



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

**SOLICITUD DE TÉRMINO
DE SERVICIO SOCIAL**

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE



Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año

Datos del Alumno

Nombre : Carim Ivan Plascencia Grimaldo	
Matrícula : 2162043247	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : C. Fresno 17 Col. Emiliano Zapata (Boyeros), Texcoco, Edo Mexico, CP 56263	
Teléfono : 5951326317	Celular : 5547168451
Correo Electrónico : carim.050697@gmail.com	CURP : PAGC970605HDFLRR00

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Biocatalisis aplicada a la quimica organica con el empleo de reductasas e hidroxinitriloliasas							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio de Biocatalisis Aplicada (N-304)							
Dependencia : Universidad Autonoma Metropolitana							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacan				Localidad : CDMX			
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	23	11	2020		23	5	2021
PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES							
Sector: 4.- Social (Urbano o Rural)				Tipo: 2.- Interno			
Orientación: 10.- Otros							

FIRMAS

Liliana Hernández Vázquez 27790
Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Héctor Manuel Luna Contla 6252
Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Carim Ivan Plascencia Grimaldo
Alumno
Nombre, firma

M. en C. Alma E. Ibarra Cázares 32807
Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza

Ciudad de México., a 07 de Junio 2021

Mtra. María Elena Contreras Garfias

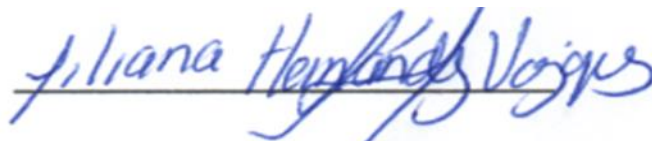
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

PRESENTE

Por medio de la presente me dirijo a usted de la manera más atenta para comunicar que el alumno: Carim Iván Plascencia Grimaldo con matricula 2162043247 concluyo el proyecto de Servicio Social: **“BIOCATÁLISIS APLICADA A LA QUÍMICA ORGÁNICA CON EL EMPLEO DE REDUCTASAS E HIDROXINITRILIASAS”**. perteneciente al proyecto genérico: Obtención de materias, principios activos, medicamentos y productos biológicos. Que se realizó en el laboratorio de Biocatálisis Aplicada (N-304) ubicado en la unidad interdisciplinaria de docencia investigación y servicio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE



Liliana Hernández Vázquez

Número económico 27790

Ciudad de México., a 07 de Junio 2021

Mtra. María Elena Contreras Garfias

Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

PRESENTE

Por medio de la presente me dirijo a usted de la manera más atenta para comunicar que el alumno: Carim Iván Plascencia Grimaldo con matrícula 2162043247 concluyo el proyecto de Servicio Social: **“BIOCATÁLISIS APLICADA A LA QUÍMICA ORGÁNICA CON EL EMPLEO DE REDUCTASAS E HIDROXINITRILIASAS”**. perteneciente al proyecto genérico: Obtención de materias, principios activos, medicamentos y productos biológicos. Que se realizó en el laboratorio de Biocatálisis Aplicada (N-304) ubicado en la unidad interdisciplinaria de docencia investigación y servicio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE

ATENTAMENTE.



Héctor Manuel Luna Contla

Número económico 6252



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

NOMBRE DEL PROYECTO: “BIOCATÁLISIS APLICADA A LA QUÍMICA ORGÁNICA CON EL EMPLEO DE REDUCTASAS E HIDROXINITRILIASAS”

PROYECTO GENÉRICO: OBTENCIÓN DE MATERIAS PRIMAS, PRINCIPIOS ACTIVOS, MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS.

ETAPA: OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DE INSUMOS PARA LA SALUD.

PRESENTA:

CARIM IVAN PLASCENCIA GRIMALDO

MAT. 2162043247

ASESORES:

DRA. LILIANA HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

DR. HÉCTOR MANUEL LUNA CONTLA

LUGAR DE REALIZACIÓN: LABORATORIO DE BIOCÁTÁLISIS APLICADA (N-304) EN LA UNIDAD INTERDISCIPLINARIA DE DOCENCIA INVESTIGACIÓN Y SERVICIO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO.

FECHA DE INICIO Y TERMINACIÓN: 23-11-2020 AL 23-05-2021

INDICE

Introducción.....	3 - 4
Marco teórico.....	5 – 11
Objetivo general y objetivos específicos.....	12
Modelo experimental 1.....	13 - 16
Resultados y discusión del modelo experimental 1.....	17 - 19
Cuestionario del modelo experimental 1.....	19
Diagrama de flujo del modelo experimental 1.....	20
Modelo experimental 2.....	21 – 24
Resultados y discusión del modelo experimental 2.....	25 – 26
Cuestionario del modelo experimental 2.....	26
Diagrama de flujo del modelo experimental 2.....	27
Conclusión.....	28
Objetivos y metas alcanzadas.....	29
Bibliografía.....	30-34

Introducción

La industria farmacéutica en los últimos años ha enfrentado nuevos retos, por un lado, debe buscar la reducción de subproductos tóxicos para el medio ambiente y por otro desarrollar terapias más selectivas y eficientes. Por lo tanto, cumplir con estos retos requiere desarrollar y mejorar los procesos de síntesis utilizando mejores biocatalizadores que disminuyan la generación de subproductos tóxicos para el medio ambiente. (Montero., et al. 2007)

Por consiguiente, la biocatálisis es un proceso biológico en el que un sustrato es modificado mediante enzimas. Los biocatalizadores se han convertido en una herramienta muy utilizada dentro de la síntesis orgánica, ya que tienen la capacidad de aceptar una amplia gama de sustratos, por lo tanto, presentan una alta especificidad quimio-, regio- y enantioselectiva, por lo que disminuyen los pasos de síntesis evitando la protección de grupos funcionales, favorecen la obtención de compuestos enantioméricamente puros y la transformación de grupos funcionales aquirales.

Por lo que es importante la investigación dirigida a la obtención de nuevos compuestos con actividad farmacológica como es el caso de los derivados de la reducción asimétrica de cetonas proquirales ya que estas conducen a alcoholes quirales, estos grupos son importantes ya que sirven como sintones en la industria química y farmacéutica. (T. Daußmann et al. 2006). Cabe mencionar que hay una multitud de métodos y reactivos disponibles para efectuar esta transformación química. Sin embargo, algunos de esos métodos utilizan reactivos tóxicos, por lo tanto, como alternativa se cuentan con métodos enzimáticos que cuentan con varias ventajas, ya descritas. Por lo consiguiente, esta aplicación es más ecológica, no está limitada a las enzimas comerciales, ya que se

pueden utilizar extractos crudos y tejidos de plantas, ya que estas contienen reductasas, por lo tanto, hace que los procesos biocatalíticos sean más eficientes, ya que, al ser ambientalmente amigables se degradan completamente en el medio y no genera desechos tóxicos, por consiguiente, aumenta su rendimiento. Otras enzimas de interés son las hidroxinitriloliasas, esta enzima, se puede obtener de diferentes semillas como son la almendra, capulín o mamey. Cabe mencionar que las hidroxinitriloliasas, catalizan la ruptura y síntesis enantioselectiva de cianohidrininas ya que ópticamente activas son intermediarios muy versátiles para la preparación de compuestos quirales.

En este proyecto se busca obtener un enfoque de la biocatálisis aplicada a la química orgánica a partir de aldehídos aromáticos con el empleo de reductasas que se encuentran en tejidos vegetales y por otro lado la preparación de cianohidrininas quirales partir del aldehído con el empleo de hidroxinitriloliasas, se encuentra en diferentes semillas como son la almendra, capulín o mamey.

