hace falta más investigación para entender mejor estas tendencias.

Además de los rendimientos de la reacción, también es muy importante valorar la *eficiencia* del proceso. Una medida de la eficiencia en las biotransformaciones es el número de productividad (N.P.), definido de la siguiente manera⁴³ :

$$\text{N.P.} = \text{cantidad de producto (mmol)} / \text{masa del catalizador en seco (kg)} \times \text{tiempo (h)}$$

Como se puede inferir de esta fórmula, entre mayor es el N.P., el rendimiento de la reacción por unidad de volumen y de tiempo es mayor. El número de productividad también nos da una idea de que tan fácil es separar los productos. No es lo mismo separar un gramo de producto de 1 kg de biocatalizador que de 10 kg.

En general, cuando se trabaja con cultivos de microorganismos, la productividad es baja (N.P. 5-50) porque la mayoría de los sustratos son tóxicos para las células y por lo tanto su concentración no puede ser muy alta si se quiere que los organismos continúen vivos. Además, la gran cantidad de biomasa en el medio de reacción hace difícil la recuperación del bioproducto. Otro gran inconveniente son las reacciones colaterales que podrían ocurrir por la presencia de otras enzimas capaces de actuar sobre el sustrato o los productos.

Por el contrario, los N.P. de las biotransformaciones con enzimas puras o en extractos crudos, son mucho mayores. Esto se debe a que hay mayor tolerancia a concentraciones altas de sustratos, se requiere menos biomasa para llevar a cabo la biotransformación, facilitándose así la recuperación de productos, y porque la reacción se lleva a cabo con alta especificidad, generando un solo producto.

Desgraciadamente no todas las enzimas se encuentran disponibles ya sea porque su precio es muy elevado o porque se desnaturalizan al purificarlas. También es posible que las enzimas que catalizan una reacción no sean constitutivas y sean inducidas por los compuestos orgánicos. En ciertos casos, como el nuestro, que no se sabe que enzima(s) es(son) la(s) responsable(s) de la biotransformación, se tendría que hacer un ensayo biodirigido para purificarla(s). Aún cuando se conoce y se dispone de la enzima adecuada, es necesario para una reacción redox, tener los cofactores o coenzimas para llevarla a cabo. Estos compuestos reaccionan estequiométricamente con el sustrato, pero

como son muy caros y relativamente inestables, se deben utilizar en cantidades muy pequeñas y ser regenerados *in situ* por una reacción acoplada^{2, 44}. Este proceso aunque es posible para algunas coenzimas, como el NAD⁺/NADH, sigue siendo caro y es una tarea complicada para quienes no son especialistas en la materia.

Por todo lo mencionado, los microorganismos, aún con su baja eficiencia, siguen siendo muy populares y en algunos casos, (como el nuestro), son los únicos métodos que existen para llevar a cabo ciertas biotransformaciones. Además modificando las condiciones de reacción, se puede incrementar la eficiencia del proceso (menores cantidades de levadura y menor tiempo), los rendimientos y la selectividad de la reacción³⁹.

Las propiedades biológicas de los bencimidazoles son muy importantes⁴⁵, por lo que nuevas rutas para su síntesis se siguen investigando^{30, 31}. Hasta la fecha no existe ningún proceso biocatalítico para su producción, por lo que desarrollarlo ofrecería una alternativa importante.

Por el contrario, la síntesis de los hidroxibencimidazoles es bastante limitada y no se cuentan con un método general eficiente^{27, 34, 37}. Salvo ejemplos aislados, la mayor de las veces, son obtenidos como subproductos. Sin duda, el método estudiado puede ser de gran utilidad. Además, la química de los hidroxibencimidazoles ha sido objeto de muy pocos estudios y por lo tanto, no existen aplicaciones de estos compuestos^{34,37}. La biorreducción de las nitroacetanilidas ofrece la posibilidad de explorar este campo.

Adicionalmente, dos características muy importantes de las biotransformaciones las hacen atractivas: son baratas y son limpias. Dos requerimientos de la industria y de la sociedad en general.

Debido al gran número de compuestos heterociclos que se pueden formar a partir de compuestos aromáticos nitrados²⁷, el haber estudiado esta biotransformación, ayudará a establecer los requerimientos estructurales para que se lleven a cabo este tipo de reacciones, así como a entender mejor las biorreducciones del grupo nitro.

Es de esperar que el número de las biotransformaciones en la investigación y en la industria se incrementen en un futuro cercano. Principalmente en la síntesis de moléculas complejas, pero también como nuevas rutas para preparar compuestos bien conocidos. Sin duda se convertirá en uno de los complementos más importante de la síntesis orgánica tradicional.

En México el desarrollo de estas metodologías puede ser muy importante, porque nuestro país por su gran biodiversidad, cuenta con un banco genético enorme para buscar enzimas

En un futuro con el fuerte desarrollo que esta teniendo la ingeniería genética, será real la posibilidad de tener microorganismos transgénicos mutantes con eficiencias altísimas, así como proteínas diseñadas para tener actividades catalíticas insospechadas.

Perspectivas:

Los resultados obtenidos hasta ahora son muy alentadores, pero queda por delante mucho trabajo para determinar los alcances de esta reacción. En primer lugar se deben de estudiar un número mayor de sustituyentes. Otro efecto importante que debe ser valorado, es la posición de los sustituyentes. En trabajos anteriores no se ha llegado a conclusiones definitivas porque con ciertos grupos (NO_2 , CF_3 y Br), la reducción se favorece si se encuentran en posición *orto* respecto al grupo nitro. Pero otros grupos como el ciano funcionan mejor estando en posición *meta*^{14, 23}. Los grupos con mayor impedimento estérico, como el COOEt tienen los mejores rendimientos cuando se encuentran en posición *para* con respecto al nitro¹⁴. Finalmente sería interesante observar que ocurre con *o*-nitroacetanilidas con más de un sustituyente, por ejemplo con grupos electrodonadores fuertes y electroattractores fuertes.

Adicionalmente, se debe investigar más sobre los mecanismos de reacción y realizar estudios de química teórica para entender mejor las tendencias de los resultados. Actualmente se están haciendo en colaboración con otros investigadores experimentos de electroquímica de las *o*-nitroacetanilidas empleadas.

Por otro lado se debe de hacer un esfuerzo para mejorar la eficiencia de la biotransformación. Las principales variables que se pueden modificar para conseguirlo son:

- a) *Aumento de la solubilidad de los compuestos y de la permeabilidad de las células*³⁹
- b) *Disponibilidad de oxígeno en el medio.*⁴⁶
- c) *pH*⁴⁸.
- a) *Temperatura*².
- b) *Inhibidores, inductores, medio de cultivo y parámetros nutricionales*².
- c) *Estado del cultivo cuando se agrega el sustrato*².
- d) *Disolventes orgánicos*⁴⁷
- e) *Inmovilización de las células*².

