



Universidad Autónoma Metropolitana

**Oxidación Microbiológica de Alcoholes por
Nocardia corallina B-276**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A:

HERMINIA INES PEREZ MENDEZ

MEXICO. D. F.

NOVIEMBRE DE 1998

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA ESTÁ INCLUIDO EN EL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACyT Y ADEMÁS CUENTA CON APOYO DEL MISMO CONSEJO, CON EL CONVENIO NÚMERO PFP-200-93.



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

Q.I. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ.

El día 10 de Noviembre del año de 1998

Comité Tutorial:

Tutor: DR. HECTOR MANUEL LUNA CONTLA.

Asesor: DR. ANGEL HORACIO SANDOVAL Y TRUJILLO

Asesor: DR. LUIS ANGEL MALDONADO GRANIEL

Sinodal: DRA. AHIDE LÓPEZ MERINO

Sinodal: DR. HÉCTOR JAIME SALGADO ZAMORA

[Handwritten signatures and initials]

IT 3906/1.1.1.1.2

Dedicatoria:

A mi madre: Elisa Méndez Vda. de Pérez

A la memoria de mi padre: Dionisio Pérez Capdevila

A mi esposo Norberto que tuvo un sueño y lo pude hacer realidad, gracias a su apoyo, paciencia y conocimientos para alcanzar esta meta.

A mi suegra: Carmen Alvarez Vda. de Manjarrez

A la memoria de mis abuelos: Eleuterio Pérez Vega y Herminia Capdevila de Pérez

A mis hermanos: Eleuterio, Betty y Alejandro

A mis sobrinos: Dionisio, Ivan, Carlos, Celeste, Ariadna, Anahí, Kathia, Alejandra, Adhara, Alfredo, Ernesto, Angel, Luis Angel, Eduardo, Tomás, María del Carmen y María Dolores.

A mis cuñadas: Josefa, Rosa, Carmen, Dolores, Rosario y Silvia.

A mis cuñados: Angel, Tomás, Luis Angel y Miguel

A mis tios, tias y primos

A mi comité Tutorial: Dr. Héctor Luna, Dr. Horacio Sandoval y Dr. Luis Angel Maldonado

A mis sinodales: Dra. Ahide López y Dr. Héctor Jaime Salgado

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS	7
ANTECEDENTES	
-Biotransformaciones	8
-Oxidaciones microbiológicas	15
-Oxidaciones químicas	19
-Descripción morfológica de Actinomicetos	23
<i>Nocardia</i>	28
-Inmovilización de Células	31
PARTE EXPERIMENTAL	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	99
PERSPECTIVAS	102
RECONOCIMIENTOS	104
BIBLIOGRAFÍA	105
ARTÍCULOS PUBLICADOS	113
RECONOCIMIENTOS Y PREMIO	118

RESUMEN

La oxidación en el campo de la química orgánica industrial constituye una de las principales herramientas en la síntesis de compuestos orgánicos y uno de los métodos con mayor potencial de contaminación, por lo anterior eventuales desarrollos de metodologías alternas como las oxidaciones microbiológicas siempre serán bienvenidas.

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar el espectro y alcance de la oxidación microbiológica de alcoholes por *Nocardia corallina* B-276.

Se sometieron a la biooxidación 43 substratos con *Nocardia corallina* B-276, a una escala de 1 mmol; de los cuales, 21 fueron de alcoholes bencílicos primarios. El producto de dichas biotransformaciones fueron los ácidos carboxílicos correspondientes, y una cetona con rendimientos del 5 al 77 %. Por otro lado, de los 5 alcoholes alílicos solamente dos produjeron los ácidos, en rendimientos del 25 al 57 %; los tres restantes no fueron biotransformados. Dentro de los substratos 4 fueron heterocíclicos, de los cuales solo el alcohol furfurílico se oxidó al ácido furoico en un rendimiento del 51 %, y los otros tres no fueron biotransformados.

También se incluyeron 4 aldehídos, en estos casos todos ellos produjeron los ácidos carboxílicos en rendimientos del 33 al 71 %.

Entre los alcoholes no relacionados estructuralmente, el 2-naftilcarbinol y el *cis*-verbenol produjeron los productos esperados en 19 y 71 % de rendimiento, respectivamente.

De los 7 dioles que se probaron, solamente uno de ellos produjo la lactona esperada en 42 % de rendimiento.

Todos los productos fueron purificados (cristalización o cromatografía) y caracterizados por: pf, espectroscopia de IR, RMN-¹H (comparándolos con muestras estándar).

Este trabajo muestra la versatilidad y limitaciones de la oxidación de alcoholes bencílicos y alílicos con la *Nocardia corallina* B-276 así como la viabilidad de ésta metodología, ya que se puede partir indistintamente del alcohol o del aldehído, conduciendo a resultados reproducibles.

Además se describen estudios iniciales de la inmovilización de células de *Nocardia corallina* B-276 en alginato de bario y su utilización en la oxidación microbiológica descrita anteriormente, para estos estudios se uso al alcohol furfurílico como sustrato.

ABSTRACT.

Oxidation is one of the main tools in the synthesis of organic compounds and it is also one of the methods with more potential for environmental pollution, for that reason new methodologies, as microbial oxidation, are always welcome.

The main objective of this work is the determination of the scope and limitations of the microbial oxidation of alcohols by *Nocardia corallina* B-276; in order to do these 43 substrates were selected: 21 primary benzylic alcohols, 5 allylic alcohols, 4 heterocyclic alcohols, 4 aldehydes, 2-naftol, *cis*-verbenol and 7 diols, in a 1mmol scale. For the primary benzylic alcohols, the products of the biotransformation were the corresponding carboxylic acids, with the exception one that produced the corresponding ketone, with yield ranging from 5 to 77 %.

For the allylic alcohols tested, only two of them gave the carboxylic acid in yields around 25-57 %; the other three were not biotransformed. In the case of the heterocyclic compounds, only furfurilic alcohol was successfully oxidized to furoic acid in 51 % yield; the other three were not biotransformed. The aldehydes produced carboxylic acid in yield from 33 to 71 %.

2-naftol and *cis*-verbenol, non-structurally related to benzyl alcohol, were oxidized to the expected products in 19 and 71 % yield, respectively.

For the diols only one produced the expected lactone in 42 % yield.

All products were purified (by crystallization or chromatography) and characterized by: mp, IR and ¹H-NMR spectroscopy (by comparison with authentic samples).

This work shows the versatility and limitations of the microbial oxidation of benzylic and allylic alcohols with *Nocardia corallina* B-276, as well as the viability of this methodology, because either the alcohol or the aldehyde can be used as starting materials, obtaining reproducible results.

It also describes the initial work in the study of immobilization of the cells of *Nocardia corallina* B-276 with barium alginate and its application to the microbial oxidation described above. In these studies the furfural alcohol was used as substrate.

INTRODUCCIÓN

La creciente preocupación por la protección del ambiente, ha impulsado a la investigación hacia la generación de procesos químicos menos, si no es que, no, contaminantes. Como un ejemplo de esta problemática están los procesos oxidativos, los cuales generan grandes cantidades de residuos difíciles de manejar o eliminar; muchos agentes oxidantes están basados en iones metálicos tóxicos como el cromo. Reacciones laterales no deseadas en este tipo de conversiones son comunes debido a su pobre especificidad. El más barato e inocuo oxidante, el oxígeno molecular, no puede ser usado eficientemente, por lo cual se hace necesario el uso de catalizadores metálicos, los cuales son generalmente costosos y contaminantes. Es altamente significativo el hecho de que existen pocos ejemplos de oxidaciones regio- y/o estereoselectivas.

Por lo anterior se ha creado la inquietud de generar procesos de oxidación biocatalíticos, por las ventajas que estos ofrecen. Entre los métodos biocatalíticos, el uso de microorganismos es posiblemente el más adecuado para utilizarse en procesos oxidativos, debido al sistema natural de reciclaje de cofactores que poseen.

Una aplicación interesante de la metodología antes mencionada es el uso de la bacteria *Nocardia corallina*, reportada por Luna et al,^{1,2} para la oxidación de alcoholes alílicos. Lo anterior nos indujo a estudiar el efecto de la estructura de alcoholes alílicos y bencílicos sobre el proceso de oxidación con *Nocardia corallina*.

Con base en lo anterior fue pertinente ampliar también el estudio a dioles no simétricos y de preferencia de naturaleza química distinta como sería, alcoholes primarios y secundarios. Recientemente Morimoto³ estudió la formación de lactonas a partir de dioles no simétricos con NaBrO₂-alúmina en fase heterogénea y encontró la oxidación preferencial del alcohol primario sobre el secundario, para el caso de 1,6-dioles. Lo anterior nos motivo a considerar este tipo de substratos, para estudiar el alcance y limitaciones de las condiciones de la biooxidación con *Nocardia corallina*.

Con la finalidad de facilitar el manejo de este tipo de biotransformaciones se han aplicado procedimientos de inmovilización de las células microbianas,⁴⁻⁷ esta vía permite una mejor manipulación de la biomasa, además de la reutilización de las células involucradas en el proceso oxidativo. Lo anterior nos llevo a estudiar la inmovilización de *Nocardia corallina* y los parámetros necesarios para reproducir la bioconversión en estas nuevas condiciones, y posiblemente sentar las bases para un eventual desarrollo biotecnológico de aplicación a escala industrial.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el espectro y alcance de la oxidación microbiológica de alcoholes por *Nocardia corallina* B-276.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudiar el efecto de la estructura de diferentes substratos en la oxidación de alcoholes alílicos y bencílicos con *Nocardia corallina*.
- b) Estudiar la regioquímica y estereoquímica en la oxidación de dioles para producir las lactonas correspondientes.
- c) Analizar los resultados alcanzados y estructurar una propuesta de metodología, incluyendo los alcances y limitaciones del proceso.

ANTECEDENTES

Para el desarrollo de este proyecto dentro de las Ciencias Biológicas, se requiere de la convergencia de varias disciplinas como son: la química orgánica, la microbiología y la química analítica. Por lo que se estimo de suma relevancia el tener una base de conocimientos generales sobre estos temas que nos permitieran desarrollar las mejores estrategias para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo.

BIOTRANSFORMACIONES

Biotransformación, bioconversión, conversión microbiológica o transformación microbiológica es la conversión de una sustancia química (substrato) a otra sustancia (producto) por un microorganismo.⁸ En estas reacciones enzimáticas el substrato puede ser metabolizado, pero en algunos casos la conversión puede tener lugar sin ganancia de energía (comensalismo). Un proceso industrial puede ser llevado a cabo por métodos químicos tradicionales o por bioconversión, ésta última opción presenta las siguientes ventajas:^{9,10}

- Especificidad de substrato: una enzima interactua o acepta un limitado número de substratos, generalmente relacionados estructuralmente.

- Especificidad de sitio (regioespecificidad): Si existen en la molécula varios grupos funcionales de un tipo determinado, las enzimas solamente afectan una posición específica.
- Estereoespecificidad: Si se utiliza una mezcla racémica como material de partida, solamente un enantiómero es convertido. Al tener un centro quiral, como resultado de la reacción enzimática, el producto normalmente es ópticamente activo.
- Condiciones de reacción suaves: Las reacciones enzimáticas no causan la destrucción de los sustratos sensibles, debido a las suaves condiciones de conversión. Los medios usados en este tipo de reacciones causan menos daño al ambiente, ya que el disolvente es generalmente agua.

Procesos Industriales de Biotransformación Microbiana

En una conversión microbiana de compuestos orgánicos pueden ser utilizados como biocatalizadores: sistemas de esporas; cultivos de células en crecimiento; células en reposo; y células inmovilizadas. En los procesos con cultivos en crecimiento, la cepa utilizada se cultiva en un medio adecuado y después del crecimiento del cultivo se añade una solución concentrada de sustrato. Una variante del procedimiento

anterior es utilizar un inóculo muy grande y añadir el sustrato inmediatamente, sin permitir un período de crecimiento.

Para la biotransformación de materiales hidrofóbicos es posible emplear un sistema polifásico. A la fase acuosa, que contiene el material celular o la enzima, se superpone una fase inmiscible en la que se ha disuelto el sustrato. El sustrato pasará lentamente a la fase acuosa y a medida que continúa la biotransformación se producirá lentamente el producto y este regresará al disolvente. En algunos casos la biotransformación se produce en la interfase.

El tiempo de la bioconversión está generalmente relacionado al tipo de reacción, la concentración del sustrato y el microorganismo utilizado. Las reacciones de oxidación que utilizan bacterias son frecuentemente concluidas en unas pocas horas; las conversiones con levaduras y especialmente con hongos pueden llevar varios días.

Las reacciones de biotransformación en equipo de gran escala se llevan a cabo en condiciones estériles en fermentadores agitados y aireados, siendo el proceso de conversión monitoreado por cromatografía o espectrofotométricamente. El proceso termina cuando se alcanza un título máximo del producto esperado. La esterilidad

del sistema es necesaria porque la contaminación puede suprimir la reacción deseada, inducir la formación de falsos productos de biotransformación o producir la degradación total del sustrato o producto.

Los productos finales de las reacciones de transformación microbiana son normalmente extracelulares y pueden encontrarse disueltos o en suspensión en el medio de la reacción. Para el procesamiento adicional generalmente no se separan las bacterias ni las levaduras, mientras que el micelio de los hongos generalmente es eliminado por filtración. En todos los casos el material celular separado debe ser lavado repetidamente con agua o con disolventes orgánicos, ya que parte significativa de los productos de la reacción pueden estar adsorbidos en las células.¹¹

Una transformación microbiológica es diferente a una fermentación y un resumen de las diferencias se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Diferencias entre Biotransformaciones y Fermentaciones

	Biotransformaciones	Fermentaciones
Microorganismo	Cultivos en crecimiento, células en reposo, o células inmovilizadas	Cultivos en crecimiento
Reacción	Reacción catalítica sencilla (uno o varios pasos)	Proceso de vida (secuencia de reacciones multipasos)
Tiempo de reacción	Corto	Largo
Materias primas	Substratos caros	Fuentes de carbón y nitrógeno baratos
Producto	Naturales o no naturales	Solamente naturales
Aislamiento del producto	Fácil	Tedioso
Cantidad de enzimas activas	Pocas	Muchas
Subproductos	Pocos	Muchos
Concentración del producto	Alto	Bajo

La biocatálisis aplicada a la síntesis orgánica es un área de investigación bien definida la cual esta teniendo un gran auge; diferentes libros¹²⁻¹⁶ y revisiones bibliográficas¹⁷⁻¹⁹ se han ocupado de esta temática. La biocatálisis se efectúa con células completas de animales,²⁰⁻²² plantas²³⁻²⁶ o microorganismos.^{27-30a,31} También se han purificado, a diferentes niveles, algunas de las enzimas presentes en estos materiales para usarse directamente en transformaciones químicas. En ocasiones estas enzimas se han utilizado en medios de reacción y con objetivos alejados a su capacidad de transformación biológica natural. Como es de esperarse, al purificar las enzimas el costo aumenta pero ello conlleva a otros beneficios, actualmente se dispone de una amplia variedad de éstas macromoléculas de manera comercial.³²

Las enzimas se agrupan de acuerdo al tipo específico de reacción que ellas son capaces de catalizar y tradicionalmente se dividen en seis clases:³³

a) Oxidoreductasas: catalizan reacciones de oxido-reducción, involucrando oxigenación, o remoción o adición de átomos de hidrógeno a un esqueleto hidrocarbonado.

b) Transferasas: transferencia de grupos como acilos, glucosilo, fosfatos y equivalentes de aldehídos y cetonas de una molécula a otra.

c) Hidrolasas: el rango de grupos hidrolizados por estas enzimas es muy amplio, incluyendo glucósidos, anhídridos, ésteres, amidas, péptidos y otras funcionalidades que contienen el enlace C-N.

d) Liasas: estas enzimas catalizan adiciones usualmente de H-X a dobles enlaces y también catalizan el proceso inverso.

e) Isomerasas: pueden efectuarse con estas enzimas varias isomerizaciones incluyendo migraciones de dobles ligaduras, isomerizaciones *cis-trans* y racemizaciones.

f) Ligasas: estas enzimas también llamadas sintetetasas, median la formación de enlaces C-O, C-S, C-N, C-C y enlaces de ésteres de fosfatos.

Las enzimas de las clases a,b,c,y d son las más usadas en síntesis. Las reacciones de oxidación son particularmente útiles en la industria.

Por otro lado las técnicas de biología molecular están abriendo nuevos horizontes, por ejemplo el desarrollo de enzimas artificiales con nuevas características, o simplemente el rediseño de enzimas por la técnica de mutagénesis directa permite la alteración de la estructura de la enzima original; los métodos modernos de secuencias de proteínas y cristalografía de rayos X son capaces de apoyar la determinación de la estructura tridimensional de la enzima modificada.^{34a} La clonación del gen responsable de la síntesis de la D-aminopeptidasa de *Ochrobactrum anthropi* en *Escherichia coli* es un ejemplo de como la actividad enzimática presente en un microorganismo puede ser incrementada por muchos ordenes de magnitud y la concentración del producto requerido es mayor.³⁵ Se sabe que algunas de estas clases de enzimas requieren cofactores o coenzimas, los cuales son costosos, difíciles de conseguir, conservar, y que hacen preferible el emplear la célula completa,²⁰ tal es el caso de las oxidoreductasas. Centraremos esta discusión alrededor de este tipo de enzimas (oxidoreductasas) ya que es el objetivo de esta tesis. En estos casos las células mas comúnmente utilizadas son las de los microorganismos, los cuales utilizan su compleja maquinaria de enzimas y coenzimas durante su ciclo metabólico normal y transforman al substrato en el marco de su metabolismo secundario. Se han informado ejemplos de aplicación industrial haciendo uso de esta idea para lograr interesantes biotransformaciones,³⁶ siendo en el campo de productos químicos finos (farmoquímicos e intermedios) la

hidroxilación de progesterona a 11α -hidroxiprogesterona por *Rhizopus arrhizus* y *R. nigricans* reportado por Peterson y Murray un excelente ejemplo,^{37,38} ya que éste paso sintético simplificó e hizo realidad la preparación, a muy bajo costo, de hormonas corticosteroides y varios de sus derivados, llevando el precio de cortisona de US\$ 200 a US\$ 6 por gramo y a la fecha solamente US\$ 1 por gramo.^{34b}

OXIDACIONES MICROBIOLÓGICAS

Dentro del amplio campo de la biotecnología, el uso de los microorganismos o sus enzimas, ocupa una parte importante y es a la fecha un área que se está desarrollando rápidamente. La oxidación con microorganismos es una metodología tan vieja como la humanidad, siendo la producción de vinagre el ejemplo más antiguo y más conocido (hay datos de su uso y obtención desde 2000 años A.C. por los babilonios).^{30b} Este es un campo de investigación que últimamente se ha revitalizado, debido al incremento en el control de la contaminación ambiental y a la posibilidad de realizar síntesis asimétrica con el empleo de este tipo de biotransformaciones.

Las aplicaciones de las biotransformaciones en esta área son muy variadas y los substratos pueden ir desde hidrocarburos hasta moléculas complejas polifuncionales.

En todos estos casos la funcionalización (oxidación) y la estereoquímica generada son factores de estudio inseparables y se busca siempre la mayor regio y/o estereoespecificidad posible; a manera de ejemplo se puede mencionar el caso de la epoxidación de alquenos en la cual el uso de codisolventes³⁹ pueden modificar substancialmente la estereoquímica producida. *Pseudomonas oleovorans*, *Methylococcus sp.* CRL M1, *Nocardia corallina* B-276 y *Brevibacterium sp.* CRL 61, se cuentan entre los microorganismos más utilizados para este tipo de biotransformación, que, además de lograr estereoespecificidad al epoxidar: 1-deceno, 1-tetradeceno y propileno respectivamente, se evita el uso de algunas sales inorgánicas y peróxidos usados en la oxidación química tradicional, los cuales pueden constituir un riesgo ambiental y un peligro para la seguridad del personal involucrado.

Ejemplos de oxidaciones microbiológicas son: la oxidación de cadenas laterales alifáticas con formación de aldehídos, cetonas o funciones carboxilo; la conversión de *n*-dodecilbenceno al ácido fenilacético por *Nocardia sp.* con un 80 % de conversión; la degradación oxidativa de las cadenas laterales, por ejemplo la conversión del 1-fenildodecano al ácido 2-hidroxifenilacético por *Nocardia opaca* Stamm T16 o al ácido fenilacético por *Nocardia opaca* P2 con un 67-85 % de conversión; la ruptura oxidativa de

los anillos aromáticos por ejemplo la conversión del naftaleno al ácido salicílico por *Corynebacterium* sp. (ATCC 15570) con un 70 % de conversión; la ruptura oxidativa de sustituyentes (desaminación oxidativa, desmetilación de grupos: O-CH₃ o N-CH₃), un ejemplo es la transformación de 10,11-dimetoxiamorfina a isocapocodeína por *Cunninghamella blakesleana* (ATCC 9245) con un 100 % de conversión; la oxidación de grupos heterofuncionales (grupos amino a grupos nitro; formación de N-óxidos y sulfóxidos), por ejemplo el 2-amino-4-alquilimidazol al 2-nitro-4-alquilimidazol por *Streptomyces* sp; la deshidrogenación de glaucina a la dihidroglaucina por *Fusarium solani* con un 60 % de conversión; y la hidroxilación de triptofano al 5-hidroxitriptofano por *B. subtilis*.²⁸ Entre los microorganismos que se han utilizado en este campo están entre otros géneros las, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Xanthobacter*, *Cunninghamella*, *Chaetomium*.⁴⁰ El género *Nocardia* ha sido utilizado ampliamente para la epoxidación microbiológica de alquenos, siendo *Nocardia corallina* la que ha proporcionado los mejores resultados.^{4-7, 41-53} Luna y col,¹ informaron el potencial uso de los dos primeros microorganismos para transformar alcoholes alílicos a los correspondientes aldehídos/ácidos o cetonas, siendo los resultados con *Nocardia corallina* los de mayor interés. El proceso se lleva a cabo en un medio de reacción difásico, encontrándose al microorganismo mayormente en la interfase. Este microorganismo, lo reportado también por Luna et al,² promovió la oxidación de

dioles a lactonas quirales; lográndose preparar materiales de alta pureza óptica, con la oxidación preferencial del grupo *pro-S*. En todos los ejemplos estudiados se utilizaron dioles primarios; es relevante el hecho que, cuando se efectuó la oxidación de un diol protegido, como el monometil éter, la reacción no condujo a productos de oxidación, lo que sugirió que la oxigenasa en *N. corallina* no oxida alcoholes saturados primarios y se presume la necesidad de la presencia de ambos grupos hidroxílicos, en su forma libre, para la mencionada biotransformación.

Un beneficio de la oxidación microbiológica es que facilita la eliminación y/o el tratamiento del agua residual de la reacción, lo cual al final del proceso presenta un menor impacto en el ambiente, sin disminuir la eficiencia química de la biotransformación.

Aunque por su volumen muchos procesos petroquímicos son aún irremplazables, el avance en el uso de microorganismos o enzimas de cualquier procedencia, en procesos de bajo volumen de producción, se hace cada vez más evidente y se estima que en un futuro cercano con nuevos desarrollos tecnológicos se podrá incrementar la escala de producción.

La posibilidad de inducir asimetría en el área de síntesis química es sin lugar a dudas un reto a la creatividad del químico y el poder usar los procesos biológicos de

distintos orígenes o enzimas aisladas, abre una amplia gama de posibilidades cuya exploración está en franco crecimiento, se estima que tan solo en el campo de las biotransformaciones, aplicadas a los farmoquímicos se están utilizando más de 2000⁵⁴ enzimas para el desarrollo de procesos conducentes a la preparación de moléculas quirales.⁵⁵ Esto nos indica el enorme impacto que tiene el área de las biotransformaciones y se considera que muchos farmoquímicos quirales que estarán en el mercado para el año 2000 se obtendrán a través de ésta metodología.

