



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: PREPARACIÓN DE FARMOQUÍMICOS

**“REDUCCIÓN DE CETONAS UTILIZANDO BIOCATALIZADORES DE  
ORIGEN VEGETAL”**

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

PRESENTA

QFB: CERVANTES DOMÍNGUEZ FADIA VICTORIA  
2122800384

COMITÉ TUTORAL:

TUTORA: DRA. AÍDA SOLÍS OBA

ASESORA: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

ASESOR: M. EN C. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ

**“REDUCCIÓN DE CETONAS UTILIZANDO BIOCATALIZADORES DE  
ORIGEN VEGETAL”**

**COMITÉ TUTORAL**

**TUTORA: Dra. AÍDA SOLÍS OBA**

---

**Vo.Bo.**

**ASESORA: Dra. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ**

---

**Vo.Bo.**

**ASESOR: M. EN C. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ**

---

**Vo.Bo.**

**ALUMNA: Q.F.B. CERVANTES DOMÍNGUEZ FADIA VICTORIA  
MATRÍCULA: 2122800384**

---

**“REDUCCIÓN DE CETONAS UTILIZANDO BIOCATALIZADORES DE  
ORIGEN VEGETAL”**

**JURADO DE EXÁMEN DE GRADO**

**PRESIDENTE: Dra. MARÍA MYRNA SOLÍS OBA**

---

**Vo.Bo.**

**VOCAL: Dra. MARÍA DEL CARMEN CRUZ LÓPEZ**

---

**Vo.Bo.**

**SECRETARIA: Dra. AÍDA SOLÍS OBA**

---

**Vo.Bo.**

## Resumen

El desarrollo de nuevos procesos para la obtención de moléculas quirales constituye un gran reto para la síntesis orgánica. La biocatálisis involucra el uso de biocatalizadores para llevar a cabo la transformación química de las moléculas. Para la industria química son de especial importancia las reductasas, enzimas que catalizan la reducción asimétrica de cetonas proquirales a sus alcoholes quirales correspondientes.

Los fenilalcoholes ópticamente puros son ampliamente utilizados en la industria de química fina, de perfumería y cosmética.

El presente trabajo tiene como objetivo encontrar biocatalizadores, oxidorreductasas de origen vegetal para la reducción enantioselectiva de acetofenonas y 1-fenilpropanonas, para obtener los alcoholes correspondientes; para ello se evaluó la capacidad oxidorreductasa de diversos vegetales, con la finalidad de proponer nuevas fuentes de biocatalizadores de fácil acceso.

Primeramente se utilizó al benzaldehído como modelo para evaluar la actividad reductasa en semillas, vainas, germinados, cáscaras, frutos y hojas de plantas de las familias *Fabaceae*, *Cucubitateae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Rosaceae*, *Poaceae*, *Vitaceae*, *Musaceae*, *Clusiaceae*, *Cactaceae*, *Lauraceae*, *Solanaceae*, *Amaryllidaceae*, *Anacardiaceae*, *Portulacaceae*, *Asteraceae*. Los materiales vegetales que mostraron porcentajes mayores a 80% de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico fueron las semillas de: chícharo, frijol bayo, frijol ayocote, frijol flor de mayo, frijol cacahuete, frijol negro, frijol pinto, alubia, garbanzo, semilla de mamey, alberjón, haba y maíz palomero. Estas semillas se utilizaron posteriormente para llevar a cabo la reducción de las acetofenonas y 1-fenilpropanonas. Se probaron varias condiciones: uso de codisolventes, temperaturas, diferentes valores de pH y la utilización de glucosa en el medio.

En todos los grupos de materiales vegetales analizados se observaron diferencias en los porcentajes de conversión, tanto en las distintas familias, como entre los géneros de la misma familia, por lo que se puede concluir que el porcentaje de reducción no necesariamente va a ser similar al utilizar vegetales de la misma familia o del mismo género.

Los materiales vegetales con los que se tuvieron los mejores porcentajes de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico fueron las semillas de: chícharo, frijol bayo, frijol ayocote, frijol flor de mayo, frijol cacahuete, frijol negro, frijol pinto, alubia, garbanzo, semilla de mamey, alberjón, haba y maíz palomero. Estas semillas se utilizaron para llevar a cabo la reducción de las acetofenonas y 1-fenilpropanonas; la semilla de mamey, garbanzo y maíz palomero no redujeron la acetofenona.

El mayor porcentaje de reducción de acetofenona usando chícharo como fuente de biocatalizador se obtuvo con etanol como codisolvente, en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 8, en presencia de 20 mg de glucosa por mililitro de reacción, a 30°C y 1300 rpm. Las condiciones utilizadas para la reducción de acetofenona con las semillas de alubia, frijol ayocote, frijol bayo, frijol cacahuate, frijol negro, frijol pinto, haba y alberjón fueron; isopropanol como codisolvente, solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 7.6, 35°C y 1300 rpm.

Los porcentajes más altos de reducción de las cetonas se obtuvieron con alberjón (**1b**, 61%), frijol ayocote (**1h**, 57%) y alubia (**1i**, 45%). Los excesos enantioméricos más altos de los alcoholes obtenidos fueron: 100% para **2a**, **2b**, **2f**, **2i** y **2j**, 97% para **2h** y 89% con el **2d** utilizando semilla de haba como biocatalizador. Usando chícharo y alberjón como biocatalizadores el alcohol **2b** mostró 98% y 99% ee respectivamente y con el **2j** se obtuvo 89% usando chícharo y 100% usando alberjón. El alberjón además presentó 94% ee con el **2f**, 81% con **2h** y 82% para el **2i**. A usar alubia como biocatalizador se obtuvo 93% con el **2i** y 83% con el **2j**. El frijol bayo presentó porcentajes de ee de 91% para **2e**, 89% para **2j** y 85% para el **2c**.

Con haba, chícharo y alberjón se obtiene únicamente el enantiómero **E1** de los alcoholes **2c**, **2d**, **2i** y **2j** y el **E2** para **2a**, **2b**, **2e**, **2f**, **2g**, **2h**, mientras que con frijol ayocote, frijol bayo, frijol cacahuate, frijol flor de mayo, frijol negro y frijol pinto y alubia se obtiene mayoritariamente el enantiómero contrario al obtenido con los otros biocatalizadores, o sea que por ejemplo cuando se obtiene el E1 con haba, chícharo y alberjón, se obtiene el E2 con los demás biocatalizadores.

Cada fuente de biocatalizador tiene preferencia para reducir enantioselectivamente diferentes sustratos.

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría, durante el período Abril-2012 a con número de registro 469514

A mi "*Alma mater*" Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco, por abrirme las puertas una vez más y ofrecerme la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente.

Al Cuerpo Académico Consolidado: Biocatálisis Aplicada a la Química Orgánica, UAM-X, Laboratorio N-201, Biotransformaciones, UAM-Xochimilco

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mis padres por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi carrera y de todas las locuras que he querido realizar.

A mis hermanos Rashid y Zobeida por su apoyo.

A la Dra. Aida por apoyarme de todas las formas para la realización de esta tesis, y por compartir sus conocimientos y su pasión por la química y sobre todo por ser el gran ser humano que es.

A la Dra. Herminia y el Dr. Norberto por haberme recibido en el laboratorio y apoyarme siempre, además de brindar sus conocimientos y su pasión por la investigación.

A la Dra. Julia, Dr. Héctor, Dra. Lili y Dr. Alberto agradezco su apoyo y orientación académica.

A mi amiga Marlen por siempre estar dispuesta a ayudarme y por apoyarme en toda la parte estadística de este trabajo.

A mi amiga Rosa por ayudarme siempre en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio Adolfo, Ricardo y Omar por todo el apoyo que me dieron durante la realización de esta tesis.

## Índice

1. Introducción	10
2. Marco teórico	11
2.1. Actividad biológica y actividad óptica	11
2.2. Obtención de alcoholes enantiopuros por medio de reducción enantioselectiva de cetonas.	14
2.3. Biocatálisis	16
2.3.1. Biocatalizadores	17
2.3.2. Biocatálisis con enzimas purificadas vs biocatálisis con células completas	17
2.3.3. Clasificación de las enzimas	18
2.3.4. Oxidorreductasas	19
2.3.5. Mecanismo de reacción de la reducción usando oxidorreductasas	22
2.3.6. Regeneración de los cofactores	23
2.3.6.1. Alcoholes	23
2.3.6.2. Azúcares	23
2.3.6.3. Aminoácidos	24
2.3.6.4. Hidrógeno	24
3. Planteamiento del problema	26
4. Hipótesis	26
5. Objetivo General	26
6. Objetivos particulares	26
7. Materiales y métodos	28
7.1. Reactivos y disolventes	28
7.2. Desarrollo del método analítico para evaluar la reducción de benzaldehído	28
7.3. Preparación de los biocatalizadores de origen vegetal	28
7.3.1. Material fresco	30
7.3.2. Liofilización	31
7.3.3. Semillas	31
7.3.4. Germinados	32
7.4. Evaluación de la capacidad de reducción de los materiales vegetales	32
7.5. Reducción química de acetofenonas y 1- fenilpropanonas	32



7.6. Desarrollo de los métodos analíticos de la reducción de las acetofenonas y 1-fenilpropanonas	33
7.7. Evaluación de la reducción de acetofenona con materiales vegetales seleccionados	34
7.7.1. Preparación de los extractos para la reacción de reducción de la acetofenona	34
7.7.2. Codisolvente	35
7.7.3. pH	35
7.7.4. Temperatura	35
7.7.5. Glucosa	35
7.8. Reducción de acetofenonas y fenilpropanonas con extractos materiales vegetales seleccionados	36
7.9. Análisis estadístico	36
8. Resultados y discusión	37
8.1. Selección de material vegetal con actividad oxidorreductasa	37
8.1.1. Grupo A, Semillas	39
8.1.2. Grupo B, Germinados	41
8.1.3. Grupo C, Harinas de semillas	42
8.1.4. Grupo D, Frutos	43
8.1.5. Grupo E, Residuos vegetales	44
8.1.6. Grupo F, Liofilizados	45
8.2. Reducción de acetofenona usando extractos de diferentes semillas como biocatalizadores	47
8.2.1. Codisolvente	47
8.2.2. pH	48
8.2.3. Glucosa	50
8.2.4. Temperatura	52
8.3. Análisis de las acetofenonas, 1-fenilpropanonas y sus alcoholes por CLAR y CG	53
8.4. Reducción biocatalizada de acetofenonas y 1-fenilpropanonas	55
8.4.1. Análisis de los porcentajes de reducción de las cetonas <b>1a-1l</b>	56
8.4.2 Análisis de los porcentajes de ee de los alcoholes <b>2a-2j</b>	60
9. Conclusiones	64
10. Perspectivas	65
11. Bibliografía	66

## 1. Introducción

La demanda de compuestos ópticamente puros ha ido en aumento, tanto en la industria farmacéutica como en la de química fina y agroalimentaria. La quiralidad es un factor importante en la actividad biológica. Cuando un enantiómero es responsable de la actividad deseada, su par enantiomérico puede ser inactivo, poseer alguna actividad de interés, ser antagonista del enantiómero contrario, o tener actividad diferente, ya sea deseable o indeseable. El desarrollo de nuevos procesos para la obtención de moléculas quirales constituye un gran reto para la síntesis orgánica.<sup>1</sup>

La biocatálisis involucra el uso de biocatalizadores en la transformación química de las moléculas, debido a la gran regio- quimio- y enantio selectividad que muestran las enzimas, se ha puesto mayor atención en el campo de las biotransformaciones para la producción de precursores, así como de compuestos biológicamente activos, con la ventaja de ser un proceso ambientalmente atractivo.<sup>2</sup>

Las oxido-reductasas son un grupo de enzimas que catalizan reacciones de oxidación y reducción. Para la industria química son de especial importancia las enzimas que catalizan la reducción asimétrica de cetonas proquirales a sus alcoholes quirales correspondientes.<sup>3</sup>

En años recientes los alcoholes secundarios ópticamente puros han tenido gran importancia comercial gracias a sus numerosas aplicaciones. Los fenilalcoholes ópticamente puros son ampliamente utilizados en la industria de química fina, de perfumería y cosmética.<sup>5</sup> Entre ellos se encuentra el 1-fenil-1-propanol ópticamente puro, que tiene diversos usos, tales como agente terapéutico, colerético, además es utilizado en perfumería y como reactivo quiral para la construcción de compuestos más complejos.<sup>4</sup>

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la reducción enantioselectiva de acetofenonas y 1-fenilpropanonas, para obtener sus correspondientes alcoholes con excesos enantioméricos mayores al 80%, utilizando oxidorreductasas de origen vegetal. Para ello se evaluó la capacidad oxidorreductasa de diversos vegetales, con la finalidad de proponer fuentes de biocatalizadores de fácil acceso.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Actividad biológica y actividad óptica

El concepto de “quiralidad” es conocido en química desde 1870; sin embargo, durante décadas la farmacopea estaba dominada por racematos y, es hasta la década de los 70’s que se volvió muy claro que la actividad biológica de los enantiómeros podía ser diferente hasta el punto en el cual alguno de los dos podía ser tóxico o dañino.<sup>5</sup>

En este respecto nos encontramos con el desastre de Contergan (talidomida), medicamento que se comercializó como sedante, este efecto farmacológico fue aprovechado para el tratamiento de los síntomas del embarazo como la ansiedad, el insomnio, las náuseas y los vómitos, su publicidad aseguraba su inocuidad. Sin embargo el 18 de noviembre de 1961, el Dr. Widukind Lenz, pediatra del Hospital de la Universidad de Hamburgo, comunicó en una reunión en Dusseldorf, 14 casos de dismelia perfectamente documentados, cuyo posible origen era la talidomida. Posteriormente se comprobó que el efecto teratogénico se debió a que el fármaco fue administrado como mezcla racémica, donde el enantiómero “R” es inductor del sueño en tanto que el “S” provoca el desarrollo inadecuado del feto (antiangiogénesis), sobre todo durante los dos primeros meses de la gestación.<sup>6</sup>

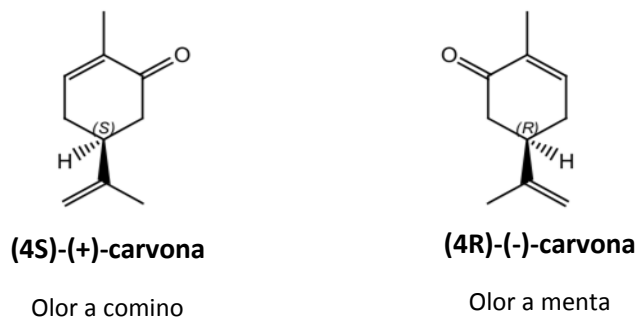
Las investigaciones de la Dra. Gilla Kaplan, en 1991, revelaron que la talidomida (enantiómero S), además, es un potente inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa. Durante los años 80 se consolida la importancia de la estereoquímica sobre la farmacocinética y la disposición de los fármacos, así, las pruebas farmacológicas para cada uno de los enantiómeros se volvieron una práctica común y obligatoria.<sup>7</sup>

Los aminoácidos y carbohidratos son precursores de proteínas y ácidos nucleicos. Los 21 aminoácidos esenciales son enantiómeros L, mientras que muchos carbohidratos tienen preferentemente configuración D. Así, los procesos fisiológicos esenciales son por lo tanto homquirales, estos muestran un 100% de estereoselectividad y solo involucran a uno de todos los posibles estereoisómeros.<sup>1</sup>

Cuando se introducen al organismo compuestos exógenos, los procesos fisiológicos muestran un alto grado de diferenciación quiral, como consecuencia de una interacción con cierto tipo de dianas quirales, como son los receptores, enzimas y canales iónicos. Por esta razón se pueden esperar diferentes tipos de respuestas biológicas como son: 1) uno de los enantiómeros tiene la actividad biológica deseada, mientras que su par enantiomérico es inactivo; 2) los pares enantioméricos poseen propiedades farmacológicas idénticas, tanto en

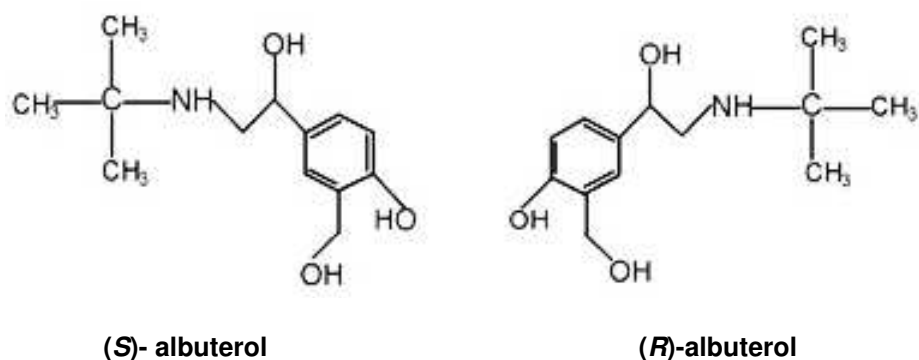
el punto de vista cualitativo como cuantitativo; 3) la actividad es cualitativamente idéntica pero cuantitativamente diferente y 4) la actividad farmacológica de los dos enantiómeros es diferente. Las interacciones fármaco-receptor altamente específicas muestran también diferencias sobre la absorción, distribución y eliminación de cada uno de los estereoisómeros.<sup>1</sup> A medida que surgían estos descubrimientos, se volvió claro que los fármacos racémicos podían ser la causa de interacción entre fármacos y reacciones adversas severas, por lo que el uso de fármacos enantioméricamente puros podría reducir las dosis y presentar menor toxicidad. Estos factores farmacodinámicos y farmacocinéticos han influido en que actualmente se prefiera el uso de uno solo de los enantiómeros.<sup>1, 8</sup>

Alrededor del 56% de los fármacos utilizados actualmente son compuestos quirales, y aproximadamente el 88% de estos compuestos quirales todavía se utilizan en forma de racematos, aun sabiendo que en algunos casos hay una gran diferencia en la actividad biológica de cada enantiómero.<sup>7</sup> Ejemplo de ellos son: La (4*S*)-(+)-carvona y la (4*R*)-(-)-carvona (figura 1), que se usan como aromatizantes, poseen distintos olores debido al rol de la quiralidad en la actividad biológica, en este caso puede deberse a alguna diferencia en la estructura tridimensional del receptor y/o en que sean distintos receptores.<sup>7</sup>



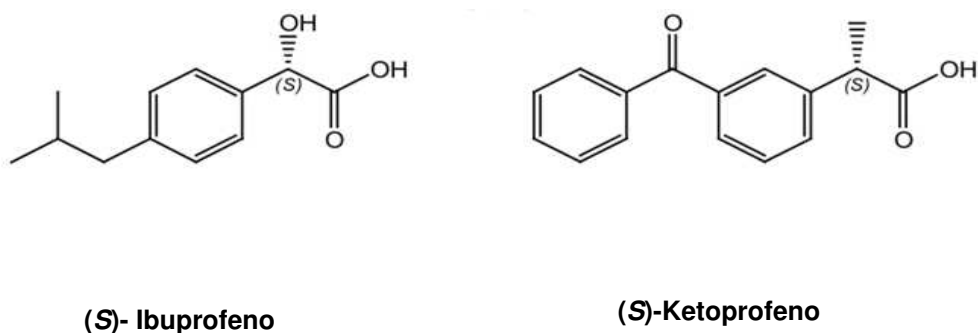
**Figura 1.** Estructuras de los enantiómeros de la  $\pm$ carvona

Otro ejemplo son el (*R*) y (*S*)-albuterol (figura 2) que es un fármaco líder de la familia de los broncodilatadores, agonista adrenoreceptor que puede incrementar el diámetro de las vías respiratorias bronquiales sin aumentar el ritmo cardíaco. Mientras que el (*S*)-albuterol, no es inerte, indirectamente antagoniza los beneficios del (*R*)-albuterol y puede tener efectos proinflamatorios.<sup>7</sup>



