

Investigación

Resolución microbiológica de 1-fenil-1-propanol y de 1-(4-toluil)-1-etanol con *Nocardia corallina* B-276

Herminia I. Pérez*, Héctor Luna, Norberto Manjarrez y Aida Solís

Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Apartado Postal 23-81, México, D.F. Fax: 5483-7237. E-mail: hperez@cueyatl.uam.mx

Recibido el 21 de marzo del 2001; aceptado el 4 de mayo del 2001

Resumen. Se estudió la resolución microbiológica de alcoholes secundarios quirales con células completas de *Nocardia corallina* B-276. Los alquilaril carbinoles seleccionados fueron resueltos, de sus respectivos racematos, con buen rendimiento y excesos enantioméricos > 99 % del compuesto con configuración *R*. Las cetonas resultantes de la oxidación enantioselectiva, se aislaron con rendimientos del 38-42 % y pueden ser recicladas al proceso de bioseparación. Esta es una nueva aplicación de este microorganismo en química orgánica.
Palabras clave: Alcoholes quirales, cetonas, resolución, *Nocardia corallina*, oxidación.

Introducción

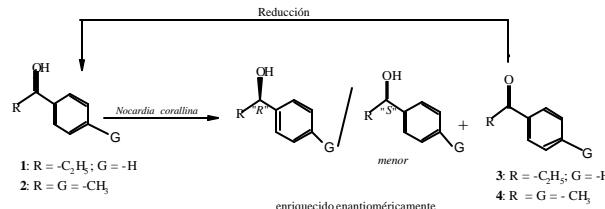
Los alcoholes secundarios quirales son importantes intermediarios para la síntesis de productos naturales, así como de compuestos con actividad biológica. Es innegable que su obtención, en los últimos años por la adición de compuestos orgánicos de zinc a aldehídos en presencia de cantidades catalíticas de un β -aminoalcohol quiral, es una vía de síntesis que ha sido extensivamente estudiada [1,2]. Se han reportado muy altos rendimientos en la reacción utilizando una variedad de aminoalcoholes como ligandos; sin embargo, se presenta el problema de que el ligando quiral debe ser fácilmente accesible o reciclabla para poderse explotar a escala preparativa [3].

Una forma alternativa de enfrentar el problema es obtenerlos a partir del racemato correspondiente; tres métodos se conocen para la preparación de alcoholes ópticamente activos a partir de sus racematos: 1) resolución; 2) oxidación selectiva de uno de los enantiómeros; y 3) desracemización por métodos químicos o biológicos [4].

Nos pareció de interés desarrollar un enfoque biocatalítico para la obtención de alcoholes secundarios quirales, dado que algunas de estas moléculas poseen un alto valor agregado. Con base en nuestros resultados alcanzados con el microorganismo *Nocardia corallina* B-276 [5,6] seleccionamos, en primera instancia, la posibilidad de desarrollar un proceso de oxidación enantioselectiva de una mezcla racémica de estos substratos, lo que permitirá realizar una resolución microbiológica, pudiendo recuperar la cetona resultante, para reciclarla al proceso previa reducción no enantioselectiva (Esquema 1).

Abstract. A microbial resolution of chiral secondary alcohols with whole cells of *Nocardia corallina* B-276 was studied. Racemic alkyaryl carbinoles were resolved into the corresponding (*R*)-compounds in good yields with > 99% enantiomeric excess. This enantioselective oxidation gives ketones in 38-42 % yields and they could be recycled to the bioseparation process. This is a new application of this microorganism in organic chemistry.

Key words: Chiral alcohols, ketones, resolution, *Nocardia corallina*, oxidations.