Modificando las variables que se han mencionado, no solo se podrían incrementar los rendimientos, también la selectividad de la biorreducción⁴¹. El aumento

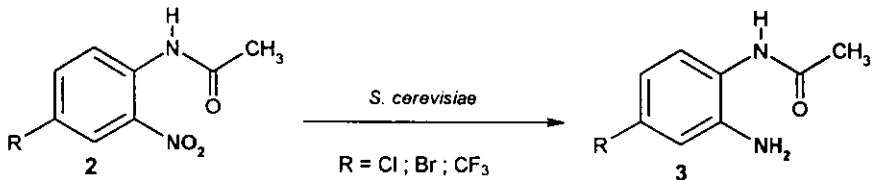
en la eficiencia también permitirá recuperar y purificar más fácilmente los bioproductos, aunque en este punto se requiere investigación para mejorar los procesos de recuperación.

En la levadura de pan se encuentran un gran número de enzimas que catalizan reacciones redox⁴⁸. La mayoría de estas enzimas (oxidoreductasas) tienen como cofactor al dinucleótido de nicotinamida- adenina (NAD(H)) y su forma fosfatada (NADP(H))². Otras oxidoreductasas menos frecuentes son dependientes de flavinas (FMN, FAD), pirroloquinolina quinona (pqq) o acetil coenzima A². Hasta la fecha no existe en la literatura alguna investigación en la que se haya tratado de elucidar cuál o cuáles enzimas son las responsables de la reducción del grupo nitro. La investigación más cercana es sobre la reducción del *p*-N,N-dimetilamino-nitrosobenceno a la correspondiente hidroxilamina, con una enzima dependiente de NADH (la alcohol deshidrogenasas del hígado de caballo^{49 50}). Esta enzima puede reducir al grupo nitroso porque al ser isoestérico e isoelectrónico a los aldehidos, es confundido con algún sustrato natural. Si se sigue la misma lógica, se puede pensar que el grupo nitro al ser isoestérico e isoelectrónico al grupo carboxilo pudiera ser reducido por una enzima que reduzca al carboxilo. Sin embargo, falta todavía mucho trabajo interdisciplinario para llegar a una conclusión sobre este tema.

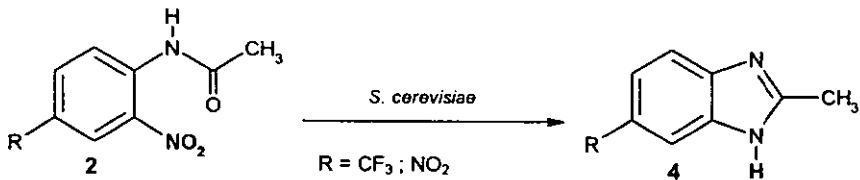
En lo que respecta a los intermediarios de la biohidrogenación de grupos nitro con *S. cerevisiae* se ha investigado más. Las evidencias sugieren que muy probablemente los intermediarios sean el grupo nitroso y la hidroxilamina^{18, 23}, pero falta también más investigación al respecto.

CONCLUSIONES.

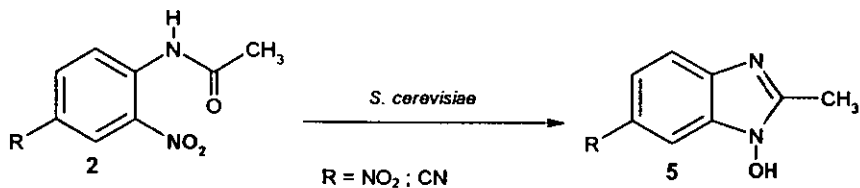
- Se demostró que las 2-nitroacetanilidas-4-substituidas son reconocidas como sustratos por el sistema biocatalítico presente en *S. cerevisiae*.
- Las 2-nitroacetanilidas **2c-e** son biohidrogenadas a las 2-aminoacetanilidas **3c-e** por *S. cerevisiae*.



- Las 2-nitroacetanilidas **2b**, **2e** y **2f** son biotransformadas a los 2-metilbenzimidazoles **4b**, **4e** y **4f**.



- Las 2-nitroacetanilidas **2f-g** son biotransformadas a los 1-hidróxi-2-metilbenzimidazoles **5f-g**.



- Las tres biotransformaciones mencionadas son ejemplos de nuevas rutas sintéticas para preparar los productos mencionados.
- Se comprobó que el rendimiento, el tiempo y los productos de la reacción están influenciados por la naturaleza del sustituyente en la posición 4.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

I. Materiales.

Se utilizaron cromatofolios ALUGRAMSILG-UV254 para correr las cromatografías en capa fina. En la cromatografía por columna se ocupó gel de sílice de capa fina (*Gel de sílice 60 MERCK (35-70 mallas ASTM)*). Los puntos de fusión se tomaron en un aparato Mel-Temp II. Los estudios de espectroscopía se realizaron en el Instituto de Química de la UNAM y se utilizaron los siguientes instrumentos:

- Espectrofotómetros de IR PERKIN-ELMER 283 Y NICOLET FT-IR 55X.
- Espectrómetros de masas Hewlett-Packard 5945 A, JMS-SX102A JEOL y JMS-AX505.
- Espectrómetro de RMN Varian Gemini-200.

Los estudios de difracción de rayos X se hicieron en el Instituto de Química utilizando un equipo Siemens P4 / PC.

II. Métodos.

Síntesis y caracterización de substratos.

Procedimiento general: 0.01 moles de *o*-nitroacetanilida *p*-sustituida, **1**, se colocaron en un matraz bola de 100mL con 20mL de anhídrido acético y unas cuantas gotas de agua. La mezcla se calentó a reflujo con agitación constante y se monitoreó por ccf. Cuando no se observó materia prima, se retiró el calentamiento, se agregaron 10 mL de agua y se agitó durante 2 horas. La acetanilida (**2**) que precipitó, se filtró y se lavó con agua fría. Las aguas madres se neutralizaron con hidróxido de amonio hasta pH = 12 y se dejaron reposar para obtener mayor cantidad de producto. En algunos casos se recristalizó de etanol-agua o acetona-agua.

Biotransformación.

Procedimiento general: En un matraz erlenmeyer de 500 mL se colocaron 15g de levadura de pan liofilizada (marca saf-instant), 15g de sacarosa y 100mL de agua a 30°C. Esta mezcla se colocó en una incubadora orbital a 30°C y 150 r.p.m. durante 30 minutos (activación). 0.5 mmoles del sustrato (2) se disolvieron en 5mL de una mezcla acetona-etanol 1:1 v/v y se agregaron al cultivo. La biotransformación se dejó durante varios días en la incubadora bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación. Fue seguida cada 24 horas por cromatografía en capa fina, para lo cual se tomaron alícuotas de 5mL que se extrajeron con acetato de etilo. Cuando no se observaron cambios, la solución se saturó con cloruro de sodio (NaCl) y se le agregaron 20g de celita y 100mL de acetato de etilo. Se agitó vigorosamente por media hora y se filtró al vacío poniendo una cama de celita con un espesor de 1cm. El residuo se extrajo tres veces con 150mL de acetato de etilo caliente. Las fracciones orgánicas se juntaron, se secaron con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄ anh.) y se concentraron en un rotavapor. La mezcla resultante fue separada por cromatografía en columna con silica gel utilizando como eluyentes hexano, acetato de etilo y metanol. El orden en el que eluyeron los compuestos fue el siguiente: la *o*-nitroacetanilida *p*-sustituida (2) que no reaccionó, la *o*-aminoacetanilida (3), el 2-metilbenzimidazol (4) y al último el 1-hidróxi-2-metilbenzimidazol (5).

