

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

SÍNTESIS MICROBIOLÓGICA DE 1-HIDROXI-1-(4-HIDROXIFENIL)-
2-PROPANONA ÓPTICAMENTE PURA COMO UN INTERMEDIO
CLAVE PARA LA MANUFACTURA DE NILIDRINA E ISOXUPRINA.

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

Que para obtener el diploma de
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
presenta:

MARÍA PATRICIA SHIRLEY DEMARE NEGRETE
Química Industrial

ASESORES:

M. en C. Mariano García Garibay
M. en C. Lorena Gómez Ruiz

noviembre de 1996



CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
3.	GENERALIDADES.....	3
3.1	FÁRMACOS QUIRALES.....	3
3.2	FÁRMACOS ADRENÉRGICOS.....	3
3.3	SÍNTESIS ASIMÉTRICA.....	8
3.4	BIOTRANSFORMACIONES.....	9
3.5	LEVADURAS DE PANIFICACIÓN	10
4.	ANTECEDENTES.....	11
5.	OBJETIVOS.....	14
6.	METODOLOGÍA.....	15
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
8.	CONCLUSIONES.....	30
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	32
10.	ANEXO ESPECTROS DE R.M.P.....	34

1. RESUMEN

Se estudió la biotransformación de aldehidos aromáticos por medio de levaduras en condiciones de fermentación. El objetivo principal de este proyecto, la síntesis de la R-1-hidroxi-1-(4-hidroxifenil)-2-propanona, fue parcialmente cubierto con la obtención del éter metílico análogo, que podría ser utilizado para la síntesis de algunos fármacos adrenérgicos como la nilidrina y la isoxuprina.

Para lograr este objetivo se realizaron las siguientes actividades:

1. Se reprodujeron de las condiciones descritas en la literatura para la síntesis de la R-1-hidroxi-1-fenilpropanona (el análogo no sustituido en el anillo) utilizando diferentes marcas de levaduras de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) comercialmente disponibles en el país.
2. Se estudió la influencia de las diferentes variables en la producción de la R-1-hidroxi-1-fenilpropanona empleando levaduras de panificación.
3. Se comparó la actividad de *S. cerevisiae* y de *Kluyveromyces marxianus* como agentes promotores de la condensación de aldehidos aromáticos.
3. Se aplicaron las condiciones óptimas de fermentación, tanto con *S. cerevisiae* como con *K. marxianus*, sobre varios benzaldehidos con función oxigenada en posición para. El sustrato más conveniente resultó ser el 4-metoxibenzaldehido.
4. Se optimizaron las condiciones de fermentación con *K. marxianus* sobre el 4-metoxibenzaldehido, estudiando la influencia de diferentes variables sobre esta biotransformación.

2. INTRODUCCIÓN

A pesar de la creciente importancia que se le da en terapéutica al uso de fármacos ópticamente puros cuando la actividad biológica reside en uno de los enantiómeros, se sigue administrando mezclas racémicas de un gran número de ellos. La presencia del isómero inactivo implica a menudo sólo la necesidad de consumir una dosis mayor del medicamento, aunque en algunos casos los efectos secundarios son producidos por el otro enantiómero, lo que significa mayor toxicidad de la mezcla racémica comparando con el enantiómero terapéuticamente útil (Crosby, 1991).

Los fármacos adrenérgicos (también llamados simpaticomiméticos) tienen una amplia variedad de aplicaciones en terapéutica, pues ejercen efectos sobre diferentes tejidos de manera similar a la adrenalina o epinefrina, que es la principal hormona simpaticomimética producida por la glándula suprarrenal. Estos fármacos son administrados en la actualidad, usualmente como mezclas racémicas, para el tratamiento de afecciones cardiovasculares, como bronquodilatadores, relajantes del útero y descongestionantes nasales.

La aplicación de métodos biotecnológicos en síntesis orgánica, haciendo uso de microorganismos vivos o de enzimas aisladas para realizar transformaciones químicas, es un campo poco explotado en nuestro país que en los últimos años ha adquirido importancia por el potencial que representa para la obtención de compuestos quirales. Siendo las enzimas, ya sea aisladas o presentes en el microorganismo, sustancias de naturaleza quiral, las reacciones que ellas promueven dan lugar a productos con alto grado de enantio y diastereoselectividad. Entre los microorganismos, las levaduras de panificación son las preferidas por muchos químicos orgánicos, pues son poco costosas, versátiles, resistentes a la contaminación y de fácil reproducción. Las reacciones promovidas por microorganismos suelen tener problemas de aislamiento por los grandes volúmenes empleados y por los productos laterales que se pueden formar como resultado de la acción de gran variedad de enzimas presentes en el microorganismo. Sin embargo, se han descrito muchas transformaciones con levaduras que, con un método adecuado de extracción, dan el producto deseado con buen rendimiento químico y enantiomérico. Si la biotransformación es efectuada sobre una materia prima poco costosa en el punto adecuado del proceso sintético, los problemas mencionados, inherentes a una biotransformación, pueden ser superados para hacer un proceso viable en escala industrial.

Entre los parámetros que afectan el curso de una biotransformación están el pH, la naturaleza de los nutrientes, la concentración del sustrato, la proporción de células, las condiciones de crecimiento, etc., pero sin duda el factor determinante es la estructura química del sustrato, que puede tener gran influencia en la quimo y estereoselectividad de la reacción.

El trabajo desarrollado es parte de un proyecto que pretende explorar la utilización de las levaduras para promover biotransformaciones sobre sustratos que llevarían a la formación enantioselectiva del isómero farmacológicamente útil de algunos fármacos del tipo de los aminoalcoholes adrenérgicos, que poseen al menos un centro quiral y que, por lo tanto, presentan al menos dos formas enantioméricas, de las cuales una es la responsable de la actividad farmacológica útil.

3. GENERALIDADES

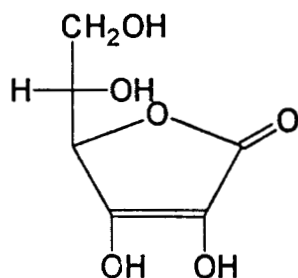
3.1 FÁRMACOS QUIRALES

Una gran proporción de principios activos para uso farmacéutico presentan en su estructura molecular al menos un centro quiral, y por tanto existen en dos formas enantioméricas, o sea imágenes especulares no superponibles.

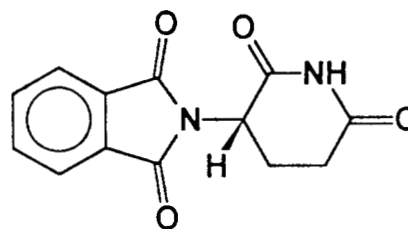
Se conocen numerosos ejemplos de fármacos que presentan actividad únicamente en una de sus formas enantioméricas. Por ejemplo, el isómero (+) del ácido ascórbico tiene propiedades curativas contra el escorbuto, mientras que el isómero levorotatorio es inactivo.

Los estudios dedicados a la relación estructura-actividad en este tipo de sustancias sugieren que se forman complejos diastereoméricos entre el fármaco quiral y los receptores biológicos en los que la relación existente entre el fármaco y el receptor es la misma que se da, por ejemplo, entre una cerradura y su llave para que se dé la respuesta esperada. En un receptor puede haber tres o más puntos de interacción que coincidirán con sólo uno de los enantiómeros de un fármaco, mientras que el otro enantiómero no podrá satisfacer esta condición.

Se dan casos también en los que existe actividad biológica totalmente diferente entre los isómeros que forman un par enantiomérico. Un ejemplo dramático es la talidomida, cuyo isómero (S) es un tranquilizante, mientras que el (R) posee poderosos efectos teratógenos.



Ácido L-ascórbico



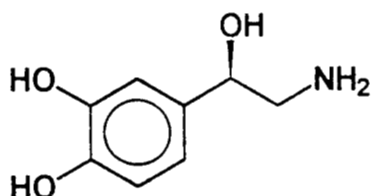
(S)-talidomida

3.2 FÁRMACOS ADRENÉRGICOS

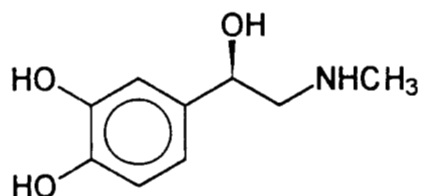
El sistema nervioso simpático (S.N.S.) o sistema nervioso autónomo está involucrado en la regulación de una amplia variedad de funciones centrales y periféricas, entre las cuales figuran el ritmo y fuerza cardiacos, el tono vascular, la presión sanguínea, el tono de los conductos bronquiales, el metabolismo de lípidos y carbohidratos, el estado de ánimo y el apetito. La

estimulación del S.N.S. ocurre normalmente como respuesta a la actividad física, situaciones de tensión emocional o reacciones alérgicas. Los fármacos que estimulan o alteran la actividad del S.N.S., llamados fármacos adrenérgicos o simpaticomiméticos, son útiles en el tratamiento de varios estados clínicos, como hipertensión, shock, falla y arritmia cardíaca, asma, alergia y anafilaxis (Goodman y Gilman, 1988).

La norepinefrina (1) es el principal transmisor adrenérgico; se almacena en las terminaciones nerviosas de los nervios simpáticos y es liberada como respuesta a la estimulación de dichos nervios, manteniéndose un nivel sanguíneo necesario para el sostén de las funciones autónomas. La epinefrina o adrenalina (2) es una hormona que se produce en las glándulas suprarrenales, y cuya liberación tiene como función producir los efectos que preparan al organismo para la "pelea o la huida".



norepinefrina (1)



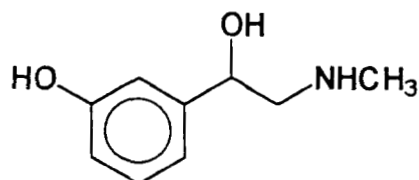
epinefrina (2)

Se han sintetizado gran variedad de análogos estructurales de la adrenalina y se han realizado estudios de relación estructura-actividad que han llevado a la conclusión de que las aminas simpaticomiméticas presentan diferentes mecanismos de acción, y que actúan sobre diferentes tipos de receptores distribuidos heterogéneamente en el cuerpo. Dichos receptores han sido designados (Lands y col., 1967) α_1 , α_2 , β_1 y β_2 , aunque recientemente algunos investigadores (Bianchetti y Manara, 1990; Granneman, 1990) proponen la existencia de otros subtipos de adrenoceptores.

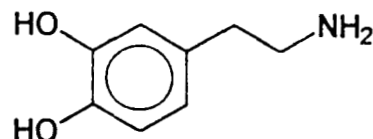
Según el mecanismo de acción, los estimulantes adrenérgicos se clasifican en tres categorías: de acción directa, de acción indirecta y de acción mixta. Los simpaticomiméticos de acción directa actúan por formación de un complejo con receptores específicos (sitios en las células con los que un fármaco reacciona para producir un efecto). El ejemplo más representativo es la epinefrina o adrenalina. Los fármacos adrenérgicos de acción indirecta promueven la liberación de catecolaminas, principalmente norepinefrina, de los gránulos de almacenamiento en los terminales nerviosos simpáticos. Son ejemplos la tiramina y la anfetamina. Los simpaticomiméticos de acción mixta actúan por los dos mecanismos antes expuestos, siendo el caso de la efedrina y la fenilpropanolamina. No siempre es posible hacer una distinción absoluta entre los simpaticomiméticos de acción directa e indirecta. Muy probablemente, todos estos fármacos actúan, unos más que otros, por ambos mecanismos, esto es, tanto sobre las zonas de los receptores como sobre las zonas de almacenamiento de las catecolaminas.

Como se mencionó antes, existen varios tipos de receptores adrenérgicos, y los fármacos simpaticomiméticos pueden actuar sobre cualquiera de ellos, selectivamente o no. Un factor determinante en la respuesta de un tejido a la acción de un fármaco adrenérgico es la proporción y densidad de los diferentes receptores en el tejido.

La estimulación de los receptores α produce, entre otros efectos, vasoconstricción de músculo liso, estimulación de glándulas y elevación de la presión sanguínea. Los efectos metabólicos son atribuidos a los receptores α_2 presentes en hígado y células grasas. La norepinefrina (1), es el prototipo de estimulante α adrenérgico. La fenilefrina (3) y la dopamina (4) son otros ejemplos. Hay abundancia de receptores α en los vasos sanguíneos y en la piel.

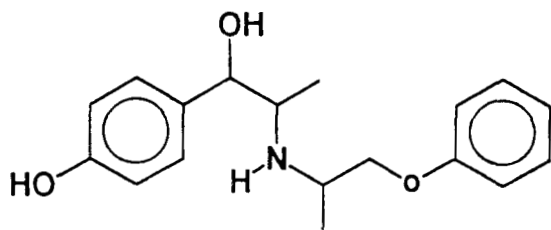


Fenilefrina (3)

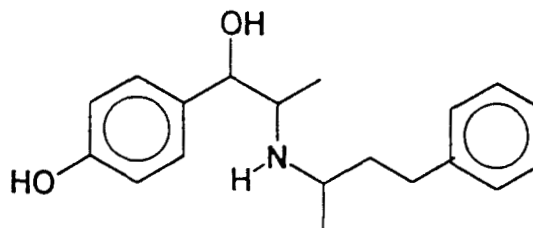


Dopamina (4)

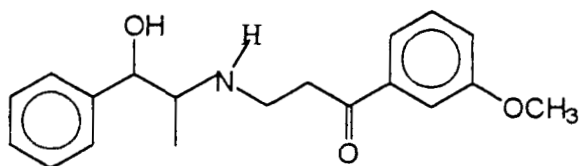
Los receptores β_1 son responsables de la estimulación del músculo cardiaco, vasodilatación y lipólisis. Son ejemplos de fármacos que los estimulan la epinefrina (2), isoxuprina (5) y nilidrina (6), oxifedrina (7) y denopamina (8).



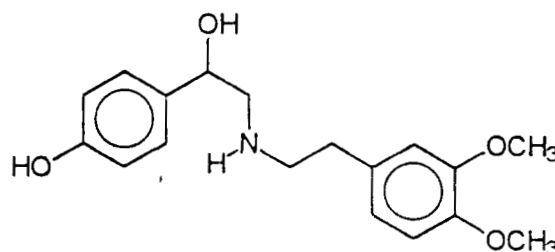
Isoxuprina (5)



Nilidrina (6)

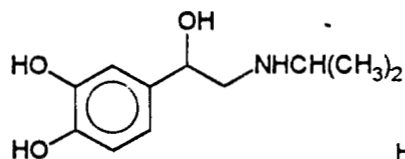


Oxifedrina (7)

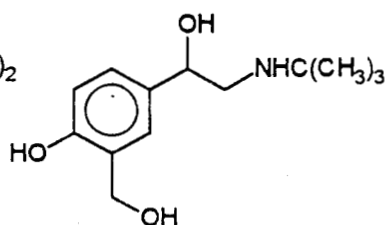


Denopamina (8)

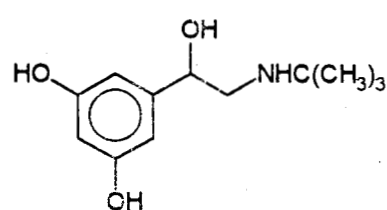
Los fármacos que estimulan a los receptores β_2 producen relajación de músculo liso (p. ej., bronquios o útero), glucogenólisis e inhibición glandular. La epinefrina (2), isoproterenol (9), salbutamol (10), terbutalina (11), efedrina (12) y metaproterenol (13) son algunos de los fármacos que estimulan dichos receptores.



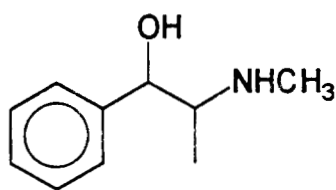
Isoproterenol (9)



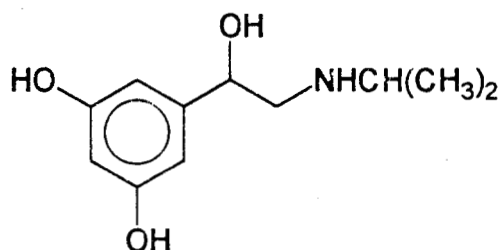
Salbutamol (10)



Terbutalina (11)

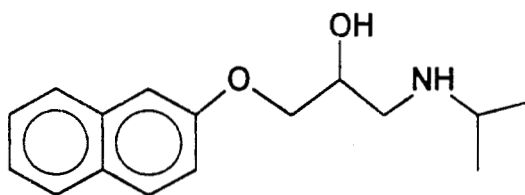


Efedrina (12)



Metaproterenol (13)

Los bloqueadores adrenérgicos antagonizan las acciones de los neurotransmisores (norepinefrina y epinefrina) o de otros fármacos simpaticomiméticos, uniéndose a los receptores correspondientes sin producir una respuesta. Son útiles en el tratamiento de problemas cardiovasculares, incluyendo hipertensión, angina de pecho y arritmias. Los más importantes por su utilidad en terapéutica son los bloqueadores de receptores β (bloqueadores β -adrenérgicos), de los cuales el prototipo es el propranolol (14).



Propranolol (14)

Los requerimientos estructurales para la actividad adrenérgica hacia cada tipo de receptor han sido objeto de diversos estudios. Para la estimulación de los receptores α es común una ariletilamina con la amina sin sustituir o con un sustituyente no voluminoso. Para el caso de los estimulantes β -adrenérgicos, los requerimientos estructurales son una ariletanolamina en la que la función amina es secundaria y el sustituyente sobre el nitrógeno es voluminoso. El isómero con configuración R en el átomo de carbono que posee el grupo hidroxilo es el más activo (Patil y col., 1970). La enantioselectividad es debida a la naturaleza quiral de los receptores, pero también hay diferente actividad con respecto a la absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Con respecto a la actividad biológica de un par de enantiómeros, puede darse uno de los siguientes casos:

a) Uno de los isómeros es activo mientras el otro es inactivo; por ejemplo, el (S) propranolol es un potente bloqueador β -adrenérgico, mientras que el isómero (R) es prácticamente inactivo (Smith, 1971)

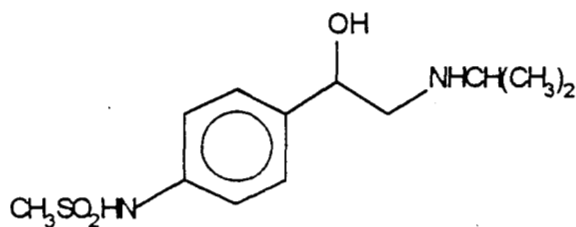
b) Uno de los isómeros es más activo que el otro. Un ejemplo es el sotalol (15). (Somani, 1968).

c) Ambos enantiómeros son igualmente activos; esto ocurre en los casos en que la funcionalidad sobre el centro asimétrico no se asocia directamente con el receptor. Por ejemplo, la p-hidroxiamfetamina (16) racémica produce los mismos efectos que cada uno de los isómeros (Patil y col., 1967).

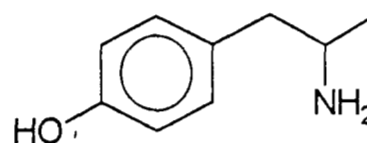
d) Un isómero antagoniza los efectos del otro. Por ejemplo, el (+) isoproterenol antagoniza los efectos del (-) isoproterenol (Popa, 1984).

e) Los isómeros presentan actividad biológica totalmente diferente: El isómero (-) de la efedrina (12) es usado como bronquiodilatador, mientras que el isómero (+) es descongestionante nasal (Hartley, 1971). Similarmente, el isómero (-)-eritro de la nilidrina (6) es estimulante β y el isómero (+)-eritro es bloqueador de receptores α (VanKijk y col., 1963).

f) Un caso interesante es el reportado por Hartley (1971), quien describe una actividad bronquiodilatadora del Salbutamol racémico (10) ligeramente mayor que la del isómero R, el cual es 64 veces más activo que el isómero S, y por otro lado, la mezcla racémica es diez veces más activa sobre el corazón (efecto secundario) que el isómero R y cien veces más activa sobre el corazón que el isómero S. Esto es, la forma racémica tiene mayor actividad biológica que cualquiera de los enantiómeros puros, ocurriendo algún tipo de sinergismo, y comportándose la mezcla racémica como una tercera especie molecular. Esta mayor actividad biológica de la mezcla racémica es, sin embargo, acentuada en los aspectos cardiovasculares, lo que ocasiona que el racemato presente importantes efectos laterales que limitan su valor terapéutico.



sotalol (15)



p-hidroxiamfetamina (16)

3.3 SÍNTESIS ASIMÉTRICA.

Para una molécula con n centros asimétricos (átomo tetraédrico como el carbono con cuatro diferentes sustituyentes) hay normalmente 2^n posibles estereoisómeros. Si la síntesis de la molécula no se realiza bajo condiciones asimétricas, se producirán todos los isómeros. La síntesis asimétrica puede definirse como una reacción que conduce a la formación preferente de un estereoisómero, debido a la quiralidad existente ya sea en el sustrato, en el disolvente o en el reactivo, o, como lo expresan Morrison y Mosher (1976): "La síntesis asimétrica es una reacción en la cual un fragmento aquiral en el sustrato es transformado, por medio de un reactivo, en una unidad quiral, de tal manera que los posibles estereoisómeros se forman en cantidades diferentes".

Existen varias alternativas para la obtención de sustancias ópticamente puras (Juaristi, 1991):

a) *Resolución* (separación de los enantiómeros), que puede ser química, cinética, cromatográfica o enzimática.

b) *Síntesis asimétrica*

c) *Biotransformaciones* (empleando microorganismos o enzimas aisladas) (Csuk y Glanzer, 1991).

d) Uso de *productos naturales ópticamente activos* como materias primas, p. ej., aminoácidos, hidroxiácidos, terpenos, carbohidratos u otros productos naturales enantioméricamente puros.

La síntesis asimétrica puede realizarse utilizando:

a) *Sustrato activo*. Si un nuevo centro asimétrico es creado en una molécula que ya es ópticamente activa se producen los dos diasterómeros en diferente proporción, puesto que el reactivo ataca desde el lado menos impedido. Para ciertas adiciones a doble enlace carbono-oxígeno de cetonas que contienen un carbono asimétrico en la posición α , la *Regla de Cram* predice cuál diasterómero predominará (Cram, 1968). El término *auxiliar quiral* se refiere al reactivo utilizado para la formación de un derivado quiral de una molécula, que después de la producción del nuevo centro asimétrico es eliminado por medio de otra reacción química.

b) *Reactivo quiral*. Cuando un sustrato ópticamente inactivo es convertido selectivamente en uno de dos enantiómeros posibles se dice que se trata de una reacción enantioselectiva.

c) *Catalizador o disolvente quiral*. La asimetría presente en una reacción, en forma de un catalizador quiral o un disolvente quiral, da lugar a la formación selectiva de un estereoisómero.

3.4 BIOTRANSFORMACIONES

La biotecnología es una ciencia interdisciplinaria con aplicaciones en muchos campos, como son el de alimentos y la industria farmacéutica. Una de las definiciones de la biotecnología es la utilización de células o partes de ellas para obtener un producto.

Es indudable la interacción entre la biotecnología y la química, dándose lo que se conoce como biotransformaciones, que pueden ser realizadas con microorganismos vivos o con enzimas. Es éste un campo poco explotado en México, tanto a nivel de investigación como de producción. Una biotransformación puede describirse como el proporcionar a un microorganismo un sustrato que no es el natural, pero con el que tiene suficientes similitudes estructurales, para que lo incluya en alguna parte de su metabolismo y lo transforme en un producto determinado (Czuk y Glanzer, 1991).

El campo de las biotransformaciones, al inicio de la década de los ochenta, despertó tal entusiasmo entre los biotecnólogos que se pensó que llegaría a desplazar a la química orgánica tradicional. Sin embargo, en los últimos cinco años el interés por esta metodología se ha enfocado a utilizar las biotransformaciones como una herramienta que puede jugar un papel más bien de apoyo a la síntesis orgánica; se intenta su aplicación cuando algún paso clave en la síntesis no puede realizarse por métodos tradicionales o por razones de costo o ambientales. Las biotransformaciones pueden realizarse haciendo uso de microorganismos o de enzimas aisladas, y tienen ciertas ventajas, como son:

a) Regio y estereoselectividad. b) Disponibilidad de gran variedad de organismos y posibilidad de modificación de las propiedades catalíticas por manipulación genética. c) Seguridad (evita el uso de reactivos tóxicos). d) Condiciones suaves de transformación (temperatura, presión y pH). e) Los biocatalizadores son capaces de realizar una gran variedad de reacciones orgánicas.

Sin embargo, también tienen desventajas: a) No es siempre posible tener acceso al enantiómero deseado. b) Frecuentemente se utilizan altas diluciones. c) Con microorganismos se tiene el riesgo de reacciones laterales no deseadas. d) Cuando se emplean enzimas aisladas, se requiere frecuentemente la adición de cofactores, que son sumamente costosos. e) Los biocatalizadores son térmicamente inestables. f) Incompatibilidad con algunos disolventes orgánicos. g) Reacciones generalmente lentas y con riesgo de inhibición. h) Aislamiento tedioso y grandes volúmenes de efluentes en lotes industriales. (Czuk y Glanzer, 1991; Servi, 1990),

Los microorganismos son usados para la síntesis de algunos importantes productos químicos como por ejemplo, ácido glutámico, ácido cítrico y etanol. En la producción farmacéutica, la biotecnología, desde hace muchos años, es utilizada en la síntesis de antibióticos (penicilina, tetraciclina, eritromicina), vacunas (polio, sarampión, DPT), vitaminas (complejo B) y hormonas esteroides.

