



**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 cetonas para la obtención de alcoholes quirales utilizando biocatalizadores de origen vegetal

**Alumno:**

Jesús Ariel Santana Martínez

Matrícula: 2172044176

**Asesoras:**

Dra. Rubria Marlen Martínez Casares.

No Eco. 41833

Dra. Aida Solís Oba

No Eco. 21208

**Lugar de realización:** Laboratorio de Biotransformaciones (N-201) en la Unidad Interdisciplinaria de Docencia Investigación y Servicio de la Universidad Autónoma Metropolitana.

**Fecha inicio:** 15 de diciembre del 2022

**Fecha terminación:** 15 de julio del 2022

## RESUMEN

La biocatálisis se ha establecido como una herramienta importante en síntesis orgánica, especialmente para la industria farmacéutica, debido a sus ventajas medioambientales y económicas. Los biocatalizadores son enzimas, las cuales son considerados recursos renovables, biodegradables, además las reacciones biocatalizadas se llevan a cabo en condiciones suaves de reacción. Entre los biocatalizadores de mayor utilidad sintética se encuentran las oxidoreductasas dentro de este gran grupo encontramos a las reductasas, que catalizan la reducción de cetonas a alcoholes enantiopuros. Los alcoholes enantiopuros son importantes intermediarios para la síntesis de compuestos con actividad biológica.

Los alcoholes se pueden obtener mediante procesos de reducción química con altos rendimientos, sin embargo, estos métodos son poco amigables con el ambiente debido al uso de metales como catalizadores, un alto gasto de disolventes y materias primas no renovables, por lo cual una alternativa es el uso de reductasas de fuentes vegetales.

En este trabajo se evaluó la actividad reductasa de diferentes materiales vegetales como: el haba (*Vicia faba*), las vainas de chícharo (*Pisum sativum*), los tallos de zanahoria (*Daucus carota*), betabel (*Beta bulgaris*) y rábano (*Raphanus sativus*), se utilizó el benzaldehído como reacción modelo. Los mayores porcentajes de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico se obtuvieron con extractos acuosos de tallos de zanahoria (99%), rábano (98%) y betabel (98%), con estos resultados se corroboró la presencia de actividad reductasa. Estos materiales vegetales se utilizaron posteriormente para llevar a cabo la reducción de 2-acetilpiridina (**1a**), 3-acetilpiridina (**2a**), 4-acetilpiridina (**3a**), 2-acetiltiofeno (**4a**) y 2-acetil-5-bromotiofeno (**5a**) a los alcoholes correspondientes (**1b**, **2b**, **3b**, **4b**, **5b**).

Para la reducción de **3a** al 4-(1-hidroxietil)piridina (**3b**), se utilizó como fuente de reductasas los extractos acuosos liofilizados de tallo de rábano (LTR), zanahoria (LTZ); vainas secas de chícharo (LVSC) y haba (LVHS); extracto acuoso de tallo de betabel (EATB), utilizando solución amortiguadora (SA) de fosfatos 0.15M a pH8.1,

42°C. Los mayores porcentajes de exceso enantiomérico (ee) se obtuvieron utilizando LVCH y LTR con 93 y 97%, respectivamente, mientras que los porcentajes de reducción (%Conv) fueron de 23 y 20%, respectivamente.

Se evaluó la reducción de **3a** al 4-(1-hidroxietil)piridina (**3b**), se utilizó como fuente de biocatalizador harina de haba seca (HHS), se compararon: 200 y 400 mg de HHS, tres soluciones amortiguadoras (SA), fosfatos 0.15M, HEPES 0.15 y 0.2M a pH 8.1. Con las mejores condiciones de reacción se llevó a cabo la reducción de **1a**, **2a**, **3a**, **4a** y **5a** a los alcoholes correspondientes (**1b**, **2b**, **3b**, **4b** y **5b**). El mayor porcentaje de reducción de **3a** al alcohol con configuración S (**3b**) fue de 48% y un %ee de 86%, al utilizar 400 mg de HHS, SA de HEPES 0.15M a pH 8.1. El aumentar la cantidad de biocatalizador incrementa el %Conv y al utilizar la SA de HEPES incrementa en >20% la reducción con respecto a SA fosfatos. La reducción de **1a** en SA de fosfatos fue de 21% al alcohol (S)-**1b** con 70% ee; para la reducción de **2a** se obtuvo 12% del alcohol (S)-**2b** con 87 % ee, para **3a** fue del 26% de reducción y se obtuvo el alcohol (S)-**3b** con 89% ee; mientras que **4a** se redujo en un 11%, y se obtuvo (S)-**4b** en 75% ee. No se observó reducción de **5a** en las condiciones de reacción estudiadas.

