UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: QUÍMICA MEDICINAL

"REDUCCIÓN BIOCATALÍTICA DE CETONAS AROMÁTICAS Y HETEROAROMÁTICAS PARA OBTENER PRECURSORES DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA"

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

PRESENTA
Q.F.B. ROSA MARÍA MARTÍNEZ PÉREZ
2152800285

COMITÉ TUTORAL:
TUTORA: DRA. AÍDA SOLÍS OBA
ASESORA: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ
ASESOR: M. EN C. NORBERTO MANJARREZ ÁLVAREZ

MARZO, 2018

“REDUCCIÓN BIOCATALÍTICA DE CETONAS AROMÁTICAS Y HETEROAROMÁTICAS PARA OBTENER PRECURSORES DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA”

COMITÉ TUTORAL

TUTORA: DRA. AÍDA SOLÍS OBA

_____

Vo.Bo.

ASESORA: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

_____

Vo.Bo.

ASESOR: M. EN C. NORBERTO MANJARREZ ÁLVAREZ

_____

Vo.Bo.

ALUMNA: Q.F.B. ROSA MARÍA MARTÍNEZ PÉREZ
MATRÍCULA: 2152800285

_____

“REDUCCIÓN BIOCATALÍTICA DE CETONAS AROMÁTICAS Y HETEROAROMÁTICAS PARA OBTENER PRECURSORES DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA”

JURADO DE EXÁMEN DE GRADO

PRESIDENTE: DR. ALEJANDRO CORDERO VARGAS

_____

Vo.Bo.

VOCAL: DR. DANIEL ARRIETA BAEZ

_____

Vo.Bo.

SECRETARIA: DRA. AÍDA SOLÍS OBA

_____

Vo.Bo.

Resumen

La quiralidad es de interés en el campo de las ciencias farmacéuticas porque los enantiómeros de un fármaco pueden tener diferente efecto farmacológico. Los alcoholes quirales se pueden obtener por medio de la reducción asimétrica de cetonas proquirales ya sea mediante métodos químicos o biocatalíticos. Las ventajas de los procedimientos biocatalíticos sobre los químicos se basan en su regio-, quimio- y estereoselectividad, además que generalmente se llevan a cabo a temperatura ambiente en medio acuoso y pH neutro. La mayoría de los biocatalizadores son de origen microbiano, pero las plantas son fuentes atractivas de enzimas. Entre las enzimas que tienen potencial aplicación en síntesis orgánica se encuentran las oxidoreductasas.

En el presente trabajo se estudió la reducción biocatalítica de 2-acetilpiridina (***1a***), 3-acetilpiridina (***1b***), 4-acetilpiridina (***1c***), 3-cloropropiofenona (***1d***) y 3-clorobenzoilacetonitrilo (***1e***) a sus respectivos alcoholes; ***2a***, ***2b***, ***2c***, ***2d*** y ***2e***, los cuales son precursores importantes en la síntesis de fármacos. Con la finalidad de optimizar el medio de reacción y aumentar la enantioselectividad se utilizó ***1a*** como sustrato modelo, seleccionando las mejores fuentes de oxidoreductasa de los extractos acuosos de las semillas de chícharo, haba, alubia, frijol ayocote, alberjón, frijol negro, frijol pinto, frijol bayo, frijol flor de mayo y frijol cacahuate; se varió el pH, el tipo y la concentración del amortiguador [boratos, tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl), ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico (TES) y ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES)], usando como codisolvente isopropanol a diferentes concentraciones (2.5, 10, 50, 100 μL x 1 mL de extracto) y diferentes temperaturas (35, 40 y 45 °C). Todas las reacciones se mantuvieron en agitación a 1300 rpm durante 24 h.

Los mayores porcentajes de exceso enantiomérico (*%ee*) de ***2a*** se obtuvieron con los extractos acuosos de las semillas seleccionadas preparados con solución amortiguadora de boratos, sin embargo, los mayores porcentajes de conversión (*%conv*) se obtuvieron con solución amortiguadora de HEPES. Tanto el *%conv* como el *%ee* de ***2a*** aumentaron al usar una solución de HEPES 0.2 M que con 0.1 M. La cantidad de isopropanol afectó el *%conv* así como el *%ee*, para alberjón, frijol ayocote y alubia, el óptimo fue del 5 μL x 1 mL de extracto, mientras que con chícharo y haba fue mejor 2.5 μL x 1 mL de extracto. Con respecto a la temperatura se

obtuvieron mejores resultados a 45 °C para chícharo y alberjón ya que aumentó el *%ee*, mientras que para frijol ayocote y alubia fue a 40 °C. Con haba disminuyó el *%ee* al incrementar la temperatura por la cual se seleccionó 35 °C. Los *%conv* y *%ee* de ***2a*** fueron: chícharo 16 y 78, haba 11 y 87, alberjón 20 y 80, frijol ayocote 73 y 92, alubia 47 y 91 % respectivamente.

Bajo las condiciones óptimas para cada semilla, se llevó a cabo la reducción de las cetonas ***1b***, ***1c***, ***1d*** y ***1e***. Los *%conv* para ***1a***, ***1b*** y ***1c*** fueron los más altos con frijol ayocote y alubia, sin embargo, con haba se obtienen los mejores *%ee*. En general los *%conv* y *%ee* de ***1d*** y ***1e*** fueron muy bajos. La metodología biocatalítica que se desarrolló representa un método biotecnológico adecuado y sencillo para la preparación de alcoholes quirales de interés farmacéutico. Los resultados obtenidos sugieren que el sistema de oxidoreductasa presente en las células de las semillas de chícharo, haba, alubia, frijol ayocote y alberjón puede ser utilizado de manera eficiente para la reducción de cetonas heteroaromáticas, además las semillas usadas están comercialmente disponibles a bajo costo, además de que no se generan residuos contaminantes.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar este proyecto. Sin esta contribución no habría podido pasar el tiempo necesario en el laboratorio para completar este proyecto, el cual se realizó durante el período de mayo 2015 - marzo 2018 con número de registro 578495.

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, por ofrecer las oportunidades de investigación para estudiantes de posgrado, brindándome nuevamente la oportunidad de egresar de ella.

A la Maestría en Ciencias Farmacéuticas, por aceptar mí proyecto y brindarme las herramientas necesarias para mi crecimiento académico.

Al cuerpo académico consolidado: Biocatálisis Aplicada a la Química Orgánica UAM-X-CA-30, al grupo de Biotransformaciones del laboratorio N-201, Biotransformaciones, por permitirme el uso del laboratorio, por el apoyo en la compra de reactivos y materiales que se utilizaron en el proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Albino y Francisca, quienes han sido la guía y el camino para poder llegar a este punto de mi carrera, los cuales con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo hiciera aun cuando todo se complicaba. Los amo.

A mis queridos hermanos Nelly, Areli y Albino, por todo el cariño y amor que me otorgan, porque siempre me han apoyado en mis decisiones y han estado a mi lado para ayudarme, escucharme, aconsejarme y en muchas ocasiones guiarme.

A mis sobrinas, Mariel e Izel, por llenar de alegría cada día de mi vida.

A mis tíos: Magdaleno, María de Lourdes, Melchor y Concepción, por compartir momentos significativos conmigo durante mi estancia en la CDMX y por siempre estar dispuestos a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A mi tutora de investigación, Dra. Aída, por creer en mí, por haberme dado la inspiración para estudiar la maestría, por tener siempre una palabra de aliento en momentos difíciles. Le agradezco infinitamente la oportunidad que me brindó para trabajar en su laboratorio, por el apoyo otorgado, su constante orientación, valiosos comentarios y sugerencias a lo largo de este proyecto.

A mis asesores la Dra. Herminia y al M. en C. Norberto, los cuales me han orientado, apoyado y corregido en mi labor científica durante este proyecto que concluye con mí Idónea Comunicación de Resultados (ICR).

A la Dra. Liliana, Dr. Ernesto, Dr. Alberto, por la orientación y ayuda que me

brindaron para la realización de esta ICR.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Fadia, Abraham, Liliana, Daniel y Aarón, por los aportes, apoyo y colaboración a mi proyecto de investigación y sobre todo por hacer del laboratorio un lugar más ameno para trabajar.

A mis amigos de la maestría: Carlos, Pietro, Doris, Pedro Anthony, Aarón, quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus conocimientos, alegrías y tristezas durante estos dos años.

A mis amigas de toda la vida Quetzalli Denisse y Maleni, por su apoyo incondicional.

A Xochitl por ser una gran amiga, colega y roomie a quien estimo mucho.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 12
2. MARCO TEÓRICO 13
   2.1. Actividad biológica y quiralidad 13
   2.2. Compuestos con actividad biológica obtenidos a partir de alcoholes enantiopuros ***2a***, ***2b***, ***2c***, ***2d*** y ***2e*** 13
      2.2.1. Antagonista del receptor de la *N*-metil-D-aspartato (NMDA) 13
      2.2.2. Inhibidor no nucleósido de la transcriptasa del VIH 14
      2.2.3. Antidepresivos 14
         2.2.3.1. Fluoxetina 15
         2.2.3.2. Norfluoxetina 16
         2.2.3.3. Atomoxetina 16
   2.3. Obtención de alcoholes ópticamente activos 17
      2.3.1. Resolución de mezclas racémicas 17
         2.3.1.1. Resolución cinética 18
      2.3.2. Síntesis asimétrica 18
         2.3.2.1. Métodos químicos 18
         2.3.2.2. Organocatálisis 20
         2.3.2.3. Biocatálisis 23
            2.3.2.3.1. Fuentes de biocatalizadores (enzimas) 23
            2.3.2.3.2. Clasificación de enzimas 24
            2.3.2.3.3. Factores que favorecen la reducción biocatalítica 27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 31
4. HIPÓTESIS 32
5. OBJETIVOS 33
   5.1. Objetivo general 33
   5.2. Objetivos particulares 33
6. MATERIALES Y MÉTODOS 34
   6.1. Reactivos químicos 34
   6.2. Reducción química de cetonas 35
      6.2.1. Reducción con borohidruro de sodio en solución 35

6.2.2. Reducción con borohidruro de sodio sin disolvente 35
6.3. Material vegetal 36
6.4. Reducción biocatalítica 37
6.4.1. Preparación de la fuente del biocatalizador 37
6.4.2. Biorreducción 37
6.5. Optimización de condiciones de biorreducción 37
6.5.1. Influencia del pH 37
6.5.2. Tipos de solución amortiguadora y de semillas 38
6.5.3. Concentración de la solución amortiguadora 38
6.5.4. Cantidad de isopropanol 38
6.5.5. Temperatura 38
6.6. Desarrollo de los métodos analíticos 38
6.6.1. Cromatografía en capa fina (CCF) 38
6.6.2. Espectroscopia de infrarrojo (IR) 38
6.6.3. Espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) 39
6.6.4. Cromatografía de gases (CG) 39
6.6.5. Cromatografía de líquidos de alta resolución quiral (CLAR) 39
6.7. Evaluación de la rotación óptica 39
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 40
7.1. Reducción química de cetonas 40
7.2. Desarrollo de los métodos analíticos 40
7.2.1. IR 40
7.2.2. RMN 41
7.2.3. CG 44
7.2.4. CLAR quiral 45
7.3. Comparación de la biorreducción de acetofenona (***1f***) y 2-acetilpiridina (***1a***) 46
7.4. Biorreducción de ***1a*** usando alberjón en soluciones amortiguadoras de tris-HCl y fosfatos, 0.1M, a pH 7.6 y 8.1 48
7.5. Biorreducción de ***1a*** utilizando semillas de haba, alubia, frijol ayocote y alberjón, en soluciones amortiguadoras de TES, Tris-HCl, HEPES y boratos 49
7.6. Efecto de la concentración de la solución amortiguadora 51
7.7. Efecto de la concentración de isopropanol 53

7.8. Efecto de la temperatura 55
7.9. Biorreducción de cetonas heteroaromáticas (***1a***-***1c***) y aromáticas (***1d*** y ***1e***) con las condiciones de reacción optimizadas 58
7.10. Determinación de la configuración *R* o *S* de los alcoholes ***2a***, ***2b***, ***2c***, ***2d*** y ***2e*** 59
8. CONCLUSIONES 61
9. METAS ALCANZADAS 62
10. PERSPECTIVAS 63
11. REFERENCIAS 64
12. ANEXO 69

1. INTRODUCCIÓN

La quiralidad es un factor importante en la actividad biológica, ya que cada enantiómero puede tener actividad diferente, por ejemplo, uno de los enantiómeros puede ser inactivo, poseer alguna actividad de interés ya sea deseable o indeseable, ser antagonista del otro enantiómero, por lo cual el desarrollo de nuevos procesos para la obtención de moléculas quirales constituye un gran reto para la síntesis orgánica. El uso de enzimas para la preparación de sustancias enantiopuras es un área de investigación en expansión, por lo tanto la elección del sistema de reacción óptima para cada enzima es un factor crítico que influye en la actividad de la enzima, su estabilidad y selectividad.[1, 2]

Los alcoholes secundarios enantioméricamente puros se encuentran entre los más valiosos intermedios clave para la fabricación de productos farmacéuticos, agroquímicos y cosméticos. Una de las formas para obtener alcoholes quirales es por hidrogenación catalítica de cetonas, utilizando complejos quirales de rodio o rutenio o biocatalizadores de origen microbiano o vegetal.[3-5]

El interés por los biocatalizadores de origen vegetal se debe a su gran potencial biotecnológico, por ejemplo las oxidorreductasas que se pueden emplear en la reducción de aldehídos y cetonas a los correspondientes alcoholes.[6, 7] En el presente trabajo se estudió la reducción biocatalítica de 2-acetilpiridina (***1a***), 3-acetilpiridina (***1b***), 4-acetilpiridina (***1c***), 3-cloropropiofenona (***1d***) y 3-clorobenzoilacetonitrilo (***1e***) a sus respectivos alcoholes: 1-(2-piridil)etanol (***2a***), 1-(3-piridil)etanol (***2b***), 1-(4-piridil)etanol (***2c***), 3-cloro-1-fenilpropanol (***2d***) y 3-clorofenil-3-hidroxipropanonitrilo (***2e***) ópticamente activos, los cuales son precursores importantes en la síntesis de fármacos. Con la finalidad de optimizar el medio de reacción y aumentar la enantioselectividad se utilizó ***1a*** como sustrato modelo, se seleccionaron las mejores fuentes de oxidoreductasa, a partir de los extractos acuosos de las semillas de chícharo, haba, alubia, frijol ayocote, alberjón, frijol negro, frijol pinto, frijol bayo, frijol flor de mayo y frijol cacahuate; se varió el pH, el tipo y la concentración del amortiguador, usando como codisolvente isopropanol a diferentes concentraciones y diferentes temperaturas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Actividad biológica y quiralidad

El fenómeno de la quiralidad existe en todos los sistemas biológicos. La interacción estereoselectiva de las biomoléculas con otras moléculas quirales es parte esencial de todos los procesos biológicos vitales. Por ejemplo, las enzimas son catalizadores quirales, capaces de llevar a cabo la transformación selectiva de un estereoisómero. Cuando los compuestos exógenos se introducen en el organismo, 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.[8, 9]

Alrededor del 56% de los fármacos utilizados actualmente son quirales, de los cuales aproximadamente el 88% se siguen utilizando en forma de racematos, aun sabiendo que en algunos casos hay grandes diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas de cada enantiómero. Por ejemplo se tienen los siguientes casos: a) solo uno de los enantiómeros es bioactivo (llamado eutómero); b) cada uno tiene efecto biológico diferente, c) uno puede ser tóxico. Como ya se ha mencionado, la unión de un fármaco a su receptor es altamente esteroespecífica, entonces cada enantiómero puede presentar actividad biológica diferente, por lo tanto, cada enantiómero de un compuesto con actividad biológica debe estudiarse como entidad independiente. [8, 10-13]

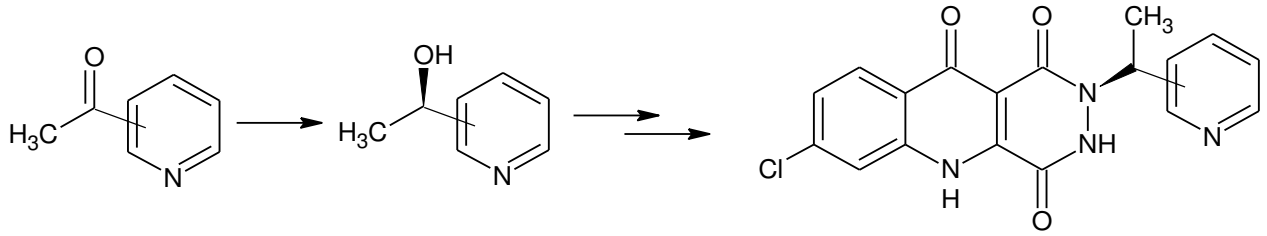
2.2. Compuestos con actividad biológica obtenidos a partir de los alcoholes enantiopuros ***2a***, ***2b***, ***2c***, ***2d*** y ***2e***

Los alcoholes enantiopuros ***2a***-***2e*** se han utilizado para la preparación de fármacos quirales con diversas actividades biológicas, como se muestran a continuación.

2.2.1. Antagonista del receptor de la *N*-metil-D-aspartato (NMDA)

Los antagonistas del receptor de la NMDA (**Esquema 1**), tienen valor terapéutico potencial en el tratamiento de una amplia gama de trastornos, como accidentes cerebrovasculares, enfermedad de Parkinson, depresión y dolor neuropático. La síntesis de estos antagonistas se

muestra en el **esquema 1**, en donde los alcoholes ***2a***, ***2b*** y ***2c*** ópticamente activos son los bloques de construcción quirales para la síntesis asimétrica de este producto.[14]



2-acetilpiridina (***1a***) (*R*)-1-(2-piridil)etanol (***2a***) (*S*)-Antagonista de NMDA

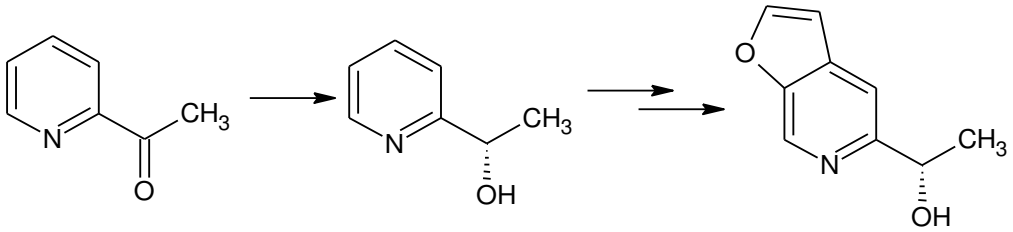
3-acetilpiridina (***1b***) (*R*)-1-(3-piridil)etanol (***2b***)

4-acetilpiridina (***1c***) (*R*)-1-(4-piridil)etanol (***2c***)

Esquema 1. Síntesis de antagonistas del receptor de la (*S*)-*N*-metil-D-aspartato ((*S*)-NMDA) a partir de ***1a***, ***1b*** y ***1c***.

2.2.2. Inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa del VIH

La (*S*)-5-(1-hidroxietil)furo[2,3-c]piridina ((*S*)-FPH) es un intermediario en la síntesis de un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa del VIH, el cual se obtiene a partir de la reducción de ***1a*** (**Esquema 2**). En estudios previos se encontró que el enantiómero (*S*)-FPH es al menos cien veces más potente contra el virus del VIH que el correspondiente enantiómero (*R*).[15, 16]



2-acetilpiridina (***1a***) (*S*)-1-(2-piridil)etanol (***2a***) (*S*)-FPH

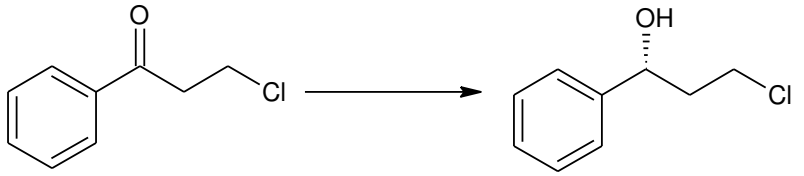
Esquema 2. Síntesis de (*S*)-5-(1-hidroxietil)furo[2,3-c]piridina a partir de ***1a***.

2.2.3. Antidepresivos

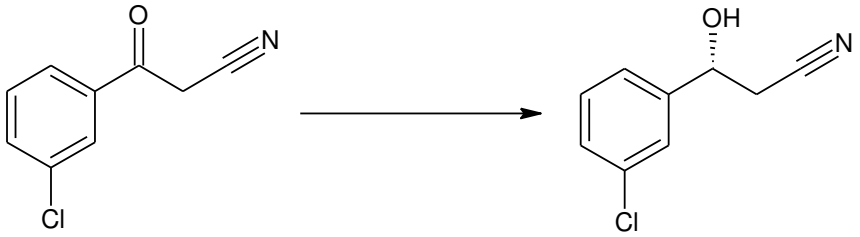
Los alcoholes ópticamente activos ***2d*** y ***2e*** han sido utilizados como bloques de construcción clave para la preparación de fluoxetina, norfluoxetina y atomoxetina (**Esquema 3**), dichos

fármacos se emplean en el tratamiento de trastornos psiquiátricos, como la depresión, la ansiedad y el alcoholismo, así como ciertos problemas metabólicos.[17-20]

A diferencia de los antidepresivos tricíclicos como imipramina, se ha demostrado que la fluoxetina y atomoxetina inhiben específicamente la noradrenalina y la recaptación selectiva de serotonina (ISRS) en seres humanos en dosis que son clínicamente bien toleradas. Estos compuestos también han sido reportados como ligandos relativamente débiles para los receptores α-1, α-2 y β-adrenérgicos, los cuales son responsables de los efectos secundarios indeseables asociados con los antidepresivos.[18]



3-cloropropiofenona (***1d***) (*R*)-3-cloro-1-fenilpropanol (***2d***)



3-clorobenzoilacetonitrilo (***1e***) (*R*)-(3-clorofenil)-3-hidroxipropanonitrilo (***2e***)

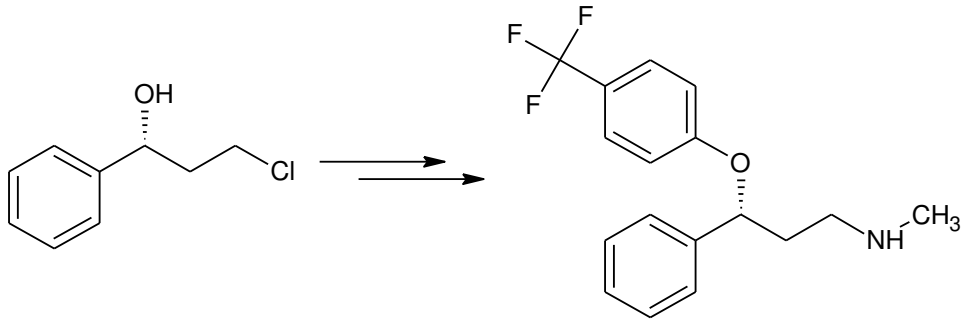
Esquema 3. Síntesis de los precursores ***2d*** y ***2e*** a partir de ***1d*** y ***1e***.

2.2.3.1. Fluoxetina

La fluoxetina es un aminoalcohol quiral (**Esquema 4**), que se comercializa como racemato (Prozac®) y se encuentra entre los más prescritos en todo el mundo, con ventas de aproximadamente 3 mil millones de dólares al año. Es un ISRS, que se utiliza en el tratamiento de la ansiedad, alcoholismo, dolor crónico, migraña, trastornos obsesivos compulsivos, trastornos de la memoria, trastornos del sueño y bulimia.[17, 21, 22]

Aunque el fármaco se usa como racemato, ambos isómeros han sido probados independientemente para el tratamiento de diferentes trastornos. Por ejemplo la (*R*)-fluoxetina ofrece el potencial para un inicio más rápido del alivio y una mayor eficacia en el tratamiento

de la depresión, así como de otros trastornos como apnea del sueño y ansiedad. Por otro lado se ha probado que (*S*)-fluoxetina puede ser más eficaz que el enantiómero (*R*) en el tratamiento de la migraña.[17, 21]

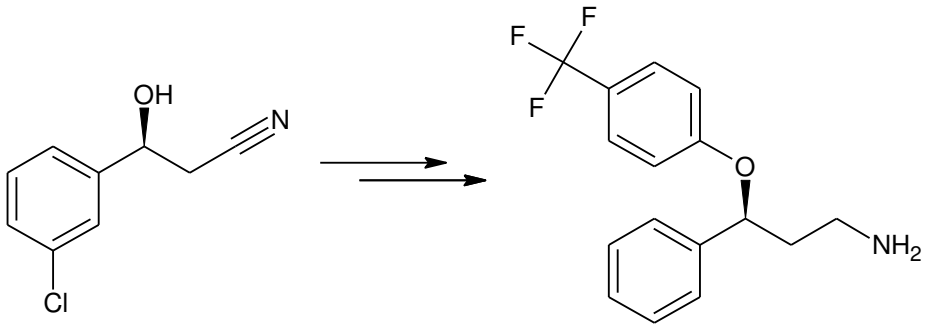


(*R*)-3-cloro-1-fenilpropanol (***2d***) (*R*)-fluoxetina

Esquema 4. (*R*)-fluoxetina obtenida a partir de (*R*)-***2d***.

2.2.3.2. Norfluoxetina

Farmacodinámicamente los enantiómeros de la norfluoxetina (**Esquema 5**), metabolitos activos de la fluoxetina, presentan el mismo efecto farmacológico pero con potencia diferente, la (*R*)-norfluoxetina es aproximadamente veinte veces menos potente que el enantiómero (*S*), que a su vez tiene la misma potencia que la propia fluoxetina.[22]

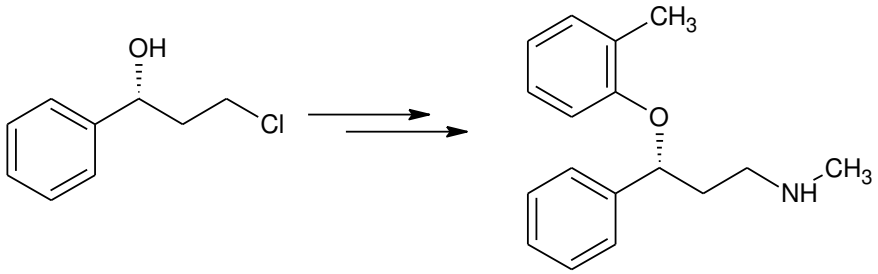


(*S*)-3-clorofenil-3-hidroxipropanonitrilo (***2e***) (*S*)-norfluoxetina

Esquema 5. (*S*)-norfluoxetina obtenida a partir de (*S*)-***2e***.

2.2.3.3. Atomoxetina

En el caso de atomoxetina (**Esquema 6**) para el tratamiento de la depresión, el enantiómero (*R*) es dos veces más potente que el racemato y nueve veces más potente que la forma (*S*).[17]



(*R*)-3-cloro-1-fenilpropanol (***2d***) (*R*)-atomoxetina

Esquema 6. (*R*)-atomoxetina obtenida a partir de (*R*)-***2d***.

2.3. Obtención de alcoholes ópticamente activos

Como ya se ha mencionado, los alcoholes secundarios aromáticos ópticamente puros representan una clase importante de bloques de construcción quirales ya que son intermediarios versátiles para la síntesis de un gran número de compuestos bioactivos. Es por ello que han sido desarrolladas diferentes metodologías con el fin de obtener estos compuestos, como la resolución y la síntesis asimétrica (**Figura 1**).[23, 24]

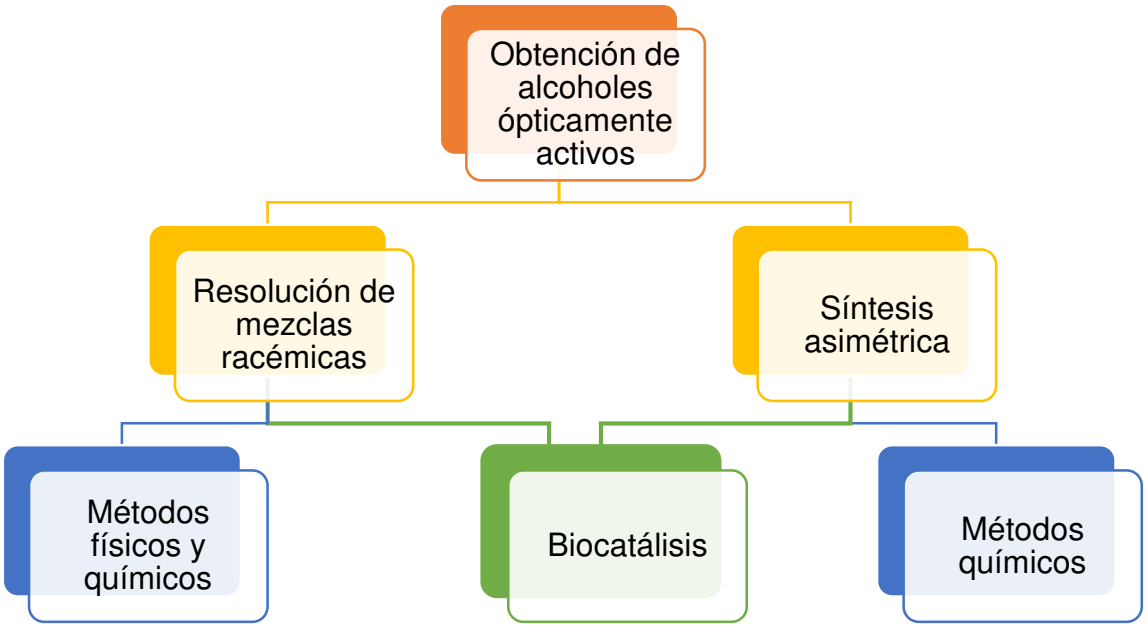


Figura 1. Métodos para la obtención de alcoholes quirales.

2.3.1. Resolución de mezclas racémicas

La resolución de racematos es uno de los principales métodos para obtener enantiómeros puros, estos métodos pueden ser físicos, químicos o biológicos. Algunos ejemplos son la

cromatografía quiral, cristalización preferencial, cristalización diastereomérica y la resolución cinética.[25]

2.3.1.1. Resolución cinética

En la resolución cinética uno de los enantiómeros de una mezcla racémica se transforma más rápidamente que su imagen especular. El requisito principal de este proceso es que la tasa de transformación del enantiómero-(*R*) no sea igual a la tasa de transformación del enantiómero-(*S*), por ejemplo $k1_{rápida}>k2_{lenta}$. En un proceso de resolución cinética enzimática ideal se puede lograr un rendimiento máximo de 50 % de cada enantiómero, lo cual es la principal limitante en este proceso. Por lo tanto, la resolución es generalmente acompañada por procesos adicionales tal como separación, racemización y reciclaje de los enantiómeros no deseados que pueden contribuir a los altos costos de procesamiento. Un ejemplo para obtener alcoholes secundarios ópticamente activos es la resolución cinética catalizada por lipasas.[23, 25]

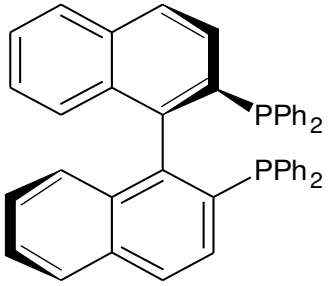
2.3.2. Síntesis asimétrica

La síntesis asimétrica, también denominada síntesis quiral o síntesis enantioselectiva, es un método en el cual se obtiene un solo enantiómero. Una ruta eficaz y prometedora para producir alcoholes quirales es la reducción asimétrica de cetonas proquirales, la cual tiene la ventaja inherente de lograr un rendimiento teórico de hasta el 100 %. Los catalizadores utilizados se pueden clasificar en dos categorías: químicos y biocatalíticos. Ambos tienen ventajas y desventajas, el estudio de estos permitirá la selección apropiada de los catalizadores con la finalidad de promover la química verde.[6, 26-28]

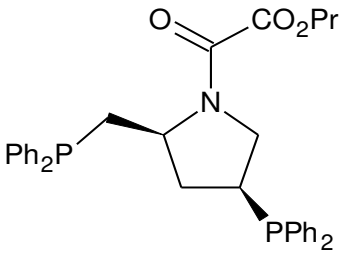
2.3.2.1. Métodos químicos

Los procesos de reducción asimétrica implican el uso de complejos metálicos quirales (rodio, rutenio o iridio) como catalizadores. La mayoría de los catalizadores de rodio comúnmente utilizados son de fosfina de rodio quiral que contienen varios grupos ligandos tales como BINAP [(2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo]) y BPPM ([(2*S*, 4*S*)-1-terc-butoxicarbonil-4-difenilfosfino-2-(difenilfosfinometil) pirrolidina]) (**Figura 2**). Al igual que el rodio los complejos

de rutenio también son efectivos cuando se usa con diversos ligandos de fosfina quirales.[4, 12, 13]



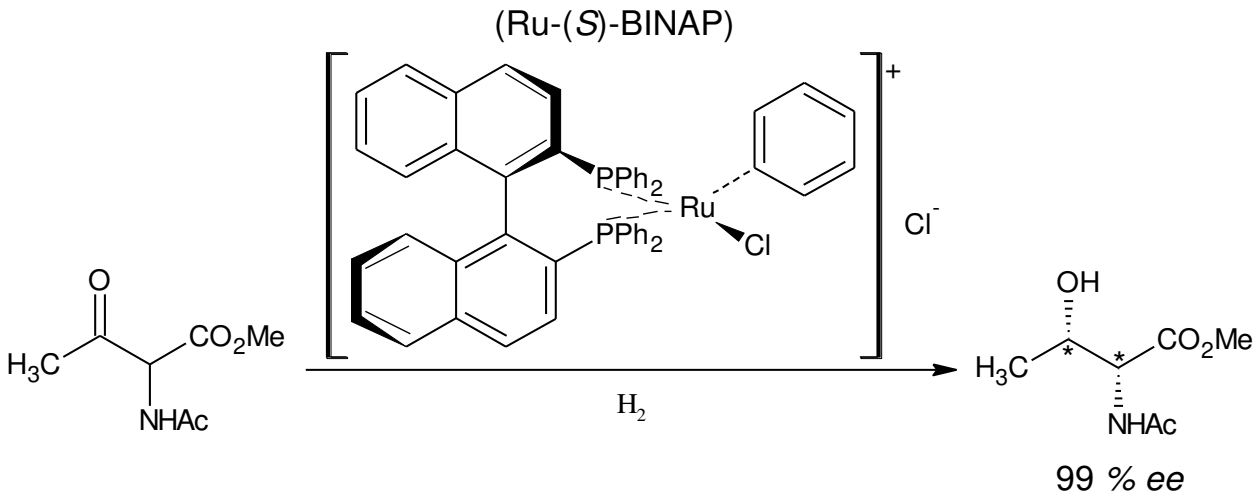
(*S*)-BINAP



BPPM

Figura 2. Ligandos comunes que se acomplejan con rodio y rutenio para catalizar reducciones asimétricas.

Particularmente los catalizadores Ru-BINAP son extremadamente valiosos en la producción de enantiómeros puros ya que la configuración es predecible, lo que significa que el catalizador utilizado con el (*S*)-BINAP por lo general da (*S*)-alcoholes con excelentes *%ee*, mayores del 99 % (**Esquema 7**). En los procesos de reducción catalíticas los ligandos generalmente sirven como donadores de electrones al metal central coordinado, por lo tanto lo activan para unirse al sustrato. En cuanto a las condiciones de reacción, todas se llevan a cabo bajo presión de hidrógeno, en diclorometano o metanol acuoso como disolventes y en algunos casos temperaturas elevadas de hasta 100 ºC, reduciendo el tiempo de reacción sin pérdida significativa de selectividad.[13]



Esquema 7. Reducción asimétrica con complejo catalizado de rutenio-BINAP.

2.3.2.2. Organocatálisis

Los organocatalizadores son pequeñas moléculas orgánicas empleados para catalizar reacciones orgánicas. En las primeras aplicaciones de la organocatálisis se llevaron a cabo con compuestos aquirales de modo que los productos obtenidos resultaron ser racémicos, pronto se descubrió que el uso de los organocatalizadores enantioméricamente puros pueden inducir alta enantioselectividad. Esto explica el enorme desarrollo del campo de la organocatálisis en la última década.[29]

Algunas de las ventajas del uso de organocatalizadores son[29]:

- La simplicidad operacional ya que no se requiere de condiciones inertes para su empleo; en contraste, los complejos organometálicos generalmente son sensibles a la humedad y al oxígeno.
- No es necesario utilizar disolventes secos, lo que permite reducir costos en la planta de producción.
- Bajo costo en comparación con el precio de enzimas, muchos metales de transición y sus complejos con propiedades catalíticas.
- Accesibilidad, ya sea mediante el aprovechamiento de sustancias naturales abundantes (acervo quiral) como son los aminoácidos y los carbohidratos.
- Protección del medio ambiente al evitar el empleo de metales que pudiesen ser intolerables en la producción de fármacos, alimentos y derivados agroquímicos.

Aunque el empleo de productos naturales como organocatalizadores constituye un concepto importante en el campo de la organocatálisis, la complejidad estructural de los productos naturales puede ser una limitante en su aplicación. Por esta razón el diseño de moléculas orgánicas simples y baratas como organocatalizadores es muy deseable.[29]

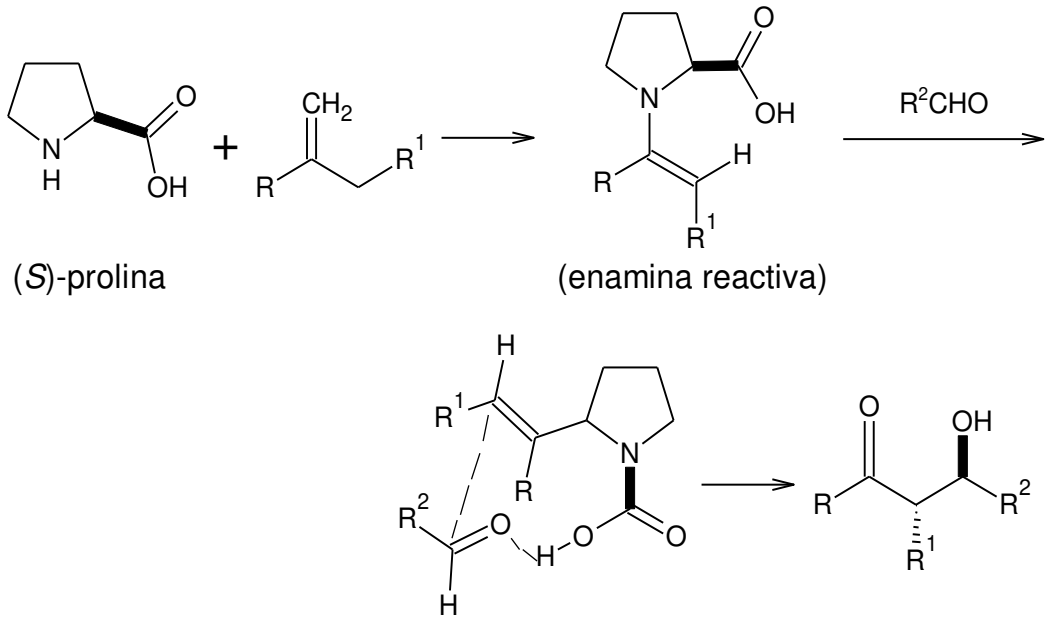
Según Dalko y Moisan, los organocatalizadores se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción:[30]

- Los que llevan a cabo la activación de la reacción mediante formación de enlaces

covalentes con uno de los sustratos, como es el caso del catalizador L-prolina y derivados (**Esquema 8**).

