



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Nombre del proyecto:

Reducción de aldehídos para la obtención de alcoholes utilizando biocatalizadores
inmovilizados de origen vegetal.

Alumna:

Elizabeth Álvarez Montalvo

Matrícula: 2182044562

Asesoras:

Dra. Rubria Marlen Martínez Casares.
No Eco. 41833

Dra. Aida Solís Oba
No Eco. 21208

Lugar de realización: Laboratorio de Biotransformaciones N-201, UAM Xochimilco.

Fecha de inicio y término: 20 de abril del 2022 al 20 de octubre del 2022

RESUMEN

La biocatálisis involucra el uso de biocatalizadores para llevar a cabo la transformación química de las moléculas. Los procesos biocatalíticos juegan un rol importante en la química orgánica debido a que favorecen una disminución sustancial de los efectos negativos sobre el medio ambiente. El uso de las oxidorreductasas como biocatalizadores es una alternativa verde para la reducción de aldehídos y cetonas a los alcoholes correspondientes. El objetivo de este trabajo fue la reducción de benzaldehído para obtener alcohol bencílico, utilizando como biocatalizadores extractos acuosos liofilizados e inmovilizados de origen vegetal, evitando el uso de catalizadores químicos, que son contaminantes para el ambiente.

Se evaluó la actividad reductasa de los materiales vegetales: vaina y semilla de chícharo (*Pisum sativum*), vaina y semilla de haba (*Vicia faba*) y semilla de mamey (*Pouteria sapota*), se utilizó al benzaldehído como reacción modelo. Los mayores porcentajes de reducción de benzaldehído se obtuvieron con: la vaina de haba seca > 99% de reducción; el extracto acuoso de vaina de chícharo obteniendo 96.5%, sin embargo al no ser estable por tiempos prolongados el extracto acuoso se liofilizo e inmovilizo obteniendo 94.3% y 95.3% respectivamente; por otro lado, al inmovilizar el extracto acuoso de vaina de haba, la reducción aumentó de 8% a 95%, con estos resultados se corrobora que el proceso de inmovilización de enzimas logra aumentar su estabilidad y con ello su actividad catalítica.

Las fuentes vegetales que presentaron porcentajes mayores a 90% de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico fueron: extracto acuoso liofilizado e inmovilizado de vaina de chícharo, inmovilizado de vaina de haba y vaina de haba seca. Estos materiales vegetales se utilizaron posteriormente para llevar a cabo la reducción de 2-acetilpiridina (**1a**), 3-acetilpiridina (**1b**) y 4-acetilpiridina (**1c**), a los alcoholes correspondientes (**2a**, **2b** y **2c**). Con la finalidad de optimizar el tiempo, el medio y la temperatura de reacción y así aumentar la enantioselectividad se utilizó **1c** como sustrato modelo.

Las condiciones de la reacción (tiempo, temperatura, solución amortiguadora (SA) y cantidad de biocatalizador) se evaluaron comparando el % de conversión (% Conv) y el % de exceso enantiomérico (% ee). El alcohol (*S*)- **1c** se obtuvo con un 85% ee, usando 100 mg de inmovilizado del extracto acuoso de vaina de haba a 42°C en SA de fosfatos, sin embargo, con el inmovilizado del extracto acuoso de vaina de chícharo (100 mg) a 35°C en SA de fosfatos se obtuvo 48.3 %ee. Por otro lado, se obtuvo un 98.3% ee, usando con 200 mg de vaina de haba seca, en SA de fosfatos a 35°C. Mientras que, con el liofilizado del extracto acuoso de vaina de chícharo (75 mg), con una SA de HEPES a 42°C, el % ee fue de 94.2%. Estos resultados evidencian que las condiciones de reacción y la fuente de biocatalizador, tienen una influencia importante en la pureza óptica del alcohol.

Bajo las condiciones óptimas se evaluó la reducción **1a**, **1b** y **1c** y el %ee de los correspondientes (*S*)-alcoholes (**2a**, **2b** y **2c**), utilizando los extractos acuosos liofilizados de las vainas de chícharo y vaina de haba seca como biocatalizadores. Los mayores % ee que se obtuvieron con extracto acuoso liofilizado de vaina de chícharo y fueron 92.4% y 94.2% para **1a** y **1c**, respectivamente, mientras que el % de reducción fue de 19.3% y 20.4%, respectivamente. Con vaina de haba seca como fuente de biocatalizador, el mayor % ee fue de 94.2 % para **1b**, y un 8% de reducción de la cetona. Con estos resultados se confirma que extracto acuoso liofilizado de vaina de chícharo y vaina de haba seca son buenas fuentes de biocatalizadores, además de ser desechos a los que se les da un valor agregado.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	MARCO TEORICO.....	3
2.1	Biocatálisis	3
2.1.1	Biocatálisis en la industria farmacéutica	3
2.1.2	Biocatalizadores.....	4
2.1.3	Oxidorreductasas.....	8
2.1.4	Importancia de las condiciones de reacción en biocatálisis.....	10
2.1.5	Obtención de alcoholes	10
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4	HIPÓTESIS	15
5	OBJETIVO.....	15
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
6	MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1	Evaluación de la actividad reductasa de los materiales vegetales	16
6.1.1	<i>Obtención de extractos enzimáticos con actividad reductasa.....</i>	<i>16</i>
6.1.2	<i>Obtención de liofilizados de extracto acuoso de los materiales vegetales:</i>	<i>17</i>
6.1.3	<i>Inmovilización del extracto acuoso vegetal con actividad reductasa</i>	<i>17</i>
6.1.4	<i>Evaluación de la actividad reductasa de los materiales vegetales.....</i>	<i>17</i>
6.2	Reducción de cetonas	19
6.2.1	<i>Reducción química con borohidruro de sodio en solución.....</i>	<i>19</i>
6.2.2	<i>Evaluación de la actividad reductasa y exceso enantiomérico</i>	<i>19</i>
6.2.3	Métodos de análisis por CG y HPLC	19
6.3	Determinación de proteínas en los materiales vegetales	20
6.4	Análisis Estadístico.....	21
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22

7.1	Evaluación de la actividad reductasa del extracto acuoso de semilla de chícharo con respecto al tiempo (24 y 48h).....	22
7.2	Evaluación de la actividad reductasa del extracto acuoso, liofilizado e inmovilizados de semilla y vaina de chícharo	22
7.3	Evaluación de la actividad reductasa del extracto acuoso, liofilizados e inmovilizados de semilla de haba, mamey y vaina de haba.....	24
7.4	Reducción química de 2-acetilpiridna, 3-acetilpiridina y 4-acetilpiridina	26
7.5	Evaluación de las condiciones de reacción para la reducción de 4-acetilpiridina.	26
7.5.1	Evaluación del tiempo de reacción para la reducción de 4-acetilpiridina ...	27
7.5.2	Evaluación del medio de reacción (solución amortiguadora (SA) de fosfatos y/o HEPES) para la reducción de 4-acetilpiridina.....	29
7.5.3	Evaluación de la temperatura del medio de reacción (35°C y 42°C) y cantidad de polvo para la reducción de 4-acetilpiridina	31
7.6	Evaluación de cetonas heterocíclicas para la obtención de alcoholes ópticamente puros	33
7.7	Cuantificación de proteínas en el extracto acuoso liofiliza e inmovilizado de desechos vegetales: vaina de chícharo y vaina de haba.	35
8	CONCLUSIONES.....	36
9	BIBLIOGRAFIA	37
10	ANEXOS	42

Índice de tablas

Tabla 1.	Clasificación de las enzimas.....	8
Tabla 2.	Cetonas heterocíclicas utilizadas como sustrato para las biorreducciones	18
Tabla 3.	Condiciones utilizadas para determinar el % Conversión por CG.....	20
Tabla 4.	Condiciones utilizadas para determinar el % ee por HPLC.	20
Tabla 5.	Porcentaje de conversión utilizando extracto acuoso del chícharo a las 3h, 24h y 48h de reacción.	22
Tabla 6.	Rendimientos de reacción	26
Tabla 7.	Determinación de la concentración de proteínas por gramo muestra de las fuentes vegetales.	35

Índice de esquemas

Esquema 1.	Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico	18
Esquema 2.	Reducción de 2-acetilpiridina (1a), 3-acetilpiridina (1b) y 4-acetilpiridina (1c) a los alcoholes respectivos (2a , 2b y 2c).....	19

Índice de gráficas

Gráfica 1.	Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico usando los extractos acuosos de semilla de chícharo (CHI) y vaina de chícharo (CCHI) recién preparados, extractos acuosos de semilla de chícharo (CHI6D, CHI15D) y vaina de chícharo (CCHI6D, CCHI15D) almacenados en refrigeración a los 6 y 15 días respectivamente, liofilizado (LCHI) e inmovilizado (ICHI) de semilla de chícharo y liofilizado (LCCHI) e inmovilizado (ICCHI) de vaina de chícharo. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ diferencia estadísticamente significativa.	23
Gráfica 2.	Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico usando los extractos acuosos, liofilizados e inmovilizados de semilla de haba con tegumento (Haba CT), sin tegumento (Haba ST), mamey (S. Mamey), vaina de haba (Vaina haba) y vaina de haba	

seca (Material Vegetal Liofilizado), ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ diferencia estadísticamente significativa. 25

Gráfica 3. A) Reducción de 4-acetilpiridina a 1-(4-piridil)etanol. **B)** Exceso enantiomérico de (S)-1-(4-piridil)etanol. Usando liofilizado (LCC) e inmovilizado (ICC) de vaina de chícharo, liofilizado (LVH) e inmovilizado (IVH) de vaina de haba y vaina de haba seca (VHS), con 24 y 48 horas de reacción, utilizando como medio de reacción SA de fosfatos (0.15M, pH 8.1) y 35°C, 28

De acuerdo con los resultados se observó que dependiendo del tipo de fuente vegetal puede variar el tiempo óptimo de reacción. Por esta razón se determinó que la mejor fuente con el que se obtienen un % ee > 95% y un % de Conversión > 38% es la vaina de haba seca a las 48h, sin embargo, con este tiempo de reacción se vuelve difícil el manejo de la reacción, ya que la reacción tiende a secarse y el proceso de extracción no es eficiente, por tal razón se decidió que el tiempo de reacción sea de 24h obteniendo un % ee > 95% pero un % de Conversión de 8.6%. Otras fuentes con resultados interesantes fueron el extracto acuoso liofilizado e inmovilizado de vaina de haba debido a que son más estables a las 24h y se obtiene un % ee > 75%. Para el inmovilizado de vaina de chícharo el tiempo de reacción óptimo fue de 24h debió que al incrementar el tiempo de reacción (48h) se presenta una disminución en el % ee. Por lo anterior, el tiempo de reacción utilizado en la evaluación de reducción de cetonas fue de 24h para los siguientes experimentos. 28

En la **gráfica 4B** el exceso enantiomérico de (S)-**1c** es más alto al utilizar una SA de fosfatos como medio de reacción. Al evaluar la reducción con la vaina de haba seca, 200 mg de polvo con SA de fosfatos se obtuvo un 98.3% ee, más alto que al utilizar SA de HEPES (94.2% ee). Para vaina de haba seca con 400 mg de polvo, no hay diferencia estadísticamente significativa al utilizar cualquiera de las dos SA, por otro lado, para el extracto acuoso liofilizado de vaina de haba al utilizar SA de fosfatos se obtiene 75.6% ee y al utilizar SA de HEPES se obtiene 53.7% ee. El liofilizado de vaina de haba al reducir **1c** se obtuvo menos de 80% ee con ambas SA, lo mismo sucede con el inmovilizado de vaina de haba, al utilizar SA de fosfatos como medio de reacción se obtiene un 63.6% ee. En ambos casos son más altos los % de conversión pero la pureza enantiomérica es mucho menor. 29

Gráfica 4. A) Reducción de 4-acetilpiridina a 1-(4-piridil)etanol. **B)** Exceso enantiomérico de (S)-1-(4-piridil)etanol. Usando liofilizado de vaina de haba (LVH), vaina de haba seca con 200 mg de polvo (VHS-200) y con 400 mg de polvo (VHS-400) e inmovilizado de vaina de haba (IVH), el medio de reacción fue en SA de fosfatos (FS) y HEPES (HE). 30

A partir del análisis de los resultados obtenidos se determinó que el medio de reacción óptimo es en SA de fosfatos, a pesar de los % de reducción bajos, se observó que hay mayores % ee en comparación que cuando se utiliza SA de HEPES como medio de reacción y la mejor fuente vegetal es la vaina de haba seca con 200 mg de polvo con la que se obtuvo > 95% ee, otra de las ventajas que tiene utilizar la vaina de haba seca es su preparación debido a que es un proceso fácil y práctico. 30

Martines, R. reporta que al evaluar las cetonas con SA de HEPES obtuvo un % reducción mayor en comparación con otras SA como: TES, Tris-HCl y boratos, por lo que se confirma que al utilizar HEPES mejora los % de reducción, sin embargo, Martines, R. reporta un % ee no muestra diferencia estadísticamente significativa en las cuatro soluciones amortiguadoras, en esta investigación los mayores % ee se obtuvieron al utilizar la SA de fosfatos. 31

Gráfica 5. A) Reducción de 4-acetilpiridina a 1-(4-piridil)etanol. **B)** Exceso enantiomérico de (S)-1-(4-piridil)etanol. Usando vaina de haba seca con 200 mg de polvo (VHS-200), con 300 mg (VSH-300) y 400 mg (VHS-400); liofilizado de vaina de chícharo con 50 mg de polvo (LCC-50), con 75 mg (LCC-75) y 100 mg (LCC-100) e inmovilizado de vaina de haba con 100 mg de polvo (IVH-100) y con 200 mg (IVH-200), la temperatura del medio de reacción fue a 35°C y a 42°C. 32

Gráfica 6. A) Reducción de 2-acetilpiridina (**1a**), 3-acetilpiridina (**1b**) y 4-acetilpiridina (**1c**) a los alcoholes correspondientes (S)-**2a**, (S)-**2b**, (S)-**2c**. **B)** Exceso enantiomérico de (S)-1-(2-piridil)etanol (**2a**), (S)-1-(3-piridil)etanol (**2b**) y (S)-1-(4-piridil)etanol (**2c**). Usando vaina de haba seca con **1a** (VHS-1a), con **1b** (VHS-1b) y con **1c** (VHS-1c); liofilizado de vaina de chícharo con **1a** (LCC-1a), con **1b** (LCC-1b) y con **1c** (LCC-1c), el medio de reacción fue con buffer de fosfatos (FS) y HEPES (HE). 34

1 INTRODUCCIÓN

Los procesos biocatalíticos involucran el uso de biocatalizadores en la transformación química de moléculas, en los procesos industriales se ha evaluado el uso de enzimas, aplicadas en un amplio número de reacciones (Arroyo, M. *et al.* 2014). Por ejemplo, entre las enzimas oxidorreductasas se encuentran las aldocetoreductasas, que catalizan la biotransformación del grupo carbonilo de aldehídos o cetonas a los alcoholes correspondientes y viceversa (Gamenara, D. *et al.* 2013). Como fuentes de aldocetoreductasas se pueden utilizar las raíces, frutos, semillas y hojas de diversas plantas como frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Solís, A. *et al.* 2019), brócoli (*Brassica oleracea var. italica*) entre otras (Suárez, G. *et al.* 2010).

La reducción de aldehídos y cetonas constituye una herramienta importante en química orgánica para la preparación de alcoholes, que se pueden utilizar en la síntesis de cosméticos, productos farmacéuticos y agroquímicos. Actualmente existen diversos sistemas de reducción química que garantizan altos rendimientos, sin embargo, utilizan metales difíciles de disponer una vez terminada la reacción, una alternativa atractiva es el uso de biocatalizadores de origen vegetal los cuales, frecuentemente, son baratos y fáciles de conseguir (Solís, A. *et al.* 2019).

Los biocatalizadores presentan ventajas frente a los catalizadores inorgánicos tradicionales como: a) una elevada especificidad, estereoselectividad y regioespecificidad; y b) una mayor actividad catalítica a temperatura ambiente y presión atmosférica. A pesar de estas claras ventajas, el empleo de los biocatalizadores no se ha generalizado en la industria, debido principalmente a: (I) su limitada estabilidad ya que al ser proteínas se pueden desnaturalizar, y perder totalmente su actividad; y (II) la dificultad que implica el separar el biocatalizador de los sustratos y productos en el medio de reacción, lo que impide su reutilización (Chauhan, S. *et al.* 2015).

Por medio de la inmovilización de enzimas se ha logrado aumentar su estabilidad, facilitando su manejo y separación en los procesos, permiten un uso continuo, aumenta su reproducibilidad, se puede reutilizar manteniendo las propiedades de la enzima, lo que convierte a este procedimiento en un proceso interesante y económicamente viable

(Yushkova, E. *et al.* 2019). La tecnología de inmovilización de enzimas crea nuevas e interesantes oportunidades de desarrollo comercial en una amplia gama de industrias.

Por lo anterior, el presente trabajo, tiene como objetivo la reducción de benzaldehído, para obtener alcohol bencílico, utilizando oxidorreductasas inmovilizadas de origen vegetal. Para ello se evaluó y se comparó la actividad oxidorreductasa de las fuentes vegetales con la oxidorreductasa inmovilizada y no inmovilizada.

