



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
PRODUCCIÓN DE FARMACOQUÍMICOS

Estudio de las biotransformaciones del 2-(2-flúor-4-bifenil) propanonitrilo
y del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (flurbiprofen) con células aisladas
de *Nocardia corallina* B-276.

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

PRESENTA

Q.F.B . LAURA ISABEL MALAGÓN VELÁZQUEZ
Matricula: 209333025

COMITÉ TUTORAL

Tutora: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ
Asesor: DR. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ.
Asesora: DRA. AIDA SOLÍS OBA

Estudio de las biotransformaciones del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo y del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (flurbiprofen) con células aisladas de *Nocardia corallina* B-276.

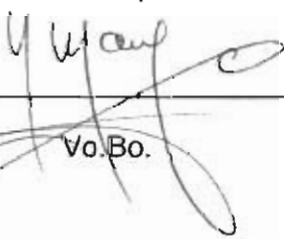
COMITÉ TUTORIAL

Tutora: Dra. Herminia Inés Pérez Méndez.



Vo.Bo.

Asesor: Dr. Norberto Manjarrez Alvarez.



Vo.Bo.

Asesora: Dra. Aida Solís Oba.



Vo.Bo.

Q.F.B. Laura Isabel Malagón Velázquez

Matricula 209383025.



JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Presidente Dr. Daniel Arrieta Báez



Vocal Dra. Erika Teresa Quintana Cano



Secretaría Dra. Herminia Inés Pérez Méndez.



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para el desarrollo de este proyecto durante el periodo Enero-2010 a Septiembre-2011 con numero de registro 240147.

Al cuerpo Académico Consolidado: Biocatálisis aplicada a la Química Orgánica UAM-Xochimilco laboratorio de biotransformaciones n-201.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres por su apoyo y ser el motor que me motiva a seguir siempre un paso hacia adelante.

A mis hermanos, Verónica, Francisco y Héctor por sus consejos y apoyo en los buenos momentos y en los que no fueron tanto.

A mis sobrinos, Kenia, Michael, Catherine y Zahorí, por enseñarme algo nuevo cada día.

A la memoria de mis abuelos Bertha, Catalina y José.

A mis tíos Guadalupe, Juan, Andrés, Lucía y Pastor

A la Dra. Herminia y Dr. Norberto por su apoyo, paciencia y entrega al compartir con nosotros sus conocimientos y hacer de nuestra estancia por esta institución una experiencia grata que siempre llevaremos en la mente y corazón.

A la Dra. Aida, Liliana y Julia.

A Cony por su amistad, apoyo y compartirme sus conocimientos.

A Esteban, Lucía y Marlen por inspirarme a seguir el mismo sendero, a su amistad y apoyo durante todos estos años.

A mis amigos y primos Lidia, Libertad, Cindy, Copytzy, Ana Luisa, Enrique, Ary, Susana, Fadia, Adolfo, Mario, Richarth, Alma, Charlie, Vane, Norma, Patricia, Julia, Yesica, Sergio, Ricardo, Nora, Alberto, Zila, Jazmín, Denis, Eunice, Noé.

Índice

| | |
|--|----|
| Figuras | I |
| Tablas | II |
| Resumen | 2 |
| 1.-Introducción | 4 |
| 2.-Antecedentes | 6 |
| 2.1 Biotransformaciones o bioconversiones | 6 |
| 2.2 Aplicaciones de las biotransformaciones microbianas | 7 |
| 2.3 Enzimas | 8 |
| 2.3.1 Enzimas en disolventes orgánicos | 10 |
| 2.4 Hidrólisis química de nitrilos | 12 |
| 2.5 Hidrólisis química de amidas | 12 |
| 2.6 Hidrólisis biocatalítica de nitrilos y amidas | 15 |
| 2.7 Nocardia corallina | 17 |
| 2.8 Importancia de los ingredientes farmacéuticos activos quirales | 18 |
| 2.9 Resolución de mezclas racémicas | 20 |
| 2.10 Métodos de síntesis de fármacos quirales | 21 |
| 2.11 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) | 22 |
| 2.12 Mecanismo de acción del flurbiprofen | 24 |
| 2.13. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos | 25 |
| 2.13.1 Flurbiprofen | 25 |
| 2.13.2 2-(2-flúor-4-bifenil) propanonitrilo | 26 |
| 2.13.3 2-(2-flúor-4-bifenil)-1-propanol | 26 |
| 2.13.4 2-(2-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanoato de metilo | 27 |
| 2.13.5 Cloruro de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanoilo | 28 |

| | |
|--|----|
| 2.13.6 2-(2-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida | 29 |
| 3. Planteamiento de problema | 30 |
| 4 Hipótesis | 31 |
| 5 Objetivos | 31 |
| 5.1 Objetivo general | 31 |
| 5.2 Objetivos específicos | 31 |
| 6 Metodología | 32 |
| 6.1 Descripción del equipo | 32 |
| 6.2 Reactivos | 32 |
| 6.3 Desarrollo experimental | 33 |
| 6.3.1 Extracción del (R,S)-ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (rac-flurbiprofen). | 33 |
| 6.3.2 Síntesis química de los compuestos requeridos | 33 |
| 6.3.2.1 Síntesis de 2-(2-flúor-4-bifenil)-1-propanol | 33 |
| 6.3.2.2 Síntesis de 2-(2-flúor-4-bifenil) propanonitrilo | 34 |
| 6.3.2.3 Síntesis de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanoato de metilo | 34 |
| 6.3.2.4 Síntesis de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida | 35 |
| 6.3.2.5 Síntesis del cloruro de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanoilo | 35 |
| 6.3.2.6 Síntesis de 2-(2'-fluor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida | 36 |
| 6.3.2.7 Síntesis de 2-(2-flúor-4-bifenil) propanonitrilo | 36 |
| 6.4 Métodos analíticos | 37 |
| 6.4.1 2-(2-flúor-4-bifenil)-1-propanol | 37 |
| 6.4.2 Ácido 2-(2-flúor-4-bifenil) propanoico, 2-(2'-fluor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida, 2-(2-flúor-4-bifenil) propanonitrilo | 37 |
| 6.4.3 Ácido 2-(2-flúor-4-bifenil) propanoico | 37 |

| | |
|--|----|
| 6.4.4 2-(2'-fluor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida, 2-(2-flúor-4-bifenil) propanonitrilo. | 38 |
| 6.5 Procedimiento para la biotransformación del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil) propanoico. | 38 |
| 6.5.1 Obtención de biomasa de Nocardia corallina | 39 |
| 6.6 Biotransformación del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil) propanoico | 39 |
| 6.7 Procedimiento para la biotransformación de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo y 2-(2'-fluor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida | 40 |
| 6.7.1 Activación de Nocardia corallina, incorporando acetonitrilo para inducir la degradación de nitrilos | 40 |
| 6.8 Biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida | 41 |
| 6.9 Biotransformación 2-(2-flúor-4-bifenil) propanonitrilo | 42 |
| 6.9.1 Procedimiento general para el aislamiento y preparación de las muestras a analizar por CG y CLAR | 42 |
| 7 Resultados y discusión | 43 |
| 7.1 Caracterización del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (rac-flurbiprofen | 43 |
| 7.1.1 Caracterización por IR del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (rac-flurbiprofen) | 43 |
| 7.1.2 Caracterización por RMN del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (flurbiprofen) | 45 |
| 7.1.3 Análisis por CG del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico | 48 |
| 7.1.4 Análisis por CLAR del ácido rac-2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico | 49 |
| 7.2 Resultados obtenidos en la síntesis química de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo | 50 |
| 7.3 Caracterización del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol | 53 |
| 7.3.1 Caracterización por espectroscopia de IR del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol | 53 |
| 7.3.2 Análisis por CG de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol | 54 |

| | |
|---|----|
| 7.3.3 Análisis por CLAR del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol | 55 |
| 7.4 Caracterización por espectroscopia de IR del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanoato de metilo, y del cloruro de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoilo | 56 |
| 7.5 Caracterización de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida | 57 |
| 7.5.1 Caracterización por IR de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida. | 57 |
| 7.5.2 Caracterización por RMN de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida | 59 |
| 7.5.3 Análisis por CG 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida | 61 |
| 7.5.4 Análisis por CLAR de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida. | 62 |
| 7.6 Caracterización de 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo | 63 |
| 7.6.1 Caracterización de por IR de 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo | 63 |
| 7.6.2 Caracterización por RMN de 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo | 64 |
| 7.6.3 Análisis por CG del 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo | 67 |
| 7.6.4 Análisis por CLAR del 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo | 68 |
| 7.7 Biotransformación del ácido (+)-2-(2'-flúor-4-bifenil)propanoico | 69 |
| 7.8 Biotransformación de la 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida | 70 |
| 7.9 Biotransformación del 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo | 75 |
| 8. Conclusiones | 78 |
| 9. Bibliografía | 80 |

Figuras

| | |
|---|----|
| Figura. 1. Enzimas utilizadas a nivel industrial en 134 procesos industriales biocatalíticos. | 9 |
| Figura 2. Hidrólisis ácida del nitrilo | 12 |
| Figura. 3. Mecanismo hidrólisis ácida de los nitrilos | 12 |
| Figura 4. Hidrólisis ácida de amidas. | 13 |
| Figura 5. Mecanismo de reacción, hidrólisis ácida de amida | 13 |
| Figura 6. Mecanismo de reacción catalizada por la enzima amidasa. | 15 |
| Figura. 7. Mecanismo de reacción catalítica de nitrilo hidratasa. | 16 |
| Figura 8. Rutas de biotransformación del nitrilo | 16 |
| Figura 9. Mecanismos de formación de prostaglandinas tromboxanos y leucotrienos a partir del ácido araquidónico | 23 |
| Figura 10. Flurbiprofen | 25 |
| Figura 11. Nitrilo del flurbiprofen | 26 |
| Figura 12. Alcohol del flurbiprofen | 26 |
| Figura 13. Éster metílico del flurbiprofen | 27 |
| Figura 14. Cloruro del flurbiprofen | 28 |
| Figura 15. Amida del flurbiprofen | 29 |
| Figura 16. Infrarrojo del <i>rac</i> -flurbiprofen. | 44 |
| Figura 17. Espectro de RMN ¹ H del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico | 46 |
| Figura 18. Espectro de RMN ¹³ C del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico. | 47 |

| | |
|---|----|
| Figura 19. Cromatograma, CG, para el ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico. | 49 |
| Figura 20. Cromatograma, CG, para la mezcla de nitrilo, flurbiprofen y amida. | 49 |
| Figura 21. Cromatograma, CLAR, del ácido <i>rac</i> -2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico. | 50 |
| Figura 22. Rutas estudiadas en la preparación de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo. | 51 |
| Figura 23. Infrarrojo del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol. | 54 |
| Figura 24. Cromatograma, CG, del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol | 55 |
| Figura 25. Cromatograma, CLAR, del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol | 55 |
| Figura 26. Infrarrojo del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoato de metilo. | 56 |
| Figura 27. Infrarrojo del cloruro de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanoilo | 57 |
| Figura. 28. Infrarrojo de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida | 58 |
| Figura 29. Espectro de RMN ¹ H del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida | 59 |
| Figura 30. Espectro de RMN ¹³ C del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida | 60 |
| Figura 31. Cromatograma, CG, de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida. | 62 |
| Figura 32. Cromatograma, CLAR, de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida | 63 |
| Figura 33. Infrarrojo de 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo. | 64 |

| | |
|---|----|
| Figura 34. Espectro de RMN ¹ H del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo | 65 |
| Figura 35. Espectro de RMN ¹³ C del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo | 66 |
| Figura 36. Cromatograma, CG, del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo. | 68 |
| Figura 37. Cromatograma, CLAR, del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo. | 68 |
| Figura 38. Cromatograma, CLAR, de la biotransformación del <i>rac</i> -flurbiprofen a las 168h, relación 1:1000 sustrato: células húmedas | 70 |
| Figura 39. Cromatograma, CG, de la biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida a las 144h; relación, 1:100 sustrato:células húmedas, Lote 5. | 72 |
| Figura 40. Cromatograma, CLAR, a las 144h de biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida, relación 1:100 sustrato:células húmedas, Lote 5. | 73 |
| Figura 41. Cromatograma, CG, de la biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida a las 360h, relación 1:100 sustrato:células húmedas, Lote 6. | 73 |
| Figura 42. Cromatograma, CLAR, a las 360h de biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'bifenil-4-il)propanamida, relación 1:100 sustrato:células húmedas, Lote 6. | 74 |
| Figura 43. Infrarrojo de la biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida a las 144h; relación, 1:100 sustrato:células húmedas, Lote 5. | 74 |
| Figura 44. Cromatograma, CG, a las 96h, relación 1:100 sustrato:células húmedas | 76 |
| Figura 45. Infrarrojo a las 96h, relación 1:100 sustrato:células húmedas. | 77 |
| Figura 46. Cromatograma, CG de las células liofilizadas, a las 144h | 77 |

Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Ventajas y desventajas de las biotransformaciones | 7 |
| Tabla 2. Clasificación de Enzimas | 8 |
| Tabla 3. Microorganismos con actividad nitrilo hidratasa, nitrilasa, amidasa | 10 |
| Tabla 4. Relación entre configuración absoluta y actividad biológica para ciertos compuestos quirales | 19 |
| Tabla 5. Desplazamiento químico (ppm) para ^{13}C y ^1H del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico | 48 |
| Tabla 6. Rendimiento de los compuestos sintetizados, en las distintas rutas estudiadas, para la preparación de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo. | 52 |
| Tabla 7. Desplazamiento químico (ppm) para ^{13}C y ^1H de la 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida | 61 |
| Tabla 8. Desplazamiento químico (ppm) para ^{13}C y ^1H del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo. | 67 |
| Tabla 9. Biotransformación del ácido (\pm)-2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico | 69 |
| Tabla 10. Biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida. | 71 |

Resumen

En la búsqueda de mejores alternativas para la obtención de fármacos que se comercializan como mezclas racémicas y la preocupación por la protección del ambiente, se ha impulsado la investigación hacia la generación de procesos químicos más amigables. Esto ha llevado también al desarrollo y mejoramiento de los métodos ya existentes y se ha encontrado que la bioconversión es una herramienta biocompatible dentro de la síntesis orgánica, empleando células microbianas, tejidos de vegetales y animales o sus enzimas aisladas.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo de fármacos que se encuentran entre los de mayor oferta por parte de la industria farmacéutica y con un frecuente patrón de prescripción por los profesionales de salud.

El flurbiprofen pertenece al grupo de derivados del ácido propiónico, que ha mostrado tener efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios. Por lo general se emplea como mezcla racémica, destacándose la forma S(+) como la molécula farmacológicamente activa. Sin embargo, en la actualidad se ha encontrado que el enantiómero R del flurbiprofen tiene actividad terapéutica contra el cáncer y en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Por lo cual las diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas entre los enantiómeros de cada fármaco son cada vez más apreciadas.

Dado nuestro interés en las estereoinversiones de los AINEs con *Nocardia corallina*, se estudió la estereoinversión del flurbiprofen. Los resultados alcanzados en esta biotransformación presentan una relación de 94/6 de los enantiómeros R/S, utilizando una relación de sustrato: células húmedas del microorganismo de 1:1000, durante 168h. Aunque no es el enantiómero más activo como AINEs, las nuevas aplicaciones terapéuticas que se han reportado para el enantiómero R, hacen más prometedora esta metodología.

En investigaciones recientes se ha logrado la hidrólisis enantioselectiva de los ésteres del flurbiprofen. Lo anterior originó el interés de estudiar la obtención del

flurbiprofen partiendo de su precursor, el nitrilo, utilizando células completas de *Nocardia corallina* B-276 como biocatalizador.

El microorganismo *Nocardia corallina* B-276 demostró ser capaz de llevar la conversión del nitrilo a la amida del flurbiprofen (profármaco utilizado para el tratamiento de la inflamación ocular) a pH de 7.51, exhibiendo de esta forma actividad nitrilo hidratasa. Sin embargo el % de conversión del nitrilo a la amida del flurbiprofen fue 40.25%, a las 96h, con una relación de sustrato:células húmedas 1:100.

También se estudió la actividad amidasa de este biocatalizador explorando la biotransformación de la amida del flurbiprofen al flurbiprofen, esperando que fuese de manera enantioselectiva. Se observó un 60-66% de conversión al ácido, a las 144h, con una relación de sustrato: células húmedas 1:100 y a un pH de 7.0 del medio de cultivo de *Nocardia corallina*.

En los dos casos anteriores el microorganismo (biocatalizador) utilizó como fuente de nitrógeno acetonitrilo, tanto para la preparación de la biomasa como del medio sólido, con la finalidad de inducir una mayor adaptación de la bacteria a esta fuente de nitrógeno y promover una mayor actividad de la enzima nitrilo hidratasa (NHasa) y amidasa.

1. INTRODUCCIÓN

La actividad enzimática de los sistemas biológicos ha sido explotada desde épocas muy remotas por la humanidad para la obtención de compuestos orgánicos, por lo general bajo la forma de mezclas complejas, y de manera reciente con los avances del conocimiento científico y tecnológico, observamos el desarrollo de procesos biotecnológicos ampliamente utilizados, principalmente en las industrias alimentaria, agrícola y farmacéutica.¹ En las últimas décadas estos desarrollos industriales deben considerar la necesidad de obtener nuevos compuestos quirales puros, con novedosas aplicaciones biológicas, en la búsqueda de reducir los efectos contaminantes generados en la producción de los mismos por métodos químicos convencionales. Lo anterior ha potencializado el resurgimiento de algunas técnicas ya conocidas y el desarrollo de otras más elaboradas que son consideradas como alternativas importantes en el quehacer de la investigación. El desarrollo de nuevos métodos de preparación por inducción asimétrica, separación, identificación y cuantificación de compuestos enantioméricamente puros posibilitan hoy, la obtención de un gran número de compuestos quirales, comparado con lo que ocurría hasta hace pocos años donde sólo se disponía de los enantiómeros que se podían encontrar en la naturaleza.

Las biotransformaciones han resultado una herramienta útil y compatible dentro de la síntesis orgánica, mediante el uso de tejidos de animales, plantas y células microbianas que han demostrado tener la capacidad de biotransformar compuestos orgánicos para darles así un mayor valor agregado, como es el caso de la bacteria *Nocardia corallina* B-276 que es capaz de llevar a cabo la hidrólisis enantioselectiva de nitrilos o amidas, así como la estereoinversión del ácido carboxílico, utilizando el sistema enzimático que posee, entre otras, enzimas isomerasas, nitrilo hidratadas y amidasas^{2,3} para la obtención de ingredientes farmacéuticos activos que se comercializan en forma de mezclas racémicas.

Actualmente las diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas entre cada enantiómero son cada vez más valoradas; por ejemplo los antiinflamatorios no

esteroideos (AINEs) constituyen un gran grupo de ingredientes farmacéuticos activos con acción: antipirética analgésica y antiinflamatoria con un frecuente patrón de prescripción a nivel mundial.

El flurbiprofen pertenece al grupo de los derivados del ácido propionico, este AINE ha mostrado propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias; posee un centro quiral, pero se comercializa en forma de racemato a pesar de que el enantiómero S(+) es la forma farmacológicamente activa.

Recientemente se ha encontrado que el enantiómero R(-) del flurbiprofen y sus derivados, tienen actividad terapéutica en el tratamiento del Alzheimer,⁴ y en detener la producción de tumores colorectales y de próstata; recientemente se han diseñado profármacos derivados del R-flurbiprofen, como por ej. el R-flurbiprofenil-2,3-bisnitrooxipropil éster el cual es una fuente de óxido nítrico (NO) que se genera por el metabolismo del nitrato.⁵

La obtención de los enantiómeros puros del flurbiprofen se ha logrado por medio de biocatálisis, la resolución cinética de *rac*-flurbiprofen con *Candida antarctica* (Novozym®435) presenta una R-estereopreferencia⁶ y en contrapartida con lipasas extracelulares de *Serratia marcescens* ES-2 se observa una preferencia contraria para dar el (S)-flurbiprofen.⁷ Lo anterior nos motivó a estudiar la obtención partiendo de un precursor del ácido deseado, el nitrilo, utilizando células completas de *Nocardia corallina* B-276 para inducir de manera enzimática la obtención del AINE, en su caso, como uno solo de los enantiómeros, ya sea por hidrólisis enantioselectiva del nitrilo o de la amida correspondiente, al actuar las enzimas nitrilo hidratasa y amidasa que se conoce posee este microorganismo^{2,3} y estudiar en un nuevo sustrato la novedosa reacción enzimática de estereoinversión con *N. corallina* que para el AINE ibuprofen fue informada por el grupo de investigación donde se realizará el presente estudio,³ esperando que la reacción de estereoinversión no sea específica para ibuprofen y se pueda así ampliar los sustratos para lograr la estereoinversión en otros AINEs de interés terapéutico y comercial.

2. ANTECEDENTES

2.1 Biotransformación o bioconversiones

En la última década, las biotransformaciones son un tema de creciente interés en síntesis de química fina y en otros sectores industriales, ya que se han constituido en una de las áreas más promisorias de investigación científica con potencial aplicación biotecnológica, debido a su utilidad y beneficios de su uso, por un menor impacto ambiental, en la obtención de materias primas y productos útiles para diferentes procesos industriales en sectores tan trascendentes como el farmacéutico, químico, alimenticio y agrícola. Se considera que de los 134 procesos industriales, el 55% corresponde al sector farmacéutico.⁸ Mediante el empleo de biotransformaciones, se ha logrado introducir y optimizar un gran número de reacciones empleadas en la síntesis de compuestos quirales; estos procesos biotecnológicos han sido capaces de modificar compuestos orgánicos con bajo costo y transformarlos en productos con alto valor agregado mediante el uso de enzimas de células: microbianas, vegetales o animales; siendo las microbianas superiores en varios aspectos, por ejemplo poseen una alta relación superficie-volumen lo que les confiere un crecimiento rápido y altas velocidades de metabolismo que conducen a la eficiente transformación de los sustratos que se le añaden. La utilización de microorganismos con este propósito se denomina bioconversión o biotransformación, e implica, el uso de cultivos en fermentadores, seguido de la adición de un compuesto químico que ha de ser convertido; en muchos casos estos productos son difíciles de obtener de fuentes naturales o por medios sintéticos.⁹

Las biotransformaciones se caracterizan por la versatilidad y eficiencia, un comparativo de sus principales ventajas y desventajas se presentan en la **tabla 1**.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de las biotransformaciones.^{9,10}

| Ventajas | Desventajas |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Regioselectividad, quimioselectividad y enantioselectividad de procesos enzimáticos implicados.• Condiciones suaves a baja temperatura.• pH neutro o cercano a la neutralidad.• Los reactivos y disolventes poseen baja toxicidad y por ello son considerados amigables con el ambiente.• No requieren la protección de grupos funcionales. | <ul style="list-style-type: none">• El empleo de altas diluciones y el uso de cofactores costosos.• Incompatibilidad con algunos disolventes orgánicos.• En algunos casos las biotransformaciones tienen rendimientos bajos.• Problemas de solubilidad de los sustratos empleados en sistemas acuosos.• Altos costos de implementación de los procesos a escala industrial. |

2.2 Aplicaciones de las biotransformaciones microbianas

Las biotransformaciones en síntesis orgánica se emplean para la preparación de compuestos enantiopuros e intermediarios de interés farmacéutico, así como en la transformación de grupos funcionales quirales, y para la obtención de compuestos que por transformación química, hasta ahora era imposible;¹¹ debido a que las biotransformaciones se llevan a cabo bajo condiciones suaves, han permitido evitar de esta forma el uso de condiciones extremas, que en otros

procesos de obtención de fármacos pueden causar racemizaciones o transposiciones. A nivel industrial se han utilizado en la elaboración de: alimentos (productos lácteos, saborizantes), bebidas (cerveza, vinos, etc.), cosmética y agroquímica.^{11,12}

2.3 Enzimas

Cada organismo produce una gran variedad de enzimas, muchas de las cuales se sintetizan en pequeña cantidad y están implicadas en múltiples procesos celulares. Las enzimas son biocatalizadores especialmente útiles, porque a menudo actúan en grupos funcionales similares en una misma molécula y en muchos casos catalizan reacciones de forma estereoespecífica.^{5,6}

En la actualidad, se conocen más de 3000 enzimas de las cuales 300 han sido investigadas y son accesibles comercialmente. Las enzimas se clasifican generalmente en seis categorías según el tipo de reacción que catalizan: oxidoreductasa, transferasa, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas (**tabla 2**).^{13,14}

Tabla 2. Clasificación de Enzimas

| Enzima | Función |
|----------------|---|
| Oxidoreductasa | Cataliza reacciones de óxido-reducción |
| Transferasa | Transfiere grupos acilo, glucosilo, fosfatos y equivalentes de aldehidos 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, |