**Figura 2.** Estructura química del R y S-albuterol

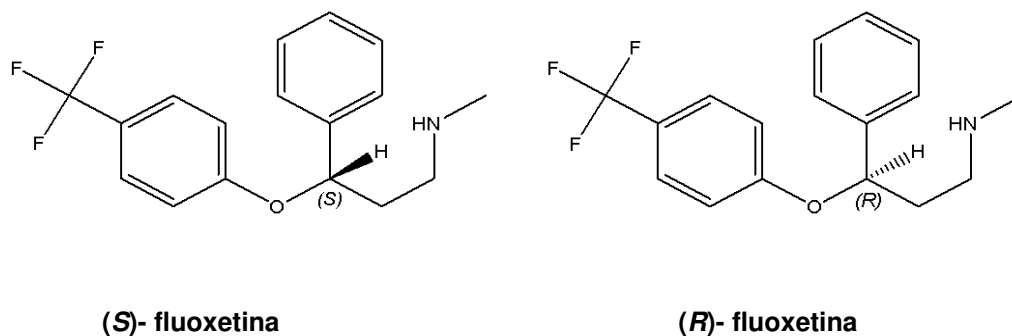
La mayoría de los antiinflamatorios no esteroideos que se utilizan actualmente son derivados de ácidos 2-arilpropiónicos o profenos. Sin embargo los racematos son responsables de muchos efectos adversos, los cuales afectan distintos órganos, incluyendo el tracto gastrointestinal, riñones, sistema respiratorio y el hígado. En el caso del ketoprofeno (figura 3), el enantiómero “S”, es más potente que el racemato. El enantiómero S muestra algunas ventajas como son: analgesia efectiva con dosis más pequeñas, aumento en la biodisponibilidad del fármaco, reducción de la irritación gástrica y aumento en su tolerancia. Aunque se piensa que el ibuprofeno racémico y el (S)-ibuprofeno (figura 3) son bioequivalentes, el uso de este último tiene como ventajas que el efecto farmacológico es más rápido.<sup>7</sup>



**Figura 3.** Estructura química del S-ibuprofeno y del S-ketoprofeno

La fluoxetina (figura 4), fue el primer inhibidor de recaptura de serotonina y el principal fármaco utilizado en el tratamiento contra la depresión, se utilizaba como racemato ya que en un inicio se encontró que los dos enantiómeros servían para la misma función, por lo que no se

consideró esencial vender un fármaco enantioméricamente puro. Sin embargo en 1996 la empresa farmacéutica Sepracor menciona que la (S)-(+)-fluoxetina puede ser utilizada para el tratamiento de la migraña y que la (R)-(-)-fluoxetina es la adecuada para el tratamiento de la depresión.<sup>1</sup>



**Figura 4.** Estructura de la R y S- fluoxetina

Algunas de las rutas de síntesis de los fármacos mencionados anteriormente tienen como precursores alcoholes secundarios; los cuales son muy importantes ya que con frecuencia se utilizan como intermediarios para la introducción de un centro quiral, para la síntesis de compuestos con actividad biológica, utilizados en la industria farmacéutica, química y agroquímica.<sup>9, 10</sup>

Los fenilalcoholes son muy utilizados en la industria de química fina, de perfumería y cosmética.<sup>8</sup> Entre ellos se encuentra el 1-fenil-1-propanol, que es utilizado en perfumería y como reactivo quiral para la construcción de compuestos más complejos en síntesis orgánica.<sup>4</sup> La reducción estereoselectiva del 3-halo-1-ariloxi-2-propanona, da como resultado bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, de los cuales, el enantiómero "S" del alcohol correspondiente es farmacológicamente activo y el "R" no muestra la función deseada.<sup>11</sup> El (-)-2-cloro-1-feniletanol es precursor para la síntesis de fármacos antidepresivos y  $\alpha$ - o  $\beta$ -adrenérgicos, como la fluoxetina, tomoxetina y nisoxetina.<sup>12</sup>

## **2.2. Obtención de alcoholes enantiopuros por medio de la reducción enantioselectiva de cetonas.**

En la última década, la demanda de compuestos ópticamente puros ha ido en aumento; así el desarrollo de nuevos procesos para su obtención es un gran reto para la síntesis orgánica.<sup>3</sup> Se han desarrollado diversos métodos para llevar a cabo la síntesis enantioselectiva de

alcoholes quirales como son:

- Síntesis asimétrica: la cual se puede llevar a cabo a partir de reacciones de sustratos aquirales con reactivos quirales o reacción en centros proquirales con reactivos quirales o aquirales.
- Resolución: la cual separa enantiómeros a partir de una mezcla racémica y se pueden llevar a cabo por procesos físicos, químicos o biológicos.<sup>13,14</sup>

La síntesis asimétrica se ha convertido en una rama importante de la química orgánica. La reducción de cetonas para la obtención de alcoholes enantioméricamente puros se puede realizar por medio de: hidrogenación catalítica utilizando complejos de rodio o rutenio, que tienen un ligando quiral de difosfina;<sup>15</sup> o utilizando biocatalizadores, que pueden ser enzimas aisladas o células completas de microorganismos o plantas.<sup>16</sup>

Por ejemplo Xie Y., *et. al.*, realizaron la reducción de acetofenona, propiofenona y 4-metoxiacetofenona con extracto crudo de enzimas preparadas a partir de la harina de frijol adzuki, para la acetofenona se tuvo 95% de conversión y 98% de ee, en el caso de la 4-metoxiacetofenona se reportó un porcentaje de conversión de 19.6% y 99.9% de ee y con la propiofenona se obtuvo un 75% de conversión y 92.4% de ee, los tiempos de reacción oscilan entre las 48 y 72 horas.<sup>17</sup>

Matsuo K., *et. al.*, llevan a cabo la reducción asimétrica de 2-cloroacetofenona, usando germinado de rábano como fuente de biocatalizador, y obtienen un ee del 80% después de 3 días de reacción.<sup>16</sup>

Machado L., *et. al.*, utilizaron dos tipos de yuca, *Manihot esculenta* y *Manihot dulcis* como fuente de reductasa, la reducción de acetofenona con *M. esculenta* fue de 84% con un 94% ee y 87% de conversión y 97% ee. Utilizando *M. dulcis*; para la reducción de la 3-metoxiacetofenona se observó 88% de conversión y 94% ee con *M. esculenta* como biocatalizador, y con *M. dulcis* se obtuvo un 89.4% de conversión y 96% de ee.<sup>18</sup>

Andrade L., *et. al.*, estudiaron al *Allium schoenoprasum*, *Arctium lappa*, *Arracacia xanthorrhiza*, *Beta vulgaris*, *Brassica rapa*, *Colocasia esculenta*, *Coriandrum sativum*, *Dioscorea alata*, *Ipomoea batatas blanca y roja*, *Manihot esculenta*, *Nelumbo nucifera*, *Polymnia sonchifolia*, *Raphanus sativus*, *Solanum tuberosum* y *Zingiber officinale* como fuente de reductasa y la acetofenona como sustrato modelo; con *Arracacia xanthorrhiza* se logró un 91% de conversión y con *Beta vulgaris* 83%, mientras que con las demás se obtuvieron porcentajes menores al 65%, con 4 de las 16 plantas se obtuvieron porcentajes de ee mayores al 98%. Con la 4-bromoacetofenona los porcentajes de conversión fueron menores a 60% y con 6 de 10 plantas

los porcentajes de *ee* fueron mayores a 98%; para el caso de la 4-metilacetofenona las conversiones fueron menores al 32% y con 5 de 10 plantas los % *ee* fueron mayores al 98%.<sup>19</sup> Liu X., *et. al.*, usaron zanahoria y apio para catalizar la reducción de diversas cetonas. Con la acetofenona, obtuvieron 97% de conversión y 96% *ee* con zanahoria y 100% de conversión y 99% *ee* con apio; para 4-metilacetofenona un 26% de conversión y 99% *ee* con zanahoria y 37% de conversión y 99% *ee* con apio; con 4-metoxiacetofenona 12% de conversión y 99% *ee* con zanahoria, 19% conversión y 99% *ee* con apio; con 4-cloroacetofenona 39% conversión y 95% *ee* con zanahoria, 58% de conversión y 92% *ee* con apio; con 2-cloroacetofenona 18% conversión y 94% *ee* con zanahoria, 28% conversión y 90% *ee* con apio; con 3-cloroacetofenona 43% de conversión y 96% *ee* con zanahoria, 65% de conversión y 93% *ee* con apio.<sup>20</sup>

### **2.3. Biocatálisis**

La biocatálisis es una rama de la biotecnología que involucra el uso de biocatalizadores en la transformación química de las moléculas o sustratos. Es importante señalar la versatilidad de las reacciones que catalizan los biocatalizadores, ya que los sustratos empleados en una reacción biocatalítica, no son necesariamente los que aceptan las enzimas en las reacciones que forman parte del metabolismo del organismo del cual proviene la misma. Los biocatalizadores pueden ser células completas o tejidos, así como enzimas aisladas con mayor o menor grado de pureza.<sup>2</sup>

La producción de compuestos químicos finos y fármacos por métodos biotecnológicos ha sido un campo de investigación emergente. La biocatálisis cuenta con características muy atractivas, especialmente en la síntesis de precursores quirales que pueden dar como resultado compuestos enantioméricamente puros, en condiciones suaves de reacción (temperatura y pH fisiológico, agua como medio de reacción). Se ha puesto mayor atención en el campo de las biotransformaciones como tecnología verde para las transformaciones asimétricas, ya que el uso de biocatalizadores generalmente evita pasos de protección y desprotección de grupos funcionales, muy utilizados en síntesis orgánica tradicional; esto permite tener procesos más cortos, producir menos desperdicios, y son ambiental y económicamente mejores que las rutas químicas convencionales.<sup>3, 21</sup>



### 2.3.1. Biocatalizadores

Un catalizador es una sustancia que aumenta la velocidad de una reacción química, sin verse alterada ella misma en el proceso global. La mayor parte de los biocatalizadores, aunque no todos ellos, son proteínas que denominamos enzimas.<sup>22</sup>

El papel de un catalizador consiste en reducir el valor de  $\Delta G^\circ$  al facilitar la formación del estado de transición. Una enzima une una molécula de sustrato en una región de la enzima denominada "sitio activo"; el sitio activo es con frecuencia un bolsillo o una hendidura rodeada por cadenas laterales de aminoácidos, que facilitan la unión del sustrato y por otras cadenas laterales que intervienen en la catálisis.<sup>22</sup> Las enzimas son capaces de catalizar reacciones con alta regio y estereoselectividad.<sup>23</sup>

Las ventajas de utilizar biocatalizadores son:

- Son muy eficientes ya que aceleran la velocidad de una reacción.
- Catalizan reacciones difíciles de obtener por técnicas en química orgánica clásica.
- Estereoselectividad, regioselectividad y selectividad química.
- Condiciones de reacción suaves, frecuentemente a temperatura ambiente y pH cercano a la neutralidad.
- Producen menor contaminación medioambiental
- Eficientes en pequeñas cantidades.
- Extremadamente versátiles y con un amplio espectro de reacciones.<sup>24</sup>

### 2.3.2. Biocatálisis con enzimas purificadas vs biocatálisis con células completas

Como biocatalizadores pueden utilizarse tanto enzimas aisladas como células completas. Comparadas con las células completas, las enzimas pueden dar ciertos beneficios, como son alta productividad y una purificación sencilla del producto de reacción. Anteriormente, solo las enzimas que se producían abundantemente en las células podían utilizarse en la industria; sin embargo actualmente es posible producir grandes cantidades de enzima a través del uso de la tecnología de ADN recombinante. Así la secuencia de ADN de una enzima en específico puede clonarse en un vector de expresión y transferirla a un huésped como *E. coli* o *S. cerevisiae* para la expresión de los genes, de esta forma se puede producir una mayor cantidad de la enzima deseada.<sup>25</sup>

Las ventajas de utilizar células completas son:

- Se pueden usar cuando se requiere de una enzima difícil de aislar.

- En reacciones dependientes de cofactores no es necesario la adición de estos al medio de reacción, ya que se usa la misma maquinaria celular para tener la presencia de estos, así como su regeneración.
- Las fuentes de enzimas pueden provenir de materias primas baratas y abundantes, como puede ser el uso de los residuos de plantas.
- Son fuentes de distintos tipos de enzimas que catalizan una gran gama de reacciones.<sup>16,25</sup>

El material vegetal es una fuente promisoría de biocatalizadores que no ha sido tan explorada como en el caso de los microorganismos. Las semillas como fuente de biocatalizadores presentan las siguientes ventajas: 1) son relativamente fáciles de conseguir, 2) pueden preservarse por largo tiempo, 3) pueden germinar en cualquier momento del año si se le proveen las condiciones apropiadas y 4) pueden conseguirse a un bajo precio.<sup>26-28</sup>

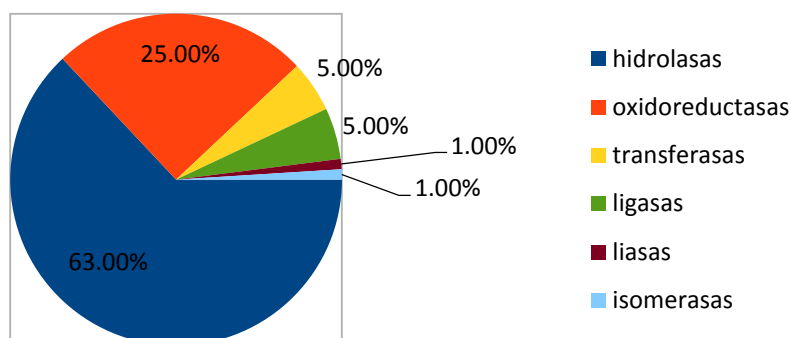
### 2.3.3. Clasificación de las enzimas

Las enzimas se dividen en 6 grupos, de acuerdo al tipo de reacción que catalizan (Tabla1).

**Tabla 1.** Clasificación de las enzimas.<sup>29, 30</sup>

Enzima	Tipo de reacción	Subclases representativas
Oxidoreductasas	Catalizan la transferencia de oxígeno, hidrógeno o electrones de un sustrato a otro.	Oxidasas, peroxidasas, oxigenasas, deshidrogenasas
Transferasas	Catalizan la transferencia de grupos funcionales de una molécula a otra.	Glicosiltransferasas, transquetolasas, metiltransferasas, transaldolasas, aciltransferasas, transaminasas
Hidrolasas	Catalizan rupturas hidrolíticas.	Esterasas, lipasas, proteasas, glicosidasas, fosfatasas
Liasas	Catalizan la eliminación o adición de un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico.	Descarboxilasas, aldolasas, quetolasas, hidratasas, deshidratasas
Isomerasas	Catalizan reordenamientos intramoleculares.	Racemasas, epimerasas, isomerasas
Ligasas	Catalizan reacciones en las que se unen dos moléculas.	Sintetasas, carboxilasas

Se estima que aproximadamente el 60% de las biotransformaciones utilizan hidrolasas, seguidas por las oxidoreductasas con un 20%.<sup>25</sup> En la figura 5 se muestra el porcentaje de uso de las distintas enzimas para biotransformaciones.



**Figura 5.** Porcentajes del uso de enzimas para biotransformaciones.<sup>29</sup>

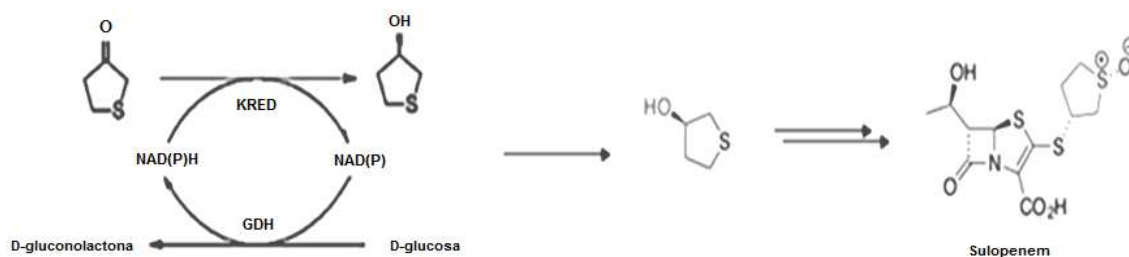
#### 2.3.4. Oxidorreductasas

Aproximadamente el 20% de los procesos industriales químicos, que involucran el uso de biocatalizadores, se llevan a cabo con oxidoreductasas, las cuales son una alternativa muy atractiva desde el punto de vista ambiental, en comparación con el uso de catalizadores químicos redox, que usualmente contienen metales de transición.<sup>3</sup>

En el caso de estas enzimas, es mejor utilizar células completas en lugar de enzimas aisladas, ya que, como se mencionó anteriormente es necesaria la utilización y la regeneración de un cofactor.<sup>3</sup>

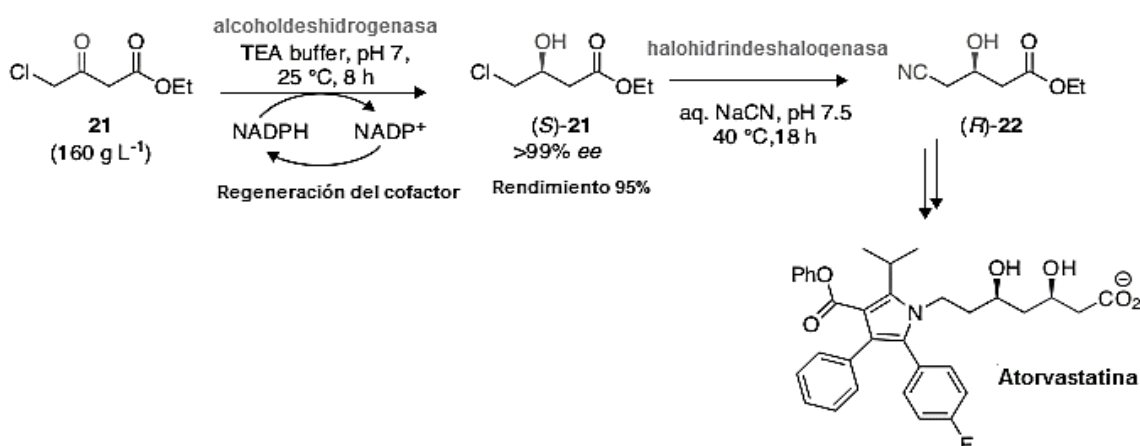
En la última década las oxidoreductasas han sido muy estudiadas por la academia y la industria. Las carbonilreductasas, son una clase de oxidoreductasas dependientes de nicotinamida, que catalizan la reducción de compuestos carbonílicos para producir alcoholes. Debido a su estricto reconocimiento del sustrato y por lo tanto la formación de productos con un alto exceso enantiomérico, este tipo de enzimas han sido utilizadas para obtener alcoholes ópticamente puros a partir de cetonas, los cuales son precursores importantes utilizados en la industria química y farmacéutica.<sup>21, 31</sup>

Como ejemplos de algunas de las transformaciones reportadas usando este tipo de enzimas, se encuentra la reducción asimétrica de la tetrahidrotiofen-3-ona (figura 6) para la obtención del (*R*)-tetrahidrotiofen-3-ol, que es un componente clave para la síntesis del antibacterial sulopenem.<sup>14</sup>



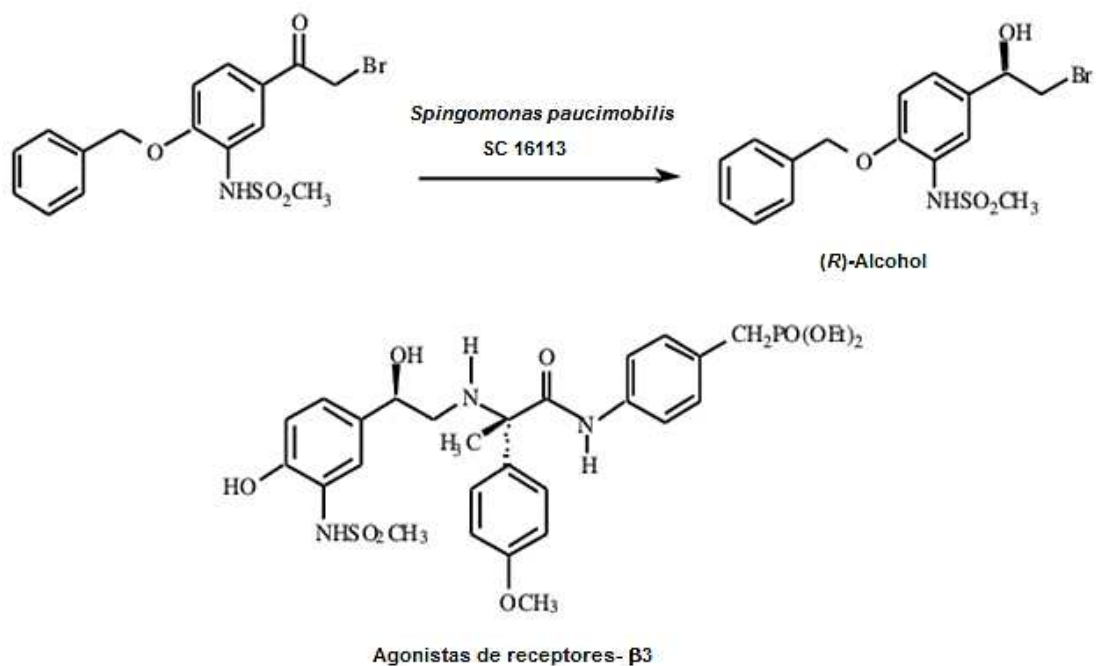
**Figura 6.** Reducción de la tetrahidrotiofen-3-ona para obtener (*R*)-tetrahidrotiofen-3-ol, precursor de sulopenem<sup>14</sup>.