2 MARCO TEORICO

2.1 Biocatálisis

La biocatálisis es una rama de la biotecnología que involucra el uso de biocatalizadores en la transformación química de las moléculas o sustratos (Cervantes, F., 2012). Los procesos biocatalíticos son una alternativa sostenible, que ofrecen ventajas frente a la química orgánica tradicional. Esto se ha determinado a través de herramientas sencillas midiendo el impacto ecológico de las biotransformaciones, tomando en cuenta los reactivos y disolventes empleados, así como todos los productos involucrados (Gotor, V. & Gómez, M., 2017).

Hasta hace unos años, la industria química no incluía en sus planes el uso de sistemas biológicos, sin embargo, los graves problemas ambientales que comenzaron a aparecer promovieron la búsqueda de alternativas limpias. Así, los procesos que involucran biocatalizadores comenzaron a jugar un rol importante, debido a la biodegradabilidad de los biocatalizadores, además por lo general las reacciones biocatalizadas requieren menos energía, se producen pocos productos secundarios y los residuos son de menor toxicidad (Lewkowicz, E. & Nóbile, M., 2017).

Algunas de las ventajas de las reacciones biocatalizadas son: su alta quimio, regio y estereoselectividad, una menor formación de subproductos y residuos, un menor consumo de energía y una disminución sustancial de los efectos negativos sobre el medio ambiente, por lo anterior, estas reacciones pueden utilizarse de forma sustentable por que se ajustan a algunos de los principios de la química verde (Solís, A. *et al.* 2018).

2.1.1 Biocatálisis en la industria farmacéutica

La biocatálisis es de vital importancia y a incrementado su valor en la investigación, desarrollo y producción de principios activos farmacéuticos, productos químicos, soluciones ambientales y en la industria cosmética (Lewkowicz, E. & Nóbile, M., 2017).

La Industria Farmacéutica se enfrenta en la actualidad a retos fundamentales. Un de ellos es reducir al menos en un orden de magnitud la producción de residuos por kilogramo de

producto. Lo cual implica el desarrollo de procesos de síntesis más eficaces y selectivos utilizando mejores catalizadores y/o biocatalizadores, con la finalidad de disminuir la generación de subproductos. El empleo de biocatalizadores en uno o varios pasos de la síntesis de un fármaco evita la utilización de grupos protectores y disminuye el número de pasos de la síntesis, aumentando el rendimiento y reduciendo la producción de residuos contaminantes.(Sanchez, J. & Sinisterra, J., 2007).

2.1.2 Biocatalizadores

Un catalizador es una sustancia que aumenta la velocidad de una reacción química, sin verse alterada ella misma en el proceso global. El papel de un catalizador consiste en reducir el valor de la energía libre de Gibbs (ΔG°) al facilitar la formación del estado de transición. (Cervantes, F., 2012).

Los biocatalizadores son proteínas que denominamos enzimas, son producidas por los sistemas vivos con finalidad catalítica, para facilitar las transformaciones químicas que tienen lugar a partir de los nutrientes en todos los organismos vivos y, debido a su amplia distribución en la naturaleza, se han empleado en las últimas décadas como catalizadores en síntesis orgánica para la preparación de compuestos como: fármacos, productos agroquímicos y otros productos con actividad biológica (Camacho, M. & Campos, J., 2007; Delgado, A. *et al.* 2002).

Uno de los factores que ha promovido el empleo de biocatalizadores es la elevada estereoselectividad, que rara vez es alcanzable a través de métodos químicos convencionales utilizando catalizadores químicos (Cui, J. *et al.* 2022; Delgado, A. *et al.* 2002). En los últimos años se han diseñado biocatalizadores mejorados y cada vez son más precisos y fáciles de utilizar (Bommarius, A. & Riebel, B., 2004).

2.1.2.1 Fuentes de obtención de los biocatalizadores

En los procesos biocatalizados se pueden usar como fuentes enzimáticas células enteras y/o enzimas aisladas, que pueden ser de origen animal, vegetal o microbiana y pueden estar en forma libre o inmovilizada. La elección de usar una u otra dependerá de diversos factores como el tipo de reacción, la necesidad de cofactores, el costo y la escala a la cual se lleve a cabo el proceso (Faber, K., 2003).

A. Células completas

El uso de células completas de origen microbiano o vegetal, 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 utilizar células completas es que las enzimas son generalmente más estables, se evita la adición de cofactores o la regeneración de estos sistemas. (Yang, G. *et al.* 2009; Vandenberghe, A. *et al.* 2013)

B. 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 reacciones. 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 (Vandenberghe, A. *et al.* 2013).

Purificar las enzimas resulta una metodología muy costosa y no se pueden reutilizar (Castillo, E. & Rodríguez, M., 2014). Además, por razones técnicas y económicas, la mayoría de los procesos químicos catalizados por enzimas requieren la reutilización o el uso continuo de biocatalizadores durante mucho tiempo. La tecnología de inmovilización crea nuevas e interesantes oportunidades de desarrollo comercial en una amplia gama de industrias.

C. Enzimas inmovilizadas

El término enzimas inmovilizadas se refiere a enzimas físicamente confinadas o localizadas en una región definida del espacio con retención de sus actividades catalíticas que pueden utilizarse de forma repetida (Chauhan, S. *et al.* 2015).

La inmovilización de enzimas se utiliza para mejorar las características catalíticas de las enzimas frente a varias formas de desnaturalización, así como para hacer

económicamente viable el uso de enzimas costosas reforzando su uso repetido (Walker, J., 2013).

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: la retención física y la unión química (Walker, J., 2013). El atrapamiento de enzimas y la inclusión en membranas son los principales métodos de inmovilización por retención física, mientras que la unión de enzimas a soportes y el reticulado son los métodos por unión química más destacados.

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosas enzimas, se reconoce que no existe un método universal válido. No obstante, gracias a toda la información disponible, se podría seleccionar la técnica más adecuada para inmovilizar una enzima destinada a una aplicación industrial concreta (Arroyo, M., *et al.* 2014).

El desarrollo de procesos industriales utilizando enzimas inmovilizadas ha incrementado de manera sustancial en las últimas décadas. Esto se debe a que no sólo se ha comprobado que la inmovilización de las enzimas permite reciclar el biocatalizador, sino que, además, la inmovilización contribuye de manera importante a incrementar la estabilidad operacional del biocatalizador, permite un diseño racional del reactor y, en algunos casos, a mejorar incluso su eficiencia catalítica (Castillo, E. & Rodríguez, M., 2014).

2.1.2.2 Biocatalizadores de origen microbiano

Los microorganismos han sido la fuente principal de enzimas, debido a que son una fuente muy versátil, los microorganismos pueden ser aislados de nuevas y diferentes fuentes naturales, encontrando nuevos biocatalizadores. Variar las condiciones en el medio de crecimiento aumenta el crecimiento del microorganismo y con ello aumentar la producción de enzima. Actualmente, los microorganismos son modificados mediante ingeniería genética para obtener enzimas en mayor cantidad y más resistentes a condiciones extremas como: temperatura, pH, cantidad de reactivo, entre otras, lo que representan una alternativa sencilla y económica, además la purificación de enzimas

extracelulares es fácil. Sin embargo, cuando se usan enzimas intracelulares, el proceso de purificación llega a dificultarse (Camacho, M. & Campos, J., 2007).

En los últimos años, se ha explorado el uso de enzimas vegetales, con la finalidad de incrementar la búsqueda de metodologías más sustentables, simples y económicas. (Solís, A. *et al.* 2018).

2.1.2.3 Biocatalizadores de origen vegetal

Está reportado que las preparaciones crudas de partes de plantas frescas, como las raíces, los frutos, las semillas o las hojas, pueden utilizarse como biocatalizadores. El uso de partes de plantas evita el aislamiento de enzimas.

El empleo de células vegetales depende de ciertos factores como: la solubilidad de los precursores, la actividad enzimática, la localización de las enzimas, reacciones colaterales que dan productos no deseados y presencia de enzimas que degradan los productos esperados. El pH, la permeabilización y efectos osmóticos también influyen en la capacidad de bioconversión de las células (Dolian, S., 2010). Muchas reacciones enzimáticas, específicamente las de oxidación y reducción requieren usar cofactores como el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) y el dinucleótido fosfato nicotinamida y adenina (NADP), que son caros e inestables, en estos casos es conveniente utilizar las células enteras (Faber, K., 2003). Algunos ejemplos recientes de fuentes reductoras son: el jugo de caña, semillas de judía mungo, fruta de la pasión fresca, brócoli, las espinacas, etc. (Solís, A. *et al.* 2018). Además, dado que México es un país con una gran biodiversidad, un cribado de la diversidad natural puede conducir al descubrimiento de nuevos biocatalizadores (Solís, A. *et al.* 2018).

2.1.2.4 Clasificación de enzimas

La International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) ha clasificado a las enzimas en seis grupos, de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan, ver **Tabla 1** (Cornish-Bowden, A., 2014).

Tabla 1. Clasificación de las enzimas

Clasificación	Clase	Función	Ejemplos de Subclases
EC. 1	Oxidorreductasas	Reacciones de óxido-reducción.	Deshidrogenasas Oxidasas Reductasas
EC. 2	Transferasas	Transferencia de grupos de una a otra molécula (metilo, acilo, glicosilo, fosfato, etc.)	Quinasas Transaminasas
EC. 3	Hidrolasas	Formación e hidrolisis de esteres, amidas, epóxidos, nitrilos, glucósidos, éteres, etc.	Lipasas Nucleasas Proteasas
EC. 4	Liasas	Adición-eliminación de moléculas pequeñas sobre C=C, C=O, C=N, etc.	Descarboxilasas
EC. 5	Isomerasas	Isomerizaciones como racemizaciones, epimerizaciones, transposiciones, etc	Epimerasas
EC. 6	Ligasas	Formación de nuevos enlaces, C-O, C-S, C-N, C-C con gasto asociado de ATP.	Carboxilasas Sintetasas

Las principales clases de enzimas que son utilizadas en síntesis orgánica son las oxidorreductasas, transaminasas e hidrolasas (Xie, Y. *et al.* 2009).

2.1.3 Oxidorreductasas

Se estima que cerca del 25% de las enzimas conocidas son de la familia de las oxidorreductasas y representan aproximadamente el 30% de las enzimas utilizadas por la industria farmacéutica (García, J; Hernáiz, M. & Hoyos, P; 2014).

Las oxidorreductasas son enzimas que catalizan reacciones de oxidación y reducción, que en el medio biológico tienen lugar a través de transferencia de electrones o átomos de hidrogeno de un donador (reductor) a un aceptor (oxidante). Otras veces la reacción consiste en la incorporación de átomos de oxígeno en el sustrato (Battaner E., 2013).

La gama de sustratos sobre los que pueden actuar es amplia, desde alcoholes, aminas aldehídos o cetonas hasta sustratos inorgánicos como pequeños aniones o metales. Su uso más habitual incluye tanto la reducción de dobles enlaces como el proceso reversible de oxidación tanto de alcoholes como de aminas (Gotor, F & Gómez., 2017).

Algunas de las ventajas de las oxidorreductasas son:

- Participan en pasos de síntesis complejas llevándolos a cabo en unas condiciones suaves.
- Son estereoselectividad, regioespecíficas además de alcanzar los parámetros cinéticos apropiados y la adquisición óptima de especificidad de sustrato.
- Su empleo es una buena opción desde el punto de vista medio ambiental comparándolo con el uso de las enzimas de la química redox, que normalmente contienen metales de transición. (Sellés, L. *et al.* 2018)

2.1.3.1 Aldocetoreductasas

Las Aldocetoreductasas son oxidoreductasas que catalizan la biotransformación de cetonas o aldehídos a los correspondientes alcoholes y viceversa a expensas del cofactor de NAD⁺ o NADP⁺ (Sengupa. *et al.* 2015)

De acuerdo con Nealon (2015), las oxidoreductasas dependientes de NADP⁺ como la aldocetoreductasa son de gran interés desde el punto de vista industrial, ya que realizan los pasos críticos en la producción de muchos compuestos difíciles de sintetizar, en condiciones suaves. Además, las oxidoreductasas dependientes de NADP⁺ poseen otras propiedades que las convierten en alternativas muy atractivas a la síntesis química orgánica, como la estereoespecificidad, la regioespecificidad y la posibilidad de adaptarlas para que tengan los parámetros cinéticos apropiados y la especificidad de sustrato deseada.

Se ha demostrado que las plantas son catalizadores útiles para la reducción específica de aldehídos y cetonas a los alcoholes correspondientes. En la literatura se ha reportado el aislamiento y caracterización de oxidoreductasas para biocatálisis en plantas, por ejemplo, zanahoria (*Daucus carota*), apio (*Apium graveolens*) (Mączka, W., *et al.* 2018). frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Solís, A. *et al.* 2019), brócoli (*Brassica oleracea var. italica*) entre otras (Suárez, G. *et al.* 2010).

La reducción de benzaldehído a alcohol bencílico se utiliza como reacción modelo para identificar nuevas fuentes de reductasas en diferentes plantas o sus partes que son fácilmente accesibles en los mercados locales (Solís, A. *et al.* 2018).

2.1.4 Importancia de las condiciones de reacción en biocatálisis

Las enzimas, siendo catalizadores biológicos, pueden ser utilizadas en una gran variedad de aplicaciones como lo son la industria alimenticia, la industria textil, el tratamiento de efluentes, y muchas otras áreas de interés comercial; sin embargo, su actividad tiende a ser poco estable debido que su estructura suele ser frágil, y por lo mismo se desnaturalizan si no se encuentran en condiciones específicas de pH y/o temperatura (De Jesús Rostro-Alanis, M., 2016).

La mayoría de los enzimas presentan un pH óptimo para el cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye bruscamente. Este efecto se debe a que, al ser las enzimas de naturaleza proteica, se desnaturalizan y pierden su actividad si el pH varía más allá de unos límites estrechos. Cualquier cambio brusco de pH puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima. A pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación (Pérez, F., 2017).

La variación de la actividad enzimática con la temperatura es diferente de unas enzimas a otras, está en función de la barrera de energía de activación de la reacción catalizada. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en otras reacciones químicas, en las reacciones catalizadas por enzimas el efecto de la temperatura es más complejo porque casi todas las enzimas se desnaturalizan al ser calentadas por encima de las temperaturas fisiológicas. La conformación de las enzimas se altera usualmente de manera irreversible perdiendo la actividad catalítica (Lodeiro, A., 2017).

2.1.5 Obtención de alcoholes

A. Reducción química

La reducción química del grupo carbonilo del benzaldehído al alcohol correspondiente implica el uso de metales pesados o sus hidruros, tales como borohidruro de sodio (NaBH_4), hidruro de aluminio y litio (LiAlH_4), trietilborohidruro de litio (LiBHEt_3), bis(trimetilsilil) amida de litio ($\text{Li}(\text{Si})_3\text{BH}$), cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3), bis(2-metilpropil)aluman (DIBAL), borohidruro de zinc ($\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$) o mediante la desproporción

de benzaldehído sobre óxidos metálicos básicos irreducibles (reacción de Cannizzaro) como óxido de zinc (ZnO), óxido de cromo (Cr_2O_3), óxido de magnesio (MgO), óxido de calcio (CaO), óxido de bario (BaO), óxido de estroncio (SrO). Algunas de las sustancias empleadas en la reducción son inflamables y pueden constituir un peligro para la salud. Además, requieren altos gastos de energía y las duras condiciones de reacción, este proceso adolece de problemas de sostenibilidad, ya que implica el uso de materias primas no renovables (Solís, A. *et al.* 2017).

Usualmente se elige el NaBH_4 , debido a la seguridad y la facilidad de su manejo, este compuesto es un sólido cristalino blanco que se puede manipular y pesar sin peligro en atmósfera abierta y usar en agua o en solución alcohólica. Suelen obtenerse altos rendimientos de alcohol. El LiAlH_4 , es un polvo blanco soluble en éter y tetrahidrofurano, es otro agente reductor. Si bien es más potente y reactivo que el NaBH_4 , el LiAlH_4 es también peligroso, y debe ser manejado por personas experimentadas. Reacciona violentamente con el agua, se descompone cuando se calienta a más de $125\text{ }^\circ\text{C}$, a pesar de estos inconvenientes, el LiAlH_4 es un reactivo en extremo valioso y se usa con frecuencia en el laboratorio (Pila, M. *et al.* 2022).

La reducción del grupo carbonilo por hidruros son complejos, ya que el ion hidruro no existe como entidad discreta. Sin embargo, los agentes reductores mencionados, funcionan como si fueran “equivalentes de iones hidruros” y el paso fundamental en la reducción del grupo carbonilo es una adición nucleofílica. Una vez que la primera reacción se completa, se adiciona agua o ácido diluido para protonar el alcóxido y generar el alcohol como producto final. Los aldehídos y las cetonas reaccionan con LiAlH_4 y NaBH_4 ; la reacción de reducción implica una adición nucleofílica de ión hidruro al aldehído o cetona. Los aldehídos se reducen a alcoholes primarios y las cetonas a alcoholes secundarios (Pila, M. *et al.* 2022).