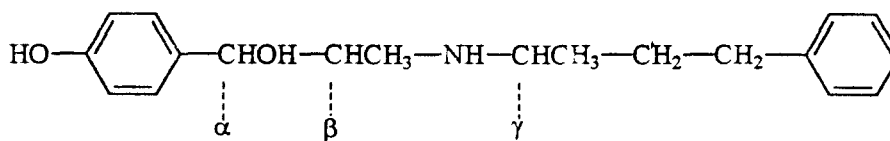
El empleo de enzimas aisladas implica un alto costo comparado con el uso de microorganismos vivos, pero tiene ventajas que en muchas ocasiones compensan este alto costo, como son un mejor rendimiento (al evitarse productos laterales que serían producidos por otras enzimas del microorganismo), menores volúmenes y un aislamiento más fácil del producto. En algunos casos se ha logrado superar el problema del costo utilizando las enzimas o los cofactores inmovilizados en un soporte inerte.

4. ANTECEDENTES

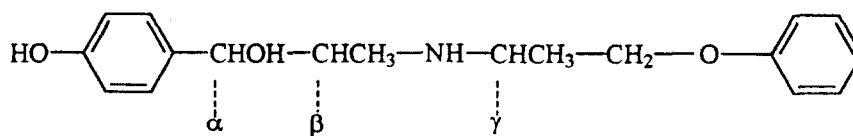
Se calcula que aproximadamente el 25% de los fármacos usados en la actualidad son administrados como mezclas racémicas, a pesar de que la presencia del isómero inactivo implica con frecuencia no sólo la necesidad de consumir una dosis mayor del medicamento, sino una mayor toxicidad de la mezcla racémica comparando con el enantiómero terapéuticamente útil (Stinton, 1992). Recientemente, la Food and Drug Administration (FDA) ha establecido nuevos lineamientos para la comercialización de estos fármacos, y en muchos casos particulares se prevé que en un futuro cercano será permitida la venta del fármaco sólo como el enantiómero puro que posee la actividad biológica útil (Borman, 1992; Stinton, 1995).

La mayor parte de los fármacos adrenérgicos o simpaticomiméticos son empleados en terapéutica como mezclas racémicas. En algunos casos, como la efedrina, los efectos farmacológicos de ambos isómeros son diferentes pero pueden ser complementarios para lograr un efecto terapéutico útil. En muchos otros, sin embargo, no se justifica el administrar una mezcla racémica, cuando uno de los isómeros es inactivo o presenta actividad no deseada. De ahí la necesidad de desarrollar ya sea síntesis enantioselectivas o métodos eficientes de separación de los enantiómeros de estos fármacos.

Los fármacos que actúan sobre los receptores adrenérgicos tienen como requisito estructural el poseer una ariletanolamina con la configuración R en el carbono bencílico de la cadena lateral. En el caso de los fármacos adrenérgicos es común encontrar diferente actividad biológica en cada una de las formas enantioméricas. Así, por ejemplo, para la nilidrina (1), utilizada como mezcla racémica de la forma eritro [(+)-eritro, (α S, β R, γ R) y (-)-eritro, (α R, β S, γ S)], se ha descrito actividad estimulante de los receptores β -adrenérgicos en el isómero (-)-eritro, mientras que el enantiómero (+)-eritro es un bloqueador de receptores α (Van Kijk y col., 1963). En el caso de la isoxuprina (2) Claasen (1961) encontró similares tipos de actividad en ambos enantiómeros de la forma eritro, el (+)-eritro, (α R, β S, γ S) y el (-) eritro (α S, β R, γ R), siendo en ambos casos, como en todos los compuestos con actividad adrenérgica, el isómero R en el carbono base del alcohol el responsable de los efectos β -adrenérgicos (estimulantes de los receptores β).



Nilidrina (1)

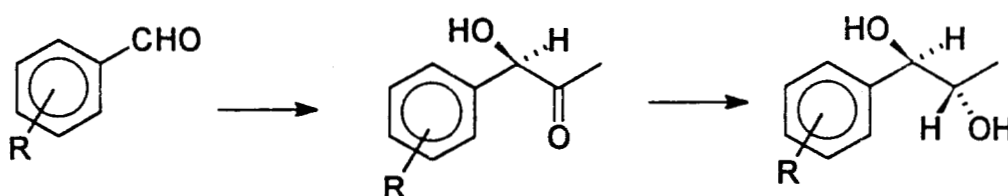


Isoxuprina (2)

Las levaduras de panificación pueden inducir la formación de enlaces carbono-carbono en la fermentación de ciertos aldehídos. Los primeros reportes relacionados con esta reacción de condensación fueron publicados por Neuberg (1921), quien informó la obtención de (R, S)-1-fenil-1,2-dihidroxiopropano vía una α -hidroxicetona no aislada. Fuganti y colaboradores (1977) ampliaron estas investigaciones sobre otros aldehídos aromáticos, obteniendo en la mayoría de los casos rendimientos cercanos al 30% de los eritro-dioles correspondientes con excesos enantioméricos de 97%. (Esquema 4.1)

Esquema 4.1

Condensación aciloínica-reducción de aldehídos aromáticos promovida por levaduras.



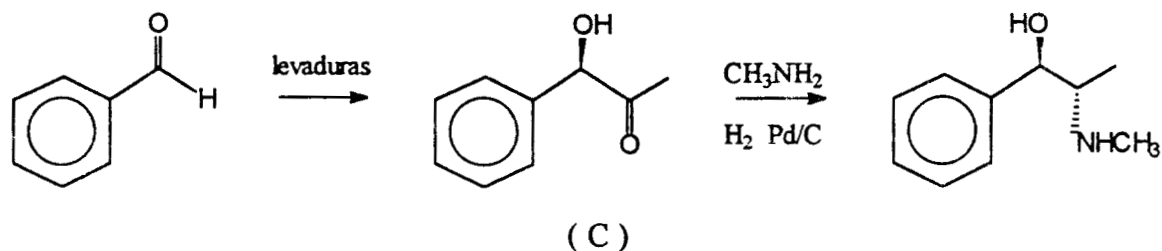
R = H, *p*-CH₃, *p*-Cl, *p*-F, *p*-OCH₃, *o*-OCH₃, *o*-Cl, *o*-F, *m*-F

Está descrito (Ohta y col., 1986) que, en esta biotransformación, a pH ácido se produce principalmente la hidroxicetona (pH óptimo 5), mientras que a pH básico (óptimo 7.5), se obtiene el eritro-diol correspondiente, siendo el principal producto lateral el alcohol bencílico.

El sistema enzimático involucrado en esta reacción es la piruvato descarboxilasa, la cual opera en una reacción que involucra Mg²⁺ y pirofosfato de tiamina; la unidad CH₃C=O proviene de la descarboxilación del piruvato y es transferida por medio del pirofosfato de 2-(α -hydroxyethyl)tiamina a la cara *si* del grupo carbonilo del aldehído aceptor para formar la (R)- α -hidroxicetona, la cual sufre posterior reducción en la cara *re* por una alcohol deshidrogenasa, resultando la formación de un diol con configuración anti (R, S). (Kren y col., 1993)

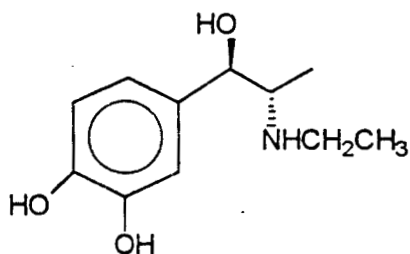
Esta condensación encontró aplicación industrial en la síntesis de *l*-efedrina (Rose, 1961) a partir de benzaldehído, siendo uno de los primeros procesos industriales que combinan en una síntesis métodos microbiológicos y químicos, pues la hidroxicetona (C) producida durante la fermentación a partir del benzaldehído es el primer intermedio de un proceso de dos pasos para la manufactura de la *l*-efedrina. (C) presenta un centro quiral que induce cierta diastereoselectividad hacia la formación del segundo centro quiral (esquema 4.2).

Esquema 4.2
Síntesis industrial de (R,S)-efedrina.

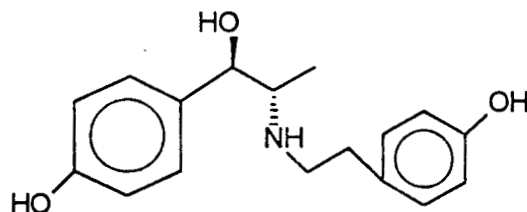


Se han descrito recientemente estudios realizados en relación con esta biotransformación, que involucran la utilización de levaduras inmovilizadas (Nikolova y Ward, 1994, Coughlin y Mahmoud, 1992 y Mahmoud y col., 1990), medio bifásico (Nikolova y Ward, 1993), cepas mutantes hiperproductoras (Seely y col., 1990), cultivo continuo (Agarwal y Basu, 1989) y corriente eléctrica (Ellaiah y Krishna, 1988). Oldrich y Zuazec (1986) patentaron un método que involucra la adición de acetaldehído a la mezcla de fermentación para inhibir la reducción y con esto reporta rendimientos de hasta el 67% de la (R)-1-hidroxi-1-fenilpropanona.

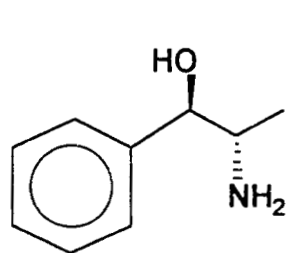
Es éste un método potencialmente útil para la síntesis enantioselectiva de otros fármacos adrenérgicos del tipo (R,S)-1-aryl-2-aminopropanoles como por ejemplo, Oxifedrina (7); Isoxuprina (5); Nilidrina (6); Dioxetdrina (17); Ritodrina (18); Fenilpropanolamina (19); Nordefrin (20).



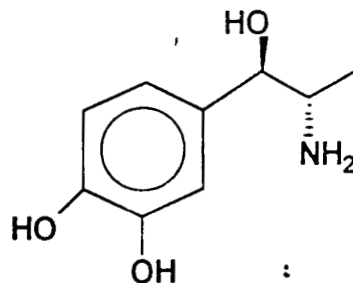
Dioxetdrina (17)



Ritodrina (18)



Fenilpropanolamina (19)



Nordefrin (20)

5. OBJETIVOS

1. Obtener el isómero (R) de la 1-hidroxi-1-(4-hidroxifenil)-2-propanona mediante una biotransformación promovida por levaduras.
2. Reproducir las condiciones descritas en la literatura para la condensación aciloínica del benzaldehído empleando levaduras de panificación comercialmente disponibles en México.
3. Estudiar el efecto de la modificación de diferentes variables sobre la biotransformación de benzaldehído durante la fermentación de *S. cerevisiae*.
4. Evaluar la eficiencia de la reacción de condensación aciloínica promovida por levaduras sobre diferentes aldehídos aromáticos con función oxigenada en posición *para*.
5. Comparar la capacidad catalítica de diferentes marcas de levaduras de panificación disponibles en México, así como de *Kluyveromyces marxianus*, hacia la síntesis de aciloínas aromáticas a partir de benzaldehídos.
6. Optimizar las condiciones de fermentación sobre el sustrato con función oxigenada en 4- que ofrezca mejores perspectivas hacia la condensación aciloínica de benzaldehídos.

6. METODOLOGIA

Microorganismos: Para el estudio de la biorreducción de cetonas aromáticas se emplearon levaduras de panificación de la marca SAFMEX (deshidratadas). Para estudiar la capacidad de promover la condensación aciloínica de aldehidos aromáticos se utilizaron dos variedades de levaduras: 1) Levaduras de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) de la marca SAMEX (deshidratadas), AZTECA (prensadas) y LEVIATAN (prensadas). 2) *Kluyveromyces marxianus* cepa CDBBL278.

Reactivos: Se utilizaron reactivos Merck y Aldrich grado analítico.

Equipo para las fermentaciones: Las fermentaciones fueron realizadas en matraces erlenmeyer de diferente capacidad en un baño de agua con agitación American Optical modelo 2156.

Determinación de pH: Se utilizó un potenciómetro marca Metrohm mod. 691.

Monitoreo de las biotransformaciones: Se siguió el progreso de las reacciones por cromatografía en capa fina de sílice, revelando con luz ultravioleta y vapores de yodo.

Determinación de exceso enantiomérico: Se realizó por relación de la rotación óptica registrada con la informada para el producto puro (Nógrádi, 1987).

Rotación óptica: Se utilizó un polarímetro Perkin-Elmer modelo 341.

Análisis de los productos de fermentación por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR): Se empleó un cromatógrafo de líquidos Waters modelo 600E con columna de acero μ Bondapak C_{18} de WATERS (2.1 X 300mm). La fase móvil fue agua-acetonitrilo 70:30, flujo de 1.6 mL/min. Detectores de luz U.V. a 254 nm y de índice de refracción.

Análisis de los productos de fermentación por espectrometría de Resonancia Magnética Protónica (RMP): Fue realizada en un espectrómetro de resonancia magnética protónica Varian EM360L de 60 Mhz, empleando cloroformo deuterado como disolvente.

6.1 Síntesis de 1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (C) a partir de benzaldehido por fermentación con *S. cerevisiae*. Se estudió la biotransformación de benzaldehido con *S. cerevisiae*, reproduciendo la metodología descrita en la literatura y valorando el efecto de la modificación de diferentes variables sobre la producción de (C).

6.1.1 Reproducción del método patentado (Oldrich, 1986) para la síntesis de 1-hidroxi-1-fenil-2-propanona a partir de benzaldehido con *S. cerevisiae*. Se preparó una solución de 2.5 g de sacarosa, 0.25 mL de licor de maíz y 0.02 mL de ácido fosfórico en 60 mL de agua destilada en un matraz erlenmeyer de 250 mL y se ajustó el pH a 5.5 por adición de hidróxido de potasio al 10%. Se adicionaron 1.5 g de levaduras de panificación SAFMEX, se protegió la boca del matraz con un algodón y se cultivó a 30° con agitación recíproca durante 30 minutos. Se inició entonces la adición de una mezcla de 0.4 mL benzaldehido y 0.25 mL de acetaldehido, en 10 porciones, una cada hora, (aprox. 0.06 mL en cada adición). Después de la última adición se agitó a la misma temperatura una hora más.

6.1.1.1 Aislamiento de la mezcla de productos. Se dio por terminada la fermentación adicionando 8 g de cloruro de sodio y 10 mL de acetato de etilo. Se agitó durante 15 minutos y se guardó a 5°C durante la noche. Se filtró sobre una cama de celita, lavando con 10 mL de acetato de etilo; se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo tres veces más con 10 mL

cada una de acetato de etilo. -El extracto orgánico se lavó con bicarbonato de sodio al 10%, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a sequedad en rotavapor, para dar 0.43 g de un aceite cuya composición fue determinada por CLAR y por espectrometría de RMP.

6.1.1.2 Purificación de la 1-hidroxi-1-fenil-2-propanona. Se realizó la separación cromatográfica de 0.8 g de la mezcla de fermentación en una columna de sílice (50 g), utilizando como eluyente cloruro de metileno:acetato de etilo 98:2. Se obtuvieron 18 fracciones de 20 mL que fueron examinadas por cromatografía en capa fina; se reunieron las fracciones que contenían la misma sustancia y se eliminó el disolvente en rotavapor. Los productos en las fracciones fueron caracterizados por sus espectros de RMP. Se determinó la rotación óptica de la 1-hidroxi-1-fenil-2-propanona aislada.

6.1.2 Diseño experimental para la optimización de la síntesis de 1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (C) a partir de benzaldehído por fermentación con *S. cerevisiae*. Se estudió el efecto de la modificación de diferentes variables en la obtención de la 1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (C) a partir de benzaldehído por fermentación con *S. cerevisiae*, con el objeto de incrementar la producción de C. Empleando la metodología descrita en 6.1.1 se realizaron por lo general cuatro experimentos simultáneos. En cada caso se repitieron, en un experimento posterior, las condiciones que produjeron el mayor rendimiento del producto deseado (C). El aislamiento de la mezcla de productos y la cuantificación de éstos se realizó utilizando el método que se describe en 6.1.1.1.

Las variables estudiadas fueron:

- Marcas de levaduras de panificación comerciales.
- Medio de fermentación
- pH
- Proporción de acetaldehído
- Número de adiciones de aldehídos
- Relación masa celular/sustrato (m/s)

6.1.2.1 Biotransformación de benzaldehído con *S. cerevisiae* empleando diferentes marcas comerciales de levaduras de panificación. Se realizaron tres experimentos, empleando en cada uno de ellos 1.5 g (base seca) de levaduras de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) de tres marcas comercialmente disponibles en el mercado. Las marcas utilizadas fueron: SAFMEX (deshidratada), AZTECA (prensada) y LEVIATAN (prensada). Previamente, se determinó la cantidad de humedad de cada una de las levaduras comerciales secando una muestra de 0.5 g de cada una de las levaduras a 50°C hasta peso constante.

6.1.2.2 Biotransformación de benzaldehído con *S. cerevisiae* variando el medio de fermentación. Con las levaduras marca SAFMEX (empleadas en lo sucesivo), se estudió la conveniencia de utilizar una solución 0.05M de fosfatos de pH 5.5 y como nutriente 0.125 g de extracto de levadura, para lo cual se hicieron cuatro experimentos combinando ambas variables: 1) Fosfatos 0.004 M pH 5.5 / licor de maíz; 2) Fosfatos 0.05 M pH 5.5 / licor de

maíz; 3) Fosfatos 0.004 pH 5.5 M / extracto de levadura; 4) Fosfatos 0.05 M pH 5.5 / extracto de levadura.

6.1.2.3 Biotransformación de benzaldehído con *S. cerevisiae* variando el pH. Se realizaron cuatro fermentaciones utilizando como medio soluciones buffer de fosfatos 0.05 M de pH 5.5 y extracto de levadura (empleados en lo sucesivo) con los siguientes pH's: 4.0, 4.5, y 5.0.

6.1.2.4 Biotransformación de benzaldehído con *S. cerevisiae* con adición de diferentes cantidades de acetaldehído. Se realizaron tres experimentos con levaduras de panificación marca SAMEX, variando la proporción de acetaldehído con relación a benzaldehído: 25%, 12.5% y 0% (p/p).

6.1.2.5 Biotransformación de benzaldehído con *S. cerevisiae* variando el número de adiciones de aldehídos. En cuatro experimentos se modificó el número de adiciones de aldehídos a 7, 5, 3 y 1. El tiempo total de la fermentación fue mantenido en 12 hrs.

6.1.2.6 Biotransformación de benzaldehído con *S. cerevisiae* variando la relación masa celular / sustrato. Se modificó la proporción de benzaldehído (más 50% de acetaldehído) con relación al peso de levaduras empleado. Se hicieron 10 adiciones y se permitió la fermentación durante 12 hrs. Se probaron las siguientes relaciones de masa celular / sustrato (m/s): 3.5, 4, 4.5, 5.

6.1.3 Método optimizado de biosíntesis de 1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (C) a partir de benzaldehído con *S. cerevisiae*. A 240 mL de solución buffer de fosfatos 0.05 M de pH 5.5, 10 g de sacarosa y 0.5 g de extracto de levadura, contenidos en un matraz erlenmeyer de 1 L se adicionaron 7.2 g de levaduras de panificación SAFMEX, se protegió la boca del matraz con algodón y se cultivó a 30°C con agitación durante 1 hr. Se inició la adición lenta de una mezcla de benzaldehído (1.6 mL) y acetaldehído (1 mL) en 7 porciones, una cada hora, manteniendo la agitación y la temperatura constantes. Después de la última adición se agitó a la misma temperatura una hora más.

Aislamiento de la mezcla de productos de fermentación: Al caldo de fermentación se adicionaron 60 mL de acetato de etilo y se saturó con cloruro de sodio. Se agitó durante 15 minutos, se filtró sobre celita y se hicieron tres extracciones con 60 mL cada una de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con 40 mL de solución al 5% de bicarbonato de sodio, se secó con sulfato de sodio y se concentró a presión reducida hasta sequedad. El producto crudo fue sometido a análisis por CLAR y por espectrometría de R.M.P.

6.2 Biotransformación de benzaldehído con *K. marxianus*. Se comparó esta biotransformación con células aisladas y con células en su medio de cultivo.

6.2.1 Propagación de *K. marxianus*. Se cultivó la levadura en un matraz de 1000 mL con 400 mL de medio estéril con la siguiente composición (g/100 mL): 5 g glucosa, 0.2 g sulfato de amonio, 0.05 g fosfato monosódico, 0.05 g sulfato de magnesio, 0.2 g extracto de levadura. Se incubó durante 24 hrs con agitación a 32°C.

6.2.1.1 Aislamiento de *K. marxianus*. Las células fueron aisladas por centrifugación a 5000 R.P.M. durante 10 min y se mantuvieron a 5°C en condiciones estériles.

6.2.2. Biotransformación de benzaldehído con células aisladas de *K. marxianus* Se reprodujeron las condiciones de fermentación descritas en 6.1.3, pero utilizando 3.5 g de *K. marxianus* (con un contenido de humedad aproximado de 65%) en lugar de 1.8 g de *S. cerevisiae* seca.

6.2.3 Biotransformación de benzaldehído con *K. marxianus* en su medio de cultivo. Se realizó la propagación de *K. marxianus* en 400 mL del medio de cultivo descrito en 6.2.1, empleando las mismas condiciones. Se adicionaron al caldo de cultivo 12.5 g de sacarosa y solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta pH de 5.5. Se inició entonces la adición de benzaldehído (1 g), mezclado con el acetaldehído (0.5 g), en 7 porciones, una cada hora. Se mantuvieron mientras tanto las condiciones de temperatura y agitación. Dos horas después de la última adición se terminó la fermentación y se aisló la mezcla de productos siguiendo la metodología descrita en 6.1.3.

6.3 Biotransformación de benzaldehídos con sustituyentes oxigenados en posición 4- por fermentación con *S. cerevisiae* y con *K. marxianus*. Se sometió cada uno de los siguientes aldehídos a las condiciones de fermentación descritas en 6.1.3. y 6.2.2. :

- I. 4-hidroxibenzaldehído
- II. 4-acetoxibenzaldehído
- III. 4-benciloxibenzaldehído
- IV. 4-metoxibenzaldehído

Se determinó el progreso de la transformación por cromatografía en capa fina, prolongándose el tiempo de reacción hasta por 72 hrs para los aldehídos I y III.

6.4 Biosíntesis de 1-(4-metoxifenil)-1-hidroxi-2-propanona (C') a partir de 4-metoxibenzaldehído (B'). Se estudió la biotransformación de 4-metoxibenzaldehído (B') en condiciones de fermentación de ambas variedades de levaduras, *S. cerevisiae* y *K. marxianus* (células aisladas), con el objetivo de obtener la 1-(4-metoxifenil)-1-hidroxi-2-propanona (C').

6.4.1 Biotransformación de 4-metoxibenzaldehído con *S. cerevisiae*. En cuatro experimentos simultáneos, se siguió el procedimiento descrito en 6.1.3., pero utilizando 4-metoxibenzaldehído en lugar de benzaldehído en las siguientes cantidades: 0.4 g, 0.3 g, 0.2 g y 0.1g.

6.4.2 Biotransformación de 4-metoxibenzaldehído con *K. marxianus* (células aisladas). Se realizaron cuatro fermentaciones como la descrita en 6.2.2, pero adicionando 4-metoxibenzaldehído en lugar de benzaldehído en las siguientes cantidades: 0.4 g, 0.3 g, 0.2 g y 0.1g..

6.4.3 Biotransformación de 4-metoxibenzaldehído con *K. marxianus* en su medio de cultivo. Se estudió el efecto de la modificación de diferentes variables en la producción de la 1-hidroxi-1-(4-metoxifenil)-propanona (C') a partir de 4-metoxibenzaldehído, durante la

fermentación de *K. marxianus*, empleando la metodología general citada en 6.4.3.1. Las variables estudiadas fueron: relación masa celular/sustrato (m/s), cantidad de sacarosa, pH, número de adiciones de aldehidos, tiempo total de fermentación.

6.4.3.1 Método general de biotransformación de 4-metoxibenzaldehido con *K. marxianus* en su medio de cultivo. Se prepararon 400 mL de medio de cultivo líquido conteniendo 5% de glucosa, 0.2% de sulfato de amonio, 0.05% de fosfato monosódico, 0.05% de sulfato de magnesio y 0.2% de extracto de levaduras. Se distribuyeron en cinco matraces erlenmeyer de 250 mL (80 mL de medio en cada uno), y se esterilizaron a 12 psi durante 30 minutos. Uno de los matraces se inoculó con células de *K. marxianus* y se incubó a 30°C con agitación durante 24 hrs. De este precultivo se tomaron 4 mL para sembrar cada uno de los cuatro medios restantes, los cuales fueron incubados también por 24 hrs a 30°C.

Después de la propagación de las levaduras, a cada uno de los cultivos se adicionó la cantidad preestablecida de sacarosa y una solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta el pH determinado. Se inició entonces la adición de 4-metoxibenzaldehido, mezclado con 50% en peso de acetaldehido, según la cantidad de éstos y el número de adiciones predeterminados. (Ver tabla 7.3). Se mantuvieron mientras tanto las condiciones de temperatura y agitación.