OXIDACIONES QUÍMICAS

Es innegable que este tipo de reacción, es una de las más empleadas en la química orgánica. Pero a su vez una de las más complejas; tanto por el número de reactivos que se puedan utilizar, como por la gran variedad de mecanismos de reacción involucrados. Algunas de las limitaciones para este proceso ya han sido mencionadas, sin embargo en el campo de la química orgánica industrial la oxidación constituye una de las principales herramientas en la síntesis de compuestos y uno de los métodos con mayor potencial de contaminación, por lo anterior se estima que desarrollo de nuevas metodologías alternas siempre serán bienvenidas. Dada la gran diversidad de grupos funcionales susceptibles de ser oxidados y a los objetivos planteados para ésta tesis, se revisarán a continuación reacciones de oxidación por tipo de enlace involucrado en el proceso oxidativo,^{56,57} a

manera de marco conceptual para visualizar una eventual comparación con las biotransformaciones estudiadas.

A. Reacciones de eliminación de Hidrógeno.

A.1 La aromatización de alquilociclohexanos, ciclohexenos o ciclohexadienos a derivados del benceno es el ejemplo mas representativo, esta reacción es catalizada por platino, níquel o paladio.

A.2 Reacciones de ciclodeshidrogenación. La formación de naftaleno a partir de *n*-butilbenceno sobre catalizadores de alúmina crómica a 500 °C; ilustra este tipo de proceso.

A.3 La deshidrogenación de alcoholes a aldehídos y cetonas. Este tipo de transformación se puede llevar a cabo con una gran variedad de agentes oxidantes, tales como: KMnO_4 , Br_2 , MnO_2 , el complejo de CrO_3 -piridina, o el empleo de CuCrO_3 , plata o cobre previenen la oxidación de alcoholes primarios hasta los ácidos carboxílicos correspondientes, y son ampliamente utilizados a nivel industrial para la producción de aldehídos; algunas cetonas se preparan por este procedimiento a partir de alcoholes secundarios; aunque a escala de laboratorio el método general más empleado es el del reactivo de Jones.⁵⁸ En el caso de alcoholes bencílicos se han utilizado compuestos de Ce(IV) para obtener aldehídos. Otros agentes empleados son la *N*-bromosuccinimida o la *N*-clorosuccinimida.

La variedad de posibilidades y condiciones de reacción son muy amplias para este tipo de transformación química.

B. Reacciones que involucran reemplazo de hidrógeno por oxígeno.

B.1 Oxidación de arilmetanos a aldehídos. Esta transformación se lleva a cabo por lo general con cloruro de cromilo (CrO_2Cl_2) o con una mezcla de CrO_3 y anhídrido acético en rendimientos moderados.

B.2 Oxidación de alcoholes primarios a ácidos carboxílicos. La reacción se puede realizar con varios agentes oxidantes fuertes, como KMnO_4 en medio: ácido o básico; en medio ácido es preferible el uso de dicromato de sodio o potasio, dado los riesgos inherentes al ácido permangánico. En estas condiciones se obtienen cantidades considerables del éster, posiblemente por la oxidación del hemiacetal formado por la reacción del aldehído intermedio con el alcohol de partida. Este procedimiento permite también preparar lactonas, por oxidación de dioles que posean al menos, un alcohol primario; si bien existen otros métodos para preparar estos ésteres cíclicos.^{3,56,57}

C. Reacciones de adición de oxígeno a enlaces insaturados.

C.1 Formación de epóxidos a partir de alquenos. Esta reacción se lleva a cabo con peroxiácidos; con oxígeno y catalizadores organometálicos de titanio⁵⁹⁻⁶² o manganeso.^{63,64} Es importante mencionar que la reacción de Sharpless muestra una

alta inducción asimétrica con ciertos sustratos y que por ello es de gran importancia en química sintética. En el caso de dobles enlaces conjugados a carbonilos, por ejemplo cetonas α,β -insaturadas, se forma el epóxido correspondiente por la reacción con H_2O_2 en medio básico.

D. Reacciones en las cuales un par electrónico no compartido se enlaza a oxígeno.

Si bien existen reacciones de oxidación sobre átomos de: azufre, nitrógeno, selenio, boro, etc., se seleccionó al azufre como ejemplo de este tipo de transformación, dada la importancia de los sulfóxidos quirales, debido a su amplia aplicación en síntesis asimétrica como intermediarios útiles y en nuestro futuro interés en ampliar nuestro estudio de oxidación de sulfuros proquirales con *Nocardia corallina*.

D.1 Oxidación de sulfuros a sulfóxidos o sulfonas. Esta reacción se lleva a cabo con cantidades controladas de H_2O_2 al 30 % con el objetivo de dirigir la reacción hacia el grupo funcional deseado. La sulfona se puede obtener directamente utilizando oxidantes fuertes como KMnO_4 , o ácido hipocloroso. Siendo de interés la transformación estereoselectiva del sulfuro a sulfóxido con agentes oxidantes más suaves y específicos.

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE ACTINOMICETOS

Los actinomicetos, conforman un grupo amplio y diversos de bacterias, son bacilos grampositivos con una tendencia característica a formar cadenas o filamentos. Los actinomicetos incluyen cierto número de taxones superiores que varían en morfología, requerimientos de oxígeno, composición de la pared celular y capacidad de formar esporas.

El término actinomiceto no tiene validez taxonómica ya que estos organismos se clasifican como bacterias en un sentido estricto y son miembros del orden Actinomycetales, pero no todos los géneros de los Actinomycetales se consideran como actinomicetos en el lenguaje común. Los actinomicetos son microorganismos que producen filamentos delgados y ramificados que se desarrollan en un micelio en todos los géneros, excepto el género *Actinomyces*. El filamento del actinomiceto puede ser bastante largo -aunque en algunos grupos es corto- y puede fragmentarse en muchas unidades más pequeñas. Las hifas o filamentos individuales se asemejan morfológicamente a los filamentos fúngicos pero son mucho más delgados, generalmente de 0.5 a 1.0 μm de diámetro; sin embargo, en algunos géneros las hifas pueden tener más de 2 μm de diámetro. Muchos de los actinomicetos del suelo producen sobre sus hifas esporas asexuales, conocidas como conidias, aisladas en

paredes o formando cadenas, mientras que unos cuantos habitantes del suelo producen sus esporas en una estructura especializada conocida como esporangio.

A pesar de estar colocados junto con las bacterias, la relación aparente de los actinomicetos con los hongos se manifiesta en tres propiedades: a) el micelio de los actinomicetos superiores tiene las extensas ramificaciones características de los hongos; b) muchos actinomicetos forman un micelio aéreo, y c) el crecimiento de los actinomicetos en cultivo líquido raramente produce la turbidez asociada con las bacterias unicelulares sino que produce la formación de filamentos, grumos o esferas. Por otra parte la morfología y el tamaño de las hifas, las conidias y los fragmentos individuales de las especies cuyo micelio sufre segmentación son semejantes a las estructuras que se observan entre las bacterias.⁶⁵

Distribución y Abundancia de los Actinomicetos en la Naturaleza.

Los actinomicetos son numerosos y están ampliamente distribuidos, no sólo en el suelo sino en una variedad de hábitats diferentes, incluyendo estiércol; fango de los ríos y el fondo de los lagos. Se encuentran en la superficie del suelo así como en los horizontes inferiores, a profundidades considerables. En abundancia, siguen a las bacterias y a veces el número viable de ambos es casi igual. Particularmente, en ambientes de pH elevado, los actinomicetos constituyen una gran proporción de la

comunidad. Como regla general son saprófitos, aunque algunas especies pueden provocar enfermedades a las plantas, animales domésticos e incluso al hombre.

En sus hábitats normales, los actinomicetos pueden presentarse en forma de conidias o de hifas vegetativas y ambas formas pueden originar colonias en medios de agar. Tanto en terreno virgen como en terreno cultivado, los actinomicetos constituyen del 10 al 50 % de la comunidad total; en áreas alcalinas, y especialmente cuando hay sequedad, la abundancia relativa es espectacularmente alta.

Se pueden hacer algunas generalizaciones respecto al papel de las características ambientales específicas en la determinación de la abundancia de los actinomicetos. En comparación con las bacterias verdaderas, los actinomicetos son menos comunes en áreas húmedas que en áreas secas. Además la población es mayor en pastizales y en suelos de pastoreo que en suelos cultivados y la abundancia en campos de cultivo con frecuencia sobrepasa la de los sitios vírgenes adyacentes. Sin embargo son desfavorables en las turberas, en las áreas inundadas y los ambientes cuyo pH es menor de 5.0; los suelos en regiones climáticas cálidas son más favorables para una extensa flora de actinomicetos que los de áreas más frías; el tamaño de la comunidad de actinomicetos en latitudes templadas tiende a aumentar conforme se acerca a los trópicos.

Taxonomía de los Actinomicetos.

Actualmente se sabe que los suelos contienen gran cantidad de actinomicetos de géneros característicamente diferentes y estos se pueden dividir en las siguientes familias:

I. STREPTOMYCETACEAE. Hifas generalmente no fragmentadas. Extenso micelio aéreo y cadenas de esporas con 5 a 50 o más conidias por cadena. Géneros: *Streptomyces*, *Microeliobosporia*, *Sporichthya*.

II. NOCARDIACEAE. Hifas característicamente fragmentadas que producen pequeñas estructuras redondeadas o elongadas. Géneros: *Nocardia*, *Pseudonocardia*.

III. MICROMONOSPORACEAE. Hifas no fragmentadas. Conidias aisladas, en pares o en cadenas cortas. Géneros: *Micromonospora*, *Microbispora*, *Micropolyspora*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomices*, *Actinobifida*.

IV. ACTINOPLANACEAE. Esporas formadas en esporangios. El diámetro de las hifas puede ser de 0.2 a más de 2.0 μm . Géneros: *Streptosporangium*, *Actinoplanes*, *Planobispora*, *Dactylosporangium*.

V. DERMATOPHILACEAE. Los fragmentos hifales se dividen para formar gran número de estructuras redondas, móviles. Género: *Geodermatophilus*.

VI. FRANKIACEAE. Habita en los nódulos de las raíces de algunas plantas no leguminosas. No crecen fuera de la planta hospedera. Género: *Frankia*.

VII. ACTINOMYCETACEAE. No producen micelios verdaderos. Por lo general son desde anaerobios estrictos a facultativos. Género: *Actinomyces*.

Aunque en el suelo se desarrollan un número razonable de géneros, tan sólo las especies de algunos géneros predominan sobre las colonias de actinomicetos que aparecen sobre medios de agar inoculados con suspensiones diluidas de suelo. Casi invariablemente, *Streptomyces* predomina numéricamente, con frecuencia constituye más del 70 al 90 % de las colonias en la mayoría de los medios de agar; raramente es baja su frecuencia relativa, pero a veces las especies de éste género representan sólo el 5 % de los actinomicetos en algunos suelos. *Nocardia* es, por lo general, el segundo más abundante, del 10 al 30 % de las colonias de actinomicetos son nocardias. Las especies de *Micromonospora* son las terceras en frecuencia y presentándose del 1 al 15 % de los actinomicetos que crecen sobre medios sólidos son miembros de este grupo morfológicamente distintivo. Las especies de *Actinomyces* se consideran poco comunes y los otros géneros también existen en número escaso.⁶⁵

Género: *Nocardia*; Morfología y Coloración.

Las especies de *Nocardia* son bacilos grampositivos aerobios parcialmente acidorresistentes. Dentro del género la formación de filamentos y la ramificación están muy desarrolladas. Las especies de *Nocardia* producen filamentos profundos y aéreos (también denominados hifas o micelios) de alrededor de 1µm de ancho. Las células de los filamentos profundos se separan en formas de rosario y los filamentos aéreos experimentan fragmentación para producir células similares a esporas unicelulares que se dispersan y forman aerosoles con facilidad.

Al igual que los *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, y *Corynebacterium*, las paredes de las *Nocardia* poseen ácidos micólicos, denominados ácidos nocárdicos. Los ácidos micólicos son ácidos grasos largos β -hidroxilados y α -ramificados, por lo común saturados o monoinsaturados. Los ácidos nocárdicos tienen alrededor de 50 carbonos de largo, en tanto que los ácidos corinomicólicos tienen 32 a 36 carbonos. Las especies de *Corynebacterium* no son acidorresistentes y las *Nocardia* presentan una acidorresistencia débil o parcial cuando se las tiñe con carbolfucsina de acuerdo con el método de Kinyoun. Si se las decolora con ácido sulfúrico del 1 al 4 % en lugar del decolorante más fuerte, la mayor parte de la cepas de *Nocardia* presentarán acidorresistencia.

Fisiología de *Nocardia*

Características de su cultivo. *Nocardia* proliferan con facilidad y rapidez en diversos medios de cultivo. En los que contienen agar las colonias aparecen dentro de los tres días siguientes a la inoculación. Después de siete a diez días se presentan colonias apiladas, irregulares, cerosas, brillantes y de varios milímetros de diámetro. A medida que se forman los filamentos aéreos la superficie de la colonia se torna opaca y vellosa.

Propiedades metabólicas diferenciales. *Nocardia* puede diferenciarse de géneros similares por su capacidad para descomponer y utilizar la parafina como una fuente de carbono y energía. Esta propiedad permite el aislamiento selectivo de *Nocardia* de cultivos mixtos.

Un método para “atrapar” *Nocardia* implica el uso de varillas de vidrio recubiertas con parafina que se preparan al sumergir una varilla de vidrio en parafina fundida. Las varillas pueden colocarse en suelos o agua del medio ambiente y las especies de *Nocardia*, si están presentes, se desarrollarán alrededor de la varilla de vidrio recubierta con parafina. Usando esta técnica se han aislado especies patógenas y saprófitas de *Nocardia* de una amplia variedad de suelos, agua dulce y agua de mar en todo el mundo. Los estudios ecológicos tienden a correlacionar la prevalencia de

una cepa particular de *N. asteroides* en el ambiente con su incidencia de infecciones como: 1) nocardiosis localizada o sistémica; 2) infecciones cutáneas; 3) infecciones linfocutáneas (esporotricoides); 4) micetomas en la población nativa.

Además de la digestión de la parafina, las especies de *Nocardia* producen catalasa y ureasa.

Infección Clínica por *Nocardia*

Epidemiología. Más de la mitad de los pacientes que desarrollan nocardiosis tienen algún tipo de deficiencia. El 30 % de los pacientes refieren el antecedente de haber recibido esteroides y/o tratamiento inmunodepresor, pero las infecciones pulmonares crónicas y el cáncer, con sus respectivos tratamientos o sin ellos, también proporcionan una base para la nocardiosis oportunista. Alrededor del 6 % de los pacientes presenta una tuberculosis previa o concurrente. Otras categorías de alto riesgo incluyen a los receptores de transplantes y a los pacientes de alcoholismo crónico. En los pacientes en quienes no prevalece una afección subyacente el pronóstico es considerablemente mejor. En los Estados Unidos la frecuencia de la nocardiosis fue estimada en 1976 como de 500 a 1000 casos por año. Desde entonces esta enfermedad ha sido reconocida con frecuencia como una infección oportunista. Del 0.5 al 2 % de los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) contraen nocardiosis, cada año se producen

varios cientos de casos nuevos. La nocardiosis no se transmite entre personas o animales, aunque se han notificado varios brotes entre pacientes con su sistema inmunológico deprimido.⁶⁶

INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS.

222485

Uno de los principales problemas que se presentan en fermentaciones cuyos productos son ligeramente difundidos al medio es la formación de los llamados "Pellets" los cuales se definen como un aglomerado de células que al tomar esta formación afectan la difusión de los substratos al interior de la célula, así como la secreción de productos al exterior. El problema anterior puede ser solucionado al incrementar la velocidad del propulsor en el tanque de fermentación, esto crea una gran dispersión de las esporas o células evitándose la formación de pellets.

En años recientes, los procesos de inmovilización de células completas han atraído grandemente la atención por el descubrimiento del enorme potencial que ofrecen los microorganismos en la industria química. La técnica de inmovilización ha sido definida como el procedimiento en el cual se confina una enzima catalíticamente activa o una célula dentro de un sistema, permitiendo el libre paso del substrato y del producto a través de él.⁶⁷ Tampion y Tampion la han definido como una célula o

una porción de ella que, por medios naturales o artificiales es impedida de moverse independientemente de sus vecinas en todas las partes de una fase líquida del sistema bajo estudio.⁶⁸ Las enzimas o células se emplean en la industria de forma inmovilizada cuando se desea el reciclado de los biocatalizadores, o bien en procesos biocatalíticos continuos.

Otro aspecto de la durabilidad de los biocatalizadores inmovilizados es la resistencia a la degradación microbiana, su operación es deseable en condiciones donde los contaminantes microbianos no pudieran desarrollarse fácilmente.

Esta metodología también mejora el rendimiento de los productos, esto puede ser atribuido a muchos factores tales como la extensión de la actividad biocatalítica, cambios metabólicos ventajosos o la canalización del flujo del material dentro de la célula a través de una vía particular. Además se mejora la estabilidad del producto, debido al corto tiempo de residencia de productos inestables o la disminución de la degradación microbiana del producto.⁶⁹

Desde que se empezaron a estudiar los sistemas de inmovilización de enzimas purificadas, se ha descubierto que están limitados a reacciones simples que no involucran cofactores, además que presentan algunas dificultades en su reutilización. Consecuentemente, se ha incrementado el interés de emplear sistemas

de inmovilización de células completas, que pueden catalizar reacciones de varios pasos, involucrando una serie completa de diferentes enzimas.⁷⁰

Las comparaciones económicas entre los procesos que involucran enzimas y células inmovilizadas con otras alternativas posibles resultan sumamente complejas. El costo depende mucho del sistema adoptado y de fuerzas de mercado no controlables. Sin embargo, es posible hacer ciertas generalizaciones de cada proceso con sus ventajas y dificultades.

Entre las ventajas que ofrecen los sistemas de inmovilización de biocatalizadores están, el que proporcionan una larga estabilidad, usualmente son reutilizables y la recuperación del producto es fácil. Aunque la inmovilización celular ha sido desarrollada después de la inmovilización de enzimas, ésta ha tenido beneficios económicos inmediatos, al evitarse los costos de separación y purificación enzimática, además de que la inmovilización celular es útil en procesos multienzimáticos y es posible reutilizar las células. Frecuentemente, las enzimas presentes en células inmovilizadas exhiben mayor estabilidad que las mismas enzimas inmovilizadas en estado puro.

Como una de las dificultades que tienen los sistemas de inmovilización podemos mencionar principalmente la baja difusión de substratos a través de la matriz y a

través de las células en el caso de enzimas intracelulares, desventaja que se presenta en sistemas de soporte en geles.

La tecnología de la fermentación sumergida tiene la ventaja de que es bien entendida y el equipo utilizado es fácilmente disponible. Pero los ciclos desperdiciados de esterilización del medio, inoculación, crecimiento de células y limpieza del equipo de fermentación son algunas de sus desventajas; los cuales se reducen en los sistemas de inmovilización. Como se notó previamente, una de las principales ventajas de la inmovilización es extender la vida metabólica de células en un estado estacionario, además la recuperación del producto es más fácil y el tamaño del recipiente puede ser reducido en un proceso con células inmovilizadas, con el consecuente ahorro de los componentes del medio de cultivo y en la operación.

Las técnicas de inmovilización se clasifican en cuatro procedimientos básicos de acuerdo a lo propuesto por Radovich,⁷¹ siendo: **inmovilización sin acarreador**, que consiste en la formación de agregados celulares por floculación natural o por floculación inducida utilizando agentes que modifican la carga superficial de las células (por ejemplo, polielectrolitos aniónicos o catiónicos); **acoplamiento covalente**, empleando un tratamiento con agentes entrecruzadores como el bromuro de cianógeno; **adsorción** a través de enlaces iónicos, hidrofóbicos o de hidrógeno

sobre un acarreador inerte; y **atrapamiento** en un material inerte semipermeable tal como geles, alginatos, fibras o membranas. Este último es el procedimiento más utilizado.

Las características deseables que debe tener un acarreador en el atrapamiento son las siguientes:

En la inmovilización: 1) controlar en lo posible el tamaño y porosidad del medio de atrapamiento, especialmente para reactores a escala industrial, 2) que los agentes atrapantes formen una matriz estable en el medio acuoso a temperaturas y valores de pH compatibles con la acción enzimática deseada y del microorganismo, 3) todos los acarreadores deben ser baratos y fácilmente disponibles, para tener el costo del proceso de inmovilización más bajo posible.

En la producción: 1) el acarreador debe poseer estabilidad mecánica para resistir largos periodos de reacción y estabilidad química en presencia de los otros componentes del sistema, 2) el acarreador debe ser inerte para el microorganismo, 3) el medio de atrapamiento debe permitir la libre difusión del substrato, producto y otros metabolitos, especialmente los dos últimos, porque pueden inhibir la reacción, 4) el acarreador debe tener capacidad para soportar una alta densidad de células.⁷¹

Una ventaja sustancial de un sistema de inmovilización es la alta densidad de células y velocidad de flujo, que permiten incrementar la productividad y la facilidad

de purificar el producto. Trabajar con velocidades de dilución más grandes que la velocidad de crecimiento de microorganismos contaminantes también ayuda a resolver problemas de contaminación.

Por otra parte, los sistemas de inmovilización presentan problemas como: posibles alteraciones metabólicas que dependen de las características de las células que se empleen, ya sea, células vivas en activa reproducción, células que son viables pero no reproducibles o células muertas; la necesidad de asegurar una eficiente difusión de sustrato y productos a través de la matriz; y los costos de inmovilización.⁷⁰ La transferencia de masa de la interfase incluye todos los pasos de la transferencia de masa de los sustratos y nutrientes hacia dentro de la matriz y la de productos a la superficie externa de la matriz de la célula inmovilizada.

Una de las formas para alcanzar una efectiva inmovilización es el atrapamiento de un agente biológico dentro de una matriz de gel. El sistema usualmente tiene tres fases: la fase biocatalítica, el flujo de alimentación/producto y la fase gaseosa del sustrato introducido y del producto generado. La completa descripción del sistema requiere el conocimiento de todas las fases. El transporte del sustrato y producto entre las fases y su relación con la productividad específica del biocatalizador inmovilizado.

Varios factores afectan la productividad específica del biocatalizador inmovilizado cuando se comparan con microorganismos individuales en una suspensión libre. Algunos de estos factores son las condiciones fisicoquímicas de las esferas comparadas con la masa líquida y la resistencia en el transporte de masa de los substratos necesarios y los productos resultantes dentro de la matriz.⁷²

Las limitaciones significativas de difusión son comunes en los sistemas de atrapamiento en geles y pueden causar que el substrato se agote o que exista inhibición por producto dentro de la matriz. Las células son muy sensibles a su microambiente, una concentración adecuada de substrato y productos dentro de las esferas juegan un importante papel en la productividad y crecimiento. Las condiciones del proceso de operación tales como velocidad de flujo y concentración de nutrientes en la fase líquida son óptimamente determinados si las limitaciones son superadas. Las condiciones óptimas claramente se basan en un análisis de difusión y reacción en la matriz celular.⁷³

La actividad de las enzimas inmovilizadas son usualmente expresadas en términos del número de gramos de producto formado por gramo de enzima/célula inmovilizada usada por hora, o como gramo de producto formado por litro de volumen de reactor por unidad de tiempo. Los efectos combinados de los factores, los cuales afectan las propiedades intrínsecas de la enzima son expresadas como

factores de efectividad, junto con las pérdidas de actividad que tengan lugar durante la inmovilización a los que también se denomina eficiencia de acoplamiento, porcentaje de retención y recuperación de actividad.⁷⁴

Por lo tanto, las propiedades del transporte de masa dentro de la matriz debe ser conocido para predecir la efectividad del biocatalizador incorporado. El alginato permite la rápida difusión del soluto de bajo peso molecular, aunque hay algunas evidencias que a altas concentraciones de alginato afectan la velocidad de difusión de los solutos.