B. Síntesis asimétrica

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. Al igual que el rodio los complejos

de rutenio también son efectivos cuando se usa con diversos ligandos de fosfina quirales (Xu G. *et al.* 2012; Vandenberghe, A. *et al.* 2013; Fruchey E., 2011).

Los catalizadores de rutenio unido a ligandos como BINAP [(2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo)] y BPPM ([[(2*S*, 4*S*)-1-terc-butoxicarbonil-4- difenilfosfino-2-(difenilfosfinometil) pirrolidina]), 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 %. En cuanto a las condiciones de reacción, por lo general se llevan a cabo bajo presión de hidrógeno, en diclorometano o metanol acuoso como disolventes y en algunos casos temperaturas elevadas de hasta 100 °C, reduciendo el tiempo de reacción sin pérdida significativa de selectividad (Fruchey E., 2011).

C. Biocatálisis

La biocatálisis es una herramienta mucho más versátil y poderosa en comparación con el procesamiento químico convencional, el empleo de aldocetoreductasas pueden ofrecer reacciones altamente selectivas, procesos ambientalmente benignos (Ni, Y., & Xu, J., 2012), evitando pasos de protección y desprotección de grupos funcionales, dando como resultado procesos más cortos (Solís, A. *et al.* 2018), es decir, son económicas y ambientalmente mejores que las síntesis químicas convencionales.

2.1.5.1 Importancia de los alcoholes quirales en la industria farmacéutica

La quiralidad es un factor determinante en la eficacia de muchos fármacos, agroquímicos y aditivos para alimentos, ya que de ello depende su actividad biológica, por ello la producción de un solo enantiómero de estos compuestos quirales es muy importante en la industria agroquímica, de alimentos y especialmente farmacéutica (Luna, H., 2004). Los alcoholes quirales enantioméricamente puros son intermedios valiosos en la preparación de una serie de moléculas biológicamente activas y moléculas precursoras de fármacos (Çolak, S., *et al.* 2019).

Actualmente, los alcoholes enantioméricamente puros son importantes bloques de construcción que se utilizan ampliamente como productos intermedios en las industrias

química y farmacéutica para la síntesis de productos finos con centros quirales como fármacos, aromatizantes y agroquímicos (Chen, B. & Zeferino, F; 2019). Las oxidorreductasas han sido utilizadas para obtener alcoholes ópticamente puros a partir de cetonas, los cuales son precursores importantes utilizados en la industria química y farmacéutica, como ejemplo de algunas de las transformaciones se encuentra la reducción asimétrica de la tetrahidrotiofen-3-ona para la obtención del (*R*)-tetrahidrotiofen-3-ol, que es un componente clave para síntesis de sulopenem, otro ejemplo es la reducción asimétrica de 4-cloro-3-oxo-utanoato de etilo para la obtención del (*S*)-alcohol correspondiente que es un precursor para la producción de la atorvastatina (Gao-Wei, Z. & Jian-He, X., 2011).

La reducción de 4-benziloxi-3-metano-sulfonilamino-2-bromo-acetofenona para la obtención de su correspondiente (*R*)-alcohol (intermediario en la producción de una molécula agonistas del receptor β_3). Otro ejemplo es la reducción de 2-bromo-4-fluoro acetofenona para la obtención de (*S*)-1-(2-bromo-4-fluorofenil) etanol, utilizado en la síntesis de fármacos anti-alzhéimer (Simon, R., Mutti, F. & Kroutil, W., 2013; Yan, Z. *et al.* 2011).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obtención de alcoholes por síntesis química tradicional garantiza altos rendimientos, sin embargo, implica el uso de metales pesados o hidruros, algunas sustancias inflamables, condiciones duras de reacción y gasto intensivo de energía e implica el uso de materia primas no renovables. El uso de las oxidoreductasas como biocatalizadores es una alternativa verde para la producción de estos alcoholes.

Los procesos biocatalíticos desempeñan un creciente rol en síntesis orgánica, ofreciendo alternativas sostenibles a los procesos químicos convencionales. Esto se determina a través de herramientas sencillas para la medida del impacto ecológico de las biotransformaciones, pudiendo tener en cuenta los reactivos y disolventes empleados, así como todos los productos involucrados. En consecuencia, es importante el estudio de nueva fuentes de biocatalizadores de origen vegetal, para la obtención de oxidoreductasas y llevar a cabo la reducción de benzaldehído para obtener los correspondientes alcoholes de interés en la industria farmacéutica.

4 HIPÓTESIS

Las oxidorreductasas presentes en los extractos acuoso liofilizado e inmovilizado de chícharo (*Pisum sativum*), haba (*Vicia faba*) y mamey (*Potería sapota*), serán capaces de llevar a cabo la reducción de aldehídos a los correspondientes alcoholes.

5 OBJETIVO

Llevar a cabo la reducción de aldehídos para la obtención de alcoholes, utilizando biocatalizadores inmovilizados de origen vegetal.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Obtener un extracto enzimático con actividad reductasa a partir de materiales vegetales.
- Evaluar la actividad reductasa de los extractos enzimáticos obtenidos de los materiales vegetales
- Inmovilizar las enzimas presentes en los extractos vegetales que muestren actividad reductasa.
- Comparar la actividad oxidorreductasa del extracto inmovilizado con el extracto vegetal
- Evaluar la actividad reductasa del extracto inmovilizado de las diferentes fuentes vegetales para la reducción de aldehídos a los alcoholes correspondientes.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

Benzaldehído, alcohol bencílico, 2-acetilpiridina (**1a**), 3-acetilpirida (**1b**), 4-acetilpiridina (**1c**) y el Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El ácido bórico, bicarbonato de sodio sulfato de sodio anhidro, fosfato de potasio monobásico y dibásico fueron de J. T. Baker. El acetato de etilo, diisopropiléter (grado industrial), isopropanol y diclorometano (ambos grado HPLC) se obtuvieron de Tecsiquim, el Hexano (grado HPLC) de Burdick & Jackson.

El equipo utilizado fue el siguiente: potenciómetro Corning Pinnacle M530; Balanza analítica Mettler Toledo AG345; cromatógrafo de gases (CG) HP 6890, la columna HP-5 de Agilent Technologies; el cromatógrafo de líquidos (HPLC) Agilent Series 1100, las columnas OJ-H (0.46 x 25 cm) y OB-H (0.46 x 5 cm), ambas Daicel Chiralcel; molino de café Hamilton Beach 80374; incubadora Enviro-Genie; liofilizadora Labconco FreeZone 4.5.

1-(2-piridil)-etanol (**2a**), 1-(3-piridil)-etanol (**2b**) y 1-(4-piridil)-etanol (**2c**) fueron sintetizados y caracterizados en el laboratorio.

Los materiales vegetales, chícharo (*Pisum sativum*), haba (*Vicia faba*) y mamey (*Potería sapota*) se adquirieron de un mercado local de la ciudad de México.

6.1 Evaluación de la actividad reductasa de los materiales vegetales

6.1.1 Obtención de extractos enzimáticos con actividad reductasa

Material vegetal fresco: El material vegetal se lavó con agua y jabón, se sumergió durante 1 min en solución de hipoclorito de sodio al 5%, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. El material vegetal se pesó y se molió con agua destilada (relación 1:1 o 1:2 p/v), posteriormente se centrifugó a 4000 rpm, 10 min a 5 °C, el sobrenadante (extracto acuoso) se utilizó como fuente de reductasa.

Polvos acetónicos: Las semillas de mamey se molieron en licuadora con acetona, después se filtraron en un embudo Buhner, el proceso se repitió 3 veces, la harina se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente tamizar. A 1 g de harina

desengrasada se le agregó 10 mL de agua destilada y se agitó durante 1 h, se centrifugó a 4000 rpm, 10 min a 5 °C, el sobrenadante (extracto acuoso) se usó como fuente de reductasa.

Material vegetal liofilizado: El material vegetal se lavó con agua y jabón, se sumergió durante 1 minuto en solución de hipoclorito de sodio al 5%, se enjuagó con agua destilada, se congeló y se liofilizó, finalmente se molió y se homogeneizó el tamaño de partícula.

6.1.2 Obtención de liofilizados de extracto acuoso de los materiales vegetales:

El extracto acuoso (10 mL) se congeló a -70°C y se liofilizó. Posteriormente se recuperó el polvo liofilizado, se pesó y tamizó. Los materiales liofilizados se almacenaron en refrigeración a 4°C. Para su utilización fueron regenerados con la cantidad de agua que perdieron, se dejaron agitar durante una hora, se usó la solución como fuente de enzima.

6.1.3 Inmovilización del extracto acuoso vegetal con actividad reductasa

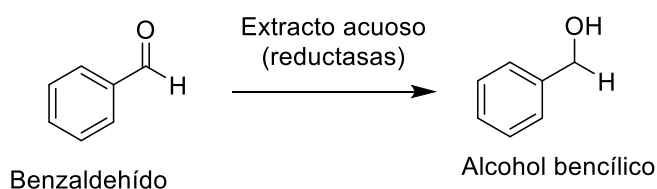
Inmovilizado directo: Al extracto acuoso o el polvo liofilizado (0.1g o su equivalente en volumen) reconstituido en agua, de las de semilla de haba y chícharo, mamey, vaina de haba y de chícharo se le adicionó la celita en una relación 1:1 y 1:4 (enzima: celita), se agitó a 5 °C por 24 h, se congeló y liofilizó.

Inmovilizado acetónico: El extracto acuoso de la vaina de haba y acetona se enfriaron a -5°C, posteriormente a la acetona en agitación constante se le adicionó celita en una relación 1:1 (extracto acuoso: celita) y se le adicionó el extracto acuoso de vaina de haba gota a gota, se dejó en agitación durante 30 minutos, se filtró a vacío y el sólido se dejó a secar durante 24 h.

6.1.4 Evaluación de la actividad reductasa de los materiales vegetales

Biorreducción: A 1 mL de extracto acuoso o su equivalente en peso de los liofilizados e inmovilizados (1:4), en el caso de los liofilizados e inmovilizados fueron reconstituidos con 1 mL de agua o buffer de fosfatos (0.15M, pH 8.1), se le agregó 0.015 mmol (1.5 µL) de benzaldehído disuelto en 48.5 µL de isopropanol, se agitó mecánicamente a 25 o

35°C, después de 24 h se extrajo con éter etílico (2 x 0.5 mL), se centrifugó, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, el % de Conversión se determinó por Cromatografía de gases (CG), se utilizó N₂ como gas acarreador, con un flujo de 0.8 mL/min, temperaturas de inyector y detector de 250°C, temperatura del horno fue de 130 °C y un volumen de inyección de 2 µL. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.



Esquema 1. Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico

Una vez seleccionados los mejores materiales, se realizó la biorreducción de diferentes cetonas heterocíclicas a sus correspondientes alcoholes, ver **Tabla 2**.

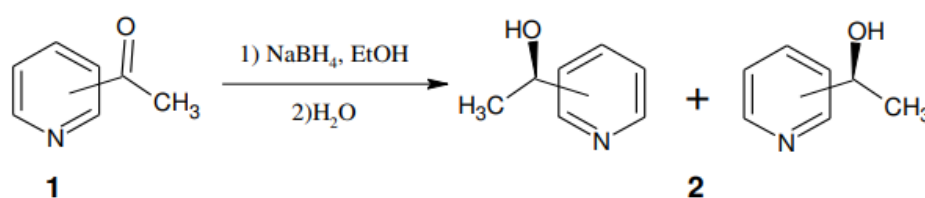
Tabla 2. Cetonas heterocíclicas utilizadas como sustrato para las biorreducciones

Cetonas			Alcoholes		
1a	2-acetilpiridina		2a	1-(2-piridil)etanol	
1b	3-acetilpiridina		2b	1-(3-piridil)etanol	
1c	4-acetilpiridina		2c	1-(4-piridil)etanol	

6.2 Reducción de cetonas

6.2.1 Reducción química con borohidruro de sodio en solución

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 2 mmol (μL) de **1a**, **1b** o **1c** se disolvieron en 5 mL de etanol al 95%, posteriormente se agregaron 2 mmol (μL) 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 (3x 3 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se decantó y se evaporó en el rotavapor. Las cetonas y los alcoholes se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y CG.



Esquema 2. Reducción de 2-acetilpiridina (**1a**), 3-acetilpiridina (**1b**) y 4-acetilpiridina (**1c**) a los alcoholes respectivos (**2a**, **2b** y **2c**).

6.2.2 Evaluación de la actividad reductasa y exceso enantiomérico

Biorreducción: A 1 mL de extracto acuoso o su equivalente en peso de los liofilizados e inmovilizados, en el caso de los liofilizados e inmovilizados fueron reconstituidos con 2 mL buffer de fosfatos o HEPES (0.15M, pH 8.1), se le agregó 0.018 mmol (1.99 μL) de 2-acetilpiridina (**1a**), 3-acetilpiridina (**1b**) o 4-acetilpiridina (**1c**) disuelto en 48 μL de isopropanol, se agitó mecánicamente a 35°C o 42 °C, después de 24 h se extrajo con acetato de etilo (3 x 2 mL), se centrifugó, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó y se reconstituyeron con la fase móvil (hexano: isopropanol, 90:10, v/v). El % Conv se determinó por CG y el %ee por HPLC. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

6.2.3 Métodos de análisis por CG y HPLC

El % Conversión se determinó por cromatografía de gases utilizando N₂ como gas acarreador y temperaturas de inyector y detector de 250°C; la columna, la temperatura

del horno y el flujo variaron dependiendo de cada compuesto. En la **Tabla 3** se muestran las condiciones utilizadas para cada compuesto y sus tiempos de retención.

Tabla 3. Condiciones utilizadas para determinar el % Conversión por CG

Aldehído					
Aldehído	t _R (min)	Alcohol	t _R (min)	Temperatura (°C)	Flujo (mL/min)
Benzaldehído	3	Alcohol bencílico	3.5	130	0.8
Cetonas					
Cetona	t _R (min)	Alcohol	t _R (min)	Temperatura (°C)	Flujo (mL/min)
1a	3.44	2a	3.66	140	0.7
1b	4.02	2b	4.70		
1c	3.80	3c	4.70		

t_R = Tiempo de retención

El % ee se determinó por HPLC quiral, la selección de la columna quiral, la velocidad de flujo, las longitudes de onda del detector, así como la composición de la fase móvil (mezcla de hexano: isopropanol) se determinó para cada compuesto. Todos los análisis se llevaron a cabo a 25°C. En la **Tabla 4** se muestran los tiempos de retención y las condiciones utilizadas para el análisis de cada compuesto.

Tabla 4. Condiciones utilizadas para determinar el % ee por HPLC.

Cetona	T _R (min)	Alcohol	T _R (min)	Columna	Eluyente*	Flujo (mL/min)
1a	12.2	(S/R)- 2a	8.9/10.6	OB-H	91:9	0.8
1b	14.2	(S/R)- 2b	7.1/11.0		87:13	1.0
1c	15.9	(S/R)- 2c	9.0/11.5		89:11	1.0

t_R = Tiempo de retención, *Hexano: Isopropanol

6.3 Determinación de proteínas en los materiales vegetales

Las diversas fuentes de reductasas: liofilizado e inmovilizado de vaina de chícharo, liofilizado e inmovilizado de vaina de haba y vaina de haba seca (50, 100, 50, 100 y 200 mg respectivamente) se suspendieron en 2 mL de agua destilada, la mezcla agitó durante

60 min a 42°C, se centrifugo a 4000 rpm, 5°C por 5 min, posteriormente se tomaron 300 µL del sobrenadante, se aforó a 5 mL con solución de Bradford y se determinó la absorbancia en un espectro UV-VIS a $\lambda=595$ nm. La concentración de proteína se determinó utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino, por el método de Lowry et al. (1951).

6.4 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico para evaluar la actividad reductasa con base en el % Conv y % ee de las diferentes extractos acuosos, liofilizados o inmovilizados utilizando el software JMP versión 13 (SAS Institute Inc., North Caroline, USA), se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba pos hoc para comparar las medias HSD Tukey–Kramer, se consideró diferencia estadísticamente significativa con $p < 0.05$. Todos los datos se expresan en media \pm desviación estándar (SD).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación de la actividad reductasa del extracto acuoso de semilla de chícharo con respecto al tiempo (24 y 48h)

Con la finalidad de determinar los tiempos de reacción, se decidió iniciar la reacción de reducción de benzaldehído utilizando extracto acuoso de la semilla de chícharo como fuente de biocatalizador.

En la **tabla 5** se presentan los porcentajes de conversión obtenidos al utilizar el extracto acuoso del chícharo como fuente de biocatalizador, después de 24h y 48h de reacción. A las 24h se obtiene un % de Conversión superior al 90%. Con los resultados obtenidos se determinó, evaluar las reacciones a 24h.