Además, se evaluó la reducción de las cetonas **1a**, **2a**, **3a**, **4a** y **5a** a los alcoholes correspondientes (**1b**, **2b**, **3b**, **4b**, **5b**), utilizando como fuente de biocatalizador el extracto acuoso de harina de haba seca en soluciones amortiguadoras (SA) de fosfatos y HEPES a 0.15M a pH 8.1. Al utilizar la SA de HEPES se observó un aumento >8% en la reducción de **1a-3a**. Para la reducción de **1a** en HEPES se obtuvo el alcohol (S)-**1b** con un 81% de ee y 55%conv; en la reducción de **2a** se obtuvo el alcohol (S)-**2b** 92 %ee y 37 %conv; mientras que en la reducción de **3a**, se obtuvo (S)-**3b** con un 90 %ee y 57 %conv y para la reducción de **4a** se obtuvo 22% del (S)-**4b** con 75 %ee. No se observó reducción de **5a** en las condiciones de reacción estudiadas.

Con estos resultados se confirma que los tallos de rábano zanahoria, betabel, las vainas secas de haba, chícharo son buenas fuentes de reductasas, además de ser desechos a los que se les da un valor agregado.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Biocatálisis .....	3
2.2 Biocatalizadores .....	3
2.3 Oxidorreductasas.....	4
2.4 Aldocetorreductasas .....	5
2.5 Obtención de alcoholes quirales .....	6
2.6 Importancia de los alcoholes enantiopuros .....	7
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	8
4. HIPÓTESIS .....	9
5. OBJETIVO.....	9
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
6.1 Reducción de cetonas .....	11
6.1.1 Reducción química de cetonas con borohidruro de sodio en solución .....	11
6.1.2 Desarrollo de los métodos analíticos .....	11
6.2 Evaluación de la actividad reductasa .....	12
6.2.1 Obtención de los materiales vegetales con actividad reductasa .....	12
6.2.2 Evaluación de la actividad reductasa utilizando benzaldehído .....	13
6.3 Influencia del tipo de solución amortiguadora .....	14
6.3.1 Preparación de soluciones amortiguadoras .....	14
6.4 Reducción de cetonas para obtener alcoholes quirales, utilizando biocatalizadores de origen vegetal .....	14
6.5 Análisis estadístico de los datos .....	15
7. Resultados y discusión .....	16
7.1 Reducción química de cetonas .....	16
7.2 Evaluación de la actividad reductasa sobre benzaldehído .....	16
7.3 Evaluación de la actividad reductasa de los extractos acuosos liofilizados sobre 4-acetilpiridina. ....	17
7.4 Reducción biocatalítica de cetonas (1-5a) con harina de haba seca.....	20
7.5 Evaluación de la actividad reductasa de cetonas (1-5a) con el extracto acuoso de harina de haba seca.....	22
8. Conclusiones .....	26
9. BIBLIOGRAFIA.....	27
10. Anexos .....	33

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Materiales vegetales utilizados para la reducción de benzaldehído y cetonas.	10
<b>Tabla 2.</b>	Condiciones utilizadas para determinar el % Conversión por CG.....	12
<b>Tabla 3.</b>	Condiciones utilizadas para determinar el % ee por CLAR. ....	12
<b>Tabla 4.</b>	Rendimiento de reacción.....	16
<b>Tabla 5.</b>	Cantidad de liofilizado y pérdida de agua obtenida de diferentes materiales vegetales.....	17
<b>Tabla 6.</b>	Interacción de los factores: SA y los diferentes alcoholes sobre el % con versión.....	25