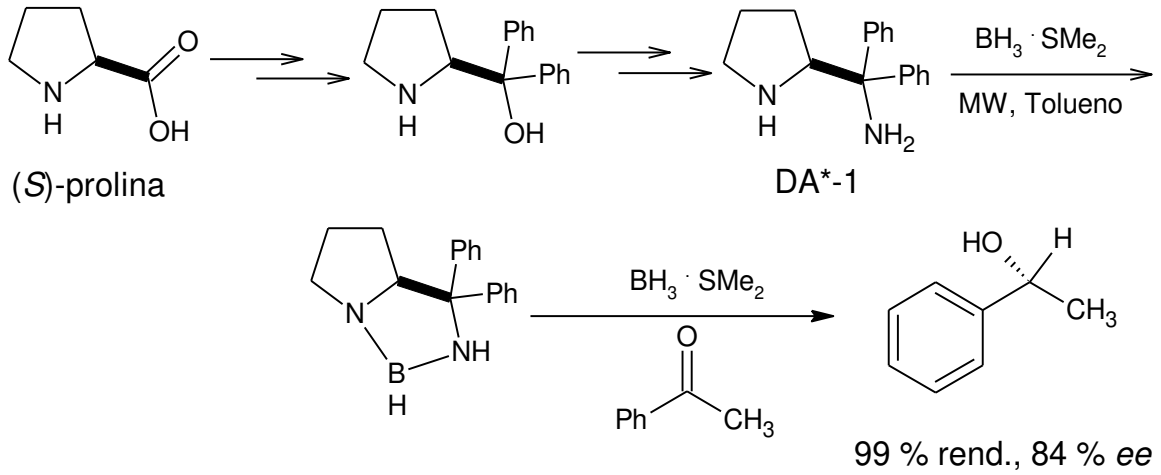
- Los que no forman enlaces covalentes con el sustrato y la activación se produce mediante interacciones más débiles. Tal es el caso de los catalizadores tioureas.
- Los llamados catalizadores de transferencia de fase, los cuales transportan un ión orgánico de una fase a otra donde reaccionará por intercambio iónico.
- Aquellos catalizadores que pueden seleccionar el sustrato atendiendo al tamaño o a otro criterio estructural, en reacciones que tienen lugar en cavidades moleculares, simulando el mecanismo de acción de las enzimas. Un ejemplo de este tipo de catalizadores lo constituyen las ciclodextrinas.[30]

La reacción de aminas derivadas de la (*S*)-prolina con aldehídos y cetonas para generar enaminas quirales permite la funcionalización en la posición alfa de compuestos carbonílicos, por ejemplo mediante la reacción aldólica. El mecanismo de esta reacción involucra la formación de una enamina reactiva (**Esquema 8**).[29]



Esquema 8. Actividad de compuestos carbonílicos mediante (*S*)-prolina.[29]

Recientemente, se ha desarrollado un método para la síntesis de una nueva diamina quiral análoga a la (*S*)-prolina (DA*-1, **Esquema 9**), la cual es utilizada como organocatalizador en la reducción enantioselectiva de cetonas proquirales, la cual ofrece un potencial enorme como organocatalizador.[29]



Esquema 9. Síntesis y aplicación de la difenilprolinilamina DA*-1.[29]

2.3.2.3. Biocatálisis

Además de la utilización de complejos de metales de transición y organocatálisis para la preparación de compuestos enantioméricamente puros, recientemente existe una tendencia en el desarrollo de métodos biocatalíticos empleando enzimas aisladas, crudas o presentes en células completas como catalizadores. Los biocatalizadores, son estéreo y regioselectivo, asimismo estas reacciones se llevan a cabo a valores de pH cercanos a los neutralidad y temperaturas ambientales.[12, 13, 31] Entre las ventajas de los biocatalizadores se encuentran:[26]

I. Selectividad

Los procesos biocatalíticos presentan alta versatilidad, eficiencia, enantio-, regio- y quimioselectividad debido al reconocimiento estricto del sustrato por la enzima. Por ejemplo, se puede lograr muy altas enantioselectividades, incluso con la reducción de cetonas alifáticas tales como metil-acetato de propilo, mientras que los catalizadores químicos pueden realizar reducciones altamente enantioselectivas por lo general cuando los dos grupos sustituyentes de carbono del carbonilo de las cetonas son significativamente diferentes.[5, 26, 32]

II. Procesos económicos y ambientalmente atractivos

El reglamento REACH (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas) y las restricciones medioambientales aprobadas por Estados Unidos., Japón y Europa, en la última década, ha abierto un gran debate en la industria química fina sobre su futuro inmediato. De esta manera, la filosofía de la Química Verde, que promueve el uso industrial de productos químicos obtenidos a partir de biomasa, el uso de disolventes verdes y procesos industriales más sostenibles, está impactando en la investigación industrial. El éxito clave en el desarrollo de procesos industriales "más ecológicos" es la integración efectiva de las tecnologías catalíticas (químicas o enzimáticas) en un esquema general de síntesis orgánica.[1]

En este sentido, la biocatálisis presenta muchas características atractivas en el contexto de la Química Verde, especialmente para la síntesis de bloques quirales de construcción que conducen a fármacos enantiopuros o aditivos alimentarios. Adicionalmente, el uso de biocatalizadores generalmente evita la necesidad de activación de grupos funcionales, eliminando los pasos de protección y desprotección habitualmente requeridos en las síntesis orgánicas tradicionales. Estas propiedades proporcionan procesos que son más cortos, producen menos residuos y son, por lo tanto, ambiental y económicamente más inteligentes que las rutas convencionales. En muchos casos los métodos biocatalíticos se han usado para llevar a cabo procesos que son difíciles de conseguir con la catálisis química.[1, 4, 13]

2.3.2.2.1. Fuentes de biocatalizadores (enzimas)

Aunque los microorganismos son las fuentes de biocatalizadores más empleadas, las plantas también se han explorado como una fuente alterna de biocatalizadores útiles en síntesis orgánica. Las transformaciones biocatalíticas utilizando plantas pueden aplicarse en la fitorremediación de contaminantes orgánicos, bioreducción de cetonas, aldehídos y olefinas, oxidación de alcoholes racémicos, lactonización enzimática, hidrólisis de ésteres, acilación de alcoholes, adición de cianuro de hidrógeno, glucosilación e hidroxilación.[7, 12, 23, 28, 33, 34]

La biocatálisis utilizando plantas, denominada química-botánica, ofrece numerosas ventajas en términos de la disponibilidad de biomasa ya que los vegetales son de fácil acceso, por

ejemplo, en mercados locales, son fáciles de manipular, de bajo costo y genera desechos biodegradables. Sin embargo, la principal desventaja es la reproducibilidad de experimentos ya que las propiedades de estos biocatalizadores dependen del lugar de origen, así como de la época del año en que se recolecte. Una alternativa a esta problemática es el uso de semillas como fuente de biocatalizadores, las cuales se pueden mantener sin alteración durante tiempos prolongados, a diferencia del material fresco, ya que se pueden almacenar en condiciones controladas de temperatura, humedad y luz.[35-37]

A. Empleo de enzimas aisladas

El aislamiento y purificación de enzimas proporciona catalizadores activos y altamente específicos que se pueden utilizar con el fin de realizar un gran espectro de transformaciones. Desafortunadamente, a pesar de sus numerosas ventajas, las enzimas purificadas son sensibles a la desnaturalización durante la preparación y la extracción; debido a cambios en el pH, la temperatura y que en muchas ocasiones requieren el uso de cofactores adicionales generando procesos costosos.[12]

B. Células completas

El uso de células completas en lugar de enzimas aisladas ofrece numerosas ventajas en términos de disponibilidad, economía y tiempo, ya que al evitar etapas de preparación, extracción y purificación del biocatalizador los procedimientos son más rápidos y sencillos. Otra ventaja de las células completas es que las enzimas son generalmente más estables, así mismo se evita la adición de cofactores, ya que estos se encuentran presentes en las células así como los sistemas de regeneración de dichos cofactores.[12, 18, 31]

2.3.2.2.2. Clasificación de enzimas

Las enzimas se han clasificado de acuerdo al tipo de reacción química que catalizan, como se indica en la **tabla 1**.

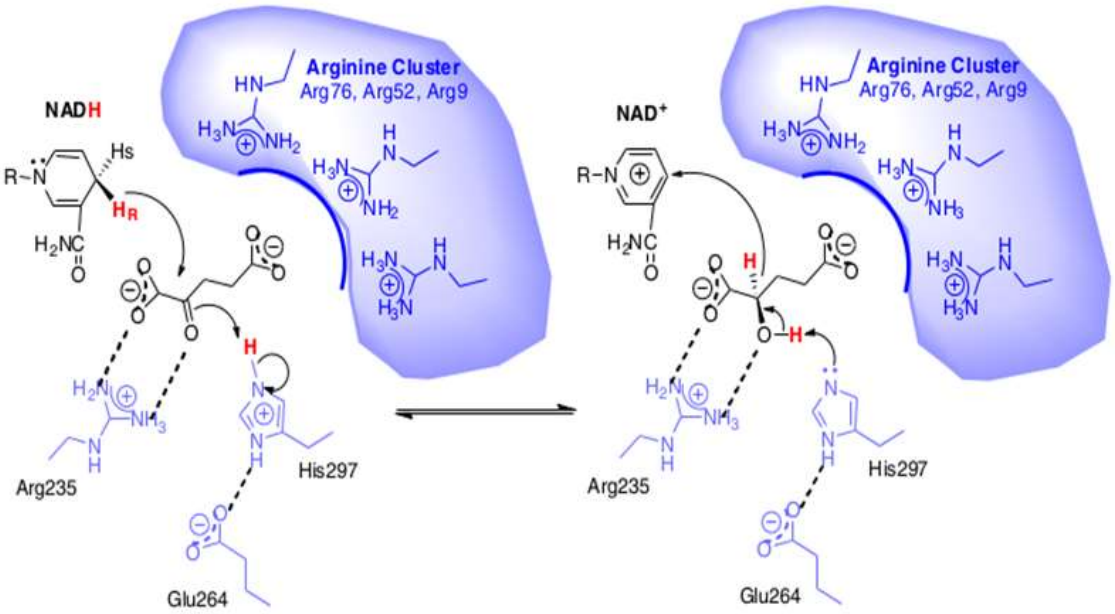
Tabla 1. Clasificación de enzimas.[25]

CLASE	SUBCLASES	FUNCIÓN
Oxidorreductasas	Deshidrogenasas, reductasas, oxidasas, peroxidasas, catalasas	Oxidación o reducción, transferencia de electrones y protones.
Transferasas	Cinasas, transaminasas, glicosiltransferasas	Transferencia de grupos funcionales: metil-, acil-, amino-, y fósforo.
Hidrolasas	Lipasas, proteasas, esterasas, nitrilasas, nitril hidratasas, glicosidasas, fosfatasas	Hidrólisis de ésteres, fosfatos, amidas, etc.
Liasas	Descarboxilasas, aldolasas, dehidratasas, sintasas, liasas	Escisión del enlace no hidrolítico. Pérdida de CO_2, H_2O, etc.
Isomerasas	Isomerasas, epimerasas	Isomerización del centro quiral
Ligasas	Carboxilasas, sintetasas	Síntesis de dos moléculas a través de enlaces C-O, C-S, C-N o C-C, adición de CO_2.

Oxidorreductasas

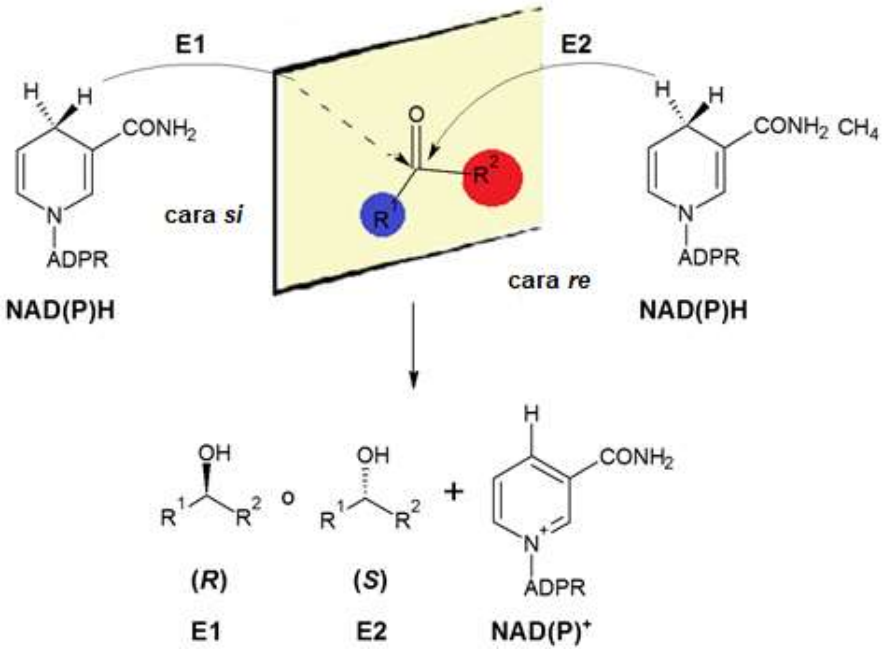
Las oxidoreductasas, como las carbonil reductasas y alcohol dehidrogenasas, catalizan reacciones redox y son usadas para la reducción de aldehídos y cetonas. Estas enzimas requieren cofactores de nicotinamida, como la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) o la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) desde las cual se transfiere un hidruro al carbono carbonílico del sustrato. Se sugiere el siguiente mecanismo (**Esquema 10**):

1. En la etapa inicial del proceso, la coenzima y el sustrato oxidado se unen a una enzima.
2. A continuación, se reduce el sustrato mientras simultáneamente se oxida la coenzima.
3. En el paso final, la coenzima y el producto reducido se separan de la enzima, la coenzima se recicla y se prepara para que el proceso comience de nuevo.[13, 26, 38]



Esquema 10. Mecanismo de reducción de cetonas catalizada por oxidorreductasas.[38]

Hay dos modelos estereoquímicos que permiten la transferencia del hidruro desde la coenzima, NAD(P)H, al sustrato. Como se muestra en el **esquema 11,** la enzima E1 promueve el ataque del hidruro a la cara *si* del grupo carbonilo y se genera el enantiómero (*R*). Mientras que con la enzima E2, los ataques de hidruro sobre la cara *re* da lugar a la formación del enantiómero (*S*).[25, 26]



Esquema 11. Estereoquímica de la transferencia de hidruro desde NAD(P)H al carbono carbonílico sobre el sustrato (R^1 es un grupo pequeño y R^2 es un grupo grande).

2.3.2.2.3 Factores que favorecen la reducción biocatalítica

Los biocatalizadores son sensibles a las condiciones de reacción empleadas, como por ejemplo:

I. Solución amortiguadora

Muchos procesos bioquímicos son sensibles incluso a pequeños cambios en las concentraciones de iones libres de protón (H^+); sabiendo que las enzimas son proteínas, cualquier cambio brusco de pH puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo, afectando las propiedades catalíticas de una enzima. Los H^+ además de alterar la estructura de la enzima pueden alterar la del sustrato. Por consiguiente, es necesario estabilizar la concentración de H^+ *in vitro* mediante la adición de un amortiguador adecuado, sin afectar el funcionamiento del sistema que se está investigando.[39-42]

Diferentes sustancias inorgánicas se han usado como amortiguadores, por ejemplo, fosfato, cacodilato, borato, bicarbonato, posteriormente se usaron también ácidos orgánicos débiles. En los últimos 30 años se han desarrollado una variedad de amortiguadores que son adecuados para sistemas biológicos. Algunos de los criterios para seleccionar estos amortiguadores son:[40-42]

- El pH de los amortiguadores utilizados en sistemas biológicos deben residir entre 6.0 y 8.0, ya que a pH más altos o más bajos pueden producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación.[40]
- Buena solubilidad en agua: El amortiguador debe ser soluble en agua, cuanto mayor sea la solubilidad en agua, más fácil será preparar soluciones madre concentradas.[38]
- Baja permeabilidad en la membrana: El amortiguador no debe ser capaz de permear las membranas biológicas para evitar su concentración en la célula u organelos. Por ejemplo, el Tris, que es una amina primaria, tiene un grado relativamente alto de solubilidad en grasas, por lo tanto puede permear las membranas. Esto también explica su toxicidad para cultivos de células de mamíferos.[40, 42]
- Bajo efecto iónico: El amortiguador no debe alterar la fuerza iónica del sistema en la

medida de lo posible, porque puede afectar la actividad catalítica de una enzima.[38]

- Estabilidad: no debe ser un sustrato enzimático o un inhibidor enzimático y no debe reaccionar con metabolitos u otros componentes, debe ser inerte.[40]
- Baja absorbancia de luz en las longitudes de onda visibles o ultravioletas: Los amortiguadores no deben absorber luz a longitudes de onda superiores a 230nm, ya que muchas investigaciones espectrofotométricas se realizan en este intervalo (determinación de las concentraciones de ADN, ARN y proteínas).[40, 42]
- Alta pureza: Los amortiguadores deben ser tan fáciles de preparar y purificar como sea posible. La pureza es extremadamente importante, ya que los contaminantes (por ejemplo, metales pesados) pueden interferir fácilmente con los sistemas biológicos sensibles.[40]
- No deben ser tóxicos hacia las células.[40]

II. Regeneración del cofactor

El proceso mediante el cual la coenzima se vuelve a reciclar a su forma reducida puede variar dependiendo de qué fuentes de hidrógeno están más fácilmente disponibles en la reacción. Algunos ejemplos comunes de fuentes de hidruros disponibles para reciclar la coenzima a través de la reducción son: alcoholes, azúcares, ácido fórmico, ciertos aminoácidos, y también fuentes de energía eléctrica y de luz.[13]

Debido al alto costo de los cofactores es necesario la presencia de un proceso de regeneración del cofactor. Algunos sistemas de reciclado comúnmente utilizados se representan en la **figura 3** y en el **esquema 12**, como cosubstrato se puede emplear formiato, glucosa, fosfato o alcoholes, los cuales se oxidan por la acción de una enzima y transfieren hidruros al cofactor oxidado, para regresar al ciclo de reducción.[25, 26]

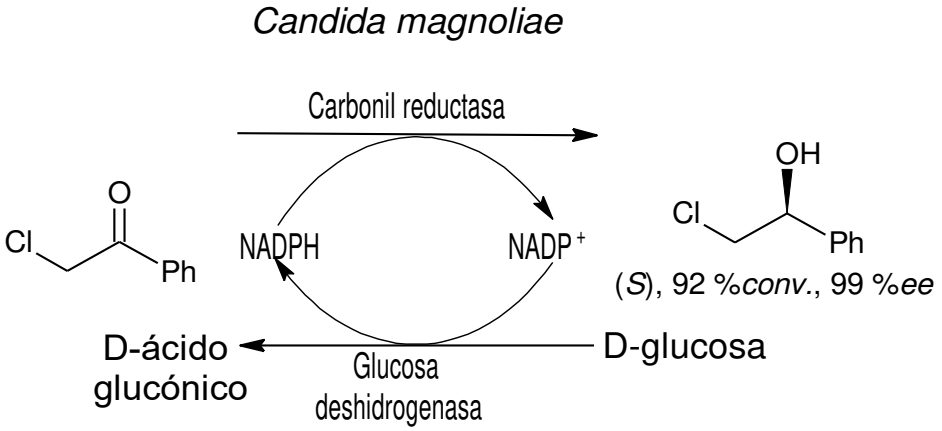
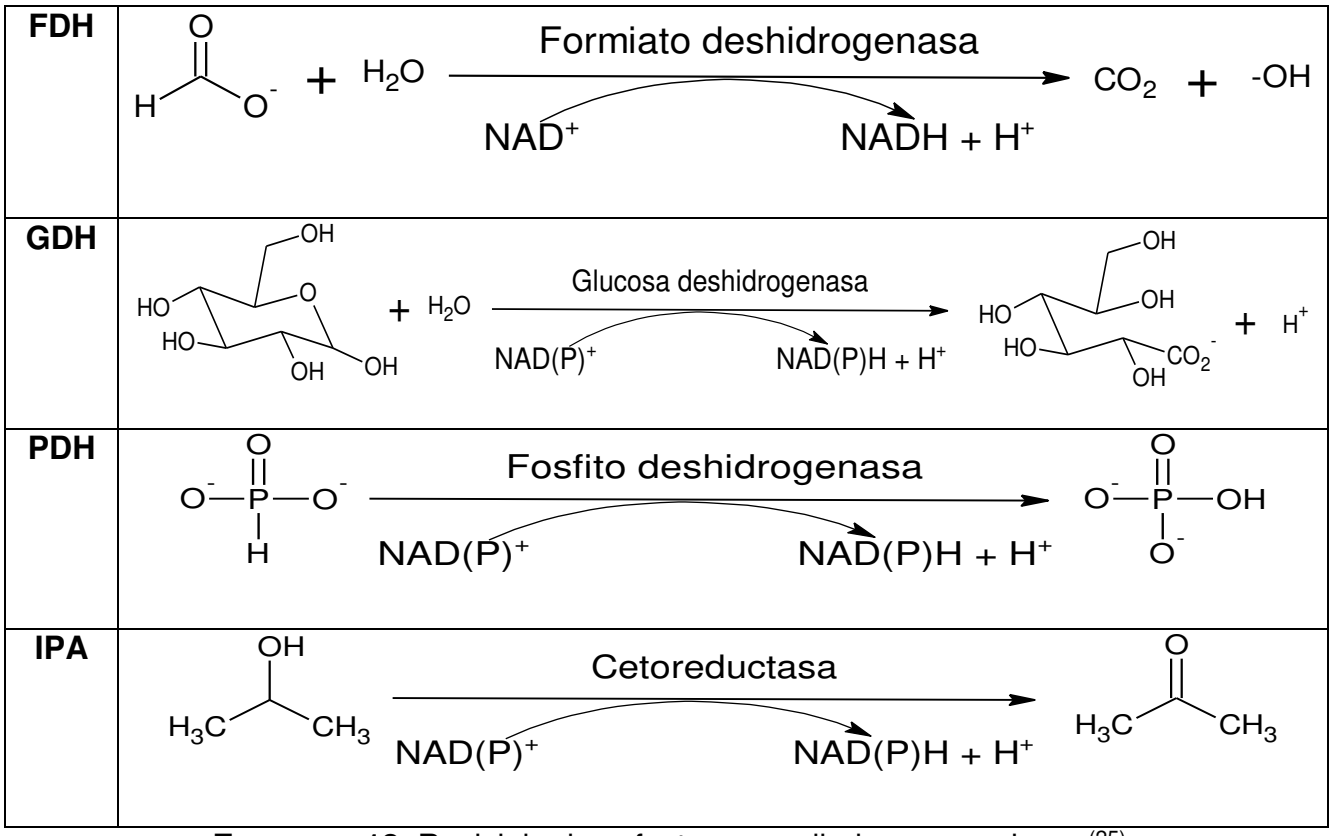


Figura 3. Ejemplo de regeneración de NADPH utilizando azúcar para la reducción de la cetona.[13]



Esquema 12. Reciclaje de cofactores mediados por enzimas.[25]

III. Temperatura

Un aumento en la temperatura provoca un aumento de la velocidad de reacción, aumentando el rendimiento en un cierto período de tiempo de reacción. En los procesos biocatalíticos la

temperatura de reacción es más baja que la utilizada en catálisis tradicional, debido a que las altas temperaturas desnaturalizan las enzimas. El rango de temperatura más utilizado en la catálisis enzimática está entre 35-50 °C.[43, 44]

IV. Naturaleza del sustrato

Las interacciones entre el centro activo de la enzima y el sustrato (E-S) se realizan a través de enlaces de naturaleza débil (ión-ión, ión-dipolo, dipolo-dipolo, enlace de hidrógeno, transferencia de carga, hidrófoba). Cuanto mayor sea el número de interacciones, mayor será la especificidad de la enzima y mayor su capacidad de discriminar entre dos sustratos estructuralmente próximos. La complementariedad entre el centro activo y el sustrato provoca tensiones sobre la molécula de sustrato favoreciendo formación o ruptura de enlaces lo que facilita su transformación en el producto.[45]

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La quiralidad es un factor importante en la actividad biológica. Se sabe que muchos fármacos quirales se administran como racematos, pero en numerosos estudios se ha determinado que cada uno de los enantiómeros puede diferir en su farmacocinética y farmacodinamia. Por lo anterior, es de gran importancia el desarrollo de nuevos procesos para la obtención de moléculas enantiopuras, la biocatálisis plantea ventajas ante los métodos convencionales como la regio-, quimio- y estereoselectividad. En consecuencia es importante el estudio de nuevas fuentes de biocatalizadores de origen vegetal, para llevar a cabo reacciones de reducción de cetonas aromáticas y heteroaromáticas para obtener alcoholes enantiopuros de interés en la industria farmacéutica.

4. HIPÓTESIS

Las oxidorreductasas presentes en los extractos acuosos de las semillas de chícharo, haba, alberjón, frijol ayocote y alubia, serán capaces de llevar a cabo la reducción enantioselectiva de 2-acetilpiridina (***1a***), 3-acetilpiridina (***1b***), 4-acetilpiridina (***1c***), 3-cloropropiofenona (***1d***) y 3-clorobenzoilacetonitrilo (***1e***), para obtener los correspondientes alcoholes enantioméricamente puros.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Llevar a cabo la reducción enantioselectiva de 2-acetilpiridina (***1a***), 3-acetilpiridina (***1b***), 4-acetilpiridina (***1c***), 3-cloropropiofenona (***1d***) y 3-clorobenzoilacetonitrilo (***1e***) a los alcoholes correspondientes (***2a***-***2e***), utilizando como fuente de oxidorreductasas las semillas de chícharo, haba, alberjón, frijol ayocote y alubia.

5.2. Objetivos particulares

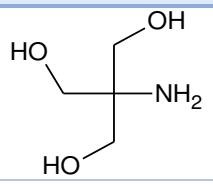
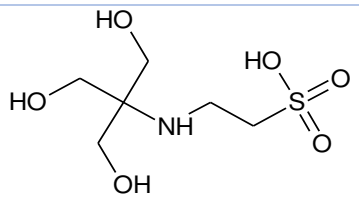
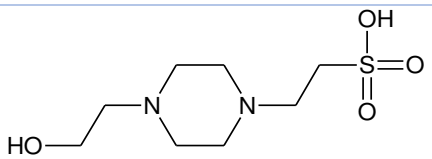
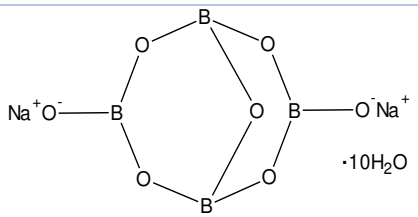
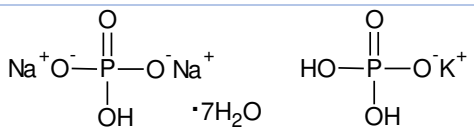
- Reducción química de cetonas para la obtención de sus respectivos alcoholes, para utilizarlas como materia prima de referencia.
- Implementar técnicas analíticas para identificar y cuantificar las materias primas y los productos de reacción.
- Implementar métodos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), para determinar el exceso enantiomérico (*ee*) de los productos.
- Investigar las condiciones óptimas de reacción para las diferentes fuentes del biocatalizador, variando pH, temperatura y codisolvente.
- Estudiar y correlacionar el efecto de la estructura química de cetonas con la actividad biocatalítica de las enzimas presentes en las semillas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Reactivos químicos

2-acertilpiridina (***1a***), 3-acetilpiridina (***1b***), 4-acetilpiridina (***1c***), 3-cloropropiofenona (***1d***), 3-clorobenzoilacetonitrilo (***1e***), acetofenona (***1f***), tris(hidroximetil)aminometano (Tris-base), ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico (TES), ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), borato de sodio decahidratado, fosfato de sodio dibásico heptahidratado, fosfato de potasio monobásico, borohidruro de sodio fueron adquiridos de Sigma-Aldrich; el ácido bórico, bicarbonato de sodio y el carbón activado fueron de J. T. Baker; el sulfato de sodio anhidro, acetato de etilo (grado industrial), isopropanol, cloroformo y diclorometano (ambos grado CLAR) se obtuvieron de Tecsiquim, el hexano (grado CLAR) de Burdick & Jackson.

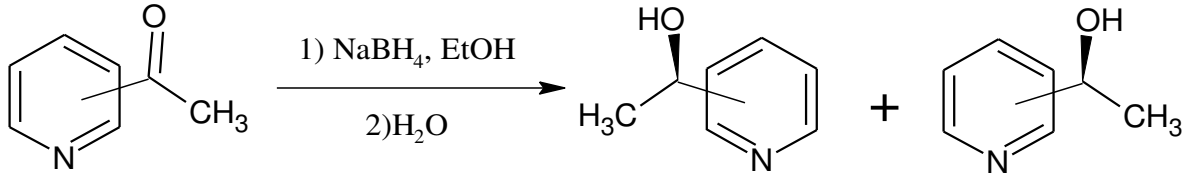
Tabla 2. Estructura y rango de pH de los amortiguadores utilizados.

Amortiguador	Estructura	Rango de pH	Peso Molecular (g/mol)
Tris-base		7.0-9.0	121.14
TES		6.8-8.2	229.25
HEPES		6.8 - 8.2	238.30
Boratos		7.4-9.2	381.42
Fosfatos		5.8-8.0	268.07 136.08

6.2. Reducción química de cetonas

6.2.1. Reducción con borohidruro de sodio en solución

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 2 mmol (250 mg) de ***1a***, ***1b*** o ***1c*** se disolvieron en 5 mL de etanol al 95 %, posteriormente se agregaron 2 mmol (78 mg) de borohidruro de sodio y se agitó; la reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina (CCF), cuando ya no se observó la cetona se agregaron 10 mL de agua destilada fría y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 3 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó en un rotavapor. Las cetonas y los alcoholes se analizaron por IR, RMN, CG y CLAR quiral.[46]

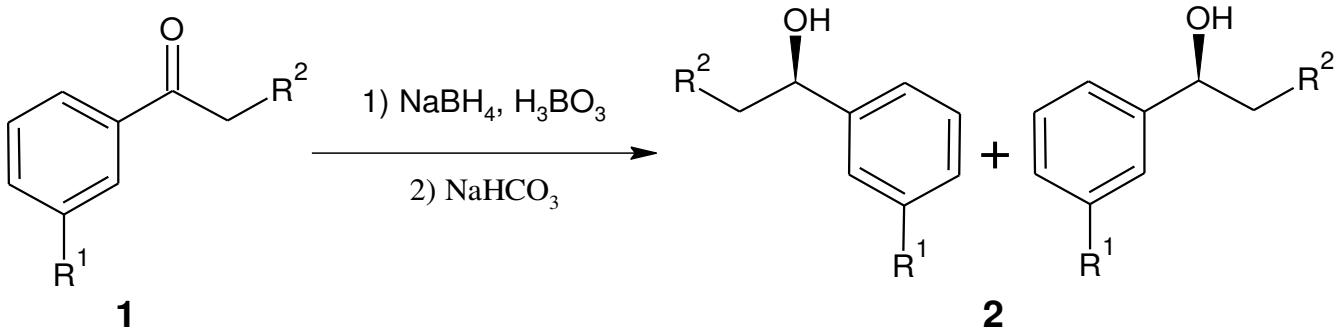


1 **2**

Esquema 13. Reducción de ***1a***, ***1b*** y ***1c*** a los alcoholes respectivos, usando borohidruro de sodio en etanol.

6.2.2. Reducción con borohidruro de sodio sin disolvente

Se colocaron 1.4 mmol (250 mg) de las cetonas ***1d*** o ***1e*** en un mortero, 1.4 mmol (53 mg) de borohidruro de sodio y 1.4 mmol (87 mg) de ácido bórico y se molió durante dos horas aproximadamente, la reacción se monitoreó por CCF, cuando ya no se observó la cetona se agregaron 5 mL de una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 3 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó en un rotavapor. Las cetonas y los alcoholes se analizaron por IR, RMN, CG y CLAR quiral.[47]



	R^1	R^2
(***1d***)	H	CH_2Cl
(***1e***)	Cl	CN

Esquema 14. Reducción de ***1d*** y ***1e*** a los alcoholes respectivos, usando borohidruro de sodio activado con ácido bórico, sin disolvente.

6.3. Material vegetal

Como fuente de oxidoreductasa se usaron las semillas de la **tabla 3**.

Tabla 3. Taxonomía de las semillas.

Semilla	**Taxonomía**		
	Familia	**Género**	**Especie**
Chícharo	*Fabaceae*	*Pisum*	*Sativum L.*
Haba	*Fabaceae*	*Vicia*	*Faba L.*
Alberjón	*Fabaceae*	*Pisum*	*Sativum L.*
Frijol ayocote	*Fabaceae*	*Phaseolus*	*Coccineus L.*
Alubia	*Fabaceae*	*Phaseolus*	*Vulgaris L.*
Frijol negro	*Fabaceae*	*Phaseolus*	*Vulgaris L.*
Frijol pinto	*Fabaceae*	*Phaseolus*	*Vulgaris L.*
Frijol bayo	*Fabaceae*	*Phaseolus*	*Leptostachyus*
Frijol flor de mayo	*Fabaceae*	*Phaseolus*	*Vulgaris L.*
Frijol cacahuate	*Fabaceae*	*Phaseolus*	*Vulgaris L.*

6.4. Reducción biocatalítica

6.4.1. Preparación de la fuente del biocatalizador

Las semillas (chícharo, haba, alubia, frijol ayocote, alberjón, frijol negro, frijol pinto, frijol bayo, frijol flor de mayo y frijol cacahuate) se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 10min, se lavaron con agua destilada y dejaron secar, posteriormente se molieron con un molino para café Hamilton Beach 80374. Se mezcló la harina con solución amortiguadora (1:3 P/P) se agitó magnéticamente durante 1 h, se centrifugó y el sobrenadante se utilizó como fuente de biocatalizador.

6.4.2. Biorreducción

A 1 mL de la fuente de biocatalizador se le agregaron 1.8×10^{-5} moles de cetona (***1a***-***1e***) disuelta en 2.5 μL de isopropanol, la mezcla de reacción se agitó magnéticamente a 35 °C en una incubadora Enviro-Genie, después de 24 horas se extrajo con acetato de etilo (1:1 V/V), se centrifugó, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó a sequedad y se redisolvió con isopropanol. El *%conv* se determinó por CG y el exceso enantiomérico por CLAR quiral. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado.

6.5. Optimización de la reacción de biorreducción

Se modificaron las siguientes variables hasta obtener las mejores condiciones de reacción para la reducción de ***1a*** a su correspondiente alcohol (***2a***). Se utilizó la harina de semilla de alberjón como modelo. La reacción se llevó a cabo con la metodología indicada en 6.4.2.

6.5.1. Influencia del pH

La harina de las semillas de alberjón se agitaron magnéticamente durante 1 h con dos diferentes soluciones amortiguadoras, una de fosfatos y otra de Tris-HCl, 0.1 M, con valores de pH 7.6 y 8.1, la mezcla se centrifugó y se ajustó el pH a 7.0 y 7.6 respectivamente con NaOH 0.1 M, el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima.

6.5.2. Tipo de solución amortiguadora y semillas

Se utilizaron las harinas de las semillas de haba, alberjón, frijol ayocote y alubia. Se preparan soluciones amortiguadoras de TES, Tris-HCl, HEPES y boratos 0.1 M y pH 8.1.

6.5.3. Concentración de la solución amortiguadora

*S*e utilizaron las harinas de las semillas de haba, alberjón, frijol ayocote y alubia. El amortiguador HEPES se prepara a concentraciones de 0.1 y 0.2 M, a pH 8.1.

6.5.4. Cantidad de isopropanol

Se disolvieron 1.8×10^{-5} moles de ***1a*** en diferentes cantidades de isopropanol, 0.25 % (2.5 μL), 1 % (10 μL), 5 % (50 μL), y 10 % (100 μL) x 1 mL de extracto.

6.5.5. Temperatura

Las biorreducciones se incubaron a diferentes temperaturas 35, 40 y 45 °C, tomando en cuenta las mejores condiciones de pH y cantidad de codisolvente para cada semilla.

6.6. Desarrollo de los métodos analíticos

6.6.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

Se usaron cromatoplacas de TLC sílica gel 60 F_{254}, Merck, los eluyentes utilizados fueron mezclas de hexano: acetato de etilo, dependiendo de la cetona. El revelado se realizó con luz UV-Vis y en algunos casos con vapores de yodo.

6.6.2. Espectroscopia de infrarrojo (IR)

Los espectros de infrarrojo se realizaron empleando un espectrofotómetro PERKIN-ELMER Paragon 1600 FT-IR. Las muestras se disuelven en cloroformo ($CHCl_3$), colocando una o dos

gotas de la mezcla en la celda de muestras líquidas.

6.6.3. Espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN)

Se utilizó un espectrómetro Agilent 600 DD2 con OneNMR Probe operado a 600 MHz para hidrógeno (^{1}H) y a 151 MHz para carbono (^{13}C). Se utilizó cloroformo deuterado ($CDCl_3$) como disolvente y tetrametilsilano como referencia interna.

6.6.4. Cromatografía de gases (CG)

El *%conv* de las reacciones de reducción se determinó por medio de CG, se usó un cromatógrafo HP 6890, equipado con una columna PTE-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) de Agilent Technologies y N_2 como gas acarreador, temperatura del inyector y del detector a 250 °C, la temperatura del horno y la velocidad de flujo dependen de cada cetona.

6.6.5. Cromatografía de líquidos de alta resolución quiral (CLAR)

El análisis del *%ee* se realizó por medio de CLAR en un cromatógrafo de Líquidos Agilent Serie 1200, utilizando las columnas quirales OD (0.46 cm x 25 cm), OJ-H (0.46 cm x 25 cm) y OB-H (0.46 cm x 25 cm) las tres de Daicel Chiralcel, el flujo así como la mezcla de eluyentes utilizado dependen de cada cetona.