Johansen y Flink consideran que las propiedades del alginato pueden influir en las características de las células de levadura inmovilizadas (especialmente en el transporte de masa), las propiedades que primeramente influyen son el peso molecular del alginato (caracterizado por su viscosidad), la proporción entre el ácido gulurónico y ácido manurónico (proporción G/M) y la concentración del alginato en el inmovilizado. Pueden también influir otras propiedades como la resistencia del gel, la retención y el número final de células inmovilizadas.⁷⁵

Uno de los soportes más utilizados para la inmovilización de enzimas, células y organelos subcelulares es el alginato de calcio, el cual consiste en bloques de copolímeros compuestos de β -D-manuronato y α -R-guluronato. Ocurriendo la

gelación en presencia de iones calcio. Se trata de un gel que es una película tridimensional; es bioquímicamente inerte y las células pueden ser atrapadas en los espacios intersticiales del gel. La resistencia de dicho soporte esta en función de sus componentes, de su concentración y de la dispersión de poros dentro de la muestra.

El alginato está presente en todas las algas marinas cafés, principalmente en el sargazo gigante (*Macrocystis pyrifera*), que es la especie más importante para la producción de alginatos. En México se ha venido cosechando desde 1958, con una producción promedio de 28,300 toneladas por año. El proceso de producción se basa en una serie de reacciones de intercambio iónico que permite extraer del alga el alginato de sodio, dicho tratamiento se inicia con el secado de las algas, se les adiciona un ácido diluido. Para extraer los alginatos se les somete a una solución alcalina de carbonato de sodio, el alginato que queda en la solución separando la masa por centrifugación o filtración. La solución de color café claro es tratada nuevamente con ácido o sales de calcio, obteniéndose los alginatos en forma gelatinosa (si se usó ácido) o como fibras (si se empleó sales de calcio). Finalmente para obtener el alginato de sodio se le agrega sales de sodio y por último las fibras se secan y muelen, el producto final es un alginato en polvo de color amarillo claro.

El alginato tiene múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica, hulera, textil, papelera, de alimentos y cervecera. Se utilizan para espesar, dar consistencia de

gel, dar estabilidad y suavizar productos. Cuando se usa para producir un gel estable, el alginato usualmente se mezcla con una sal de calcio, este método es usado básicamente para formar perlas de alginato que contengan células vivas o muertas. Debido a que los geles de alginato son térmicamente irreversibles, las perlas de alginato pueden usarse a temperaturas elevadas.⁷⁶

En cuanto a las propiedades físicas y químicas del alginato que se utiliza en la inmovilización de células, el alginato forma esferas con muchos cationes divalentes y trivalentes, son térmicamente resistentes, pero se destruyen o se hinchan por un exceso de cationes tales como el Na^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , K^+ o por agentes quelantes como el EDTA, citratos, fosfatos y polifosfatos, que provocan la pérdida de Ca^{2+} .⁷⁷ Se mejora la resistencia mecánica de las perlas de alginato usando bario en lugar de calcio como agente gelificante. La afinidad de los iones de bario hacia el alginato es mucho más alta que los iones calcio, las perlas de alginato de bario son muy estables en soluciones ácidas o neutras en contraste a las de alginato de calcio. Las perlas son más estables a los efectos químicos (amortiguador de fosfato) y mecánico (sonicación).⁷⁸ Las esferas de alginato de bario se han usado como matriz para células y tejidos en vivo.⁷⁹

PARTE EXPERIMENTAL

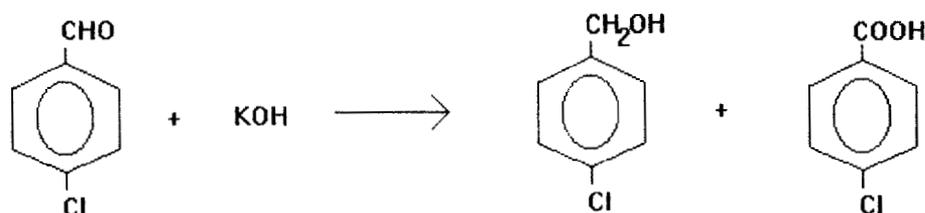
Los espectros de infrarrojo (FTIR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Paragon 1000; los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) en un espectrómetro Bruker modelo DMX500, los espectros de Masas en un espectrómetro Jeol modelo Gcmate, las lecturas de UV se determinaron en un espectrofotómetro Beckman modelo 35. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Osyma y no están corregidos. Las incubaciones se llevaron a cabo en un agitador orbital con temperatura controlada Revco modelo OSI473A. Para cromatografía en capa fina (ccf), se utilizó silicagel GF₂₅₄, (Merck). Los reactivos utilizados fueron adquiridos de: Aldrich, Sigma, Merck y Bioxon. La bacteria *Nocardia corallina* B-276 (ATCC 31338), fue adquirida del American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA).

222485

Preparación de alcoholes bencílicos sustituidos y derivados de ácido benzoico

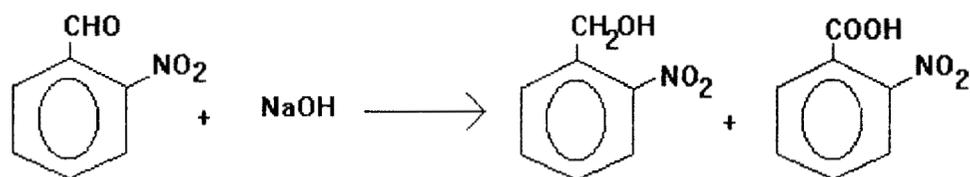
Reacción de Cannizzaro

Alcohol 4-clorobencílico y ácido 4-clorobenzoico⁸⁰



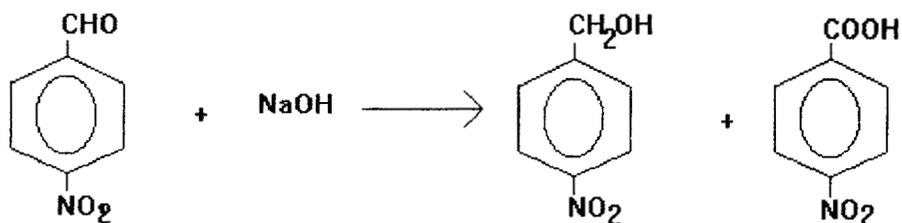
En un matraz de tres bocas de 250 ml, se pesó 2 g (1.4×10^{-2} mol) de 4-clorobenzaldehído, se adiciona poco a poco 11.15 ml (7.1×10^{-2} mol) de KOH al 50 %, la mezcla se agita en un baño maría para mantener la temperatura de 50-60 °C, hasta que desaparezca el olor al aldehído, aproximadamente 3 h. Posteriormente se le agrega 55 ml de agua, precipitando el alcohol 4-clorobencílico pf 68-69 °C. La fase acuosa se extrae con éter (2 X 20 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, y se evapora a presión reducida; para obtener 0.366 g del alcohol 4-clorobencílico, pf 68-70 °C (informado, 70-72 °C)^{32a} rendimiento 36.1 %. La fase acuosa se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), se forma un precipitado, se recristaliza de etanol obteniéndose 0.347 g del ácido 4-clorobenzoico, pf 237-240 °C (informado, 239-241 °C)^{32b} rendimiento 31.2 %. Los productos se identificaron por ccf e I.R.

Alcohol 2-nitrobencílico y ácido 2-nitrobenzoico ⁸⁰



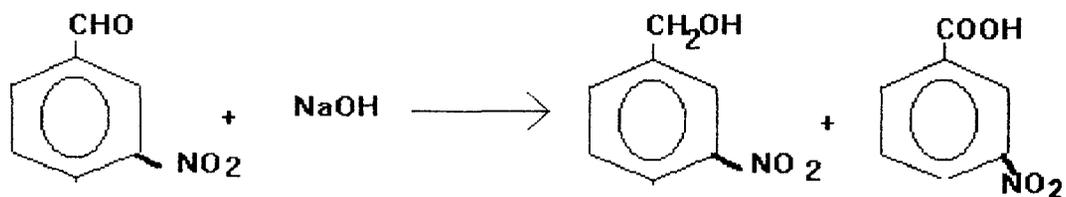
En un matraz de 3 bocas de 250 ml se coloca 2 g (1.3×10^{-2} mol) de 2-nitrobenzaldehído, se adiciona poco a poco 11.35 ml (9.9×10^{-2} mol) de NaOH al 35 %, se calienta ligeramente en un baño maría, no dejando subir la temperatura a más de 45°C, durante 50 min. Se agrega 100 ml de agua y se extrae con éter (2 X 25 ml), formándose un sólido, el cual se recristaliza de etanol para obtener 0.396 g del alcohol 2-nitrobencílico, pf 68-70 °C, (informado, 70-72 °C)^{32c} rendimiento 39.1 %. La fase acuosa se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), se extrae con éter, (2 X 25 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, y se evapora a presión reducida, obteniéndose 0.607 g del ácido 2-nitrobenzoico, pf 143-145 °C, (informado, 146-148 °C)^{32d} rendimiento 54.9 %. Los productos se identificaron por ccf e I.R.

Alcohol 4-nitrobencílico y ácido 4-nitrobenzoico ⁸⁰



En un matraz de 3 bocas de 250 ml, se colocan 2 g (1.3×10^{-2} mol) de 4-nitrobenzaldehído, se adiciona poco a poco 11.35 ml (9.9×10^{-2} mol) de NaOH al 35 %, se mantiene a una temperatura de 45 °C durante 30 min. Se agrega 85 ml de agua, se extrae con éter (2 X 25 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora a presión reducida, para obtener 0.419 g del alcohol 4-nitrobencílico, pf 88-91 °C, (informado, 92-94 °C)^{32c} rendimiento 41.4 %. La fase acuosa se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), se extrae con éter (2 X 25 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora a presión reducida, obteniéndose 0.467 g del ácido 4-nitrobenzoico, pf 234-238 °C, (informado, 239-241 °C)^{32e} rendimiento 42.2 %. Los productos se identificaron por ccf e I.R.

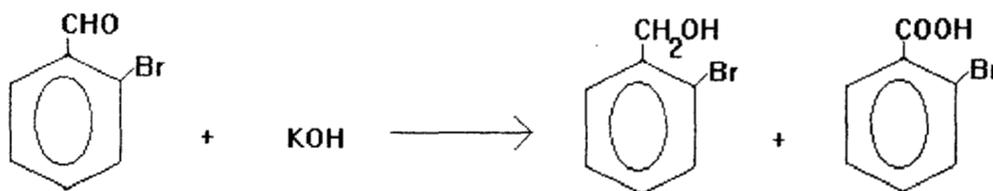
Alcohol 3-nitrobencílico y ácido 3-nitrobenzoico⁸⁰



En un matraz de 3 bocas de 25 ml, se colocan 0.2 g (1.3×10^{-3} mol) de 3-nitrobenzaldehído,⁸⁵ se adiciona poco a poco 1.06 ml (9.9×10^{-3} mol) de NaOH al 35 %, se mantiene a una temperatura de 45 °C durante 30 min. Se agrega 5 ml de agua, se extrae con éter (2 X 15 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se

evapora a presión reducida, para obtener 0.039 g del alcohol 3-nitrobencílico, pf 30-31 °C, (informado, 30-32 °C)^{32e} rendimiento 38.4 %. La fase acuosa se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), se extrae con éter (2 X 15 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora a presión reducida, obteniéndose 0.047 g del ácido 3-nitrobenzoico, pf 138-140 °C, (informado, 140-142 °C)^{32e} rendimiento 42.2 %. Los productos se identificaron por ccf e I.R.

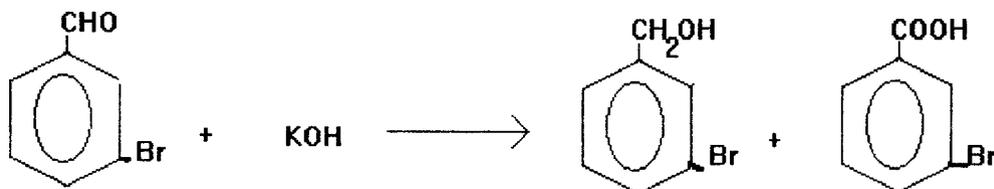
Alcohol 2-bromobencílico y ácido 2-bromobenzoico ⁸⁰



En un matraz de 3 bocas de 250 ml, equipado con agitación y baño maría; se le agrega 6.35 ml (5.7×10^{-2} mol) de KOH al 50 %, se adiciona 1.5 g (8.1×10^{-3} mol) de 2-bromobenzaldehído; la mezcla se calienta ligeramente para mantener la temperatura a 60°C, se continua la agitación por 2 h. Se agrega agua, se extrae con éter (2 X 15 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora a presión reducida, para obtener 0.230 g del alcohol 2-bromobencílico, se recristaliza de agua pf 77-81 °C (informado, 79-82 °C)^{32f} rendimiento 30.3 %. La fase acuosa se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), obteniéndose 0.233 g del ácido 2-bromobenzoico pf 145-

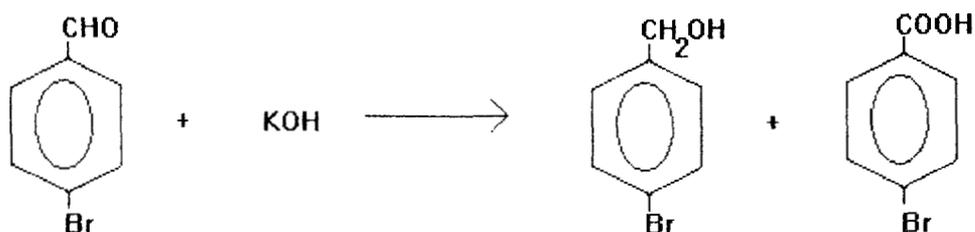
148 °C (informado, 145-150 °C)^{32f} rendimiento 28.6 %. Los productos se identificaron por ccf e I.R.

Alcohol 3-bromobencílico y ácido3-bromobenzoico ⁸⁰



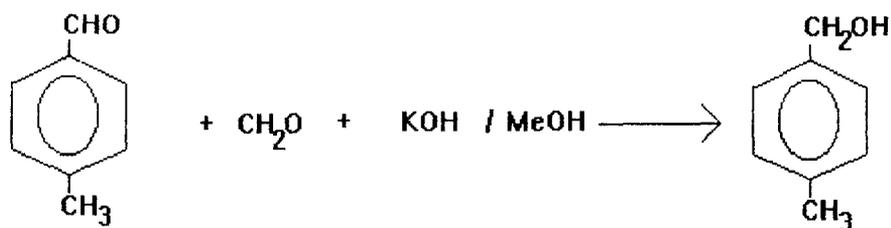
En un matraz de 3 bocas de 250 ml, equipado con agitación y baño maría; se agrega 4.24 ml (3.8×10^{-2} mol) de KOH al 50 %, se adiciona 1.0 g (5.4×10^{-3} mol) de 3-bromobenzaldehído; se calienta ligeramente para mantener la temperatura a 60 °C, se continua la agitación por 2 h. Se agrega 20 ml de agua, se extrae con éter (2 X 15 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora a presión reducida, para obtener 0.246 g de un líquido, siendo el alcohol 3-bromobencílico, rendimiento 48.7 % . La fase acuosa se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), obteniéndose 0.260 g del ácido 3-bromobenzoico, pf 153-156 °C (informado, 155-158 °C)^{32f} rendimiento 47.9 %. Los productos se identificaron por ccf e I.R.

Alcohol 4-bromobencílico y ácido 4-bromobenzoico ⁸⁰



En un matraz de 3 bocas de 250 ml, equipado con agitación mecánica se adiciona 12.7 ml (1.1×10^{-1} mol) de KOH al 50 %, se agrega 3 g (8.1×10^{-3} mol) de 4-bromobenzaldehído; se calienta ligeramente para mantener la temperatura a 60 °C y se continua la agitación durante 90 min se agrega 50 ml de agua, se extrae con éter (2 X 15 ml), se evapora a presión reducida para obtener 0.444 g del alcohol 4-bromobencílico, pf 73-75 °C, (informado, 75-77 °C)^{32f} rendimiento 29.3 %. La fase acuosa se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), obteniéndose 0.761 g del ácido 4-bromobenzoico, pf 249-252 °C, (informado, 252-254 °C)^{32f} rendimiento 46.7 %. Los productos se identificaron por ccf e I.R.

Alcohol 4-metilbencílico ⁸¹

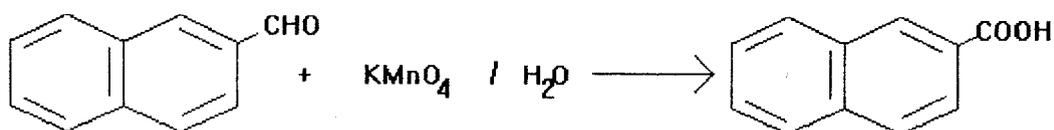


En un matraz de 3 bocas de 250 ml, se colocan 1.82 g (1.6×10^{-2} mol) de hojuelas de KOH, se adiciona 2.68 ml de MeOH, la mezcla se agita hasta completa disolución, se adiciona poco a poco una mezcla de 1.25 ml de solución de CH₂O al 36 % (1.5×10^{-2} mol) y 1.47 ml (1.25×10^{-2} mol) de 4-metilbenzaldehído , se deja a reflujo durante 6:40 h; se destila el MeOH, se agrega 20 ml de agua se enfria, formándose un sólido de pf 48-50 °C, la fase acuosa se extrae con tolueno (2 X 20 ml), posteriormente se destila el tolueno, dando un sólido de pf 43-46 °C, con un rendimiento de 83.1 %. Se recristalizan de hexano, para obtener 0.936 g del alcohol 4-metilbencílico, pf 57-59 °C, (informado, 59-61 °C)^{32g} y rendimiento de 50.6 %. Se identifica por ccf e I.R.

Preparación de derivados de ácidos carboxílicos aromáticos

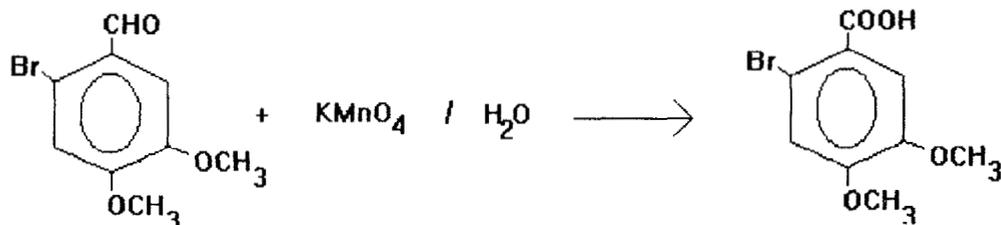
Reacciones de Oxidación con KMnO_4 , HNO_3

Ácido 2-naftoico ⁸²



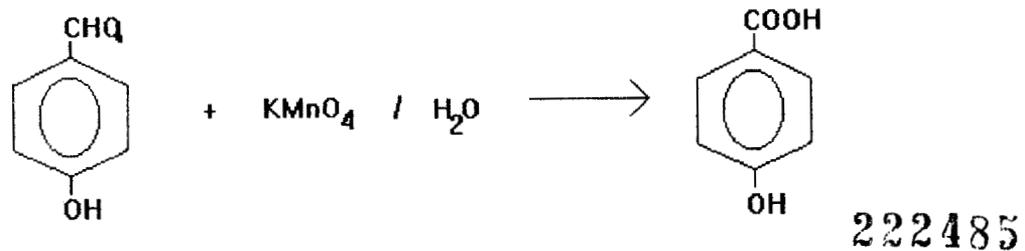
En un matraz de 3 bocas de 250 ml, se coloca 0.5 g (3.2×10^{-3} mol) de 2-naftaldehído, se adiciona 125 ml de agua, se deja en vigorosa agitación hasta formar una emulsión; se calienta ligeramente en un baño maría a una temperatura de 70-80°C, se adiciona una solución de KMnO_4 [0.7083g (4.5×10^{-3} mol) en 14.16 ml de agua], se mantiene la temperatura durante una hora. Se agrega 9 ml de NaOH al 30 %, se filtra y se lava con agua caliente, el filtrado se enfría hasta que precipite la materia prima sin reaccionar, (62 mg). El filtrado se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), los cristales amarillos se filtran, obteniéndose 0.141 g del ácido 2-naftoico, pf 183-186 °C, (informado, 185-187 °C)^{32h} rendimiento 25.6 %, éste se identifica por ccf e I.R.

Ácido 6-bromoveratrílico⁸²



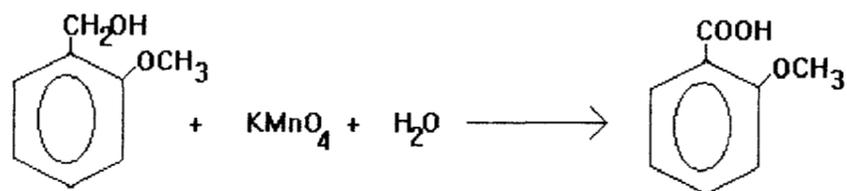
En un matraz de 3 bocas de 250 ml, se coloca 0.5 g (2.5×10^{-3} mol) de 6-bromoveratraldehído, se adiciona 125 ml de agua, se deja en agitación hasta formar una emulsión, se calienta ligeramente en un baño de agua para alcanzar una temperatura de 70-80 °C. Se adiciona una solución de KMnO_4 [0.45 g (1.8×10^{-3} mol) en 9 ml de agua], se deja en agitación por una hora manteniendo la temperatura. Se agrega 8 ml de NaOH al 30 %, se filtra en caliente sobre Celita, el filtrado se enfría hasta que precipite la materia prima sin reaccionar, el filtrado se acidifica con HCl al 15% (pH=2), se filtra y se seca para obtener 0.362 g del ácido 6-bromoveratrílico, pf 181-184 °C, (informado, 185-187 °C).³²ⁱ Rendimiento 67.9 %, éste se identifica por ccf e I.R.

Ácido 4-hidroxibenzoico⁸²



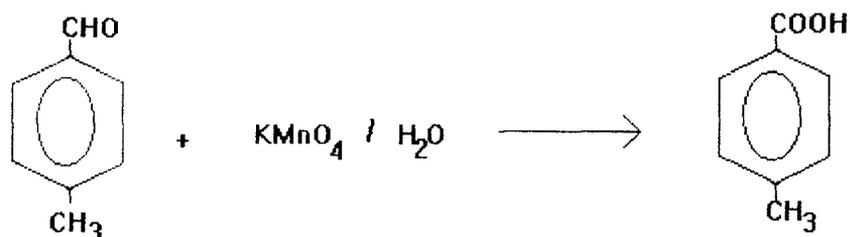
En un matraz de 3 bocas de 250 ml, se coloca 0.462 g (3.8×10^{-3} mol) de 4-hidroxibenzaldehído, se adiciona 125 ml de agua, se deja agitando hasta formar una emulsión. se calienta ligeramente en un baño de agua para mantener la temperatura de 70-80 °C. Se adiciona una solución de KMnO_4 [0.837g (5.3×10^{-3} mol) en 14 ml de agua], se deja agitando por 2 h, manteniendo la temperatura. Se agrega 10 ml de KOH al 10 % y se filtra en caliente, las sales se lavan con agua caliente, el filtrado se acidifica con 15 ml de HCl al 15 % (pH=2), se extrae con acetato de etilo (3 X 20 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora a presión reducida. Se recristaliza de agua obteniéndose 0.069 g del ácido 4-hidroxibenzoico, pf 212-215 °C, (informado, 215-217 °C).^{32j} rendimiento 13.1 %, éste se identifica por ccf e I.R.

Ácido 2-metoxibenzoico⁸²



En un matraz de 3 bocas de 250 ml, se coloca 1 g (7.2×10^{-3} mol) de alcohol 2-metoxibencílico, se adiciona 250 ml de agua, se calienta ligeramente a una temperatura de 70-80°C. Posteriormente se adiciona una solución de KMnO_4 [0.8120g (5.1×10^{-3} mol) en 16.4 ml de agua], manteniendo la temperatura por 40 min. Se adiciona 10 ml de NaOH al 30 %, se filtra y se lavan las sales con agua caliente, se enfría para que precipite la materia prima sin reaccionar. Se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), se extrae con acetato de etilo (3 X 20 ml), se evapora a presión reducida, obteniéndose después de lavar con éter 0.334 g del ácido 2-metoxibenzoico, pf 96-99 °C, (informado, 98-100 °C).^{32k} rendimiento 30.2 %. El producto se identifica por ccf e I.R.