Después de la última adición se tomaron muestras cada hora para monitorear por cromatografía en capa fina el progreso de la transformación y decidir el tiempo adicional de fermentación. Cuando la fermentación se dio por terminada, se aisló la mezcla de productos siguiendo la metodología descrita en 6.1.3.1. El análisis de la mezcla de reacción se realizó por espectrometría de RMP.

6.4.3.1.1 Variación de la relación masa celular/sustrato en la fermentación de *K. marxianus* con 4-metoxibenzaldehido (B´). En tres experimentos se adicionó el 4-metoxibenzaldehido en las siguientes cantidades: 0.4, 0.3 y 0.2 g. En el cuarto matraz se redujo el tiempo de fermentación a doce horas para la concentración más baja de sustrato. El acetaldehido se adicionó mezclado con el sustrato y en una proporción de 50% en relación a éste.

6.4.3.1.2 Variación de la cantidad de sacarosa en la fermentación de *K. marxianus* con 4-metoxibenzaldehido (B´). Para 0.2 g de sustrato y 0.1 de acetaldehido, se realizaron cuatro experimentos variando la cantidad de sacarosa adicionada al medio de fermentación. Se emplearon las siguientes cantidades de sacarosa: 1, 1.5, 2 y 2.5 g (1.25%, 1.85%, 2.5% y 3% respectivamente).

6.4.3.1.3 Variación del pH en la fermentación de *K. marxianus* con 4-metoxibenzaldehido (B´). Se modificó el pH del medio después de la propagación de las células por adición de una solución 0.1 N de hidróxido de sodio. Los pH's ensayados fueron: 5.5, 5, 4.5 y 4.

6.4.3.1.4 Variación en el número de adiciones de sustrato en la fermentación de *K. marxianus* con 4-metoxibenzaldehido (B´). Se hicieron cuatro experimentos variando el número de adiciones del sustrato (0.2 g) mezclado con acetaldehido (0.1 g). Se compararon

los resultados haciendo 7, 5, 3 y 1 adiciones con periodicidad de 1 hora. El tiempo total de fermentación en todos los casos fue de doce horas.

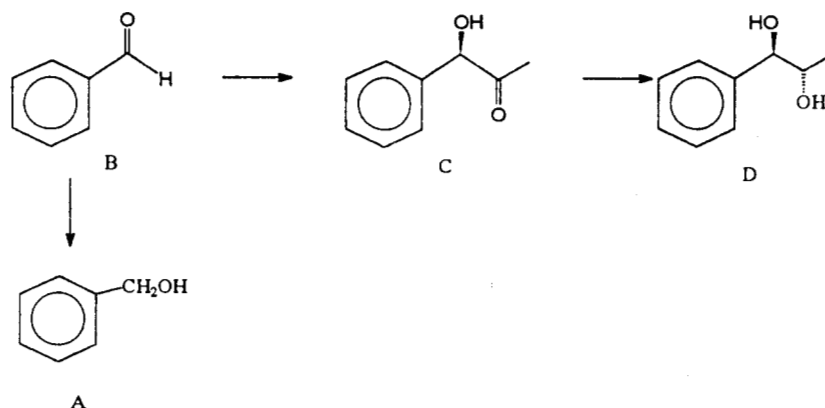
6.4.3.1.5 Variación en el tiempo de fermentación de *K. marxianus* con 4-metoxibenzaldehído (B'). Se repitió la serie de experimentos descrita en 6.4.1.1.2.4, pero el tiempo total de fermentación se fijó en dos horas después de la última adición.

6.4.3.2 Método optimizado de obtención de 1-(4-metoxifenil)-1-hidroxi-2-propanona (C') a partir de 4-metoxibenzaldehído por biotransformación promovida por *K. marxianus*. Se realizó un cultivo de *K. marxianus* en un matraz erlenmeyer de 1 L conteniendo 400 mL del medio descrito en 6.2.1. Después de la propagación de las levaduras se adicionaron 10 g de sacarosa y una solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta pH de 5.0. Se inició entonces la adición de 4-metoxibenzaldehído (1 g), mezclado con el acetaldehído (0.5 g), en 10 porciones, una cada hora. Se mantuvieron mientras tanto las condiciones de temperatura y agitación. Dos horas después de la última adición se terminó la fermentación y se aisló la mezcla de productos de la manera usual. El análisis de la mezcla de reacción se realizó por espectrometría de RMP.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Biosíntesis de (R)-1-hidroxi-1-fenilpropanona (C) por fermentación de *S. cerevisiae* en presencia de benzaldehído. En la primera parte del proyecto se reprodujeron y optimizaron las condiciones descritas en la literatura (Oldrich, 1986) para la obtención, a partir de benzaldehído, de la (R)-1-hidroxi-1-fenilpropanona (C, Esquema 7.1), utilizando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* deshidratada disponible comercialmente en México (Levadura Comercial de Panificación SAFMEX).

Esquema 7.1



Está reportado (Ohta y col., 1986) que el principal producto lateral de esta biotransformación es el diol (D), resultado de la reducción de la cetona (C), teniendo el pH del medio de fermentación una influencia determinante en la producción de este metabolito; a pH's ácidos (4-6) se inhibe la reducción. Nosotros encontramos, sin embargo, que en todos los experimentos realizados el producto principal es el alcohol bencílico (A), producto de la bio-reducción del benzaldehído. Esto sucedió aún con la adición de acetaldehído a la mezcla de fermentación, lo cual está reportado que disminuye la formación de productos de reducción, aparentemente porque funciona como un aceptor de hidrógeno.

Bajo las condiciones descritas en 6.1.1 y utilizando las levaduras de panificación SAFMEX, se obtuvo como producto de reacción un aceite cuya composición fue determinada por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMP), calculándose la proporción de los productos en la mezcla de reacción como se muestra en la Tabla 7.1 (exp. No. 6.1.2.1.a), (espectro 6.1.2.1.a)

De una parte de esta mezcla se separaron los productos por cromatografía en columna de sílice. Se obtuvieron, a partir de 0.8 g del crudo de esta reacción, 0.139 g de un producto de polaridad ligeramente menor a la del alcohol bencílico, que fue identificado como la 1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (C), por medio de su espectro de RMP (Brussee, 1988): δ (ppm) 2.05 (s, 3H, CH₃ ; 4.6 (s, 1H, OH) ; 5.0 (s, 1H, CH); 7.32-7.41 (m, 5H Ar). $[\alpha]_D^{20} - 277^\circ$ (c=1, CHCl₃). (ver espectro C) E.e. 70%. (reportado $[\alpha]_D^{20} - 395^\circ$) (Fuganti y col., 1988). También fue aislado por cromatografía en capa fina el diol (D) para usarlo como referencia en

el análisis cromatográfico y espectroscópico: δ (ppm) 1.05 (d, 3H, $j = 3.0$, CH_3); 2.75 (s, 2H, 2 x OH); 3.9-4.4 (m, 1H, CH-2); 4.7 (d, 1H CH-1); 7.25 (s, 5H, Ar). (Espectro D).

Se realizaron entonces una serie de experimentos encaminados a incrementar la producción de C durante esta fermentación. Las variables estudiadas fueron:

- a) marcas comerciales de levaduras de panificación
- b) medio de fermentación
- c) proporción de acetaldehído
- d) número de adiciones de benzaldehído/acetaldehído
- e) proporción de células

7.1.1 Biotransformación de benzaldehído con diferentes marcas comerciales de levaduras de panificación. En la Tabla 7.1 se resumen los resultados obtenidos aplicando la metodología descrita en 6.1.1 sobre diferentes marcas comerciales de levaduras (exp. 6.1.2.1 a-c). Se encontró que las levaduras de panificación SAFMEX dieron un porcentaje mayor del producto C. También se comprobó que estas levaduras permiten una mayor reproducibilidad en los resultados, por lo que fueron las levaduras de panificación empleadas en los experimentos posteriores.

7.1.2 Efecto de modificaciones en el medio de fermentación en la producción de 1-hidroxi-1-fenilpropanona (C) a partir de benzaldehído por fermentación con *S. cerevisiae*. Considerando que una solución de fosfatos de mayor concentración podría servir como amortiguador del pH de la reacción, se probó la biotransformación utilizando como medio de fermentación soluciones de fosfatos de diferente concentración y extracto de levadura como fuente de nitrógeno. En la tabla 7.1 (exp. 6.1.2.2.a-d) se marca la proporción obtenida de productos de la fermentación utilizando soluciones 0.05 M y 0.1 M de fosfatos de pH 5.5 (a diferencia de lo que está descrito en la patente, aprox. 0.004M) y extracto de levadura (0.125 g) en lugar de licor de maíz, para lo cual se hicieron cinco fermentaciones combinando las variables. Se observó un ligero incremento en la producción de C al utilizar una solución buffer de fosfatos de concentración 0.05 M y extracto de levadura, por lo que en experimentos sucesivos fue éste el medio de fermentación empleado.

7.1.3 Efecto del pH del medio de fermentación en la producción de 1-hidroxi-1-fenilpropanona (C) a partir de benzaldehído por fermentación con *S. cerevisiae*. Se hicieron tres fermentaciones empleando buffer 0.05M con pH de 4.0, 4.5 y 5.0. En todas las pruebas se observó un menor rendimiento de C, por lo que se concluyó que el pH inicial de 5.5 es el más conveniente, observándose que el pH del medio hacia el final de la fermentación llega hasta 3 - 3.5. (Ver tabla 7.1; exp. 6.1.2.3 a - c).

7.1.4 Efecto de la cantidad de acetaldehído adicionada en la producción de 1-hidroxi-1-fenilpropanona (C) a partir de benzaldehído por fermentación con *S. cerevisiae*. Se realizaron cuatro fermentaciones variando la proporción de acetaldehído con relación a benzaldehído: 50%, 25%, 12.5% y 0%. (Tabla 7.1; exp. 6.1.2.4 a - c).

Exp No.	levaduras	medio de fermentación	pH	Ac/B	No. de adiciones	m/s	% A	% B	% C	% D
6.1.2.1.a	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.004 M/licor de maiz	5.5	0.5	10	3.5	66	13.4	15.6	5
6.1.2.1.b	<i>S. cerevisiae</i> Azteca	fosfatos 0.004 M/licor de maiz	5.5	0.5	10	3.5	61	21	12	3
6.1.2.1.c	<i>S. cerevisiae</i> Levitán	fosfatos 0.004 M/licor de maiz	5.5	0.5	10	3.5	48	44.5	5.5	2
6.1.2.2.a	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/licor de maiz	5.5	0.5	10	3.5	68	12	12	8
6.1.2.2.b	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.004 M/extracto de lev.	5.5	0.5	10	3.5	68.5	17.5	12	2
6.1.2.2.c	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/ extracto de lev.	5.5	0.5	10	3.5	68	12.5	16.5	3
6.1.2.2.d	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.1 M/extracto de lev.	5.5	0.5	10	3.5	59.6	25.4	11	4
6.1.2.3.a	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/ extracto de lev.	4.0	0.5	10	3.5	35.3	56	8.7	--
6.1.2.3.b	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/ extracto de lev.	4.5	0.5	10	3.5	48	42	8	2
6.1.2.3.c	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/ extracto de lev.	5.0	0.5	10	3.5	69	10	14.5	6.5
6.1.2.4.a	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/extracto de lev.	5.5	0.25	10	3.5	67	12	13.5	7.5
6.1.2.4.b	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/extracto de lev.	5.5	0.125	10	3.5	70	9.5	12.5	8
6.1.2.4.c	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/extracto de lev.	5.5	0	10	3.5	67.3	10.4	15.3	7
6.1.2.5.a	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/extracto de lev.	5.5	0.5	7	3.5	65	13	17.3	4.7
6.1.2.5.b	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/extracto de lev.	5.5	0.5	5	3.5	68	11	13.5	7.5
6.1.2.5.c	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/extracto de lev.	5.5	0.5	3	3.5	60.5	17.2	11.3	11
6.1.2.5.d	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/extracto de lev.	5.5	0.5	1	3.5	53.5	24.5	12	10
6.1.2.6.a	<i>S. cerevisiae</i> SAEMEX	fosfatos 0.05 M/extracto de lev.	5.5	0.5	7	4	64	13	18	5.5
6.1.2.6.b	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/extracto de lev.	5.5	0.5	7	4.5	65	3.8	25.5	5.7
6.1.2.6.c	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/extracto de lev.	5.5	0.5	7	5	68.5	---	18.5	13
6.1.3	<i>S. cerevisiae</i> SAFMEX	fosfatos 0.05 M/extracto de lev.	5.5	0.5	7	4.5	57.2	5.8	25.3	11.6
6.2.2	<i>K. marxianus</i> (aisladas)	células aisladas	5.5	0.5	7	3.5	62	4	28	6
6.2.3	<i>K. marxianus</i> (cultivo)	caldo de cultivo	5.5	0.5	7	3.5	58	12	26.4	3.5

Tabla 7.1

Proporción de productos obtenidos en la biotransformación de benzaldehído durante la fermentación de levaduras.

Ac/B = relación acetaldehído / benzaldehído

m/s = relación masa celular (base seca) / sustrato (benzaldehído)

A = alcohol bencílico; B = benzaldehído; C = cetona; D = diol

El empleo de acetaldehído como preventor de las reducciones que conducen a los productos no deseados (A) y (D) no parece tener un efecto importante, a diferencia de lo descrito en la patente, aunque esto podría ser debido a las condiciones propias de la Ciudad de México, que permiten la ebullición del acetaldehído a 17°C, por lo que la pérdida de este reactivo por evaporación en las condiciones normales de fermentación es más significativa que en una fermentación realizada a menor altura sobre el nivel del mar.

7.1.5 Efecto del número de adiciones de aldehídos en la producción de 1-hidroxi-1-fenilpropanona (C) a partir de benzaldehído por fermentación con *S. cerevisiae*. En cuatro experimentos se redujo el número de adiciones de aldehídos a 7, 5, 3 y 1. En todos los casos el tiempo total de fermentación fue de 12 hrs. Los resultados de estos experimentos se registran en la tabla 7.1 (exp. 6.1.2.5.a - d). El mejor rendimiento, para una proporción de 3.5 g de células por gramo de sustrato, correspondió a siete adiciones.

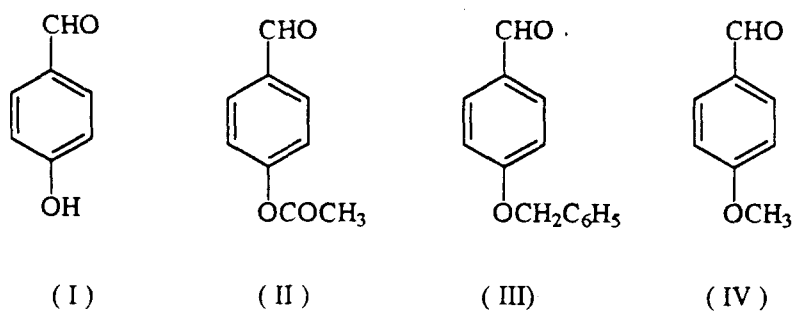
7.1.6 Efecto de la relación masa celular/sustrato en la producción de 1-hidroxi-1-fenilpropanona (C) a partir de benzaldehído por fermentación con *S. cerevisiae*. Se modificó la cantidad de benzaldehído adicionado (en 7 porciones, una cada hora) a 1.5 g de levaduras, para tratar de determinar la relación ideal que conduce al mayor consumo del sustrato (B) y menor producción de (A) y (D). Se probaron las siguientes relaciones de masa celular/benzaldehído (m/s): 3.5, 4, 4.5, 5. El tiempo total de la fermentación fue de 12 hrs. Se obtuvo el cetol (C) en la mayor proporción (25.5%) cuando se utilizó una proporción de 4.5 g de levaduras por gramo de benzaldehído (Tabla 7.1; exp. 6.5.2.6.a - c).

La proporción ideal de células en relación con benzaldehído depende del número de adiciones que se hacen de dicho sustrato, así como del tiempo que se conceda a la fermentación después de la adición del sustrato. Si se hace una sola adición de 0.4 g de benzaldehído para 1.5 g de levaduras, el sustrato resulta tóxico para las células y su crecimiento y viabilidad son disminuidos. Por otro lado, una proporción grande de células promueve el consumo de todo el sustrato en aproximadamente una hora y también promoverá la reducción del cetol (C) al diol (D). Esto ha sido verificado durante el transcurso de las fermentaciones por medio de cromatografía en capa fina o cromatografía de líquidos de alta resolución.

En la metodología 6.1.3 se describió el escalamiento con las condiciones optimizadas utilizando *S. cerevisiae*. Los análisis cromatográfico y de resonancia magnética del producto crudo de esta reacción coinciden en asignar a los componentes de esta mezcla una proporción de 57.2% de alcohol bencílico (A), 5.8 % de benzaldehído (B), 25.3% de 1-hidroxi-1-fenilpropanona (C), y 11.6 % del diol (D). (espectro 6.1.3).

7.2 Fermentación de *Kluyveromyces marxianus* con benzaldehído para la producción de 1-hidroxi-1-fenilpropanona. Buscando incrementar el rendimiento del producto C, se realizaron nuevos experimentos en los que se utilizó otra variedad de levaduras, la *Kluyveromyces marxianus*. Se compararon los resultados con la utilización de células aisladas (metodología 6.2.2) y con células en su medio de cultivo (metodología 6.2.3). En la Tabla 7.1 (exp. 6.2.2 y 6.2.3) se señalan los rendimientos relativos de los productos A, B, C y D en las mezclas crudas de productos de fermentación. Se observó que *K. marxianus*, ya sea empleando células aisladas o sin aislar, en su medio de cultivo, promueve la transformación deseada con mayor eficiencia que la cepa de *S. cerevisiae* empleada (espectros 6.2.2 y 6.2.3).

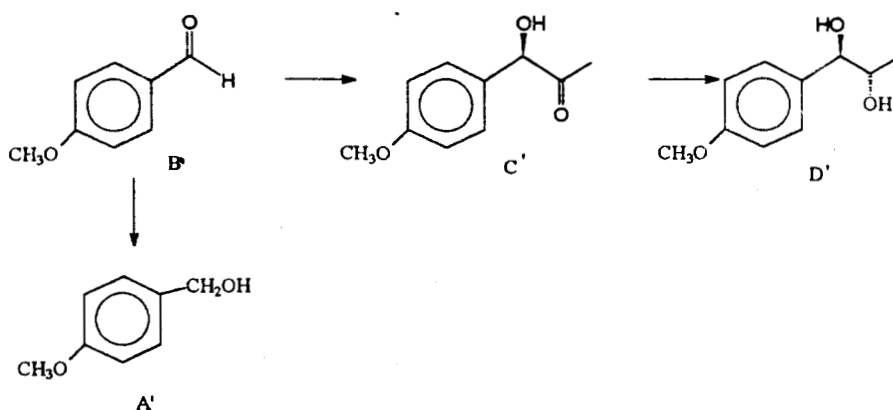
7.3 Biotransformación de benzaldehídos con sustituyentes oxigenados en posición 4- por fermentación con *S. cerevisiae* y *K. marxianus*. A pesar de los modestos rendimientos, esta biotransformación podría aún ser considerada como un medio útil de preparación de aciloínas como intermediarios para la obtención de los aminopropanoles que pretendemos sintetizar, por lo que se emprendió el estudio de la misma sobre sustratos con funcionalidad oxigenada en la posición 4-, que pueden producir intermediarios útiles en la síntesis de algunos fármacos, como la nilidrina y la isoxuprina. Con este propósito se probó inicialmente, con las metodologías descritas en 6.1.3 y 6.2.2, la biotransformación con *S. cerevisiae* y *K. marxianus* sobre el p-hidroxibenzaldehído (I); resultando la transformación fuertemente inhibida y recuperándose la materia prima, seguramente debido a la toxicidad del grupo fenólico.* Posteriormente se probó la misma fermentación con p-acetoxibenzaldehído (II), el cual tampoco resultó ser un buen sustrato por ser fácilmente hidrolizado por enzimas de las levaduras, siendo el producto principal el p-hidroxibenzaldehído (I) (identificado por cromatografía en capa fina). Otro sustrato probado fue el p-benciloxibenzaldehído (III), el cual, probablemente debido a su baja solubilidad en el medio, fue recuperado casi cuantitativamente después de 72 hrs de reacción. Las reacciones fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina.



El compuesto metoxilado (IV) resultó ser el sustrato más conveniente para esta biotransformación, tanto con *S. cerevisiae* como con *K. marxianus*, observándose en cromatografía en capa fina una mezcla de productos similar a la mezcla obtenida de la fermentación de benzaldehído (esquema 7.2), por lo que se repitieron las fermentaciones en dos series de experimentos, una con cada levadura, en presencia de cantidades diferentes de 4-metoxibenzaldehído.

* Se realizó un estudio de viabilidad de la levadura *K. marxianus* en un medio base conteniendo concentraciones variables (0.05, 0.1 y 0.2 g/100mL) de 4-hidroxibenzaldehído y de su sal bisulfítica, observándose que dichos compuestos fenólicos inhiben el crecimiento de la levadura aún en las concentraciones más bajas.

Esquema 7.2



En la tabla 7.2 se señala la proporción de los productos obtenidos a partir de 4-metoxibenzaldehído en fermentaciones con ambas variedades de levaduras, utilizando las metodologías descritas en 6.4.1 y 6.4.2. En la fermentación con *K. marxianus* se produjo mayor proporción del metabolito deseado (C'). El diol (D') no ha sido considerado por ser incierta su cuantificación por el método empleado (RMP).

Tabla 7.2

Proporción de productos obtenidos en la fermentación de levaduras con p-metoxibenzaldehído y acetaldehído.

experimento	LEVADURAS	g sustrato	% A'	% B'	% C'
6.4.1.a	<i>S. cerevisiae</i>	0.4	31.5	68.5	---
6.4.1.b	"	0.3	28	70	2
6.4.1.c	"	0.2	43	52	5
6.4.1.d	"	0.1	64	21	5
6.4.2.a	<i>K. marxianus</i>	0.4	35	61	4
6.4.2.b	"	0.3	39.5	54	6.5
6.4.2.c	"	0.2	40	51	9
6.4.2.d	"	0.1	79	12	9

7.4 Biotransformación de 4-metoxibenzaldehído con *K. marxianus* en su caldo de cultivo.

Se plantearon entonces una serie de experimentos con el objetivo de encontrar las condiciones de fermentación que llevaran al producto deseado, la 1-hidroxi-1-(4-metoxifenil)-propanona (C') con mayor rendimiento. A continuación se discuten los resultados de los experimentos realizados con *K. marxianus* en su caldo de cultivo según el método general citado en 6.4.3.1. Las variables estudiadas fueron:

- Proporción de células
- Cantidad de sacarosa
- pH

- Número de adiciones de aldehidos
- Tiempo total de fermentación

Los análisis de las mezclas crudas de reacción fueron realizados por medio de RMP. No se logró desarrollar un sistema de elución para CLAR que separara eficientemente C' y B' para realizar un análisis confiable por este método, por lo que se decidió analizar la composición de las mezclas por RMP, aunque por este método la cuantificación del diol (D') es poco precisa.

7.4.1 Efecto de la variación de la relación masa celular/sustrato en la biotransformación de 4-metoxibenzaldehido durante la fermentación de *K. marxianus* (experimento 6.4.3.1.1). El experimento en el que se emplearon 0.2 g de sustrato (en 10 adiciones y mezclado con 0.1 g de acetaldehido) para 80 mL del caldo de cultivo (relación masa celular/sustrato de aprox. 4.8, considerando una producción aproximada de 1- 1.2 g de células/100 mL de medio de cultivo) dio un mayor rendimiento del producto C' por lo que fue ésta la proporción de sustrato empleada en lo sucesivo. (tabla 7.3, exp. 6.4.3.1.1.a-d),

7.4.2 Efecto de la variación en la fuente de carbono en la biotransformación de 4-metoxibenzaldehido durante la fermentación de *K. marxianus* (experimento 6.4.3.1.2). Una concentración de sacarosa de 2.5% favoreció la transformación completa de (B'). (Ver tabla 7.3, exp. 6.4.3.1.2.a-c). El empleo de glucosa como fuente de carbono dio como resultado una menor transformación del sustrato.

7.4.3 Efecto de la variación en el pH sobre la biotransformación de 4-metoxibenzaldehido en la fermentación de *K. marxianus* (experimento 6.4.3.1.3). Se hicieron cuatro experimentos ajustando a diferente pH el medio de fermentación después de la propagación de las células. Los pH's ensayados fueron: 5.5, 5, 4.5 y 4. El mejor rendimiento de C' fue logrado con un pH inicial de 5, por lo que fue el empleado en experimentos posteriores. Los resultados se resumen en la tabla 7.3 (experimentos 6.4.3.1.3.a-c).

7.4.4 Efecto de la variación en el número de adiciones de aldehidos sobre la biotransformación de 4-metoxibenzaldehido, en la fermentación de *K. marxianus* (experimento 6.4.3.1.4). Se observó que al reducir el número de adiciones el rendimiento de C' disminuye, por lo que es conveniente adicionar el sustrato en diez porciones. (Tabla 7.3; exp. 6.4.3.1.4.a-d).