Otro ejemplo es la síntesis de uno de los precursores para la producción de la atorvastatina, se ha realizado por medio de la reducción asimétrica del 4-cloro-3-oxo-utanoato de etilo con aldehído deshidrogenasas, el (*S*)-alcohol correspondiente se ha obtenido con un ee > 99% (Figura 7).



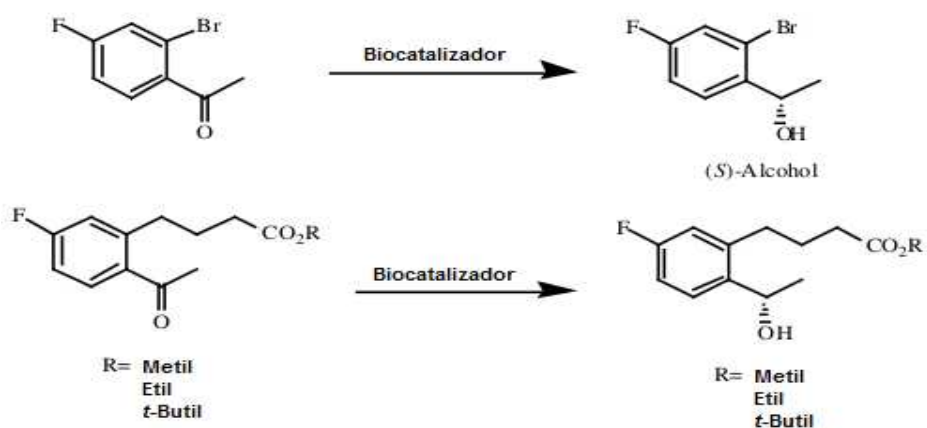
**Figura 7.** Biocatálisis para obtención de precursores enantioméricamente puros para la síntesis de atorvastatina.<sup>21</sup>

La reducción microbiológica del 4-benziloxi-3-metano-sulfonilamino-2'-bromo-acetofenona (sintón para la producción de una molécula agonista del receptor  $\beta_3$ ) a su correspondiente *R*-alcohol, se ha llevado a cabo utilizando *Spingomonas paucimobilis* SC 16113, obteniendo un rendimiento de 85% y un ee de 98% (Figura 8).



**Figura 8.** Reducción microbiológica del 4-benziloxi-3-metano-sulfonilamino-2'-bromo-acetofenona a su correspondiente *R*-alcohol.<sup>32</sup>

También el intermediario quiral (*S*)-1-(2'-bromo-4'-fluorofenil) etanol, utilizado en la síntesis de fármacos anti alzhéimer, se ha preparado por medio de la reducción enantioselectiva de la 2-bromo-4-fluoro acetofenona con *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Spingomonas*, se ha obtenido un rendimiento mayor al 90% y un 99% de *ee*.<sup>21,32</sup>



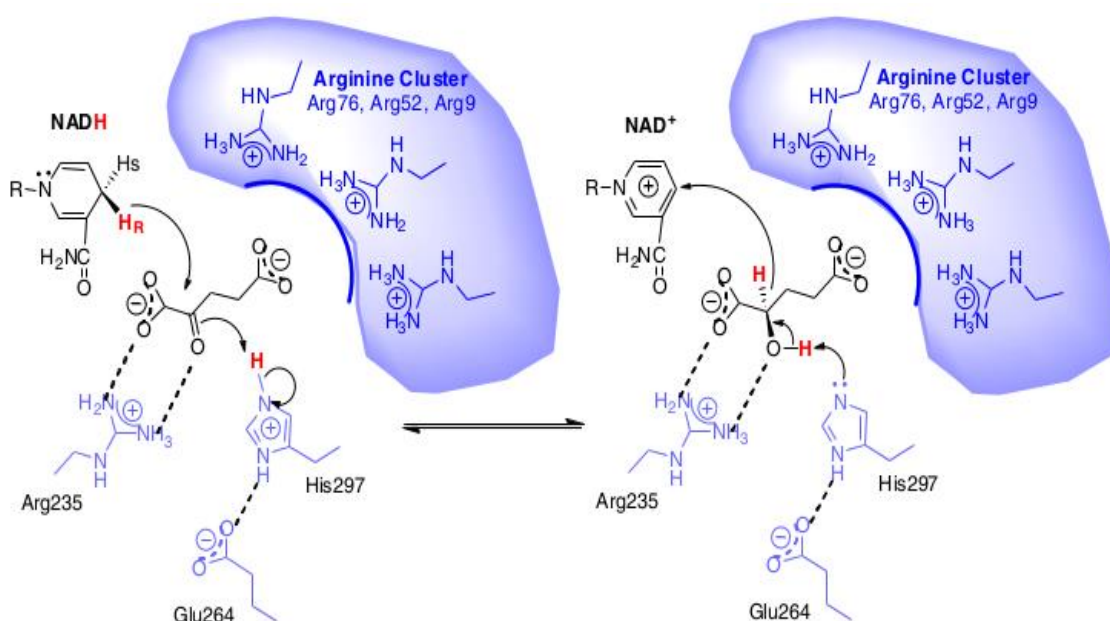
**Figura 9.** Reducción de derivados de acetofenona para la obtención de precursores de fármacos anti Alzhéimer.<sup>32</sup>

### 2.3.5. Mecanismo de reacción de la reducción usando oxidorreductasas

Las oxidorreductasas, como las deshidrogenasas, reductasas, oxidasas y oxigenasas, requieren coenzimas como el NADH, NADPH o flavina. Las reacciones redox, se llevan a cabo por medio de 2 reacciones simultáneas, una de reducción y otra de oxidación y son transformados al menos dos sustratos; la reducción de una cetona se acopla a la oxidación de una coenzima. La reducción es la reacción más frecuente que llevan a cabo las oxidorreductasas.<sup>11</sup> Las enzimas y las coenzimas trabajan en conjunto para catalizar estas reacciones. El mecanismo de reducción con NADH como coenzima procede de la siguiente manera (Figura 10):

1. La coenzima y el sustrato se unen a la enzima.
2. El sustrato se reduce, mientras que la coenzima se oxida.
3. La coenzima y el producto se disocian de la enzima.

El mecanismo y estereoquímica para las deshidrogenasas dependientes de NAD (P)H, se ha estudiado con detalle. El hidruro, que proviene del cofactor, ataca la cara *re* o *si* del carbonilo, dependiendo de la orientación de la unión del sustrato a la enzima, lo cual resulta en la producción del alcohol *R* o *S*, respectivamente.<sup>3</sup>



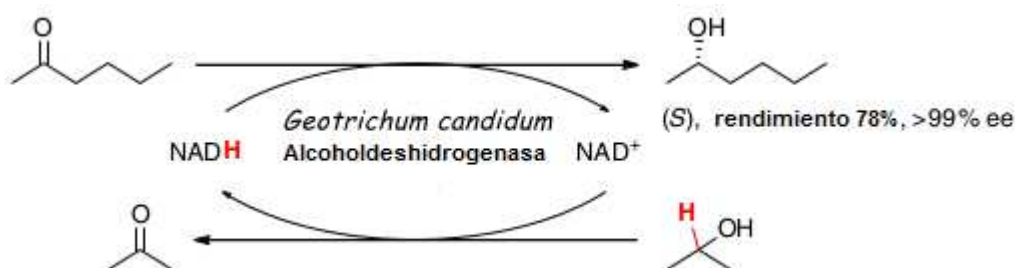
**Figura 10.** Mecanismo de reducción de cetonas catalizada por oxidorreductasas.<sup>33</sup>

### 2.3.6. Regeneración de los cofactores

Debido a que las coenzimas son muy caras para utilizarse como reactivos no reutilizables, se han buscado formas para que la forma oxidada de la coenzima, se transforme a la forma reducida para utilizarla en el siguiente ciclo de reacción. Para poder llevar a cabo la reducción del cofactor, es necesario tener fuentes de hidrógeno, a continuación se discuten algunas de estas fuentes:

#### 2.3.6.1. Alcoholes

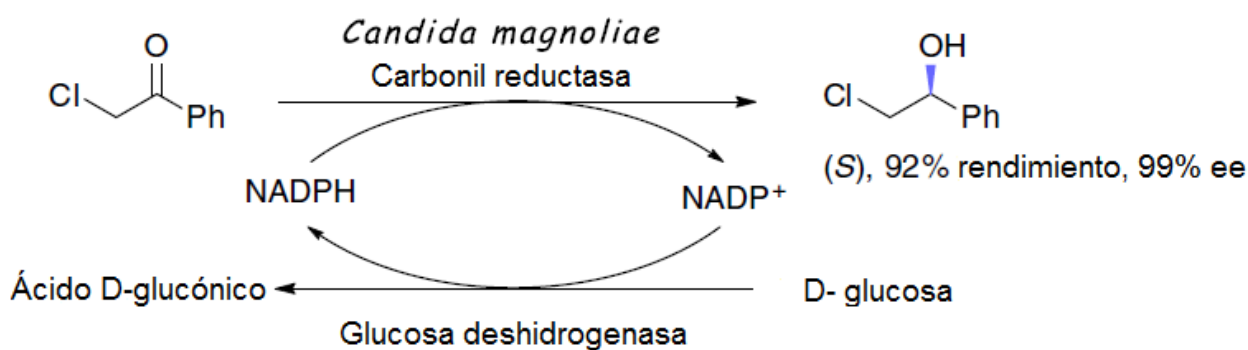
Los alcoholes, como el etanol y el 2-propanol, se han utilizado ampliamente para la regeneración de las coenzimas utilizadas en las reacciones de reducción catalizadas por oxidorreductasas. Usualmente se utiliza un exceso de la fuente de hidrógeno para forzar el equilibrio de la reacción hacia la formación de productos. Por ejemplo se realizó la reducción de hexanona al (S)-2-hexanol utilizando la alcohol deshidrogenasa de *Geotrichum candidum*, con NADH en un líquido iónico y 2-propanol, con un rendimiento de 72% y un ee de 99% (figura 11).<sup>33</sup>



**Figura 11.** Reducción enzimática de hexanona, ejemplo de regeneración del cofactor NADH en presencia de 2-propanol

#### 2.3.6.2. Azúcares

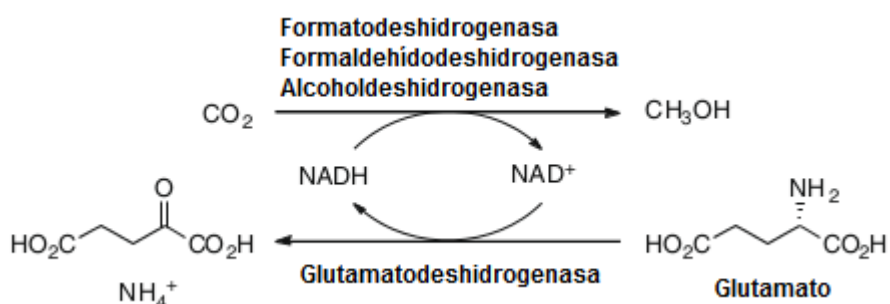
Se han utilizado tanto la glucosa como la glucosa-6-fosfato para la regeneración de cofactores. Por ejemplo la reducción de cetonas con la reductasa de *Candida magnolia*, se realizó en presencia de glucosa y glucosa deshidrogenasa, para regenerar la forma reducida de la coenzima (figura 12), se obtuvo 92% de rendimiento y 99% de ee.<sup>33</sup>



**Figura 12.** Reducción de 2-cloro-1-feniletanona en presencia de la glucosa para la regeneración de NADPH.<sup>33</sup>

### 2.3.6.3. Aminoácidos

Se ha utilizado la glutamato deshidrogenasa para la regeneración del NADH. Por ejemplo en la reducción del dióxido de carbono a metanol, el cofactor oxidado (NAD<sup>+</sup>) se redujo (NADH), por medio de la glutamato deshidrogenasa y ácido glutámico<sup>33</sup> (Figura 13).

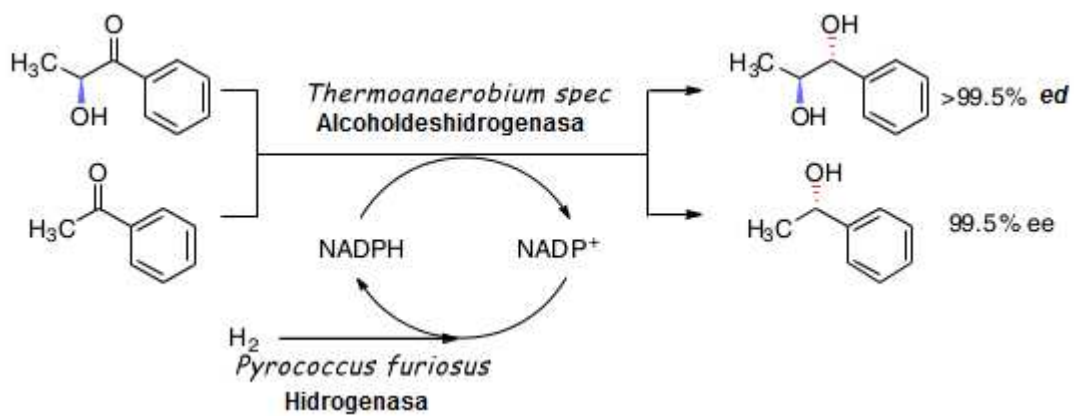


**Figura 13.** Ejemplo de la regeneración de cofactor en presencia de aminoácidos.<sup>29</sup>

### 2.3.6.4. Hidrógeno

El hidrógeno molecular se ha utilizado para reciclar coenzimas. Por ejemplo la alcohol deshidrogenasa termofílica dependiente de NADPH, proveniente de *Thermoanaerobium sp.* se utilizó para reducir la (2S)-hidroxi-1-fenilpropanona al diol correspondiente (1R, 2S)-hidroxi-fenilpropanodiol con un 98% de transformación y 99.5% de ee, como se observa en la figura 14, se regeneró el NADH en presencia de H<sub>2</sub> y una hidrogenasa. Utilizando este mismo sistema, también se ha llevado a cabo la reducción de acetofenona.<sup>33</sup>





**Figura 14.** Reducción de (2S)-hidroxi-1-fenilpropanona, regeneración de NADPH por medio de hidrógeno molecular<sup>33</sup>

### **3. Planteamiento del problema**

La actividad biológica de los compuestos quirales puede ser diferente para cada isómero, por ejemplo uno de los enantiómeros puede ser responsable de la actividad biológica deseada mientras que el otro enantiómero puede ser inactivo, antagonista del enantiómero activo, o tener una actividad diferente, ya sea deseable o indeseable. Por esto es indispensable que los compuestos biológicamente activos se encuentren en forma enantiopura, por lo que uno de los grandes retos en síntesis orgánica es la preparación de compuestos enantiopuros. Estos compuestos se pueden obtener por medio de síntesis asimétrica o por resolución de las mezclas racémicas. Actualmente se ha recurrido a la biocatálisis para la obtención de compuestos enantiopuros; ya que es de suma importancia contar con biocatalizadores que permitan la síntesis de moléculas con alta pureza óptica, que sean accesibles y de bajo costo, una alternativa interesante para cumplir con estos objetivos en un biocatalizador es utilizar materiales de origen vegetal. Por lo anterior, resulta interesante estudiar la actividad reductasa de extractos acuosos frescos y/o liofilizados de diferentes materiales vegetales, disponibles en mercados locales, de tal forma que se logre una metodología para la obtención de alcoholes enantiopuros utilizando reductasas de origen vegetal.

### **4. Hipótesis**

Las reductasas presentes en los extractos acuosos de material vegetal fresco o liofilizado, de las familias *Brassicáceas*, *Curcubitáceas* y *Fabaceas*, así como de *Malus domestica*, *Pisum sativum*, *Solanum tuberosum* y *Allium cepa*, serán capaces de llevar a cabo la reducción enantioselectiva de benzaldehído, acetofenonas y 1-fenilpropanonas, a sus correspondientes alcoholes secundarios.

### **5. Objetivo General**

- Realizar la reducción enantioselectiva de acetofenonas y 1-fenilpropanonas, usando extractos acuosos de diversos vegetales como fuente de oxidorreductasas.

### **6. Objetivos particulares**

- Implementar las técnicas analíticas adecuadas para identificar y cuantificar materias primas y productos de reacción.
- Implementar un método por Cromatografía de Líquidos de Alta resolución, para determinar

el exceso enantiomérico (*ee*) de los productos.

- Estudiar la reducción del benzaldehído como modelo, para determinar la actividad reductora en los extractos acuosos de material vegetal fresco o liofilizado.
- Optimizar las condiciones de la reducción de acetofenona, como modelo, variando pH, temperatura, codisolvente, relación entre cantidad de material vegetal y sustrato.
- Liofilizar los materiales vegetales que demuestren tener la mayor actividad reductora y determinar si la actividad biocatalítica se mantiene, usando benzaldehído como modelo.
- Analizar el efecto de la estructura de las acetofenonas y 1-fenilpropanonas sobre la actividad reductasa de los extractos acuosos de los materiales vegetales frescos o liofilizados.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Reactivos y disolventes

El benzaldehído y la acetofenona se adquirieron de J.T. Baker, el alcohol bencílico se obtuvo de Janssen Chimica. El 1-feniletanol, 2-metilacetofenona, 3-metilacetofenona, 4-metilacetofenona, 2-cloroacetofenona, 4-cloroacetofenona, 3-bromoacetofenona, 4-metoxiacetofenona, propiofenona, 4-Bromopropiofenona, 4-cloropropiofenona, 4-metoxipropiofenona se obtuvieron de Sigma Aldrich. El borohidruro de sodio, fosfato dibásico de sodio heptahidratado y el fosfato monobásico de potasio se adquirieron de J.T Baker. El etanol, cloruro de metileno, acetato de etilo y éter etílico son de grado reactivo y se adquirieron de J.T. Baker. Los disolventes grado CLAR, Hexano e isopropanol se adquirieron de Honeywell y Tecsiqum respectivamente.

Los alcoholes 2-metilfeniletanol, 3-metilfeniletanol, 4-metilfeniletanol, 2-clorofeniletanol, 4-clorofeniletanol, 3-bromofeniletanol, 4-metoxifeniletanol, 1-fenilpropanol, 4-bromofenilpropanol, 4-clorofenilpropanol, 4-metoxifenilpropanol se sintetizaron por reducción, con borohidruro de sodio, de las correspondientes cetonas.

### 7.2. Desarrollo del método analítico para evaluar la reducción de benzaldehído

Se utilizó un cromatógrafo de gases HP 6890, equipado con una columna Supelcowax-10 (30m x 25mm x 25µm) y N<sub>2</sub> como gas acarreador, a 190°C y 1mL/min, utilizando benzaldehído y alcohol bencílico comerciales como sustancias de referencia.

### 7.3. Preparación de los biocatalizadores de origen vegetal

Se utilizaron distintos tipos de materiales vegetales, como semillas, raíces, frutos, germinados y residuos vegetales. Estos materiales se usaron frescos o liofilizados. En la tabla 2 se muestran los materiales vegetales probados para catalizar la reducción de benzaldehído.

