

T
839

 XOCOMILCO SERVICIO DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

78430

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

PRODUCCIÓN DE FARMOQUÍMICOS

ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS DEL (\pm)-2-(4-ISOBUTILFENIL)
PROPANONITRILO CON *Nocardia corallina*.

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

P R E S E N T A

Q.F.B. RICARDO LIEVANO REYES

MATRÍCULA 206182797

COMITÉ TUTORAL

Tutor: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

Asesor: DRA. AIDA SOLÍS OBA

Asesor: DR. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ

Marzo/2009

**ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS DEL (±)-2-(4-ISOBUTILFENIL)
PROPANONITRILO CON *Nocardia corallina*.**

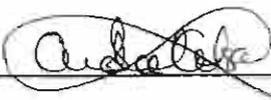
COMITÉ TUTORAL

Tutor: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ



Vo.Bo.

Asesor: DRA. AIDA SOLÍS OBA



Vo.Bo.

Asesor: DR. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ



Vo.Bo.

**Alumno: QFB. RICARDO LIEVANO REYES
Matrícula: 206182797**



**ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS DEL (±)-2-(4-ISOBUTILFENIL)
PROPANONITRILO CON *Nocardia corallina*.**

JURADO DE EXAMEN DE GRADO



PRESIDENTA: DRA. MARÍA DEL CARMEN VILLEGAS HERNÁNDEZ



VOCAL: DRA. MARÍA MYRNA SOLÍS OBA



SECRETARIA: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

RESUMEN

Las biotransformaciones, también llamadas biocatálisis aplicadas a la síntesis química han tenido gran auge, ya que se pueden obtener muchas ventajas con este tipo de transformaciones químicas como son la químio-, regio- y enantioselectividad, además de que este tipo de reacciones se pueden llevar a cabo con buenos rendimientos en medios acuosos, teniendo reacciones limpias y que contaminan en menor medida al medio ambiente, contrario a lo que pasa cuando se utiliza la síntesis química convencional.

En este trabajo se estudió la hidrólisis del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, la isomerización del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico para obtener un proceso biocatalítico en el cual se obtuviera la resolución de estas mezclas recémicas, logrando con esto resolver los problemas de efectos adversos causados por este tipo de compuestos quirales. Se estudiaron dos métodos: Células en suspensión en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y en proceso de fermentación.

En el desarrollo de este estudio se confirmó la actividad enzimática de la nitrilo hidratasa presentada por *Nocardia corallina*, ya que se logró obtener la amida correspondiente al (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, además de la presencia de esta enzima se observa que este microorganismo puede hidrolizar hasta el correspondiente ácido, por lo que podemos decir que este actinomiceto presenta la enzima llamada amidasa. Cabe mencionar que al presentarse estas dos actividades enzimáticas no se observó de manera clara la enantioselectividad en los productos obtenidos. Sin embargo se encontró que a tiempos largos de biotransformación se da una isomerización del ácido obtenido al enantiómero *R*.

Al estudiarse la biotransformación del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico se presentó el enriquecimiento del enantiómero *R*(-), por lo que podemos decir que *Nocardia corallina* presenta una isomerasa que biotransformó el enantiómero *S*(+), para obtener una mayor proporción del enantiómero *R*(-).

Esta actividad enzimática fue corroborada al realizar la biotransformación del ácido S(+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico observándose la presencia del enantiómero *R*. Se realizó otra biotransformación con el enantiómero S(+) del ácido pero ahora utilizando como segunda fase *n*-octano, lo cual mejoró de manera significativa la isomerización hacia el enantiómero *R*.

Por último se estudió la biotransformación de la (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida para ver si se presentaba la hidrólisis hacia el ácido correspondiente y verificar la presencia de la amidasa. Después de 48 horas de reacción no se logró la obtención del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico. Esto puede deberse a la necesidad de tener conjuntamente al nitrilo para desarrollar el proceso de hidrólisis dado que es su precursor.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma Metropolitana y al programa de Maestría en Ciencias Farmacéuticas de esta institución, por su apoyo para el desarrollo adecuado de los aspectos teóricos y experimentales en este estudio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar estudios de maestría, durante el periodo Octubre-2005 a Septiembre-2007 con número de registro 203323.

Al Cuerpo Académico Consolidado: Biocatálisis Aplicada a la Química Orgánica, UAM-X-CA-30, Laboratorio G-206, UAM-Xochimilco.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Para la culminación de este proyecto tuve el apoyo de muchas personas que estuvieron presentes en una u otra forma, aportando su apoyo moral, amor, experiencia y conocimientos para poder realizarlo.

Quisiera iniciar agradeciendo a mi esposa Alma que gracias a su amor, comprensión y ayuda me motivó a seguir adelante, a mi hijo Leonardo que el amor que siento hacia él representa un motor para llevar a cabo mis objetivos y metas, sin ese amor que nos une como familia hubiera sido prácticamente imposible la conclusión de este trabajo.

A mis padres María de la Luz[†] y Federico quisiera agradecerles por su amor, confianza, educación, apoyo incondicional etc., que durante toda mi vida me han brindado, todo esto me ha hecho sentir afortunado de tenerlos siempre conmigo.

A mis hermanos Guillermo, Jorge y Edgar les agradezco sus palabras de aliento y consejos que sé que nacieron en su corazón para que yo pudiera ser una mejor persona en todos los aspectos de mi vida, gracias por que siempre han sido un buen ejemplo para mí.

A la Dra. Herminia y al Dr. Norberto les agradezco su incondicional apoyo, confianza, generosidad y paciencia, además que gracias a su experiencia y valiosas observaciones, el trabajo aportó resultados importantes para generar conocimiento dentro de esta área de estudio denominada Biotransformaciones.

También quisiera aprovechar este espacio para agradecer a los doctores Aída, Ma. Myrna, Ma. Del Carmen, Héctor y Julia por sus observaciones y sugerencias en el desarrollo y evaluación de este trabajo.

Para finalizar agradecer a mis compañeros y amigos Fernando, Mario, Cony, Artemio, Marlen, Omar etc. que siempre me apoyaron en la realización de este estudio.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	iii
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	iv
ÍNDICE	v
ESQUEMAS Y GRÁFICAS	viii
TABLAS	ix
FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	4
2.1 Transformaciones microbianas.	4
2.2 Ventajas y desventajas de las transformaciones microbianas.	5
2.3 Tipos de transformaciones microbianas.	6
2.4 Procesos de transformaciones microbianas.	7
2.5 Aplicación de los procesos de transformaciones microbianas.	8
2.6 Transformaciones microbianas en la industria farmacéutica.	10
2.7 Enzimas, elemento clave en los procesos de biotransformación.	11
2.8 <i>Nocardia corallina</i> .	11
2.8.1 Descripción morfológica de <i>Nocardia</i> .	11
2.9 Escalamiento a nivel fermentador.	13
2.9.1 Escalamiento de procesos.	13
2.9.2 Transferencia de oxígeno.	15
2.9.3 Determinación experimental de la transferencia de oxígeno.	16
2.9.4 Técnica dinámica (régimen no estacionario).	17
2.10 Hidrólisis química de nitrilos.	17
2.11 Hidrólisis microbiológica de nitrilos.	18
2.12 Isomerización microbiológica.	19
2.13 (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.	19
2.14 Proceso de biotransformación del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con <i>Nocardia corallina</i> .	20
2.15 Proceso de isomerización del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico con <i>Nocardia corallina</i> .	20
2.16 Propiedades fisicoquímicas del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.	22
2.17 Propiedades fisicoquímicas del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.	22
2.18 Propiedades fisicoquímicas del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.	23
2.19 Métodos de resolución y análisis cuantitativo de enantiómeros.	24

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	25
4. HIPÓTESIS.	25
5. OBJETIVOS.	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos específicos.	26
6. MATERIAL Y MÉTODOS.	27
6.1 Equipo utilizado.	27
6.2 Reactivos.	27
6.3 Desarrollo de los métodos analíticos.	28
6.3.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).	28
6.3.1.1 Determinación de la relación enantiomérica para el (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.	28
6.3.1.2 Determinación de la relación enantiomérica para el (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.	29
6.3.1.3 Determinación de la relación enantiomérica para el ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico.	29
6.3.2 Cromatografía de gases (CG).	30
6.4 Crecimiento en placa del microorganismo (<i>Nocardia corallina</i> B-276)	30
6.4.1 Composición del medio para placas de agar	30
6.4.2 Preparación del medio de cultivo líquido	30
6.5 Método para construir la curva de peso húmedo contra peso seco de <i>Nocardia corallina</i> para células en suspensión.	31
6.6 Método para realizar las curvas patrón peso húmedo y peso seco vs densidad óptica (DO) para fermentador de 3 litros.	31
6.7 Biotransformaciones.	32
6.7.1 Procedimiento general para la biotransformación del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, ácido(±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico y (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida con células en suspensión.	32
6.7.1.1 Células en suspensión.	33
6.7.2 Procedimiento general para la biotransformación de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, y el ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico en fermentador.	34
6.7.2.1 Crecimiento en fermentador de 3 litros.	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	36
7.1. Método analítico para la materia prima y productos de referencia.	36
7.1.1 Espectros de Infrarrojo.	36
7.1.2 Espectros de Resonancia magnética nuclear (RMN) ¹ H y ¹³ C.	38
7.1.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).	41
7.1.3.1 (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.	41
7.1.3.2 (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.	42
7.1.3.3 Ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico.	42
7.1.4 Cromatografía de gases.	44

7.2 Análisis de blancos de los sustratos: (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, ácido-2-(4-isobutilfenil) propanóico y (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.	46
7.3 Curva de peso húmedo vs peso seco de <i>Nocardia corallina</i> para células en suspensión.	49
7.4 Datos obtenidos para la curva patrón de Densidad óptica vs peso seco y húmedo de <i>Nocardia corallina</i> a nivel fermentador	51
7.5 Biotransformaciones con células en suspensión (método 1) y en fermentador (método 2).	52
7.5.1 Biotransformación del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con células en suspensión (método 1).	52
7.5.2 Biotransformación del (±)-2-(4-isobutilfenil) propanonitrilo en fermentador de 3 litros (método 2).	56
7.6 Biotransformación del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil) propanóico (Ibuprofeno) con células suspendidas (método 1) y en fermentador (método 2).	58
7.6.1 Biotransformación del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico con células en suspensión (método 1).	58
7.6.2 Biotransformación del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil) propanóico en fermentador de 3L.	62
7.7 Biotransformación del ácido S-(+)-2-(4-isobutilfenil) propanóico (método 1).	63
7.8 Biotransformación del (±)-2-(4-isobutilfenil) propanoamida (método 1).	65
8. CONCLUSIONES.	69
9. REFERENCIAS.	70

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Pág.

Esquema 1.- Enzimas potencialmente involucradas en un proceso de biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con *Nocardia corallina*. 19

Esquema 2.- Potencial vía de biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con *Nocardia corallina*. 20

Esquema 3.-Epimerización del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico con *Nocardia corallina*. 21

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Pág.

Gráfica 1.- Curva patrón de células húmedas vs peso seco. 50

Gráfica 2.- Densidad óptica (DO) vs células húmedas y peso seco. 52

Gráfica 3.- Bioconversión del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico (lote 1) 60

Gráfica 4.- Bioconversión del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico (lote 2) 60

Gráfica 5.- Bioconversión del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico (lote 4) 61

Gráfica 6.- Bioconversión del S-(+) ácido-2-(4-isobutilfenil)propanóico 24 horas [1:35]. 64

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1.-	Ejemplo de procesos biocatalíticos y biotransformaciones a través de los siglos.	4
Tabla 2.-	Porcentaje de biotransformaciones catalizadas por enzimas reportadas en el periodo de 1996 a 1998.	7
Tabla 3.-	Clasificación de enzimas.	11
Tabla 4.-	Clasificación de escalas de procesos de fermentación.	13
Tabla 5.-	Condiciones cromatográficas para la resolución del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.	28
Tabla 6.-	Condiciones cromatográficas para la resolución del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.	29
Tabla 7.-	Condiciones cromatográficas para la resolución del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico.	29
Tabla 8.-	Datos de la curva de células húmedas contra peso	50
Tabla 9.-	Densidad óptica (DO) vs células húmedas y peso seco.	51
Tabla 10.-	% de los sustratos al final de la conversión para las biotransformaciones de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con células suspendidas.	53

Tabla 11.-	Biotransformaciones realizadas de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo en fermentador 3L.	57
Tabla 12.-	Biotransformaciones del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico realizadas con células suspendidas.	59
Tabla 13.-	Biotransformaciones de ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico realizadas en fermentador de 3L.	62
Tabla 14.-	Bioconversión del ácido S-(+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico con células suspendidas con <i>n</i> -octano.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1.-	Tipo de compuestos producidos usando procesos de biotransformación.	9
Figura 2.-	Sectores industriales en los que se usan las biotransformaciones.	9
Figura 3.-	Número de procesos de biotransformación a escala industrial.	10
Figura 4.-	Procesos de biotransformación para la obtención de productos enantiopuros.	10
Figura 5.-	Espectro infrarrojo del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.	36
Figura 6.-	Espectro infrarrojo de la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.	37
Figura 7.-	Espectro infrarrojo del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.	37
Figura 8.-	Espectro de RMN ^{13}C de la referencia de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.	38
Figura 9.-	Espectro de RMN ^1H de la referencia de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.	39

Figura 10.-	Espectro de RMN ¹³ C de la referencia de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.	39
Figura 11.-	Espectro de RMN ¹ H de la referencia de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.	40
Figura 12.-	Espectro RMN ¹³ C de la referencia de ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.	40
Figura 13.-	Espectro RMN ¹ H de la referencia de ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.	41
Figura 14.-	Cromatograma del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.	42
Figura 15.-	Cromatograma del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.	42
Figura 16.-	Cromatograma del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.	43
Figura 17.-	Cromatograma del ácido S-(+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.	43
Figura 18.-	Cromatograma de gases del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico, t.r = 3.855 minutos.	44
Figura 19.-	Cromatograma de gases del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida, t.r = 5.386 minutos.	44
Figura 20.-	Cromatograma de gases del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, t.r = 2.763 minutos.	45
Figura 21.-	Cromatograma de gases de la mezcla del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo (t.r = 2.784 min.), ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico (t.r = 3.661 min) y del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida (t.r = 5.589 min).	46
Figura 22.-	CLAR del blanco de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.	47
Figura 23.-	CLAR del blanco de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.	47
Figura 24.-	CLAR del blanco del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.	47
Figura 25.-	CG del blanco de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.	48
Figura 26.-	CG del blanco de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.	48
Figura 27.-	CG del blanco del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.	49

Figura 28.- Cromatograma de gases del lote 4, (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo (2.59 min.), ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico (3.43 min.) y (\pm)-2-(4-isobutilfenil) propanoamida (5.50 min.).	55
Figura 29.- Cromatograma CLAR del lote 4, ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico (9.299 y 10.05 min.) y la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida (15.48 min.), columna OJ-H, a las 24 h.	55
Figura 30.- Cromatograma del lote 4 con relación sustrato:células de 1:12.1, (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo (2.7 min), ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico (3.36 min) y la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida (4.50 min).	58
Figura 31.- Cromatograma por CLAR de la (\pm)-2-(4-isobutilfenil) propanoamida de referencia (10.53 y 11.40 min).	65
Figura 32.- Cromatograma por CLAR de la biotransformación de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida, observándose los enantiómeros de la amida a los 10.3 y 11.12 min.	65
Figura 33.- Cromatograma por CLAR de la biotransformación de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida con n-octano, observándose los enantiómeros de la amida a los 10.3 y 11.14 min.	66
Figura 34.- Cromatograma por CG de la biotransformación de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida (4.51 min.)	66
Figura 35.- Cromatograma por CG, de la biotransformación de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida con n-octano (amida 4.77 min).	67
Figura 36.- Espectro de infrarrojo de la biotransformación de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida (3202, 3338 y en 1668 cm^{-1}), con n-octano.	67
Figura 37.- Espectro de infrarrojo de la biotransformación de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida (3191, 3348 y en 1669 cm^{-1}) sin n-octano.	68

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una gran preocupación por las enormes cantidades de residuos producidos por la actividad industrial, los cuales contaminan en considerable medida al medio ambiente, lo que ha traído como consecuencia la investigación y el desarrollo de métodos en los que se presente una menor cantidad de este tipo de residuos. Por lo tanto, se han desarrollado procesos biocatalíticos que disminuyen los riesgos de cualquier tipo de contaminación, además que proporcionan algunas ventajas como: especificidad de sustrato; variedad de reacciones que se pueden llevar a cabo; buenos rendimientos en los productos obtenidos; medios acuosos y reacciones limpias.¹

La biocatálisis aplicada a la síntesis orgánica es un área de investigación bien definida la cual ha estado teniendo un gran auge en desarrollos biotecnológicos; diferentes libros² y revisiones bibliográficas se han ocupado de esta temática.^{3,4} Este proceso se efectúa con células completas de animales, plantas o microorganismos; también se han purificado 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.⁵ Los microorganismos son los más utilizados para una biocatálisis.^{5,8}

Por otra parte, en el mercado farmacéutico mundial, aproximadamente el 25% de los fármacos que se comercializan son racematos o mezclas de diasterómeros. Tales estereoisómeros frecuentemente difieren en términos de actividad biológica y perfiles farmacocinéticos, además el uso de mezclas contribuye a la presencia de efectos adversos, particularmente cuando uno de los enantiómeros es inactivo o tiene menor actividad que el otro. Otro de los factores que afectan la terapéutica, al utilizar mezclas racémicas,⁹ es la dosis administrada al paciente ya que existe la posibilidad de no suministrarle la cantidad adecuada de fármaco, dándole una menor o mayor cantidad de éste.^{9,10}

Durante la pasada década la síntesis o resolución de fármacos ópticamente activos y sus intermediarios, ha recibido mucha atención por parte de académicos e investigadores de la industria farmacéutica. Tres posibles razones hacen que estos cambios sean interesantes posibilidades¹¹:

(1) El beneficio médico usando fármacos ópticamente puros.

Existen numerosos ejemplos en los cuales se observa que la actividad biológica deseada reside en solo un enantiómero de un fármaco quiral, ya que con el otro isómero puede existir menor potencia, inactividad, o presentar efectos adversos no deseados.

(2) Un cambio en el clima regulatorio.

Se han generado nuevas guías o regulaciones por parte de las autoridades sanitarias a favor del desarrollo de un solo estereoisómero para la venta de nuevos fármacos.

(3) Recientes avances en la síntesis de compuestos ópticamente puros.