Marco teórico

La biocatálisis es un proceso biológico, donde un sustrato es modificado mediante reacciones catalizadas por enzimas, las cuales pueden ser puras, parcialmente modificadas o extractos crudos. Estas enzimas pueden provenir de organismos vivos; una ventaja de las enzimas es que pueden seguir funcionando in vitro, siendo esta una herramienta utilizada dentro de la síntesis orgánica. Las tres principales áreas de la catálisis enzimática son: las biotransformaciones, la biorremediación y la biocatálisis, todas estas áreas se basan en la comprensión profunda de los principios bioquímicos básicos de las enzimas que catalizan reacciones químicas. La diferencia entre biocatálisis y los procesos de biorremediación y biotransformación es que estos últimos utilizan células completas para la transformación del sustrato. (Bommarius, A.S & Riebel-Bommarius, B.R., 2004)

En la actualidad se busca un biocatalizador capaz de transformar un gran número de sustratos químicos, ya que el desarrollo de un catalizador específico para un solo compuesto no es económicamente viable. La biocatálisis a menudo ofrece ventajas sobre la síntesis química, por el hecho de que las reacciones catalizadas por enzimas son a menudo altamente enantioselectivas y regioselectivas, se llevan a cabo a temperatura ambiente y a presión atmosférica, evitado así el uso de condiciones más extremas que pueden causar problemas como; isomerización, racemización o epimerización, adicionalmente las enzimas pueden ser sobre expresadas, o inmovilizadas para ser reutilizadas para que los procesos biocatalíticos sean más rentables. La biocatálisis ha sido reconocida como una excelente estrategia para la preparación de productos farmacéuticos, ya que a comparación del método convencional

que utiliza comúnmente metales pesados como catalizadores los procesos biocatalíticos son amigables con el ambiente. (Gotor, V., 2002)

Por consiguiente, las enzimas son una clase de macromoléculas multivalentes, multifuncionales con la habilidad de unirse a moléculas pequeñas y subsecuentemente realizar una reacción. Sin excepción todas las enzimas son proteínas que consisten en una o más cadenas lineales de los 20 aminoácidos comunes. (Purkarthofer, T., et al, 2007)

Los microorganismos son la principal fuente de enzimas, mientras que los órganos de animales y materiales vegetales contribuyen el 10 por ciento respectivamente al total de enzimas procesadas. Es fundamental que la enzima mantenga su configuración espacial para que el sustrato encaje en el centro activo. Un cambio de temperatura, pH o salinidad puede provocar desnaturalización de la enzima y la alteración de su estructura implica pérdida de la funcionalidad. (Bommarius, A.S & Riebel-Bommarius, B.R., 2004)

Por lo tanto, la biocatálisis aplicada a la industria farmacéutica es de suma importancia ya que el uso de métodos enzimáticos confiere varias ventajas, especialmente su regio, químico y estereoselectividad. De acuerdo con la literatura hay multitud de métodos y reactivos disponibles para efectuar la transformación química (Bommarius, A.S & Riebel-Bommarius, B.R., 2004). Sin embargo, algunos de estos métodos utilizan reactivos tóxicos o peligrosos, por lo tanto, hace que la biocatálisis sea una herramienta mucho más versátil y poderosa para la síntesis orgánica, especialmente para la síntesis quiral. Por ejemplo, la reducción del grupo carbonilo es una de las reacciones más importantes en química orgánica, desde el punto de vista teórico como sintético; como alternativa se cuentan uso de enzimas para obtener compuestos como los alcoholes ópticamente

activos a través de la reducción de cetonas con el empleo de reductasas, cabe mencionar que los alcoholes secundarios quirales se requieren con frecuencia como intermedios importantes para la introducción del centro quiral en productos farmacéuticos, saborizantes, aromatizantes y químicos agrícolas (Daußmann., et al. 2006). La reducción de cetonas enantioselectivas es una ruta confiable, escalable y sencilla hacia los alcoholes ópticamente activos. En comparación con el procesamiento químico convencional, las reducciones asimétricas biocatalíticas pueden ofrecer reacciones altamente selectivas, procesos ambientalmente benignos y aún tienen una aplicación comercial limitada debido en gran parte a la baja productividad volumétrica. Se ha prestado mucha atención al desarrollo de biocatalizadores y posteriormente a la realización de procesos de reducción biocatalítica con una carga de sustrato elevada para lograr la viabilidad económica, por lo tanto, la competitividad para biotransformaciones a gran escala. Por lo que los recientes esfuerzos de ingeniería y descubrimiento de enzimas han aumentado en gran medida la disponibilidad de biocatalizadores ideales, lo que hace que la biocatálisis sea una herramienta mucho más versátil y poderosa para la síntesis orgánica, especialmente para la síntesis quiral (Ni, Y., & Xu, J. H. 2012). De acuerdo con la literatura, en los últimos años, la reducción asimétrica biocatalítica ha sido documentada y revisada varias veces desde varios aspectos, (Matsuda. T., et al. 2009) discutieron exhaustivamente las reducciones asimétricas y oxidaciones con biocatalizadores, mecanismo de cobertura, alcance del sustrato y muchos más. Por otro lado (Hollmann. F., et al. 2011) ofrecieron una descripción general de las reducciones enzimáticas con una visión crítica de los aspectos de la química verde por lo tanto, es de suma importancia el empleo de estos tipo de

sustratos como lo son los extractos crudos y tejidos de plantas, por lo que esta aplicación es más ecológica, por lo que no hay que estar limitados al uso de enzimas comerciales, ya que su costo es muy elevado por lo tanto, se tiene otro eje en el cual se pueden utilizar extractos crudos y tejidos de plantas ya mencionado. En años recientes el uso de plantas y cultivos de células vegetales han sido estudiado como potenciales agentes reductores; varios ejemplos de plantas completas con sistemas de alcohol deshidrogenasas han sido reportadas en la literatura ya que las enzimas que producen las plantas son capaces de realizar reacciones en condiciones suaves (pH y temperatura), con notable quimio, regio y estereoselectividad. (Gašo-Sokač, D., et al. 2014) (Patil, D. 2015).

Por otro lado, cabe mencionar que se han utilizado prácticamente cada parte de las plantas, ya que la actividad enzimática cambia, por ejemplo, el agua de coco (*Cocos nucifera* L) reduce aldehídos, cetonas alifáticas, compuestos aromáticos con excelentes rendimientos y alta enantioselectividad (Fonseca, A. M., et al. 2009)

En otro estudio las hojas de maíz (*Zea maíz*) o plátano (*Musa sapientum*) dan la reducción de benzaldehídos sustituidos en buenos rendimientos, además se observó la descarboxilación de aldehídos 4-hidroxi-sustituidos (Luna, H. et al. 2014)

Por otro lado, de acuerdo con (Leyva, E., et al. 2012) desarrollaron una metodología de química verde para la bio-reducción rápida y sencilla de aldehídos aromáticos a alcoholes aromáticos utilizando un extracto de *Aloe vera* en suspensión acuosa. Por medio de radiación de microondas, esta reacción se llevó a cabo en un período de tiempo muy corto. El procedimiento desarrollado es una ruta alternativa para preparar alcoholes aromáticos, los cuales son reactivos muy utilizados en la industria y en la preparación de

cosméticos. Cabe mencionar en otro estudio realizado por (Patil, D., 2015), la raíz de varias plantas ha sido utilizada para el mismo fin, entre las que se cuentan *Daucus carota* (zanahoria), *Brassica rapa*, *Eryngium horridum* (una maleza), papa, betabel, cilantro, jengibre, taro, loto, mandioca y rábano.

Existen reportes del uso de frutas como: uva, manzana, plátano, cereza, pera, fresa, naranja para la bioreducción de nitroetonas policíclicas aromáticas. Un punto importante de mencionar es que la bioreducción se lleva a cabo tanto en aldehídos como cetonas, y en el último caso las enantioselectividades llegan a ser excelentes. (Patil, D., 2015)

Otras enzimas de interés son las hidroxinitrilasa, ya que estas catalizan la ruptura y síntesis enantioselectiva de cianohidrininas ya que ópticamente activas son intermediarios muy versátiles para la preparación de compuestos quirales como: α -hidroxiácidos y sus ésteres, β -aminoalcoholes, β -hidroxi- α -aminoácidos, α -hidroxialdehídos y α -hidroxicetonas, los cuales son precursores de fármacos y agroquímicos (Effenberger, F., 1994).