**Tabla 2.** Materiales vegetales probados para la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico.

Familia y género	Material vegetal
SEMILLAS	
<i>Fabaceae, Phaseolus</i>	Frijol pinto Frijol flor de mayo Frijol ayocote Frijol cacahuete Frijol rojo (semilla inmadura) Frijol negro Frijol bayo Alubia Ejote (semilla inmadura)
<i>Fabaceae, Cicer</i>	Garbanzo
<i>Fabaceae, Pisum</i>	Alberjón Chícharo (semilla inmadura)
<i>Fabaceae, Vicia</i>	Haba sin pericarpio (semilla inmadura)
<i>Fabaceae, Inga</i>	Jinicuil
<i>Fabaceae, Lens</i>	Lenteja
<i>Fabaceae, Leucaena</i>	Huaje (semilla inmadura)
<i>Fabaceae, Medicago</i>	Alfalfa
<i>Poaceae, Zea</i>	Maíz palomero Maíz (Elote)
<i>Poaceae, Phalaris</i>	Alpiste
<i>Poaceae, Hordeum</i>	Cebada
<i>Poaceae, Avena</i>	Avena
<i>Poaceae, Triticum</i>	Trigo
<i>Solanaceae, Capsicum</i>	Semilla fresca de pimiento verde Semilla fresca de chile
<i>Brassicaceae, Brassica</i>	Nabo de canario (semilla inmadura)
<i>Rosaceae, Prunus</i>	Almendra Capulín
RAÍCES	
<i>Solanaceae, Solanum</i>	Papa
<i>Brassicaceae, Brassica</i>	Nabo
<i>Brassicaceae, Raphanus</i>	Rábano
<i>Apiaceae, Daucus</i>	Zanahoria
INFLORESCENCIAS	
<i>Brassicaceae, Brassica</i>	Coliflor Brócoli
TALLOS	
<i>Apiaceae, Apium</i>	Apio
<i>Brassicaceae, Brassica</i>	Tronco de brócoli

FRUTOS	
<i>Curcubitaceae, Curcubita</i>	Calabaza Calabaza zucchini Calabaza bola
<i>Curcubitaceae, Cucumis</i>	Pepino
<i>Curcubitaceae, Sechium</i>	Chayote
<i>Sapotaceae, Pouteria</i>	Mamey
<i>Lauraceae, Persea</i>	Aguacate
<i>Platanaceae, Platanus</i>	Plátano
<i>Rosaceae, Malus</i>	Manzana verde Manzana roja
<i>Rosaceae, Pyrus</i>	Pera
<i>Rosaceae, Prunus</i>	Ciruela roja
<i>Vitaceae, Vitis</i>	Uva roja
<i>Fabaceae, Inga</i>	Algodoncillo de jinicuil
HOJAS	
<i>Asteraceae, Lactuca</i>	Lechuga italiana
<i>Cactaceae, Opuntia</i>	Nopal
<i>Apiaceae, Coriandrum</i>	Cilantro
<i>Portulacaceae, portulaca</i>	Verdolaga
<i>Brassicaceae, Brassica</i>	Col
RESIDUOS VEGETALES	
<i>Fabaceae, Phaseolus</i>	Vaina de frijol rojo Vaina de ejote
<i>Fabaceae, Vicia</i>	Vaina de haba Pericarpio de haba liofilizado
<i>Fabaceae, Inga</i>	Vaina de jinicuil
<i>Fabaceae, Leucaena</i>	Vaina de huaje Vaina de huaje liofilizada
<i>Curcubitaceae, Sechium</i>	Chayote (semilla blanca) Cáscara de chayote
<i>Brassicaceae, Brassica</i>	Vaina de nabo de canario
<i>Rosaceae, Pyrus</i>	Cáscara de pera
<i>Platanaceae, Platanus</i>	Cáscara de plátano
<i>Anacardiaceae, Mangifera</i>	Cáscara de mango
<i>Lauraceae, Persea</i>	Cáscara de aguacate
<i>Rosaceae, Malus</i>	Cáscara de manzana verde
<i>Sapotaceae, Pouteria</i>	Cáscara de mamey

### 7.3.1. Material fresco

El material vegetal fresco indicado en la **Tabla 2** (raíces, inflorescencias, tallos, frutos y hojas) se lavó con agua y jabón, se sumergió durante 1 minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 5%, posteriormente se enjuagó con agua destilada, cada material se dividió en dos partes uno para hacer la prueba con el material fresco y otra para hacer la prueba con el material liofilizado.

El material vegetal fresco se pesó y se molió con agua destilada (relación 1:1), se centrifugó a 4500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se usó como fuente de enzima.

### **7.3.2. Liofilización**

El material vegetal fresco indicado en la **Tabla 2** (raíces, inflorescencias, tallos, frutos y hojas) se cortó en pedazos pequeños de aproximadamente 5 cm y/o se molió en licuadora, se liofilizó utilizando una liofilizadora LABCONCO FreeZone 4.5, con una temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$  y una presión de 0.133 mBar. Los materiales liofilizados se almacenaron en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se regeneraron con la cantidad de agua que perdieron y se les agregó agua con una relación de peso húmedo de 1:1, se dejaron agitar durante 1 hora, se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 minutos, se usó el sobrenadante como fuente de enzima.

### **7.3.3. Semillas**

Las semillas se lavaron con agua e hipoclorito de sodio al 5%, después se escurrieron y se dejaron secar. Las semillas se utilizaron de tres formas:

- Remojadas: se pesaron 10 g de semilla (frijol pinto, frijol flor de mayo, frijol ayocote, frijol cacahuate, frijol negro, frijol bayo, alubia, garbanzo, alberjón, lenteja, maíz palomero) se agregaron 40 mL de agua destilada y se dejaron remojar durante 24 h, posteriormente se molieron con licuadora, centrifugaron y se utilizó el sobrenadante como fuente de enzima.
- Harinas: con un molino para café se molieron 10 g de semillas (frijol pinto, frijol flor de mayo, frijol ayocote, frijol cacahuate, frijol negro, frijol bayo, alubia, garbanzo, alberjón, lenteja, maíz palomero y haba seca), se agregaron 30 mL de agua destilada y se agitaron magnéticamente durante 1 hora; pasado este tiempo se centrifugaron y el sobrenadante se usó como fuente de enzima.
- Polvos acetónicos: las semillas de almendra, mamey, aguacate, calabaza y capulín se molieron en licuadora con acetona, después se filtraron con un embudo büchner, el proceso se repitió 3 veces, el polvo seco se tamizó con malla de 0.3 mm. Al polvo seco se le agregaron 40 mL de agua destilada y se puso en agitación durante 1 hora, se centrifugó y el sobrenadante se usó como fuente de enzima.

#### **7.3.4. Germinados**

Las semillas de frijol pinto, frijol flor de mayo, frijol ayocote, frijol negro, frijol cacahuate, frijol bayo, alubia, alberjón, lenteja, alfalfa, trigo, huaje y rábano, se lavaron con agua y detergente, consecutivamente se sumergieron durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 5% y se enjuagaron con agua destilada. Posteriormente en una caja petri se colocó una cama de algodón previamente esterilizado y se humedeció con agua destilada estéril, sobre el algodón se pusieron las semillas y sobre estas otra capa de algodón húmedo, se incubaron durante cuatro días a 25°C. El germinado se trató de la misma forma que los materiales frescos (sección 7.3.1) para obtener el extracto acuoso y utilizarlo como fuente de enzima.

#### **7.4. Evaluación de la capacidad de reducción de los materiales vegetales**

Se utilizó la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico como reacción de referencia para determinar la capacidad de reducción de los distintos extractos acuosos del material vegetal (Tabla 2). Se usaron  $1.484 \times 10^{-5}$  moles de benzaldehído por cada mililitro de extracto, la mezcla se agitó durante 24h, a 1300 rpm y 25°C. La mezcla de reacción se extrajo con éter etílico y se analizó por cromatografía de gases. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los materiales que mostraron mayor % de conversión se consideraron para la reacción con acetofenonas y 1-fenilpropanonas.

Para facilitar el análisis de las 115 pruebas realizadas, los resultados se muestran de acuerdo al material vegetal, para ello se dividieron en 6 grupos: A, semillas; B, germinados; C, harinas de semillas; D, frutos; E, residuos vegetales y F, liofilizados.

#### **7.5. Reducción química de acetofenonas y 1- fenilpropanonas**

Para desarrollar los métodos analíticos se sintetizaron por vía química los alcoholes de las acetofenonas y fenilpropanonas (Tabla 3).

Se pesaron 250 mg de la cetona correspondiente y se disolvieron en 5 mL de etanol al 95%, posteriormente se agregaron 80 mg de borohidruro de sodio y se dejaron en agitación magnética; se realizó el seguimiento de reacción por Cromatografía en Capa Fina (CCF) tomando muestras cada hora. Cuando se observó la desaparición de la cetona se agregaron 10 mL de agua destilada fría y se extrajeron con cloruro de metileno (3X3mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en un rotavapor con una temperatura del baño a 40°C. Todas las cetonas y los alcoholes se caracterizaron por IR, RMN (ver anexos), CG y CLAR quiral.



### 7.6. Desarrollo de los métodos analíticos para evaluar la reducción de las acetofenonas y 1-fenilpropanonas

Para el seguimiento de la transformación de las cetonas a los alcoholes se utilizó un cromatógrafo de gases HP 6890, equipado con una columna Supelcowax-10 (30m x 0.25mm, 0.25 $\mu$ m), y con un detector de ionización de flama, se usó N<sub>2</sub> como gas acarreador. En la tabla 3 se muestran las condiciones para el análisis de cada par de cetona-alcohol.

**Tabla 3.** Condiciones de análisis de las cetonas y sus alcoholes por CG.

Cetona/alcohol	Temperatura (°C)	Velocidad de flujo (mL/min)
Acetofenona/ feniletanol	180	0.8
2-metilacetofenona/ 2-metilfeniletanol	190	1
3-metilacetofenona/ 3-metilfeniletanol	190	1
4-metilacetofenona/ 4-metilfeniletanol	190	1
2-cloroacetofenona/ 2-clorofeniletanol	210	1
4-cloroacetofenona/ 4-clorofeniletanol	180	0.8
3-bromoacetofenona/ 3-bromofeniletanol	230	1
4-metoxiacetofenona/ 4-metoxifeniletanol	200	1
Propiofenona/ fenilpropanol	190	1
4-Bromopropiofenona/ 4-bromofenilpropanol	230	1
4-cloropropiofenona/ 4-clorofenilpropanol	210	1
4-metoxipropiofenona/ 4-metoxifenilpropanol	210	0.7

El análisis del exceso enantiomérico se realizó por medio de CLAR quiral en un cromatógrafo de Líquidos Agilent Serie 1200, empleando como fase móvil mezclas de hexano:isopropanol a diferentes velocidades de flujo, con una columna Chiralcel OD, equipado con un detector de

arreglo de diodos. En la tabla 4 se muestran las condiciones utilizadas para este análisis.

**Tabla 4.** Condiciones cromatográficas (CLAR) para el análisis del exceso enantiomérico.

Cetona/alcohol	Relación hexano:isopropanol	Velocidad de flujo (mL/min)
Acetofenona/ feniletanol	90:10	1
3-metilacetofenona/ 3-metilfeniletanol	90:10	0.4
2-cloroacetofenona/ 2-clorofeniletanol	98:2	0.6
4-cloroacetofenona/ 4-clorofeniletanol	97:3	0.8
3-bromoacetofenona/ 3-bromofeniletanol	97:3	0.8
4-metoxiacetofenona/ 4-metoxifeniletanol	96:4	1
Propiofenona/ fenilpropanol	97:3	0.8
4-Bromopropiofenona/ 4-bromofenilpropanol	99.5:0.5	0.7
4-cloropropiofenona/ 4-clorofenilpropanol	98:2	0.8
4-metoxipropiofenona/ 4-metoxifenilpropanol	90:10	0.8

### **7.7. Evaluación de la reducción de acetofenona con materiales vegetales seleccionados**

Para mejorar los porcentajes de reducción de la acetofenona se modificaron diferentes variables, como fueron: codisolvente, pH, temperatura y utilización de glucosa en el medio de reacción.

#### **7.7.1. Preparación de los extractos para la reacción de reducción de la acetofenona**

- Chícharo: Se pesaron 15 g de semilla de chícharo, se molieron en licuadora con 15 mL de agua o solución amortiguadora (pH 6,7, 7.6 y 8) según sea el caso, la mezcla se centrifugó y se utilizó el sobrenadante como fuente de enzima.
- Semillas: Con alubia, frijol ayocote, frijol bayo, frijol cacahuate, frijol flor de mayo, frijol negro, frijol pinto, haba y alberjón se prepararon harinas moliendo con molino y se

pesaron 10 g de cada material, se les agregó 30 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M con el pH adecuado para cada prueba, (6, 7, 7.6 y 8) esta mezcla se dejó en agitación durante una hora y posteriormente se centrifugó y se utilizó el sobrenadante como fuente de enzima

Se tomaron 5 mL de sobrenadante para cada vial y se agregaron  $1.7 \times 10^{-5}$  moles de acetofenona disuelta en el codisolvente adecuado (etanol o isopropanol). Estas reacciones se realizaron en una incubadora Enviro-Genie a 1300 rpm durante 24 h. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

### **7.7.2. Codisolvente**

Se tomaron  $1.7 \times 10^{-5}$  moles de acetofenona y se disolvieron en  $4.28 \times 10^{-5}$  moles de etanol o  $3.27 \times 10^{-5}$  moles de isopropanol como codisolventes, la reacción se llevó a cabo con 5 mL de extracto acuoso de chícharo a 25°C y las demás semillas se probaron a pH 7.6 y a 30°C. (sección 7.7.1)

### **7.7.3. pH**

Se ajustó el pH del sobrenadante de todos los materiales a probar a 6, 7, 7.6 y 8 con una solución de NaOH al 2% y el sobrenadante se usó como fuente de enzima. A 5 mL de sobrenadante se le agregaron  $1.7 \times 10^{-5}$  moles de acetofenona disuelta en  $4.28 \times 10^{-5}$  moles de etanol o  $3.27 \times 10^{-5}$  moles de isopropanol y se dejó en agitación a 1300 rpm en una incubadora Enviro-Genie a 25°C durante 24h.

### **7.7.4. Temperatura**

Se prepara el extracto de la semilla de chícharo usando una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a pH 8

Para el caso de alberjón, frijol ayocote, frijol cacahuete y haba se prepararon los extractos con solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.6

Para esta prueba del efecto de la temperatura se probaron todos los extractos a dos temperaturas: 30 y 35 °C

### **7.7.5. Glucosa**

Como mencionan Xie Y., *et. al.*,<sup>17</sup> la glucosa sirve como regenerador de cofactores, por lo que se evaluó la influencia de la glucosa en el % de reducción

Se prepararon los extractos con solución amortiguadora de fosfatos pH 8 para la semilla del chícharo y pH 7.6 para las demás semillas, se tomaron 5 mL de extracto y se agregaron a cada vial que contenían 100 mg de glucosa, se pusieron en agitación hasta la disolución de esta y posteriormente se agregaron  $1.7 \times 10^{-5}$  moles de acetofenona disuelta en  $4.28 \times 10^{-5}$  moles de etanol en el caso del chícharo y  $3.27 \times 10^{-5}$  moles de isopropanol en el caso de las demás semillas.

### **7.8. Reducción de acetofenonas y fenilpropanonas con extractos de materiales vegetales seleccionados**

Al extracto de las semillas de chícharo, frijol bayo, frijol ayocote, frijol flor de mayo, frijol cacahuate, frijol negro, frijol pinto, alubia, garbanzo, semilla de mamey, alberjón, haba y maíz palomero, se le agregaron  $1.7 \times 10^{-5}$  moles de cada una de las cetonas indicadas en la tabla 4 disuelta en el codisolvente adecuado (etanol o isopropanol) por mililitro de reacción y se mantuvo con agitación magnética durante 24 h; posteriormente la muestra se extrajo con acetato de etilo (0.5 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó a sequedad y se redisolvió con isopropanol. El % de conversión se determinó por CG y el exceso enantiomérico por CLAR quiral. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado.

### **7.9. Análisis Estadístico**

Todos los datos se expresaron en media +/- DE (desviación estándar). Con los resultados se realizó un análisis estadístico inferencial usando el programa JMP V. Las pruebas realizadas fueron t-student para datos independientes considerando varianzas iguales o desiguales con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  para las pruebas de codisolvente, glucosa y temperatura y análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ , con la finalidad de ver si existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de cada grupo de datos. En las pruebas que mostraron diferencia estadísticamente significativa en al menos una de las medias a comparar, se aplicó la prueba HSD-Tukey Kramer para determinar cuál o cuáles grupos eran diferentes. Esta prueba se aplicó para el estudio con benzaldehído y la prueba de pH en la reducción de acetofenona.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1. Selección de material vegetal con actividad oxidoreductasa

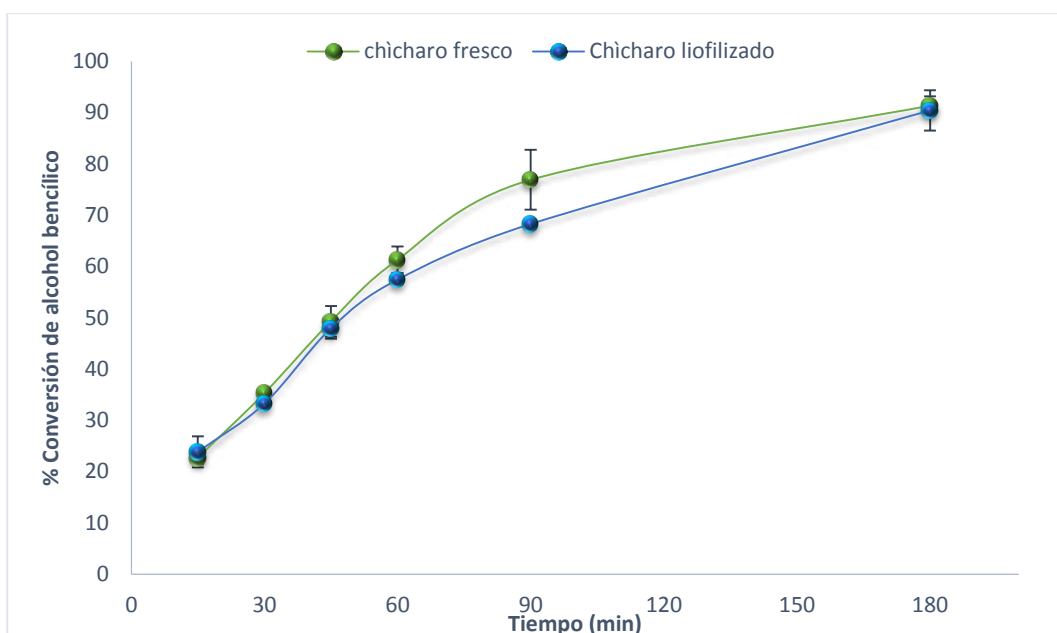
Con la finalidad de encontrar nuevas fuentes de oxidoreductasas de origen vegetal, se utilizó la reacción de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico (Figura 15) como modelo, empleando como fuente de posible biocatalizador distintos materiales vegetales pertenecientes a diversas familias (ver tabla 2).



**Figura 15.** Reacción de reducción biocatalizada de benzaldehído a alcohol bencílico.

Debido a que no se conocían las condiciones ni los tiempos de reacción, se decidió iniciar el estudio de la reacción de reducción de benzaldehído utilizando el extracto acuoso de la semilla de chícharo como fuente de biocatalizador, a 25°C, agitación de 1300 rpm, sin codisolvente, se tomaron muestras cada 15 minutos durante una hora y posteriormente cada hora hasta las 3 horas. En este tiempo se obtuvo aproximadamente un 90% de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico.

Debido a que la semilla fresca de chícharo no se puede almacenar por tiempo prolongado ya que se descompone, se realizó una comparación de la reducción de benzaldehído utilizando extractos de semilla fresca de chícharo y de semilla de chícharo liofilizado. En la Figura 16 se observa la comparación de las medias de los porcentajes de transformación a alcohol bencílico usando las dos fuentes de biocatalizador a distintos tiempos; no se observa una diferencia entre el uso del chícharo fresco o el chícharo liofilizado. Esto es una ventaja, ya que es posible liofilizar las semillas para conservar por más tiempo el material vegetal sin perder la eficacia de la enzima, así mismo se conservan los cofactores necesarios para llevar a cabo la reducción, ya que sin estos no es posible que la enzima reduzca cualquier sustrato (**Figura 10**).



**Figura 16.** Gráfica comparativa de la reducción de benzaldehído usando como fuente de biocatalizador los extractos de chícharo fresco y de chícharo liofilizado.