## Índice de esquemas

<b>Esquema 1.</b>	Reducción química de cetonas.....	11
<b>Esquema 2.</b>	Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico .....	13
<b>Esquema 3.</b>	Reducción de cetonas con extracto acuoso de haba ( <i>Vicia faba</i> ) para la obtención de alcoholes quirales.....	15

## Índice de gráficas

<b>Gráfica 1.</b>	Porcentaje de conversión de benzaldehído a alcohol bencílico utilizando las siguientes fuentes vegetales, extracto acuoso de tallo de rábano (EATR), zanahoria (EATZ) vaina de chícharo (EAVCH), betabel (EATB) y harina de haba seca (HHS). ....	16
<b>Gráfica 2.</b>	Porcentaje de reducción de 4-acetilpiridina a (S)-4-(1-hidroxietil) piridina y porcentaje de exceso enantiomérico (%ee) de alcohol con configuración (S) utilizando liofilizado del extracto acuoso de vaina de chícharo (LVCH), vaina de haba seca (VHS) y vaina de chícharo seca (VCS). * $p < 0.05$ diferencia estadísticamente significativa .....	18
<b>Gráfica 3.</b>	Porcentaje de reducción de 4-acetilpiridina a (S)-4-(1-hidroxietil) piridina y el % de exceso enantiomérico (%ee) de alcohol con configuración (S) utilizando liofilizado de tallo de rábano (LTR), liofilizado de tallo de zanahoria (LTZ) y extracto acuoso de tallo de betabel (EATV). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto.....	19
<b>Gráfica 4.</b>	Reducción de <b>3a</b> al alcohol (S)- <b>3b</b> y % ee, utilizando 200 mg y 400 mg HHS en SA de fosfatos 0.15 M, pH 8.1. * $p < 0.05$ diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto.....	20
<b>Gráfica 5.</b>	Reducción de <b>3a</b> al alcohol (S)- <b>3b</b> y % ee, utilizando 400 mg HHS en SA de fosfatos 0.15 M, SA HEPES 0.15 y 0.2M a pH 8.1. ** $p < 0.001$ diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto.....	21

**Gráfica 6.** Reducción de las cetonas **1a, 2a, 3a, 4a** y **5a** a sus correspondientes alcoholes (**1b, 2b, 3b, 4b** y **5b**), utilizando 400 mg de HHS y SA de fosfatos 0.15M. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.001$  diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto ..... 22

**Gráfica 7.** Porcentaje de reducción de **1a, 2a, 3a, 4a** al alcohol (S)-**1b, 2b, 3b** y **4b**, y % ee utilizando extracto acuoso de harina de haba seca en presencia de SA de fosfatos 0.15 M a pH 8.1. \*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$  diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto. .... 23

**Gráfica 8.** Porcentaje de reducción de **1a, 2a, 3a, 4a** a su alcohol correspondiente (S)-**1b, 2b, 3b** y **4b**, así como porcentaje del exceso enantiómero utilizando extracto acuoso de harina de haba seca en presencia de SA de HEPES 0.15 M a pH 8.1. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*  $p < 0.001$  diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto..... 24

## 1. INTRODUCCIÓN

La biocatálisis se refiere al uso de catalizadores biológicos (enzimas), para realizar transformaciones químicas en compuestos orgánicos. Los biocatalizadores pueden ser enzimas purificadas, extractos crudos, células completas o enzimas inmovilizadas (Wu *et al.*, 2020). Los procesos biocatalíticos incluyen la producción de enzimas, el desarrollo de procesos biocatalíticos, la biotransformación, la ingeniería de enzimas, la inmovilización y el reciclaje de biocatalizadores (Kuo,2020).