7.4.5 Efecto de la variación en el tiempo de fermentación sobre la biotransformación de 4-metoxibenzaldehido durante la fermentación de *K. marxianus* (experimento 6.4.3.1.5). Se repitió la serie de experimentos citada en 7.4.4, pero el tiempo total de fermentación se fijó en dos horas después de la última adición. No se logró por este método mejorar la proporción del producto C' en la mezcla de fermentación. (Tabla 7.3; exp. 6.4.3.1.5.a-d).

Los intentos realizados para aislar, por cromatografía, una muestra pura del producto 1-hidroxi-1-(4-metoxifenil)-2-propanona (C') no han sido exitosos, pues este producto tiene una polaridad muy semejante -en todos los sistemas de elución probados- al producto de reducción (A'), y se carece, por lo tanto, de una muestra pura para la determinación de la rotación óptica.

exp. No.	m/s	pH	sacarosa %	No. adiciones	Tiempo total hrs.	% A'	% B'	% C'
6.4.3.1.1.a	2.4	5.5	1.25	10	24	44	54	2
6.4.3.1.1.b	3.2	5.5	1.25	10	24	34.7	59	6.3
6.4.3.1.1.c	4.8	5.5	1.25	10	24	80.8	12.6	6.5
6.4.3.1.1.d	9.6	5.5	1.25	10	12	84.6*	2.6	5.2
6.4.3.1.2.a	4.8	5.5	1.85	10	12	53.3	40	6.7
6.4.3.1.2.b	4.8	5.5	2.5	10	12	88.5	---	11.5
6.4.3.1.2.c	4.8	5.5	3.0	10	12	79	15.8	5.2
6.4.3.1.2.d	4.8	5.5	0	10	12	34	59	7
6.4.3.1.3.a	4.8	5.0	2.5	10	12	78	7.3	14.7
6.4.3.1.3.b	4.8	4.5	2.5	10	12	81	14	5
6.4.3.1.3.c	4.8	4.0	2.5	10	12	12	88	--
6.4.3.1.4.a	4.8	5.0	2.5	8	12	93.5	---	6.5
6.4.3.1.4.b	4.8	5.0	2.5	6	12	83.5	11.5	5
6.4.3.1.4.c	4.8	5.0	2.5	3	12	81.6	16	2.4
6.4.3.1.4.d	4.8	5.0	2.5	1	12	43	52	4
6.4.3.1.4.e	4.8	5.0	2.5	1	24	91.8*	---	---
6.4.3.1.5.a	4.8	5.0	2.5	8	10	90.9	---	9.1
6.4.3.1.5.b	4.8	5.0	2.5	6	8	72.5	21	6.5
6.4.3.1.5.c	4.8	5.0	2.5	3	5	49	46	5
6.4.3.1.5.d	4.8	5.0	2.5	1	3	30	63	7

Tabla 7.3

Proporción de productos obtenidos de la fermentación de *K. marxianus*, en su caldo de cultivo, con 4-metoxibenzaldehído.

A' = alcohol bencílico; B' = benzaldehído; C' = cetona; D' = diol

m/s = relación masa celular (base seca) / sustrato (p-metoxibenzaldehído) * Se observó una proporción importante de D' (6-10%).

7.5. Cuantificación de los productos en las mezclas crudas de reacción. Interpretación de los espectros de R.M.N.¹H

En los espectros de las mezclas crudas de reacción se separan claramente las señales correspondientes a los diferentes grupos de hidrógenos que forman parte de las moléculas que integran dichas mezclas.

Esto se ilustra en el **espectro 6.4.3.1.5.b**, en el que se pueden ver las siguientes señales:

- El átomo de hidrógeno perteneciente al grupo aldehído se observa a $\delta = 9.8$ ppm como una señal simple.
- Los 4 protones unidos al anillo aromático se localizan alrededor de $\delta = 7$, y se presentan como doblete para los compuestos A', B' y C', aunque con diferente desplazamiento químico (ver también espectros B' y A').
- El hidrógeno base del alcohol en el cetol se observa como singulete a $\delta = 4.9$.
- El metileno (CH₂) correspondiente al alcohol p-metoxibencílico (A') es señal simple y se ubica en $\delta = 4.5$ ppm.
- Los protones de los metoxilos se muestran como una señal simple con el mismo desplazamiento ($\delta = 3.7$) para A' y C' (se observa una sola señal), y ligeramente desplazado a campo bajo ($\delta = 3.8$) para el metoxilo del aldehído.
- Los átomos de hidrógeno de la metilcetona del producto C' se observa a $\delta = 2.0$.
- Los protones correspondientes a los grupos OH de A' y C' aparecen juntos, generalmente como una señal ancha, con desplazamiento variable de alrededor de $\delta = 3-4$.
- El hidrógeno del metilo del compuesto D', aunque no siempre es observable debido a que algunas impurezas lo enmascaran, aparece como un doblete a $\delta = 1.0$.

La señal de integración es proporcional al número de hidrógenos responsables de cada señal, por lo que es posible, por medición de la altura de esta integral, hacer un cálculo aproximado de la proporción que guardan dichos átomos, y, por consiguiente, de la proporción de cada componente de la mezcla.

8. CONCLUSIONES

1. La biotransformación de benzaldehído (B) en 1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (C) fue estudiada con diferentes marcas de levaduras de panificación comercialmente disponibles en el país, obteniéndose el mejor rendimiento con las levaduras SAFMEX. Se determinó también que el medio de fermentación puede ser preparado empleando una solución de fosfatos 0.05 M y extracto de levadura como nutriente. El máximo rendimiento logrado es muy bajo comparado con el reportado en la literatura, lo cual puede atribuirse a características de la cepa empleada. Las condiciones óptimas encontradas para esta biotransformación son:

- pH inicial: 5 - 5.5
- relación masa celular/benzaldehído total: 4.5
- No. de adiciones 7 (en 7 hrs)
- tiempo total de fermentación 9 hrs
- adición de acetaldehído en 50% (p/p).

Hay que señalar que prácticamente todas estas variables son interdependientes, de tal manera que de la modificación de cualquiera de ellas puede surgir la conveniencia de modificar otras.

2. La variedad de levaduras *Kluyveromyces marxianus* produjo un rendimiento ligeramente mayor del cetol (C) en condiciones similares de fermentación, por lo que sería conveniente estudiar su empleo en esta biotransformación, buscando incrementar la producción de (C) y el aprovechamiento de la biomasa como fuente de proteína unicelular.

3. Se determinó la factibilidad de realizar esta biotransformación en su medio de cultivo, lo que representa un proceso más sencillo.

4. El 4-metoxibenzaldehído (B') fue, de los sustratos con función oxigenada en posición 4 sobre el anillo aromático probados, el que mejores resultados dio para esta biotransformación. Sin embargo, el producto de la condensación aciloínica (C') se generó con rendimientos aún más modestos que los obtenidos en la biotransformación de benzaldehído, debido probablemente a un mayor efecto tóxico sobre las levaduras, además de una menor reactividad de este aldehído, y obteniéndose mejores resultados con *K. marxianus* que con *S. cerevisiae*. Las condiciones que resultaron ser las más convenientes para la transformación de p-metoxibenzaldehído en 1-hidroxi-1-(4-metoxifenil)-2-propanona durante la fermentación de *K. marxianus* fueron:

- pH inicial: de 5. A pH más bajo se observó inhibición de la transformación y a pH mayor se favorecen las reducciones.
- Relación masa celular/sustrato: 4.8 (Una consideración aproximada tomando en cuenta que la producción usual de células de *K. marxianus* es de aproximadamente 10 - 12 g/L). A mayor proporción de células la transformación fue más rápida y completa, pero se favoreció mayormente la formación de productos de reducción. El número de adiciones y el tiempo de reacción necesario es dependiente de esta variable.
- Fuente de carbono: La fuente de carbono más conveniente es la sacarosa en una concentración de 2.5%.
- Adición de acetaldehído en una proporción de 50% con respecto al sustrato. Sin embargo, esta variable no parece tener una influencia definitiva en el rendimiento del producto

deseado. Por otro lado, hay incertidumbre en relación con la cantidad del reactivo realmente presente en la mezcla de fermentación, debido a su bajo punto de ebullición, y no fue posible realizar la fermentación en sistema cerrado por la presión generada debido a la producción de bióxido de carbono, además de la presión producida por el propio acetaldehído.

- Número de adiciones: Aunque el número de adiciones de los aldehídos puede reducirse, dependiendo de la cantidad de células, es conveniente hacer diez adiciones para disminuir el efecto tóxico de estas sustancias hacia las levaduras.

En cuanto a la pureza óptica del producto (C'), las dificultades encontradas para la purificación de éste, que es un líquido con polaridad muy similar al producto de reducción, han impedido que se complete este trabajo con los correspondientes estudios de rotación óptica y espectroscopía de resonancia magnética protónica con reactivos de desplazamiento quiral.

10. BIBLIOGRAFÍA

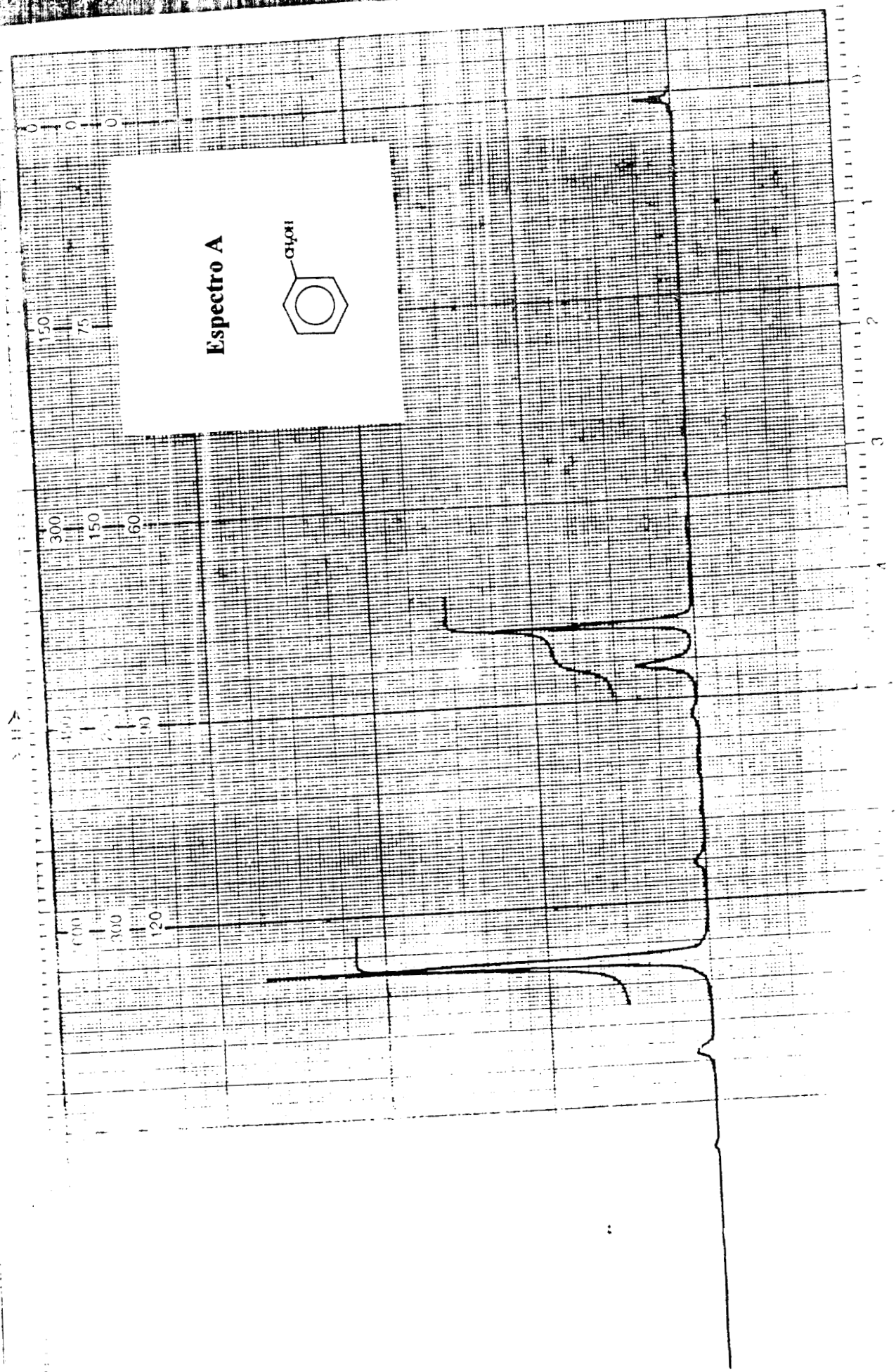
- Agarwal, S. C.; Basu, S. K. *J. Microb. Biotech.*, **1989**, *4* (2) 84.
- Allinger, N. L.; Eliel, E. L.; *Topics in Stereochemistry*, Wiley: New York, **1989**.
- Bianchetti A., L. Manara, L., *Br. J. Pharmacol.* **1990**, *100*, 831.
- Borman, S. *Chemical and Engeneering News*, June 15, **1992**, p. 5.
- Claassen, V., *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *8*, 116.
- Coughlin, R. W.; Mahmoud, W. M. *U.S. Pat. 5,173,413 (Cl.435/148 C12P7/26)*, **22 Dec 1992**.
- Cram J. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 4019.
- Crosby, J., *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4789.
- Csuk, R.; Glanzer, B. I.; *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 49.
- Davies, H. G., Green, R. H., Kelly, D. R., y Roberts, S. M., *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry*. Academic Press, London, **1989**.
- Ellaiah, P.; Krishna, K., *Indian J. Technol.*, **1988**, *26* (10) 509.
- Fuganti, C., Grasselli, P., Poli, G., Servi, S. y Zorzella, A.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 1619.
- Fuganti, C.; Grasselli, P. *Chem. Ind.* **1977**, 983.
- Goodman, L. y Gilman, A. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McMillan, **1988**.
- Granneman, J. G., *J. Pharmacol. and Exp. Therap.* **1990**, *254*, 508.
- Hartley, M. *J. Med. Chem.*, **1971**, *14*, 895.
- Juaristi, E. *Stereochemistry and Conformational Analysis*, J. Wiley and Sons, New York, **1991**.
- Kölbl, H. K., Hildebrand, H., Piel, N., Scröeder, T. y Zitzmann, W., *Pure and Appl. Chem.*, **1988**, *60*, 825-831.
- Kren, V.; Crout, D. H.; Dalton, H.; Hutchinson, D. W.; Koenig, W.; Torner, M. Dean, G.; Thomason, N. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, *4*, 341.
- Lands, A. M., Arnold, A., McAuliff, J. P., Ludena, F. P., Brown, T. G., *Nature*, **1967**, *214*, 597.
- Lorence, A.; Gonzalez, R. L.; Solleiro, J. L. *BIOCIT SIGLO XXI*, **1993**, *6*, 12.
- Mahmoud, W. M.; El-Sayed, A; Coughlin, R., *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *36*, 47-54.
- Morrison, J. D., y Mosher, H. S., *Asymmetric Organic Reactions*, American Chemical Society. Washington, **1976**, p. 4-6.
- Neuberg, C.; Hirsch, J. *Biochem Z.* **1921**, *115*, 282
- Nikolova, P. Ward, O.P., *Biotechnol. Lett.*, **1994**, *16*, 7.
- Nikolova, P.; Ward, O.P.; *J. Chem. Soc. Chem Commun.*, **1993**, 341.
- Ohta, H.; Ozaki, K.; Konishi, J.; Tsuchihashi, G. I. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 1261.
- Oldrich, J. *Zvacec, Pat. Czech.* 231,401 (Cl. C12Pz/24), **1986**.
- Paris et al *Ann. Pharm. Franc.* **1967**, *25*, 177.
- Patil, P. N.; LaPidus, J. B.; Tye, A. *J. Pharm. Sciences*, **1970**, *59*, 1205.
- Patil, P. N.; LaPidus, J. B.; Tye, A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1967**, *155*, 1.
- Popa, V. T. *J. Asthma* **1984**, *21*, 183.
- Rose, A. H. *Industrial Microbiology*; Butterworths: Washington, DC, **1961** p. 264
- S. Servi, *Syntesis*, **1990**, *1*, 1.
- Seely, R. J.; Hageman, R. V.; Robert, V.; Yarns, M. J.; Siñovam. S.A. (Synergen Inc.) PCT Int. Appl. WO 9004, 631 (Cl. C12N1/16 03 may 1990).

- Smith, L. H. *J. Med. Chem.* 1971, 14, 326.
Somani, W. J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 1968, 164, 317.
Stinton, S. C., *Chem. and Eng. News*, sept 28, 1992, p. 46.
Stinton, S. C., *Chem and Eng. News*, oct 9, 1995, p. 44.
Van Dijk, J.; Keizer, V. G.; Moed, H. D. *Recueil*, 1963, 82,189.

9. ANEXO

ESPECTROS DE R.M.P.