6.7. Evaluación de la rotación óptica

Los alcoholes ***2a***-***2e*** se disolvieron en 1 mL de cloroformo, se pasó a una celda para polarímetro de 1 mL, 1 dm de longitud; posteriormente se leyó en el polarímetro Perkin Elmer modelo 341, equipado con una lámpara de Na (589 nm longitud de onda) a 20 °C.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Reducción química de cetonas

Debido a que no se contaba con los alcoholes correspondientes de cada cetona ***1a***, ***1b***, ***1c***, ***1d*** y ***1e***, estos se obtuvieron por reducción química utilizando la metodología de Kim *et al* [46] con el fin de ser utilizados como estándares para desarrollar los métodos de analíticos. Para ***1a***, ***1b*** y ***1c*** se obtuvieron rendimientos mayores al 80 %, sin embargo, para ***1d*** y ***1e*** los rendimientos fueron menores al 30 % por lo que se empleó la metodología propuesta por Tae *et al* [47], el cual consistió en utilizar ácido bórico para activar la reacción y con ello mejor el rendimiento de la reacción.

7.2. Desarrollo de los métodos analíticos

7.2.1. IR

Las cetonas y los alcoholes se identificaron por IR, los espectros de las cetonas ***1a***-***1e*** se encuentran en los **anexos 1**, **3**, **5**, **7** y **9** respectivamente. En todos los espectros se observó la señal correspondiente al carbonilo (ϕ-CH=O) de la cetona como señal más característica. Como ejemplo, en la **figura 4** se muestra el espectro de la cetona ***1a***.

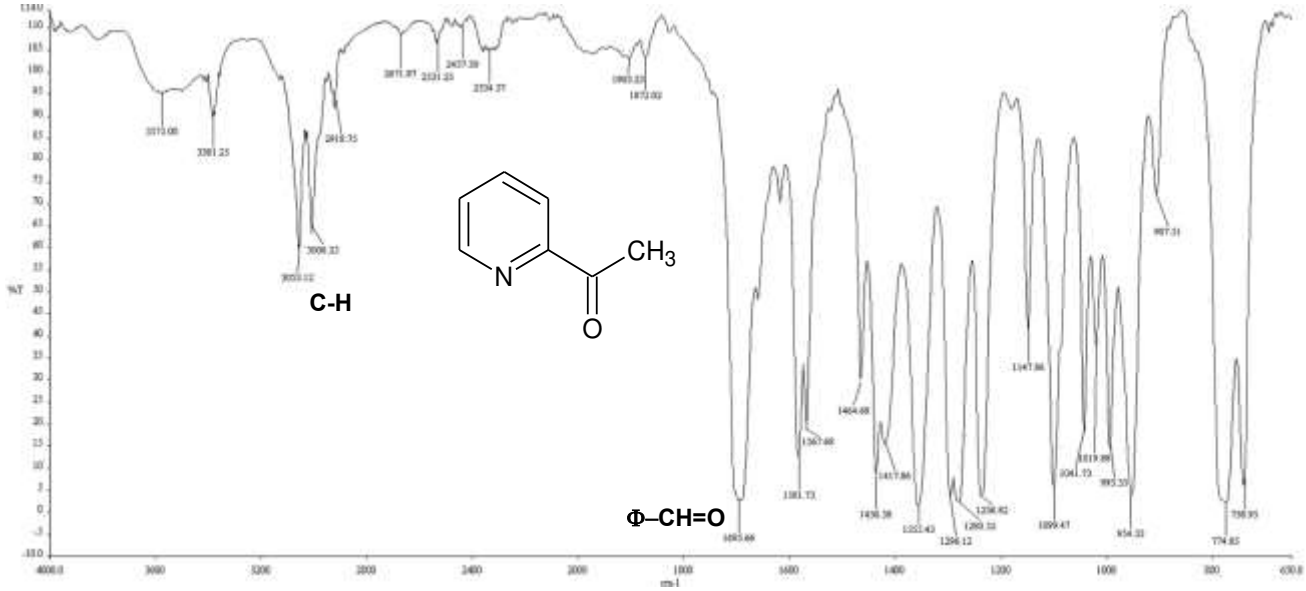


Figura 4. Espectro de IR ($CHCl_3$) de ***1a***. Se observan las señales de estiramiento del enlace ϕ-C-H a 3053 y 3006 cm^{-1} y del grupo carbonilo de cetona (ϕ-CH=O) a 1695 cm^{-1}.

Los espectros de los alcoholes ***2a*** (**Anexo 2**), ***2b*** (**Anexo 4**) y ***2c*** (**Anexo 6**) se compararon con los reportados por Lakshmi *et al* [48], el del alcohol ***2d*** (**Anexo 8**) se comparó con lo reportado por Zhou *et al* [20] y el del alcohol ***2e*** (**Anexo 10**) se comparó con lo reportado por Kamal *et al* [17], en donde se observa que los compuestos obtenidos si corresponden con lo reportado en la literatura, presentando como señal más característica el O-H del alcohol. Como ejemplo, en la **figura 5** se muestra el espectro del alcohol ***2a***.

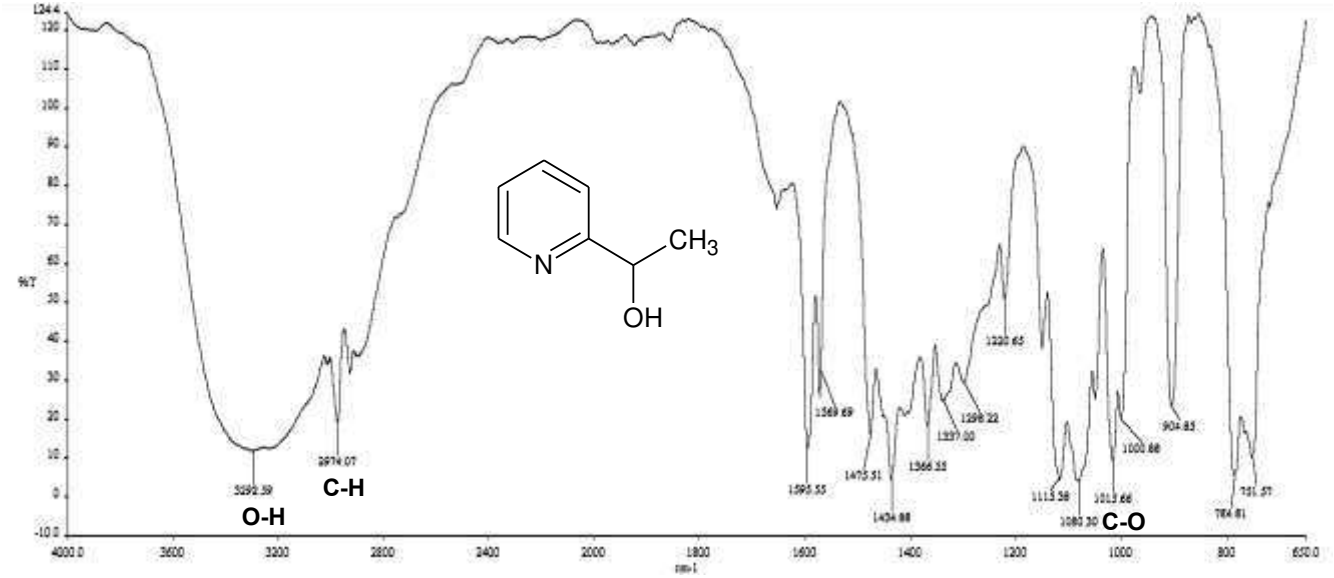


Figura 5. Espectro de IR ($CHCl_3$) de ***2a***. Se observa la señal que corresponde al enlace O-H a 3292 cm^{-1}, C-H a 2974 cm^{-1} y del enlace C-O a 1015 cm^{-1}.

7.2.2 RMN

Las cetonas y los alcoholes se identificaron por ^{1}H-RMN, los espectros de las cetonas (***1a***-***1e***) se encuentran en los **anexos 11**, **13**, **15**, **17** y **19** respectivamente. Los alcoholes ***2a*** (**Anexo 12**), ***2b*** (**Anexo 14**) y ***2c*** (**Anexo 16**) se compararon con los reportados por Pal *et al* [16], Lakshmi *et al* [48] y Aldabalde *et al* [49], el del alcohol ***2d*** (**Anexo 18**) se comparó con lo reportado por Zhou *et al* [20] y el del alcohol ***2e*** (**Anexo 20**) se comparó con lo reportado por Kamal *et al* [17], en donde se observa que los compuestos obtenidos si corresponden con lo reportado en la literatura, presentando como señales más características: el -CH acoplado a $-CH_3$ generando un cuarteto (q) a 4.8 ppm y el del -OH no acoplado generando un singulete (s) a 4.5 ppm. En la **figura 6** y **7** se muestra el espectro de ^{1}H-RMN de la cetona ***1a*** y su respectivo alcohol ***2a***.

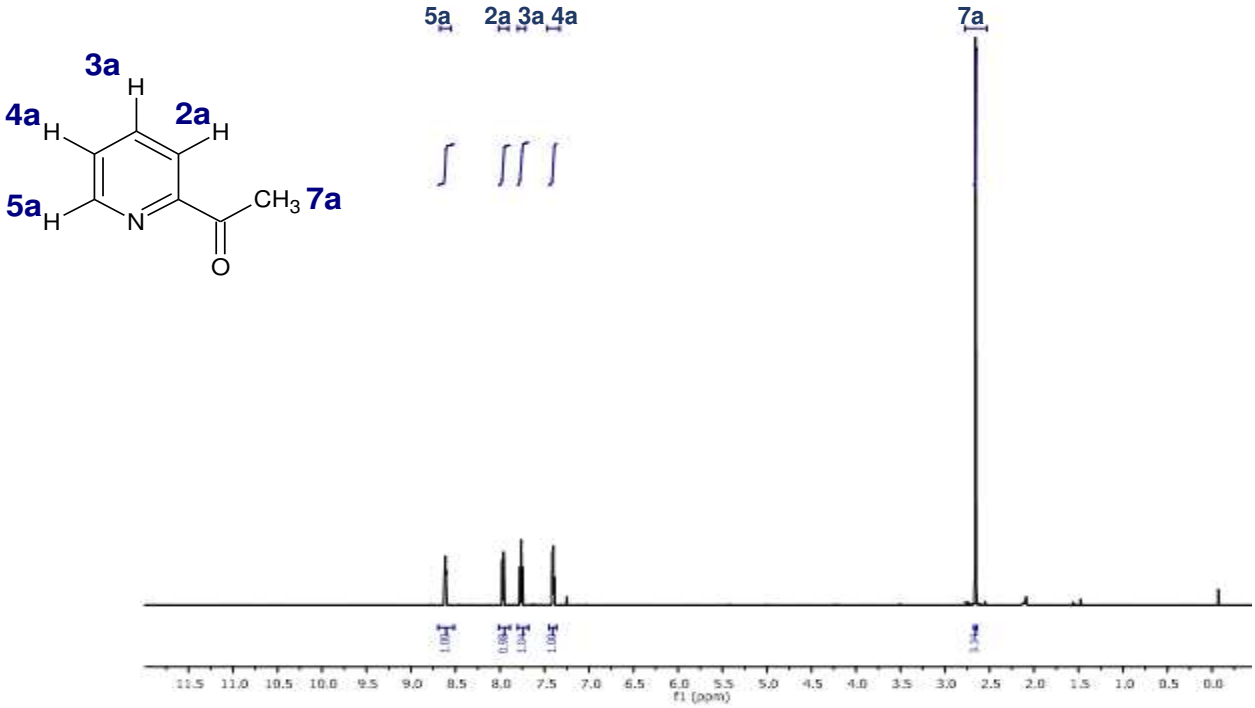


Figura 6. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de ***1a***. δ 8.6 (dd, J=5.8, 1.4 Hz, 1H), 7.9 (dd, J=9.0, 1.2 Hz, 1H), 7.7 (td, J=7.7, 1.4 Hz, 1H), 7.4–7.3 (m, 1H), 2.6 (s, J=4.2 Hz, 3H).

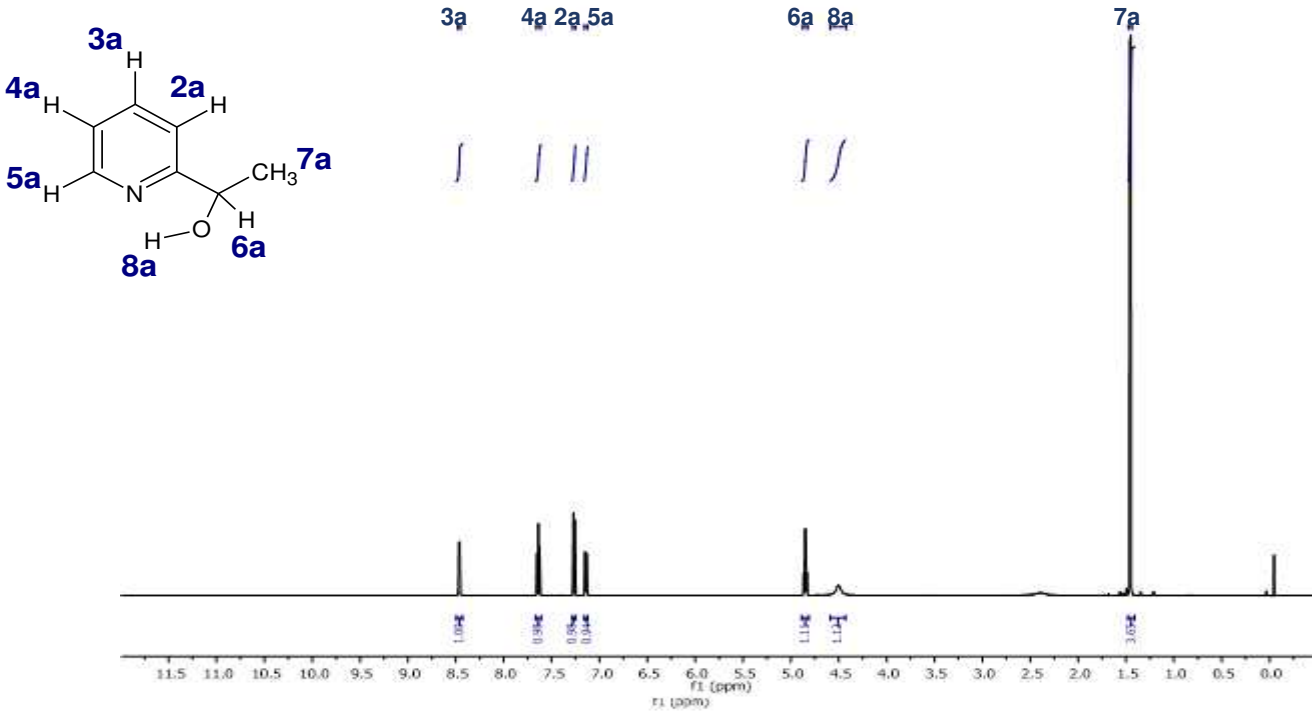


Figura 7. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de ***2a***. δ 8.4 (d, J=4.9 Hz, 1H), 7.6 (td, J=7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.2 (dd, J=7.9, 0.5 Hz, 1H), 7.1–7.1 (m, 1H), 4.8 (q, J=6.6 Hz, 1H), 4.5 (s, 1H), 1.4 (d, J=6.6 Hz, 3H).

Las cetonas y los alcoholes se identificaron por ^{13}C-RMN, los espectros de las cetonas ***1a-1e*** se encuentran en los **anexos 21**, **23**, **25**, **27** y **29** respectivamente. Los alcoholes ***2a*** (**Anexo 22**), ***2b*** (**Anexo 24**) y ***2c*** (**Anexo 26**) se compararon con los reportados por Pal *et al* [16], Lakshmi *et al* [48] y Aldabalde *et al* [49], el de los alcoholes ***2d*** (**Anexo 28**) y ***2e*** (**Anexo 30**) se compararon simulando el espectro en MestReNova, en donde se observa que los compuestos obtenidos si corresponden con lo reportado en la literatura, presentando como señal más característica el ^{13}C unido al –OH a 68.97 ppm. En la **figura 8** y **9** se muestra el espectro de ^{13}C-RMN de la cetona ***1a*** y su respectivo alcohol ***2a***.

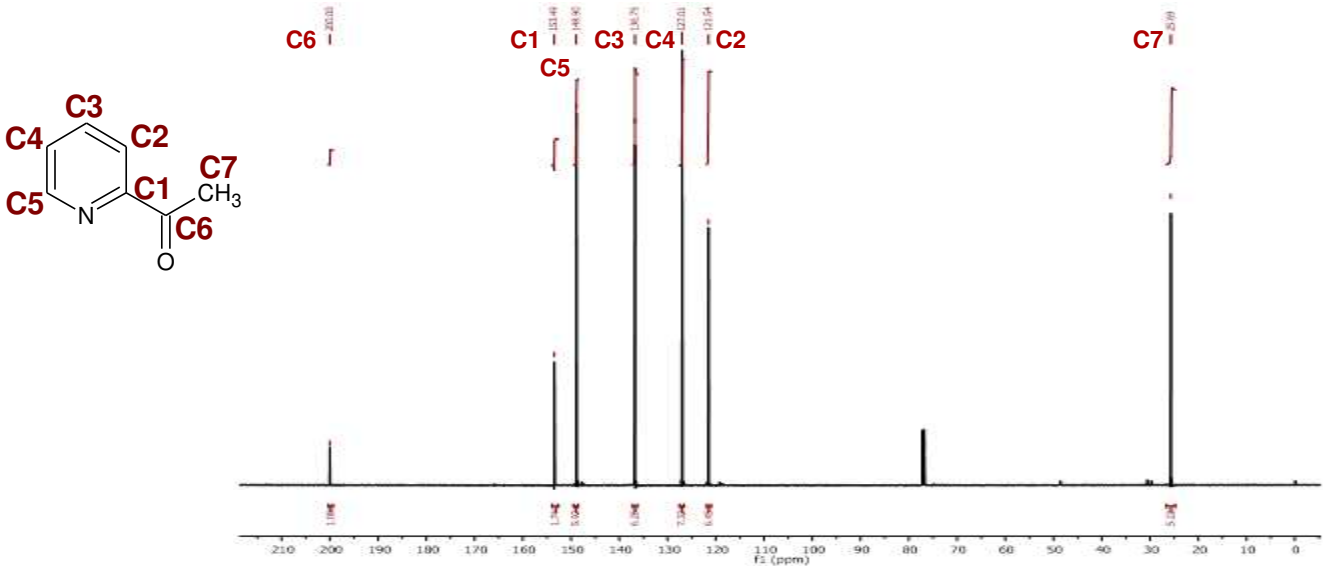


Figura 8. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de ***1a***. δ 200.00, 153.49, 148.90, 136.75, 127.01, 121.54, 25.69.

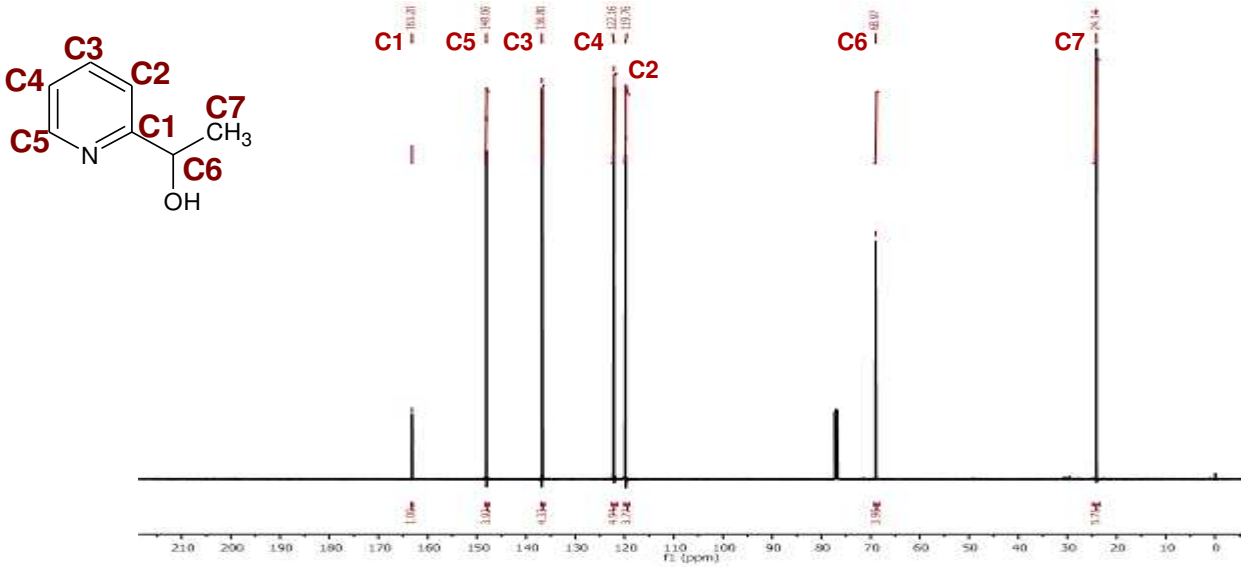


Figura 9. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de ***2a***. δ 163.20, 148.06, 136.80, 122.16, 119.76, 68.97, 24.14.

7.2.3. CG

Las cetonas ***1a***-***1e*** y los alcoholes ***2a***-***2e*** se analizaron por CG, el objetivo fue la separación de la cetona y su respectivo alcohol para determinar % de conversión, los cromatogramas correspondientes se encuentran en los **anexos 31**-**35**. En la **figura 10** se muestra el cromatograma de la cetona ***1a*** y su respectivo alcohol ***2a***. En la **tabla 4** se muestran las condiciones para el análisis de cada par de cetona-alcohol, con la finalidad de obtener la mejor separación de los picos, así como reducir los t_R, permitiendo una mejor identificación y seguimiento de la reacción.

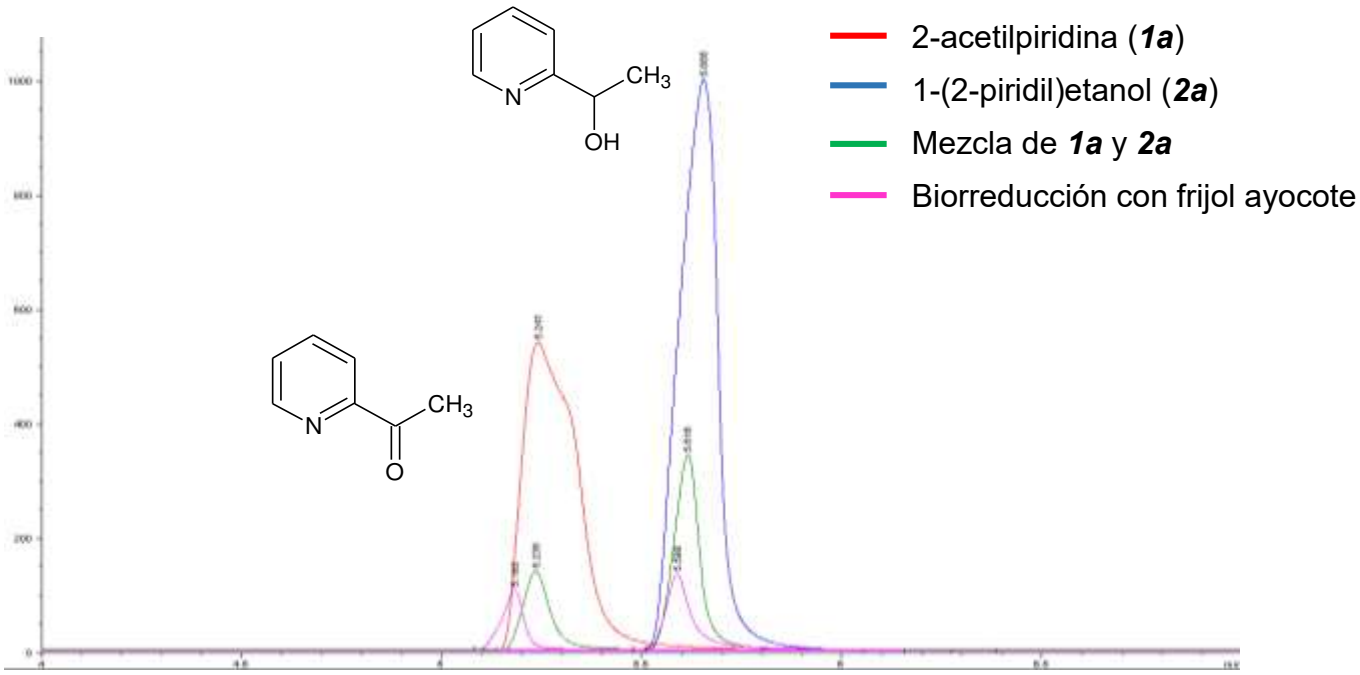


Figura 10. Cromatograma de gases de la cetona ***1a*** línea roja, alcohol ***2a*** línea azul, la mezcla de ambos (***1a*** y ***2a***) línea verde y un ejemplo de biorreducción con frijol ayocote, línea rosa.

Tabla 4. Condiciones para el análisis de las cetonas ***1a***-***1e*** y sus respectivos alcoholes (***2a***-***2e***) por CG.

Cetona	t_R* (min)	Alcohol	t_R* (min)	Temperatura (°C)	Flujo (mL/min)
1a	5.23	***2a***	5.61	140	0.6
1b	5.07	***2b***	5.81	140	0.7
1c	5.02	***2c***	6.04	140	0.7
1d	2.85	***2d***	4.19	180	0.8
1e	7.25	***2e***	8.48	180	0.8

*t_R: Tiempo de retención.

7.2.4. CLAR quiral

Las cetonas ***1a***-***1e*** y los alcoholes ***2a***-***2e*** se analizaron por HPLC quiral, el objetivo fue la separación de los enantiómeros de los alcoholes y determinar el % de exceso enantiomérico (*%ee*), los espectros se encuentran en los **anexos 36**-**40**. En la **figura 11** se muestra el cromatograma de la cetona ***1a*** y sus respectivos alcoholes (*R*) y (*S*)-***2a***, para el análisis se utilizó la columna quiral OD, por comparación con los t_R de Mohammadi *et al* [50] así como de la rotación óptica, el cual se presenta en el apartado 7.10.; se ha determinado que el enantiómero (*R*)-***2a*** presenta menor t_R que el (*S*).

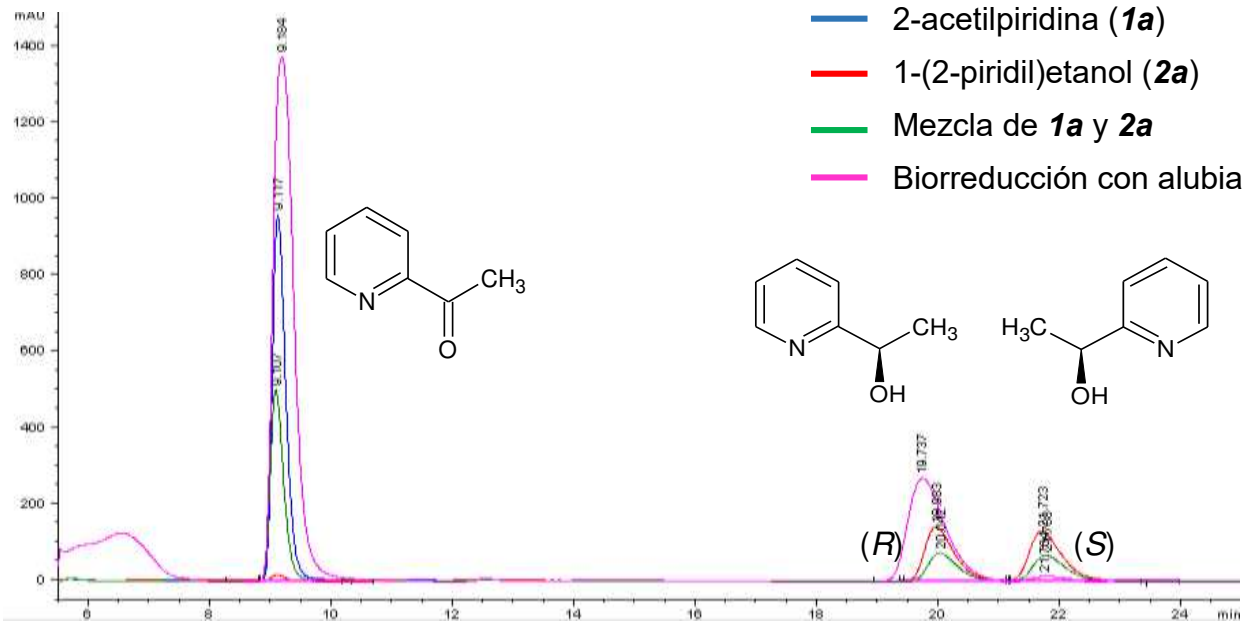


Figura 11. Cromatograma obtenido por CLAR quiral de la cetona ***1a*** línea azul, al alcohol ***2a*** línea roja, la mezcla de ambos (***1a*** y ***2a***) línea verde y un ejemplo de biorreducción con alubia, línea rosa.

Diversos autores como Pal *et al* [16], Akakabe *et al* [51] y Uwai *et al* [52], han analizado los alcoholes ***2b*** y ***2c*** por cromatografía quiral, utilizando las columnas quirales OB, OB-H y OJ-H, todos ellos han coincidido en que el anantiómero "*S*" de los dos alcoholes presenta menor tiempo de retención que el "*R*", por lo que por comparación con los t_R así como de la rotación óptica (presentado en el apartado 7.10.) se determinó la configuración de los alcoholes que se obtuvieron por biorreducción. En la **tabla 5** se muestran las condiciones para el análisis de cada par de cetona-alcohol.

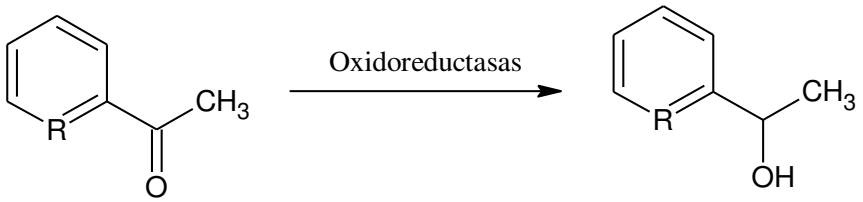
Tabla 5. Condiciones para el análisis de las diferentes cetonas ***1a***-***1e*** y sus respectivos alcoholes (***2a***-***2e***) por CLAR quiral.

Cetona	t_R*(min)	Alcohol	t_R*(min)	Columna	Eluyente**	Flujo (mL/min)
1a	9.10	(*R*/*S*)-***2a***	20.04/21.78	OD	97:03	0.7
1b	14.31	(*S*/*R*)-***2b***	9.38/11.73	OJ-H	90:10	0.7
1c	21.13	(*S*/*R*)-***2c***	13.20/17.38	OB-H	90:10	0.7
1d	19.03	***2d***	24.33[a]/27.24[a]	OJ-H	97:03	0.7
1e	38.80	***2e***	16.80[a]/19.86[a]	OJ-H	88:12	1.0

*t_R: Tiempo de retención. **Hexano: isopropanol. [a]:no se conoce la configuración.

7.3. Comparación de la biorreducción de acetofenona (***1f***) y 2-acetilpiridina (***1a***)

En las pruebas previas realizadas en el laboratorio de biotransformaciones de la UAM-Xochimilco, se llevó a cabo el estudio de la reducción biocatalizada de diez cetonas aromáticas para evaluar la actividad reductasa de diez semillas (chícharo, haba, alberjón, frijol ayocote y alubia, frijol flor de mayo, frijol bayo, frijol negro, frijol cacahuate, frijol pinto).[53] Debido a la importancia, como precursores de compuestos con actividad, de los alcoholes ***2a***, ***2b*** y ***2c***, se utilizaron las semillas mencionadas para evaluar su capacidad para reducir cetonas heterocíclicas y obtener los alcoholes señalados en forma enantiopura. Se comparó la actividad reductasa de las semillas mencionadas usando como sustratos acetofenona (***1f***) y la cetona heterocíclica 2-acetilpiridina (***1a***), los resultados se observan en la **tabla 6**.



	R	
Acetofenona (***1f***)	CH	1-feniletanol (***2f***)
2-acetilpiridina (***1a***)	N	1-(2-piridil)etanol (***2a***)

Esquema 15. Reducción biocatalizada de las cetonas ***1f*** y ***1a*** a sus respectivos alcoholes ***2f*** y ***2a***.

En general, el *%conv* de ***1f*** a su correspondiente alcohol ***2f*** es mayor que la de ***1a*** (**Tabla 6**) con las semillas de chícharo, alubia, alberjón, frijol negro, frijol pinto, frijol bayo, frijol flor de mayo, frijol cacahuate; pero los *%ee* de ***2a*** son mayores que los de ***2f*** con alubia, frijol negro,

frijol pinto, frijol bayo, frijol flor de mayo, frijol cacahuate. Probablemente el nitrógeno en el anillo heteroaromático afecta la actividad reductora de las fuentes de reductasa.[16] Cabe mencionar que con las semillas de chícharo, alberjón y haba se obtiene principalmente el enantiómero (*S*) de ***2a*** y ***2f*** (**Figura 12**), mientras que con alubia, frijol ayocote, frijol negro, frijol pinto, frijol bayo, frijol flor de mayo y frijol cacahuate se obtiene principalmente el otro enantiómero (**Figura 13**). Para las demás pruebas se seleccionaron las semillas de alubia y alberjón al presentar buenos *%conv*, aunque con haba y frijol ayocote se obtuvieron bajos *%conv* también se seleccionaron para las demás pruebas ya que con ellos se obtuvieron mayores *%ee* de ***2a***.

Tabla 6. Comparación de la reducción de ***1a*** y ***1f***, solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.6).

Semillas	***2a***		***2f***	
	% conv	***%ee***	***%conv***	***%ee***
Chícharo	27	33	44	43
Alubia	24	76	33	38
Alberjón	24	42	26	71
Haba	12	62	5	100
Frijol ayocote	10	98	10	98
Frijol negro	10	100	17	39
Frijol pinto	10	77	25	48
Frijol bayo	8	100	25	53
Frijol flor de mayo	8	77	22	39
Frijol cacahuate	7	92	22	39

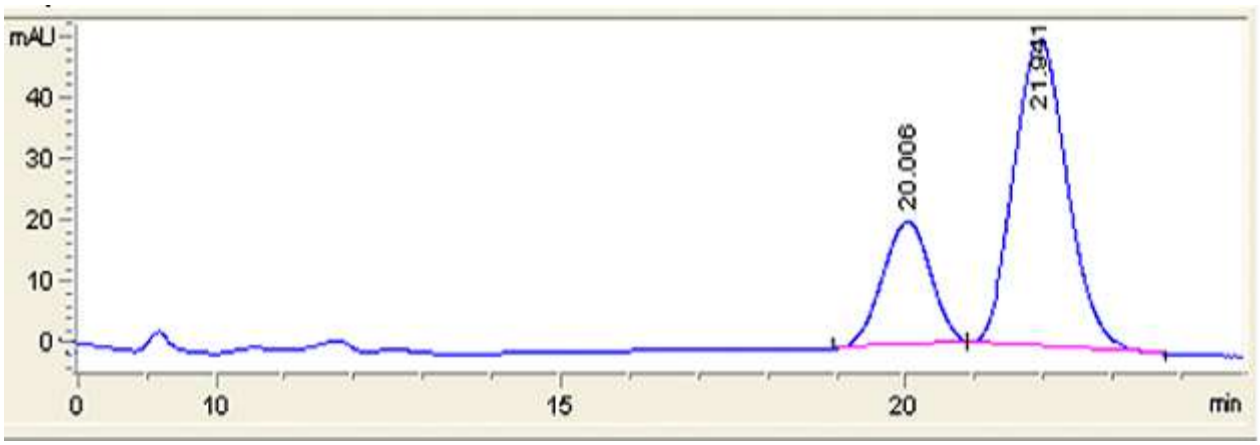


Figura 12. Cromatograma obtenido por CLAR de la biorreducción de ***1a*** al alcohol ***2a*** con alberjón.

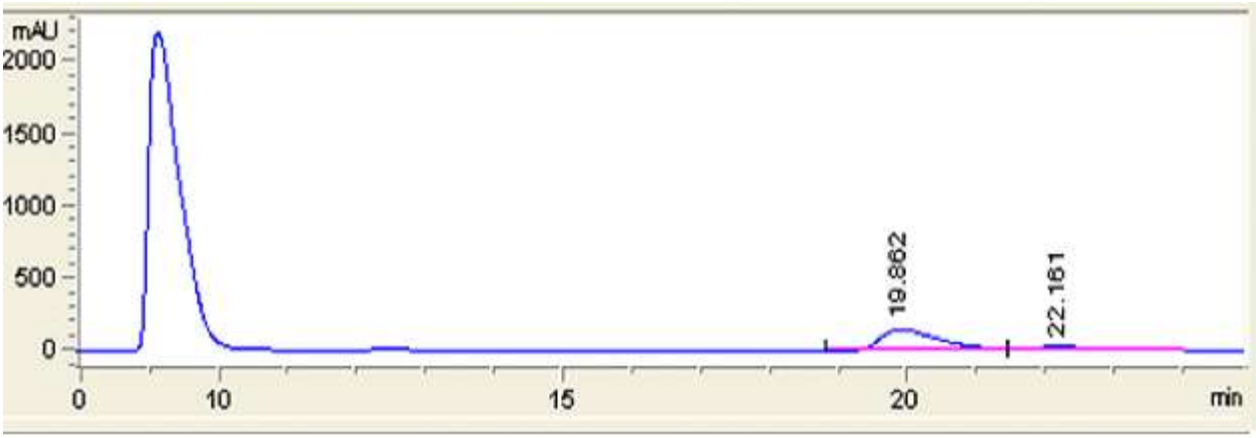


Figura 13. Cromatograma obtenido por CLAR de la biorreducción de ***1a*** al alcohol ***2a*** con frijol ayocote.

7.4. Biorreducción de ***1a*** usando alberjón en soluciones amortiguadoras de Tris-HCl y fosfatos, 0.1 M, a pH 7.6 y 8.1

Debido a que la conversión de ***2a*** fue baja y para aumentar su pureza óptica, se evaluó la influencia del pH y tipo de amortiguador sobre la conv y el %ee, se seleccionó a la semilla de alberjón como modelo. La reducción de ***1a*** se llevó acabo con soluciones amortiguadoras de fosfatos y tris-HCl, a pH de 7.6 y 8.1, a 35 °C, durante 24 h. El pH tiene una influencia importante sobre la reacción enzimática, si el pH es demasiado alto o demasiado bajo, puede alterar el estado de ionización o dañar la enzima.

El extracto acuoso de la semilla de alberjón, se preparó mezclando la solución amortiguadora correspodiente y el polvo de dicha semilla, se agitó y centrifugó, se observó que el pH del sobrenadante disminuyó (**Tabla 7**). El pH de los extractos **3** y **4** se ajustó a 7.0, mientras que el de los extractos **7** y **8** se ajustó a 7.6 con NaOH 0.1 M, no se ajustó al pH original para evitar la adición excesiva de base y afectar la estabilidad de la enzima. El pH de los extractos **1**, **2**, **5** y **6** no se ajustó. En la **tabla 7** se observa que la conversión aumentó cuando se ajustó el pH, sin embargo, el *%ee* disminuyó; probablemente el exceso de sales en el medio de reacción afectaron la enantioselectividad de la enzima. Los mejores resultados se obtuvieron con Tris-HCl, a un pH inicial de 8.1, sin ajuste de pH (**Tabla 7**, reacción **5**), por lo que las siguientes reacciones se realizaron a pH 8.1, sin ajustar.