El grupo de biocatalizadores más utilizado en síntesis orgánica y en procesos industriales son las hidrolasas.¹⁵ Se estima que más del 70% de las enzimas empleadas en la industria pertenecen a esta familia (**figura1**).¹⁶ Las hidrolasas catalizan la hidrólisis selectiva en enlaces de tipo C-O, C-N, son enzimas fácilmente accesibles, que no requieren cofactores y que presentan una versatilidad catalítica puesto que adoptan diversas conformaciones que les permiten acomodar en el centro activo una amplia variedad de sustratos.¹⁷

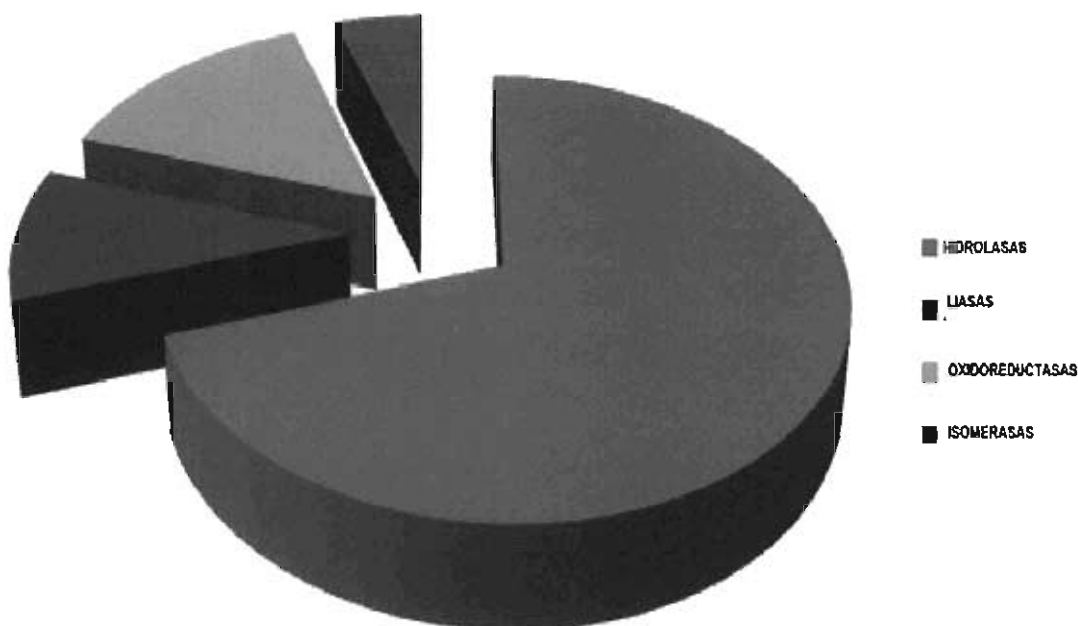


Figura. 1. Enzimas utilizadas a nivel industrial en 134 procesos industriales biocatalíticos

Entre los microorganismos utilizados en la transformación de sustratos de interés industrial y que han reportado actividad enzimática de nitrilo hidratasa, amidasa o nitrilasa se muestran en la **tabla 3**.^{17,18}

Tabla 3. Microorganismos con actividad nitrilo hidratasa, nitrilasa, amidasa

| Nitrilo hidratasa | Nitrilasa | Amidasa |
|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| <i>Pseudomonas putida</i> | <i>Rhodococcus AJ270</i> | <i>Rhodococcus ATCC BAA-870</i> |
| <i>Rhodococcus equi A4</i> | <i>Agrobacterium sp</i> | <i>Rhodococcus sp. AJ270</i> |
| <i>Rhodococcus ATCC BAA-870</i> | <i>P. fluorescens</i> | <i>Klebsiella terrigena</i> |
| <i>Rhodococcus sp. AJ270</i> | <i>Candida famata</i> | <i>Aspergillus niger</i> |
| <i>Torulopsis cendida</i> | <i>Candida guilliermodi</i> | |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Cryptococcus sp</i> | |
| <i>Myrothecium verrucaria</i> | <i>Rhodotorula glutinis</i> | |
| <i>Aspergillus niger</i> | <i>Fusarium solani</i> | |
| <i>Nocardia corallina</i> | | |

2.3.1 Enzimas en disolventes orgánicos

Las biotransformaciones se caracterizan por transcurrir de manera usual en sistemas acuosos, las enzimas tienen la capacidad de trabajar en mezclas miscibles de agua-disolvente orgánico,¹⁹ en sistemas bifásicos agua-disolvente orgánico inmiscible, en sistemas micelares reversos o en medios orgánicos,²⁰ tanto hidrofílicos como hidrofóbicos no están rodeados de un propio disolvente, sino por agua.

Las proteínas presentan alrededor una capa esencial de agua, que es fundamental para su actividad catalítica. Debido a las diferentes solubilidades en agua de los distintos disolventes orgánicos, se requieren diferentes cantidades de agua para mantener la actividad catalítica de cada enzima, ya que la actividad de los procesos enzimáticos depende en gran medida de esta capa esencial de agua. En caso de emplear una enzima en forma sólida (liofilizada o adsorbida sobre un soporte inerte) en disolvente orgánico, va a producirse un proceso de catálisis heterogénea en el que aparecen dos fases: una líquida formada por el disolvente orgánico y los reactivos disueltos y otra sólida constituida por la enzima con su capa esencial de agua.

Las ventajas sintéticas de llevar a cabo procesos en disolvente orgánicos son las siguientes:²¹

- Catálisis de un gran número de reacciones que serían desfavorables en agua.
- Ausencia de reacciones laterales no deseadas que suelen suceder en medios acuosos.
- Solubilización de sustratos hidrofóbicos.
- Facilidad de recuperación de ciertos productos insolubles y del propio catalizador
- Incremento de la estabilidad térmica de las enzimas, especialmente a bajo nivel de agua.
- Posibilidad de producir cambios importantes en la selectividad de los biocatalizadores.

La actividad de las enzimas en medios orgánicos dependen de manera muy importante de factores como la cantidad de agua, la solvatación de los sustratos, el control del pH, el estado físico de la enzima y la naturaleza del disolvente. Sin embargo, se ha observado que las enzimas presentan una actividad mucho menor en disolventes orgánicos que en el agua, debido a factores como las limitaciones disfuncionales, la poca estabilización del intermediario enzima-sustrato, la flexibilidad restringida de las proteínas en un medio orgánico e incluso desnaturalización parcial del biocatalizador en el proceso de liofilización.

Para contrarrestar estos problemas se han desarrollado técnicas como la solubilización de la enzima en el disolvente orgánico, o la absorción de los preparados enzimáticos en soportes porosos que reduzcan las limitaciones disfuncionales. También se ha empleado la adición de excipientes o de sales antes de la liofilización del biocatalizador, o la preparación de crudos enzimáticos a partir de disoluciones acuosas a un pH óptimo para la actividad catalítica.²¹

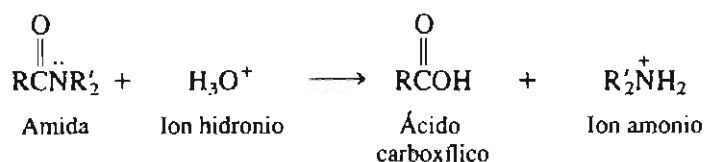
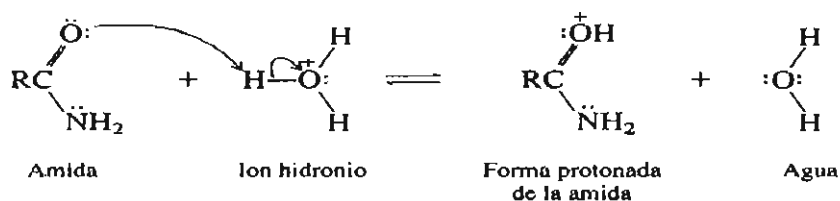


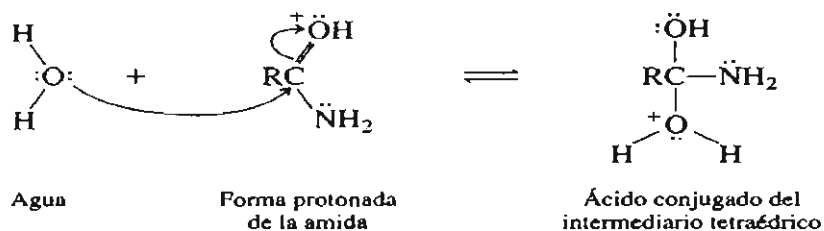
Figura 4. Hidrólisis ácida de amidas.

Los pasos 1 a 3 muestran la formación del intermediario tetraédrico.

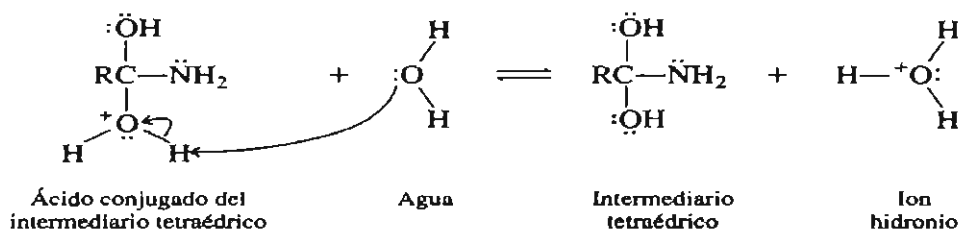
Paso 1: Protonación del oxígeno carbonílico de la amida



Paso 2: Adición nucleofílica de agua a la forma protonada de la amida

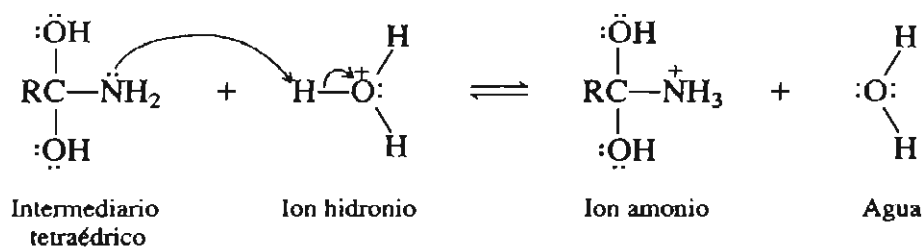


Paso 3: Desprotonación del ion oxonio para llegar a la forma neutra del intermediario tetraédrico

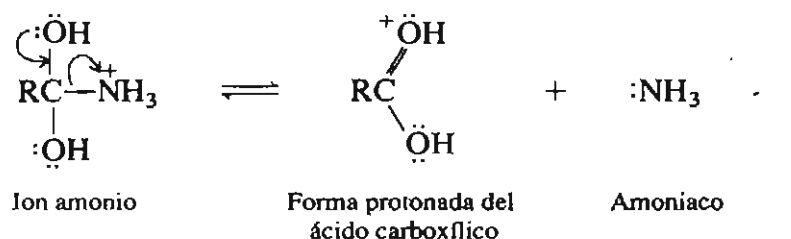


La disociación del intermediario tetraédrico se muestra en los pasos 4 a 6.

Paso 4: Protonación del intermediario tetraédrico en el nitrógeno del amino



Paso 5: Disociación de la forma *N*-protonada del intermediario tetraédrico para forma amoniaco y la forma protonada del ácido carboxílico



Paso 6: Procesos de transferencia de protones, que producen el ion amonio y el ácido carboxílico

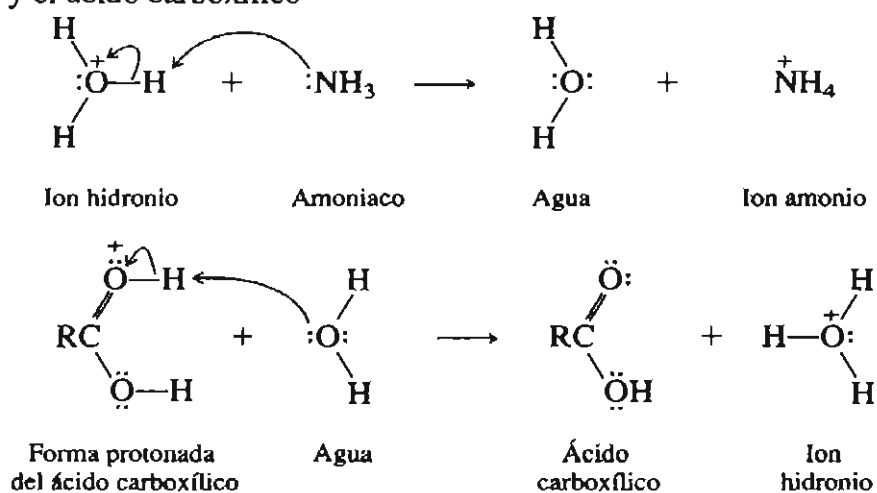


Figura 5. Mecanismo de reacción, hidrólisis ácida de amidas.

2.6 Hidrólisis biocatalítica de nitrilos y amidas

Una importante aplicación de la hidrólisis enzimática es en la hidrólisis del grupo nitrilo, ya que se evitan las usuales condiciones de reacción con temperaturas altas o el uso de bases o ácidos fuertes, típicas de la hidrólisis química.^{24,25}

Se han empleado diversos microorganismos para catalizar la hidrólisis de una gran variedad de nitrilos, al igual que en otros procesos biocatalíticos, estas reacciones ocurren con químio-regio- o estereoselectividad difícil de alcanzar con los métodos químicos convencionales.^{2,11,18}

La hidrólisis biocatalítica de nitrilos a los ácidos carboxílicos puede ocurrir por dos mecanismos: 1) por medio de una nitrilasa, lo que permite obtener el ácido carboxílico directamente y 2) por la vía de una nitrilo hidratasa (NHasa) que lo transforma primero a la amida, la cual puede ser hidrolizada por una amidasa y obtener así el ácido carboxílico,^{2,18,25} ver **figuras 6, 7, 8**.

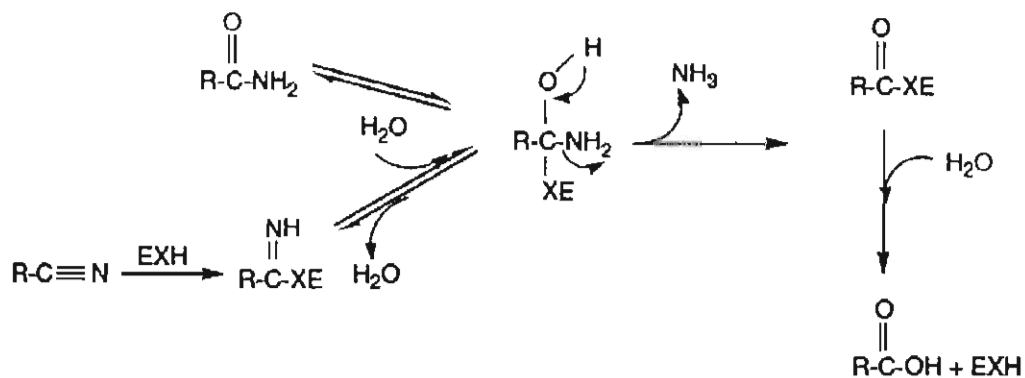


Figura 6. Mecanismo de reacción catalizada por la enzima amidasa.

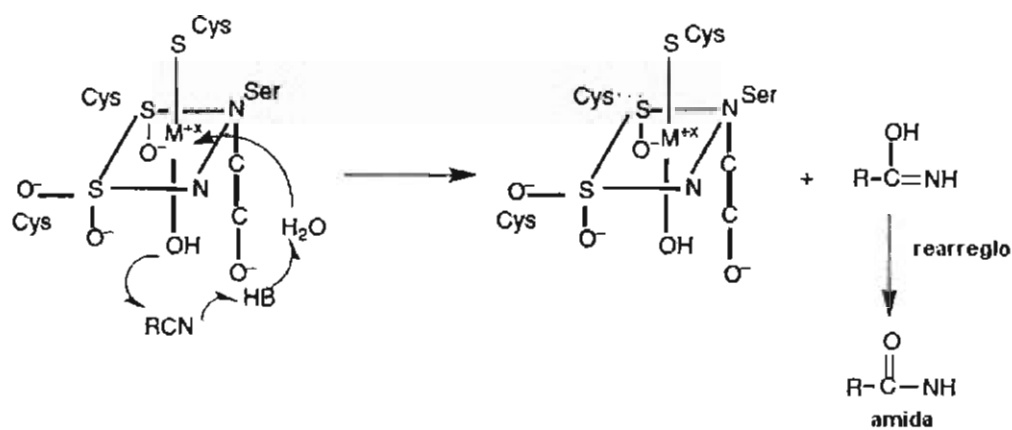


Figura. 7. Mecanismo de reacción catalítica de nitrilo hidratasa.

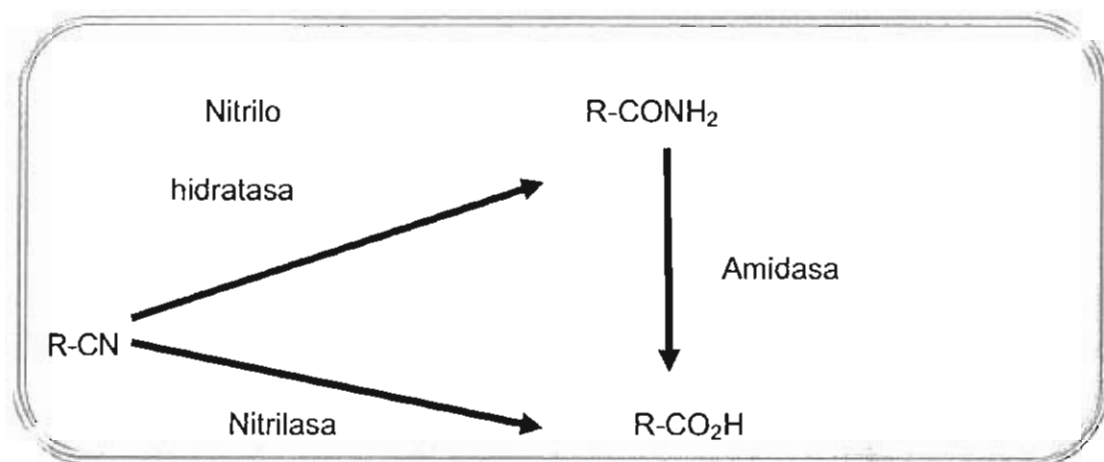


Figura 8. Rutas de biotransformación del nitrilo.

2.7 *Nocardia corallina*

La familia *Nocardiaceae* pertenece al suborden *Corynebacteriaceae* del orden cuarto, tipo químico de *Actinomycetales*. El género *Nocardia* fue descrito por Edmond Nocard en 1888 de una infección en bovino, forma parte de la familia *Nocardiaceae* junto con los géneros *Rhodococcus*, *Tsukamurella* y *Gordonia*,²⁶ comprende numerosas especies de interés médico y capaces de infectar al humano como: *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis*. Las infecciones producidas por estos dos microorganismos son poco frecuentes, causan infecciones localizadas como diseminadas en humanos frecuentemente inmunodeprimidos y en animales.^{26,27}

Macroscopía y microscopía.

Son cocobacilos ramificados que forman hifas aéreas (formando colonias algodonosas), células similares a esporas, es común la formación de filamentos, los cuales son profundos y tienden a fragmentarse. Al igual que otros actinomicetos, la pared celular contiene ácidos micólicos, también llamados ácidos nocárdicos, a la presencia de estos se le atribuye la ácidoresistencia que puede ser débil o parcial cuando se tiñen con carbolfucsina.^{26,28} Las colonias son de color naranja, de superficie y bordes irregulares, con un característico olor a tierra mojada, varía según la especie.²⁷

Desde el punto de vista nutricional son aerobios estrictos, capaces de crecer en presencia de una variedad de fuentes de carbono.²⁶ Los microorganismos del género *Nocardia* proliferan con facilidad y rapidez en diversos medios de cultivo, en aquellos que contienen agar la aparición de colonias es variable, de uno a cinco días. 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. *Nocardia* puede diferenciarse de géneros similares por su capacidad para descomponer y utilizar la parafina como una fuente de carbono y energía. Esta propiedad permite el aislamiento selectivo de *Nocardia* de cultivos mixtos.²⁹

Las especies como *Nocardia corallina* y *Nocardia gluberlua* son de gran importancia a nivel industrial, la primera en epoxidación de alquenos²⁸ y en epoxidaciones estereoespecíficas en química fina²⁰ o en la degradación de derivados clorados;³⁰ y la segunda como especie biodegradadora de nitrilos.³¹

Estudios recientes en procesos de biotransformación, se ha encontrado que dentro de este género, la bacteria *Nocardia corallina* B-276 es capaz de llevar a cabo la hidrólisis de nitrilos o amidas, así como la estereoinversión del ácido carboxílico obtenido, mediante enzimas isomerasas, nitrilo hidratatas y amidasas para la obtención de ingredientes farmacéuticos activos.^{2,3}

2.8 Importancia de los ingredientes farmacéuticos activos quirales

La mayoría de los ingredientes farmacéuticos activos quirales casi siempre se obtienen como mezcla racémica, en lugar del enantiómero puro; debido a las ventajas terapéuticas que ofrecen cada uno de los enantiómeros, la producción de los mismo ha crecido a un ritmo mayor del 13% anual durante los últimos años,³² de 1300 fármacos que se obtienen mediante síntesis orgánica, 500 de estas sustancias son quirales. Actualmente estas sustancias son comercializadas y administradas como mezclas racémicas, aun cuando la actividad terapéutica deseada reside en uno solo de los enantiómeros.²²

En un organismo, la mayoría de los procesos relevantes en la acción de un ingrediente farmacéutico activo (IFA) son: la inhibición selectiva de enzimas, el transporte a través de membranas celulares y la función como agonistas o antagonistas de receptores; y esto depende estrechamente de la estereoquímica del mismo. Factores tan fundamentales como la actividad biológica, toxicidad y metabolismo, pueden ser diferentes para los enantiómeros de un fármaco quiral.^{33,34} Existen numerosos ejemplos³⁵ en la literatura científica sobre distintas acciones biológicas de enantiómeros. Si consideramos un IFA con un centro quiral, en el que uno de los enantiómeros tiene efecto terapéutico mientras que el otro enantiómero, puede presentar otros posibles comportamientos, tales como: 1)

la misma actividad biológica; 2) ningún efecto tóxico para el organismo receptor; 3) una actividad antagonista a la del enantiómero terapéutico, con lo cual anula su acción. Algunos de estos casos se presentan en la **tabla 4**.¹³

Tabla 4. Relación entre configuración absoluta y actividad biológica para ciertos compuestos quirales

| Compuesto con actividad biológica | Configuración absoluta | Efecto biológico |
|-----------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| Talidomida | <i>R</i> | Sedante |
| | <i>S</i> | Extremadamente teratogénico |
| Cloranfenicol | <i>R,R</i> | Antibacteriano |
| | <i>S,S</i> | Inactivo |
| Propranolol | <i>R</i> | Anticonceptivo |
| | <i>S</i> | Antihipertensivo |
| Etambutol | <i>S,S</i> | Tratamiento de tuberculosis |
| | <i>R,R</i> | Causa ceguera |
| Paclobutrazol | <i>R,R</i> | Fungicida |
| | <i>S,S</i> | Regulador del crecimiento de plantas |

A pesar de estas evidencias, hasta la década de los ochentas, la mayoría de los fármacos sintéticos eran comercializados como racematos. Así, en 1985 la proporción de fármacos presentados como mezclas de enantiómeros frente a los que se presentaban como un único enantiómero era de 7 a 1, existen dos razones fundamentales para el cambio de tendencia observado en este campo.

- 1) Las nuevas disposiciones, que obligan a realizar estudios exhaustivos sobre cada uno de los enantiómeros de un IFA racémico, han facilitado el desarrollo de los mismos en forma de un enantiómero.

- 2) Los avances conseguidos en la síntesis de compuestos ópticamente puros especialmente en el campo de la biocatálisis.¹³

2.9 Resolución de mezclas racémicas

Las diferencias farmacocinéticas y farmacodinamias entre los enantiómeros de un IFA administrado como racemato son cada vez más considerados. Por lo anterior el proceso de separar los enantiómeros es cada vez más requerido para su estudio farmacológico y posterior comercialización, esta separación se denomina resolución. Puesto que los enantiómeros tienen propiedades físicas y químicas idénticas en un ambiente simétrico,³⁶ existen tres metodologías fundamentales para la resolución de mezclas racémicas:

Resoluciones clásicas: Consisten en el uso de una cantidad estequiométrica del agente de resolución quiral, que se une de manera covalente o no covalente con el sustrato a resolver para formar un par de diastereoisómeros. Una vez separados, el sustrato se libera del agente de resolución por una transformación química. Esta técnica es muy utilizada, si la formación de sales es sencilla, como en el caso de aminas y ácidos.

Cromatografía quiral: Implica el empleo de una fase estacionaria quiral donde se separan los enantiómeros disueltos en una fase móvil. Puede llevarse a cabo de forma analítica o preparativa, aunque a gran escala es menos empleada por el alto costo que implica.

Resolución cinética: En este caso se utiliza un catalizador o reactivo quiral que reacciona con distinta velocidad con un enantiómero que con el otro, generando así una mezcla del sustrato de partida y del producto enantioenriquecido. El componente deseado de la mezcla será posteriormente separado. En las resoluciones cinéticas catalizadas, las velocidades relativas de reacción para los enantiómeros del sustrato se expresan $k_{rel} = k^{rápido}/k^{lento}$ y depende de la magnitud $\Delta\Delta G_n^\ddagger$, que representa la diferencia de energía entre los estados de transición diastereoisómeros formados por cada agente de resolución en el paso determinante de la reacción.