END OF SWEET

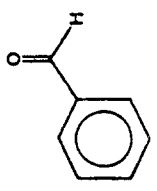


OPERATOR

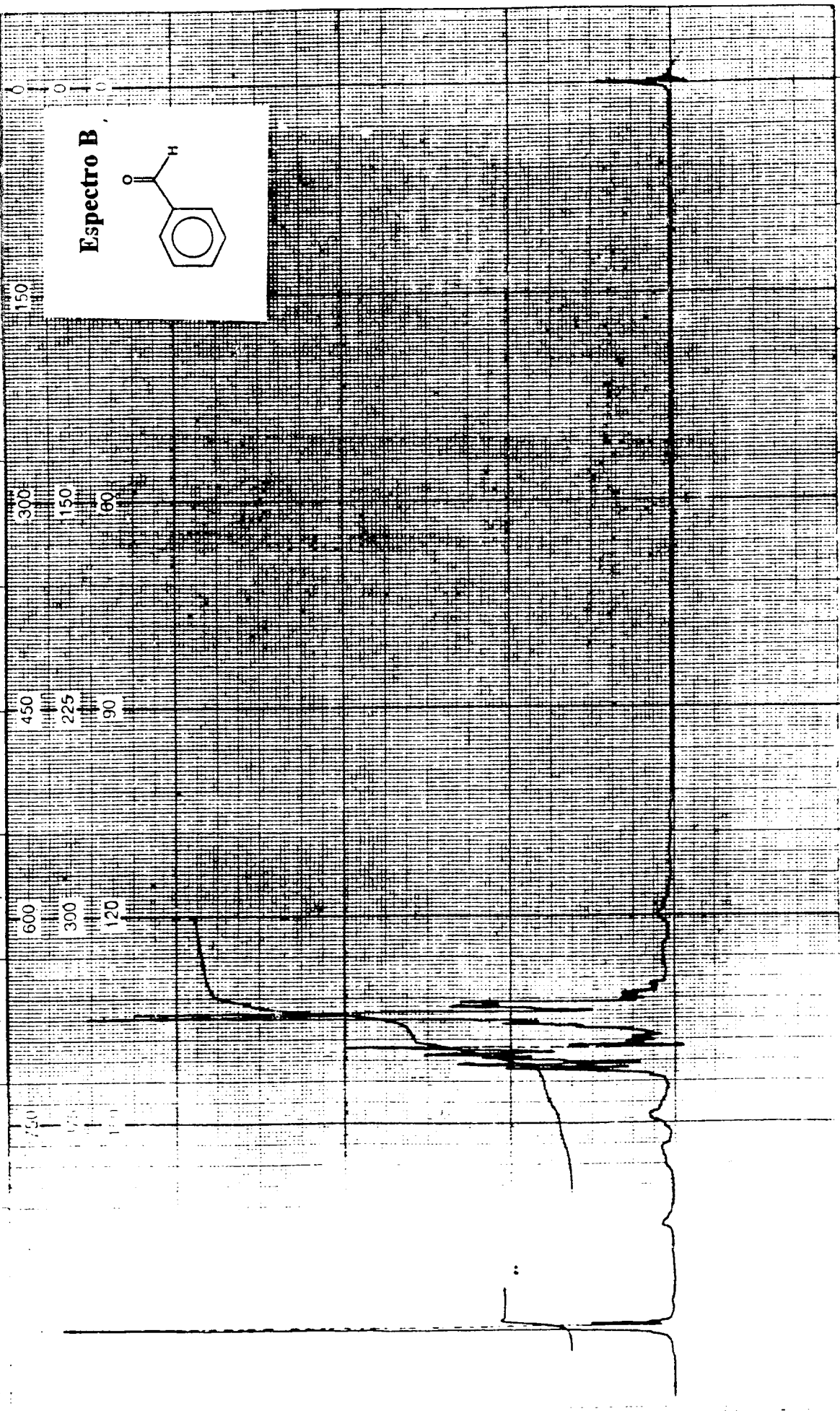
SAMPLES

END OF SWEEP

Espectro B

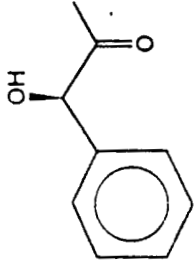


↑
E
V

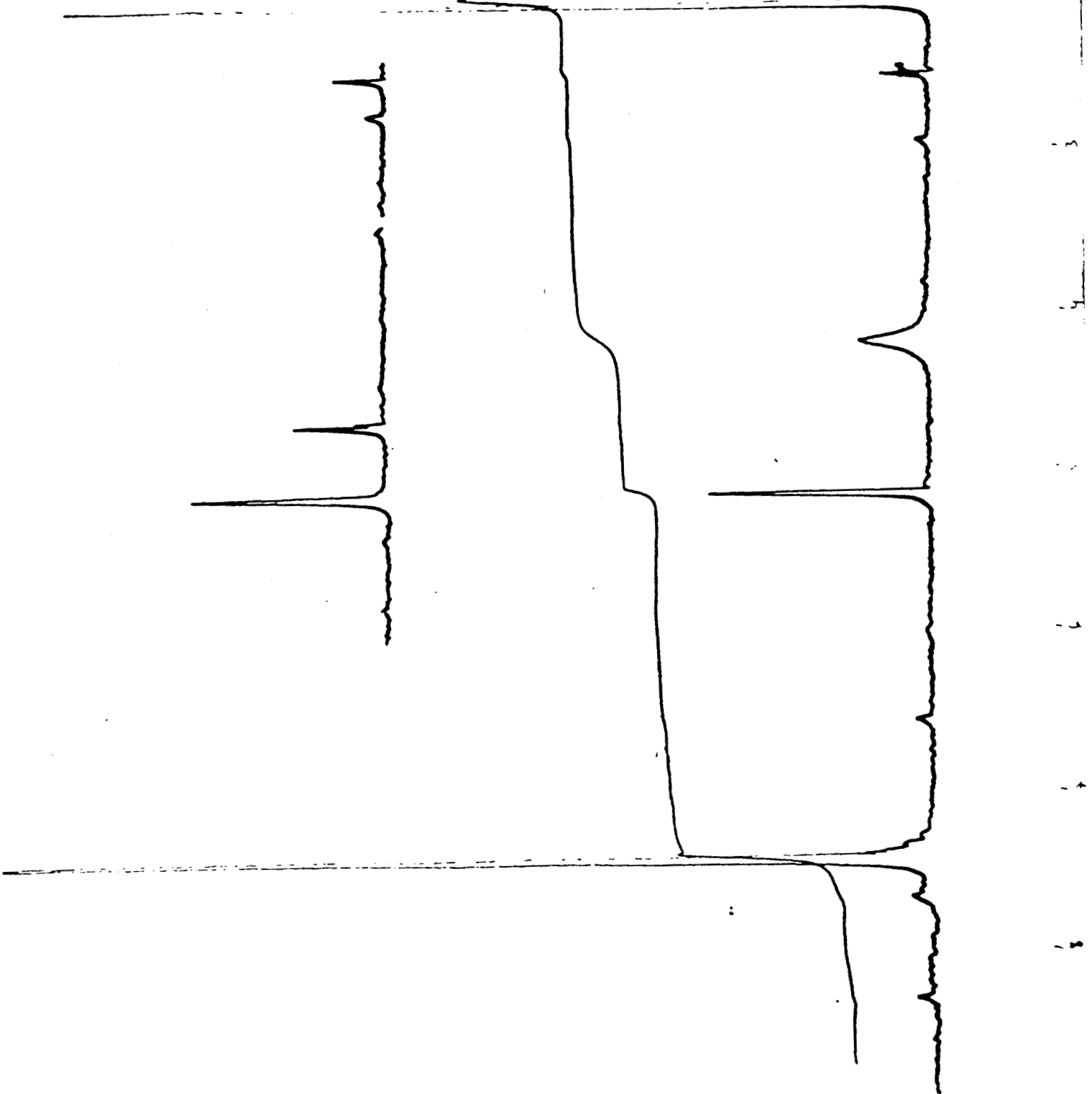


0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

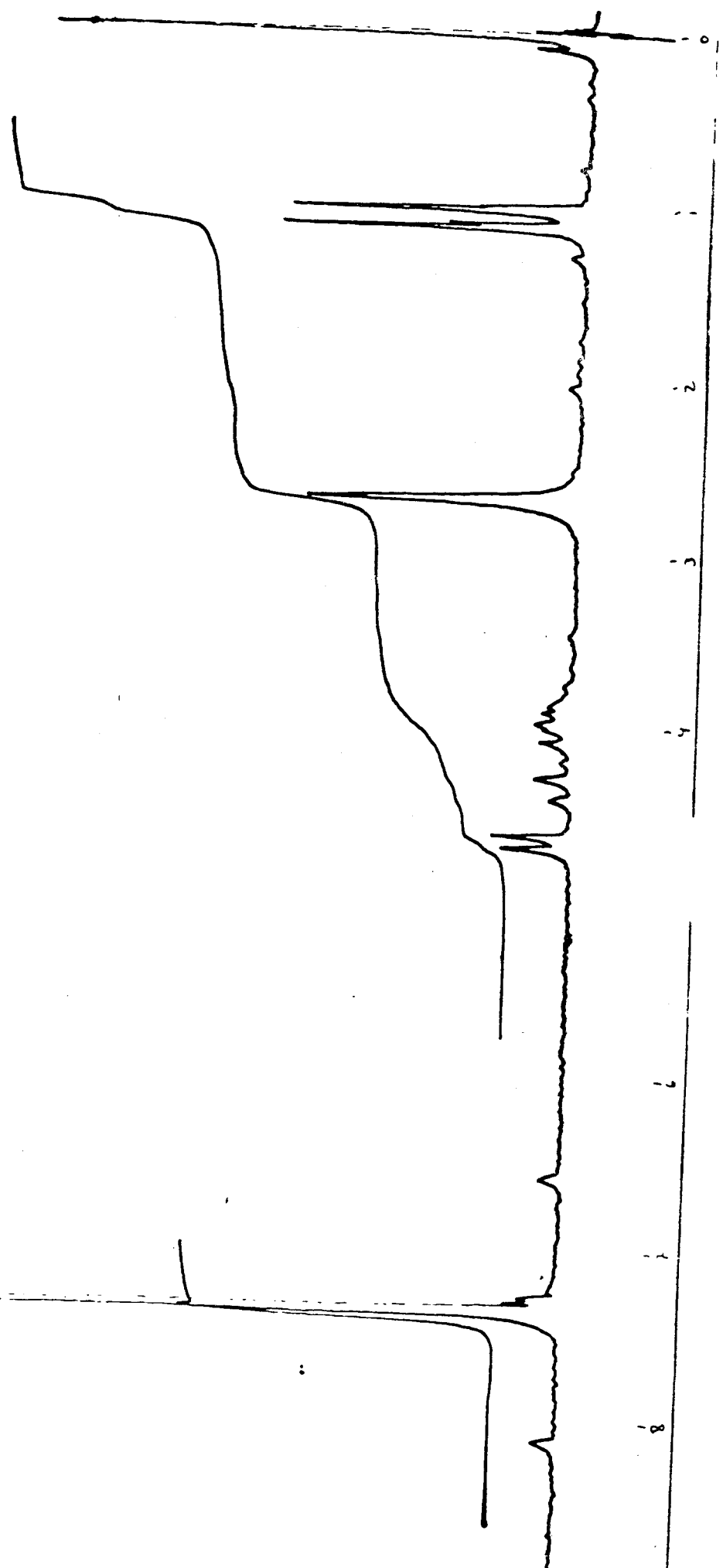
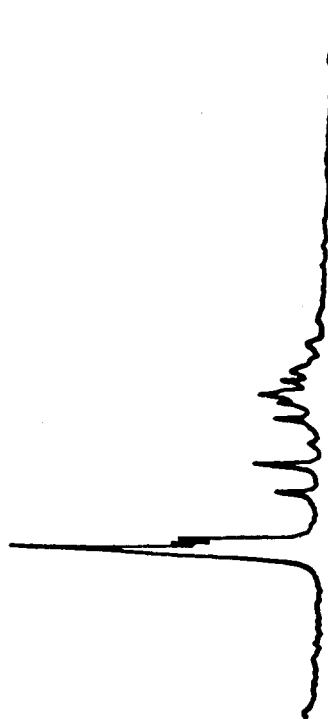
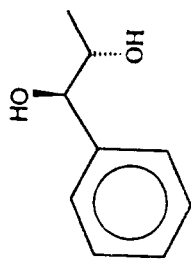
Espectro C



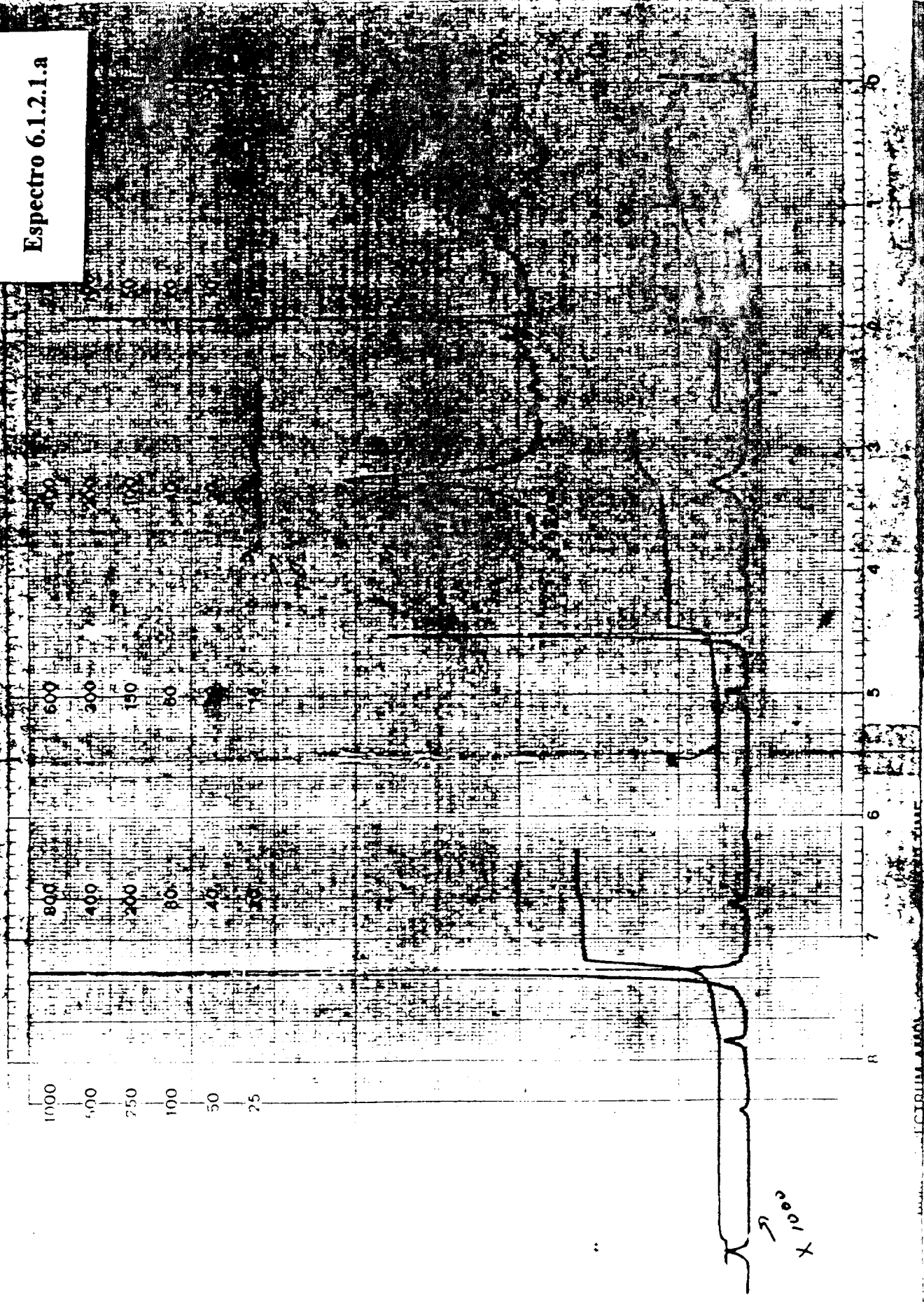
222182



Espectro D



Espectro 6.1.2.1.a

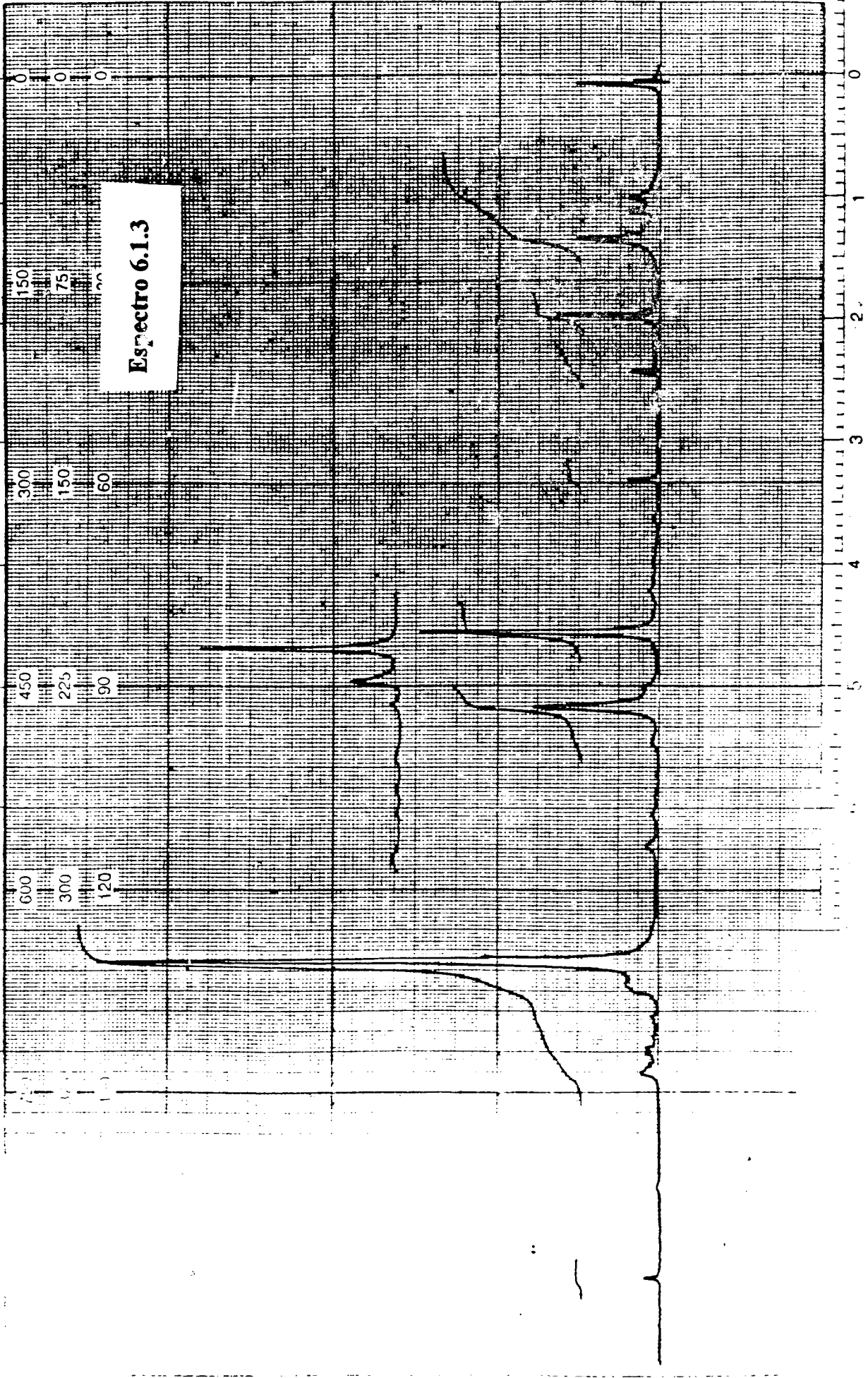


X
→
1000

ESPECTRO INFRAROJO

END OF SWEEP

X-H



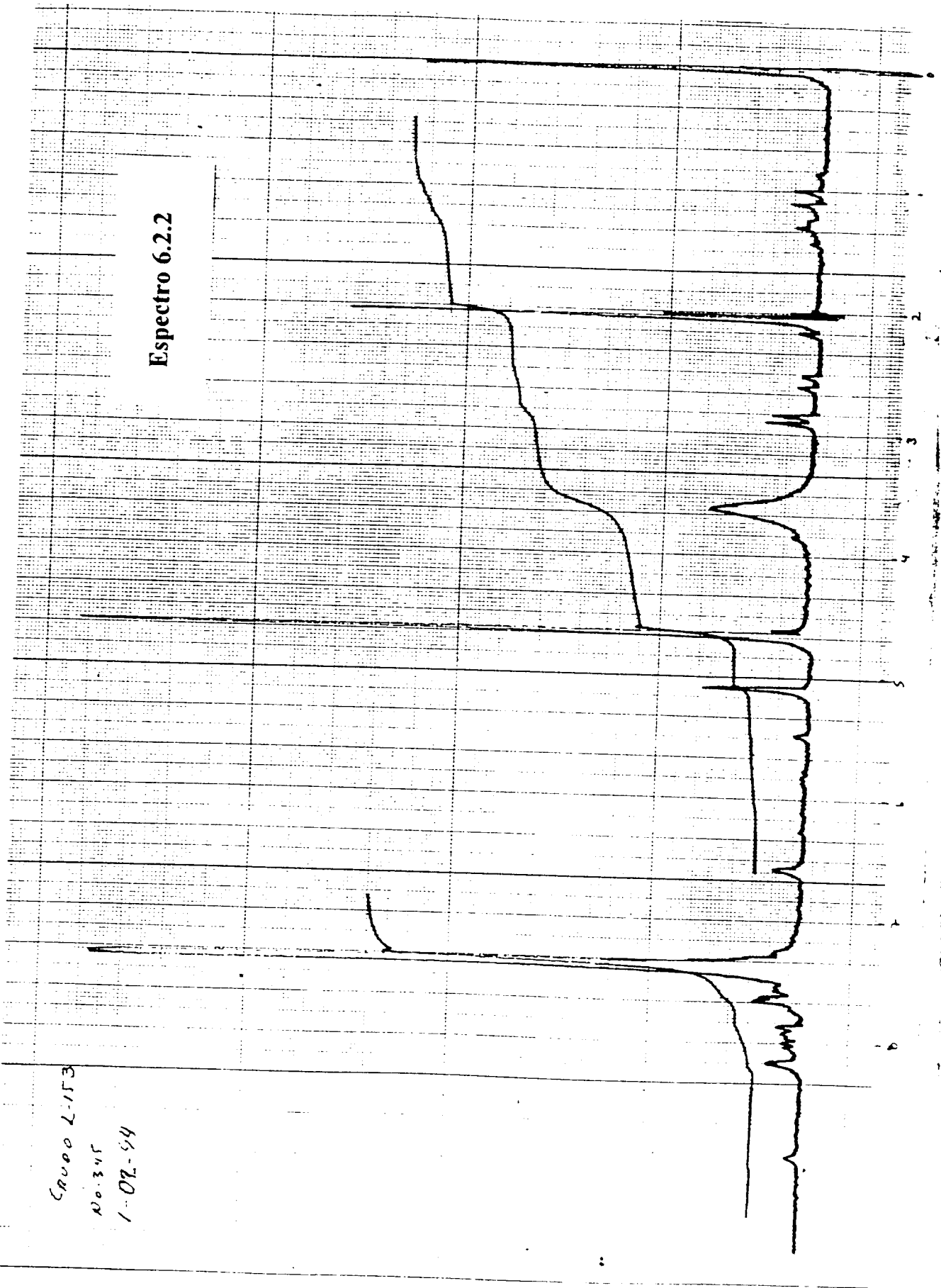
Espectro 6.1.3

Grupos 2-153

No. 345

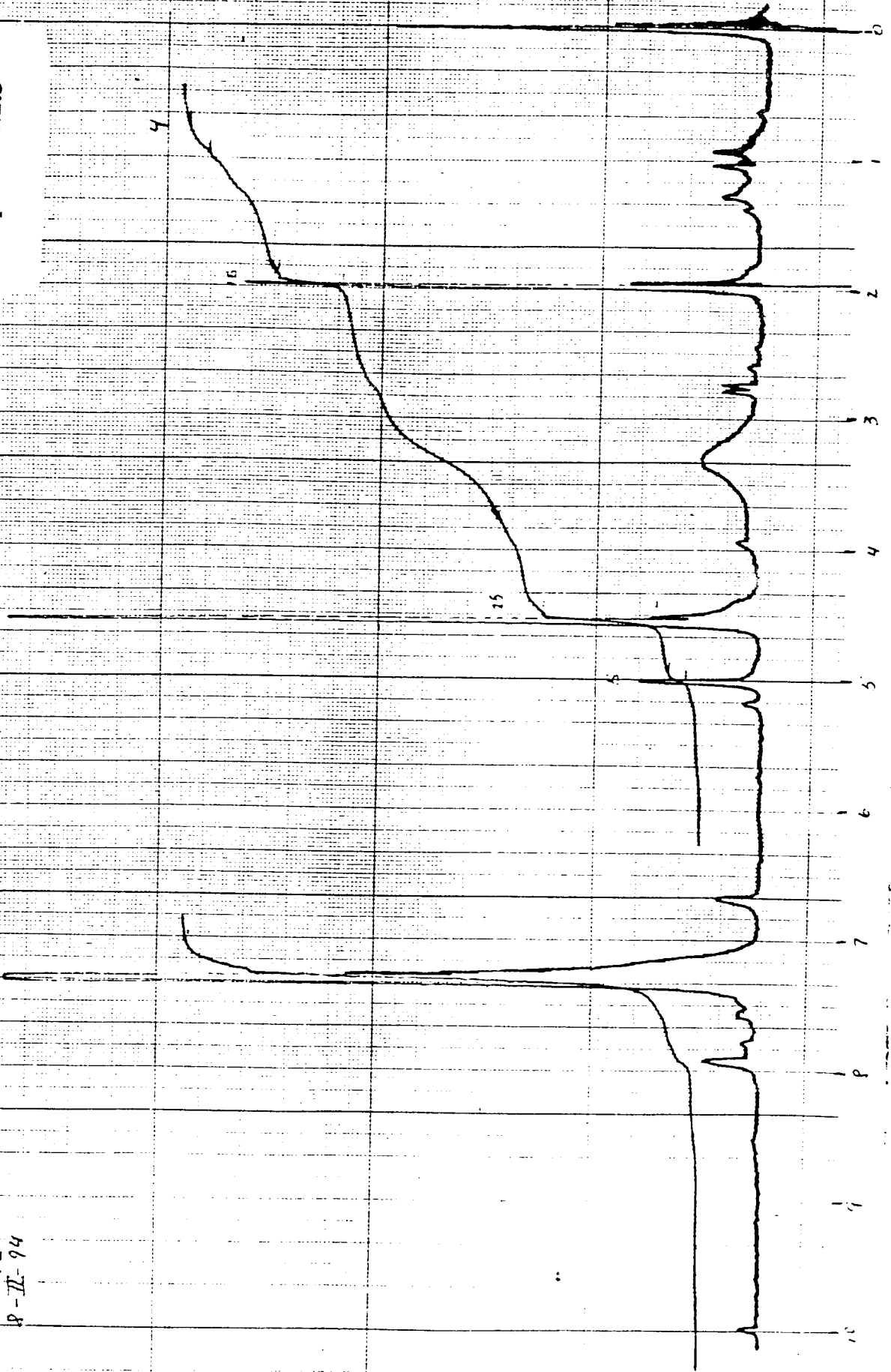
1-02-54

Espectro 6.2.2

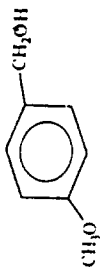


Espectro 6.2.3

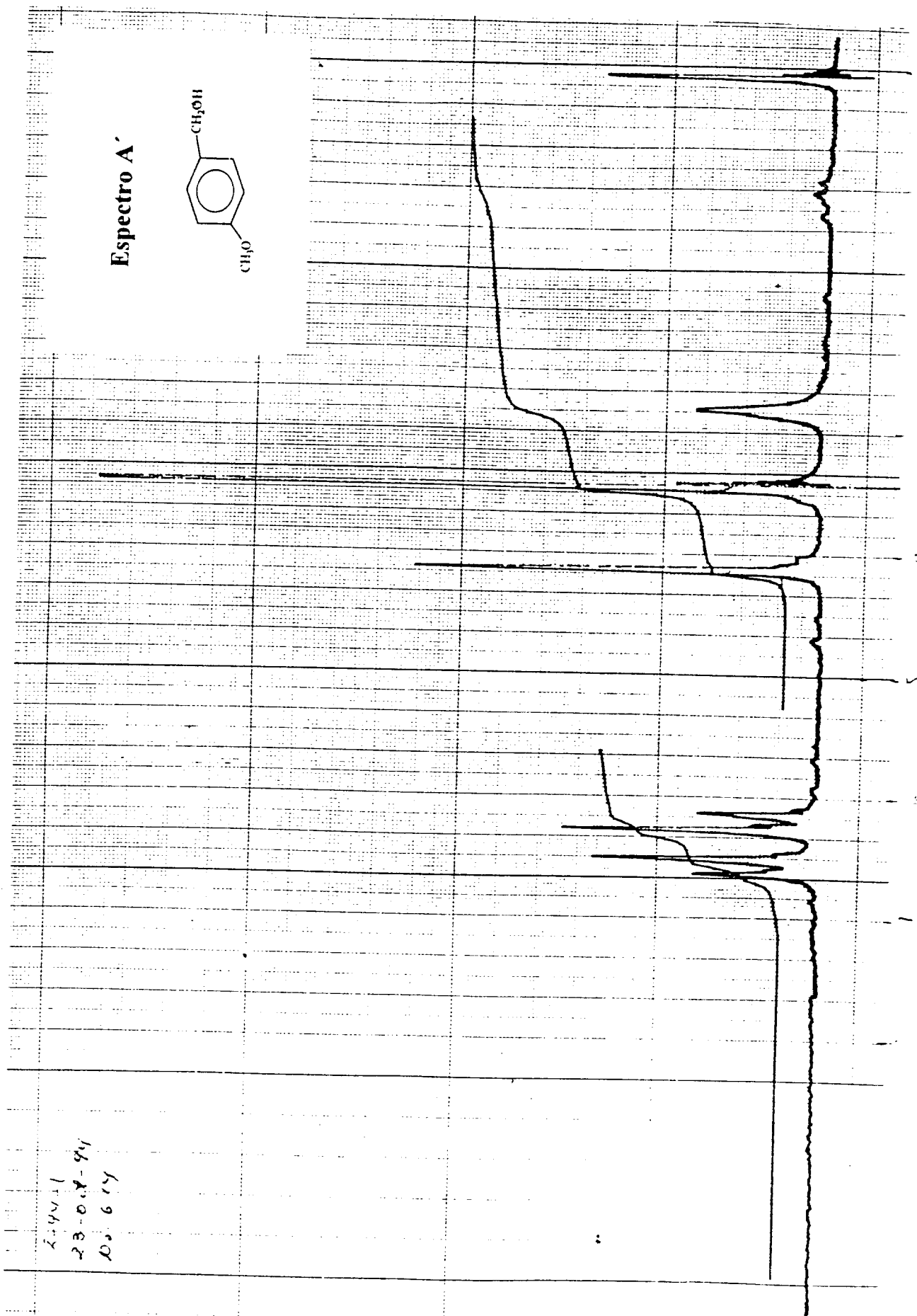
L-41-0
1. 5/2
P-II-94



Espectro A'



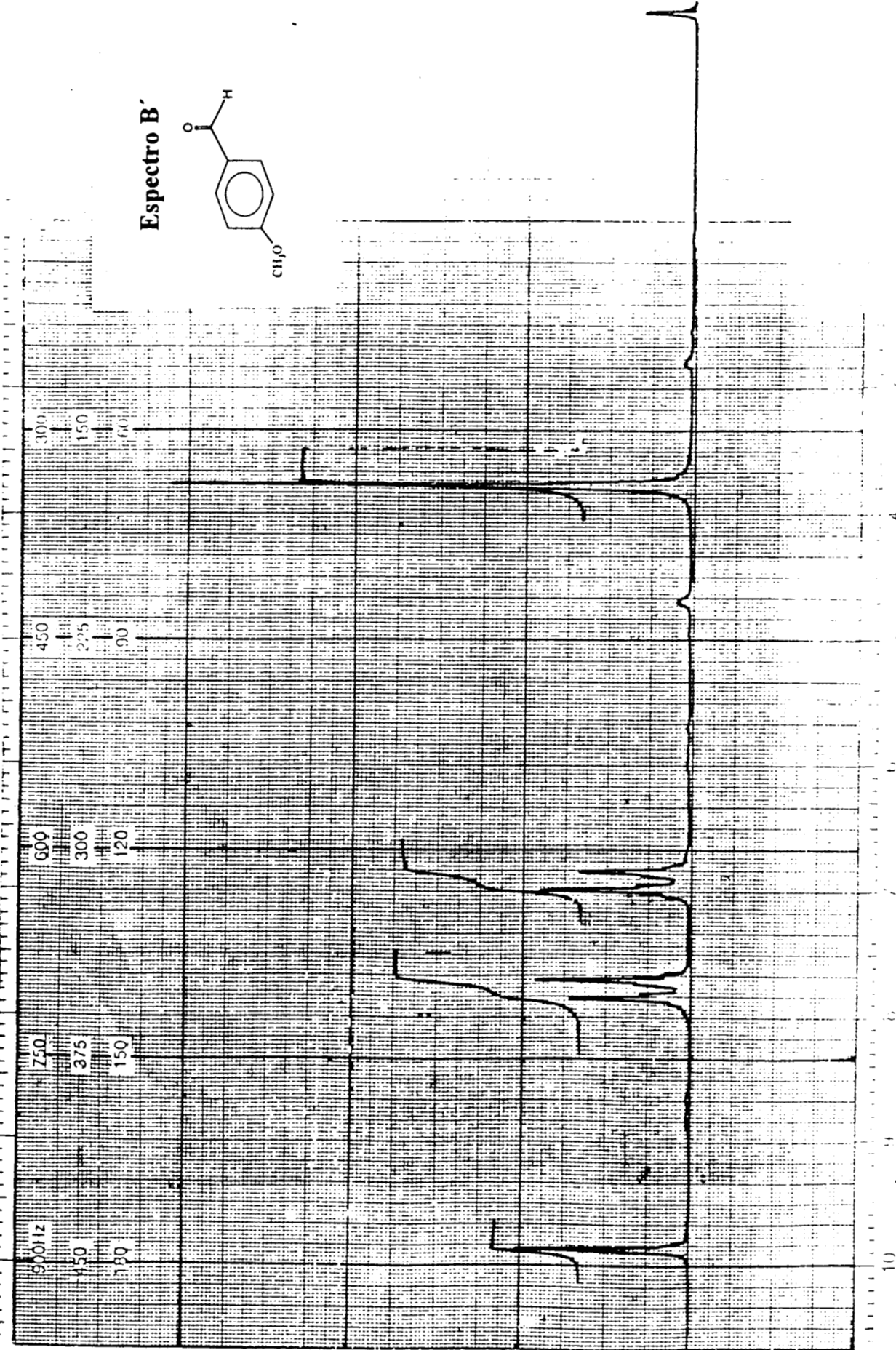
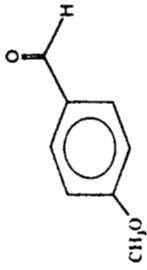
2-44-11
23-0.7-94
D. 6 14