Esquema 1

Para desarrollar esta propuesta metodológica seleccionamos los siguientes ejemplos de aplicación. Se consideró al 1-fenil-1-propanol, **1**, por sus diversos usos, tales como: 1) agente terapéutico, colerético, 2) en perfumería, 3) como medio para transferencia de calor [7a] y 4) como reactivo quiral para la construcción de compuestos más complejos en síntesis orgánica; en este último caso con un alto valor comercial, p. ej. 183.40 USD por un mililitro del enantiómero *R* y 201.60 USD por la misma cantidad del isómero *S* [8]. También se consideró estudiar la obtención del (*R*)-1-(4-toluil)-1-etanol, un constituyente del aceite esencial de *Curcuma longa* L., (Zingiberaceae) y plantas relacionadas [7b]. En lo referente a su estructura, ambos son alcoholes secundarios quirales, en general alquilaril carbinoles. El estudio de estos substratos ampliarían nuestros resultados alcanzados en la oxidación microbiológica con *Nocardia corallina* B-276 de diaril carbinoles [9] y daría un marco más adecuado para caracterizar los alcances y limitaciones del método.

Resultados y discusión

Se estudió la biotransformación para separar **1** de su racemato; en primera instancia se seleccionó un tiempo de bioconversión de 8 h. Despues del trabajo usual de aislamiento se analizó la mezcla por cromatografía de gases (CG), obteniéndose una relación de 22 % de propiofenona, **3**, y 78 % de la mezcla de alcoholes enantioméricamente enriquecida (Tabla 1). La columna G-TA separó los enantiómeros observándose un 10 % de exceso enantiomérico (*ee*), la rotación óptica presentada es dextrógiro y con base en los datos de rotación informados en la literatura para el enantiómero (*S*): $[\alpha]_D = -46.7$ ($c = 5.1$, CHCl_3) [10]; se le asignó al enantiómero en exceso de nuestro caso, la configuración *R*. Se consideró necesario ampliar los tiempos de biotransformación encontrándose que a las 27 h se observa en el crudo una relación, por CG, cetona:alcohol de 69:31; el análisis del *ee* presenta sólo uno de los enantiómeros, para un porcentaje de *ee* mayor de 99, confirmándose por medio de la rotación óptica que es el isómero dextrógiro, con configuración *R*. La enantioselectividad que alcanza el microorganismo es destacable.

Se obtienen rendimientos de producto aislado del 42 % de la propiofenona, **3**, para reciclar al proceso de separación previa reducción. Así como un rendimiento del 36 % para el alcohol purificado *R*, **1**. Los productos se caracterizaron por IR, RMN ^1H y RMN ^{13}C . La mayor velocidad de oxidación del enantiómero *S* por el microorganismo, es similar a lo observado en nuestro estudio de diaril carbinoles quirales con substituyentes en *para* [9], donde el enantiómero *R* es el producto mayoritario.

Al estudiar el alcohol secundario **2**, un isómero estructural de **1**, al contar con la misma masa molecular es más fácil relacionar los resultados para ir acotando los alcances de esta metodología. El reducir el tamaño de la cadena alquílica y ubicar un substituyente ($-\text{CH}_3$) en la posición *para* del compuesto, deben incrementar las condiciones para favorecer la velocidad de biotransformación y la enantioselectividad del microorganismo [9]. Se ha estudiado que *Nocardia corallina* B-276 posee una enzima multicomponente para el proceso de epoxidación enantioselectiva de alquenos [11], donde predomina el enantiómero *R*. Consideramos que esas reacciones redox con transferencia de electrón también están involucradas en estos procesos de biotransformación, así como la estereoquímica del sitio reactivo de la enzima. Despues de 8 h de bioconversión y el trabajo usual de aislamiento, se obtiene un crudo que por CG en la columna B-PH, presenta una relación cetona:alcohol, 41:59, el análisis del *ee* indica que sólo hay uno de los alcoholes enantioméricos, con un porcentaje de *ee* mayor a 99 (Tabla 1), confirmándose que es dextrógiro por determinación de la rotación óptica; para el enantiómero (*S*): $[\alpha]_D = -43.5$ ($c = 0.994$, CH_3OH) [12]; permitiendo asignar la configuración *R*. El análogo de acetofenona, **4**, presenta un rendimiento de bioconversión del 38 % y se recupera el 96 % del alcohol quiral.