En los últimos años se ha podido conseguir la preparación de grandes cantidades de compuestos ópticamente puros, ejemplos de estos avances son: síntesis química asimétrica, resolución cinética catalítica, resolución de mezclas racémicas vía cristalización estereoselectiva o cromatografía quiral.¹¹

Debido a lo anterior, se consideró de interés estudiar la biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo ya que puede resultar con algunos de estos beneficios en la síntesis del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico, un agente antiinflamatorio no esteroideo, que se comercializa bajo el esquema de compra OTC (over the counter), es decir no requiere receta médica para su venta.

En el presente trabajo se consideró también el estudio de la isomerización de la mezcla racémica del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico con el microorganismo *Nocardia corallina*, buscando la obtención del (-)-2-(4-isobutilfenil)propanóico ó *R*-ibuprofeno, el cual se ha descubierto que puede utilizarse en padecimientos como el Alzheimer¹² y en tratamientos de quimioterapia.¹³

Para ambos casos, se utilizó como aplicación de la biocatálisis el sistema enzimático de *Nocardia corallina* para demostrar la participación de: nitrilo hidratasa y epimerasa, lo anterior es un aporte al conocimiento para la obtención de fármacos enantioméricamente puros.

2. ANTECEDENTES

2.1. Transformaciones microbianas

Los microorganismos tienen la capacidad de modificar químicamente una amplia variedad de compuestos orgánicos. Tales cambios son denominados transformaciones microbianas o biotransformaciones. Para llevar a cabo estas modificaciones se requiere de enzimas las cuales son catalizadores de la naturaleza que exhiben una gran especificidad y un enorme poder catalítico (biocatálisis).¹⁴

Los procesos de biotransformación han sido utilizados desde hace cientos de años (ver **Tabla 1**).¹⁵ Por ejemplo la biotransformación de etanol a ácido acético (vinagre) por *Acetobacter*.

Tabla 1. Ejemplos de procesos biocatalíticos y biotransformaciones a través de los siglos.

Año	Proceso
5000 AC	Producción de vinagre
800 AC	Hidrólisis de caseína con quimosina para la producción de queso
1670	Bio-oxidación de etanol a ácido acético
1897	E. Buchner descubre las primeras enzimas que convierten azúcar en alcohol
1940	Inversión de la sucrosa usando una invertasa
1950	Bioconversión de esteroides
1970	Hidrólisis de penicilina a ácido 6-aminopenicilánico
1985	Producción de acrilamida mediante un proceso enzimático
1990	Hidrólisis de la insulina porcina a insulina humana mediante una proteasa (tripsina)

2.2 Ventajas y desventajas de las transformaciones microbianas.

Actualmente la aplicación de la biocatálisis ha atravesado la frontera académica, encontrando un campo fértil de acción en la industria farmoquímica, específicamente para la manufactura de compuestos enantiopuros.¹⁶ Por lo que podemos decir que se han resuelto algunos problemas al realizar la síntesis utilizando la biocatálisis; sin embargo este tipo de reacciones no dejan de presentar ventajas y desventajas.

Ventajas

- Las transformaciones microbianas dañan en menor medida al medio ambiente, ya que generalmente se presentan en condiciones suaves de reacción: las biotransformaciones se llevan a cabo generalmente en medios acuosos (evitando el uso de disolventes orgánicos no degradables), a temperatura ambiente y presión atmosférica, evitando con esto el uso de condiciones de reacción extremas, que pueden causar isomerizaciones, racemizaciones, epimerizaciones o transposiciones.
- Especificidad del sustrato: Normalmente una enzima cataliza solamente la transformación de un tipo de sustrato.
- Estereoespecificidad: En presencia de una mezcla racémica como material de partida, solamente un enantiómero es convertido.
- Adicionalmente, cuando el biocatalizador, (microorganismos o enzimas aisladas) están inmovilizados se pueden reciclar varias veces sin pérdida significativa de sus propiedades catalíticas.¹⁶
- Los microorganismos, por ejemplo las bacterias, tienen la capacidad de producir grandes cantidades de biomasa.¹⁵

- Las enzimas de los microorganismos presentan quimio-, regio-, y enantioselectividad.¹⁵

Desventajas

- Las bioconversiones con enzimas están limitadas en ocasiones al uso de cofactores.^{17, 18}
- Las transformaciones microbianas tienen una alta vulnerabilidad a los cambios de pH y temperatura.
- En algunos casos los procesos de biotransformación tienen rendimientos bajos.
- Altos costos de implementación de los procesos a escala industrial.^{16, 19}

2.3 Tipos de transformaciones microbianas.

Las transformaciones microbianas pueden ser agrupadas desde el punto de vista químico en las siguientes categorías: oxidación, reducción, hidrólisis, condensación, isomerización, formación de nuevos enlaces C-C e introducción de heterofunciones.¹⁷

Se realizó una revisión en el campo de las transformaciones microbianas (biocatálisis) considerando los años de 1996-1998 y se encontró que existe una mayor cantidad de ejemplos de hidrólisis y esterificaciones; probablemente por que las enzimas hidrolasas y estererasas para este tipo de reacciones son accesibles comercialmente, ver **tabla 2**.²⁰

Tabla 2. Porcentaje de biotransformaciones catalizadas por enzimas reportadas en el periodo de 1996 a 1998.²⁰

Tipo de biotransformación	Porcentaje de biotransformaciones		
	1996	1997	1998
Hidrólisis	20	25	22
Esterificación	18	23	23
Formación de amidas	3	5	6
Reducción	9	13	9
Oxidación	21	12	18
Formación de puentes C-C	8	5	6
Modificación de carbohidratos	10	10	6
Otros	11	7	10
Total	100	100	100

2.4 Procesos de transformaciones microbianas

En la conversión microbiana de compuestos orgánicos pueden ser utilizados sistemas de esporas, cultivos en crecimiento, células en reposo, enzimas, células inmovilizadas o enzimas inmovilizadas.²¹

En los procesos con cultivos en crecimiento, la cepa utilizada se cultiva en un medio adecuado y después del crecimiento del cultivo (6-24 h) se añade una solución concentrada de sustrato.²² Una variante de este procedimiento es utilizar un inóculo muy grande y añadir el sustrato concentrado inmediatamente, sin permitir un periodo de crecimiento.²²

Para la biotransformación de materiales lipofílicos es posible emplear un sistema polifásico. A la fase acuosa, que contiene el material celular o la enzima, se superpone una fase con un fluido inmiscible en agua en el que se ha disuelto el sustrato. El sustrato pasa lentamente a la fase acuosa y a medida que continúa la reacción de transformación el producto revierte a la fase del disolvente. En algunos casos la transformación se produce realmente en la interfase, entre la fase acuosa y del disolvente.²²

El porcentaje de la conversión está relacionado con el tiempo de reacción, la concentración de sustrato y el microorganismo utilizado. Las reacciones de oxidación y de deshidratación que se llevan a cabo con bacterias son frecuentemente completadas en unas pocas horas; las conversiones con levaduras y especialmente con hongos pueden llevar varios días.²²

Si no es necesaria la inducción de la enzima por el sustrato que se añade, pueden ser utilizados sistemas de células sin crecimiento. Esto tiene la considerable ventaja de que se elimina la inhibición del crecimiento por el sustrato. Pueden ser utilizadas altas densidades de células, lo que facilita el aumento de productividad; al mismo tiempo se reduce el riesgo de contaminación. Puesto que la reacción de transformación se produce predominantemente en la solución del tampón, la recuperación del producto es relativamente sencilla. Un conjunto de procesos utilizan células inmovilizadas, lo que ofrece la ventaja de que el proceso pueda ser llevado a cabo continuamente y las células puedan ser utilizadas una y otra vez.^{21, 22}

2.5 Aplicación de los procesos de transformaciones microbianas

Han sido descritas una amplia variedad de biotransformaciones, pero solamente han encontrado aplicación industrial algunos de estos procesos. Ciertos procesos tienen rendimientos insuficientes y para otros el mercado es limitado. Se espera que se produzca un amplio rango de aplicaciones en conexión con nuevas tecnologías, como procesos más económicos que utilizan células o enzimas inmovilizadas.²² Otras mejoras son esperadas por la utilización de cepas, que han sido optimizadas genéticamente para procesos específicos.²²

Analizando las biotransformaciones industriales, éstas están dirigidas a compuestos naturales y sus derivados (**figura 1**). Los carbohidratos y derivados de grasas son los más usados en la industria alimenticia.²³ En la industria farmacéutica y agropecuaria, son utilizados otro tipo de compuestos

(esteroides, moléculas quirales, péptidos, etc.), como se muestra en la **figura 1**, teniendo mayor número de procesos la farmacéutica (**figura 2**).²³

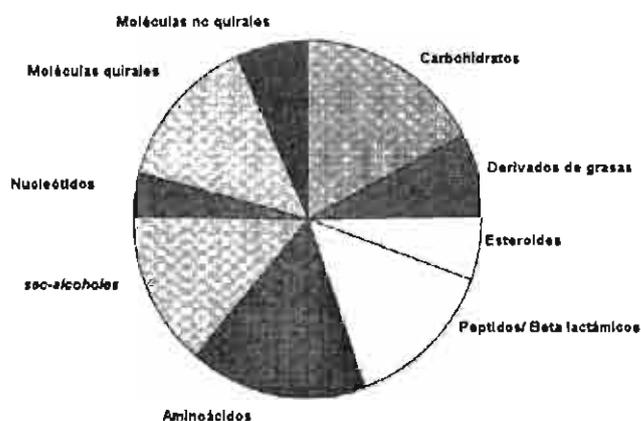


Figura 1. Tipo de compuestos producidos usando procesos de Biotransformación.

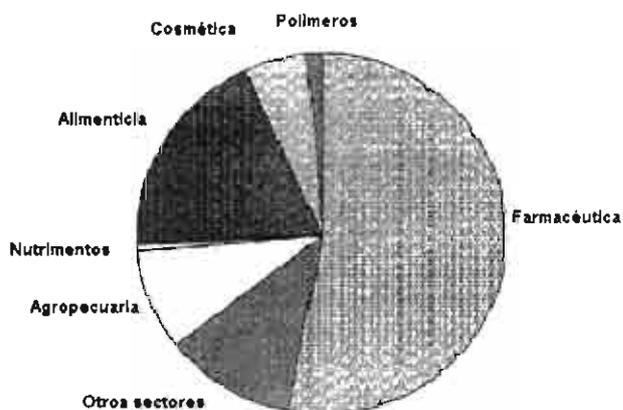


Figura 2. Sectores industriales en los que se usan las biotransformaciones.

2.6 Transformaciones microbianas en la industria farmacéutica.

El número total de procesos de biocatálisis ha ido aumentando rápidamente a escala industrial durante la pasada década, (**figura 3**), el número de productos derivados de estos procesos indican que son particularmente valiosos para el sector dedicado a la química fina (industria farmoquímica y farmacéutica), y dentro de este sector se encuentran los compuestos en los que está implicada la quiralidad, estos se muestran en la **figura 4**.²³

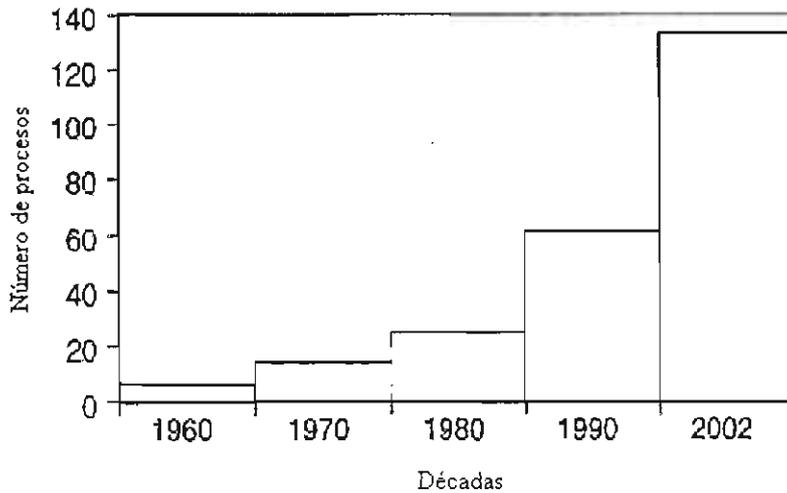


Figura 3. Número de procesos de biotransformación a escala industrial

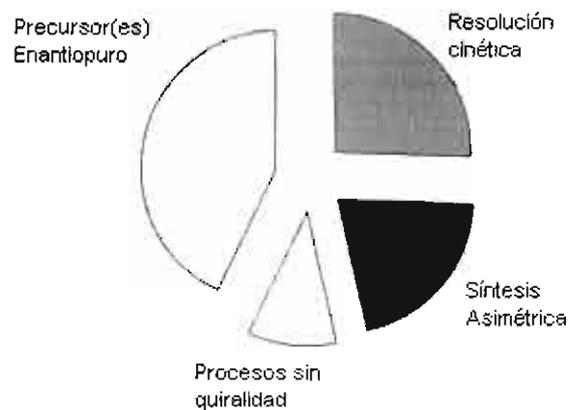


Figura 4. Procesos de biotransformación para la obtención de productos enantiopuros.

2.7 Enzimas, elemento clave en los procesos de biotransformación

Una enzima usualmente es una proteína que actúa como catalizador de una reacción biológica. Como todos los catalizadores, las enzimas no afectan la constante de equilibrio de una reacción y sólo actúan para abatir la energía de activación para una reacción, con lo que aceleran dicha reacción.^{2, 24}

Las enzimas se agrupan de acuerdo al tipo específico de reacción que son capaces de catalizar y, tradicionalmente, se dividen en seis clases como se muestra en la **tabla 3**.¹⁷

Tabla 3. Clasificación de enzimas^{2, 17}

Enzima	Función
Oxidoreductasa	Cataliza reacciones de óxido-reducción
Transferasa	Transfiere grupos acilo, glucosilo, fosfatos y equivalentes de aldehídos y cetonas de una molécula a otra
Hidrolasa	Hidroliza grupos como glucósidos, anhídridos, ésteres, amidas, péptidos y otros enlaces como C-N
Liasa	Cataliza adiciones entre hidrógeno y halógeno a dobles enlaces y también cataliza el proceso inverso
Isomerasa	Cataliza reacciones de isomerización incluyendo migraciones de dobles ligaduras, isomerizaciones <i>cis</i> , <i>trans</i> y racemizaciones
Ligasa	Cataliza la formación de enlaces C-O, C-S, C-N, C-C y enlaces de ésteres de fosfatos

2.8 *Nocardia corallina*

2.8.1 Descripción morfológica de *Nocardia*.

Las especies de *Nocardia* pertenecen al grupo de los actinomicetos, habitan en el suelo, son bacilos Gram positivos aerobios parcialmente ácidosresistentes, crecen fácilmente dentro de una amplia gama de temperaturas y se cultivan en medios relativamente simples.²²

Estas especies 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 forma de rosario y los filamentos aéreos experimentan fragmentación para producir células similares a esporas unicelulares que se dispersan con facilidad.²²

Las paredes de *Nocardia* poseen ácidos nocárdicos, éstos son parecidos a los ácidos micólicos que presentan *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*. Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga β-hidroxilados y α-ramificados, por lo común saturados o monoinsaturados. Los ácidos nocárdicos tienen alrededor de 50 carbonos de largo, mientras que los ácidos coronomicólicos tienen de 32 a 36.²⁵

Las especies de *Corynebacterium* no son ácidosresistentes y las de *Nocardia* presentan una ácidosresistencia débil o parcial cuando se tiñen fácilmente con carbolfucsina básica sin calentar y, para comprobar su ácido-alcohol resistencia, se usa H₂SO₄ del 1% al 4% sin etanol, ya que el ácido más el alcohol es efectivo como agente decolorante.²⁵

Las especies de *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.^{25, 26}

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

Para capturar *Nocardia* se utilizan varillas de vidrio cubiertas de parafina, esto se logra sumergiendo las varillas en parafina fundida y posteriormente colocándolas ya sea en el suelo o agua del medio ambiente. El aislamiento se evidenciará por el crecimiento de ésta alrededor de la varilla.²⁶

2.9. Escalamientos a nivel fermentador.

2.9.1. Escalamiento de procesos.

En el desarrollo de un proceso, ya sea fermentativo o de cualquier otra índole, el escalamiento es uno de los pasos de mayor importancia para asegurar la rentabilidad y productividad de dicho proceso, ya que involucra variables desde el diseño del equipo, sistemas auxiliares a emplear, factores técnicos y factores económicos.

En el caso de las biotransformaciones aeróbicas, predecir resultados a escala de producción industrial, basados en el escalamiento de datos obtenidos en el laboratorio, requiere de un análisis cuidadoso tanto de las variables fisicoquímicas como biológicas.²⁷

De acuerdo con la capacidad del fermentador se pueden clasificar las escalas como se muestra en la **tabla 4**, así como conocer los rangos de operación más comunes en lo que se refiere a potencia por unidad de volumen y a velocidad de agitación.²⁷

Tabla 4. Clasificación de escalas de procesos de fermentación.

Escala del fermentador	Potencia de trabajo W/L*	Capacidad del fermentador (litros)	Velocidad de agitación (rpm)
Escala pequeña	8-10	3	200-2000
Escala piloto	3-5	10	200-1200
Escala industrial	1-3	50	100-800
		200	50-400
		500	50-300

*W= Watt, L=litro

Cuando en el escalamiento se pretenden trasladar las condiciones de operación de un equipo a otro, o de una escala a otra, es importante establecer que la relación entre las variables: potencia/volumen, revoluciones por minuto, cantidad de aire por minuto sean similares.²⁷

El control ambiental y su escalamiento dependen por lo tanto de las limitaciones del equipo. Usualmente es la transferencia de oxígeno la que determina la capacidad operativa de un fermentador y es por ello que debe de tomarse como un criterio para el escalamiento.²⁷

La transferencia de oxígeno puede establecerse de la siguiente manera:

Velocidad de transferencia de $O_2 = K_L a (C^*g - C_L)$ promedio

Velocidad de transferencia de $O_2 = Q_{O_2} x$

Donde:

$K_L a$ = coeficiente volumétrico de transferencia de masa (h^{-1}).

C^*g = concentración del oxígeno disuelto en equilibrio con el oxígeno de fase gaseosa.

C_L = concentración de oxígeno disuelto.

Q_{O_2} = demanda específica de oxígeno ($mmol O_2/g \text{ células-h}$)

x = concentración celular ($g/L, mg/mL$)

Los criterios más adecuados para pasar de una escala a otra son mantener la relación P/V (potencia/volumen) constante y $K_L a$ constante. Sin embargo el uso del $K_L a$ constante presenta algunas dificultades por las siguientes razones²⁸:

- a) Cambio durante el transcurso de la fermentación, debido al aumento de la viscosidad del medio, aumento de la concentración de células y por problemas de formación de espuma.

- b) Las correlaciones de K_{La} solo son válidas en ciertos rangos de operación y para geometrías del fermentador particulares.
- c) El método por el cual se determina el K_{La} .