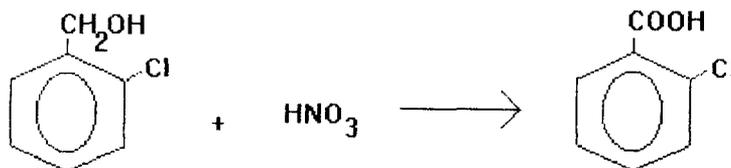
Ácido 4-metilbenzoico⁸²



En un matraz de 3 bocas de 250 ml, se pesa 1 g (8.3×10^{-3} mol) de 4-metilbenzaldehído, se adiciona 200 ml de agua, se calienta ligeramente para mantener la temperatura de 70-80°C. Se adiciona una solución de KMnO₄ [1.77 g (1.1×10^{-2} mol) en 3.4 ml de agua], se continua la agitación por una hora, manteniendo la temperatura. Se agrega 15 ml de KOH al 10 % (pH=12), se filtra en caliente, se lavan las sales con agua caliente, el filtrado se acidifica con HCl al 30 % (pH=2), se filtra y se seca. Se recristaliza de éter para obtener 1.13 g del ácido 4-metilbenzoico, pf 179-181 °C, (informado, 180-182 °C).³²¹ rendimiento 52.1 %. Se identifica por ccf e I.R.

COORDINACIÓN DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

Ácido 2-clorobenzoico⁸³

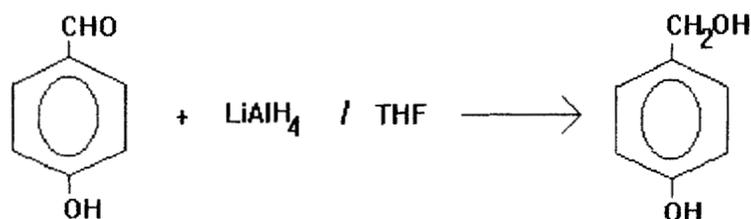


En un matraz de 3 bocas de 250 ml, se coloca 0.5 g (3.5×10^{-3} mol) de alcohol 2-clorobencílico se adiciona 4.34 ml (9.7×10^{-3} mol) de HNO_3 al 65 %, manteniendo la temperatura de 70-80 °C por una hora. Se enfría, se le adiciona 15 ml de agua fría y se filtra, para obtener 0.383 g del ácido 2-clorobenzoico, pf 136-139 °C, (informado, 138-140 °C).^{32b} rendimiento 69.7 %. El ácido se identifica por ccf e I.R.

Preparación de alcoholes bencílicos sustituidos

Reacciones de Reducción con LiAlH_4

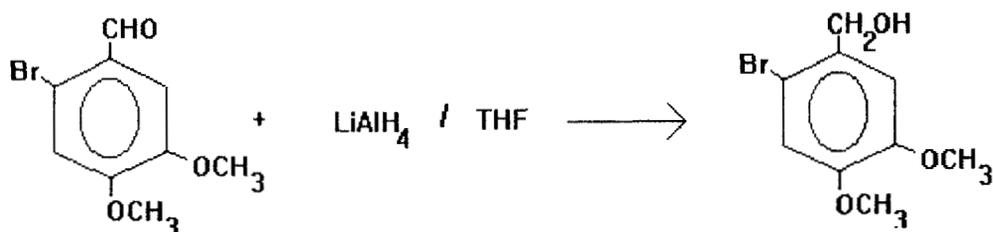
Alcohol 4-hidroxibencílico⁸⁴



En un matraz de 3 bocas de 250 ml, provisto de trampa de cloruro de calcio, refrigerante de aire, y agitación; se coloca 1 g (8.2×10^{-3} mol) de 4-hidroxibenzaldehído y 8.97 ml de THF; se adiciona poco a poco 0.36 g (9.6×10^{-3} mol) de LiAlH_4 manteniendo la temperatura a 30 °C, se adiciona 30 ml más de THF, se deja en agitación durante 22:30 h. Se agrega 3 ml de agua y se adiciona 10 ml de NaOH al 30 %. La fase acuosa se acidifica con HCl al 15% (pH=2) , se extrae con acetato de etilo (2 X 25 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora

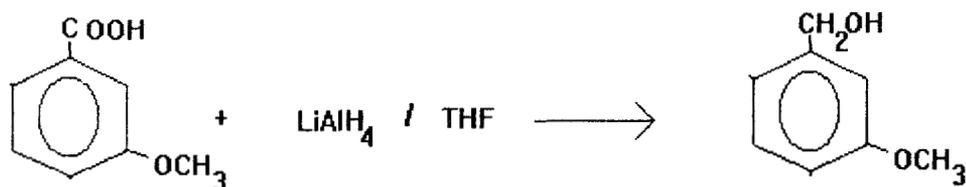
a presión reducida, rendimiento crudo de 97.6 %, los cristales se lavan con éter, obteniéndose 0.229 g del alcohol 4-hidroxibencílico, pf 110-112 °C, (informado, 118-122 °C).^{32m} rendimiento 22.5 %. Se identifica por ccf e I.R.

Alcohol 6-bromoveratrílico⁸⁴



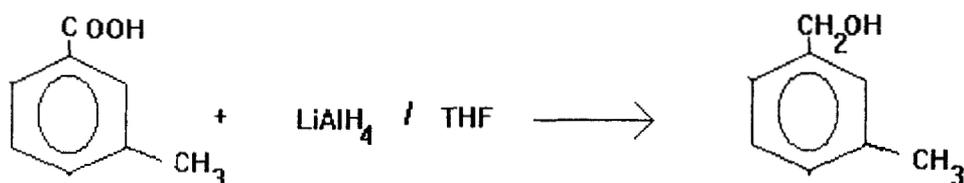
En un matraz de 3 bocas de 250 ml, provisto de trampa de cloruro de calcio, refrigerante y agitación; se coloca 1.5 g (6.1×10^{-3} mol) de 6-bromoveratraldehído, y 36.3 ml de THF, se adiciona poco a poco 0.23 g (6.7×10^{-3} mol) de LiAlH₄ manteniendo la temperatura a 30 °C, la mezcla se deja a reflujo 2:10 h. Se agrega 3 ml de agua y 10 ml de NaOH al 10 %, para eliminar el exceso de LiAlH₄. Se acidifica con HCl al 15 % (pH=2); se extrae con acetato de etilo (2 X 25 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora a presión reducida, dando un sólido de pf 64-70 °C con rendimiento de 96.4 %, se recristaliza de éter, obteniéndose 1.12 g del alcohol 6-bromoveratrílico, pf 88-90 °C rendimiento 70.1 %. Se identifica por ccf e I.R.

Alcohol 3-metoxibencílico⁸⁴



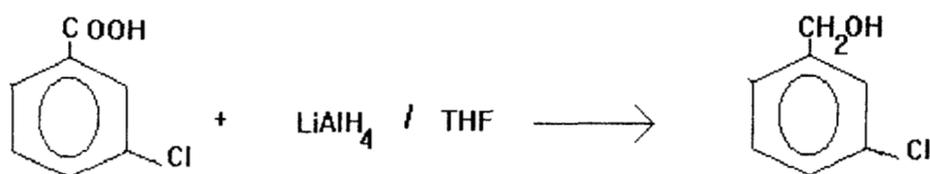
En un matraz de 3 bocas de 25 ml, provisto de trampa de cloruro de calcio, refrigerante y agitación; se coloca 0.55 g (3.6×10^{-3} mol) del ácido 3-metoxibenzoico, y 6 ml de THF, se adiciona poco a poco 0.29 g (7.5×10^{-3} mol) de LiAlH₄ manteniendo la temperatura a 30 °C, se deja a reflujo 2:10 h. Se agrega 1 ml de agua y 0.3 ml de NaOH al 15%, para eliminar el exceso de LiAlH₄. Se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), se extrae con éter (2 X 15 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora a presión reducida, obteniéndose 0.396 g de un líquido, siendo el alcohol 3-metoxibencílico con rendimiento de 79.3 %. Se identifica por ccf e I.R.

Alcohol 3-metilbencílico⁸⁴



En un matraz de 3 bocas de 25 ml, provisto de trampa de cloruro de calcio, refrigerante y agitación; se coloca 1.0 g (7.4×10^{-3} mol) de ácido 3-metilbenzoico, y 6 ml de THF, se adiciona poco a poco 0.59 g (15.5×10^{-3} mol) de LiAlH_4 manteniendo la temperatura a $30\text{ }^\circ\text{C}$, se deja a reflujo 2:10 h. Se agrega 1 ml de agua y 0.3 ml de NaOH al 15 %, para eliminar el exceso de LiAlH_4 . Se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), se extrae con éter (2 x 15 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora a presión reducida, para obtener 0.717 g de un líquido, siendo el alcohol 3-metilbencílico, con rendimiento de 79.9 %. Se identifica por ccf e I.R.

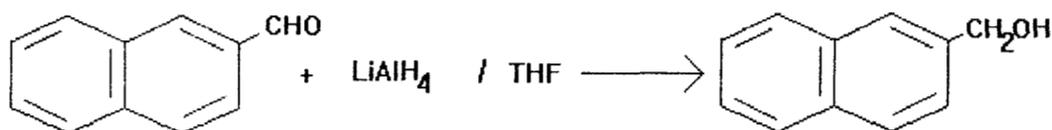
Alcohol 3-clorobencílico⁸⁴



En un matraz de 3 bocas de 25 ml, provisto de trampa de cloruro de calcio, refrigerante y agitación; se coloca 1.1 g (6.4×10^{-3} mol) de ácido 3-clorobenzoico, y 6 ml de THF, se adiciona poco a poco 0.38 g (9.6×10^{-3} mol) de LiAlH_4 manteniendo la temperatura a $30\text{ }^\circ\text{C}$, se deja a reflujo 2:10 h. Se agrega 1 ml de agua y 0.3 ml de NaOH al 15 %, para eliminar el exceso de LiAlH_4 . Se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), se extrae con éter (2 X 15 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se

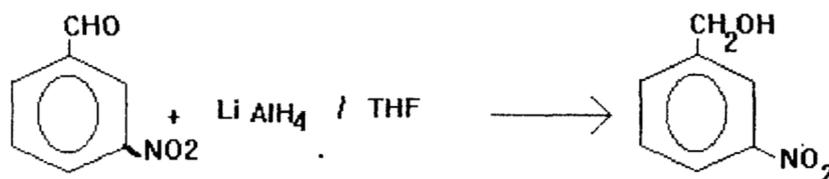
evapora a presión reducida, para obtener 0.978 g de un líquido, siendo el alcohol 3-clorobencílico con rendimiento de 97.6 %. Se identifica por ccf e I.R.

Alcohol 2-naftilcarbinol⁸⁴



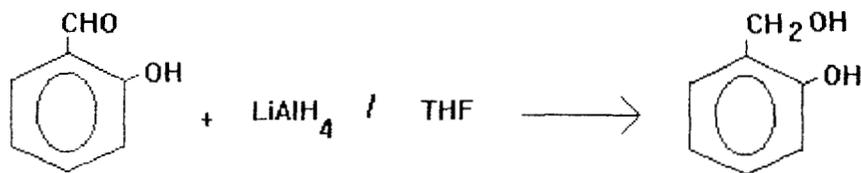
En un matraz de 3 bocas de 250 ml, provisto de trampa de cloruro de calcio; se coloca 0.5 g (3.2×10^{-3} mol) de 2-naftaldehído, se adiciona 4 ml de THF, se agrega poco a poco 0.064g (8.0×10^{-4} mol) de LiAlH_4 , se deja en vigorosa agitación durante 1:40 h a temperatura ambiente y una hora a 30 °C. Se adiciona 3 ml de agua y 10 ml de NaOH al 30 % para eliminar el exceso de LiAlH_4 . Se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), se extrae con éter (2 X 25 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se evapora a presión reducida, para obtener 0.464 g del alcohol 2-naftilcarbinol, pf 75-78°C, (informado, 79-81 °C).³²ⁿ rendimiento 91.7 %. El alcohol se identifica por ccf e I.R.

Alcohol 3-nitrobencílico⁸⁴



En un matraz de 3 bocas de 250 ml, provisto de refrigerante de aire, trampa de cloruro de calcio y agitación, se coloca 0.44 g (2.91×10^{-3} mol) de 3-nitrobenzaldehído, se adiciona 16 ml de THF, se calienta ligeramente para mantener la temperatura de 30-40°C, durante 40 min, se agrega, poco a poco, 0.13 g de LiAlH_4 (3.4×10^{-3} mol). Se adiciona 3 ml de agua y 10 ml de NaOH para eliminar el exceso de LiAlH_4 ; se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), se extrae con acetato de etilo (2 X 25 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se evapora a presión reducida, para obtener un líquido aceitoso con rendimiento de 75.4 %. Se purifica por cromatografía en columna, se eluyó con una mezcla de acetato de etilo:hexano (2:1), obteniéndose 0.139 g del alcohol 3-nitrobencílico, pf 30-31 °C, (informado, 30-32 °C)^{32e} rendimiento 31.2 %. Se identifica por ccf e I.R.

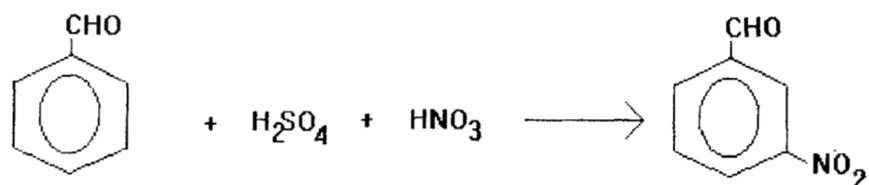
Alcohol 2-hidroxibencílico⁸⁴



En un matraz de 3 bocas de 250 ml, provisto de trampa de cloruro de calcio, refrigerante y agitación; se coloca 3 g (2.5×10^{-2} mol) de 2-hidroxibenzaldehído, con 15 ml de THF. Se adiciona poco a poco 0.47 g (1.3×10^{-2} mol) de LiAlH_4 , se mantiene a reflujo durante 10 min y 20 min en agitación a temperatura ambiente. Se

adiciona 3 ml de agua y 10 ml de NaOH al 30 % para eliminar el exceso de LiAlH_4 ; se acidifica con HCl al 15 % (pH=2), se extrae con acetato de etilo (2 x 25 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora a presión reducida, para obtener 1.247 g del alcohol 2-hidroxibencílico recristalizado de acetato de etilo-hexano (1:0.5), pf 80-83 °C, (informado, 83-85 °C)³²ⁱ rendimiento 40.9 %. El producto se identifica por ccf e I.R.

Preparación de 3-nitrobenzaldehído⁸⁶



En un matraz de 3 bocas de 250 ml, provisto de un embudo de adición; se adiciona 61.7 ml (1.16 mol) de H_2SO_4 al 98% y 8.9 ml (2.0×10^{-1} mol) de HNO_3 al 65 %, se enfría sobre un baño de hielo para mantener una temperatura de 5-10 °C. Se adiciona, gota a gota, 9.5 ml (9.9×10^{-2} mol) de benzaldehído aproximadamente durante una hora, manteniendo la temperatura, al término de la adición se retira el baño de hielo y se deja en agitación durante 25 min. a temperatura ambiente. Se agrega 150 g de hielo, se forma un sólido éste se filtra y se lava en varias ocasiones con agua fría, se lleva a (pH=12) con NaOH al 12 %, se filtra, el sólido se recristaliza

de etanol, para obtener 8.977 g del 3-nitrobenzaldehído, pf 55-57 °C, (informado, 57-59 °C)^{32ñ} rendimiento del 60.0 %, este se identifica por ccf e I.R.

Método general de preparación de dioles a partir de las lactonas correspondientes por reducción con LiAlH_4 ⁸⁶

222485

Se prepararon los siguientes dioles: 1,4-pentanodiol; 1,4-octanodiol; 1,5-undecanodiol; 1-fenil-1,4-butanodiol a partir de las siguientes lactonas: γ -valerolactona, γ -octanolactona, δ -undecanolactona y γ -fenil- γ -butirolactona.

En un matraz de 3 bocas de 25 ml, provisto de trampa de cloruro de calcio, refrigerante y agitación; se coloca 1 mol de la lactona, con 7 ml de THF, se adiciona poco a poco 1.2 mol de LiAlH_4 manteniendo la temperatura a 30 °C, se deja en agitación a temperatura ambiente siguiendo el curso de la reacción por ccf. Se agrega suficiente agua y 5 ml de NaOH al 30 %, para eliminar el exceso de LiAlH_4 . Se acidifica con 15 ml de HCl al 18 % (pH=2); se extrae con éter (2 X 20 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora a presión reducida, dando un líquido con rendimiento de 47-79 %. Se identifica por ccf e I.R.

Tabla 2. Obtención de Dioles

Lactona	Tiempo (h)	Diol	% Rendimiento
γ -valerolactona	2:0	1,4-pentanodiol	79.1
γ -octanolactona	22:0	1,4-octanodiol	47.3
δ -undecanolactona	0:17	1,5-undecanodiol	79.3
γ -fenil- γ -butirolactona	3:0	1-fenil-1,4-butanodiol	70.0

Activación de *Nocardia corallina* B-276

La activación de la bacteria se efectuó a través de la inoculación de una placa de agar con una suspensión de la cepa comercial y fue incubada a 30 °C por tres días.

La composición del agar es: Extracto de carne, 3.0 g/l; peptona, 5.0 g/l; agar, 15 g/l; a un pH = 6.8.

Una muestra de la cepa se preservó en glicerol acuoso al 80 % (v/v), almacenándose a -20°C.

El medio de cultivo líquido usado en las biotransformaciones se preparó de la siguiente manera:

Solución A: $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/l; K_2HPO_4 , 1.74 g/l; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 2.0 g/l; extracto de levadura, 1.0 g/l.

Solución B: MgSO_4 , 1.5 g/l.

Solución C: glucosa, 2.0 g/l.

Cada solución fue esterilizada por separado y se mezclaron bajo condiciones asépticas ajustando el pH final, a 8.0 (± 0.5).

Procedimiento general para efectuar las biotransformaciones

Precultivo I: Un matraz Erlenmeyer de 125 ml, conteniendo 50 ml de medio de cultivo estéril, fue inoculado con el contenido de una placa de agar (con crecimiento o desarrollo de más de 72 h), posteriormente se incubó a 28-30 °C con agitación rotatoria (200 rpm) por 24-30 h.

Precultivo II: El contenido del matraz de la etapa del Precultivo I fue asépticamente trasvasado a un matraz Erlenmeyer de 250 ml, el cual contenía 100 ml del mismo medio de cultivo estéril; el matraz fue incubado a 28-30 °C con agitación rotatoria (200 rpm) por 24-30 h.

Biotransformación: Los substratos se adicionaron, bajo condiciones asépticas, al cultivo anterior (Precultivo II) en cantidades de 100-150 mg, utilizando 1.0 ml de *N,N*-dimetilformamida como codisolvente, seguido de la adición de 10 ml de *n*-octano como segunda fase. La mezcla se agitó a 28-30 °C y el progreso de la reacción se siguió por ccf.

El aislamiento del producto se realizó llevando la mezcla de reacción a un pH ácido con la adición de 0.5 ml de HCl al 20 % , saturando con cloruro de sodio y filtrando sobre Celita, el filtrado se extrae con acetato de etilo (4 X 25 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en éter etílico y se adiciona una solución saturada de bicarbonato de sodio o de hidróxido de sodio 1N, (2 X 10 ml), separándose las fases. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose, entre los neutros, el alcohol recuperado. La fase acuosa se ajusta a pH=1 con sol. de HCl al 18 % y se extrae con éter etílico (4 X 20 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose el ácido deseado.

Procedimiento general para la biotransformación de dioles

La biotransformación se llevo acabo por el procedimiento anteriormente descrito y el aislamiento del producto por sus características se efectuó de la siguiente manera: la mezcla de reacción se lleva a un pH=5 con 0.5 ml de HCl al 10 %, saturando con cloruro de sodio y filtrando sobre Celita, el líquido se extrae con cloruro de metileno (3 X 25 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. A veces se requiere de extracción continua (12 h) con cloruro de metileno o cloroformo (200 ml).

Cuantificación de células

Este método se basa en las lecturas de las densidades ópticas (D.O) de varias diluciones (1:10, 1:100, 1:1000, etc) para la cuantificación de células en mg/ml por medio de un espectrofotómetro.

A los medios de cultivos líquidos de células preparados como se mencionó anteriormente (por duplicado) después de 72 h, se centrifugan a 9000 rpm/20 min a 4 °C, se desecha el sobrenadante y el precipitado es resuspendido en 20 ml de agua destilada, de esta mezcla se toma 1 ml y se agregan 9 ml de agua destilada y se lee en el espectrofotómetro a 660 nm, de esta dilución se toma 1 ml más 9 ml de agua

destilada y se lee en el espectrofotómetro y así sucesivamente se hacen varias diluciones. Este método se ha desarrollado con la finalidad de obtener una curva estándar y poder extrapolar los resultados.

Se pesaron 10 filtros milipore, 47 mm de diámetro, se ponen a peso constante a 60 °C durante 22 h, posteriormente se pesa cada uno de ellos.

En los filtros milipore pesados anteriormente se filtran las diluciones hechas, se ponen a peso constante a 60 °C durante 22 h. Por diferencia se obtiene el peso seco, el cual junto con la D.O. se grafica obteniéndose así la pendiente (m) y el intercepto (b) para poder extrapolar los resultados obtenidos en la gráfica y aplicar la siguiente ecuación:

$$X = (y - b/m) \text{ (dilución)}$$

Donde:

X= mg/ml de células (peso seco)

Y= densidad óptica

m= pendiente

b=intercepto

Procedimiento para la inmovilización de células

Producción de biomasa. En un matraz Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml del medio de cultivo estéril (etapa para la producción de biomasa) fue inoculado con las células contenidas en la placa de agar y se incubo a 28-30 °C, con agitación rotatoria (200 rpm) por 96 h. La mezcla se centrifugó a 4 °C (9000 rpm) por 20 min.

Procedimiento de inmovilización. Al paquete celular (suspensión de células centrifugadas para tener una concentración aproximada de 100 mg de peso seco de células por ml de solución de alginato) se le adicionó la solución del ácido algínico al 15 % (p/v) y esta suspensión se goteó a velocidad constante (bomba peristáltica) sobre una solución de cloruro de bario 0.125 M, dejándose en agitación por 24 h. Guardándose en la misma solución a 4 °C, hasta su uso.

Procedimiento para la biotransformación con células inmovilizadas

La biotransformación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 ml utilizando de 10 a 40 esferas de *Nocardia* inmovilizada, se le adiciona de 50 a 150 mg de alcohol furfurílico en 50 ml del medio de cultivo líquido antes descrito, 0.8 ml de DMF y 10 ml de *n*-octano. La mezcla heterogénea se agita por periodos de 24 a 72 h con agitación rotatoria (140 rpm) a 28-30 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron en primera instancia, las condiciones adecuadas para el crecimiento de *Nocardia corallina*, con agitación recíproca, para ello se cuantificó el peso del microorganismo desarrollado en relación a la temperatura de incubación (intervalo de 26° a 32° C) y al pH del medio de cultivo (intervalo de 6.97 a 8.6) encontrándose que el intervalo de pH más adecuado para producir un óptimo crecimiento fue de 7.6-8.0 y la temperatura de incubación de 28-30 °C.

Durante el estudio anterior se enfrentaron serios problemas, ya que *Nocardia corallina* presentaba diferentes formas de desarrollo, lo más frecuente fue encontrar una aglutinación de células, conduciendo a biotransformaciones no reproducibles. Además en la fase de Precultivo II las células mostraron una coloración amarilla, fuera de lo normal.