Testigos:

- A.- En un matraz erlenmeyer de 500mL se colocaron 15 de sacarosa, 100mL de agua y 0.5 mmoles del sustrato (2) disueltos en 5mL de acetona-etanol 1:1 v/v.
- B.- 15 g de levadura de pan seca (saf-instant) y 100ml de agua se calentaron a 90°C durante una hora. La mezcla se dejó enfriar y se le agregó 15 de sacarosa y 0.5 mmoles del sustrato (2) disueltos en 5mL de acetona-etanol 1:1 v/v

En ambos casos se agitó durante varios días en la incubadora a 30°C y 150 r.p.m. Cada 24 horas se tomaron alícuotas de 5mL que se extrajeron con acetato de etilo. A los ocho días la solución se saturó con cloruro de sodio (NaCl), se agregaron 20g de celita (para el testigo B) y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se secaron con Na₂SO₄ anh., se concentraron en un rotavapor y en algunos casos la mezcla fue separada por cromatografía en columna con silica gel utilizando como eluyentes hexano, acetato de etilo y metanol.

III. Espectroscopía.

Todos los espectros de infrarrojo se corrieron en pastilla de KBr y las bandas de absorción están reportadas en cm^{-1} . La espectroscopía de masas se realizó por impacto electrónico de baja resolución. La resonancia magnética nuclear de ^1H , se corrió a 200 MHz en CDCl_3 (las excepciones se indican en cada caso). Para algunos compuestos se obtuvo la RMN de ^{13}C (50 MHz y 75 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en hertz. Se asignaron las siguientes abreviaturas: s = singulete, d = doblete, dd = doblete doble, t = triplete y m = multiplete. Los puntos de fusión están sin corregir.

Substratos:

2a [R=CH₃] 4-Metil-2-nitroacetanilida: RMN¹H: δ 10.20 (s, 1H, NH), 8.63 (d, J=8.6, 1H, arom), 8.01(d, J=1.3, 1H, arom), 7.45 (dd, J=8.3, 2.1, 1H, arom), 2.38 (s, 3H, CH₃-fen), 2.28 (s, 3H, CH₃). IR ν 3382, 3362, 1719; 1518; 1343. EM m/z 194 (M⁺, 41), 152 (100), 106 (51), 43 (54). pf. 91-93°C.

2b [R=H] 2-Nitroacetanilida: RMN¹H: δ 10.32 (s, 1H, NH), 8.77 (dd, J=8.6, 1.4, 1H, arom), 8.21(dd, J=8.5, 1.5, 1H, arom), 7.65(m, 2H), 7.18 (m, 2H), 2.30 (s, 3H, CH₃). IR ν 3373, 1710, 1343, 750. EM m/z 180 (M⁺, 24), 138 (100), 92 (29), 43 (46). pf. 90-92°C.

2c [R=Cl] 4-Cloro-2-nitroacetanilida: RMN¹H: δ 10.25 (s, 1H, NH), 8.79 (d, J=9.2, 1H, arom), 8.21 (d, J=2.5, 1H, arom), 7.60 (dd, J=9.2, 2.6, 1H, arom), 2.30 (s, 3H, CH₃). IR ν 3367, 1714, 1487, 1338. EM m/z 216 (M+2, 8.6), 214(M⁺, 25.4), 172 (100), 126 (26), 43 (92). pf. 100-102°C.

2d [R=Br] 4-Bromo-2-nitroacetanilida: RMN¹H: δ 10.23 (s, 1H, NH), 8.72 (d, J=9.1, 1H, arom), 8.35 (d, J=2.4, 1H, arom), 7.73 (dd, J=9.1, 2.3, 1H, arom), 2.29 (s, 3H, CH₃). IR ν 3366, 1712, 1485, 1337. EM m/z 260 (M+2, 25.5), 258 (M⁺, 26), 216(100), 170(28). pf. 101-103°C.

2e [R=CF₃] 4-Trifluorometil-2-nitroacetanilida: RMN¹H: δ 10.48 (s, 1H, NH), 9.00 (d, J=9.0, 1H, arom), 8.50 (d, J= 2.0, 1H, arom), 7.87 (dd, J=8.9, 2.1, 1H, arom), 2.34 (s, 1H,

CH₃). IR ν 3382, 1714, 1530, 1323, 1126. EM m/z 248 (M⁺, 44.2), 206 (95), 160 (46), 43 (100). pf. 99-102°C.

2f [R=NO₂] 2,4-Dinitroacetanilida: RMN¹H: δ 10.62 (s, 1H, NH), 9.13 (d, J=2.7, 1H, arom), 9.10 (d, J=9.5, 1H, arom), 8.48 (dd, J=9.5, 2.7, 1H, arom), 2.38 (s, 3H, CH₃). IR ν 3330, 1710, 1501, 1341. EM m/z 225 (M⁺, 19), 183 (89), 43 (100). pf. 120-122°C.

2g [R=CN] 4-Ciano-2-nitroacetanilida: RMN¹H: δ 10.54 (s, 1H, NH), 9.03 (d, J=8.9, 1H, arom), 8.56 (d, J=2.0, 1H, arom), 7.88 (dd, J= 9.0, 2.0, 1H, arom), 2.35 (s, 3H, CH₃). IR ν 3267, 2235, 1709, 1498, 1351. EM m/z 205 (M⁺, 25), 163 (100), 117(18), 43 (91). pf. 86-88°C.

Bioproductos

3c [R=Cl] 2-Amino-4-cloroacetanilida: RMN¹H: δ 8.90 (s, 1H, NH), 7.16 (d, J=8.4, 1H, arom), 6.75 (d, J=2.3, 1H, arom), 6.63 (dd, J=8.4, 2.3, 1H, arom), 4.35 (s, 2H, NH₂), 2.14 (s, 3H, CH₃). IR ν 3439, 3321, 3231, 1631, 1495. EM m/z 186 M+2, 184 M⁺, 142, 114, 43. pf. 134-136°C.