Cuanto mayor sea $\Delta\Delta G_n \neq$ y mayor grado de reversibilidad de la reacción, mayor serán los excesos enantioméricos del sustrato (ee_s) y del producto (ee_p).³⁷

2.10 Métodos de síntesis de fármacos quirales

Los intermediarios quirales de los compuestos con acción terapéutica pueden prepararse de diversas maneras:

- 1.) Obtención a partir de sustratos quirales naturales,³⁸ producidos generalmente por procesos de fermentación. En este caso los productos de partida son quirales, reduciendo de esta manera pasos de síntesis. Su limitación radica en la ausencia de ciertos compuestos ópticamente activos en la naturaleza, lo que dificulta su obtención a gran escala.
- 2.) Resolución de mezclas racémicas por métodos como cristalización preferente de estereo- o diastereoisómeros, o por resolución cinética de compuestos racémicos por métodos químicos o biocatalíticos. La principal desventaja de la resolución de mezclas racémicas consiste en que el rendimiento máximo que se puede obtener de cada enantiómero es de 50%. En ciertos casos, este inconveniente se puede superar con métodos como la racemización del enantiómero no deseado en el medio de reacción (resolución cinética dinámica)³⁹ o mediante la separación del enantiómero no deseado y posterior resolución.⁴⁰
- 3.) Síntesis asimétrica: Empleando un catalizador quiral que convierte un sustrato proquiral en un producto quiral.⁴¹ En este caso se puede acceder a cualquiera de los enantiómeros de la mezcla con un rendimiento del 100% dependiendo de la naturaleza del catalizador y condiciones de reacción.

En los últimos años los métodos biocatalíticos han demostrado ser una herramienta muy eficaz en las síntesis de IFA, así como el desarrollo de una cantidad creciente de productos de alto valor agregado.⁴²

2.11 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

La historia de los AINEs se remonta al siglo XIX, en que se descubrió los efectos beneficiosos de la corteza del sauce de la cual se extraía el ácido salicílico. Se le usaba en esa época para el tratamiento de diversos problemas músculo-esqueléticos, pero tenía mala tolerancia. A fines del siglo XIX, Félix Hofmann buscando reducir los efectos indeseables del ácido salicílico, descubrió el ácido acetilsalicílico en 1899. Es hasta el año de 1968 que se descubre la actividad de los derivados propiónicos.⁴³

Los antiinflamatorios no esteroideos forman un grupo numeroso de fármacos que comparten acciones terapéuticas y efectos adversos; se dividen en dos clases: los analgésicos opioides, y el grupo de fármacos analgésicos, antiinflamatorios, y antipiréticos pertenecientes a los AINEs.

El efecto analgésico se basa en el bloqueo de la producción periférica y central de prostaglandinas; a nivel central, impiden la sensibilización de las neuronas medulares y supramedulares, permitiendo la modulación (inhibición) central del dolor.⁴⁴

Las investigaciones realizadas en el sistema nervioso central (SNC) sobre la actividad de células inflamatorias, liberación de enzimas y radicales libres derivados de oxígeno y otros mecanismos, revelan que los efectos de los AINEs pueden ser independientes de la síntesis de prostaglandinas (**figura 9**).^{44,45}

La inflamación es la respuesta normal del tejido ante una lesión. Incluye diversas fases tales como lesión inicial, una fase vascular con vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar que consecuentemente desarrolla edema y una fase celular caracterizada por migración de polimorfonucleares, neutrófilos y eosinófilos, posteriormente macrófagos y monocitos. Posteriormente una fase de cicatrización con actividad de fibroblastos y depósito de colágeno y mucopolisacáridos, causando la reparación del tejido lesionado. En un evento de

inflamación existe una gran complejidad de elementos mediadores de la misma y que se involucran en el proceso fisiopatológico del dolor.⁴³

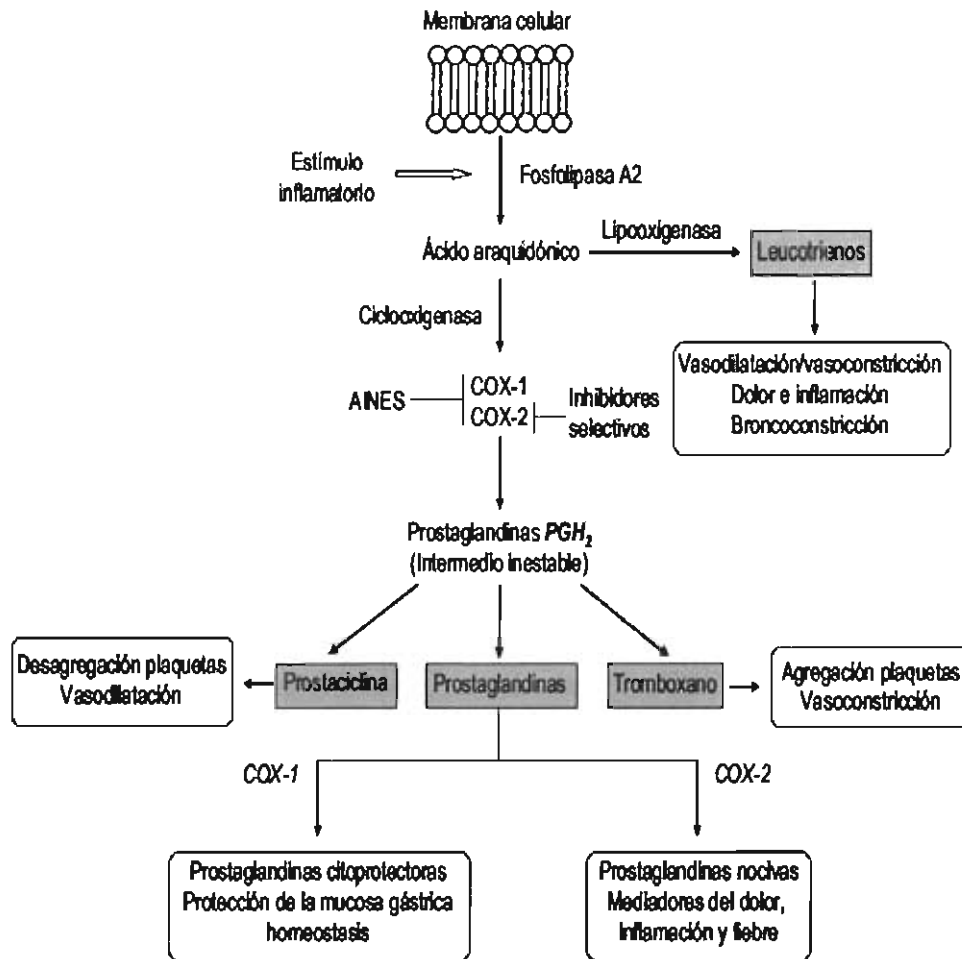


Figura 9. Mecanismos de formación de prostaglandinas tromboxanos y leucotrienos a partir del ácido araquidónico

La acción analgésica de los AINEs es preferentemente periférica al inhibir la síntesis de prostaglandinas e impidiendo la sensibilización de los nociceptores aferentes primarios.^{44,45}

2.12 Mecanismo de acción del flurbiprofen

El flurbiprofen es un derivado del ácido propiónico que posee propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas este AINE tiene un centro quiral, pero en la mayoría de las formas farmacéuticas se utiliza como mezcla racémica, es decir se utilizan los dos enantiómeros *R*(-) y *S*(+) ver **figura 10**,^{45,46} a pesar que se conoce que el enantiómero *S*(+) es la forma farmacológicamente activa utilizado principalmente para padecimientos como edema, osteoartritis, artritis reumatoide y disturbios músculo-esqueléticos.⁴⁵

Recientemente se ha encontrado que el enantiómero *R*(-) del flurbiprofen (Flurizan)⁴⁷ y derivados de él, tienen actividad terapéutica en el tratamiento del Alzheimer,^{48,49} y en detener la producción de tumores colorectales.⁵⁰ El efecto terapéutico como un agente antiinflamatorio no esteroideo, se deriva de su actividad inhibitoria de la prostaglandina sintetasa.^{43,45}

Como todos los antiinflamatorios no esteroideos de la familia de los ácidos aril-propiónicos, el flurbiprofen inhibe la acción de las enzimas COX-1 y COX-2. Los efectos antiinflamatorios del flurbiprofen son el resultado de la inhibición periférica de la síntesis de prostaglandinas subsiguiente a la inhibición de la ciclooxigenasa.

El flurbiprofen inhibe la migración leucocitaria a las áreas inflamadas, impidiendo la liberación por los leucocitos de citoquinas y otras moléculas que actúan sobre los receptores. El flurbiprofen, como otros AINEs, no altera el umbral del dolor ni modifica los niveles de prostaglandinas cerebrales, concluyéndose que sus efectos son periféricos. La antipirexis es consecuencia de la vasodilatación periférica debido a una acción central sobre el centro regulador de la temperatura del hipotálamo.⁴⁵

Farmacocinética

El flurbiprofen se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, presentándose picos de concentraciones plasmáticas de 1 a 5 horas después de la administración. Su vida media de eliminación es de unas 5-6 horas

aproximadamente. El flurbiprofen se une fuertemente a las proteínas plasmáticas, se metaboliza en el hígado, dando lugar a dos metabolitos inactivos que junto con el flurbiprofen, se excretan por vía renal como tales o como metabolitos conjugados, la excreción renal es rápida y completa.⁴⁵

2.13 Propiedades fisicoquímicas de los compuestos

2.13.1 Flurbiprofen

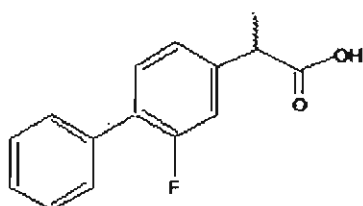


Figura 10. Flurbiprofen

Nombre (IUPAC): (R,S) ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico⁴⁶

Fórmula C₁₅H₁₃FO₂

Propiedades fisicoquímicas:⁴⁶

Polvo cristalino blanco, Pf: 110-111°C, insoluble en agua, soluble en etanol, acetona, cloroformo, éter dietílico y metanol, PM: 244.3 g/mol.

2.13.2 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo

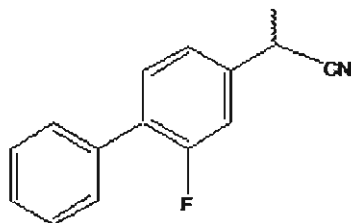


Figura 11. Nitrilo del flurbiprofen

Nombre (IUPAC): (*R,S*) 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo

Fórmula: C₁₅H₁₂FN

Propiedades fisicoquímicas experimentales:

Polvo amarillo, Pf: 80-85°C, soluble: Acetato de etilo, cloruro de metileno, cloroformo, isopropanol, PM: 225.26 g/mol.

2.13.3 2-(2-flúor-4-bifenil)-1-propanol

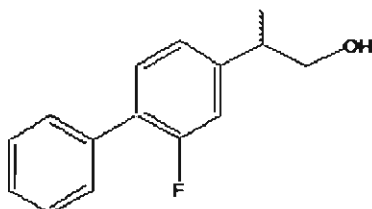


Figura 12. Alcohol del flurbiprofen

Nombre (IUPAC): (*R, S*) 2-(2-flúor-4-bifenil)-1-propanol

Fórmula: C₁₅H₁₅FO

Propiedades fisicoquímicas experimentales:

Cristales blancos, Pf: 58-60°C, soluble: acetato de etilo, hexano, cloruro de metileno, PM: 230.27g/mol.

2.13.4 2-(2-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoato de metilo

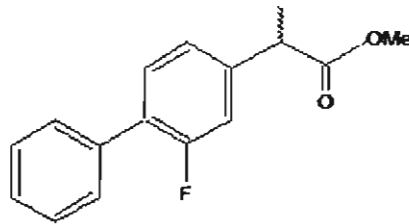


Figura 13. Éster metílico del flurbiprofen

Nombre (IUPAC): (*R, S*) 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoato de metilo

Fórmula: $C_{16}H_{15}FO_2$

Propiedades fisicoquímicas experimentales:

Polvo blanco, Pf: 65°C, Soluble: acetato de etilo, cloruro de metileno, PM: 258 g/mol.

2.13.5 Cloruro de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoilo

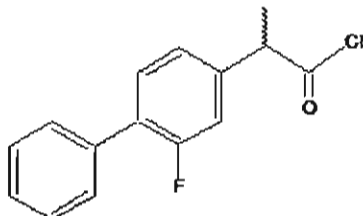


Figura 14. Cloruro del flurbiprofen

Nombre (IUPAC): Cloruro de (*R, S*) 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il) propanoilo

Fórmula: C₁₅H₁₂ClFO

Propiedades fisicoquímicas experimentales:

Poivo blanco, Pf: 35-37°C, soluble: cloroformo, acetato de etilo, cloruro de metileno, PM: 262 g/mol

2.13.6 2-(2-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida

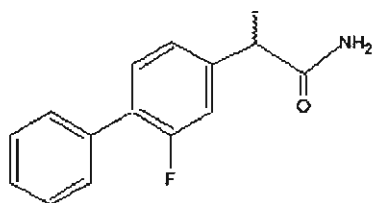


Figura 15. Amida del flurbiprofen

Nombre (IUPAC): (R,S) 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida

Fórmula : C₁₅H₁₄FNO

Propiedades Físicoquímicas:⁵¹

Polvo blanco, Pf: 125-130°C, soluble acetato de etilo, cloruro de metileno, cloroformo, PM: 243.27 g/mol.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años ha cobrado una creciente importancia la obtención y separación de los ingredientes farmacéuticos activos como compuestos enantioméricamente puros, debido al gran número de ventajas frente al empleo de mezclas racémicas. Esto ha llevado al desarrollo y mejoramiento de métodos de obtención e identificación de compuestos enantiopuros, actualmente 134 de los procesos industriales que utilizan la biotransformación como medio de producción, el 55% de estos procesos corresponde al sector farmacéutico, de esta forma la biotransformación ha resultado una herramienta útil en síntesis orgánica debido a que las reacciones no solo son regio y estereoespecíficas, sino que también se pueden obtener productos quirales enantioespecíficos, mediante el empleo de sistemas biológicos (células microbianas, vegetales o animales o sus enzimas aisladas).

Dentro de los ingredientes farmacéuticos activos que se comercializan como mezcla racémica, se encuentra el AINE *rac*-flurbiprofen que en investigaciones recientes han logrado la obtención de sus enantiómeros por medio de la bioconversión de sus ésteres (hidrólisis), mediante el uso de microorganismos como *Candida antarctica* a mostrando (*R*)-estereopreferencia y *Serratia marcescens* ES-2 una preferencia por el (*S*)-flurbiprofen.⁷

Lo anterior originó el interés por estudiar su obtención partiendo de un precursor del flurbiprofen, el nitrilo, utilizando células completas de *Nocardia corallina* B-276 para inducir de manera enzimática la obtención del AINE como uno solo de los enantiómeros, por hidrólisis enantioselectiva del nitrilo o de la amida correspondiente al intervenir enzimas como nitrilo hidratasa y amidasa que se conoce poseen este microorganismo; así como la estereoinversión del AINE, proceso que ha sido capaz de realizar con otro fármaco de la misma naturaleza.

4. HIPÓTESIS

Nocardia corallina B-276 llevará a cabo las biotransformaciones enantioselectivas del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo y del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico, utilizando diferentes relaciones de sustrato:células húmedas.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar las biotransformaciones del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo y del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico con *Nocardia corallina* B-276.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar el 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo racémico.

Desarrollar el método analítico que permita el seguimiento de la biotransformación del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo.

Estudiar la hidrólisis de la 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo con células aisladas de *Nocardia corallina* B-276 utilizando diferentes relaciones de sustrato:células húmedas.

Analizar los productos de la biotransformación del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo.

Estudiar la estereoinversión del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (flurbiprofen) con células aisladas de *Nocardia corallina* B-276 utilizando diferentes relaciones de sustrato: células húmedas.

Desarrollar el método analítico que permita el seguimiento de la estereoinversión del flurbiprofen con *Nocardia corallina* B-276.

6. METODOLOGÍA

6.1 Descripción del equipo

- 1.- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR): Agilent 1100, detector UV/Visible de arreglo de diodos.
- 2.- Cromatógrafo de Gases (CG): Hewlett Packard serie 6890.
- 3.- Espectrofotómetro de infrarrojo (IR): Pekin-Elmer 1600FT.
- 4.- Resonancia magnética nuclear (RMN): Varían DMX400 de 400MHz.
- 5.- Agitador orbital Thermo Scientific MaxQ4000.
- 6.- Liofilizador Freezone 4.5 Labconco.

6.2 Reactivos

Flurbiprofen, el ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico fue extraído del medicamento comercial (Ansaid®) presentación en comprimidos de 100mg.

*Hidruro doble de litio y aluminio, Sigma-Adrich® RA

*THF, Omini Solv® RA

*Iodo, J.T. Baker S. A RA

*Metanol, Tecsiquim® CLAR

*Sodio metálico, Técnica Química® RA

*Tetracloruro de carbono, Técnica Química® RA.

*Cloruro de tionilo, Zur Synthese® RA.

*Hidróxido de amonio, Merck® RA.

*Sulfato de sodio anhidro y sulfito de sodio anhidro, J.T. Baker S.A. RA.

*Cloroformo, Técnica Química® RA.

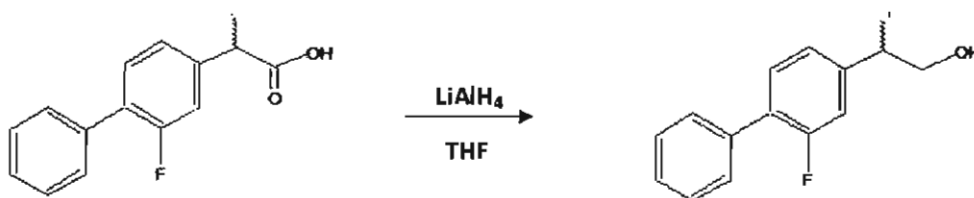
6.3 Desarrollo experimental

6.3.1 Extracción del (*R,S*)-ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (*rac*-flurbiprofen)

Se pulverizaron cuarenta comprimidos de 100 mg (Ansaid®), hasta obtener un polvo fino, se le adicionó 150 mL de cloroformo con agitación por 1 h, se filtró a vacío y se evaporó el disolvente a presión reducida (rotavapor), se caracterizó por IR y RMN de ^1H y ^{13}C .

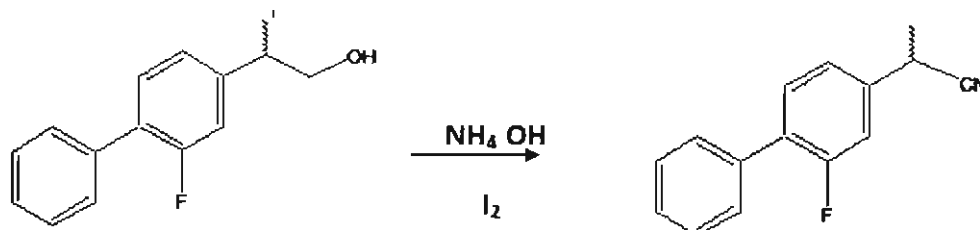
6.3.2 Síntesis química de los compuestos requeridos

6.3.2.1 Síntesis de 2-(2-flúor-4-bifenil)-1-propanol⁵²



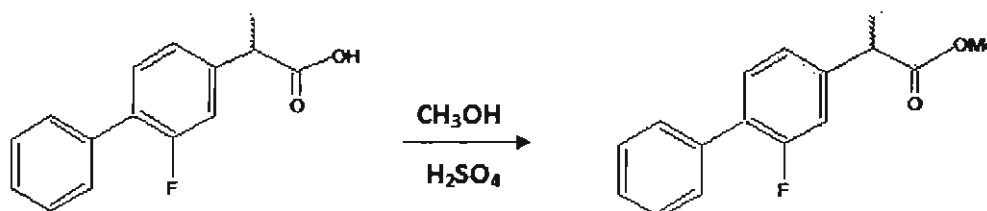
En un matraz balón de 50 mL se pesó 1g de flurbiprofen racémico (3.848 mmol), se disolvió en 20 mL de THF y se le adicionó lentamente 0.7730 g de hidruro doble de litio y aluminio (19 mmol), se colocó a temperatura de reflujo con trampa de SiO_2 con indicador para la humedad. Se monitoreó el avance de la reacción de reducción por cromatografía en capa fina (CCF). El THF se destiló, se le agregó con agitación y en un baño de hielo 13 mL agua destilada y 2.5 mL de NaOH al 15% hasta el cambio de color gris a blanco, se filtró sobre celita, se extrajo con (3 X 20 mL) de CH_2Cl_2 , se secó con Na_2SO_4 anhidro, se destiló el disolvente a presión reducida (rotavapor). Se caracterizó por IR y RMN de ^1H y ^{13}C .

6.3.2.2 Síntesis de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo⁵²



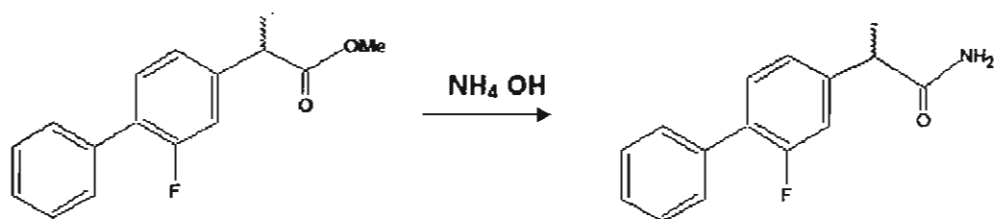
En un matraz balón de 25 mL se pesó 100 mg del 2-(2-flúor-4-bifenil)-1-propanol, se le adicionó a temperatura ambiente 3 mL de NH_4OH (0.43 mmol) y 330.65 mg de I_2 (1.3028 mmol), se puso a reflujo, se monitoreó por CCF. Se adicionó 20 mL de agua y 3 mL de solución saturada de Na_2SO_3 a 0°C , se extrajo con 20 mL de acetato de etilo, se secó con Na_2SO_4 anhidro, el disolvente se destiló a presión reducida. Caracterizándose por IR y RMN de ^1H y ^{13}C .

6.3.2.3 Síntesis de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoato de metilo⁵³



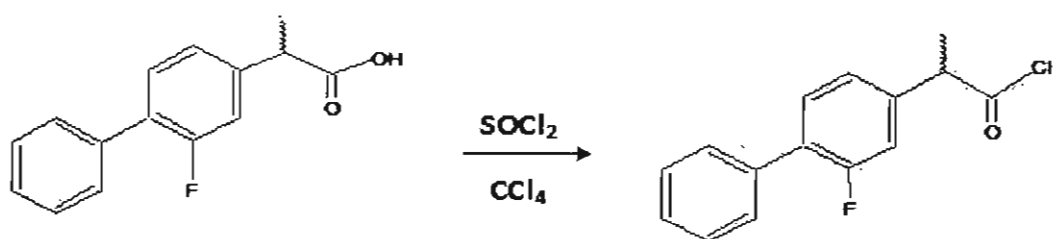
En un matraz balón de 25 mL se pesó 1.5 g de flurbiprofen racémico (6.14 mmol), se disolvió en 7 mL de metanol con agitación constante, se agregó lentamente 0.3 mL de H_2SO_4 concentrado, se puso a reflujo y se monitoreó por CCF. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se extrajo con (3 x 20 mL) de CH_2Cl_2 , se lavó con solución saturada de NaHCO_3 , y solución saturada de NaCl , se secó con Na_2SO_4 anhidro, se destiló el disolvente a presión reducida. Caracterizándose por IR y RMN de ^1H y ^{13}C .

6.3.2.4 Síntesis de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida⁵³



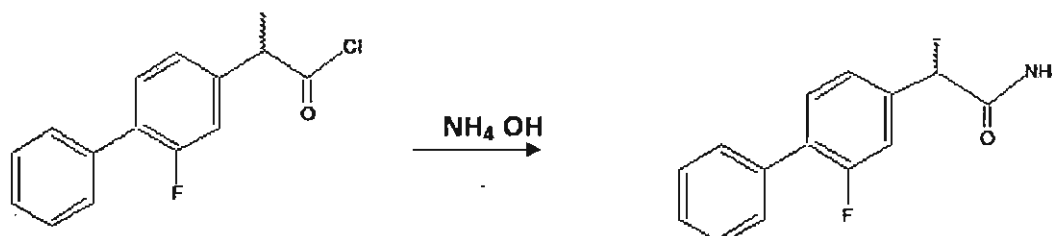
En un matraz balón de 50 mL se pesó 100 mg del 2-(2-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoato de metilo, se adicionó 5 mL de NH_4OH (0.38 mmol), se mantuvo en agitación hasta la formación de un sólido blanco. Caracterizándose por IR y RMN de ^1H y ^{13}C .