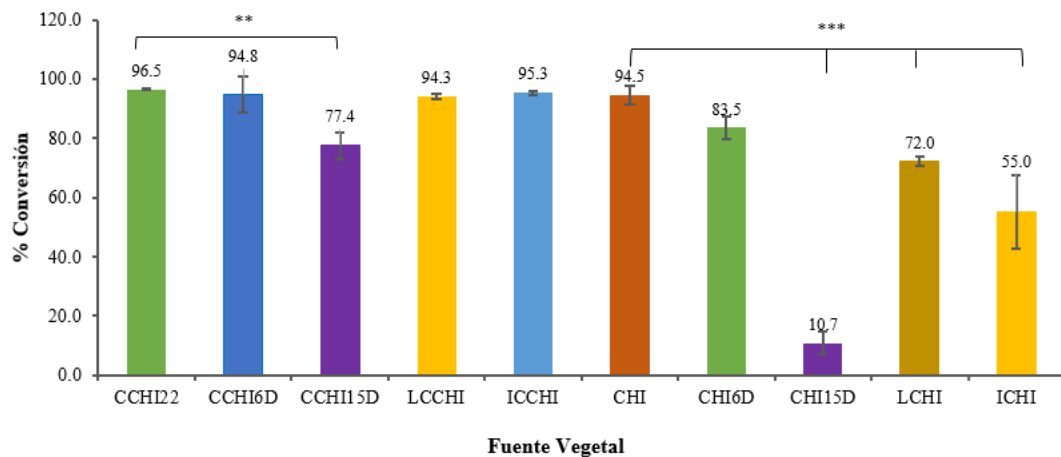
Tabla 5. Porcentaje de conversión utilizando extracto acuoso del chícharo a las 3h, 24h y 48h de reacción.

Fuente Vegetal	Muestreo (h)	% Conversión
Extracto acuoso de chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	24	94.5 ± 3.05
	48	99.1 ± 0.57

7.2 Evaluación de la actividad reductasa del extracto acuoso, liofilizado e inmovilizados de semilla y vaina de chícharo

En la **gráfica 1** se observa que el porcentaje de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico con el extracto acuoso de la vaina de chícharo que fue de 96.5%, con el extracto después de 6 días en refrigeración fue de 94.8%, sin embargo, el extracto acuoso después de 15 días en refrigeración el % de Conversión disminuye un 19.1%. Por lo que el extracto acuoso de vaina de chícharo se puede conservar hasta 6 días en refrigeración sin pérdida significativa de su actividad catalítica. El % de Conversión del liofilizado e inmovilizado del extracto acuoso de la vaina de chícharo fue de 94.3% y 95.3 % respectivamente, si diferencia significativa con el extracto acuoso.

El % de Conversión con el extracto acuoso de la semilla chícharo fue de 94.5, mientras que con el extracto acuoso después de 6 días en refrigeración se observa una disminución de 11.0% y a los 15 días se observa una disminución de significativa de la actividad reductasa de más del 80.0%. Al liofilizar e inmovilizar el extracto acuoso de semilla de chícharo se observó una disminución en la conversión de 22.5% y 48.3%, respectivamente, con respecto al uso del extracto recién preparado. Por otro lado, al liofilizar e inmovilizar el extracto acuoso de semilla de chícharo se observó una disminución significativa del % de Conversión >39%. Al comparar los resultados de los extractos acuosos de semilla de chícharo (94.5 %) y la vaina de chícharo (96.5 %), se observa que la vaina de chícharo tiene un mayor % de Conversión, es estable por más tiempo, además es un desecho al que se le puede dar un valor agregado.



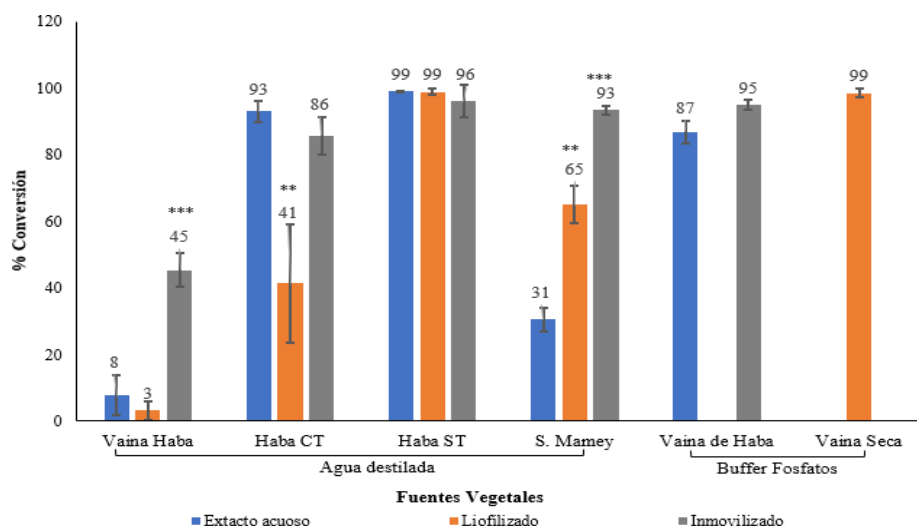
Gráfica 1. Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico usando los extractos acuosos de semilla de chícharo (CHI) y vaina de chícharo (CCHI) recién preparados, extractos acuosos de semilla de chícharo (CHI6D, CHI15D) y vaina de chícharo (CCHI6D, CCHI15D) almacenados en refrigeración a los 6 y 15 días respectivamente, liofilizado (LCHI) e inmovilizado (ICHI) de semilla de chícharo y liofilizado (LCCHI) e inmovilizado (ICCHI) de vaina de chícharo. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ diferencia estadísticamente significativa.

7.3 Evaluación de la actividad reductasa del extracto acuoso, liofilizados e inmovilizados de semilla de haba, mamey y vaina de haba

En la **gráfica 2**, se observa que la reducción de benzaldehído es más alta con los extractos acuosos de semilla de haba con tegumento y haba sin tegumento con 99% y 93 % de reducción, respectivamente. El liofilizado e inmovilizado de haba sin tegumento mantienen su actividad catalítica con 99 y 96 % de reducción, sin diferencia a lo obtenido para el extracto acuoso. Lo anterior es una ventaja ya que al liofilizar o inmovilizar el extracto acuoso se podrá conservar por más tiempo sin perder la eficacia de la enzima. Por otro lado, el liofilizado e inmovilizado de haba con tegumento disminuyeron su actividad catalítica, con respecto al extracto acuoso, en un 52% y 7% respectivamente. El proceso de liofilización al extracto acuoso de haba con tegumento afecta drásticamente su actividad reductasa.

Los extractos acuosos de vaina de haba y semilla de mamey presentan bajos % de reducción con 8% y 31 %, respectivamente, al liofilizar el extracto acuoso de semilla de mamey aumento significativamente el % de Conversión en un 34%. La inmovilización de las enzimas presentes en los extractos acuosos de vaina de haba y semilla de mamey provocó un aumento significativamente su actividad catalítica, con % de reducción de 45 y 93% respectivamente.

Al obtenerse tan bajos resultados con el extracto acuoso, inmovilizado y liofilizado de la vaina de haba, se realizó la reducción utilizando: 1) solución amortiguadora de fosfatos (0.15 M, pH 8.1) como medio de reacción y una temperatura de 35°C, con estas condiciones se observó que el % de Conversión aumento significativamente obteniéndose un 87% de reducción para los extractos acuosos y 95% en el caso del inmovilizado acetónico. Con estos resultados se corrobora que el proceso de inmovilización de enzimas logra aumentar su estabilidad y con ello su actividad catalítica, en este caso su actividad reductasa. Adicionalmente, se evaluó la actividad reductasa del material vegetal liofilizado (vainas de haba seca) cabe destacar que este caso el material vegetal únicamente es lavado, liofilizado y triturado, con la finalidad de conservarse por un tiempo más largo, al evaluar el % de reducción sorprendentemente se obtuvo > 99% de alcohol bencílico.



Gráfica 2. Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico usando los extractos acuosos, liofilizados e inmovilizados de semilla de haba con tegumento (Haba CT), sin tegumento (Haba ST), mamey (S. Mamey), vaina de haba (Vaina haba) y vaina de haba seca (Material Vegetal Liofilizado), ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ diferencia estadísticamente significativa.

Cervantes, F. menciona que la mayoría de las semillas que catalizan la reducción de benzaldehído pertenecen a la familia de las fabáceas y se obtienen porcentajes de conversión mayores al 80%, lo cual se corrobora en las gráficas anteriores.

La utilización de desechos vegetales es una alternativa interesante como fuente de biocatalizador, Cervantes, F. reporta que la vaina de frijol rojo como desecho vegetal tiene 54% de Conversión, sin embargo, al analizar los desechos vegetales como vaina de chícharo y vaina de haba se obtuvieron % reducciones superiores en un 42.5% y 45 % de Conversión respectivamente.

Después de comparar los resultados obtenidos de la reducción de benzaldehído, se seleccionaron los materiales vegetales con los que se obtuvieron porcentajes de conversión de benzaldehído a alcohol bencílico mayores a 90% y se tomaron en cuenta las siguientes características; el liofilizado de vaina de chícharo como se pudo observar en la gráfica 1 el % de Conversión no tienen diferencia significativa en comparación con el extracto acuoso, por lo tanto, al liofilizar se puede conservar durante tiempos prolongados, por otro lado, se utilizó el inmovilizado de vaina de chícharo ya que se

comprobó que mantiene su estabilidad y la actividad catalítica de la enzima. Se utilizó la vaina de haba seca e inmovilizado acetónico de vaina de haba, ya que, al ser estables, mantienen su actividad catalítica y al ser un desecho fueron de interés utilizarlos como fuentes de biocatalizadores para la reducción de cetonas.

7.4 Reducción química de 2-acetilpiridina, 3-acetilpiridina y 4-acetilpiridina

Los alcoholes racémicos fueron sintetizados mediante métodos tradicionales, fueron sintetizados como referencia para la identificación de los alcoholes obtenidos mediante biocatálisis, los rendimientos y factores de retención (R_f) se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Rendimientos de reacción

Compuesto	Rendimiento de reacción (%)	Identificación por TLC		
		R_f cetona	R_f alcohol	Fase móvil de elución*
1b	57.3	0.4	0.6	50:50
1c	60.0	0.4	0.6	70:30
1d	65.0	0.5	0.7	90:10

* Hexano: Acetato de etilo, R_f = factor de retención

Los alcoholes correspondientes fueron identificados por CCF, CG, y CLAR, ver **anexos del 1 al 6**.

Se identificaron por resonancia magnética de protones H^1 cada una de las estructuras de cada cetona y de su respectivo alcohol, los espectros obtenidos se encuentran en los **anexos del 7 al 12**.

7.5 Evaluación de las condiciones de reacción para la reducción de 4-acetilpiridina.

Se evaluaron las siguientes condiciones de reacción: tiempo, temperatura, solución amortiguadora (SA) y cantidad de biocatalizador, para ello se utilizaron las fuentes vegetales: extracto acuoso liofilizado e inmovilizado de vaina de chícharo, vaina de haba

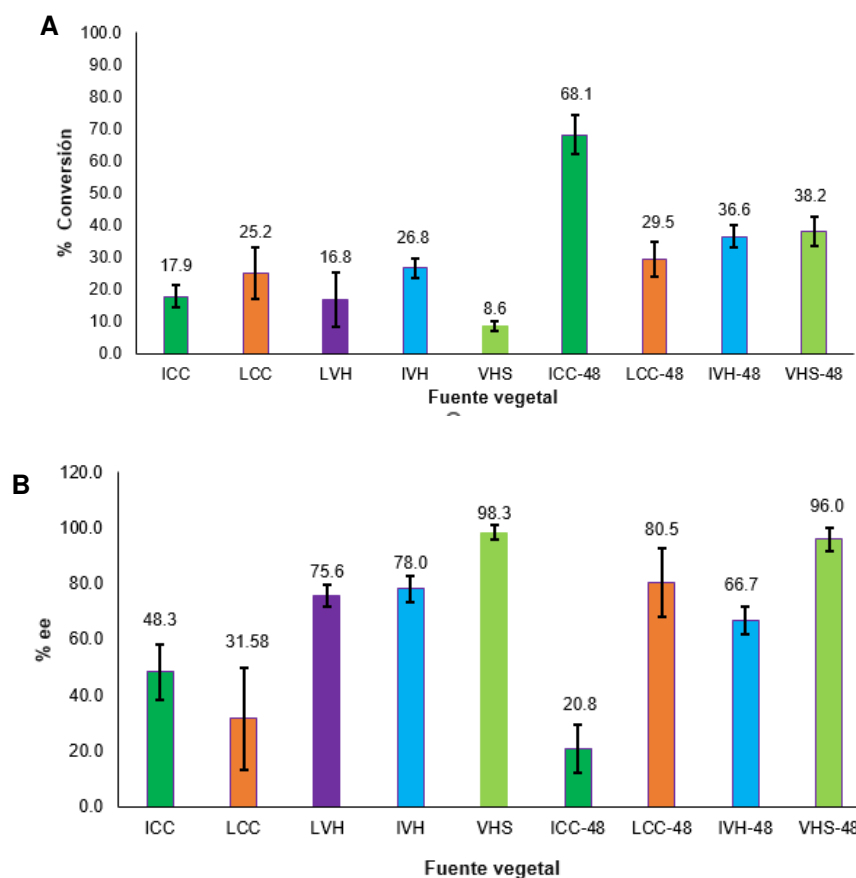
y vaina de haba seca, para evaluar su capacidad de reducir la cetona heterocíclica **1c** y obtener el alcohol correspondiente (**2c**) en forma enantiopura.

El tiempo de retención para el alcohol (*S*)-**1c** es menor (9.02 min) al compararlos con los t_R , se determinó la configuración del alcohol que se obtuvo por biorreducción. En la **tabla 4** se muestran las condiciones para el análisis de la cetona-alcohol, los cromatogramas correspondientes por CG y HPLC se encuentra en el **anexo 3** y **6** respectivamente y los espectros H-RMN correspondientes se encuentran en los **anexos 11** y **12**.

7.5.1 Evaluación del tiempo de reacción para la reducción de 4-acetilpiridina

Debido a que no se conocían los tiempos de reacción, se decidió iniciar el análisis a las 24h y posteriormente a las 48h. En la **gráfica 3A** se observa que la reducción de **1c** es más alta con el inmovilizado de vaina de chícharo y la vaina de haba seca a las 48h sin diferencia estadísticamente significativa, aumentando en un 50.2% y 29.6% respectivamente en comparación a las 24h. En el caso del extracto acuoso liofilizado de vaina de chícharo el % de reducción para las 24h y 48h no hay una diferencia significativa, por otro lado, para el extracto acuoso liofilizado de vaina de haba se analizó a las 24h obteniendo un % de reducción de 16.8, sin embargo, al inmovilizar el extracto acuoso de vaina de haba se obtiene un 26.8 % de Conversión, por lo que se prefiere utilizar el inmovilizado ya que se comprueba que aumenta la estabilidad y la actividad catalítica.

En la **gráfica 3B** se observa que el exceso enantiomérico de (*S*)-**1c** es más alto para vaina de haba seca, el % ee a las 24h y 48h no tiene diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, al inmovilizar el extracto acuoso de vaina de haba con 48h de reacción se obtuvo 66.7% ee y a las 24h se obtuvo 78% que al compáralo con el extracto acuoso liofilizado de vaina de haba (75.6% ee), sin diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, el inmovilizado de vaina de chícharo a pesar de tener un buen % de reducción a las 48h, el % ee disminuye en un 27.5% en comparación a las 24h, a diferencia del extracto acuoso liofilizado de vaina de chícharo que a las 48h hay un aumento de 48.92% ee siendo este el tiempo de reacción óptimo.