Cabe mencionar que las cianohidrininas siempre han tenido un lugar de importancia tanto como productos técnicos como reactivos en la química orgánica. Por lo tanto, las cianohidrininas ópticamente activas se han investigado ampliamente, en el cual se han empleado para síntesis relativamente recientemente.

De acuerdo con (Lanfranchi, E., et al. 2013) la reacción de formación de cianohidrininas, es una reacción de adición nucleofílica de los componentes del HCN sobre un grupo carbonilo; la reacción puede ser catalizada por ácido o base, o como en este caso una enzima las hidroxinitrilo liasas (HNLs, por sus siglas en inglés) (EC 4.1.2.10, EC 4.1.2.11,

EC 4.1.2.46 y EC 4.1.2.47), también conocidas como oxinitrilasas, hidroxinitrilasas, mandelonitrilo liasas, hidroximandelonitrilo liasas, en que catalizan la ruptura del compuesto carbonílico puede ser un aldehído o una cetona, para obtener la síntesis enantioselectiva de cianohidrininas. (Effenberger, F., et al. 1987)

Por lo tanto, de acuerdo con lo antes mencionado las HNLs han representado una alternativa sumamente adecuada. Además, que las fuentes naturales de estas enzimas son abundantes y por ello existe la facilidad de obtenerlas en cantidades grandes. De acuerdo con (Wöhler, F., & Liebig, J., 1838) reportaron por primera vez la actividad de las HNLs al investigar la formación del ácido cianhídrico en la reacción de cianogénesis. Cabe mencionar que la reacción inversa fue primero observada por (L. Rosenthaler., 1908), al usar emulsina, en el cual consistía en una emulsión derivada de almendras amargas (*Prunus amigdalus*) al preparar (*R*)-mandelonitrilo. De acuerdo con la literatura las HNLs, son clasificadas en dos grupos principales, las HNLs I y las HNLs II, esto está basado en la presencia o ausencia del dinucleótido de flavina y adenina (FAD). Por lo tanto, las enzimas se clasificaron en proteínas que no contienen FAD y que contienen FAD. Las enzimas que contienen FAD se han aislado exclusivamente de las Rosáceas, mientras que las HNLs independientes de FAD, que tienen una estructura más heterogénea, se han caracterizado de varias familias de plantas Poaceae, Euphorbiaceae, Linaceae, Olacaceae. Filicaceae (Hickel, A., et al. 1996).

La cianogénesis, la liberación de HCN a partir de glucósidos cianogénicos se debe a la escisión del resto de carbohidrato por β -glucosidasas para producir el correspondiente α -hidroxinitrilo, que se disocia espontáneamente en HCN y un compuesto carbonilo, por acción de una α -HNLs (Wajant, H., & Effenberger, F., 1996). Por lo tanto, las principales

propiedades bioquímicas de los HNLs purificadas de varias especies de plantas superiores, ha sido reportado en más de 3000 especies de plantas vasculares, comprendiendo 105 familias de plantas con flores conteniendo HNLs. De acuerdo con (Wajant, H., & Effenberger, F., 1996) las más prominentes están las plantas de las familias Linaceae, Euphorbiaceae, Clusiaceae, Olacaceae, Rosaceae, Gramineae (monocotiledoneas), Polypodiaceae y Flitaceae (helechos).

La cianogénesis ha sido reportada en diversos grupos taxonómicos como bacterias (*Chromobacterium violaceum*, y algunas especies de *Pseudomonas*), hongos, líquenes, milpiés (*Apheloria corrugata*) artrópodos e insectos (*Zygaena trifolii*, una mariposa nocturna) (Knowles, C. J., & Bunch, A. W., 1986).

Las HNLs adolescentes del FAD han sido encontradas en *Sorghum bicolor*, (Bové, C. & Conn, E.E., 1961), *Manihot esculenta*, (Wajant, H., 1995 a), *Phlebodium aureum* (Wajant, H., 1995 b) y *Linum usitatissimum*, (Xu, L.L., 1988), cabe mencionar que de acuerdo con la literatura cada una tienen propiedades fisicoquímicas diferentes, como especificidad de sustrato, masa, glicosilación, punto isoeléctrico y secuencia de aminoácidos.

Las HNLs se encuentran en las semillas de multitud de plantas, por ejemplo, las R-HNL se encuentran en la almendra, lino, manzana, chabacano, cereza, (Fechter, MH & Griengl, H., 2004) ciruela, durazno, capulín, mamey (Solís, A., et al. 1998). Por otro lado, las S-HNL se encuentran en el sorgo, (Bové, C. & Conn, E. E., 1961) manchicacao, (Griengl, H., et al. 1997) y hule (Wagner, UG, et al. 1996).

Objetivo General

Evaluar la capacidad enzimática de preparados enzimáticos crudos y tejidos de plantas para la obtención de moléculas de interés farmacéutico

Objetivos específicos

- Preparación del mandelonitrilo usando como biocatalizador harina desengrasada de almendra, capulín o mamey.
- Reducción del Piperonal (1,3-Benzodioxol-5-carbaldehído) con preparados crudos de tejidos vegetales (hoja de plátano) para producir alcohol Piperonílico (1,3-Benzodioxol-5-metanol).
- Elaborar los dos Modelos Experimentales de los procedimientos antes mencionados para su uso en los laboratorios de los módulos de Reactividad de Compuestos Orgánicos de Interés Farmacéutico (IV) y de Obtención de Compuestos Orgánicos de Interés Farmacéutico (V) de la Licenciatura de QFB, afines o similares.

Modelo experimental 1

Reducción de aldehídos aromáticos con tejidos vegetales.

Objetivo. Reducción del Piperonal (1,3-Benzodioxol-5-carbaldehído) con preparados crudos de tejidos vegetales (hoja de plátano) para producir alcohol Piperonílico (1,3-Benzodioxol-5-metanol).

Antecedentes. La reducción del grupo carbonilo es una de las reacciones más importantes en química orgánica, desde el punto de vista teórico como sintético. Hay multitud de métodos y reactivos disponibles para efectuar esta transformación química. Sin embargo, algunos de esos métodos utilizan reactivos tóxicos y/o peligrosos; como alternativa se cuentan con métodos enzimáticos que cuentan con varias ventajas, especialmente su regio, químico y estereoselectividad. (Ni, Y., & Xu, J. H. 2012). Esta aplicación es más ecológica, no está limitada a las enzimas comerciales, ya que se pueden utilizar extractos crudos y tejidos de plantas.

La reducción asimétrica de cetonas proquirales conduce a alcoholes quirales importantes como sintones en la industria química y farmacéutica (T. Daußmann et al. 2006). La producción de esos alcoholes ópticamente activos usando biocatalizadores ha atraído mucha atención en las últimas décadas (Ni, Y., & Xu, J. H. 2012). Aunque la levadura de pan fue el biocatalizador más utilizado en la reducción de cetonas proquirales conduciendo a alcoholes quirales, los cultivos de células vegetales también han sido investigados (Y. Naoshima, Y. Akakabe., et al. 1991)

En años recientes el uso de plantas y cultivos de células vegetales han sido estudiado como potenciales agentes reductores; varios ejemplos de plantas completas con sistemas de alcohol deshidrogenasas han sido reportadas (Gašo-Sokač, D., et al, 2014)

En otro estudio las hojas de maíz (*Zea maiz*) o plátano (*Musa sapientum*) dan la reducción de benzaldehídos sustituidos en buenos rendimientos, además se observó la descarboxilación de aldehídos 4-hidroxi-sustituidos (Luna, H., et al. 2014)

Un punto importante de mencionar es que la bioreducción se lleva a cabo tanto en aldehídos como cetonas, y en el último caso las enantioselectividades llegan a ser excelentes.