6.3.2.5 Síntesis del cloruro de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoilo⁵³



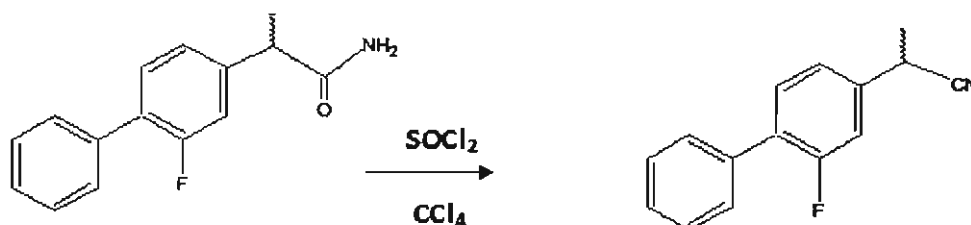
En un matraz balón de 25 mL se pesó 1 g de flurbiprofen racémico (3.848 mmol), con 3 mL de CCl_4 con agitación constante hasta total disolución del flurbiprofen, se le adicionó lentamente 0.5 mL de SOCl_2 y se puso a temperatura de reflujo, se monitoreó por CCF. Se destiló el CCl_4 y el SOCl_2 residual a presión reducida. Caracterizándose por IR y RMN de ^1H y ^{13}C .

6.3.2.6 Síntesis de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida⁵³



En un matraz balón de 25 mL se pesó 1.12 g (4.26 mmol) del cloruro de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoilo y se le adicionó 3 mL de solución hidróxido de amonio al 28%, se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta la formación de un sólido blanco, se filtró y se lavó con agua destilada fría. Caracterizándose por IR, y RMN de ^1H y ^{13}C .

6.3.2.7 Síntesis de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo⁵³



En un matraz balón de 25 mL se pesó 420 mg (1.72 mmol) del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida y se le adicionó 3 mL de CCl_4 con agitación constante hasta su total disolución. Posteriormente lentamente se adicionó 0.62 mL (8.6 mmol) de SOCl_2 y se puso a temperatura de reflujo monitoreando por CCF el avance de la reacción. Se destiló el CCl_4 y el SOCl_2 residual a presión reducida. El

producto obtenido se purificó por columna usando una mezcla eluyente de hexano: isopropanol 70:30. Caracterizándose por IR y RMN de ^1H y ^{13}C .

6.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

El desarrollo del método analítico por Cromatografía de Gases (CG) para la determinación del % de conversión de las sustancias obtenidas, se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

6.4.1 2-(2-flúor-4-bifenil)-1-propanol

Temperatura de inyector y detector: 250°C; horno con rampa de temperatura de 180-210°C (20°C/min, 6 min), flujo de 1.2 mL/min, con una columna HP-5.

6.4.2 Ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico, 2-(2'-fluor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida, 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo

Temperatura del inyector y detector: 250°C; horno con rampa de temperatura de 180-210°C (20°C/min, 6 min) 210-180°C (20°C/min, 9 min), flujo de 2.0 mL/min, con una columna HP-5.

El desarrollo del método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), para la determinación del % de exceso enantiomérico (%ee) de los sustratos y productos, se realizó con las siguientes condiciones:

6.4.3 Ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico

Fase normal:

Columna quiral OD Daicel Chemical Industries, LTD, de 0.46cm x 25cm, flujo de 0.6mL/min, fase móvil hexano-isopropanol (99:1, ATF 0.5%), λ 210, 220, 240, nm a una presión de 22 bar.

6.4.4 2-(2'-fluor-1,1'-bifenil-4-il) propanamida, 2-(2-flúor-4-bifenil) propanonitrilo

Columna quiral Lux 3u cellulose-2 Phenomenex. LC 50x2mm, flujo de 0.4mL/min, fase móvil hexano-isopropanol (80:20), λ 210, 230, 240, 254, 280 nm a una presión de 30 bar.

6.5 Procedimiento para la biotransformación del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil) propanoico

Activación de *Nocardia corallina*

Medio sólido

Las placas de agar se prepararon, con la siguiente composición: Extracto de carne 3.0 g/L; peptona 5 g/L; agar 10.0 g/L. El pH de las placas se ajustó a 6.8 con NaOH al 2%, posteriormente se esteriliza a 15 lb/pulgada de presión y 120°C durante 15 min, el medio se colocó en cajas Petri bajo condiciones estériles (campana de flujo laminar) y se colocaron en una estufa a 37°C por 24 h para prueba de esterilidad. Transcurrido el tiempo y comprobada la esterilidad se procedió a sembrar las placas con *Nocardia corallina* a 28-30°C por 72-96 horas.

Precultivo

Medio líquido

El medio de cultivo líquido tenía la siguiente composición: K_2HPO_4 1.738 g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g/L; extracto de levadura 1.0g/L; glucosa 2.0g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.207g/L.

Se ajustó el pH a 8.5 con KOH al 50% p/v, se filtró y se esterilizó durante 15 minutos. La incubación de los cultivos líquidos fue realizada en un agitador orbital a 150 rpm a 28-30°C.

Precultivo I:

20 matraces Erlenmeyer de 125 mL y 4 matraces Erlenmeyer de 500 mL, con 100 mL y 300 mL de medio de cultivo estéril respectivamente, fueron inoculados con las células contenidas en 5 placas de agar (con crecimiento o desarrollo de 96 h) e incubados a 28-30°C en un agitador orbital (150rpm) por 48 h.

Precultivo II:

El contenido de los matraces Erlenmeyer de 125 mL y 4 matraces de 500 mL fueron asépticamente trasvasados a 20 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo estéril y a 2 matraces Erlenmeyer de 1 L con 400 mL de medio de cultivo estéril; los matraces fueron incubados a 28-30°C en un agitador orbital a 150 rpm.

6.5.1 Obtención de biomasa de *Nocardia corallina*

Después de 48 horas de crecimiento del precultivo II, las células se separaron del medio por centrifugación (4500 rpm/15 min), se decantó el medio y las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7.0 centrifugado en cada ocasión en las mismas condiciones.

Se pesó las células húmedas para cuantificar la biomasa obtenida y definir la relación sustrato: células en peso húmedo. Las células se activaron con solución amortiguadora de fosfatos durante 30 minutos, a 28-30°C en un agitador orbital a 150 rpm.⁵⁴

6.6 Biotransformación del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico

La biotransformación del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico se realizó en 8 lotes a diferentes relaciones de sustrato:células húmedas (1:50, 1:500 y 1:1000) de *Nocardia corallina* con diferentes periodos de biotransformación.

Se disolvió el *rac*-flurbiprofen en 0.3 mL de *N,N*-dimetilformamida (0.6% v/v) y se adicionó a la relación de células seleccionadas, suspendidas en 50 mL de

solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a pH 7.0. La mezcla se dejó agitando en un agitador rotatorio por el tiempo seleccionado a 28-30°C.

6.7 Procedimiento para la biotransformación de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo y 2-(2'-fluor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida.

6.7.1 Activación de *Nocardia corallina*, incorporando acetonitrilo para inducir la degradación de nitrilos

Medio sólido.

Las placas de agar se prepararon, con la siguiente composición: Extracto de carne 3.0 g/L; peptona 5 g/L; agar 10 g/L. El pH de las placas se ajustó a 6.8 con NaOH al 2%, posteriormente se esterilizó a 15 lb/pulgadas de presión y 120°C durante 15 min, se enfrió a temperatura ambiente y se le adicionó 5 mL CH₃CN. El medio se colocó en cajas Petri bajo condiciones estériles (campana de flujo laminar) y se dejó en una estufa a 37°C por 24h para prueba de esterilidad. Transcurrido el tiempo y comprobada la esterilidad, se procedió a sembrar las placas con *Nocardia corallina* a 28-30°C por 96 horas.

Precultivo

Medio líquido

La incubación de los cultivos líquidos fue realizada en un agitador orbital a 150 rpm a 28-30°C. El medio de cultivo líquido tenía la siguiente composición:

K₂HPO₄ 1.738 g/L; FeSO₄ · 7H₂O 0.05 g/L; extracto de levadura 1.0g/L; glucosa 2.0 g/L; MgSO₄ · 7H₂O 2.207 g/L .

Se ajustó el pH a 8.5 con KOH al 50% p/v, se filtró y esterilizó durante 15 minutos. Se enfrió y se le adicionó 0.75 mL/L de CH₃CN.

Precultivo I:

20 matraces Erlenmeyer de 125 mL y 4 matraces Erlenmeyer de 500 mL, con 100 mL y 300 mL de medio de cultivo estéril respectivamente, fueron inoculados con las células contenidas en 5 placas de agar (con crecimiento o desarrollo de 96 h), e incubados a 28-30°C en un agitador orbital (150 rpm) por 48 h.

Precultivo II:

El contenido de los matraces Erlenmeyer de 125 mL y 4 matraces de 500 mL fueron asépticamente trasvasados a 20 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo estéril y a 2 matraces Erlenmeyer de 1L con 400 mL de medio de cultivo estéril; los matraces fueron incubados a 28- 30°C en un agitador orbital (150 rpm) por 48 h.

El aislamiento de la biomasa de *Nocardia corallina*, se efectuó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.5.1.

6.8 Biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida

Para las biotransformaciones de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida se realizaron 8 lotes a diferentes relaciones de sustrato:células húmedas 1:100 y 1:400) de *Nocardia corallina*, a diferentes horas de biotransformación. Para los lotes con una relación 1:100 y 1:400, se disolvió el sustrato con 0.3 mL de *N,N*-dimetilformamida (0.6% v/v), se le adicionó a las células suspendidas en 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7.0 y se dejó agitando a la temperatura de 28-30°C.

Para los lotes con una relación 1:500 se realizaron por duplicado, el sustrato fue disuelto en 0.6 mL *N,N*-dimetilformamida (1.2% v/v) y se le adicionó a las células suspendidas en 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7.0.

6.9 Biotransformación 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo

Las biotransformaciones de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo, ocho lotes, se realizaron a diferentes relaciones de sustrato/células húmedas (1:100 y 1:500) de *Nocardia corallina*.

Los primeros lotes, relación 1:100, el sustrato fue disuelto en 0.3 mL de *N,N*-dimetilformamida (0.6% v/v), se le adicionó a las células suspendidas en 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a pH 7.0 durante el tiempo seleccionado.

Los lotes con una relación 1:500 se realizaron por duplicado, las células fueron suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a pH 7.0, el sustrato se disolvió en 0.6 mL de *N,N*-dimetilformamida (1.2% v/v).

Para la relación 1:20 sustrato/células secas, la preparación del medio sólido y líquido se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito anteriormente, la biomasa obtenida se liofilizo durante 5 h, se le adicionó 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a pH 7.02 y posteriormente se le agregó el sustrato disuelto en 0.3 mL *N,N*-dimetilformamida (0.6% v/v).

6.9.1 Procedimiento general para el aislamiento y preparación de las muestras a analizar por CG y CLAR

Las células se separaron por centrifugación a 4500 rpm/15min, y el sobrenadante se extrajo con cloroformo; la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el disolvente se destiló a presión reducida.

Las muestras se disolvieron en 1 mL de isopropanol, CLAR, y se analizaron por CLAR para determinar la relación enantiomérica. Por CG se cuantificó el % de conversión del nitrilo y de la amida del flurbiprofen.

Por cada lote realizado se llevó a cabo la preparación de blanco de células en las mismas condiciones de biotransformación para su análisis por CG y CLAR.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El *rac*-flurbiprofen fue seleccionado como materia prima común en las rutas químicas de síntesis para obtener la amida y el nitrilo correspondiente, y éste ácido racémico se utilizó en la biotransformación con *Nocardia corallina* B-276. Se obtuvo por extracción con CHCl_3 del medicamento comercial Ansaid[®], dada su disponibilidad y facilidad de aislarlo de manera cuantitativa. El *rac*-flurbiprofen aislado se caracterizó por espectroscopia y se desarrollaron los métodos cromatográficos necesarios, para posteriormente estudiar la reacción de estereoinversión vía una biotransformación.

7.1 Caracterización del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (*rac*-flurbiprofen)

7.1.1 Caracterización por IR del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (*rac*-flurbiprofen)

En la **figura 16** se presenta el espectro correspondiente al *rac*-flurbiprofen, se pueden observar las señales de absorción por el estiramiento del enlace O-H; y una banda ancha de menor absorción en la región 2925.23 a 3031.77 cm^{-1} generada por los enlaces C-H del bifenilo; el grupo carbonilo del ácido se observa como una banda intensa en la región de 1706.57 cm^{-1} y en la región de 1025.37 cm^{-1} la banda correspondiente del C-F en un carbono sp^2 .

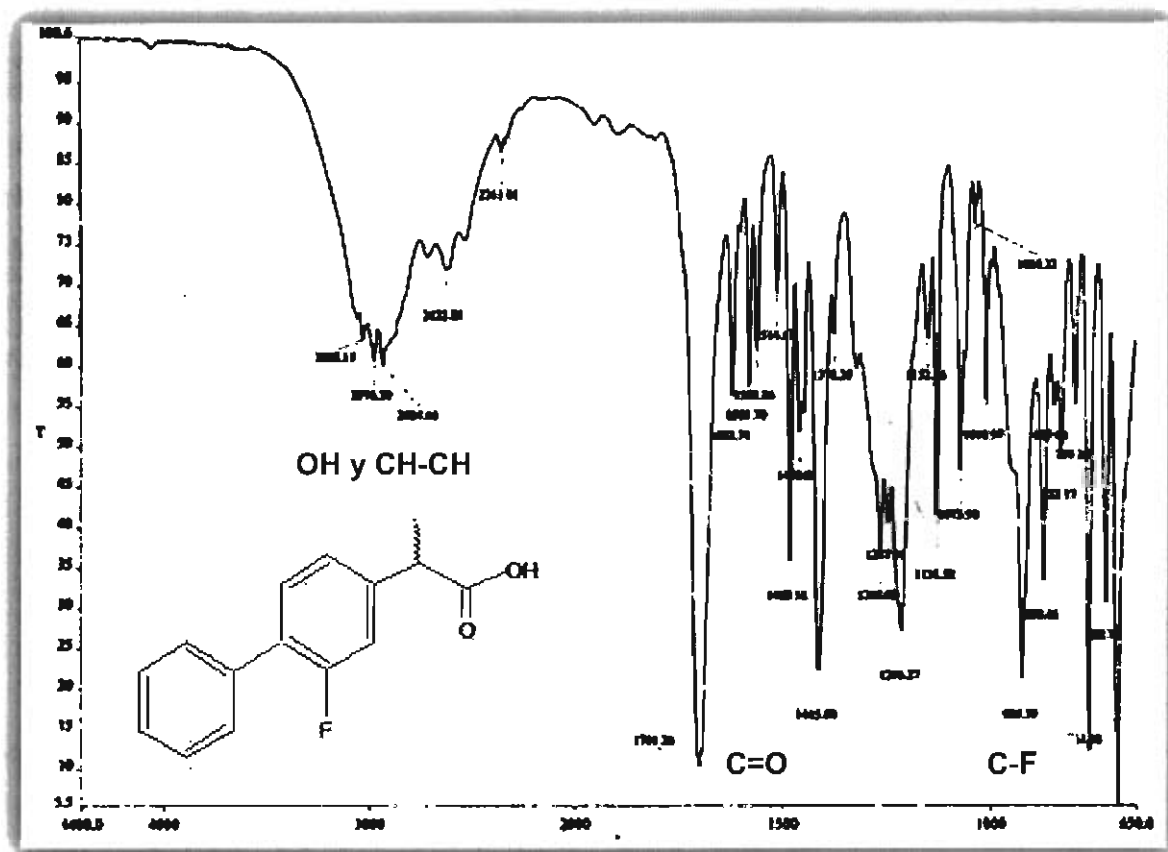


Figura 16. Infrarrojo del *rac*-flurbiprofen.

7.1.2 Caracterización por RMN del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (flurbiprofen)

Se corroboró la estructura por medio de sus espectros de RMN tanto de ^1H como de ^{13}C , en la **tabla 5** se presentan los valores obtenidos con el programa ACD-Labs (CNMR HNMR) Predictor versión 5.11, así como los valores experimentales asignados para ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico.

RMN ^1H del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico

El hidrógeno, H-12, aparece como cuarteto en 3.776 ($J=7.2$ Hz) y los hidrógenos del metilo (H-13) como doblete en 1.540 ($J=7.2$ Hz); los hidrógenos aromáticos se presentan en la región de 7.17 a 7.522 ppm. El OH (H-14) del ácido se observa en 10.54 ppm, ver **figura 1**

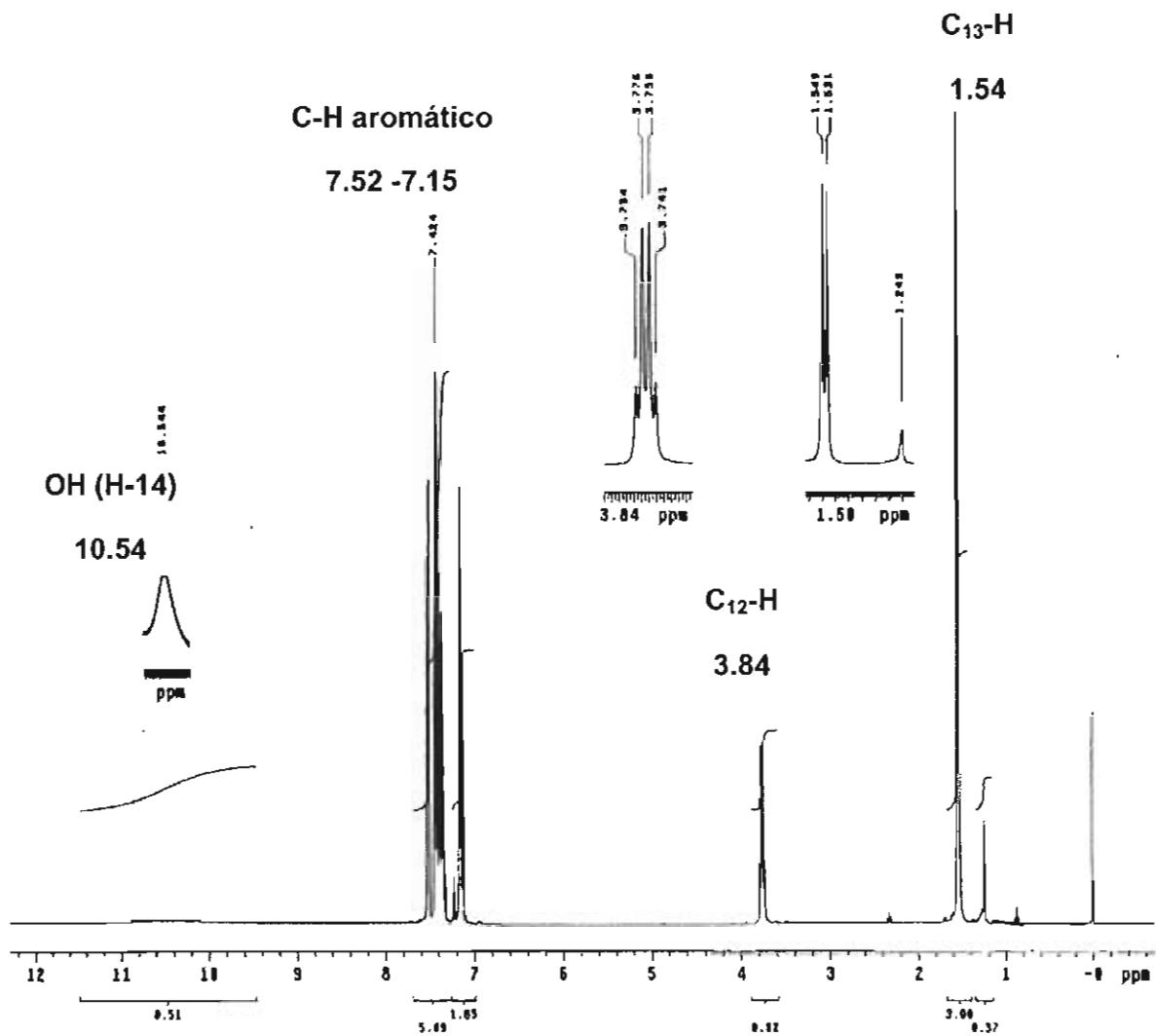
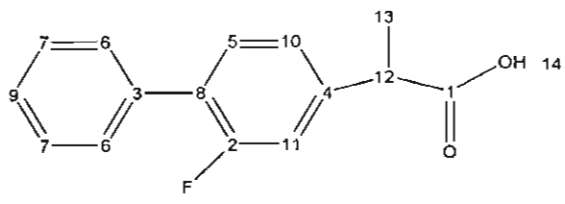


Figura 17. Espectro de RMN ^1H del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico.

Con respecto al análisis de ^{13}C se observó como señales características, al carbono correspondiente al carbonilo en 179.97 ppm; en 44.77 el carbono del CH alifático; para los carbonos correspondientes al anillo aromático se observa la influencia del núcleo del átomo de flúor, doblando la señales claramente para los carbonos 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 y 11, ver figura 18, lo que permitió la asignación de la estructura esperada.

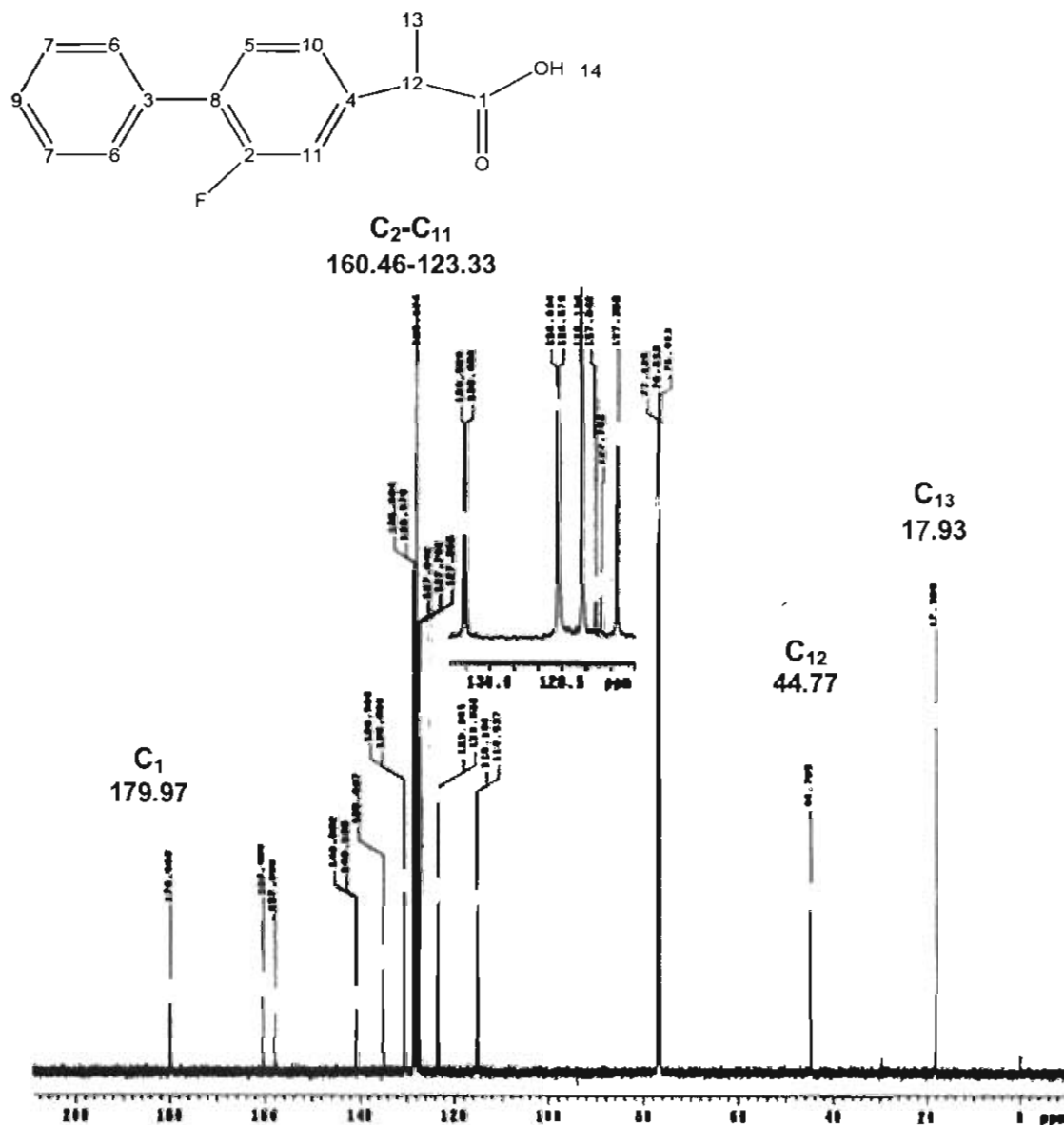


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico.

