Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Línea de Investigación: Química Medicinal

OBTENCIÓN DE ALCOHOLES SECUNDARIOS ENANTIOMÉRICAMENTE ENRIQUECIDOS VÍA REDUCCIÓN ENZIMÁTICA DE CETONAS

Idónea Comunicación de Resultados que para obtener el grado de Maestra en Ciencias Farmacéuticas

Presenta:
QFB. María Teresa Lara Carvajal
Matrícula: 2123807654

Tutora: Dra. Herminia Inés Pérez Méndez
Asesora: Dra. Aída Solís Oba
Asesor: M. en C. Q. Norberto Manjarrez Alvarez

México, D. F. **Septiembre 2015**

“OBTENCIÓN DE ALCOHOLES SECUNDARIOS ENANTIOMÉRICAMENTE ENRIQUECIDOS VÍA REDUCCIÓN ENZIMÁTICA DE CETONAS”

COMITÉ TUTORAL

TUTORA: Dra. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

_____

Vo.Bo.

ASESORA: Dra. AÍDA SOLÍS OBA

_____

Vo.Bo.

ASESOR: M. en C. NORBERTO MANJAREZ ALVAREZ

_____

Vo.Bo.

ALUMNA: Q.F.B. MARÍA TERESA LARA CARVAJAL
MATRÍCULA: 2123807654

_____

“OBTENCIÓN DE ALCOHOLES SECUNDARIOS ENANTIOMÉRICAMENTE ENRIQUECIDOS VÍA REDUCCIÓN ENZIMÁTICA DE CETONAS”

JURADO DE EXÁMEN DE GRADO

PRESIDENTE: Dr. DANIEL ARRIETA BAEZ

_____

Vo.Bo.

VOCAL: Dr. ALEJANDRO CORDERO VARGAS

_____

Vo.Bo.

SECRETARIO: Dra. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

_____

Vo.Bo.

Locura es hacer lo mismo una y otra vez
esperando resultados diferentes.

AGRADECIMIENTOS

Al Cuerpo Académico de la Universidad Autónoma Metropolitana que me formó en este programa de estudios de posgrado, de cada uno me llevo valiosas enseñanzas que aplicaré en mi futuro laboral.

A mi tutora, Dra. Herminia Inés Pérez Méndez, por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto, brindándome todo lo necesario sin contratiempos, por ser mi guía después de los “días malos para la ciencia”, por su accesibilidad y la confianza que me inspiró desde que la conocí. Gracias por contagiarme del fascinante mundo de las biotransformaciones aplicadas a la química orgánica.

A mis asesores, Dra. Aida Solís Oba y al M. en C. Q. Norberto Manjarrez Alvarez por orientarme cuando fue necesario durante este año de trabajo experimental y por el aporte que hicieron para mejorar significativamente este trabajo.

A mis sinodales, Dr. Daniel Arrieta Baez y Dr. Alejandro Cordero Vargas, quienes con sus observaciones le dieron el retoque final a este trabajo.

Al todo el laboratorio de Biotransformaciones del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-X, por servirme como lugar físico de trabajo diario para la culminación de esta etapa estudiantil.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría, con número de registro 284203.

DEDICATORIA

A mi padre, Sr. Fausto Lara Marquez, a mi madre Sra. Teresa Isabel Carvajal Rivas y a mi hermana Guadalupe Isabel, por apoyarme en mi decisión de hacer mis estudios de maestría, por ser mi motor interno que tengo para cada día superarme como persona e impulsarme a hacer lo que realmente me apasiona, papitos y hermana, los amo de aquí al infinito.

A mis tíos, Lic. José Joaquín Carvajal Rivas y al Lic. Fernando Fernández Castellanos, ya que de manera desinteresada recibí de cada uno su apoyo incondicional, uno al inicio y otro al final de este camino que hoy concluyo, toda mi vida les estaré agradecida, los quiero mucho, Dios los tenga en su gloria.

A Rufino, dedico también a ti este logro en mi vida ya que siempre estuviste, aún en mi ausencia, y fue por ti que me enteré de este programa de estudios y me alentó a intentarlo. Sabes cuánto te amo.

RESUMEN

Los compuestos enantioméricamente puros son una pieza fundamental en la producción de algunos productos farmacéuticos, dado que la quiralidad es el factor clave para su efectividad. Una vía para la preparación de éstos y que cuenta con un valor agregado adicional, es el uso de procesos donde se busque reducir los efectos contaminantes generados por los métodos químicos convencionales. Actualmente, los procesos de biotransformación están teniendo auge gracias a su quimio- regio- y estereoselectividad, además de que se pueden llevar a cabo en medios acuosos, siendo más limpios para el medio ambiente.

En este trabajo se estudiaron las condiciones para obtener los alcoholes secundarios enantioméricamente enriquecidos, a partir de las cetonas proquirales correspondientes, el 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y el éster 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**), intermediarios para las síntesis del Clopidogrel (antiagregante plaquetario) y de la Fluoxetina (antidepresivo), con células de *Nocardia corallina* B-276. Se utilizó como compuesto modelo a la propiofenona (**3**) para optimizar las condiciones de la reacción de reducción.

En el desarrollo del trabajo se corroboró que *Nocardia corallina* B-276 tiene la capacidad de reducir enantioselectivamente a la propiofenona y al 2-clorobenzoilformiato de metilo, con enriquecimiento del enantiómero (*R*), con una relación de 1:500 (p/p) sustrato:células húmedas, siendo reversible la biotransformación con propiofenona y no reversible con 2-clorobenzoilformiato de metilo a las 24 h.

En la biorreducción del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo con una relación de 1:500 (p/p) sustrato:células húmedas se obtuvo un porcentaje de conversión menor de la cetona al alcohol, con varios subproductos de reacción, probablemente por la actividad de otras enzimas presentes en *Nocardia corallina* y por el gran impedimento estérico para su cetorreductasa, por lo que se puede considerar que en las condiciones de reacción utilizadas, no es un sustrato a reducir con este microorganismo.

Se observó que las diferencias en los porcentajes de conversión entre cada lote de las biorreducciones de los tres sustratos estudiados, podrían estar relacionados con el pH final del medio de crecimiento de *Nocardia corallina*.

ÍNDICE

RESUMEN I
ÍNDICE DE FIGURAS V
ÍNDICE DE TABLAS VI
ÍNDICE DE GRÁFICAS VII
1. INTRODUCCIÓN 1
2. ANTECEDENTES 3
2.1. Obtención de alcoholes secundarios 3
2.2. Enzimas 3
2.3. Biotransformaciones 5
2.3.1. Biorreducciones 6
2.3.1.1. Papel del dinucleótido de nicotinamida adenina en el metabolismo 7
2.4. Actinomicetales 8
2.4.1. *Nocardia* 9
2.5. Fármacos quirales 11
2.5.1. Clopidogrel 12
2.5.1.1. 2-cloromandelato de metilo (**1A**) 13
2.5.2. Fluoxetina 14
2.5.2.1. 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) 15
2.5.2.2. 1-fenil-1-propanol (**3A**) 15
2.6. Separaciones quirales por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución 16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 17
4. HIPÓTESIS 17
5. OBJETIVO GENERAL 18
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18
6. MATERIAL Y MÉTODOS 19
6.1. Instrumentos y Equipos 19
6.2. Insumos Químicos 19
6.3. Síntesis Química 20
6.3.1. Obtención del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) 20

6.3.1.1. Obtención del (*R)*-2-cloromandelato de metilo 20
6.3.2. Obtención del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) 20
6.3.3. Obtención del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) 22
6.4. Métodos analíticos por Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) 23
6.4.1. Desarrollo de los métodos analíticos del 2-cloromandelato de metilo (**1**) y 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1A**) 24
6.4.2. Desarrollo de los métodos analíticos del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) 24
6.4.3. Desarrollo de los métodos analíticos para propiofenona (**3**) y 1-fenil-1-propanol (**3A**) 24
6.5. Obtención de biomasa de *Nocardia corallina* B-276 25
6.6. Biotransformaciones 25
6.6.1. Tratamiento de las muestras 26
6.6.2. Control negativo 26
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 27
7.1. Síntesis Química 27
7.1.1. Obtención del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) 27
7.1.1.1. Caracterización por IR del ácido 2-cloromandélico, del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) y del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) 28
7.1.1.2. Caracterización por RMN del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) y del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) 30
7.1.2. Obtención del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) 32
7.1.2.1. Caracterización por IR del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) 32
7.1.2.2. Caracterización por RMN de los compuestos 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) 34
7.2. Desarrollo de los métodos analíticos por Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) 36
7.2.1. Desarrollo de los métodos analíticos para la propiofenona (**3**) y el 1-fenil-1-propanol (**3A**) 36

7.2.2. Desarrollo de los métodos analíticos para el 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) 39
7.2.3. Desarrollo de los métodos analíticos para el 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y el 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) 41
7.3. Biotransformaciones 44
7.3.1. Biotransformación de propiofenona (**3**) y 1-fenil-1-propanol (**3A**) 44
7.3.2. Biotransformación del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) 47
7.3.3. Biotransformación del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) 49
8. CONCLUSIONES 51
9. REFERENCIAS 52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de reducción enzimática 7
Figura 2. Reacción de reducción-oxidación del dinucleótido de nicotinamida adenina .. 8
Figura 3. Enantiómeros de la talidomida 11
Figura 4. (*S*)-clopidogrel 13
Figura 5. 2-cloromandelato de metilo (**1A**) 13
Figura 6. (*S*)-fluoxetina 14
Figura 7. 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) 15
Figura 8. 1-fenil-1-propanol (**3A**) 15
Figura 9. Síntesis del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) 22
Figura 10. Obtención del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) 23
Figura 11. Espectro de IR del ácido 2-cloromandélico 28
Figura 12. Espectro de IR del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) 29
Figura 13. Espectro de IR del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) 29
Figura 14. Espectro de RMN ^{1}H del 2-cloromandelato de metilo (**1A**), en $CDCl_3$ 30
Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C del 2-cloromandelato de metilo (**1A**), en $CDCl_3$... 31
Figura 16. Espectro de RMN de ^{1}H del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**), en $CDCl_3$ 31
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**), en $CDCl_3$ 32
Figura 18. Espectro de IR del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) 33
Figura 19. Espectro de IR del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) 33
Figura 20. Espectro de RMN de ^{1}H del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**), en $CDCl_3$ 34
Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**), en $CDCl_3$ 35
Figura 22. Espectro de RMN de ^{1}H del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**), en $CDCl_3$ 35
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**), en $CDCl_3$ 36
Figura 24. Cromatograma de CG de propiofenona (**3**) y del 1-fenil-1-propanol (**3A**).... 37

Figura 25. Cromatograma CLAR de la mezcla de propiofenona (**3**) con 1-fenil-1-propanol (**3A**)..... 38
Figura 26. Cromatograma de CG del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y del 2-cloromandelato de metilo (**1A**)..... 40
Figura 27. Cromatograma CLAR de la mezcla del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y del 2-cloromandelato de metilo (**1A**)..... 41
Figura 28. Cromatograma CLAR de la mezcla racémica del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) y su enantiómero (*R*)..... 41
Figura 29. Cromatograma de CG del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**)..... 42
Figura 30. Cromatograma CLAR de la mezcla del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**)..... 43
Figura 31. Biotransformación de propiofenona (**3**) con *Nocardia corallina* B-276..... 44
Figura 32. Biotransformación del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) con *Nocardia corallina* B-276..... 47
Figura 33. Biotransformación del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) con *Nocardia corallina* B-276..... 50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de enzimas..... 4
Tabla 2. Síntesis del 2-cloromandelato de metilo (**1A**)..... 27
Tabla 3. Oxidación del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) con NaOCl..... 27
Tabla 4. Condiciones de análisis por CG de la propiofenona (**3**) y del 1-fenil-1-propanol (**3A**)..... 37
Tabla 5. Condiciones de análisis por CLAR para la propiofenona (**3**) y el 1-fenil-1-propanol (**3A**)..... 38
Tabla 6. Condiciones de análisis por CG del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y del 2-cloromandelato de metilo (**1A**)..... 39

Tabla 7. Tiempos de retención (t_r) por CLAR del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y del 2-cloromandelato de metilo (**1A**)..... 40
Tabla 8. Condiciones de análisis por CG del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) 42
Tabla 9. Condiciones para el análisis por CLAR del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**)..... 43
Tabla 10. Biotransformaciones de propiofenona (**3**) del lote (**L2**) 46
Tabla 11. Oxidación del 1-fenil-1-propanol (**3A**)..... 47
Tabla 12. Biotransformación del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) con *Nocardia corallina* B-276..... 48
Tabla 13. Biotransformaciones del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) con *Nocardia corallina* B-276..... 48
Tabla 14. Biotransformación del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) con *Nocardia corallina* B-276, lote 3 49

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Seguimiento de la biotransformación del (**L1**) de propiofenona (**3**) con *Nocardia corallina* B-276 45
Gráfica 2. Relación enantiomérica vs tiempo de la biotransformación del (**L1**) de propiofenona (**3**) con *Nocardia corallina* B-276 45

1. INTRODUCCIÓN

La actividad enzimática de los sistemas biológicos ha sido explotada desde épocas remotas para la obtención de compuestos orgánicos, y de manera reciente se ha observado con los avances del conocimiento científico y tecnológico, el desarrollo de procesos biotecnológicos ampliamente utilizados, principalmente en las industrias alimentaria, agrícola y farmacéutica.[1] En las últimas décadas, los desarrollos industriales deben considerar la necesidad de obtener compuestos quirales puros, con novedosas aplicaciones biológicas, buscando con ello reducir los efectos contaminantes generados en la producción de los mismos por métodos químicos convencionales.

La mayoría de los compuestos con actividad biológica poseen centros quirales y normalmente sus estereoisómeros no poseen la misma actividad. Especialmente si nos referimos a los fármacos, la interacción de los enantiómeros con sus receptores es diferente y como consecuencia su actividad terapéutica puede ser nula, insuficiente o no deseada.[2]

Las reacciones de reducción constituyen una parte significativa en la síntesis química, ya que varias clases de compuestos orgánicos pueden ser reducidos para obtener productos con un mayor valor agregado, entre estos encontramos a los ácidos carboxílicos y sus ésteres, cetonas o aldehídos que al reducirse producen alcoholes, los agentes reductores más empleados son el $LiAlH_4$ y el $NaBH_4$. La reducción de cetonas proquirales genera compuestos racémicos, dichas reducciones se llevan a cabo, por lo general, empleando $LiAlH_4$/(THF,0°C); o DIBAL/(tolueno,-78°C), asimismo se han reportado diversos agentes químicos quirales para inducir asimetría.[3]

Los alcoholes secundarios quirales han sido preparados por hidrogenación asimétrica de cetonas proquirales usando complejos de rutenio o compuestos de boro; también se han utilizado compuestos organometálicos de zinc, los cuales se adicionan nucleofílicamente al aldehído correspondiente en presencia de ligandos quirales.[4] Uno de los métodos de reducción enantioselectiva de cetonas proquirales se basa en el uso del catalizador quiral 1,2,3-oxazaborolidinas.[5]

Una alternativa para la obtención de compuestos enantiopuros es el uso de los procesos de biotransformación, la industria farmacéutica ha empleado estos procesos desde la

década de los 90´s como parte de sus programas de desarrollo de nuevos principios activos.[2]

En estudios previos se ha demostrado la capacidad de *Nocardia corallina* para oxidar alcoholes secundarios quirales[6] de manera estereoselectiva;[7] sin embargo al efectuar la oxidación enantioselectiva del racemato 4-(clorofenil)fenilmetanol,[8] se observó que también se lleva a cabo la reducción de la 4-clorobenzofenona formada, la cual se ha utilizado como intermediario para la síntesis de algunos fármacos como por ejemplo el antihistamínico Cetirizina.

Con estos resultados se planteó estudiar la reducción de cetonas con *Nocardia corallina,* con sustratos que tuvieran en su estructura química un grupo fenilo unido en posición alfa al carbonilo, por lo que se seleccionó al 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y al éster 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) como materias primas, los cuales son intermediarios para las síntesis de Clopidogrel (antiagregante plaquetario) y de Fluoxetina (antidepresivo) respectivamente.

Por lo anterior fue necesario estudiar las condiciones que permitieran demostrar la actividad reductora de este microorganismo con los sustratos mencionados, para obtener alcoholes secundarios enantioméricamente enriquecidos a partir de cetonas proquirales, lo que sería una nueva aplicación para este microorganismo, usando como sustrato modelo a la propiofenona (**3**).

2. ANTECEDENTES

Los sistemas biológicos son muy selectivos y a nivel metabólico discriminan compuestos con diferencias estereoquímicas. Existen moléculas que tienen la misma cantidad de átomos y secuencia de enlaces pero cuya actividad biológica es diferente en la manera como se orientan en el espacio, la cual influye directamente en cómo la molécula interactúa con el receptor.[9]

2.1. Obtención de alcoholes secundarios

Los agentes reductores más empleados para reducir cetonas para la obtención de alcoholes secundarios son el hidruro de litio y aluminio ($LiAlH_4$) y el borohidruro de sodio ($NaBH_4$), pero se utiliza al $NaBH_4$ debido a su seguridad, se evita la reacción de sobrerreducción (paso de un carbinol a metileno) y por su fácil manejo. El $NaBH_4$ es un sólido blanco cristalino, termoestable e higroscópico y puede usarse en solución acuosa o en alcohol,[10] con rendimientos altos del producto. El $LiAlH_4$, es un agente reductor más reactivo que el $NaBH_4$, capaz de reducir prácticamente todos los grupos funcionales reducibles por lo que es muy difícil aplicarlo para la reducción selectiva de moléculas multifuncionales.[11]

Los alcoholes quirales son intermediarios importantes en química fina y en la industria farmacéutica.[12] Estos pueden ser producidos por la oxidación enantioselectiva de alcoholes racémicos, hidrólisis de ésteres o por biorreducción de cetonas proquirales. La reducción enzimática de cetonas se lleva a cabo por medio de oxidorreductasas y se ha convertido en un proceso eficaz para la preparación de alcoholes enantioméricamente enriquecidos, hidroxiésteres o hidroxiácidos.[13]

2.2. Enzimas

Un catalizador es una sustancia que aumenta la rapidez o velocidad de una reacción química, sin verse alterada ella misma en el proceso global. La mayor parte de los catalizadores biológicos, aunque no todos ellos, son enzimas cuya naturaleza es proteica e intervienen en la regulación química de las células y organismos. La clasificación más aceptada de las enzimas fue realizada por la Comisión de Enzimas de la Unión

Internacional de Biología Molecular y Bioquímica quien las clasificó en seis grupos, de acuerdo con el sustrato específico sobre el cual actúan[14,15] (Tabla 1). Se ha estimado que cerca del 44% de las biotransformaciones industriales usan hidrolasas, seguido por las oxidorreductasas con un 30%.[2]

Tabla 1. Clasificación de enzimas

Clase	Reacción catalizada
Oxidorreductasas	Oxidación-reducción. Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H)
Transferasas	Transferencia de grupos funcionales de una molécula a otra
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas
Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura del ATP

La actividad de algunas enzimas depende sólo de su estructura como proteínas, mientras que otras necesitan, además uno o más componentes no proteicos, llamados cofactores. El cofactor puede ser un ion metálico o bien una molécula orgánica llamada coenzima, algunas enzimas necesitan de ambos. El complejo enzima-cofactor catalíticamente activo recibe el nombre de holoenzima y cuando se separa del cofactor, la enzima restante, que por sí misma es inactiva catalíticamente, se designa con el nombre de apoenzima.[15]