Generalidades de la reacción

Reacción y estequiometria

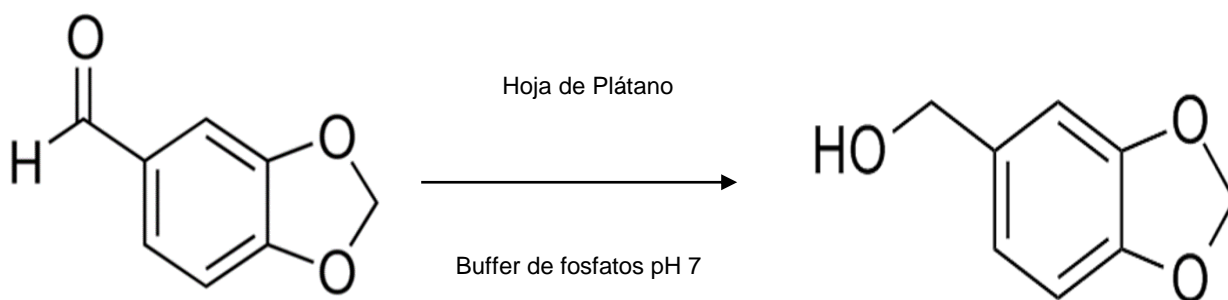


Figura 1. Piperonal

Figura 2. Alcohol Piperonilico

Material:

Para la preparación del biocatalizador	Para la reacción de reducción
2 Hojas frescas de plátano	1 Matraz Erlenmeyer de 250 mL
2 Vasos de precipitados de 250 mL	Parrilla de agitación
Tijeras limpias	Embudo de filtración rápida
	Embudo de separación de 250 mL
	Vial de 5 mL
	1 pipeta pasteur
	1 pipeta graduada de 5 mL
	1 pipeta graduada de 1 mL
	1 probeta de 100 mL
	Magneto
	1 soporte universal
	Papel filtro
	2 vasos de precipitado de 100 mL

Reactivos:

Para la preparación del biocatalizador	Para la reacción de cianación	
Agua destilada	Benzaldehido (libre de ác. Benzoico)	
Sol. de hipoclorito de sodio al 5%	Buffer de fosfatos 0.2 M (pH 7.0)	Fosfato monopotásico Fosfato disódico
	Acetona RA	
	Acetato de etilo RA	
	Sulfato de sodio anhidro	

Procedimiento:

a) Preparación del biocatalizador:

Las hojas de plátano se lavan perfectamente con agua destilada, desinfectadas por lavado con una solución al 5% de hipoclorito de sodio y nuevamente lavadas abundantemente con agua destilada. Posteriormente las hojas limpias son cortadas en fragmento de aproximadamente 0.3 cm^2 , y conservadas a 4°C para su uso.

b) Reacción de bioreducción:

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 60 mL de buffer de fosfatos 0.2M (pH 7.0), se depositan 10 g del biocatalizador, por consiguiente, se añaden 40 mg del Piperonal disueltos en 0.8 mL de acetona RA. La mezcla de reacción se coloca en una parrilla de agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. El biocatalizador (hojas) son removidos por filtración simple y la solución es extraída dos veces con 100 mL acetato de etilo. El producto crudo de reacción es identificado por TLC y $\text{H}^1\text{-RMN}$, y posteriormente purificado por cromatografía en columna, para lo cual la mezcla de reacción se filtró a través de una pipeta Pasteur con carbón activado, para eliminar clorofilas. Posteriormente se aplicó en una columna con silica gel y se eluyó con mezcla de hexano acetato de etilo 70:30. Tomando fracciones de 3 mL cada vez, se analizó por CCF, se reunieron las fracciones y las que contenían el compuesto puro se determinó el rendimiento.

NOTA. Se pueden utilizar otros aldehídos como sustratos y además otro tipo de hojas o tejidos vegetales.

Resultados.

Tabla 1. Rendimiento de la reducción del Piperonal

Alcohol piperonílico	Rendimiento %
Reacción ^a	71.77%

a. Esta reacción se realizó por triplicado, por lo tanto, se obtuvo el promedio para el rendimiento.

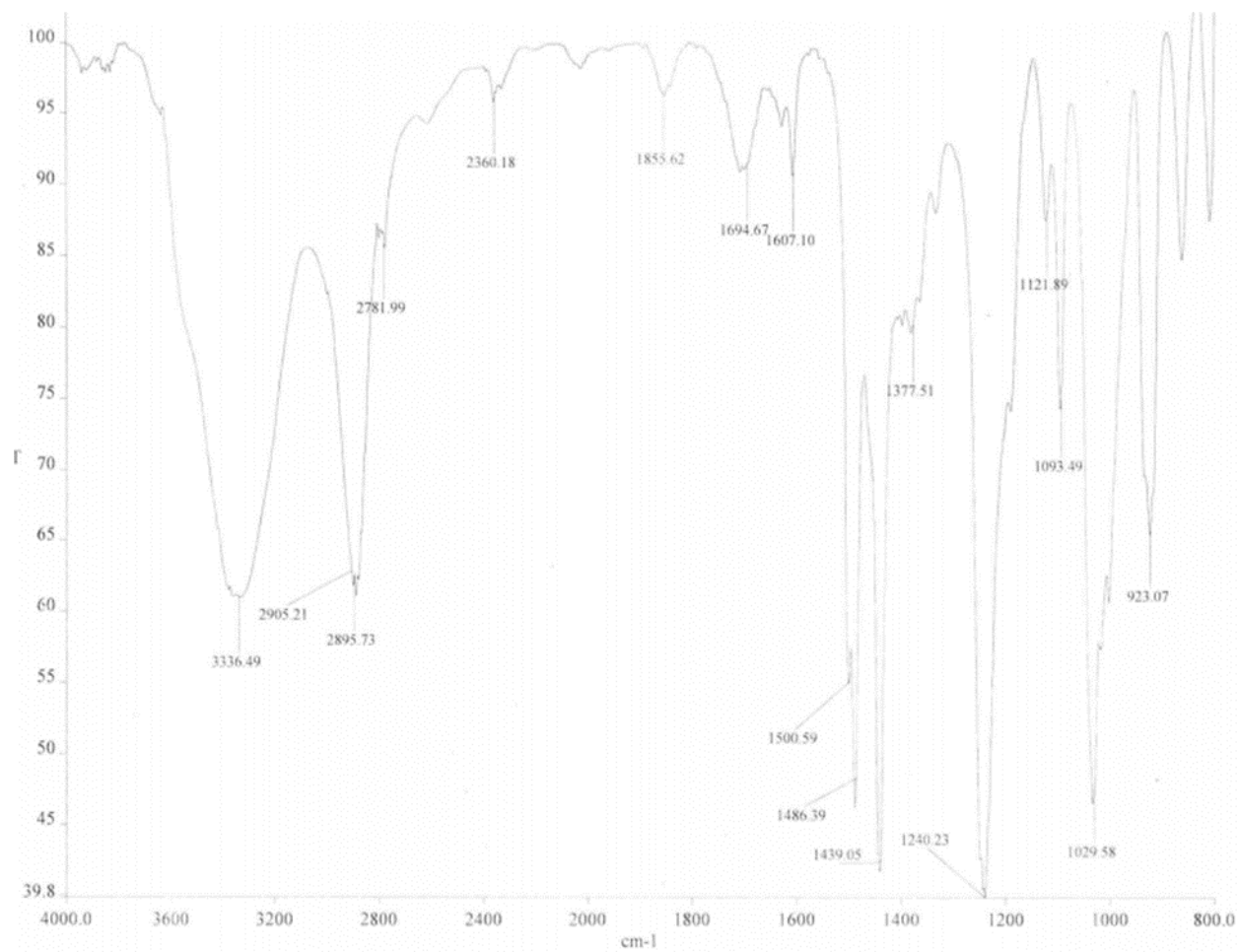


Figura 2. La caracterización se llevó a cabo en un espectrofotómetro de Infrarrojo Perkin-Elmer Spectrum BX, FT-IR System, en el cual se observa la transformación del Piperonal al alcohol Piperonílico: IR 3336.49 cm⁻¹ (OH), 2895.73 cm⁻¹ (CH₂), 1486.39 cm⁻¹, 1439.05 cm⁻¹ (aromático), 1240.23 cm⁻¹, 1029.58 cm⁻¹ (éter cíclico) 923.07 cm⁻¹