Tabla 5. Desplazamiento químico (ppm) para ^{13}C y ^1H del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico

| No. Carbono | ^{13}C -ACD-Labs | ^{13}C | Hidrógeno en C # | ^1H -ACD-Labs | ^1H |
|-------------|---------------------------|-----------------|------------------|------------------------|--------------|
| 1 | 180.89 | 179.97 | 1 | ---- | ---- |
| 2 | 158.66 | 160.46 | 2 | ---- | ---- |
| 2 | 158.66 | 157.99 | 3 | ---- | ---- |
| 3 | 136.30 | 140.58 | 4 | ---- | ---- |
| 3 | 136.30 | 140.50 | 5 | 7.4 | 7.39 |
| 4 | 140.59 | 135.01 | 6 | 7.53 | 7.52 |
| 5 | 129.86 | 130.54 | 7 | 7.4 | 7.42 |
| 5 | 129.86 | 130.50 | 8 | ---- | ---- |
| 6 | 128.4 | 128.60 | 9 | 7.3 | 7.35 |
| 6 | 128.4 | 128.58 | 10 | 7.2 | 7.17 |
| 7 | 127.30 | 128.10 | 11 | 7.25 | 7.15 |
| 7 | 128.30 | 128.10 | 12 | 3.77 | 3.78 |
| 8 | 128.23 | 127.84 | 13 | 1.53 | 1.54 |
| 8 | 128.23 | 127.70 | | | |
| 9 | 127.5 | 127.36 | OH # 14 | 10.62 | 10.54 |
| 10 | 122.81 | 123.37 | | | |
| 10 | 122.81 | 123.33 | | | |
| 11 | 114.76 | 115.17 | | | |
| 11 | 114.76 | 114.94 | | | |
| 12 | 42.83 | 44.77 | | | |
| 13 | 18.13 | 17.93 | | | |

7.1.3 Análisis por CG del ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico

Se desarrolló el método analítico por CG para determinar el % de conversión al ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico durante los procesos de biotransformación del nitrilo y la amida. Ya que muy probablemente se obtendría en estos casos como mezcla. Con estos compuestos se preparó una mezcla con los tres sustratos para encontrar las mejores condiciones analíticas de separación, además de realizar los cromatogramas para cada uno de ellos por separado. La separación fue exitosa presentando un tiempo de retención para el ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico (flurbiprofen) de 3.327 min y para la mezcla (nitrilo, flurbiprofen, amida) los tiempos de retención fueron 2.250, 3.065, 4.799 min respectivamente, ver figuras 19 y 20.

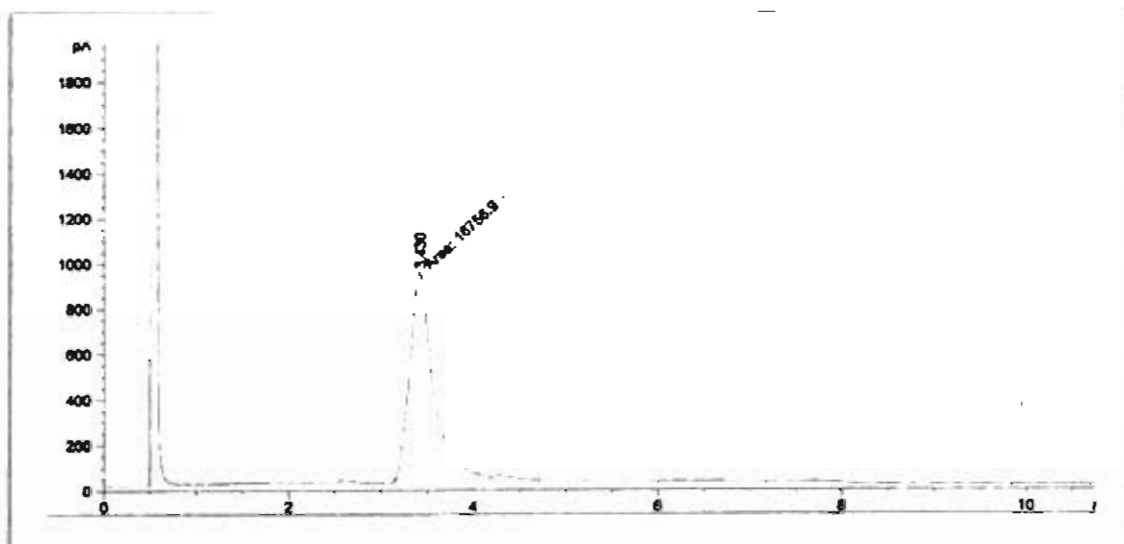


Figura 19. Cromatograma, CG, para el ácido 2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico.

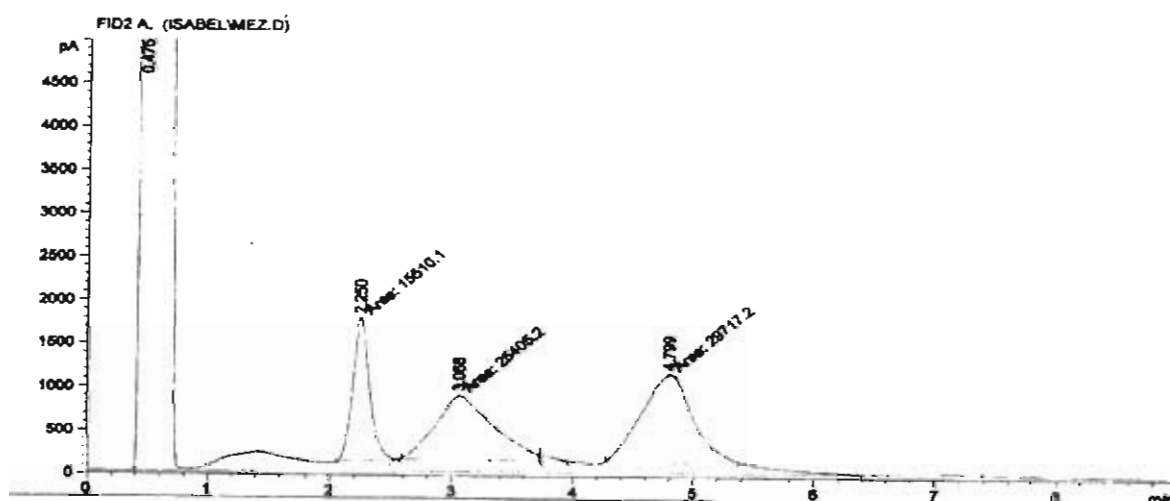


Figura 20. Cromatograma, CG, para la mezcla de nitrilo, flurbiprofen y amida.

7.1.4 Análisis por CLAR del ácido *rac*-2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico

La separación de los enantiómeros del ácido *rac*-2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico se obtuvo con tiempos de retención, *tr*, de: (*R*) 23.82 y (*S*) 25.53 min, con una mayor resolución de los picos a una longitud de onda de 240 nm, figura 21.

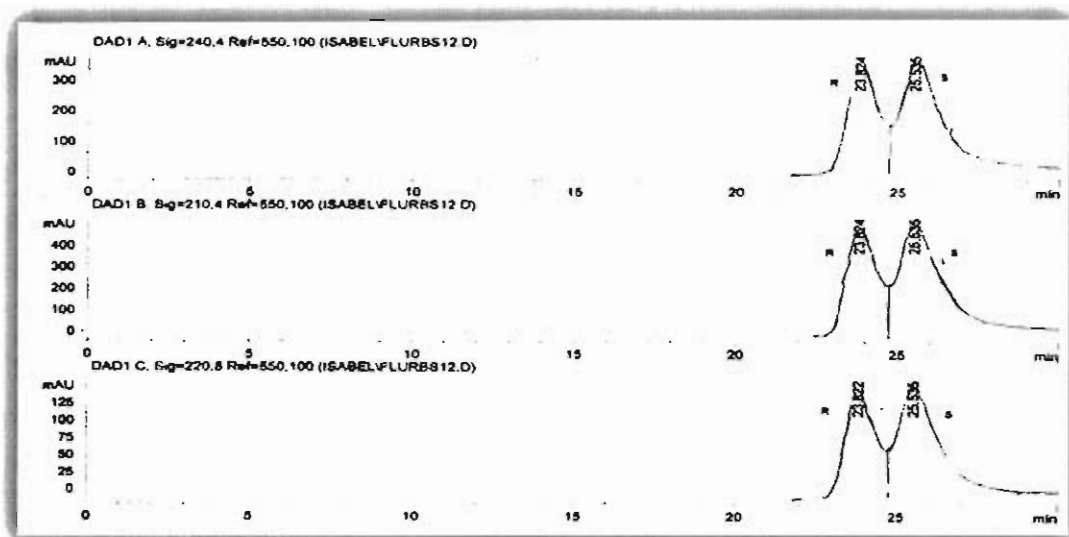


Figura 21. Cromatograma, CLAR, del ácido *rac*-2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico.

7.2 Resultados obtenidos en la síntesis química de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo

Para la obtención del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo se estudiaron tres rutas sintéticas, las cuales se describen en la **figura 22**, se utilizaron los procedimientos descritos anteriormente en el apartado de metodología; los rendimientos de los compuestos obtenidos se presentan en la **tabla 6**.

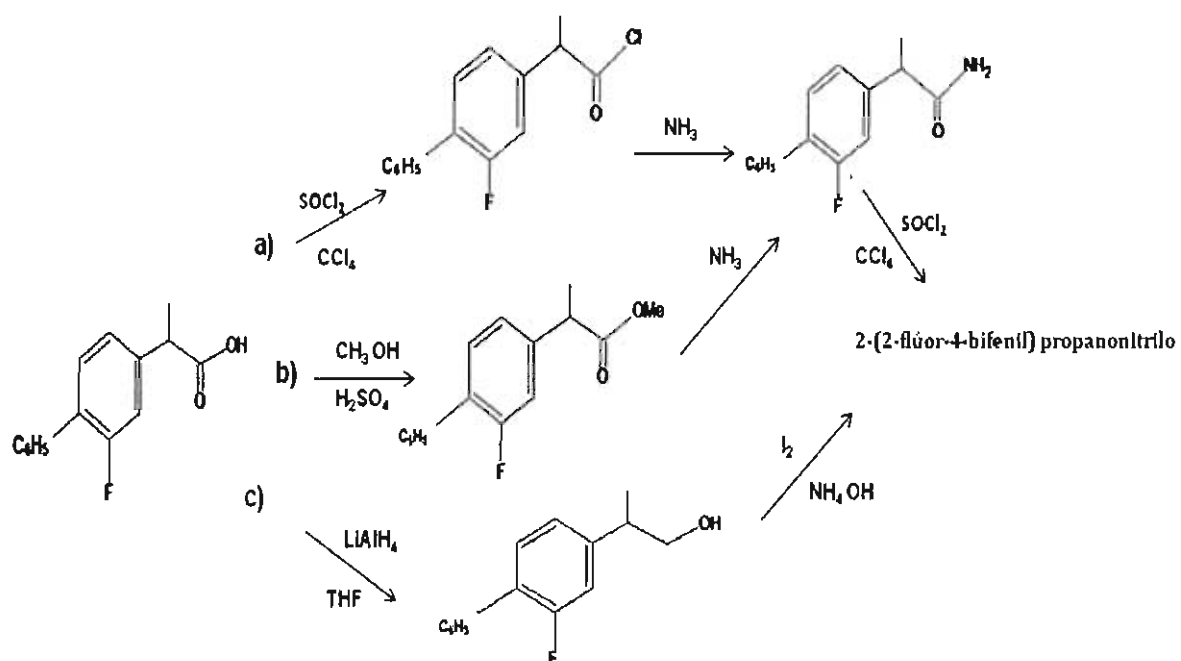


Figura 22. Rutas estudiadas en la preparación de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo.

Tabla 6. Rendimiento de los compuestos sintetizados, en las distintas rutas estudiadas, para la preparación de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo.

| COMPUESTOS | RENDIMIENTOS |
|---|--------------|
| 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol | 70% |
| 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoato de metilo. | 80% |
| cloruro de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoilo | 82% |
| 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida | 95% |
| 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo | >99% |

Siendo la ruta a), de tres pasos, la más adecuada. Se puede calcular el rendimiento global (no optimizado) de la misma, empleando los valores presentados en la **tabla 6**, en la obtención de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo:

$$\text{Rendimiento global: } 0.82 \times 0.95 \times 1.00 \times 100 = 77.9\%$$

La ruta b) dio un rendimiento mediano en el paso de esterificación, 80% (no optimizado) pero la posterior transformación a la amida empleando sol. acuosa de NH₄OH, presentó problemas de solubilidad y a pesar de un periodo largo de reacción a temperatura ambiente, se recuperó la materia prima observándose muy poca conversión a la amida. Si bien se pudo optar por efectuar la reacción de amidación a presiones superiores a la atmosférica, utilizando recipientes metálicos adecuados con NH₃ en disolventes orgánicos, se optó por abandonar la secuencia b).

La ruta c) se consideró novedosa y muy interesante de explorar, dado que la conversión de manera directa de alcoholes a nitrilos, sin aislar un aldehído, es un proceso poco frecuente y con base en los resultados informados por Naoshi y Hideo en 2005,⁵⁴ los cuales empleando iodo molecular en amoníaco acuoso obtuvieron nitrilos con buen rendimiento a partir del alcohol correspondiente, lo que nos motivó a preparar el alcohol necesario, el 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol por reducción del *rac*-flurbiprofen. Así el tratamiento con LiAlH₄ en disolventes apróticos (tetrahidrofurano) dio un 70% de rendimiento del alcohol (ver **tabla 6**). Sin embargo los intentos de conversión de este alcohol al nitrilo, en las condiciones mencionadas,⁵⁴ sólo generó mezclas complejas. Por lo anterior la ruta a) mencionada fue la ruta definitiva que se empleó para preparar tanto la amida como el nitrilo, ambos compuestos necesarios en las biotransformaciones que se estudiaron con *Nocardia corallina*.

Una vez aislados los productos de cada reacción química se procedió, en su momento, al análisis espectroscópico de cada uno de ellos en las rutas estudiadas para obtener el 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo. Se describen a continuación los resultados del análisis espectroscópico y de cromatografía para cada uno.

7.3 Caracterización del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol

7.3.1 Caracterización por espectroscopia de IR del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol

En la **figura 23** se muestra espectro de IR del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol, al compararlo con el espectro de IR del ácido *rac*-flurbiprofen presentado en la **figura 16**, se observa la desaparición del carbonilo como resultado de la reducción del ácido al alcohol y señales de alargamiento del O-H en la región de 3363.38 cm⁻¹ y las bandas correspondientes C-O en la región de 1024.93 cm⁻¹ y en la misma región la banda del C-F en un carbono sp².

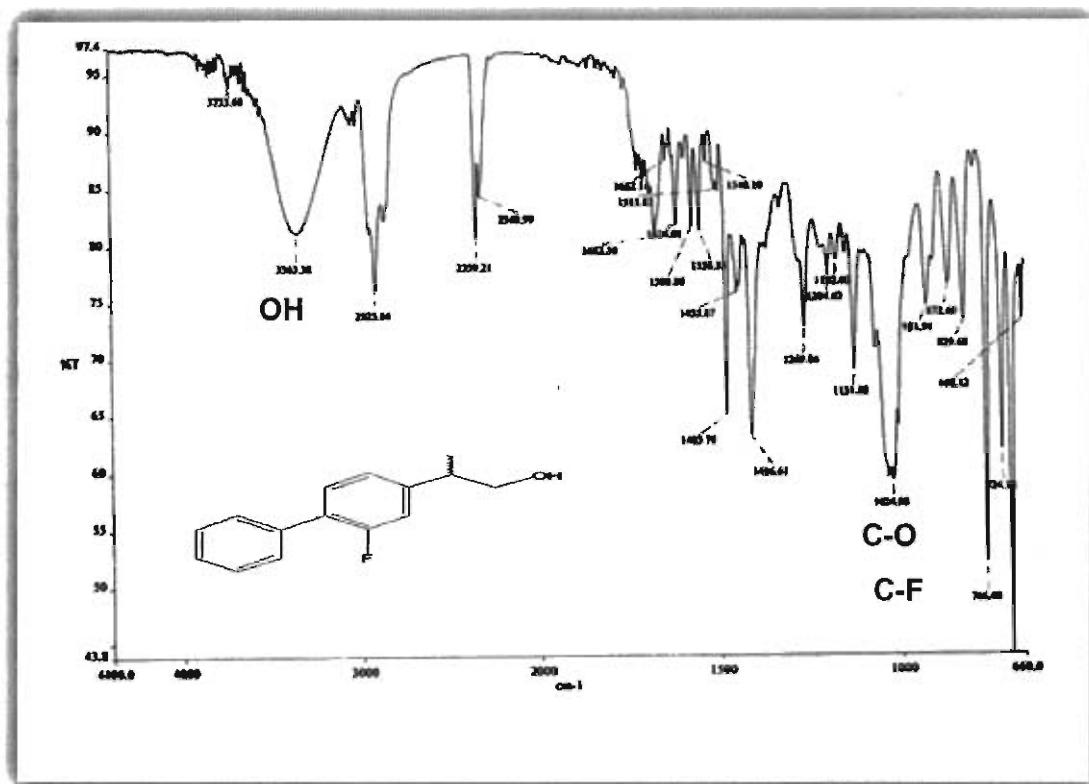


Figura 23. Infrarrojo del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol.

7.3.2 Análisis por CG de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol

Con respecto al análisis por CG, **figura 24**, se muestra el cromatograma dónde aparece el pico correspondiente al 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol con un tiempo de retención de 3.754 min.

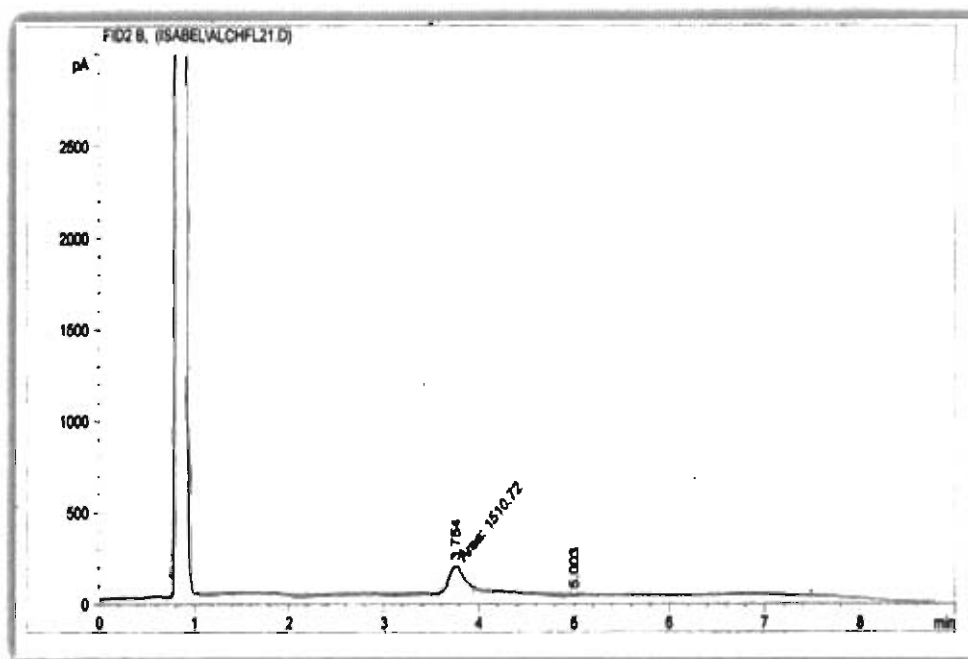


Figura 24. Cromatograma, CG, del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol.

7.3.3 Análisis por CLAR del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol

En **figura 25** se observa la separación de los enantiómeros del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol con una buena resolución a diferentes longitudes de onda 210, 220 y 240 nm con tiempos de retención (t_r) de 23.03 y 26.97 min.

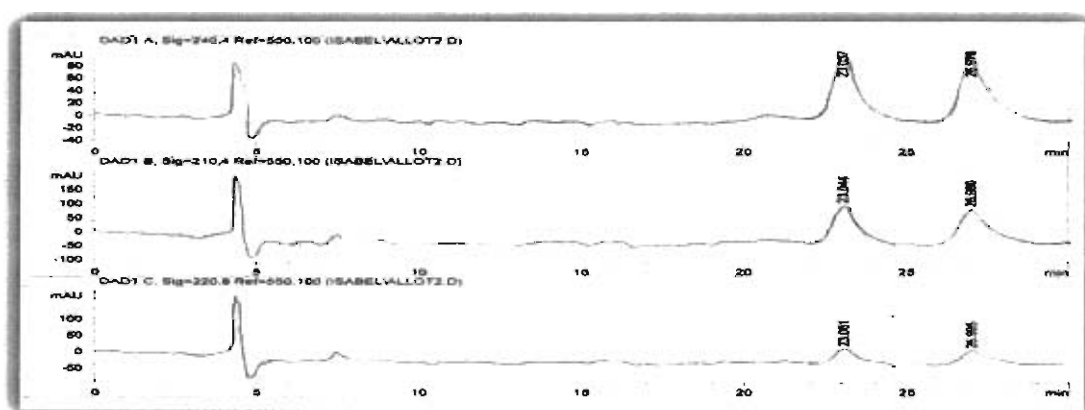


Figura 25. Cromatograma, CLAR, del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)-1-propanol.

7.4 Caracterización por espectroscopia de IR del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoato de metilo, y del cloruro de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoilo

Con respecto a los espectros obtenidos para el éster metílico y para el cloruro del flurbiprofen, se observa para el primer compuesto una banda en la región de 1732.95 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster metílico y bandas pertenecientes a C-O-C en la región 1168.45 cm^{-1} y para el carbonilo del cloruro del ácido del flurbiprofen la señal aparece en 1775.53 cm^{-1} (figuras 26 y 27 respectivamente).

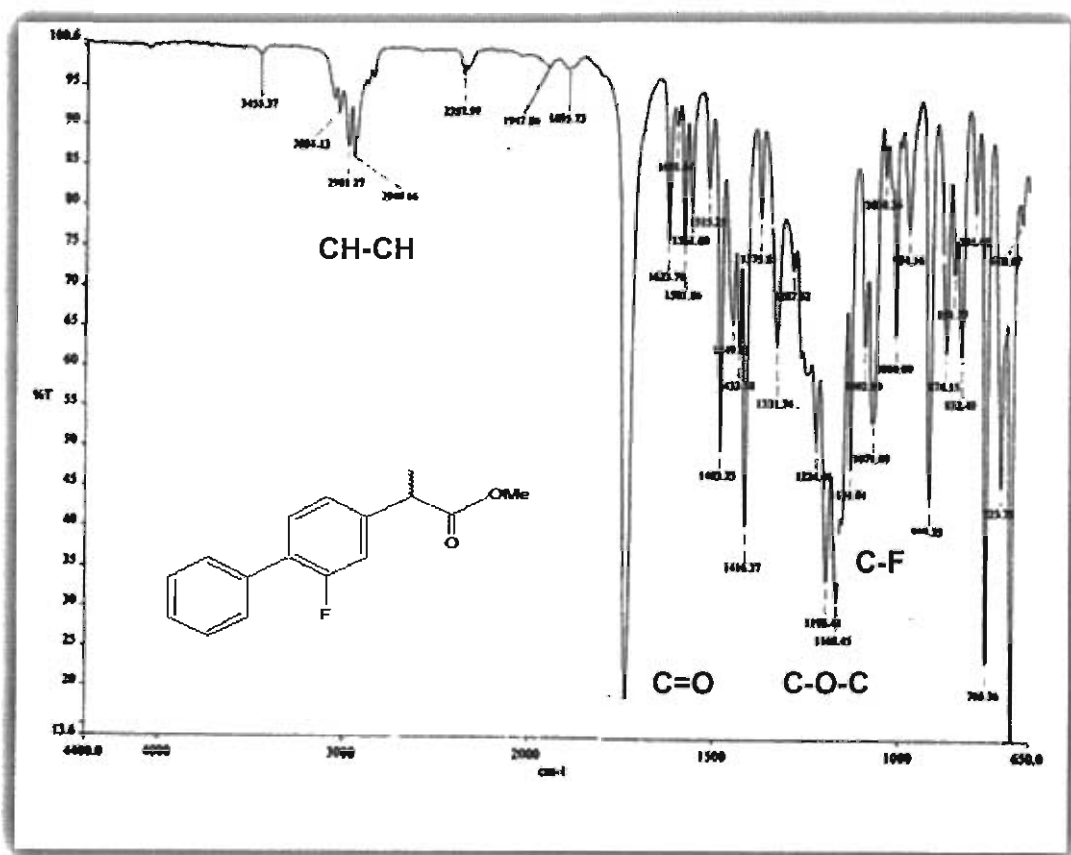


Figura 26. Infrarrojo del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoato de metilo.