Se estimó relevante el contar con dos métodos para la determinación del exceso enantiomérico del compuesto obte-

Tabla 1. Comparación de las biotransformaciones de racematos de los alquilaril carbinoles **1** y **2** con *Nocardia corallina* B-276.

Substrato	Tiempo (h)	Relación* cetona:alcohol	% de <i>ee</i> *	Configuración**
1	8	22 / 78	10	<i>R</i>
1	27	69 / 31	> 99	<i>R</i>
2	8	41 / 59	> 99	<i>R</i>
2	24	44 / 56	> 99	<i>R</i>

* Determinado por CG usando columnas quirales (ChiralDEX G-TA y B-PH).

** La asignación de la configuración absoluta de alcohol enriquecido se realizó por comparación del signo de la rotación específica con datos en la literatura.

nido, para lo cual se seleccionó además de la CG el método de RMN ^1H , haciendo uso de reactivos de desplazamiento quiral para analizar los racematos, soportados en un equipo de RMN de 500 MHz. Así, el racemato problema se trató, en CDCl_3 , con tris-[3-(heptafluoropropilhidroximetilen)-*d*-alcanforato de europio (III), (+)-[Eu(hfc)₃], y se obtiene una buena resolución de la señal en 4.8 ppm del CH_2OH de **2**, desplazándose a 8.02 y 7.93 ppm respectivamente. Al repetir el experimento con el producto aislado de la biotransformación, sólo se observa una señal, para un porcentaje de *ee* mayor de 99.

El alargamiento de los tiempos de bioconversión, hasta 24 h, se reflejó en rendimientos menores de producto aislado, asumiéndose que el microorganismo degradó o puede incorporar al substrato a su metabolismo.

Con base en estos resultados, se puede afirmar que el proceso de resolución microbiológica de racematos de alquilaril carbinoles quirales con *Nocardia corallina* B-276, es altamente enantioselectivo y es un método alternativo para la preparación de este tipo de compuestos, lo que es una nueva aplicación de este microorganismo en el campo de las biotransformaciones.

Parte experimental

Los alcoholes secundarios seleccionados se prepararon por adición de reactivos de Grignard al aldehído correspondiente, siguiendo el método general informado [13]. Los espectros IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 1600FT, los de RMN ^1H y RMN ^{13}C se obtuvieron en un espectrómetro Bruker DMX500, los desplazamientos químicos están en ppm (δ) respecto al TMS. Las rotaciones específicas fueron medidas en un polarímetro Perkin-Elmer 341 con el disolvente indicado. El análisis por cromatografía de gases fue realizado en un cromatógrafo Hewlett Packard serie 6890, equipado con detector de ionización de flama y columnas quirales ChiralDEX B-PH (30 m) y G-TA (30 m). Las purificaciones en columna flash se realizaron con sílica gel, malla 230-400, empleando disolventes purificados en el laboratorio por los métodos estándares.

La bacteria *Nocardia corallina* B-276 (ATCC 31338) se activó a 30 °C en placas de agar, con la siguiente composición: 3.0 g / L, extracto de carne; 5.0 g / L, peptona; 15.0 g /

L, agar; a pH = 6.8. La incubación de los cultivos líquidos fue realizada en un agitador orbital. El medio de cultivo se preparó de la siguiente manera: Solución A: 0.05 g FeSO₄ × 7H₂O / L; 1.74 g K₂HPO₄ / L; 2.0 g (NH₄)₂SO₄ / L; 1.0 g extracto de levadura / L. Solución B: 1.5 g MgSO₄ / L. Solución C: 2.0 g glucosa / L. Cada solución se esterilizó por separado, y posteriormente se mezclaron bajo condiciones asépticas ajustando el pH final a 8.0 (± 0.5) con KOH al 50 %.