Gráfica 3. A) Reducción de 4-acetilpiridina a 1-(4-piridil)etanol. **B)** Exceso enantiomérico de (S)-1-(4-piridil)etanol. Usando liofilizado (LCC) e inmovilizado (ICC) de vaina de chícharo, liofilizado (LVH) e inmovilizado (IVH) de vaina de haba y vaina de haba seca (VHS), con 24 y 48 horas de reacción, utilizando como medio de reacción SA de fosfatos (0.15M, pH 8.1) y 35°C,

De acuerdo con los resultados se observó que dependiendo del tipo de fuente vegetal puede variar el tiempo óptimo de reacción. Por esta razón se determinó que la mejor fuente con el que se obtienen un % ee > 95% y un % de Conversión > 38% es la vaina de haba seca a las 48h, sin embargo, con este tiempo de reacción se vuelve difícil el manejo de la reacción, ya que la reacción tiende a secarse y el proceso de extracción no es eficiente, por tal razón se decidió que le tiempo de reacción sea de 24h obteniendo un

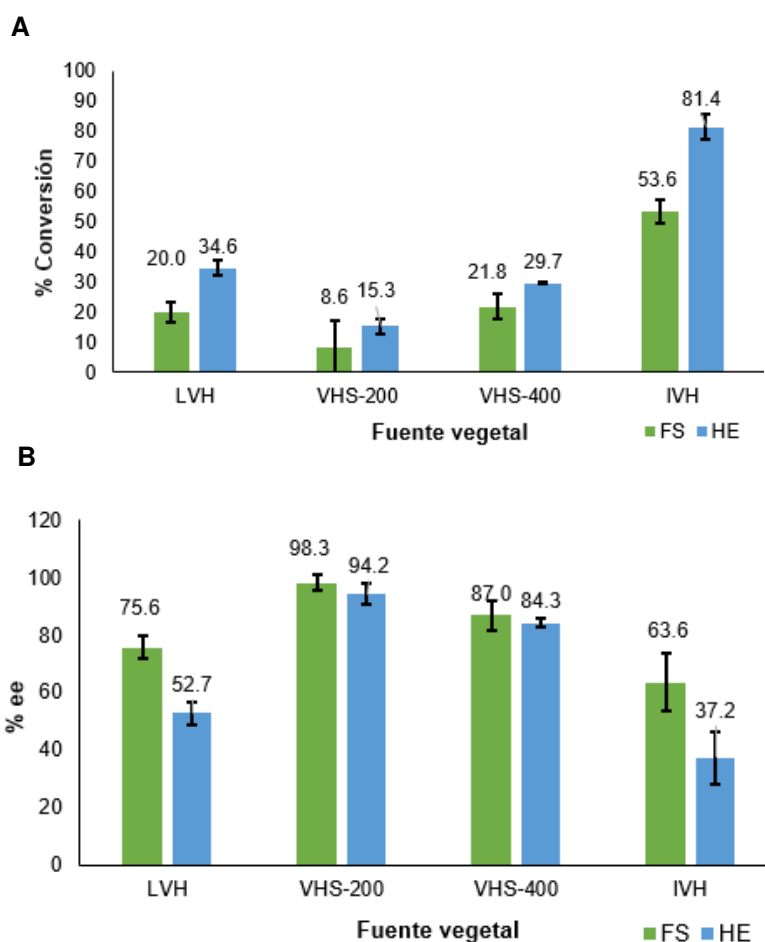
% ee > 95% pero un % de Conversión de 8.6%. Otras fuentes con resultados interesantes fueron el extracto acuoso liofilizado e inmovilizado de vaina de haba debido a que son más estables a las 24h y se obtiene un % ee > 75%. Para el inmovilizado de vaina de chícharo el tiempo de reacción óptimo fue de 24h debió que al incrementar el tiempo de reacción (48h) se presenta una disminución en el % ee. Por lo anterior, el tiempo de reacción utilizado en la evaluación de reducción de cetonas fue de 24h para los siguientes experimentos.

7.5.2 Evaluación del medio de reacción (solución amortiguadora (SA) de fosfatos y/o HEPES) para la reducción de 4-acetilpiridina

Con el tiempo de reacción óptimo se procedió a evaluar el medio de reacción utilizando una SA de fosfatos y/o HEPES. En la **gráfica 4A** se observa que la reducción de **1c** al (S)-**2c** es más alta al utilizar una SA de HEPES como medio de reacción en comparación que cuando se utiliza SA de fosfatos. Al utilizar como fuente vegetal el inmovilizado de vaina de haba se obtuvo 81.4% de reducción en SA de HEPES y 53.6% en SA de fosfatos, por otro lado, el extracto acuoso liofilizado de vaina de haba (34.6% de Conversión) y la vaina de haba seca con 400 mg de polvo (29.7% de Conversión) no tienen diferencia estadísticamente significativa en el % de reducción al utilizar SA de HEPES, sin embargo, la vaina de haba seca con 200 mg de polvo al utilizar SA de HEPES se obtiene 15.3% de reducción y al utilizar SA de fosfatos se obtiene de 8.6% de Conversión. Para todas las fuentes vegetales probadas en este análisis se comprobó que la mejor SA para obtener un mayor % de reducción es utilizar la SA de HEPES.

En la **gráfica 4B** el exceso enantiomérico de (S)-**1c** es más alto al utilizar una SA de fosfatos como medio de reacción. Al evaluar la reducción con la vaina de haba seca, 200 mg de polvo con SA de fosfatos se obtuvo un 98.3% ee, más alto que al utilizar SA de HEPES (94.2% ee). Para vaina de haba seca con 400 mg de polvo, no hay diferencia estadísticamente significativa al utilizar cualquiera de las dos SA, por otro lado, para el extracto acuoso liofilizado de vaina de haba al utilizar SA de fosfatos se obtiene 75.6% ee y al utilizar SA de HEPES se obtiene 53.7% ee. El liofilizado de vaina de haba al

reducir 1c se obtuvo menos de 80% ee con ambas SA, lo mismo sucede con el inmovilizado de vaina de haba, al utilizar SA de fosfatos como medio de reacción se obtiene un 63.6% ee. En ambos casos son más altos los % de conversión pero la pureza enantiomérica es mucho menor.



Gráfica 4. A) Reducción de 4-acetilpiridina a 1-(4-piridil)etanol. **B)** Exceso enantiomérico de (S)-1-(4-piridil)etanol. Usando liofilizado de vaina de haba (LVH), vaina de haba seca con 200 mg de polvo (VHS-200) y con 400 mg de polvo (VHS-400) e inmovilizado de vaina de haba (IVH), el medio de reacción fue en SA de fosfatos (FS) y HEPES (HE).

A partir del análisis de los resultados obtenidos se determinó que el medio de reacción óptimo es en SA de fosfatos, a pesar de los % de reducción bajos, se observó que hay mayores % ee en comparación que cuando se utiliza SA de HEPES como medio de

reacción y la mejor fuente vegetal es la vaina de haba seca con 200 mg de polvo con la que se obtuvo > 95% ee, otra de las ventajas que tiene utilizar la vaina de haba seca es su preparación debido a que es un proceso fácil y práctico.

Martines, R. reporta que al evaluar las cetonas con SA de HEPES obtuvo un % reducción mayor en comparación con otras SA como: TES, Tris-HCl y boratos, por lo que se confirma que al utilizar HEPES mejora los % de reducción, sin embargo, Martines, R. reporta un % ee no muestra diferencia estadísticamente significativa en las cuatro soluciones amortiguadoras, en esta investigación los mayores % ee se obtuvieron al utilizar la SA de fosfatos.

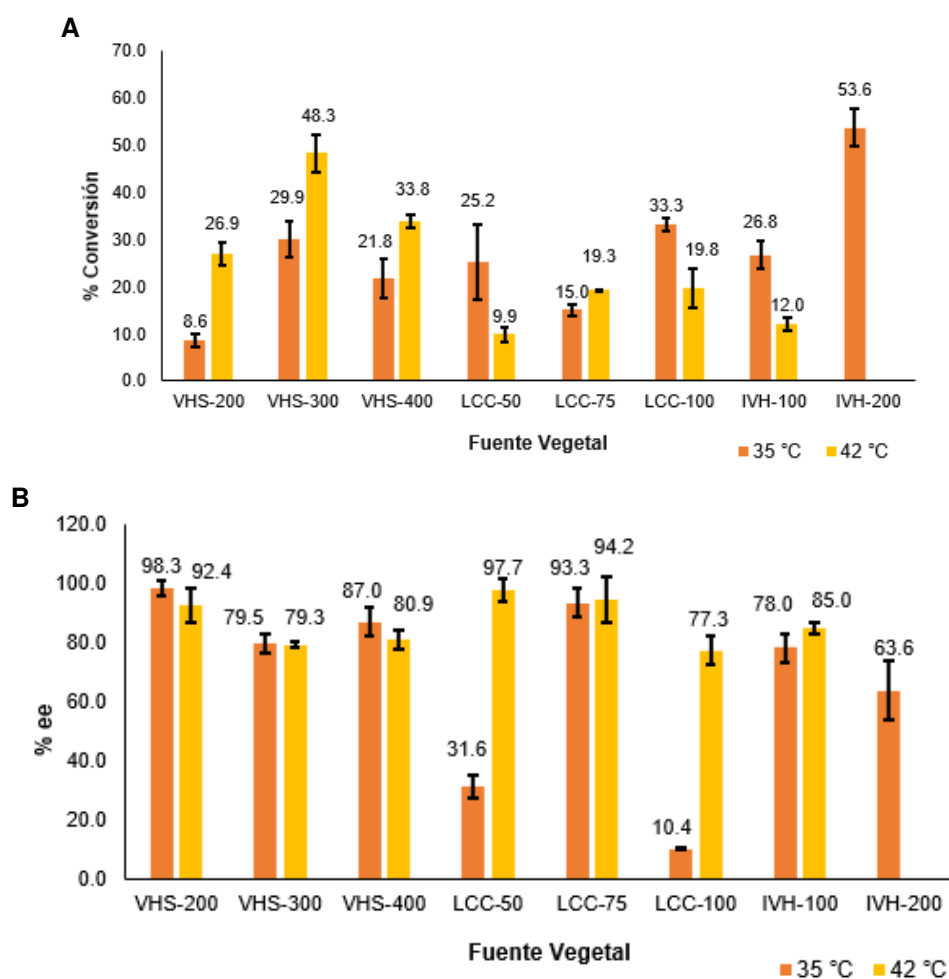
7.5.3 Evaluación de la temperatura del medio de reacción (35°C y 42°C) y cantidad de polvo para la reducción de 4-acetilpiridina

La temperatura de reacción es un parámetro que se evaluó debido a que tiene un efecto en la actividad catalítica y la enantioselectividad de una enzima. Un incremento en la temperatura incrementa la velocidad de reacción, sin embargo, este también puede incrementar la probabilidad de desnaturalización de la enzima de interés (Sánchez, J. & Sinisterra, J., 2007). Por esta razón se evaluó la reducción biocatalizada de 4-acetilpiridina a 35°C y 42°C.

En la **gráfica 5A** se observa que la reducción de **1c** es más alta con el inmovilizado de vaina de haba con 200 mg de polvo obteniendo 53.6% de Conversión a 35°C, seguido de la vaina de haba seca con 300 mg y 400 mg de polvo obteniendo 48.3% y 33.6% de Conversión respectivamente ambas a 42° C, sin embargo, estas condiciones de reacción afectan significativamente el % ee. Por otro lado, la vaina de haba seca con 200 mg de polvo y el extracto acuoso liofilizado de vaina de chícharo con 75 mg de polvo al reducir 1c se obtuvieron mayores % de reducción a 42°C. Por otro lado al utilizar el extracto acuoso liofilizado de vaina de chícharo con 50 y 100 mg de polvo, los % de reducción fueron mayores al utilizar una temperatura de reacción de 35°C.

En la **gráfica 5B** se observa que el exceso enantiomérico de (*S*)-**1c** es mejor con la vaina de haba seca con 200 mg de polvo con > 90% ee, sin diferencia estadísticamente significativa si se utiliza 35°C o 42° C, por otro lado, con la vaina de haba seca con 300

y 400 mg de polvo se obtuvo % ee < 88%, sin diferencia significativa en el temperatura de reacción (35 y 42°C). Otra fuente vegetal con un alto % ee es el extracto acuoso liofilizado de vaina de chícharo con > 90% ee, al utilizar 75 mg o 50 mg de polvo a 42°C no muestra diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, se prefiere utilizar 75 mg de polvo debido a un mayor % de reducción, al utilizar 100 mg de polvo se obtienen 77.3% ee a 42°C y 10.4% ee a 35°C, por último, al utilizar el inmovilizado de vaina de haba se obtuvo < 85% ee al utilizar 42°C y 35°C, por lo cual no fue seleccionado para reducir las cetonas faltantes.



Gráfica 5. A) Reducción de 4-acetilpiridina a 1-(4-piridil)etanol. **B)** Exceso enantiomérico de (S)-1-(4-piridil)etanol. Usando vaina de haba seca con 200 mg de polvo (VHS-200), con 300 mg (VSH-300) y 400 mg (VHS-400); liofilizado de vaina de chícharo

con 50 mg de polvo (LCC-50), con 75 mg (LCC-75) y 100 mg (LCC-100) e inmovilizado de vaina de haba con 100 mg de polvo (IVH-100) y con 200 mg (IVH-200), la temperatura del medio de reacción fue a 35°C y a 42°C.

Con los resultados anteriores, se determinó que la fuente vegetal, el medio, la temperatura y el tiempo de reacción, son importantes para la evaluación del % de conversión y ee. Las mejores fuentes vegetales fueron: la vaina de haba seca con 200 mg de polvo, utilizando la solución amortiguadora de fosfatos a 42°C durante 24h y el extracto acuoso liofilizado de vaina de chícharo con 75 mg de polvo, utilizando solución amortiguadora de fosfatos a 42°C durante 24h.

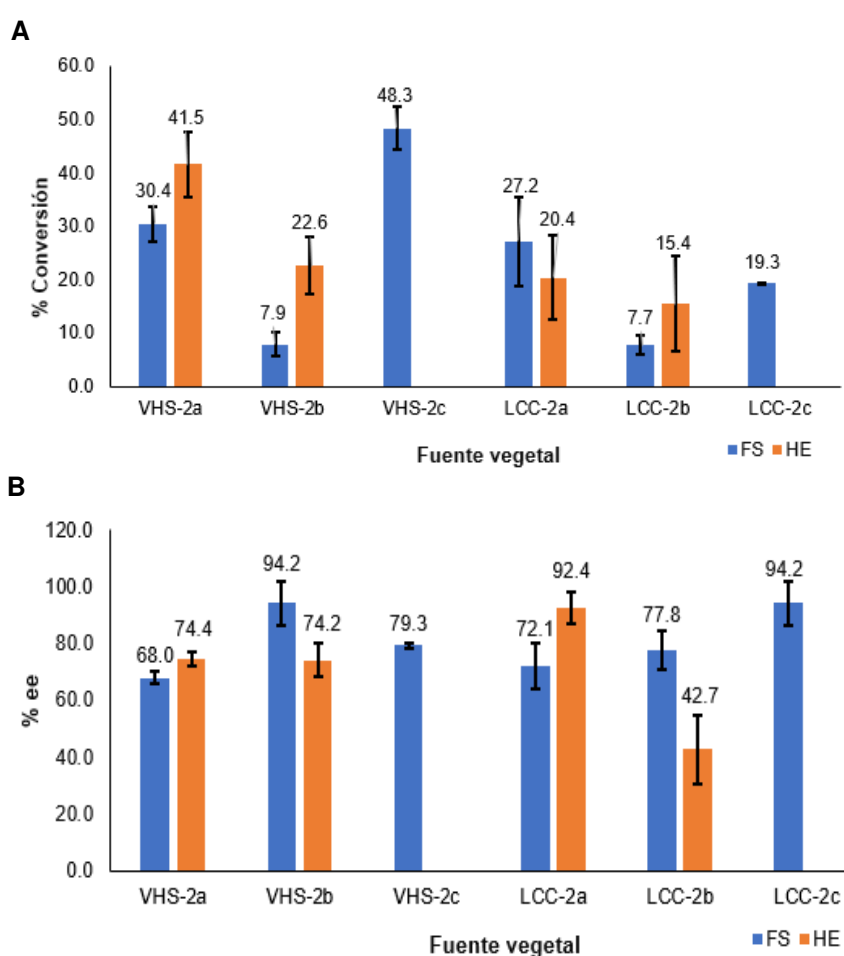
7.6 Evaluación de cetonas heterocíclicas para la obtención de alcoholes ópticamente puros

Se realizó el análisis con respecto a la fuente vegetal, la cetona heterocíclica y la solución amortiguadora utilizada como medio de reacción. Los tiempos de retención para los alcoholes (*S*)-**1a**, (*S*)-**1b** y (*S*)-**1c** son: 8.9, 7.1 y 9.0 min, respectivamente; al compararlos con los t_R , se determinó la configuración de los alcoholes que se obtuvieron por biorreducción. En la **tabla 4** se muestran las condiciones para el análisis de cada par de cetona-alcohol, los cromatogramas correspondientes por CG y HPLC se encuentran en el **anexo 1** al **6** respectivamente y los espectros H-RMN correspondientes se encuentran en los **anexos** del **7** al **12**.

En la **gráfica 6** se observa la reducción de las cetonas heterocíclicas **1a**, **1b** y **1c** y el exceso enantiomérico de los alcoholes (*S*)-**1a**, (*S*)-**1b** y (*S*)-**1c**, utilizando dos biocatalizadores. Para la vaina de haba seca se obtuvo el mayor % de reducción con la cetona **1c**, utilizando una solución amortiguadora de fosfatos se obtuvo 48.3%, sin embargo, el mayor % de ee se obtiene con la cetona **1b** con 94.3% ee, se corrobora lo reportado en los resultados anteriores, en donde al utilizar la solución amortiguadora de fosfatos se obtienen mayores % ee que al utilizar HEPES. Para el extracto acuoso liofilizado de vaina de chícharo se obtiene un mayor % de reducción con la cetona **1a** utilizando solución amortiguadora de fosfatos (27.3%), sin embargo, el mayor % ee se obtuvo con las cetonas **1c** y **1a** con 94.2 y 92.4% ee, respectivamente, utilizando solución amortiguadora de fosfatos y HEPES respectivamente. Con estos resultados se confirma

que vaina de haba seca y el extracto acuso liofilizado de vaina de chícharo son buenas fuentes de biocatalizadores, además de ser desechos a los que se les da un valor agregado.

Los mayores porcentajes de reducción fueron con **1a** y **1c**, Martínez, R. reporto que esto se puede deber a la carga parcialmente positiva sobre el nitrógeno de piridina, tras la coordinación con un residuo del aminoácido de la enzima, lo que 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.