Tabla 7. *%conv* y *%ee* de ***2a***, obtenido usando semillas de alberjón en soluciones amortiguadoras de Tris-HCl y fosfatos, 0.1 M, pH 7.6 y 8.1.

Reacción	Solución amortiguadora	pH			*%conv 2a*	*%ee 2a*
		Solución amortiguadora	Extracto de alberjón	Reacción		
1	Tris-HCl	7.6	6.3	6.3	5	48
2	Fosfatos		6.7	6.7	22	23
3	Tris-HCl		6.3	7.0*	11	20
4	Fosfatos		6.7	7.0*	26	21
5	Tris-HCl	8.1	6.7	6.7	20	32
6	Fosfatos		6.8	6.8	20	25
7	Tris-HCl		6.7	7.6*	26	23
8	Fosfatos		6.8	7.6*	26	23

*pH ajustado.

7.5. Biorreducción de ***1a*** utilizando semillas de haba, alubia, frijol ayocote y alberjón, en soluciones amortiguadoras de TES, Tris-HCl, HEPES y boratos

En los siguientes experimentos se evaluó la capacidad reductora de las semillas de haba, alubia, frijol ayocote y alberjón usando ***1a*** como modelo. Para evaluar la influencia del tipo de amortiguador, las reacciones de reducción se llevaron a cabo en soluciones amortiguadoras de TES, Tris-HCl, HEPES y boratos, 0.1 M, a pH inicial de 8.1 sin ajustar, a 35 °C, durante 24 h. La selección del amortiguador puede ser crucial para una buena actividad enzimática, el amortiguador debe estar en el rango óptimo para la enzima, así mismo no debe inhibir la actividad enzimática.[43,54]

En la **figura 14** se observa que el mayor *%conv* se obtiene en presencia de amortiguador HEPES, seguido por TES y Tris-HCl, con boratos se obtienen los *%conv* más bajos. Con estos resultados se realizó un ANOVA seguido de una prueba de Tukey, del análisis se concluyó que las reacciones en HEPES muestran diferencia estadísticamente significativa con respecto a las reacciones en TES, Tris-HCl y boratos, con los cuales se obtuvieron *%conv* menores.

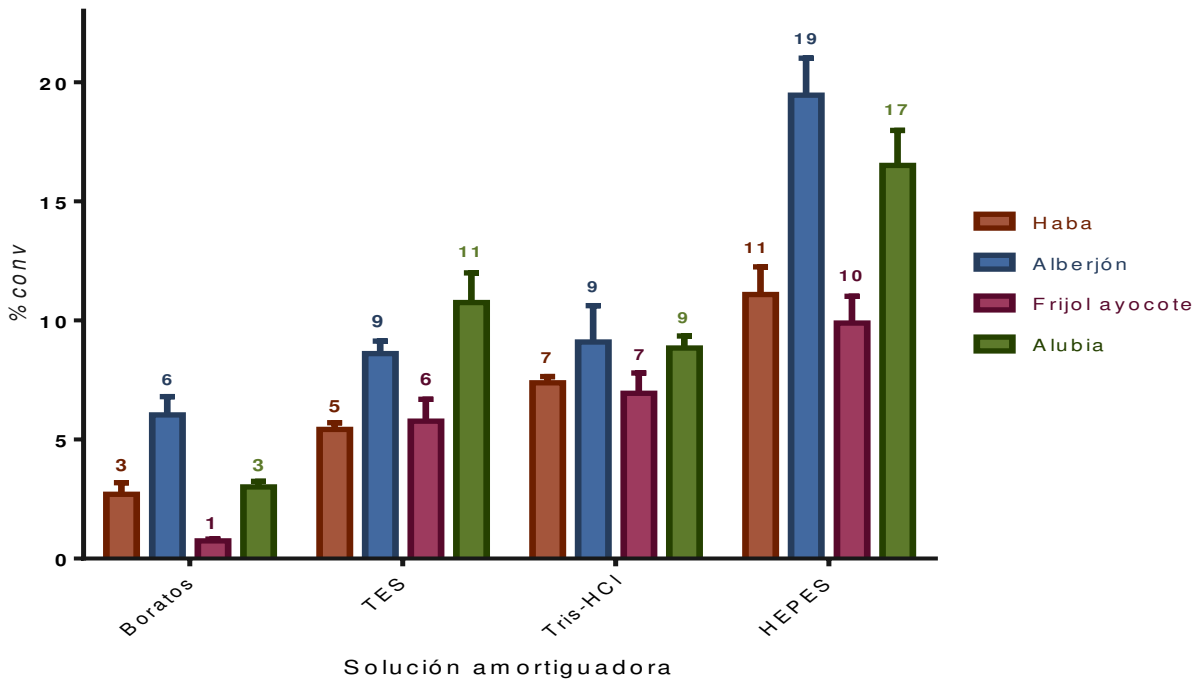


Figura 14. *%conv* de ***1a*** a ***2a*** con semillas de haba, alberjón, frijol ayocote y alubia en presencia de soluciones amortiguadoras de TES, Tris-HCl, HEPES y boratos, 0.1 M, pH 8.1 a 35 °C, 24 h.

En la **figura 15** se observa que los mayores *%ee* se obtienen en presencia de la solución amortiguadora de boratos, con frijol ayocote se obtuvo ***2a*** en forma enantiopura, y con alubia se logró un 95 % *ee*. Con los resultados obtenidos se realizó un ANOVA seguido de una prueba de Tukey, del análisis se concluyó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los cuatro amortiguadores, es decir que la enantioselectividad de las enzimas presentes en los extractos de las semillas es similar independientemente del amortiguador seleccionado.

A partir del análisis de los resultados obtenidos y tomando en cuenta el análisis de ANOVA y Tukey, se seleccionó al HEPES para preparar los extractos acuosos de las semillas debido a que el *%conv* es mayor (**Figura 14**) y que estadísticamente la enantioselectividad es prácticamente la misma con los cuatro amortiguadores (**Figura 15**).

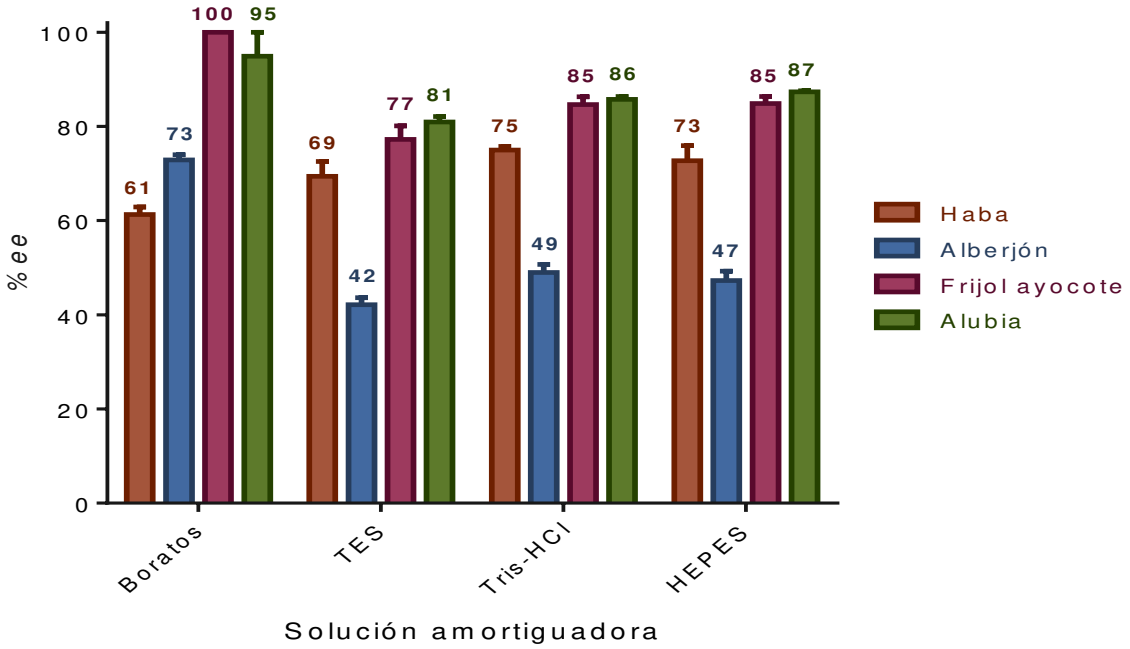


Figura 15. *%ee* de ***2a*** obtenido con semillas de haba, alberjón, frijol ayocote y alubia en presencia de soluciones amortiguadoras de TES, Tris-HCl, HEPES y boratos, 0.1 M, pH 8.1 a 35 °C, 24 h.

7.6. Efecto de la concentración de la solución amortiguadora

Además del pH, la concentración del amortiguador también es importante, concentraciones por debajo de 0.1 M alteran la carga superficial de la enzima, mientras que las concentraciones más altas no sólo neutralizan las fuerzas electrostáticas de la superficie de la enzima, sino que también afectan a la estructura tridimensional.[39,55] Por lo tanto, determinar tanto el pH como la concentración de la solución amortiguadora son de vital importancia para la actividad biocatalítica de las enzimas. En la **figura 15** se puede observar que al aumentar la concentración de la solución amortiguadora HEPES de 0.1 a 0.2 M, el *%conv* aumenta en caso de alberjón (de 19 a 27 %), frijol ayocote (de 10 a 13 %) y alubia (de 17 a 26 %), mientras que con haba no hay cambio.

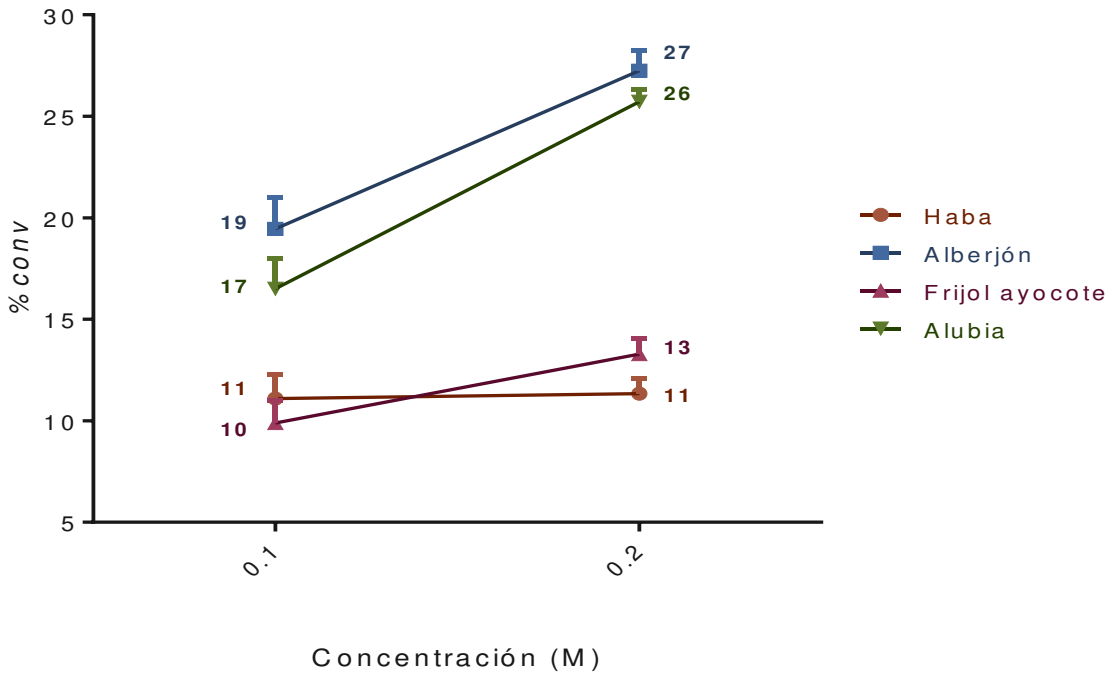


Figura 16. *%conv* de ***1a*** a ***2a*** con semillas de haba, alberjón, frijol ayocote y alubia, solución amortiguadora HEPES 0.1 y 0.2 M, pH 8.1 a 35 °C, 24 h.

En la **figura 17** se observa que el *%ee* mejora al aumentar la concentración del amortiguador en el caso de haba (de 73 a 87 %), alubia (de 87 a 89 %) y alberjón (47 a 52 %), pero con frijol ayocote disminuye ligeramente (85 a 82 %). Los resultados, tanto de *%conv* como *%ee,* se analizaron por medio de una t de student, en donde no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración 0.1 y 0.2 M de la solución amortiguadora HEPES, sin embargo, el extracto obtenido con la solución amortiguadora de 0.2 M es más fácil de manipular, por lo cual se decide trabajar con la solución 0.2 M.

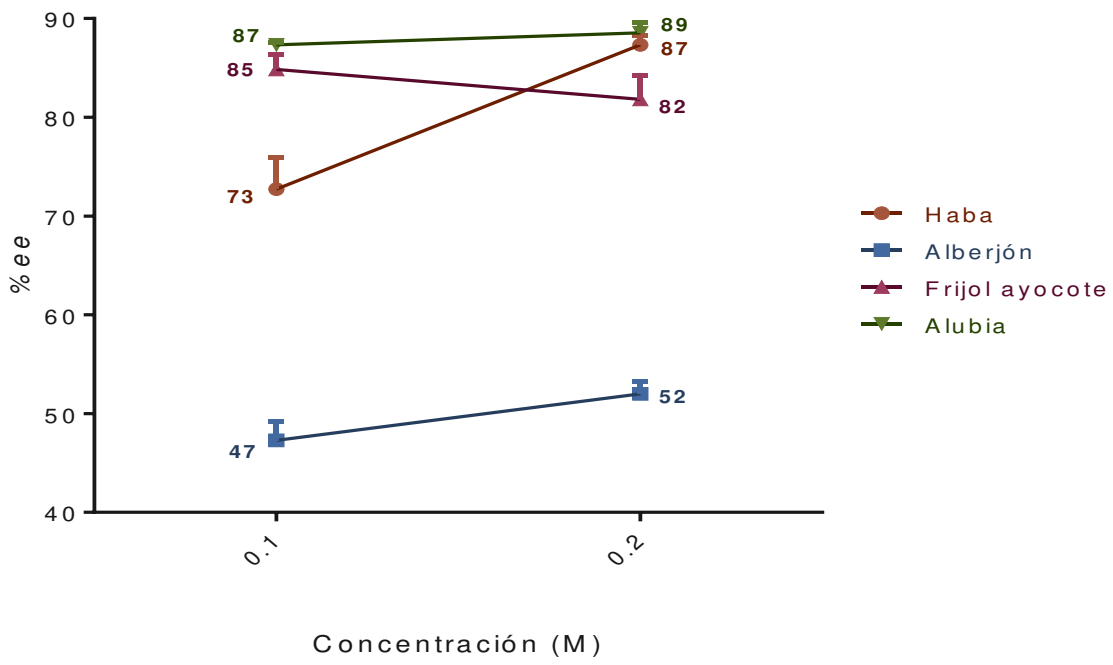


Figura 17. *%ee* de ***2a*** con semillas de haba, alberjón, frijol ayocote y alubia, solución amortiguadora HEPES 0.1 y 0.2 M, pH 8.1 a 35 °C, 24 h.

7.7. Efecto de la concentración de isopropanol

Varios informes demuestran que la adición de disolventes orgánicos puede mejorar la enantioselectividad y la actividad de procesos biocatalíticos.[56] Además en el caso del isopropanol ayuda a la regeneración del cofactor, por lo que se utilizaron diferentes cantidades de isopropanol, 2.5 μL (0.25 %), 10 μL (1 %), 50 μL (5 %) y 100 μL (10 %) en solución amortiguadora HEPES, 0.2 M, pH 8.1 a 35 °C, durante 24 h para evaluar su influencia sobre la reducción de ***1a***. En la **figura 18**, se observa que dependiendo de cada fuente de enzima el %*conv* varía cuando cambia la cantidad de isopropanol. Con chícharo el *%conv* fue mayor con 10 y 50 μL de isopropanol. Con haba la conversión fue similar en todos los casos. En el caso de alberjón el *%conv* disminuyó al aumentar la cantidad de isopropanol, la mayor conversión se tiene con 2.5 μL de isopropanol. Al contrario que con alberjón, con frijol ayocote y alubia el *%conv* aumentó al aumentar la cantidad de isopropanol, los mejores resultados se lograron con 50 μL de isopropanol. En todos los casos con 100 μL de isopropanol el *%conv* disminuyó.

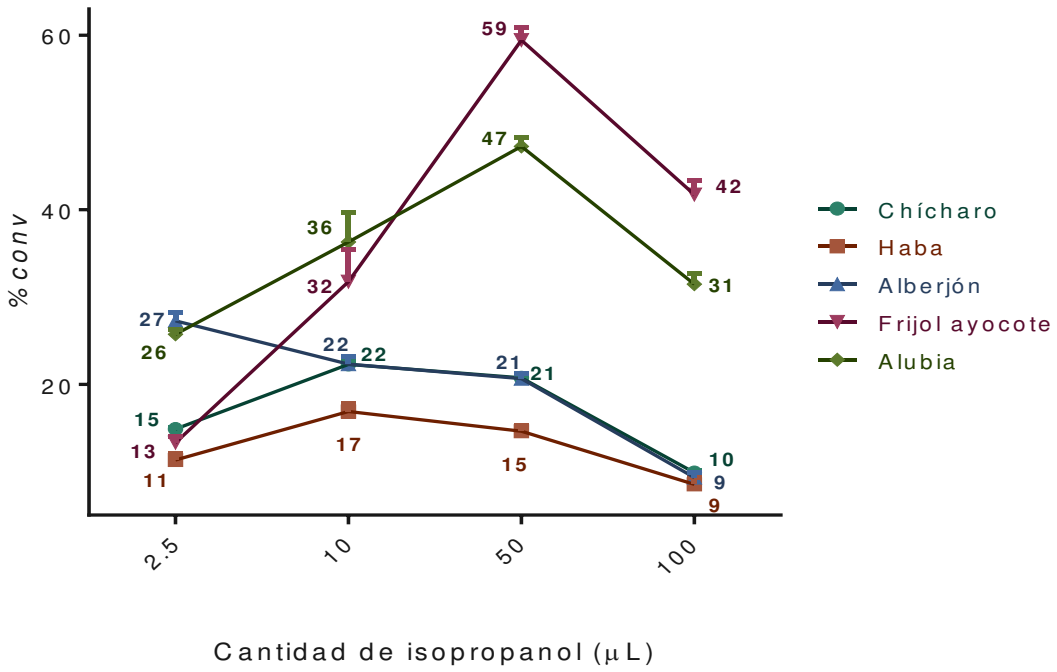


Figura 18. %*conv* de ***1a*** a ***2a*** con semillas de chícharo, haba, alberjón, frijol ayocote y alubia, cantidad de isopropanol 2.5, 10, 50 y 100 µL, solución amortiguadora HEPES, 0.2 M, pH 8.1 a 35 °C, 24 h.

En la **figura 19**, se observa que en todos los casos el *%ee* disminuyó al llevar a cabo la reacción en presencia de 100 µL de isopropanol. Con chícharo los mayores *%ee* se obtuvieron con 2.5 y 50 µL de isopropanol; con haba el mayor *%ee* se obtuvo con 2.5 µL; con alberjón, frijol ayocote y alubia los mejores resultados se obtuvieron con 50 µL de isopropanol. Los resultados obtenidos, tanto de *%conv* como *%ee* se analizaron por medio de ANOVA y Tukey, se determinó que con cada una de las semillas hay diferencia estadística al utilizar las diferentes cantidades de isopropanol, es decir que la cantidad de codisolvente sí afecta su actividad biocatalítica. En base a lo anterior se decidió trabajar con 2.5 µL de isopropanol para chícharo y haba, mientras que con alberjón, frijol ayocote y alubia se usó 50 µL ya que en esas condiciones se lograron los mayores *%conv* y *%ee*.

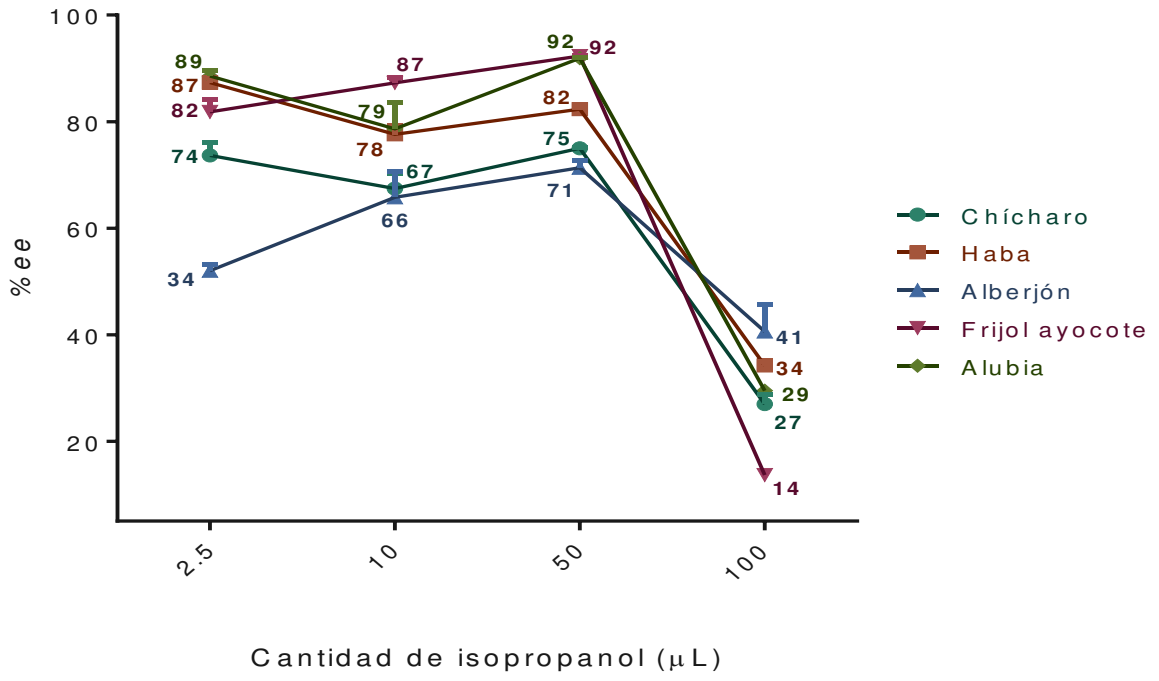


Figura 19. %*ee* de ***2a*** obtenido con semillas de chícharo, haba, alberjón, frijol ayocote y alubia, cantidad de isopropanol 2.5, 10, 50 y 100 µL, solución amortiguadora HEPES, 0.2 M, pH 8.1 a 35 °C, 24 h.

7.8. Efecto de la temperatura

La temperatura de reacción es otro de los parámetros que tienen un marcado efecto sobre la actividad catalítica y la enantioselectividad de una enzima por el cambio de la estructura y configuración de su sitio activo.[26,56] Con las condiciones óptimas de pH, tipo y concentración de amortiguador y concentración de codisolvente, se procedió a evaluar el efecto de la temperatura sobre la reacción biocatalítica, utilizandose temperaturas de 35, 40 y 45 °C. En la **figura 20** se observa que con frijol ayocote la conversión es mayor a 40 °C, mientras que con chícharo, haba, alubia y alberjón, el cambio de la temperatura no afecta significativamente el *%conv*, aunque en todos los casos se observa un ligero aumento de conversión a 40 °C.

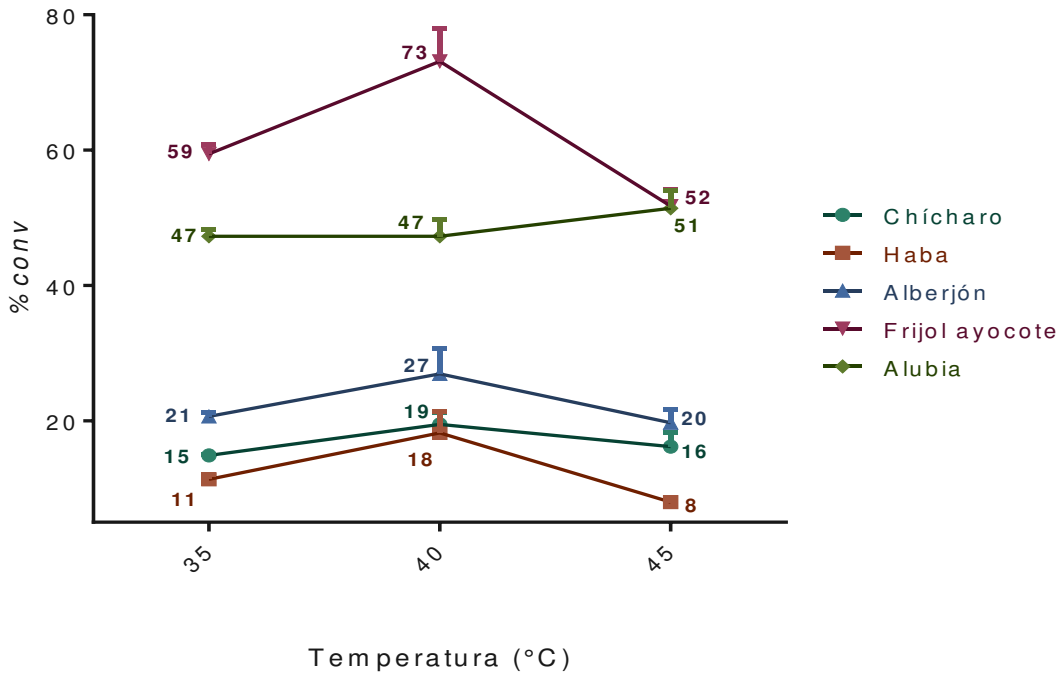


Figura 20. %*conv* de ***1a*** a ***2a*** con semillas de chícharo, haba, alberjón, frijol ayocote y alubia, solución amortiguadora HEPES 0.2 M, pH 8.1 a temperaturas de 35, 40 y 45 °C, 24 h.

El *%ee* de ***2a*** obtenido en presencia de extractos de chícharo, frijol ayocote y alubia, prácticamente fue el mismo a las tres temperaturas seleccionadas (35, 40 y 45 °C), ya que se observó una variación de ±4 %, es decir que la enantioselectividad no se afectó significativamente con la temperatura (**Figura 21**). En el caso de haba si se observó la influencia de la temperatura sobre la actividad biocatalítica, el *%ee* de ***2a*** a 35 °C fue de 87 %, a 40 °C 81 %, pero a 45 °C disminuye a 67 %, esta disminución con el aumento de temperatura se puede deber a algún tipo de modificación tridimensional en la interacción de las moléculas de sustrato y la enzima.[55] Con alberjón se obtuvo el mayor *%ee* a 45 °C (80 %) y el menor a 35 °C (71 %). Los resultados de %conv y %ee obtenidos se analizaron por medio de ANOVA y Tukey y se determinó que existe diferencia significativa entre llevar a cabo la reducción a 35, 40 o 45 °C, por lo cual se seleccionó trabajar a 35 °C con haba, 40 °C con frijol ayocote y alubia, y a 45 °C con chícharo y alberjón.

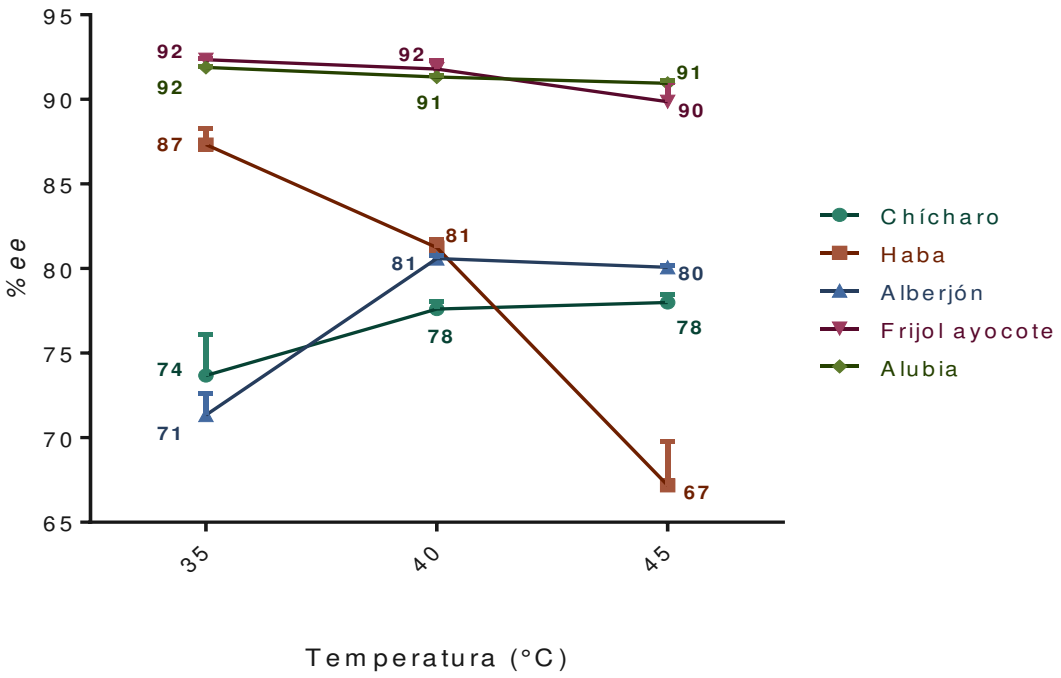


Figura 21. %*ee* de ***2a*** con semillas de chícharo, haba, alberjón, frijol ayocote y alubia, solución amortiguadora HEPES 0.2 M, pH 8.1 a temperaturas de 35, 40 y 45 °C, 24 h.

En la **tabla 8** se resumen los resultados de la optimización de las condiciones de reducción de ***1a*** a su correspondiente alcohol (***2a***) con las semillas de chícharo, haba, alberjón, frijol ayocote y alubia. Para las demás pruebas, las condiciones de reacción se llevan a cabo en solución amortiguadora HEPES 0.2 M, pH 8.1, variando la cantidad de isopropanol y la temperatura según la **tabla 8**, durante 24 h.

Tabla 8. Condiciones de reacción con respecto a cada semilla.

Semilla	Isopropanol (μL)	Temperatura (°C)
Chícharo	2.5	45
Haba	2.5	35
Alberjón	50	45
Frijol ayocote	50	40
Alubia	50	40

7.9. Biorreducción de cetonas heteroaromáticas (***1a***-***1c***) y aromáticas (***1d*** y ***1e***) con las condiciones de reacción optimizadas

Los resultados de la reducción de las cetonas ***1a***-***1e*** a sus respectivos alcoholes (***2a***-***2e***), usando como fuente de reductasa las semillas de chícharo, haba, alberjón, frijol ayocote y alubia se muestran en la **tabla 9**.

La conversión de las cetonas ***1a***-***1e*** depende de la estructura de la cetona correspondiente, así como de la fuente del biocatalizador. La reducción de las cetonas heteroaromáticas (***1a***-***1c***) resultó más eficiente que la reducción de ***1d*** y ***1e***, como se aprecia en la **tabla 9**. Estos resultados se pueden explicar considerando dos factores: el primero es el estérico, las cetonas ***1d*** y ***1e*** están más impedidas estéricamente que las derivadas de piridina, lo cual impide el acercamiento apropiado entre la enzima y el sustrato; el segundo factor es debido a la presencia del heteroátomo, Pal *et al* [16] proponen que el nitrógeno del heterociclo puede formar un puente de hidrógeno con residuos de aminoácidos en el sitio activo de la enzima para favoreciendo una mejor orientación, en estrecha proximidad con respecto a la fuente de hidruro (NADPH) lo cual permite la liberación selectiva del hidruro desde el cofactor favoreciendo la reacción de reducción de ***1a***, ***1b*** y ***1c***.

En el caso de las acetipiridinas, la mayor conversión se obtuvo para la reducción de *p*-acetilpiridina (***1c***), independientemente de la fuente de enzima (**Tabla 9**), con alubia y frijol ayocote la reducción fue cuantitativa. En la literatura se ha reportado que la carga parcialmente positiva sobre el nitrógeno de piridina, tras la coordinación con un residuo de aminoácido de enzima, da lugar a una disminución de la densidad electrónica en acetilcarbonilo, especialmente en las posiciones *o* y *p* favoreciendo la reducción de *o* y *p* acetilpiridinas sobre la *m*-sustituida.[16] Esto se observó usando como fuentes de enzima las semillas de chícharo y alberjón, ya que se obtuvieron mayores *%conv* al reducir ***1a*** y ***1c*** que con ***1b***. En los casos de haba, frijol ayocote y alubia la mayor conversión se obtuvo con las acetilpiridinas sustituidas en *meta* (***1b***) y *para* (***1c***). En general los mayores *%conv* se obtuvieron con alubia y frijol ayocote.

Tabla 9. *%conv* y *%ee* de cetonas ***1a***-***1e*** a los respectivos alcoholes (***2a***-***2e***), con las condiciones de reacción optimizadas, durante 24 h.

	Chícharo		**Haba**		**Alberjón**		**Frijol ayocote**		**Alubia**	
	%conv	***%ee***	***%conv***	***%ee***	***%conv***	***%ee***	***%conv***	***%ee***	***%conv***	***%ee***
2a	16	78	11	87	20	80	73	92	47	91
2b	13	76	15	100	15	68	96	75	76	73
2c	29	82	38	90	65	90	100	79	100	75
2d	2	66	2	77	5	73	13	100	14	92
2e	5	*nd*	6	53	4	15	14	84	13	92

nd= El *%ee* no se pudo determinar.

La enantioselectividad de la reacción de reducción fue diferente dependiendo tanto de la estructura del sustrato como de la fuente de enzima (**Tabla 9**). En general los *%ee* fueron mayores al 66 %, excepto para ***2e*** que fueron menores con las semillas de chícharo, haba y alberjón. Las semillas de frijol ayocote y alubia resultaron ser las más interesantes ya que con todas las cetonas se obtuvieron altos *%ee*, incluyendo las cetonas ***1d*** y ***1e***, que presentaron baja conversión. Con la semilla de haba también se lograron altos *%ee*, mientras que la enantioselectividad de las semillas de chícharo y alberjón fue similar. Las cetonas ***1a*** y ***1c*** fueron las mejor aceptadas por todas las semillas, ya que los alcoholes correspondientes tuvieron los mayores excesos enantioméricos. La reducción biocatalizada de ***1d*** y ***1e*** con las cuatro semillas, fue menos eficiente en comparación con los análogos de piridina (***1a***, ***1b*** y ***1c***).

7.10. Determinación de la configuración *R* o *S* de los alcoholes ***2a***, ***2b***, ***2c***, ***2d*** y ***2e***

Las rotaciones ópticas de los alcoholes ***2a***, ***2b***, ***2c***, ***2d*** y ***2e*** se muestran en la **tabla 10**, las cuales se compararon con lo reportado en la literatura para corroborar la configuración de cada uno de los alcoholes, la cual ya se había asignado por CLAR quiral. Los resultados de ***2a*** se compararon con los de Mohammadi *et al* [50], ***2b*** con los de Lakshmi *et al* [48], ***2c*** y con los de Pal *et al* [16], se asignó configuración (*R*) a los alcoholes ***2a***, ***2b*** y ***2c*** que presentaron rotación positiva. Por lo que, al analizar los alcoholes ***2a***, ***2b*** y ***2c*** obtenidos con las semillas *Phaseolus* (frijol ayocote y alubia) tienen configuración (*R*) y con las *Pisum* y *Vicia* (chícharo, alberjón y haba) tienen configuración (*S*).

Tabla 10. Rotación óptica obtenidos de los alcoholes ***2a***, ***2b***, ***2c***, ***2d*** y ***2e*** con las diferentes semillas.

	***Fabaceae phaseolus* (frijol ayocote y alubia)**		***Fabaceae pisum* y *vicia* (chícharo, alberjón y haba)**	
	Rotación óptica observada	Rotación óptica específica	Rotación óptica observada	Rotación óptica específica
2a	0.830	91.21	-2.420	-208.62
2b	0.158	83.16	-2.005	-63.00
2c	0.807	200.42	-5.500	-275.00
2d	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*
2e	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*

nd: No se pudo determinar.

En el caso de los alcoholes ***2d*** y ***2e*** no se logró determinar la rotación debido a que la conversión fue muy baja y la cantidad de alcohol no fue suficiente para una medición confiable.

8. CONCLUSIONES

Las semillas de chícharo, alubia, alberjón, haba, frijol ayocote, frijol negro, frijol pinto, frijol bayo, frijol flor de mayo y frijol cacahuate mostraron una alta eficiencia para reducir a ***1a***. El medio de reacción es importante, con amortiguador de boratos se obtiene mayor *%ee*, sin embargo, con HEPES aumenta el *%conv*. A una concentración de HEPES 0.2 M se lograron mejores resultados que con 0.1 M. La cantidad de isopropanol afecta directamente el *%conv* y *%ee*. Para alberjón, frijol ayocote y alubia es mejor trabajar con 5 %, mientras que con chícharo y haba es mejor 0.25 % de isopropanol. Con respecto a la temperatura, se observó que, a 45 °C, para chícharo y alberjón, mejora el *%ee*; y para frijol ayocote y alubia mejora el *%conv* a 40 °C. Con haba disminuye el *%ee* al incrementar la temperatura por la cual se trabaja a 35 °C.

Bajo las condiciones óptimas para cada semilla [chícharo (0.25 % de isopropanol, 45 °C), haba (0.25 % de isopropanol, 35 °C), alberjón (5 % de isopropanol, 45 °C), frijol ayocote (5 % de isopropanol, 40 °C), alubia (5 % de isopropanol, 40 °C)] se obtuvieron buenos *%conv* de las acetilpiridinas y excelentes *%ee* de los alcoholes correspondientes. Sin embargo, en la biorreducción de ***1d*** y ***1e*** se obtuvieron *%conv* y *%ee* bajos.

Con las semillas del género *Phaseolus* (frijol ayocote y alubia) se obtiene los alcoholes ***2a***, ***2b*** y ***2c*** con configuración (*R*) y con las *Pisum* y *Vicia* (chícharo, haba y alberjón) la configuración (*S*).

Estos resultados son muy prometedores ya que las fuentes empleadas como medios enzimáticos (chícharo, haba, alberjón, frijol ayocote y alubia) pueden reducir cetonas heteroaromáticas, con una alta estereoselectividad mediante un enfoque respetuoso con el medio ambiente, proporcionando procesos menos costosos para obtener intermediarios importantes.