Las enzimas o biocatalizadores tienen la capacidad de realizar transformaciones químicas específicas que se llevan a cabo en condiciones suaves, a temperaturas de 20 a 40°C, con un pH entre 5 y 8, son totalmente biodegradables[16] y valoradas por sus habilidades intrínsecas para unir sustratos orgánicos y catalizar reacciones debido a la alta especificidad y selectividad de las interacciones entre el sitio activo de la enzima y el sustrato. Durante los últimos años se han desarrollado diferentes reacciones biocatalíticas que han sido muy útiles, entre las cuales se incluyen una variedad de

oxidaciones, reducciones, hidrólisis y unión de enlaces C-C para convertir moléculas quirales y obtener productos ópticamente puros en procesos asimétricos,[17] minimizando de ésta manera los problemas de obtención de otros subproductos y reacciones no deseadas.[16]

2.3. Biotransformaciones

Hoy en día, la industria busca desarrollar procesos que sean económicamente viables, rentables y escalables con pérdidas mínimas.[16] Además, desarrollar herramientas biotecnológicas que formen parte de procesos limpios y eficientes energéticamente para la prevención, control y disminución de la contaminación ambiental.[18] En estos procesos, las biotransformaciones han llegado a ser una alternativa ideal, que ha sido aceptada ampliamente en la industria farmacéutica y de química fina, especialmente en la obtención de moléculas quirales para utilizarlas como principios activos farmacéuticos.[16]
Las biotransformaciones se definen como todo proceso por el cual un compuesto es modificado mediante reacciones catalizadas por enzimas, puras o parcialmente purificadas, en forma libre, inmovilizadas o como células completas.[19] Estas transformaciones se desarrollan en condiciones suaves de temperatura, pH y presión, teniendo subproductos mínimos con menos contaminación ambiental, debido a que se disminuyen los disolventes usados a comparación de la síntesis convencional, ya que en general se llevan a cabo en un medio acuoso;[16] lo cual da como resultado una química "verde" amigable con el medio ambiente que es más noble que la síntesis química convencional.[2]
Si el proceso de conversión química de la sustancia se lleva a cabo con la ayuda de una enzima libre o inmovilizada, se emplea el término biocatálisis, sin embargo si se lleva a cabo con la ayuda de una célula completa conteniendo la enzima necesaria, se habla de biotransformación.[20]
En las biotransformaciones que utilizan microorganismos se pueden desarrollar síntesis selectivas, las enzimas contenidas en las células microbianas son estables por más tiempo comparadas con las aisladas, ya que dentro de la célula están protegidas del ambiente externo. Sin embargo el sistema de células enteras tiene ciertos inconvenientes, como el uso de equipo costoso, reacciones no deseadas causadas por

los productos de degradación durante el crecimiento celular, el manejo de grandes volúmenes del medio y baja productividad, debido a que los sustratos que se desea biotransformar pueden ser tóxicos para el microorganismo siendo tolerados de manera general a concentraciones entre el 0.1 y el 0.3 %.[16]

2.3.1. Biorreducciones

Las enzimas oxidorreductasas comprenden una larga clase de enzimas que catalizan simultáneamente reacciones de oxidación y de reducción,[21] por ejemplo las deshidrogenasas, reductasas, oxidasas, peroxidasas, oxigenasas, hidroxilasas, entre otras.

Las enzimas reductasas catalizan la conversión regio- y estereoselectiva de una amplia gama de cetonas y de algunos aldehídos a alcoholes quirales que son de gran interés como intermediarios en síntesis, por lo que estas enzimas tienen una amplia aplicación en el campo de las biotransformaciones y han sido utilizadas industrialmente, ya sea como enzimas aisladas o con las células completas.[22]

En sistemas donde se emplean células completas, la especificidad del sustrato de la reacción viene determinada por la reductasa de la célula.[23]

Al ser enzimas intracelulares (reductasas), dependen del cofactor dinucleótido de nicotinamida adenina NAD(P)H para suministrar el equivalente de hidruro, necesario para la biorreducción, consumiéndose en cantidades equimoleculares respecto al sustrato a reducir, lo cual implica que la regeneración del cofactor puede volver al proceso económicamente inviable con enzimas libres sin regeneración del cofactor (el precio aproximado de 1 mol de NADH es de 10^6 dólares y el de 1 mol de NADPH 10^5 dólares).[24]

Es por ello que se suelen utilizar células enteras como biocatalizadores ya que su propio metabolismo celular se encarga de la regeneración del cofactor; el proceso resulta, por lo tanto, mucho más ventajoso desde el punto de vista económico, no solo por este hecho, sino también porque se reducen los costos implicados en el aislamiento y purificación de la enzima. El problema es que dentro de las células suele haber más de una enzima que cataliza el proceso, obteniéndose en algunos casos bajos excesos enantioméricos (*ee*).[22]

Durante el curso de la reacción (Figura 1) el hidruro del cofactor de nicotinamida se transfiere a través de la cara *re* o la cara *si* de la cetona para originar el alcohol (*S*) o el

(*R*) respectivamente. En la mayoría de los casos, el curso estereoquímico de la reacción puede predecirse por el tamaño relativo de los sustituyentes (*p*, pequeño; *G,* grande) del carbono sp^2 de la cetona, en lo que se conoce como la regla de Prelog.[25]

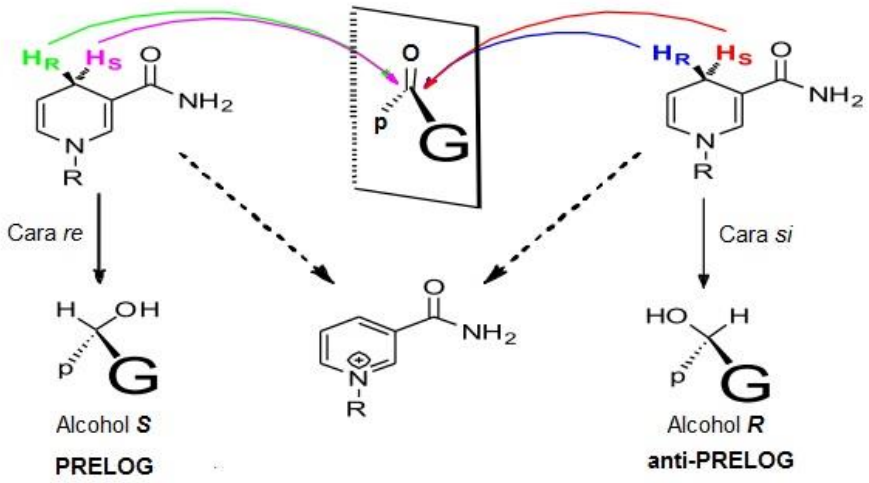


Figura 1. Mecanismo de reducción enzimática

2.3.1.1. Papel del dinucleótido de nicotinamida adenina en el metabolismo

La principal fuente de electrones para la biosíntesis reductora es el NADPH, el dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (reducido). El $NADP^+$ y el NADPH, son similares al NAD^+ y al NADH (Figura 2) respectivamente, solo que los primeros tienen un grupo fosfato adicional esterificado en C-2' en el grupo adenilato.

El NAD^+ y el $NADP^+$ son equivalentes en su tendencia termodinámica a aceptar electrones, ya que poseen potenciales estándar de reducción iguales. Sin embargo, las enzimas ligadas a los nucleótidos de nicotinamida que actúan normalmente en una dirección catabólica utilizan el par NAD^+-NADH, mientras que las que actúan principalmente en rutas anabólicas utilizan $NADP^+$-NADPH, por lo que las enzimas ligadas a los nucleótidos de nicotinamida que oxidan sustratos (deshidrogenasas) suelen emplear al NAD^+ como cofactor, mientras que las enzimas que reducen sustratos (reductasas) emplean como cofactor generalmente NADPH, el cual se sintetiza a partir del $NADP^+$ en la ruta de las pentosas fosfato, o a partir del NADH mediante la acción de

la transhidrogenasa mitocondrial ligada a la energía. El $NADP^+$ se sintetiza a partir del NAD^+ por una quinasa dependiente de ATP.[14]

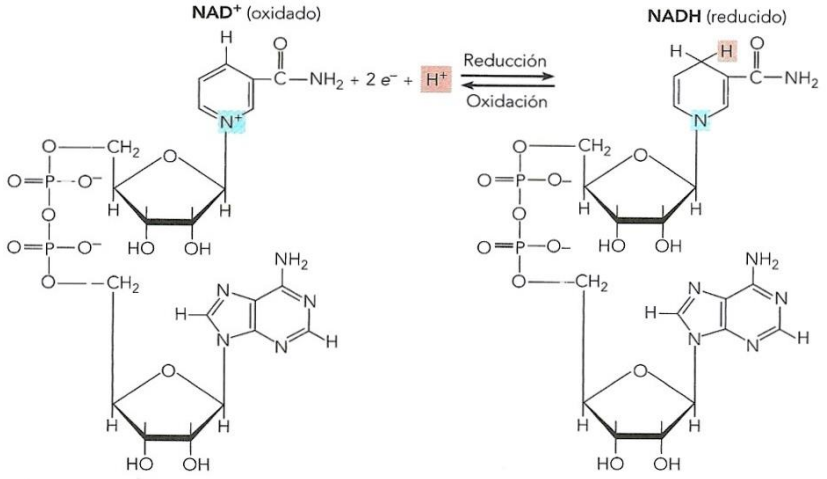


Figura 2. Reacción de reducción-oxidación del dinucleótido de nicotinamida adenina

2.4. Actinomicetales

Para el éxito del desarrollo de los bioprocesos es un prerrequisito el estudio de la eficiencia y costo efectividad de cultivos de microorganismos ya que éstos son la mayor fuente de enzimas. Las bacterias y hongos se utilizan para varias aplicaciones como la obtención de: metabolitos secundarios, productos químicos, genes para ingeniería metabólica, fabricación de biocombustibles, resolución de mezclas racémicas, evaluación ambiental de los compuestos, entre otras.[16]

El orden de los *Actinomycetales* comprende un grupo de bacterias que tienden a formar filamentos y a ramificarse; algunas familias desarrollan micelios a partir de filamentos, mientras que otras presentan filamentos cortos como sucede con la familia *Mycobacteriaceae*. Los filamentos al fragmentarse, toman formas cocoides, o adquieren la forma de difteroides. Otras familias se caracterizan por formar verdaderas esporas, que pueden ser únicas o presentarse en pares o en cadenas, las familias de los actinomicetos son:[26]

Famila I. *Actinomycetaceae*

Familia II. *Mycobacteriaceae*

Familia III. *Frankiaceae*

Familia IV. *Actinoplanaceae*
Familia V. *Dermatophilaceae*
Familia VI. *Nocardiaceae*
Familia VII. *Streptomycetaceae*
Familia VIII. *Micromonosporaceae*

2.4.1. *Nocardia*

El género *Nocardia*, pertenece a la familia *Nocardiaceae*, clase de los actinomicetos y son bacterias superiores que en muchas características se asemejan a los hongos e incluye más de 50 especies, y por lo menos 33 causan enfermedad en los seres humanos.[27]

Esta bacteria fue descrita por Edmon Nocard en 1888 a partir de una infección de bovino,[28] se distribuye geográficamente a nivel mundial, es considerada saprófita en agua dulce y salada, suelo, materia orgánica en descomposición y heces fecales de animales, es miembro común de la flora del suelo, siendo éste su hábitat preferencial, constituyendo hasta un 25 % de la microflora edáfica en zonas áridas,[29] desempeña un papel activo en la descomposición de la materia orgánica y no forma parte de la flora normal del hombre o de otros animales.[30,31]

Son bacilos aerobios estrictos, inmóviles, gram-positivos, parcialmente ácido-resistentes, con pocas exigencias nutricionales, cuyo crecimiento es lento en la mayoría de los medios no selectivos (48-72 h) a 35°C,[28] en los cuales toleran un pH entre 6.5 y 9.[29] Las colonias son de aspecto variable dependiendo del medio y tiempo de incubación, tienen olor característico a tierra húmeda, y pueden observarse como tiza blanca, salmón, rosa o café.[28] Una característica morfológica distintiva es la formación de grandes micelios ramificados que se fragmentan en formas cocoides y bacilares, esta fragmentación constituye el modo de multiplicación de la bacteria. Las pruebas bioquímicas de hidrólisis de xantina, hipoxantina, tirosina, caseína, así como las pruebas de descomposición de urea y resistencia a la lisozima permiten la diferenciación de las especies patógenas de *Nocardia* más importantes a nivel clínico (*N. asteroides, N. brasiliensis y N. otitidiscaviarum*), sin embargo estas técnicas no permiten diferenciar el complejo de *N. asteroides* de otras *Nocardias* no patógenas (*N. camea*) o de especies de otros géneros

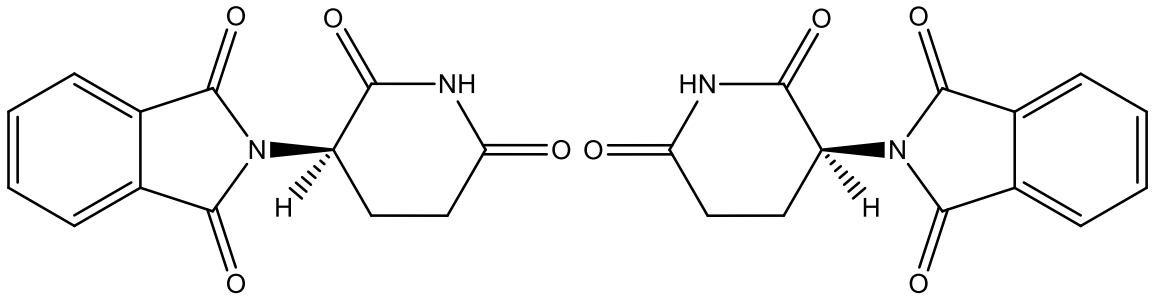
tales como *Mycobacterium, Rhodococcus, Gordonia y Tsukamurella*. Actualmente, la definición de las especies de la familia *Nocardiaceae* se basa fundamentalmente en la información filogenética molecular dada por la secuencia génica del ARN ribosomal 16S y del gen *hsp*65.[28,29]

Muchos de los productos naturales microbianos de importancia económica se obtienen a partir de los actinomicetos, después de los antibióticos, las enzimas son sus productos más importantes, las cuales son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica, textil, en terapia médica, química biorgánica y biología celular.[26]

En particular *Nocardia corallina* B-276, es de interés biotecnológico ya que ha mostrado tener la carga enzimática adecuada para biotransformar tanto sustratos macromoleculares, como moléculas pequeñas de manera selectiva,[32] teniendo actividad enzimática de nitrilo hidratasa en células suspendidas, tanto con nitrilos aromáticos como con nitrilos alifáticos.[33] Además es un microorganismo capaz de resolver alcoholes quirales vía oxidación enantioselectiva, biotransformando a uno de los enantiómeros a la cetona correspondiente, como es el caso de ariletilcarbinoles y dietilcarbinoles, donde tiene preferencia por el enantiómero (*S*), resolviendo así el enantiómero (*R*) con buenos excesos enantioméricos (>99 %*ee*) dependiendo del sustrato.[7,34] Posee un multicomponente enzimático, alqueno monoxigenasa (AMO), que cataliza la epoxidación estereoespecífica de alquenos para dar principalmente enantiómeros (*R*).[35] Kato y colaboradores reportaron la reducción de benzoato a alcohol bencílico por *Nocardia asteroides* JCM 3016.[36]

2.5. Fármacos quirales

Al tener una distribución espacial diferente, los enantiómeros de un fármaco quiral se relacionan también de manera diferente con su diana molecular, ya que ésta es una estructura quiral tridimensional capaz de distinguir los enantiómeros e interactuar con ellos de forma diferente, lo cual puede causar que cada enantiómero tenga distinta actividad farmacodinámica y diferentes propiedades farmacocinéticas; por ejemplo, un enantiómero puede tener actividad farmacológica terapéutica y el otro no tenerla, estar disminuida o tener actividad tóxica.[9] El ejemplo más significativo es el de la talidomida (Figura 3), ya que el enantiómero (*S*) resultó ser un potente teratogénico fetal, como se observó con los niños nacidos en los años 50 con focomegalia, mientras que el enantiómero (*R*) tiene actividad sedante.[37]



(R)-Talidomida
Sedante

(S)-Talidomida
Teratogénico

Figura 3. Enantiómeros de la talidomida

En 1987 la FDA formuló un grupo de pautas a seguir en la presentación de nuevas solicitudes de medicamentos cuando fue abordado directamente el tema de la estereoquímica en la fabricación de principios activos, mismas que se publicaron finalmente en 1992 y estipulaban que la acción de cada enantiómero de un producto farmacéutico debería ser caracterizada individualmente. Esta regulación llegó a ser el principal motivo para los investigadores y compañías farmacéuticas para buscar procesos químicos o bioquímicos que dieran lugar a compuestos enantioméricamente puros.[38]

En la actualidad la industria química ha ido desarrollando nuevos métodos de síntesis enzimática y de fermentación, para obtener aminoácidos, aminoalcoholes, alcoholes, aminas y epóxidos enantioméricamente puros como intermediarios para la industria

farmacéutica y agroquímica, donde se requieren grandes cantidades de compuestos con un alto grado de pureza.[38]

En los casos en los que uno de los enantiómeros no tiene actividad o es menor con respecto al otro, es común que sean distribuidos comercialmente como una mezcla racémica. Por otro lado, usar el enantiómero puro activo en vez de la mezcla racémica puede presentar diferentes ventajas, como un perfil farmacocinético menos complejo, mayor afinidad y potencia, menores interacciones con otros fármacos e incluso menores efectos adversos.[9]

2.5.1. Clopidogrel

El clopidogrel es el fármaco más vendido a nivel mundial administrado a pacientes arterioescleróticos,[39] es usado ampliamente para la prevención y tratamiento de infarto al miocardio y enfermedades cerebrovasculares[40] con ventas mundiales de 10 billones de dólares por año,[41] el mecanismo por el cual actúa se lleva a cabo por inhibición de los mecanismos ADP-dependientes inhibiendo así la agregación plaquetaria.[42] Es un miembro del grupo de las tienopiridinas, fármacos antiplaquetarios, es un éster carboxílico que contiene un carbono quiral.[43] El enantiómero (*S*) (Figura 4) tiene actividad antiplaquetaria, mientras que su enantiómero (*R*) carece de actividad y a dosis más altas puede provocar convulsiones en ratones[40] esto implica que el contenido del enantiómero (*R*) debe ser controlado cuidadosamente en los productos farmacéuticos.[43] El clopidogrel es inactivo *in-vitro* por lo que es necesaria una biotransformación hepática para que se exprese la actividad antiagregante del fármaco.[44]

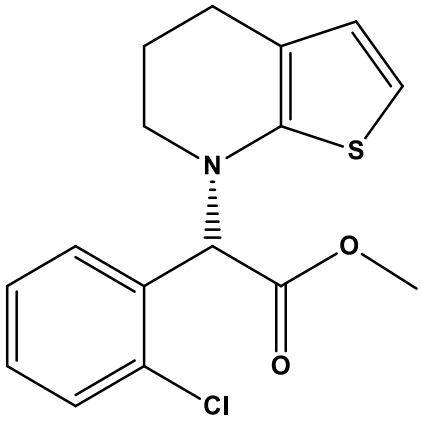


Figura 4. (*S*)-clopidogrel

2.5.1.1. 2-cloromandelato de metilo (1A)

Tanto el ácido (*R*)-2-cloromandélico como el 2-cloromandelato de metilo (**1A**) (Figura 5) con configuración (*R*), son sintones quirales clave para la síntesis del (*S*)-clopidogrel.[39] El ácido (*R*)-2-cloromandélico puede ser obtenido de su mezcla racémica a través de una cristalización diasteromérica o por la hidrólisis enantioselectiva de sus correspondientes nitrilos[45,46] y ésteres racémicos.[47] El (*R*)-2-cloromandelato de metilo se ha producido por reducción asimétrica del 2-clorobenzoilformiato de metilo con microorganismos como la *E. coli* recombinante.[48]