3d [R=Br] 2-Amino-4-bromoacetanilida: RMN¹H: δ 7.81 (s, 1H, NH), 7.03 (d, J=8.4, 1H, arom), 6.92 (d, J=2.2, 1H, arom), 6.85 (dd, J=8.5, 2.2, 1H, arom), 4.11 (s, 2H, NH₂), 2.17 (s, 3H, CH₃). IR ν . EM m/z 230 M+2+, 228 M+, 186, 158, 43. pf. 130-135°C

3e [R=CF₃] 2-Amino-4-trifluorometilacetanilida: RMN¹H: δ 9.08 (s, 1H, NH), 7.29 (d, J=8.1, 1H, arom), 7.12 (d, J=2.0, 1H, arom), 6.99 (dd, J=8.1, 2.0, 1H, arom), 4.46 (s, 2H, NH₂), 2.23 (s, 3H, CH₃). IR ν 3412, 3347, 1653, 1516, 1028. EM m/z 218(M⁺) 176, 130, 43. pf. 128-131°C.

4b [R=H] 2-Metilbenzimidazol: Se obtuvo cuando la cantidad de levadura se cambió a 50g en 250 mL de agua. Se pusieron 0.55mmol de sustrato RMN¹H : δ 7.54 (m, 2H, arom), 7.22 (m, 2H, arom), 6.21 (s, 1H, NH), 2.63 (s, 3H, CH₃). RMN¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 150.9, 138.5, 122.3, 14.5, 15.0. IR ν 3462, 2937, 1542, 1454, 1404, 1271, 909. EM m/z 132 M+, 131, 104, 90. pf. 162-166°C.

4e [R=CF₃] 2-Metil-6-trifluorometilbenzimidazol: RMN¹H: δ 12.06 (s, 1H, NH), 7.81 (d, J=1.4, 1H, arom), 7.51 (dd, J=8.4, 1.3, 1H, arom), 7.42 (d, J=8.4, 1H, arom), 2.62 (s, 1H, CH₃). IR ν 3489, 3278, 1524, 1492, 1126. EM m/z 200 M⁺, 199, 172, 131. pf. 178-181°C.

4f [R=NO₂] 2-Metil-6-nitrobenzimidazol: RMN¹H (300MHz, CDCl₃-d₆-DMSO): δ 12.17 (s, 1H, NH), 8.43 (d, J=2.1, 1H, arom), 8.10 (dd, J=8.9, 2.3, 1H, arom), 7.54 (d, J=9.0, 1H, arom), 2.65 (s, 1H, CH₃). RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃-d₆-DMSO): δ 155.73, 142.32, 116.95, 113.31, 110.92, 14.53. IR ν 3566, 3330, 2926, 2819, 1516, 1472, 1337, 830. EM m/z 177 M⁺, 147, 131, 104. pf. 214-215°C.

5f [R=NO₂] 1-Hidroxi-2-metil-6-nitobenzimidazol: RMN¹H: δ 12.3 (s, 1H, OH), 8.19 (d, J=2.3, 1H, arom), 8.02 (dd, J=8.9, 2.3, 1H, arom), 7.65 (d, J=8.9, 1H, arom), 2.53 (s, 3H, CH₃). RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃-d₆-DMSO): δ 153.6, 142.3, 142.1, 131.3, 118.7, 116.6, 104.8, 12.1. IR ν 3447, 3078, 2410, 1606, 1524, 1349, 1301, 1270, 122, 1158, 887, 734. EM m/z 193 M⁺, 177, 163, 147, 130. pf. 290°C desc.

5g [R=CN] 6-Ciano-1-hidroxi-2-metilbenzimidazol: RMN¹H: δ 12.05 (s, 1H, OH), 7.97 (d, J=1.3, 1H, arom), 7.68 (d, J=8.5, 1H, arom), 7.53 (dd, J=8.4, 1.5, 1H, arom), 2.52 (s, 3H, CH₃). IR ν 3425, 3012, 2412, 2228, 1453, 1287, 1233, 1185, 815. EM m/z 173 M⁺ 157, 156, 131, 130, 104, 103, 43. pf. 260-265 desc.

BIBLIOGRAFÍA

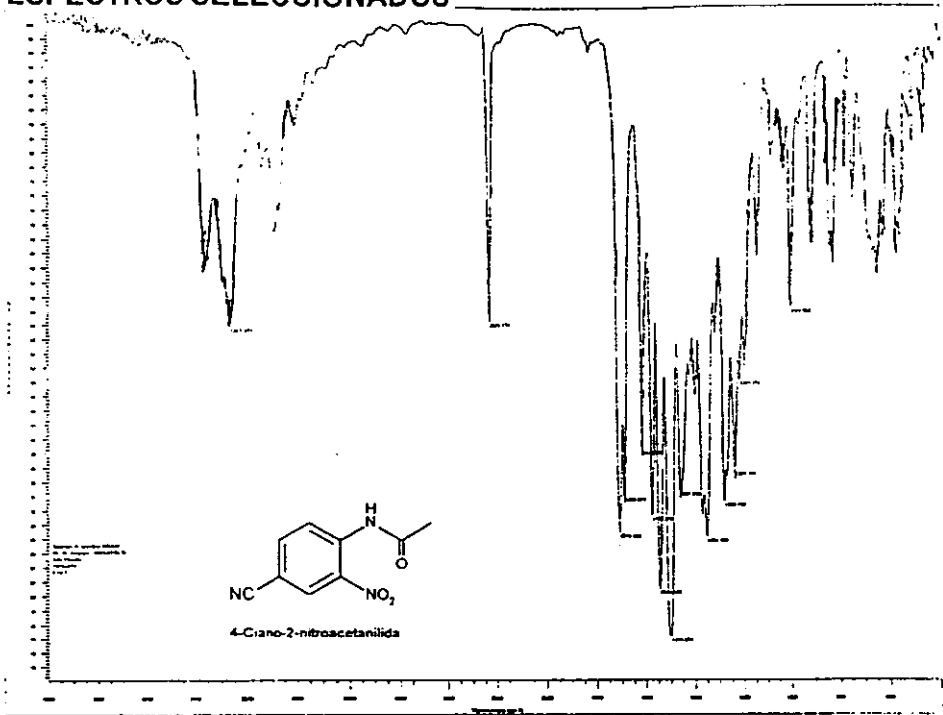
-
1. Neideleman, S. L., *Biocatalysis*, Abramowicz, D.A. (editor), Van Nostrand Reinhold, E.U., 1990, pp 14-17.
 2. Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3ª ed., Springer, Alemania, 1997.
 3. Faber, K., *Pure Appl. Chem.* , 1997, 69, 1614.
 4. Ema T., Sugiyama, Y., Fukumoto, M., Moriya, H., Cui, J-N., Sakai, T. y Utaka, M., *J. Org. Chem.*, 1988, 63, 4996.
 5. Ward, O.P. y Young, C.S., *Enzyme Microb. Technol.* , 1990, 12, 482.
 6. A excepción de las proteasas.
 7. Roberts, S.M., *J. Chem. Soc. , Perkin Trans. 1*, 1998, 157.
 8. Servi, S., *Synthesis*, 1990, 1.
 9. Csuk, R. y Glazner, B.I., *Chem. Rev.*, 1991, 91, 49.
 10. Stewart, J.D., Reed, K.W., Kayser, M.M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 1996, 755.
 11. Beecher, J., Brackenridge, I. , Roberts, S.M., Tang, J., Willetts, A.J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 1995, 1645.
 12. Neuberg, C., Welde, E. *Biochem. Z.*, 1914, 60, 472 y Neuberg, C., *Adv. Carbohydr. Chem.* ,1945, 4, 75.
 13. Navarro-Ocaña, A., Jiménez-Estrada, M., González-Paredes, M.B., Bárzana, E. *Synlett*, 1996, 695.
 14. Takeshita, M., Yoshida, S., Kiya, R., Higuchi, N. y Kobayashi, Y., *Chem. Pharm. Bull.* , 1989, 37, 615.
 15. Takeshita, M., Yoshida, S., *Heterocycles*, 1990, 30, 2201.
-