Por estudios microscópicos (frotis en fresco) se observó que el material biológico no estaba contaminado conservándose la identidad de la bacteria, pero se aprecia algo de lisis celular.

El problema de la aglutinación se atribuyó al tipo de agitación que se estaba utilizando, ya que al cambiar a agitación rotatoria la producción de biomasa

(Precultivo II), nos llevo al desarrollo de células en suspensión con opalescencia de color salmón, lo cual condujo a biotransformaciones exitosas y reproducibles.

El objetivo de esta tesis era el estudio de la oxidación de alcoholes bencílicos primarios, por ello el substrato inicial, además de ser la referencia lógica, fue el alcohol bencílico. De los experimentos realizados con el alcohol bencílico (35-50 mg, con tiempos de 4-22 h de biotransformación), no se obtuvo el ácido benzoico esperado y si una mezcla compleja de por lo menos dos productos mayoritarios, no observándose el aldehído correspondiente.

Con el objetivo de racionalizar estos resultados, se llevó a cabo un experimento utilizando al ácido benzoico como substrato, bajo las mismas condiciones de biotransformación; sin embargo bajo estas condiciones el microorganismo no lo biotransformó, recuperándose la materia prima sin cambio. Ello hace evidente que el ácido benzoico no es un intermediario en la ruta para obtener alguno de los dos compuestos no identificados antes mencionados, y nos indica que posiblemente otras rutas metabólicas están involucradas, previas a la producción del ácido benzoico.

A pesar de los resultados desalentadores se procedió a probar la biotransformación con otros alcoholes bencílicos substituidos en el anillo aromático. Para esta

discusión los resultados se presentarán agrupados por patrón de sustitución, seguido por los sustratos no relacionados estructuralmente.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos con los alcoholes bencílicos *orto*-sustituídos.

Tabla 3. Biotransformación de alcoholes bencílicos *orto*-sustituídos⁸⁷



		% Rendimiento (mol/mol)	Tiempo de Reacción (h)
1: R= OH	2: R= OH	74	27
3: R= NO ₂	4: R= NO ₂	- ^a	110
5: R= Cl	6: R= Cl	19	26
7: R= NH ₂	8: R= NH ₂	- ^b	26
9: R= OCH ₃	10: R= OCH ₃	5	27
11: R= Br	12: R= Br	12	30

a: 25 % de materia prima recuperada

b: mezcla compleja

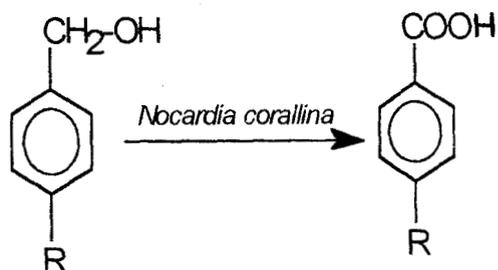
Los grupos sustituyentes se seleccionaron con el fin de investigar, si los efectos electrónicos de estos podrían tener influencia en el proceso de oxidación. Desafortunadamente los resultados no mostraron una relación clara entre los efectos electrónicos y el rendimiento de los productos de oxidación. Para el caso de los grupos activadores (hidroxilo, amino, metoxilo), el *orto*-hidroxi derivado (1) produjo el rendimiento más alto, por el contrario el *o*-metoxi derivado (9), mostró una caída sustancial del rendimiento (solo 5%). Lo anterior nos llevo a especular sobre la necesidad de la presencia del grupo oxidrilo libre a cierta distancia del grupo reactivo, en este caso el oxidrilo bencílico primario. Esto último viene a reforzar la hipótesis, presentada por Luna et al², de que un grupo oxidrilo libre a cierta distancia es imprescindible para llevarse a cabo la oxidación de 1,4-dioles (ambos primarios) para producir lactonas quirales con la *Nocardia corallina*.

Otra posible explicación para el bajo rendimiento en la producción del ácido (10), podría ser un potencial impedimento estérico, efecto ampliamente conocido en casos similares. Aunque para el caso de los derivados halogenados, la influencia del voluminoso átomo de bromo (12 % de rendimiento) no produjo una caída tan dramática en relación al sustituyente cloro (19 % rendimiento).

El caso del amino derivado (7), parece involucrar factores adicionales a los efectos electrónicos del sustituyente; se observó la desaparición de la materia prima, pero en lugar del esperado ácido antranílico (8) se obtuvo una mezcla compleja de productos. Por el contrario el nitro derivado (3), condujo a la recuperación de la materia prima en un 25 % (después de recristalizar de agua), a pesar del largo período de reacción; el análisis cromatográfico durante la biotransformación no mostró la aparición de ningún producto adicional y la baja recuperación de la materia prima se debió a la recristalización de la compleja fase neutra extraída.

Es de mencionarse que esta metodología constituye una nueva opción para preparar el conocido intermedio farmoquímico denominado ác. salicílico (2).

Tabla 4. Biotransformación de alcoholes bencílicos *para*-sustituídos⁸⁷



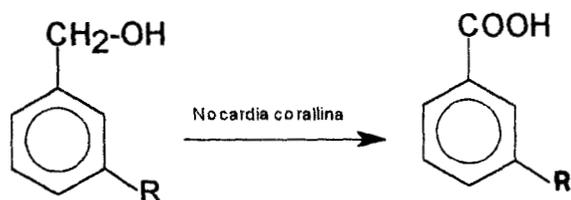
		% Rendimiento (mol/mol)	Tiempo de Reacción (h)
13: R= OCH ₃	14: R= OCH ₃	32	6
15: R= Cl	16: R= Cl	50	24
17: R= NO ₂	18: R= NO ₂	50	24
19: R= OH	20: R=OH	- ^a	24
21: R= CH ₃	22: R= CH ₃	47	27
23: R= Br	24: R= Br	11	34

a: mezcla compleja

Los rendimientos producidos por los derivados *para*-sustituídos (Tabla 4) fueron superiores a los obtenidos con los isómeros *orto*, a excepción del derivado hidroxilado (19) el cual produjo una mezcla compleja, de la cual no se logró aislar un compuesto mayoritario. Es interesante observar que el derivado metoxilado (13), con el grupo en una posición más alejada del sitio de la reacción, produjo un

rendimiento mayor al del isómero en *orto*, en menor tiempo de bioconversión, en experimentos a tiempos mayores (30 h) se observa un decremento en el rendimiento (25 %). Los alcoholes halogenados, bromo (23) y cloro (15) presentan resultados contrastantes en éste caso, si los efectos estéricos de los átomos en la serie *orto* fuera el predominante, los resultados serían los esperados (11 % y 50 % respectivamente); ya que los efectos electrónicos son muy similares. Esta explicación, sin embargo no es consistente con el caso del derivado metoxilado (13) o el nitro derivado (17), que es biotransformado al ácido (18) en un 50 % de rendimiento en 24 h, lo que además está en franca oposición con el resultado observado con su isómero *orto*, el cual no reacciona a pesar de 110 h. Para el metil derivado (21) se observa un 47 % de rendimiento. Los resultados obtenidos con los derivados cloro y nitro, son iguales (50 % de rendimiento); ya que ambos grupos son desactivadores del anillo aromático pero con efectos resonantes contrarios, se podría especular un efecto electrónico en el proceso de oxidación. Sin embargo el metil derivado presenta un rendimiento muy similar, siendo este grupo un activador débil del anillo aromático, si bien por efectos de hiperconjugación; lo anterior nos lleva a proponer que posiblemente la oxidación no se vea afectada significativamente por los efectos electrónicos en el anillo por los sustituyentes.

Tabla 5. Biotransformación de alcoholes bencílicos *meta*-sustituidos⁸⁷



		% Rendimiento (mol/mol)	Tiempo de Reacción (h)
25: R= NO ₂	26: R= NO ₂	64	123
27: R= OCH ₃	28: R= OCH ₃	77	25
29: R= Cl	30: R= Cl	46	25
31: R= Br	32: R= Br	52	25
33: R= CH ₃	34: R= CH ₃	72	25

Para los isómeros en *meta* se observa en la Tabla 5 rendimientos más homogéneos y por lo general mayores. Esto se puede racionalizar en que existe un leve efecto electrónico, ya que por la sustitución en *meta* este efecto se aprecia menos. El nitro derivado (25) presenta los tiempos de bioconversión mas grandes y un 64 % de rendimiento. Resalta el comportamiento del metoxilo (27) el cual presenta el rendimiento más alto de todos los sustituyentes estudiados, un 77 %. En esta serie no se pudo contar con el *meta* hidroxilo derivado. Los derivados halogenados cloro (29) y bromo (31) dan rendimientos medianos muy similares, 46 y 52 %

respectivamente. El grupo activador metilo (33) favorece la oxidación y se obtiene un 72 % del ácido 34 siendo entonces, observable en la serie meta, un ligero efecto positivo para la biotransformación con la presencia de grupos activadores (metoxilo y metilo).

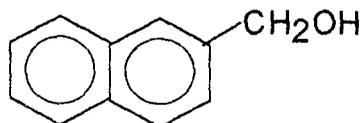
Tabla 6 Comparación de los rendimientos de la oxidación de los isómeros (orto, meta, para) de alcoholes bencílicos monosustituidos.

Substituyente	<i>orto</i>		<i>meta</i>		<i>para</i>	
	Tiempo (h)	%	Tiempo (h)	%	Tiempo (h)	%
NO ₂	110	^a	123	64	24	50
OMe	27	5	25	77	6	32
OH	27	74	n.d.	n.d.	24	^b
Cl	26	19	25	46	24	50
Br	30	12	25	52	34	11
Me	n.d.	n.d.	25	72	27	47

^a 25% de materia prima recuperada; ^b mezcla compleja; n.d. no determinado.

En la Tabla 6 se resumen los resultados alcanzados en las tres series isoméricas de alcoholes bencílicos, en general podemos concluir que existe un ligero efecto electrónico del sustituyente que influye la oxidación con *Nocardia corallina*, siendo más evidente en la serie *meta*, el resultado tan interesante en la oxidación del

alcohol *orto* hidroxibencílico se atribuye a un posible puente de hidrógeno entre ambos grupos hidroxilos, favoreciendo la acción de la enzima para llevar a cabo la bioconversión. Esta posibilidad no es posible al tener el grupo metoxilo en el alcohol 9.



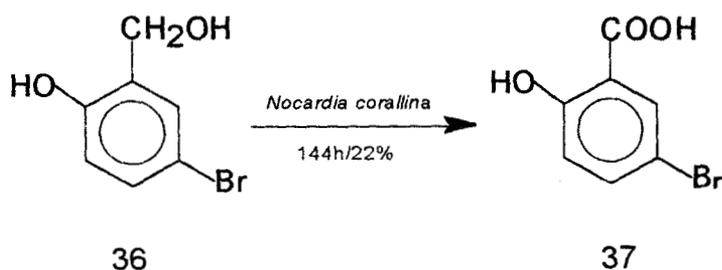
35

2-naftilcarbinol

Para analizar el efecto del tamaño del anillo aromático se sometió al alcohol 2-naftilcarbinol (35), a la biotransformación por 24 h, obteniéndose 18.75 % de rendimiento del ácido 2-naftilcarboxílico identificándose por IR, y comparación en ccf y pf con una muestra auténtica.

Con la finalidad de reforzar el entendimiento de las tendencias en reactividad observada con los derivados monosustituidos, especialmente en lo relacionado a la posición de sustitución, se efectuaron experimentos con derivados di- y trisustituidos. Cabe notar que el criterio utilizado en la selección de estos substratos fue su disponibilidad y que no se tuvo en mente algún patrón de

substitución en particular por ello la discusión de los resultados obtenidos se llevara a cabo individualmente.



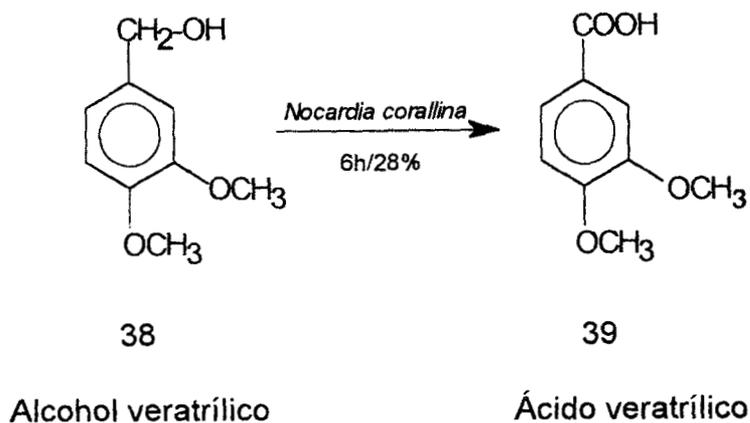
Alcohol 5-bromo-2-hidroxibencílico

Ácido 5-bromo-2-hidroxibenzoico

El alcohol 5-bromo-2-hidroxibencílico (36), después de 144 h de biotransformación y purificación por extracción de ácido/neutro, produjo un 22 % de rendimiento del ácido 5-bromo-2-hidroxibenzoico (37) y 62.3 mg de neutros siendo mayoritariamente, por ccf e IR , el alcohol de partida con impurezas.

Sorpresivamente este rendimiento del 22 % no fue el esperado, ya que el alcohol *orto*-hidroxibencílico (1) fue el derivado *orto* monosustituido que produjo el rendimiento más alto y además el alcohol *meta*-bromobencílico (31) tuvo un rendimiento del 50 %, lo cual podría suponerse que para el compuesto 36, el rendimiento de la oxidación microbiológica fuera similar o cercano, al obtenido por los compuestos monosustituidos (1 y 31).⁸⁷ El bajo rendimiento podría atribuirse a

restricciones estéricas en el sitio de reacción de la(s) enzima(s) involucradas en el proceso.

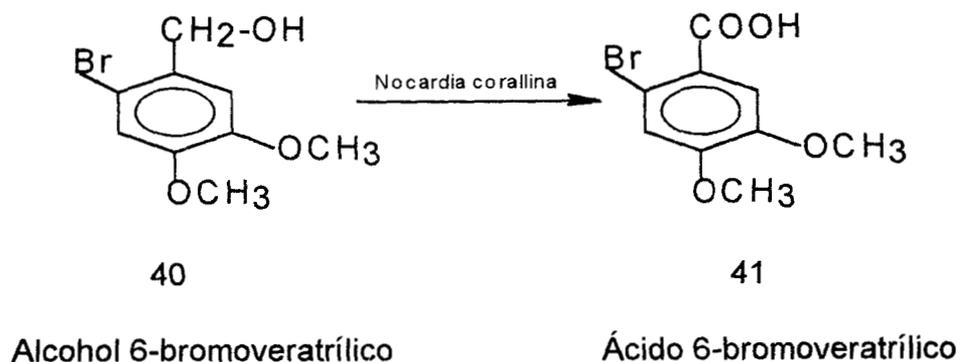


El alcohol veratrílico (38) después de 6 h de biotransformación y separación por extracción de ácido/neutro, condujo a un 28 % de rendimiento del ácido veratrílico (39) y 21.8 mg de neutros siendo este, una mezcla mayoritaria de alcohol 38 e impurezas detectadas por ccf e IR. Suponiendo que al aumentar el tiempo de biotransformación la cantidad de ácido aumentaría, se llevo a cabo un experimento con 100 mg de 38 con un tiempo de reacción de 24 h, produciendo tan solo un 13.3 % de producto, recuperándose 6.3 mg de neutros. Este resultado no refleja lo esperado ya que el alcohol monosustituido con metoxilo en *meta* (27) nos dió un 77 % de rendimiento y el isómero en *para* (13) un 32 %. Podemos entonces suponer que el sustituyente en la posición 4 puede regir la viabilidad del proceso oxidativo.

Con el objeto de ampliar la información sobre el sitio de la oxidación, se decidió explorar la biotransformación del grupo aldehído, ya que si bien no ha sido aislado por nosotros en nuestras condiciones, es lógico suponer que puede formar parte de la ruta de oxidación de la *Nocardia corallina*, pero ésto era necesario demostrarlo. El aldehído veratrílico, se sometió a biotransformación por 9 h, obteniéndose 39 % del ácido veratrílico (39), recuperando 41.3 mg de neutros cuya composición mayoritaria era el aldehído veratrílico. Este resultado nos indica que sí es consistente el obtener un mejor rendimiento al cambiar el substrato de alcohol al aldehído, ya que el átomo de carbono involucrado en la oxidación cambia de número de oxidación (-2 a 0) y se acerca más al del ácido carboxílico +2 de la ruta esperada de oxidación. Sin embargo esta modificación no contrarresta el fuerte efecto que disminuye la capacidad oxidativa de la *Nocardia* y solo se observa un ligero incremento comparándolo con el 28 % obtenido a partir del alcohol veratrílico (38), lo que resalta el efecto estructural del sustituyente en *para* como responsable de estos resultados.

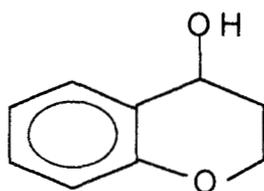
Dada la conocida capacidad de oxidación de aldehídos aromáticos por el aire se decidió estudiar el efecto del medio de cultivo, sin el microorganismo, sobre el aldehído veratrílico (experimento blanco). Se sometió a las condiciones usuales por 51 h y luego de la separación se recuperó un 86 % del aldehído. Con este resultado

se ratifica la capacidad de la *Nocardia* para oxidar aldehídos aromáticos y concluimos que el ambiente y el medio no participan significativamente en el proceso oxidativo.



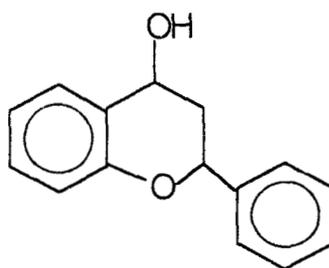
En vista de los resultados y observaciones derivadas de la oxidación del alcohol 38, nos pareció interesante probar la biotransformación con el alcohol 6-bromoveratrílico (40); después de 33 h se recuperó solo materia prima (53 %). Lo anterior vino a ratificar dos teorías que han surgido durante el desarrollo de éste trabajo, una que el efecto estérico en la posición *orto* al sitio de reacción es muy significativo y, segundo que la presencia de grupos metoxilo en el anillo aromático conducen al consumo del substrato por una vía no determinada, además de que no se logro observar ni aislar productos de dicha ruta alternativa.

Dentro de los alcoholes bencílicos mas complejos se probó la oxidación del 4-cromanol (42), y el 4-flavanol (43), cuya estructura bicíclica podría aportar datos acerca de los requerimientos estructurales de este proceso oxidativo.



42
4-cromanol

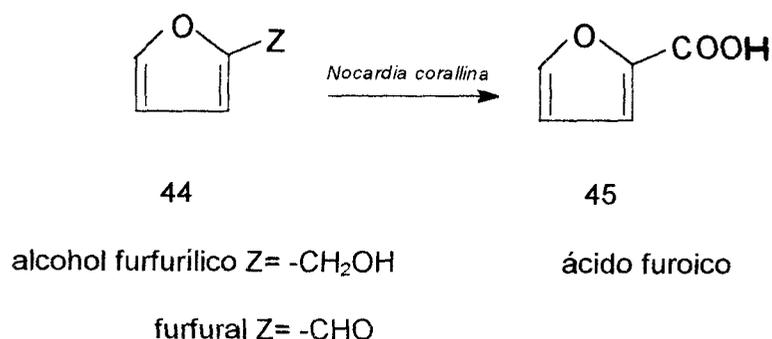
Con el 4-cromanol, después de 30 h de biotransformación, se obtuvo un 94 % balance de masa de una mezcla de alcohol y cetona, debido a estos resultados se decidió aumentar el tiempo de biotransformación dando el siguiente resultado; después de 100 h de biotransformación, produjo 31.5 % balance de masa de una mezcla del alcohol original y la cetona. Lo cual nos está indicando que en el proceso de oxidación con la *Nocardia corallina*, probablemente tanto el alcohol como la cetona se están degradando.



43
4-flavanol

El 4-flavanol (43), después de 144 h de biotransformación se recuperó 39.3 % balance de masa de una mezcla compleja, siendo minoritariamente el alcohol de partida; no observándose para éstos ejemplos, viable el proceso de biotransformación con este microorganismo.

Dos ejemplos de alcoholes bencílicos heterocíclicos fueron probados.

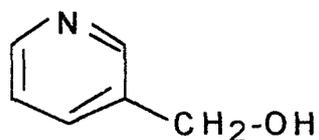


El alcohol furfurílico (44), por ser éste el primer alcohol heterocíclico que se experimentaba, se decidió efectuar el estudio completo haciendo las biotransformaciones con el alcohol (44, Z=-CH₂OH), el aldehído (44, Z=-CHO), y el ácido furoico (45), además de una reacción blanco (aldehído más medio de reacción), obteniéndose lo siguiente: Con el alcohol y después de 25 h de biotransformación se obtuvo un 51.3 % del ácido furoico (45). A partir del aldehído y 8:50 h de biotransformación, se obtuvo 71.4 % de rendimiento, del ácido furoico (45), recuperándose 35.9 mg de material neutro, siendo esta una mezcla minoritaria

del aldehído. Para el ácido 45 y después de 25 h de biotransformación, se recupera el 76 % del ácido, con esto consideramos que el substrato, ácido furoico, es estable en el medio de reacción y al microorganismo. La reacción blanco, consistiendo de aldehído y medio de reacción, por 51:20 h, se observa la recuperación de solamente el 36.2 % de la materia prima.⁸⁸ La identificación del ácido furoico (45) se efectuó por ccf y pf comparando con una muestra auténtica, y por medio de los espectros de I.R.,⁸⁹ RMN-¹H,⁹⁰ Masas,⁹¹ fueron idénticos a los publicados. Por lo anterior podemos afirmar, en primera instancia, que la *Nocardia* sí acepta estructuras análogas a los alcoholes bencílicos; la biotransformación del aldehído al ácido nos permite inferir también que el proceso de oxidación con la especie *Nocardia* involucra primero al aldehído y después se lleva a cabo la oxidación hacia el ácido correspondiente. Es evidente que el mejor rendimiento para preparar el ác. furoico es a partir del aldehído. Con este resultado se observa que los aldehídos son susceptibles de oxidación por la *Nocardia corallina* B-276 y es éste, el primer reporte de la biotransformación de este grupo funcional.

De todos es conocido la facilidad de oxidación del anillo furánico por el aire y la catálisis que aporta la luz a este proceso, sin embargo en las condiciones estudiadas en este trabajo se favorece una oxidación limpia de la materia prima. Esta sensibilidad a la que se alude, se hizo manifiesta en el caso del blanco (aldehído mas medio), dado el bajo porcentaje del aldehído recuperado, tan solo

36.2 %, sin que se observe la formación del ác. furoico. Además no se observa el proceso reversible de la reducción del producto obtenido ni la destrucción del anillo heterocíclico con la *Nocardia corallina*, como ha ocurrido con otros microorganismos.⁸⁸



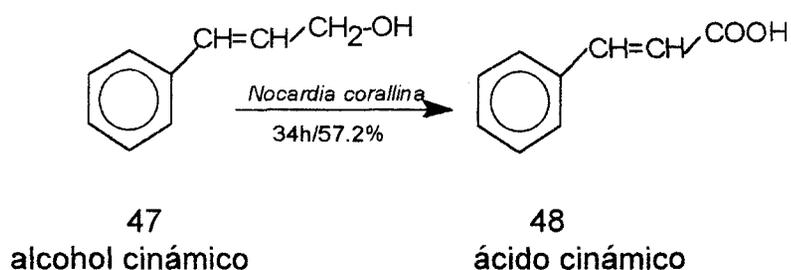
46

Alcohol nicotínico

El otro substrato heterocíclico seleccionado fue el alcohol nicotínico (46), se sometió a 5 h de biotransformación, observándose la desaparición de la materia prima, dando un producto el cual se aisló a un pH de 4.85 (debido a que el ácido deseado forma un zwitterion), después de 24 h de extracción continua de CHCl_3 , el producto aislado no correspondió al ácido nicotínico. Con el objetivo de obtener mayor cantidad del posible producto se repitió la biotransformación, triplicando la escala, sin embargo el compuesto no logro aislarse con suficiente pureza para su identificación. Con el objetivo de comprobar si el producto deseado, ácido nicotínico, se biotransformaba en el medio se decidió hacer un experimento con el ácido nicotínico, el cual después de 25 h de biotransformación; produjo un producto que por IR no correspondía al ácido de partida. De esta manera se observa que el

material deseado es metabolizado a otro sustrato en las condiciones de biotransformación.