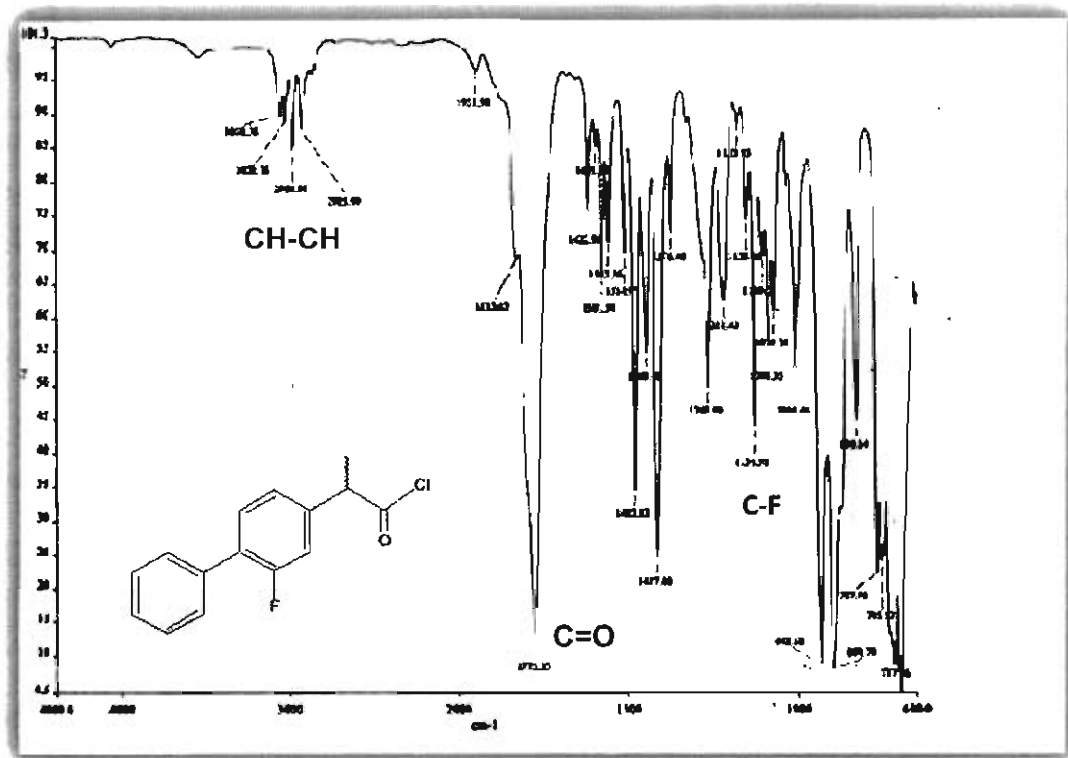


Figura 27. Infrarrojo del cloruro de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoilo.

7.5 Caracterización de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida

7.5.1 Caracterización por IR de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida.

Las dos bandas características de una amida primaria, como es el caso de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida, se observan en la **figura 28**, a 3352.06 y 3165.82 cm^{-1} (N-H) y una banda para el enlace C=O en 1659.75-1629.57 cm^{-1} .

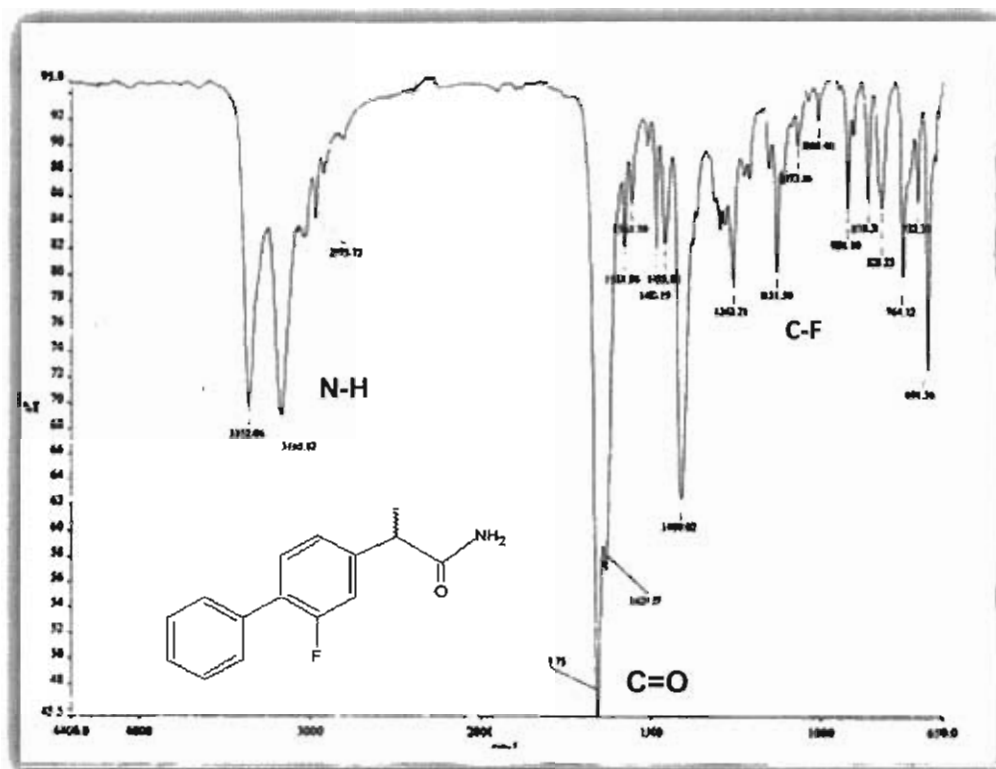


Figura. 28. Infrarrojo de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida.

7.5.2 Caracterización por RMN de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida

RMN ^1H de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida

Los hidrógenos correspondientes a la amida obtenida, NH_2 , se observan en 5.42 y 5.79 ppm. Los hidrógenos del metilo en 1.53 ppm ($J= 7.2$ Hz) y en 3.47 ppm el hidrógeno del centro quiral ($J= 7.2$ Hz); en la región 7.13 a 7.53 ppm los hidrógenos del bifenilo, ver **figura 29**.

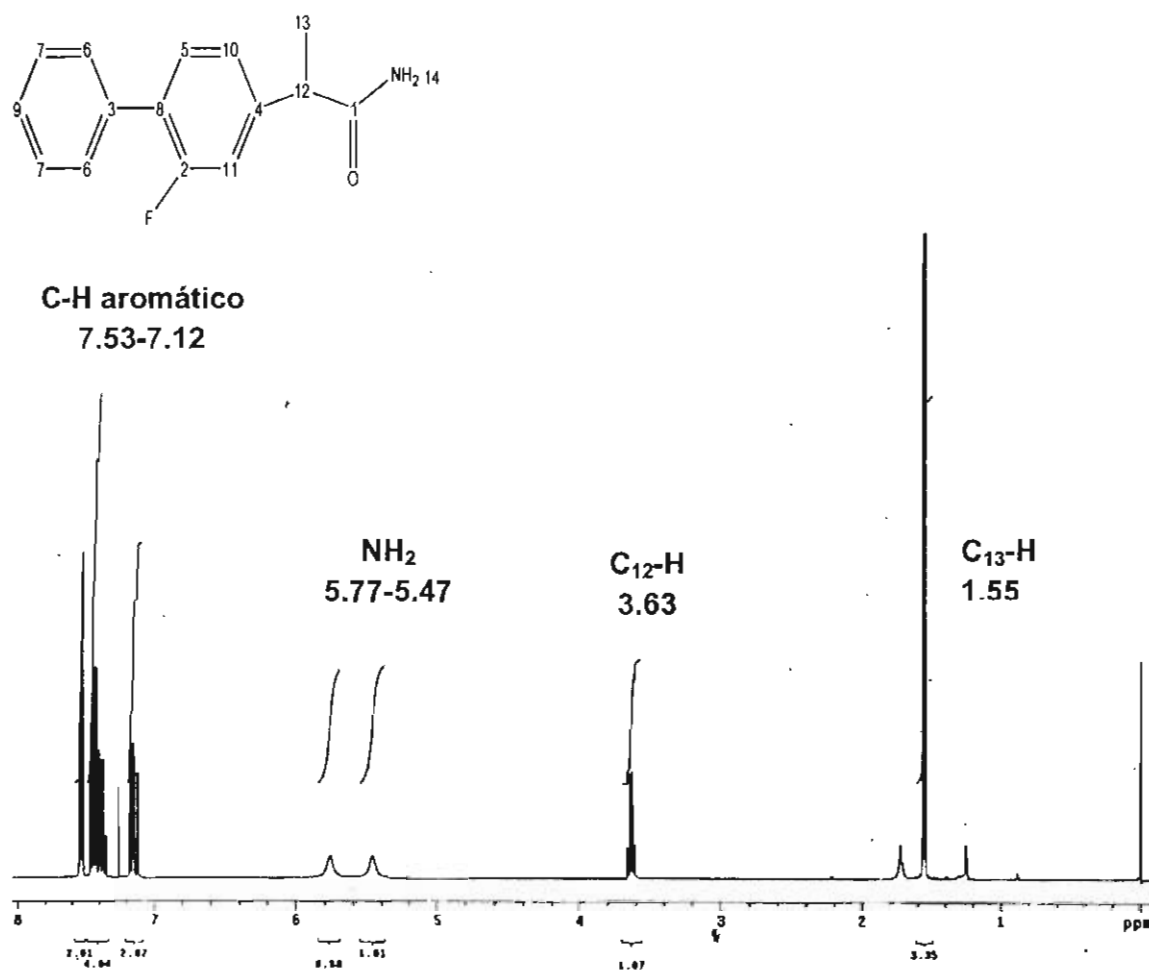


Figura 29. Espectro de RMN ^1H del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida.

RMN ^{13}C de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida

Sin duda las señales más representativas en el espectro de RMN ^{13}C son: el carbono correspondiente al carbonilo de la amida en 175.89 ppm; el carbono sp^3 del metilo en 18.32 ppm; el carbono del centro quiral en 46.05 ppm, además de los carbonos correspondientes al anillo aromático, ver **figura 30**. Las asignaciones de cada uno de los carbonos e hidrógenos se presentan en la **tabla 7**.

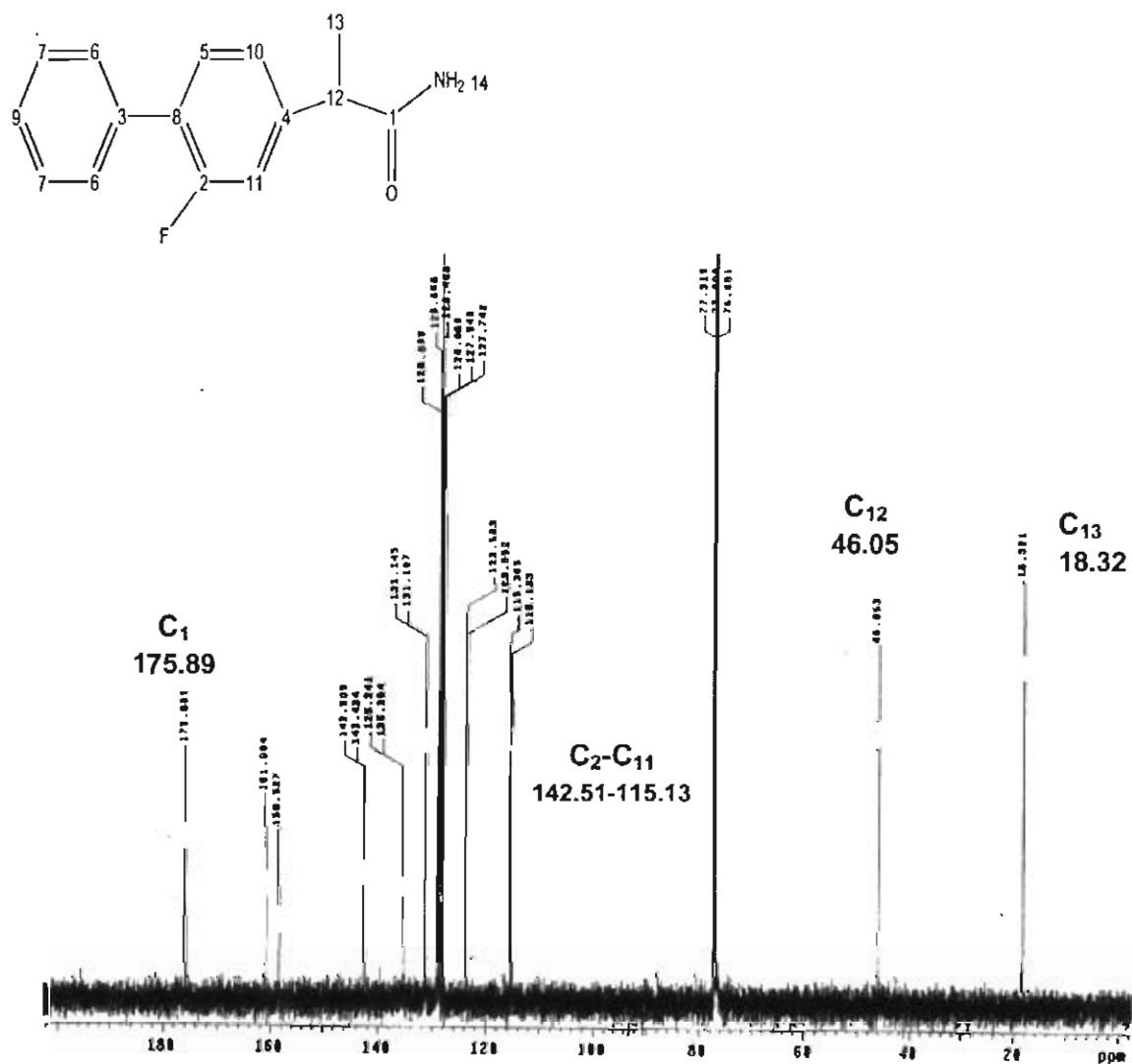


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida.

Tabla 7. Desplazamiento químico (ppm) para ^{13}C y ^1H de la 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida

| No. Carbono | ^{13}C -ACD-Labs | ^{13}C | Hidrógeno en C # | ^1H -ACD-Labs | ^1H |
|-------------|---------------------------|-----------------|------------------|------------------------|--------------|
| 1 | 177.51 | 175.89 | 1 | — | — |
| 2 | 159.46 | 161.00 | 2 | — | — |
| 2 | 159.46 | 158.53 | 3 | — | — |
| 3 | 147.40 | 142.51 | 4 | — | — |
| 3 | 147.40 | 142.43 | 5 | 7.42 | 7.4 |
| 4 | 135.67 | 135.25 | 6 | 7.53 | 7.53 |
| 5 | 130.66 | 131.15 | 7 | 7.42 | 7.44 |
| 5 | 130.66 | 131.11 | 8 | — | — |
| 6 | 128.9 | 128.90 | 9 | 7.35 | 7.35 |
| 6 | 128.99 | 128.90 | 10 | 7.13 | 7.16 |
| 7 | 128.30 | 128.86 | 11 | 7.30 | 7.12 |
| 7 | 128.30 | 128.47 | 12 | 3.59 | 3.63 |
| 8 | 128.3 | 128.08 | 13 | 1.50 | 1.55 |
| 8 | 128.83 | 127.95 | NH 14a | 5.76 | 5.77 |
| 9 | 127.50 | 127.74 | NH 14b | 5.76 | 5.47 |
| 10 | 125.00 | 123.58 | | | |
| 10 | 125.00 | 123.55 | | | |
| 11 | 116.64 | 115.37 | | | |
| 11 | 116.64 | 115.13 | | | |
| 12 | 44.01 | 46.05 | | | |
| 13 | 18.33 | 18.32 | | | |

7.5.3 Análisis por CG 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida

En la **figura 31**, se presenta el cromatograma, por CG, del 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida, obteniéndose un tiempo de retención de 4.8 min.

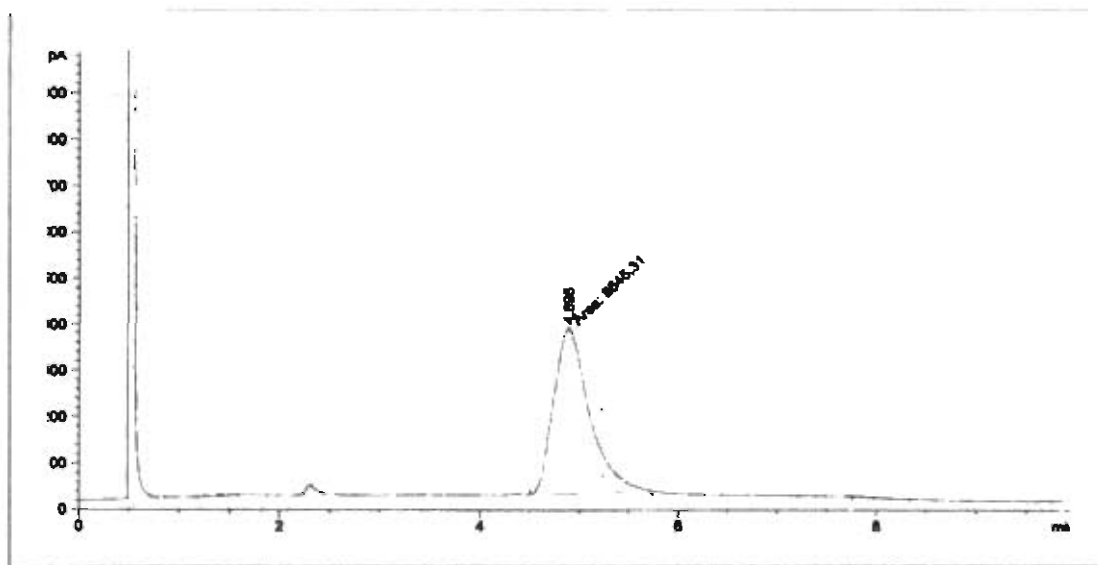


Figura 31. Cromatograma, CG, de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida.

7.5.4 Análisis por CLAR de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida.

En la **figura 32** se presenta el cromatograma, por CLAR, con una buena separación de los enantiómeros en las longitudes de onda de 210, 230 y 254 nm, sin embargo hubo una mejor resolución a una longitud de onda de 280 nm, con picos simétricos con tiempos de retención de 25.61 y 26.87 min.

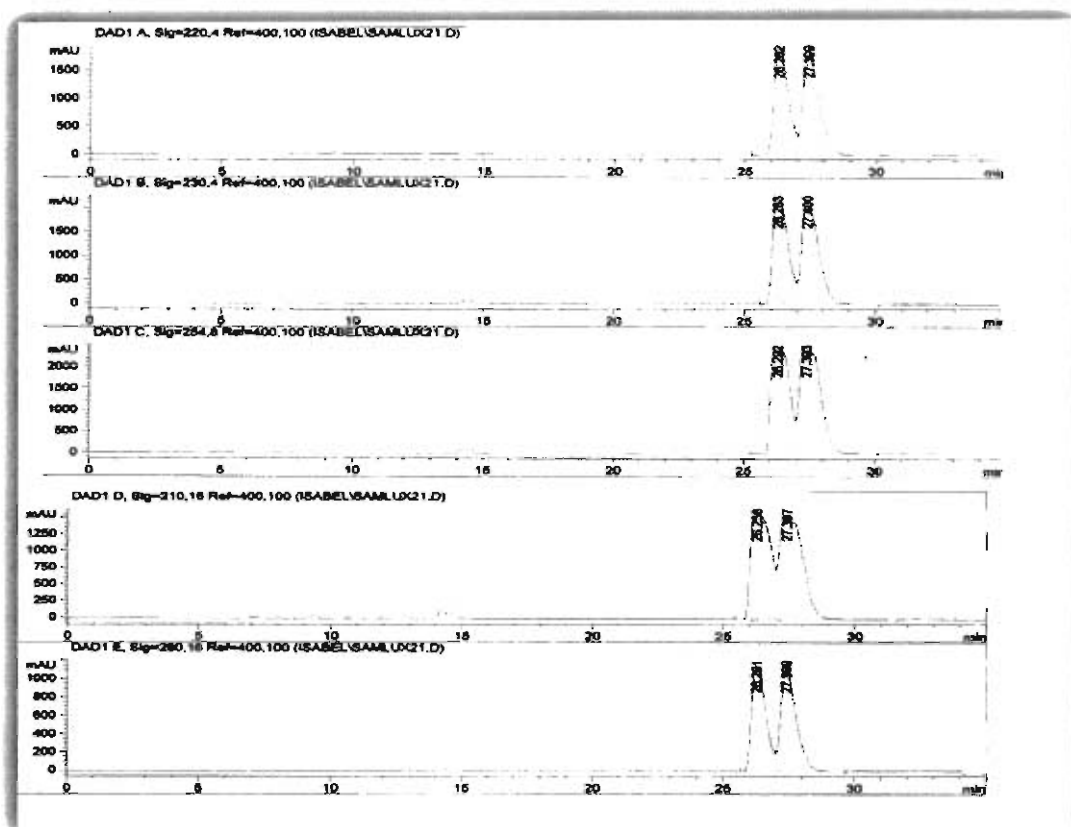


Figura 32. Cromatograma, CLAR, de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida.

7.6 Caracterización de 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo.

7.6.1 Caracterización de por IR de 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo.

En la figura 33 se muestra el espectro de IR del 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo; la banda característica de CN en 2241.59 cm^{-1} .

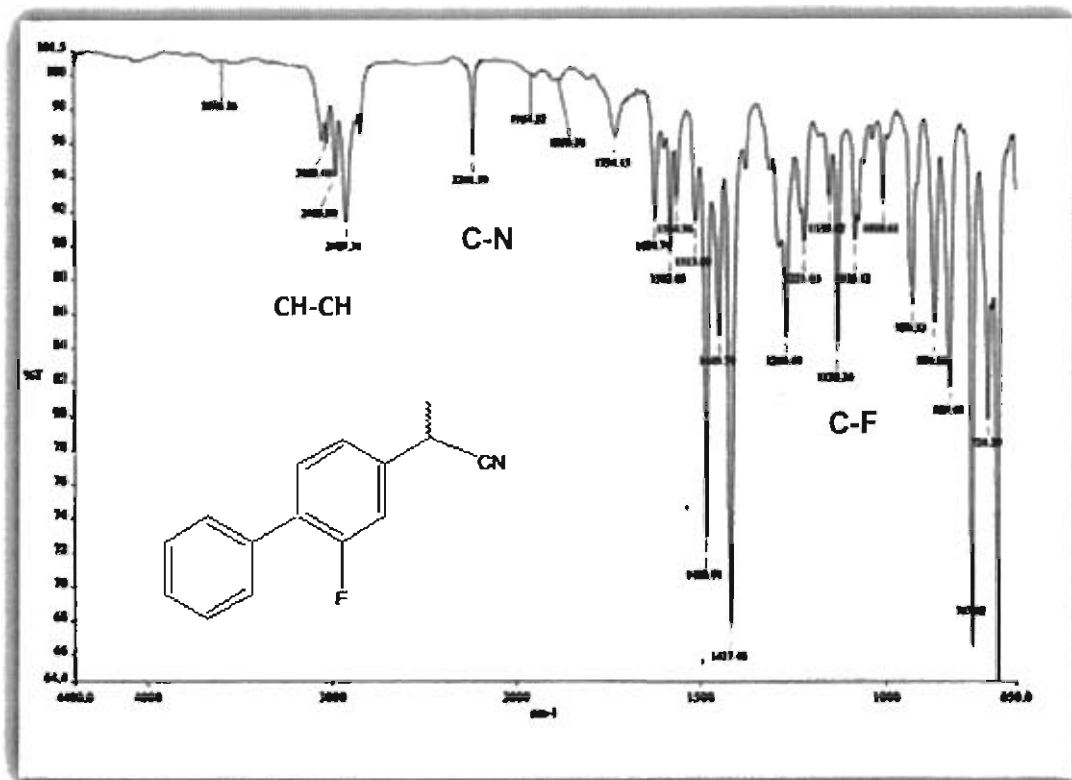


Figura 33. Infrarrojo de 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo.

7.6.2 Caracterización por RMN de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo

RMN ¹H de 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo

Los hidrógenos del metilo se observan en 1.69 ppm ($J = 7.2$ Hz); en 3.94 ppm el hidrógeno del carbono quiral ($J = 7.2$ Hz) y en 7.17 a 7.55 ppm las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos, ver **figura 34**.