-
16. Takeshita, M., Yoshida, S., *Heterocycles*, 1990, 30, 871.
 17. Baik, W., Han, J.L., Lee, K.C., Lee, N.H., Kim, B.H., Hahn, J-T. , *Tetrahedron Lett.* , 1994, 35, 3695.
 18. Davey, C.L., Powell, L.W., Turner, N.J., y Wells, A., *Tetrahedron Lett.* , 1994, 35, 7867.
 19. Baik, W., Park, T.H., Kim, B.H. y Jun, Y.M., *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 5683.
 20. Baik, W., Rhee, J.U., Lee, S.H., Lee, N.H., Kim, B.H. y Kim, K.S., *Tetrahedron Letters*, 1995, 36, 2794.
 21. Baik, W., Kim, D.I., Koo, S., Rhee, J.U., Shin, S.H. y Kim, B.H., *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38, 845.
 22. Baik, W., Kim, D.I., Lee, H.J., Chung, W.J., Kim, B.H., Lee, S.W. *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38, 4579.
 23. Blakie, J.A., Turner, N.J., Wells, A.S., *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38, 3043.
 24. Morrison, R.T. y Boyd, R.N., *Química Orgánica*, 5ªed., Addison-Wseley Iberoamericana, E.U., 1990, pp. 515, 921-6, 959.
 25. Larock, R.C., *Comprehensive Organic Transformation: A Guide to Funcional Grup Preparations*, VCH Publishers Inc., N.Y., 1989, pp 411-5.
 26. March, J., *Advanced Organic Chemistry*, 4ª ed. , John Wiley and Sons, E.U., 1992, pp. 1216-19, 1233.
 27. Preston, P.N. y Tennant, G., *Chem. Rev.*, 1972, 72, 627.
 28. Gilchrist, T.L., *Química Heterocíclica*, 2ªed., Addison-Wseley Iberoamericana, E.U., 1995, pp 302-5.
 29. *Chem. Abstr.*, 1963, 57, 10065. *Chem. Abstr.*, 1971, 74, 76424.
 30. Sun, Q. y Yan, B., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 361.
-

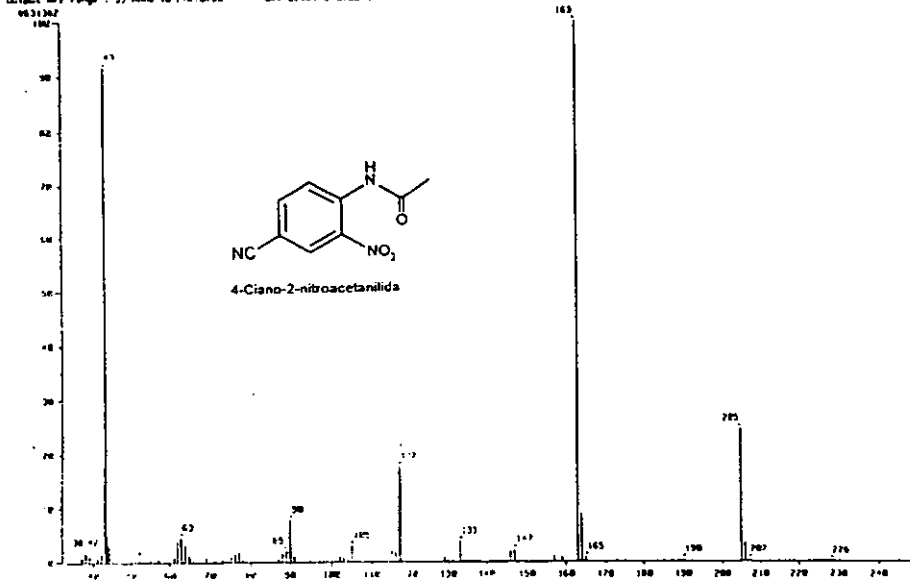
-
31. Mayer, J.P., Lewis, G.S., McGee, C. y Bankaitis-Davis, D., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 6655.
32. Takahashi, S. y Kano, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **1963**, 11, 1375.
33. Stacy, G. W., Wollner, T. E. y Oakes, T.R., *J. Het. Chem.*, **1966**, 51.
34. Smith, D.H., *Bencimidazoles and Congeneric Tricyclic Compounds*, Preston, P.N. (editor), , John Wiley & Sons, E.U., **1981**, col. The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Parte 1, pp 287-329; 28-37.
35. Ross, M., *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Katritzky, A., Rees, C. y Scriver, E. (editores), **1996**, Vol. 3, pp.183-220.
36. Dirlam, J. P., Cue, Jr., B. W., y Gombatz, *J. Org. Chem.* , **1978**, 43, 76.
37. Schulenberg, J.W. y Archer, S., *J. Org. Chem.*, **1965**, 1279.
38. Harvey, I.W., McFarlane,M.D., Moody, D.J. y Smith, D.M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1988**, 691.
39. Gardiner, J.M., Loyns, C.R., Schwalbe, C.H., Barrett, G.C: y Lowe, P.R., *Tetrahedron*, **1995**, 51, 4101.
40. Modificada de Furniss,B., Hannaford, A., Smith, P. y Tatchell, A., *Vogel's Textbook of Prac. Org. Chem.*, 5ªed., Longman, G.B., **1989**, pp 1274.
41. Roberts, S.M., *Preparative Biotransformations*, Jhon Wiley and Sons, E.U., **1994**, pp. 2:8:4.
42. Satoh, T., Mitsuo, N., Nishiki, M., Inoue, Y. y Ooi, Y., *Chem. Pharm. Bull*, **1981**, 29, 1443.
43. Simon H., Bader, J., Gunther H, Neumann, S. y Thanos, J., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1985**, 24, 539.
-