La reducción de benzaldehído con extracto de chícharo es casi completa en 3 h, pero con las otras fuentes de enzima (**Tabla 2**) se observó que en 3 horas la conversión era menor al 5%, por lo que se decidió analizar la mezcla de reacción a las 24 h. En la tabla 5 se muestran los materiales que no reducen al benzaldehído y en las tablas 6-11, se muestran los resultados de los materiales que si tienen capacidad reductasa.

**Tabla 5.** Material vegetal que no reduce al benzaldehído

Hoja de verdolaga	Fruto de ciruela	Cáscara de mamey
manzana verde	Vaina de huaje	Cáscara de manzana verde
roja	Cáscara de plátano	Algodoncillo de jinicuil
pera	Cáscara de mango	Vaina de huaje liofilizado
uva roja	Cáscara de aguacate	Pericarpio de haba liofilizado

Los materiales vegetales que si presentaron actividad reductasa se dividieron en 6 grupos, de acuerdo al tipo de material, para facilitar su análisis. Se realizó el análisis de varianzas y en los casos en que se observaron diferencias significativas se aplicó la prueba de HSD-Tukey Kramer. Los grupos fueron: A, semillas; B, germinados; C, harinas de semillas; D, frutos; E, residuos vegetales y F, liofilizados. Los resultados se presentan a continuación:

### 8.1.1. Grupo A, Semillas

En la **Tabla 6** se presentan los porcentajes de reducción de benzaldehído utilizando diversas semillas; lo más importante que se puede observar en este grupo es que con 13 de las 26 semillas se obtienen porcentajes de conversión mayores al 80%. La mayoría de las semillas que catalizan la reducción de benzaldehído pertenecen a las familias *Fabaceae* (frijoles, garbanzo, alberjón, chícharo, haba, alubia, jinicuil, lenteja, ejote y huaje) o *Poaceae* (maíz, alpiste, cebada, avena y trigo).

**Tabla 6.** Porcentajes de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico (a las 24 h) usando semillas (grupo A) como fuente de biocatalizador

Semilla	Familia y género	Media del % Conversión ± DE*
Frijol pinto	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	100 ± 0
Frijol flor de mayo	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	100 ± 0
Frijol ayocote	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	100 ± 0
Frijol cacahuete	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	100 ± 0
Garbanzo	<i>Fabaceae</i> <i>Cicer</i>	100 ± 0
Alberjón	<i>Fabaceae</i> <i>Pisum</i>	100 ± 0
Maíz palomero	<i>Poaceae</i> <i>Zea</i>	93.1 ± 3.30
Chícharo	<i>Fabaceae</i> <i>Pisum</i>	91.4 ± 1.78
Maíz	<i>Poaceae</i> <i>Zea</i>	90.4 ± 6.72
Haba sin pericarpio (semilla verde)	<i>Fabaceae</i> <i>Vicia</i>	90.1 ± 3.89
Frijol rojo (semilla verde)	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	89.1 ± 9.51
Frijol negro	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	84.2 ± 6.51
Frijol bayo	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	83.1 ± 4.50
Alubia	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	77.2 ± 3.68
Alpiste	<i>Poaceae</i> <i>Phalaris</i>	74.7 ± 1.53
Jinicuil (semilla inmadura)	<i>Fabaceae</i> <i>Inga</i>	72.6 ± 4.76
Cebada	<i>Poaceae</i> <i>Hordeum</i>	64.4 ± 5.26
Lenteja	<i>Fabaceae</i> <i>Lens</i>	53.1 ± 0.26
Avena	<i>Poaceae</i>	50.6 ± 8.77

	<i>Avena</i>	
Ejote (semilla verde)	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	41.1 ± 2.63
Nabo de canario (semilla inmadura)	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	40 ± 8.0314
Huaje (semilla inmadura)	<i>Fabaceae</i> <i>Leucaena</i>	36.8 ± 4.13
Calabaza	<i>Curcubitaceae</i> <i>Curcubita</i>	29.2 ± 8.29
Trigo	<i>Poaceae</i> <i>Triticum</i>	28.1 ± 3.1578
Semilla fresca de pimiento verde	<i>Solanaceae</i> <i>Capsicum</i>	23 ± 0.0057
Semilla fresca de chile	<i>Solanaceae</i> <i>Capsicum</i>	17.4 ± 3.3

\*DE= Desviación estándar

Las semillas con las que se obtuvo el 100% de reducción pertenecen a la familia *Fabaceae*, de las cuales cuatro de ellas pertenecen al género *Phaseolus*, una al género *Cicer* y la otra al género *Pisum*. De las semillas con las que se lograron porcentajes de conversión del 90 al 93%, dos de ellas pertenecen a la familia *Fabaceae* y otras dos a la familia *Poaceae*. Con respecto a las semillas verdes, por ejemplo frijol rojo y ejote, se observan menores porcentajes de conversión que con las respectivas semillas secas. Por ejemplo en el caso del uso de los frijoles (cacahuate, flor de mayo, pinto y ayocote) con todos se obtuvo el 100% de conversión, mientras que con ejote solo se logró el 41%.

En la **Tabla 6** podemos observar que con las semillas de lenteja (53%), jinicuil (73%) y huaje (37%) se tienen porcentajes de conversión a alcohol bencílico menores al 80%, estas semillas que, si bien pertenecen a la familia *Fabaceae*, no son del mismo género que las semillas de los frijoles, con las que se obtuvieron porcentajes de conversión mayores a 80%, estas semillas son de los géneros *Lens*, *Inga* y *Leucaena* respectivamente. Cabe mencionar que la preparación del extracto de la semilla de huaje, la relación semilla:agua destilada fue de 1:5, debido a la viscosidad y dificultad de obtener el sobrenadante y para las otras semillas se utilizó una relación 1:3; por lo que, si se pudiera disminuir esta relación, presumiblemente se podrían tener mejores porcentajes de conversión. En el caso de las semillas probadas pertenecientes a las familias *Brassicaceae* (nabo de canario), *Solanaceae* (pimiento verde y chile) y *Curcubitaceae* (calabaza), se obtuvieron porcentajes de conversión menores al 40%.



### 8.1.2. Grupo B, Germinados

Se germinaron las semillas de los frijoles, huaje, lenteja, rábano, alfalfa, alubia, alberjón y trigo para determinar si la reducción de benzaldehído usando germinados, como fuente de biocatalizador, era más eficiente que con las semillas correspondientes, en la tabla 7 se muestran los resultados.

**Tabla 7.** Porcentajes de reducción de benzaldehído (a las 24 h) usando germinados como biocatalizadores (Grupo B).

Nombre de material vegetal	Familia y género	Media del % Conversión $\pm$ DE*
Frijol pinto	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	100 $\pm$ 0
Frijol flor de mayo	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	100 $\pm$ 0
Frijol ayocote	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	100 $\pm$ 0
Frijol negro	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	99.8 $\pm$ 0.4
Frijol cacahuete	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	99.7 $\pm$ 0.54
Frijol bayo	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	98.7 $\pm$ 2.3
Alubia	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	67.2 $\pm$ 20.53
Alberjón	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	66.8 $\pm$ 5.81
Lenteja	<i>Fabaceae</i> <i>Lens</i>	47.7 $\pm$ 13.26
Alfalfa	<i>Fabaceae</i> <i>Medicago</i>	19.8 $\pm$ 8.21
Trigo	<i>Poaceae</i> <i>Triticum</i>	13.5 $\pm$ 0.76
Huaje	<i>Fabaceae</i> <i>Leucaena</i>	12.1 $\pm$ 1.14
Rábano	<i>Brassicaceae</i> <i>Raphanus</i>	4.8 $\pm$ 0.49

\*DE= desviación estándar

Se realizó un ANOVA para comparar los resultados obtenidos al usar como fuente de reductasa tanto los extractos de germinados como los extractos de semillas sin germinar y observamos que existe una diferencia significativa entre al menos uno de los grupos comparados; por lo que se aplicó la prueba de HSD-Tukey Kramer para saber cuáles eran los grupos que tenían diferencia y resultó que en el caso del alberjón existe diferencia en la actividad biocatalítica del germinado y la semilla. Se observa que con la semilla se obtuvo un 100% de conversión y con el germinado 66%. En contraste, con los germinados de frijol negro

y frijol bayo (99.8% y 98.7% respectivamente) se tuvieron mejores conversiones que con las semillas (84.2% y 83.1% respectivamente). Con los germinados de frijol pinto, frijol flor de mayo, frijol ayocote, frijol cacahuate, no existe diferencia significativa entre usar la semilla o el germinado para llevar a cabo la reducción de benzaldehído, ya que en ambos casos se obtuvo un 100% de conversión a alcohol bencílico.

### 8.1.3. Grupo C, Harinas de semillas

En este tratamiento se usaron Almendra, semilla de mamey, semilla de capulín, semilla de calabaza y semilla de aguacate. En la **Tabla 8** se observan los porcentajes de la reducción biocatalizada de benzaldehído con las harinas de diferentes semillas.

**Tabla 8.** Porcentajes de reducción a alcohol bencílico con harinas de semillas (Grupo C)

Nombre de material vegetal (familia)	Familia y género	Media del % Conversión $\pm$ DE*
Frijol ayocote (2013)	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	100 $\pm$ 0
Almendra (2005)	<i>Rosaceae</i> <i>Prunus</i>	100 $\pm$ 0
Almendra (2013)	<i>Rosaceae</i> <i>Prunus</i>	68.5 $\pm$ 4.98
Mamey (2006)	<i>Sapotaceae</i> <i>Pouteria</i>	77.4 $\pm$ 13.15
Mamey (2013)	<i>Sapotaceae</i> <i>Pouteria</i>	66.5 $\pm$ 15.25
Capulín (2013)	<i>Rosaceae</i> <i>Prunus</i>	86.2 $\pm$ 6.97
Semilla de calabaza (2013)	<i>Curcubitaceae</i> <i>Curcubita</i>	25.2 $\pm$ 5.78
Aguacate (2013)	<i>Lauraceae</i> <i>Persea</i>	16.5 $\pm$ 10.14

\*DE= desviación estándar

En el caso de las harinas acetónicas de almendra y mamey se tenían muestras almacenadas a 4°C por 8 y 9 años, por lo que se consideró interesante determinar si las enzimas conservaban su actividad después de ese tiempo, así que se comparó la actividad biocatalítica de estas con la de las harinas correspondientes recién preparadas. Con la almendra de 2005 se obtuvo un porcentaje de conversión del 100%, mientras que con la harina preparada en 2013 fue del 68.5%, esto puede deberse a que probablemente las semillas fueron recolectadas en distintas épocas del año y cosechadas en diferentes lugares, por lo que las características de las semillas son diferentes. Con las semillas de mamey de 2005 y 2013 las conversiones

fueron del 77.4% y 66.5%, respectivamente. Es decir que las harinas desengrasadas de almendra y mamey se pueden almacenar por tiempos prolongados, sin que se pierda substancialmente la actividad reductasa.

La reducción de benzaldehído fue del 100% usando ya sea la semilla (**Tabla 6**), el germinado (**Tabla 7**) o la harina (**Tabla 8**) del frijol ayocote, con estos resultados podemos asumir que este se puede usar en cualquiera de las tres formas mencionadas como fuente de reductasa.

#### 8.1.4. Grupo D, Frutos

En la **Tabla 9** se muestran los porcentajes de conversión del benzaldehído alcanzado usando los materiales del grupo D (frutos) como fuente de biocatalizador. En este grupo se observa que con zanahoria y pulpa de plátano se obtuvieron los mejores porcentajes de conversión, 63.3 y 60% respectivamente.

**Tabla 9.** Porcentaje de reducción de benzaldehído con frutos (F), raíces(R), inflorescencias (I), hojas (H) y tallos (T) (a las 24 h) (Grupo D).

Nombre de material vegetal	Familia y género	Media del % Conversión ± DE*
Zanahoria(R)	<i>Apiaceae</i> <i>Daucus</i>	63.3 ± 9.99
Pulpa de plátano (F)	<i>Platanaceae</i> <i>Platanus</i>	60.0 ± 5.76
Apio (T)	<i>Apiaceae</i> <i>Apium</i>	32.9 ± 10.94
Calabaza zucchini (F)	<i>Curcubitaceae</i> <i>Curcubita</i>	30.3 ± 0.66
Coliflor (I)	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	24.5 ± 6.21
Pulpa de Mamey (F)	<i>Sapotaceae</i> <i>Pouteria</i>	25.2 ± 6.63
Calabaza bola (F)	<i>Curcubitaceae</i> <i>Curcubita</i>	23.9 ± 6.86
Col (H)	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	23.8 ± 5.91
Lechuga italiana(H)	<i>Asteraceae</i> <i>Lactuca</i>	21.8 ± 4.65
Algodoncillo del jinicuil (F)	<i>Fabaceae</i> <i>Inga</i>	20.3 ± 2.48
Rábano(R)	<i>Brassicaceae</i> <i>Raphanus</i>	19.5 ± 6.44
Brócoli (I)	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	19 ± 1.28
Nopal (H)	<i>Cactaceae</i> <i>Opuntia</i>	18.9 ± 5.28
Nabo (R)	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	18.2 ± 1.002
Pepino (F)	<i>Curcubitaceae</i>	18.1 ± 4.86

	<i>Cucumis</i>	
Papa (R)	<i>Solanaceae</i> <i>Solanum</i>	14.9 ± 0.31
Cilantro (H)	<i>Apiaceae</i> <i>Coriandrum</i>	13.6 ± 1.16
Aguacate (F)	<i>Lauraceae</i> <i>Persea</i>	13.5 ± 1.55
Pulpa de chayote (F)	<i>Curcubitaceae</i> <i>Sechium</i>	10.7 ± 2.08
Tronco de brócoli (T)	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	31.2 ± 3.08

\*DE= desviación estándar

Mediante el ANOVA y la prueba de Tukey se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el % de conversión de benzaldehído catalizado por cilantro (13.6%) y apio (32.9%) con respecto a zanahoria (63.3%), los tres materiales pertenecientes a la familia *Apiaceae*. En el caso de los frutos de la familia *Brassicaceae* no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

En la familia de las *Curcubitaceae* se observa que los dos tipos de calabaza utilizados no tuvieron diferencia significativa entre ellos, con la calabaza zucchini se logró una conversión del 30% y con calabaza bola fue del 23%; pero si se observan diferencias significativas con el pepino (18.1%) y el chayote (10.7%) que pertenecen a géneros diferentes.

#### 8.1.5. Grupo E, Residuos vegetales

En la **Tabla 10** observamos los porcentajes de reducción usando residuos vegetales como fuente de biocatalizador de la reducción del benzaldehído. Aun cuando las transformaciones fueron menores al 60% en todos los casos, el uso del material de este grupo es interesante, ya que es una buena opción para realizar la reducción de aldehídos con materiales que tienen pocas aplicaciones. Es importante señalar, que la mejor conversión se obtuvo con la vaina de frijol rojo (54%).

**Tabla 10.** Porcentajes de conversión de la reducción de benzaldehído con residuos vegetales (Grupo E) (a las 24 h)

Nombre de material vegetal	Familia y género	Media del % Conversión ± DE*
Vaina de frijol rojo	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	53.9 ± 17.32
Vaina de nabo de canario	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	48.9 ± 12.49
Chayote (semilla blanca)	<i>Curcubitaceae</i> <i>Sechium</i>	37.2 ± 2.73
Vaina de haba	<i>Fabaceae</i> <i>Vicia</i>	30 ± 4.24
Vaina de ejote	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	29.8 ± 4.5
Vaina de jinicuil	<i>Fabaceae</i> <i>Inga</i>	29.6 ± 4.62
Cáscara de chayote	<i>Curcubitaceae</i> <i>Sechium</i>	20.8 ± 3.81
Cáscara de pera	<i>Rosaceae</i> <i>Pyrus</i>	2.6 ± 0.37

\*DE= desviación estándar

#### 8.1.6. Grupo F, Liofilizados

En la **Tabla 11** se muestran los porcentajes de conversión de la reacción de reducción de benzaldehído utilizando material vegetal liofilizado como fuente de biocatalizador. En los casos de chícharo, vaina de nabo de canario, calabaza zucchini, frijol rojo, jinicuil, apio, tronco de brócoli, vaina de ejote, lechuga italiana, pepino y coliflor no se observan diferencias en los porcentajes de conversión con respecto a los materiales vegetales no liofilizados. En otros casos se observa un aumento en la actividad biocatalítica de los materiales liofilizados como con calabaza bola, nopal, haba sin pericarpio, brócoli, papa y huaje. Mientras que con otros materiales disminuye la conversión al liofilizarlos, como en el caso de la zanahoria liofilizada donde se tiene solamente 36.8% de alcohol bencílico y con zanahoria fresca 63%. Los resultados muestran que es posible utilizar los materiales vegetales liofilizados como fuente de reductasa, ya que se conservaron tanto la enzima como los cofactores, los cuales sin ellos no se tendría una reducción por parte de la enzima. (**Figura 10**)

**Tabla 11.** Porcentajes de reducción de benzaldehído (a las 24 h) con materiales vegetales liofilizados (Grupo F)

Nombre de material vegetal	Familia y género	Media del % Conversión ± DE*
Haba sin pericarpio (semilla verde)	<i>Fabaceae</i> <i>Vicia</i>	98.6 ± 1.23
Chícharo (semilla verde)	<i>Fabaceae</i> <i>Pisum</i>	90.4 ± 3.94
Frijol rojo (semilla verde)	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	82.2 ± 2.68
Nopal	<i>Cactaceae</i> <i>Opuntia</i>	69.1 ± 5.01
Jinicuil	<i>Fabaceae</i> <i>Inga</i>	68.4 ± 23.88
Vaina del nabo de canario	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	48.9 ± 8.47
Vaina de frijol rojo	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	45.2 ± 3.03
Apio	<i>Sapotaceae</i> <i>Apium</i>	37.4 ± 5.57
Calabaza bola	<i>Curcubitaceae</i> <i>Curcubita</i>	36.9 ± 1.89
Zanahoria	<i>Apiaceae</i> <i>Daucus</i>	36.8 ± 0.76
Tronco de brócoli	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	35.8 ± 25.39
Vaina de haba	<i>Fabaceae</i> <i>Vicia</i>	33.9 ± 26.09
Nabo de canario (semilla verde)	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	32 ± 7
Col	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	31.3 ± 3.45
Calabaza zucchini	<i>Curcubitaceae</i> <i>Curcubita</i>	29.0 ± 6.52
Vaina de ejote	<i>Fabaceae</i> <i>Phaseolus</i>	27.3 ± 2.27
Brócoli	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	26.3 ± 4.8
Papa	<i>Solanaceae</i> <i>Solanum</i>	24.4 ± 5.83
Lechuga italiana	<i>Asteraceae</i> <i>Lactuca</i>	22.7 ± 4.43
Coliflor	<i>Brassicaceae</i> <i>Brassica</i>	21.0 ± 6.18
Pepino	<i>Curcubitaceae</i> <i>Cucumis</i>	20.4 ± 10.65
Huaje (semilla verde)	<i>Fabaceae</i> <i>Leucaena</i>	18.8 ± 2.35
Rábano	<i>Brassicaceae</i> <i>Raphanus</i>	15.9 ± 1.7
Vaina de jinicuil	<i>Fabaceae</i> <i>Inga</i>	4.6 ± 4.05
Chayote	<i>Curcubitaceae</i> <i>Sechium</i>	17.8 ± 7.64

\*DE= desviación estándar

A partir de los resultados obtenidos, se puede observar que los materiales vegetales que mostraron una mayor actividad biocatalítica para la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico fueron las semillas, con los vegetales de los demás grupos se obtuvieron menores porcentajes de conversión, sin embargo estos materiales pueden ser nuevas fuentes de biocatalizadores.

Después de comparar los resultados obtenidos de la reducción de benzaldehído, se seleccionaron los materiales vegetales con los que se tuvieron porcentajes de conversión de benzaldehído mayores a 75%: semillas de chícharo, frijol bayo, frijol ayocote, frijol flor de mayo, frijol cacahuate, frijol negro, frijol pinto, alubia, garbanzo, semilla de mamey, alberjón, haba y maíz palomero, para realizar la reducción de las acetofenonas y 1-fenil propanonas.