START OF SWEEP

→ H

Espectro B'



10

9

8

7

6

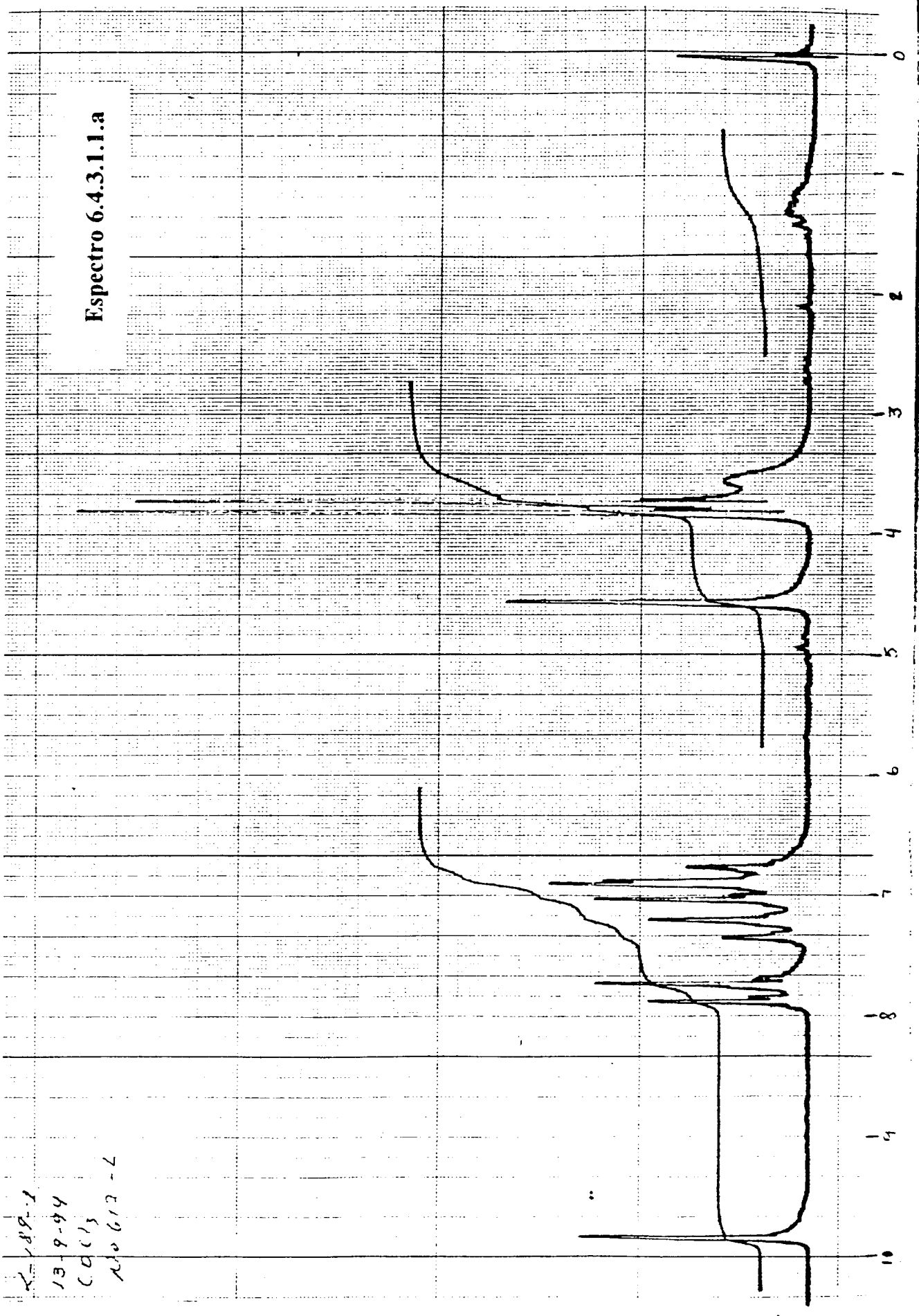
5

4

3

13-89-1
13-9-94
C.G.C.13
A.0612-2

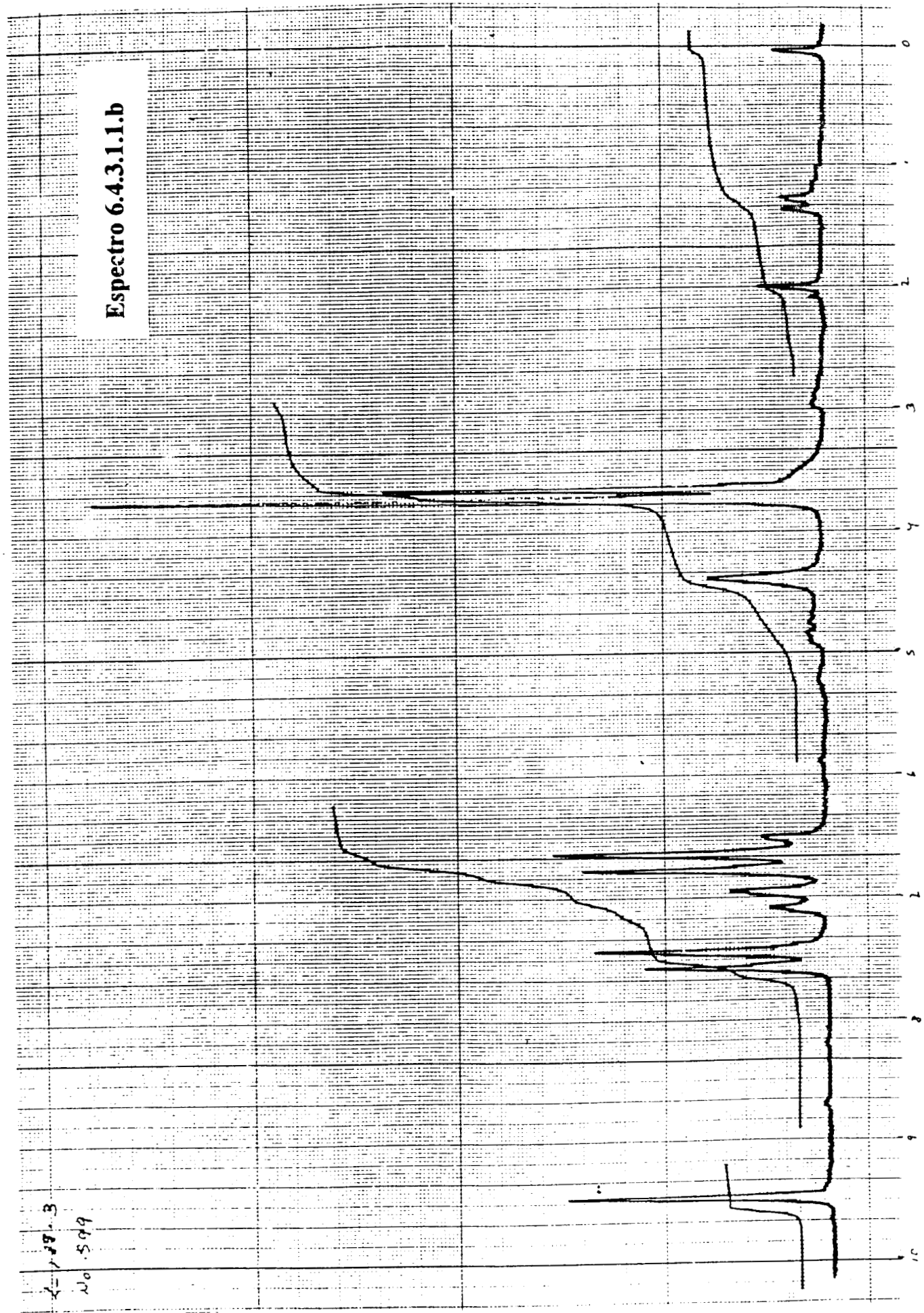
Espectro 6.4.3.1.1.a



L-139.3

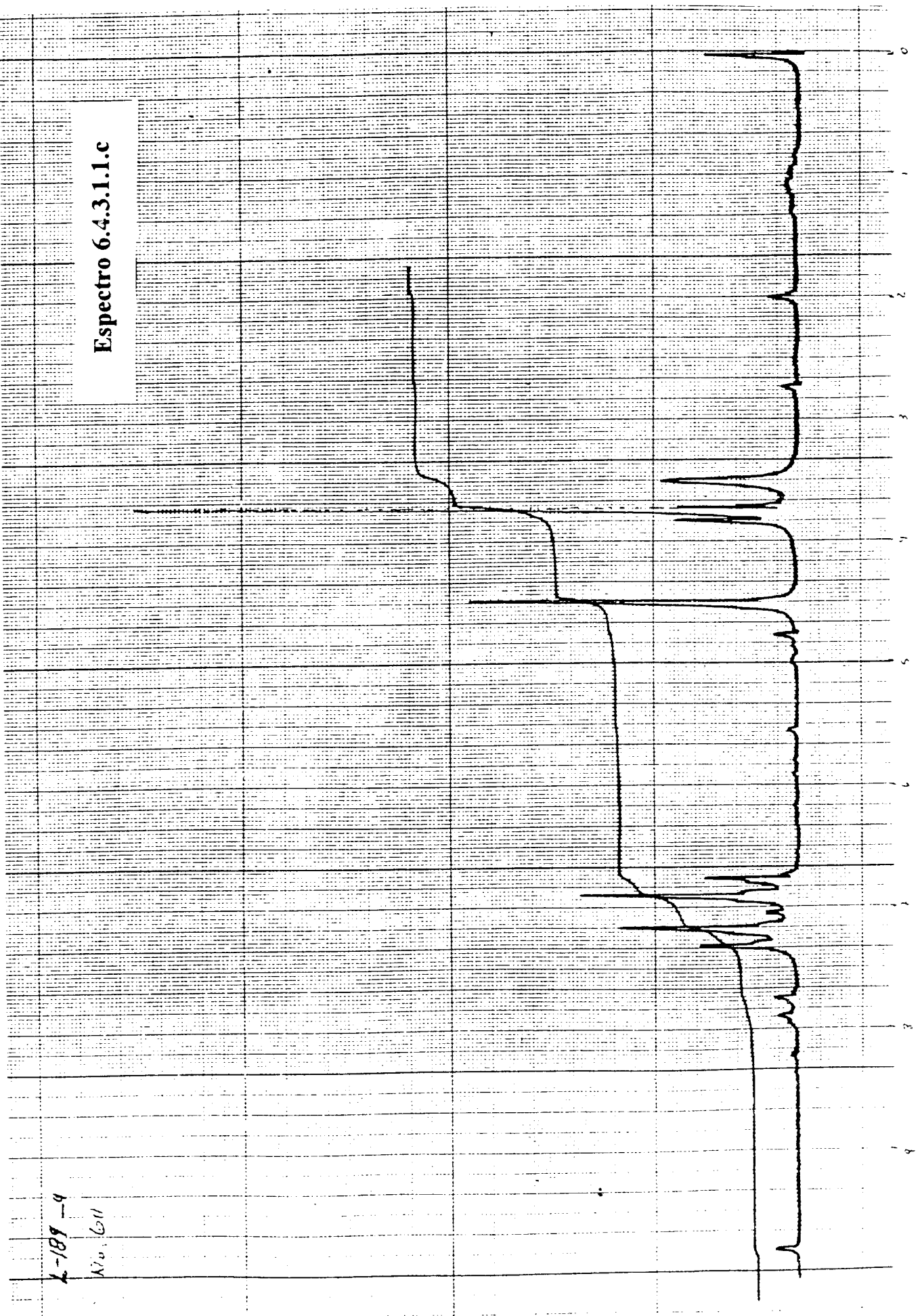
No. 599

Espectro 6.4.3.1.1.b



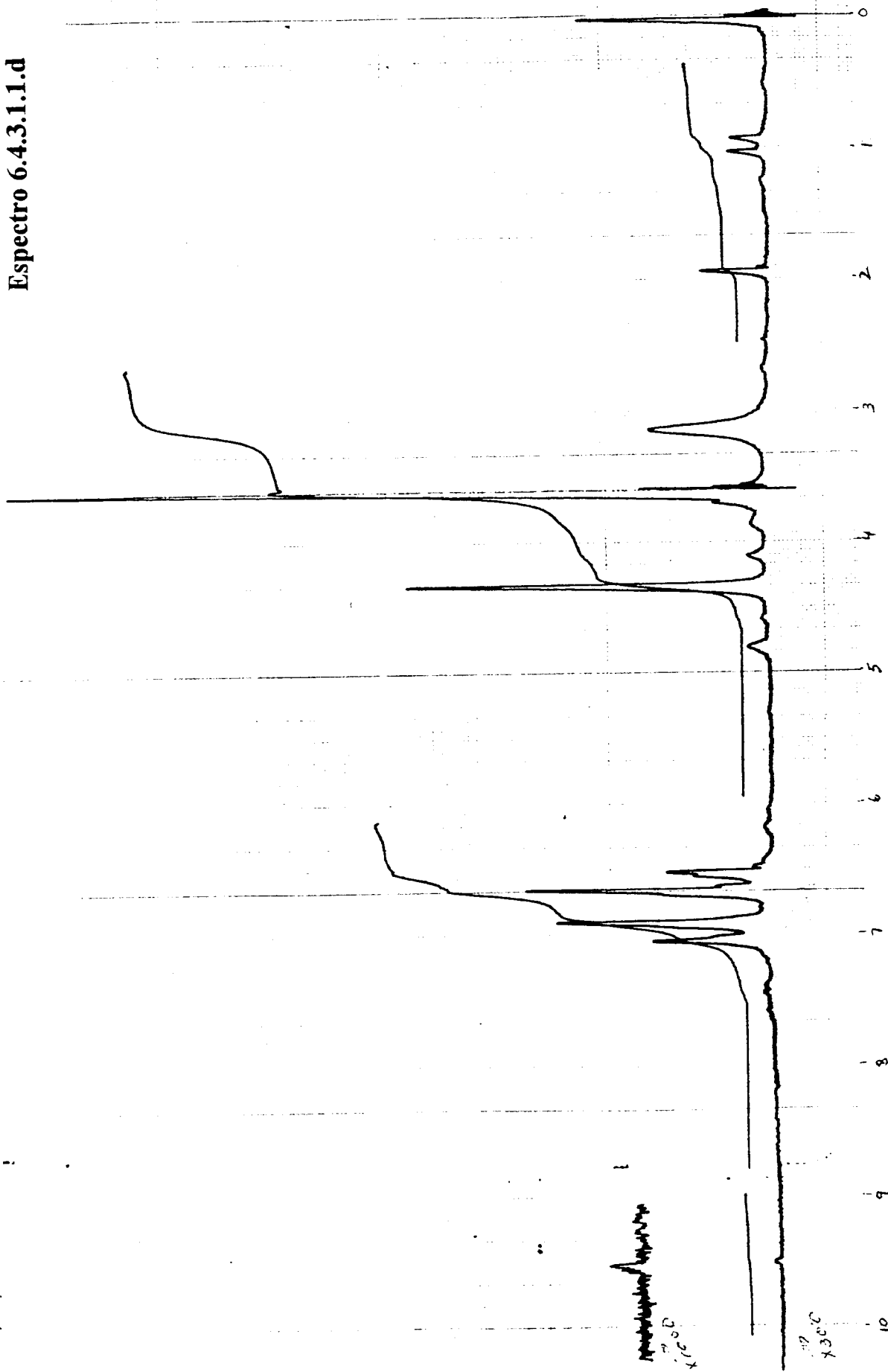
4-188
Xiv, 611

Espectro 6.4.3.1.1.c



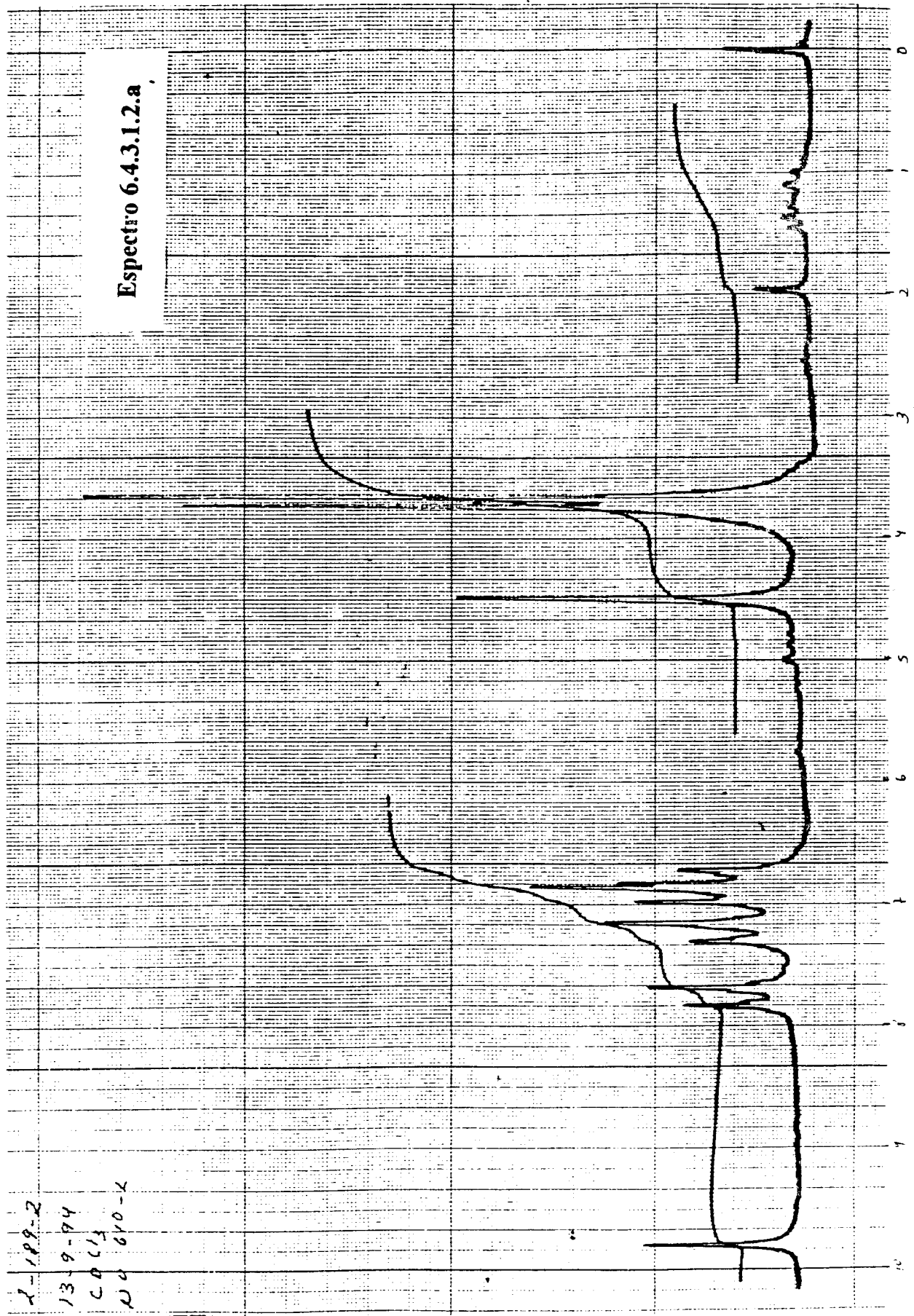
L-188-1
R. 542

Espectro 6.4.3.1.1.d



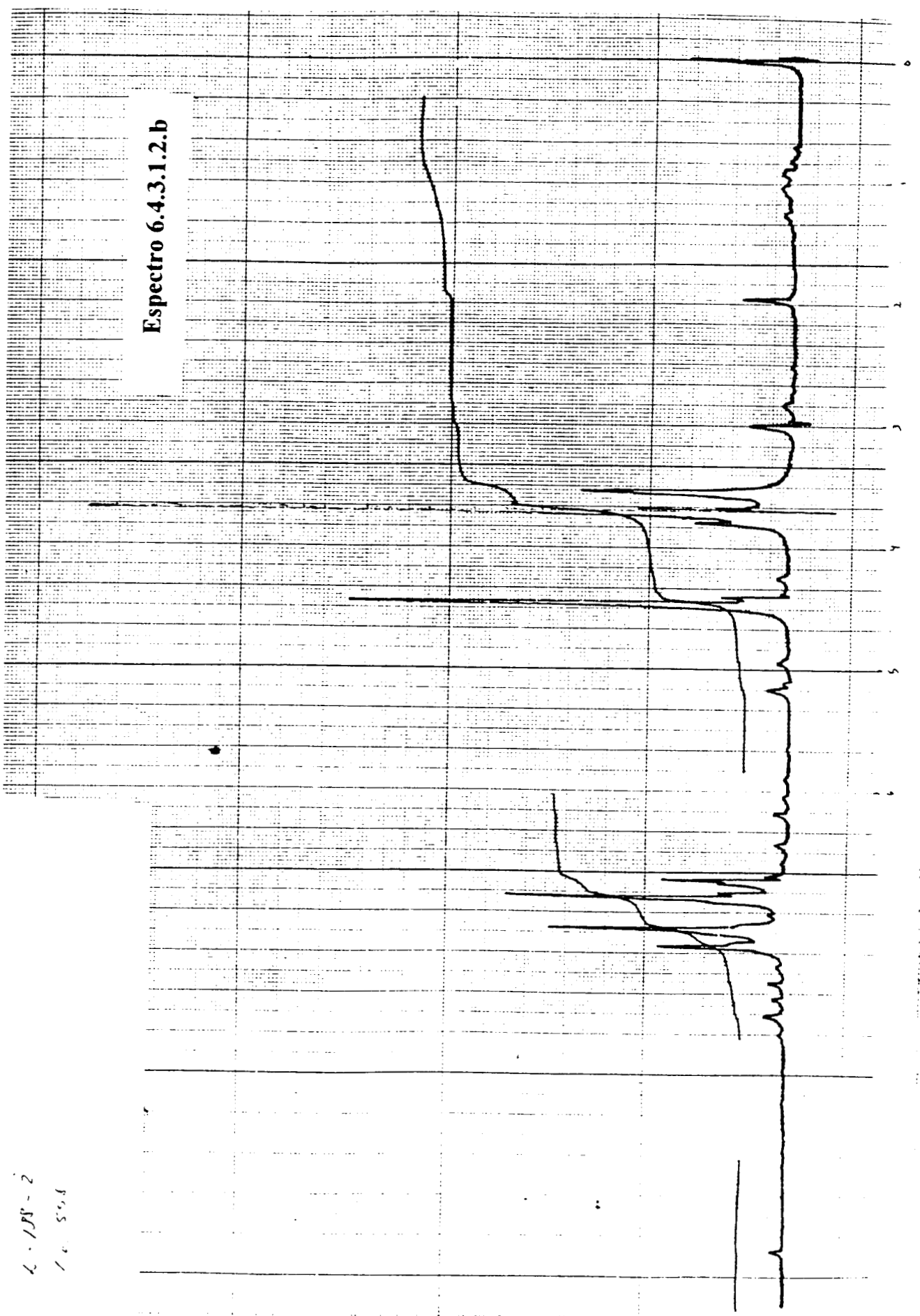
L-189-2
13-9-74
COC13
ND 610-K

Espectro 6.4.3.1.2.a



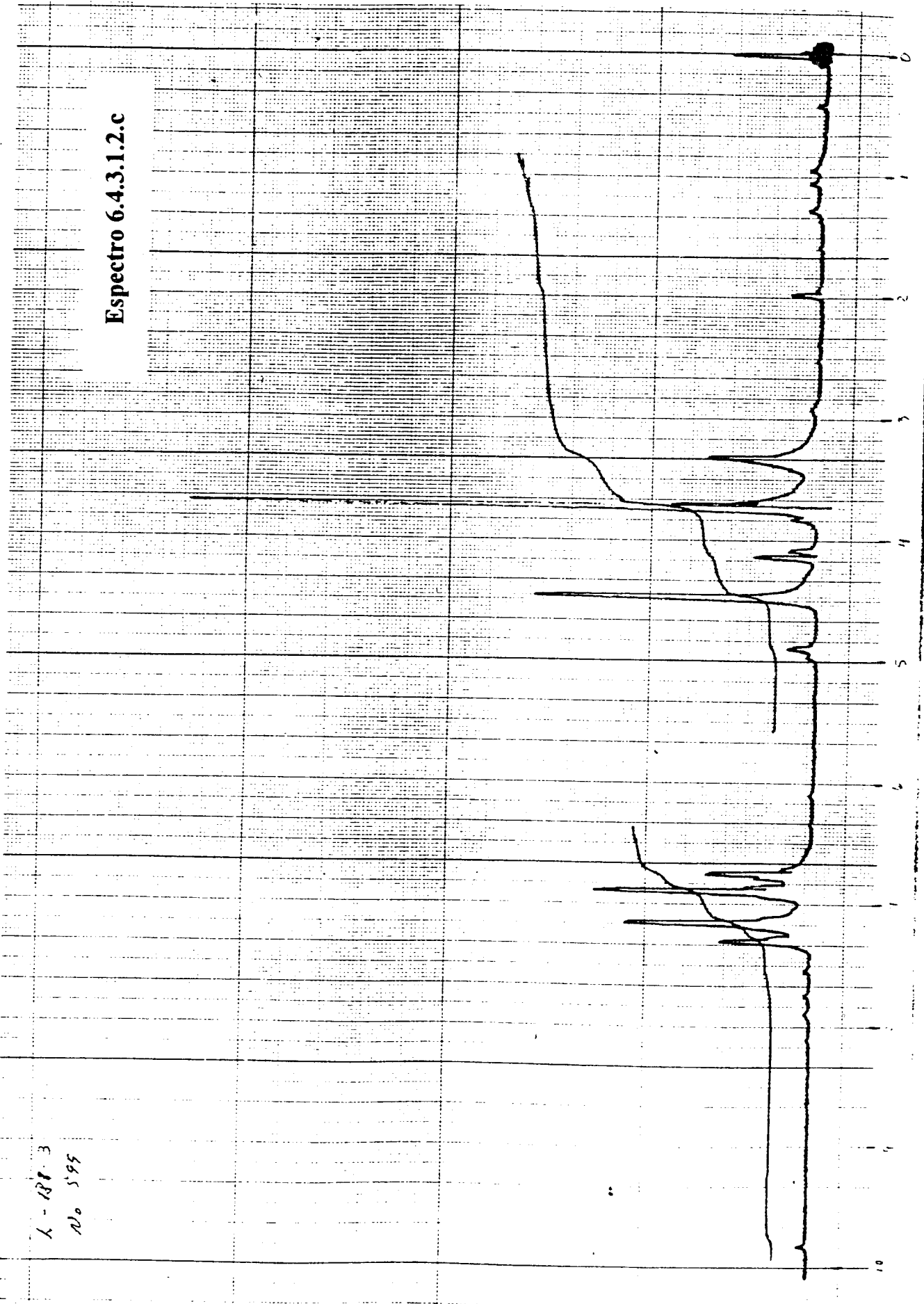