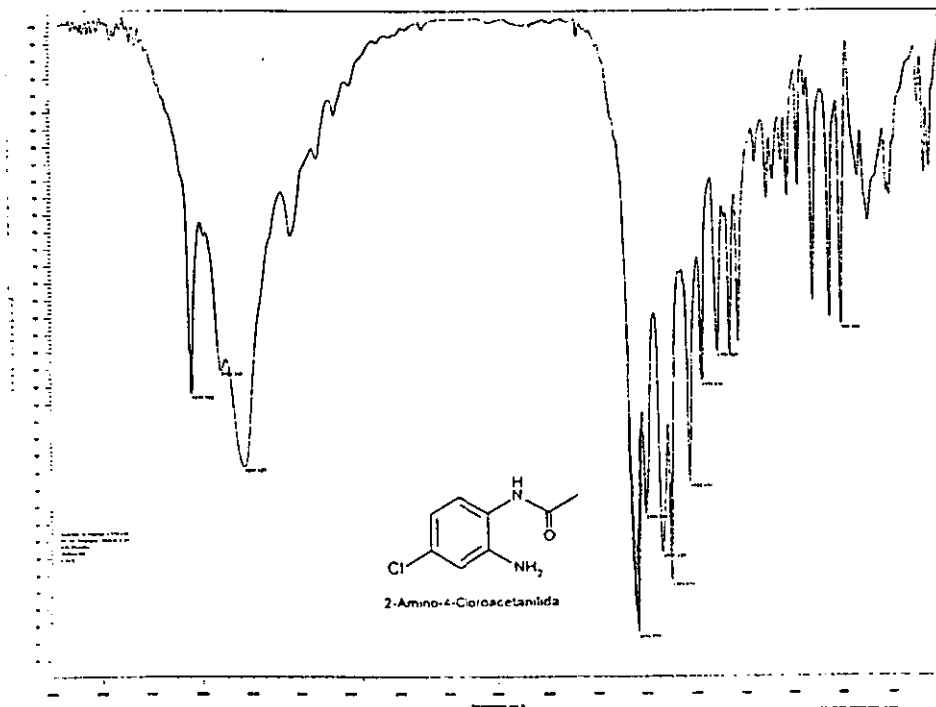
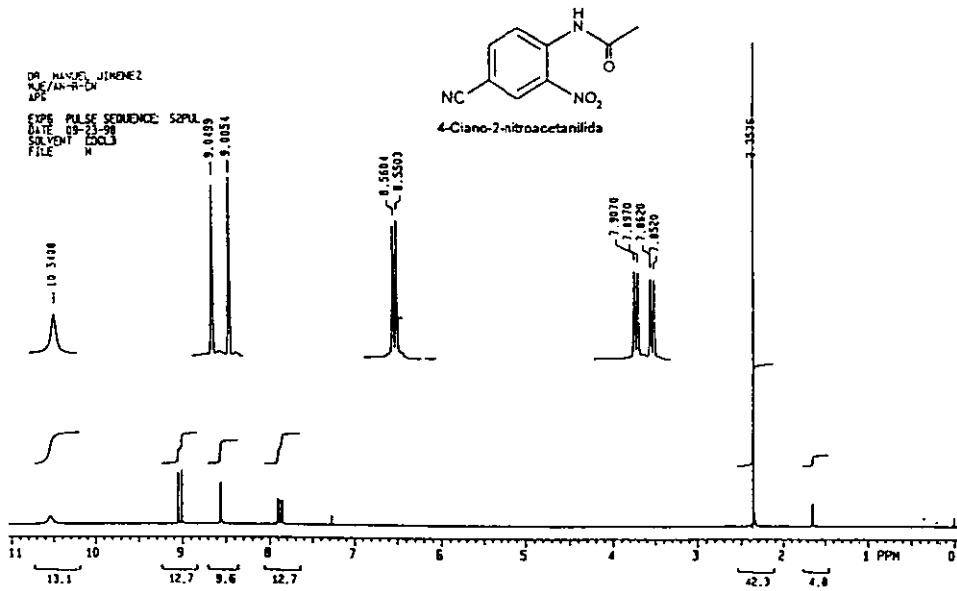
-
44. Wong, C.H. y Whitesides, G.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 5012.
45. a) Kubo, K., Inada, Y., Kohara, Y., Sugiura, Y., Ojima, M., Itoh, K, Furukawa, Y, Nishikawa, K y Naka, T., *J. Med.Chem.*, **1993**, 36, 1772 ; b) Cheng, J.B., Cooper, K., Duplantier, A., Eggler, J., Kraus, K., Marshall, S., Marfat, A., Masamune, H., Shirley, J., Tickner, J., Umland, J.P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, 1969.
46. Kockova-Kratochvilova A., *Yeast and Yeast-like Organisms*, VCH Publishers, Alemania, **1990**, pp. 304-380
47. D'Arrigo, P., Pedrocchi, G., Servi, S y Srtini, A., *Tetrahedron Asymetry*, **1997**, 8, 2375.
48. Voet, D. y Voet, J.G., *Biochemistry*, Jhon Wiley and Sons, E.U., **1995**.
49. Dunn, M.F. y Bernhard, S.A., *Biochemistry*, **1971**, 10, 4569.
50. Leskovac, V. y Trivié, S., *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 6123.
51. Navarro-Ocaña, *Síntesis Quimioenzimática de Bloques de Construcción con S. cerevisiae a partir de nitroalquenos*, **1998**, Tesis de doctorado, Fac. Quím. U.N.A.M.
52. Lide, D., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 74^a ed., CRC Press, E.U., **1993**.
53. Buckingham, J. (editor), *Dictionary of Organic Compounds*, 5^a ed., Chapman and Hall, E.U., **1982**,
54. Roberts, S.M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.*, **1999**, 1.
-

ESPECTROS SELECCIONADOS

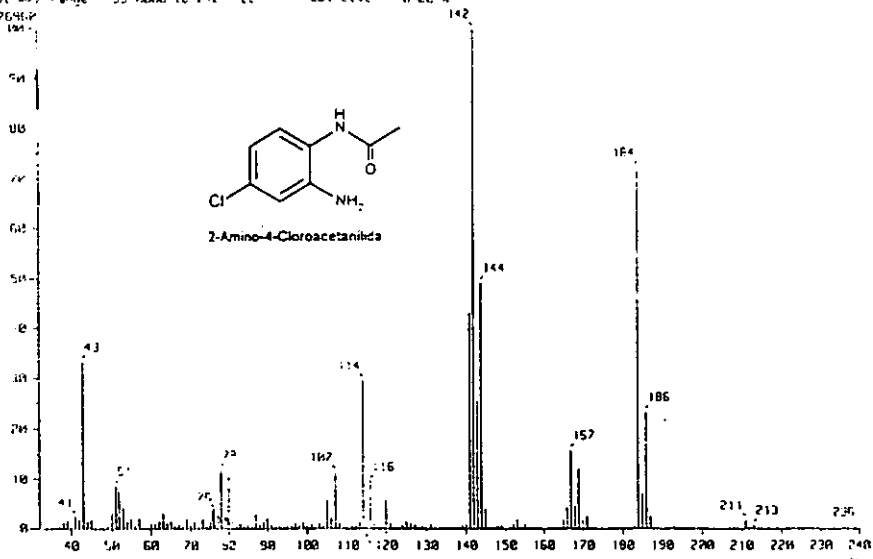


[Mass Spectrum]
 Date : 23-Jul-98 12:57
 Sample: NUC-M-414
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : E1+
 Spectrum Type : Normal Ion 10V-Linear3 Temp : 50.0 deg C
 RT : 8.66 min Scan : 122, 333
 qE : 16.0 (100) Int. : 329, 70
 Detector range : 3) 700 to 710. 8796 Cut Level : 0.00 eV