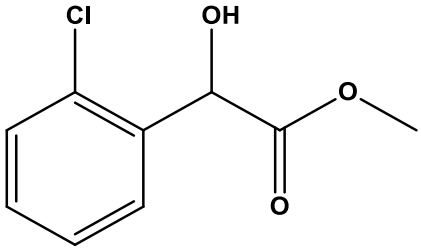


Figura 5. 2-cloromandelato de metilo (**1A**)

2.5.2. Fluoxetina

La mayoría de los antidepresivos ejercen efectos importantes en el metabolismo de los neurotransmisores (monoaminas) y de sus receptores, en particular noradrenalina y serotonina.[49] La fluoxetina está indicada para el tratamiento de la depresión, ansiedad, dolor crónico y bulimia[50] así como también ha sido utilizada para pacientes con trastorno bipolar y ataques de pánico.[51] La fluoxetina se clasifica como inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina.[49]

Químicamente es un aminoalcohol quiral con dos estereoisómeros que presentan la misma actividad de inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina con igual potencia tanto *in-vitro* como *in-vivo*. El enantiómero (*R*) es menos benéfico que su mezcla racémica ya que aumenta sus efectos adversos, sin embargo, *in*-vivo, el enantiómero (*S*) de la fluoxetina (Figura 6) tiene una duración ligeramente mayor que el enantiómero (*R*).[52]

En el humano, su metabolismo es fuertemente dependiente del citocromo P450 (CYP2D6). La principal vía metabólica es la *N*-desmetilación a norfluoxetina;[53] los principales metabolitos de la fluoxetina son: norfluoxetina, fluoxetina, conjugados de norfluoxetina y ácido hipúrico, juntos pueden sumar el 95% de la dosis administrada. La concentración en plasma de la norfluoxetina es comparable con la de fluoxetina en el estado estacionario, sin embargo el metabolito de la (*S*)-fluoxetina, la (*S*)-norfluoxetina, es igual de efectivo que la (*S*)-fluoxetina, mientras que la (*R*)-norfluoxetina es un inhibidor débil.[52]

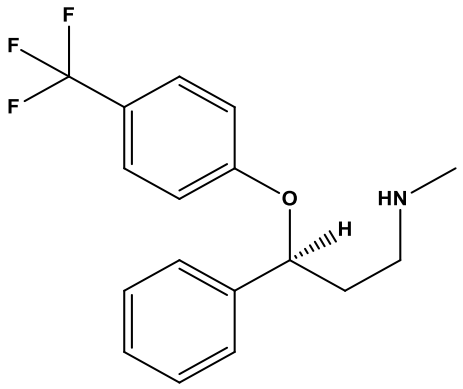


Figura 6. (*S*)-fluoxetina

2.5.2.1. 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (2A)

Los β-hidroxiésteres son sintones importantes en síntesis orgánica, actualmente los métodos biocatalíticos para obtener estos compuestos han recibido gran atención, el 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) (Figura 7), es un intermediario farmacéutico importante para la síntesis de fluoxetina, este sintón quiral se puede obtener por biorreducción enantioselectiva del 3-oxo-3-fenil-propanoato de etilo (**2**).[50]

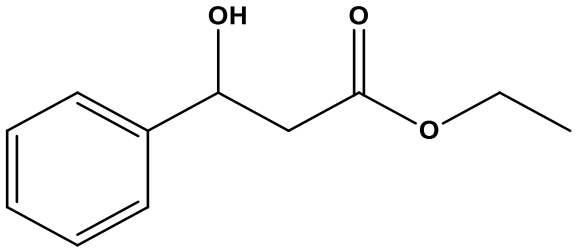


Figura 7. 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**)

2.5.2.2. 1-fenil-1-propanol (3A)

A nivel farmacológico el 1-fenil-1-propanol o carbicol (Figura 8), tiene actividad colerética (estimula la expulsión de la bilis retenida en la vesícula)[34] y es usado como intermediario para la síntesis de fluoxetina.[54] Además es un importante intermediario quiral usado para la síntesis de compuestos quirales más complejos con un alto valor comercial, por ejemplo, su enantiómero (*S*) Sigma-Aldrich lo vende actualmente a $3,626.00 pesos por mL y el (*R*) a $3,789.00 pesos,[55] tiene fragancia floral y un efecto balsámico por lo que es usado en perfumería y como aditivo alimentario, permitido en la adición directa en comida para consumo humano. Se le puede encontrar presente en la cerveza de mijo.[56]

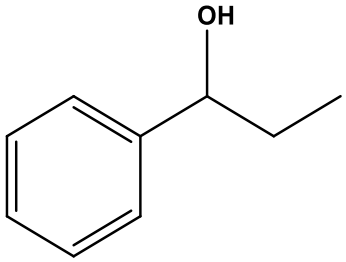


Figura 8. 1-fenil-1-propanol (**3A**)

2.6. Separaciones quirales por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La cromatografía es un método muy empleado para la separación, identificación y determinación de los componentes de una mezcla que pasa a través de una fase estacionaria mediante una fase móvil, la separación se basa en las diferentes velocidades de migración entre los componentes de la fase móvil.[57]

Los procesos de separación de enantiómeros involucran el uso de cromatografía de gases, cromatografía de fluidos supercríticos y cromatografía de líquidos de alta resolución siendo ésta la más ampliamente utilizada.[51]

La separación cromatográfica de enantiómeros puede ser de dos formas, por separación directa, que está basada en la formación de complejos diastereoméricos lábiles con un agente quiral complejo en la fase móvil o estacionaria; o por separación indirecta, la cual está basada en la formación de derivados de diasteroisómeros con enlaces covalentes entre el soluto y un reactivo ópticamente activo antes de la separación cromatográfica.[58]

En el transcurso de las últimas décadas se han descrito un gran número de fases estacionarias quirales y algunas son comercialmente accesibles. Entre ellas, las que han tenido gran aplicación por su estabilidad, eficiencia y su capacidad de resolución son las que se componen de polisacáridos y proteínas.

Las fases estacionarias de polisacáridos están preparadas con capas de derivados de celulosa o amilosa (acetatos, benzoatos o carbamatos) en una matriz de sílica gel pretratada y pueden ser usadas como fase normal o reversa. El principal sitio quiral adsorbente de los acetatos y benzoatos es su grupo carbonilo polar, el cual interactúa con los racematos a través de puentes de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo. En los carbamatos, el soluto puede interaccionar con el grupo C=O a través de interacciones dipolo-dipolo y con el grupo NH a través de puentes de hidrógeno.[59]

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años, la obtención y separación de principios activos enantioméricamente puros, ha cobrado una creciente importancia debido al gran número de ventajas frente al empleo de mezclas racémicas. Esto ha llevado al desarrollo y mejoramiento de métodos de identificación y obtención de compuestos enantiopuros, actualmente 134 procesos industriales utilizan la biotransformación como medio de producción y el 55% de éstos corresponde al sector farmacéutico. De esta forma la biotransformación ha resultado una herramienta útil en síntesis orgánica debido a que las reacciones no sólo son regioespecíficas y estereoselectivas, sino que también se pueden ser estereoespecíficas, mediante el empleo de sistemas biológicos (células microbianas, vegetales o animales o sus enzimas aisladas). Por lo cual se estudió la reducción enantioselectiva del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y el 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) los cuales son intermediarios para las síntesis de Clopidogrel (antiagregante plaquetario) y de Fluoxetina (antidepresivo) respectivamente, usando como modelo previo a la propiofenona (**3**) con células de *Nocardia corallina.*

4. HIPÓTESIS

Es posible obtener los productos de las reducciones enantioselectivas del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) utilizando diferentes relaciones sustrato:células húmedas de *Nocardia corallina* B-276.

5. OBJETIVO GENERAL

Reducir el 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y el 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) mediante su biotransformación con células de *Nocardia corallina* B-276.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar el 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y el 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y sus respectivos alcoholes, (**1A**) y (**2A**).
2. Caracterizar por IR y RMN (^{1}H, ^{13}C) las cetonas y los alcoholes secundarios.
3. Desarrollar el método analítico que permita el seguimiento de las biotransformaciones con *Nocardia corallina* de las materias primas (cetonas) y de los productos (alcoholes secundarios).
4. Estudiar la reducción del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**), del éster 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y de la propiofenona (**3**) con células aisladas de *Nocardia corallina* B-276, utilizando diferentes relaciones de sustrato:células húmedas en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Instrumentos y Equipos

1. Espectrofotómetro de infrarrojo (IR) Perkin-Elmer Paragon 1600 FT, FT-IR System.
2. Resonancia magnética nuclear (RMN) Varian Mercury DMX400 de 400 MHz y Agilent DD2 600MHz con OneNMRProbe.
3. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent 1100 con detector de UV/visible de arreglo de diodos.
4. Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard HP 6890 equipado con un detector de ionización de flama, usando N_2 como gas acarreador.
5. Agitador rotatorio REVCO.
6. Centrífuga IEC centra MP4 International Equipment Company.
7. Autoclave Metron.
8. Campana de flujo laminar VLF6 Misonix.

6.2. Insumos Químicos

Las materias primas, propiofenona (**3**), 1-fenil-1-propanol (**3A**) y cloruro de benciltrietilamonio se adquirieron de Sigma Aldrich, el ácido 2-cloromandélico, ácido (*R*)-2-cloromandélico de Alfa Aesar, el 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) de Merck, los reactivos y disolventes utilizados para las síntesis fueron grado reactivo (J.T. Baker, Aldrich y Merck), los reactivos para el crecimiento de *Nocardia corallina* de Bioxon y Merck, los disolventes grado CLAR de Tecsiquim y J.T. Baker, sílica gel para columna flash (200-400 mm) de Merck.

6.3. Síntesis Química

Se sintetizaron las siguientes materias primas: La cetona (**1**) y los alcoholes (**1A, 2A**) con la finalidad de desarrollar los métodos analíticos y utilizarlos como referencia para las biotransformaciones.

Para la síntesis del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) (Figura 9), se esterificó el ácido 2-cloromandélico y el ácido (*R*)-2-cloromandélico, con el cual se desarrolló el método CLAR para identificar el tiempo de retención de este enantiómero, en la reducción de (**1**).

6.3.1. Obtención del 2-cloromandelato de metilo (1A)

En un matraz balón de 50 mL se pesaron 280 mg (1.5 mmol) del ácido 2-cloromandélico, se adicionaron 10 mL de metanol (MeOH) y 4 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4 conc.). La mezcla se calentó a reflujo por 24 h, la reacción se monitoreó por Cromatografía en Capa Fina (CCF). Cuando la materia prima se consumió por completo, el disolvente se evaporó a presión reducida, se neutralizó el H_2SO_4 con solución saturada de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), se extrajo el producto con cloruro de metileno (CH_2Cl_2) (3 x 20 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y se evaporó el disolvente a presión reducida.[44] El producto se caracterizó por IR y RMN (^1H y ^{13}C).

6.3.1.1. Obtención del (*R*)-2-cloromandelato de metilo

En un matraz balón de 50 mL se pesaron 17.2 mg (0.09 mmol) del ácido (*R*)-2-cloromandélico, se adicionaron 10 mL de metanol (MeOH) y 4 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4 conc.). La mezcla se calentó a reflujo por 24 h, la reacción se monitoreó por Cromatografía en Capa Fina (CCF). Cuando la materia prima se consumió por completo, el disolvente se evaporó a presión reducida, se neutralizó el H_2SO_4 con solución saturada de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), se extrajo el producto con cloruro de metileno (CH_2Cl_2) (3 x 20 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y se evaporó el disolvente a presión reducida.[44] El producto se caracterizó por IR y RMN (^1H y ^{13}C).

6.3.2. Obtención del 2-clorobenzoilformiato de metilo (1)

La síntesis del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**), se realizó por dos métodos (A y B):

Método A. En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se pesaron 50 mg (0.25 mmol) del 2-cloromandelato de metilo (**1A**), se disolvieron en 1 mL de acetato de etilo (AcOEt) y 2 mL de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10%, se adicionó una pizca de cloruro de benciltrietilamonio ($C_6H_5CH_2N(Cl)(C_2H_5)_3$) como catalizador de transferencia de fase. La mezcla se agitó por 24 h a temperatura ambiente, el crudo de reacción se extrajo con AcOEt (3 x 1.5 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y se evaporó el disolvente a presión reducida,[60] el residuo se purificó por cromatografía en columna con sílica gel con una mezcla eluyente hexano:acetato de etilo (90:10), las fracciones se analizaron por IR.

Método B. Preparación del reactivo de Jones. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL, con 5mL de H_2SO_4 conc. se le adicionaron lentamente 5 g (0.05 mol) de óxido de cromo VI (CrO_3) y se agregaron cuidadosamente 15 mL de agua destilada.
Se pesaron en un matraz bola de 50 mL 21.3 mg (0.106 mmol) de 2-cloromandelato de metilo, con agitación y baño de hielo se adicionó gota a gota el reactivo de Jones hasta que la mezcla tuvo una coloración naranja constante, se retiró el baño de hielo y se agitó 1 h, monitoreando la reacción por Cromatografía en Capa Fina (CCF). Se adicionaron 5 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2 M hasta que ya no se observó la formación de precipitado. El crudo de reacción se extrajo con éter etílico (3 x 5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida.[61] El residuo se purificó por cromatografía en columna con sílica gel con una mezcla eluyente de hexano:acetato de etilo (90:10). Las fracciones se analizaron por IR y el producto por RMN ^1H y RMN ^{13}C.

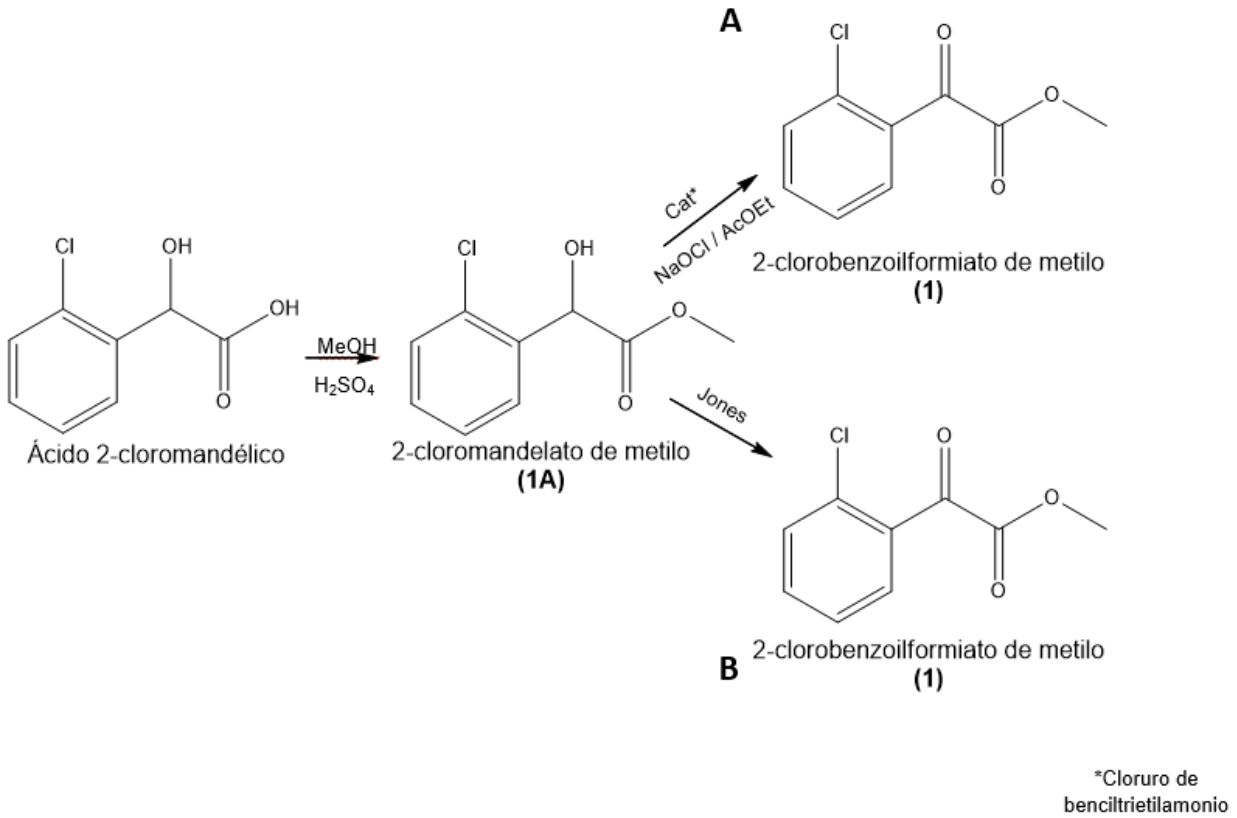


Figura 9. Síntesis del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**)

6.3.3. Obtención del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (2A)

La síntesis del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) (Figura 10) se realizó con borohidruro de sodio ($NaBH_4$) por dos procedimientos de aislamiento, A y B.

A.[62] En un matraz de dos bocas de 50 mL se pesaron 60 mg (0.31 mmol) de 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y se disolvieron en 5 mL de MeOH bajo atmósfera de nitrógeno. Se adicionaron lentamente 19 mg (0.5 mmol) de $NaBH_4$, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación con atmósfera de nitrógeno a 0-5°C por 1 h; se le agregaron 5 mL de solución saturada de NaCl y se agitó por 10 min más a temperatura ambiente. La mezcla fue diluida con la adición de 2.5 mL de AcOEt y 2.5 mL de agua destilada. Se separó la fase orgánica, y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 5 mL), las fases orgánicas se lavaron con 5 mL de solución saturada de NaCl, se secaron con Na_2SO_4 anhidro, y se evaporó el disolvente a presión reducida, el residuo se purificó por cromatografía en columna con sílica gel con una mezcla eluyente hexano:acetato de etilo (80:20). Las fracciones se analizaron por IR.

B.[63] En un matraz Erlenmeyer de 50 mL se pesaron 60 mg (0.31 mmol) de (**2**), se adicionaron 5 mL de EtOH y 19 mg (0.5 mmol) de $NaBH_4$, la mezcla se mantuvo en agitación constante monitoreando la reacción por Cromatografía en Capa Fina (CCF). La mezcla de reacción se aciduló con HCl 10% hasta pH ligeramente ácido, se agregaron 10 mL de agua fría con agitación, el crudo de reacción se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 5 mL); se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna con sílica gel con una mezcla eluyente hexano:acetato de etilo (80:20). Las fracciones se analizaron por IR y el producto por RMN ^1H y RMN ^{13}C.

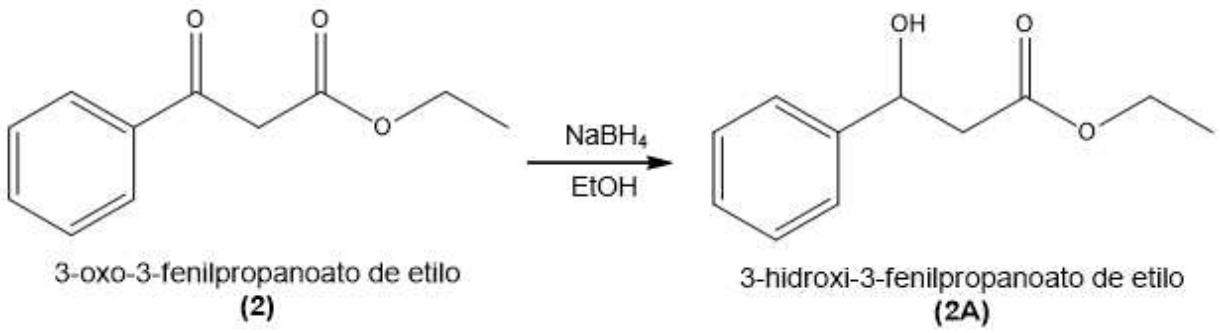


Figura 10. Obtención del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**)

6.4. Métodos analíticos por Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Se pesaron 5 mg de los compuestos estudiados, se disolvieron en 1 mL de isopropanol CLAR y las muestras se filtraron por membrana de nailon de 0.20 µm.