## **8.2. Reducción de acetofenona usando extractos de las semillas seleccionadas, como biocatalizadores**

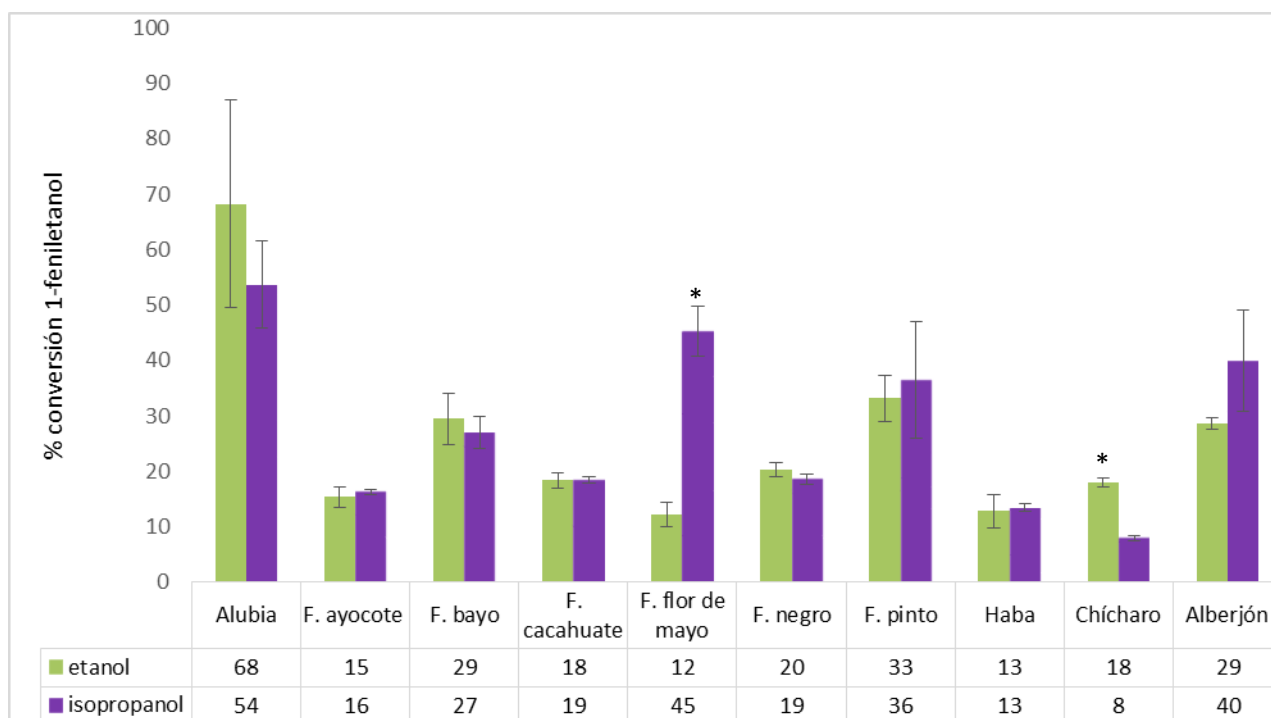
Además de probar los diversos materiales vegetales, se evaluó el efecto del codisolvente, pH, temperatura y glucosa sobre la reducción de acetofenona, usando como fuente de biocatalizador los extractos acuosos de las semillas seleccionadas.

### **8.2.1. Codisolvente**

Como mencionan Andrade L., *et. al.*,<sup>27</sup> se ha demostrado que al mejorar la solubilidad de compuestos orgánicos a transformar, se facilita la interacción con la enzima y por lo tanto mejora la conversión, por lo que es importante el uso de codisolventes en el caso de que el sustrato sea insoluble en medio acuoso.<sup>30</sup> Además, debido a que la reducción de carbonilos con oxidorreductasas necesita de cofactores (NADH o NADPH), es necesario buscar mecanismos para regenerarlos de tal forma que se favorezca la reducción. Xie Y. *et. al.*,<sup>17</sup> realizaron un experimento para comparar algunos co-sustratos para regenerar el cofactor, como fueron etanol, isopropanol, manitol y glucosa para la reducción de acetofenona con frijoles adzuki como fuente de biocatalizador, encontraron que al agregar estos co-sustratos se mejora la reducción. Por otro lado, Matsuda T. *et. al.*,<sup>33</sup> mencionan que los alcoholes como el etanol e isopropanol se han utilizado ampliamente para reciclar las coenzimas que se utilizan en las reducciones biocatalizadas.<sup>29</sup> Basado en lo anterior se probaron etanol e isopropanol para observar si con alguno de estos codisolventes mejoraba la conversión de la acetofenona a 1-feniletanol. En la **figura 18** podemos observar la comparación de los porcentajes de conversión de 1-feniletanol utilizando como codisolventes etanol e isopropanol, usando como

fuente de enzima las semillas de alubia, frijol ayocote, frijol bayo, frijol cacahuate, frijol flor de mayo, frijol negro, frijol pinto, haba, chícharo y alberjón.

Con los % de conversión se realizó una prueba t student, para muestras independientes, con la finalidad de ver si existe diferencia estadística entre el uso de etanol e isopropanol como codisolventes. Solo se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el etanol e isopropanol en presencia de frijol flor de mayo y chícharo como biocatalizadores, con todos los demás biocatalizadores no se encontró diferencia. Como se observa en la **figura 18**, en el caso del chícharo se puede concluir que el etanol es mejor codisolvente significativamente ( $p < 0.05$ ) mientras que en el caso del biocatalizador frijol flor de mayo el codisolvente isopropanol mostro un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el % de conversión comparado con el codisolvente etanol. Para las siguientes pruebas se decidió utilizar etanol como codisolvente en las reducciones con semilla de chícharo e isopropanol en las reducciones con las demás semillas seleccionadas.



**Figura 18.** Porcentaje de conversión de acetofenona con etanol e isopropanol como codisolventes a las 24 h. \* Diferencia estadísticamente significativa con una  $p < 0.05$

### 8.2.2. pH

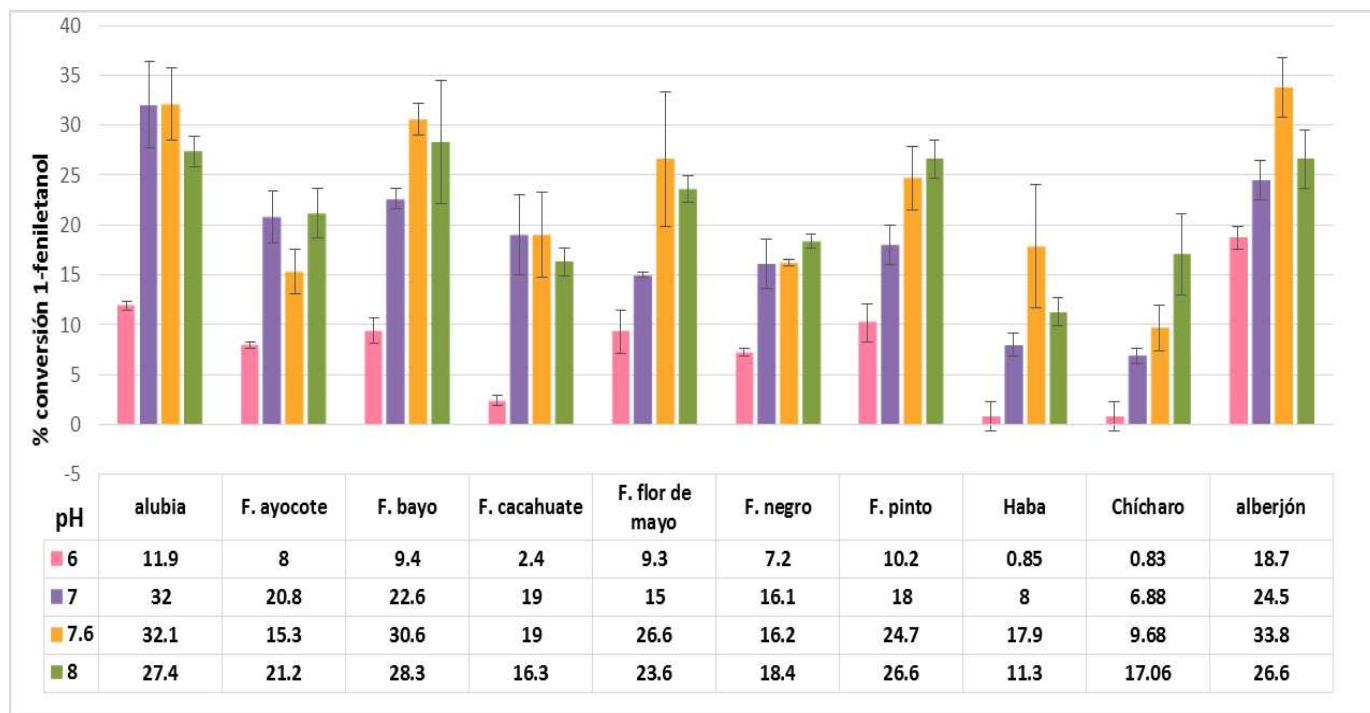
En su teoría del efecto de pH en la cinética enzimática, Michaelis y Davidsohn (1911) mencionan que el centro activo de las enzimas tiene residuos de aminoácidos ionizables y que sólo una de esas especies ionizables es catalíticamente activa, por lo que la actividad de la



enzima depende del pH.<sup>35</sup>

Se llevó a cabo la reacción de reducción de la acetofenona con las diferentes semillas seleccionadas (alubia, frijol ayocote, frijol bayo, frijol cacahuete, frijol flor de mayo, frijol negro, frijol pinto, haba, chícharo y alberjón) a diferentes valores de pH para determinar su efecto sobre el porcentaje de reducción biocatalítica de acetofenona a 1-feniletanol. Se utilizaron soluciones amortiguadoras de fosfatos (0.1M) con valores de pH: 6, 7, 7.6 y 8. Se encontró que los mayores porcentajes de conversión se lograron a pH de 7.6 y de 8 (> 12%), mientras que la conversión disminuye al disminuir el pH (**Figura 19**).

Con los resultados anteriores se realizó un análisis estadístico inferencial y se aplicó una prueba de análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  para cada biocatalizador, con la finalidad de ver si existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de cada grupo de datos de pH (6, 7, 7.6 y 8), esta prueba mostró que existía diferencia significativa con al menos un valor de pH en todos los grupos de prueba, por lo cual se aplicó la prueba HSD-Tukey Kramer para determinar cuál o cuáles grupos son diferentes. Para los biocatalizadores frijol bayo, frijol negro, frijol pinto, haba, chícharo y alberjón los pH's , 7.6 y 8 muestran los porcentajes de conversión más altos y para alubia, frijol cacahuete se observan porcentajes mayores con pH de 7 y 7.6 y con frijol ayocote los mejores valores de pH fueron 7 y 8, estos porcentajes de conversión se pueden observar en la tabla de la **Figura19** y no muestran diferencia significativa entre ellos, excepto para la semilla de chícharo fresco, el cual presenta una diferencia estadísticamente significativa al utilizar pH 8 con el cual se obtienen los porcentajes de conversión más altos (25-33%), al utilizar pH 6 y comparar con los otros valores de pH se observa diferencia estadísticamente con todas las semillas, sin embargo con la semilla de chícharo se obtienen porcentajes de conversión bajos (0-11%) por lo que no es recomendable usar este pH para llevar a cabo las reacciones de reducción con estos biocatalizadores. Se decidió utilizar la solución amortiguadora de pH 8 para preparar el extracto de chícharo y la solución pH 7.6 para preparar los extractos de las demás semillas y evaluar los demás parámetros.



**Figura 19.** Conversión biocatalizada de acetofenona a 1-feniletanol a distintos valores de pH (a las 24h).

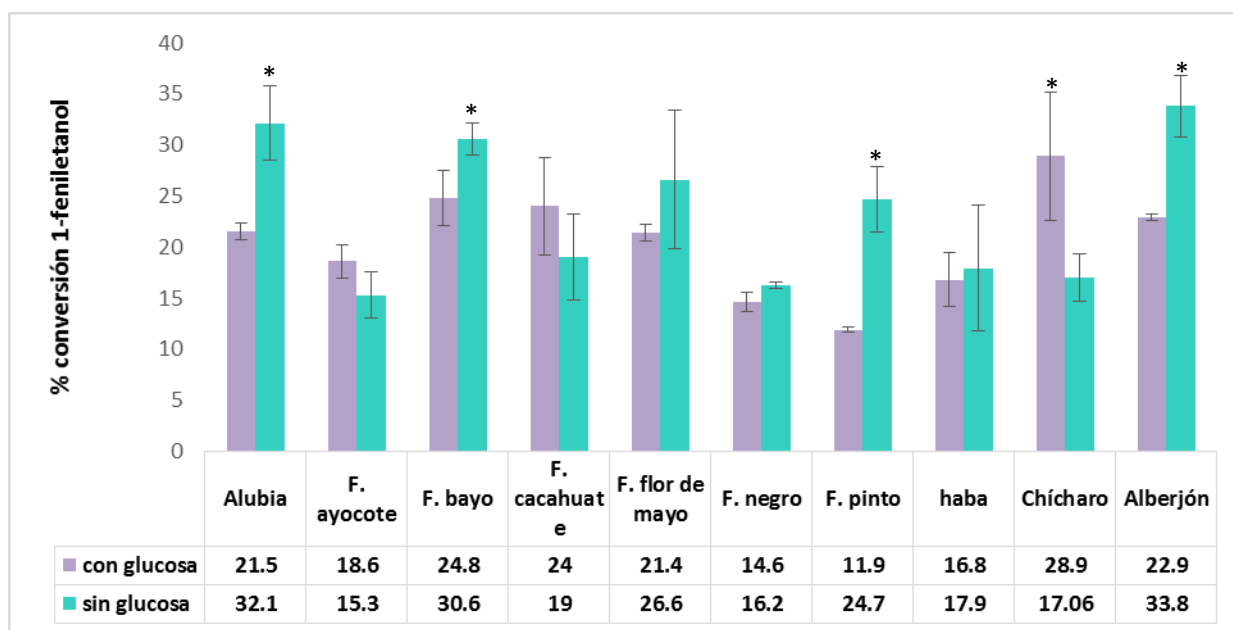
### 8.2.3. Glucosa

Las enzimas que catalizan la reducción del grupo carbonilo requieren de la transferencia de un hidruro a este grupo, el cual toman de las coenzimas; como estas son muy caras para usarlas como reactivos, se prefiere reducir la forma oxidada de la coenzima para reutilizarla en el siguiente ciclo de reacción; para llevar a cabo la regeneración del cofactor son necesarias fuentes de hidrógeno, como pueden ser la glucosa o la glucosa-6-fosfato.<sup>33</sup>

Se realizó una prueba agregando glucosa al medio de reacción, para determinar si mejoraba el porcentaje de conversión. Se utilizaron 20 mg de glucosa por mL de extracto, a 30°C, 24 h, etanol como codisolvente con buffer de fosfatos 0.1M pH 8 para la reducción con semilla de chícharo y pH 7.6 e isopropanol como codisolvente para la reducción con las demás semillas (alubia, frijol ayocote, frijol bayo, frijol cacahuete, frijol flor de mayo, frijol negro, frijol pinto, haba y alberjón). En la **Figura 20** se observa la comparación de los porcentajes de conversión a 1-feniletanol con y sin glucosa en el medio de reacción.

Con los % de conversión obtenidos para las reacciones con glucosa y sin glucosa, se realizó una prueba t student para muestras independientes con la finalidad de ver si existe diferencia estadística entre las reacciones que contenían glucosa en el medio de reacción y las que no la contenían. La conversión alcanzada usando las semillas de alubia, frijol bajo, frijol pinto y

alberjón mostraron diferencias estadísticamente significativas entre usar y no usar glucosa en la reacción, mostrándose que se obtienen porcentajes de conversión mayores al no agregar glucosa al medio. En el caso del chícharo también se observa una diferencia, sin embargo en este caso se obtiene mayor conversión en las reacciones que contenían glucosa que en las que no contenían. Esta diferencia se puede deber al porcentaje de carbohidratos presentes en cada semilla, ya que, como reportan Granito M., *et. al.* y Noboa A., *et. al.*, la cantidad de carbohidratos presentes en las semillas secas de *Phaseolus* (frijoles)<sup>36</sup> y *Pisum sativum* (alberjón)<sup>37</sup> es de entre 50-60%, a diferencia de la cantidad de carbohidratos presentes en la semilla fresca de chícharo (*Pisum sativum*), la cual es de 14%. Las semillas secas contienen mayor cantidad de carbohidratos, entre los cuales se puede encontrar la cantidad suficiente de glucosa para la regeneración de los cofactores, a diferencia de la semilla fresca de chícharo que contiene menor cantidad de carbohidratos. Debido a los resultados obtenidos con las reacciones en presencia de glucosa, está solo se adicionó a las reacciones catalizadas por el extractos de la semilla fresca de chícharo.



**Figura 20.** Reducción de acetofenona con 20mg de glucosa/mL en el medio de reacción (a las 24 h).

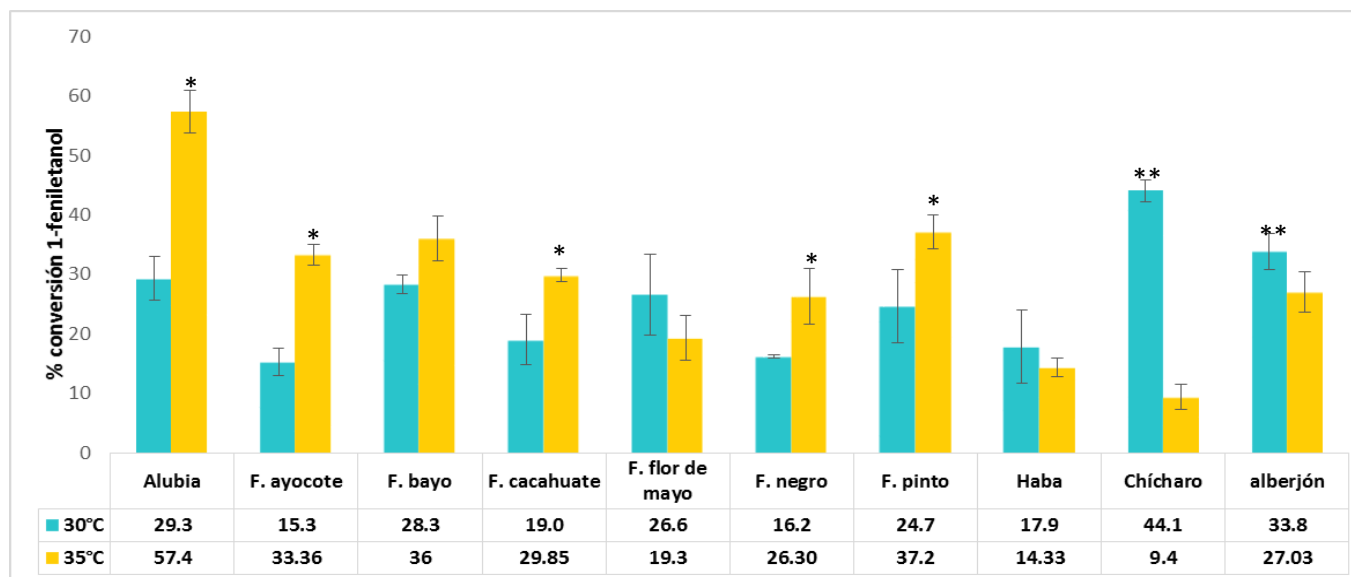
\* Diferencia estadísticamente significativa con una  $p < 0.05$

#### 8.2.4. Temperatura

La temperatura es una variable muy importante en cualquier sistema biológico, y particularmente en el caso de los procesos enzimáticos. Tanto en la teoría de las colisiones, como en la teoría del estado de transición se sabe que un cambio en la temperatura provocará cambios en la constante de velocidad de cualquier reacción.<sup>36</sup>

Es de esperarse que la temperatura tenga un gran impacto, no solo en la actividad enzimática, sino también en la estabilidad de la enzima. Un incremento en la temperatura, incrementa la velocidad de la reacción, sin embargo este también puede incrementar la probabilidad de desnaturalización de la enzima de interés. Por ello se estudió la reducción biocatalizada de acetofenona a 30 y 35°C, los resultados se muestran en la **Figura 21**. La reducción de acetofenona con chícharo se llevó a cabo a pH 8, a 30°C y 35°C, a 30°C se obtuvo un porcentaje de conversión de 44.1%, mientras que a 35°C solo se observó un 9.4% del alcohol, probablemente debido a la desnaturalización de la enzima debido a un pH alto en el medio de reacción y una temperatura relativamente alta.