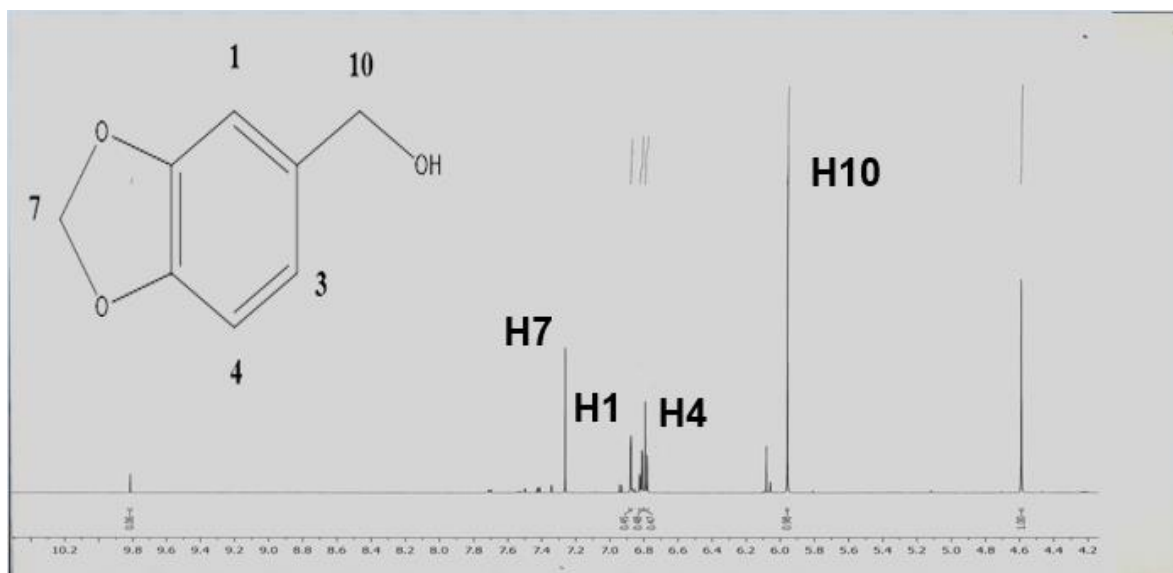


Figura 3. RMN del alcohol Piperonilico. ^1H RMN. El espectro de RMN de ^1H fue obtenido en el equipo, Agilent de 600 MHz.

Discusión

La reducción biocatalítica de aldehídos es una de las reacciones más importantes y practica para preparar alcoholes, por consiguiente, pueden ser transformados en otros productos químicos industrialmente importante. Por lo tanto, hacia un enfoque verde, sin residuos o contaminantes para el medio ambiente, es importante tener en cuenta la posibilidad de usar hojas de plátano frescas para ser utilizadas como biocatalizador para reducir aldehídos, por lo tanto, se usó Piperonal para la síntesis de alcohol piperonilico.

De acuerdo con la “Figura 2”, se caracterizó la estructura química del alcohol piperonilico por IR en el cual se observa las bandas características al grupo funcional de acuerdo con la estructura química, 3336.49 cm^{-1} (OH), 2895.73 cm^{-1} (CH_2), 1486.39 cm^{-1} , 1439.05 cm^{-1} (aromático), 1240.23 cm^{-1} , 1029.58 cm^{-1} (éter cíclico) 923.07 cm^{-1} .

Por otro lado, para la caracterización del compuesto de interés se realizó el análisis por RMN del alcohol piperonilico en cual, se disolvió en DMSO y se compararon los valores

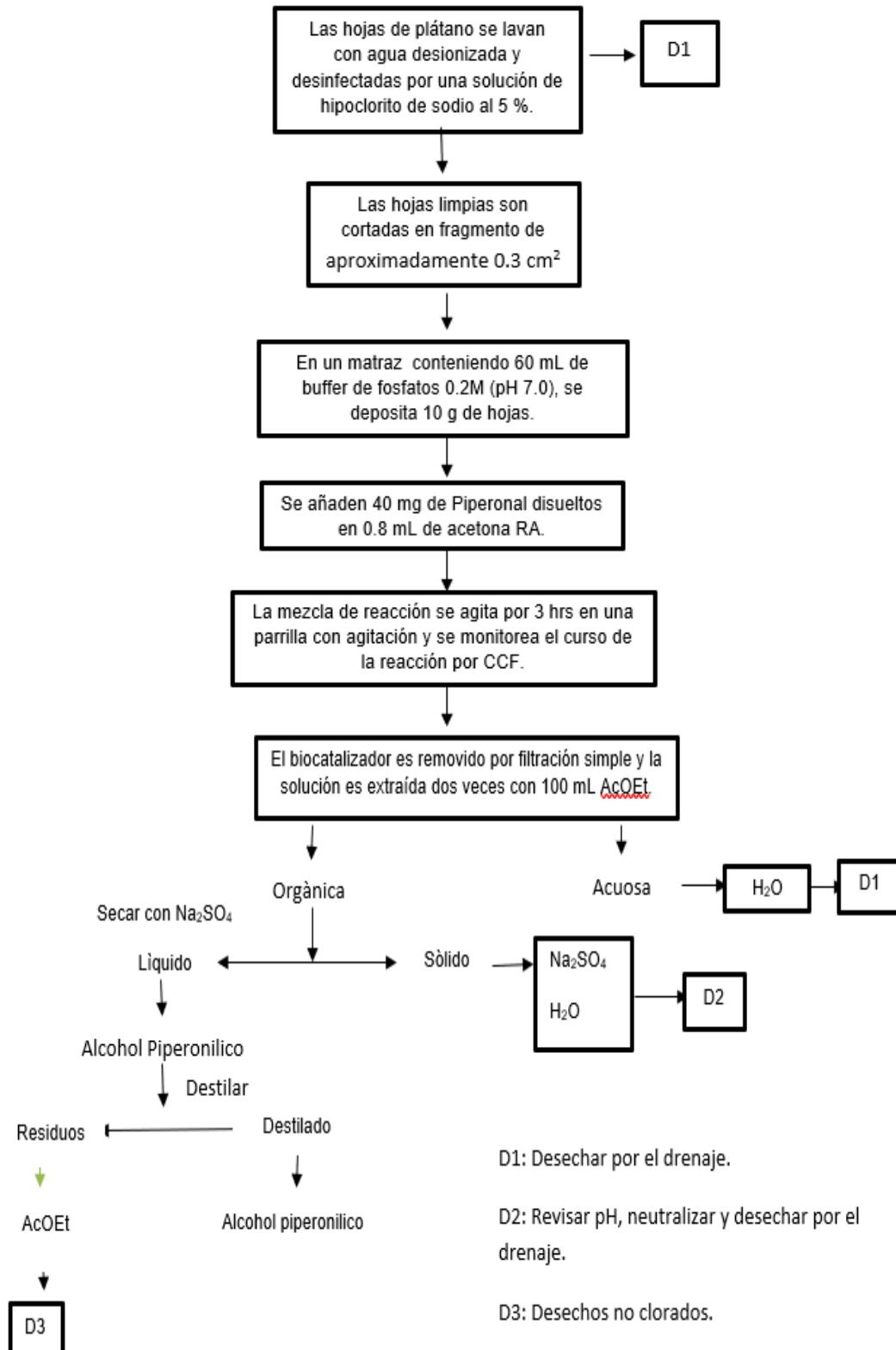
experimentales con los calculados por el programa MestReNova CNMR y HNMR predictor. En la “Figura 3” se muestra el espectro de RMN para para protón ^1H que de acuerdo con la interpretación de las señales se obtuvo el compuesto de interés.