Se desarrollaron los métodos analíticos de los compuestos por cromatografía de gases (CG), para calcular la relación de alcohol/cetona de las biotransformaciones y por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para calcular el exceso enantiomérico (*ee*).

6.4.1. Desarrollo de los métodos analíticos del 2-cloromandelato de metilo (1) y 2-clorobenzoilformiato de metilo (1A)

Para CG se probaron diferentes condiciones con una columna Supelcowax™-10, inyector y detector a 250°C con flujo de 1 mL/min a diferentes temperaturas del horno, 180, 190, 200, 210, 220 y 230°C.

Para CLAR[60] con una columna quiral Chiralcel OD (25.0 x 0.46 cm L X ID), fase móvil hexano:isopropanol (90:10), a diferentes λ: 220, 215, 235, 245 y 254 nm y flujos de 0.6, 0.8 y 1.0 mL/min y con volumen de inyección de 5 µL a 25°C.

6.4.2. Desarrollo de los métodos analíticos del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (2) y 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (2A)

Para CG se probaron varias condiciones con diferentes columnas: Supelcowax™-10; HP-5; Gamma-Dex™120 y SPB™-50, varios flujos y temperaturas.

Condiciones para la columna SPB™-50, flujo de 1 mL/min con una rampa de temperatura iniciando desde 40°C y aumentándola 10°C/min hasta los 210°C, manteniéndola durante 8 min.

Para CLAR con una columna quiral Chiralcel OD (25.0 x 0.46 cm L X ID), donde se probaron varias relaciones de fases móviles con hexano:isopropanol (90:10), (95:5), (94:6) y (97:3), a diferentes λ: 210, 215, 220, 230, 254, 270 y 280 nm, con flujo de 1.0 mL/min con volumen de inyección de 5 µL a 25°C.

6.4.3. Desarrollo de los métodos analíticos para propiofenona (3) y 1-fenil-1-propanol (3A)

Para CG se probaron diferentes condiciones con una columna Supelcowax™-10, inyector y detector a 250°C, temperaturas del horno a 150 y 180°C y flujos de 0.6 y 0.8 mL/min.

Para CLAR por dos métodos; el primero[64] con una columna quiral Chiralcel OB-H (25.0 x 0.46 cm L X ID), fase móvil hexano:isopropanol (90:10), a λ de 220 y 254 nm, flujo de 0.5 mL/min con volumen de inyección de 5 µL a 25°C; el segundo método,[65] con una columna quiral Chiralcel OD (25.0 x 0.46 cm L X ID), fase móvil hexano:isopropanol 97:3, a λ de 220 y 254 nm, flujo de 0.8 mL/min con volumen de inyección de 5 µL a 25°C.

6.5. Obtención de biomasa de *Nocardia corallina* B-276

Crecimiento en medio sólido en placas de agar con la siguiente composición, extracto de carne 3 g/L, peptona de carne 5 g/L y agar bacteriológico 15 g/L, ajustando el pH a 6.8 con NaOH al 2%, esterilizando previamente el medio a 15 lb/pulg^2 de presión y 120°C durante 15 min, el medio se colocó en cajas Petri, se realizó la prueba de esterilidad a 37°C por 24 h, se sembró la cepa de *Nocardia corallina* B-276 y se incubó a 28-30°C por 72-96 h.

Crecimiento en medio de cultivo líquido con la siguiente composición, extracto de levadura 10g/L y glucosa 10 g/L, se ajustó el pH a 8.5 con KOH al 50 % (p/v), se esterilizó a 15 lb/pulg^2 de presión y 120°C durante 15 min. Se incubó con bacterias de *Nocardia corallina* y se incubó a 28-30°C agitando a 150 rpm por 96 h.

Después del tiempo de incubación, las células se separaron del medio líquido por centrifugación a 4500 rpm por 15 min, se decantó el sobrenadante y se tomó el pH de éste. Las células obtenidas se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7.0 y centrifugándolas cada vez a 4500 rpm por 15 min. Se pesaron las células para cuantificar la biomasa.[6]

6.6. Biotransformaciones

Para activar las células de *Nocardia* corallina B-276 se incubaron en 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7.0 durante 30 min a 28-30°C a 150 rpm, se añadió el sustrato en una relación sustrato:células húmedas de 1:500 (p/p), previamente disuelto en 0.5 mL de *N,N*-dimetilformamida, se mantuvo en agitación bajo las mismas condiciones a diferentes tiempos de biotransformación.

6.6.1. Tratamiento de las muestras

Se adicionaron a la mezcla de biotransformación 0.3 g de NaCl y se agitó por 20 min más. Las células se separaron por centrifugación a 4500 rpm por 15 min. Se extrajo el producto del sobrenadante con el disolvente apropiado por triplicado, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó el disolvente a presión reducida.

El producto se disolvió en 1 mL de isopropanol grado CLAR, las muestras se filtraron por membrana de nailon de 0.20 µm y se colocaron en un vial para su posterior análisis por CG y CLAR.[6]

6.6.2. Control negativo

Para cada biotransformación se realizaron blancos de células de *Nocardia corallina* en 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0 bajo las mismas condiciones de biotransformación.[6]

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Síntesis Química

7.1.1. Obtención del 2-clorobenzoilformiato de metilo (1)

Se obtuvo el 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) por medio de una ruta sintética de dos pasos partiendo del ácido 2-cloromandélico, el primer paso la esterificación y el segundo en la oxidación del alcohol secundario, Figura 9.

Para la esterificación se realizaron cuatro lotes (Tabla 2), obteniendo el mayor rendimiento de 97.3% en el lote tres.

Tabla 2. Síntesis del 2-cloromandelato de metilo (**1A**)

Lote	ác. 2-cloromandélico g/(mmol)	MeOH mL/(mmol)	Tiempo (h)	Producto g/(mmol)	Rendimiento (%)
1	0.28/1.5	10/247.1	24	0.265/1.32	90.0
2	0.5/2.7	20/494.2	24	0.484/2.4	91.9
3	1.5/8.04	60/1482.7	24	1.538/7.67	97.3
4	1.0/5.36	40/988.5	24	0.846/4.22	81.7

Para la oxidación del alcohol 2-cloromandelato de metilo (**1A**), se realizaron tres lotes (Tabla 3), variando la cantidad de NaOCl y AcOEt.

Tabla 3. Oxidación del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) con NaOCl

Lote	2-cloromandelato de metilo g/(mmol)	NaOCl al 10%/AcOEt (mL/mL)	Rendimiento (%)
1	0.0525/0.26	2/1	11.6
2	0.054/0.27	2/1	13.4
3	0.0204/0.10	4/3	9.1

Dado que la oxidación con NaOCl los rendimientos son muy bajos (13.4%), se utilizó la oxidación con el reactivo de Jones, obteniéndose un rendimiento del 62.3%.

7.1.1.1. Caracterización por IR del ácido 2-cloromandélico, del 2-cloromandelato de metilo (1A) y del 2-clorobenzoilformiato de metilo (1)

En el espectro IR del ácido 2-cloromandélico (Figura 11) se observan las señales características del grupo –OH del ácido a 3410 cm^{-1} y su correspondiente C=O (C8) a 1720 cm^{-1}, los sobretonos a 1932 cm^{-1} del fenilo y la señal de estiramiento a 750 cm^{-1} del C-Cl (C1), y después de su esterificación, en el espectro de IR del compuesto (**1A**) (Figura 12) se observa la señal del -OH del alcohol a 3449 cm^{-1} (C7), la señal del C=O del éster a 1736 cm^{-1} (C8) junto con las dos señales intensas a 1219 y 1086 cm^{-1} correspondientes al estiramiento C-O del mismo grupo, y a 754 cm^{-1} la señal del C-Cl (C1), lo que nos confirma la obtención del compuesto (**1A**).

En el espectro de IR del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) (Figura 13), se observó la ausencia de la señal del alcohol y la presencia de dos señales de C=O, una a 1739 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster (C8) y otra a 1697 cm^{-1} que indica la presencia del carbonilo de la cetona formada (C7), además de la señal de estiramiento del C-O del éster a 1205 cm^{-1} y la permanencia de la señal de C-Cl a 759 cm^{-1}.

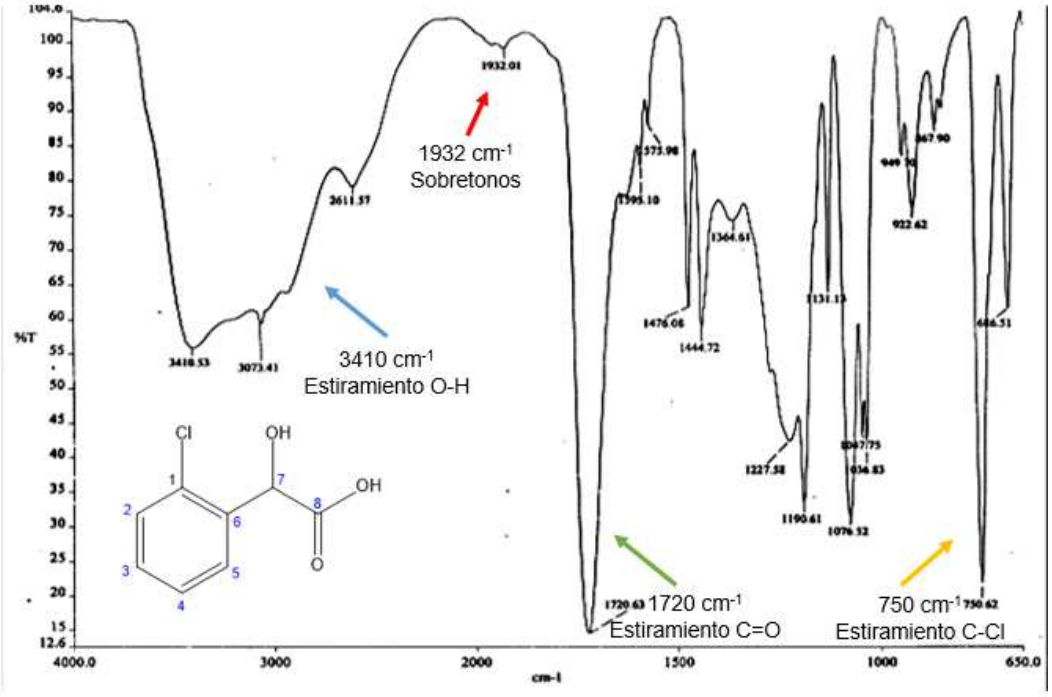


Figura 11. Espectro de IR del ácido 2-cloromandélico

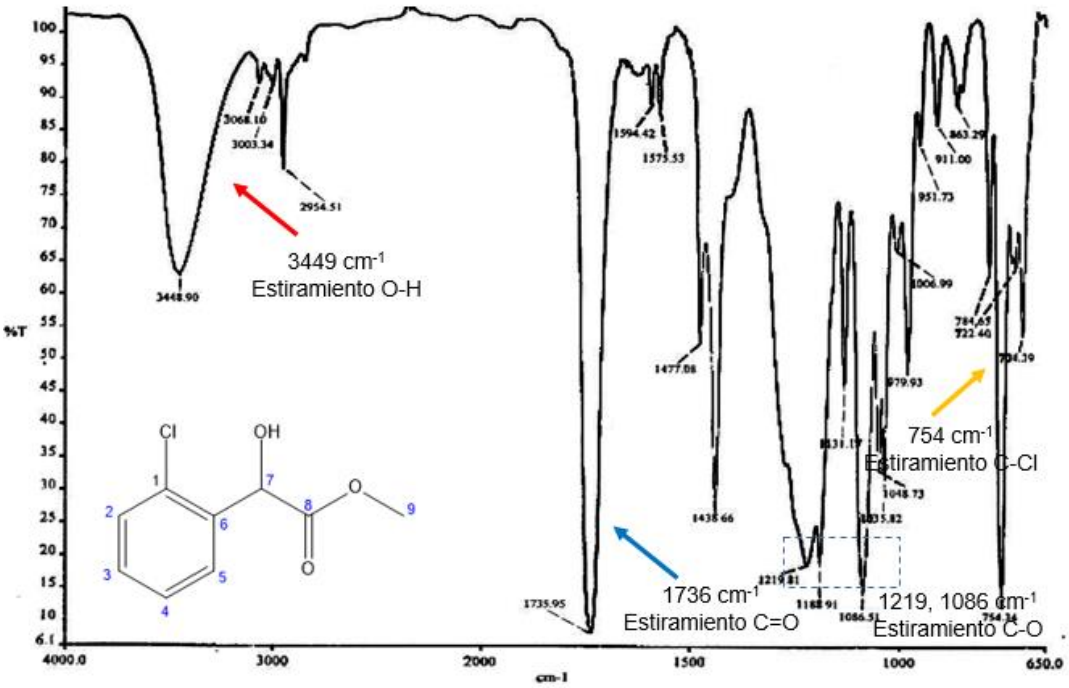


Figura 12. Espectro de IR del 2-cloromandelato de metilo (**1A**)

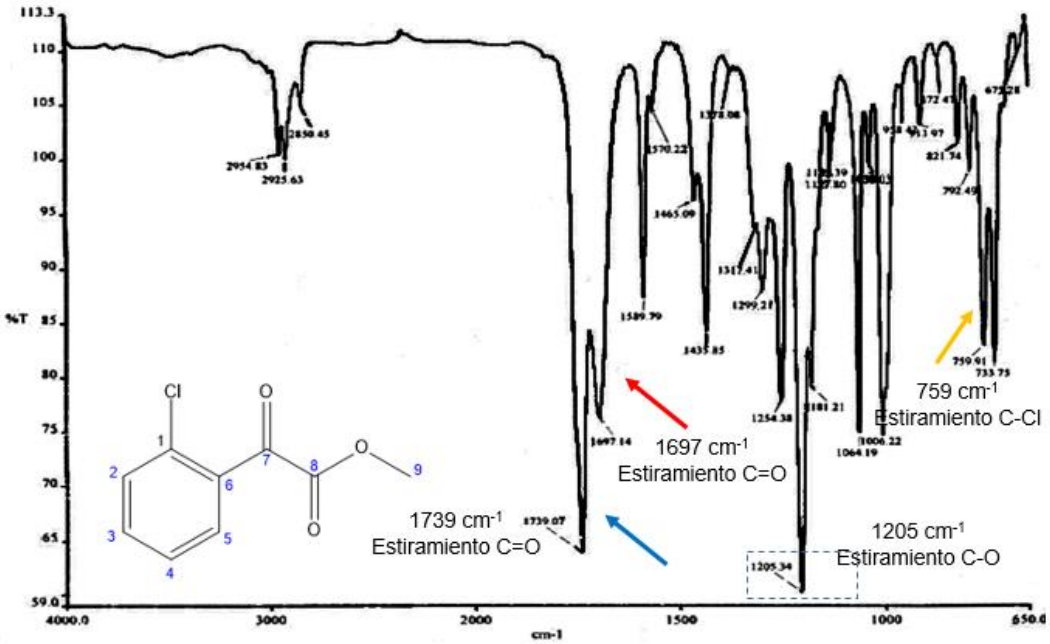


Figura 13. Espectro de IR del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**)

7.1.1.2. Caracterización por RMN del 2-cloromandelato de metilo (1A) y del 2-clorobenzoilformiato de metilo (1)

Se realizó el análisis de RMN ^{1}H del 2-cloromandelato de metilo (**1A**), (Figura 14). Entre 7.2 y 7.5 ppm se observan las señales de los hidrógenos de la parte aromática, a 5.6 ppm la señal del singulete del -CH unido al alcohol, a 3.8 ppm la señal simple del $–CH_3$ y a 3.5 ppm la señal del hidrógeno del -OH; por RMN ^{13}C se observa el carbonilo del éster a 174 ppm (C8) y a 70 ppm el carbono del metino unido al –OH (C7) (Figura 15).

En el espectro de RMN ^{1}H del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**), (Figura 16) se observa la desaparición de la señal del -CH en 5.5 ppm y la del hidrógeno del –OH en 3.5 ppm, así como la aparición de la señal por RMN ^{13}C a 186 ppm del carbono de la cetona (C7) y a 163 ppm del éster (C8) con la desaparición de la señal del carbono del metino unido a 70 ppm (Figura 17), con lo que se comprueba que se obtuvo el 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**).

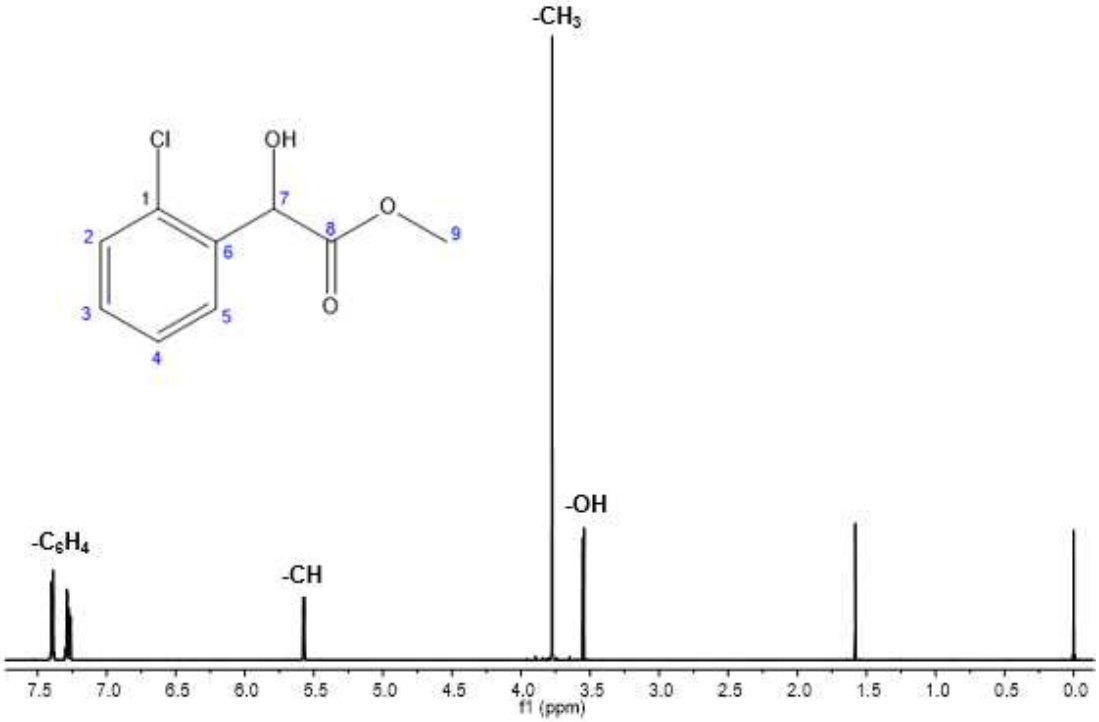


Figura 14. Espectro de RMN ^{1}H del 2-cloromandelato de metilo (**1A**), en $CDCl_3$