Gráfica 6. **A)** Reducción de 2-acetilpiridina (**1a**), 3-acetilpiridina (**1b**) y 4-acetilpiridina (**1c**) a los alcoholes correspondientes (*S*)-**2a**, (*S*)-**2b**, (*S*)-**2c**. **B)** Exceso enantiomérico de (*S*)-1-(2-piridil)etanol (**2a**), (*S*)-1-(3-piridil)etanol (**2b**) y (*S*)-1-(4-piridil)etanol (**2c**). Usando

vaina de haba seca con **1a** (VHS-1a), con **1b** (VHS-1b) y con **1c** (VHS-1c); liofilizado de vaina de chícharo con **1a** (LCC-1a), con **1b** (LCC-1b) y con **1c** (LCC-1c), el medio de reacción fue con buffer de fosfatos (FS) y HEPES (HE).

7.7 Cuantificación de proteínas en el extracto acuoso liofilizado e inmovilizado de desechos vegetales: vaina de chícharo y vaina de haba.

Con la finalidad de determinar el contenido de proteína, se decidió analizar los desechos vegetales ya que se han obtenido resultados prometedores en la obtención de alcoholes enantiopuros.

En la **tabla 7** se presentan los mg de proteína/g de polvo, para el extracto acuoso liofilizado de vaina de chícharo, el cual tiene mayor contenido de proteína en comparación con el inmovilizado, esto se puede deber al proceso de inmovilización (directo). Lo mismo sucedió con el extracto acuoso liofilizado de vaina de haba en donde se obtuvo un mayor contenido de proteína en comparación con el inmovilizado la diferencia es de 2.26 mg de proteína / g de polvo). Por otro lado, al comparar el inmovilizado directo de vaina de chícharo y el inmovilizado acetónico de vaina de haba se puede observar que hay una diferencia en el contenido de proteína obteniendo una mayor cantidad cuando el inmovilizado es directo, la inmovilización acetónica, ya que, al ser goteado el extracto acuoso, la proteína precipitada sobre celita, pero una mayor pérdida del contenido enzimático en las etapas del proceso, debido a que parte de la enzima queda en el medio líquido. El soporte que se eligió (celita) tiene resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación, y fue fácilmente separable del medio líquido lo que facilita sea reutilizado (Arroyo, M., *et al.* 2014).

Tabla 7. Determinación de la concentración de proteínas por gramo muestra de las fuentes vegetales.

Fuente vegetal	mg de proteína /reacción (µg/mL)	mg de proteína / g de polvo
Inmovilizado de vaina de chícharo (ICC)	10.03	0.66
Liofilizado de vaina de chícharo (LCC)	9.52	1.30

Inmovilizado de vaina de haba (IVH)	7.78	0.51
Vaina de haba seca (VHS)	10.61	0.35
Liofilizado de vaina de haba (LVH)	20.53	2.61

8 CONCLUSIONES

Se comprobó la actividad reductasas de los extractos acuosos de vaina de chícharo, vaina de haba, semillas de chícharo, mamey y haba con y sin tegumento. El extracto acuoso del chícharo no se puede almacenar en refrigeración, ya que pierde su actividad reductasa, mientras que la vaina de chícharo se puede almacenar hasta por 6 días manteniendo su actividad catalítica, sin embargo al liofilizarlo e inmovilizarlo se puede almacenar por tiempo prolongados sin la pérdida de su actividad reductasa. Inmovilizar los extractos acuosos de vaina de haba y semilla de mamey, aumenta significativamente la actividad reductasa con respecto al extracto acuoso. El extracto acuoso liofilizado e inmovilizado de vaina de chícharo, el inmovilizado acetónico del extracto acuoso de vaina de haba y la vaina de haba seca son buenas fuente de biocatalizador para reducir benzaldehído a alcohol bencílico y 4-acetilpiridina (**1c**) al correspondiente alcohol (*S*)-**2c**.

Las condiciones de reacción y la fuente de biocatalizador tienen una influencia importante en la pureza óptica del alcohol, para obtener el alcohol (*S*)- **2c** se prefiere utilizar 200 mg de vaina de haba seca, en SA de fosfatos a 35°C y 75 mg del extracto acuso liofilizado de vaina de chícharo, con una SA de HEPES a 42°C. Bajo estas condiciones, para obtener (*S*)-**2a** y (*S*)-**2c** con altos %ee la mejor fuente fue el extracto acuoso liofilizado de vaina de chícharo, al utilizar SA de HEPES y fosfatos, respectivamente. Mientras que para obtener el alcohol enantiopuro (*S*)-**2b**, la mejor fuente fue la vaina de haba seca, al utilizar SA de fosfatos

Estos resultados son prometedores ya que el extracto acuso liofilizado de vaina de chícharo y vaina de haba seca son buenas fuentes de biocatalizadores puesto que pueden reducir cetonas con una alta estereoselectividad mediante un enfoque respetuoso con el medio ambiente además de ser desechos a los que se les da un valor agregado.

9 BIBLIOGRAFIA

Arroyo, M., Acebal, C. & De la Mata, I. (2014). Biocatálisis y biotecnología. *Arbor*, 190 (768): a156. Doi: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4010>

Battaner, E. (2013). *Compendio de enzimología*. 1era edición. Ediciones universidad de salamanca en miembros de la UNE (Unión de Editoriales Universitarias Españolas). España. Pp. 68-72.

Bommarius, A. S. & Riebel, B. R. (2004). *Biocatalysis*. Copyright WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 3-527-30344-8. Pp, 4-6.

Camacho, M. E. & Campos, J. M. (2007). *Química fina farmacéutica*. Editorial Universidad de Granada. Primera edición, pp. 45-75, Granada, España.

Castillo, E. & Rodríguez, M. (2014). *Enzimas aplicadas en procesos industriales*. *Revista Digital Universitaria* 15(12): 3-8.

Cervantes, F. V. (2012). *Reducción de cetonas utilizando biocatalizadores de origen vegetal*. Comunicación idónea de resultados para obtener el grado de maestro en ciencias farmacéuticas. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

Chauhan, S., Vohra, A., Lakhanpal, A., & Gupta, R. (2015). *Immobilization of commercial pectinase (Polygalacturonase) on celite and its application in juice clarification*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2135-2141.

Chen, B. & Zeferino, F. (2019). *Enzymatic synthesis of enantiopure alcohols: current state and prespectives*. *Royal Society of Chemistry Advances*, 9, 2102- 2115.

Chen, B. & Zeferino, F. (2019). *Enzymatic synthesis of enantiopure alcohols: current state and prespectives*. *RSC Advances*, 9, pp. 2102- 2115.

Çolak, S., Şahin, E., Dertli, E., Yilmaz, M. T., & Taylan, O. (2019). *Response surface methodology as optimization strategy for asymmetric bioreduction of acetophenone using whole cell of Lactobacillus senmaizukei*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 201800028.

Cornish-Bowden, A. (2014). Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 74-87.

Cui, J., Zheng, G., Black, G., Iqbal, H. & Bilal, M. (2022). Editorial: *Enzyme Biocatalysts: Design and Application*. PubMed central. 35186889 doi: 10.3389/fchem.2022.851857

De Jesús Rostro-Alanis, M., Mancera-Andrade, E. I., Patiño, M. B. G., Arrieta-Baez, D., Cardenas, B., Martinez-Chapa, S. O., & Saldívar, R. P. (2016). *Nanobiocatalysis: Nanostructured materials – a minireview*. *Biocatalysis*. 2(1), 1-24

Del Monte, A., Cutiño, B. V., González, J. O., González, D., Figueroa, V. & Cao, R. (2013). *Application of enzymes on biocatalysis. Perspectives of the use of nanoarrays as biocatalysts*. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 2(2), 7-24.

Delgado, A., Minguillón, C. & Joglar, J. (2002) *Introducción a la síntesis de fármacos*. Editorial Síntesis. Primera edición, pp. 151-230, Madrid, España.

Faber, K. (2003). *Biotransformations in organic chemistry* (2 ed.). Berlín: Springer.

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.

Gamenara, D., Seoane, A., Saenz-Méndez, P. & Domínguez de María, P. (2013). *Redox Biocatalysis: Fundamental and Applications*. John Wiley & Sons, Inc; Hoboken (USA).

Gao-Wei, Z. & Jian-He, X. (2011). *New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals*. *Curr Opin Biotech*, 6, 784-792.

García, J; Hernáiz, M. & Hoyos, P. (2014). *Obtención de nuevos biocatalizadores: inmovilización de la peroxidasa de soja*. *Reduca (Recursos Educativos)*, 6 (1), 81-86.

Gotor, V. & Gómez, M. J. H. (2017). *Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en síntesis orgánica*. *Real Sociedad Española de Química*, 113 (1), 2017, 27-35. ,

Juaristi E. (2011). *Organocatalizadores quirales y su aplicación en síntesis asimétrica*, Educación Química, 22(1), 12-14.

Lewkowicz, E. & Nóbile, M. (2017). *Especialización en Biocatálisis y Biotransformaciones*. Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes. Buenos Aires, Argentina.

Lodeiro, A. (2017). *Catálisis enzimática; fundamentos químicos de la vida*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). 690-3-2291-1-10-20170418. Pp 137-147.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry, 193(1), 265-275.

Luna, H. (2004). *Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos*. Revista de la Sociedad Química de México, 48, 211-219.

Mączka, W., Sołtysik, D., Wińska, K., Grabarczyk, M., & Szumny, A. (2018). Plant-Mediated Biotransformations of S(+)- and R(-)-Carvones. Applied Sciences, 8(12), 2605.

Nealon, C., Musa, M., Patel, J. & Phillips, R. (2015). *Controlling substrate specificity and stereospecificity of alcohol dehydrogenases ACS*. Catalbha 2100–2114

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

Pérez, F. (2017). *Fisiología vegetal: enzimas y coenzimas mecanismos de regulación*. 3201/000026081. Pp 23-28.

Pila, M. N., Ruiz, D.L., Colasurdo, D.D. & Allegretti, P.E. (2022). *Química orgánica II*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). Facultad de Ciencias Exactas. 978-950-34-2129-1. Pp 24-29.

Romagnolo, A., Spina, F., Risso, S., Crotti, M., Monti, D., Brenna, E., & Lanfranco, L. (2016). *Fungal Oxidoreductases as Biocatalysts for Fine Chemicals Transformations*. Chemical Engineering Transactions, 49, 31-36.

Sanchez, J. M. & Sinisterra, J. V. (2007). *Biocatálisis aplicada a la química farmacéutica*. Grupo de Biotransformaciones. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid, 1199-1236.

Sellés, L., Kelly, C. L., Mordaka, P. M., & Heap, J. T. (2018). Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1866(2), 327-347. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.11.005>

Sengupta, D., Naik, D. & Reddy, A.R. (2015). Plant aldo-keto reductases (AKRs) as multi-tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and defense: a structure function update. *J Plant Physiol*. 179:40-55.

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

Solís, A., Martínez, R. M., Cervantes, F., Pérez, H. I., Manjarrez, N. & Solís, M. (2018) *Reduction of substituted benzaldehydes, acetophenone and 2-acetylpyridine using bean seeds as crude reductase enzymes*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37:2, 152-157, DOI: 10.1080/10242422.2018.1510492.

Solís, O. A., Martínez, R. M., Cervantes, F., Pérez, H. I. & Solís O.M. (2017). *Biocatalytic reduction of benzaldehyde using vegetable waste as enzyme sources*. *Acta Universitaria*, 27(4), 13-18.

Suárez, G.; Hernández, T.; Navarro, A.; Oliart, R. M.; Valerio, G. (2010). *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 15 (3), 441–445.

Vallejo, Y., Barrios, L. & Anaya, J. (2021). *Thin layer chromatography: a current alternative in the pharmaceutical industry*. Grupo de Investigación de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena. Cartagena 130015, Colombia. PUCP ISSN: 1012-3946.

Vandenberghé 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.

Walker, J. M. (2013). *Immobilization of enzymes and cells*. 3era edition. Edited by Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Madrid, Spain. Pp. 15-26.

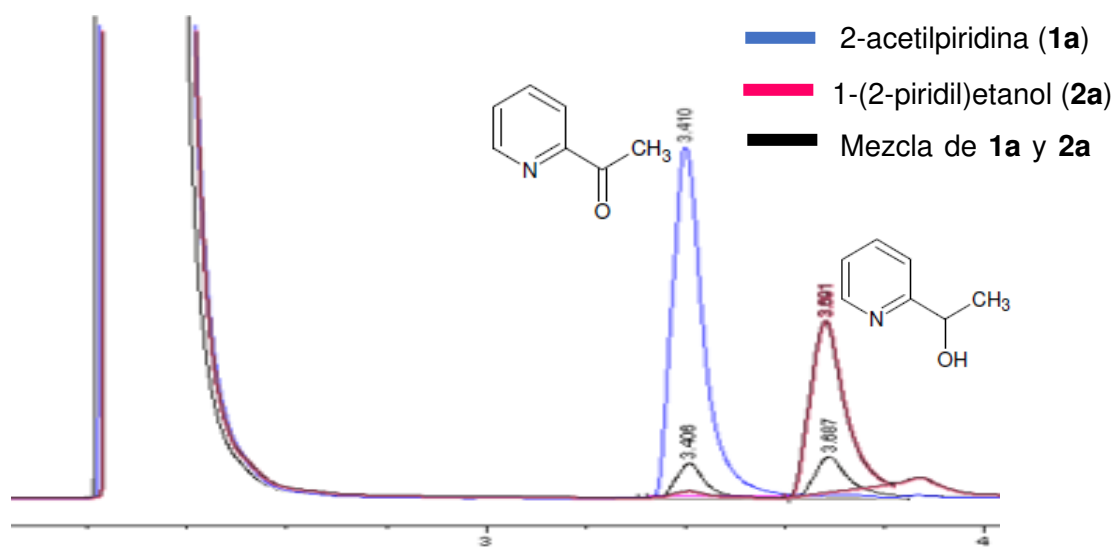
Xie, Y., Xu, J., Lu, W. & Lin, G. (2009). *Adzuki bean: A new resource of biocatalyst for asymmetric reduction of aromatic ketones with high stereoselectivity and substrate tolerance*. *Bioresources Technology*, 100, 2463-2468.

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.

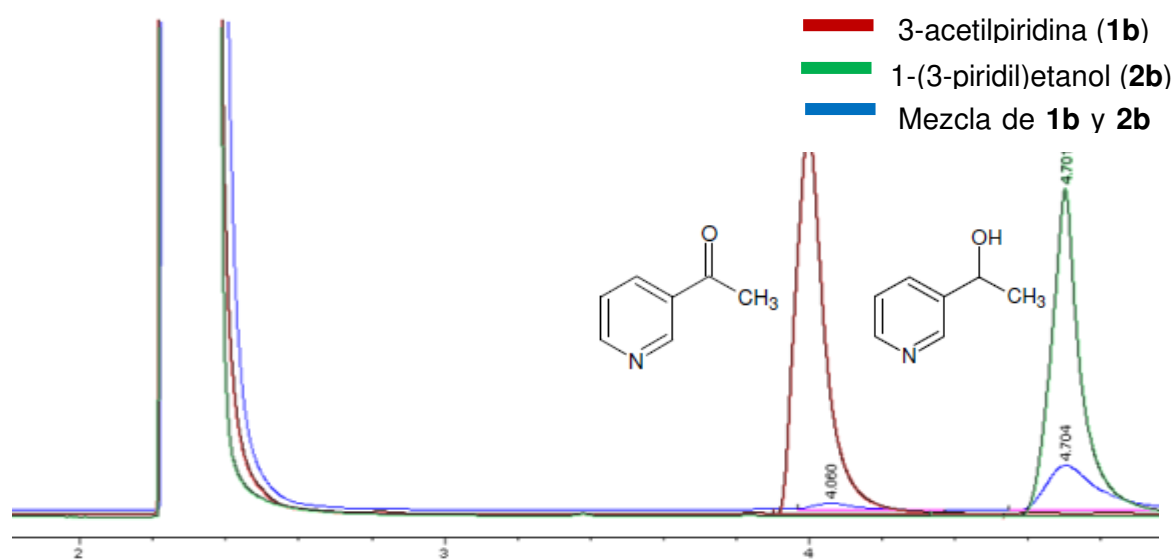
Yan, Z., Nie, Y., Xu, Y., Liu, X. & Xiao, R. (2011). *Biocatalytic reduction of prochiral aromatic ketones to optically pure alcohols by a coupled enzyme system for cofactor regeneration*. *Tetrahedron Lett.* 9, 999-1002.

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.