Se realizó un análisis estadístico inferencial y se aplicó una prueba t student a los % de conversión obtenidos a las dos temperaturas, con la finalidad de ver si existe diferencia estadística entre las conversiones logradas a 30 y 35°C con cada uno de los biocatalizadores utilizados. En el caso de los biocatalizadores de frijol bayo, frijol flor de mayo y haba no se encontró diferencia entre las conversiones obtenidas a ambas temperaturas; mientras que para los biocatalizadores restantes se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las temperaturas analizadas. Para alubia, frijol ayocote, frijol cacahuate, frijol negro y frijol pinto se puede concluir que a 35°C se incrementa el % de conversión, mientras que para chícharo y alberjón se observa un incremento estadísticamente significativo a 30°C. Con base en los resultados obtenidos se decidió realizar la reducción con chícharo a 30°C y con las demás semillas a 35°C.



**Figura 21.** Reducción biocatalizada de acetofenona a 30°C y 35°C. \* Diferencia estadísticamente significativa a 35°C y \*\* a 30°C, con una  $p < 0.05$ .

### 8.3. Análisis de las acetofenonas, 1-fenilpropanonas y sus alcoholes por CLAR y CG

Para determinar el % de conversión de las cetonas a los correspondientes alcoholes se desarrolló un método analítico por cromatografía de gases; mientras que para determinar los excesos enantioméricos de los alcoholes obtenidos por biocatálisis se implementó un método analítico por CLAR quiral. En la **tabla 15** se muestran los tiempos de retención en CG de las cetonas y sus respectivos alcoholes.

**Tabla 15.** Tiempos de retención en CG de las cetonas y alcoholes.

Cetona/alcohol	Tiempos de retención (min)
Acetofenona/ feniletanol	3.418/4.221
2-metilacetofenona/ 2-metilfeniletanol	2.847/3.671
<i>3-metilacetofenona/ 3-metilfeniletanol</i>	<i>3.092/3.473</i>
4-metilacetofenona/ 4-metilfeniletanol	3.652/4.200
2-cloroacetofenona/ 2-clorofeniletanol	3.428/4.782
4-cloroacetofenona/ 4-clorofeniletanol	3.170/4.159
3-bromoacetofenona/ 3-bromofeniletanol	3.277/4.445
4-metoxiacetofenona/ 4-metoxifeniletanol	6.051/6.652
Propiofenona/ fenilpropanol	3.410/4.113
4-Bromopropiofenona/ 4-bromofenilpropanol	3.593/4.905
4-cloropropiofenona/ 4-clorofenilpropanol	3.745/5.377
4-metoxipropiofenona/ 4-metoxifenilpropanol	7.234/7.845

En la **tabla 16** se tienen los tiempos de retención, obtenidos por medio de CLAR quiral, de las cetonas y de cada uno de los enantiómeros de los alcoholes correspondientes, con estos datos se determinaron los excesos enantioméricos de los alcoholes obtenidos usando como fuente de biocatalizadores los distintos materiales vegetales seleccionados.

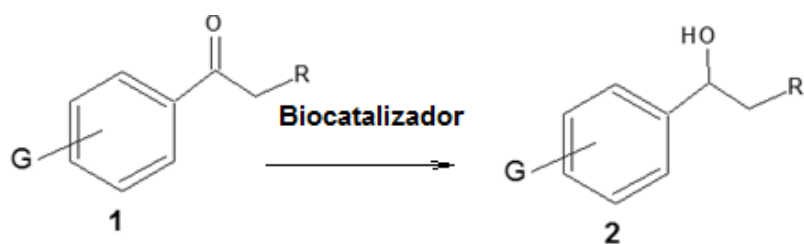
**Tabla 16.** Tiempos de retención en CLAR de las cetonas y alcoholes

Cetona/alcohol	Tiempos de retención (min) Cetona/ROH E1* y E2*
Acetofenona/ feniletanol	7.256/8.266 y 9.117
3-metilacetofenona/ 3-metilfeniletanol	7.466/13.656 y 14.682
2-cloroacetofenona/ 2-clorofeniletanol	11.298/19.869 y 21.464
4-cloroacetofenona/ 4-clorofeniletanol	8.294/14.643 y 15.626
3-bromoacetofenona/ 3-bromofeniletanol	7.813/11.538 y 12.462
4-metoxiacetofenona/ 4-metoxifeniletanol	9.432/14.702 y 15.925
Propiofenona/ fenilpropanol	8.574/14.32 y 16.25
4-Bromopropiofenona/ 4-bromofenilpropanol	9.595/35.175 y 37.141
4-cloropropiofenona/ 4-clorofenilpropanol	7.427/16.564 y 17.678
4-metoxipropiofenona/ 4-metoxifenilpropanol	8.963/9.701 y 10.41

\*ROH E1 y E2: enantiómeros del alcohol

#### 8.4. Reducción biocatalizada de acetofenonas y 1-fenilpropanonas

Posteriormente a todas las pruebas realizadas para incrementar los porcentajes de reducción de acetofenona, se procedió a realizar la reducción biocatalizada de las distintas acetofenonas y 1-fenilpropanonas (**Figura 27**), usando como fuente de biocatalizador alubia, frijol ayocote, frijol bayo, frijol cacahuate, frijol flor de mayo, frijol negro, frijol pinto, haba, chícharo y alberjón.



	<b>G</b>	<b>R</b>		<b>G</b>	<b>R</b>
<b>a</b>	H	H	<b>g</b>	H	CH <sub>3</sub>
<b>b</b>	2-Cl	H	<b>h</b>	4-Br	CH <sub>3</sub>
<b>c</b>	3-Br	H	<b>i</b>	4-Cl	CH <sub>3</sub>
<b>d</b>	4-Cl	H	<b>J</b>	4-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>e</b>	3-CH <sub>3</sub>	H	<b>k</b>	2-CH <sub>3</sub>	H
<b>f</b>	4-OCH <sub>3</sub>	H	<b>l</b>	4-CH <sub>3</sub>	H

**Figura 27.** Reducción biocatalizada de cetonas (**1a-1l**) a sus respectivos alcoholes (**2a-2l**)

#### 8.4.1. Análisis de los porcentajes de reducción de las cetonas 1a-1l

De acuerdo con los resultados mostrados en la **Tabla 17**, se puede observar que al utilizar el frijol ayocote como biocatalizador los porcentajes de reducción más altos fueron de 52 y 57% con las cetonas **1b** y la **1h** respectivamente, además mostró 32% de conversión con la cetona **1d** y con 5 de los 12 sustratos (**1a**, **1e**, **1g**, **1j** y **1l**) los porcentajes de conversión fueron entre 13% y 20%. El mayor porcentaje de conversión con la semilla de alubia como biocatalizador fue de 45% con la cetona **1i** como sustrato, además se observan porcentajes de conversión entre 30-40% con las cetonas **1a**, **1b**, **1c**, **1e**, **1h**, **1k** y **1l**.



**Tabla 17.** Porcentajes de conversión y porcentajes de ee de los distintos fenilalcoholes (2a-2i) obtenidos a acetofenonas y 1-fenilpropanonas (1a-1i), con distintos materiales vegetales.

	2a		2b		2c		2d		2e		2f		2g		2h		2i	
	%conv	%ee	%conv	%ee	%conv	%ee	%conv	%ee	%conv	%ee	%conv	%ee	%conv	%ee	%conv	%ee	%conv	%ee
alubia	33	38	32	62	40	68	12	42	31	93	5	20	29	58	38	57	45	59
Frijol ayocote	17	38	52	61	21	48	32	21	14	85	5	34	17	29	57	19	22	25
Frijol bayo	25	53	20	74	25	85	29	49	18	91	3	37	20	63	33	68	24	66
Frijol cacahuete	22	39	16	48	19	59	35	39	17	69	8	39	10	33	44	42	28	48
Frijol flor de mayo	22	45	17	65	21	72	28	55	22	86	4	38	20	64	28	72	26	73
Frijol negro	17	39	16	41	17	56	27	31	16	91	1	31	14	31	26	66	22	73
Frijol pinto	25	48	19	55	27	71	24	44	23	86	5	32	16	35	44	56	24	68
Haba	5	100	5	100	16	78	9	89	14	75	1	100	8	40	6	97	5	100
chicharo	44	43	14	98	9	40	12	76	1	78	4	59	10	6	4	71	7	72
alberjón	26	71	61	99	52	35	30	77	17	51	7	94	31	10	22	81	17	82

Con chícharo el mayor porcentaje de conversión fue de 44% al reducir **1a**, en general los demás porcentajes con chícharo fueron bajos, menores a 15%, pero esto se puede deber a la época del año en la que se compró el chícharo (septiembre 2014) que se utilizó para reducir las cetonas, ya que se ha observado que la actividad biocatalítica de algunos materiales vegetales es dependiente de la época del año y de la región en que se cultiva.

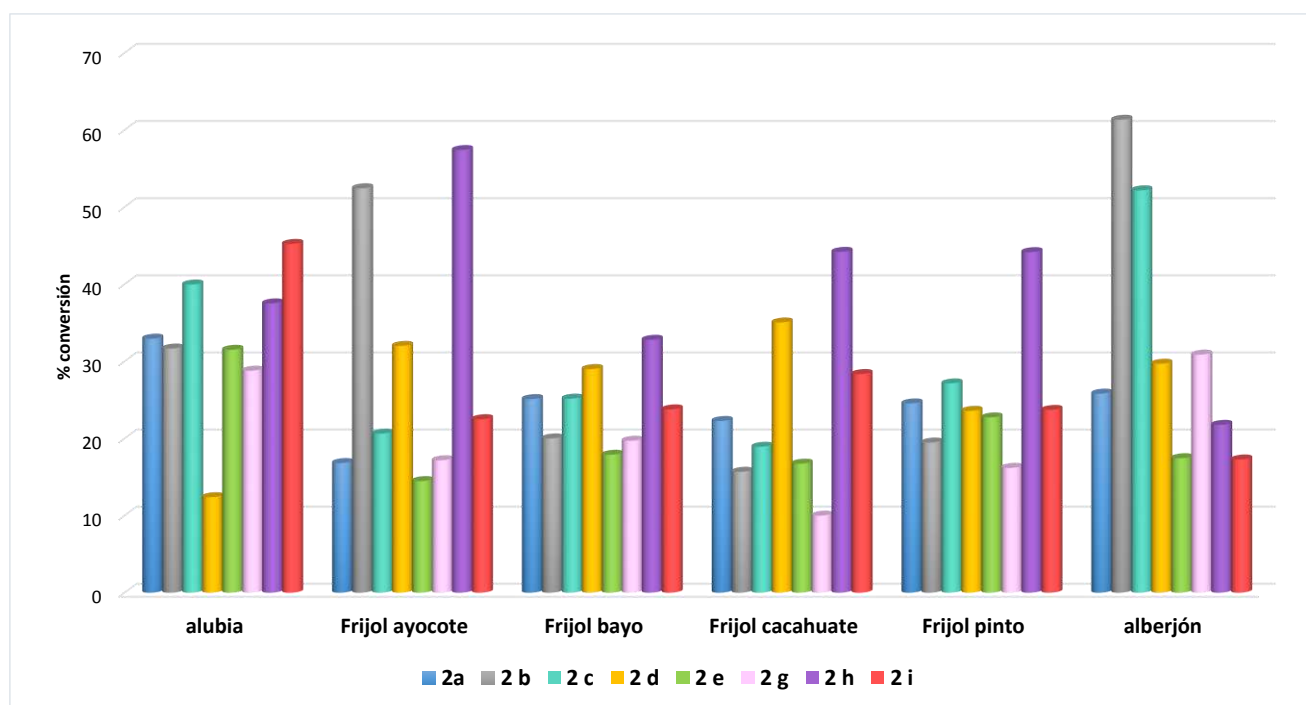
Con alberjón se obtuvo un 61% de conversión al usar **1b** como sustrato y 52% al reducir la cetona **1c**, con **1a**, **1d** y **1g** se tuvieron porcentajes de conversión entre 25 y 30%.

El porcentaje más alto al utilizar el frijol bayo como biocatalizador fue de 33% al utilizar **1h**, se observan porcentajes de conversión entre 20 y 30% al reducir las cetonas **1a**, **1b**, **1c**, **1d**, **1g**, **1i** y **1l**.

En las reducciones con frijol cacahuate y frijol flor de mayo observamos que los mejores porcentajes de conversión se obtuvieron al utilizar **1d** y **1h** como sustrato, teniendo 44% de conversión con la cetona **1h** y 35% con la **1d** al usar frijol cacahuate y 28% para ambas cetonas al utilizar frijol flor de mayo como biocatalizador.

Los porcentajes más altos que mostraron frijol negro, frijol pinto y haba fueron de 27% para la cetona **1d**, 44% para la cetona **1h** y 16% para la cetona **1c** respectivamente.

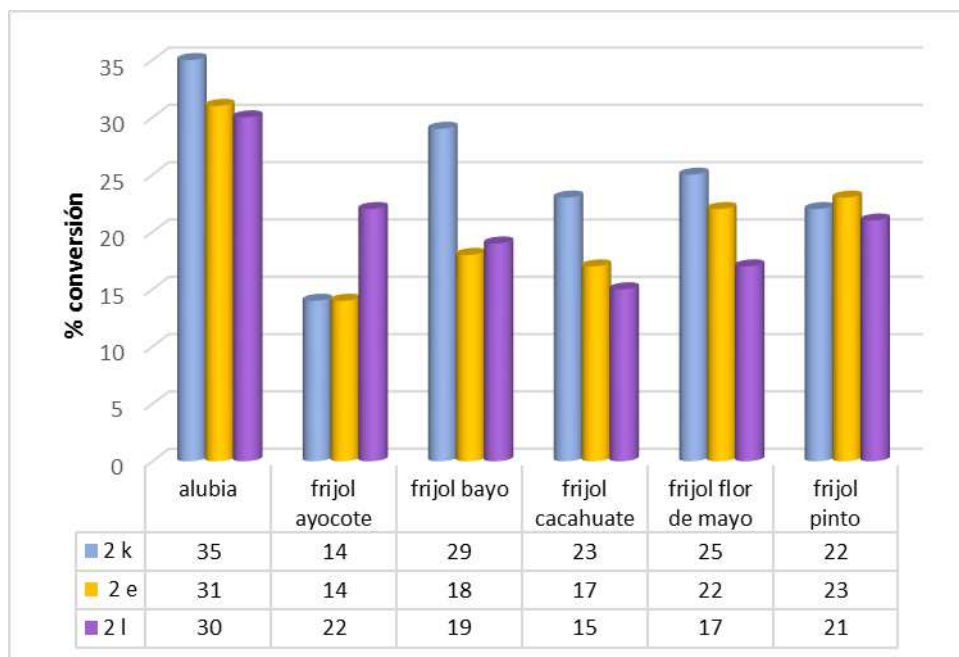
Con ninguno de los materiales usados como fuente de biocatalizador se logró una reducción mayor al 17% de la 4-metoxiacetofenona (**1f**) y de la 4-metoxipropanona (**1j**). Probablemente el efecto electrodonador del grupo metoxi disminuye la reactividad del carbonilo hacia la reducción biocatalizada. En la **Figura 28** se comparan los porcentajes de conversión obtenidos con las semillas que mostraron mayor actividad biocatalítica.



**Figura 28.** Comparación del porcentaje de conversión de las cetonas **1a-1e** a los alcoholes **2a-2e** y **1g-1-i** a los alcoholes **2g-2i** con las semillas con mayor capacidad de reducción.

Se observa que la alubia es capaz de reducir a casi todas las cetonas con porcentajes de conversión entre 33 y 45%, excepto con la cetona **1d**, con la cual presentó 12% del alcohol.

En el caso de los alcoholes **2k** y **2l** no fue posible separar los enantiómeros por CLAR quiral, por lo que solo se muestran sus porcentajes de conversión. En la **Figura 29** se observa que, en general, la posición del grupo metilo no tuvo un efecto significativo sobre la actividad biocatalítica de los materiales vegetales utilizados. Con alubia se obtuvieron los mayores porcentajes de reducción de las tres cetonas **2k**, **2e** y **2l** con 35, 31 y 30% respectivamente.



**Figura 29.** Comparación de porcentajes de conversión de **2k**, **2e** y **2l**

Con las semillas de garbanzo, semilla de mamey y maíz palomero no se logró realizar la reducción de la acetofenona.

A partir del análisis de los resultados obtenidos, se puede decir que cada fuente de biocatalizador tiene preferencia para reducir diferentes sustratos.

#### 8.4.2. Análisis de los porcentajes de ee de los alcoholes 2a-2j

En la **Tabla 14** se observa que, al igual que con los porcentajes de conversión, los excesos enantioméricos de los alcoholes obtenidos (**2a-2j**) son diferentes dependiendo de la fuente de biocatalizador utilizada. Se observa que para 9 de los 10 compuestos estudiados se logró al menos el 85% ee con alguno de los materiales vegetales estudiados y se logró el 100 % ee en 5 de los 10 compuestos estudiados; por lo que se puede decir que las semillas son una fuente de biocatalizadores para reacciones enantioselectivas.

En general, las semillas con las que se lograron los mejores porcentajes de ee fueron haba, chícharo, alberjón, frijol bayo, frijol pinto y frijol negro. Con **2e** y **2j** casi todas las plantas mostraron la mayor enantioselectividad, al obtenerse ee mayores al 75%. Los menores porcentajes de ee se observan en **2a**, **2d**, **2f** y **2g** (6-43%). En la Figura 30 observamos la comparación de los porcentajes de ee más altos, con las semillas que mostraron ee mayor al 60%.

Con haba se obtuvieron los alcoholes **2a**, **2b**, **2f**, **2i** y **2j** con 100% de ee, **2h** con 97%, 89% con el **2d**, 78% con **2c** y 75% con **2e**, el ee más bajo fue de 40% para **2g**.

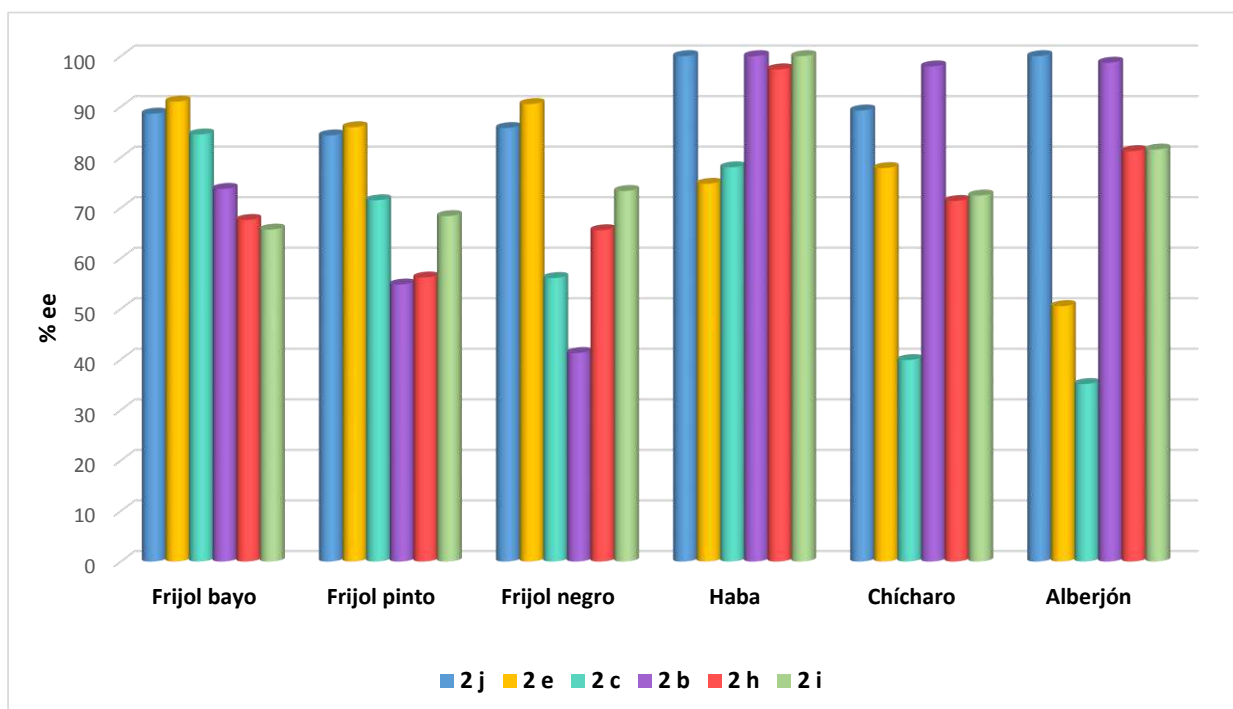
Con chícharo y el alberjón los %ee fueron similares, siendo los mejores: el **2b** con 98% y 99% respectivamente, en el caso del **2j** fue de 89% y 100% respectivamente; el chícharo además presentó buenos excesos con los alcoholes **2d** (76%), **2e** (78%) y **2h** (71%). El alberjón después del haba fue el que presentó los mayores ee, **2a** (71%), **2d** (77%), **2f** (94%), **2h** (81%), **2i** (82%).