Cabe mencionar que el rendimiento que se obtuvo de la reacción (tabla 1) fue adecuado porque a pesar de las condiciones de reacción, el rendimiento fue alto.

Cuestionario.

1. ¿Qué tipo de enzimas efectúan las reacciones de reducción de compuestos carbonílicos?
2. Fundamentando en el tipo de biocatalizador utilizado, ¿Qué otras plantas se podrían utilizar para este tipo de reacción?
3. ¿Cuál es la relevancia de la estereoquímica en la reducción de cetonas?
4. ¿Qué importancia tiene la preparación del buffer de fosfatos a pH de 7?
5. ¿Qué sustratos se pueden utilizar para la bio-reducción y cual es más enantioselectivo?

Diagrama de Flujo

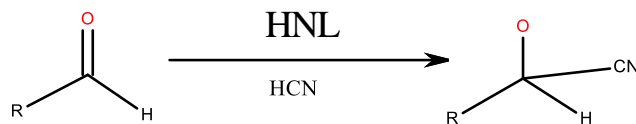


Modelo experimental 2

Preparación de cianohidrinas quirales usando hidroxinitriloliasas contenidas en harinas desengrasadas de semillas

Objetivo: Preparación de mandelonitrilo quiral usando como biocatalizador harina desengrasada de almendra, capulín o mamey.

Antecedentes. Las cianohidrinas ópticamente activas son intermediarios muy versátiles para la preparación de compuestos quirales como: α -hidroxiácidos y sus ésteres, β -aminoalcoholes, β -hidroxi- α -aminoácidos, α -hidroxialdehídos y α -hidroxicetonas, los cuales son precursores de fármacos y agroquímicos. (Effenberger, F. 1994).



La reacción de formación de cianohidrinas es una reacción de adición nucleofílica de los componentes del HCN sobre un grupo carbonilo; la reacción puede ser catalizada por ácido o base, o como en este caso una enzima. El compuesto carbonílico puede ser un aldehído o una cetona, para obtener enantioselectividad se pueden usar diversos catalizadores (Effenberger, F., et. al 1987).

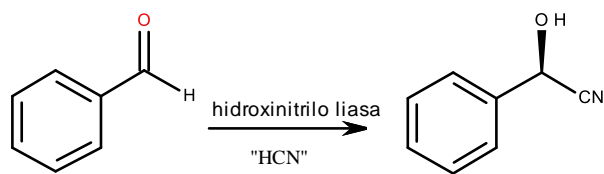
Las hidroxinitrilo liasas (HNLs, por sus siglas en inglés) (EC 4.1.2.10, EC 4.1.2.11, EC 4.1.2.46 y EC 4.1.2.47), también conocidas como oxinitrilasas, hidroxinitrilasas, mandelonitrilo liasas, hidroximandelonitrilo liasas, catalizan la ruptura y síntesis enantioselectiva de cianohidrinas. (Lanfranchi, E., et al. 2013)

Actualmente las HNLs han representado una alternativa sumamente adecuada. Además, que las fuentes naturales de estas enzimas son abundantes y por ello existe la facilidad de obtenerlas en cantidades grandes.

Las HNLs se encuentran en las semillas de multitud de plantas, por ejemplo, las *R*-HNL se encuentran en la almendra, (Huuhtanen. T. & T., Kanerva 1992) lino, manzana, chabacano, cereza, (Kiljunen, E. & Kanerva, LT 1997), ciruela, durazno, capulín, mamey Solís. A. et. al 1998) Las *S*-HNL se encuentran en el sorgo, (Bové, C. & Conn, EE 1961), manchicacao, (Van Scharrenburg et. al 1993) y hule (Klempier, N, et. al 1995)

Por otro lado, además de la excelente enantioselectividad de estas enzimas, aceptan una amplia gama de substratos (Lanfranchi, E., et al. 2013).

Reacción y estequiometria



Parte experimental.

Material:

Para la preparación del biocatalizador	Para la reacción de cianación
Semillas peladas de almendra, capulín o mamey	Matraz de bola o vial con tapa de 5 mL
Licadora con vaso de vidrio	Agitador magnético
Kitasato	Baño de hielo
Büchner	Embudo de separación 50 mL
Papel filtro	Vaso de precipitados 10 mL
Cápsula de porcelana	Parrilla de agitación
Espátula	Probeta de 10 mL
	Micropipeta
	Pipeta de 1 mL
	Pipeta de 2 mL
	Soporte Universal

Reactivos:

Para la preparación del biocatalizador	Para la reacción de cianación
Acetato de etilo RA	Benzaldehído
	Buffer de citratos 0.02 M pH 4-5.5
	Harina desengrasada (Almendra. Mamey o capulín)
	Cianuro de sodio o potasio
	Agua destilada
	Ácido acético 1 M
	Solución saturada de cloruro de sodio
	Sulfato de sodio anhidro

Procedimiento

- a) Preparación de la harina desengrasada de semilla (Almendra, mamey o capulín)

La semilla se pone a remojar en agua a una temperatura de 30 °C por 10 min (Nota 1) y posteriormente se retira la cutícula; luego se ponen en la licadora y se añade suficiente

acetato de etilo RA para cubrir perfectamente las semillas, se muelen bien y se filtran al vacío a través de un Büchner, el residuo se suspende nuevamente en acetato de etilo y se repite la molienda, nuevamente se filtra y la operación se repite una vez más. El residuo sólido se deposita en una cápsula de porcelana, se disgrega y permite evaporar el exceso de disolvente en la campana de extracción. El polvo bien seco se guarda en un frasco bien cerrado y se conserva en refrigeración a 4° C.

b) Reacción de cianación:

En una suspensión de 75 mg de harina desengrasada en 2.5 mL de solución amortiguadora de citratos 0.02M (pH 4-5.5), se le adiciona 50 mg (0.47 mmol) de benzaldehído (0.05 mL) disuelto en 1.0 mL de metanol y 0.75 mL de solución amortiguadora de KCN/ácido acético 1 M a pH 4 (Nota 2). La mezcla se coloca en agitación magnética, a temperatura ambiente por 1 hora, se filtra y el filtrado se extrae 3 veces con 3 mL de cloroformo; los extractos orgánicos combinados se lavan con 5.0 mL de solución saturada de cloruro de sodio, se secan con sulfato de sodio anhidro y evaporan a sequedad. Se determina el rendimiento, la rotación óptica del producto y se analiza el producto por HPLC usando una columna quiral CHIRALCEL OD.

Variaciones posibles del experimento: Se pueden utilizar otros aldehídos como sustratos.

NOTAS PRECAUTORIAS:

NOTA 1: La temperatura durante la molienda de las semillas no debe pasar de 40° C, ya que la actividad de la enzima se pierde. El polvo bien seco deberá guardar en el refrigerador.

NOTA 2: La generación y uso del ácido cianhídrico (HCN) es extremadamente peligrosa, la reacción debe llevarse a cabo en la campana de extracción todo el tiempo.

Resultados.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la rotación óptica del producto para la síntesis de mandelonitrilo con preparados solidos de semillas de capulín, almendra y mamey.