9. METAS ALCANZADAS

- Se obtuvieron los compuestos seleccionados, los cuales se identificaron y cuantificaron mediante técnicas analíticas.
- Al investigar las condiciones óptimas de reacción para las diferentes fuentes del biocatalizador, se mejoraron los *%conv* y *%ee* de ***2a***, ***2b*** y ***2c***, precursores importantes del antagonista del receptor de la (*S*)-*N*-metil-D-aspartato ((*S*)-NMDA), utilizandose en varios trastornos, como por ejemplo, en el inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa del VIH ((*S*)-FPH).
- El efecto de la estructura química de cetonas afecta la actividad biocatalítica de las enzimas presentes en las semillas.

10. PERSPECTIVAS

- Se propone realizar pruebas con otras semillas del género *Phaseolus* como fuente de reductasa, las cuales presentaron los mejores *%ee*.
- Con la optimización de condiciones se probará otros sustratos heterociclos, que sean precursores de compuestos con actividad biológica.

11. REFERENCIAS

1. Muñoz D., Hoyos P., Hernáiz M., Alcántara A., Sánchez J., (2012), *Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs*, Bioresource Technology, 115, 196-207.
2. Yan Z., Nie Y., Xu Y., Liu X., Xiao R., (2011), *Biocatalytic reduction of prochiral aromatic ketones to optically pure alcohols by a coupled enzyme system for cofactor regeneration*, Tetrahedron Letters, 52(9), 999-1002.
3. Simon R., Mutti F., Kroutil W., (2013), *Biocatalytic synthesis of enantiopure building blocks for pharmaceuticals*, Drug Discovery Today: Technologies, 10(1), 37-44.
4. Xu G., Yu H., Zhang X., Xu J., (2012), *Access to optically active aryl halohydrins using a substrate-tolerant carbonyl reductase discovered from Kluyveromyces thermotolerans*, ACS Catalysis, 2, 2566-2571.
5. Machado L., Souza J., de Mattos M., Sakata S., Cordell G., Lemos T., (2006), *Bioreduction of aldehydes and ketones using Manihot species*, Phytochemistry, 67, 1637-1643.
6. Xu C., Zhonghua Y., Rong Z., Gai Y., Jiabao Y., (2010), *Production of chiral aromatic alcohol by asymmetric reduction with vegetable catalyst,* Chinese Journal of Chemical Engineering, 18(6), 1029-1033.
7. Andrade L., Utsunomiya R., Omori A., Porto A., Comasseto J., (2006), *Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 38, 84-90.
8. Kasprzyk B., (2010), *Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality*, Chemical Society Reviews,39, 4466-4503.
9. Agranat I., Caner H., Caldwell J., (2002), *Putting chirality to work: The strategy of chiral switches*. Nature Publishing Group, 1(1), 753-768.
10. Rentsch K., (2002), *The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 54, 1-9.
11. Nguyen L., He H., Pham C., (2006), *Chiral Drugs: An Overview*, International Journal of Biomedical Science, 2(2), 85-100.
12. Vandenberghe A., Markó I., Lucaccioni F., Lutts S., (2013), *Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables,* Industrial Crops and Products, 42, 380-385.

13. Fruchey E., (2011), *Asymmetric reductions of ketones, imines, and oximes using biocatalytic enzymes found in pea plants*, Honors Research Thesis, The Ohio State University, USA.
14. Brown D., Urbanek R., Bare T., McLaren F., Horchler C., Murphy M., Steelman G., Empfield J., Forst J., Herzog K., Xiao W., Dyroff M., Lee C., Trivedi S., Neilson K., Keith R., (2003), *Synthesis of 7-chloro-2,3-dihydro-2-[1-(pyridinyl)alkyl]pyridazino[4,5-b]quinoline-1,4,10(5H)-triones as NMDA glycine-site antagonists*, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters,13, 3553-3556.
15. Kawano S., Horikawa M., Yoshihiko Y., Hasegawa J., (2003), *Microbial enantioselective reduction of acetylpyridine derivatives*, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 67(4), 809-814.
16. Pal M., Srivastava G., Moon L., Jolly R., (2012), *Bioreduction of methyl heteroaryl and aryl heteroaryl ketones in high enantiomeric excess with newly isolated fungal strains*, Bioresource Technology, 118, 306-314.
17. Kamal A., Ramesh G., Ramu R., (2002), *Chemoenzymatic synthesis 2 of both enantiomers of fluoxetine, tomoxetine and nisoxetine: lopase-catalyzed resolution of 3-aryl-3-hydroxypropanitriles*, Tetrahedron: Asymmetry, 13, 2039-2051.
18. Yang G., Ou Z., Yao S., Xu J., (2009), *Asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone to (S)-3-chloro-1-phenylpropanol using immobilized Saccharomyces cerevisiae CGMCC 2266 cells*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 57, 83-88.
19. Zhu D., Ankati H., Mukherjee C., Yang Y., Biehl E., Hua L., (2007), *Asymmetric reduction of β-ketonitriles with a recombinant carbonyl reductase and enzymatic transformation to optically pure β-hydroxy carboxylic acids*, Organic Letters, 9(13), 2561-2563.
20. Zhou J., Fang Q., Hu Y., Yang L., Wu F., Xie L., Wu J., Li S., (2014), *Copper(II)-catalyzed enantioselective hydrosilylation of halo-substituted alkylaryl and heteroaryl ketones: asymmetric synthesis of (R)-fluoxetine and (S)-duloxetine*, Organic Biomolecular Chemistry, 12, 1009-1017.
21. Coronel C., Arce G., Iglesias C., Magallanes C., Rodriguez P., Rodríguez S., Gonzalez D., (2014), *Chemoenzymatic synthesis of fluoxetine precursors. Reduction of β-substituted propiophenones*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 102, 94-98.
22. Hilborn J., Lu Z., Jurgens A., Fang Q., Byers P., Wald S., Senanayake C., (2001), *A practical asymmetric synthesis of (R)-fluoxetine and its major metabolite (R)-norfluoxetine*, Tetrahedron Letters, 42, 8919-8921.

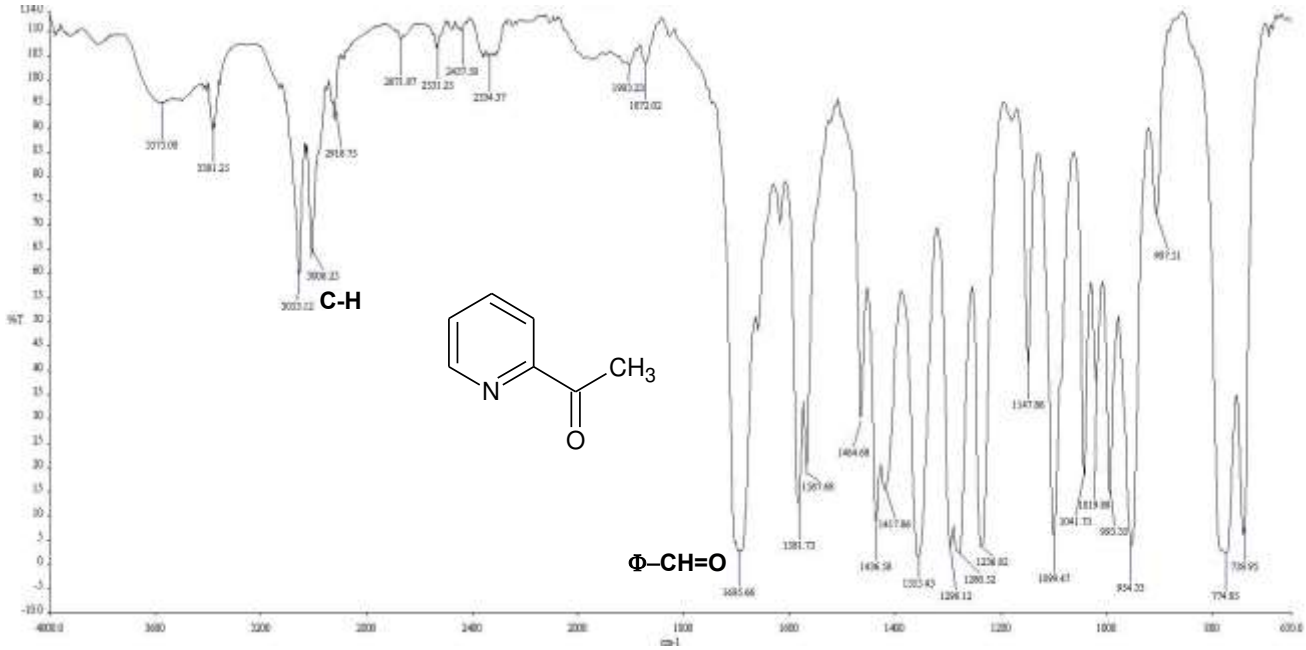
23. Bizerra A., de Gonzalo G., Lavandera I., Fernández G., de Mattos C., de Oliveira M., Lemos T., Gotor V., (2010), *Reduction processes biocatalyzed by Vigna unguiculata*, Tetrahedron: Asymmetry, 21, 566-570.
24. Wu K., Chen L., Fan H., Zhao Z., Wang H., Wei D., (2016), *Synthesis of enantiopure epoxide by 'one pot' chemoenzymatic approach using a highly enantioselective dehydrogenase*, Tetrahedron Letters, 57, 899-90.
25. Milner S., Maguire A., (2012), *Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis*, Archive for Organic Chemistry, 1, 321-382.
26. Nakamura K., Yamanaka R., MatsudA T., Harada T., (2003), *Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts*, Tetrahedron: Asymmetry, 14, 2659-2681.
27. Dudzik A., Snoch W., Borowiecki P., Opalinska J., Witko M., Heider J., Szaleniec M., (2015), *Asymmetric reduction of ketones and β-keto esters by (S)-1-phenylethanol dehydrogenase from denitrifying bacterium Aromatoleum aromaticum*, Applied Microbiology Biotechnology, 99(12), 5055-5069.
28. Ni Y., Li C., Ma H., Zhang J., Xu J., (2011), *Biocatalytic properties of a recombinant aldo-keto reductase with broad substrate spectrum and excellent stereoselectivity*, Applied Microbiology Biotechnology, 89, 1111-1118.
29. Juaristi E., (2011), *Organocatalizadores quirales y su aplicación en síntesis asimétrica*, Educación Química, 22(1), 12-14.
30. Marqués E., Herrera R., (2009), *El renacer de un nuevo campo: la Organocatálisis Asimétrica. Tioureas como organocatalizadores*, Anales de Química, 105(1), 05-12.
31. Patil D., (2015), *Biocatalysis using plant material: A green access to asymmetric reduction*, International Journal of ChemTech Research, 8(8), 318-324.
32. Leyva E., Moctezuma E., Santos M., Loredo S., Hernández O., (2012), *Fast microwave assisted bioreduction of aromatic aldehydes using Aloe vera. A green chemistry reaction*. Revista Latinoamericana de Química, 40(3), 140-147.
33. Alves D., Costa R., Costa J., da Costa J., Mattos M., Gomes T., Queiroz F., (2012), *Lens culinaris: A new biocatalyst for reducing carbonyl and nitro groups*, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 17, 407-412.
34. Tong L., Cui J., Ren W., Wang X., Qian X., (2008), *Asymmetric bioreduction of substituted acenaphthenequinones using plant enzymatic systems: A novel strategy for the preparation of (+)- and (-)- mono hydroxyacenaphthenones*, Chinese Chemical Letters, 19, 1179-1182.

35. Matsuo K., Kawabe S., Tokuda Y., Eguchi T., Yamanakab R., Nakamurac K., (2008), *Asymmetric reduction of ketones with a germinated plant*, Tetrahedron: Asymmetry, 19, 157-159.
36. Noguera C., Ferrari M., Sanz M., Orden A., (2012), *Deracemization of secondary alcohols by chemo-enzymatic sequence with plant cells*, Journal of Biotechnology, 160, 189– 194.
37. Orden A., Bisogno F., Giordano O., Sanz M., (2008), *Comparative study in the asymmetric bioreduction of ketones by plant organs and undifferentiated cells*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 51, 49–55.
38. Matsuda T., Yamanaka R., Nakamura K., (2009), *Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction*, Tetrahedron Asymmetry, 20(5), 513-557.
39. Rodríguez C., de Gonzalo G., Gotor V., (2012), *Optimization of oxidative bioconversions catalyzed by phenylacetone monooxygenase from Thermobifida fusca*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 74, 138-143.
40. AppliChem, (2008), *Biological buffers*, recuperado el 14 de junio de 2017, disponible en: https://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/BioBuffer.pdf.
41. Thiel T., Liczkowski L., Bissen S., (1998), *New zwitterionic butanesulfonic acids that extend the alkaline range of four families of good buffers: Evaluation for use in biological systems*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 37, 117-129.
42. Grajales O., (2005), *Apuntes de bioquímica vegetal. Bases para su aplicación fisiológica*, UNAM, 1ra edición, 45-47.
43. Liu X., Pan Z., Xu J., Li H., (2010), *Enantioselective reduction of acetophenone analogues using carrot and celeriac enzymes system*, Chinese Chemical Letters, 21, 305-308.
44. Rojas A., Girón E., Torres H., (2010), *Variables de operación en el proceso de transesterificación de aceites vegetales: una revisión-catálisis enzimática*, SCIELO, Ingeniería e Investigación, 30(1), 17-21.
45. Claramunt R., Farrán M., López C., Pérez M., Santa María D., (2013), *Química bioorgánica y productos naturales,* Universidad Nacional de Educación a Distancia, España.
46. Kim J., De Catro K., Lim M., Rhee H., (2010), *Reduction of aromatic and aliphatic keto esters using sodium borohydride/MeOH at room temperature: a thorough investigation*, Tetrahedron, 66, 3995-4001.
47. Tae B., Kyu S., Sung M., Ryeon S., Keun D; (2006), *Solvent-free reduction of aldehydes and ketones using solid acid-activated sodium borohydride*, Tetrahedron, 62, 8164-8168.
48. Lakshmi C., Reddy G., Rao A., (2011), *Asymmetric Reduction of Heteroaryl Methyl Ketones*

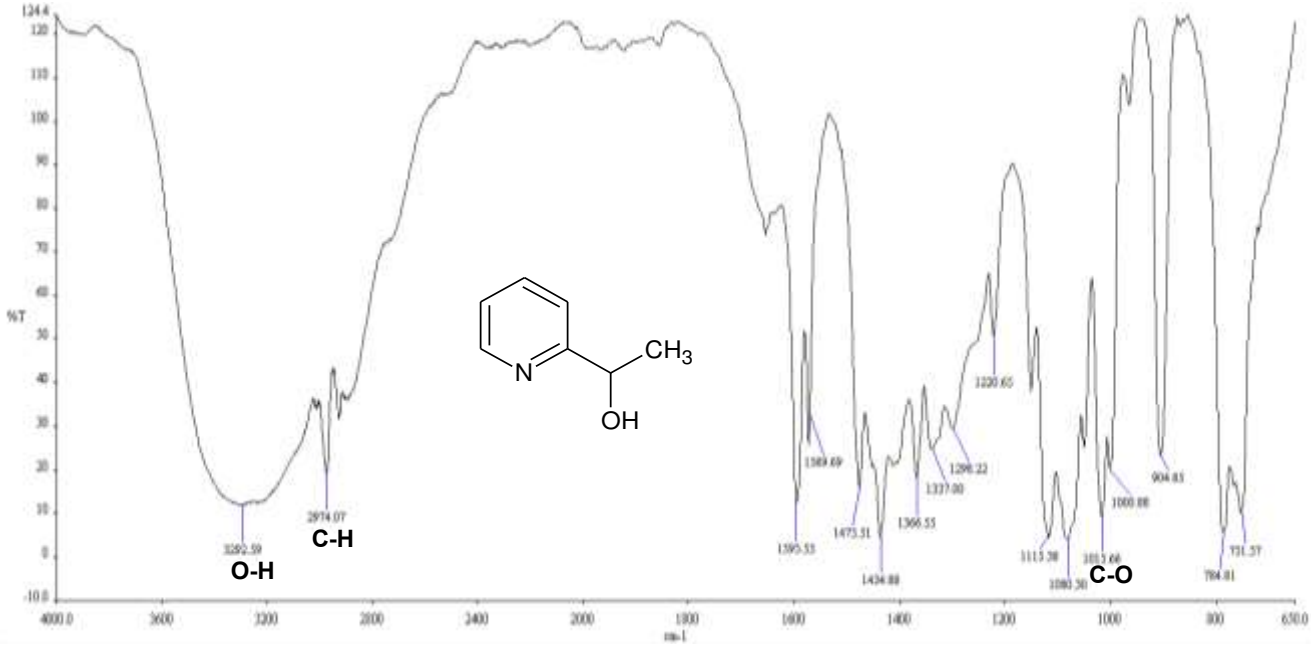
Using Daucus carota, Green and Sustainable Chemistry, 1, 117-122.

49. Aldabalde V., Arcia P., Gonzalez A., Gonzalez D., (2007), *Enzymatic synthesis of chiral heteroaryl alcohols using plant fragments as the only biocatalyst and reducing agent*, Green Chemistry Letters and Reviews, 1(1), 25-30.
50. Mohammadi M., Yousefi M., Habibi Z., (2011), *Highly enantioselective bioreduction of prochiral ketones by stem and germinated plant of Brassica oleracea variety italica*, Biocatalysis and Biotransformation, 29(6), 328-336.
51. Akakabe Y.,Takahashi M., Kamezawa M., Kikuchi K., Tachibana H., Ohtani T., Naoshima Y., (1995), *Biocatalytic preparation of chiral alcohols by enantioselectiva reduction with immobilized cells of carrot*, Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1.
52. Uwai K., Konno N., Kitamura S., Ohta S., Takeshita M., (2005), *Purification and characterization of rat liver enzyme catalyzing stereoselective reduction of acetylpyridines*, Chirality, 17(8), 494-500.
53. Cervantes F., (2015), *Reducción de cetonas utilizando biocatalizadores de origen vegetal*, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, México.
54. Schomburg K., Ardao I., Götz K., Rieckenberg F., Liese A., Zeng A., Rarey M., (2012), *Computational biotechnology: Prediction of competitive substrate inhibition of enzymes by buffer compounds with protein–ligand docking*, Journal of Biotechnology, 161, 391-401.
55. Liu X., Wang Y., Gao H., Xu J., (2012), *Asymmetric reduction of α-hydroxy aromatic ketones to chiral aryl vicinal diols using carrot enzymes system*, Chinese Chemicals Letters, 23, 635-638.
56. Xu M., Chen B., Zheng Y., (2013), *Catalytic resolution of DL-tryptophan amides using the resting cells of Flavobacterium aquatile ZJB-09211 in a two-phase system*, Catalysis Communications, 38, 31-34.

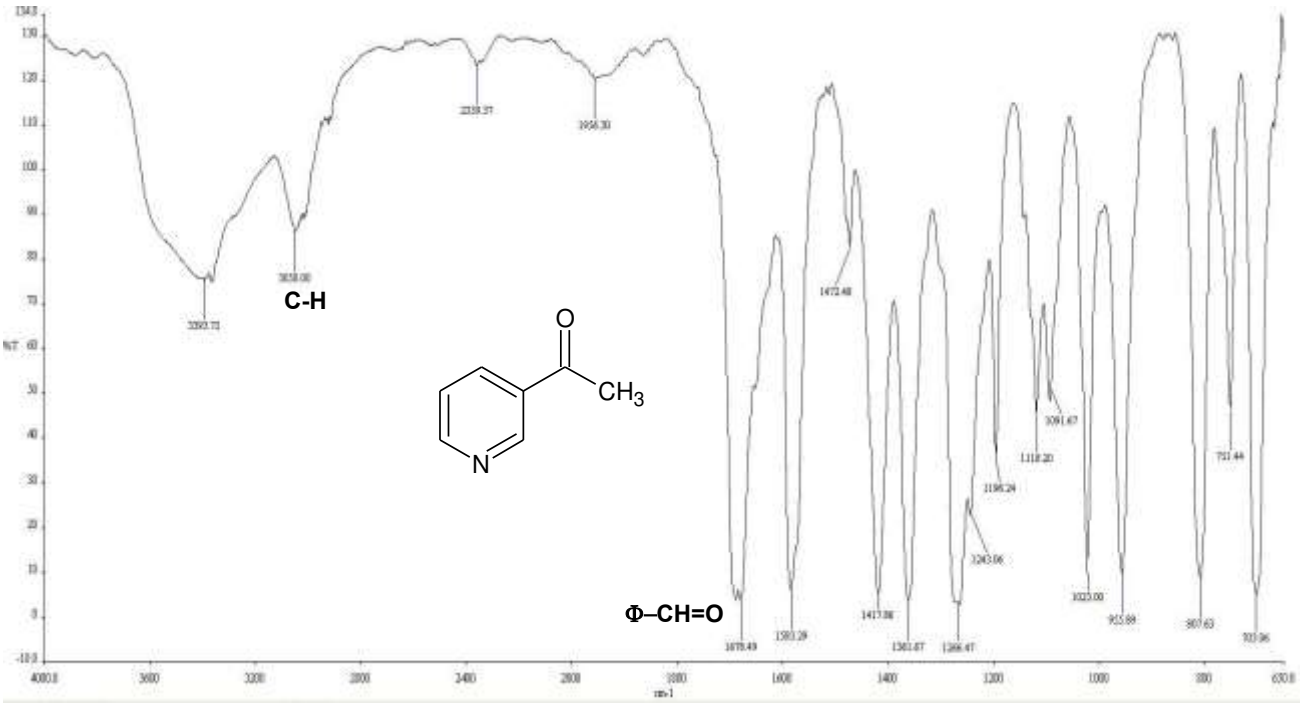
12. ANEXOS



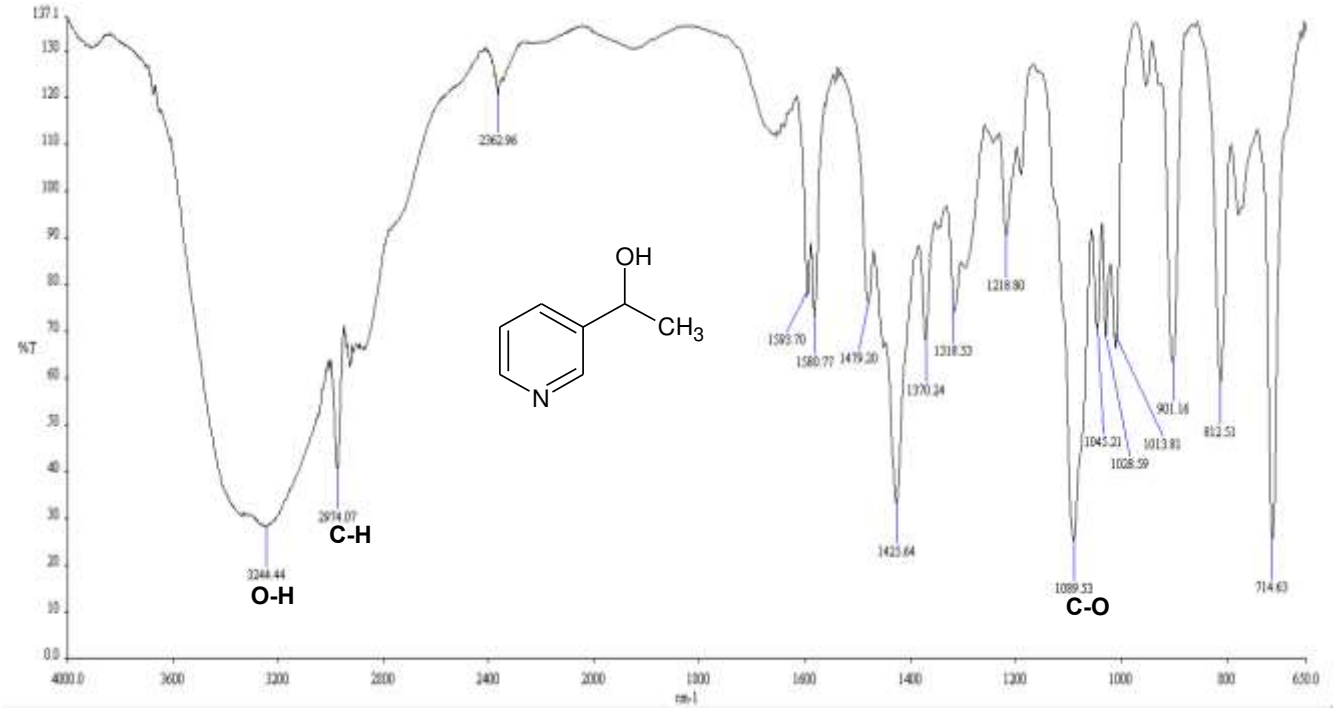
Anexo 1. Espectro de IR ($CHCl_3$) de 2-acetilpiridina (***1a***). En donde se observa las señales de estiramiento del enlace ϕ–C-H a 3053 y 3006cm^{-1}, así como del grupo carbonilo (ϕ-CH=O) a 1695cm^{-1}.



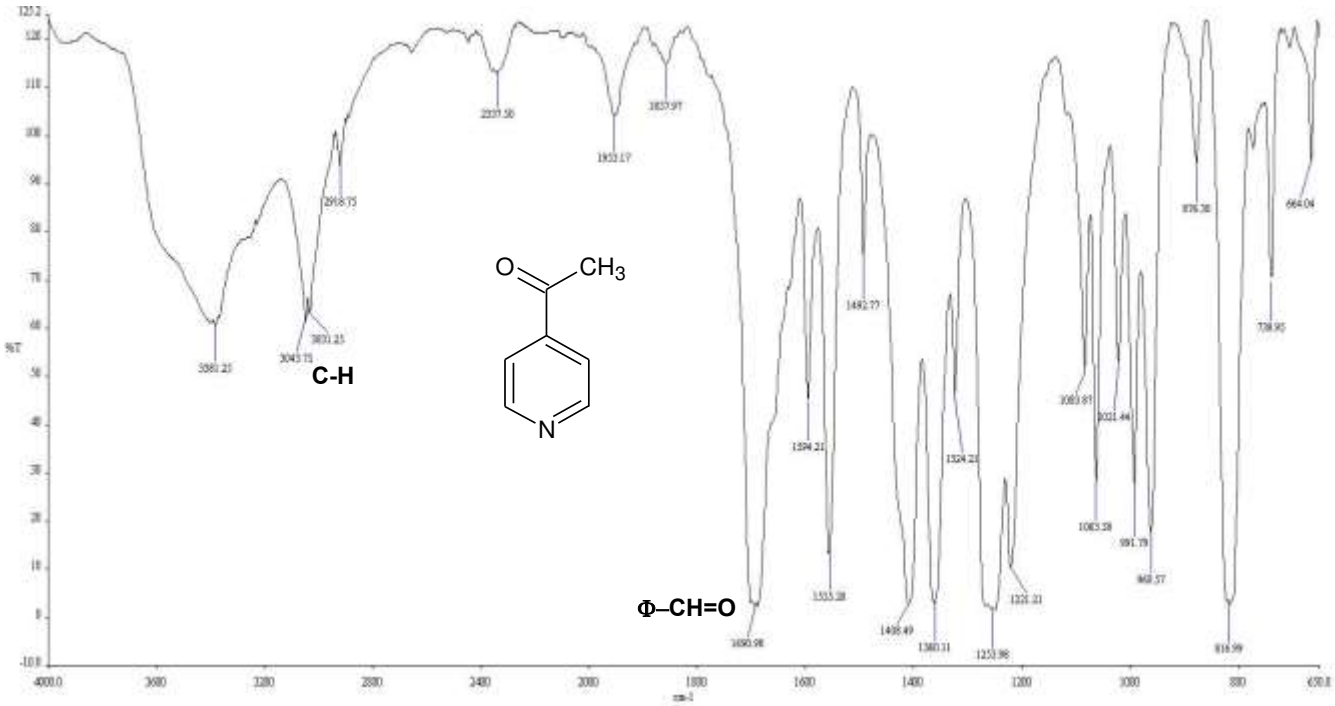
Anexo 2. Espectro de IR ($CHCl_3$) de 1-(2-piridil)etanol (***2a***). En donde se la señal que corresponde al enlace O-H a 3292cm^{-1}, C-H a 2974cm^{-1} y del enlace C-O a 1015cm^{-1}.



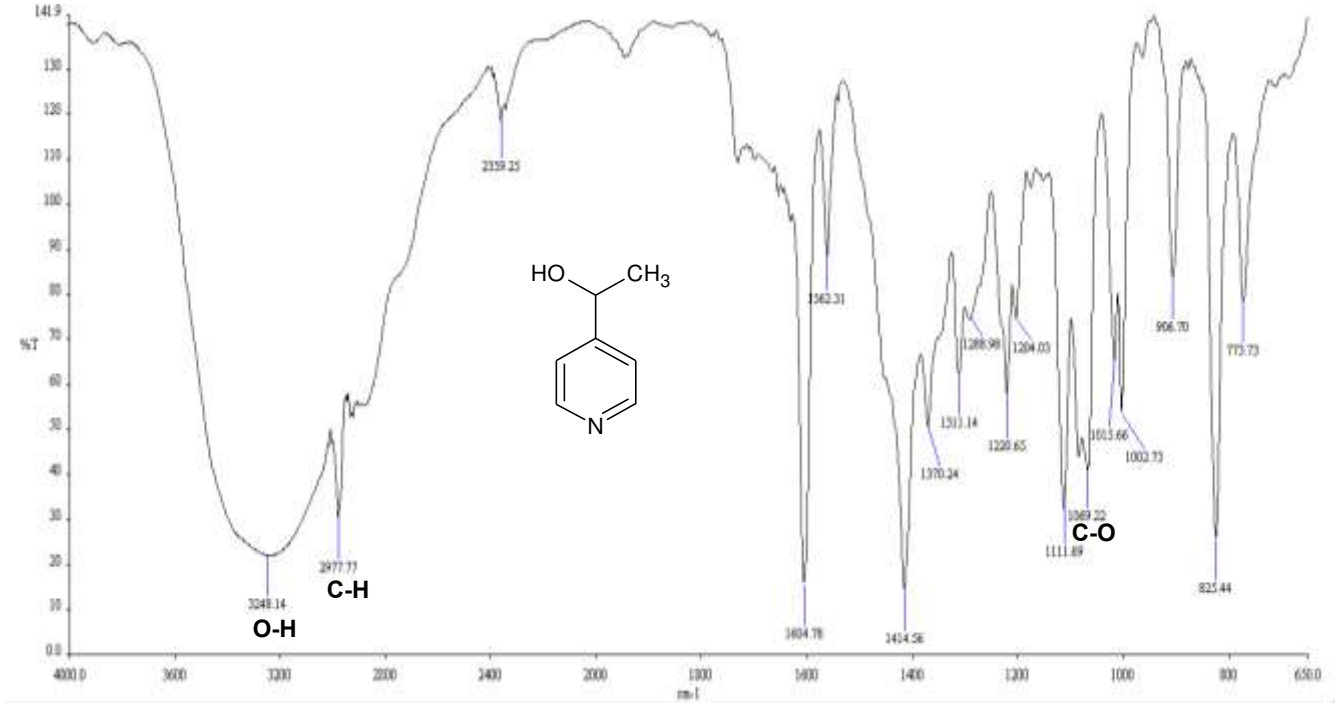
Anexo 3. Espectro de IR ($CHCl_3$) de 3-acetilpiridina (***1b***). En donde se observa las señales de estiramiento del enlace ϕ–C-H a 3050cm^{-1}, así como del grupo carbonilo (ϕ-CH=O) a 1678cm^{-1}.



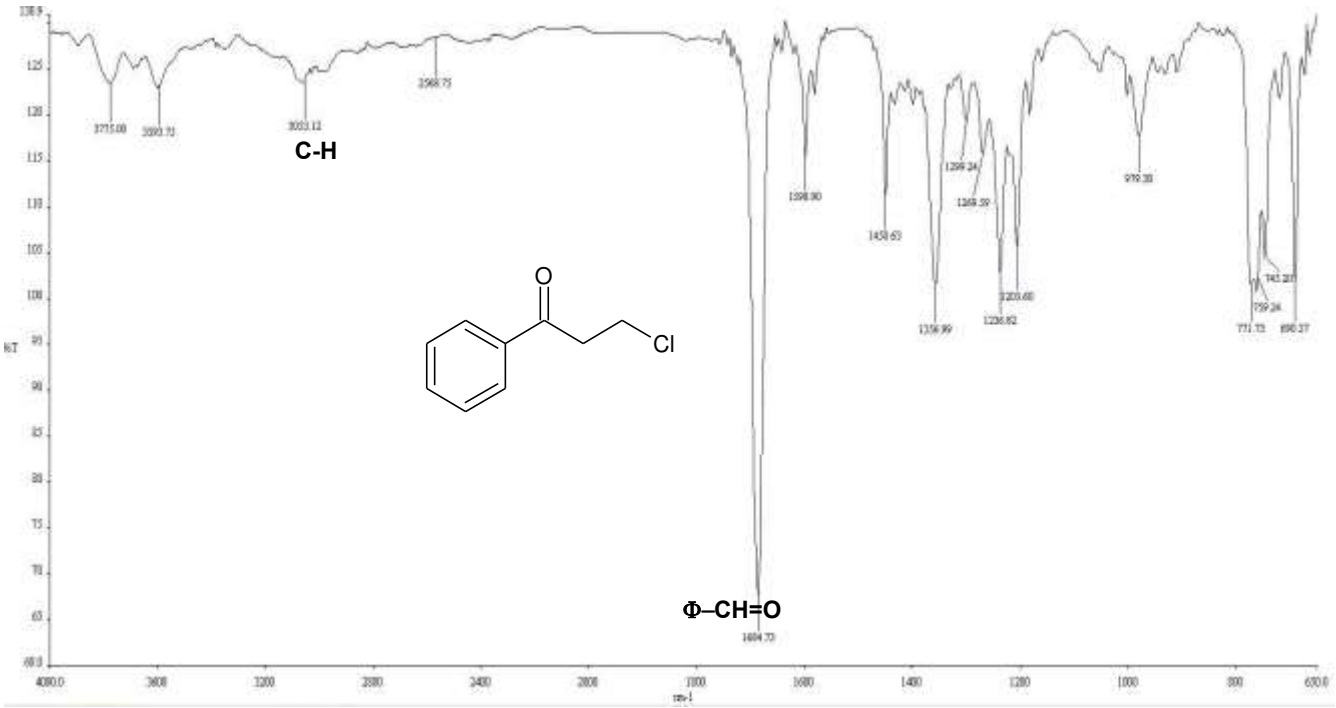
Anexo 4. Espectro de IR ($CHCl_3$) de 1-(3-piridil)etanol (***2b***). En donde se observa la señal que corresponde al enlace O-H a 3244cm^{-1}, C-H a 2974cm^{-1} y del enlace C-O a 1089cm^{-1}.



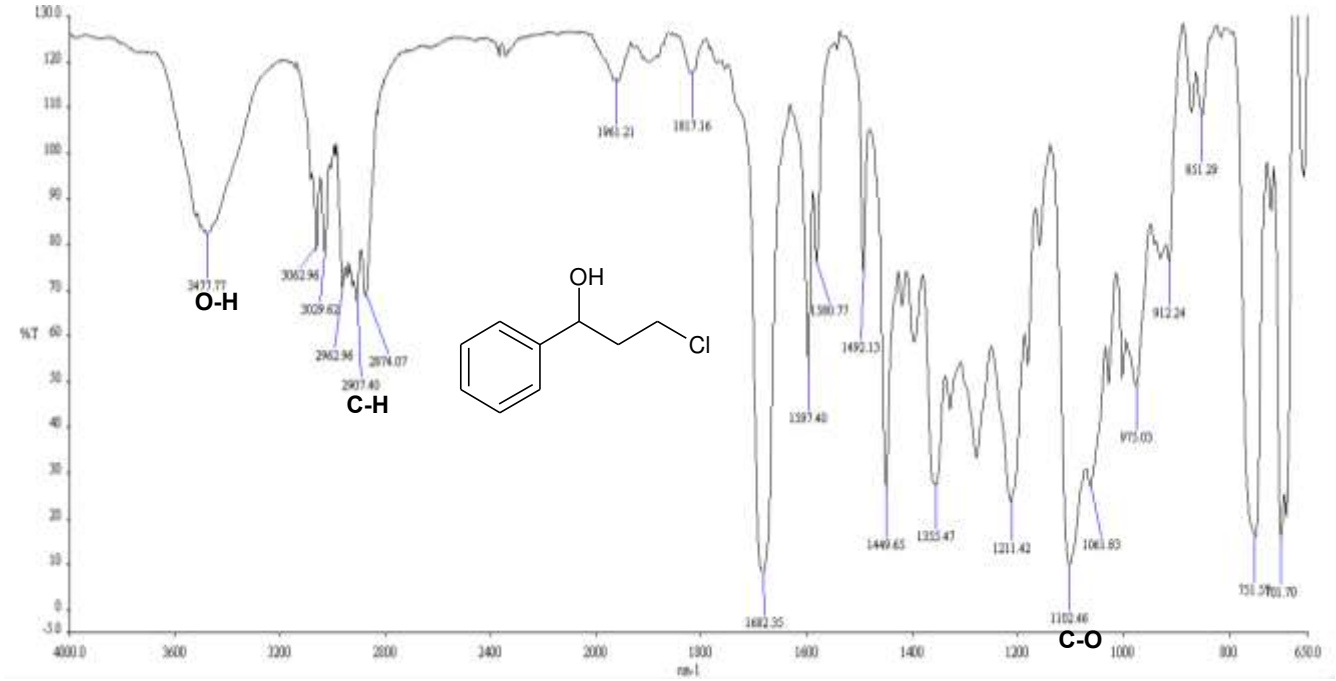
Anexo 5. Espectro de IR ($CHCl_3$) de 4-acetilpiridina (***1c***). En donde se observa las señales de estiramiento del enlace ϕ–C-H a 3043 y 3031cm^{-1}, así como del grupo carbonilo (ϕ-CH=O) a 1690cm^{-1}.