El mayor porcentaje de ee que presentó alubia fue de 93% con el **2i**, además de este tuvo con **2j** 83%, **2c** 68% y **2b** 62%.

El frijol bayo presentó buenos porcentajes de ee con **2e** 91%, **2j** 89%, **2c** 85%, y **2b** 74%.

Con el frijol flor de mayo observamos porcentajes de ee de 91% **2j**, 86% **2e**, 73% **2i** y 72% para **2c** y **2h**.

Con los frijoles negro, pinto, cacahuate y ayocote se obtuvieron porcentajes de ee altos con el **2j**, 86, 84, 81y 76% respectivamente; el frijol negro además mostró buen ee con el alcohol **2e** 91% y el **2i** 73%, el frijol pinto con **2e** 86% y **2c** 71% y el frijol ayocote con el **2e** el cual tuvo 85% de ee .

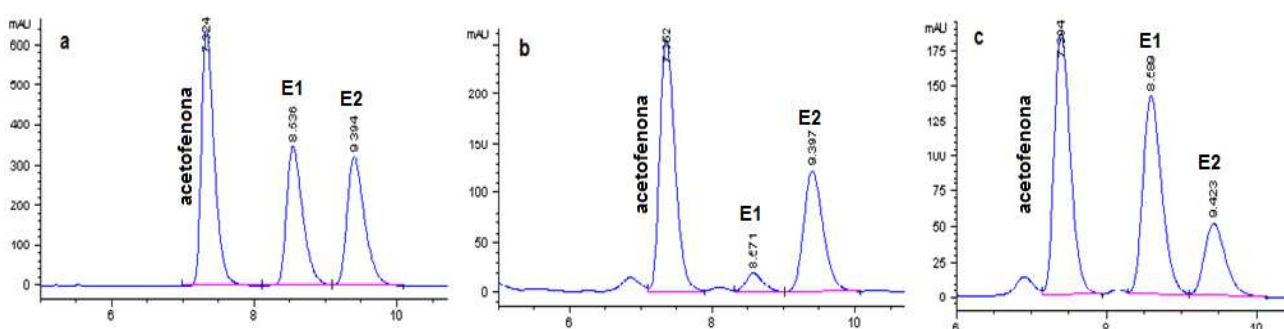


**Figura 30.** Comparación de los % de ee de los alcoholes obtenidos con las semillas que mostraron mayor enantioselectividad.

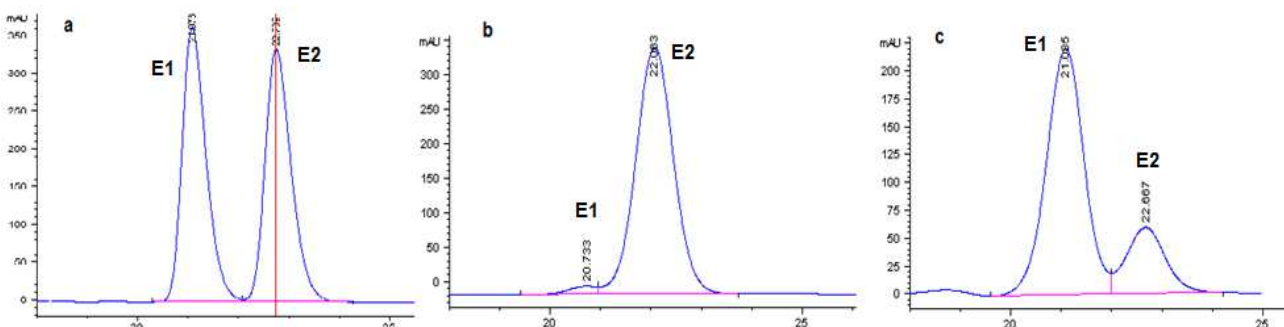
Es importante mencionar que con alubia, frijol ayocote, frijol bayo, frijol cacahuete, frijol flor de mayo, frijol negro y frijol pinto, se obtuvo un mayor porcentaje del **E1** de los alcoholes **2a**, **2b**, **2f**, **2g**, **2h** y **2e**, mientras que se obtuvo el **E2** de los alcoholes **2c**, **2d**, **2j** y **2i**.

Con el haba, el chícharo fresco y el alberjón se obtienen en todos los casos, el enantiómero contrario a los obtenidos con los frijoles.

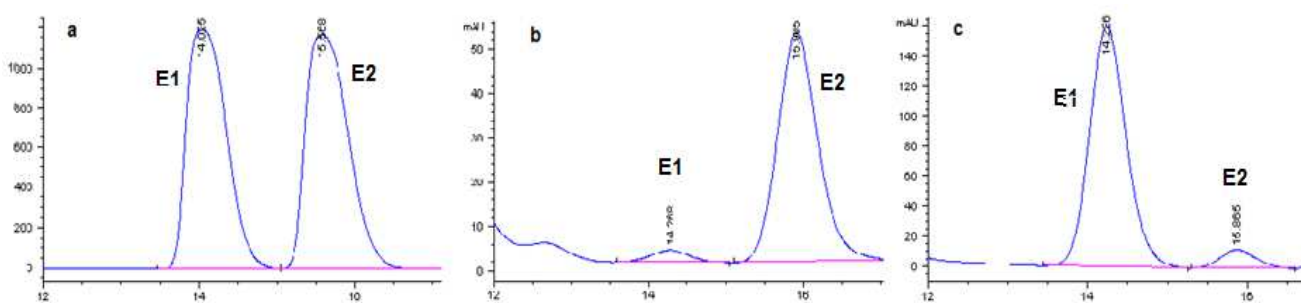
Para ejemplificar la obtención de los distintos enantiómeros con las semillas, en las **Figuras 31-33** se comparan los cromatogramas de los enantiómeros del 1-feniletanol (**2a**), 2-clorofeniletanol (**2b**) y 4-metoxifenilpropanol (**2j**), que se obtuvieron con alberjón y con alubia; en todos los casos se observa que con alberjón se obtiene mayoritariamente el enantiómero **E2** y con alubia mayoritariamente **E1**.



**Figura 31.** Cromatogramas del 1-feniletanol obtenido por medio de la reducción biocatalizada de acetofenona, a) acetofenona y los enantiómeros del 1-feniletanol racémico (**E1** y **E2**); b) acetofenona y 1-feniletanol (**E1** y **E2**) obtenido por reducción biocatalizada con alberjón, c) acetofenona y 1-feniletanol (**E1** y **E2**) obtenido por reducción biocatalizada con alubia.



**Figura 32.** Cromatogramas del 1-(2-clorofenil) etanol obtenido por medio de la reducción biocatalizada de 2-cloroacetofenona, a) enantiómeros del 2-clorofeniletanol racémico (**E1** y **E2**); b) 1-(2-clorofenil) etanol (**E1** y **E2**) obtenido por reducción biocatalizada con alberjón, c) 1-(2-clorofenil) etanol (**E1** y **E2**) obtenido por reducción biocatalizada con alubia.



**Figura 33.** Cromatogramas de excesos enantioméricos de la reducción biocatalizada de 4-metoxipropiofenona, a) enantiómeros del 4-metoxifenilpropanol (**E1** y **E2**) racémico; b) 4-metoxifenilpropanol (**E1** y **E2**) obtenido por reducción biocatalizada con alberjón, c) 4-metoxifenilpropanol (**E1** y **E2**) obtenido por reducción biocatalizada con alubia.

Cabe mencionar que al realizar una búsqueda bibliográfica, la única semilla reportada de las estudiadas en este trabajo para la reducción de acetofenonas y 1-fenilpropanonas fue chícharo; además se buscaron artículos en los cuales se llevaran a cabo reducciones con las cetonas que trabajamos y si bien existen muchos artículos reportados para acetofenona y acetofenonas sustituidas en posición *para*, no existen muchos ejemplos de la reducción de cetonas estéricamente impedidas como por ejemplo la 2-cloroacetofenona.<sup>18, 20</sup>

Podemos observar que en algunos casos obtuvimos mayores porcentajes de reducción con los biocatalizadores estudiados en este trabajo en comparación con lo reportado en la literatura, por ejemplo la reducción de la 2-cloroacetofenona (**1b**) que tuvo porcentaje de conversión 61% y de ee 99% con alberjón, en comparación del artículo publicado de Liu X., *et. al.*,<sup>20</sup> donde se muestran reducciones con apio y zanahoria con porcentajes de conversión menores a 30% y ee de 94 y 90%; o el artículo de Matsuo K., *et. al.*,<sup>18</sup> donde reportan 80% de ee de este mismo compuesto. También tuvimos resultados acordes a lo reportado en la literatura, por ejemplo al reducir la 4-metoxiacetofenona se tienen bajos porcentajes de conversión (1-8%) y comparando con los artículos de Xie Y., *et. al.* y Liu X., *et. al.*, donde se observan porcentajes de conversión de esta misma cetona en un rango entre 12-19%.<sup>17, 20</sup>

Con las pruebas que realizamos en el presente trabajo se encontraron biocatalizadores muy poco o nada reportados para las reacciones de reducción de acetofenonas y 1-fenilpropanona, en algunos casos como en el haba puede ser un biocatalizador prometedor, debido a los altos porcentajes de ee que mostró con todos los alcoholes obtenidos. Es posible seguir estudiando las variables para mejorar las reducciones con estos biocatalizadores.

## 9. Conclusiones

Los materiales con los que se logró reducir la acetofenona fueron las semillas de chícharo, frijol bayo, frijol ayocote, frijol flor de mayo, frijol cacahuete, frijol negro, frijol pinto, alubia, alberjón y haba.

Los mayores porcentajes de reducción de acetofenona, usando semilla fresca de chícharo, se lograron usando etanol como codisolvente, pH 8, 20 mg de glucosa por mililitro de reacción y a 30°C.

En el caso de las semillas de frijol bayo, frijol ayocote, frijol flor de mayo, frijol cacahuete, frijol negro, frijol pinto, alubia, alberjón y haba los mayores porcentajes de reducción de acetofenona se obtuvieron usando fueron isopropanol como codisolvente, pH 7.6 y a 35°C. Las semillas de chícharo, frijol bayo, frijol ayocote, frijol flor de mayo, frijol cacahuete, frijol negro, frijol pinto, alubia, alberjón y haba reducen diferentes tipos de cetonas. Los porcentajes de conversión dependen de la estructura de la molécula, pero el exceso enantiomérico depende de la enantioselectividad de la enzima de presente en cada material vegetal.

Se observó que el tamaño de la cadena en las cetonas no sustituidas (acetofenona y 1-fenilpropanona), no influye en el porcentaje de la reducción biocatalizada. La presencia de grupos electroattractores en la molécula de cetona favorece su reducción. Los grupos electrodonadores fuertes, como el grupo metoxi, dificultan la reducción de la cetona. La reducción de las cetonas que poseen grupos electrodonadores débiles, como el grupo metilo, es similar a la reducción de las correspondientes cetonas no sustituidas.



## **10. Perspectivas**

El presente trabajo tuvo tres fases para su realización, la primera parte fue la evaluación de la capacidad reductora por medio de la reducción de benzaldehído, la segunda parte las variables para mejorar la reducción de las cetonas y la tercera parte la reducción de las acetofenonas y 1-fenilpropanonas; dentro de cada una de estas fases se proponen los siguientes puntos para mejorar los resultados de la reducción biocatalítica:

- Evaluación del material: en la reducción utilizando germinados, se podrían tomar muestras a tiempos menores a las 24 h para determinar si existe diferencia en la conversión con los materiales sin germinar; además se pueden evaluar otras condiciones de reacción como temperatura o pH.
- Reducción de acetofenonas y 1-fenilpropanonas: realizar la reducción con las mejores condiciones de reacción para cada semilla.

## 11. Bibliografía

1. Agranat I., Caner H., Caldwell J., Putting chirality to work: The strategy of chiral switches. Nature Publishing Group, 2002, Vol.1, No.1, 753-768.
2. Caner H., Groner E., Levy L. Trends in the development of chiral drugs. Drugs Disc Tod, 2004, Vol.9, No. 3, 105-110.
3. Muñoz D., Hoyos P., Hernáiz M., Alcántara A., Sánchez-Montero J. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs, Bioresource Technol, 2012, Vol.115, 196–207.
4. Pérez H.I., Luna H., Manjarrez N., Solis A. Resolución microbiológica de 1-fenil-1-propanol y de 1-(4-toluil) -1-etanol con *Nocardia Corallina* B-276. J Mex Chem Soc, 2001, Vol.45, No. 2, 43-46.
5. Helmchen G. Asymmetric synthesis with chemical and biological methods. 2007, Alemania, Wiley VCH, 1era. Edición, pp.5.
6. Pintado S., La catástrofe de la talidomida en el cincuentenario de su comercialización. JANO, 2009, Vol. 726, No.1, 34-37.
7. Leffingwell J., Chirality & Bioactivity I.: Pharmacology. Leffingwell Reports. 2003, Vol. 3, No.1, 1-27.
8. Da Silva Brandi J. Estudo comparativo entre os enantiômeros da carvona em modelos de inflamação aguda de hipersensibilidade imediata, tesis doctoral. 2011, Brasil, Universida de Federal da Paraíba, pp. 31-35.
9. Avi M., Wiedner R. M., Griengl H., Schwab H. Improvement of a stereoselective biocatalytic synthesis by substrate and enzyme engineering: 2-hydroxy-(4'-oxocyclohexyl)acetonitrile as the model. Chem-EurJ, 2008, Vol.14, No. 36, 11415-11422.
10. Yan Ni, Jian-He Xu. Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols. Biotechnol Adv, 2012, Vol.30, No 6, 1279–1288.
11. Hôlsch K. Enantioselective reduction of prochiral ketones by engineered bifunctional fusion proteins. Appl Biochem Biotech, 2010, Vol. 56, No.4, 131-140.
12. Wang L., Li C., Ni Y., Zhang J., Liu X., Xu J. Highly efficient synthesis of chiral alcohols with a novel NADH-dependent reductase from *Streptomyces coelicolor*. Bioresource Technol, 2011, Vol.102, No. 14, 7023–7028.
13. Mazón A. Resolución y cinética de alcoholes y ácidos carboxílicos, vía reacciones de esterificación y síntesis de  $\alpha$ -aminoácidos vía alilaciones catalizadas por paladio, tesis

- doctoral. 1996, España, Universidad de Alicante, pp3-4.
14. Gao-Wei Z., Jian-He X. New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. *Curr Opin Biotech*, 2011, Vol. 22, No. 6, 784–792.
  15. Caprio V., Williams J. *Catalysis in asymmetric synthesis*. 2009, UK, Wiley, 2a edición, pp. 9, 47.
  16. Matsuo K., Kawabe S., Tokuda Y., Eguchi T., Yamanaka R., Nakamura K. Asymmetric reduction of ketones with a germinated plant. *Tetrahedron-Asymmetr*, 2008, Vol.19, No. 2, 157–159.
  17. Xie Y., Xu J., Lu W., Lin G. Adzuki bean: A new resource of biocatalyst for asymmetric reduction of aromatic ketones with high stereoselectivity and substrate tolerance. *Bioresource Technol*, 2009, Vol.100, No. 9, 2463–2468.
  18. Machado L., Souza J., Mattos M., Sakata S., Cordell G., Lemos T. Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species. *Phytochem*, 2006, Vol. 67, No. 2, 1637-1643.
  19. Andrade L., Utsunomiya R., Omori A., Porto A., Comasseto J. Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. *J Mol Cat B: Enz*, 2006, Vol. 38, No. 2, 84–90.
  20. Liu X., Wang Y., Gao H., Xu J. Asymmetric reduction of  $\alpha$ -hydroxy aromatic ketones to chiral aryl vicinal diols using carrot enzymes system. *Cclet*, 2012, Vol. 23, No. 6, 635-638.
  21. Simon R., Mutti F., Kroutil W. Biocatalytic synthesis of enantiopure building blocks for pharmaceuticals. *Drug Disc Tod*, 2013, Vol. 10, No. 1, 37–44.
  22. Mathews C.K. *Bioquímica*. 2002, México, Editorial Pearson, 3era edición. pp 403-405
  23. Wanda K., Mironowicz M., Mironowicz A. Enantioselective hydrolysis of 1-aryl ethyl acetates and reduction of aryl methyl ketones using carrot, celeriac and horseradish enzyme systems. *Tetrahedron-Asymmetr*, 2002, Vol.13, No.21, 2299–2302.
  24. Solís, A. Estudio de nuevas fuentes de oxinitrilasas y su aplicación en síntesis orgánica. Tesis doctoral, 1999, México, UAM-X. pp 15-19
  25. Johannes T., Simurdiak M., Zhao H. *Biocatalysis*, 2006, New York, Encyclopedia of Chemical Processing. Marcel Dekker, Inc., 1a edición, pp. 101-110.
  26. Xie Y., Xu J., Lu W., Lin G. Adzuki bean: A new resource of biocatalyst for asymmetric reduction of aromatic ketones with high stereoselectivity and substrate tolerance. *Bioresource Technol*, 2009, Vol.100, No. 9, 2463–2468.

27. Andrade L., Utsunomiya R., Omori A., Porto A., Comasseto J. Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. *J Mol Cat B: Enz*, 2006, Vol. 38, No. 2, 84–90.
28. Salvano M., Cantero J., Vázquez A., Formica S., Aimar M. Searching for local biocatalysts: Bioreduction of aldehydes using plant roots of the Province of Córdoba (Argentina). *J Mol Cat B: Enz*, 2011, Vol.71, No.1-2, 16–21.
29. Tao J., Lin G., Liese A. *Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry*. 2009, Singapur, John Wiley & Sons Asia, 1a edición. pp.1-3
30. Patel R. Biocatalysis: Synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Curr Org Chem*, 2006, Vol.10, No.1, 1289-132.
31. Yan Z., Nie Y., Xu Y., Liu X., Xiao R. Biocatalytic reduction of prochiral aromatic ketones to optically pure alcohols by a coupled enzyme system for cofactor regeneration. *Tetrahedron Lett*, 2011, Vol. 52, No. 9, 999–1002.
32. Patel R. Biocatalysis: Synthesis of Chiral Intermediates for Pharmaceuticals. *Curr Org Chem*, 2006, Vol.10, No 11, 1289-1321.
33. Matsuda T., Yamanaka R., Nakamura K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron-Asymmetr*, 2009, Vol. 20, No.5, 513–557.
34. Andrade L., Piovan L., Pasquini M. Improving the enantioselective bioreduction of aromatic ketones mediated by *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*: the role of glycerol as a co-solvent. *Tetrahedron-Asymmetr*, 2009, Vol. 20, No13, 1521–1525.
35. Illanés A. *Enzyme Biocatalysis: Principles and applications*. 2008, Chile, Springer Science, 1ª edición, pp.134-140.
36. Granito M., Guinand J., Pérez S., Pérez D., Morros M. Contenido de carbohidratos en variedades autóctonas de *Phaseolus vulgaris* cultivadas en Venezuela, *Rev. Fac. Agron.*, 2008, Vol.25, 649-664.
37. Noboa A. Caracterización, física, química y nutricional de la arveja (*Pisum sativum L.*) cultivada en Ecuador, como un aporte y base de estudio para la creación de una norma técnica ecuatoriana (NTE 2010) por parte del Instituto Ecuatoriano de Normalización. Tesis de Grado. 2010, Ecuador, Universidad Tecnológica Equinoccial, pp. 11
38. McMurry, J. *Química Orgánica*. 2012. Octava edición, ed. México: CENGAGE learning. Pp. 55-58