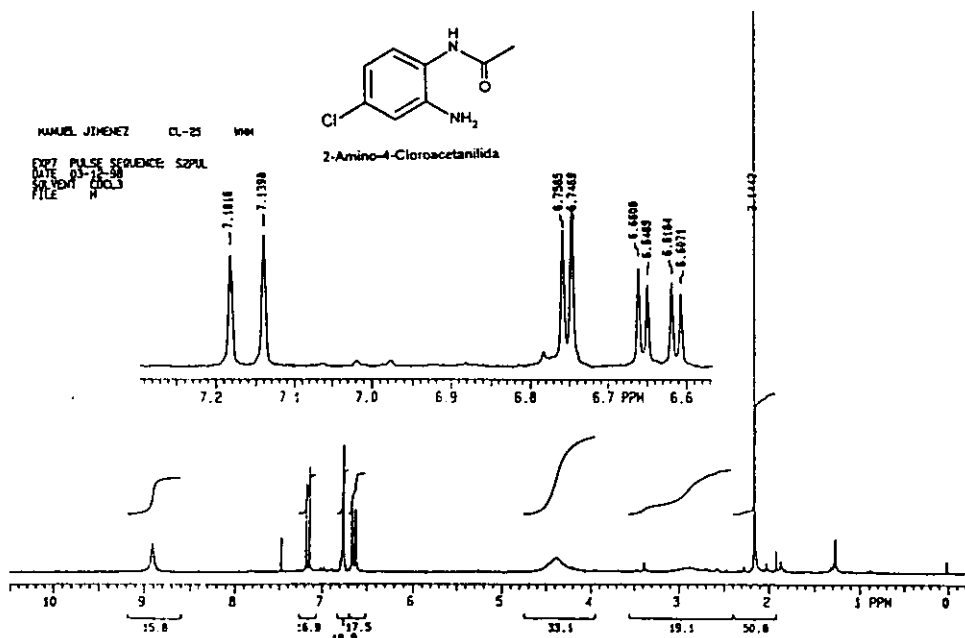
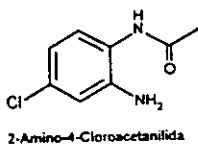


Mass Spectrum 1
 Date: 11-Mar-88 16:09
 Sample: M31-111-V5
 Note: -
 Inlet: Direct Ion Mode: EI+
 Spectrum Type: Normal Inlet (PF-Lines)
 RT: 1.13 min Scan#: 142,523 Temp: 45.6 deg.C
 BP: 142.0000 Int.: 1589.68
 Output range: 33 0000 to 242 1000 Cut Level: 0.00 X



MANUEL JIMENEZ CL-25 VM

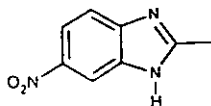
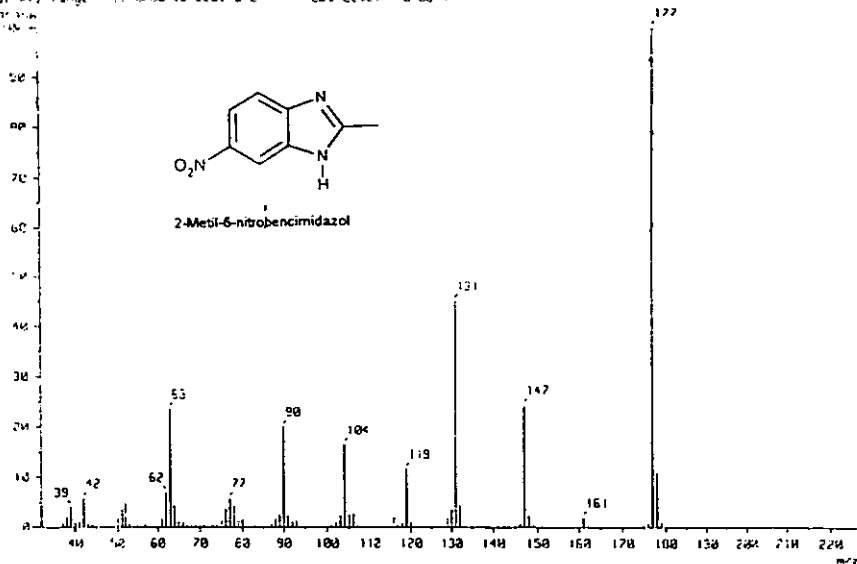
EXP7 PULSE SEQUENCE: S2PUL
 DATE: 03-12-88
 FOR UNIT: C0013
 FILE: N



Mass Spectrum
Date: 02-Jul-98 12:36
Sample: 102147

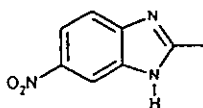
Date: 02-Jul-98 12:36

Ion Mode: EI+
Scan: 131.721
Temp: 111.2 deg C
Output range: 33.2338 to 226.4578
Cut Level: 8.00 x