En las últimas décadas, la biocatálisis ha ganado interés, debido a su potencial para ser aplicada a la producción de compuestos con actividad farmacológica con alta eficiencia, alto rendimiento. En particular, ha demostrado ser una herramienta eficaz y potente en la preparación de moléculas quirales (Rossino *et al.*, 2022).

Las reacciones biocatalizadas poseen muchas características atractivas para la síntesis de intermediarios quirales, ya que pueden llevarse a cabo a en un medio acuoso a temperatura ambiental y presión atmosférica, limitando o evitando así la isomerización, la racemización, la epimerización y el reordenamiento (Rossino *et al.*, 2022). Además, representan una alternativa eficiente, altamente selectiva y más ecológica en comparación a los catalizadores metálicos.

Entre las enzimas más utilizadas en la síntesis orgánica se encuentran las oxidorreductasas, que catalizan reacciones redox, se llevan a cabo por medio de dos reacciones simultaneas la reducción y la oxidación. Entre las oxidorreductasas se encuentran las aldocetoreductasas (ACR), que catalizan la biotransformación del grupo carbonilo de aldehído o cetonas a los alcoholes correspondientes y viceversa (Penning, 2017; Sellés, 2018).

Algunas fuentes de ACR son las raíces, frutos, semillas y hojas de diversas plantas como frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Solís, 2019; Solís 2017) brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), coliflor (*B. oleracea* var. *Botrytis*), espinaca (*Espinacia oleracea*), col (*Brassica oleracea*) (Suárez-Franco, 2010), zanahoria (*Daucus carota*), nabo (*Brassica rapa*) entre otras (Suárez-Franco, 2010). Las ACR se emplean en la síntesis enantioselectiva de alcoholes quirales a partir de la reducción de cetonas

proquirales (Wang, 2020). Los alcoholes ópticamente puros ocupan un lugar central, ya que son importantes intermediarios en la síntesis de productos.

Actualmente existen diversos sistemas de reducción por métodos químicos tradicionales, que garantizan altos rendimientos, sin embargo, utilizan metales difíciles de disponer una vez terminada la reacción, además utilizan altas temperaturas y un alto gasto de disolventes, requieren el uso de ligandos quirales, y materias primas no renovables (Salvi, 2017).

Una alternativa atractiva es el uso de biocatalizadores, como las aldocetoreductasas de origen vegetal los cuales, frecuentemente, son baratos y fáciles de conseguir. Además, México es un país con una amplia diversidad natural, por lo cual una evaluación de las diferentes fuentes vegetales puede conducir al descubrimiento de nuevos biocatalizadores. Por lo anterior en esta investigación se llevó a cabo la reducción de cetonas para la obtención de alcoholes quirales, utilizando biocatalizadores de origen vegetal.



## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Biocatálisis**

La biocatálisis involucra la aplicación de enzimas para la transformación de sustratos químicos y desempeña un papel importante en la síntesis de intermediarios de productos químicos, agroquímicos y farmacéuticos a nivel industrial.

Las principales ventajas de los métodos biocatalíticos son: a) alta especificidad, b) ruta sintética simplificada, c) altos rendimientos con excepcionales regio-, quimio- y estereoselectividades, d) generan menos subproductos y desechos, e) amplia disponibilidad comercial de biocatalizadores, f) condiciones de reacción suaves comparadas con los métodos químicos tradicionales (presión y temperatura ambiente), g) fácil recuperación del producto y h) fácil eliminación de los materiales biológicos, ya que son biodegradables (Salvi, 2017).

En los últimos años, las industrias han experimentado cambios radicales al invertir en metodologías más sostenibles con la finalidad de minimizar los desechos y su huella ecológica. Como resultado, la biocatálisis es una herramienta atractiva para la industria química y farmacéutica, ya que satisface las demandas para obtener procesos industriales altamente selectivos, seguros, sostenibles y con características más ecológicas (Truppo, 2017).

Sin embargo, el número de aplicaciones biocatalíticas industriales sigue estando limitado debido a las dificultades de escalamiento, los tediosos procesos de optimización y los largos tiempos de reacción, así como por la inestabilidad de las enzimas en el tiempo y su incompatibilidad con otras condiciones de reacción (Sheldon, 2018).