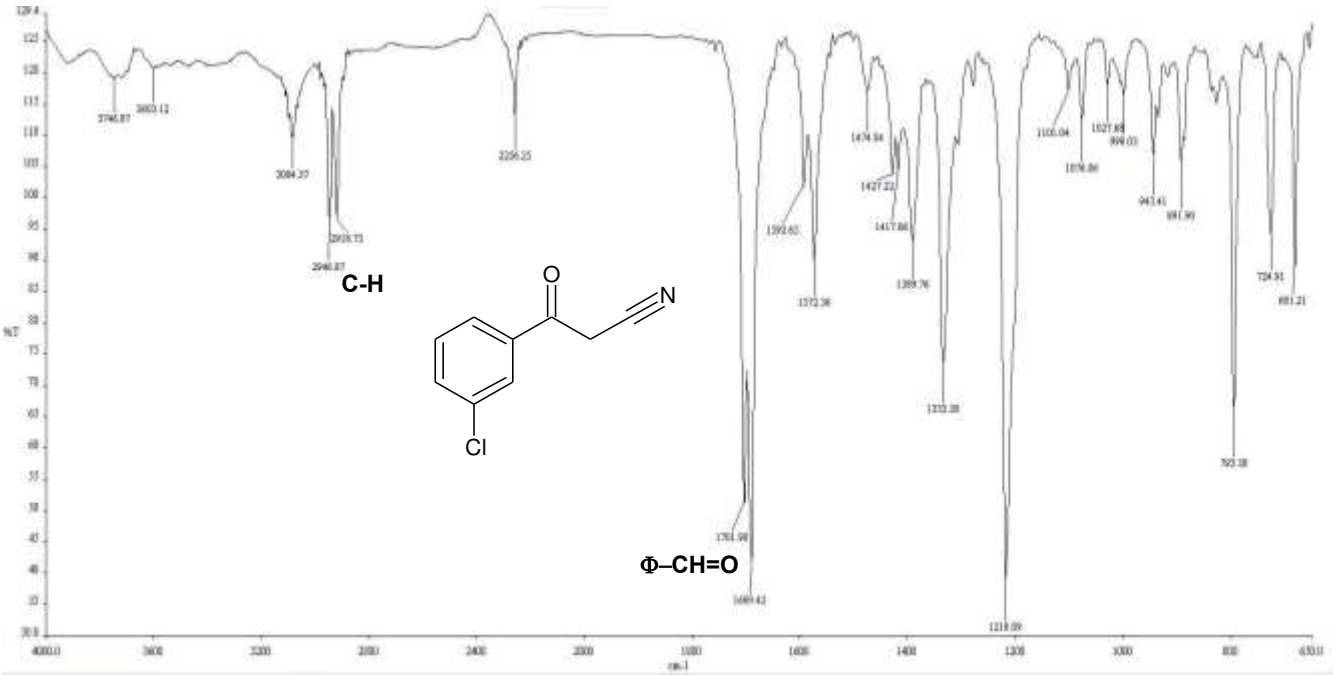
Anexo 6. Espectro de IR ($CHCl_3$) de 1-(4-piridil)etanol (***2c***). En donde se observa la señal que corresponde al enlace O-H a 3248cm^{-1}, C-H a 2977cm^{-1} y del enlace C-O a 1069cm^{-1}.



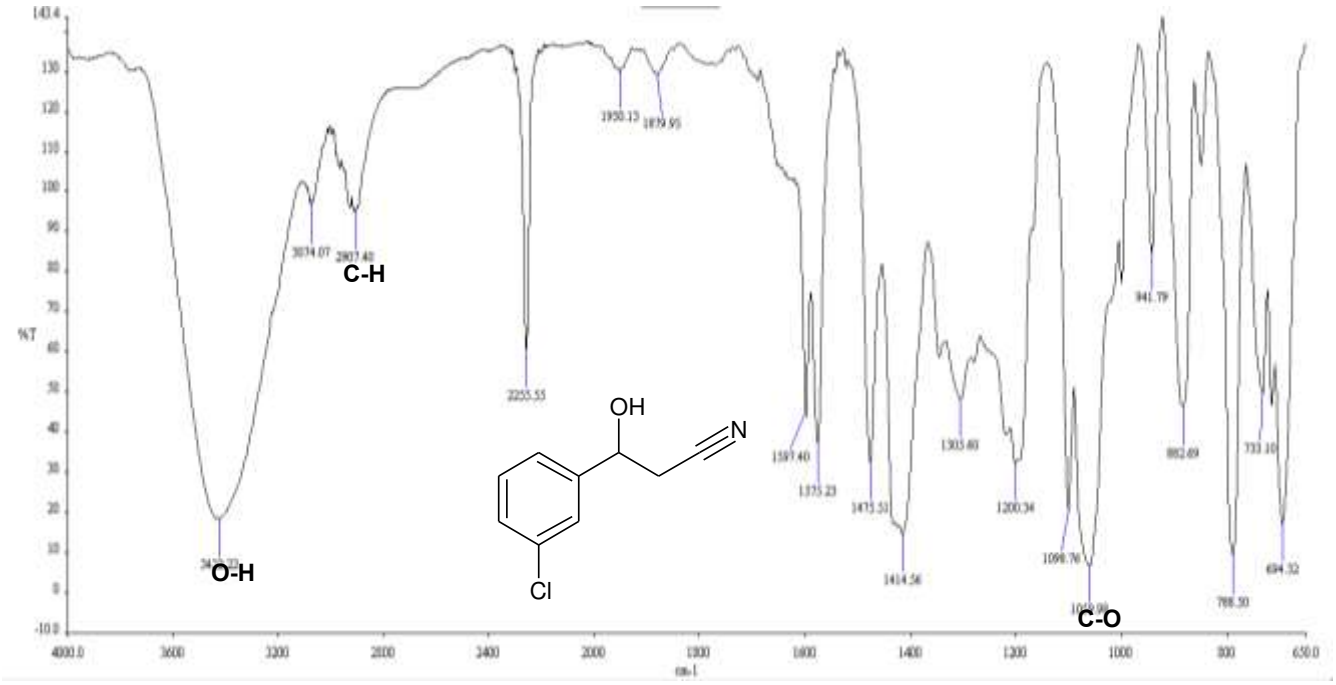
Anexo 7. Espectro de IR ($CHCl_3$) de 3-cloropropiofenona (***1d***). En donde se observa las señales de estiramiento del enlace ϕ–C-H a 3053cm^{-1}, así como del grupo carbonilo (ϕ-CH=O) a 1684cm^{-1}.



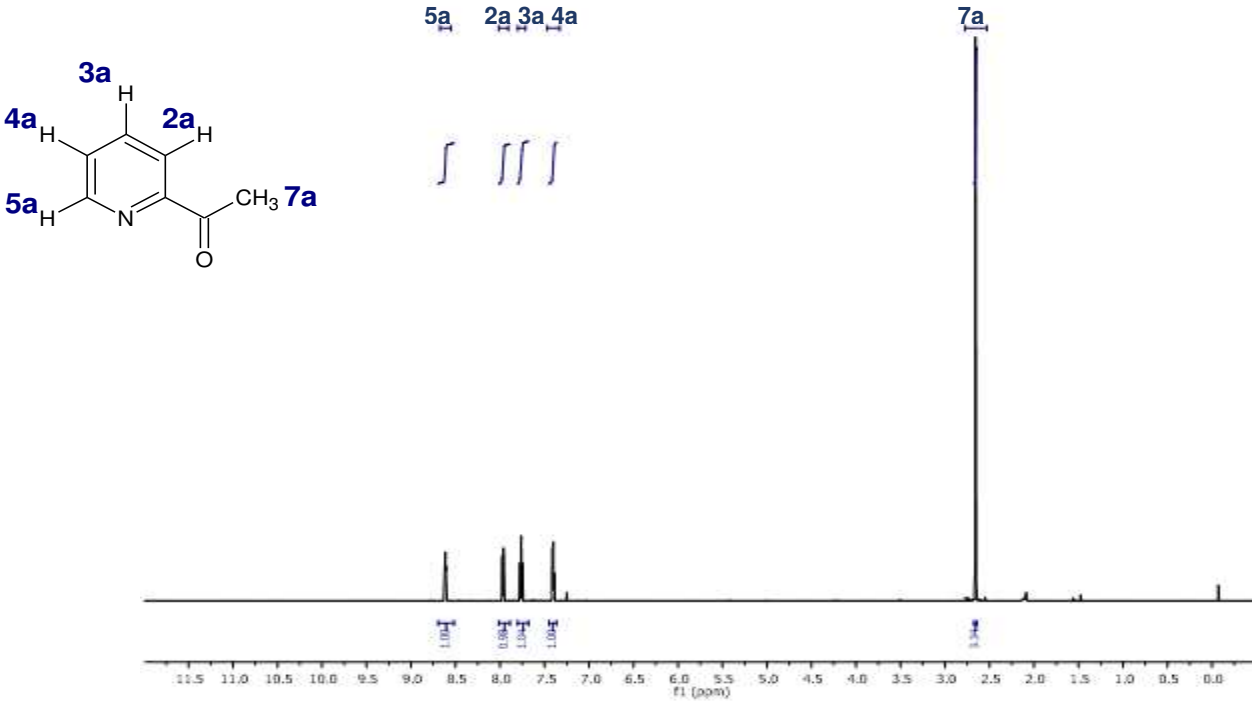
Anexo 8. Espectro de IR ($CHCl_3$) de 3-cloro-1-fenilpropanol (***2d***). En donde se observa la señal que corresponde al enlace O-H a 3477cm^{-1}, C-H a 2907cm^{-1} y del enlace C-O a 1102cm^{-1}.



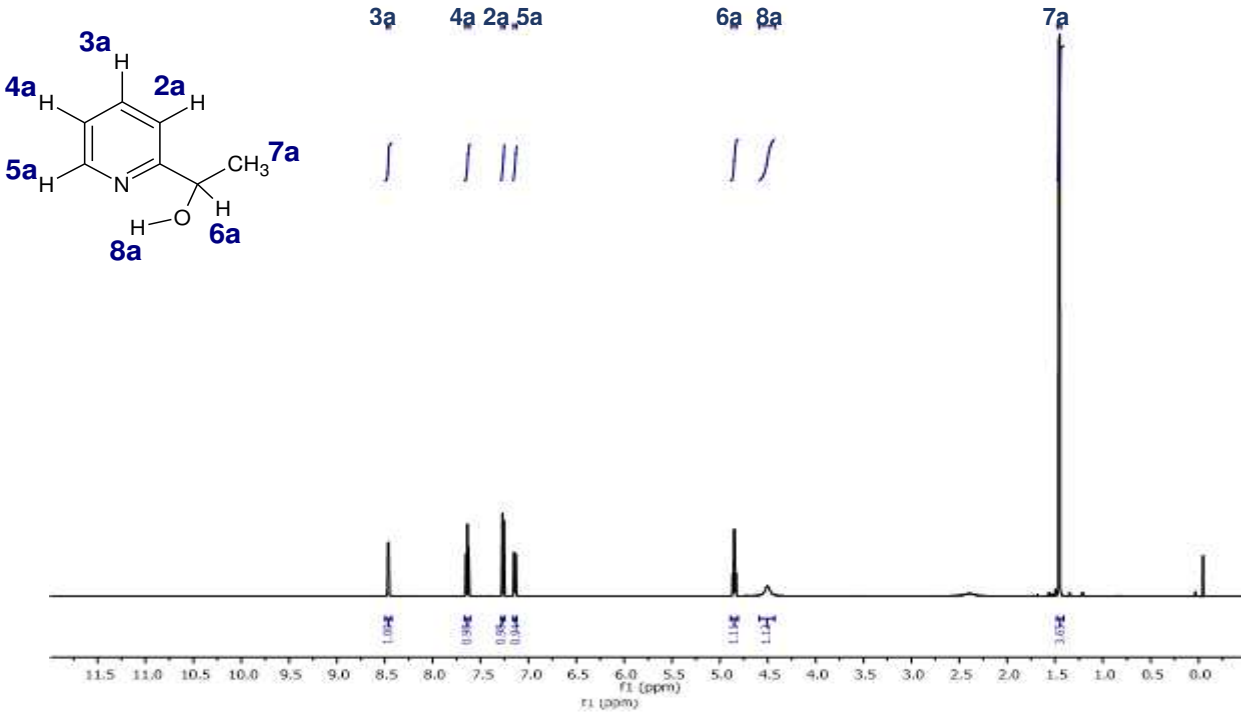
Anexo 9. Espectro de IR ($CHCl_3$) de 3-clorobenzoilacetonitrilo (***1e***). En donde se observa las señales de estiramiento del enlace ϕ–C-H a 29.46 y 2918cm^{-1}, así como del grupo carbonilo (ϕ-CH=O) a 1689cm^{-1}.



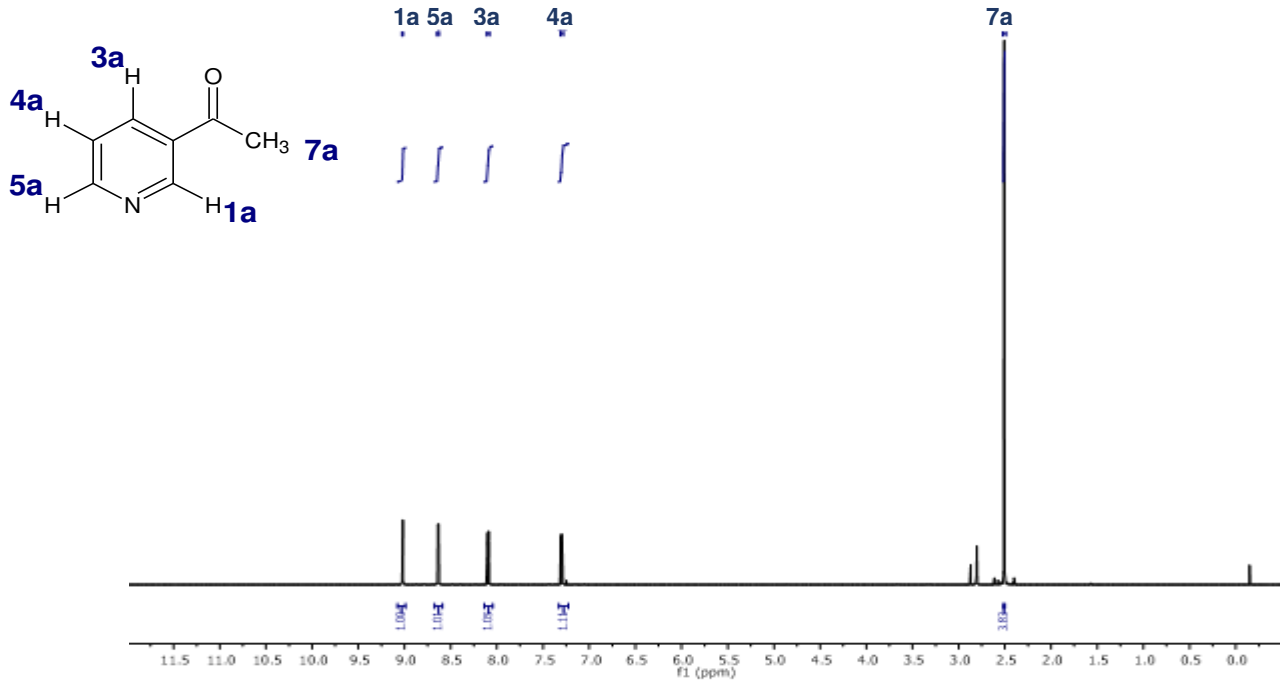
Anexo 10. Espectro de IR ($CHCl_3$) de 3-clorofenil-3-hidroxipropanonitrilo (***2e***). En donde se observa la señal que corresponde al enlace O-H a 3422cm^{-1}, C-H a 2907cm^{-1} y del enlace C-O a 1059cm^{-1}.



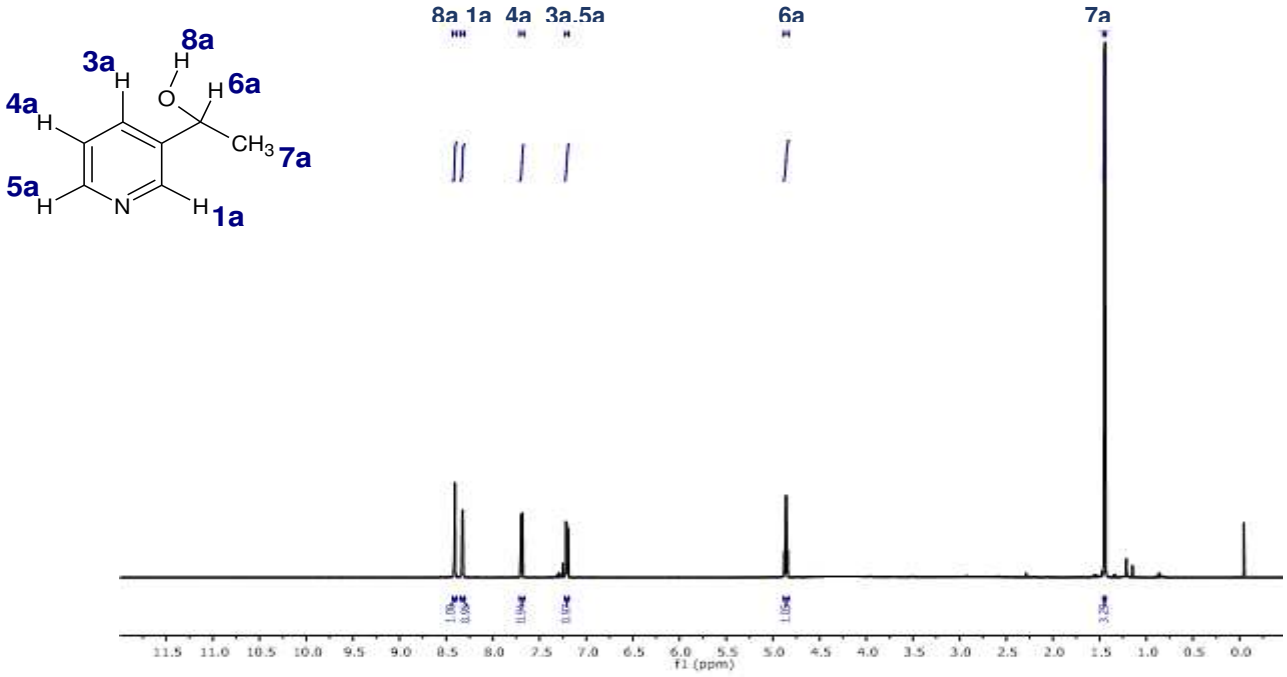
Anexo 11. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de 2-acetilpiridina (***1a***). δ 8.6 (dd, J=5.8, 1.4Hz, 1H), 7.9 (dd, J=9.0, 1.2Hz, 1H), 7.7 (td, J=7.7, 1.4Hz, 1H), 7.4–7.3 (m, 1H), 2.6 (s, J=4.2Hz, 3H).



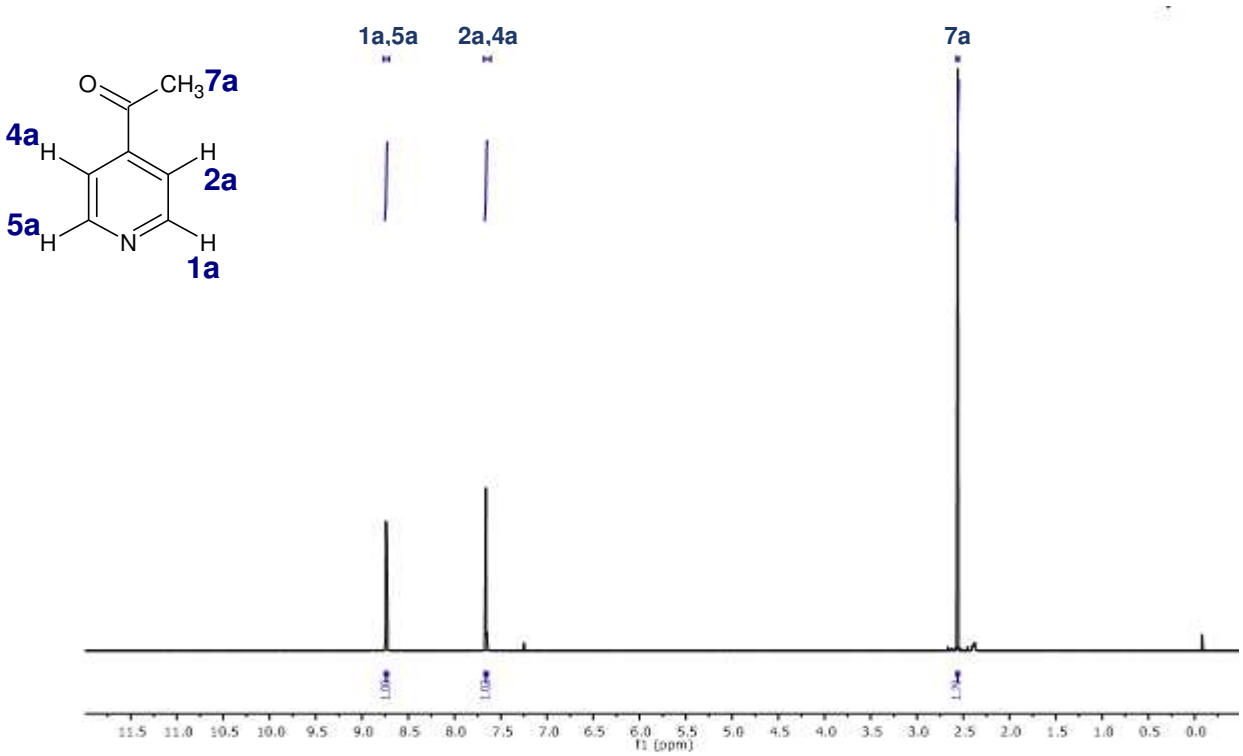
Anexo 12. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de 1-(2-piridil)etanol (***2a***). δ 8.4 (d, J=4.9Hz, 1H), 7.6 (td, J=7.7, 1.7Hz, 1H), 7.2 (dd, J=7.9, 0.5Hz, 1H), 7.1–7.1 (m, 1H), 4.8 (q, J=6.6Hz, 1H), 4.5 (s, 1H), 1.4 (d, J=6.6 Hz, 3H).



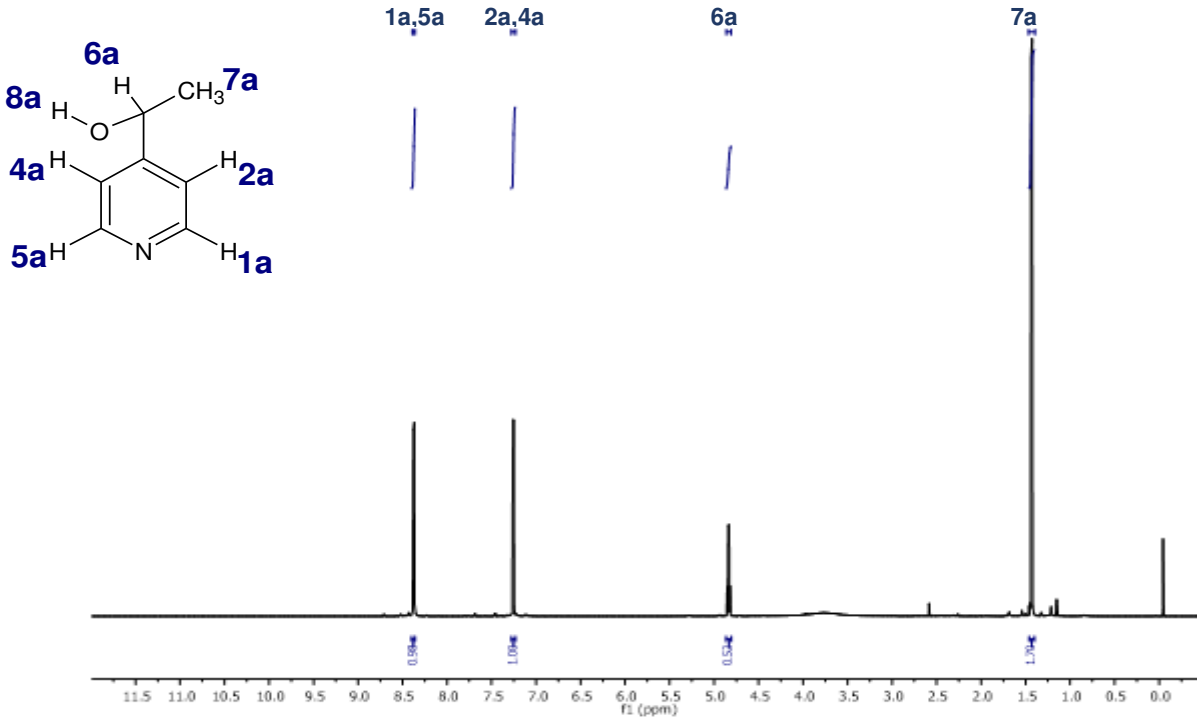
Anexo 13. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de 3-acetilpiridina (***1b***). δ 9.0 (dd, J=2.3, 0.8Hz, 1H), 8.6 (dd, J=4.8, 1.7Hz, 1H), 8.1 (dt, J=7.5, 1.5Hz 1H), 7.3 (ddd, J=8.0, 4.8, 0.9Hz, 1H), 2.5 (s, J=2.9Hz, 3H).



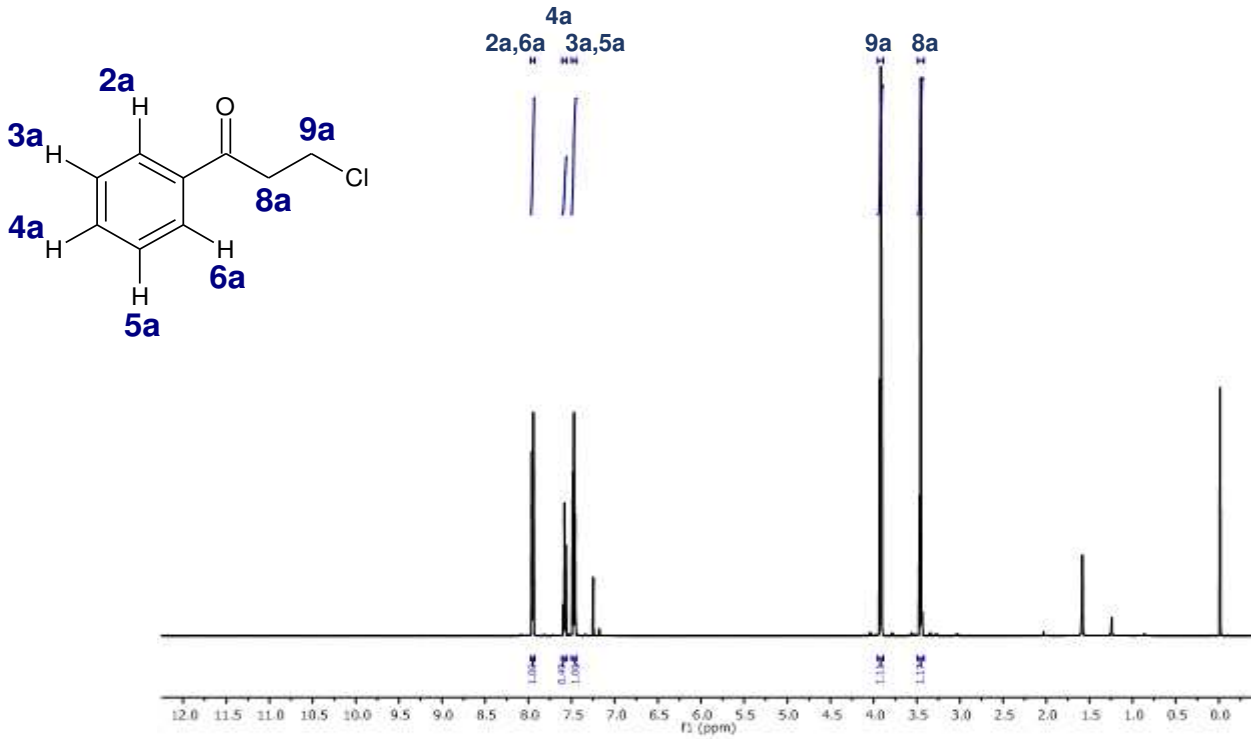
Anexo 14. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de 1-(3-piridil)etanol (***2b***). δ 8.4 (d, J=2.1Hz, 1H), 8.3 (dd, J=4.8, 1.6Hz, 1H), 7.6 (dt, J=7.8, 1.7Hz, 1H), 7.49-7.24 (m, 2H), 4.8 (q, J=6.5Hz, 1H), 1.4 (d, J=6.5Hz, 3H).



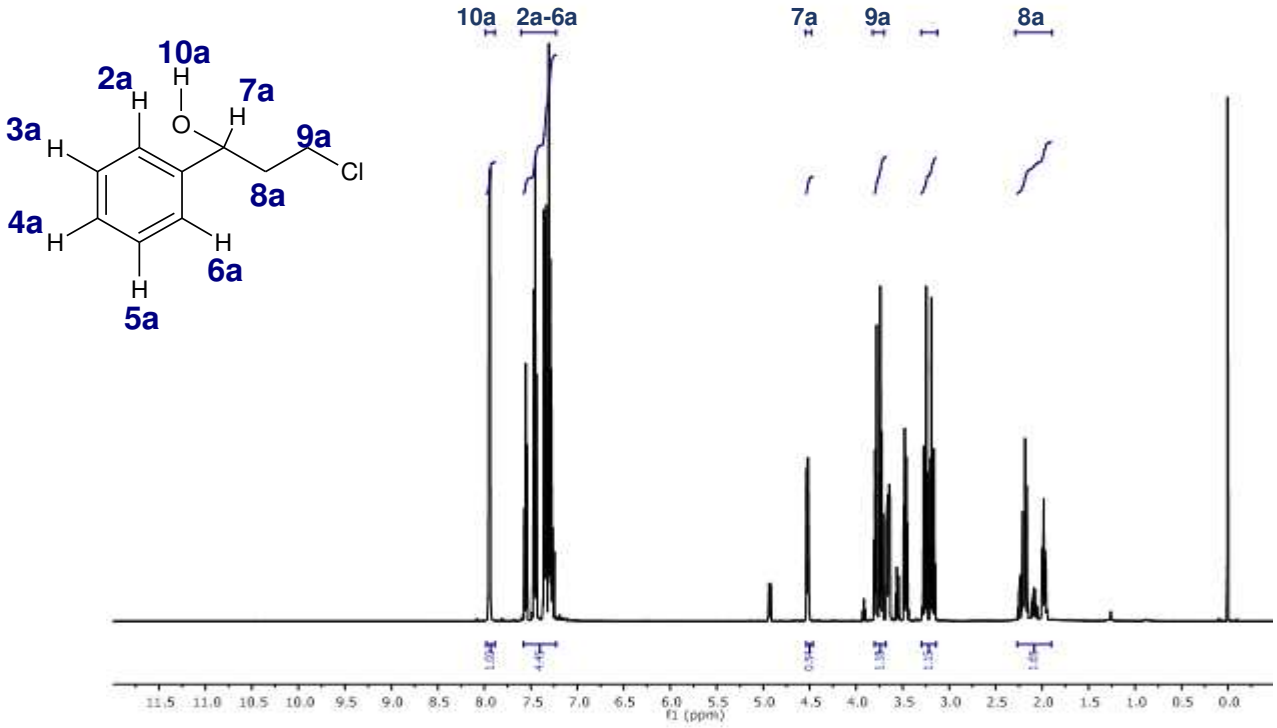
Anexo 15. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de 4-acetilpiridina (***1c***). δ 8.7–8.7 (m, 2H), 7.6–7.6 (m, 2H), 2.5 (s, J = 1.3Hz, 3H).



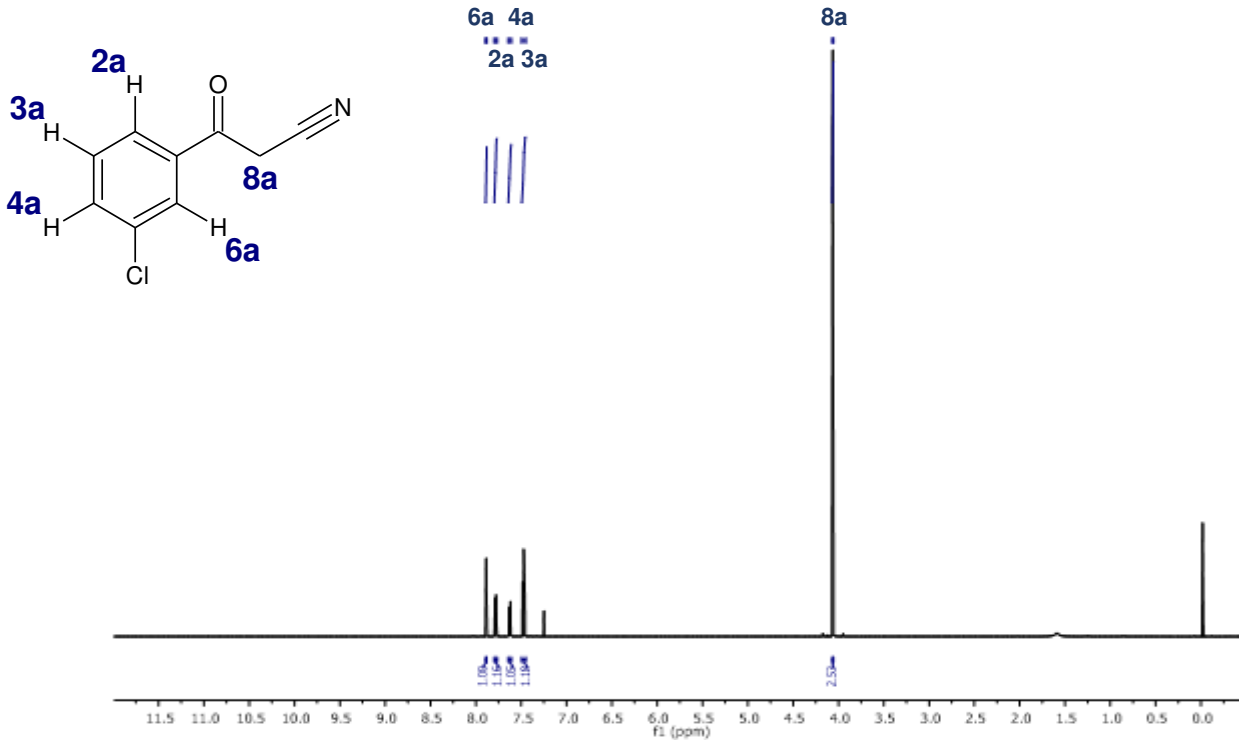
Anexo 16. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de 1-(4-piridil)etanol (***2c***). δ 8.3 (dd, J=4.6, 1.5Hz, 2H), 7.2 (dd, J=4.8, 1.3Hz, 2H), 4.8 (q, J=6.6Hz, 1H), 1.4 (d, J=6.6Hz, 3H).



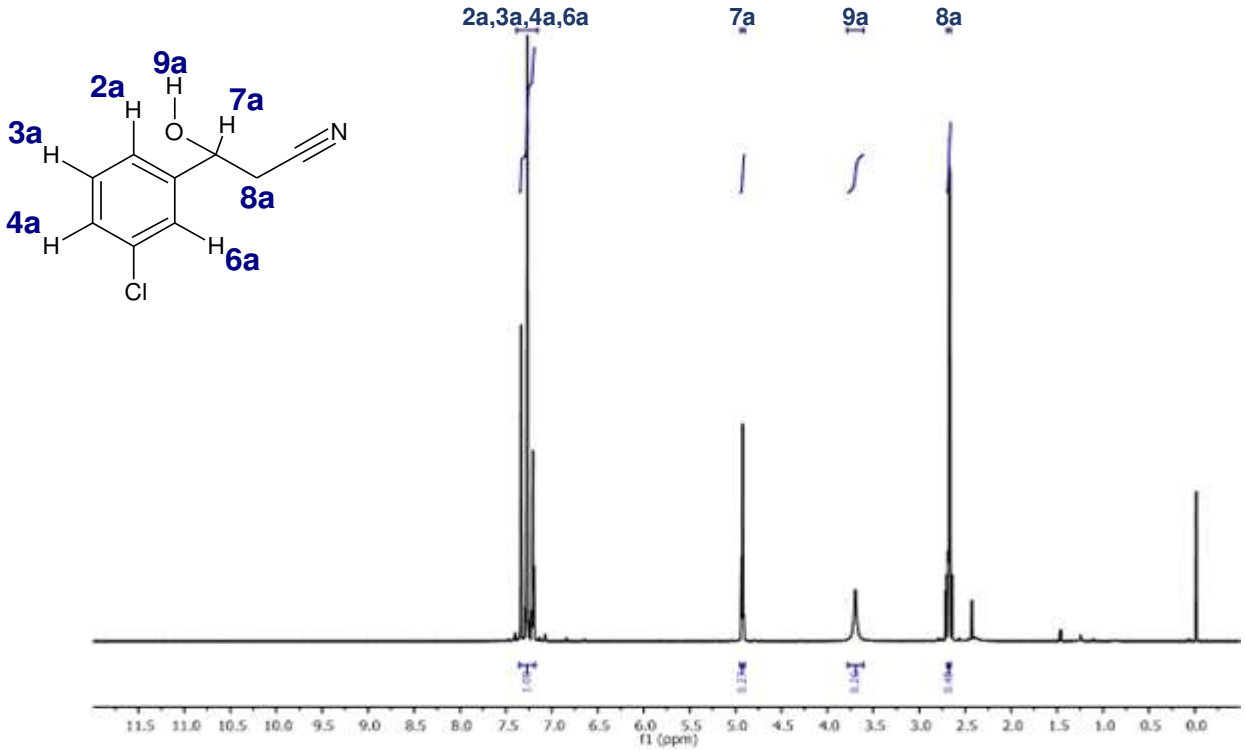
Anexo 17. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de 3-cloropropiofenona (***1d***). δ 7.9 (dd, J=8.4, 1.2Hz, 2H), 7.6–7.5 (m, 1H), 7.4 (t, J=7.8Hz, 2H), 3.9 (t, J=6.8Hz, 2H), 3.4 (t, J=6.8Hz, 2H).



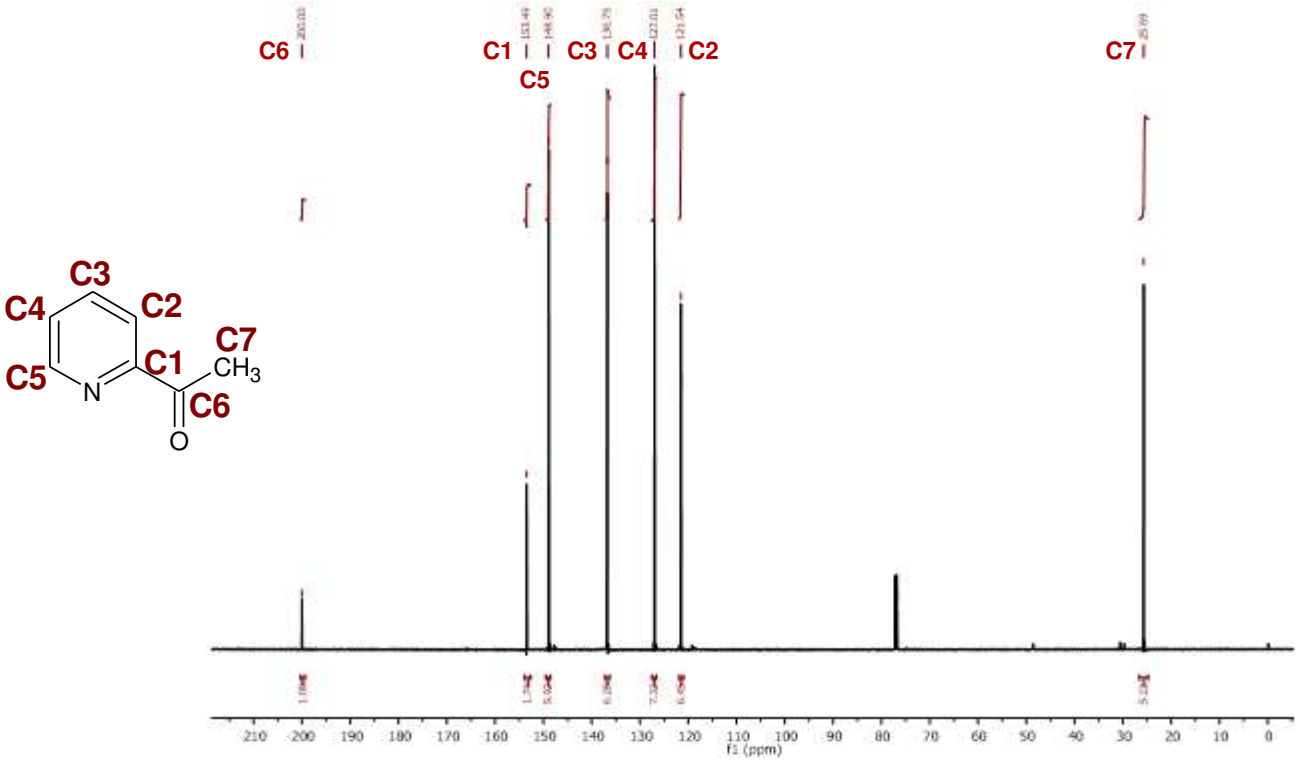
Anexo 18. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de 3-cloro-1-fenilpropanol (***2d***). δ 7.9 (dd, J=8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.6–7.2 (m, 5H), 4.5–4.4 (m, 1H), 3.8–3.7 (m, 2H), 2.3–1.8 (m, 2H).