La ubicación del electrodo de oxígeno disuelto es otro punto que debe de considerarse en el escalamiento, ya que éste deberá colocarse en una posición en donde mida la concentración de oxígeno disuelto del volumen activo. También habrá de considerarse la transferencia de calor, ya que a medida que el fermentador aumenta de tamaño, el área de enfriamiento o calentamiento disminuye.²⁷

2.9.2 Transferencia de oxígeno.

En los procesos aeróbicos es necesario un suministro adecuado de oxígeno que satisfaga los requerimientos metabólicos de los microorganismos empleados, por ello es indispensable conocer los requerimientos de oxígeno del cultivo, para asegurarse de que su suministro es suficiente.²⁸

Al evaluar la transferencia de oxígeno, es necesario conocer y calcular las resistencias a la transferencia que encuentra el oxígeno antes de llegar a la célula, las resistencias están determinadas por los obstáculos que se oponen a la transferencia, estas son:

- 1- En la película gaseosa (para gases muy solubles ej. NH_3)
- 2- En la interfase gas-líquido
- 3- En la película líquida (para gases poco solubles)
- 4- En el seno del líquido
- 5- En la película líquida que rodea al sólido
- 6- En la interfase líquido-sólido
- 7- En la fase sólida conteniendo las células
- 8- En los sitios de la reacción bioquímica.

Se ha demostrado que en el caso de organismos unicelulares, la mayor resistencia la opone la película del líquido que rodea las burbujas, pero en los agregados celulares, el paso limitante es la difusión a través del agregado mismo.²⁸

2.9.3 Determinación experimental de la transferencia de oxígeno.

Existe una gran variedad de métodos para medir la capacidad de transferencia de oxígeno en un fermentador, todas estas técnicas se basan en un balance de oxígeno, ya sea de todo el sistema o de la fermentación en particular, el balance se representa mediante la siguiente fórmula que muestra el cambio de la concentración de oxígeno respecto al tiempo.²⁸

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C_L) - Q_{O_2} X$$

Donde:

dC = diferencial de concentración de oxígeno

dt = diferencial del tiempo

Las técnicas utilizadas para la transferencia de oxígeno comúnmente se basan en dos tipos de medición:

Medición indirecta

- 1.- Oxidación de sulfito
- 2.- Técnica de eliminación de gas

Medición directa

- 1.- Balance de oxígeno en el sistema
- 2.- Técnica dinámica (régimen no estacionario)

Al emplear los métodos de medición directa, se tiene la ventaja que se realizan bajo condiciones reales de operación y, por tanto, los valores obtenidos son más representativos del sistema en estudio.²⁸

2.9.4 Técnica dinámica (régimen no estacionario).

Propuesto por Taguchi y Humphrey,²⁹ en este método se introduce una perturbación en el sistema (interrupción de la aireación o de la agitación) por lo que este responde modificando C_L y, de esta variación puede calcularse el K_La .

Condición: La medición de la concentración de oxígeno debe efectuarse en forma rápida, de modo que los parámetros fisiológicos (respiración) y cinéticos (biomasa, C_L , C^*g) puedan considerarse constantes.

Ventajas.

- La determinación se hace *in situ*
- Solo requiere un electrodo de oxígeno
- Puede calcularse el C^*g

Limitaciones.

- Se requiere un electrodo de respuesta rápida
- El K_La que se calcula es puntual
- Hay errores dados por:
tiempo de respuesta del electrodo
transferencia de oxígeno desde la superficie.

2.10 Hidrólisis química de nitrilos.

Los nitrilos constituyen un valioso grupo funcional para la síntesis orgánica ya que son versátiles intermediarios. La hidrólisis de nitrilos a amidas, ó formaciones de aminas, ácidos carboxílicos, carbonilos y otros compuestos son ejemplos de su utilidad. La regio-, quimio- y estereoselectividad en la hidrólisis de nitrilos no es accesible bajo condiciones normales.²⁴

Éstas reacciones pueden llevarse a cabo mediante una hidrólisis ya sea con soluciones básicas o ácidas a altas temperaturas, produciendo ácidos carboxílicos más amoniaco o una amina; el mecanismo de la hidrólisis básica incluye la adición nucleofílica de un ión hidróxilo al enlace polar $C\equiv N$, de un

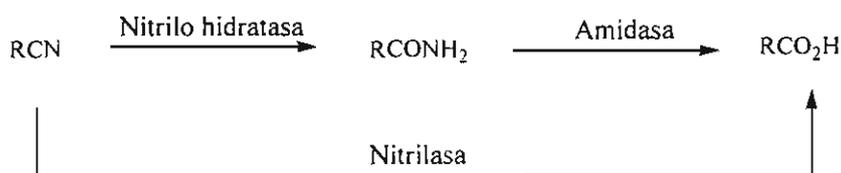
modo análogo a la adición nucleofílica al enlace polar C=O. En seguida, la hidroximina formada se isomeriza a una amida. Las amidas pueden ser obtenidas con agentes oxidantes fuertes como por ejemplo el peróxido de hidrógeno o el superóxido de sodio en dimetilsulfóxido (DMSO). Una hidrólisis posterior de la amida produce el ácido carboxílico.^{24, 30}

Por lo que una de las ventajas del grupo nitrilo es que puede ser introducido como un carbanión estable en agua y una de sus desventajas es que la hidrólisis de estos compuestos por síntesis orgánica a amidas o ácidos carboxílicos usualmente requiere condiciones drásticas.³¹

Sin embargo, con enzimas estas transformaciones pueden ser realizadas fácilmente bajo condiciones suaves y puede ser, por lo tanto, convenientes para su aplicación en hidrólisis, por supuesto la posibilidad de realizar una resolución de nitrilos racémicos con estas enzimas es un apartado a considerar y motiva al estudio de estos sistemas biológicos.³¹

2.11 Hidrólisis microbiológica de nitrilos

La habilidad de las enzimas para hidrolizar nitrilos ha sido extensamente reportada y existen dos mecanismos que dependen del microorganismo utilizado, estos son: hidrólisis de nitrilo a amida, por una nitrilo hidratasa seguida de la hidrólisis de la amida a ácido carboxílico por una amidasa, o por una conversión directa a ácido carboxílico vía una nitrilasa, como se muestra en el **esquema 1**.^{31, 32} La diferencia entre estos dos mecanismos es poco importante en el caso de hidrólisis regioselectiva, sin embargo es crucial cuando se usa la nitrilasa para la resolución cinética.^{20, 33} Con este estudio se conocerá la vía de hidrólisis del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con *Nocardia corallina*.



Esquema 1. Enzimas potencialmente involucradas en un proceso de biotransformación del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con *Nocardia corallina*.

2.12 Isomerización microbiológica.

Las isomerizaciones son una herramienta importante para resolver mezclas racémicas. Este tipo de reacciones son catalizadas por las isomerasas, las cuales abarcan 5 clases de enzimas, estas catalizan cambios dentro de la molécula. Dependiendo del tipo de isomerismo, las enzimas se denominan como *epimerasas*, *racemasas*, *cis-trans-isomerasas*, *tautomerasas* o *mutasas*.³⁴ Las subclases más importantes son las *racemasas*, *epimerasas* y las *oxidoreductasas* intramoleculares.³⁵

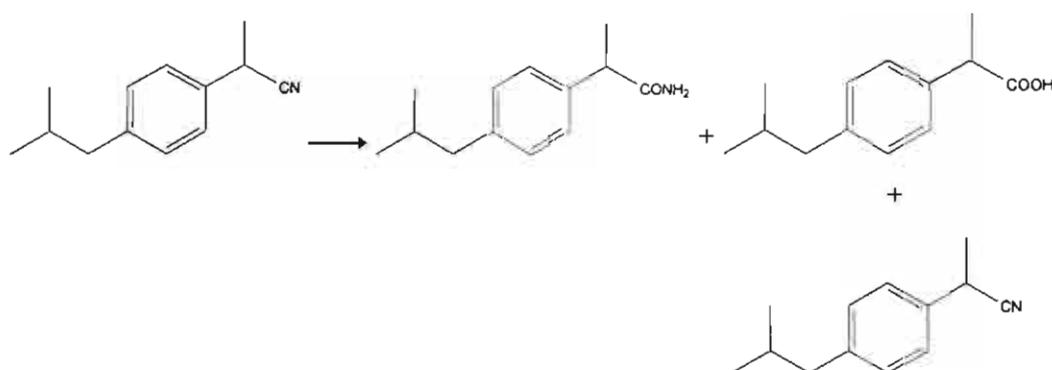
Hasegawa reportó en 1990 que las estereoinversiones catalizadas por microorganismos dan un rendimiento teórico del 100% para la obtención de alcoholes ópticamente activos.³⁶ Esto es muy importante ya que permite utilizar el 100% del material quiral y no es necesario reciclar el enantiómero no deseado.

2.13 (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.

El (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo es utilizado para la síntesis del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico, también conocido como ibuprofeno, siendo este un antiinflamatorio no esteroideo perteneciente al grupo de los derivados de los ácidos propanóicos.³⁵

2.14 Proceso de biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con *Nocardia corallina*

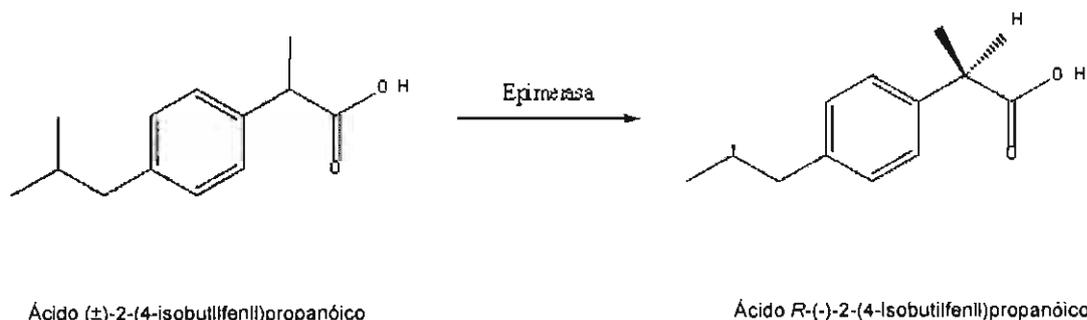
El proceso de biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con *Nocardia corallina* básicamente se espera que se lleve a cabo por la hidrólisis hacia su respectiva amida o ácido como se puede observar en el **esquema 2**.³⁰ La estereoespecificidad será un tema de gran interés a considerar en este proceso biocatalítico.³³



Esquema 2. Potencial vía de biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con *Nocardia corallina*.

2.15 Proceso de isomerización del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico con *Nocardia corallina*.

En la isomerización del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico se espera el enriquecimiento del enantiómero *R*(-), es decir la isomerización del centro quiral, la cual se llevará a cabo por la presencia de una enzima de la clase principal de las isomerasas llamada epimerasa (**esquema 3**).

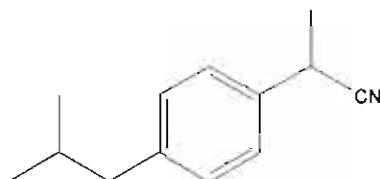


Esquema 3. Epimerización del ácido (±)-2-(4-isobutylfenil)propanóico con *Nocardia corallina*.

Como antecedentes para esta desracemización microbiológica, se cuenta con el hecho de que, en mamíferos ésta estereoinversión es posible, por ejemplo en el hígado de rata³⁷ y en humanos³⁸ se obtiene el enantiómero (S) del ibuprofen. Varias especies de *Nocardia* han sido estudiadas para desarrollar este proceso así, en la estereoinversión del alcohol (±)-3-pentín-2-ol, se obtiene el alcohol (*R*) con un 70% de rendimiento. En éste caso se desarrolla una oxidación enantioselectiva del (S) y posteriormente se da una reducción enantioselectiva de la cetona intermedia.³⁹ La isomerización de ácidos carboxílicos quirales α-substituidos se ha estudiado con *Nocardia diaphanozonaria*, así el ácido (±)-2-fenilpropanoico es biotransformado al enantiómero (*R*) con un 95.8% de exceso enantiomérico (ee) y 91% de ácido recuperado.⁴⁰ Kato *et al.*,⁴¹ estudiaron el mecanismo de esta desracemización microbiana en estos ácidos carboxílicos α-substituidos. Además del interés científico hay que sumar la importancia comercial de estos compuestos, varios de ellos son conocidos agentes antiinflamatorios no esteroideos, lo que hace muy atractivo el conocer los alcances de esta metodología. Sin embargo al someter al (±)-ibuprofen a biotransformación durante 48 horas, estos autores recuperaron el 85% del ácido pero con sólo un 9% de ee. Se han reportado excelentes rendimientos con otros derivados, como el ácido 2-(4-clorofenoxi)propanóico, 95% de ácido recuperado con un 97% de ee, siendo el enantiómero (*R*) el mayoritario.⁴² Es decir una pequeña variante estructural favorece esta desracemización, pero la utilidad del método quedó seriamente restringida en la serie de ácidos propiónicos α-substituidos.

Si bien se ha estudiado la hidrólisis enantioselectiva de ésteres de (\pm)-ibuprofen con enzimas de microorganismos,⁴³ los rendimientos han sido moderados. A manera de ejemplo, se recupera un 17% de este ácido con un ee > 99% y 68% del éster metílico cuando se utiliza *Pseudomonas fluorescens*.⁴³ En éste estudio se decidió no abordar esta metodología con *Nocardia corallina*, aunque es potencialmente factible emplearla, por lo que puede ser tema de posteriores investigaciones.

2.16 Propiedades fisicoquímicas del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.⁴⁴



$C_{13}H_{17}N$

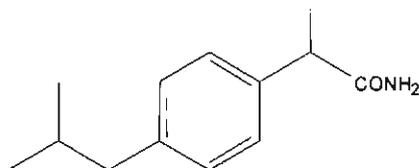
Peso molecular: 187.28

Punto de ebullición_{760 Torr}: $289.3 \pm 9.0^{\circ}C$

Densidad: $0.940 \pm 0.06 \text{ g/cm}^3$

Relativamente insoluble en agua, se disuelve en la mayoría de los disolventes orgánicos.

2.17 Propiedades fisicoquímicas del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.⁴⁵



$C_{13}H_{18}NO_2$

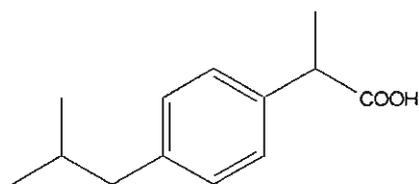
Peso molecular: 221.30

Punto de fusión: $112-114^{\circ}C$

Densidad: $1.058 \pm 0.06 \text{ g/cm}^3$

Relativamente insoluble en agua, se disuelve en la mayoría de los disolventes orgánicos.

2.18 Propiedades fisicoquímicas del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.⁴⁶



$C_{13}H_{18}O_2$

Peso molecular: 206.27

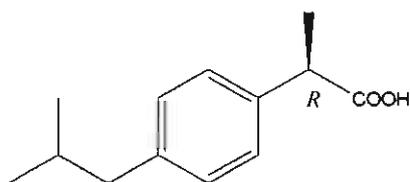
C 75.69% H 8.80% O 15.51%

Sólido cristalino estable.

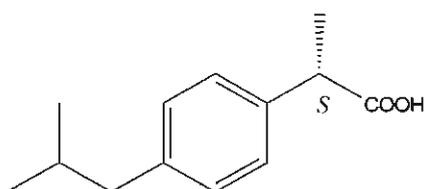
Punto de fusión: 75-77°C

Relativamente insoluble en agua, se disuelve en la mayoría de los disolventes orgánicos.

ácido *R*-(-)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.⁴⁶



ácido *S*-(+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.⁴⁶



2.19 Métodos de resolución y análisis cuantitativo de enantiómeros.

Los métodos actuales para la resolución son: la síntesis química asimétrica; resolución cinética catalítica; resolución de mezclas racémicas vía cristalización estereoselectiva o cromatografía quiral.⁴⁷ Para el análisis de enantiómeros los métodos utilizados son: la polarimetría, la resonancia magnética nuclear (RMN), dilución isotópica, calorimetría, algunas técnicas enzimáticas como la isomerización, técnicas cromatográficas como la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), cromatografía de gases (CG), cromatografía en capa fina (CCF) y electroforesis capilar. La electroforesis capilar es ya una realidad para el análisis enantiomérico, esta técnica es más exacta que las técnicas cromatográficas usadas para este tipo de análisis; la principal desventaja de esta técnica es su baja sensibilidad.⁴⁸

La utilización de sensores electroquímicos para el reconocimiento molecular de enantiómeros no es laboriosa si uno los compara con técnicas estructurales o cromatográficas. La confiabilidad de la respuesta así como la información analítica obtenida usando sensores electroquímicos esta estrictamente relacionada con el sensor designado. El método es preciso, rápido y no es caro, por consiguiente, el análisis enantiomérico usando técnicas electroquímicas es una buena alternativa para la separación de este tipo de moléculas.⁴⁸

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En el caso del fármaco antiinflamatorio no esteroideo ibuprofeno se han reportado diferentes actividades terapéuticas para cada enantiómero, se sabe que el enantiómero *S* es el que presenta la actividad terapéutica como analgésico y antiinflamatorio; pero actualmente se ha descubierto que el enantiómero *R* puede ser utilizado en padecimientos como el Alzheimer y en algunos tratamientos de quimioterapia, por lo cual en el presente estudio se analizará la hidrólisis enantioselectiva del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo y de la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida con *Nocardia corallina* B-276. Así mismo, se estudiará el proceso de desracemización del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico para la obtención de uno de los enantiómeros con *Nocardia corallina* B-276.

4. HIPÓTESIS.

Es factible la hidrólisis enantioselectiva del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo y la isomerización del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico utilizando *Nocardia corallina* B-276.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo General.

Estudiar la hidrólisis enantioselectiva del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo y la isomerización del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico con *Nocardia corallina* B-276.

AGRICULTURA Y AGROPECUARIO

5.2 Objetivos específicos.

- Estudiar la biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con células en suspensión de *Nocardia corallina* con diferentes relaciones sustrato/células en peso seco.
- Estudiar la biotransformación de la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida con células en suspensión de *Nocardia corallina* con diferentes relaciones sustrato/células en peso seco.
- Estudiar la isomerización del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico con células en suspensión de *Nocardia corallina* con diferentes relaciones sustrato/células en peso seco.
- Desarrollar un método de extracción para los productos de la hidrólisis del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.
- Aislar y caracterizar los productos de la hidrólisis de la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con *Nocardia corallina*.
- Desarrollar el método analítico que permita seguir el proceso de biotransformación para: el (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida y el ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.
- Escalar el proceso de la hidrólisis del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con *Nocardia corallina* a nivel fermentador de 3 litros.
- Escalar el proceso de la isomerización del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico con *Nocardia corallina* a nivel fermentador de 3 litros.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Equipo utilizado.