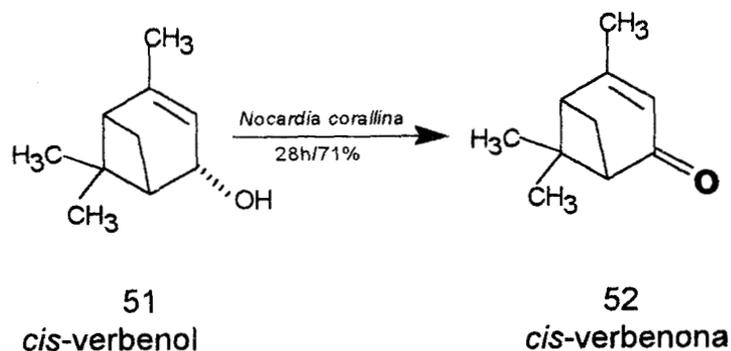
En la búsqueda de establecer los límites y alcances de esta oxidación de alcoholes con *N. corallina* se probaron otros sustratos con características electrónicas similares a los anteriores, a continuación se discutirán los resultados obtenidos en la biotransformación de diversos alcoholes alilícos.



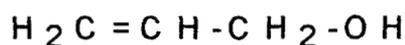
El alcohol cinámico (47), se seleccionó como un caso especial de alcohol bencílico con conjugación extendida, en este compuesto se sometía a competencia la conocida capacidad epoxidante de la *Nocardia corallina* con la posibilidad estudiada por nosotros de oxidación de un alcohol vecino a una doble ligadura, encontramos que en los experimentos efectuados no se observó en ningún caso la epoxidación del doble enlace. Sin embargo, después de 34 h de biotransformación el alcohol cinámico nos dió 57.2 % de rendimiento del ácido cinámico (48) y 1.6 % material neutro, el cual fue identificado como el alcohol de partida.

Con la finalidad de corroborar el camino que sigue la oxidación con la *Nocardia* (primero biotransformación a aldehído y posteriormente al ácido) sí se parte del aldehído cinámico el tiempo de biotransformación debería ser menor y la cantidad de ácido generado mayor, por lo anterior se decidió experimentar la biotransformación del aldehído cinámico; en estas condiciones, después de 8:50 h, se obtuvo 23.4 mg (20.87 %) del ácido cinámico, se recupera 37.4 % del aldehído. situación que no se correlaciona con los experimentos efectuados con el alcohol y el aldehído furfurílico, donde la obtención del ác. furoico es favorecida a partir del aldehído, esto puede ser racionalizado desde distintos puntos de vista que pasan por las estructuras intrínsecas de cada substrato y la labilidad inherente que favorece una descomposición, etc..

Con el objetivo de ver el efecto del medio se preparó un experimento con aldehído mas medio de cultivo por 51 h recuperándose el 85 % de la materia prima sin transformación. Estos resultados nos indican que la oxidación del aldehído sí se lleva a cabo por el microorganismo y el experimento con el blanco nos señala que el medio no induce una oxidación química en las condiciones de biotransformación.



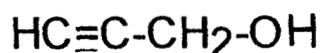
Nos pareció interesante someter al proceso de oxidación al (+)-*cis-verbenol* (51), el cual posee un alcohol alílico secundario y una molécula con mayor complejidad estructural; después de 28 h de biotransformación se obtuvo la *cis-verbenona* (52) en un 71.3 % de rendimiento. Este es el primer caso de oxidación de un alcohol alílico secundario quiral que se reporta con este microorganismo.



53
2-propen-1-ol

Nos pareció interesante la reactividad que presentan los alcoholes alílicos y esto nos indujo a probar las oxidaciones microbiológicas del 2-propen-1-ol (53), el cual después de 26 h de biotransformación y 25 h de extracción continua con CHCl_3 , nos da la mezcla del ácido acrílico y el alcohol (53), el cual se identificó por ccf e IR; siendo el mayor problema la extracción del producto y materia prima del medio de

biotransformación, haciéndolo impráctico y difícil de cuantificar como producto aislado. A lo anterior se debe sumar la inestabilidad inherente al producto mismo el cual se polimeriza fácilmente, dificultando aún más su aislamiento. Por lo que para éste ejemplo, sólo se puede afirmar de manera cualitativa que ocurre una biotransformación.

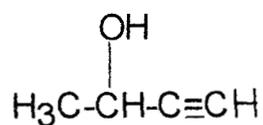


54

Alcohol propargílico

Debido a que el triple enlace es muy cercano en su comportamiento a un doble enlace, decidimos estudiar la biotransformación de los alcoholes propargílicos, con *Nocardia corallina*, si bien se consideró que por analogía con el substrato 53 se podrían presentar problemas en el proceso de recuperación de los compuestos orgánicos deseados, del medio líquido de la biotransformación. Dada la disponibilidad del alcohol 54 se procedió al estudio correspondiente. A 150 mg del miembro mas sencillo o simple de esta familia, el alcohol propargílico (54), después de 26 h de biotransformación y 24 h de extracción continua de CHCl_3 nos dió más de un gramo de neutros, lo anterior ilustra lo complejo que se vuelve el proceso de extracción ya que se aísla materia orgánica del medio de cultivo y de la *Nocardia*. A diferencia del caso anterior y a pesar de seis experimentos no se puede afirmar que ocurra la formación del ácido correspondiente. Se exploró el efecto del medio y se

decidió realizar dos blancos, uno con el alcohol propargílico y otro con el ácido propargílico. Con el primer caso, luego de 28 h de reacción, de los 150 mg de partida se logró aislar 18.3 mg de un líquido café después de extracción continua de CHCl_3 por 23 h, en el IR no se observa la señal característica de la triple ligadura por lo anterior se concluye que el medio juega un papel participativo que conduce a otros productos no caracterizados e imposibilita por esta acción, el poder realizar la biotransformación en los casos que se empleó el microorganismo. Es de mencionarse que con el segundo blanco, el ácido propargílico, después de 28 h se obtuvo lo siguiente: De 150 mg se recuperó 36.2 mg del mismo; lo anterior nos ilustra que el medio sorprendentemente no lo descompone, a pesar que uno esperaría una mayor labilidad por ser un sistema más reactivo. Por lo anterior estos resultados nos llevan a la necesidad, para éste substrato, de seleccionarlo para otro tipo de condiciones de biotransformación; las células inmovilizadas pueden ser una vía en un medio líquido diferente al aquí utilizado. El producto más importante aislado de esta biotransformación presenta un peso molecular de 254.9921 por espectroscopia de Masas y se observa por RMN- ^1H 4 grupos de señales en 3.37 un singulete (área 3.37) en 4.4238 singulete (área 2,18) y señales complejas en la zona de hidrógenos aromáticos de 7.8165-8.0542 (área 3.1 y 1.00 respectivamente); por IR C=O en 1738 cm^{-1} ; con esta información no hemos asignado todavía una estructura.



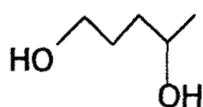
55
3-butin-2-ol

Por otro lado el 3-butin-2-ol (55), con 34 h de biotransformación, se observó la desaparición de la materia prima, y la aparición de una mezcla de productos (aproximadamente 22% de balance de masa) el cual por IR se observa la presencia del grupo carbonilo en 1686.7 cm^{-1} y la desaparición de la triple ligadura y por RMN- ^1H se indica la ausencia del hidrógeno del alquino y no se observa el metilo en 2.4 ppm que son las señales características para el producto deseado 3-butin-2-ona. Con este resultado se decidió someter al medio de biotransformación al producto esperado y ver cual era el efecto de la *Nocardia* sobre el mismo, después de 34 h de biotransformación y extracción continua de CHCl_3 se obtuvo un crudo inestable (aproximadamente 25% balance de masa) el cual por IR presenta señales similares a las observadas anteriormente.

Por el momento no se ha determinado la estructura de los productos de ambas reacciones, pero éste resultado inesperado sumado al obtenido con el alcohol propargílico nos induce a reafirmar la necesidad de abrir, en un futuro, una nueva línea de investigación relacionada a la biotransformación de alquinos con *Nocardia*

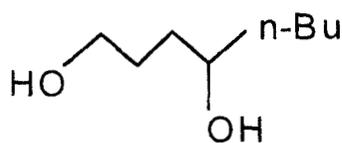
corallina, y se deberá de seleccionar substratos de peso molecular más alto para obviar las dificultades encontradas en el proceso de aislamiento.

Otro objetivo del presente trabajo era profundizar el estudio iniciado por Luna et al², de la oxidación de dioles para producir lactonas, por ello fueron seleccionados los siguientes dioles simétricos y no simétricos para someterlos a biotransformación:



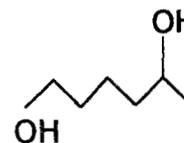
56

1,4-pentanodiol



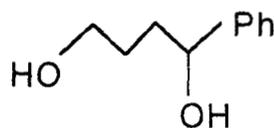
57

1,4-octanodiol



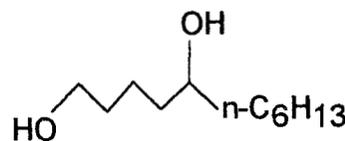
58

1,5-hexanodiol



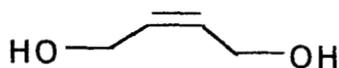
59

1-fenil-1,4-butanodiol



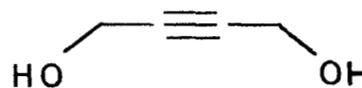
60

1,5-undecanodiol



61

cis-2-buteno-1,4-diol



62

2-butino-1,4-diol

Se obtuvieron los siguientes resultados:

El 1,4-pentanodiol (56), después de 27 h de biotransformación y extracción continua con CHCl_3 (12 h), se obtuvieron 30 mg que por IR, RMN- ^1H , no corresponden a la γ -valerolactona deseada, observándose que es materia prima con otros compuestos.

El 1,4-octanodiol (57), después de 30 h de biotransformación y extracción continua con CHCl_3 (12 h), se obtuvieron 14 mg que por IR, RMN- ^1H , no corresponden a la γ -octanolactona deseada, observándose que es materia prima en una mezcla compleja.

El 1,5-hexanodiol (58), después de 27 h de biotransformación y extracción continua de CHCl_3 (12 h), se obtuvieron 69 mg que por IR, RMN- ^1H , no corresponden a la δ -hexanolactona, reproduciéndose los resultados anteriores de no formación de la lactona, recuperación con mucha dificultad de parte de la materia prima y por el volumen de disolvente empleado extracción de otros compuestos del medio o de residuos de la *Nocardia*.

El 1-fenil-1,4-butanodiol (59), después de 26 h de biotransformación y extracción continua con CHCl_3 (12 h), se obtuvieron 32 mg de crudo que por IR, RMN- ^1H , no

corresponden a la γ -fenil- γ -butirolactona deseada, observándose un resultado similar a los anteriores.

El 1,5-undecanodiol (60), después de 26 h de biotransformación y extracción continua con CHCl_3 (12 h), se obtuvieron 16 mg que por IR, RMN- ^1H , no corresponden a la δ -undecanolactona deseada.

El *cis*-2-buteno-1,4-diol (61), después de 29 h de biotransformación y extracción continua con CHCl_3 (12 h), permitió aislar un 42 % de la 2-(5H)furanona, la cual fue identificada por ccf, IR, RMN- ^1H y espectroscopia de Masas.⁹¹ Este sustrato fue aislado por Luna et al² con un rendimiento del 50 %, por lo anterior podemos concluir que nuestras condiciones de biotransformación están estandarizadas y los resultados son reproducibles, por lo que el problema es debido al tipo estructural de los dioles seleccionados.

El 2-butino-1,4-diol (62), después de 26.4 h de biotransformación y extracción continua con CHCl_3 (12 h), se produjo 56 % (balance de masa) de una mezcla compleja. Aunque no se esperaba obtener la lactona, debido a la restricción estructural para la ciclización, fue interesante constatar la reactividad inesperada de los alquinos observada con los alcoholes propargílicos.

Con estos resultados se puede inferir que con dioles alifáticos lineales, con posibilidad de giro libre, no hay formación de las lactonas esperadas, al menos en las condiciones estudiadas; solo el caso del *cis*-2-buteno-1,4-diol nos condujo al producto esperado. Estos hechos sumados a los logrados por Luna,² orientan a que además de requerir estar libres los dos hidroxilos se requiere una relativa rigidez en la molécula que mantengan cercanos ambos grupos oxidrilos, para que proceda la biotransformación.

Dentro de los objetivos de ésta tesis se planteaba el estudio, en su etapa inicial, de la posibilidad de inmovilizar las células de *N. corallina* y su posterior evaluación en relación a su capacidad oxidativa. Se seleccionó al alcohol furfurílico como substrato de referencia por los excelentes resultados que éste produjo, además de que éste es el primer reporte de preparación biocatalizada del ácido furoico.⁸⁸

En primera instancia se empezaron haciendo pruebas con siete fases líquidas, para ver la resistencia de las esferas (sin *Nocardia corallina*), tanto mecánica como química. Se probaron con 20 esferas en cada experimento, se realizó la medición de las esferas con un Vernier:

- 1) Medio de cultivo, DMF y *n*-octano, diámetro de las esferas entre 2.0-2.2 mm
- 2) DMF, diámetro de las esferas entre 2.2-2.3 mm

- 3) *n*-octano, diámetro de las esferas entre 2.3-2.5 mm
- 4) hexano, diámetro de las esferas entre 2.7-2.8 mm
- 5) *n*-octano y medio de cultivo, diámetro de las esferas entre 2.7-2.8 mm
- 6) DMF y medio de cultivo, diámetro de las esferas entre 2.7-2.8 mm
- 7) Medio de cultivo, diámetro de las esferas entre 2.8-2.9 mm.

Se agitaron a 28-30 °C y a 200 rpm con diferentes tiempos 22 h, 48 h, y 88 h. A las 22 h se observó lo siguiente para cada caso:

- 1) Se pusieron opacas sin cambio significativo en su diámetro
- 2) Su diámetro aumento de 2.2-2.3 mm a 2.7-2.8 mm
- 3) Su diámetro disminuyo de 2.3-2.5 a 1.8-2.0 mm y se endurecieron
- 4) La finalidad de utilizar hexano por *n*-octano fue por el costo de éste último, pero este se empezó a evaporar en nuestras condiciones, además de que las esferas se hicieron más chicas, diámetro de 2.7-2.8 mm a 2.13 mm
- 5) Se pusieron opacas, su diámetro aumento de 2.7-2.8 mm a 4.03 mm
- 6) No se aprecia cambio significativo
- 7) Se pusieron opacas, su diámetro aumento de 2.8-2.9 mm a 4.51-4.78 mm.

A las 48 h y 88 h de agitación en estas condiciones de evaluación, algunas esferas se empezaron a romper y se incrementaron las características anteriormente

descritas; cuando la esfera se agrandaba ésta se deformaba y algunas de ellas adquieren una apariencia de disco irregular, similar a lentejas.

Con base en este estudio preliminar, se decidió hacer las biotransformaciones en la fase líquida denominada 1), con medio de cultivo, DMF y *n*-octano, pero con velocidad de agitación menor (140-160 rpm).

La biotransformación del alcohol furfurílico al ác. furoico nos dio los siguientes resultados:

Se obtuvo el ácido furoico con rendimientos del 22 al 37 %, por periodos de 24 a 72 h de bioconversión. Se encontró que las células inmovilizadas pueden reutilizarse hasta tres veces, manteniendo su eficiencia y conservando su actividad hasta por siete meses después de inmovilizadas. Estos resultados son preliminares y requerirán optimizarse, sin embargo se demuestra que es posible conservar la actividad enzimática de la *Nocardia corallina* B-276 por tiempos mayores y se facilita el trabajo de extracción, por la sensible disminución de la biomasa y los crudos se obtienen más limpios; con respecto al medio no requiere de esterilización.

CONCLUSIONES

1. Se estudio el efecto de la estructura en el proceso de oxidación con *Nocardia corallina* de alcoholes bencílicos; con la información obtenida se observa un ligero efecto que tienen ciertos sustituyentes tanto en la posición relativa que guardan con respecto el grupo a oxidar, como por la naturaleza de sus propiedades, aunque no se logró encontrar una relación lineal entre los efectos electrónicos de los sustituyentes y los rendimientos de la reacción.
2. Se demostró que la oxidación de alcoholes bencílicos puede ser extrapolada a sus contrapartes heterocíclicas (alcohol furfurílico) y la posibilidad de utilizar otro tipo de hidrocarburos aromáticos como el naftaleno.
3. Se observó que el aldehído correspondiente, aunque no se logra aislar, puede ser intermediario durante el proceso de oxidación.
4. La oxidación de dioles en estas condiciones, presenta como gran limitación la necesidad de una estructura rígida en el diol inicial para permitir la oxidación. Lo anterior es un hallazgo que restringe de manera notable el espectro de posibilidades para preparar sintónes con control de la estereoquímica en las lactonas resultantes.

5. Con base en los resultados obtenidos la técnica de inmovilización desarrollada sí afecta la eficiencia de la oxidación microbológica de *Nocardia corallina* observada a nivel matraz; aunque por el momento no se pueden sacar conclusiones determinantes, antes de efectuar estudios mas profundos al respecto. Aunque se observan ventajas para el manejo de la oxidación con la inmovilización, se deberá continuar buscando otros sistemas para fijar las células completas de *Nocardia corallina*.

6. Dado el tiempo de vida activa de las células inmovilizadas, se puede concluir que el procedimiento es adecuado pero optimizable y puede hacer viable el uso industrial de esta metodología de oxidación.

7. Se puede ya, estructurar algunas propuestas acerca del alcance y limitaciones de esta biotransformación que nos permita considerarla como un método general de oxidación, las cuales son:

- Que los grupos metoxilos (activadores fuertes), pueden tener un efecto en el microorganismo que dificulta su biotransformación, (esto dado los resultados con los alcoholes *p*-,*o*-metoxibencílicos, veratrílico y 6-bromoveratrílico).

- Que la posición *meta* independientemente del sustituyente tendrían rendimientos más altos, debido a un ligero efecto electrónico.
- Que la metodología con *Nocardia corallina* puede extrapolarse a otros compuestos heterocíclicos relacionados.
- Que con derivados de alcoholes alílicos en estas condiciones, la *Nocardia corallina* prefiere oxidar al átomo de carbono del alcohol o del aldehído más que inducir la adición de oxígeno a dobles ligaduras para dar el epóxido correspondiente, por ejemplo en los casos de los alcoholes y aldehídos perillílico, cinámico.

PERSPECTIVAS

Con los resultados alcanzados y la experiencia adquirida en esta tesis, se pueden visualizar algunas acciones por continuar con la investigación en ésta área, así como otros tópicos que podrían desarrollarse en un futuro cercano. Considero relevante desglosar algunas ideas en este sentido:

1. Se debe continuar el estudio de la oxidación de alcoholes bencílicos secundarios, con el objetivo de evaluar la enantioselectividad del proceso de oxidación con *Nocardia corallina*. Así como evaluar en alcoholes alílicos racémicos la biotransformación para encontrar las condiciones para llevar a cabo su resolución, con base en el resultado observado con el *cis*-verbenol.
2. Es conveniente continuar con el estudio de la inmovilización de la *Nocardia corallina* incluyéndose la evaluación de diferentes tipos de material de soporte.
3. Siguiendo la misma línea de investigación, seleccionar algunos sustratos de esta tesis y efectuar biotransformaciones con otros microorganismos, especialmente actinomicetos.

4. Hacer una búsqueda de posibles compuestos de interés comercial, en donde se pueda aplicar ésta metodología con *Nocardia corallina*, para eventuales desarrollos tecnológicos, ésta idea estaría muy relacionada con la perspectiva 2.

5. En la línea de extender las bondades de está metodología, por correlación con los reactivos químicos tradicionales, los cuales llevan a cabo la oxidación de alcoholes bencílicos y transformación de dioles a lactonas, se podría explorar la aplicación de ésta metodología microbiológica para la preparación de sulfóxidos quirales por oxidación con *Nocardia corallina* de sulfuros proquirales, éste puede ser un tema de interés; dada la amplia gama de aplicaciones de estos substratos en síntesis. Por supuesto la obtención de las sulfonas puede ofrecer un método alternativo de síntesis.

6. Profundizar en el estudio de la oxidación de dioles a lactonas quirales, especialmente incrementando la rigidez de la molécula en los substratos.

Con estos ejemplos de perspectivas para ampliar esta temática, se puede observar la riqueza de posibilidades que puede ofrecer el campo emergente de las biotransformaciones.

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de este proyecto doctoral por medio del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación (0491P-B9506) y el Programa de Fomento al Posgrado(PFP/200/93).

A la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Xochimilco por el apoyo brindado para la realización de la parte experimental de ésta tesis.

Se agradece al M.en C. Atilano Gutiérrez Carrillo por la realización de los espectros de RMN-¹H en esta Universidad.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- H. Luna, K. Prasad, O. Repic *Biocatalysis* **1993**, *8*, 155.
- 2.- H. Luna, K. Prasad, O. Repic *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 303.
- 3.- T. Morimoto, M. Hirano, K. Iwasaki, T. Ishikawa *Chemistry Letters* **1994**, 53.
- 4.- L.B. Wingard Jr., R.P. Roach, O. Miyawaki, K.A. Egler, G.E. Klinzing *Enzyme Microb. Technol.* **1985**, *7*, 503.
- 5.- K. Kawakami *Enzyme-engineering-10* **1990**, 613, 707.
- 6.- K. Kawakami, T. Abe, T. Yoshida *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 371.
- 7.- K. Kawakami, S. Tsuruda, K. Miyagi *Biotechnology Progress* **1990**, *6*, 357.
- 8.- D.R. Storm, D.E. Koshland Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *66*, 445.
- 9.- H.G.W. Leuenberger "Microbial Transformations Some Applications in Natural Product Chemistry S." Academic Press, London. (1978). 87.
- 10.- K. Kieslich "Microbial transformations-type reactions S." Academic Press, London. (1978). 57.
- 11.- W. Crueger, A. Crueger. "Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial" Acribia, S.A. Zaragoza, España. (1989). 331.
- 12.- J. B. Jones, C.J. Sih, D. Perlman "Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry" John Wiley. New York (1976).
- 13.- J. Tramper, H.C. Van der Plas, P. Linko "Biocatalysis in Organic Syntheses" Studies in Organic Chemistry, Vol 22. Elsevier. Amsterdam (1985).

- 14.- H. G. Davies, R.H. Green, D.R. Kelly, S.M. Roberts "Biotransformation in Preparative Organic Chemistry" Academic Press. London (1989).
- 15.- D.A. Abramowicz "Biocatalysis" Van Nostrand Reinhold. New York (1990).
- 16.- D.H. Crout, M. Christen. "Modern Synthetic Methods". Vol. 5. Springer. Berlin, (1989) 1.
- 17.- F.S. Sariaslani, J.P. Rosazza *Enzyme Microb. Technol.*, **1984**, 6, 241.
- 18.- H. Yamada, S. Shimizu. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 622.
- 19.- P. Gramatica. *Chim. Oggi.* **1988**, 6, 17; **1989**, 7, 43; **1989**, 11, 9.
- 20.- E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, A. Manzocchi *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1071.
- 21.- A. Mizrahi *Process Biochem.* **1986**, 108.
- 22.- W.R. Arathoon, J.R. Birch *Science* **1986**, 232, 1390.
- 23.- J.P. Kutney *Nat. Prod. Rep.* **1990**, 7, 85.
- 24.- J.P. Kutney *Synlett.* **1991**, 11.
- 25.- T. Suga, T. Hirata *PHYtochemistry* **1990**, 29, 2393.
- 26.- Applications of Plant Cells and Tissue Cultures; Ciba Foundations Symposium, 1988; J. Wiley & Sons: Chichester, (1988); Vol. 137, 228.
- 27.- C. Tamm *Angew. Chem.* **1962**, 74, 225.
- 28.- K. Kieslich "Microbial Transformations of Non Steroid Cyclic Compounds" Thieme. Stuttgart (1976).