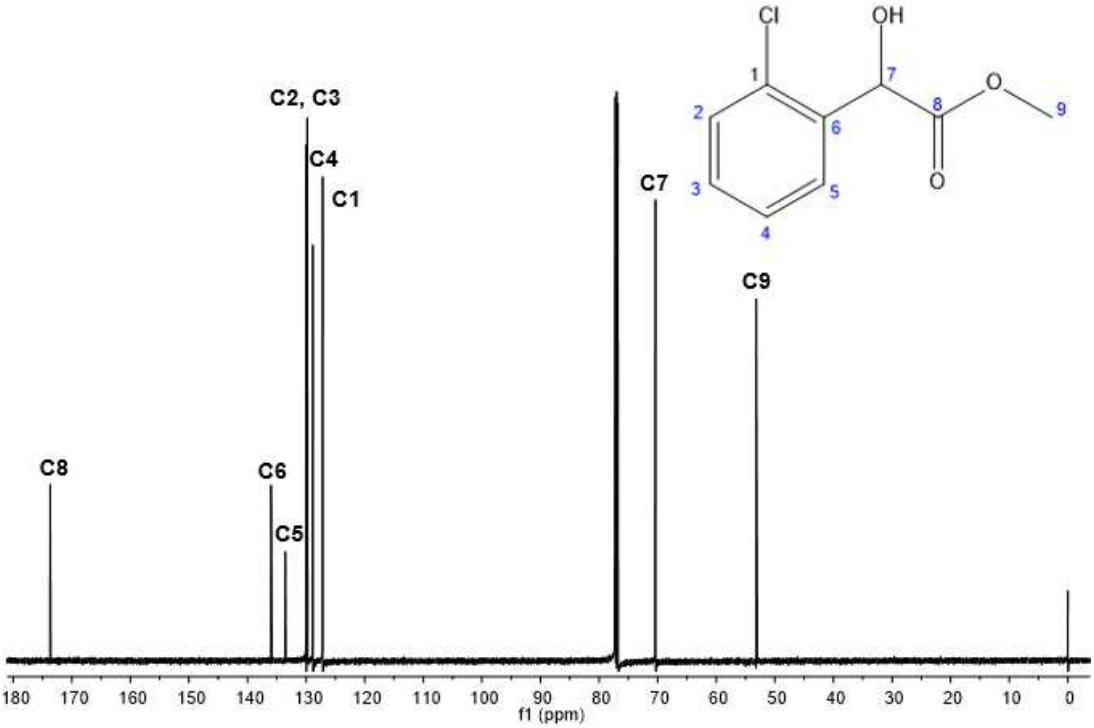


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C del 2-cloromandelato de metilo (**1A**), en $CDCl_3$

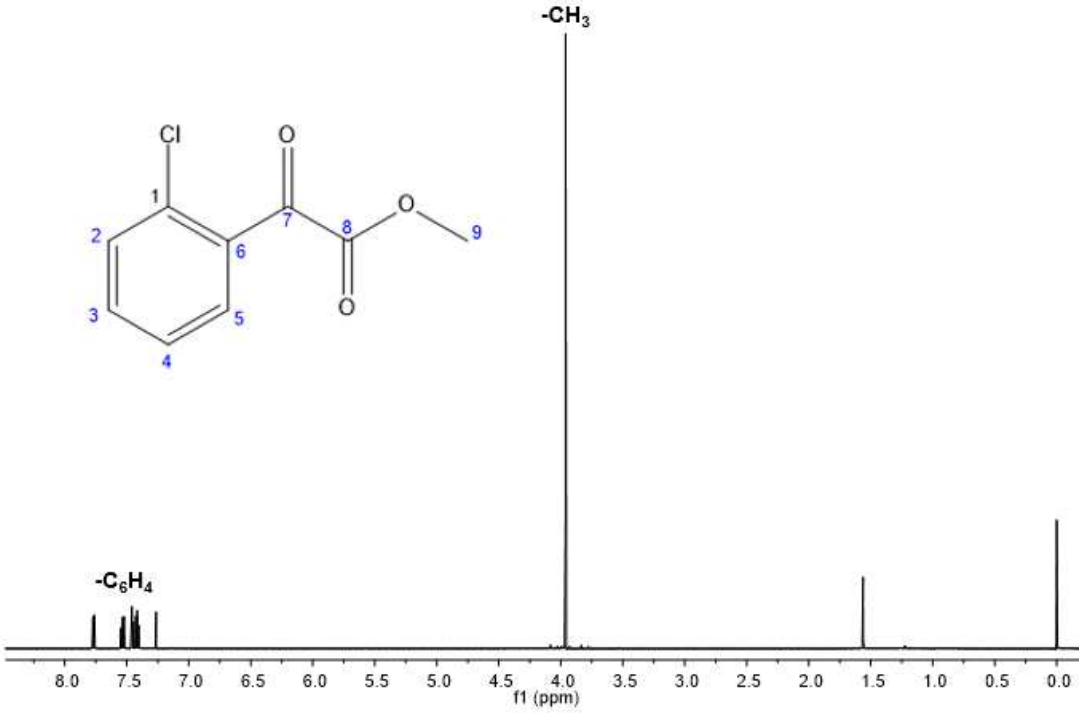


Figura 16. Espectro de RMN de ^{1}H del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**), en $CDCl_3$

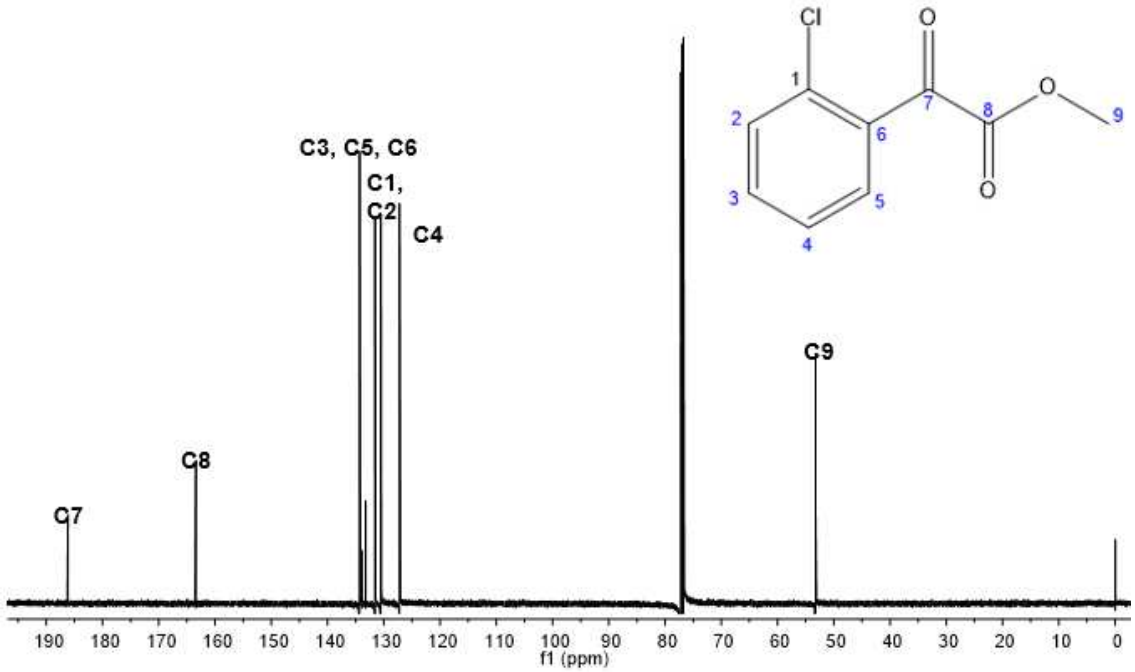


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**), en $CDCl_3$

7.1.2. Obtención del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (2A)

Se realizó la reducción del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) con $NaBH_4$ usando dos procedimientos, con el procedimiento A no se obtuvo el alcohol, ya que no se observó la señal del protón del -OH a 3.6 ppm por RMN. Con el procedimiento B se obtuvieron 32.7 mg del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**) para un 54% de rendimiento, la diferencia entre los procedimientos fue el aislamiento del compuesto.

7.1.2.1. Caracterización por IR del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (2) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (2A)

En el análisis espectroscópico por IR del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) (Figura 18) aparecen las dos señales del C=O, una correspondiente al éster (C9) a 1737 cm^{-1} y la otra al grupo cetona (C7) a 1686 cm^{-1}, además de las señales de estiramiento de C-O del éster a 1266 y 1196 cm^{-1}. Después de la reducción, en la Figura 19, se muestra la señal de estiramiento característica del –OH del alcohol (C7) a 3449 cm^{-1} y una señal a 1714 cm^{-1} del C=O del éster (C9) y la señal de C-O del mismo grupo a 1155 y 1026 cm^{-1}, con lo que se confirma así la reducción de la cetona.

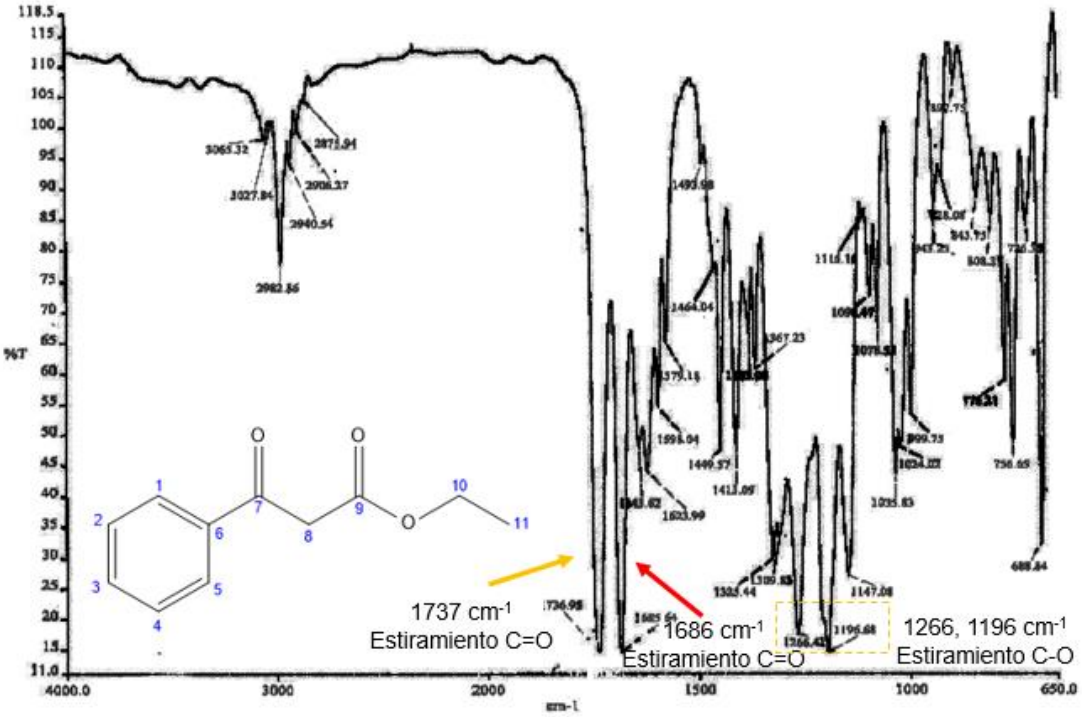


Figura 18. Espectro de IR del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**)

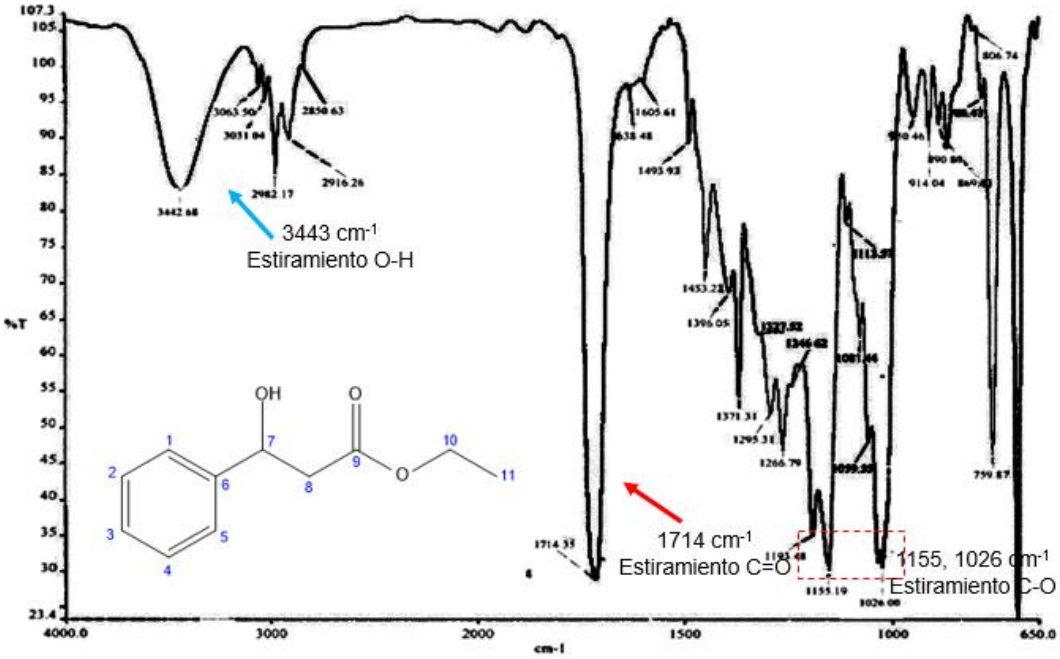


Figura 19. Espectro de IR del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**)

7.1.2.2. Caracterización por RMN de los compuestos 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (2) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (2A)

Se realizó el análisis de RMN de ^{1}H del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) (Figura 20), en donde se observan las señales de los hidrógenos del grupo fenilo entre 8 y 7 ppm, a 3.95 ppm la señal simple del metileno y a 4.25 y 1.25 ppm el $–CH_2$ y $–CH_3$ del radical etilo. Por RMN de ^{13}C (Figura 21) aparece a 192 ppm el carbonilo de la cetona (C7) y el del éster (C9) a 168 ppm. Después de la reducción se observa en el espectro de RMN ^{1}H (Figura 22) una señal múltiple a 2.71 ppm que corresponde al $–CH_2$ vecino al carbonilo del éster, observándose también la señal característica del hidrógeno del alcohol a 3.27 ppm y a 5.12 ppm la señal del metileno unido al alcohol de la molécula; y por RMN ^{13}C (Figura 23) la señal del carbonilo del éster (C9) a 172 ppm; con los resultados anteriores se comprueba la obtención del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**).

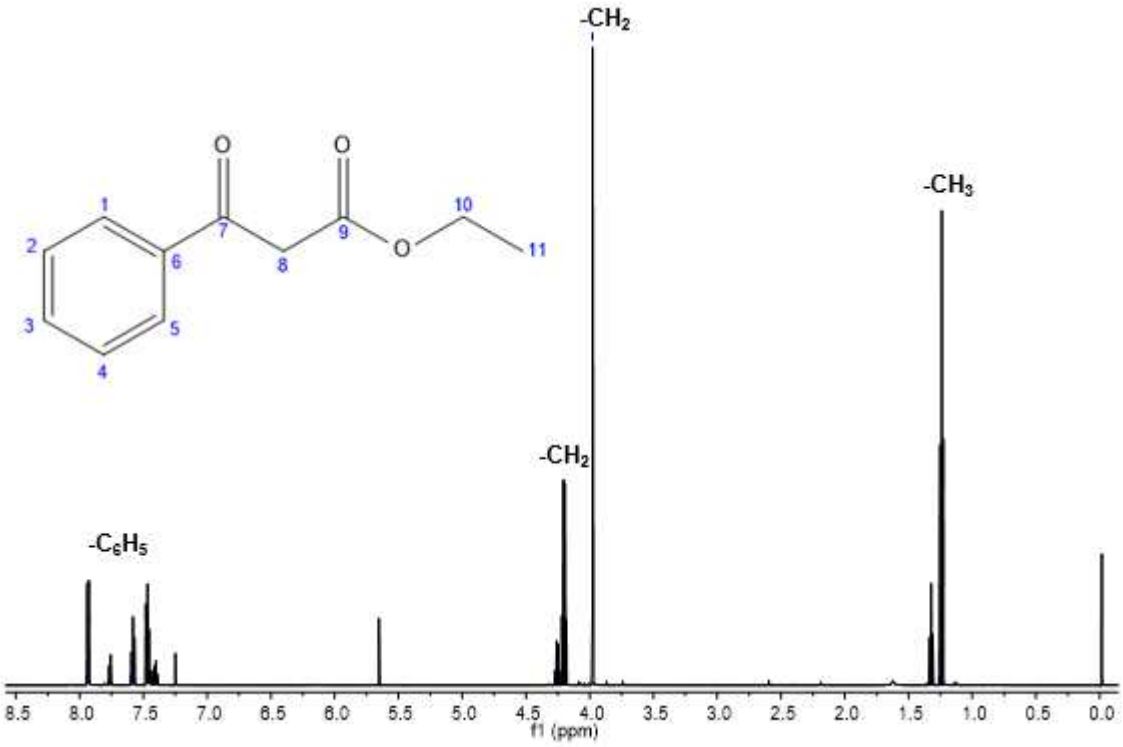


Figura 20. Espectro de RMN de ^{1}H del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**), en $CDCl_3$

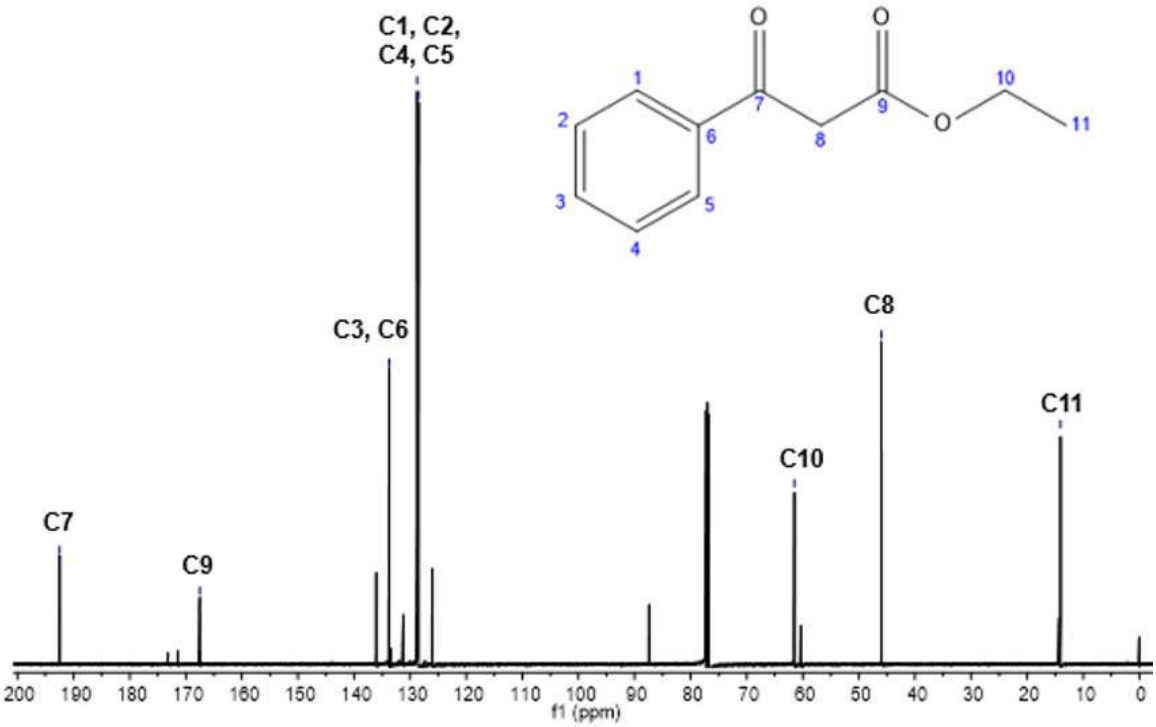


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**), en $CDCl_3$

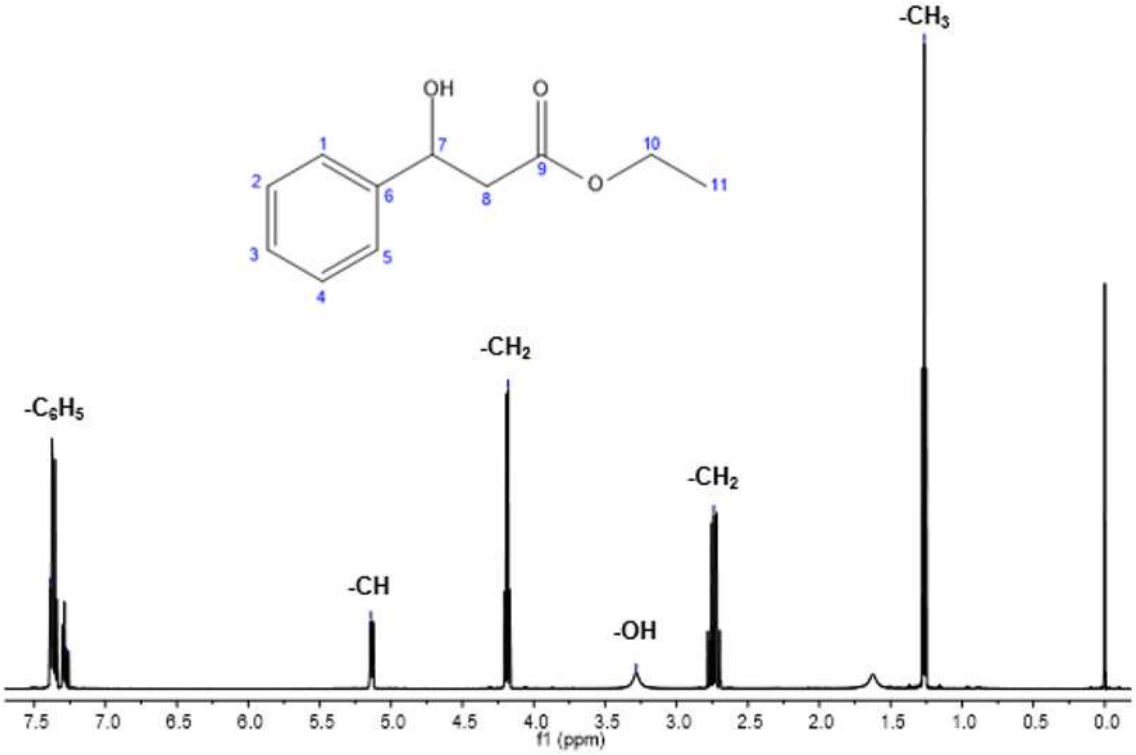


Figura 22. Espectro de RMN de ^{1}H del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**), en $CDCl_3$