1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent 1100 con detector de UV/visible de arreglo de diodos.
2. Cromatógrafo de gases (CG) HP 6890 series.
3. Espectrofotómetro de infrarrojo (IR) Perkin-Elmer Paragon 1600 FT y Perkin-Elmer Spectrum BX, FT-IR System.
4. Resonancia magnética nuclear (RNM) Varian 400 MHz
5. Polarímetro Perkin Elmer modelo 341
6. Espectrofotómetro Genesys 20 (325 – 1100 nm).
7. Agitador orbital REVCO
8. Bioreactor esterilizable de 3 litros Applikon, equipado con una mantilla eléctrica, termómetro de Pt 100, sensor de pH Applisens Z001023510 (pH 0-12/0-135°C), sensor de oxígeno disuelto Applisens Z010019011, difusor de aire, rotámetro, agitador con sistema de propelas con velocidad variable, toma de muestras, condensador y registrador automatizado de variables, con:
 - a) Control de agitación P100 ADI 1032 Applikon de velocidad variable
 - b) Consola de flujo Applikon
 - c) Consola ADI 1030 Bio Controller Applikon (pH, temperatura, O₂)
 - d) Software Bio Xpert Data acquisition & control program versión 1.1 x

6.2 Reactivos

1. El (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo y la (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida fueron proporcionados por el Dr. José Ignacio Regla Contreras, FES. Zaragoza, UNAM.
2. El Ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico es extraído del medicamento comercial (Motrin tabletas de 500mg).
3. El Ácido S-(+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico 99 %, adquirido de Sigma-Aldrich.
4. Isopropanol y hexano grado CLAR, fueron adquiridos de Tecsiquim.

5. Cloroformo, acetato de etilo y hexano grado reactivo analítico, fueron adquiridos de Tecsiquim.
6. *N,N*-dimetilformamida (DMF), adquirido de Merck.
7. *n*-octano, adquirido de J.T.Baker.

6.3 Desarrollo de los métodos analíticos

6.3.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Columnas quirales: CHIRACEL OD (250 X 4.6 mm, L X ID) con un recubrimiento de celulosa tris-(3,5-dimetilfenil carbamato) y CHIRACEL OJ-H (250 X 4.6 mm, L X ID) con un recubrimiento de celulosa tris-4-metilbenzoato. Todas con un soporte de 5 μ m de sílica gel.

6.3.1.1 Determinación de la relación enantiomérica para el (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo. Para esta determinación se probaron las siguientes condiciones presentados en la **tabla 5**:

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la resolución del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.

Flujo (mL/min)	Mezcla de disolventes	Longitud de Onda (λ)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Columna
0.8	99:1 hexano:isopropanol	220, 230, 254, 270	20 $^{\circ}$ C	OJ-H
1	99:1 hexano:isopropanol (0.1% de ácido trifluoracético)	220, 230, 254, 270	20 $^{\circ}$ C	OD
1	99:1 hexano:isopropanol (0.2% de ácido trifluoracético)	220, 230, 254, 270	20 $^{\circ}$ C	OD
0.5	99.5:0.5 hexano:isopropanol (0.1% de ácido trifluoracético)	220, 230, 254, 270	25 $^{\circ}$ C	OD

6.3.1.2 Determinación de la relación enantiomérica para el (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida. Para esta determinación se probaron las siguientes condiciones presentados en la **tabla 6**:

Tabla 6. Condiciones cromatográficas para la resolución del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.

Flujo (mL/min)	Mezcla de disolventes	Longitud de Onda (λ)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Columna
0.4	90:10 hexano:isopropanol	220, 230, 240, 260, 280	25 $^{\circ}$ C	OD
0.6	90:10 hexano:isopropanol	220, 230, 240, 260, 280	25 $^{\circ}$ C	OD
0.8	90:10 hexano:isopropanol	220, 230, 240, 260, 280	25 $^{\circ}$ C	OD
1	90:10 hexano:isopropanol	220, 230, 240, 260, 280	25 $^{\circ}$ C	OD
1	90:10 hexano:isopropanol	220, 230, 240, 260, 280	25 $^{\circ}$ C	OJ-H

6.3.1.3 Determinación de la relación enantiomérica para el ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico. Para esta determinación se probaron las siguientes condiciones presentados en la **tabla 7**:

Tabla 7. Condiciones cromatográficas para la resolución del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico.

Flujo (mL/min)	Mezcla de disolventes	Longitud de Onda (λ)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Columna
1	99.7:0.3 hexano:isopropanol (0.2% de ácido trifluoroacético)	220, 230, 254,270	25 $^{\circ}$ C	OD
0.8	99:1 hexano:isopropanol	220, 230, 254,270	25 $^{\circ}$ C	OJ-H
1	98:2 hexano:isopropanol (0.4% de ácido trifluoroacético)	220, 230, 254,270	25 $^{\circ}$ C	OJ-H
0.8	98:2 hexano:isopropanol	220, 230, 254,270	25 $^{\circ}$ C	OJ-H
0.6	95:5 hexano:isopropanol	220, 230, 254,270	25 $^{\circ}$ C	OJ-H

6.3.2 Cromatografía de Gases (CG).

Se utilizó una columna HP-5 (5% HP ME Siloxano, 30000 X 0.25 mm L X ID). Las condiciones para la determinación del porcentaje de conversión para el (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, ácido(±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico y (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida fueron:

Flujo de 1.0 mL/min, con una temperatura del inyector y detector de 250°C y temperatura del horno a 180°C, gas acarreador N₂.

6.4 Crecimiento en placa del microorganismo (*Nocardia corallina* B-276).

Se prepararon placas de agar con medio de cultivo enriquecido, en las cuales se sembró el microorganismo por un periodo de 72 a 96 horas a una temperatura de 28-30°C.

6.4.1 Composición del medio para las placas de agar.

Extracto de levadura 3g/L, peptona 5g/L y agar 15g/L.²²

6.4.2 Preparación del medio de cultivo líquido.

El medio de cultivo se preparó con la siguiente composición: 0.05 g FeSO₄·7H₂O/L; 1.74 g K₂HPO₄/L; 2.0 g (NH₄)₂SO₄/L; 1.0 g extracto de levadura/L, 1.5 g MgSO₄/L y 2.0 g glucosa/L. Se pesó la cantidad necesaria para preparar el medio, se ajustó el pH a 9.0 con KOH al 50% recién preparada, se filtró y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos, quedando un pH 8.0-8.5.

6.5 Método para construir la curva de peso húmedo contra peso seco de *Nocardia corallina* para células en suspensión.

Para poder medir la biomasa en peso seco, se construyó una curva patrón de células húmedas vs peso seco, la cual se elaboró de la siguiente manera:

- 1.- Se colocaron membranas de 0.22 μm en la estufa a 60°C de 24-30 horas, hasta tener peso constante.
- 2.- Se suspendieron las cantidades correspondientes de 0.002 a 1.8 g de biomasa en 50 mL de buffer de fosfatos pH 7.0 en matraces de 125 mL.
- 3.- Posteriormente las muestras fueron filtradas sobre las membranas de 0.22 μm para ser pesadas y determinar el peso húmedo.
- 4.- Después fueron secadas a una temperatura de 60 °C en una estufa, hasta que su peso permaneciera constante, para determinar su peso seco.
- 5.- Por último se elaboró una curva con los datos obtenidos determinando por regresión lineal la ecuación.

Esta curva se realizó por duplicado.

6.6 Método para realizar la curva patrón peso húmedo y peso seco vs densidad óptica (DO) para fermentador de 3 litros.

Para medir la biomasa durante las diferentes fases del proceso se determinó la curva patrón de células húmedas vs DO de la siguiente manera:

- 1.- Se colocaron membranas de 0.22 μm en la estufa a 60°C de 24-30 horas, hasta tener peso constante.
- 2.- Crecimiento de la *Nocardia corallina* mediante la siembra en placas de agar con su posterior incubación a 28-32°C durante 72-96 horas.
- 3.- Las colonias de *Nocardia corallina* se inocularon a dos matraces Erlenmeyer de 500 mL con deflectores, conteniendo 200 mL de medio en cada uno, previamente esterilizado, estos se incubaron a 28-32°C y se agitaron a 170 rpm en un agitador orbital.

4.- Se tomaron muestras de 5 mL por duplicado cada hora, durante 8 horas, se leyó la DO en un espectrofotómetro a 660 nm y las muestras se filtraron.

5.- Las muestras se pesaron para obtener los puntos de células húmedas vs. DO y se elaboró la gráfica, determinando por regresión lineal la ecuación que correspondía a la curva.

6.7 Biotransformaciones.

Las biotransformaciones se realizaron por dos métodos:

Método 1: Células en suspensión.³¹

Se tomaron muestras a diferentes tiempos de biotransformación, y en cada lote se tenía un blanco de células (biomasa de *Nocardia corallina* suspendida en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 sin sustrato).

Asimismo se realizaron blanco de los sustratos (sustratos en solución amortiguadora de fosfato pH 7): del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, del ácido-2-(4-isobutilfenil)propanoico y (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida para ver su estabilidad en la solución amortiguadora.

6.7.1 Procedimiento general para la biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico y (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida con células en suspensión.

6.7.1.1 Células en suspensión

Precultivo I

Se preparó un inóculo al transferir las colonias de *Nocardia corallina*, a dos matraces estériles de 250 mL con deflectores, con 125 mL de medio de cultivo líquido en cada uno, incubándose en un agitador orbital a una temperatura de 28-30°C con una agitación de 170 rpm por un periodo de 20-24 horas.

Precultivo II

El contenido de los matraces del precultivo I se trasvasó en condiciones de esterilidad a dos matraces de un litro con deflectores, con 500 mL de medio de cultivo en cada uno, incubándose en un agitador orbital a una temperatura de 28-30°C con una agitación de 170 rpm por un periodo de 20-24 horas.

Cosecha y activación de células

Las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación a 4,500 rpm durante 15 minutos desechando el sobrenadante, las células se lavan dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.0, centrifugando en cada ocasión bajo las mismas condiciones. La biomasa se pesó y se activó con 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos a 170 rpm, 28-32°C durante 30 min.

Biotransformación de los sustratos

Los siguientes sustratos: (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico, ácido S-(+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico y la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida disueltos en 0.3mL de DMF 0.6 % v/v a diferentes relaciones sustrato/células en peso seco. La biotransformación se siguió tomando muestras a diferentes tiempos.⁴⁹

A las muestras de las biotransformaciones con los sustratos anteriores se trabajaron de la siguiente forma: se les adicionó NaCl hasta saturación y las células de *Nocardia corallina* se separaron por centrifugación a 4500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se extrajo con disolventes orgánicos a diferentes pH, dependiendo del producto de la biotransformación; para el (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo la fase acuosa se ajusta a un pH de 8.5 extrayendo con CHCl₃ el nitrilo que no se biotransformó. Se extrae con acetato de etilo la (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida al mismo pH. Posteriormente la fase acuosa se ajustó a un pH de 2 y el ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico (ibuprofeno) se extrajo con cloroformo. Las fases orgánicas se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron a presión reducida. El residuo obtenido, después de haber evaporado la fase orgánica, se disolvió en 500 mL de isopropanol grado CLAR y se filtró a través de una membrana de 0.45 μm y el filtrado se colectó en un vial. Se caracterizaron los productos por IR, RMN, CLAR y CG.

Método 2: Fermentador de 3 L, para los siguientes sustratos:

El (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, y el ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico.

Se tomaron muestras a diferentes tiempos de biotransformación.

6.7.2 Procedimiento general para la biotransformación de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, y el ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico en fermentador.

6.7.2.1 Crecimiento en fermentador de 3 litros.

Se preparó el inóculo en el medio de cultivo líquido, transfiriendo las colonias de *Nocardia corallina* contenidas en una placa de agar con un crecimiento de 72-96h a dos matraces estériles de 500 mL con deflectores, con 200 mL de medio de cultivo en cada uno, incubándose en un agitador orbital a una

temperatura de 28-30°C con una agitación de 170 rpm por un periodo de 43-45 horas.

Se prepararon 1800 mL de medio de cultivo estéril para el fermentador Applikon de 3 L con un pH 8.0-8.5 a 28-30°C, 226 rpm y aereación a 0.9 vvm.

Manteniendo estas condiciones durante 12 horas, posteriormente se le adicionaron los 400 mL del inóculo anterior en condiciones estériles. El crecimiento celular en el fermentador se determinó cada hora midiendo la absorbancia a 660 nm hasta finalizar el crecimiento exponencial, alcanzándose a las 6 horas. La cantidad de células se calculó conforme a la curva patrón peso seco vs densidad óptica (DO) en fermentador de 3 litros.

Biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo y del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico.

Los sustratos previamente disueltos en DMF 0.6 % v/v se adicionaron al fermentador, a diferentes relaciones sustrato/células (p/p), tomándose muestras a diferentes tiempos. A las muestras se le agregó NaCl y se centrifugan durante 15 minutos a 4500 rpm, el sobrenadante obtenido se evaporó a presión reducida hasta 300 mL y se extrajo continuamente con CHCl_3 durante 24 horas, la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente en el rotavapor. El residuo obtenido después de haber evaporado la fase orgánica, se disolvió en 500 mL de isopropanol CLAR y se filtró a través de una membrana de 0.45 μm y el filtrado se colectó en un vial, para determinar la relación enantiomérica por CLAR y el porcentaje de conversión por CG.

7. RESULTADOS y DISCUSIÓN

7.1. Métodos analíticos para la materia prima y productos de referencia.

7.1.1 Espectros de Infrarrojo.

Se realizó el análisis utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo para la materia prima y los productos de referencia, para darle seguimiento a las biotransformaciones:

En el espectro de IR del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo se observa la señal del nitrilo en 2240.96 cm^{-1} , ver **figura 5**, señal seleccionada para ver la biotransformación a otro grupo funcional (amida o ácido), por ser característico del grupo nitrilo.

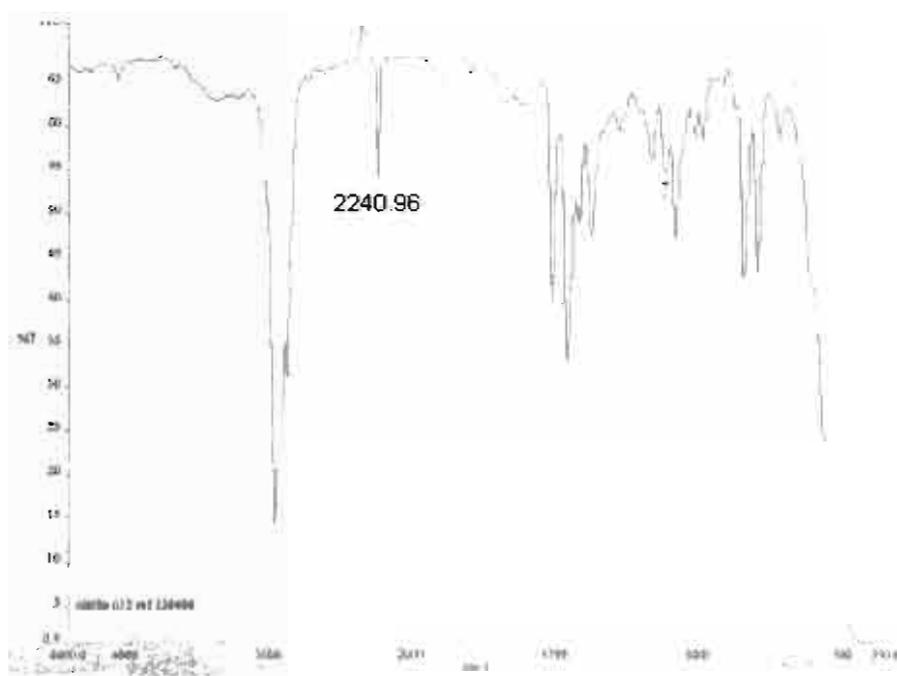


Figura 5. Espectro infrarrojo del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.

En la **figura 6**, se muestra el espectro de IR de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida donde se observan las señales características de la amida primaria (N-H) en 3349.81 , 3175.08 y en 1656.68 cm^{-1} el carbonilo, señales que nos permitirán ver el avance de la conversión.



Figura 6. Espectro infrarrojo de la (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.

En el espectro de IR del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico, extraído del medicamento comercial (Motrin 500 mg) se observa el carbonilo del ácido en 1707.25 cm^{-1} y la banda ancha del alargamiento O-H del grupo carboxilo en 2955.87 cm^{-1} (**figura 7**).



Figura 7. Espectro infrarrojo del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico.

7.1.2 Espectros de Resonancia magnética nuclear de ^{13}C e ^1H .

Como señal característica de la RMN ^{13}C , **figura 8**, el carbono del nitrilo se observa en 180 ppm.

En el espectro de RMN ^1H , **figura 9**, el hidrógeno en el carbono base del $-\text{CN}$ como un cuarteto centrado en 3.7 ppm, con el patrón de sustitución 1,4 (*para*) del anillo aromático en 7.2 y 7.1 ppm.

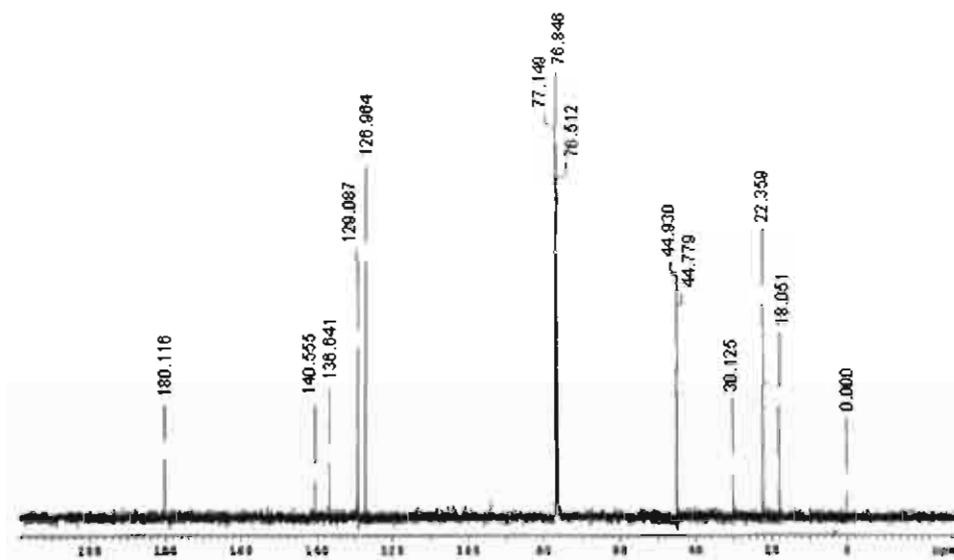


Figura 8. Espectro de RMN ^{13}C del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.