### **2.2 Biocatalizadores**

Los biocatalizadores representan una alternativa eficiente, altamente selectiva y más ecológica comparados con los catalizadores metálicos. Existen diferentes fuentes de biocatalizadores, como lo son los animales, plantas y microorganismos (Okpara, 2022). Los biocatalizadores se pueden emplear como células completas o extractos crudos, enzimas purificadas y enzimas inmovilizadas.

Las enzimas puras proporcionan catalizadores activos y altamente específicos que se pueden utilizar con el fin de realizar un gran espectro de reacciones. Sin

embargo, las enzimas purificadas son sensibles a la desnaturalización, debido a cambios en el pH, la temperatura y que en muchas ocasiones requieren el uso de cofactores adicionales generando procesos costosos (Nadar,2017).

La inmovilización de enzimas es una herramienta utilizada 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 (Basso,2019).

El uso de células completas presenta ventajas como por ejemplo; son más económicas que las enzimas puras, mantienen su alta regio-, quimio- y enantioselectividad, tienen baja toxicidad, no requieren suministrar o regenerar cofactores, los cuales son costosos. Además, los compuestos residuales de la pared celular actúan de manera protectora para las enzimas, por lo tanto, permiten aplicaciones enzimáticas en condiciones de reacción adversas o en medios de reacción no convencionales o no acuosos (Garzón-Posse, 2018; Wachtmeister, 2016).

Los factores que afectan la actividad enzimática son: la concentración de sustrato, la concentración del producto, la estabilidad de la enzima o del microorganismo, , la temperatura y el pH. (Kuo, 2020).

Las enzimas se clasifican de acuerdo con la reacción que catalicen, de acuerdo con la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), se clasifican en 6 grandes grupos: hidrolasas, transferasas, liasas, isomerasas, ligasas y oxidorreductasas (Soy, 2020).

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).

### **2.3 Oxidorreductasas**

Las oxidorreductasas catalizan la oxidación de una especie química (un agente reductor o donador de electrones) con la reducción simultánea de otra (un agente oxidante o aceptor de electrones). Las oxidorreductasas pueden actuar sobre una amplia gama de sustratos orgánicos, incluidos alcoholes, aminas y cetonas, y sustratos inorgánicos, incluidos aniones pequeños, como sulfito, y metales como el

mercurio (Sellés, 2018; Dong,2018). Estas enzimas tienen diferentes centros activos redox para realizar sus funciones. Estas enzimas son objetivos valiosos para la industria farmacéutica, además ayudan a establecer una bioeconomía, encajando con el desarrollo de industrias altamente eficientes, sostenibles y ecológicas (Espina, 2021).

Las oxidorreductasas necesitan cofactores, que son necesarios para realizar su actividad enzimática. Estos cofactores o coenzimas se encuentran fuertemente unidos a ellas. Algunos cofactores son: el dinucleótido de nicotinamida y adenina ( $\text{NAD}^+$ ) o el dinucleótido fosfato de nicotianamina y adenina ( $\text{NADP}^+$ ) (Chánique,2018). Además, las oxidorreductasas dependientes de cofactores son capaces de oxidar un sustrato, mediante la transferencia de un grupo hidruro ( $\text{H}^-$ ) a un cofactor ya sea  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ , lo que da como resultado la forma reducida  $\text{NADH}$  o  $\text{NADPH}$  (Sellés, 2018).

De acuerdo con Nealon (2015), las oxidorreductasas dependientes de  $\text{NADPH}$  como por ejemplo la aldocetoreductasa (ACR), son de gran interés desde punto de vista industrial, ya que realizan los pasos críticos en la producción de muchos compuestos difíciles de sintetizar, en condiciones suaves de reacción. Además, las oxidorreductasas dependientes de  $\text{NADPH}$  poseen otras propiedades que las convierten en alternativas muy atractivas a la síntesis química, como la posibilidad de adaptarlas para que tengan los parámetros cinéticos apropiados, la estereo, regio y enantioespecificidad.