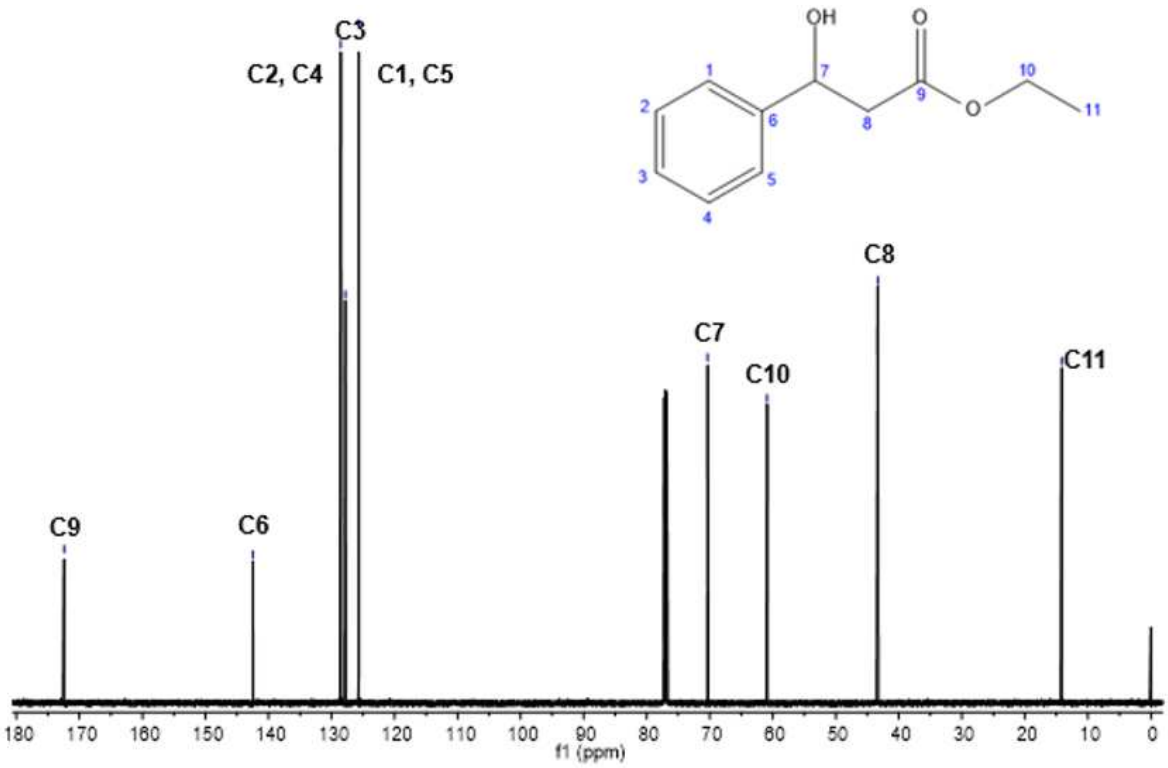


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**), en $CDCl_3$

7.2. Desarrollo de los métodos analíticos por Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

7.2.1. Desarrollo de los métodos analíticos para la propiofenona (3) y el 1-fenil-1-propanol (3A)

Para obtener el porcentaje de conversión de propiofenona (**3**) a 1-fenil-1-propanol (**3A**) por CG se probaron varias condiciones (Tabla 4) con una columna Supelcowax™-10, siendo las óptimas condiciones con temperatura del horno a 180°C, flujo de 0.8 mL/min, con tiempos de retención (t_r) para la (**3**) de 4.38 min y para el (**3A**) de 5.58 min (Figura 24).

Tabla 4. Condiciones de análisis por CG de la propiofenona (**3**) y del 1-fenil-1-propanol (**3A**)

Compuestos	T. del Horno (°C)	Flujo (mL/min)	t_r (min)
Propiofenona	150	0.6	9.62
	180	0.6	5.44
	180	0.8	4.33
1-fenil-1-propanol	180	0.8	5.63
Mezcla	180	0.8	4.38
			5.58

t_r= Tiempos de retención

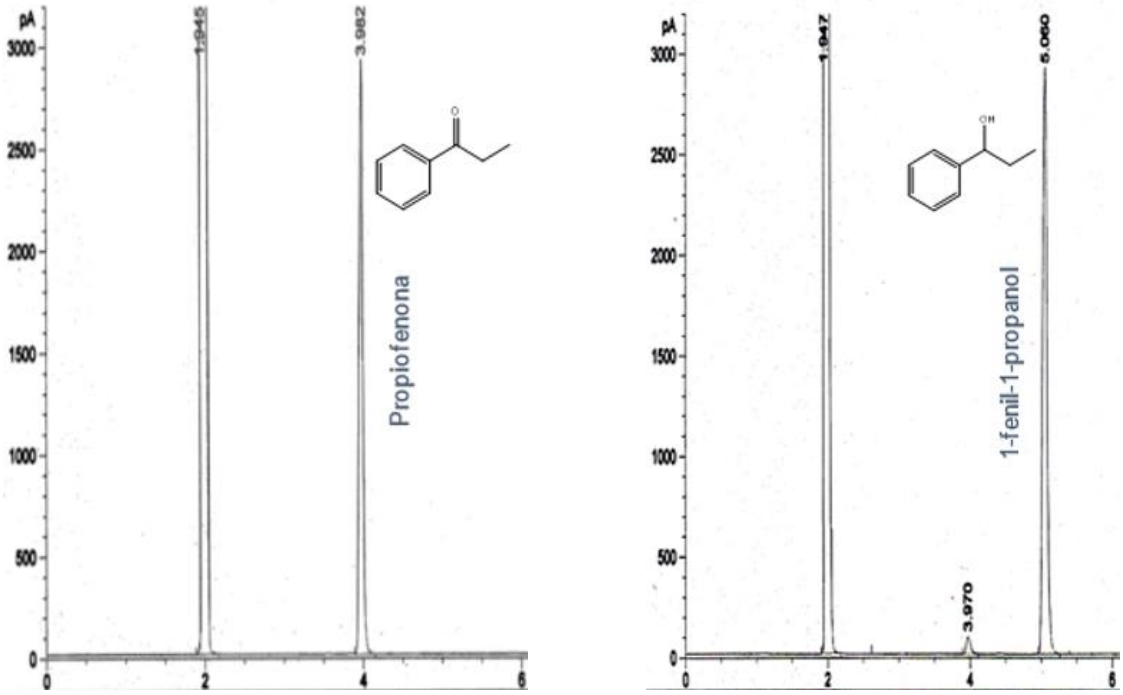


Figura 24. Cromatograma de CG de propiofenona (**3**) y del 1-fenil-1-propanol (**3A**)

Para determinar el porcentaje del exceso enantiomérico (%*ee*) de (**3A**) por CLAR se probaron dos columnas quirales, Chiracel OB-H y OD, las condiciones se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de análisis por CLAR para la propiofenona (**3**) y el 1-fenil-1-propanol (**3A**)

Columna	Flujo (mL/min)	Fase móvil Hex:Isop	t_r de (3) (min)	t_r de (*R*)-3A/(*S*)-3A (min)	(*R*)-3A/(*S*)-3A (%)
OB-H	0.5	90:10	20.4	9.6/11.4	51/49
OD	1.0	97:03	7.7	12.7/15.0	54/46

t_r= Tiempos de retención

Se seleccionó el método con la columna OB-H a una λ de 254 nm, por tener tiempos de retención para los enantiómeros más cortos que con la columna OD, picos mejor resueltos y que no interfieren con los picos de los productos celulares de *Nocardia corallina* donde se tienen señales por debajo de 7 min, ni con el pico de la cetona que aparece a los 20.4 min (Figura 25). La asignación de los tiempos de retención de los enantiómeros se realizó con base a lo reportado en la literatura ($t_{(R)}$=10.46 min y $t_{(S)}$= 12.38 min).[64]

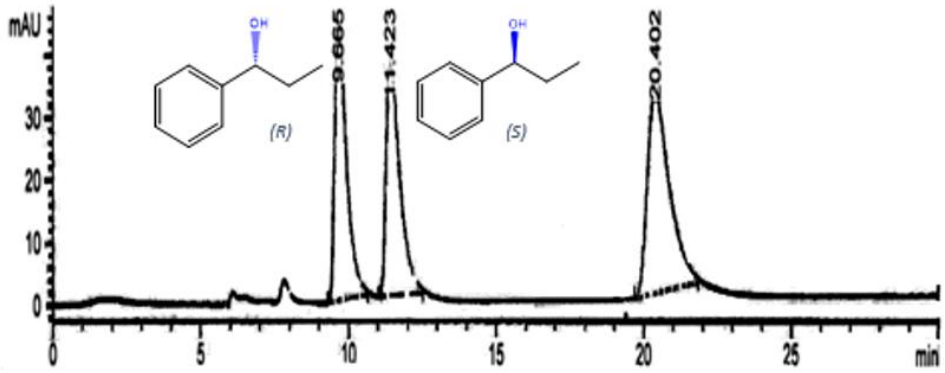


Figura 25. Cromatograma CLAR de la mezcla de propiofenona (**3**) con 1-fenil-1-propanol (**3A**)

7.2.2. Desarrollo de los métodos analíticos para el 2-clorobenzoilformiato de metilo (1) y del 2-cloromandelato de metilo (1A)

Las condiciones utilizadas para el desarrollo del método por CG para determinar el porcentaje de conversión de (**1**) a (**1A**) en las biotransformaciones, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de análisis por CG del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y del 2-cloromandelato de metilo (**1A**)

T. del Horno (°C)	t_r de (1) (min)	t_r de (1A) (min)
180	15.7	25.7
190	11.6	18.0
200	8.8	13.2
210	6.9	9.8
220	5.6	7.6
230	4.6	6.1

t_r= Tiempos de retención; Flujo 1.0 mL/min, columna SupelcowaxTM-10.

Siendo las mejores condiciones a una temperatura del horno de 230°C, con flujo de 1.0 mL/min, t_r de 4.6 min para el 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y de 6.1 min para el 2-cloromandelato de metilo (**1A**), ya que son tiempos más cortos de análisis y se obtienen picos con buena resolución (Figura 26).

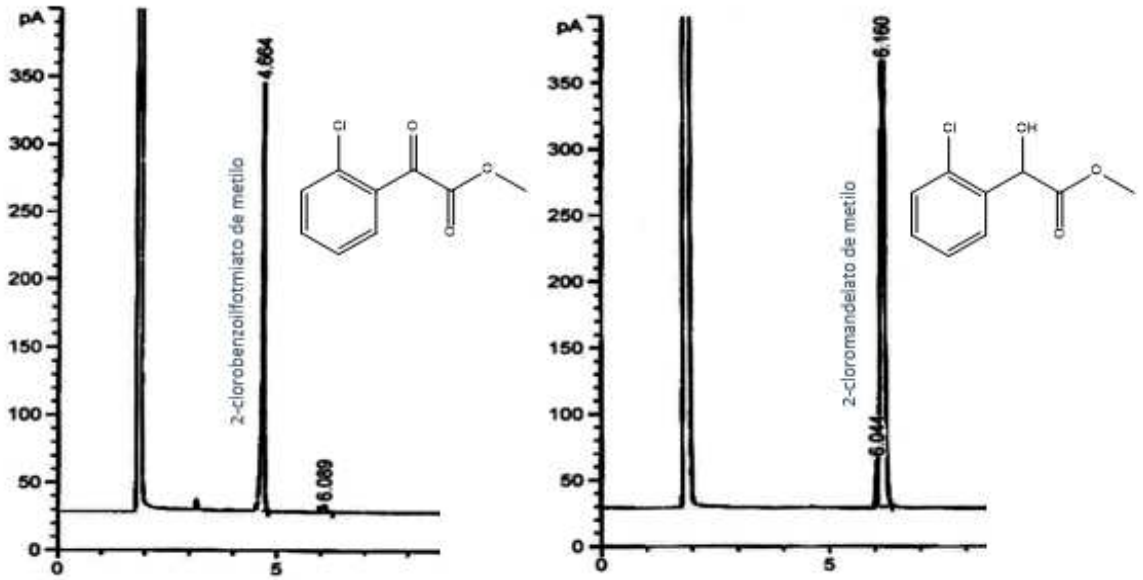


Figura 26. Cromatograma de CG del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y del 2-cloromandelato de metilo (**1A**)

Para determinar el %*ee* del compuesto (**1A**) por CLAR se probaron las siguientes condiciones, ver Tabla 7.

Tabla 7. Tiempos de retención (t_r) por CLAR del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y del 2-cloromandelato de metilo (**1A**)

Flujo (mL/min)	**t_r de (1) (min)**	**t_r de (*R*)-1A/(*S*)-1A (min)**	**(*R*)-1A/(*S*)-1A (%)**
1.0	7.0	10.2/8.9	49.9/50.1
0.8	8.7	12.6/11.0	50.2/49.8
0.6	11.6	16.7/14.7	50.3/49.7

t_r= Tiempos de retención. Columna OD, fase móvil hexano:isopropanol (90:10), λ= 235 nm.

Las mejores condiciones fueron: flujo de 1.0 mL/min con un tiempo de retención para el alcohol (*R*) de 10.2 min y de 8.9 min para el (*S*) siendo estos tiempos más cortos que los obtenidos con los flujos de 0.8 y 0.6 mL/min, de esta manera se tienen picos mejor resueltos y no interfieren con los picos de los productos celulares de *Nocardia corallina* ni con el pico de la cetona que aparece a los 7 min (Figura 27).

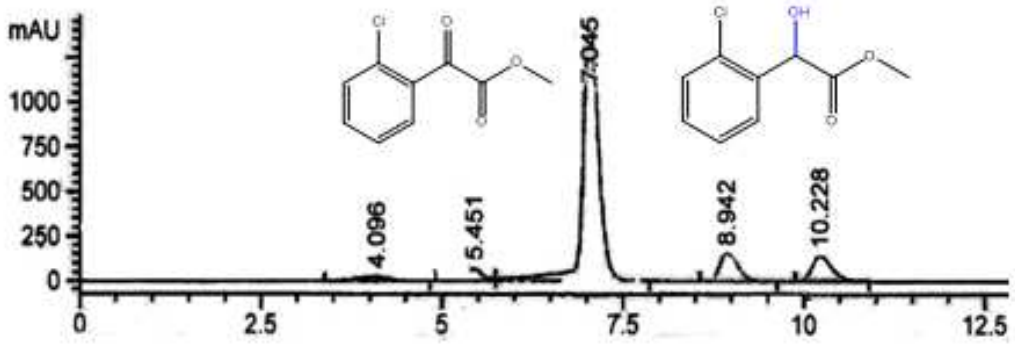


Figura 27. Cromatograma CLAR de la mezcla del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y del 2-cloromandelato de metilo (**1A**)

Para determinar cuál de los picos correspondía a cada uno de los enantiómeros del alcohol, se inyectó el (*R*)-2-cloromandelato de metilo sintetizado y se observó que el pico aparece a los 10.1 min, posteriormente se preparó una mezcla agregando un exceso del enantiómero (*R*) a la solución del 2-cloromandelato de metilo racémico, observando el aumento de la señal del pico con tiempo de 10.1 min, comprobando de esta manera su correspondencia con el enantiómero (*R*) (Figura 28).

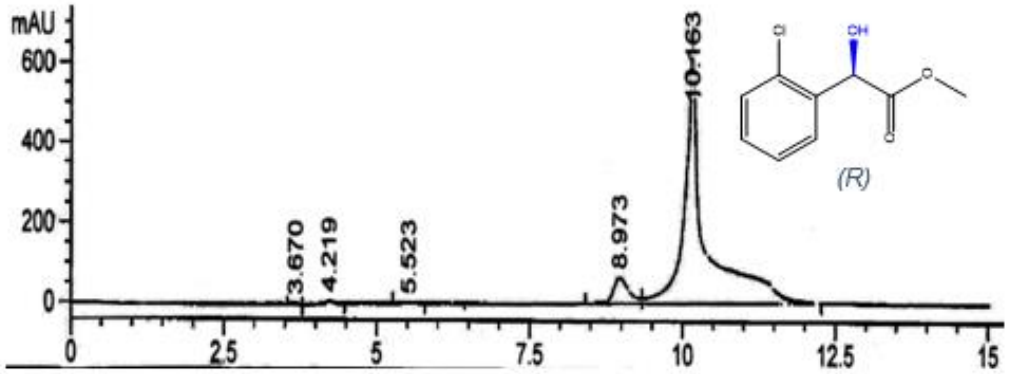


Figura 28. Cromatograma CLAR de la mezcla racémica del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) y su enantiómero (*R*)

7.2.3. Desarrollo de los métodos analíticos para el 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (2) y el 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (2A)

Se desarrolló el método por CG de estos compuestos probando diferentes columnas: la Supelcowax™-10, HP-5 y Gamma-Dex™120 a varios flujos y temperaturas, sin embargo con estas columnas no se pudieron tener separaciones adecuadas. Con la columna

SPB^{TM}-50 se obtuvo una mejor separación con las siguientes condiciones: flujo de 1 mL/min con una rampa de temperatura iniciando a 40°C y aumentándola 10°C/min hasta los 210°C y manteniéndola constante durante 8 min (Tabla 8), con tiempos de retención para la cetona de 10.8 min y para el alcohol de 16.9 min (Figura 29).