En el espectro de RMN ^1H , **figura 9**, el hidrógeno en el carbono base del $-\text{CN}$ como un cuarteto centrado en 3.7 ppm, con el patrón de sustitución 1,4 (*para*) del anillo aromático en 7.2 y 7.1 ppm.

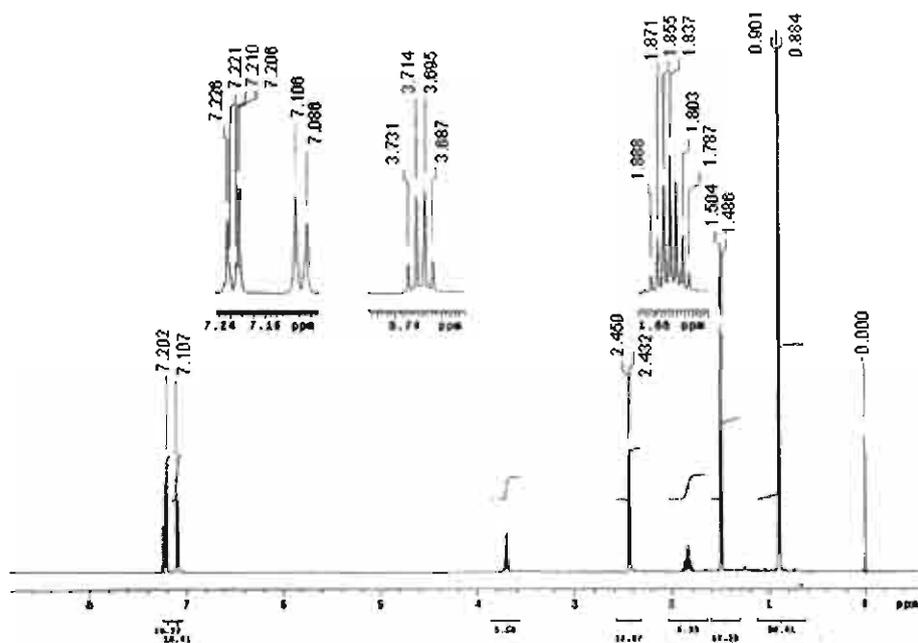


Figura 9. Espectro de RMN ^1H del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.

En la **figura 10**, se aprecia en el espectro de RMN ^{13}C del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida, la señal característica para el carbono del carbonilo de la amida en 176.4 ppm. En RMN ^1H , **figura 11** se observan las señales de los hidrógenos de la amida en 5.37-5.31 ppm y el hidrógeno en el carbono alfa de la propionamida 2-arilada se recorre hasta 3.57 ppm como cuarteto.

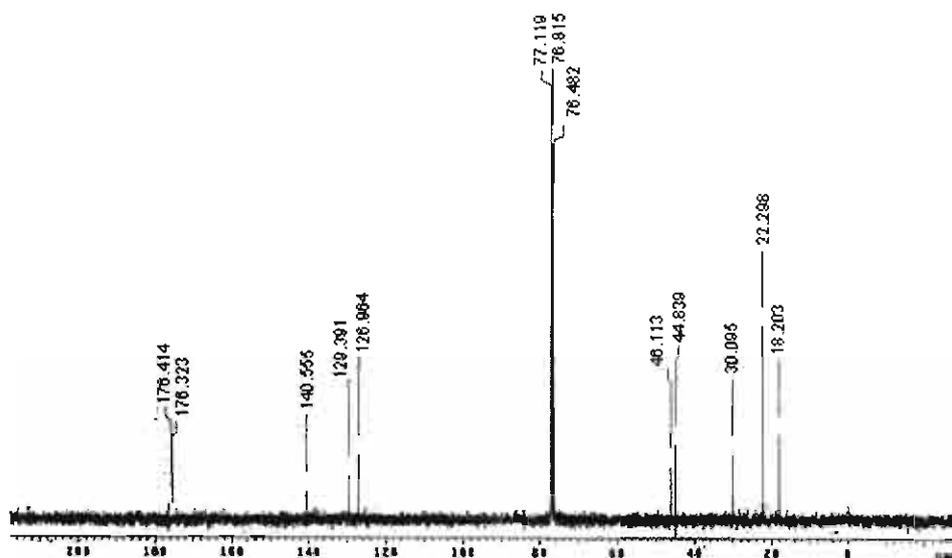


Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida

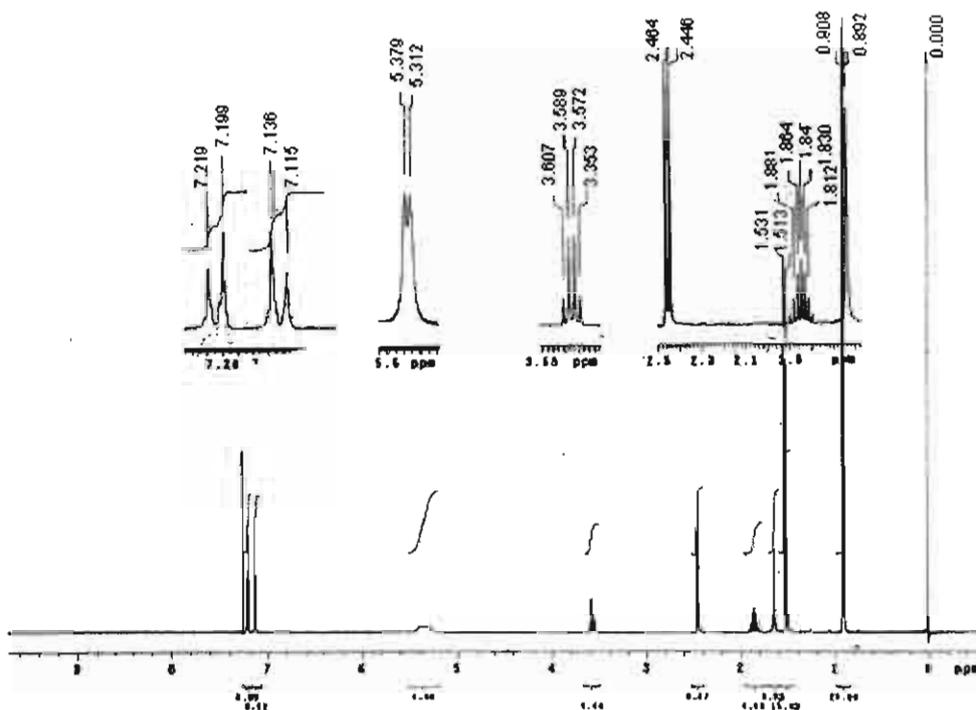


Figura 11. Espectro de RMN ¹H de la (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida

Con respecto al ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico, se observa en 180.7 ppm, el carbono del ácido carboxílico como señal más desplazada y característica para seguir la biotransformación, figura 12.

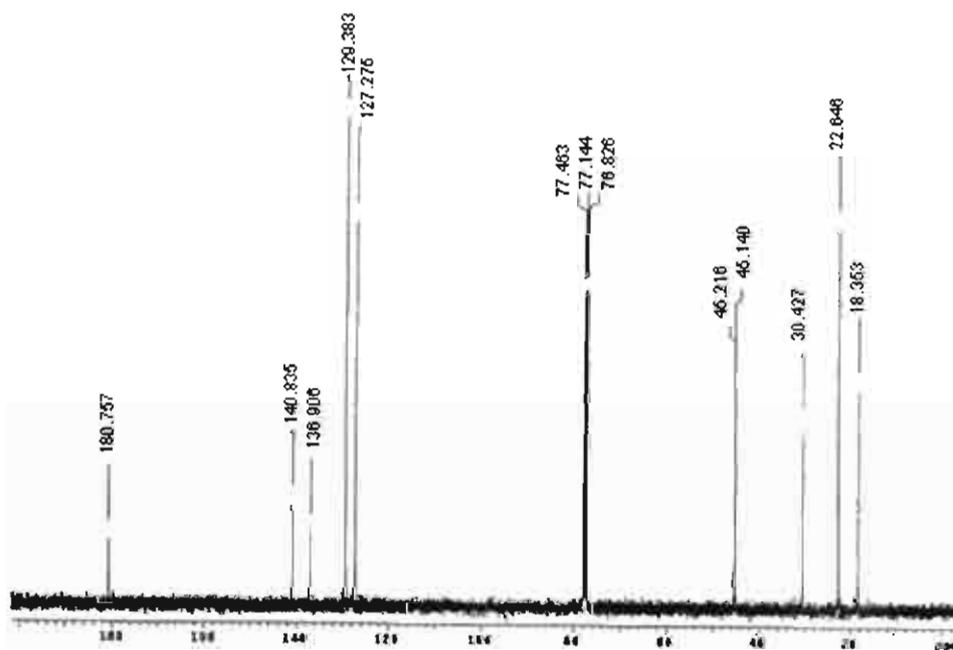


Figura 12. Espectro RMN ¹³C del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.

En RMN ^1H , ver **figura 13**, la señal del C-H alfa al carbonilo, aparece ligeramente desplazada hasta 3.7 y 3.69 (señales del cuarteto). Siendo muy indicativa la desaparición de las señales de la amida (NH_2) como referencia a considerar en el proceso de bioconversión que estudiaremos.

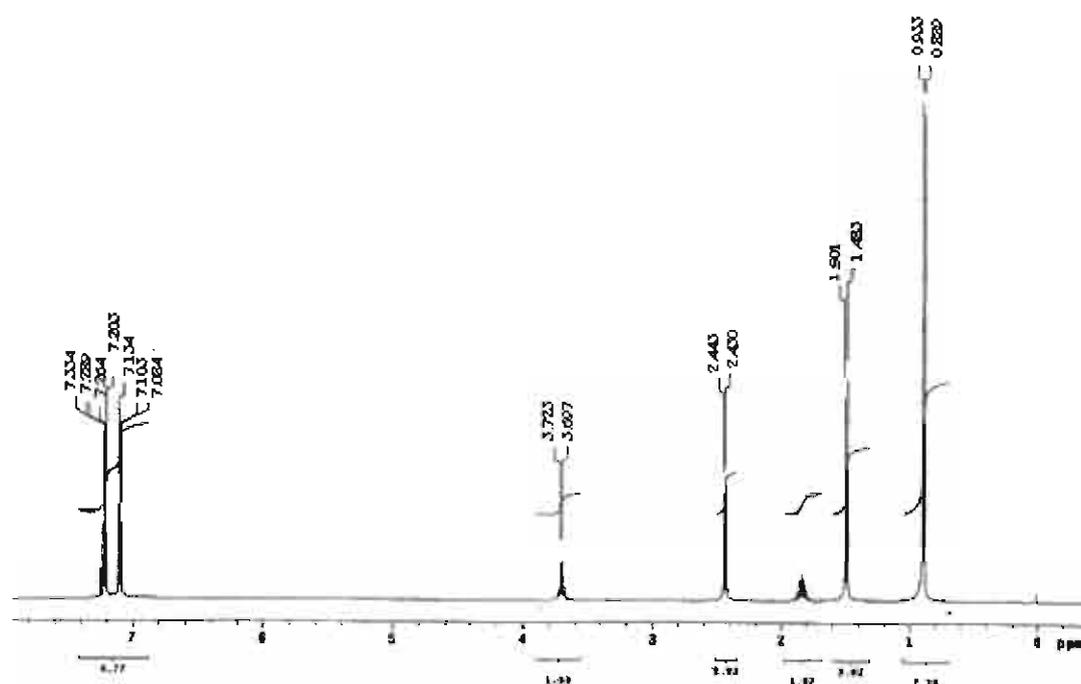


Figura 13. Espectro RMN ^1H del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico.

7.1.3 Cromatografía de Líquidos de alta resolución (CLAR).

7.1.3.1 (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo.

Con la columna Chiracel OD, se probaron diferentes condiciones de análisis, siendo la mezcla de disolventes 99.5:0.5 hexano:isopropanol con 0.1% de ácido trifluoroacético la más adecuada para la separación de los enantiómeros, flujo de 0.5 mL/min a $\lambda=220$ nm, y una temperatura de 25°C , después de inyectar 5 μL los tiempos de retención para los enantiómeros son 21.61 y 23.72 min. con una relación enantiomérica de 49.8/50.2 calculada por sus áreas en el cromatograma de la **figura 14**.

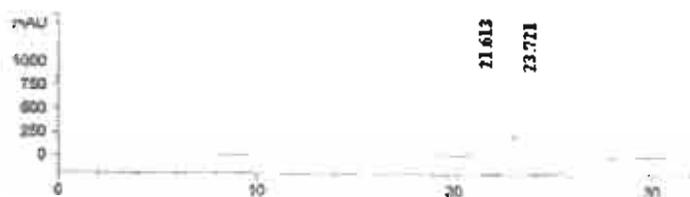


Figura 14. Cromatograma del (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo

7.1.3.2 (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.

Se probaron diferentes condiciones de análisis para la (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida con la columna Chiracel OD; se encontró que la más adecuada para la separación de los enantiómeros fue utilizando una mezcla de disolventes 90:10 hexano:isopropanol, 25°C, con un flujo de 0.8mL/min, a $\lambda=220$ nm, inyectándose 5 μ L. Los tiempos de retención para esta mezcla racémica son 9.58 y 10.45 min. observándose en la **figura 15** con una relación enantiomérica de 49.6/50.4

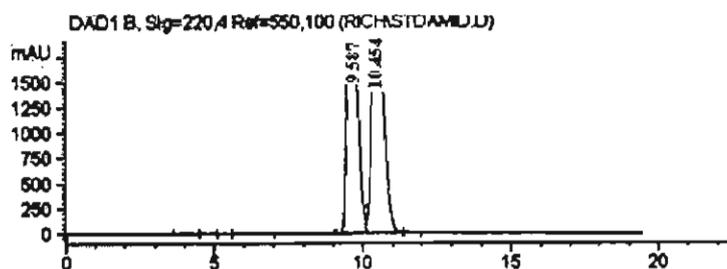


Figura 15. Cromatograma del (±)-2-(4- isobutilfenil)propanoamida.

7.1.3.3 Ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico.

Las condiciones de análisis para el ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico, la columna Chiracel OJ-H es la mezcla de disolventes 95:5 hexano:isopropanol a un flujo de 0.6 mL/min a $\lambda=220$ nm y 25°C. Los tiempos de retención para esta mezcla racémica son de 9.18 y 9.87 min. con una relación enantiomérica de 49.5 % del *R*, y 50.5 % del *S* como se puede observar en la **figura 16**. La

asignación de la configuración absoluta se soporta en el análisis realizado a una muestra de referencia del enantiómero S de Aldrich.

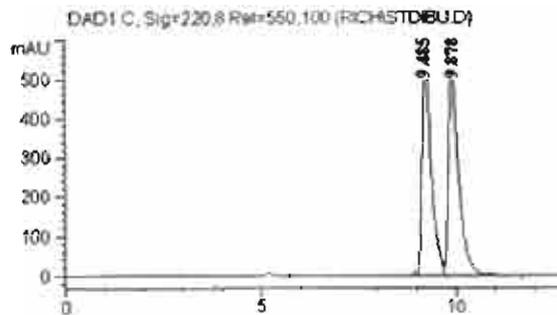


Figura 16. Cromatograma del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico

Con el fin de conocer cual enantiómero es el que tiene menor tiempo de retención en el método descrito anteriormente para el ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico, se analizó el ácido S-(+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico (adquirido de Aldrich) con las mismas condiciones y la señal se observa a los 9.24 min. Como se muestra en la siguiente **figura 17**.



Figura 17. Cromatograma del ácido S-(+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico.

7.1.4 Cromatografía de gases.

En las **figuras 18, 19 y 20** se presentan los cromatogramas de las materias primas utilizadas determinados con las condiciones experimentales descritas en el apartado 6.3.2.

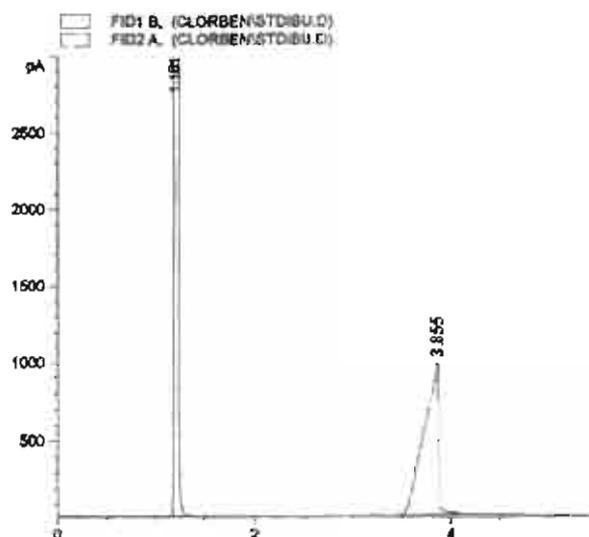


Figura 18. Cromatograma del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico, t.r = 3.855 minutos.

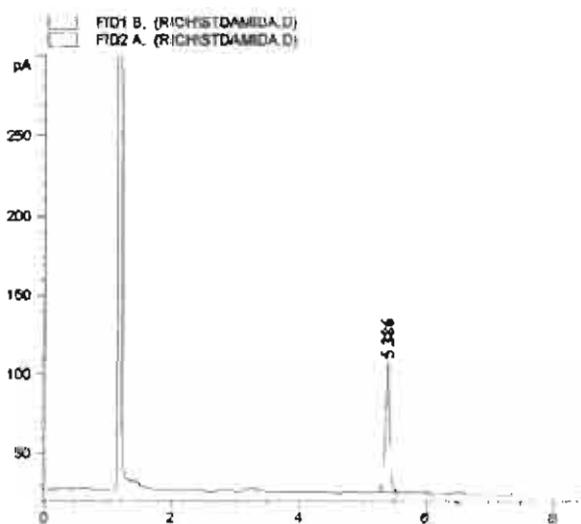


Figura 19. Cromatograma del (±)-2-(4-isobutilfenil) propanoamida, t.r = 5.386 minutos

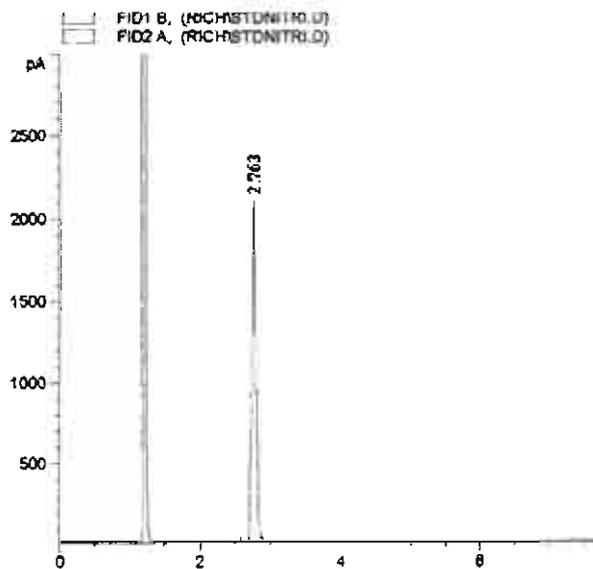


Figura 20. Cromatograma del (\pm)-2-(4-isobutilfenil) propanonitrilo, $t_r = 2.763$ minutos

Ya que en las biotransformaciones se podrían obtener los tres compuestos antes estudiados, por lo cual se consideró necesario hacer una mezcla con las tres materias primas (nitrilo, amida y ácido) para observar los posibles desplazamientos por las interacciones entre ellos, **figura 21**. En los cromatogramas, la señal que aparece alrededor del primer minuto, es la del disolvente isopropanol grado CLAR.