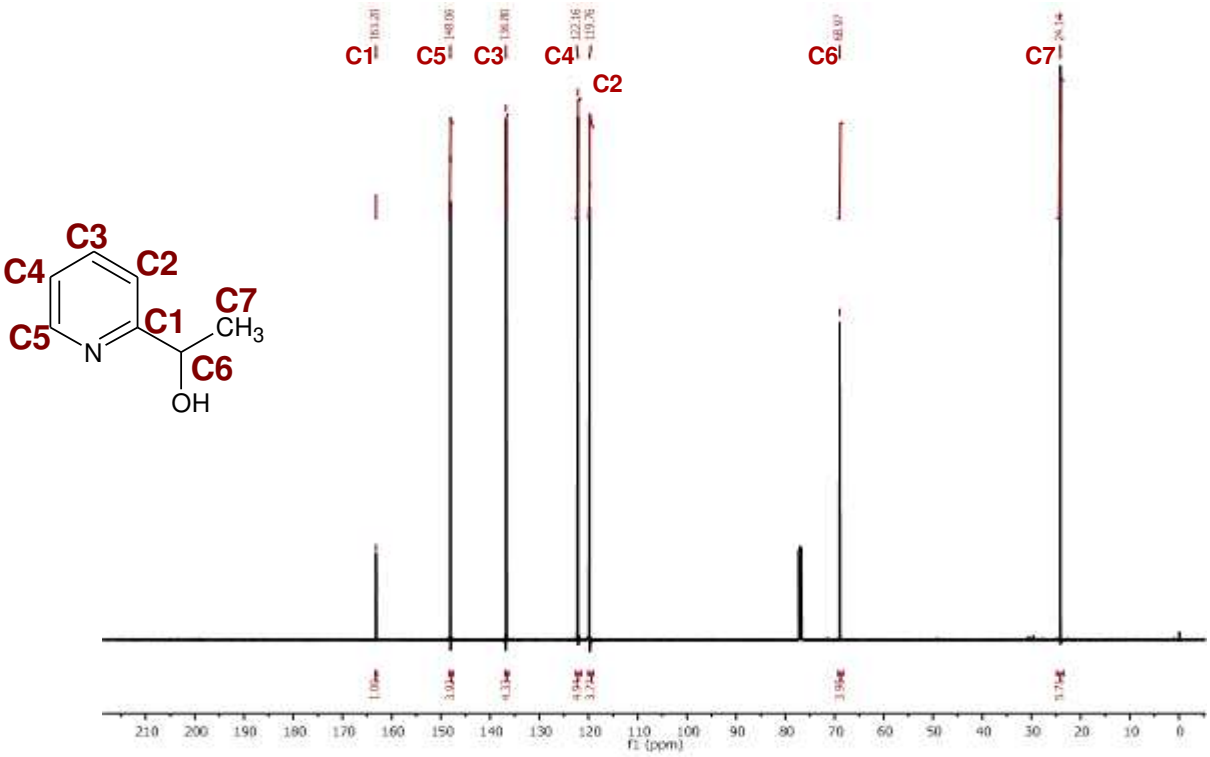
Anexo 19. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de 3-clorobenzoilacetonitrilo (***1e***). δ 7.8 (t, J=1.8Hz, 1H), 7.7 (ddd, J=7.8, 1.6, 1.1Hz, 1H), 7.6–7.6 (m, 1H), 7.4 (t, J=8.0Hz, 1H), 4.0 (s, 2H).



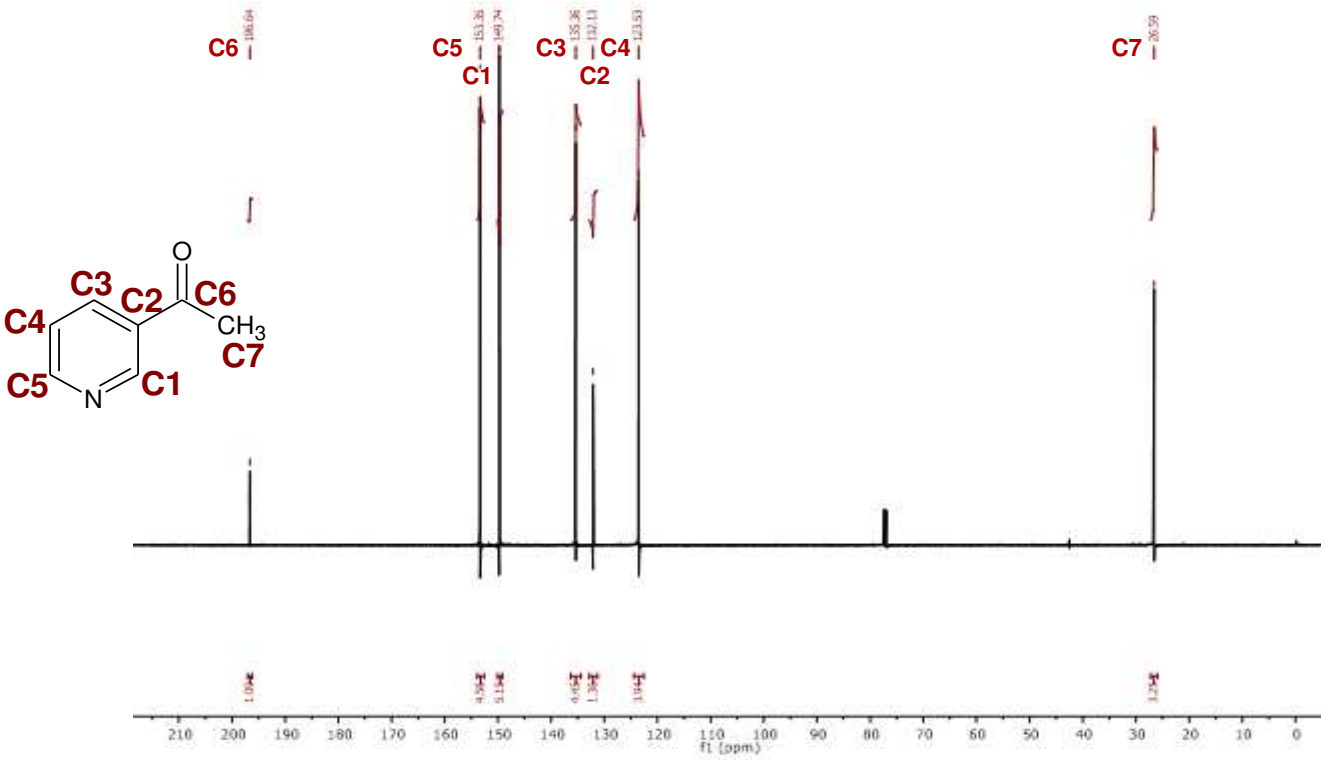
Anexo 20. Espectro de ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) de 3-clorofenil-3-hidroxipropanonitrilo (***2e***). δ 7.3–7.1 (m, 4H), 4.9 (t, J=6.5Hz, 1H), 3.7 (s, 1H), 2.6 (dd, J=6.1, 3.7Hz, 2H).



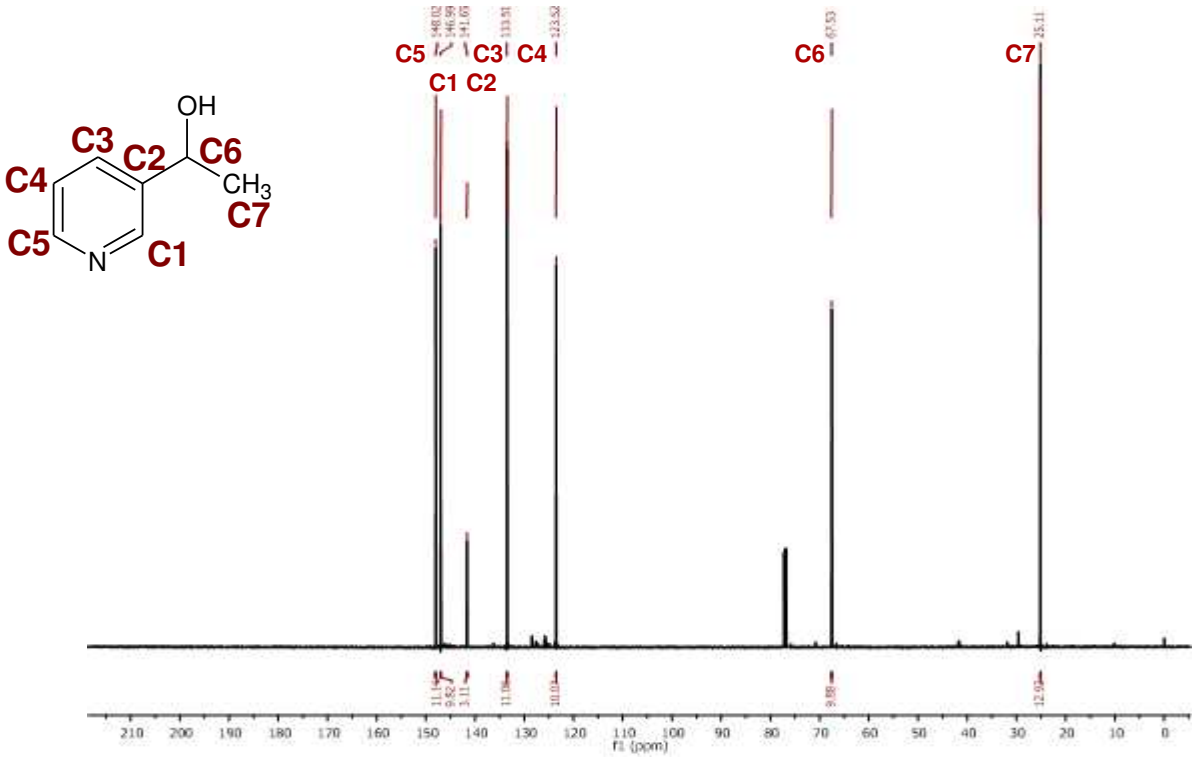
Anexo 21. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de 2-acetilpiridina (***1a***). δ 200.00, 153.49, 148.90, 136.75, 127.01, 121.54, 25.69.



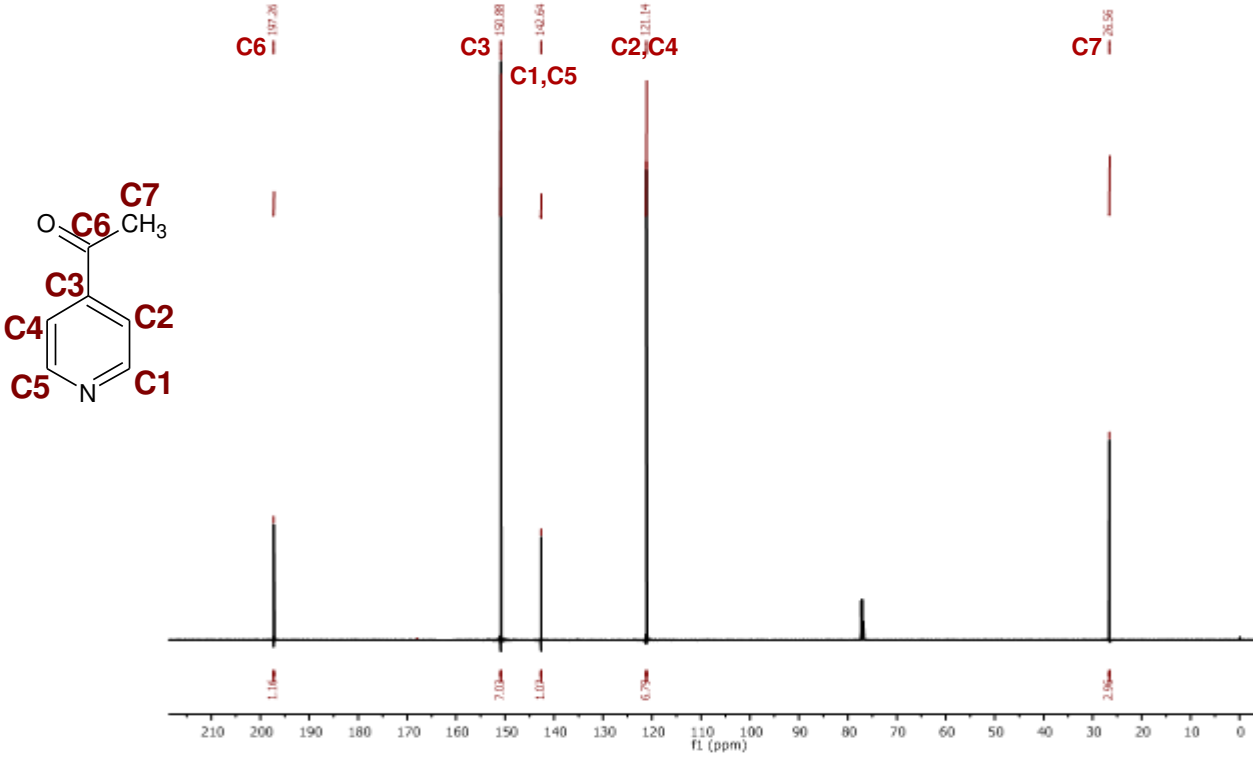
Anexo 22. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de 1-(2-piridil)etanol (***2a***). δ 163.20, 148.06, 136.80, 122.16, 119.76, 68.97, 24.14.



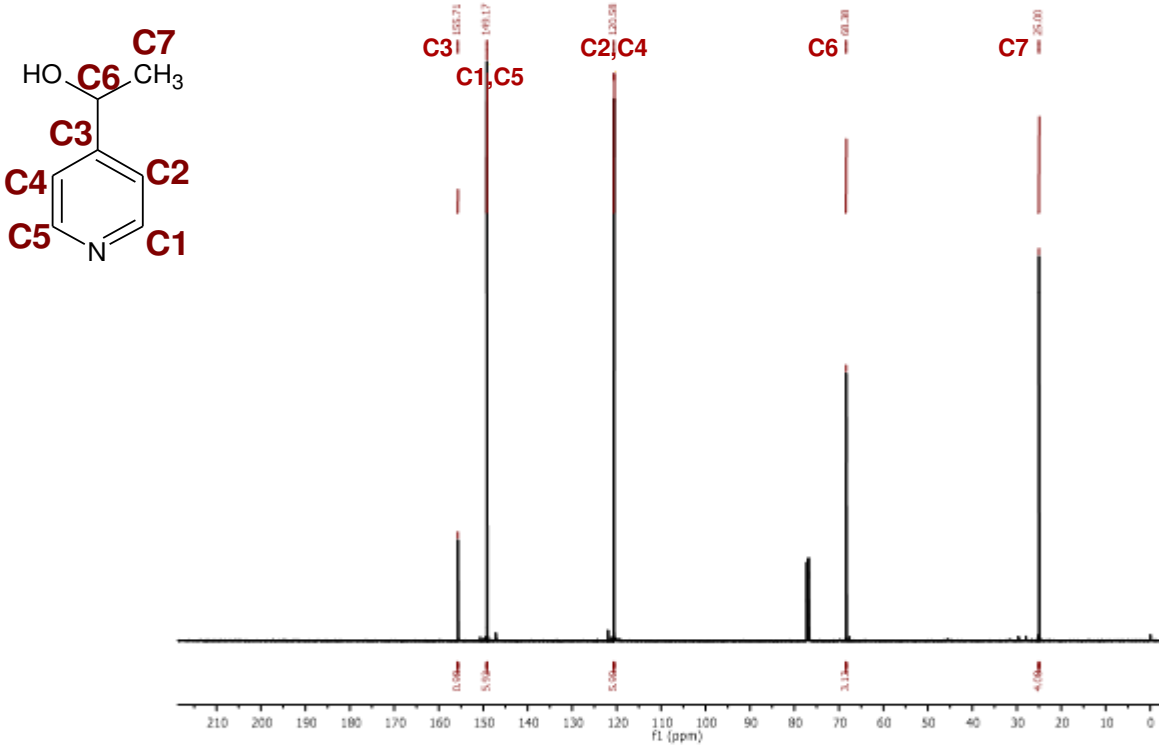
Anexo 23. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de 3-acetilpiridina (***1b***). δ 196.64, 153.35, 149.74, 135.36, 132.13, 123.53, 26.59.



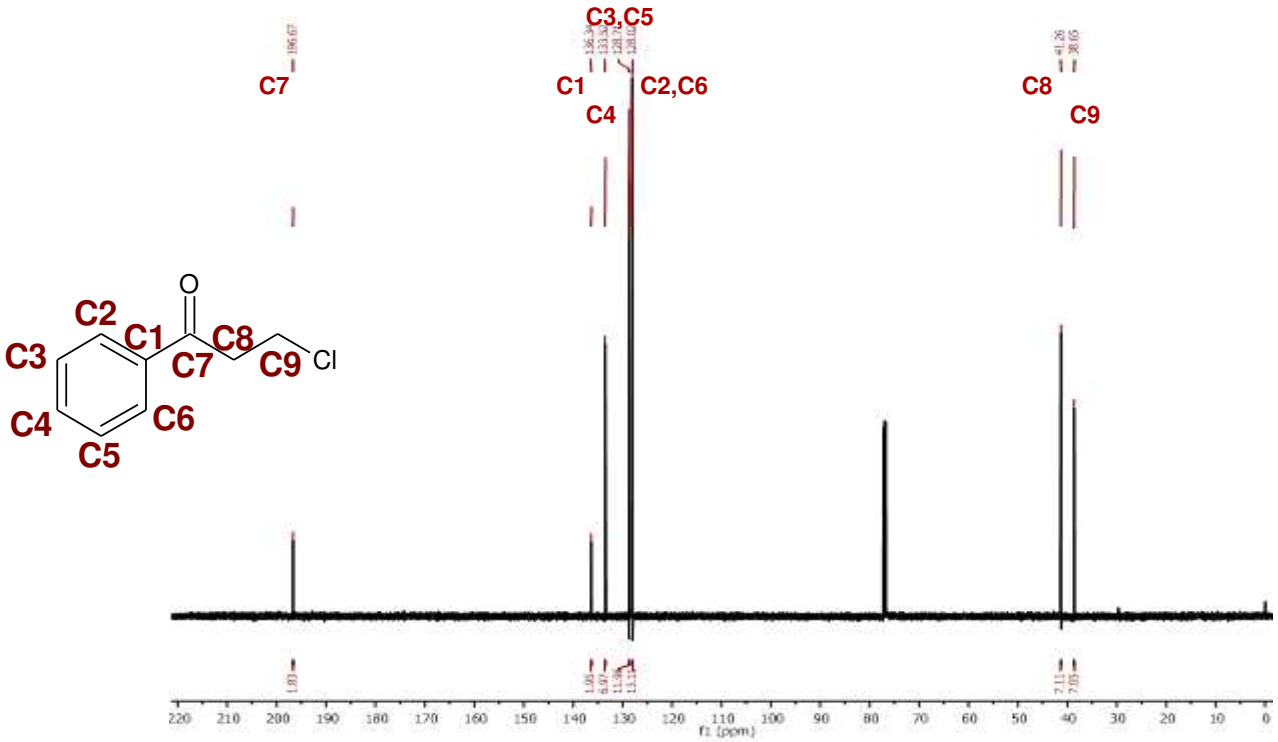
Anexo 24. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de 1-(3-piridil)etanol (***2b***). δ 148.02, 146.99, 141.65, 133.51, 123.52, 67.53, 25.11.



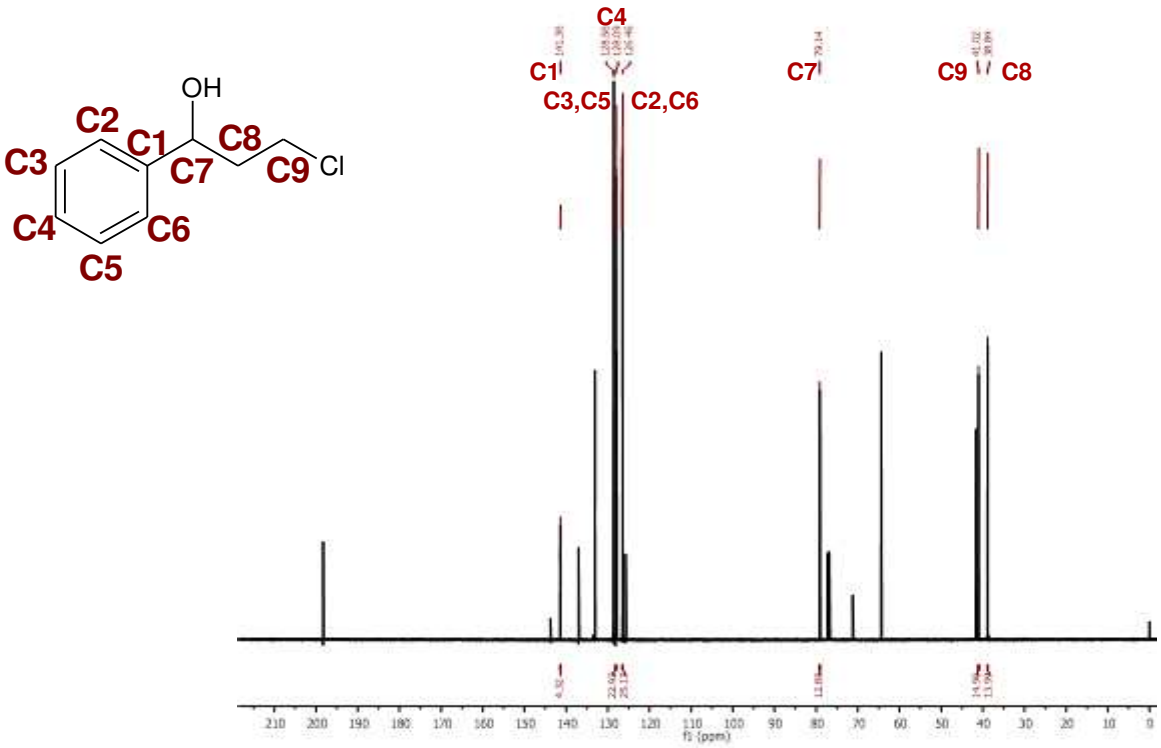
Anexo 25. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de 4-acetilpiridina (***1c***). δ 197.26, 150.88, 142.64, 121.14, 26.56.



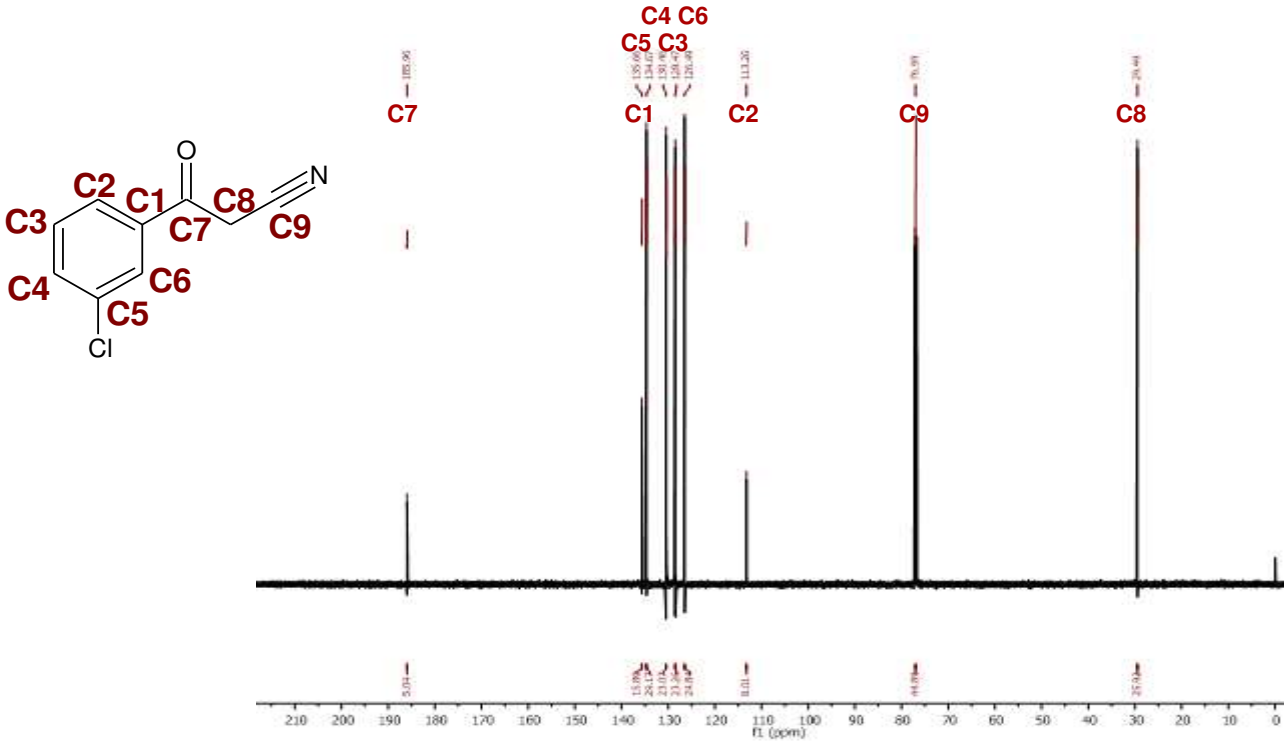
Anexo 26. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de 1-(4-piridil)etanol (***2c***). δ 155.71, 149.17, 120.58, 68.38, 25.00.



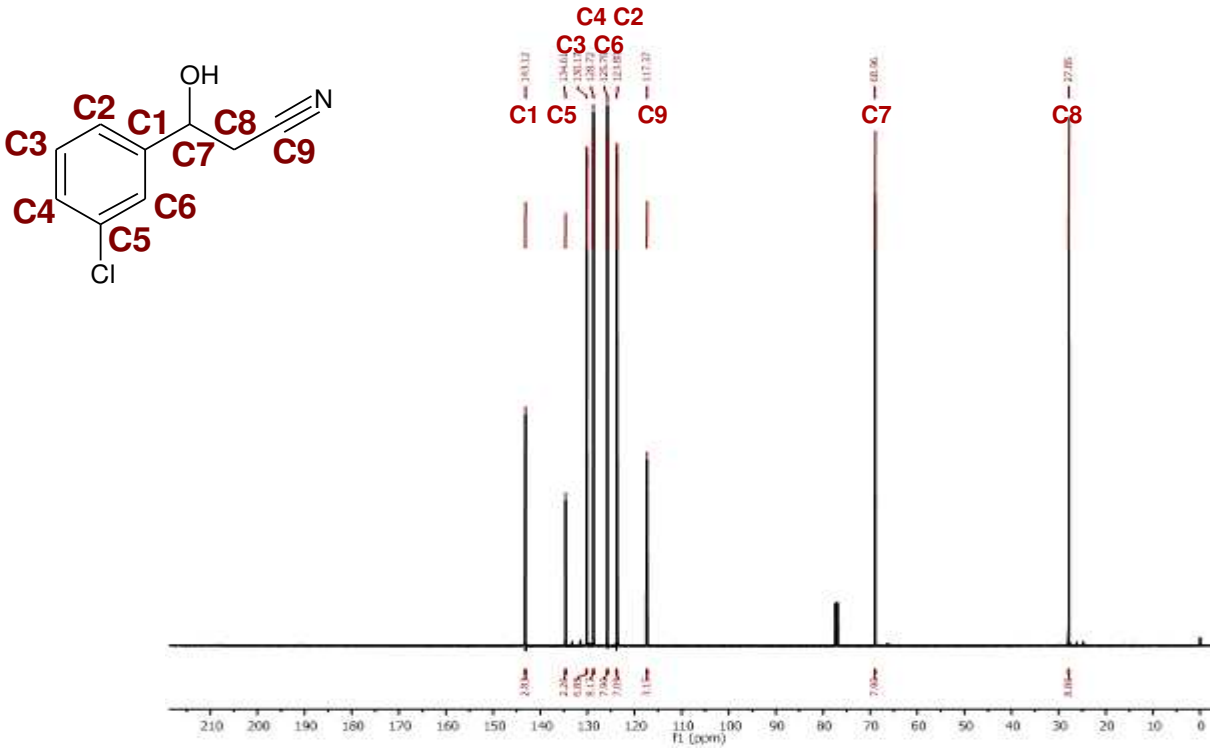
Anexo 27. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de 3-cloropropiofenona (***1d***). δ 196.67, 136.34, 133.52, 128.71, 128.02, 41.26, 38.65.



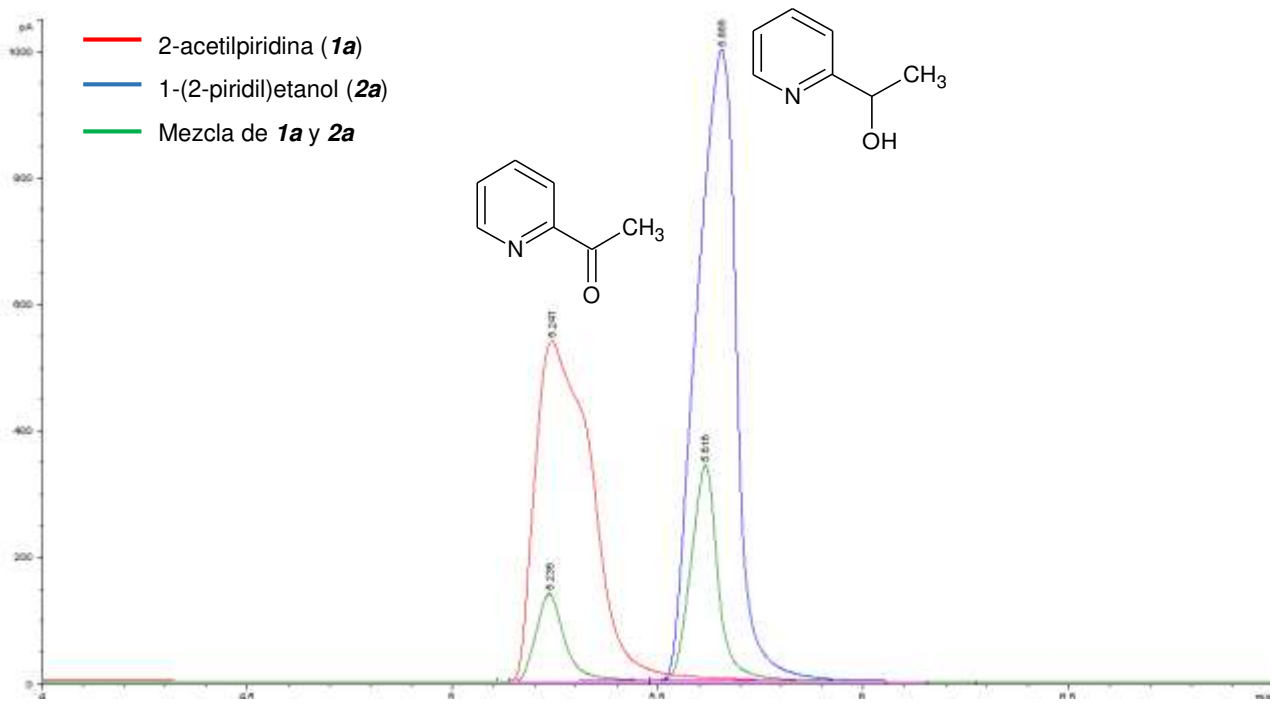
Anexo 28. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de 3-cloro-1-fenilpropanol (***2d***). δ 141.36, 128.56, 128.09, 126.46, 79.14, 41.02, 38.84.



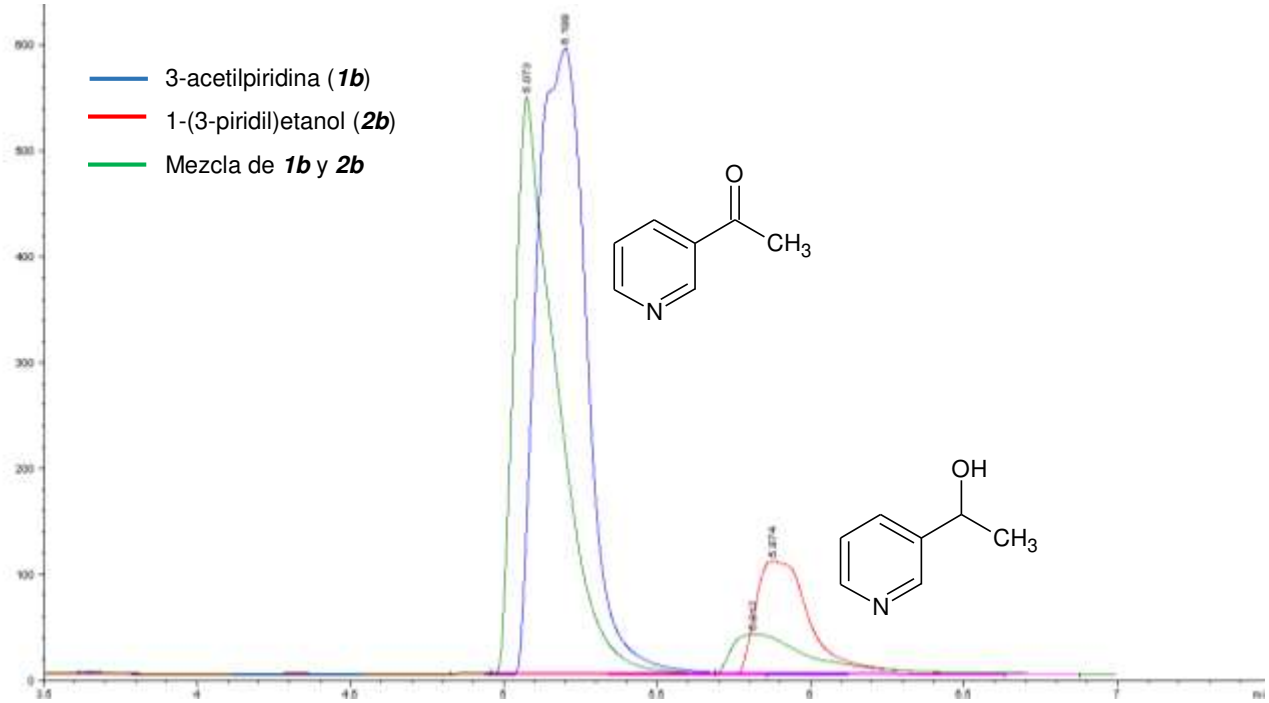
Anexo 29. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de 3-clorobenzoilacetonitrilo (***1e***). δ 185.96, 135.66, 134.67, 130.46, 128.47, 126.49, 113.26, 76.99, 29.49.



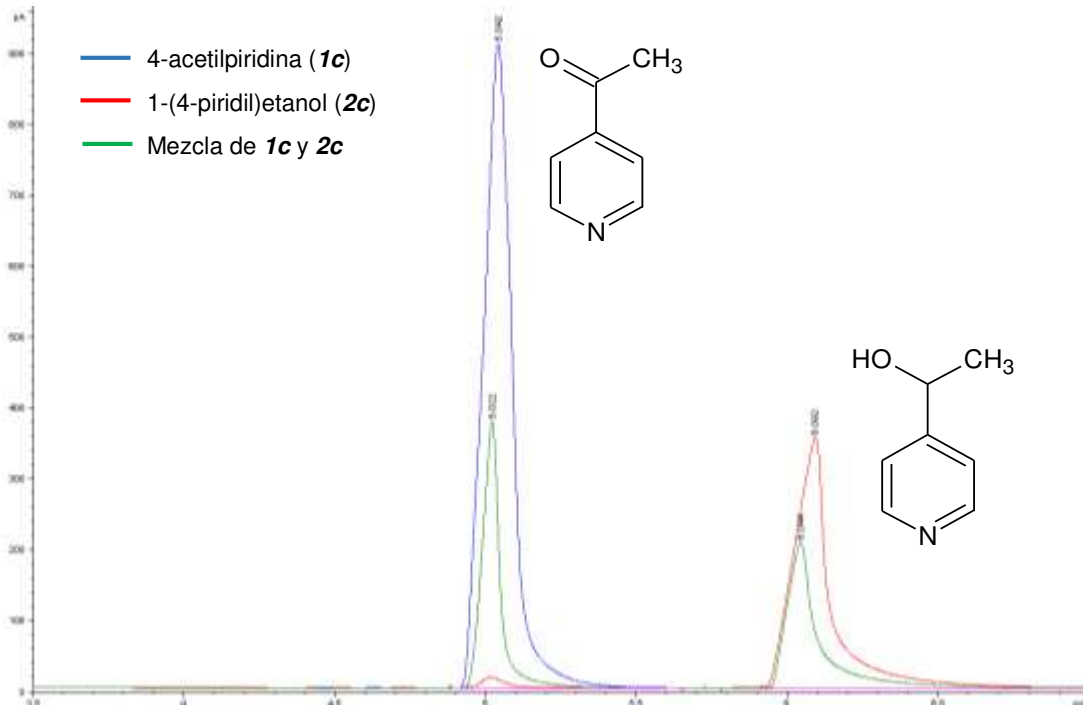
Anexo 30. Espectro de ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) de 3-clorofenil-3-hidroxipropanonitrilo (***2e***). δ 143.12, 134.61, 130.17, 128.72, 125.76, 123.80, 117.37, 68.96, 27.85.