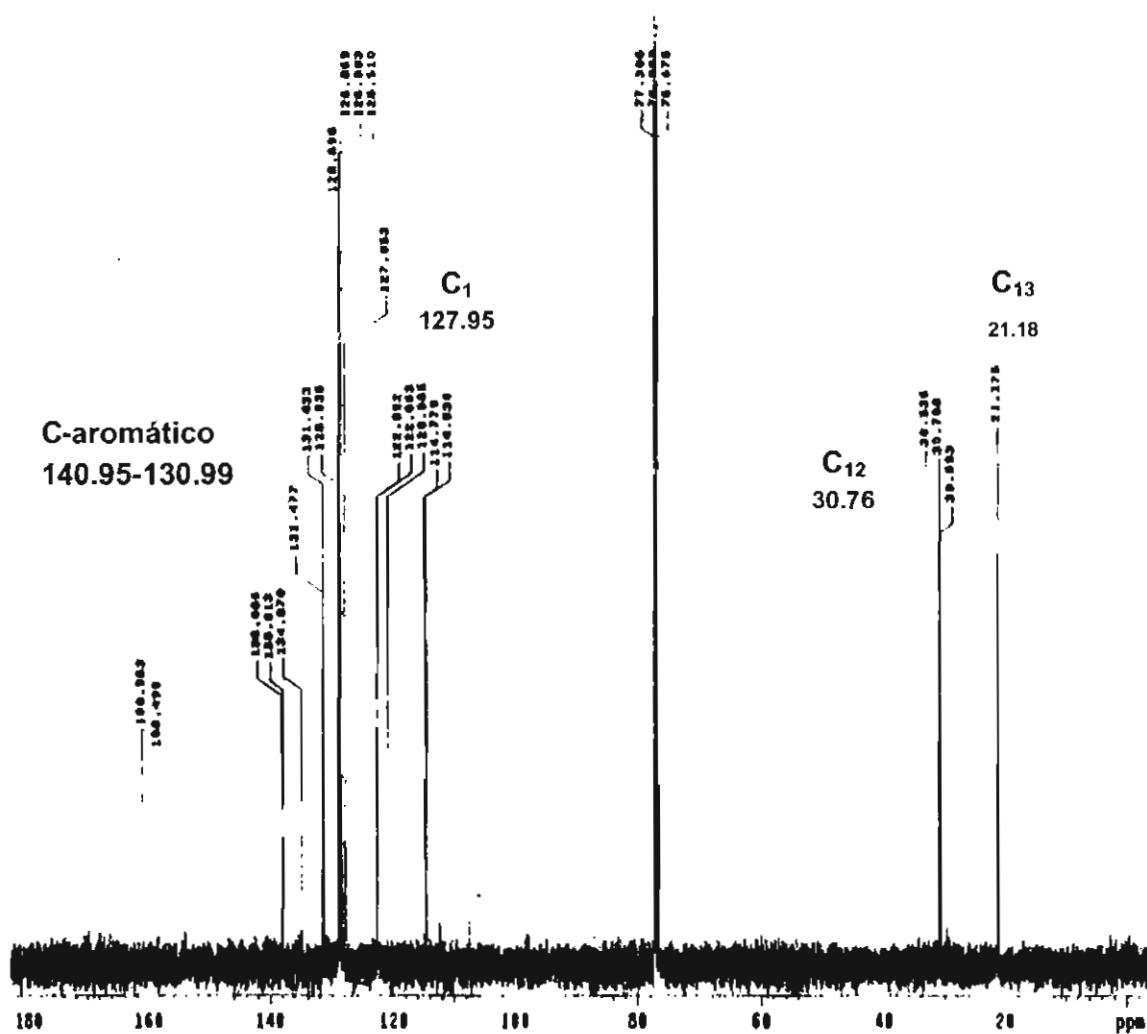
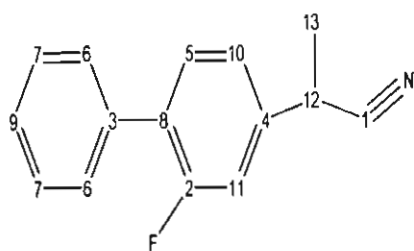


Figura 35. Espectro de RMN¹³C del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo.

Tabla 8. Desplazamiento químico (ppm) para ^{13}C y ^1H del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo.

| No. Carbono | ^{13}C -ACD-Labs | ^{13}C | Hidrógeno en C # | ^1H -ACD-Labs | ^1H |
|-------------|---------------------------|-----------------|------------------|------------------------|--------------|
| 1 | 123.00 | 127.95 | 1 | ----- | ----- |
| 2 | 160.30 | 160.98 | 2 | ----- | ----- |
| 2 | 160.30 | 158.50 | 3 | ----- | ----- |
| 3 | 128.87 | 138.09 | 4 | ----- | ----- |
| 3 | 128.87 | 138.01 | 5 | 7.53 | 7.40 |
| 4 | 128.78 | 131.48 | 6 | 7.58 | 7.55 |
| 5 | 127.00 | 131.43 | 7 | 7.42 | 7.46 |
| 5 | 127.00 | 128.94 | 8 | ----- | ----- |
| 6 | 128.58 | 126.70 | 9 | 7.37 | 7.37 |
| 6 | 128.58 | 126.66 | 10 | 7.35 | 7.22 |
| 7 | 128.30 | 126.60 | 11 | 7.17 | 7.17 |
| 7 | 128.30 | 126.51 | 12 | 3.96 | 3.94 |
| 8 | 127.50 | 122.70 | 13 | 1.63 | 1.69 |
| 8 | 127.50 | 122.66 | | | |
| 9 | 123.86 | 120.91 | | | |
| 10 | 119.66 | 120.51 | | | |
| 11 | 114.81 | 114.77 | | | |
| 11 | 114.81 | 114.53 | | | |
| 12 | 28.49 | 30.71 | | | |
| 13 | 20.21 | 21.18 | | | |
| | | | | | |

7.6.3 Análisis por CG del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo

En la **figura 36**, se muestra el cromatograma de CG del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo con un tiempo de retención de 2.4 minutos.

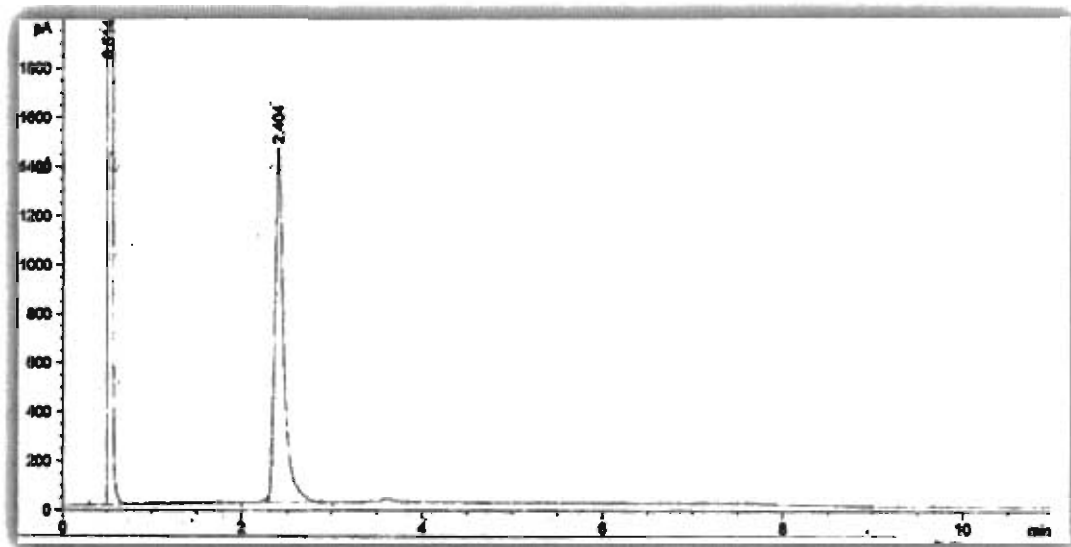


Figura 36. Cromatograma, CG, del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo.

7.6.4 Análisis por CLAR del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo

En la figura 37 se presenta el cromatograma por CLAR del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo, la resolución de los enantiómeros fueron similares en todas las longitudes de onda, los tiempos retención fueron 15.40 y 15.71 minutos.

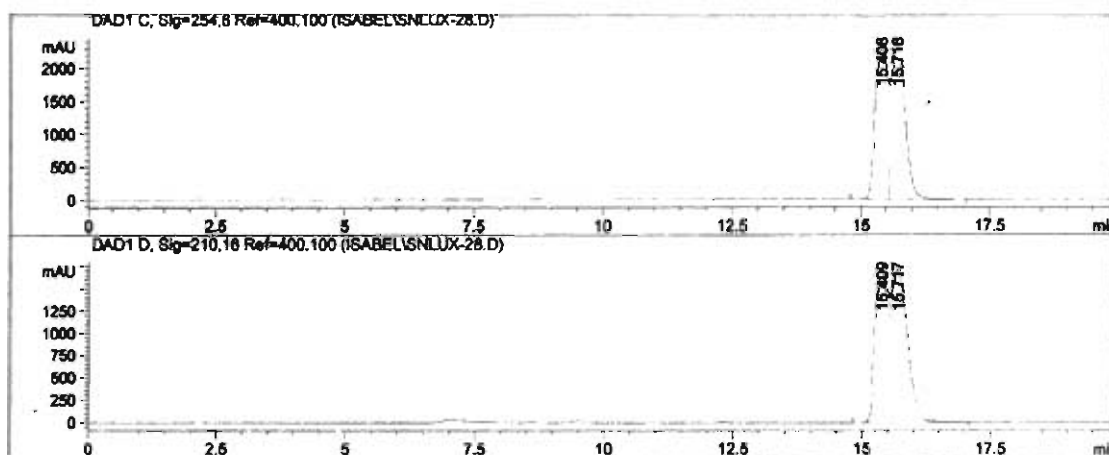


Figura 37. Cromatograma, CLAR, del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo.

7.7 Biotransformación del ácido (±)-2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico

Para las biotransformaciones del *rac*-flurbiprofen se realizaron un total de 8 lotes a diferentes relaciones de sustrato:células húmedas y a distintos tiempos de biotransformación; los resultados obtenidos por CLAR se presentan en la **tabla 9**, es evidente que a bajas concentraciones de células húmedas (1:50 y 1:100), la estereoinversión del *rac*-flurbiprofen no se efectúa, mientras que a concentraciones altas del biocatalizador (1:500 y 1:1000) sí se observa la estereoinversión del *rac*-flurbiprofen, presentándose una nueva proporción por CLAR de enantiómeros, ahora 94 y 6 del *R*(-) y *S*(+) respectivamente; desplazando la bioconversión hacia la formación estereoselectiva del enantiómero *R*(-), obteniéndose un 88% de ee, ver **figura 38**.

Tabla 9. Biotransformación del ácido (±)-2-(2-flúor-4-bifenil)propanoico.

| Lote | pH del sobrenadante de células | Relación Sust:cel | Tiempo (h) | % Relación enantiomérica | |
|------|--------------------------------|-------------------|------------|--------------------------|----------|
| | | | | <i>R</i> | <i>S</i> |
| 1 | 6.95 | 1:50 | 24 | 51 | 49 |
| 2 | | 1:50 | 48 | 46 | 54 |
| 3 | | 1:50 | 120 | 48 | 52 |
| 4 | 6.39 | 1:100 | 144 | 56 | 44 |
| 5 | 7.00 | 1:500 | 120 | 63 | 37 |
| 6 | 7.09 | 1:500 | 288 | 90 | 10 |
| 7 | 7.09 | 1:500 | 288 | 86 | 14 |
| 8 | 7.08 | 1:1000 | 168 | 94 | 6 |

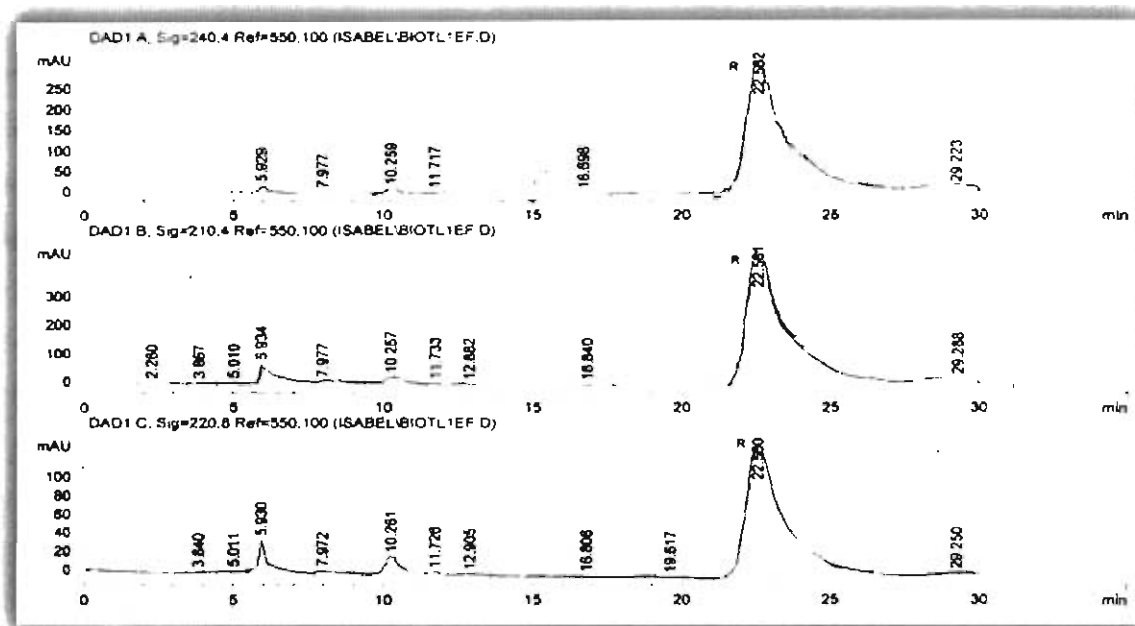


Figura 38. Cromatograma, CLAR, de la biotransformación del *rac*-flurbiprofen a las 168 h, relación 1:1000 sustrato: células húmedas.

7.8 Biotransformación de la 2-(2-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida

Para la biotransformación de la amida del flurbiprofen al ácido se realizaron 8 lotes con una relación sustrato:células húmedas de 1:100, 1:400 y 1:500, ver **tabla 10**.

En el caso de la relación 1:100, el microorganismo (biocatalizador) utilizó como fuente de nitrógeno acetonitrilo, tanto para la preparación de la biomasa como del medio sólido, con la finalidad de inducir una mayor adaptación de la bacteria a esta fuente de nitrógeno, los resultados fueron los siguientes:

Por CG el % de conversión de la amida al ácido, a las 144 h, fue 66.11%. Los tiempos de retención fueron 3.82 min y 6.48 min a un pH 7.00; con respecto a la relación enantiomérica por CLAR se presentan valores de 38.00 *R*(-) y 62.00 *S*(+), **figura 39** y **40**. Para el experimento de biotransformación de 360 h, el % de conversión fue de 60.49 con una relación enantiomérica de 40.00 *R*(-) y 60.00 de *S*(+), **figura 41** y **42**. Es importante señalar que el biocatalizador utilizado,

provino de un medio de cultivo donde el pH del sobrenadante después del crecimiento de las células fue de 5.35. Para los experimentos con relación de: 1:400 y 1:500, utilizando tiempos de biotransformación de 101 y 192 h, se buscó disminuir el tiempo de bioconversión incrementando la cantidad de biocatalizador, sin embargo para estos lotes no se observó conversión del sustrato. En estos casos con respecto al origen del biocatalizador, el pH obtenido del sobrenadante de células fue de 6.24 y 5.44. Lo anterior permite inferir que cuando el pH del sobrenadante es ácido la actividad enzimática disminuye.

En el análisis por IR después de las 144 h, con una relación sustrato:células húmedas 1:100, se observa que el crudo de la biotransformación muestra un ensanchamiento considerable en la región de alargamiento del enlace N-H, 3352.06-3165.82 cm^{-1} y en la del carbonilo de la amida, 1659.75-1629.57 cm^{-1} originado por la presencia del ácido carboxílico, lo que se demuestra por CLAR, además de la banda del carbonilo del ácido en 1703.82 cm^{-1} ver **figuras 43 y 16** del infrarrojo del *rac*-flurbiprofen.

Tabla 10. Biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida.

| Lote | pH del sobrenadante de las células | Relación sustrato/células húmedas | Tiempo (h) | % Conversión CG | % Relación enantiomérica | |
|------|------------------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|----|
| | | | | | R | S |
| 1 | 7.51 | 1:100 | 24 | 0 | 50 | 50 |
| 2 | | | 48 | 0 | 50 | 50 |
| 3 | | | 72 | 0 | 50 | 50 |
| 4 | | | 96 | 0 | 50 | 50 |
| 5 | 7.00 | 1:100 | 144 | 66.11 | 38 | 62 |
| 6 | 5.35 | 1:100 | 360 | 60.49 | 40 | 60 |
| 7 | 6.24 | 1:400 | 101 | 0 | 50 | 50 |
| 8 | 5.44 | 1:500 | 192 | 0 | 50 | 50 |

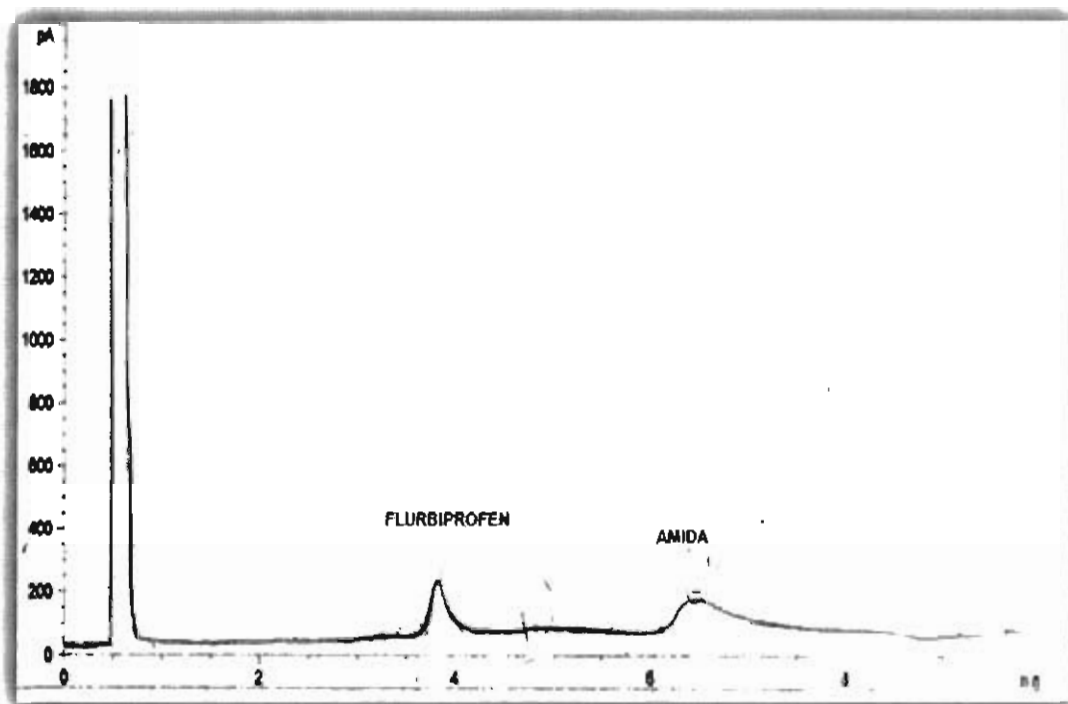


Figura 39. Cromatograma, CG, de la biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida a las 144 h; relación, 1:100 sustrato:células húmedas, Lote 5.

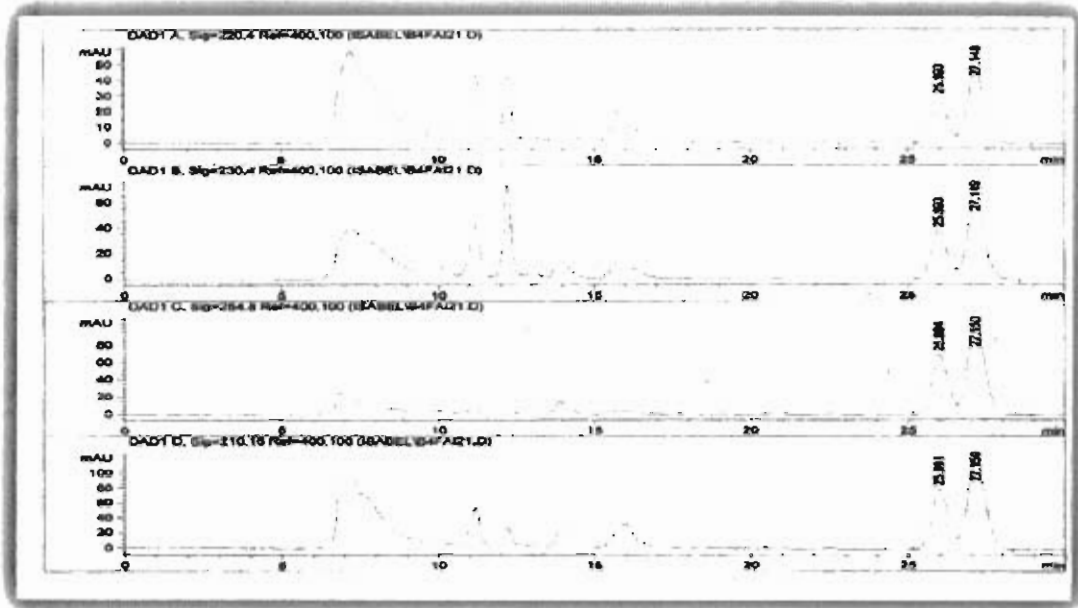


Figura 40. Cromatograma, CLAR, a las 144 h de biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida, relación 1:100 sustrato:células húmedas, Lote 5.

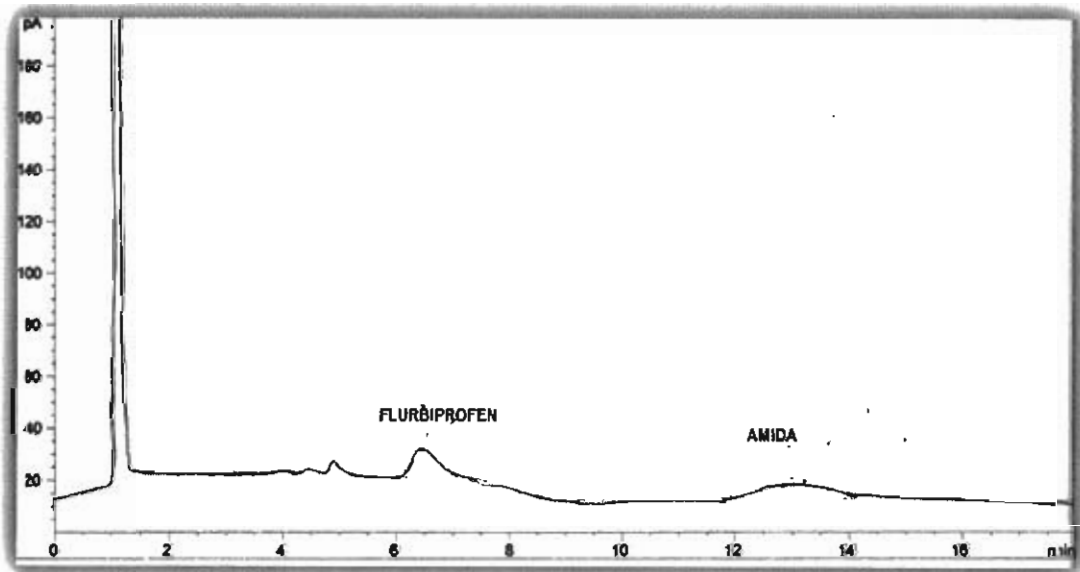


Figura 41. Cromatograma, CG, de la biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida a las 360 h, relación 1:100 sustrato:células húmedas, Lote 6.

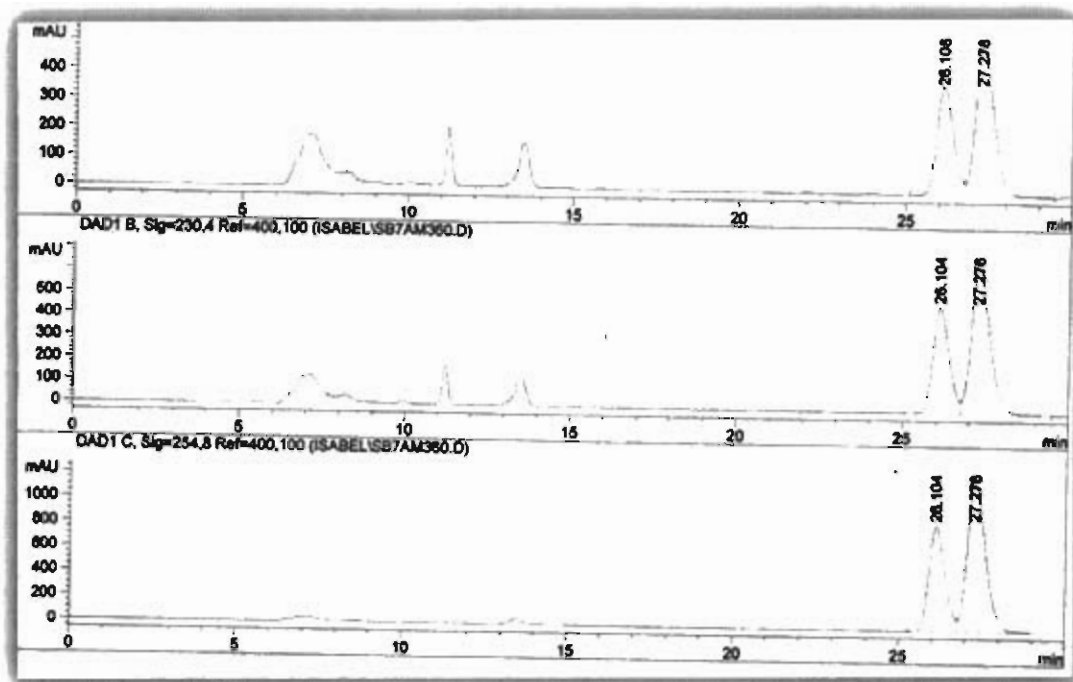


Figura 42. Cromatograma, CLAR, a las 360 h de biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida, relación 1:100 sustrato:células húmedas, Lote 6.