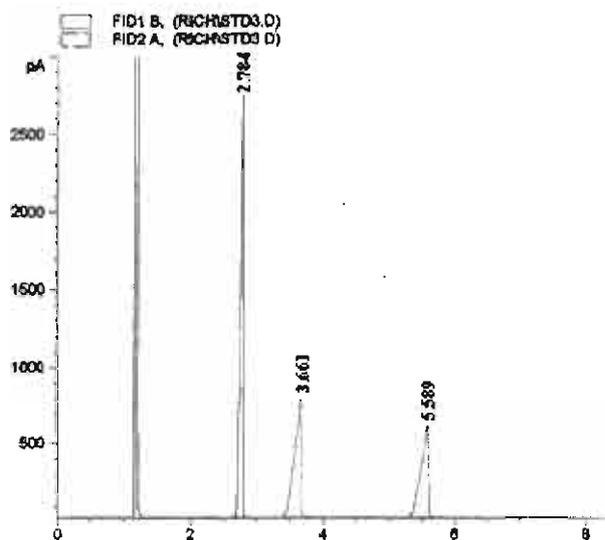


Figura 21. Cromatograma de la mezcla del (\pm)-2-(4-isobutilfenil) propanonitrilo (t.r = 2.784 min.), ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico (t.r = 3.661 min) y del (\pm)-2-(4-isobutilfenil) propanoamida (t.r = 5.589 min).

7.2 Análisis de blancos de los sustratos: (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, ácido-2-(4-isobutilfenil)propanóico y (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.

Con el fin de verificar la estabilidad de los compuestos a estudiar con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y la *N,N*-dimetilformamida (DMF), se adicionaron a tres matraces, cada uno con 50 mL de solución amortiguadora y 0.3 mL de DMF (0.6% v/v), el ácido 2-(4-isobutilfenil)propanóico, el (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo y la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida, respectivamente. A las 48 horas se procedió a la extracción de los mismos del medio acuoso con cloroformo o acetato de etilo y se analizaron por: CLAR y CG en las condiciones descritas en los apartados 7.1.3 y 7.1.4 para cada uno de los sustratos. El análisis de los cromatogramas nos indica que no se presentó ningún cambio y los sustratos fueron recuperados. Lo anterior se aprecia por comparación de los cromatogramas previamente determinados a los compuestos de referencia con los cromatogramas obtenidos por CLAR en las **figuras 22, 23 y 24**, y en Gases (ver **figuras 25, 26 y 27**).

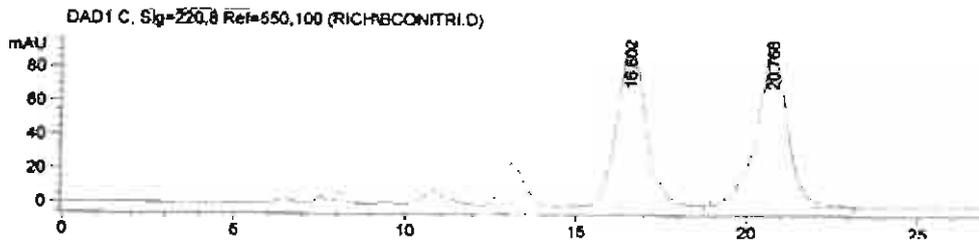


Figura 22. CLAR del blanco de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo. Columna OD.

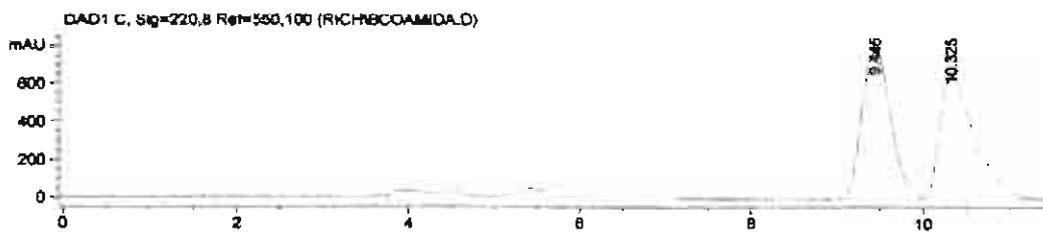


Figura 23. CLAR del blanco de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida. Columna OD

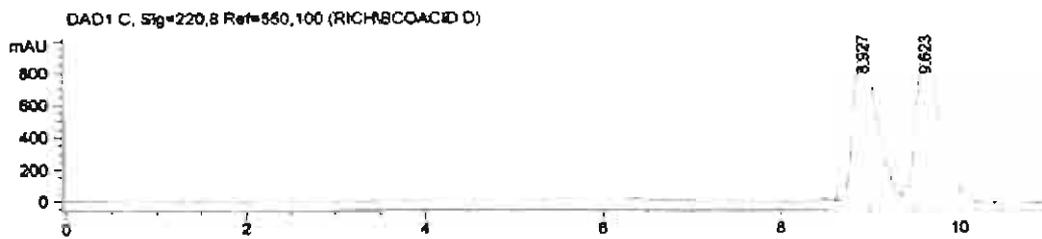


Figura 24. CLAR del blanco del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico. Columna OJ-H

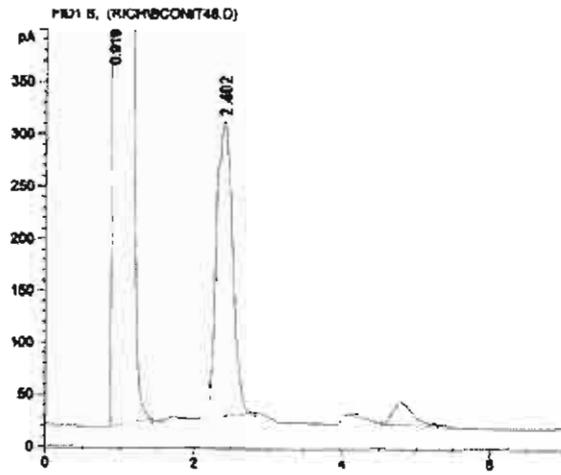


Figura 25. CG del blanco de (±)-2-(4-isobutilfenil) propanonitrilo.

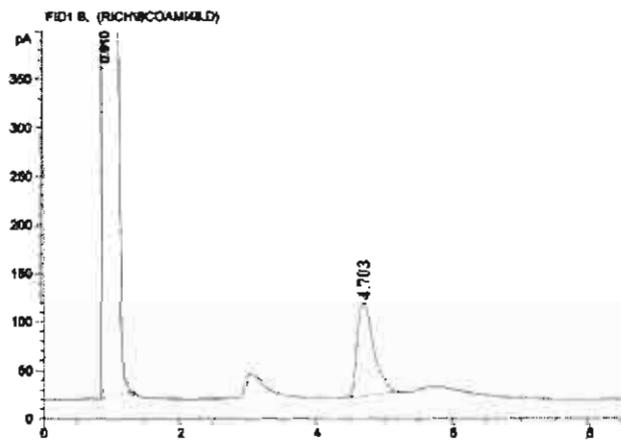


Figura 26. CG del blanco de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.

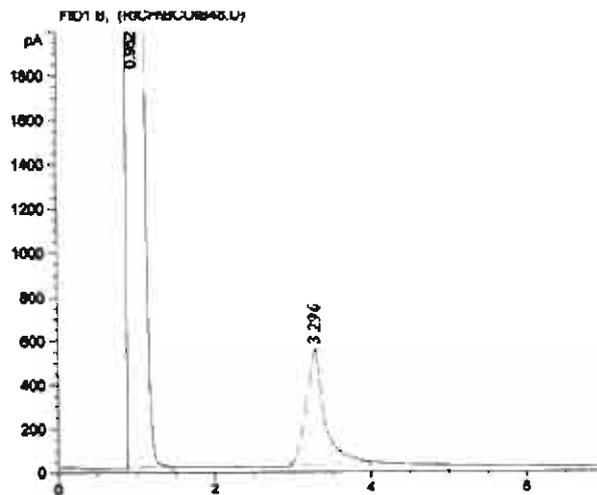


Figura 27. CG del blanco del ácido (\pm) -2-(4-isobutilfenil)propanóico.

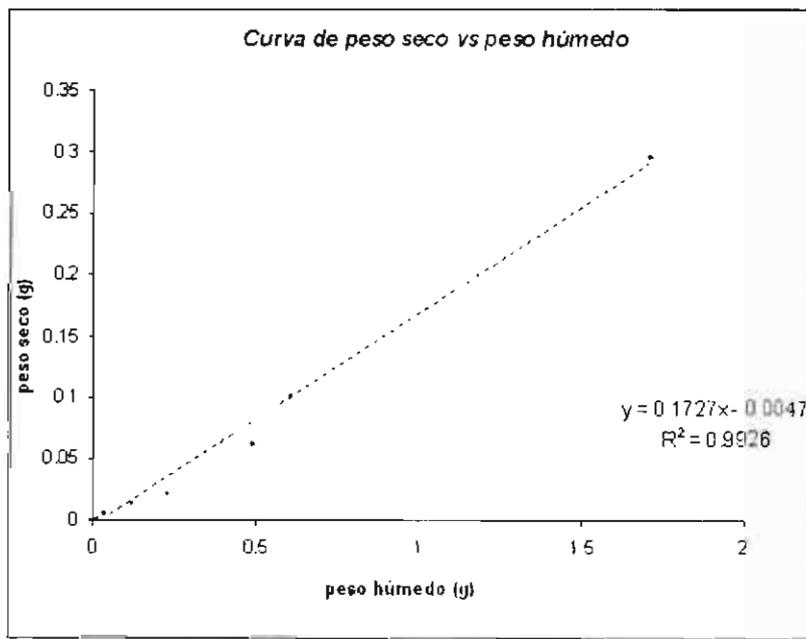
7.3 Curva de peso húmedo vs peso seco de *Nocardia corallina* para células en suspensión.

Con la finalidad de tener los pesos reales de células de *Nocardia corallina* secas, se realizó esta curva para los experimentos con células en suspensión (método 1), y así manejar las relaciones de sustrato:células húmedas o secas. Se procedió de conformidad con la metodología expresada en el apartado 6.5.

Los datos del peso de las células aisladas húmedas y posteriormente secadas, se expresan como: peso húmedo y peso seco, y se describen en la **Tabla 8** y en la **Gráfica 1**.

Tabla 8. Datos de la curva de células húmedas vs peso seco

Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)
2.312	0.288
4.498	0.440
9.742	1.252
12.072	2.030
34.204	5.928
115.600	14.400
224.900	22.000
487.100	62.600
603.600	101.500
1710.200	296.400



Gráfica 1.- Curva de células húmedas vs peso seco.

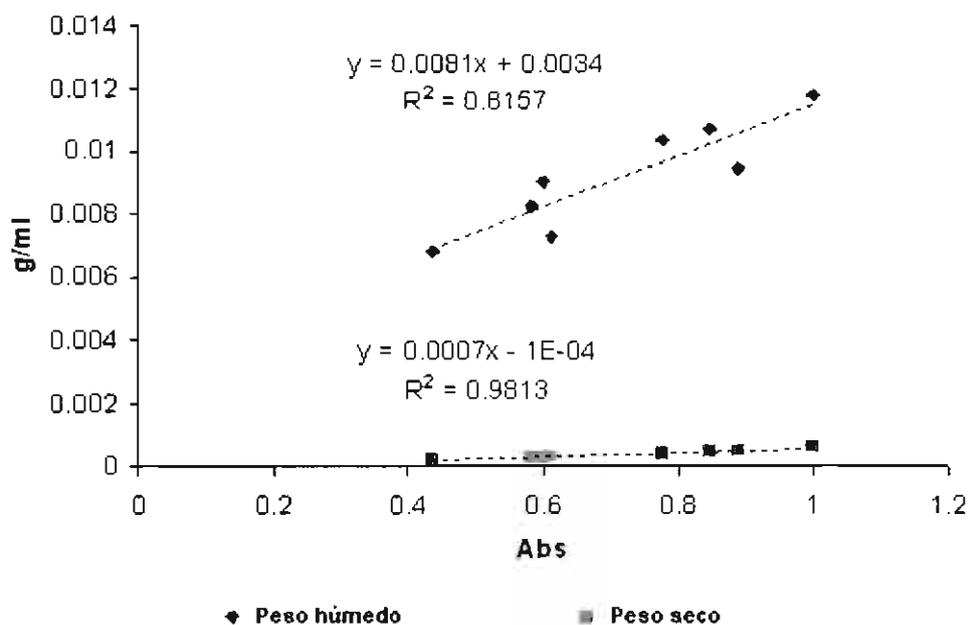
7.4 Datos obtenidos para la curva de densidad óptica vs peso seco y húmedo de *Nocardia corallina* a nivel fermentador.

Con la finalidad de tener los pesos reales de células de *Nocardia corallina* secas y células húmedas en el fermentador de 3 litros con relación a su densidad óptica se realizó esta curva y así correlacionar las relaciones de sustrato:células húmedas o secas. Se procedió de conformidad a lo descrito en el apartado 6.6. Los datos de densidad óptica vs peso húmedo y peso seco se describen en la **Tabla 9** y en la **Gráfica 2**.

Tabla 9.- Densidad óptica (DO) vs células húmedas y peso seco.

Densidad óptica	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)
0.436	6.830	0.232
0.600	9.000	0.309
0.582	8.230	0.299
0.612	7.290	0.315
0.777	10.320	0.421
0.847	10.700	0.476
0.889	9.420	0.512
1.000	11.770	0.621

Relación absorbancia vs peso seco y peso húmedo



Gráfica 2.- Densidad óptica (DO) vs células húmedas y peso seco.

Biotransformación de los sustratos.

7.5 Biotransformación con células en suspensión (método 1) y en fermentador (método 2).

Durante el presente estudio se realizaron un total de 29 experimentos:

Para el método 1, 19 experimentos; y para el método 2, 10 experimentos.

7.5.1 Biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con células en suspensión (método 1)

Las biotransformaciones se realizaron con diferentes relaciones sustrato/células en peso seco, como se muestra en la **tabla 10**, se identificó la bioconversión incompleta del nitrilo a la amida y al ácido:

Tabla 10. % de los sustratos al final de la conversión para la biotransformación de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con células suspendidas.

No. de Lote	Relación sustrato/peso seco	Tiempo (h)	% de los sustratos al final de la conversión		
			Nitrilo	Ácido	Amida
1	1:0.3	48	61	17	22
		73	64	20	16
		97	61	21	18
2	1:5	26	8	75	17
3	1:5	24	15	63	22
		48	17	66	17
		67	15	73	12
4	1:17	24	66	24	10
5	1:17	24	86	2	12
6	1:17	24	81	13	6
7	1:17	24	41	20	39
		48	19	29	52

En los lotes 2 y 3 los resultados fueron alentadores entre las 24 y 26 horas de biotransformación se obtuvieron porcentajes de conversión al ácido elevados (63 y 75 %), con una relación enantiomérica de 62/38 *R/S* y >99% del *R* respectivamente calculado por CLAR, mientras que el % de conversión a la amida fue de 22 y 17%.

Los excesos enantioméricos (ee) del lote 3, desde las 24 a las 67 horas, fueron >99% del enantiómero *R*, y dado que el nitrilo y la amida se encuentran en valores de conversión menores de un 50%, el ee debería de ser mucho menor a >99%, esto demuestra que se esta desarrollando una biotransformación adicional que se puede explicar por una epimerización del centro quiral, es decir el enantiómero *S* del ácido se esta invirtiendo al *R*. Dada la importancia de este resultado ya que implica una desracemización, se estudió por separado esta posible segunda biotransformación, tomando como sustrato el ácido racémico comercial, ibuprofen; los resultados obtenidos de este estudio se presentan por separado.

Continuando con la biotransformación del nitrilo al ácido, al triplicar la relación sustrato:biomasa (lotes 4-7) con la finalidad de disminuir tiempos y aumentar el % de los productos al final de la bioconversión al ácido, se observa que a las 24 horas se tenía % altos del nitrilo sin reaccionar, lo cual hace suponer que al trabajar con lotes diferentes de la misma cepa, aunque las condiciones de adaptación para esta sean las mismas no fue el adecuado o, que probablemente se contaminó, ya que el pH de los sobrenadantes en el proceso de aislamiento de las células (antes de los lavados y de la biotransformación) quedan cercanos a 5, la biotransformación a estos pH se hace muy lenta. Recientemente hemos observado en nuestro grupo de investigación que las biotransformaciones con *Nocardia corallina* con estos y otros sustratos, que el pH óptimo para estos experimentos, debe de estar en el rango de 6.3-7.0 al final del periodo de crecimiento de la biomasa en el medio de cultivo, si esto no ocurre, al emplear estas células en las biotransformaciones las mismas son más lentas y existe menor reproducibilidad de los resultados alcanzados.

En el lote 4 con una relación 1:17 de sustrato: células, a las 24 horas se observan por CG los siguientes porcentajes: nitrilo 66, ácido 24 y amida 10, ver **figura 28**. Haciendo uso de CLAR (indicado en el apartado 7.1.3), se obtuvieron las relaciones enantioméricas: nitrilo 49/51, ácido 64/36 *R/S* ver **figura 29**, de la amida 71/29, los picos con tiempos de retención entre 5 y 6 minutos corresponden a los productos de desechos de *Nocardia corallina* y esto fue corroborado con el blanco de células como se muestra en la **figura 29** (CLAR). Cabe mencionar que en estas condiciones (columna OJ-H), solo se puede observar la separación de la mezcla racémica del ácido 2-(4-isobutilfenil)propanóico y la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida no se resuelve en estas condiciones, teniendo un tiempo de retención de 15.48 minutos.