6.185-2
1. 5.5.8

Espectro 6.4.3.1.2.b



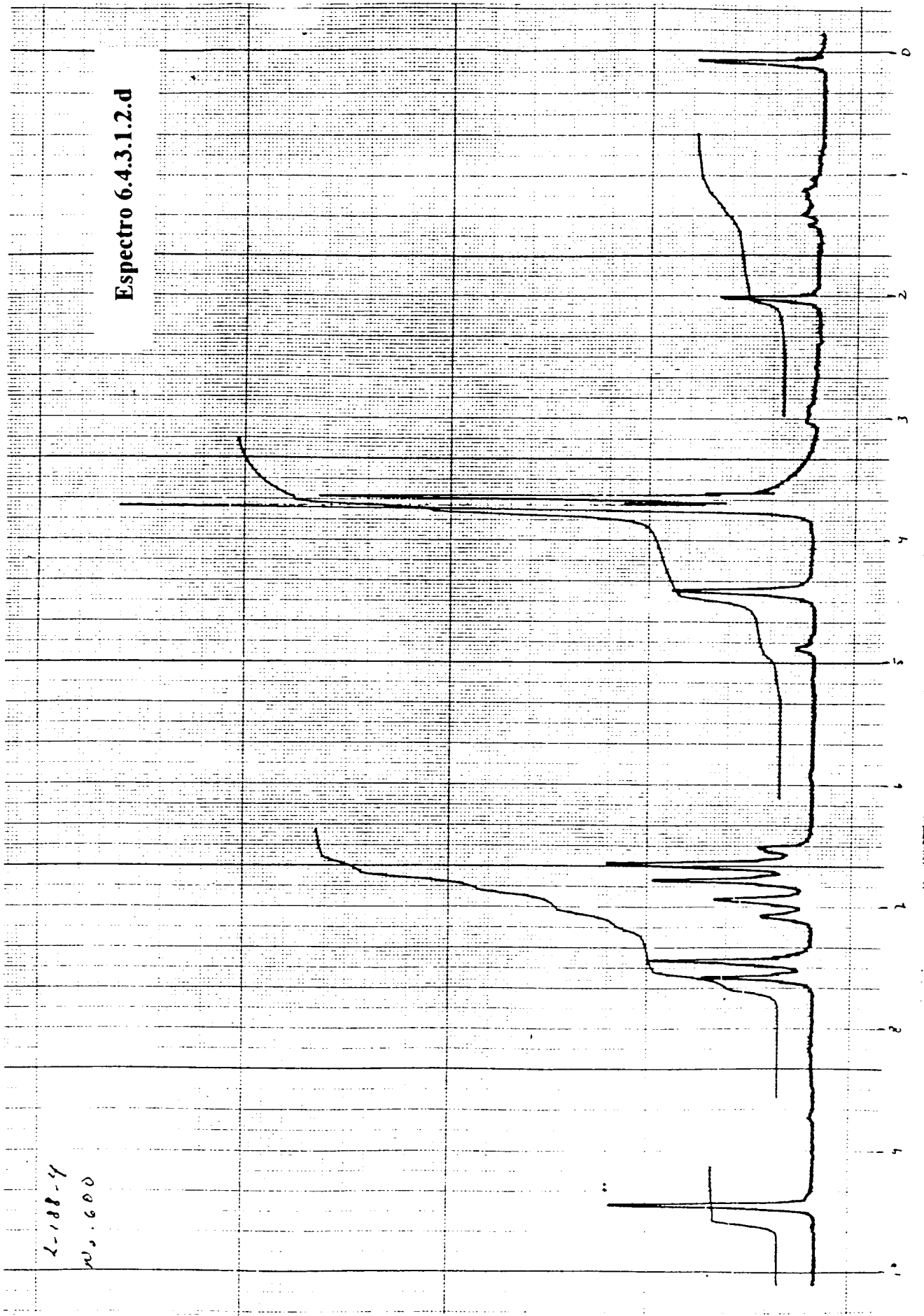
X-181.3
No. 595

Espectro 6.4.3.1.2.c



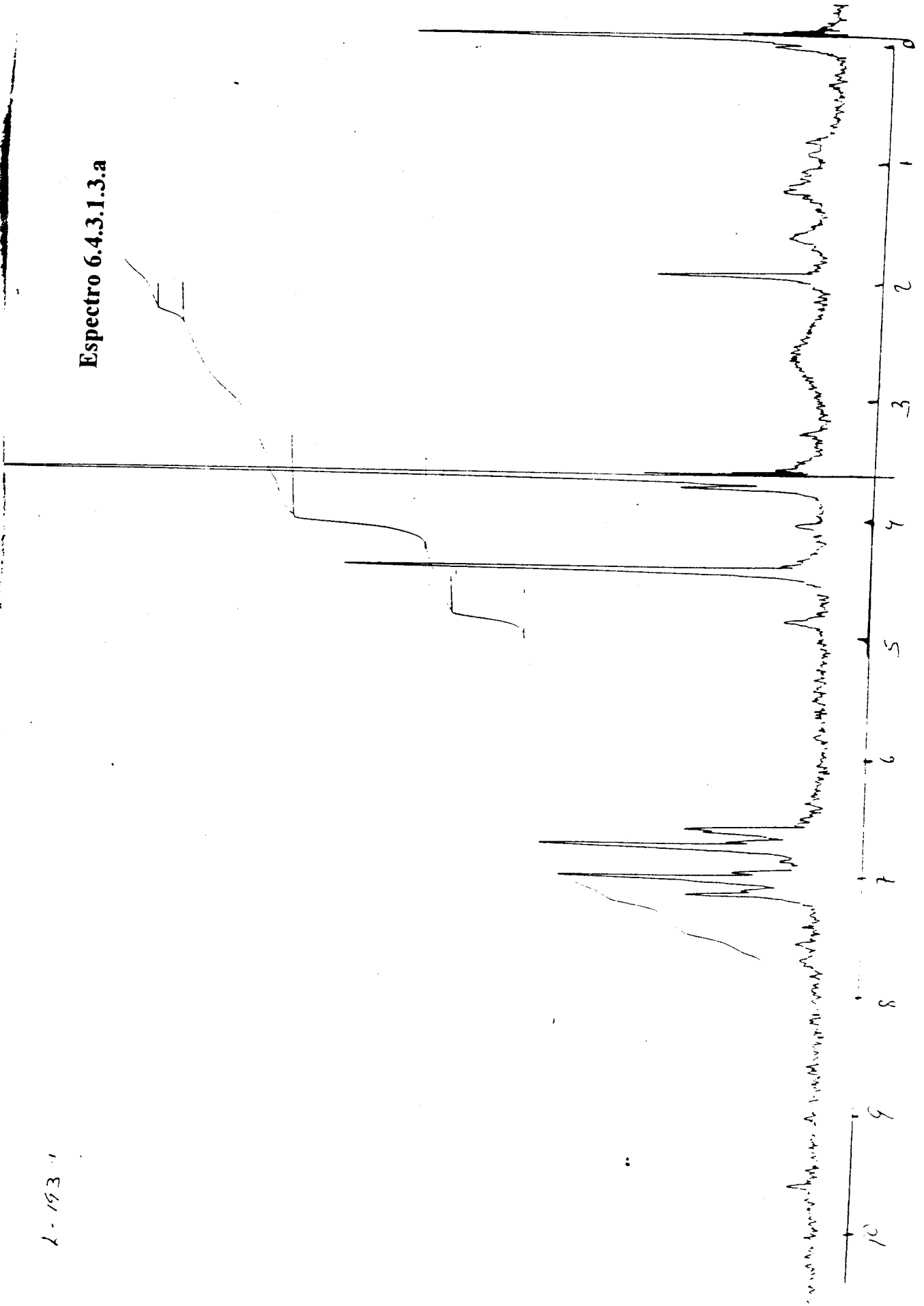
L-188-4
W. 600

Espectro 6.4.3.1.2.d



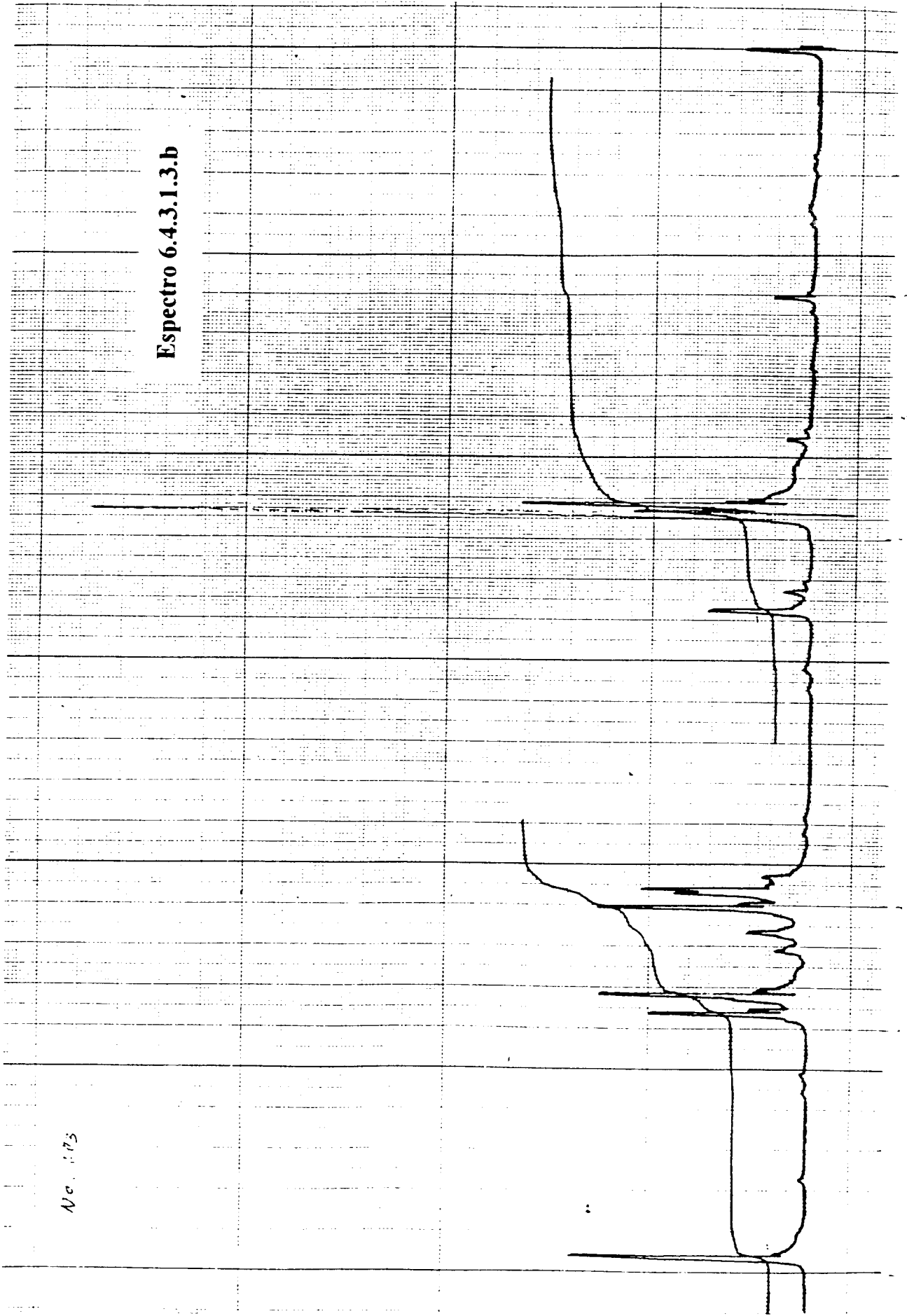
1-193-1

Espectro 6.4.3.1.3.a



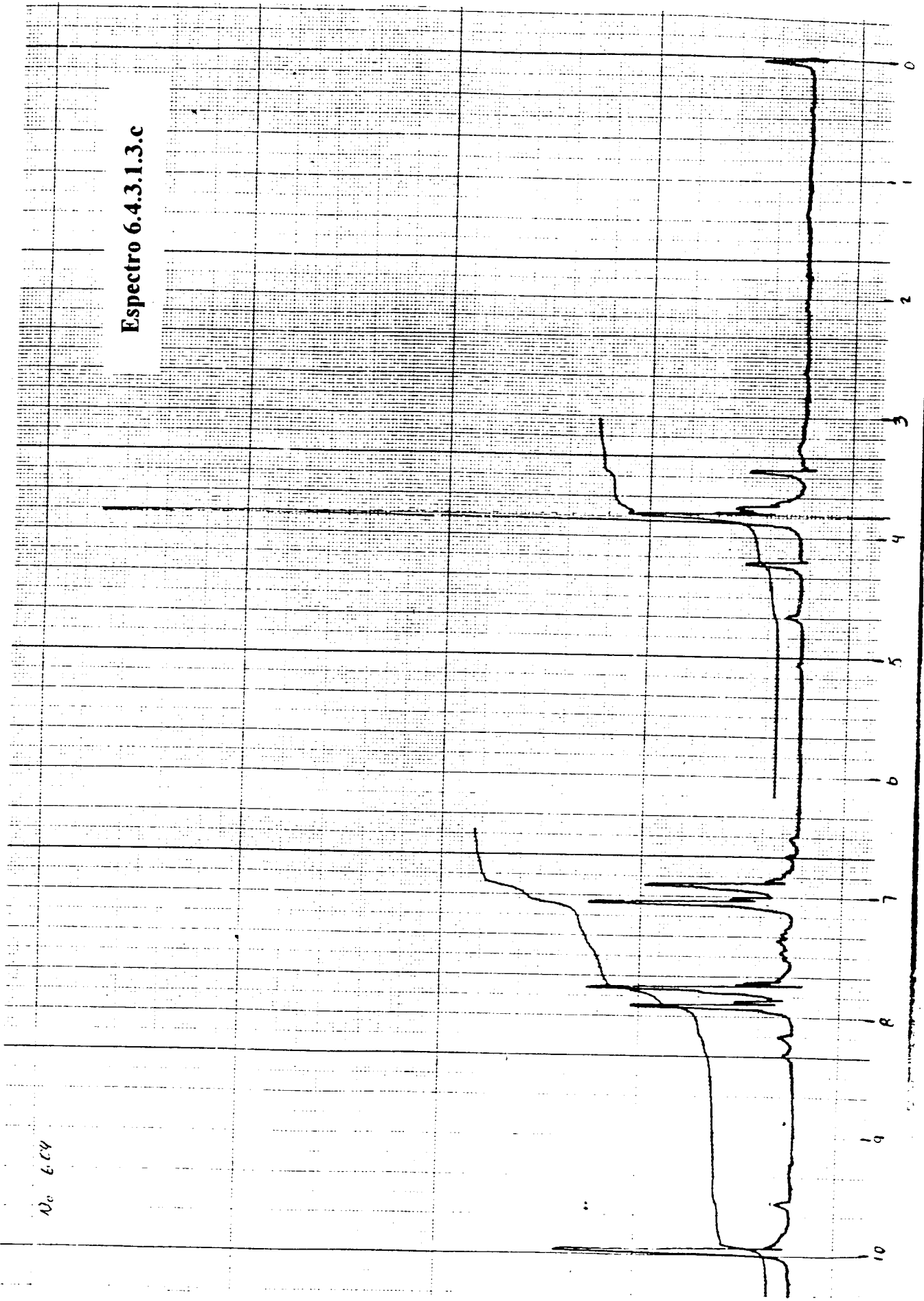
No. 173

Espectro 6.4.3.1.3.b

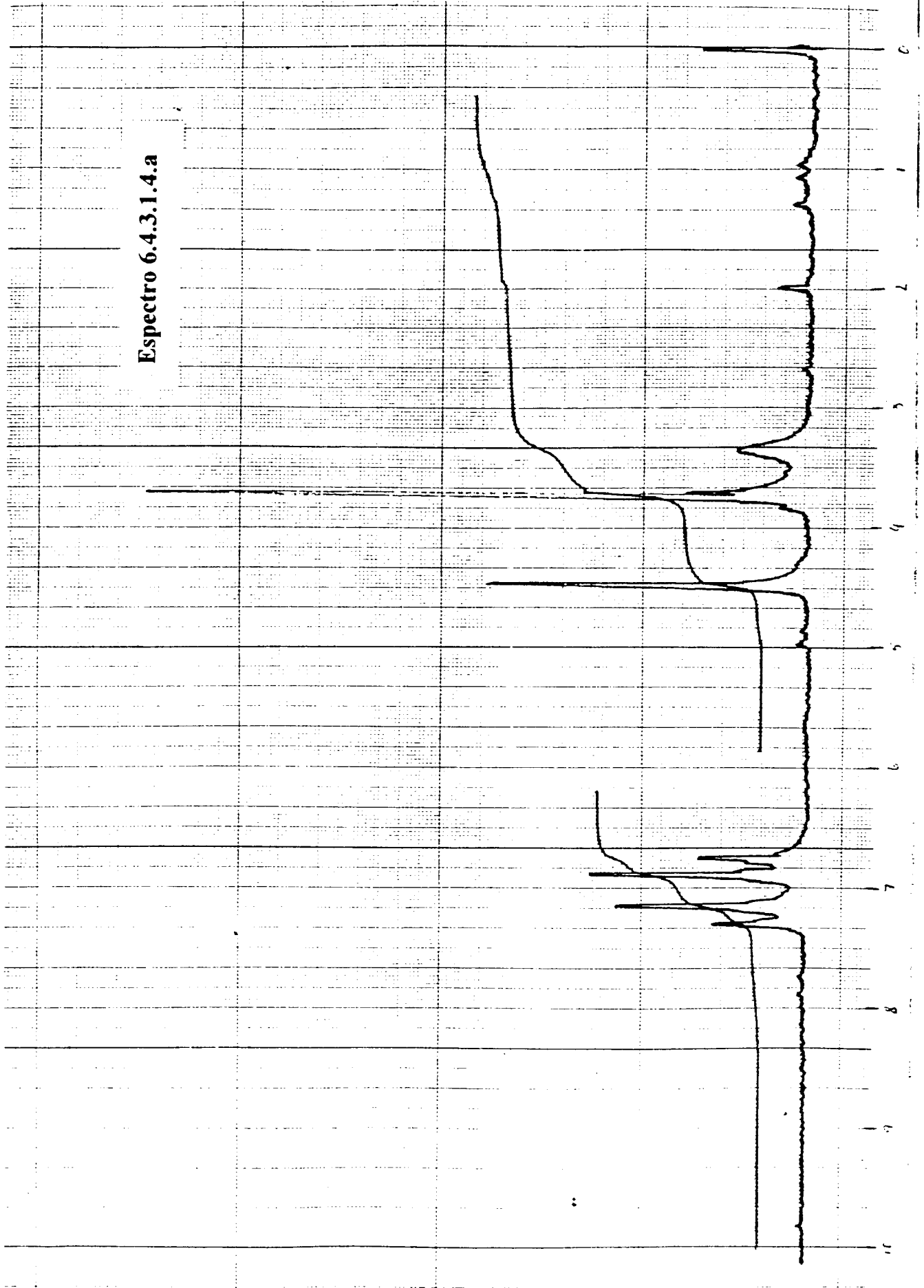


N_c 6.04

Espectro 6.4.3.1.3.c

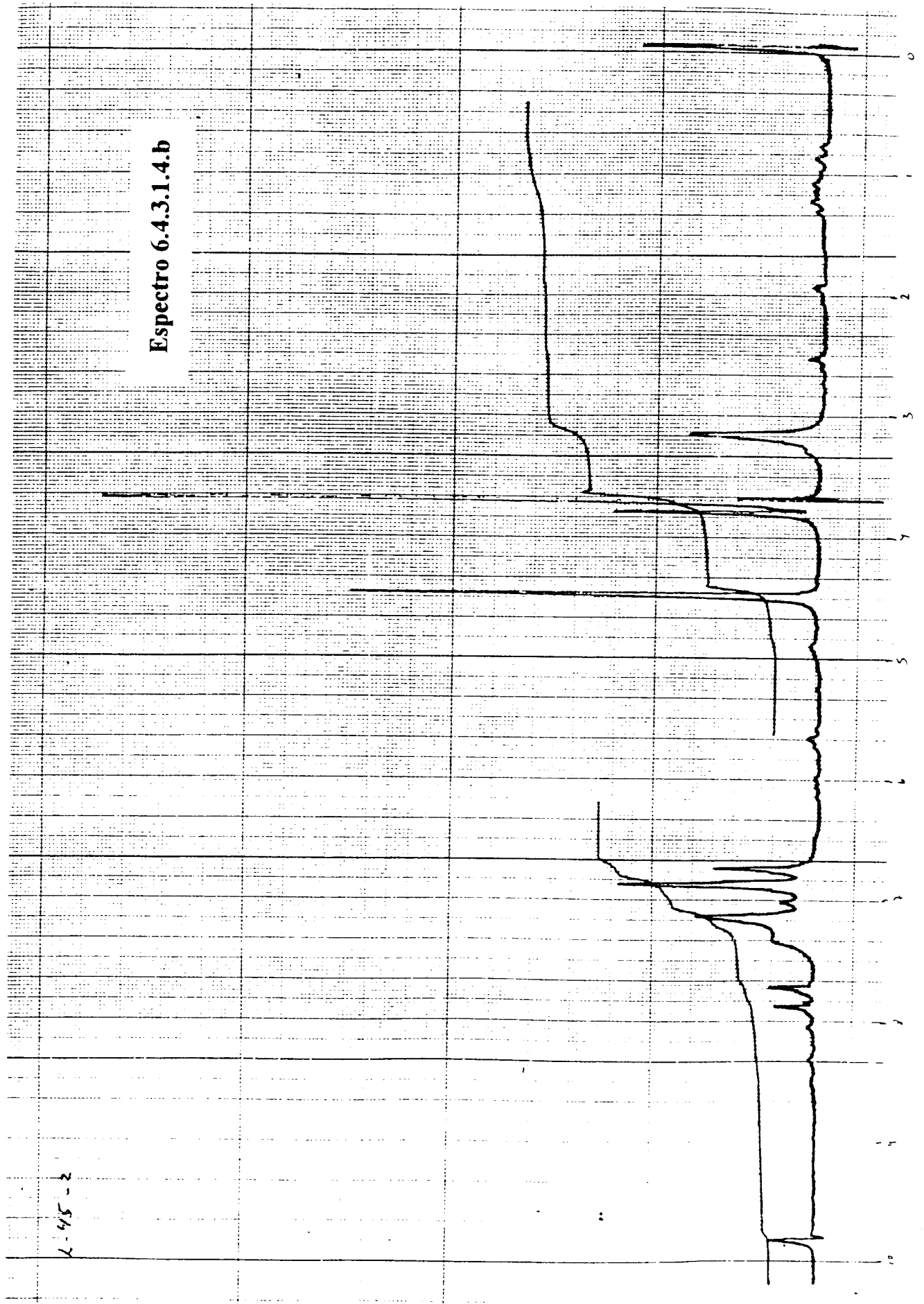


Espectro 6.4.3.1.4.a



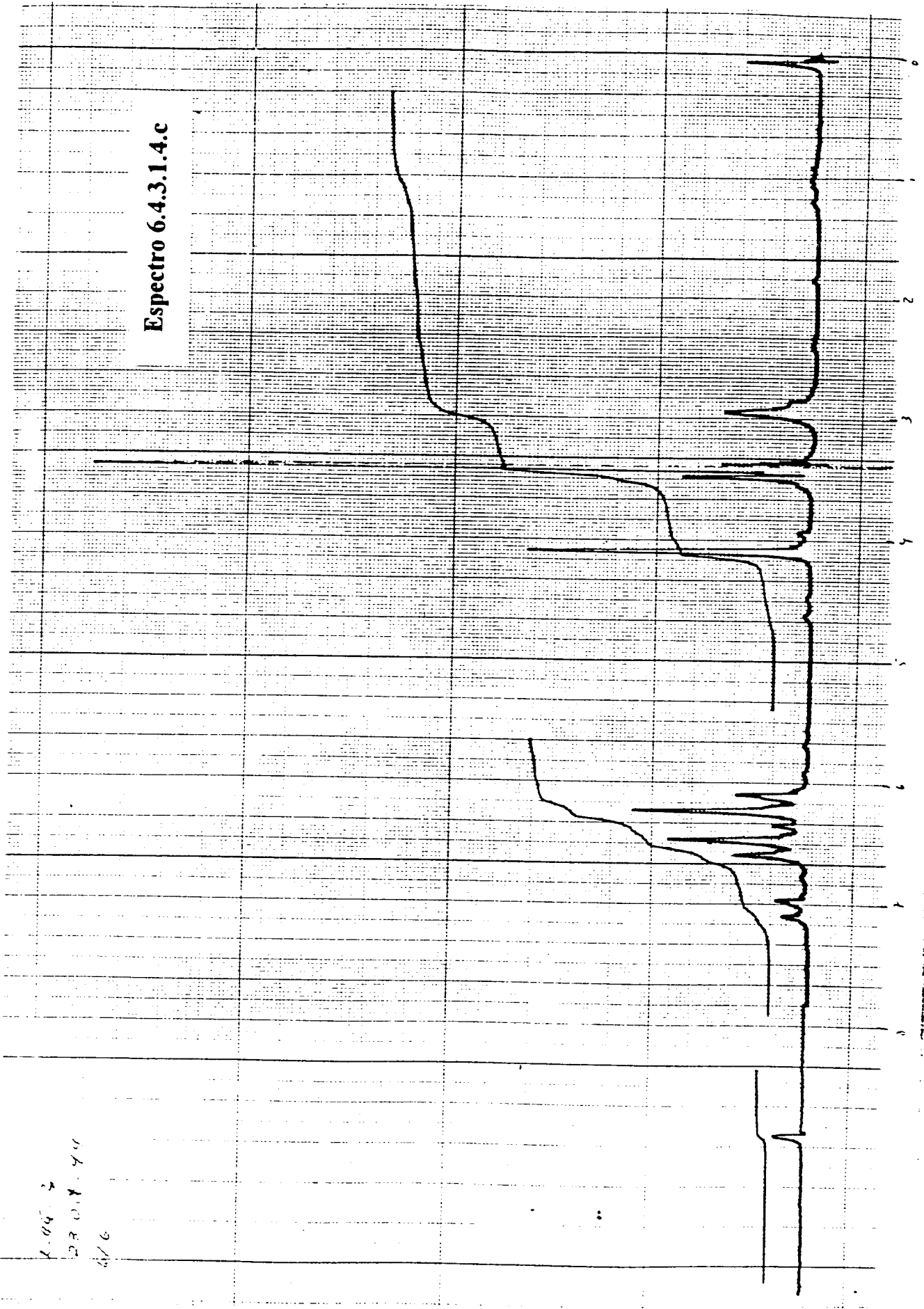
4-45-2