Preparado enzimático ^a	α ^b	Exceso enantiómero % ^c
Capulín	+0.494	R: 92.5 % S: 7.5 %
Almendra	+0.08	R: 80.37 % S: 19.63 %
Mamey	+0.08	R: 71.61 % S: 28.39 %

a: Solución amortiguadora de citratos 0.02M (pH 4-5.5), solución amortiguadora de KCN/AcOH a pH 4, Benzaldehído (0.47 mmol), 75 mg de preparado enzimático para todos los casos por 1 hora de reacción en agitación magnética a temperatura ambiente. b: Rotación óptica medida por una disolución de la muestra en 4 mL de CH₂Cl₂. c: Se realizo por HPLC quiral usando una columna CHIRALCEL OD

Discusión

De acuerdo con la “Tabla 2” los 3 preparado enzimáticos presentaron rotación óptica adecuada y el exceso de % enantiómero fue significativo ya que las HNLs se encuentran en mayor proporción en las semillas de multitud de plantas, por lo tanto, las *R*-HNLs se encuentran en la almendra, capulín y mamey.

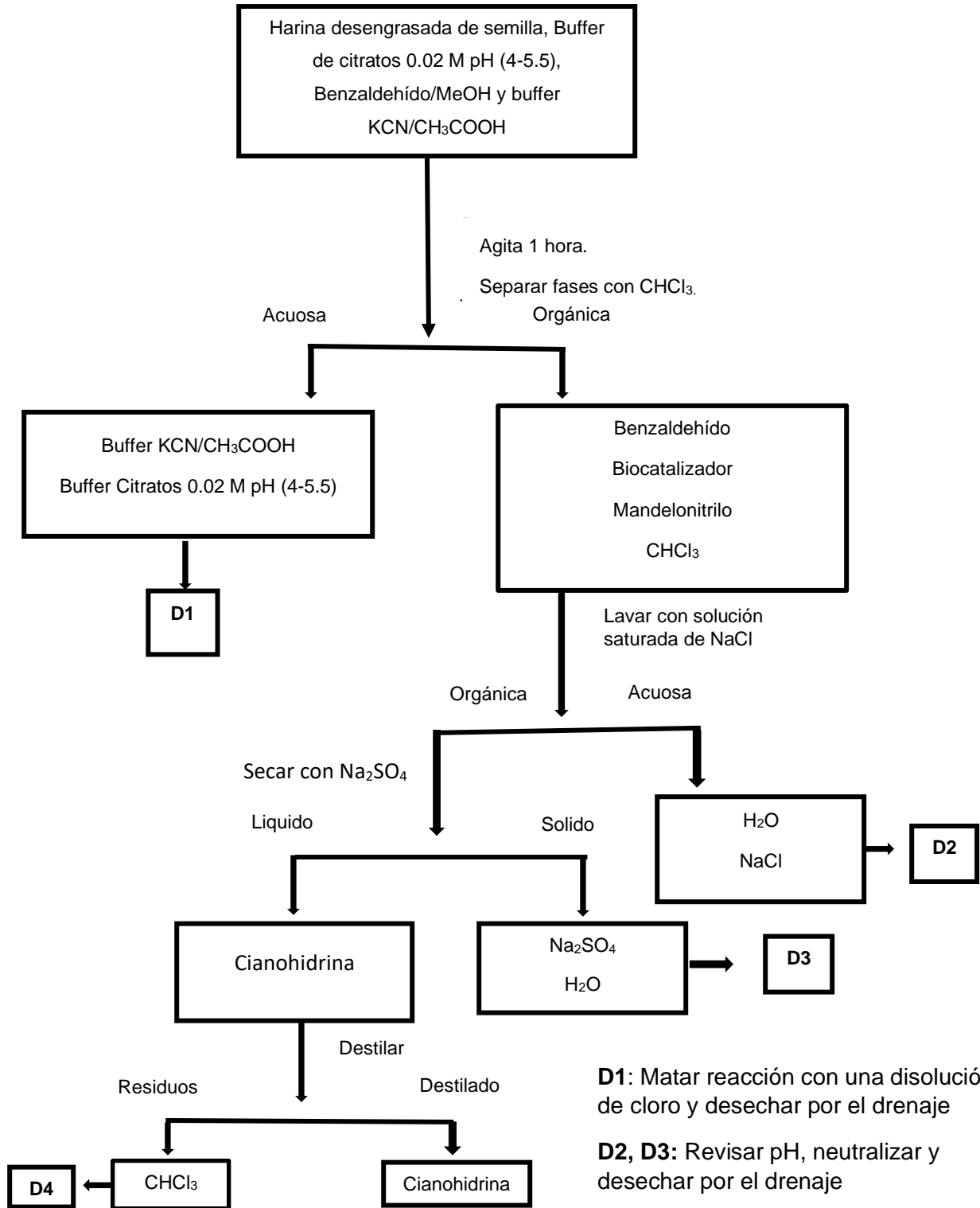
Cabe mencionar una desventaja que se presentó durante la preparación del biocatalizador es que, durante el molido de las semillas para obtener la harina, se genera un aumento en la temperatura lo cual puede provocar la inactivación de algunas enzimas,

siendo así un factor por considerar ya que no se obtiene el producto deseado, por lo tanto, este es un paso crítico para la reacción.

Cuestionario:

1. Dibuje el mecanismo de reacción de formación química de cianohidrinas.
2. Mencione otras fuentes de HNLs.
3. ¿Cuál es la función de las HNLs en las plantas?
4. Importancia biológica de los compuestos quirales.
5. ¿Qué se debe hacer en caso de intoxicación por HCN?

Diagrama de flujo que incluye disposición de residuos



D1: Matar reacción con una disolución de cloro y desechar por el drenaje

D2, D3: Revisar pH, neutralizar y desechar por el drenaje

D4: Desechar en compuestos clorados

Conclusión

Una alternativa verde es utilizar los biocatalizadores ya que estos se han convertido en una herramienta muy utilizada dentro de la síntesis orgánica, ya que tienen la capacidad de aceptar una amplia gama de sustratos, por lo tanto, presentan una alta especificidad quimio-, regio- y enantioselectiva. Por consiguiente, como forma de optimización de la biorreducción de carbonilos, en este caso el piperonal, para la obtención de alcoholes (alcohol piperonílico) de interés farmacéutico e industrial es la inmovilización de enzimas presentes en la hoja de plátano, lo cual reduciría el tiempo, costo de esas reacciones y lo más importante que es una alternativa verde. En este trabajo se obtuvieron rendimientos aceptables de %, y la caracterización del compuesto por IR y por RMN fue el adecuado, lo mismo para el modelo experimental 2 en el cual las cianohidrinas ópticamente activas son intermediarios muy versátiles para la preparación de compuestos quirales, por lo tanto, son precursores de fármacos y agroquímicos que son de interés. En el cual, para llevar a cabo, esta reacción se utilizaron 3 semillas (capulín, almendra y mamey) en el cual se encuentra las HNLs, estas enzimas catalizan la ruptura y síntesis enantioselectiva de cianohidrinas. En cual se obtuvieron rotaciones ópticas significativas y exceso enantiomérico adecuado de acuerdo con la literatura.

Objetivos y metas alcanzadas

Se cumplieron todos los objetivos propuestos en este proyecto ya que:

Se evaluó la capacidad enzimática de preparados enzimáticos crudos y tejidos de plantas para la obtención de moléculas de interés farmacéutico.

Se cumplió con lo propuesto de generar un experimental factible de realizar en el laboratorio de docencia, ya que el modelo experimental 1, fue la reducción del piperonal por la acción enzimática que contiene la hoja de plátano para producir alcohol Piperonilico y el modelo experimental 2, fue la preparación del mandelonitrilo usando como biocatalizador harina desengrasada de almendra, capulín o mamey.

Y por último estos dos modelos experimentales son aplicables en los laboratorios de los módulos de Reactividad de Compuestos Orgánicos de Interés Farmacéutico (IV) y de Obtención de Compuestos Orgánicos de Interés Farmacéutico (V) de la Licenciatura de QFB.