- 29.- A.L. Demain *Science* **1981**, 214, 987.
- 30.- a) J. P. Rosazza "Microbial Transformations of Bioactive Compounds" Vol. I y
2. CRC Press Inc. Boca Ratón (1982).
b) Vol. I. (1982). 2.
- 31.- K. Kieslich *Arzneim.-Forsch.* **1986**, 36, 774, 888, 1006.
- 32.- Catálogos Sigma, Fluka y Aldrich 1996-1997, a) p 324, b) p 322, c) p 1079, d) p
1077, e) p 1078, f) p 214, g) p 968, h) p 1057, i) p 222, j) p 812, k) p 112, l) p
1434, m) p 813, n) p 1056, ñ) p 1076.
- 33.- International Union of Biochemistry: Enzyme Nomenclature. Academic Press,
New York (1979).
- 34.- a) Opportunity Series No. 35. "Opportunities for Bioconversion and Biocatalysis
in Speciality and Fine Chemicals". Industrial Liaison Bureau Inc. The
Netherlands. (1992). 197.
b) (1992). 130.
- 35.- Y. Asano, K. Kishino, A. Yamada, S. Hanamoto, K. Kondo *Recl. Trav. Chim.*
Pays-Bas **1991**, 110, 206.
- 36.- H. G. Kula *Chimia* **1991**, 45, 81.
- 37.- D.H. Peterson, H.C. Murray *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 1871.
- 38.- H.C. Murray, D.H. Peterson. U.S. Patent 2, 602, 769, **1952**.

- 39.- C.T. Hou "Microbial Oxidation of Hydrocarbons". Symposium on advances in Petrochemical Technology. American Chem. Soc. Denver meeting April 5-10 (1987). 210.
- 40.- H.L. Holland "Organic Synthesis with Oxidative Enzymes" VCH Publishers, Inc. New York (1992).
- 41.- K. Furuhashi. Jpn. Kokai Tokkyo Koho Japan Patent 01 75,479 (89 75,479). C.A. 111, 55864a. **1989**.
- 42.- Jpn. Kokai Tokkyo Koho Japan Patent 58,141,790 (83 141,790). C.A. 100, 33283f. **1984**.
- 43.- Jpn. Kokai Tokkyo Koho Japan Patent 58,141,791 (83 141,791). C.A. 100, 50060y. **1984**.
- 44.- Jpn. Kokai Tokkyo Koho Japan Patent 82 02,692. C.A. 96, 160835m. **1982**.
- 45.- Y. Hirakawa, K. Takagi. Jpn. Kokai Tokkyo Koho Japan Patent 60,259,195 (85 259,195). C.A. 104, 184885n. **1986**.
- 46.- Y. Hirakawa, K. Takagi. Jpn. Kokai Tokkyo Koho Japan Patent 60,259,194 (85 259,194). C.A. 104, 184886p. **1986**.
- 47.- Y. Hirakawa, K. Takagi. Jpn. Kokai Tokkyo Koho Japan Patent 60,259,193 (85 259,193). C.A. 104, 184887q. **1986**.
- 48.- K. Furuhashi, K. Takagi. Jpn. Kokai Tokkyo Koho Japan Patent 60,214,893 (85 214,893). C.A. 104, 128246t. **1986**.

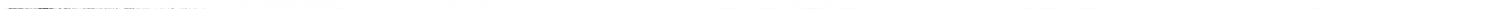
- 49.- O. Takahashi, K. Furuhashi. Jpn. Kokai Tokkyo Koho Japan Patent 02 15,039 (90 15,039). C.A. 113, 5708y. **1990**.
- 50.- K. Furuhashi. Jpn. Kokai Tokkyo Koho Japan Patent 01 27,482 (89 27,482). C.A. 111, 132614y. **1989**.
- 51.- O. Takahashi, J. Umezawa, K. Furuhashi, M. Takagi *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, 1583.
- 52.- K. Furuhashi, M. Shintani, M. Takagi *Appl. Microb. Biotech.* **1986**, 23, 218.
- 53.- K. Furuhashi *Chemical Economy & Engineering Review* **1986**, 18, 21.
- 54.- International Union of Biochemistry: Enzymes Nomenclature, Academic Press, New York, (1984).
- 55.- A.L. Margolin *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, 15, 266.
- 56.- J. March "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure" John Wiley & Sons. USA . (1985), 735-736, 1052-1090, y las referencias ahí citadas.
- 57.- Larock, R.C. "Comprehensive Organic Transformations" VCH Publishers, Inc. New York. (1989), 93-97, 456-461, 604-614, 824, 834-838, y las referencias ahí citadas.
- 58.- D. W. Mayo, R. M. Pike, S. S. Butcher "Microscale Organic Laboratory" John Wiley & Sons. USA . (1986).
- 59.- K. B. Sharpless *Chemtech.* **1985**, 15, 692.
- 60.- S. S. Stinson *Chem. Eng. News.* **1981**, 59, 22.

- 61.- Y. Gao *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5765.
- 62.- Y. Gao *Chem. Week.* **1990**, *146*, 29.
- 63.- N. H. Lee, A. R. Muci, E.N. Jacobsen *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5055.
- 64.- R. Bergmann, B. Eiermann, R. Gericke *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2759.
- 65.- M. Alexander "Introducción a la Microbiología" De. AGT, S. A. México.
(1980). 47.
- 66.- W.K., Joklik, H.P., Willett, D.B., Amos, C.M. Wilfert "Zinsser Microbiología". Ed.
Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. (1994). 722.
- 67.- A. J. Rosevear *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1984**, *34B*, 127.
- 68.- J. Tampion and M. D. Tampion "Immobilized Cells: Principles and Applications".
Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain. **1987**. 1-18, 77-115.
- 69.- G. A. Dervakos, C. Webb *Biotech. Adv.* **1991**, *9*, 559.
- 70.- M. J. Núñez, J. M. Lema *Enzyme Microb. Technol.* **1987**, *9*, 642.
- 71.- J. M. Radovich *Enzyme Microb. Technol.* **1985**, *7*, 2.
- 72.- Ch. D., Scolt, Ch. A. Woodward, J. E. Thompson *Enzyme Microb. Technol.*
1989, 258.
- 73.- J. P., Arnuaud, C. Lacroix, F. Castaigne *Enzyme Microb. Technol.* **1992**,
14, 715.
- 74.- A. Wiseman "Principios de Biotecnología". De. Acribia. Zaragoza, España.
(1986). 200.
- 75.- A. Johansen, and J. M. Flink *Enzyme Microb. Technol.* **1986**, *8*, 737.

- 76.- K. B. Guiseley *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, *11*, 706.
- 77.- P. S. J., Cheetham, K. W. Blunt, and Ch. Bucke *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, *21*, 2155.
- 78.- H. Tanaka, and S. Irie *Biotechnol. Techniques* **1988**, *17*, 193.
- 79.- T., Zekorn, A., Horcher, U., Siebers, R., Schnettler, G., Klock, B., Hering, U., Zimmermann, R.G., Bretzel, K., Federlin *Acta Diabetol* **1992**, *29*, 99.
- 80.- T.A. Geissman. "Organic Reactions" Vol. 2, (1944). 104, 112.
- 81.- Arthur Vogel. Vogel's "Textbook of Practical Organic Chemistry", Ed. Logman, London and New York , (1978). 793.
- 82.- R. L. Shriner, E.C. Kleiderer "Organic Syntheses Coll." Vol 2, (1943). 538.
- 83.- N. Manjarrez, H.I. Pérez, C. Hernández, I. Bada *Rev. Sociedad Química de México*, **1989**, *33*, No. 2, 48.
- 84.- G. W. Brown. "Organic Reactions" Vol. 6, (1951). 469.
- 85.- R. L. Icke, C. E. Redemann, B.B. Wisegorver "Organic Syntheses Coll." Vol 3, (1955). 644.
- 86.- B. L., Feringa, de B. Lange *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, No. 11, 1303.
- 87.- H.I. Pérez, H. Luna, L.A. Maldonado, H. Sandoval, N. Manjarrez, A. Solis, R. Sánchez *Biotechnology Letters* **1998**, *20*, 77.
- 88.- H. Luna, H.I. Pérez, N. Manjarrez, A. Solis, R. Sánchez *Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **1997**, *28*, No. 2, 17.

- 89.- The Aldrich Library of FT-IR Spectra. (1985). 1^a ed., Aldrich Chemical Co.
Milwaukee. 1(2) 585-A.
- 90.- The Aldrich Library of NMR Spectra. (1983). 2^a ed., Aldrich Chemical Co.,
Milwaukee. 2(1)195-A.
- 91.- Software by Stein, S. E., Levitsky, A. A. y Fateev, O. V. NIST, Mass spectral,
MS Search Program, versión 1.1a.

ARTÍCULOS PUBLICADOS



Oxidation of substituted benzyl alcohols to carboxylic acids by *Nocardia corallina* B-276

Herminia I. Pérez*, Héctor Luna, Luis A. Maldonado†, Horacio Sandoval, Norberto Manjarrez, Aida Solis and Remedios Sánchez.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Departamento Sistemas Biológicos; A. P. 23/181; México, D.F. MEXICO.

†Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F., MEXICO.

Whole cells of *Nocardia corallina* B-276, oxidized 21 substituted benzyl alcohols, at 1 mM scale, to carboxylic acids at 28–30 °C, giving yields of products from 5 to 77% .

Introduction

Oxidation of alcohols to either aldehydes or carboxylic acids is a process generally performed at laboratory scale with the Jones reagent (Lindberg, 1984) but in industry it is usually carried out with O₂ in presence of organometallic catalysts (Sharpless, 1985; Gao, 1990; Lee *et al.*, 1991). Biocatalytic methods are emerging as viable alternatives to traditional organic chemistry methods and to help overcome adverse environmental impacts.

Among the more used microorganisms in this field are: *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Xanthobacter*, *Cunninghamella* and *Chaetomium* (Holland, 1992). Thus, it is well documented the ability of *Nocardia corallina* to oxidize alkenes to optically active 1,2-epoxyalkanes (Takahashi and Furuhashi, 1990; Furuhashi, 1989).

Luna *et al.*, 1993 reported the application of *Pseudomonas oleovorans* and *Nocardia corallina* to the biotransformation of allylic alcohols to the corresponding aldehydes or carboxylic acids, these results were interesting as it was the first report of these two microorganisms oxidizing alcohols. Due to our interest in microbial oxidations, we describe here a study of the microbial oxidation of several substituted benzyl alcohols to carboxylic acids.

Materials and methods

Nocardia corallina B-276 ATCC 31338 was grown at 28–30 °C on agar plates (Luna *et al.*, 1994). Incubation of liquid cultures was done in an orbital shaker. All substrates were prepared by conventional methods mentioned in the literature or purchased from Aldrich, Sigma or Janssen. All carboxylic acids were identified by infrared spectra, as liquid films or KBr discs, and by TLC on Silica gel 60 GF₂₅₄ for comparative analysis with authentic samples.

General procedure for biotransformation

Preculture I

A 125 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of sterile culture medium was inoculated from an agar plate (three days old) and incubated at 28–30 °C on an orbital shaker (200 rpm) for 20–24 h.

Preculture II

The content of Preculture I flask was aseptically poured into a 250 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of fresh sterile culture medium. The flask was incubated at 28–30 °C on an orbital shaker (200 rpm) for 24 h.

Biotransformation

Under aseptic conditions the substrate (1 mmol) was added to the flask containing Preculture II using 1 ml of N,N-Dimethylformamide, followed by the addition of *n*-octane (15 ml). The mixture (166 ml final volume) was incubated at 28–30 °C on an orbital shaker (200 rpm). The biotransformation was monitored by TLC, and stopped (see Figure 1, 2, and 3 for reaction time of each substrate) by acidifying to pH 1 with 0.05 M HCl, then saturated with NaCl and filtered through Celite; the carboxylic acids were extracted with ethyl acetate or dichloromethane (4 × 25 ml). The acids were purified by recrystallization.

Results and discussion

Benzyl alcohol, gave a complex mixture of products as shown by TLC analysis, where benzoic acid, the expected product, was never found. The possible reason for the unexpected result was that this substrate may be taken through the metabolic cycles of the bacteria and transformed to different products. We also subjected benzoic acid to the same reaction conditions, resulting in the recovering of the unchanged acid; showing in this manner

that the expected oxidation product was not further metabolized.

To discuss the subsequent results we grouped the substrates by substitution patterns. In the *ortho* series the hydroxyl substituted benzyl alcohol 1 gave the best results of all with a 74% yield (see Figure 1). We explain this fact under the hypothesis of the closeness of the *o*-hydroxyl group to the reaction site; this idea is supported by the observation in previous work (Luna *et al.*, 1994) where 1,4-diols are transformed by *N. corallina* to the corresponding lactones, when the two hydroxyl groups are close enough to interact; when such interaction is prevented, the oxidation did not take place. The halides gave the acids in low yields (6 19% and 12, 12%), and the methoxyl derivative 9 gave only 5% yield. The nitro compound 3 failed to give oxidation products with the recovering of starting material. The *ortho*-amino compound 7 gave a complex mixture of products, from which a main product could not be isolated.

In the *para* series (see Figure 2), this methodology failed for the hydroxyl-substituted compound 19, reinforcing our early suggestion, but the other derivatives, *para*-chloro 15, *para*-nitro 17, *para*-methyl 21, were biotransformed in moderate yields (50%, 50% and 47%, respectively).

In the *meta* series (see Figure 3), the *meta*-nitro compound 25, produced the acid 26 in 64% yield. Comparing this last result with the *ortho*-isomer 3 (where no bioconversion took place) and the *para*-isomer 17, with a 50% yield; make us to think in the possibility of some electronic effect being involved during this biotransformation. The *meta*-methoxy compound 27 gave 77% yield, contrasting with a



		% Yield ^a (mol/mol)	Reaction Time (h)
1: R= OH	2: R= OH	74	27
3: R= NO ₂	4: R= NO ₂	^a	110
5: R= Cl	6: R= Cl	19	26
7: R= NH ₂	8: R= NH ₂	^b	26
9: R= OCH ₃	10: R= OCH ₃	5	27
11: R= Br	12: R= Br	12	30

a: 25 % of recovered starting material.

b: Complex mixture

^a 1 mM substrate used in each case

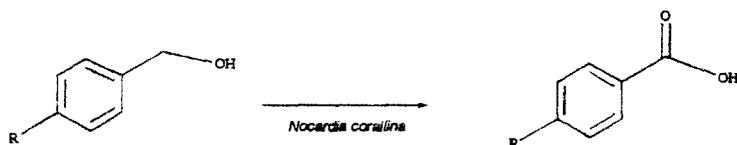
reactions conditions were not optimised

Figure 1 Biotransformation of *ortho*-substituted benzyl alcohols

5% and 32% yield obtained for the *ortho* and *para* cases respectively, strengthening our previous statement.

Table 1 shows a summary of results obtained with five different substituents attached to the three isomeric positions; with exception of the *meta*-chloro compound 29, the other four cases showed for the *meta* series the best yields in this study.

In general we can conclude that a slightly electronic effect is influencing the oxidation process with *Nocardia corallina*, in terms of isolated yields. We can also explain these results, considering a steric effect in the *ortho* series, with exception of the hydroxyl group; but as we mention before, we attributed this phenomena to the fact that in 1, there is



		% Yield ^a (mol/mol)	Reaction Time (h)
13: R= OCH ₃	14: R= OCH ₃	32	6
15: R= Cl	16: R= Cl	50	24
17: R= NO ₂	18: R= NO ₂	50	24
19: R= OH	20: R= OH	**	24
21: R= CH ₃	22: R= CH ₃	47	27
23: R= Br	24: R= Br	11	34

^a 1mM substrate used in each case

** Complex mixture.

reactions conditions were not optimised.

Figure 2 Biotransformation of *para*-substituted benzyl alcohols

Table 1 Comparison of isomeric (*ortho*, *meta*, *para*) mono-substituted benzyl alcohols.

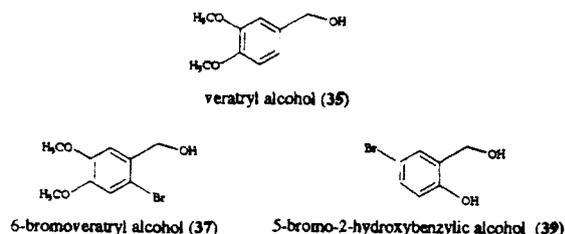
Substituent	<i>ortho</i>		<i>meta</i>		<i>para</i>	
	Rxn time (h)	Yield (%)	Rxn time (h)	Yield (%)	Rxn time (h)	Yield (%)
NO ₂	110	1	123	64	24	50
OMe	27	5	25	77	6	32
Cl	26	19	25	46	24	50
Br	30	12	25	52	34	11
Me	n.d.	n.d.	25	72	27	47

1: 25 % starting material recovered
n.d.: not determined



		% Yield * (mol:mol)	Reaction Time (h)
25: R= NO ₂	26: R= NO ₂	64	123
27: R= OCH ₃	28: R= OCH ₃	77	25
29: R= Cl	30: R= Cl	46	25
31: R= Br	32: R= Br	52	25
33: R= CH ₃	34: R= CH ₃	72	25

* 1 mM substrate used in each case reactions conditions were not optimised.

Figure 3 Biotransformation of *meta*-substituted benzyl alcohols**Figure 4** Di- and trisubstituted alcohols.

hydrogen bonding between both hydroxyl groups, favoring the action of the enzyme to carry out the bioconversion. This possibility is forbidden for the methoxyl group.

We extended our study, exploring the oxidation of more substituted benzyl alcohols. Veratrylic alcohol 35 (see Figure 4), a trisubstituted compound, produced the corresponding acid, veratrylic acid, in 28% yield (after only 6

h), similar to the yield produced with the *p*-methoxybenzyl alcohol 13. The inclusion of an extra bromine atom to the last compound, in position-6, did not lead to the expected 6-bromoveratrylic acid, possibly due to the increase in the steric hindrance at *ortho* position. The 5-bromo-2-hydroxybenzyl alcohol 39, showed a very similar behaviour, producing only 22% yield (after 144 h) of the corresponding acid, in contrast with 74% produced for 1.

In conclusion, we consider this methodology of general application for the oxidation of benzyl alcohols to the corresponding carboxylic acids with substituents in the *meta* and *para* positions.

Acknowledgements

We thank the financial support of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia, MEXICO, Grant Num. 400200-5-0491PB.

References

- Furuhashi, K. (1989) Japanese Patent 27, 482/1989 (*Chem. Abstr.*, (1989) 111:132614y).
- Gao, Y. (1990) *Chem. Week.* 146:29.
- Holland, H.L. (1992) *Organic Synthesis with oxidative enzymes.*, New York: VCH Publishers, Inc.
- Lee, N.H., Muci, A.R. and Jacobsen, E.N. (1991) *Tetrahedron Lett.* 32:5055.
- Lindberg, T. (1984) *Strategies and Tactics in Organic Synthesis.* Orlando, Florida: Academic Press Inc..
- Luna, H., Prasad, K. and Repic, O. (1993) *Biocatalysis*, 8:155.
- Luna, H., Prasad, K. and Repic, O. (1994) *Tetrahedron: Asymmetry*, 5:303.
- Sharpless, K.B. (1985) *Chemtech* 15:692.
- Takahashi, O. and Furuhashi, K. (1990) Japanese Patent, 15, 039/1990 (*Chem. Abstr.*, (1990) 113:5708y).

Received: 6 October 1997

Revisions requested: 17 October/6 November 1997

Revisions received: 3 November/28 November 1997

Accepted: 1 December 1997

PREPARACIÓN DE ÁCIDO FUROICO POR OXIDACIÓN MICROBIOLÓGICA

FUROIC ACID PREPARATION BY MICROBIAL OXIDATION

Héctor Luna, Norberto Manjarrez A., Herminia I. Pérez M., Aida Solís O. y Remedios Sánchez D.
Departamento Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

INTRODUCCIÓN

En nuestra línea de investigación sobre biotransformaciones se está trabajando en el desarrollo de métodos biocatalíticos de oxidación de alcoholes bencílicos (1); una variante de este tipo de compuestos son los derivados heterocíclicos, de los cuales el alcohol furfurílico es un ejemplo. Se decidió experimentar con este alcohol debido a que algunos reportes indican que la *Neurospora* (2) efectúa esta biotransformación a través de un mecanismo complejo de óxido-reducción en el cual intervienen los tres estadios de oxidación de este compuesto (alcohol-aldehído-ácido carboxílico); consecuentemente, es imposible su aplicación preparativa. Otros microorganismos llevan a cabo la destrucción completa del anillo (3-5).

Dentro de la química orgánica industrial, la oxidación constituye una de las principales herramientas en la síntesis de compuestos orgánicos y por lo tanto es uno de los métodos con mayor potencial de daño ecológico; por ello, son siempre bienvenidos los desarrollos de metodologías alternas.

La oxidación de alcoholes a aldehídos o en su caso a los ácidos carboxílicos correspondientes es un proceso que, por lo general, se efectúa en presencia de oxígeno y catalizadores organometálicos de titanio (6-9) o manganeso (10,11). Estos métodos

RESUMEN

Se describe la preparación del ácido furoico mediante una oxidación microbiológica con *Nocardia corallina* B-276 (ATCC 31338), a partir tanto del alcohol furfurílico como del furfural, con rendimientos del 51% y 71% respectivamente.

No se observó ruptura ni cambios en el anillo furánico en las condiciones experimentales.

Nuestro reporte es el primero de este tipo de biotransformación de un compuesto heterocíclico por *Nocardia corallina*.

ABSTRACT

Preparation of furoic acid using a microbial oxidation with *Nocardia corallina* B-276 (ATCC 31338) is described, starting with either furfurylic alcohol or furfural providing 51% and 71% yield respectively.

Ring cleavage or ring modification were not observed under our reaction conditions.

This is the first report of this kind of heterocyclic compounds biotransformation by *Nocardia corallina*.

muchas veces generan residuos difíciles de tratar, y por lo tanto son inaceptables bajo las nuevas regulaciones ambientales.

Los métodos biocatalíticos permiten la eliminación y/o el tratamiento del agua residual de la reacción, lo que al final del proceso presenta un menor impacto en el ambiente, sin mermar la eficiencia química de la transformación.

El ácido furoico (ver Fig. 1) y otros análogos se utilizan para conservar alimentos debido a su efecto bacteriostático y fungicida (12), pero su importancia radica en formar parte de intermediarios en la síntesis de compuestos con actividad antimicrobiana (13-21).

Se ha informado de la preparación, con métodos químicos, del ácido furoico a

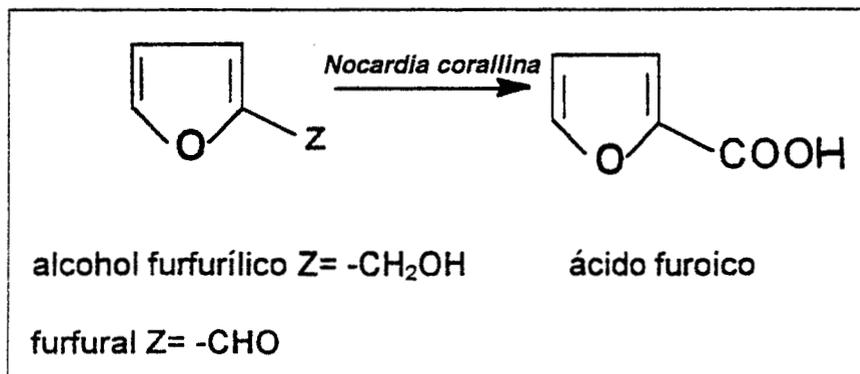


Figura 1. Preparación biocatalítica de ácido furoico.