Procedimiento general para realizar las biotransformaciones

Precultivo I

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

Precultivo II

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

Oxidación microbiológica de 1-fenil-1-propanol, 1. Bajo condiciones asépticas el alcohol racémico **1**, 0.15 g (1.1 mmoles) fue adicionado al matraz contenido el Precultivo II utilizando 1 ml de *N,N*-dimetilformamida, seguido por la adición de *n*-octano (10 ml). La mezcla fue incubada a 28-30 °C en un agitador orbital (200 rpm) por 27 h. El progreso de la biotransformación fue monitoreado por cromatografía en capa fina. Al término de la reacción la mezcla fue saturada con NaCl y filtrada a través de celita; la propofenona, **3**, y el alcohol **1**, enantioméricamente enriquecido, fueron extraídos con acetato de etilo (4 × 25 mL). Los productos fueron separados por cromatografía en columna flash (hexano:acetato de etilo, 85:15). Se obtuvieron 0.062 g de la propofenona, **3**, para un 42 % de bioconversión; aceite amarillo pálido cuyos espectros de IR y RMN ¹H fueron idénticos a los publicados [14a, 15a]; y 0.027 g de **1**, para un 36 % de alcohol recuperado como un aceite amarillo pálido. $[\alpha]_D = +46.1$ (c = 0.2, CHCl₃), [lit. $[\alpha]_D = -46.7$ (c = 5.1, CHCl₃), % ee >99, (S)] [10]. IR (película) ν_{max} 3358, 2966, 1683, 1453, 1014 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.36-7.24 (5H, m, aromáticos), 4.58 (1H, t, J = 6.8 Hz, CH-O), 2.08 (1H, s, OH), 1.90-1.68 (2H, m, CH₂), 0.90 (3H, t, J = 6.8 Hz, CH₃); RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) δ 144.56 (C-1 del anillo), 128.34 (C-3 del anillo), 127.43 (C-4 del anillo), 125.93 (C-2 del anillo), 75.95 (CH-OH), 31.82 (CH₂), 10.07 (CH₃).

Determinación del exceso enantiomérico (ee), de (R)-1-fenil-1-propanol

Se realizó por CG utilizando una columna quiral G-TA, 0.3 mm X 30 m, 100 °C, N₂, 0.6 mL / min. Los tiempos de retención

fueron: $t_R = 27.0$ min, $t_S = 27.7$ min. El alcohol enriquecido del proceso de separación enantioselectiva, dió un $t_R = 27.3$ min, para un % ee > 99.

Oxidación microbiológica de 1-(4-toluil)-1-etanol, 2. El alcohol racémico **2**, 0.10 g (0.73 mmoles) fue adicionado en condiciones asépticas al matraz contenido el Precultivo II utilizando 1 mL de *N,N*-dimetilformamida, seguido por la adición de *n*-octano (10 mL). La mezcla fue incubada a 28-30 °C en un agitador orbital (200 rpm) por 8 h. El progreso de la biotransformación fue monitoreado por cromatografía en capa fina. La mezcla fue saturada con NaCl y filtrada a través de celita; el producto, 4-metil acetofenona, **4**, y el alcohol enantioméricamente enriquecido, fueron extraídos con acetato de etilo (4 × 25 mL). Los productos fueron purificados por cromatografía en columna flash (hexano:acetato de etilo, 85:15). Se obtuvieron 0.037 g de la cetona, **4**, para un 38 % de bioconversión; aceite amarillo pálido cuyos espectros de IR y RMN ¹H fueron idénticos a los publicados [14b, 15b]; y 0.048 g del alcohol enriquecido, para un 96 % de alcohol recuperado como un aceite amarillo pálido. $[\alpha]_D = +40.7$ (c = 0.212, CH₃OH), [lit. $[\alpha]_D = -43.5$ (c = 0.994, CH₃OH), % ee >99, (S)] [12]. IR (película) ν_{max} 3373, 2974, 1613, 1514, 1083 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.23 (d, 2H, H-3), 7.13 (d, 2H, H-2), 4.81 (t, 1H, J = 6.5 Hz, CH), 2.33 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.03 (señal ancha, 1H, OH), 1.46 (d, 3H, J = 6.5 Hz, CH₃). RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) δ 142.9 (C-1 del anillo), 137.05 (C-4 del anillo), 129.09 (C-3 del anillo), 125.14 y 125.30 (C-2 del anillo), 70.14 (CH-OH), 25.01 (CH₃), 21.02 (CH₃-Ar).