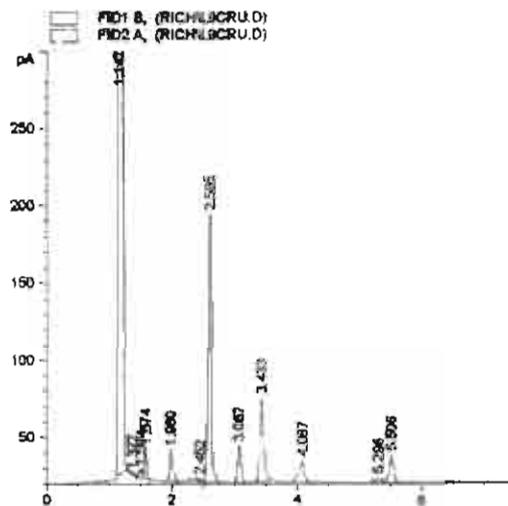


Figura 28. Cromatograma de gases del lote 4, (±)-2-(4-isobutilfenil) propanonitrilo (2.59 min.), ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico (3.43 min.) y (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida (5.50 min.).

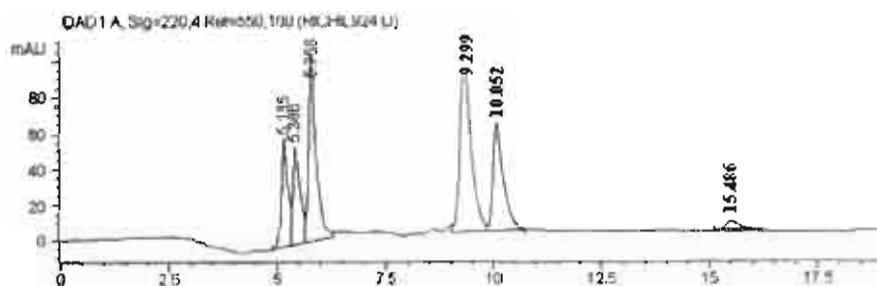


Figura 29. Cromatograma CLAR del lote 4, ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoico (9.29 y 10.05 min.) y la (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida (15.48 min.), columna OJ-H, a las 24 h.

Para el lote 7 a las 24 horas, los % de los productos al final de la bioconversión fueron los siguientes: nitrilo 41, ácido 20 y de amida 39, las relaciones enantioméricas fueron: 49/51 del nitrilo; 54/46 *R/S* para el ácido y 65/35 para la amida. A las 48 horas los porcentajes de los productos son: 19 % de nitrilo, 29 % de ácido y 52 % de amida con una relación enantiomérica de: 48/52 del nitrilo, 89/11 *R/S* del ácido y 91/9 para la amida. Al compararse estos resultados con el lote 3 a las 48 horas, en donde el porcentaje de nitrilo es del 17%, pero teniendo mayor porcentaje del ácido (66%) que de amida (17%), contrario al resultado del lote 7. Esto nos confirma la lentitud de la biotransformación la cual se vio afectada por el pH al momento de aislar la biomasa ya que este fue cercano a 5, lo que demuestra lo afirmado anteriormente.

7.5.2 Biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil) propanonitrilo en fermentador de 3 litros (método 2).

Una vez realizado el estudio con células suspendidas, se realizó el escalamiento de la biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil) propanonitrilo a nivel fermentador de 3 litros en las condiciones del apartado 6.7.2, con diferentes relaciones sustrato:células en peso seco. La determinación de los % se realizó por CG en las condiciones indicadas (apartado 7.1.4), los resultados obtenidos se muestran en la siguiente **tabla 11**.

Tabla 11. Biotransformaciones realizadas del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo en fermentador de 3 litros.

No. de Lote	Relación sustrato/peso seco	Tiempo de muestreo (h)	% de los sustratos al final de la conversión		
			Nitrilo	Ácido	Amida
1	1:1.6	22.5	86	7	7
		24	58	21	21
		28	64	18	18
		31	62	20	18
2	1:8.3	22.5	64	18	18
		24	63	19	18
		35	64	18	18
		43	63	18	19
		94	64	18	18
3	1:8.7	24	62	19	19
		48	69	16	15
		89	62	20	18
		101	73	15	12
		113	63	20	17
4	1:12.1	4	64	18	18
		17	64	18	18
		20	65	17	18
		28.5	65	16	19
		48	65	18	17
5	1:12.1	17.5	61	20	19
		96	65	17	18

Las relaciones de sustrato:células variaron desde 1:1.6 hasta 1:12.1 (estimadas por lecturas de DO) a diferentes tiempos desde las 24 hasta las 96 horas de biotransformación. No se observan cambios significativos en los porcentajes de bioconversión llegándose a una relación de 58-65 % de nitrilo y del ácido entre 17-21 % y la amida de un 18-21 %. Comparando estos resultados con los obtenidos con el método 1, células en suspensión, se puede asumir que al volumen de trabajo de 2.2 litros, la dilución del sustrato y el biocatalizador es

muy grande, por lo cual la biotransformación suponemos que llega a un equilibrio en estas condiciones. En la **figura 30** se presenta el cromatograma de gases para el lote 4 a las 48 horas, al analizarlo se observa la presencia de los tres compuestos, a los 2.7 min. la materia prima (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo, a los 3.36 min. la señal del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico y a los 4.50 min. de la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida.

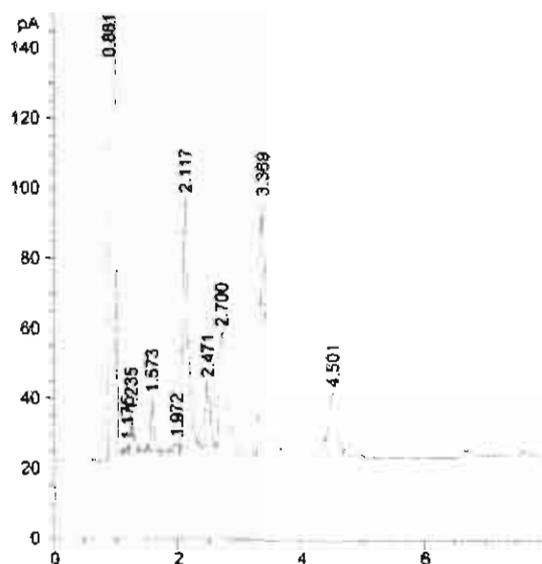


Figura 30. Cromatograma del lote 4, (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo (2.7 min), ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico (3.36 min) y la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida (4.50 min).

7.6 Biotransformación del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico (Ibuprofeno) con células suspendidas (método 1) y en fermentador (método 2).

7.6.1 Biotransformación del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoico con células en suspensión (método 1).

Las biotransformaciones se realizaron con diferentes relaciones sustrato/células en peso seco, como se muestra en la **tabla 12**. En este caso el

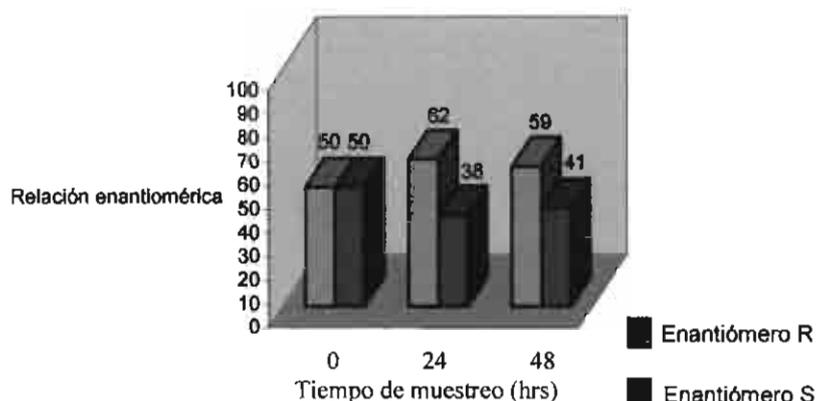
objetivo es demostrar la esteroinvertión y determinar los parámetros para llevarse a cabo en este caso, de manera exploratoria, se decidió incrementar la cantidad del biocatalizador; se cuantificaron las relaciones enantioméricas (*R/S*) por CLAR según el apartado 7.1.3.

Tabla 12. Biotransformaciones del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico realizadas con células suspendidas.

No. de Lote	Relación sustrato/peso seco	Tiempo de Muestreo (h)	Relación enantiomérica del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico (%)	
			<i>R</i>	<i>S</i>
1	1:17	24	62	38
		48	59	41
2	1:17	48	69	31
		72	76	24
3	1:17	24	52	48
		48	47	53
4	1:35	24	82	18
		48	70	30
5	1:35	24	85	15
6	1:35	24	57	43
		48	66	34
7	1:35	24	60	40
		48	63	37
8	1:36	24	69	31

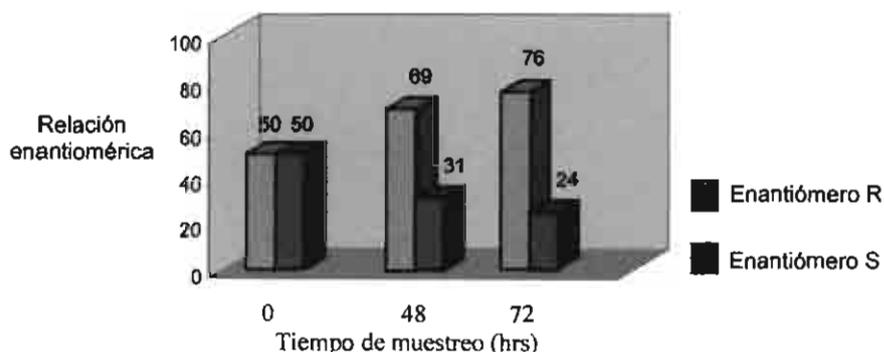
Se estudió el comportamiento de *Nocardia corallina* con el ibuprofeno racémico, utilizando una relación sustrato:células en peso seco de 1:17. Se realizó el seguimiento de la biotransformación hasta las 48 horas (lote 1), tomando una muestra a las 24 horas. Con base en los tiempos de retención por CLAR a 220 nm del ibuprofeno racémico de referencia, los cuales fueron para

el enantiómero (*R*) 9.29 minutos y para el (*S*) 10.03 minutos, se determinaron las relaciones enantioméricas del producto presentando una estereoinversión, teniendo la siguiente relación porcentual de estereoisómeros (*R/S*): 62/38 a las 24 h y 59/41 a las 48 h respectivamente como se observa en la **gráfica 3**.



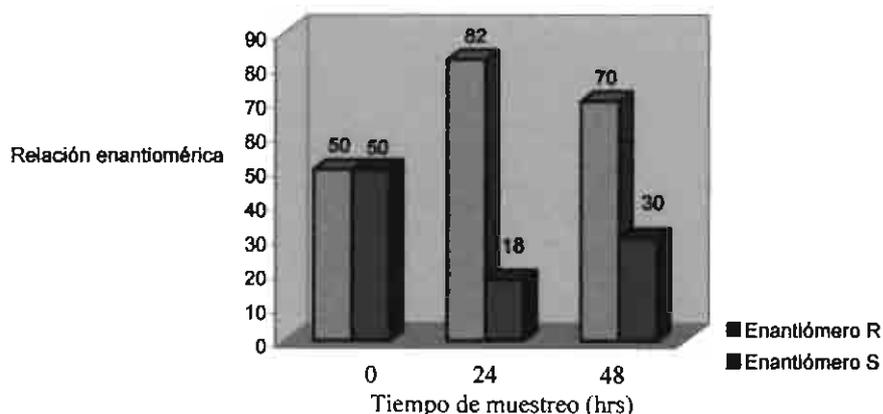
Gráfica 3. Bioconversión del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico, (lote 1)

Un primer criterio fue modificar el tiempo de biotransformación conservando la relación sustrato:células, así a las 72 horas (lote 2), se tomaron muestras a las 48 y 72 horas; las relaciones enantioméricas observadas por CLAR, presentan la siguiente relación porcentual de estereoisómeros: 69/31 y 76/24 respectivamente, **gráfica 4**.



Gráfica 4. Bioconversión del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico (lote 2)

Cuando se incrementó al doble la cantidad de células hasta alcanzar una relación 1:35 (lote 4), después de 24 horas de biotransformación se obtuvo una relación de enantiómeros: 82/18 y a las 48 horas 70/30, **gráfica 5**. Con base en los tiempos de retención observados de la mezcla enantiomérica enriquecida, 7.9 y 8.8 minutos, se observa un incremento en el enantiómero de más rápida elución. Se determinó en un polarímetro el sentido de la rotación óptica de la biotransformación a las 24 horas (disolviéndolo en etanol CLAR) obteniéndose una rotación negativa que correspondería al enantiómero $R(-)^{46}$. Corroborada la configuración absoluta del enantiómero enriquecido, podemos afirmar que éste microorganismo tiene la capacidad de realizar una estereoinversión para darnos el enantiómero contrario al que se obtiene por bioconversión con mamíferos (rata y humano)^{37,38}.



Gráfica 5. Biotransformación del ácido (±)-2-(4-isobutilfenil)propanóico, (lote 4).

Con los datos anteriores se puede observar que a tiempos largos de bioconversión se tiende a equilibrar los enantiómeros, de la **tabla 12** se puede apreciar que las relaciones más altas para el enantiómero (R) se alcanzan con una relación 1:35 a las 24 horas y a tiempos más largos se aprecia una disminución.

7.6.2 Biotransformación del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico en fermentador de 3L.

Con la finalidad de incrementar el volumen de la biotransformación (para incrementar la cantidad de biomasa) se realizaron experimentos a nivel fermentador (3L), en las condiciones del apartado 6.7.2 en los cuales se observaron los siguientes resultados:

Tabla 13. Biotransformaciones del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico realizadas en fermentador de 3L.

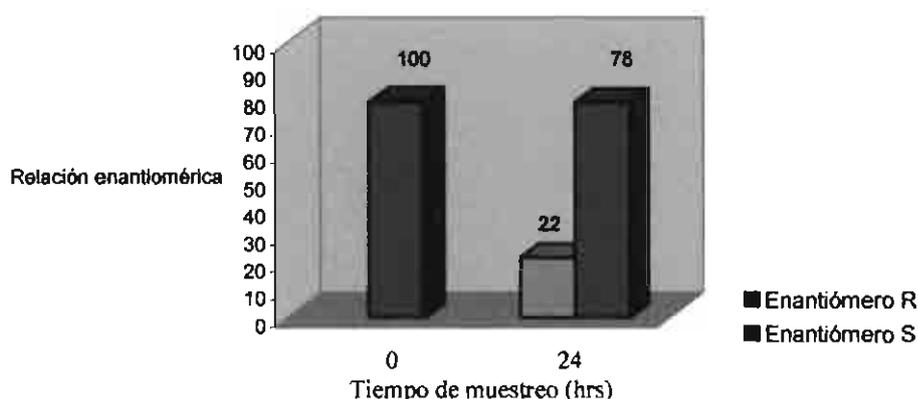
No. de Lote	Relación sustrato/peso seco	Tiempo de Muestreo (h)	Relación enantiomérica del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico (%)	
			R	S
1	1:1.6	20	73	27
		40	53	47
2	1:1.6	13	60	40
		15	64	36
		17	64	36
		19.5	65	35
		21	63	37
		24	61	39
		26	56	44
3	1:1.6	24	57	43
		48	56	44
		72	58	42
		96	56	44
		120	55	45
4	1:1.76	24	67	33
		37	65	35
		40	60	40
		42	59	41
5	1:3.7	8	62	38

En todos los experimentos realizados con el fermentador (a excepción del lote 1), se observa que en estas condiciones la isomerización es muy lenta y no es significativa, aún con tiempos de conversión largos, 120 horas (lote 3). Este resultado es muy interesante ya que en medios de alta dilución y con relaciones sustrato:células menores a las empleadas en el método 1, se aprecia un comportamiento diferente. Podemos deducir que se requieren cantidades muy superiores de biocatalizador para efectuar una mayor estereoinversión y el método 2 difícilmente sería práctico para desarrollar esta metodología de isomerización, dadas las dificultades experimentales de aislamiento del ácido por el volumen de trabajo.

7.7 Biotransformación del ácido S-(+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico (método 1).

En este punto se consideró relevante estudiar la inversión del enantiómero (S) del ibuprofen para corroborar que la bioconversión, estereoinversión, al (R) es específica. Los resultados alcanzados se presentan a continuación.

Empleando el método 1, el enantiómero S del ibuprofeno con una relación sustrato:células en peso seco 1:35 por 24 horas, después del tratamiento usual, la muestra se analizó por CLAR y comparando contra los cromatogramas de las muestras del ácido racémico y el ácido S de referencia (ver **figura 16** y **17**), nos confirma que el enantiómero S se epimeriza al enantiómero R, observándose la señal a los 9.355 minutos, seguido del pico correspondiente al enantiómero S, 10.055 minutos, con una relación porcentual de estereoisómeros (R:S) de 22:78 respectivamente, **gráfica 6**.



Gráfica 6. Bioconversión del S-(+) ácido-2-(4-isobutilfenil)propanóico 24 horas, relación sustrato:células [1:35].

En esta etapa se consideró la posibilidad de incorporar una segunda fase al medio de la biotransformación del ácido (+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico con células de *Nocardia corallina* suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos, al utilizar *n*-octano se obtiene una mayor estereoinversión del enantiómero "S" al "R" como se puede observar en la siguiente **tabla 14**.

Tabla 14. Bioconversión del ácido S-(+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico con células suspendidas con *n*-octano.

Tiempo de muestreo (h)	Biotransformación con adición de <i>n</i> -octano		Biotransformación sin adición de <i>n</i> -octano	
	%S	%R	%S	%R
24	96	4	90	10
48	43	57	85	15
72	29	71	86	14

Es decir a las 72 horas ya se tiene un 71% del enantiómero *R*, cuando al tiempo 0, no existía absolutamente nada del mismo, por lo anterior se puede ratificar la estereoinversión con *Nocardia corallina* del ácido (+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico y se observa el beneficio de utilizar una segunda fase.

7.8 Biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil) propanoamida (método 1).

Se efectuaron dos biotransformaciones de la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida con células de *Nocardia corallina* suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos a una relación sustrato:células en peso seco de 1:17, durante 48 horas, utilizando en una de ellas *n*-octano como segunda fase, al analizarlas por CLAR solamente observamos las señales de la amida en las dos biotransformaciones, ver **figuras 32** y **33**, como elemento de comparación en la **figura 31** se presenta el cromatograma (CLAR) de la resolución de la amida estudiada. Por CG en la **figura 34** y **35**, se observa también la ausencia del ácido esperado, es decir no hay transformación.

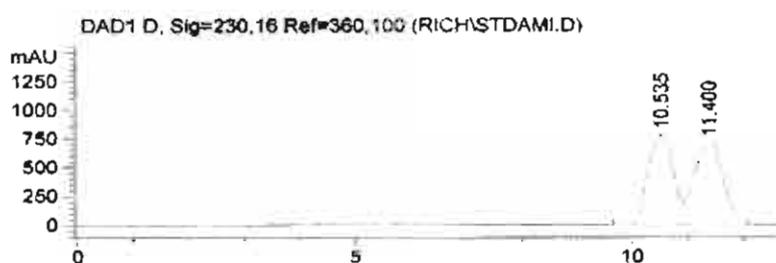


Figura 31. Cromatograma por CLAR de la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida de referencia (10.53 y 11.40 min). Columna OD.