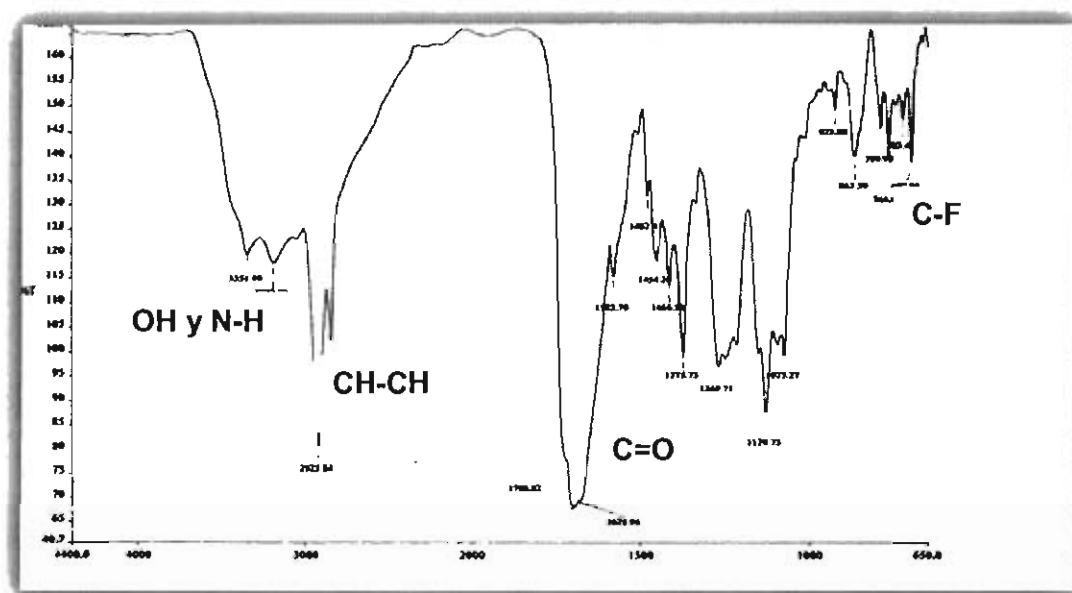


Figura 43. Infrarrojo de la biotransformación de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida a las 144 h; relación, 1:100 sustrato:células húmedas, Lote 5.

7.9 Biotransformación del 2-(2-flúor-4-bifenil)propanonitrilo

Para la biotransformación del nitrilo del flurbiprofen a la amida o al ácido, se realizaron 8 lotes a distintas relaciones sustrato:células húmedas, 1:20, 1:100 y 1:500; a diferentes tiempos de biotransformación, los lotes se realizaron por duplicado.

Para la preparación del medio sólido y líquido, se utilizó como fuente de nitrógeno para el microorganismo acetonitrilo con la finalidad de inducir una mayor actividad de las enzimas nitrilo hidrata y nitrilasa; los productos obtenidos de la biotransformación se analizaron por CG y espectroscopía de IR.

Los primeros experimentos se realizaron con una relación de sustrato:células húmedas de 1:100, a un pH 7.51 del sobrenadante, durante 24, 48 y 72 h, sin observarse una apreciable bioconversión del sustrato. Al prolongar el tiempo de bioconversión hasta 96 horas, se presentó un % de conversión al 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida de 40.25%. Los tiempos de retención en cromatografía de gases de 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo y 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida son de 2.39 min y 4.93 min, ver **figura 44**. En el análisis del espectro de IR del producto aislado de la bioconversión, ver **figura 45**, se observan bandas de amida, N-H, en 3352.06 y 3165.82 cm^{-1} y absorción en 1662.50 cm^{-1} para un C=O.

Una variante que se realizó en esta etapa del estudio, fue el emplear células liofilizadas del microorganismo, con una relación 1:20 de sustrato: células liofilizadas (pH 6.59 del sobrenadante de células, antes del aislamiento de la biomasa), después de someterlas a biotransformación durante 144 h, no se observó conversión del sustrato ver **figura 46**, por lo que esta opción de conservación de la biomasa obtenida no se exploró más.

Con el objetivo de reducir el tiempo de biotransformación y buscando aumentar el porcentaje de la conversión del nitrilo a la amida, se optó por incrementar la relación de sustrato:células húmedas a 1:500, (pero con pH 5.35 y 6.86 del sobrenadante de células) sin embargo la conversión del sustrato no se llevó a

cabo, observándose solo la materia prima por CG. Esto sugiere la influencia del valor del pH final del medio de crecimiento de las células sobre la actividad enzimática del microorganismo, como una variable adicional a considerar para lograr la actividad de nitrilo hidratasa del biocatalizador. En contraste, a pH de 7.51 del medio de crecimiento del microorganismo utilizado en el lote de 1:100 a las 96 hrs, si hubo bioconversión del nitrilo a la amida. Este hecho nos plantea, que en un futuro, se deberá de reexplorar el uso de células liofilizadas obtenidas de un medio de cultivo con valores finales de pH superiores a 7.5, antes de descartar esta posibilidad de conservación del biocatalizador para un uso posterior en este tipo de biotransformación.

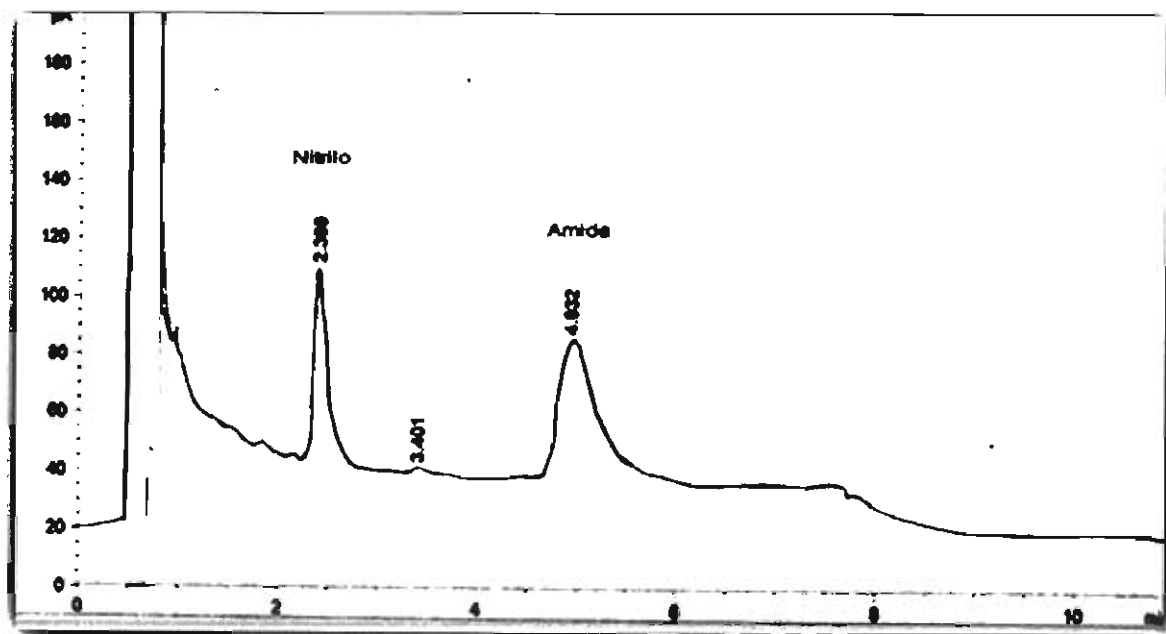


Figura 44. Cromatograma, CG, a las 96 h, relación 1:100 sustrato:células húmedas.

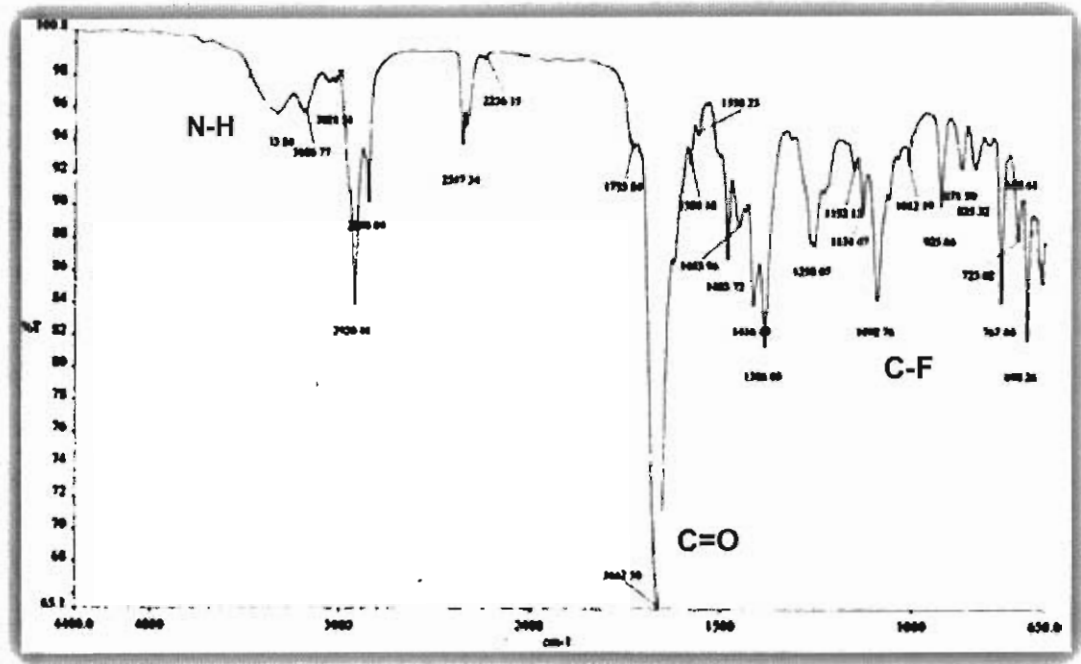


Figura 45. Infrarrojo a las 96 h, relación 1:100 sustrato:células húmedas.

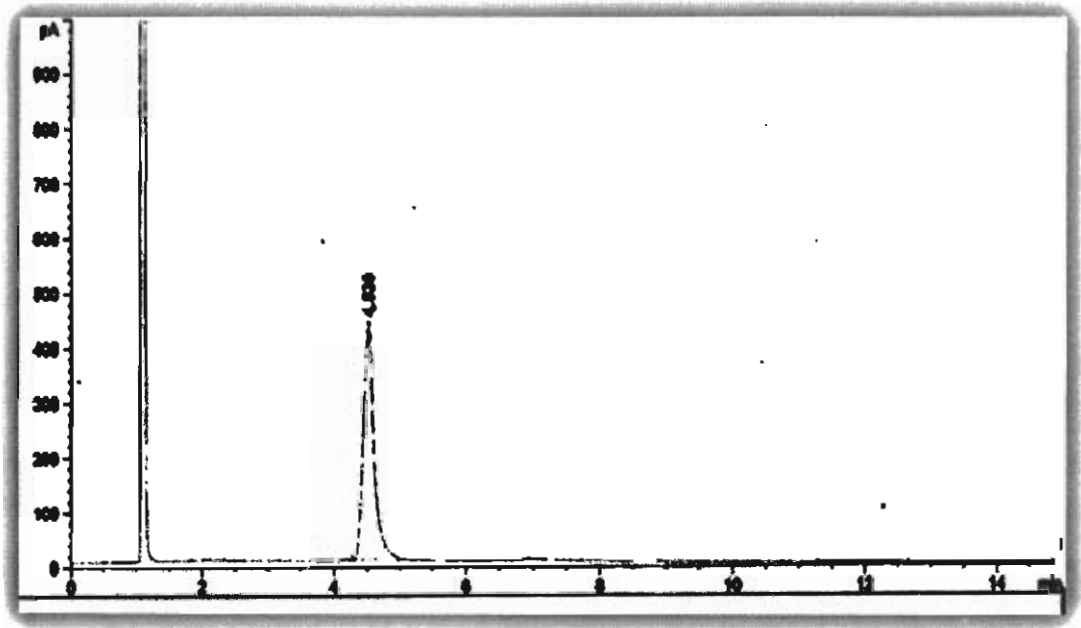


Figura 46. Cromatograma, CG de las células liofilizadas, a las 144 h.

8. CONCLUSIONES

Se realizaron las síntesis de los siguientes compuestos: 2-(2'-flúor-4-bifenil)-1-propanol (70%), 2-flúor- α -metil-[1,1'-bifenil]-4-acetato de metilo (80%), cloruro de 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoilo (82%) y con un rendimiento de 95% y >99% para 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida y 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo respectivamente, estos compuestos se caracterizaron por IR, RMN ^1H y RMN ^{13}C .

Se desarrollaron los métodos analíticos para la resolución de los enantiómeros por CLAR de: ácido 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoico (flurbiprofen); 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo; 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida y 2-(2'-flúor-4-bifenil)-1-propanol, los tres primeros utilizados como sustratos, por separado, en el estudio de la biotransformación con *Nocardia corallina*.

Se desarrolló el método analítico para determinar los % de conversión por CG para: el ácido 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoico (flurbiprofen); 2-(2'-flúor-4-bifenil)propanonitrilo y 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanamida y 2-(2'-flúor-4-bifenil)-1-propanol.

Se demostró que el microorganismo *Nocardia corallina* B-276 es capaz de llevar a cabo la estereoinversión del *rac*-flurbiprofen, a un pH 7.08, para obtener preferentemente el enantiómero *R* del ácido 2-(2'-flúor-1,1'-bifenil-4-il)propanoico con 88 %ee. Con lo anterior se puede afirmar que el sistema enzimático de este microorganismo no es específico para un solo AINE (ibuprofen)³ lo que amplía la posibilidad de su potencial aplicación con otros agentes antiinflamatorios, siendo además éste, el primer reporte de esta biotransformación con flurbiprofen.

Con respecto al estudio de la biotransformación de la amida al ácido, se demostró por CG, el % de conversión y que *Nocardia corallina* puede llevar a cabo la hidrólisis, aunque con muy baja enantioselectividad (14 %ee) de la amida, empleando en las condiciones estudiadas tiempos prolongados de biotransformación: Se tendrán que buscar mejores condiciones para disminuir los tiempos de biotransformación, esperando lograr el incremento del %ee. Así mismo

se observó la dependencia de la actividad biocatalítica en la bioconversión, al pH (neutro) del medio de cultivo donde se aísla la biomasa.

En el caso de la biotransformación del nitrilo a la amida, se determinó por CG el porcentaje de conversión del nitrilo a la amida del flurbiprofen con *Nocardia corallina* B-276, demostrando que este microorganismo presenta capacidad de *nitrilo hidratasa*, preferentemente cuando la biomasa se obtiene a un pH de 7.51 (sobrenadante después del crecimiento de las células).

Por lo anterior, se considera que los resultados alcanzados en este proyecto fueron satisfactorios, tanto en las síntesis químicas, como en los métodos analíticos desarrollados y por las biotransformaciones realizadas; la integración de éstas disciplinas para contar con los sustratos necesarios y poder así efectuar las biocatálisis originalmente planteadas, permitió ampliar el conocimiento sobre la capacidad enzimática de *Nocardia corallina* B-276 en un AINE de amplio uso en el país.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Davies, J., **2007**, Small molecules: The lexicon of biodiversity, J Biotechnol, 129 (1), 3-5.
- 2.- Pérez H.I, Manjarrez N., Luna H., Solís A., Ramírez C., **2005** Nitrile hidratase activity of *Nocardia corallina* B-276. J Braz Chem Soc, 16(6A), 1150-1153.
- 3.- Lievano R., Pérez H.I., Manjarrez N., Solís A., Solís-Oba M., **2012**, Hydrolysis of ibuprofen nitrile and ibuprofen amide and deracemisation of ibuprofen using *Nocardia corallina* B-276, Molecules, 17(3), 3148-3154.
- 4.- Galimberti D., Scarpini E., **2008**, New perspectives for the treatment of Alzheimer's disease, J Open Geriatric Medicine, 1, 33-42.
- 5.- Ciou J.F, Wang P.Y., Wu A.C., Tsai S.W. **2011**. Lipase-catalyzed alcoholic resolution of (*R,S*)-flurbiprofenyl azolides for preparation of (*R*)-NO-flurbiprofen ester prodrugs. Process Biochem, 46 (4), 960-965.
- 6.- Zhang H.Y., Wang X., Ching C. B. **2007**. *R*-stereopreference analysis of lipase Novozym[®]435 in kinetic resolution of flurbiprofen. Chirality, 19 (4), 245-249.
- 7.- Bae H.A., Lee K.W, Lee Y.H. **2006**. Enantioselective properties of extracellular lipase from *Serratia marcescens* ES-2 for kinetic resolution of (*S*)-flurbiprofen. J Mol Cat B: Enzymatic, 40 (1-2), 24-29.
- 8.- Velasco R., Montenegro M., Vélez J., **2009**, Biotransformación de compuestos aromáticos sustituidos mediante hongos filamentosos fitopatógenos de los géneros *Botryodiplodia* y *Colletotrichum*. Rev Soc Quím Perú, 75 (1), 94-98.
- 9.- Correa Y. M., **2009**, Tesis de Maestría, Biotransformación de los sustratos cinamaldehído y ibuprofen mediante el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín Facultad de Ciencias-Escuela de Química Colombia, pp. 22-49
- 10.- Pras N., Wondenbag H., Van Uden W., **1992**, Bioconversion of naturally occurring precursors and related synthetic compounds using plant cell cultures; J Biotechnol, 26 (1), 29-62.

- 11.- Luna. H., **2004**, Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos, Rev Soc Quím Méx, 48 (3), 211-219.
- 12.- McMurry J., **2000**, Química Orgánica, 5ª ed., Editorial Thompson, México; pp 344-345.
- 13.- Calvo G., **2003**, Tesis Doctoral, Biotransformación en la síntesis y resolución de compuestos de interés farmacéutico, Universidad de Oviedo Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, España, pp 3-4.
- 14.- Yazbeck D., Martinez, C.A.; Hu, S.; Tao, J. **2004**, Challenges in the development of an efficient enzymatic process in the pharmaceutical industry. Tetrahedron: Asymmetry, 15, 2757-2763.
- 15.- Stanley R., **2001**. Preparative biotransformations. J Chem Soc, Perkin Trans1, 13, 1475-1499.
- 16.- Leirese A., Seelbach K., Wandrey C., **2000**, Industrial biotransformations, Wiley-VCH, Weinheim, p 409.
- 17.- Bornschover U.T., Kaszlauskas R.S., **1999**, Hydrolases in organic regio-and stereoselective biotransformations, Wiley-VCH Weinheim, p 354.
- 18.- Chen. J., Chao. R., Zheng.Y, Shen Y., **2009**, Microbial transformation of nitriles to high-value acids or amides, Biochem Eng Biotechnol, 113, 33-77.
- 19.- Butler L.G., **1979**, Enzymes in non-aqueous solvents, Enzyme Microb Technol, 1 (4), 253-259.
- 20.- Tramper, J., Vermüe, M.H., Beeftink H.H., Stockar V., **1992**, Biocatalysis in non-conventional media, Elsevier, Amsterdam, p 1337.
- 21.- Carrea G., Riva S., **2000**, Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents, Angew Chem Int Ed, 39(13), 2226-2254.
- 22.- Francis, C., **2006**, Química Orgánica 6ª ed., Editorial Mc-Graw Hill, México, pp 876-882.
- 23.- Hall J.H., Gisler M., **1976**, A simple method for converting nitriles to amides hydrolysis with potassium hydroxide in *tert*-butyl alcohol, J Org Chem, 41 (23), 3769-3770.
- 24.- Mylerova V., Martinkova L., **2003**, Synthetic applications of nitrile-converting enzymes. Curr Org Chem, 7(13), 1279-1295.

- 25.- Velonkar H., Kim G., Preez R., **2010.**, Development in nitrile and amide biotransformation processes, Trends Biotechnol, 28 (11), 561-569.
- 26.- González A., **2006**, *Nocardia asteroides*. Rev Chil Infectologia, 23(4), 359.
- 27.- Corti M.E., Fioti V., **2003**. Nocardiosis: a review. Int J Infectious Diseases, 7 (4), 243-250.
- 28.- Pérez H.I., **1998**, Tesis de Doctorado, Oxidación microbiología de alcoholes por *Nocardia corallina* B-276, UAM-Xochimilco, México, pp 4-7.
- 29.- Balows A., Truper H.G., Dwoekin M., Harder W., Scheleifer K.H., **1992**, The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications, Ed 2^a, Ed. Springer-Verlay, New York, pp 1188-1213.
- 30.- Saeki H., Akira M., Furuhashi K., Averhoffl B., Gottschalkl G., **1999**. Degradation of trichloroethene by a linear plasmidecoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus coralline* (*Nocardia corallina*) B-276, Microbiol, 145, 1721-1730.
- 31.- Chand T., Kumar H., **2005**. *Nocardia globerula* NHB-2: a versatile nitrile-degrading organism, Can J Microbiol, 51(8), 705-708.
- 32.- Stinson, S.C., **2001**, Chiral pharmaceuticals. Chem Eng News, 79 (40), 79–97.
- 33.- Testa B., Mayer M., **1998**, Stereoselective drug metabolism and its significance in drug research, Prog Drug Res, 32, 249-303.
- 34.- Beckett A., **1991**. A practical approach to chiral separations by liquid chromatography, Biochem Soc Trans, 19, 443-446.
- 35.- Ariens E.J., **1986**. Stereochemistry: A source of problem in medical chemistry J Med Res Rev, 1 (6), 451-466.
- 36.- William P., **1991**. Resolution of chiral drugs, Pure Appl Chem, 63 (8), 119-122.
- 37.- Keith J.M., Larrow J.F., Jacobsen E.N, **2001**. Practical considerations in kinetic resolution reaction. Adv Synth Catal, 343, 5-26.
- 38.- Crosby J., Collins A.N., Shedrake G.N., **1992**. Chirality in Industry, The commercial manufacture and applications of optically active compounds, John Wiley & Sons Chichester, UK, pp 5-20.
- 39.- Strauss U., Felfer U., **1999**. Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess, Tetrahedron: Asymmetry, 10 (1), 107-117.

- 40.- Guo Z.W.J., **1993**. Novel plots of data from combined multistep enzymatic resolutions of enantiomers, *J Org Chem*, 58 (21), 5748-5752.
- 41.- Jacobsen E.N., Pfaltz A., Yamamoto H., **1999**. *Comprehensive asymmetry in industry*, Springer New York, I (III), pp 304-564.
- 42.- Patel R.N., **2002**, Microbial enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme Microb Technol*, 31 (6), 809-826.
- 43.- Vaya I., **2007**, Tesis Doctoral, Estados excitados del antiinflamatorio no esteroideo flurbiprofen como sondas para interacción con proteínas. Universidad Politécnica de Valencia Departamento de Química, Instituto de Tecnología (UPV/CSIC) España, p16.
- 44.- Rivera A., **2006**. AINEs: Mecanismo de acción en el sistema nervioso central (SNC). *Rev Mex Anestesiología*, 29 (1), 36-40.
- 45.- Goodman y Gilman, **2001**, Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª Ed, Tomo 1, Editorial McGraw Hill, México, pp 720-724.
- 46.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5ª edición, **1998**. pp 1229-1230.
- 47.- Pignatello R., Panto V., Salmaso S., Bersani S., Pistara V., Barrio J., Pluglisi G., **2008**. Flurbiprofen derivatives in Alzheimer's disease: Synthesis, pharmacokinetic and biological assessment of lipoamino acid prodrugs, *Bioconjugate Chem*, 19 (1), 349-357.
- 48.- Méndez M., Martínez M., **2006**. AINES y estatinas para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer, *Rev Científica de América Latina y el Caribe*, 2(2), 2-4.
- 49.- Martin J., Le Leu R., Young G.P., **2010**. R-Flurbiprofen suppresses distal nonmucin-producing colorectal tumors in azoxymethane-treated rats, without suppressing eicosanoid production, *J Phy Gastroin Liver Physiol*, pp 1-6.
- 50.- Ingvorsen K., Godtfredsen S.E., Tsuchiya, R.T. **1998**. Microbial hydrolysis of organic nitriles and amides, Biochemical synthesis group, Novo Industry A/S, Novo alle Bagsvaerd, *J Ciba Foundation Symposium*, 140, 16-31.
- 51.- Mishara A., Veasamy R., **2008**, Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of amide produg flurbiprofen, *J Braz Chem Soc*, 19(1), 89-100.

- 52.- Naoshi M., Hideo T., **2005**, Direct oxidative conversion of primary alcohols to nitriles using molecular iodine in ammonia water. *Synlett*, 1456–1458.
- 53.- Furniss B., Hannford A., Smith P., **1989**, Tetchell A., *Vogel's Textbook of practical Organic Chemistry*, 5^a ed., Ed Longman, England, pp 695-745.
- 54.- Pérez H., Luna H., Manjarrez N., Solís A., **2001**. Resolución microbiológica de 1-fenil-1-propanol y 1-(4-toluil)-1-etanol con *Nocardia corallina* B-276. *Rev Soc Quím Méx*, 45(5), 43-46.