Tabla 8. Condiciones de análisis por CG del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**)

T. del Horno (°C)	t_r de (2) (min)	t_r del (2A) (min)
40-210/10°C/min	10.8	16.9

t_r= Tiempos de retención; Flujo 1.0 mL/min.

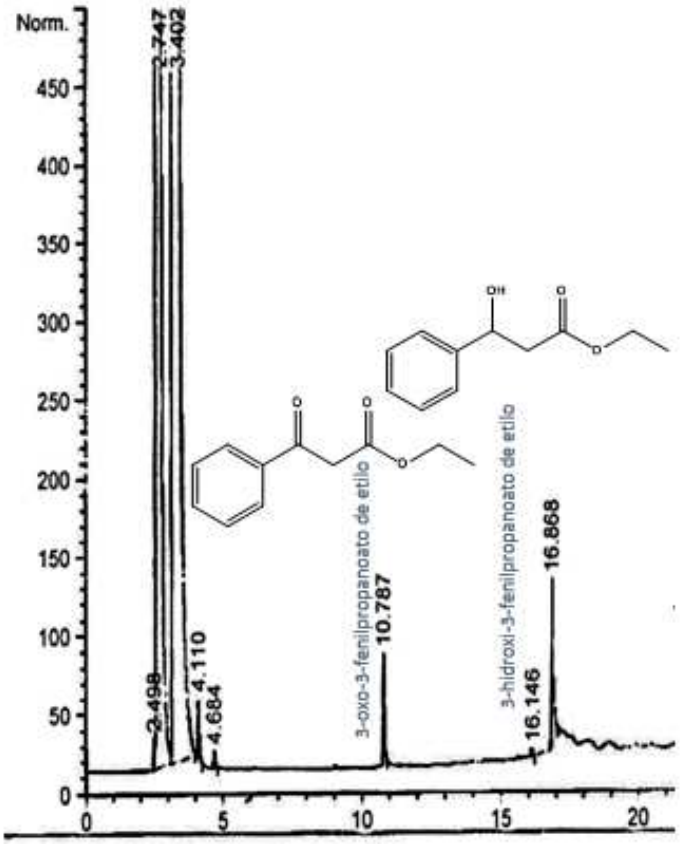


Figura 29. Cromatograma de CG del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**)

Por CLAR se probaron varias columnas y condiciones, dentro de las que se encuentra la columna quiral Chiralcel OD (25.0 x 0.46 cm L X ID) con fase móvil hexano:isopropanol 95:5, λ de 215 nm, flujo de 1.0mL/min, con la que se obtienen tiempos de retención más cortos que usando una fase móvil de 97:3 (Tabla 9), sin embargo al inyectar la muestra del blanco de células con la fase móvil de 95:5 hexano:isopropanol se observó que aparece un pico a los 12 min que podría traslaparse con el enantiómero (N-1) cuyo tiempo de retención fue de 12.6 min, por lo que la mejor separación de los enantiómeros (en las biotransformaciones) es con la fase móvil de 97:3 hexano:isopropanol donde los picos del blanco y de los enantiómeros del alcohol no se traslapan, quedando tiempos de retención para el enantiómero (N-1) de 16.4 min y para el (N-2) de 21.7 min (Figura 30).

Tabla 9. Condiciones para el análisis por CLAR del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**)

Columna	Flujo (mL/min)	Fase móvil Hex:Isop	t_r de (2) (min)	t_r de (2A) (N-1)/(N-2)	(N-1)-2A/(N-2)-2A (%)
OD	1.0	95:5	9.9	12.6/16.9	50.5/49.5
	1.0	97:3	9.1	16.5/21.7	49.3/50.7

t_r= Tiempos de retención

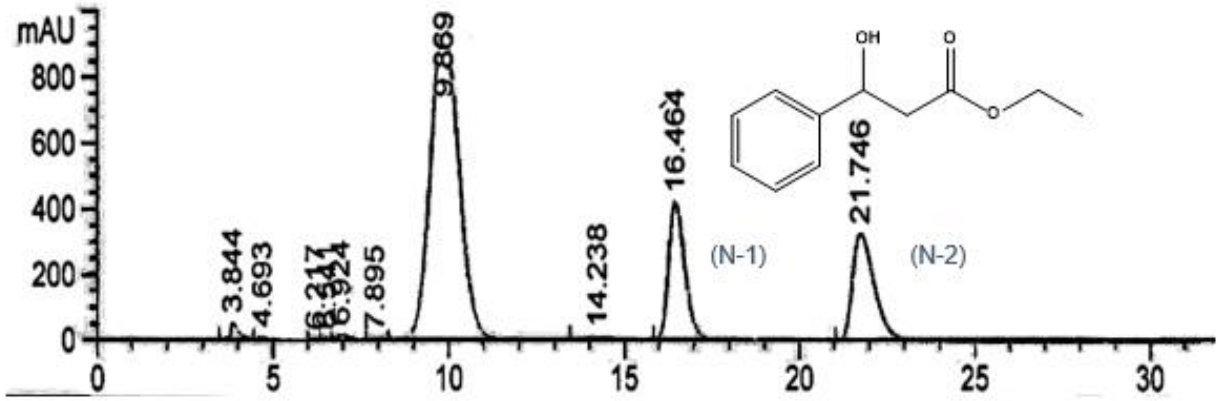


Figura 30. Cromatograma CLAR de la mezcla del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y del 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**)

7.3. Biotransformaciones

7.3.1. Biotransformación de propiofenona (3) y 1-fenil-1-propanol (3A)

Se utilizó a la propiofenona (**3**) (Figura 31) como modelo para el estudio de la reducción de las cetonas (**1**) y (**2**) con *Nocardia corallina*. Se seleccionó a la cetona (**3**) ya que el fenilo está en posición alfa al grupo carbonilo de la cetona, estructuralmente similar a 4-clorobenzofenona, sustrato que se logra reducir con *Nocardia corallina* B-276, como lo determinaron Ramírez M. A. y colaboradores.[8]

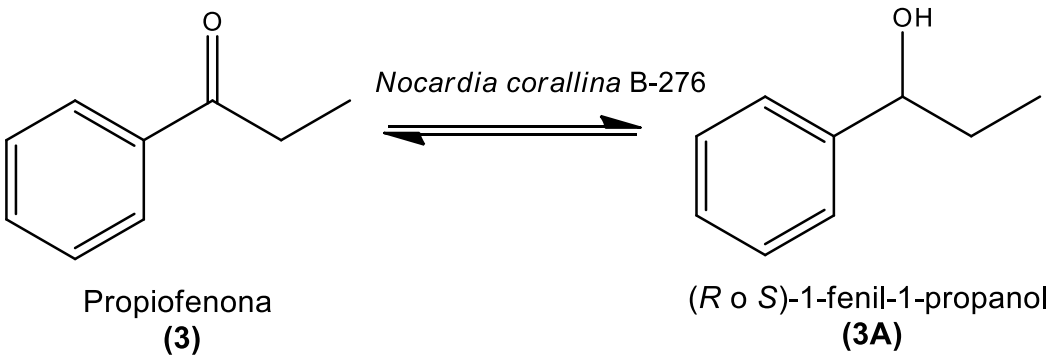
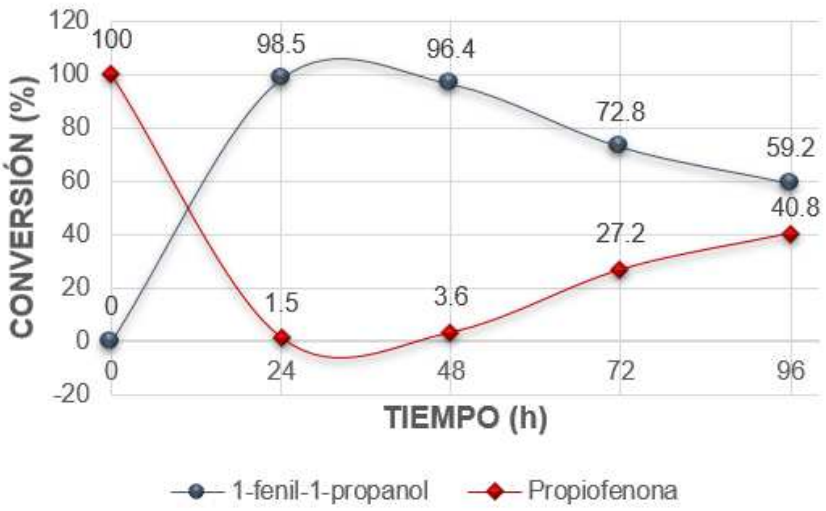
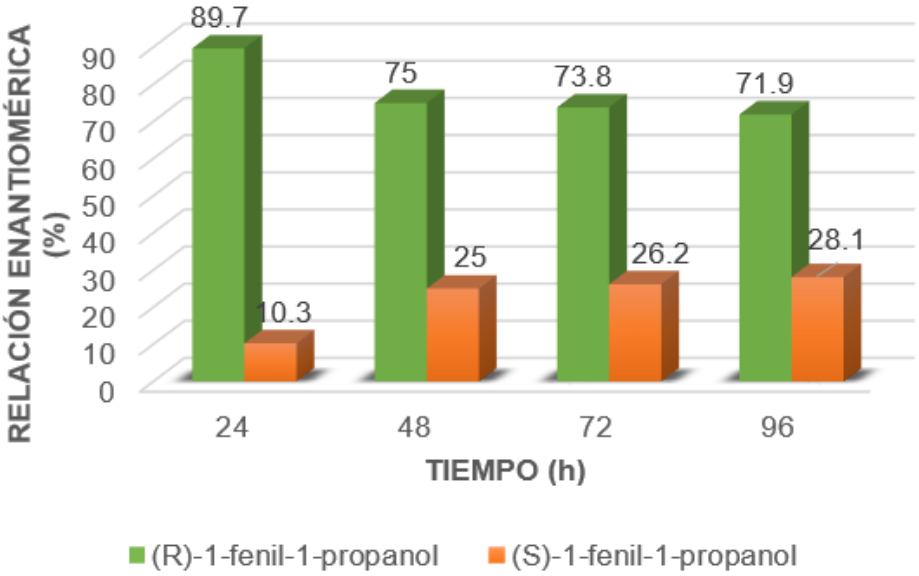


Figura 31. Biotransformación de propiofenona (**3**) con *Nocardia corallina* B-276

Se realizó la biorreducción de (**3**) con *Nocardia corallina* con una relación sustrato:células húmedas de 1:500 (p/p) realizando la extracción del producto con acetato de etilo.[64] En la biotransformación del primer lote (**L1**) se observó que a las 24 h se obtiene la mayor conversión de cetona a alcohol con un 98.5% (Gráfica 1), con un 89.7% del enantiómero (*R*) y un 10.3% del (*S*) (Gráfica 2).



Gráfica 1. Seguimiento de la biotransformación del (**L1**) de propiofenona (**3**) con *Nocardia corallina* B-276



Gráfica 2. Relación enantiomérica *vs* tiempo de la biotransformación del (**L1**) de propiofenona (**3**) con *Nocardia corallina* B-276

En el seguimiento de la reacción se observó que a las 24 h, se tenía el 98.5% del 1-fenil-1-propanol (**3A**), después de este tiempo el microorganismo oxida el alcohol (**3A**), en donde a las 72 h el porcentaje del alcohol es del 73% y 59% a las 96 h comprobando así la reversibilidad de la reacción de reducción con este sustrato a una relación de 1:500 (p/p) de sustrato:células húmedas. El aumento del porcentaje del enantiómero (*S*) después de las 24 h (10.3%), se puede explicar de dos formas, una que *Nocardia*

transformara el enantiómero (*R*) al (*S*) mediante una desracemización[8,66] o bien que después de este tiempo oxidara el enantiómero (*R*) consumiéndose éste y aumentando así el porcentaje del alcohol con configuración (*S*) 28.1% a las 96 h.

En la biotransformación de la propiofenona (**3**) a las 24 y 36 h (Tabla 10), se observó solamente el enantiómero (*R*), y su conversión es menor que en el (**L1**) (Gráfica 1). La diferencia de las conversiones entre estos lotes puede estar relacionada con el pH final del medio de crecimiento de *Nocardia corallina* en la obtención de la biomasa antes de la biotransformación ya que fue la variable que cambió entre cada lote, en el (**L1**) el pH fue de 5.36 (98.5% de alcohol) y en el (**L2**) fue de 7.62 (42.0% de alcohol) a las 24 h.

Tabla 10. Biotransformaciones de propiofenona (**3**) del lote (**L2**)

Lote	pH final del sobrenadante del medio de crecimiento	Tiempo (h)	Relación cetona/alcohol	(%*ee*)
L2-1	7.62	24	66/34	100 (*R*)
L2-1	7.62	24	58/42	100 (*R*)
L2-2	7.62	36	65/35	100 (*R*)
L2-2	7.62	36	64/36	100 (*R*)

Del análisis de estos dos lotes de biotransformación se puede predecir que el mejor tiempo de biorreducción de (**3**) con *Nocardia corallina* fue a las 24 h (**L1**), ya que a pesar de que en el segundo lote se obtiene un producto enantioméricamente puro 100% *vs* 89.7% del (*R*), en el primero se obtiene un porcentaje mayor del alcohol (98.5 *vs* 42%).

Al observar la biotransformación de (**3**) a las 24 h (**L1**) se decidió estudiar la oxidación del 1-fenil-1-propanol (**3A**) con *Nocardia corallina* en nuestras condiciones.
En la Tabla 11 se observa que *Nocardia corallina* es capaz de oxidar el alcohol (*S*)-(**3A**) sin consumir el enantiómero (*R*)-(**3A**), obteniendo un porcentaje del 46% de alcohol y 54% de cetona a las 24 h con una relación sustrato:células húmedas (p/p) 1:500 a pH de 7.62 esto sugiere que el microorganismo también tiene selectividad para oxidar solo el enantiómero (*S*). Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Ríos Ramírez[64] quien

realizó las oxidaciones del 1-fenil-1-propanol con *Nocardia corallina* B-276 en suspensión y reporta a las 24 h 26% de cetona y un %*ee* del 100% para el enantiómero (*R*) a una relación 1:17 sustrato:células secas.

Tabla 11. Oxidación del 1-fenil-1-propanol (**3A**)

Lote	Tiempo (h)	Relación alcohol/cetona	(%ee)
1	24	46/54	100 (*R*)
2	36	57/43	100 (*R*)

pH final del sobrenadante del medio de crecimiento= 7.62

7.3.2. Biotransformación del 2-clorobenzoilformiato de metilo (1) y del 2-cloromandelato de metilo (1A)

Como se observó que el mejor tiempo de biotransformación para (**3**) con un pH de 5.36 fue de 24 h. La biotransformación de (**1**) (Figura 32), se analizó a las 24 y 48 h, se realizaron 2 lotes, (Tabla 12) con una relación sustrato:células húmedas (p/p) 1:500, se obtuvieron porcentajes de cetona a alcohol mayores del 94%.

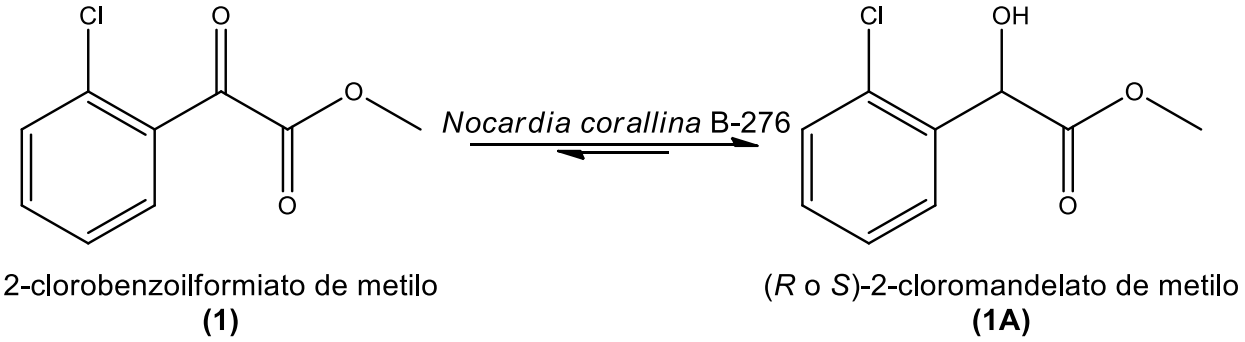


Figura 32. Biotransformación del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) con *Nocardia corallina* B-276

Tabla 12. Biotransformación del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) con *Nocardia corallina* B-276

Lote	pH del sobrenadante del medio de crecimiento	Tiempo (h)	Relación cetona/alcohol	(%*ee*)
1	5.88	24	1/99	62 (*R*)
2	7.3	24	0/100	40 (*R*)
2	7.3	24	6/94	22 (*R*)
2	7.3	48	0/100	44 (*R*)
2	7.3	48	0/100	50 (*R*)|

La mejor biotransformación fue a las 24 h, pH 5.88 del lote 1, con una conversión del 99% de cetona al alcohol, con un 62% *ee* del enantiómero (*R*).

Debido a que se observó que *Nocardia* oxidó el alcohol (**3A**), se decidió estudiar la oxidación del 2-cloromandelato de metilo (**1A**), en las mismas condiciones de reacción. En la Tabla 13 se observa que los porcentajes de oxidación del alcohol a la cetona a las 48 h son bajos (8%).

Tabla 13. Biotransformaciones del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) con *Nocardia corallina* B-276

Lote	pH del sobrenadante del medio de crecimiento	Tiempo (h)	Relación alcohol/cetona	(%ee)
1	5.88	24	97/3	32 (*R*)
2	7.3	24	99/1	16 (*R*)
2	7.3	24	100/0	8 (*R*)
2	7.3	48	92/8	16 (*R*)
2	7.3	48	100/0	40 (*R*)

Lo cual indica que la oxidación del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) es más lenta que la reducción del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**), además en el lote 1 en la oxidación de (**1A**), cuando el pH del medio de cultivo de la biomasa es ligeramente ácido *Nocardia* biotransforma el alcohol (*S*) a la cetona (3%). En el lote 2 con un pH del medio de 7.3 se

obtuvo 1 y 8%, del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) a las 24 y 48 h respectivamente, donde se esperaría que se obtuviera un %*ee* mayor a las 48 h, por la oxidación del enantiómero (*S*), sin embargo ambos fueron del 16%. En donde no hay oxidación a las 24 y 48 h, 8 y 40% *ee* de (*R*), se puede explicar por la estereoinversión del alcohol (*S*) al (*R*).[8,66]

Con estos resultados se decidió realizar otro lote de biotransformación del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) (Tabla 14), con una relación sustrato:células húmedas de 1:1000 (p/p), a mayores tiempos de biotransformación de 96 y 120 h, donde se obtuvieron mayores porcentajes de cetona con poco exceso enantiomérico; por lo que *Nocardia corallina* puede oxidar lentamente al 2-cloromandelato de metilo (**1A**) pero no enantioselectivamente.