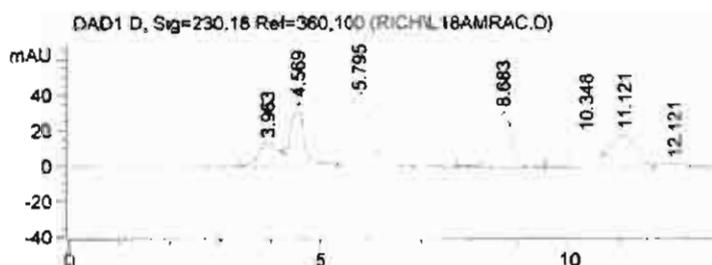


Figura 32. Cromatograma por CLAR de la biotransformación de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida, observándose los enantiómeros de la amida a los 10.3 y 11.12 min. Columna OD

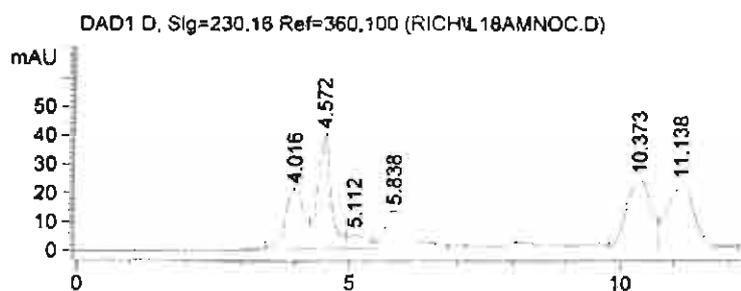


Figura 33. Cromatograma por CLAR de la biotransformación de (±)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida con *n*-octano, observándose los enantiómeros de la amida a los 10.3 y 11.14 min. Columna OD.

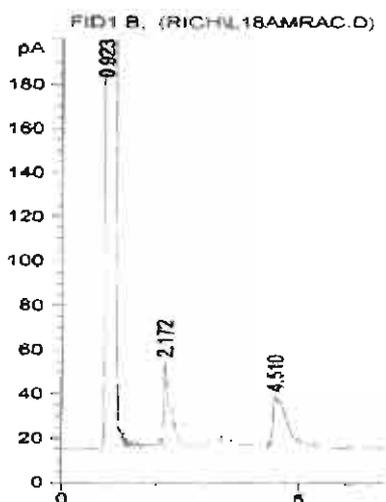


Figura 34. Cromatograma por CG de la biotransformación de (±)-2-(4-isobutilfenil) propanoamida (4.51 min.)

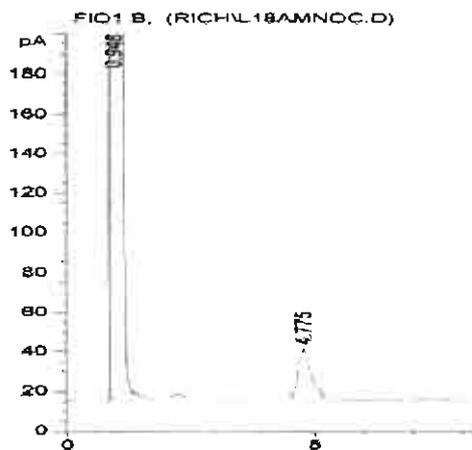


Figura 35. Cromatograma por CG, de la biotransformación de (\pm) -2-(4-isobutilfenil)propanoamida con *n*-octano (amida 4.77 min).

Al analizar los espectros en IR de ambos experimentos, se observan las señales características de la amida, las cuales se encuentran alrededor de los 3202.69, 3338.04 y en 1668.42 cm^{-1} para el experimento al cual se le adicionó *n*-octano; y en el que no se le adicionó el *n*-octano aparecen en 3191.91, 3348.75 y en 1669.61 cm^{-1} (**figuras 36 y 37**). Es evidente la ausencia del ácido carboxílico esperado.

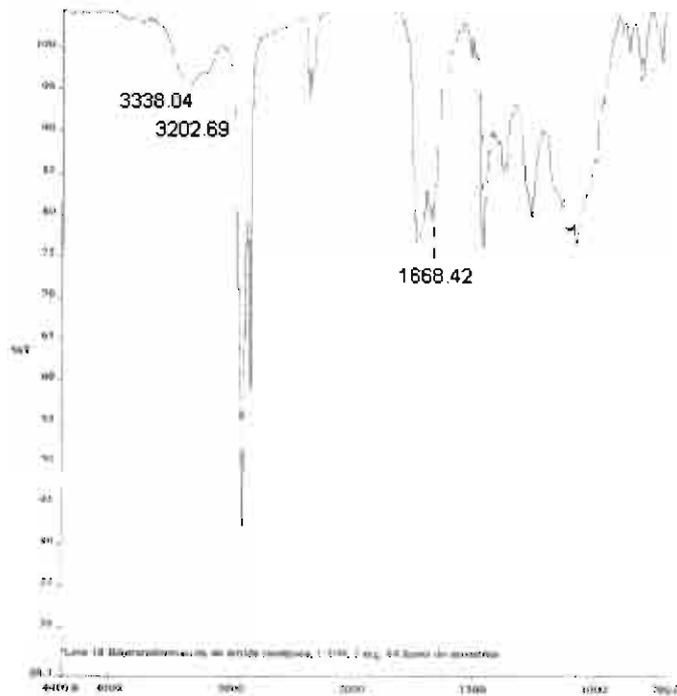


Figura 36. Espectro de infrarrojo de la biotransformación de (\pm) -2-(4-isobutilfenil)propanoamida (3202.69, 3338.04 y en 1668.42 cm^{-1}), con *n*-octano.

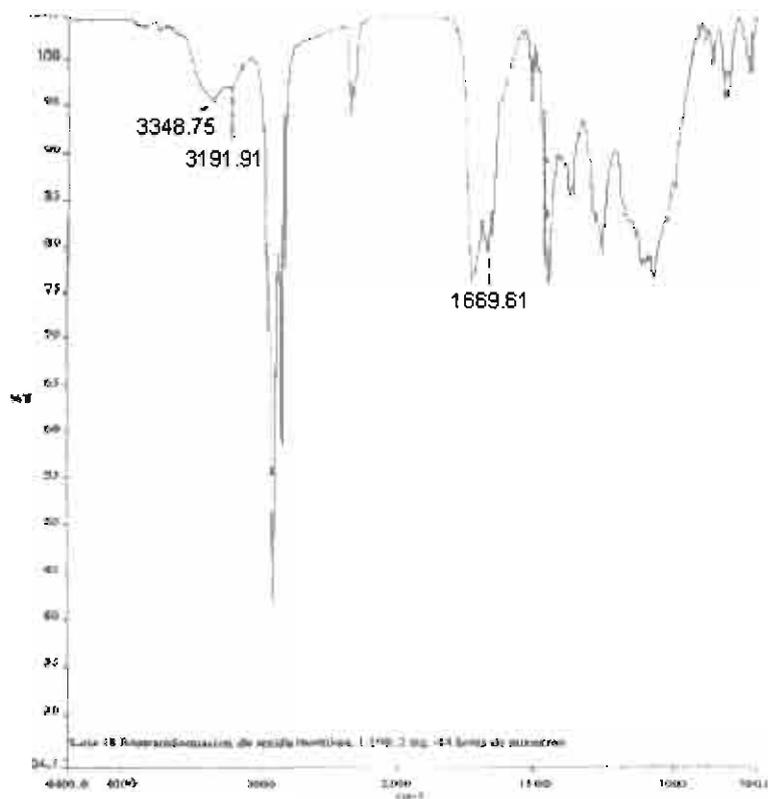


Figura 37. Espectro infrarrojo de la biotransformación de (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida (3191.91, 3348.75 y en 1669.61 cm^{-1}) sin *n*-octano.

Esto puede deberse a la necesidad de tener conjuntamente al nitrilo para desarrollar el proceso de hidrólisis, dado que es su precursor. Una situación similar se ha observado en los procesos de bioreducción de cetonas a alcoholes con este microorganismo.⁵⁰

8. CONCLUSIONES

La biotransformación con células en suspensión del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo con una relación sustrato: células secas de 1:5 (mejor conversión) a la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida y al ácido 2-(4-isobutilfenil)propanóico demuestra la capacidad de nitrilo hidratasa y amidasa de *Nocardia corallina* B-276. Sin embargo la estereoespecificidad no fue la esperada, aunque se observa isomerización del ácido obtenido hacia el enantiómero *R*.

En el fermentador de 3-L, la biotransformación del (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanonitrilo procede también la hidrólisis, aún con la menor relación sustrato:células en peso seco de 1:1.6. Cuando se incrementa la relación de biocatalizador, esto no se refleja en una mayor hidrólisis. También al comparar con el método de células suspendidas, se tiene dificultad para aislar los productos por la dilución.

Al realizar la biotransformación del ácido (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanóico tanto en células en suspensión como en el fermentador, se presenta una isomerización, que enriquece al enantiómero *R*(-). Hasta nuestro conocimiento este es el primer reporte de esta actividad enzimática para el microorganismo *Nocardia corallina* B-276.

Cuando se biotransforma el ácido (*S*) (+)-2-(4-isobutilfenil)propanóico con células en suspensión, utilizando al *n*-octano como segunda fase, se presenta una mayor estereoinversión del enantiómero *S*(+) al enantiómero *R*(-). De esta forma se corrobora la capacidad de este microorganismo para efectuar la estereoinversión del ácido *S* al *R*, lo que demuestra la presencia de enzimas isomerasas en el medio.

La biotransformación de la (\pm)-2-(4-isobutilfenil)propanoamida, no presenta hidrólisis de la amida.

9. REFERENCIAS.

- 1.- Tucker JL. 2006. Green chemistry, a pharmaceutical perspective. *Org. Process Res. Dev.* 10:315-319.
- 2.- Faber K. 2000, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4^a ed., Edit. Springer, Alemania, pp. 21-22, 220-221.
- 3.- Yazbeck DR, Martinez CA, Hu S, Tao J. 2004. Challenges in the development of an efficient enzymatic process in the pharmaceutical industry. *Tetrahedron: Asymmetry* 15:2757-2763.
- 4.- Woodley JM. 2008. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol.* 26:321-327.
- 5.- Perales RE, Bruce NC, Schmid A, Wackett LP. 2002. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis. *Appl. Env. Microbiol.* 68:4699-4709.
- 6.- Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG. 2003. Dispelling the myths- biocatalysis industrial synthesis. *Science.* 299:1694-1697.
- 7.- Liese A, Filho MV. 1999. Production of fine chemicals using biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:595-603.
- 8.- Fessner WD, Jones JB. 2001. Biocatalysis and biotransformation from discovery to application. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5:103-105.
- 9.- Hutt AJ, O'Grady J. 1996. Drug chirality: a consideration of the significance of the stereochemistry of antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 37: 7-32.
- 10.- Mustranta A. 1992. Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:61-66.

11.- Tsai SW, Lin JJ, Chang CS, Chen JP. 1997. Enzymatic synthesis of (S)-ibuprofen ester prodrug from racemic ibuprofen by lipase in organic solvents. *Biotechnol. Prog.* 13:82-88.

12.- Needleman P. Treatment of Alzheimer's disease with the *R* (-) isomer of a 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drug alone or in combination with a cyclooxygenase-2 selective inhibitor. *PCT Int. Appl.* (2004), 149 pp. CODEN: PIXXD2 WO 2004110378 A2 20041223 CAN 142:49249 AN 2004:1124589 CAPLUS.

13.- Xiaotao Q, Hall SD. Therapeutic methods and compositions using *R* - ibuprofen. *PCT Int. Appl.* (1997), 88 pp. CODEN: PIXXD2 WO 9748391 A2 19971224 CAN 128:97725 AN 1998:25162 CAPLUS

14.- Boffey S. 1990. *Biocología: principios biológicos*, 1ª Ed. Edit. ACRIBIA, S. A. España. pp. 1-13, 171-196.

15.- Leresche JE, Meyer HP. 2006. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Org. Process Res. Dev.* 10:572-580.

16.- Luna H. 2004. Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 48:211-219.

17.- Bommarius AS, Riebel BR. 2004. *Biocatalysis*. 1ª Ed. Edit. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 1-16.

18.- Davis BG, Boyer V. 2001. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* 18:618-640.

19.- Turner NJ. 2003. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol.* 11:474-478.

- 20.- Roberts SM. 2004. Biocatalysis in synthetic organic chemistry. *Tetrahedron*. 60:499-500.
- 21.- Crueger W, Crueger A. 1989. *Biotecnología: Manual de microbiología industrial*, Edit. ACRIBIA. España. pp. 331-348, 39-41.
- 22.- Pérez H. 1998. Tesis de doctorado. Oxidación microbiológica de alcoholes por *Nocardia corallina* B-276, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco México, DF.
- 23.- Straathof AJJ, Panke S, Schmid A. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin Biotechnol*. 13:548-556.
- 24.- Mc Murry J. 2001. *Química orgánica*, 5ª Ed. Edit. International Thomson editores. Mexico. pp. 1074-1107.
- 25.- Bernard DD, Herman NE, Harold S. Ginsberg, Dulbecco R. 1996. *Tratado de microbiología*, 4ta. Ed. Edit. Masson, S.A., España. pp. 637-643.
- 26.- Scriban. R. 1984. *Biotecnología*, 2ª Ed. Edit. El manual moderno, S.A. de C.V. Mexico. pp. 8-57, 61-129.
- 27.- Quintero R. 1987. *Ingeniería Bioquímica*. 1ª Ed. Ed. Alhambra Mexicana, México, pp. 86-100.
- 28.- Miura Y, 1976. Transfer of oxygen and scale-up in submerged aerobic fermentation. *Adv. Biochem. Eng.* 4:3-40.
- 29.- Taguchi H, Humphrey AE, 1966. Dynamic measurement of volumetric O₂ transfer coefficient in fermentation systems. *J. Ferment. Technol.* 44: 881-889.
- 30.- Pérez HI, Manjarrez N, Luna H, Solís A, Ramírez C. 2005. Nitrile hydratase activity of *Nocardia corallina* B-276. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, No. 6A, p.p. 1150-1153.

- 31.- Kakeya H, Sakai N, Sugai T, Ohta H. 1991. Microbial hydrolysis as a potent method for the preparation of optically active nitriles, amides and carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* 32:1343-1346.
- 32.- Fallon RD, Stieglitz B., Turner I. 1997. A *Pseudomonas putida* capable of stereoselective hydrolysis of nitriles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:156-161.
- 33.- Yamamoto K, Ueno Y, Otsubo K, Kawakami K, Komatsu KI. 1990. Production of S-(+)-Ibuprofen from a nitrile compound by *Acinetobacter* sp. strain AK226. *Appl. Env. Microbiol.* 56:3125-3129.
- 34.- Liese A, Seelbach K, Wandrey C. 2000. *Industrial biotransformations*. 1^a Ed. Edit. Wiley. VCH, p.p. 31-54.
- 35.- Jencks WP. 1986. *Catalysis in chemistry and enzymology*. 1^a Ed. Edit. Dover Publications, Inc., p.p. 67-77.
- 36.- Hasegawa J, Ogura M, Tsuda S, Maemoto SI, Kutsuki H, Ohashi T. 1990. High-yield production of optically active 1,2-diols from the corresponding racemates by microbial stereoinversion *Agric. Biol. Chem.* 54:1819-1827.
- 37.- Xiaotao Q, Hall SD. 1993. Modulation of enantioselective metabolism and inversion of Ibuprofen by xenobiotics in isolated rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 845-851.
- 38.- Reichel C, Brugger R, Bang H, Geisslinger G, Brune K. 1997. Molecular cloning and expression of a 2-arylpropionyl-Coenzyme A epimerase: A key enzyme in the inversion metabolism of Ibuprofen. *Mol. Pharmacol.* 51:576-582.
- 39.- Ogawa J, Xie SX, Shimizu S. 1999. Stereoinversion of optically active 3-pentyn-2-ol by *Nocardia* species. *Biotechnol. Lett.* 21:331-335.

40.- Mitsukura K, Yoshida T, Nagasawa, T. 2002. Synthesis of (*R*)-2-phenylpropanoic acid from its racemate through an isomerase-involving reaction by *Nocardia diaphanozonaria*. *Biotechnol. Lett.* 24:1615-1621.

41.- Kato D, Mitsuda S, Ohta H. 2003. Microbial deracemization of α -substituted carboxylic acids: Substrate specificity and mechanistic investigation. *J. Org. Chem.* 68:7234-7242.

42.- Kato D, Miyamoto, K, Ohta H. 2004. Microbial deracemization of α -substituted carboxylic acids: control of the reaction path. *Tetrahedron: Asymmetry.* 15:2965-2973.

43.- Kumar I, Manju K, Jolly RS. 2001. A new biocatalyst for the preparation of enantiomerically pure 2-arylpropanoic acids. *Tetrahedron: Asymmetry.* 12: 1431-1434.

44.- SciFinder Scholar. CAS. Benceneacetonitrile, α -methyl-4-(2-methylpropyl)-, Número de registro: 58609-73-7. Fecha de consulta: 13/05/08

45.- SciFinder Scholar. CAS. Benceneacetamide, α -methyl-4-(2-methylpropyl)-, Número de registro: 59512-17-3. Fecha de consulta: 13/05/08

46.- SciFinder Scholar. CAS. Benceneacetic acid, α -methyl-4-(2-methylpropyl)-, Número de registro: 15687-27-1. Benceneacetic acid, α -methyl-4-(2-methylpropyl)-, (α S)-. Número de registro: 51146-56-6. Benceneacetic acid, α -methyl-4-(2-methylpropyl)-, (α R)-. Número de registro: 51146-57-7. Fecha de consulta: 13/05/08

47.- Avendaño C. 2001. Introducción a la química farmacéutica. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 2a. Edición. p.p. 904-908.

48.- upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-02222007-195248/unrestricted/01chapte1.pdf Fecha de consulta: 24/01/08.

49.- Pérez H, Luna H, Manjarrez N, Solís A. 2001. Resolution of methylarylmethanols via oxidation with *Nocardia corallina*. *Tetrahedron Asymmetry* 12:1709-1712.

50.- Ramirez MA, Pérez HI, Manjarrez N, Solís A, Luna H, Cassani J. 2008. Biocatalytic oxidative resolution of (±)-4-(chlorophenil)phenylmethanol by *Nocardia corallina* B-276. *Electron. J. Biotechnol.* Consultado en <http://www.Ejbiotechnology.info/content/vol11/issue4/full/3/>. Fecha de consulta 28/11/08.