Determinación del exceso enantiomérico (ee), de (R)-1-(4-toluil)-1-etanol

Se realizó por dos procedimientos:

- 1) Utilizando CG con una columna quiral B-PH, 0.3 mm X 30 m, 100 °C, N₂, 1.0 mL / min. Los tiempos de retención fueron: $t_R = 42.1$ min, $t_S = 42.8$ min. El producto de la separación enantioselectiva, dió, $t_R = 42.1$ min, para un % ee > 99.
- 2) Por RMN ¹H, comparando los datos del producto quiral obtenido con el correspondiente de los alcoholes racémicos **2**, en CDCl₃, referidos a la señal del espectro del hidrógeno de α -CH-OH, desplazándola con el reactivo quiral (+)-[Eu(hfc)₃]. Así la señal del α -CH-OH del racemato en 4.80 ppm, fue desplazada y resuelta con el reactivo indicado a: 8.02 y 7.93 ppm. El alcohol, producto de la separación presentó sólo una señal después de este tratamiento para un % ee > 99.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Proyecto No. 28543N. También agradecemos al M. en C. Atilano Gutiérrez, adscrito a la Unidad Iztapalapa de la UAM, la realización de los espectros de RMN ¹³C y RMN ¹H.

Referencias

1. Okaniwa, M.; Yanada, R.; Ibuka, T. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1047-1050 (y las referencias ahí citadas).
2. Dosa, P.I.; Ruble, J. C.; Fu, G. C. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 444-445.
3. Bae, S. J.; Kim, S. W.; Hyeon, T.; Kim, B. M. *Chem. Commun.* **2000**, *31*-32.
4. Nakamura, K.; Inoue, Y.; Matsuda, T.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6263-6266.
5. Pérez, H. I.; Luna, H.; Maldonado, L. A.; Sandoval, H.; Manjarrez, N.; Solís, A.; Sánchez, R. *Biotechnology Lett.* **1998**, *20*, 77-79.
6. Pérez, H. I.; Luna, H.; Manjarrez, N.; Solís, A.; Nuñez, M.A. *Biotechnology Lett.* **1999**, *21*, 855-858.
7. Budavari, S. *The Merck Index*, 11th ed. Merck & Co., Rahway, N.J., **1989**, a) 547; b) *Ibid* 472.
8. Aldrich: *Manual de productos químicos finos y equipo de laboratorio*. Ed. Aldrich Chemical, Milwaukee, **2000**, 1314.
9. Pérez, H. I.; Luna, H.; Manjarrez, N.; Solís, A.; Nuñez, M. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4263-4268.
10. Prasad, K. R. K.; Joshi, N. N. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3770-3771.
11. Gallagher, S. C.; Cammack, R.; Dalton, H. *Biochem. J.* **1999**, *339*, 79-85.
12. Nakamura, K., Matsuda, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8957-8964.
13. Hilgetag, G., Martini, A. *Weygand / Hilgetag Preparative Organic Chemistry*. 4^a Ed. John Wiley & Sons, New York. **1972**. 878-883.
14. Pouchart, C. J. *The Aldrich Library of FT-IR Spectra*. Ed. Aldrich Chemical, Milwaukee, **1997**, a) *1*(2), 8C; b) *Ibid* *1*(2), 25B.
15. Pouchart, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT-NMR Spectra*. Ed. Aldrich Chemical, Milwaukee, **1992**, a) *1*(2), 802B; b) *Ibid* *1*(2) 818A.