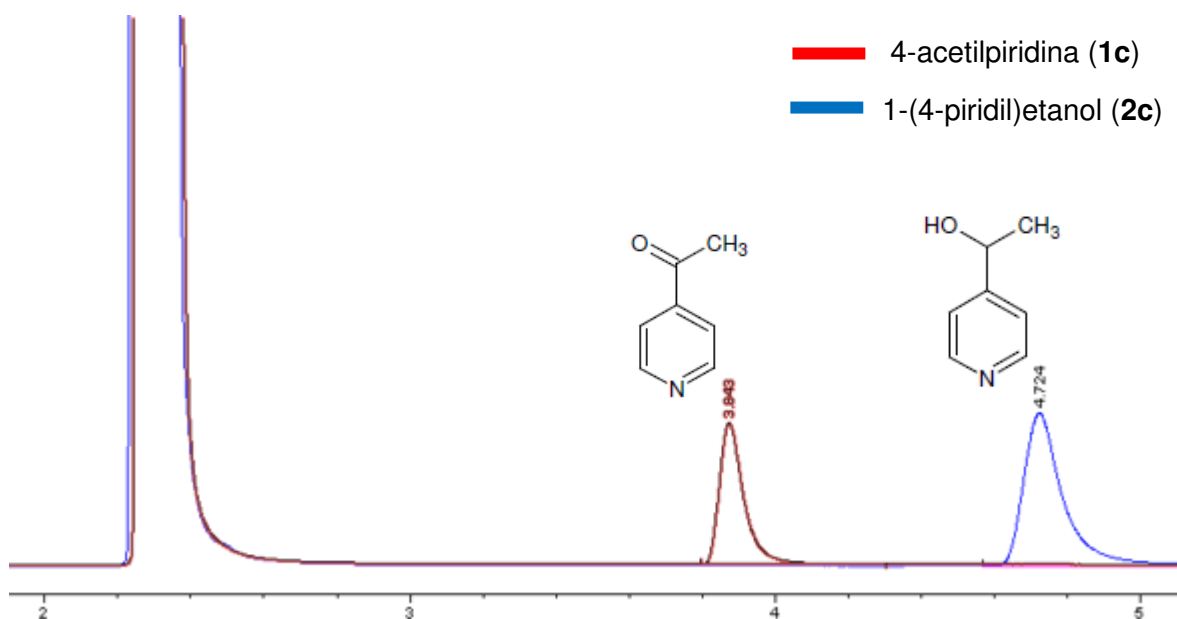
10 ANEXOS



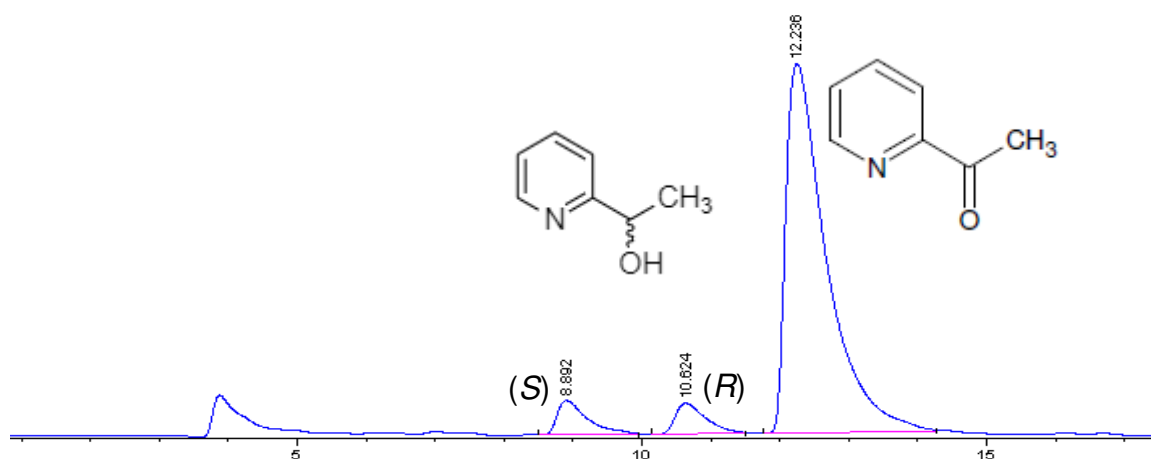
Anexo 1. Cromatograma por CG de 2-acetilpiridina (**1a**) y 1-(2-piridil)etanol (**2a**). los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 3.4 min para **1a** y 3.7 min para **2a**.



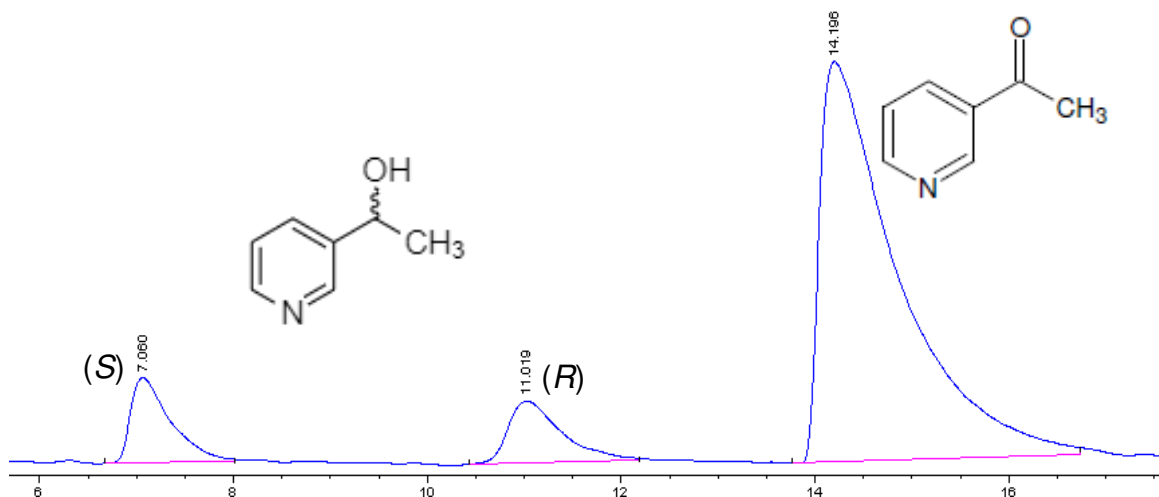
Anexo 2. Cromatograma por CG de 3-acetilpiridina (**1b**) y 1-(3-piridil)etanol (**2b**). los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 4.0 min para **1b** y 4.7 min para **2b**.



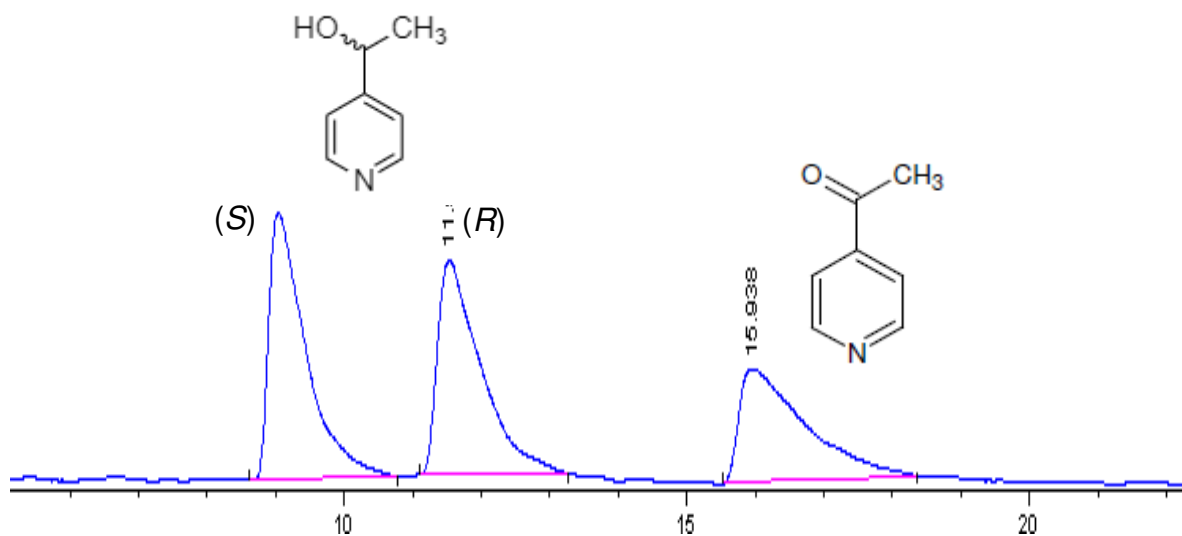
Anexo 3. Cromatograma por CG de 4-acetilpiridina (**1c**) y 1-(4-piridil)etanol (**2c**). los tiempos de retención de los diferentes compuestos fueron: 3.8 min para **1c** y 4.7 min para **2c**.



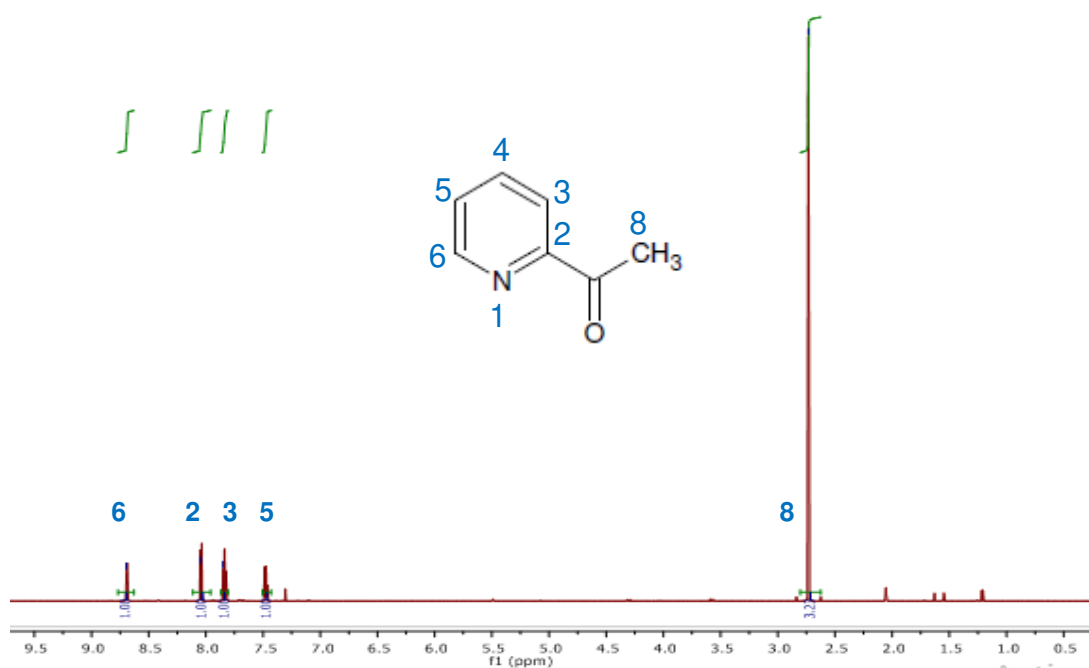
Anexo 4. Cromatograma por HPLC de 2-acetilpiridina (**1a**) y 1-(2-piridil)etanol (**2a**). los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 12.2 min para **1a**, 8.9 min para (*S*)-**2a** y 10.6 min para (*R*)-**2a**.



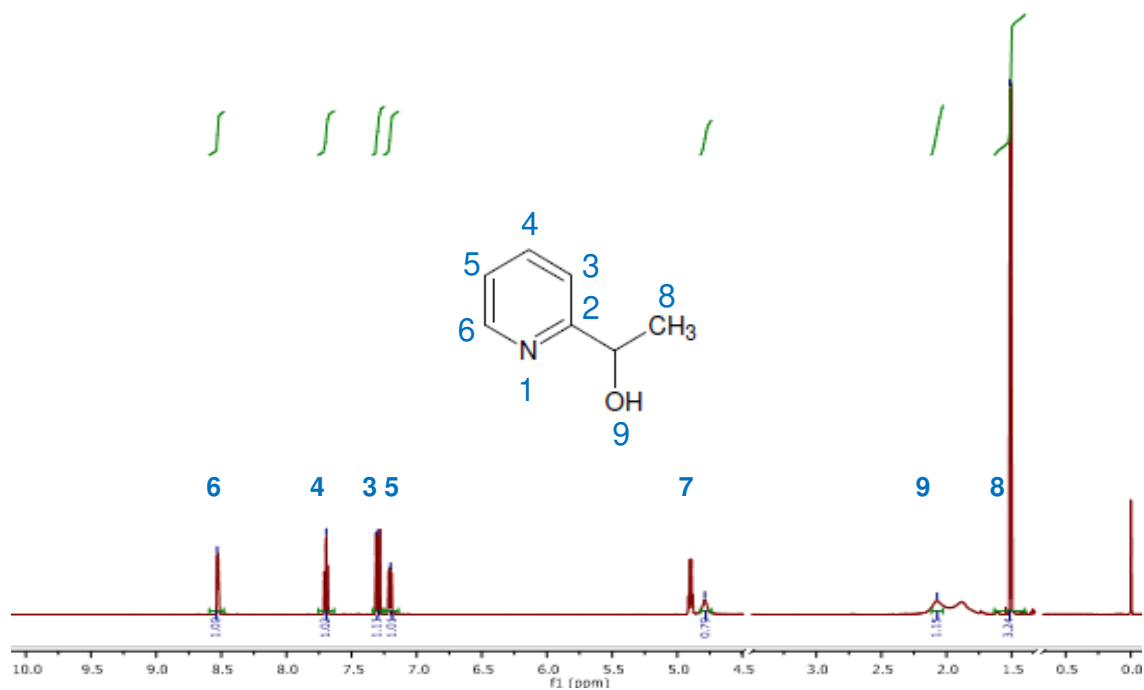
Anexo 5. Cromatograma por HPLC de 3-acetilpiridina (**1b**) y 1-(3-piridil)etanol (**2b**). los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 14.2 min para **1b**, 7.1 min para (*S*)-**2b** y 11.0 min para (*R*)-**2b**.



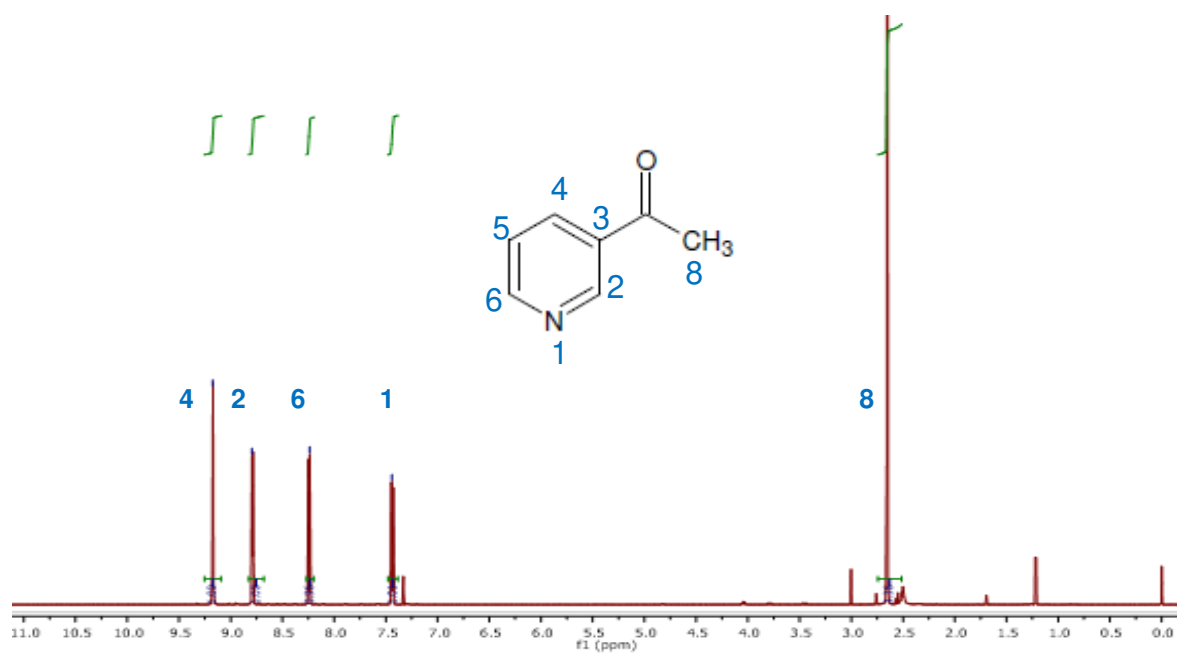
Anexo 6. Cromatograma por HPLC de 4-acetilpiridina (**1c**) y 1-(4-piridil)etanol (**2c**). los tiempos de retención de los diferentes compuestos fueron: 15.9 min para **1c**, 9.0 min para (*S*)-**2c** y 11.5 min para (*R*)-**2c**.