Correspondencia: Héctor Luna
Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud
C.P. 04960 México, D.F.
Tel. 724-52-55
Fax: 724-52-37

partir del furfural por reacción con KMnO_4 (22) o con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (23); vía una reacción de Cannizzaro con NaOH (24,25); por oxidación catalítica con sales de Ni^{2+} , Co^{2+} en NaOCl (26); por oxidación con aire y Pd /carbón animal en solución acuosa alcalina (27); por reacción con aire sobre Ag_2O en medio alcalino (28) o con $\text{CuO-Ag}_2\text{O-C}$ en un medio alcalino (29); por oxidación con Ag (30), o aire sobre $\text{CuO-Ag}_2\text{O}$ (31); con peróxido de hidrógeno en medio alcalino (32); y con disolventes orgánicos como piridina (33). También se ha empleado NaOCl (34,35) para esta transformación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Paragon 1000; los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN- ^1H), en un espectrómetro Bruker modelo DMX500; y los espectros de masas, en un espectrómetro Jeol modelo GCmate. Los puntos de fusión no están corregidos. Las identificaciones por cromatografía en capa fina (ccf) se efectuaron utilizando silicagel GF₂₅₄, Merck. Los reactivos empleados fueron de las marcas: Aldrich, Sigma, Merck y Bioxon.

La bacteria *Nocardia corallina* B-276 (ATCC 31338) se adquirió en la American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). La activación de la bacteria se efectuó a 30°C en placas de agar, con la siguiente composición: extracto de carne, 3.0 g/L; peptona, 5.0 g/L; agar, 15 g/L; a un pH = 6.8.

El medio de cultivo líquido se preparó de la siguiente manera:

Solución A: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/L;
 K_2HPO_4 , 1.74 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 g/L;
extracto de levadura, 1.0 g/L.

Solución B: MgSO_4 , 1.5 g/L.

Solución C: glucosa, 2.0 g/L.

Cada solución se esterilizó por separado, y posteriormente las soluciones se mezclaron bajo condiciones asepticas ajustando el pH final a 8.0 (± 0.5), con KOH al 50% o H_2SO_4 al 50%.

Procedimiento general para efectuar las biotransformaciones

Precultivo I: Un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml del medio de cultivo estéril fue inoculado con las células contenidas en una placa de agar (con crecimiento o desarrollo por más de 72 h), e incubado a 28-30°C con agitación rotatoria (200 rpm) por 24 h.

Precultivo II: El contenido del matraz de la etapa del precultivo I fue asepticamente trasvasado a un matraz Erlenmeyer de 250 ml, el cual contenía 100 ml del mismo medio de cultivo estéril; el matraz se incubó a 28-30°C con agitación rotatoria (200 rpm) por 24 h.

Biotransformación del alcohol furfúrico: Se adicionaron, en condiciones asepticas, 150 mg de alcohol furfúrico al precultivo II, utilizando N,N-dimetilformamida como codisolvente y adicionando n-octano como segunda fase. La mezcla se agitó a 28-30°C durante 25 h. El aislamiento del producto se realizó llevando la mezcla de reacción a pH ácido con HCl al 20%, saturando con NaCl y filtrando sobre celita; el líquido se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida; finalmente se purificó por recristalización de agua, $p_f=125-7^\circ\text{C}$ (informado, 130-140°C)(36). La identificación del ácido furoico se efectuó por ccf comparando con muestra auténtica, y los espectros de FTIR, RMN- ^1H y masas fueron idénticos a los publicados (37-39).

Biotransformación del furfural: Se adicionaron, en condiciones asepticas, 100 mg de furfural al precultivo II, utilizando N,N-dimetilformamida como codisolvente y adicionando n-octano como segunda fase. La mezcla se agitó a 28-30°C durante 10 h. El aislamiento del producto se realizó llevando la mezcla de reacción a pH ácido con HCl al 20%, saturando con NaCl y filtrando sobre celita; el líquido se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida, se purificó por extracción ácido/neutral, recristalizándose de agua, $p_f=125-7^\circ\text{C}$. La identificación del ácido furoico se efectuó por ccf comparando con muestra auténtica, y los espectros de FTIR, RMN- ^1H y

masas, fueron idénticos a los publicados (37-39).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El alcohol furfúrico (150 mg) 25 h, de biotransformación produjeron 87.7 mg (51.3%) de ácido furoico, después de recristalización de agua.

El furfural (100 mg) y 10 h de biotransformación y purificación por extracción ácido/neutral produjeron 83.2 mg (71.36%) del ácido furoico; después de recristalización de agua.

Se probó la estabilidad del ácido furoico (50 mg) en las condiciones de biotransformación durante 25 h recuperándose 75.8% del ácido. Con este experimento se demostró cierta estabilidad de este sustrato en el medio de reacción y la poca afinidad del microorganismo por él, a diferencia de los reportes mencionados anteriormente para el caso de *Neurospora* (2) y otros microorganismos (3-5).

En la literatura se indica que el furfural puede autooxidarse en ciertas condiciones de reacción (40), lo que nos condujo a probar la estabilidad del aldehído en nuestras condiciones de trabajo, sin la presencia del microorganismo (prueba blanco). La recuperación de solamente el 36.2% del material inicial nos conduce a pensar que podría estarse llevando a cabo un proceso similar de autooxidación.

La biotransformación de furfural a ácido furoico con *Nocardia corallina* nos permite inferir que la ruta seguida por el alcohol es primero la biotransformación al aldehído furfural y la posterior oxidación de éste al ácido furoico correspondiente; es evidente que el mejor rendimiento para preparar el ácido furoico es a partir del aldehído. El anillo furánico es fácilmente oxidable por el aire en presencia de luz; esta sensibilidad se hizo manifiesta en el caso del blanco (aldehído más medio), dado el bajo porcentaje del aldehído recuperado, tan sólo 36.2%, sin que se observe la formación del ácido furoico. Las condiciones de biotransformación aquí reportadas favorecen una oxidación limpia del alcohol furfúrico y del furfural.

CONCLUSIONES

Una de las ventajas de la biotransformación

con este microorganismo es la protección del ambiente. Además, no se observa el proceso reversible de la reducción del producto obtenido ni la destrucción del anillo heterocíclico con la *Nocardia corallina*, como ha ocurrido con otros microorganismos.

Se aprecia la viabilidad de esta metodología, ya que se puede partir indistintamente del alcohol o del aldehído correspondiente, conduciendo a resultados reproducibles.

Cabe hacer notar que éste es el primer reporte de la preparación del ácido furoico por métodos microbiológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Manjarrez A., N., Pérez M., H.I., Solís O., A. y Luna H. 1995. "Oxidación Microbiológica de alcoholes". Memorias XXVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. *Rev. Mex. Cienc. Farmac.*, 26(4): 97.
- Eilers, F. I. y Sussaman, A.S. 1970. "Conversion of furfural to furoic acid and furfuryl alcohol by *Neurospora ascospores*". *Planta*, 94 (3): 253-264.
- Kitcher, J.P. y Trudgill, P.W. 1970. "Oxidation of furan-2-carboxylate to 2-oxoglutarate by *Pseudomonas putida* F2: enzymology and electron transport". *Biochem. J.*, 118 (3): 55-56.
- Jones, A.H. y Trudgill, P.W. 1967. "The metabolism of 2-furoic acid by a *Pseudomonas fluorescens*". *Biochem. J.*, 105 (2): 31.
- Trudgill, P.W. 1968. "The metabolism of 2-furoic acid by a *Pseudomonas fluorescens* F2". *Biochem. J.*, 109 (2): 7.
- Sharpless, K. B. 1985. "The discovery of titanium catalyzed asymmetric epoxidation". *Chemtech.*, 15: 692.
- O'Sullivan, D. 1981. "Water photolysis: New catalysts boost efficiency". *Chem. Eng. News.*, 59: 64-69.
- Gao, I., Hanson, R. M., Kunder, J. M., Ko, S., Masumune, H. y Sharpless, B. K. 1987. "Catalytic asymmetric epoxidation and kinetic resolution: modified procedures including in situ derivatization". *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 5765-80.
- Gao, I. 1990. "Chemical to aid oil production". *Chem. Week.*, 146: 29.
- Lee, N. H., Muci, A. R. y Jacobsen, E.N. 1991. "Enantiomerically pure epoxochromans via asymmetric catalysis". *Tetrahedron Lett.*, 32: 5055-58.
- Bergmann, R., Eiermann, V. y Gericke, R. 1990. "4-Heterocycloxyloxy-2H-1-benzopyran potassium channel activators". *J. Med. Chem.*, 33: 2759-67.
- Goswin, V. H., Friedrich, R. y Heinz, J.M. 1964. "Preservation of food". *Pat. Ger.* 1,172,938.
- King, E.J., Manahan, R.D. y Russell, K. L. 1957. "Laboratory methods for screening possible inhibitors of dental caries". *J. Dental Research*, 36: 307-13.
- Solov'ev, V.N., Konyaev, G. A., Novikov, S.S., Khmel' nitskii, L.I. y Novikova, T.S. 1965. "Antimicrobial activity of nitrofurans with simple substituents". *Farmakol. i Toksikol.*, 28 (3): 316-320.
- Felix, H., Joly, J., Fort, V. y Fromatin, M. 1962. "Entamide furoate in 60 cases of amebiasis". *Bull. Soc. Pathol. Exotique*, 55: 370-8.
- Avakyan, V.M. 1957. "Pharmacological properties and chemical structure of some furan-2-carboxylate amino esters". *Farmakol. i Toksikol.*, 19: 19-21.
- Mndzhoyan, A.L. y Aleksanyan, R.A. 1962. "Effect of some furan-2-carboxylic acid esters on experimental bronchospasm". *Inst. Tonkoi Organ. Khim.*, (1): 147-87.
- Bönicke, R. 1958. "The tuberculostatic effect of pentaheterocyclic carboxylic acid hydrazides". *Z. Hyg. Infektionskrankh.*, 145: 263-75.
- Killam, K. F. y Bain, J. A. 1957. "Convulsant hydrazides. I. In vitro and in vivo inhibition of vitamin B6 enzymes by convulsant hydrazides". *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 119: 255-62.
- Buu-Hoi, Ng. Ph., Dat Xounng, Ng., Binon, F. y Hoang Nam, Ng. 1952. "Mechanism of action of tuberculostatic hydrazides". *Compt. rend.*, 235: 329-31.
- Owens, R. G. 1959. "Plant disease control by 5-nitrofur derivatives in relation to chemical structure". *Contribs. Boyce Thompson Institute*, 20: 141-9.
- Wagner, S. 1936. "Preparation of pyromucic acid". *J. Chem. Education*, 13: 270.
- Hurd, C. D., Garrett, J. W. y Osborne, E. N. 1933. "Furan reactions. IV. Furoic acid from furfural". *J. Am. Chem. Soc.*, 55: 1082-84.
- Wilson, W. C. 1941. "2-Furancarboxylic acid and 2-furylcarbinol". *Organic Synthesis*, vol. 1, 2a. ed., John Wiley and Sons, Nueva York, pp. 270-74.
- Gilman, H. y Soltz, W.M. 1930. "The Cannizzaro reaction with furfural". *Coll. J. Sci.*, 5: 15-18.
- Ho, T-L. y Hall, T. W. 1975. "Sodium hypochlorite reactions. III. Catalytic Nakagawa and related systems". *Synth. Commun.*, 5(4): 309-13.
- Csuros, Z., Soos, R., Fogassy, E. y Szabo, G. T. 1974. "Catalytic oxidation with air of furan derivatives substituted in the α position". *Chem. Eng.*, 18(3): 249-61.
- Masakazu, T. 1952. "Synthesis of 1,4-dichlorobutane from furfural". *J. Chem. Soc. Japan*, 55: 291-3.
- Tomio Terai et al. 1951. "Pyromucic acid from furfural". *Noguchi Research Institute, Japan*, 1111, Mar. 5. Tomado de *Chem. Abstr.*, 47:3883a. (1953).
- Abuzyarova, R. M., Mansurova, D. Kh. y Makhkamov, Kh. M. 1978. "Study of the preparation of pyromucic acid by furfural oxidation on fiber-based catalysts". *Khim. Khim. Tekhnol. Vysokomol. Soedin, USSR*, pp. 59-61.
- Kimura, R. y Morita, Y. 1956. "Preparation of furancarboxylic acid". *Bull. Inst. Chem. Research, Kyoto Univ.*, 34: 250-4.
- Tsutomu Kawada et al. 1952. "Furoic acid from furfural". *Nippon Petroleum Oil Co.*, Japan, 4576, Nov. 6. Tomado de *Chem. Abstr.*, 47: 11248a. (1953)
- Midorikawa, K. y Baba H. 1959. "Manufacture of furancarboxylic acid from furfural". *Physical and Chemical Researches, Japan*, 6113, July 14. Tomado de *Chem. Abstr.*, 54: 1544a. (1960).
- Arita, H. y Odawara, T. 1950. "Furoic acid from furfural". *Asahi Chemical Industries Co.*, Japan, 1130, Mar. 31. Tomado de *Chem. Abstr.*, 47: 2214c. (1953).
- Meyer, G. 1954. "Oxidation of 2-furaldehyde to pyromucic acid". *Pat. Ger.* 908,023.
- Windholz, M. 1983. *The Merck Index*. 10a. ed. Merck & Co., Rahway, N.J., p. 4184.
- Aldrich Chemical Co., 1983. *The Aldrich Library of NMR Spectra*. 2a. ed., Milwaukee, 2(1)195-A.
- Aldrich Chemical Co., 1985. *The Aldrich Library of FT-IR Spectra*. 1a. ed., Milwaukee, 1(2) 585-A.
- Software by Stein, S. E., Levitsky, A. A. y Fateev, O. V. NIST, Mass spectral, MS Search Program, versión 1.1a.
- Kul'nevich, V. G., Abramyan, S. V. y Shapiro, Yu. M. 1971. "Role of pyromucic acid in the autoxidation of furfural. I. Oxidation of pyromucic acid in water". *Khim. Geterotsikl. Soedin*, 7(1): 9-13.

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo, por medio del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación (0491P-B9506) y el Programa de Fomento al Posgrado (PFP/200/93). Se agradece al M. en C. Atilano Gutiérrez Carrillo la realización de los espectros de RMN-¹H en esta universidad.

KITS DE DIAGNÓSTICO NO APROBADOS

La FDA advierte sobre la existencia de "kits" no aprobados para diagnóstico en casa. La Agencia para los Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), advierte a consumidores y farmacéuticos sobre dos no aprobados y fraudulentos kits de diagnóstico para uso en casa distribuidos por Lei-Home Access Care, que es una división de Biotecnología Jin-Green, Inc., en Synnyvale, California.

Uno de los kits de diagnóstico es promovido a través de Internet como "Personal HIV Test Kit" y se llama "Lei-Home Access HIV Test". El otro kit de diagnóstico esta etiquetado como "In-Home-Hepatitis A Test Kit". La FDA recomienda que cualquiera de estos dos kits no aprobados de diagnóstico sean retirados de las farmacias y tiendas que distribuyen estos productos al consumidor. Actualmente la única prueba doméstica aprobada para detectar el virus que causa la enfermedad del SIDA se distribuye en Estados Unidos y se llama "Home Access HIV-1 Test System" (también llamado Home Access Express HIV-1 Test System), producido por Home Access Health Corp., Hoffman States. Con este sistema doméstico el consumidor puede enviar por correo una muestra de sangre seca, obtenida a partir de la picadura en un dedo, a un

laboratorio para su análisis. Los resultados, confidenciales y altamente confiables, se obtienen posteriormente por teléfono, con la asistencia psicológica en caso de que el consumidor así lo solicite. Algo muy importante es que la FDA no ha aprobado ningún kit de diagnóstico de este tipo para la hepatitis.

Fuente: Internet, <http://www.fda.gov>

ANTIHISTAMÍNICOS QUE NO CAUSAN SUEÑO

La Terfenadina es un antihistamínico no sedante usado para reducir la fiebre. Cuando se usa adecuadamente, la terfedamina tiene un índice de seguridad alto, pero cuando se administra a pacientes con enfermedades cardiacas o hepáticas en sobredosis o con la interacción de otros fármacos, puede producir graves o fatales arritmias cardiacas. Por esta razón se recomienda siempre consultar la información que sobre el producto se tiene disponible sobre cómo prescribir la terfenadina, sobre todo para prevenir enfermedades cardiacas.

La terfenadina es un profármaco que es transformado en el organismo en un metabolito ácido (fexofenadina), el cual es responsable de los efectos terapéuticos. En muchas circunstancias, la terfenadina es completamente metabolizada por efecto de

primer paso por el hígado y deja de estar presente en la circulación sistémica. Si el metabolismo es inhibido o saturado, el profármaco alcanza la circulación y prolonga el intervalo QT en un ECG. Esto predispone a arritmias ventriculares que pueden avanzar a fibrilación ventricular y la muerte. Es importante recordar que la probabilidad de muerte es muy baja y que la prevención de arritmias puede lograrse con el uso correcto de la terfenadina. Así, la terfenadina no debe administrarse a pacientes con problemas cardiacos y con enfermedades hepáticas; la dosis máxima debe ser de 120 mg al día en adultos y no debe administrarse en conjunto con los siguientes fármacos: ketoconazol, itraconazol, antifúngicos relacionados con los imidazoles, eritromicina, claritromicina y otros antibióticos relacionados con los macrólidos.

Existen alternativas de antihistamínicos no sedantes que pueden reemplazar a la terfenadina sin la prescripción médica: astemizol (Hismanal), cetirizina (Zirtek) y Loratadina (Clarityn). Sin embargo, la información que se tiene sobre el astemizol está bajo revisión ya que puede causar serios problemas cardiacos en ciertas circunstancias.

Fuente: Internet: <http://www.fda.gov>
Para información adicional, dirigirse a:
morher@servidor.unam.mx

1966-1996



ASOCIACIÓN FARMACÉUTICA MEXICANA A.C.

Premio al mejor trabajo de investigación publicado en la Revista Mexicana de Estudios Farmacéuticos

Con motivo de su XXX aniversario, la Asociación Farmacéutica Mexicana otorga un premio de \$5000.00 en efectivo al mejor trabajo de investigación publicado en la Revista Mexicana de Estudios Farmacéuticos en los números correspondientes a agosto, septiembre de 1996, julio, agosto de 1997.

Nos es grato comunicar a nuestros lectores que el Comité Científico de la AFM otorgó el premio al artículo intitulado:

"Preparación del ácido furoico por oxidación microbiológica"

cuyos autores son los investigadores Héctor Luna, Norberto Manjarrez, Herminia Pérez, Aida Solís y Remedios Sánchez, del Departamento Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. El artículo premiado se publicó en el número correspondiente a los meses de marzo-abril de 1997.

Vayan nuestras más calurosas felicitaciones a los ganadores.

RECONOCIMIENTOS Y PREMIO

La Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C.

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A

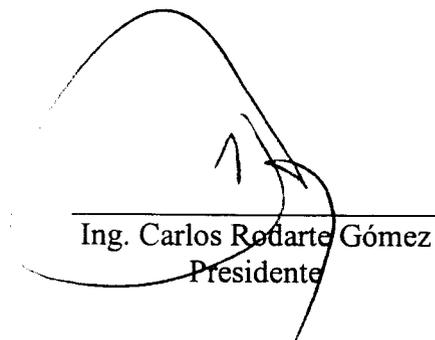
QI Herminia Pérez

Por haber sido acreedora del Premio al mejor Trabajo de Investigación intitulado:

**PREPARACIÓN DEL ÁCIDO FURÓICO POR
OXIDACIÓN MICROBIOLÓGICA**

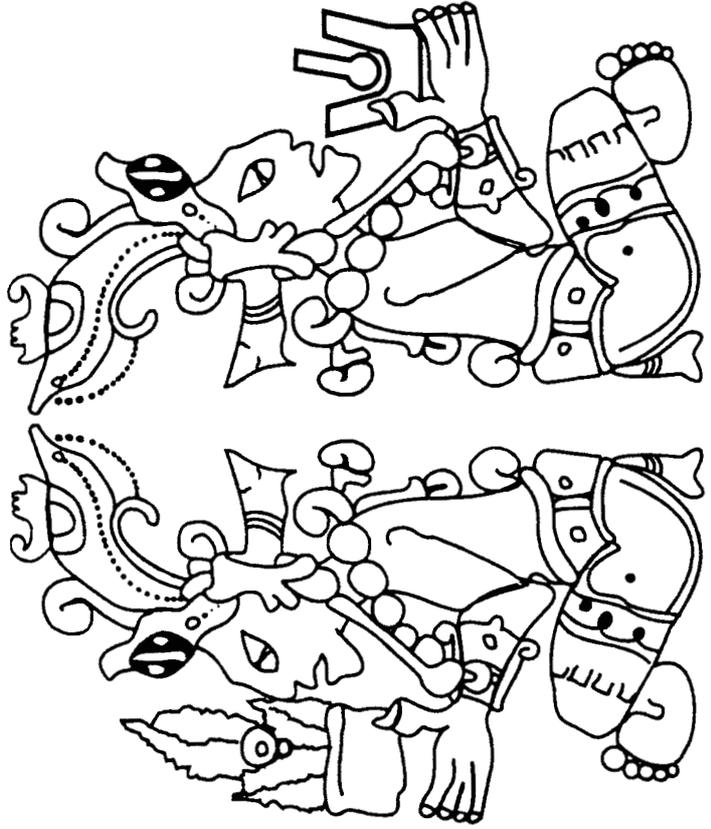
Publicado en la Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas en 1997.

“POR LA SUPERACIÓN TÉCNICA Y CIENTÍFICA”



Ing. Carlos Rodarte Gómez
Presidente

Asociación
Farmacéutica
Mexicana, A.C.



Otorga el presente

DIPLOMA

A:
HERMINIA I. PÉREZ M.

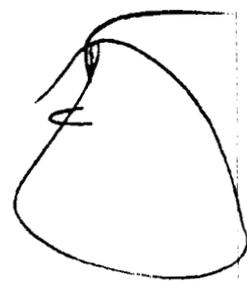
Por haber obtenido el premio como Mejor Trabajo Libre en el área de BIOTECNOLOGÍA con el trabajo:

BIOTRANSFORMACIÓN DE ALCOHOLES BENCÍLICOS MONOSUBSTITUIDOS
CON *Nocardia corallina* B-276.

Cancún, México
4 de diciembre, 1997

**CONGRESO NACIONAL DE
CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

2do. Encuentro Internacional de Profesionales
de las Ciencias Farmacéuticas



Ing. Carlos Rodarte Gómez
Presidente

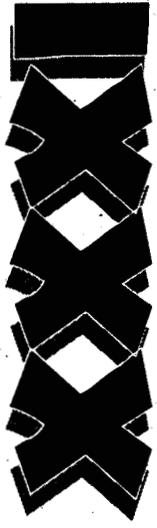


QFB Edwin Raimond-Kedilbac
Dir. de Ciencia y Tecnología



QFB Daniel Montes Chávez
Director de Congreso

VERACRUZ



CONGRESO NACIONAL
DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

La Asociación Farmacéutica Mexicana A.C.
otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

HERMINIA I. PEREZ M.

Por haber obtenido el premio como mejor Trabajo Libre Cartel en el área de
Biotecnología intitulado:

**INMOVILIZACION DE CELULAS DE *N. corallina* B-276 EN ALGINATO DE
BARIO PARA LA BIOTRANSFORMACION DEL ALCOHOL FURFURILICO.**

Ing. Carlos Rodarte G.
Presidente

QFB Edwin Raimond-K.
Director de Ciencia y Tecnología

QFB Daniel Montes Ch.
Director de Congreso

25 al 29 de Octubre de 1998, Veracruz, Ver.