Espectro 6.4.3.1.4.b



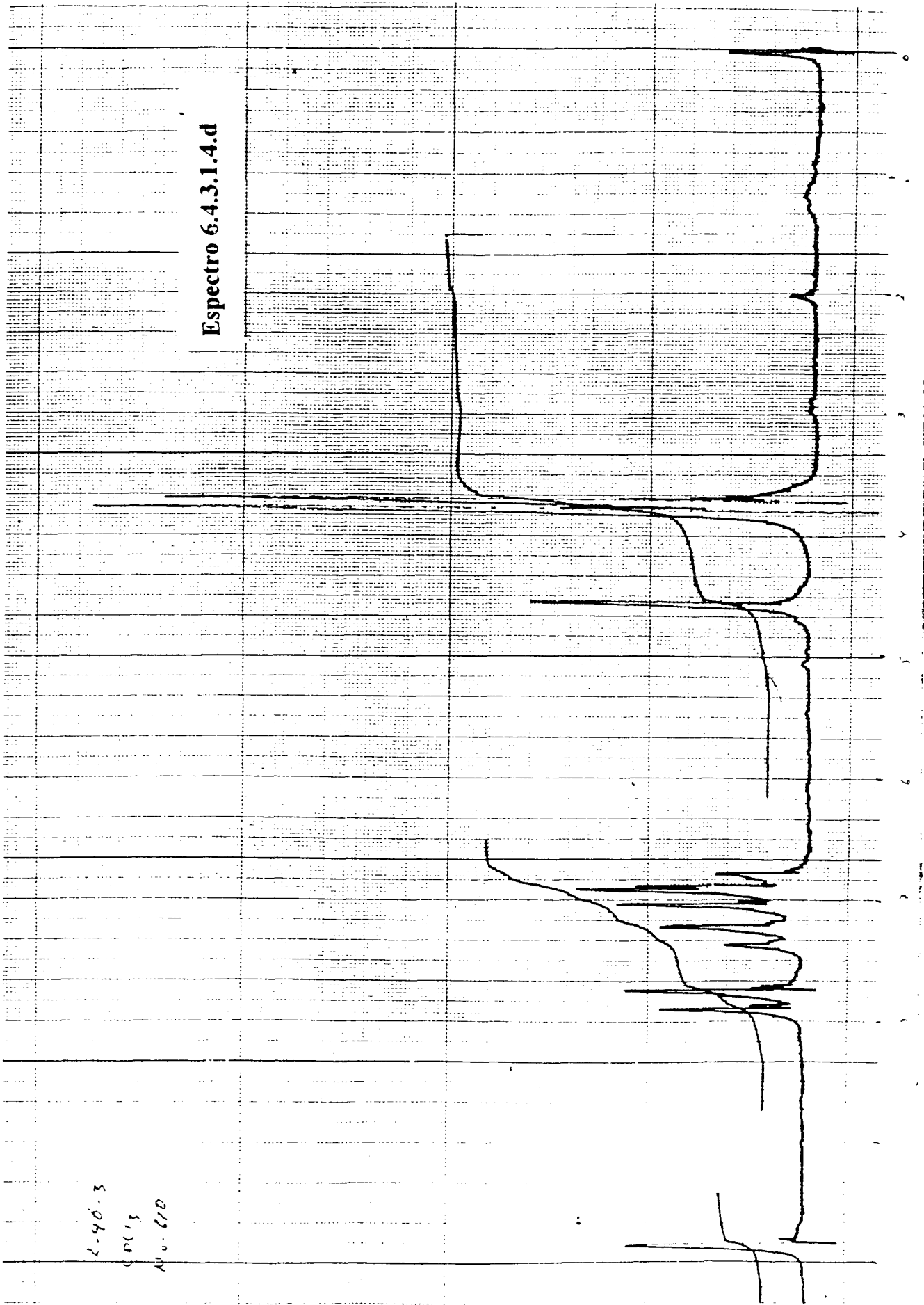
1.04 2
23.01.94
4/6

Espectro 6.4.3.1.4.c



L-40-3
CPC 13
M. V. C/D

Espectro 6.4.3.1.4.d

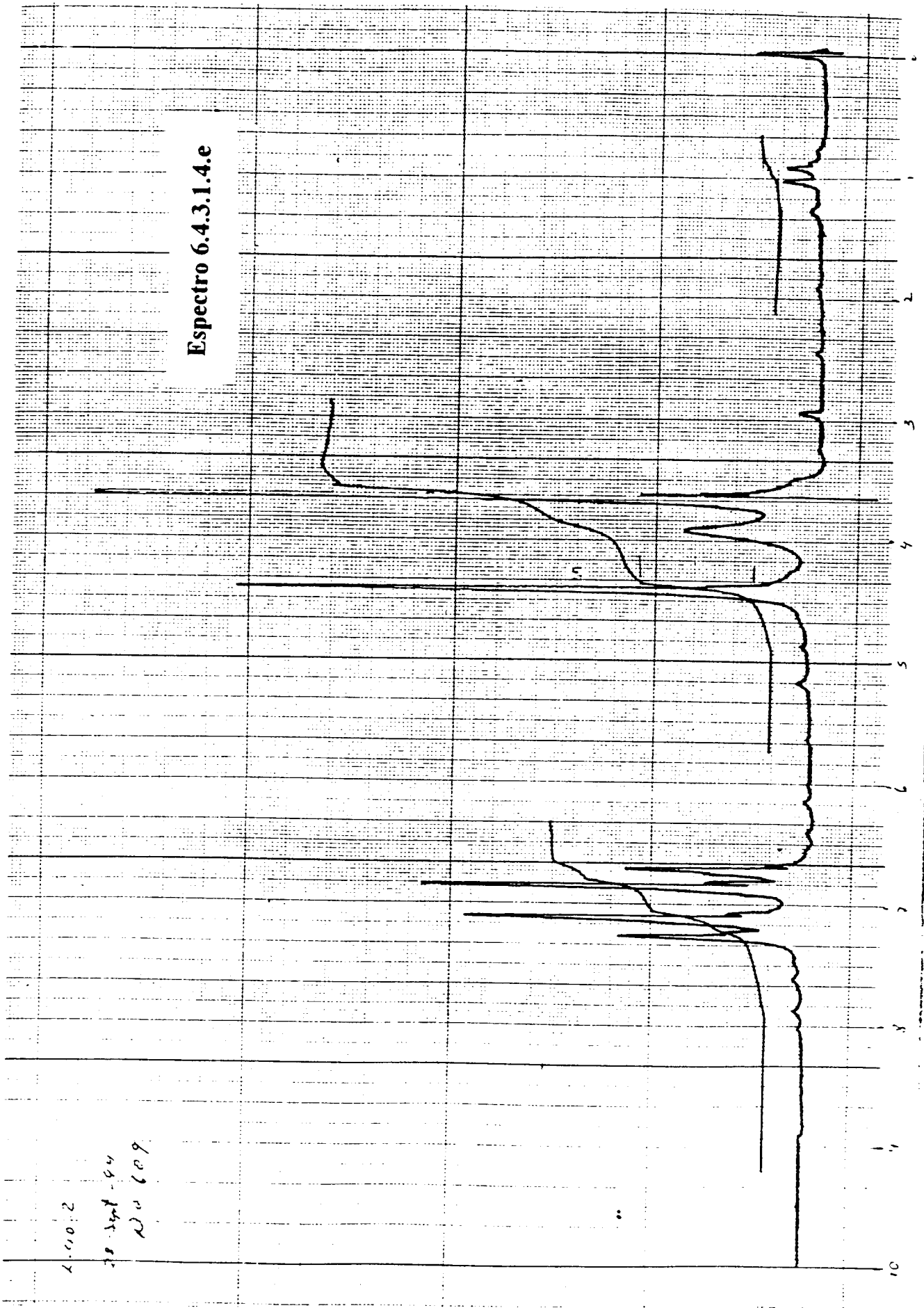


1.10.2

30.12.84

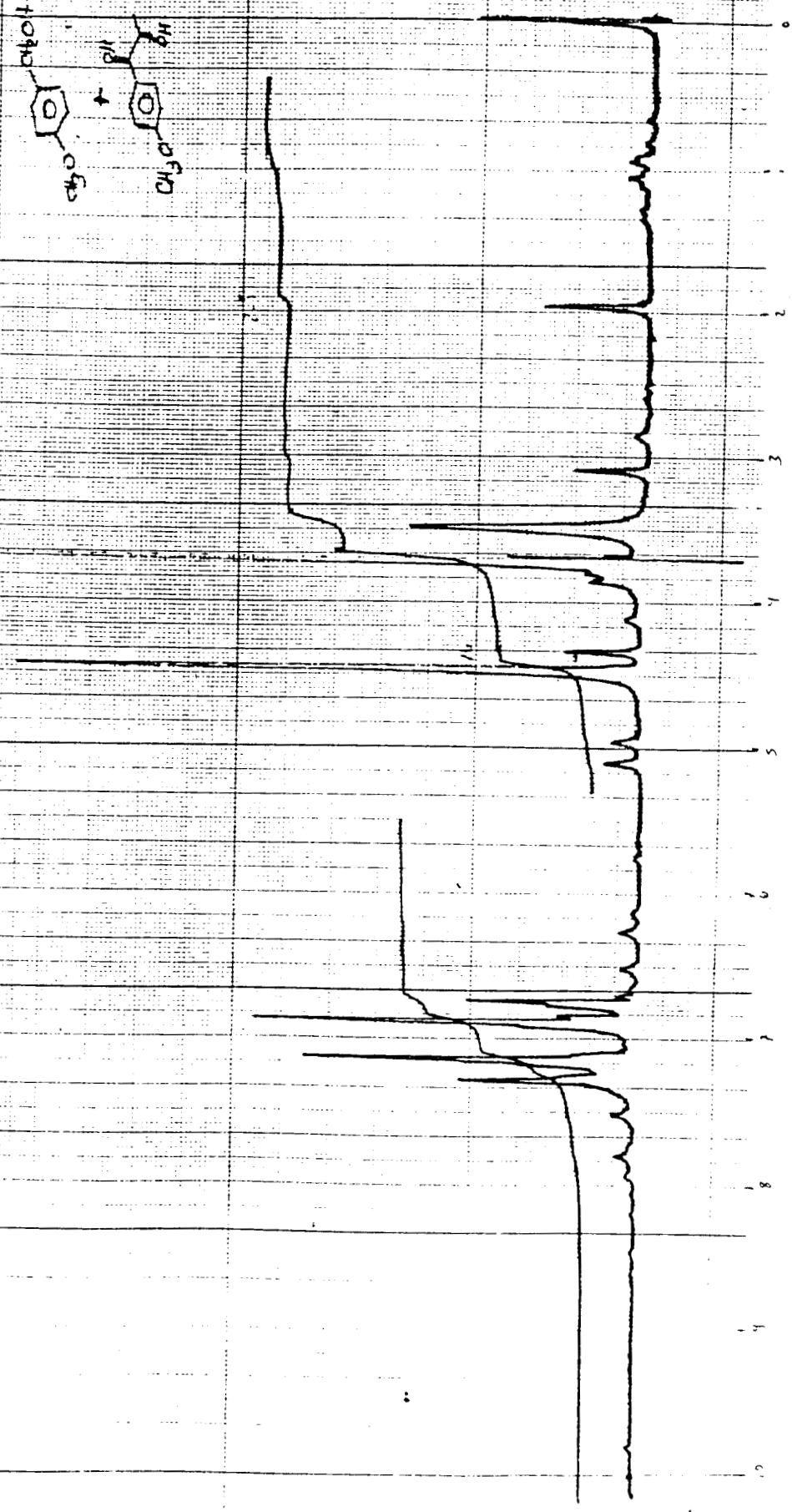
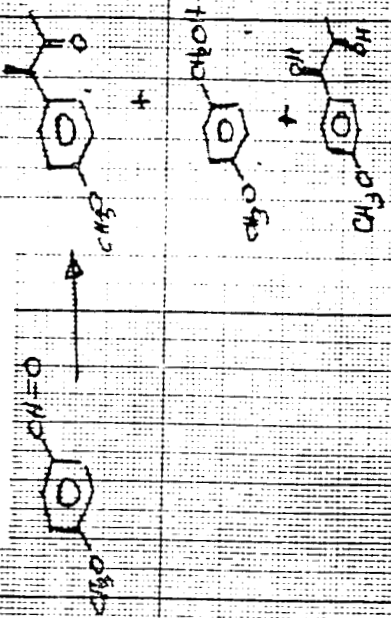
200609

Espectro 6.4.3.1.4.e



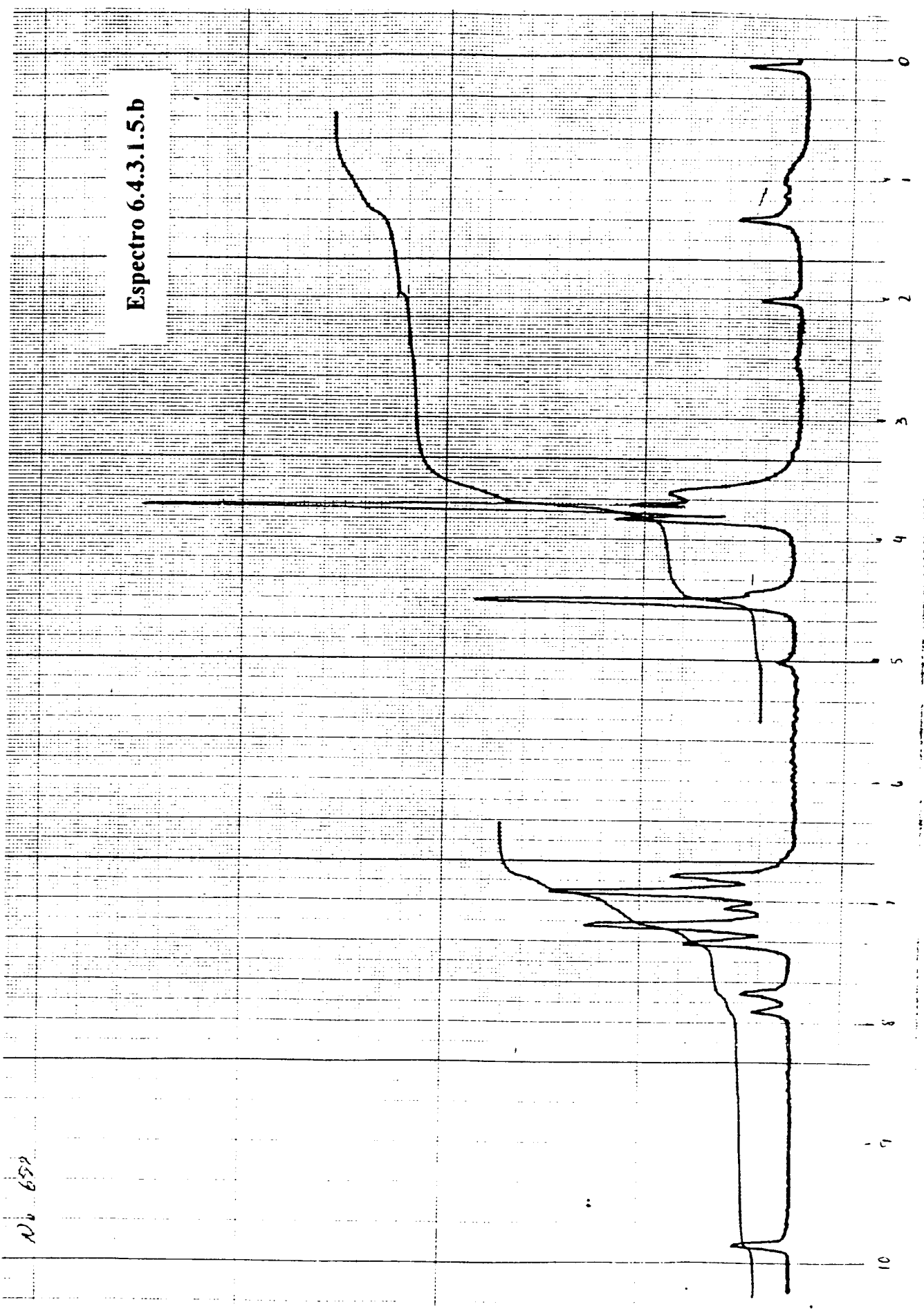
41-3
698

Espectro 6.4.3.1.5.a



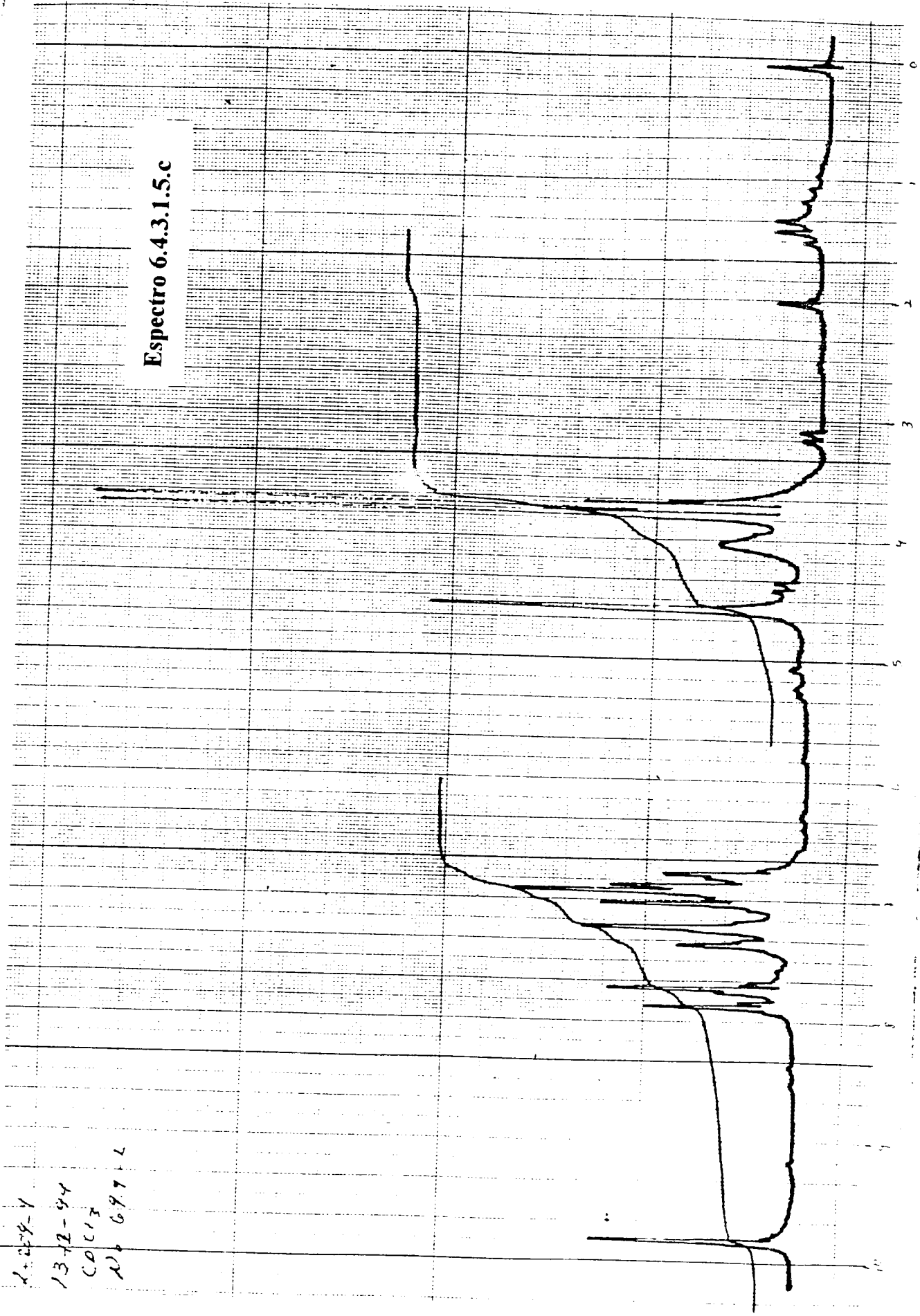
N. 652

Espectro 6.4.3.1.5.b



1-279-1
13-12-54
COC13
A 6 697-2

Espectro 6.4.3.1.5.c



10. 652

Espectro 6.4.3.1.5.d