Tabla 14. Biotransformación del 2-cloromandelato de metilo (**1A**) con *Nocardia corallina* B-276, lote 3

Lote	Relación sustrato:células	pH del sobrenadante del medio de crecimiento	Tiempo (h)	Relación alcohol/cetona	(% *ee*)
3	1:1000	7.57	96	58/42	20 (*S*)
3	1:1000	7.57	120	8/92	10 (*R*)

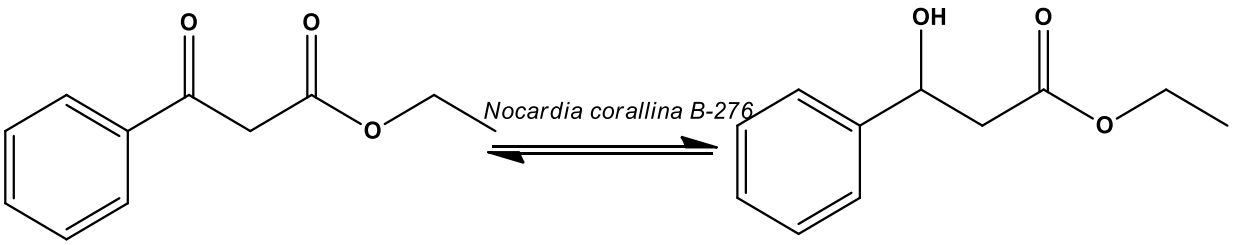
A partir de estos resultados se puede inferir que *Nocardia corallina* puede llevar a cabo la biorreducción del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**), con una relación sustrato:células húmedas de 1:500 (p/p) sin que el alcohol enantioméricamente enriquecido se oxide durante este tiempo (48 h).

7.3.3. Biotransformación del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (2)

Para el estudio de la biorreducción del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) (Figura 33) se realizaron varios lotes con una relación sustrato:células húmedas de 1:500 (p/p), a las 24, 48, 72, 96 y 144 h, en las cuales no se pudo obtener una buena conversión al alcohol, debido a que durante el transcurso de la reacción se forman subproductos que no se pudieron identificar por las cantidades utilizadas en la biotransformación (10-30 mg de sustrato). A las 72 h se obtuvo un 19% del alcohol con un 64% de exceso del enantiómero

(N-1). Este porcentaje de conversión es similar al obtenido por Silva en 2010 (18%), quien cataloga a este β-cetoéster como uno de los compuestos más difíciles de reducir con microorganismos.[67]

El nivel de conversión y la enantioselectividad dependen de la estructura del sustrato, del efecto estérico y el efecto electrónico del grupo funcional a transformar así como por la regioselectividad y estereoselectividad de las enzimas.[68] En particular el 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) presenta una demanda estérica grande para la cetorreductasa de *Nocardia corallina*, por lo que se considera un mal sustrato a reducir por esta vía microbiológica, sin embargo ciertos microorganismos sí tienen esta facultad, por ejemplo de Souza Ramos y colaboradores en 2009 pudieron biorreducir el 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) con células enteras en solución de *Pichiasp., K. marxianus, Rhodotorula rubra, Rhodotorula minuta y Mucorramannianus* obteniendo más de 50% de conversión con un exceso enantiomérico del 100% del (*S*)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (*S*)-(**2A**).[50] Otros estudios son los realizados por Ema y colaboradores en 2001 quienes obtuvieron un 51% de conversión con 88% *ee* realizando la biorreducción con una carbonilrreductasa aislada de *S. cerevisiae*,[69] y Yadav y colaboradores en 2002, también realizaron la reducción obteniendo un 62% de conversión con un 98% *ee*, con células enteras de zanahoria (*Daucus carota),* ambos también con el enantiómero enriquecido (*S*).[70]



3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo
(2)

(R o S) 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo
(2A)

Figura 33. Biotransformación del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) con *Nocardia corallina* B-276

8. CONCLUSIONES

Se sintetizaron y caracterizaron el 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) y el 3 hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**).

Se desarrollaron los métodos analíticos por CG y CLAR de propiofenona (**3**), 1-fenil-1-propanol (**3A**), 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**), 2-cloromandelato de metilo (**1A**), 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) y 3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (**2A**).

Nocardia corallina tiene la capacidad de reducir enantioselectivamente la propiofenona (**3**) y el 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**), con enriquecimiento del enantiómero (*R*), con una relación sustrato:células húmedas de 1:500 (p/p).

Después de las 24 h de biotransformación de propiofenona (**3**) la reacción es reversible, con una relación sustrato:células húmedas de 1:500 (p/p).

La biotransformación del 2-clorobenzoilformiato de metilo (**1**) a una relación 1:500 (p/p) sustrato:células húmedas es adecuada a las 24 h, ya que no es reversible.

Con la biotransformaciones del 3-oxo-3-fenilpropanoato de etilo (**2**) a una relación 1:500 (p/p) sustrato:células húmedas se obtiene un porcentaje de conversión menor de la cetona al alcohol y subproductos de reacción, por lo que se considera un mal sustrato a reducir con *Nocardia corallina*.

Las diferencias en las conversiones entre los lotes de las biotransformaciones (de los tres sustratos) podrían estar relacionados con el pH final del medio de crecimiento de *Nocardia corallina* en la obtención de biomasa, estos cambios podrían deberse al desarrollo de diferentes metabolitos o a la variabilidad del tamaño del inóculo en el medio de crecimiento de *Nocardia.*

9. REFERENCIAS

1. Davies J. Small molecules: The lexicon of biodiversity. *J Biotechnol* **2007**; *129*(1): 3-5.
2. Straathof A. J. J., Panke S., Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotech* **2002**; *13*(6): 548-556.
3. Smith M. B. *Organic Synthesis*, Cap 3. Ed. McGraw-Hill International. Editions Chemistry Series, Singapur. **1994**.
4. Pu L. Yu H-B. Catalytic asymmetric organizinc additions to carbonyl compounds. Chem Rev **2001**; *101*: 757-824.
5. Corey E. J., Helal C. J. Aminoacrylic compounds. Part 31. Reduction of carbonyl compounds with chiral oxazaborolidine catalysts: a new paradigm for enantioselective catalysis and a powerful new synthetic method. Angew Chem Int Ed **1998**; 37: 1987-2012.
6. Manjarrez N., Pérez H. I., Solís A., Luna H., Liévano R., Ramírez, M. Biotransformation of (*S*)-cis-verbenol with *Nocardia corallina* B-276. *J Braz Chem Soc* **2007**; *18*(4): 709-713.
7. Pérez H. I., Luna H., Manjarrez N., Solís A., Nuñez M. A. Enantioselective oxidation of diarylcarbinols by *Nocardia corallina* B-276. *Tetrahedron-Asymmetr* **2000**; *11*: 4263-4268.
8. Ramírez M. A., Pérez H. I., Manjarrez N., Solís A., Luna H., Cassani J. Biocatalytic oxidative kinetic resolution of (±)-4-(chlorophenyl)phenylmethanol by *Nocardia corallina* B-276. *Electronic Journal of Biotechnology* **2008**; *11*(4): 1-7.
9. Navarro J. R., García Muñoz E., Osuna Sánchez A. Efectos de los isómeros en la práctica clínica. *Actas Peru Anestesiol* **2012**; *20*: 27-30.
10. Oronzio R., Monteleone G., Pozio A., De Francesco M., Galli. New reactor design for catalytic sodium borohydride hydrolysis. *Int J Hydrogen Energ* **2009**; *34*: 4555-4560.
11. Zeynizadeh B., Behyar T. Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with $NaBH_4$/wet SiO_2 under solvent free condition. *J Braz Chem Soc* **2005**; *16*(6A): 1200-1209.
12. Whittall J, Sutton P. W. *Practical methods for biocatalysis and biotransformations 2*. 1° edition. John Willey & Sons. **2012**.
13. Parkot J, H, Hummel W. Purification, cloning, and overexpression of an alcohol dehydrogenase from *Nocardia globerula* reducing aliphatic ketones and bulky ketoesters. *Appl Microbiol Biot* **2010**; *86*: 1813-1820.

14. Mathews C. K., Van Holde K. E., Ahern K. G. *Bioquímica* 3° ed. Editorial Pearson Educación. S. A. Madrid, España. **2002**.
15. Nelson D. L., Cox M. M. *Lehninger Principios de bioquímica*. 4° ed. Editorial Omega. Barcelona, España. **2005**.
16. Kaushik N., Biswas S., Singh J. Biocatalysis and Biotransformation Processes – An Insight. *The SciTech Journal* **2014**; *01*(08): 2311-2348. Online.
17. Chen J., Rosazza J. P. N. Microbial transformation of ibuprofen by *Nocardia* species. *Appl Environ Microb* **1994**; *60*(4): 1292-1296.
18. Vásquez V. M. Biocatálisis y enzimas en la síntesis asimétrica del inhibidor de fosfodiesterasa 5. Tesis de Licenciatura. Escuela de Tecnología Médica. Universidad de Talca (Chile). **2009**.
19. Roberts M. R., Turner N. J., Willets A. J., Turner M. K. *Introduction at Biocatalysis using enzymes and micro-organisms*. Cambridge University Press. USA. **1995**.
20. Ghisalba O., Meyer H. P., Wohlgemuth R. Industrial biotransformation. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology.* John Wiley & Sons, Inc **2010**.
21. May S. W. Applications of oxidorreductases. *Curr Opin Biotech* **2009**; *10*: 370-375.
22. Sánchez M. J. M., Sinisterra G. J. V. Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* **2007**; *73*(4): 1199-1236.
23. Leskovac V., Trivic S., Pericin D. The three zinc-containing alcohol deshidrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **2002**; *2*(4): 481-494.
24. Uppada V., Bhaduri S., Noronha S. B. Cofactor regeneration – an important aspect of biocatalysis. *Curr Sci India* **2014**; *106*(7): 946-957.
25. Hall M, Bommarius A. S. Enantioenriched compounds via enzyme-catalyzed redox reactions. *J Am Chem Soc* **2011**; *111*: 4088-4110.
26. Sandoval Trujillo H. *Actinomicetos. Microorganismos de la luz.* Universidad Autónoma Metropolitana. CBS. Unidad Xochimilco. México, D. F. **1993**.
27. Rernán P. J., Falcón E. R., Matuk P. Y., Rodriguez L. I. Nocardiosis diseminada: Reporte de un caso. *Rev Mex Neuroci* **2012**; *13*(4): 215-219.
28. González P., Cona E. *Nocardia asteroides*. *Rev Chil Infec* **2006**; *23*(3): 359.

29. Rojas O. C., Medina C., Rumenoff L., Suárez O., Martínez E., Serrano J. A., Liendo E., Uzcátegui N. M., Boiron P., Rodríguez N. V., Couble A., Mouniée D., Sánchez H. K., Sandoval H., López W., Mosquera E., Zanteliz J. Primer reporte de infección natural por *Nocardia cyriacigeorgica* en ratones BALB/c. *Rev Soc Ven Microbiol* **2008**; *28*: 38-42.
30. Pier, A. C. *Actinomycetes*. En: Stoenner H., W. Kaplan M. Torten eds. Vol 1, Section A; *CRC Handbook Series in Zoonoses.* Boca Raton. Florida: CRC Press.**1979**.
31. Land G. M., McGinnis R., Staneck J., Gatson A. Aerobic pathogenic *Actinomycetales*. En: Balows A., Hausler W. J., Hermann K. L. Jr., Isenberg H. D., Shadomy H. J. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology; **1991**.
32. Feng X., Zou Z., Fu S., Sun L., Su Z., Sun D. A. Microbial oxidation and glucosidation of echinocystic acid by *Nocardia corallina. J Mol Catal B-Enzym* **2010**; *66*: 219-223.
33. Pérez H. I., Manjarrez N., Luna H., Solís A., Ramírez C. Nitrile hidratase activity of *Nocardia corallina* B-276. *J Brazil Chem Soc* **2005**; *16*(6A): 1150-1153.
34. Pérez H. I., Luna H., Manjarrez N., Solís A. Resolución microbiológica de 1-fenil-1-propanol y de 1-(4-toluil)-1-etanol con *Nocardia corallina* B-276. *Rev Soc Quím Méx* **2001**; *45(*2): 43-46.
35. Gallagher S. C., Cammack R., Dalton H. Alkene monooxygenase from *Nocardia corallina* B-276 is a member of the class of dinuclear iron proteins capable of stereospecific epoxigenation reactions. *Eur J Biochem* **1997**; *247*: 635-641.
36. Kato N., Konishi H., Uda K., Shimao M., Sakazawa C. Microbial reduction of benzoate to benzyl alcohol. *Agr Biol Chem Tokyo* **1988**; *52*: 1885-1886.
37. Bartlett J. B., Dredge K., Dalgleish A. G. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. (Box 1. The Chemistry of thalidomide). *Nat Rev Cancer* **2004**; *4*, 314-322.
38. Rodrígues J. A. R., Moran P. J. S., Conceicao G. J. A., Fardelone L. C. Recent advances in the biocatalytic asymmetric reduction of acetophenones and α,β-unsaturated carbonyl compounds. *Food Technol Biotech* **2004**; *42*(4): 295-303.
39. Peng X. Y., Hugh G. Y., Lei Y. H., Ni Y., Di M. B., He X. J. Improved *o*-chlorobenzoylformate biorreduction by stabilizing aldo-keto reductase YtBE with additives. *J Mol Catal B-Enzym* **2014**; *104*: 108-114.

40. Antic D., Filipic S., Ivkovic B., Nikolic K., Agbaba D. Direct separation of Clopidogrel enantiomers by reverse-phase planar chromatography method using β-cyclodextrin as a chiral mobile phase additive. *A Chrom* **2011**; *23*(2): 235-245.
41. Zheng G. W., Xu J. H. New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. *Curr Opin Biotech* **2011**; *22*: 784-792.
42. Flórez J., Armijo J. A., Mediavilla A. Farmacología humana. 3° ed. Masson, S. A. **1998**. Barcelona, España.
43. Gomez Y., Adams E., Hoogmartens J. Analysis of purity in 19 drug product tablets containing Clopidogrel: 19 copies versus the original brand. J *Pharm Biomed Anal* **2004**; *34*: 341-348.
44. Yin L., Shan M., Jia X., Li X., Chan S. C. A. Ru-catalyzed enantioselective preparation of methyl (R)-*o*-chloromandelate and its application in the synthesis of (S)-Clopidogrel. *J Organomet Chem* **2009**; *694*: 2092-2095.
45. Ni Y., Pan J., Ma H-M., Li C-X., Zhang J., Zheng G-W., Xu J-H. Biorreduction of methyl o-chlorobenzoylformate at 500 gL-1 without external cofactors for efficient production of enantiopure Clopidogrel intermediate. *Tetrahedron Lett* **2012**; *53*(35): 4715-4717.
46. DeSantis G., Zhu Z., Greenberg W. A., Wong K., Chaplin J., Hanson S. R., Farwell B., Nicholson L. W., Rand C. L., Weiner D. P., Robertson D. E., Burk M. J. An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. *J Am Chem Soc* **2002**; *124*(31), 9024-9025.
47. Torres R., Ortiz C., Pessela B. C., Palomo J. M., Mateo C., Guisán J. M., Fernández-Lafuente,R. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorpiton on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. *Enzyme Microb Tech* **2006**; *39*: 167-171.
48. Ema T., Okita N., Ide S., Saki T. Higly enantioselective and efficient synthesis of methyl (R)-o-chloromandelate with recombinant *E. coli*: toward practical and green acces to Clopidogrel. *Org Biomol Chem* **2007**; *5*: 1175-1176.
49. Goodman Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12° ed. McGrawHill Interamericana Editores. México D. F. **2011**.

50. De Souza R. A., Benzaquem R. J., Vazquez L., Batista F. S., Gomes F., Leite S., Klaus V., Ramos M. C., De Aquino N. R. A., Antunes O. A. C. Inmobilized microorganisms in the reduction of ethyl benzoylacetate. *Tetrahedron Lett* **2009**; *50*: 7362-7364.
51. Sachdeva M. S., Babu R. J. Remington. The Science and Practice of Pharmacy. 21st ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. **2005**.
52. Kim J., Riggs K. W., Rurak D. W. Stereoselective pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in pregnant sheep. *Drug Metab Dispos* **2004**; *32*(2), 212-221.
53. D'Souza D. L., Dimmitt D. C., Robbins D. K., Nezamis J., Simms L., Koch K. M., Effect of Alosetron on the Pharmacokinetics of Fluoxetine. *J Clin Pharmacol* **2001**; *41*, 455-458.
54. Xavier S., Periandy S., Ramalingam S. NBO, conformational, NLO, HOMO-LUMO, NMR and electronic spectral study on 1-phenyl-1-propanol by quantum computational methods. Spectrochim Acta A **2015**; *137*: 306-320.
55. Sigma-Aldrich. Catálogo en línea. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=(R)-1-phenyl-1-propanol&N=0&focus=product&lang=es&region=MX. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=%28s%29-1-phenyl-1-propanol&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=es&region=MX&focus=product. Consultado el 1 de Junio de 2015.
56. Burdock G. A. 1-phenyl-1-propanol. In: Encyclopedia of food and color additives. Burdock G A. CRC Press, Inc. USA. **1997**.
57. Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R. *Química Analítica*. 7° ed. McGraw-Hill Interamericana Editores. México, D. F. **2001**.
58. Ikan R., Crammer B. Organic Chemistry, Compound Detection. *Encyclopedia of Physical Science and Technology* 3° ed. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Academic Press. **2003**.
59. Bonato P. S., Bortocan R., Gaitani C. M., Paias F. O., Iha M. H., Lima R. P. Enantiomeric resolution of drugs and metabolites in polysaccharide- and protein-based chiral stationary phases. *J Braz Chem Soc* **2002**; *13*(2): 190-199.
60. Jeong M, Lee Y. M, Hong S. H, Park Y. S, Yoo I K, Jung H, M. Optimization of enantioselective synthesis of methyl (*R*)-2-chloromandelate by whole cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* **2010**; *32*: 1529-1531.

61. Espinoza Campos R. A. Biotransformación del mandelato de metilo con células aisladas de *Nocardia corallina* B-276 suspendidas en solución amortiguadora. Servicio Social. Departamento de Sistemas Biológicos. CBS. UAM-Xochimilco. **2010**.
62. Borowiecki P, Bretner M. Studies on the chemoenzymatic synthesis of (*R*)- and (*S*)-methyl 3-aryl-3-hydroxypropionates: the influence of toluene-pretreatment of lipase preparations on enantioselective transesterifications. *Tetrahedron-Asymm* **2013**; *24*, 925-936.
63. Varga A, Zaharia V, Nógrádi M, Poppe L. Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of 3-hidroxy and 3-amino-3-phenylpropanoic acid. *Tetrahedron-Asymm* **2013**; *24*, 1389-1394.
64. Ríos Ramírez M T. Biotransformación del 1-fenil-1-propanol con células aisladas de *Nocardia corallina* B-276 suspendidas en solución amortiguadora. Servicio Social. Departamento de Sistemas Biológicos. CBS. UAM-Xochimilco. **2007**.
65. Uzura A., Katsuragui T., Tani Y. Stereoselective oxidation of alkylbenzenes by fungi. *J Biosci Bioeng* **2001**; *91*(2): 217-221.
66. Pérez H.I., Luna H., Manjarrez N., Solis A. Resolution of methylarylmethanols via oxidation with *Nocardia corallina*. *Tetrahedron-Asymm* **2001**; *12*, 1709-1712.
67. Silva A. J. Biotransformación de cetonas proquirales utilizando levaduras y hongos filamentosos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. **2010**.
68. Ou Z., Chen Q., Yang G., Xu L. Asymmetric reduction of 3-oxo-3-phenylpropionic acid ethyl ester by undifferentiated cells of white turnip in phosphate buffer/organic solvent. *Korean J Chem Eng* **2011**; *28*(2): 378-382.
69. Ema T. Moiya H., Kofukuda T., Ishida T., Maehara K., Utaka M., Sakai T. High enanantioselectivity and broad substrate specificity of a carbonyl reductase: toward a versatile biocatalyst. *J Org Chem* **2001**; *66*: 8682-8684.
70. Yadav J. S., Nanda S., Thirupathi R. P., Bhaskar R. A. Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucuscarota* root. *J Org Chem* **2002**; *67*, 3900-3903.