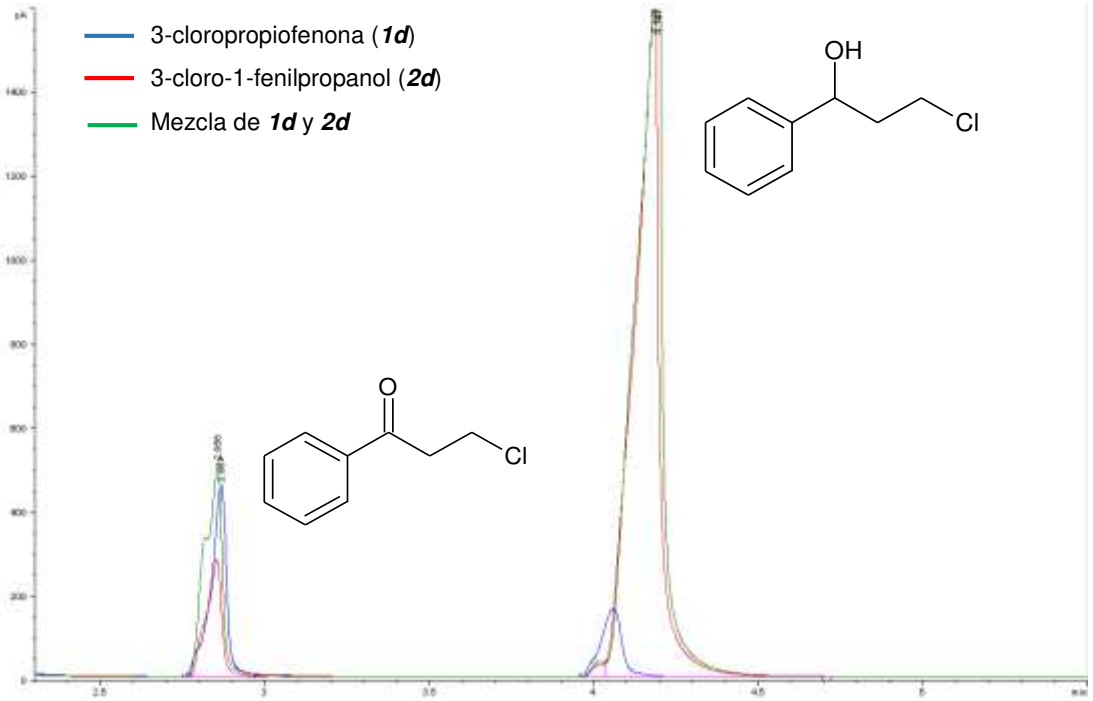
Anexo 31. Cromatograma por GC de 2-acetilpiridina (***1a***) y 1-(2-piridil)etanol (**2*a***). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 5.235 min para ***1a*** y 5.616 min para ***2a***.



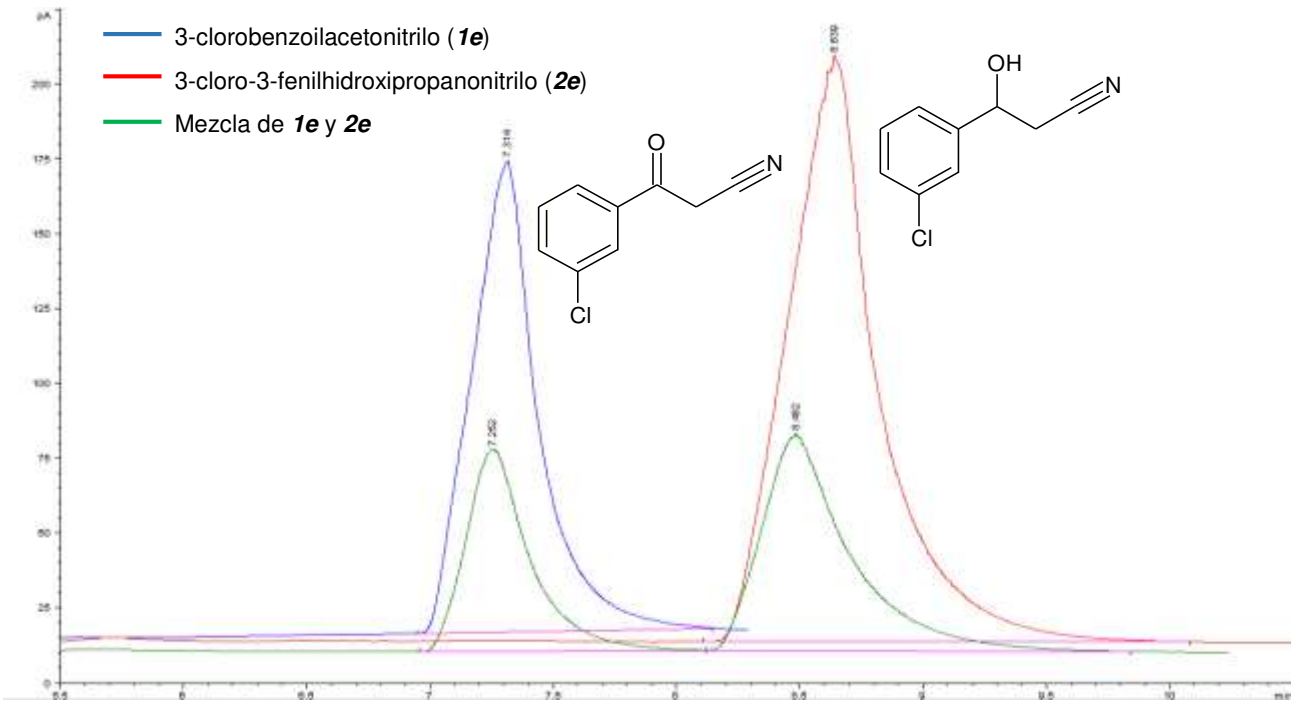
Anexo 32. Cromatograma por CG de 3-acetilpiridina (***1b***) y 1-(3-piridil)etanol (**2*b***). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 5.073 min para ***1b*** y 5.812 min para ***2b***.



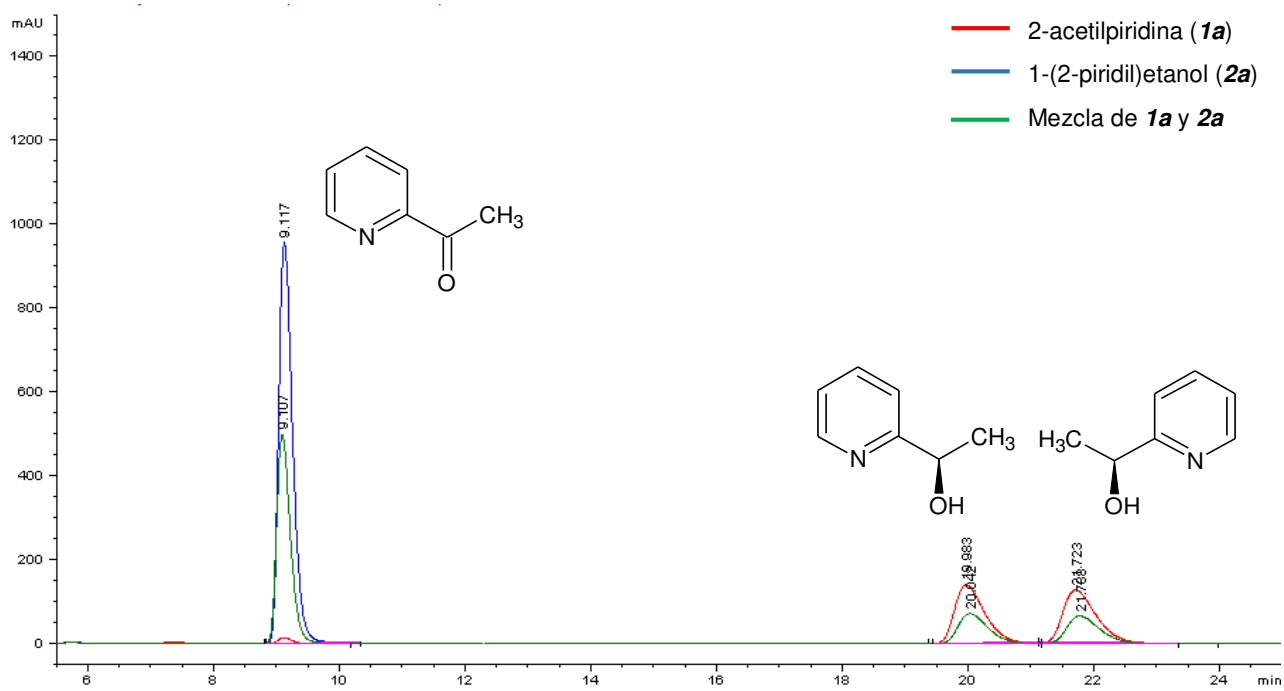
Anexo 33. Cromatograma por CG de 4-acetilpiridina (***1c***) y 1-(4-piridil)etanol (**2*c***). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 5.022 min para ***1c*** y 6.044 min para ***2c***.



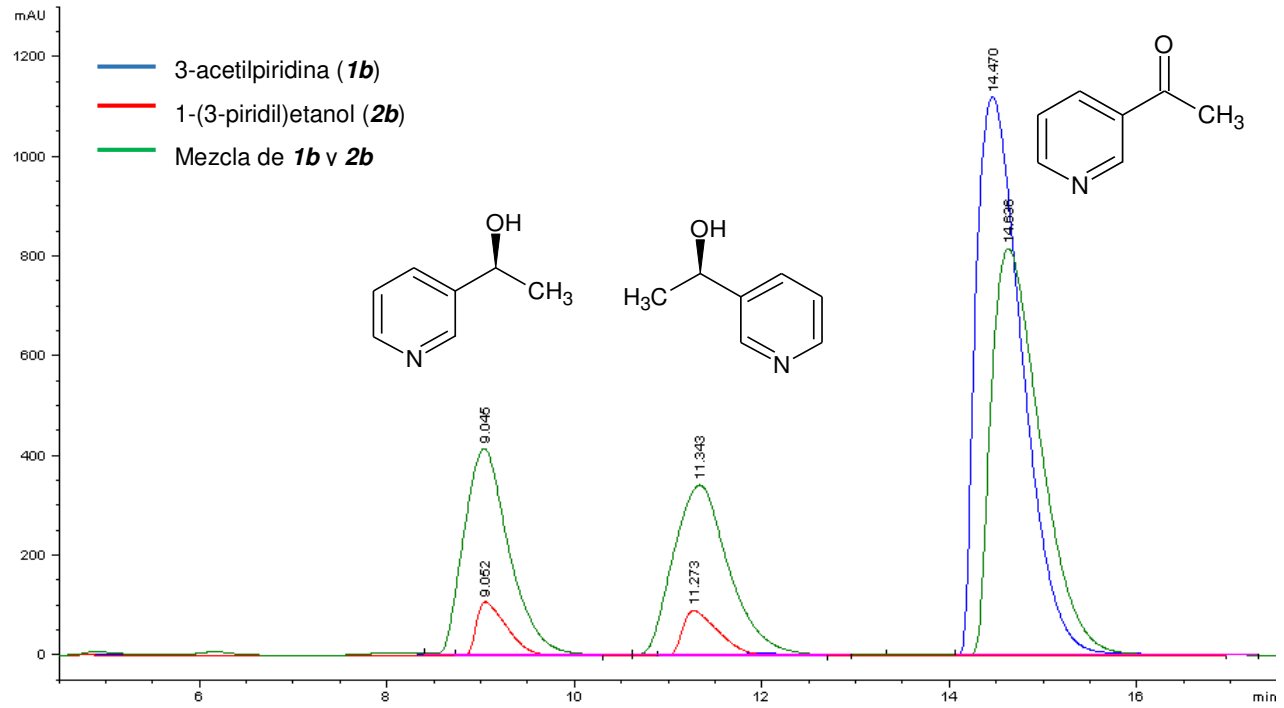
Anexo 34. Cromatograma por CG de 3-cloropropiofenona (***1d***) y 3-cloro-1-fenilpropanol (**2*d***). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 2.856 min para ***1d*** y 4.197 min para ***2d***.



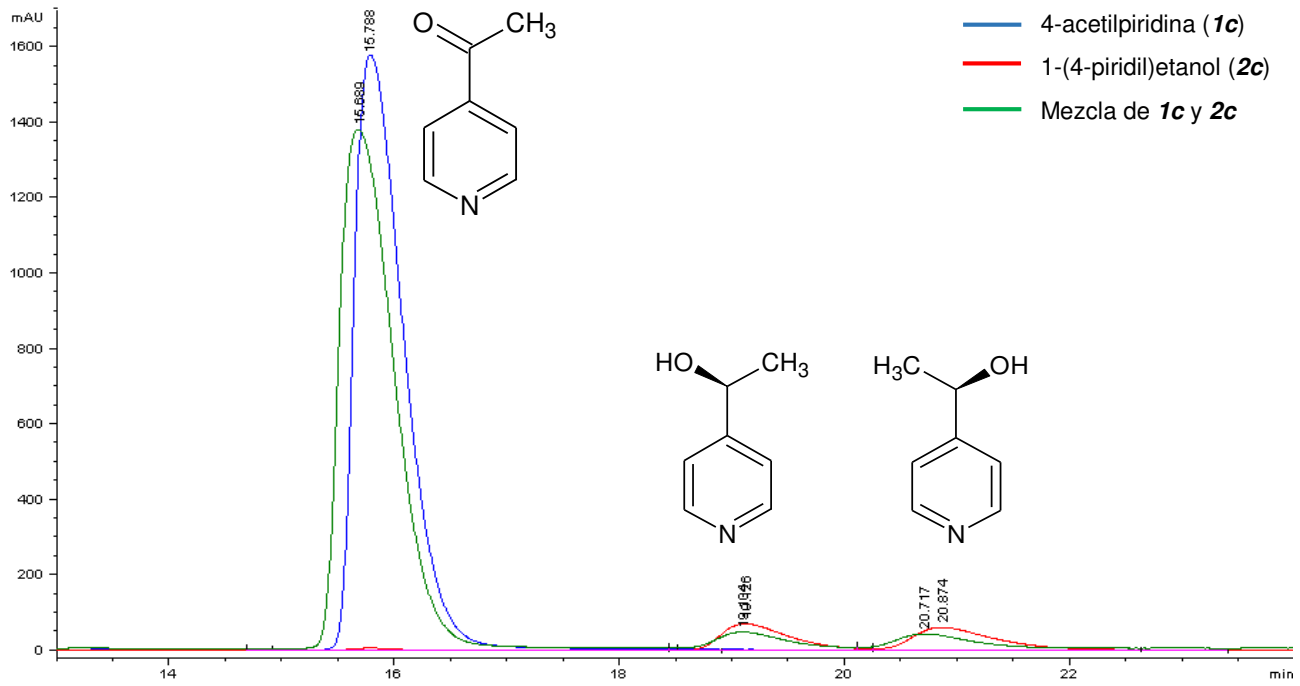
Anexo 35. Cromatograma por CG de 3-clorobenzoilacetonitrilo (***1e***) y 3-clorofenil-3-hidroxipropanonitrilo (***2e***). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 7.250 min para ***1e*** y 8.481 min para ***2e***.[48]



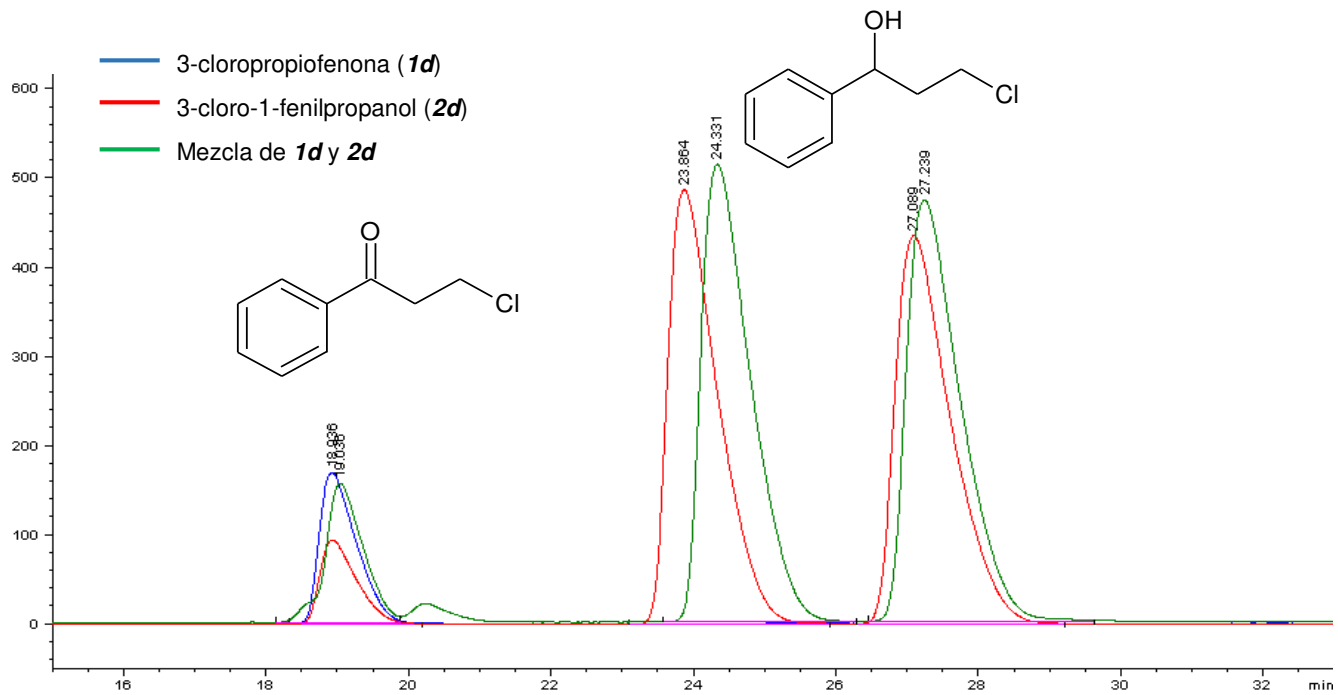
Anexo 36. Cromatograma por CLAR quiral de 2-acetilpiridina (***1a***) y 1-(2-piridil)etanol (***2a***). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 9.107 min para ***1a***, 20.042 min para (*R*)-***2a*** y 21.788 min para (*S*)-***2a***.



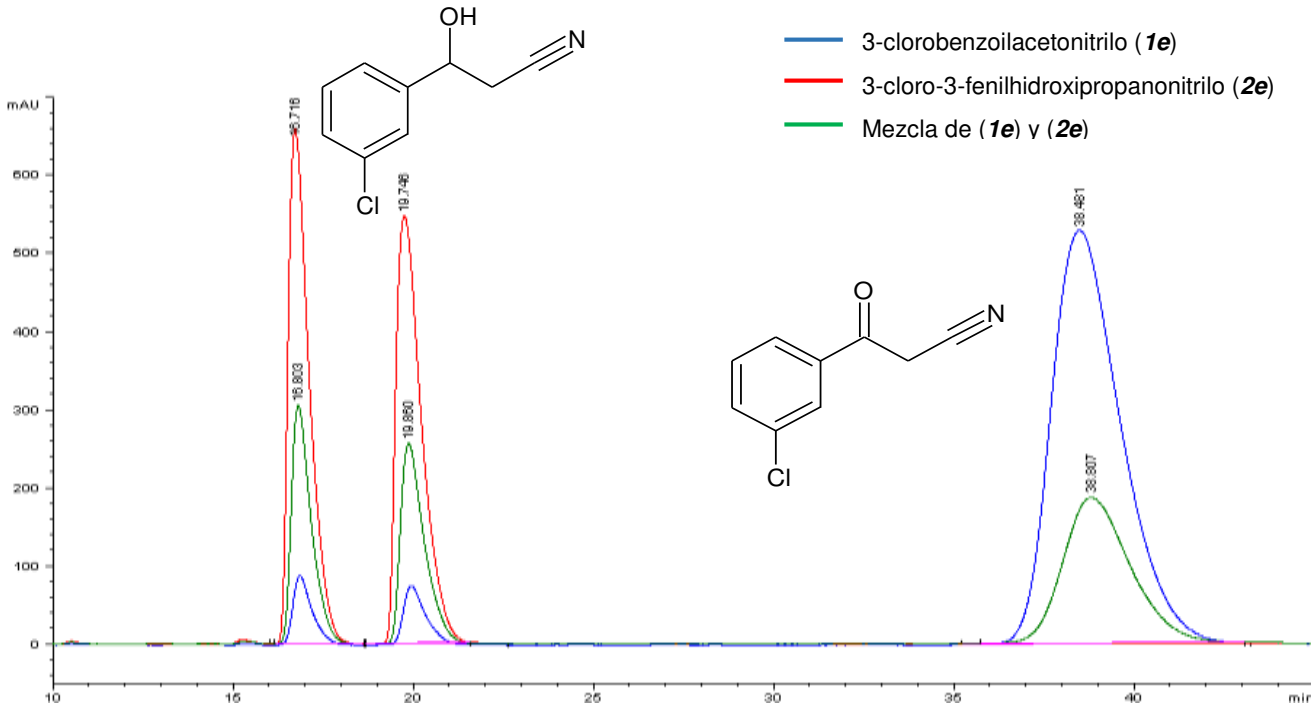
Anexo 37. Cromatograma con CLAR quiral de 3-acetilpiridina (***1b***) y 1-(3-piridil)etanol (**2*b***). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 9.045 min para (*S*)-***2b***, 11.343 min para (*R*)-***2b*** y 14.636 min para ***1b***.[46]



Anexo 38. Cromatograma de CLAR quiral de 4-acetilpiridina (***1c***) y 1-(4-piridil)etanol (**2*c***). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 13.204 min para ***1c***, 17.382 min para (*S*)-***2c*** y 21.133 min para (*R*)-***2c***.[16]



Anexo 39. Cromatograma de CLAR quiral de 3-cloropropiofenona (***1d***) y 3-cloro-1-fenilpropanol (***2d***). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 19.037 min para ***1d***, 24.331 min para (*A*)-***2d*** y 27.239 min para (*B*)-***2d***.



Anexo 40. Cromatograma de CLAR quiral de 3-clorobenzoilacetonitrilo (***1e***) y 3-clorofenil-3-hidroxipropanonitrilo (***2e***). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 16.802 min para (*A*)-***2e***, 19.860 min para (*B*)-***2e*** y 38.804 min para ***1e***.

OPTIMIZACIÓN DE LA REDUCCIÓN BIOCATALÍTICA DE 2-ACETILPIRIDINA

Área: Bio-procesos

Rosa María Martínez Pérez[a], Aida Solís Oba[a], Herminia Inés Pérez Mendez[a], Norberto Manjarrez Álvarez[a], Liliana Hernández Olivares[a], Abraham Cano Hipólit[a], Myrna Solís Oba[b],

[a]Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, [b]Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Tlaxcala, México,

rmmartinez@outlook.es

Palabras clave: 1-(2-piridin)etanol, 2-acetilpiridina, biocatálisis, estereoselectividad, reductasas.

Resumen

El 1-(2-piridil)etanol es un intermediario quiral importante usado en la síntesis de una variedad de productos farmacéuticos como el 5-(1-hidroxietil)-furo[2,3-c]piridina (FPH), inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa del VIH. En estudios previos se encontró que el enantiómero (*S*)-FPH es al menos cien veces más potente que el correspondiente enantiómero (*R*) contra el virus.[1, 2] La biocatálisis es una herramienta importante para la síntesis de alcoholes enantiopuros, por ejemplo por reducción de cetonas. En la actualidad la mayoría de los biocatalizadores son de origen microbiano, pero los vegetales son fuentes atractivas de enzimas que han sido poco estudiadas.[3, 4] La actividad de la enzima, la estabilidad y la selectividad dependen del medio de reacción.[5] En el presente trabajo se estudió la reducción biocatalítica de 2-acetilpiridina a 1-(2-piridil)etanol (**1A**), utilizando semillas de chícharo, haba, alubia, frijol ayocote y alberjón como fuente de oxidoreductasa, en diferentes soluciones amortiguadoras (boratos, tris-HCl, TES y HEPES) a pH 8.10, usando como codisolvente isopropanol a diferentes concentraciones (2.5, 10, 50, 100µL) y diferentes temperaturas (35, 40 y 45°C), para optimizar el medio de reacción y aumentar la enantioselectividad. Todas las reacciones se mantienen en agitación magnética durante 24hrs. Con solución amortiguadora de boratos se obtiene mayor *% exceso enantiomérico (ee)* de **1A**, sin embargo con HEPES aumenta el *%conversión (conv)*. Tanto el *%conv* como el *%ee* de **1A** mejoran al usar HEPES 0.2M que con 0.1M. La cantidad de isopropanol afecta directamente el *%conv* y *%ee*, para alberjón, frijol ayocote y alubia el óptimo fue del 50µL, mientras que con chícharo y haba es mejor 2.5µL de isopropanol. Con respecto a la temperatura es mejor trabajar a 45°C para chícharo y alberjón ya que mejora el *%ee*, para frijol ayocote y alubia mejora el *%conv* a 40°C. Con haba disminuye el *%ee* al incrementar la temperatura por la cual se trabaja a 35°C. Bajo las condiciones óptimas para cada semilla los *%conv* y *%ee* fueron: chícharo 16 y 78, haba 11 y 88, alberjón 20 y 87, frijol ayocote 73 y 92, alubia 47 y 91% de **1A** respectivamente.

Referencias

1. Kawano S., Horikawa W., Yasohara Y., Hasegawa J., "Microbial enantioselectiva reduction of acetylpyridine derivatives", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 67, No. 4, p. 809-814, 2003.
2. Pal M., Srivastava G., Moon L., Jolly R., "Bioreduction of methyl heteroaryl and aryl heteroaryl ketones in high enantiomeric excess with newly isolated fungal strains", *Bioresource Technology*, Vol. 118, p. 306-314, 2012.
3. Alves D., Costa R., Costa J., MattosM., Gomes T., Queiroz F., "Lens culinaris: A New Biocatalyst for Reducing Carbonyl and Nitro Groups", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Vo. 17, p. 407-412, 2012.
4. Vandenberghe A., Markó I., Lucaccioni F., Lutts S., "Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables", *Industrial Crops and Products*, Vol. 42, p. 380-385, 2013.
5. 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*, Vol. 52 No. 9, p. 999-1002, 2011.

Organizan:	CA-UATLX-25	*"6° Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada"*
CA-BUAP-232	CA-UATLX-217	*"Foro Regional IMIQ-Tlaxcala"*
CA-UV-411	CA-UATLX-232	*http://sniqba6-2017.webnode.mx/*
CIBA-IPN	IMIQ Tlaxcala	*facebook.com/SNIQBA*
		contactosniqba@gmail.com

Anexo 41. Resumen de cartel para el 6° simposio nacional de ingeniería química y bioquímica aplicada

Otorga la presente

Constancia

6° Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada

A: Rosa María Martínez Pérez, Aida Solís Oba, Herminia Inés Pérez Méndez, Norberto Manjarrez Álvarez, Liliana Hernández Olivares, Abraham Cano Hipólito, Myrna Solís Oba

Por la presentación en Cartel del trabajo

"OPTIMIZACIÓN DE LA REDUCCIÓN BIOCATALÍTICA DE 2-ACETILPIRIDINA"

Durante el 6º Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada – Foro Regional IMIQ 2017, que se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Tlaxcala del 11 al 13 de septiembre del 2017.

Dra. Sherry Carro Sánchez
Presidente del Comité Local

Anexo 42. Constancia de presentación del cartel titulado "*Optimización de la reducción bioquímica de 2-acetilpiridina*".

Otorga el presente

Reconocimiento

6° Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada

A: Rosa María Martínez Pérez, Aida Solís Oba, Herminia Inés Pérez Mendez, Norberto Manjarrez Álvarez, Liliana Hernández Olivares, Abraham Cano Hipólito, Myrna Solís Oba

Por haber obtenido el Segundo lugar en el concurso de carteles en el área de BIOPROCESOS con el trabajo

"OPTIMIZACIÓN DE LA REDUCCIÓN BIOCATALÍTICA DE 2-ACETILPIRIDINA"

Durante el 6º Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada – Foro Regional IMIQ 2017, que se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Tlaxcala del 11 al 13 de septiembre del 2017.

SECCIÓN IMIQ

Anexo 43. Reconocimiento por el segundo lugar en el área de bioprocesos del cartel titulado "*Optimización de la reducción bioquímica de 2-acetilpiridina*".

10° Encuentro Nacional de Biotecnología
24 al 28 de Octubre de 2016

Estudio de la reducción biocatalítica de 2-acetilpiridina en diferentes condiciones de reacción

Rosa María Martínez-Pérez[1*], Liliana Hernández-Olivares[1], Aida Solís-Oba[1], Herminia Inés Pérez-Mendez[1], Norberto Manjarrez-Álvarez[1] y Julia Cassani-Hernández[1]
[1]Departamento de sistemas biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Del. Coyoacán, C.P. 04960, D.F. México, Tel. 54 83 7000, rmmartinez@outlook.es.

Palabras clave: 1-(2-piridin)etanol, 2-acetilpiridina, biocatálisis, estereoselectividad, reductasas.

Introducción

Los alcoholes secundarios enantioméricamente puros son valiosos intermedios para la elaborar fármacos, agroquímicos y cosméticos, Simon col. (2013) que se pueden obtener usando biocatalizadores. Machado col. (2006) Muñoz col. (2012) El uso de enzimas para la preparación de sustancias enantiopuras es un área de investigación en expansión. La actividad de la enzima, la estabilidad y la selectividad dependen en gran medida del medio de reacción. Yan col. (2011) El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la reducción enantioselectiva de 2-acetilpiridina a 1-(2-piridil)etanol, utilizando semillas de haba, alubia, frijol ayocote y alberjón como fuente de reductasa, usando diferentes amortiguadores: de boratos, tris-HCl, TES y HEPES; con la finalidad de optimizar el medio de reacción y aumentar la enantioselectividad.

Metodología

Las semillas se lavan, desinfectan con NaClO al 5%, se enjuagan, se muelen y se tamizan. La harina se mezcla con el amortiguador (1g/3mL) y agita 60 min, posteriormente se centrifuga (4000rpm/15min), el sobrenadante se usa como fuente de enzima. Se mezclan $1.8x10^{-5}$ moles de 2-acetilpiridina, 1.5µL de isopropanol y 1mL de extracto, se agita durante 24hrs (1300 rpm/35 °C). La mezcla se extrae con acetato de etilo, la conversión (conv) se determina por CG y el exceso enantiomérico (ee) por CLAR quiral, los experimentos se realizan por triplicado.

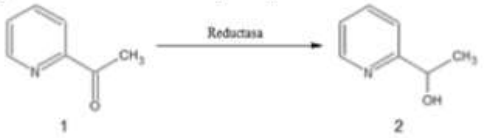


Fig. 1. Reducción de 2-acetilpiridina (**1**) a 1-(2-piridin)etanol (**2**) con diferentes semillas y diferentes amortiguadores.

Resultados y Discusión

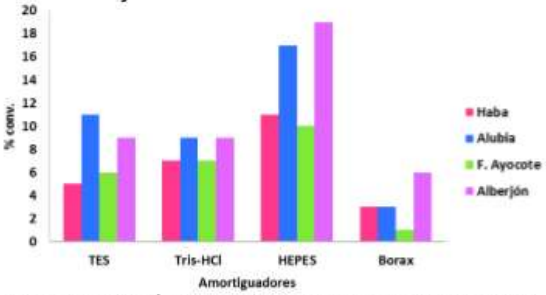


Fig. 2. % de reducción de 2-acetilpiridina usando reductasas de semillas y diferentes amortiguadores.

Los mayores % de conv se obtuvieron con HEPES y en todos los casos con las semillas de alberjón y alubia (Fig. 2). Sin embargo, el % ee es mayor al utilizar Borax seguido por HEPES, el f. ayocote y la alubia son las semillas más enantioselectivas (Fig 3).

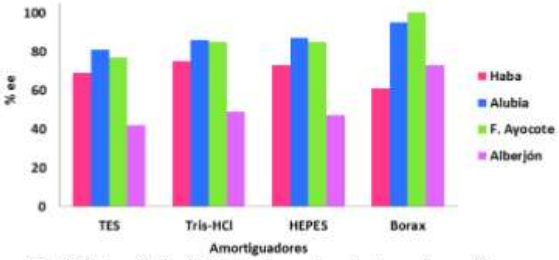


Fig. 3. % de ee 1-(2-piridin)etanol usando reductasas de semillas y diferentes amortiguadores.

Conclusiones

Las diferentes semillas usadas mostraron una alta versatilidad para reducir a 2-acetilpiridina. El medio en de reacción es importante, ya que amortiguadores orgánicos se tiene mayor %conv, sin embargo los inorgánicos aumentan el %ee.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

Referencias

Simon, R., Mutti, F., Kroutil, W., (2013), Biocatalytic synthesis of enantiopure building blocks for pharmaceuticals, Drug Disc Tod, 10(1), 37–44.

Muñoz, D., Hoyos, P., Hernáiz, M., Alcántara, A., Sánchez, J., (2012), Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs, Bioresource Technol, 115, 196–207.

Machado, L., Souza, J., Mattos, M., Sakata, S., Cordell, G., Lemos, T., (2006), Bioreduction of aldehydes and ketones using Manihot species, Phytochemistry, 67, 1637–1643.

Yan, Z., Nie, Y., Xu, Y., Liu, X., Xiao, R., (2011), Biocatalytic reduction of prochiral aromatic ketones to optically pure alcohols by a coupled enzyme system for cofactor regeneration, Tetrahedron Lett, 52(9), 999–1002.

Anexo 44. Resumen de cartel para el 10° encuentro nacional de biotecnología del IPN.

Instituto Politécnico Nacional
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos

80 1936-2016 AÑOS IPN "La Técnica al Servicio de la Patria"

RED de Biotecnología

Otorga el presente reconocimiento a:

Rosa María Martínez-Pérez, Liliana Hernández-Olivares, Aida Solís-Oba, Herminia Inés Pérez-Mendez, Norberto Manjarrez-Álvarez y Julia Cassani-Hernández

por la presentación del trabajo titulado:

Estudio de la reducción biocatalítica de 2-acetilpiridina en diferentes condiciones de reacción

en el **10° Encuentro Nacional de Biotecnología** del IPN

Llevado a cabo en la Ciudad de Cuernavaca, Morelos del 26 al 28 de octubre

Cuernavaca, Morelos., 28 de octubre de 2016

Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo
Coordinadora Red de Biotecnología del IPN

Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio
Director - CEPROBI-IPN

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala
Coordinadora del Encuentro

Anexo 45. Constancia de presentación del cartel titulado "*Estudio de la reducción biocatalítica de 2-acetilpiridina en diferentes condiciones de reacción*".

BIOCATEM
BIOCATÁLISIS PARA LAS INDUSTRIAS
ALIMENTARIA · TÉCNICA · MÉDICA

Simposio
"BIOCATÁLISIS:
UNA HERRAMIENTA CLAVE
PARA LA QUÍMICA SUSTENTABLE"

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Reducción de cetonas heteroaromáticas usando alberjón como fuente biocatalítica

Martínez Pérez, Rosa María*, Solís Oba, Aida, Pérez Méndez, Herminia Inés, Manjarrez Álvarez, Norberto, Hernández Olivares, Liliana.
Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Sistemas Biológicos.
*Responsable de la investigación, e-mail: rmmartinez@outlook.es

RESUMEN

Debido a su alta quimio-, regio- y estereoselectividad, la biocatálisis se ha convertido en una herramienta ideal para la síntesis asimétrica. [1] En la actualidad la mayoría de los biocatalizadores son de origen microbiano, pero los vegetales son fuentes atractivas de enzimas que han permanecido poco estudiadas. [2] La reducción asimétrica de cetonas proquirales es una de las reacciones más importantes y prácticas para la producción de alcoholes enantiomericamente puros, los cuales son intermedios para la síntesis de productos farmacéuticos, agroquímicos, saborizantes, fragancias, entre otros. [3] En el presente trabajo se estudió la reducción biocatalítica de 2-acetilpiridina, 3-acetilpiridina y 2-acetil-5-bromotiofeno usando albenjón como fuente de oxidorreductasas, para obtener los alcoholes correspondientes, precursores en la síntesis de fármacos como duloxetina, piridoxina y rosoxacina. La reducción biocatálitica se llevó a cabo a 30 °C, 1300 rpm, con dos tipos de amortiguadores tris-HCl y fosfatos a pH 7, usando isopropanol como codisolvente. Para la 3-acetilpiridina el %conv. fue de 8 con %ee 27 al usar tris-HCl, mientras que con fosfatos la conversión fue de 39% y 10% de ee. Para la 2-acetilpiridina el %conv. fue de 38 con %ee 66 al usar tris-HCl y %conv. de 42 con %ee 30 al utilizar fosfatos. Para 2-acetil-5-bromotiofeno el %conv. fue de 35 con %ee 50 al usar tris-HCl y %conv. de 40 con %ee 10 al utilizar fosfatos. A partir de estos resultados se puede concluir que con el el amortiguador tris-HCl se tiene menor conversión pero mayor enantioselectividad. Se va a estudiar el efecto de otros factores para mejorar las condiciones de reacción para estas cetonas y aumentar el % de conversión.

REFERENCIAS

[1] X. Liu, Y. Wang, H. Y. Gao, J. H. Xu. Asymmetric reduction of α-hydroxy aromatic ketones to chiral aryl vicinal diols using carrot enzymes system. Chinese Chemical, Letters 23, (2012) 635–638.
[2] C. Xu, Y. Zhonghua, Z. Rong, Y. Gai, Y. Jiabao. Production of Chiral Aromatic Alcohol by Asymmetric Reduction with Vegetable Catalyst, Chinese Journal of Chemical Engineering, 18(6), (2010) 1029—1033.
[3] C. Lakshmi, G. Roopa, A. Bhaskar, Asymmetric Reduction of Heteroaryl Methyl Ketones Using Daucus carota, Green and Sustainable Chemistry, 1, (2011) 117-122.

CIATEJ

7 Y 8 DE JUNIO, 2016
UAM-XOCHIMILCO
MÉXICO, D.F.

Anexo 46. Resumen de cartel para el simposio "biocatálisis: una herramienta clave para la química sustentable".

"Biocatálisis: una herramienta clave para la química sustentable"

7-8 Junio 2016 México, D.F.

El Comité Organizador del Simposio

"Biocatálisis: una herramienta clave para la química sustentable"

otorga la presente

CONSTANCIA

a

Rosa María Martínez Pérez, Aida Solís Oba, Herminia Inés Pérez Méndez, Norberto Manjarrez Álvarez, Liliana Hernández Olivares

por la presentación de su cartel titulado

Reducción de cetonas heteroaromáticas usando alberjón como fuente biocatalítica

Ciudad de México, a 8 de junio del 2016

Dra. Georgina Sandoval
Comité Organizador

Dra. Liliana Hernández Vázquez
Comité Organizador

Anexo 47. Constancia de presentación del cartel titulado "*Reducción de cetonas heteroaromáticas usando alberjón como fuente biocatalítica*".