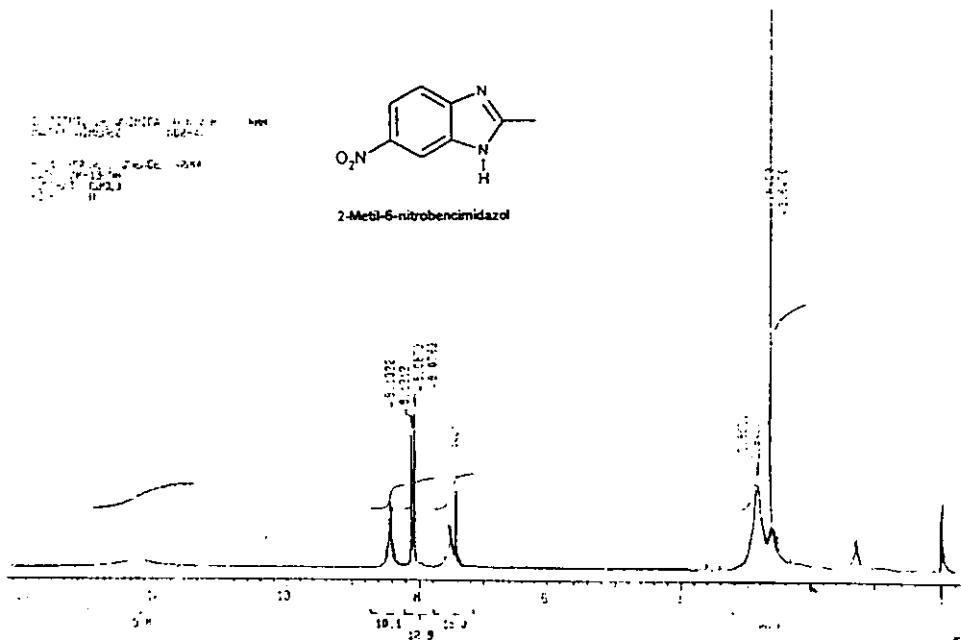


2-Methyl-5-nitrobenzimidazol

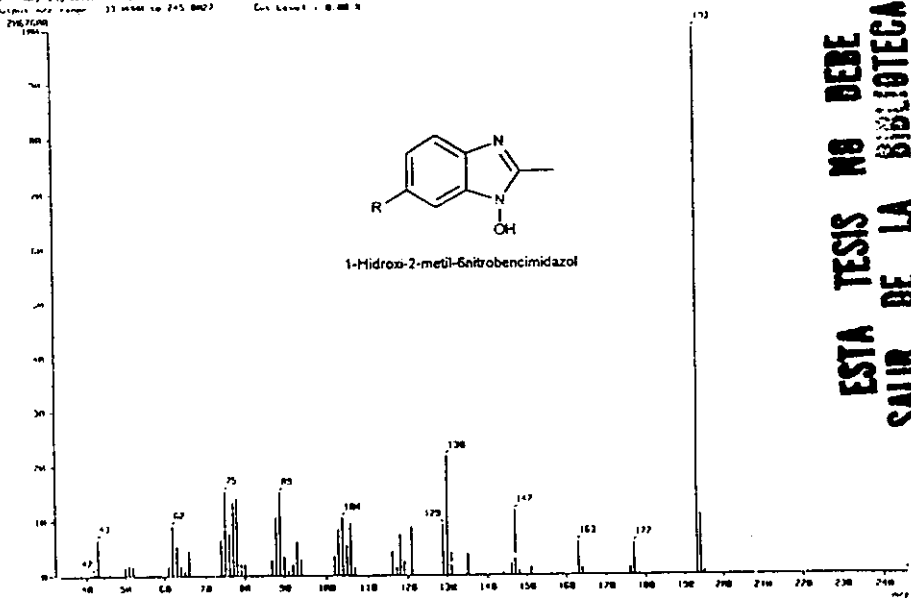
1. 13C NMR of 2-Methyl-5-nitrobenzimidazol
2. 1H NMR of 2-Methyl-5-nitrobenzimidazol



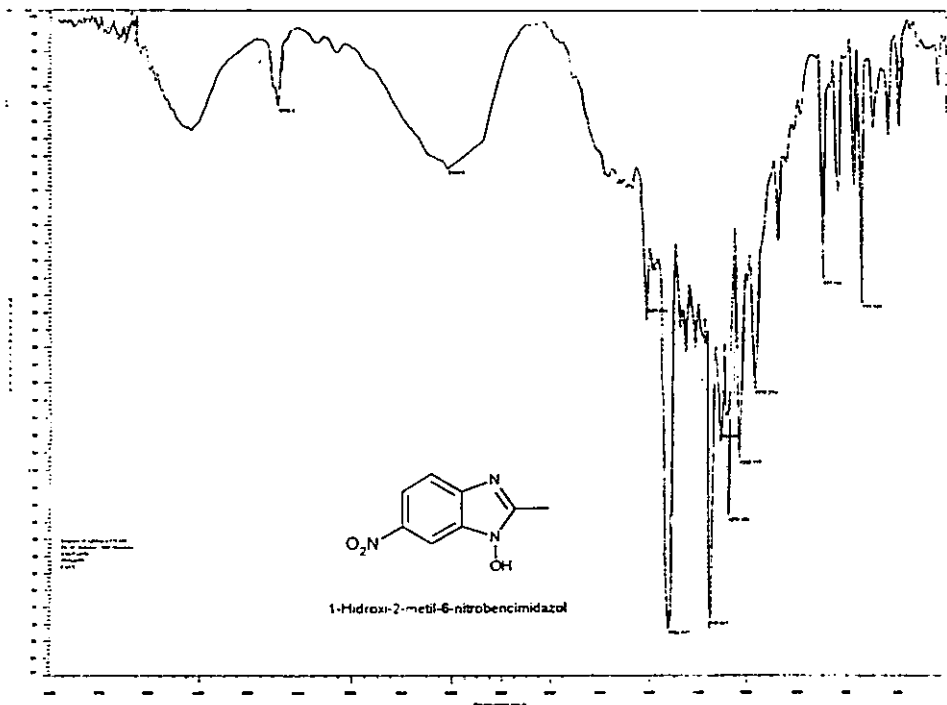
2-Methyl-5-nitrobenzimidazol



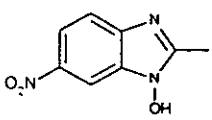
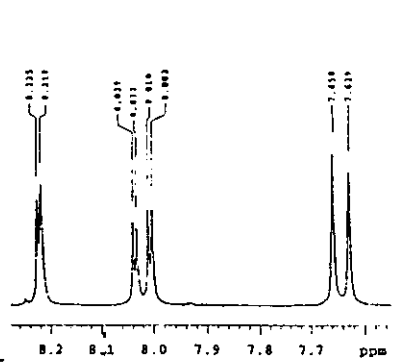
1. Mass Spectrum 1
 Date: 15-May-98 15:24
 Sample: PKC-MSD-148
 Name:
 Inlet: Direct Ion Peak: C1+
 Scan Range: 40-200
 Scan Rate: 10000
 Temp: 200.4 deg.C
 Ref: 1.56
 Ref. Mass: 419.0468 Int: 197.18
 Output File Name: J1.MSD to 745.0007 C1+ Level: 0.0000



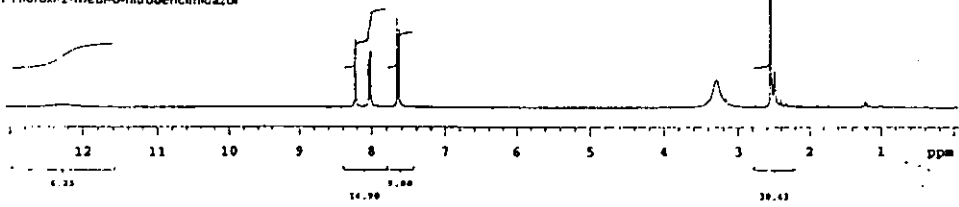
ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA



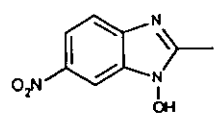
Dr. R. Jimenez NJE-NITRO
 Disolvente: CDCl₃+DMSO
 100 MHz
 Observar: H1



1-Hidroxi-2-metil-6-nitrobenzimidazol



Dr. R. Jimenez NJE-NITRO
 Disolvente: CDCl₃+DMSO
 75 MHz
 Observar: C13



1-Hidroxi-2-metil-6-nitrobenzimidazol