“En estos tiempos, hacer química verde es un reto de todos”.

-Carim Plascencia.

Bibliografía

Bommarius, AS y Riebel-Bommarius, BR (2004). *Biocatálisis: fundamentos y aplicaciones*. John Wiley & Sons.

Bové, C. y Conn, EE (1961). Metabolismo de compuestos aromáticos en plantas superiores II. Purificación y Propiedades de la Oxinitrilasa de *Sorghum vulgare*. *Revista de química biológica*, 236 (1), 207-210.

Bové, C. y Conn, EE (1961). Metabolismo de compuestos aromáticos en plantas superiores: II. Purificación y propiedades de la oxinitrilasa de *Sorghum vulgare*. *Revista de química biológica*, 236 (1), 207-210.

Daußmann T, Hennemann HG, Rosen TC (2006) Enzymatische technologien zur Synthese chiraler alkohol-derivado. *Chem Ing Tech* 78: 249-255

Effenberger, F. (1994). Síntesis y reacciones de cianohidrinas ópticamente activas. *Angewandte Chemie International Edition en inglés*, 33 (15-16), 1555-1564.

Effenberger, F., Ziegler, T., & Förster, S. (1987). Enzymkatalysierte Cyanhydrin-Synthese in organischen Lösungsmitteln. *Angewandte Chemie*, 99(5), 491-492.

Fechter, MH y Griengl, H. (2004). Liasas de hidroxinitrilo: fuentes biológicas y aplicación como biocatalizadores. *Tecnología alimentaria y biotecnología*, 42 (4), 287-294.

Fonseca, A. M., Monte, F. J. Q., María da Conceição, F., de Mattos, M. C., Cordell, G. A., Braz-Filho, R., & Lemos, T. L. (2009). Coconut water (*Cocos nucifera* L.)—A new biocatalyst system for organic synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1-4), 78-82.

Gašo-Sokač, D., Nujić, M., Bušić, V., & Habuda-Stanić, M. (2014). Biocatalytic reductions by plant tissue-Green alternative to alcohol production. *Croatian journal of food science and technology*, 6(1), 51-60.

Gotor, V. (2002). Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals. *Organic process research & development*, 6(4), 420-426.

Griengl, H., Hickel, A., Johnson, D. V., Schmidt, M., Kratky, C., & Schwab, H. (1997). Enzymatic cleavage and formation of cyanohydrins: a reaction of biological and synthetic relevance. *Chemical Communications*, (20), 1933-1940.

Hickel, A., Hasslacher, M. y Griengl, H. (1996). Liasas de hidroxinitrilo: funciones y propiedades. *Physiologia Plantarum*, 98 (4), 891-898.

Hollmann, F., Arends, IW y Holtmann, D. (2011). Reducciones enzimáticas para el químico. *Química verde*, 13 (9), 2285-2314.

Huhtanen, TT y Kanerva, LT (1992). Síntesis catalizada por enzimas de cianohidrinas alifáticas ópticamente activas. *Tetraedro: Asimetría*, 3 (10), 1223-1226.

Kiljunen, E. y Kanerva, LT (1997). Nuevas fuentes de (R) -oxinitrilasa para la síntesis de (R) -cianhidrinas en éter diisopropílico. *Tetraedro: Asimetría*, 8 (8), 1225-1234.

Klempier, N., Pichler, U. y Griengl, H. (1995). Síntesis de (S) -cianohidrinas α , β -insaturadas utilizando la oxinitrilasa de *Hevea brasiliensis*. *Tetraedro: asimetría*, 6 (4), 845-848.

Knowles, C. J., & Bunch, A. W. (1986). Microbial cyanide metabolism. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 27, pp. 73-111). Academic Press.

L. Rosenthaler., (1908) "Enzyme effected asymmetrical synthesis". *Biochem. Zeitschrift*; 14: Pag. 238-253

Lanfranchi, E., Steiner, K., Glieder, A., Hajnal, I., A Sheldon, R., van Pelt, S. y Winkler, M. (2013). Mini revisión: desarrollos recientes en hidroxinitrilo liasas para biotecnología industrial. *Patentes recientes sobre biotecnología*, 7 (3), 197-206.

Leyva, E., Moctezuma, E., Santos-Díaz, M. D. S., Loredó-Carrillo, S. E., & Hernández-González, O. (2012). Fast microwave assisted bioreduction of aromatic aldehydes using Aloe vera: A green chemistry reaction. *Revista latinoamericana de química*, 40(3), 140-147.

Luna, H., Hernández-Vázquez, L., Reyo, A., Arias, L., Manjarrez, N. y Navarro-Ocaña, A. (2014). Residuos de hojas de plátano y maíz como alternativa verde para la preparación de alcoholes bencílicos utilizados como materias primas para fragancias. *Productos y cultivos industriales*, 59, 105-108.

Matsuda, T., Yamanaka, R. y Nakamura, K. (2009). Avances recientes en biocatálisis para oxidación y reducción asimétricas. *Tetraedro: Asimetría*, 20 (5), 513-557.

Montero JMS, Gago JVS. (2007) Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica. In: *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 73 (4): 1199-1236

Naoshima, Y., & Akakabe, Y. (1991). Biotransformation of aromatic ketones with cell cultures of carrot, tobacco and Gardenia. *Phytochemistry*, 30(11), 3595-3597.

Ni, Y., & Xu, J. H. (2012). Biocatalytic ketone reduction: a green and efficient access to enantiopure alcohols. *Biotechnology advances*, 30(6), 1279-1288.

Patil, D. (2015). Biocatalysis using plant material: A green access to asymmetric reduction. *International Journal of ChemTech Research*, 8(8), 318-324.

Purkarthofer, T., Skranc, W., Schuster, C., & Griengl, H. (2007). Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(2), 309-320.

Solís, A., Luna, H., Pérez, H. I., Manjarrez, N., Sánchez, R., Albores-Velasco, M., & Castillo, R. (1998). New sources of (R)-oxynitrilase: capulin (*Prunus capuli*) and mamey (*Mammea americana*). *Biotechnology letters*, 20(12), 1183-1185.

Van Scharrenburg, G. J. M., Sloothaak, J. B., Kruse, C. G., Smitskamp-Wilms, E., & Brussee, J. (1993). The Potential of (R)-and (S)-Oxynitrilases for the Enzymatic Synthesis of Optically Active Cyanohydrins. *ChemInform*, 24(17).

Wagner, UG, Hasslacher, M., Griengl, H., Schwab, H. y Kratky, C. (1996). Mecanismo de cianogénesis: la estructura cristalina de la hidroxinitrilo liasa de *Hevea brasiliensis*. *Estructura*, 4 (7), 811-822.


Wajant, H., & Effenberger, F. (1996). Hydroxynitrile lyases of higher plants. *Biological chemistry*, 377(10), 611-617.

Wajant, H., Förster, S., Böttinger, H., Effenberger, F. y Pfizenmaier, K. (1995a). La acetona cianohidrina liasa de *Manihot esculenta* (mandioca) es serológicamente distinta de otras hidroxinitrilo liasas. *Ciencia de las plantas*, 108 (1), 1-11.

Wajant, H., Forster, S., Selmar, D., Effenberger, F., & Pfizenmaier, K. (1995b). Purification and characterization of a novel (R)-mandelonitrile lyase from the fern *Phlebodium aureum*. *Plant physiology*, 109(4), 1231-1238.

Wöhler, F., & Liebig, J. (1838). Untersuchungen über die Natur der Harnsäure. *Annalen der Pharmacie*, 26(3), 241-336.

Xu, LL, Singh, BK y Conn, EE (1988). Purificación y caracterización de acetoniacianhidrina liasa de *Linum usitatissimum*. *Archivos de bioquímica y biofísica*, 263 (2), 256-263.



Liliana Hernández Vázquez

27790



Héctor Manuel Luna Contla

6252