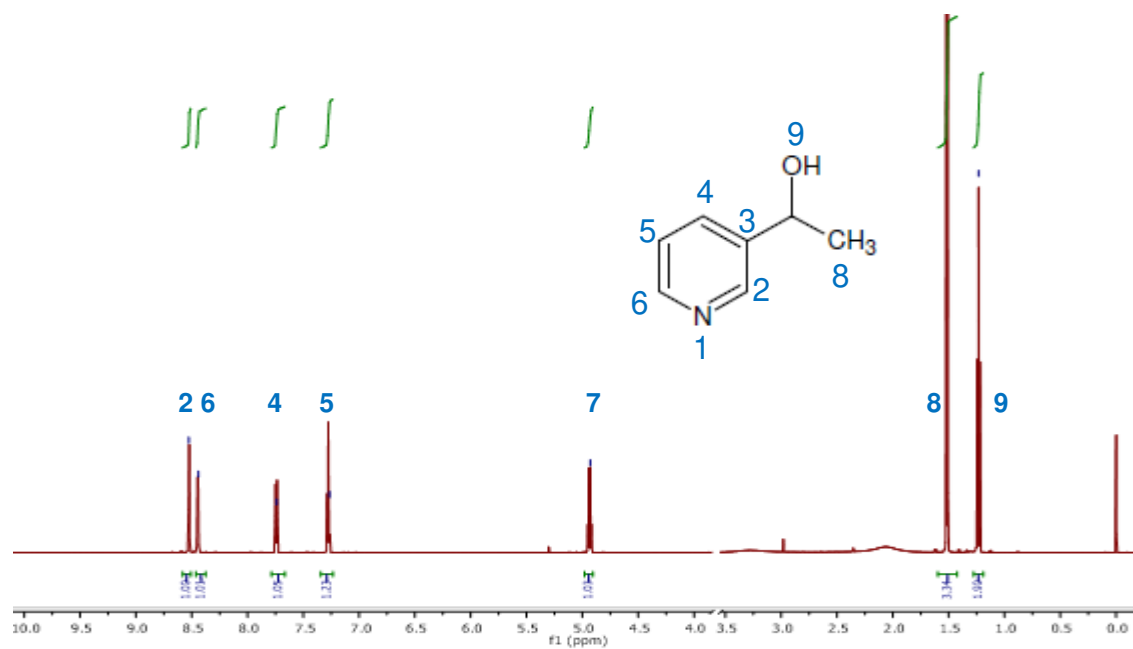
Anexo 7. Espectro de H-RMN de 2-acetilpiridina (**1a**).



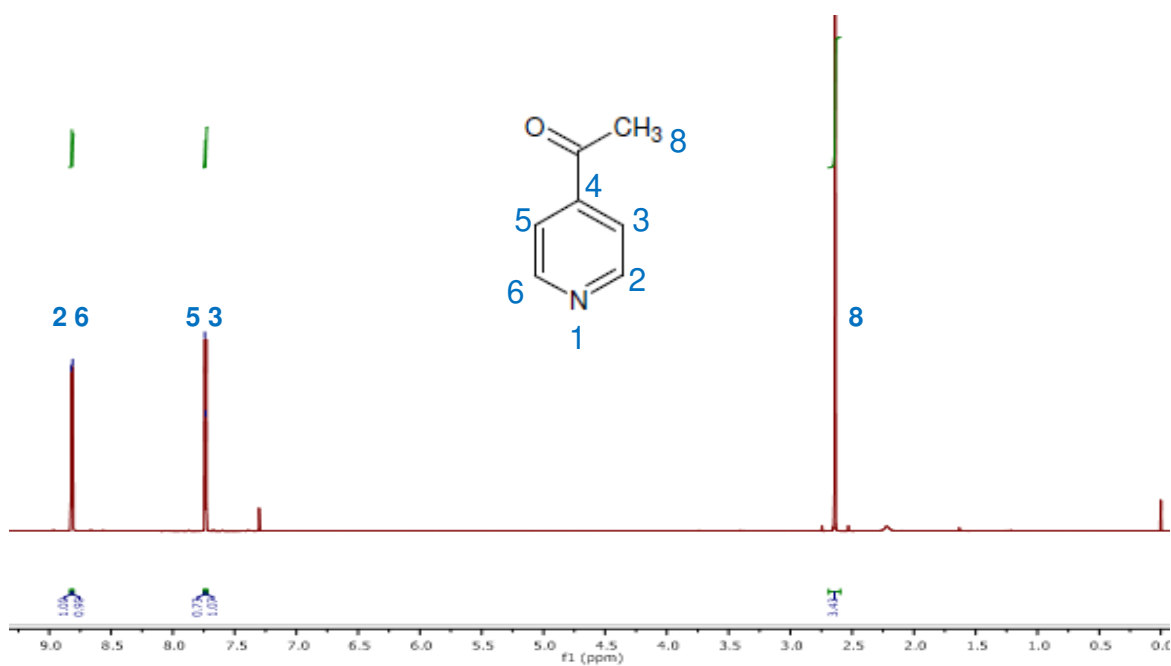
Anexo 8. Espectro de H-RMN de 1-(2-piridil)etanol (**2a**).



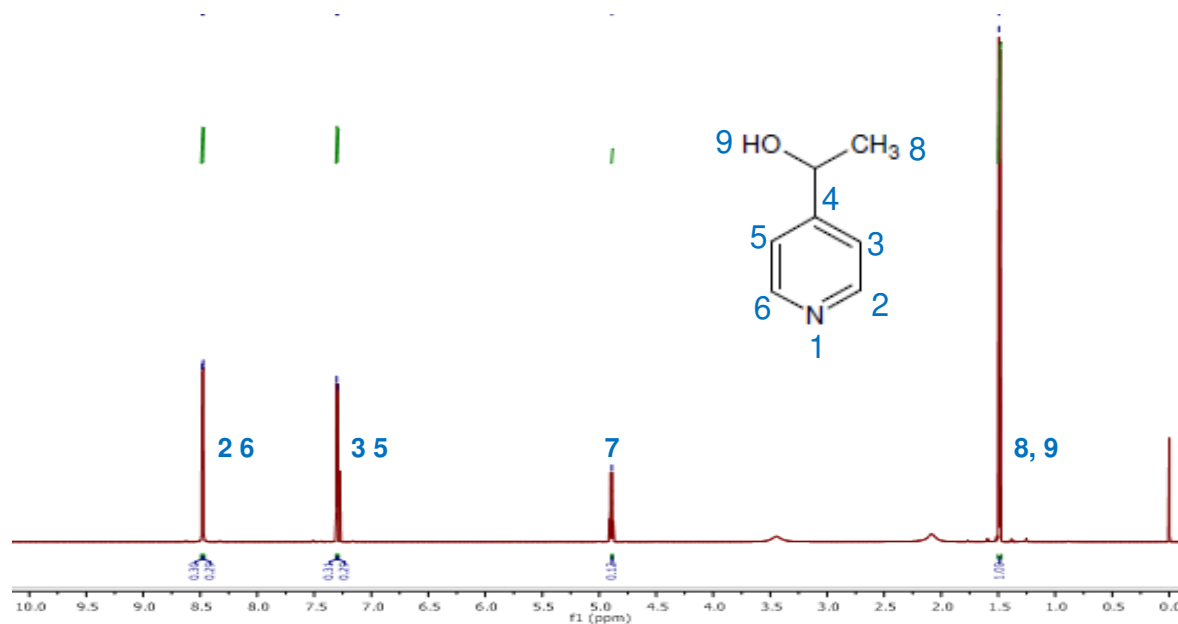
Anexo 9. Espectro de H-RMN de 3-acetilpiridina (**1b**).



Anexo 10. Espectro de H-RMN de 1-(3-piridil)etanol (**2b**).



Anexo 11. Espectro de H-RMN de 4-acetilpiridina (1c).



Anexo 12. Espectro de H-RMN de 1-(4-piridil)etanol (2c).

Elizabeth Álvarez Montalvo, R. Marlen Martínez Casares*, Aida Solís Oba, Lilianna Hernández Vazquez, Julia Cassani, Hector Luna Contla

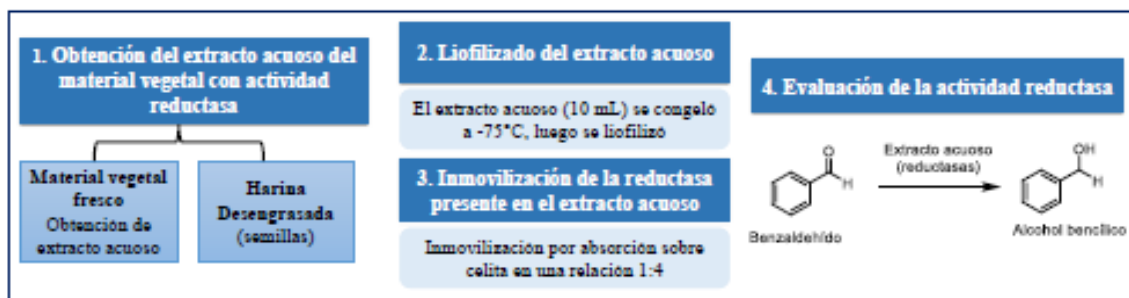
Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960, Ciudad de México,

*rmartinez@correo.xoc.uam.mx

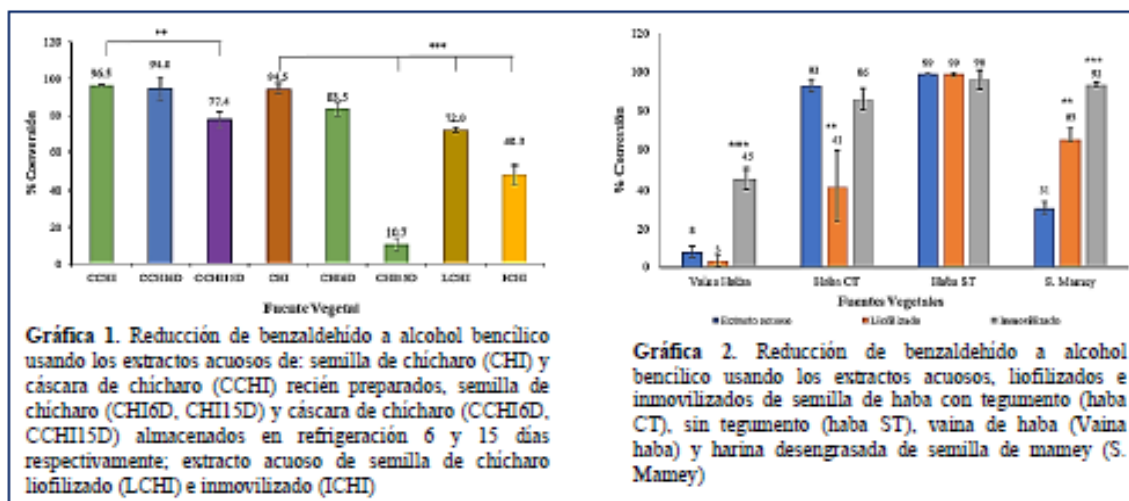
INTRODUCCIÓN

La reducción de aldehídos y cetonas constituye una herramienta importante en química orgánica para la preparación de alcoholes, la cual se puede llevar a cabo con reductasas de origen vegetal, en sustitución de los catalizadores químicos, que son contaminantes del medio ambiente. El objetivo de este trabajo fue la reducción de benzaldehído para obtener alcohol bencilico, utilizando las reductasas presentes en extractos acuosos de origen vegetal, así como en los liofilizados y en los inmovilizados sobre celita de dichos extractos.

METODOLOGÍA



RESULTADOS



CONCLUSIÓN

Los extractos acuosos (Eac) de semilla y cáscara de chícharo y de semilla de haba mostraron alta actividad reductasa. El liofilizado del Eac de la cáscara de haba sin tegumento mantuvo su actividad biocatalítica original. Mientras que los inmovilizados de los EAC de vaina de haba, semilla de haba y de semilla de mamey conservaron o mejoraron la actividad reductasa original.

Referencias

- Solís, A.; Martínez, R. M.; Cervantes, F.; Pérez, H. I.; Manjarez, N.; Solís, M. *Biocatal. Biotransformation* 2019, 37 (2), 152–157. (4)
- Yushkova, E. D.; Nazarova, E. A.; Matyushina, A. V.; Noskova, A. O.; Shavronskaya, D. O.; Vinogradov, V. V.; Skvortsova, N. N.; Krivoshepkins, E. F. *J. Agric. Food Chem.* 2019, 67 (42), 11553–11567.



Anexo 14. Constancia de presentación del cartel titulado “*Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico utilizando biocatalizadores de origen vegetal*”.

Elizbeth Alvarez Montalvo¹, R. Marlen Martínez Casares^{1}, Aida Solís Oba¹, Liliana Hernández Vázquez¹, Julia Cassani Hernández¹, Héctor Luna Condo¹.*

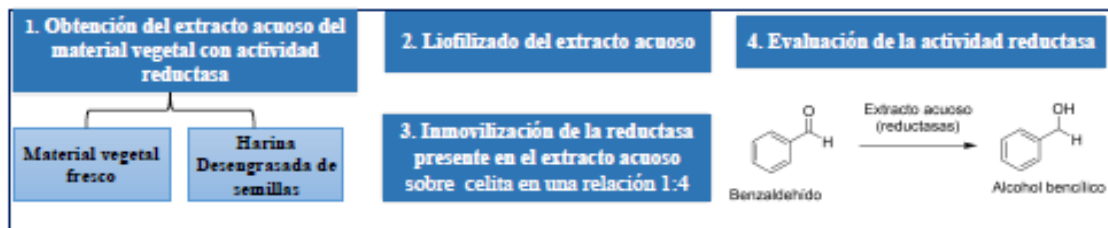
BTR-7

*Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960, Ciudad de México *rmartinez@correo.xoc.uam.mx*

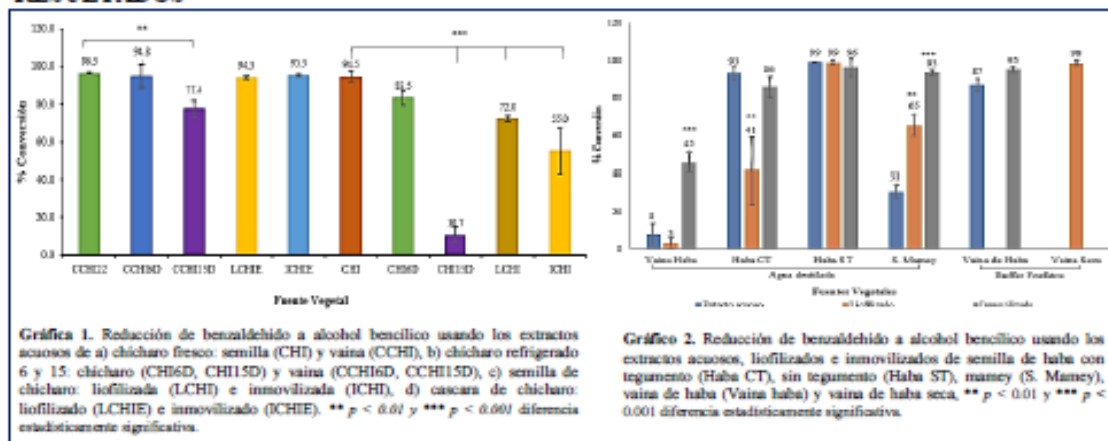
INTRODUCCIÓN

La reducción de aldehídos y cetonas constituye una herramienta importante en química orgánica para la preparación de alcoholes, la cual se puede llevar a cabo con reductasas de origen vegetal, en sustitución de los catalizadores químicos, que son contaminantes del medio ambiente. El objetivo de este trabajo fue la reducción de benzaldehído para obtener alcohol bencílico, utilizando las reductasas presentes en extractos acuosos de origen vegetal, así como en los liofilizados y en los inmovilizados sobre celita de dichos extractos.

METODOLOGÍA



RESULTADOS



CONCLUSIÓN

Se comprobó la actividad reductasas de los extractos acuosos de vainas de chícharo y de haba, semillas de chícharo, mamey y haba con y sin tegumento. El extracto acuoso del chícharo pierde su actividad reductasa si se almacena en refrigeración, mientras que la vaina de chícharo se puede almacenar hasta por 6 días. Inmovilizar la reductasa presente en los extractos acuosos de vaina de haba y semilla de mamey, aumenta significativamente la actividad biocatalítica con respecto al extracto acuoso. El extracto acuoso de vaina de chícharo, el inmovilizado de semilla de mamey y el liofilizado de vaina de haba son buenas fuentes de biocatalizador, además son un desecho al que se le puede dar un valor agregado.

REFERENCIAS

- Solís, A.; Martínez, R. M.; Cervantes, F.; Pérez, H. I.; Manjarrés, N.; Solís, M. *Biocatal. Biotransformation* 2019, 37 (2), 152–157. (4)
- Yashkova, E. D.; Nazarova, E. A.; Matyshina, A. V.; Noskova, A. O.; Shavronskaya, D. O.; et al. *Agric. Food Chem.* 2019, 67 (42), 11553–11567.

Anexo 15. Cartel del XI congreso del Departamento de Sistemas Biológicos celebrada en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.



DEPARTAMENTO DE SISTEMAS
BIOLÓGICOS
Jefaturas de Áreas de Investigación



Otorgan la presente **CONSTANCIA** a:

Elizabeth Álvarez Montalvo, R. Marlen Martínez Casares, Aida Solís Oba, Liliana Hernández Vázquez, Julia Cassani Hernández, Héctor Luna Contla

Por presentar el cartel titulado

“Comparación de reductasas de origen vegetal para la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico”

En el IX Congreso del Departamento de Sistemas Biológicos

Realizado en la Ciudad de México, los días 13 y 14 de octubre de 2022

Dr. Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos

Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa
Jefatura del Área de Obtención y
Producción de Compuestos Orgánicos

Anexo 16. Constancia de presentación del cartel titulado *“Comparación de reductasas de origen vegetal para la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico”*.