#### **2.4 Aldocetoreductasas**

Las aldocetoreductasas (ACR) pertenecen a una superfamilia de oxidorreductasas, son dependientes de  $\text{NADP}^+$ , cataliza la reducción de sustratos que contienen grupo carbonilo, por ejemplo, aldehídos y cetonas para producir alcoholes primarios y secundarios (Penning, 2017).

La reducción mediada por aldocetoreductasas de compuestos carbonílicos proquirales, es una forma interesante de sintetizar alcoholes enantiopuros, los cuales son de gran interés para la industria farmacéutica (Qiu, 2021).

Las oxidorreductasas han sido utilizadas para obtener alcoholes ópticamente puros a partir de cetonas, los cuales son precursores importantes utilizados en la industria

farmacéutica, como ejemplo la reducción asimétrica de 3-cloro-1-(tiofen-2-il)-propan-1-ona para la obtención de (S)-3-cloro-1-(tiofen-2-il)propan-1-ol que es un componente clave para la síntesis de la duloxetina (Wu, S. *et al*/2020). Otro ejemplo es la reducción de 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo para la obtención de (S)-4-cloro-3-hidroxi-butanoato de etilo que es un componente básico de los inhibidores de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (Musa, 2022).

### **2.5 Obtención de alcoholes quirales**

Hay diferentes formas de obtener alcoholes quirales como: la resolución de mezclas racémicas, síntesis asimétrica, métodos químicos, organocatálisis y biocatálisis, cada método presenta ventajas y desventajas.

- *Métodos químicos:*

Los métodos químicos requieren el uso de catalizadores metálicos que son dañinos y costosos, tales como el hidruro de aluminio y litio ( $\text{LiAlH}_4$ ), trietilborohidruro de litio ( $\text{LiBHEt}_3$ ), bis (trimetilsilil amida de litio ( $\text{Li}(\text{Si})_3\text{BH}$ ), cianoborohidruro de sodio ( $\text{NaCNBH}_3$ ), 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 ( $\text{ZnO}$ ), óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), óxido de magnesio ( $\text{MgO}$ ), óxido de calcio ( $\text{CaO}$ ), óxido de bario ( $\text{BaO}$ ), óxido de estroncio ( $\text{SrO}$ ). Algunas de las sustancias empleadas en la reducción son inflamables y pueden constituir un peligro para la salud (Bhardwaj, 2017, Solís, A *et al.* 2017)

- *Resolución de mezclas racémicas*

La resolución de racematos es una alternativa sencilla para obtener el enantiómero de interés. Estos métodos pueden ser físicos, químicos o biológicos. Se utiliza en la industria cuando no se dispone de una síntesis enantioselectiva. Se han desarrollado diferentes métodos de resolución enantioselectiva que incluyen, cromatografía quiral, cristalización preferencial o diastereoisomérica y la resolución cinética (Mokhtari, 2017, Qie, 2018).

- *Síntesis asimétrica*

La síntesis asimétrica se refiere a la conversión enantioselectiva de un sustrato proquiral en un producto óptico activo, con el fin de obtener el enantiómero puro.

Los procesos de reducción asimétrica implican el uso de complejos metálicos quirales (rodio, rutenio o iridio). La mayoría de los catalizadores de rodio comúnmente utilizados son de fosfina de rodio quiral, estos catalizadores son costosos y difíciles de disponer al final del proceso. (Bhardwaj, 2017, Xu, G. et al. 2012; Vandenberghe, A. et al. 2013; Fruchey, E. 2011).

- *Biocatálisis*

La biocatálisis es una metodología que permite obtener compuestos enantioméricamente puros, no se requiere la utilización de metales como catalizadores, debido a que la enzima es un catalizador de origen natural, este método en los últimos años ha tomado importancia para la obtención de alcoholes ópticamente puros. Por ejemplo, la reducción biocatalítica de cetonas proquirales en presencia de una aldocetoreductasa para la obtención de alcoholes enantiopuros.

## **2.6 Importancia de los alcoholes enantiopuros**

La quiralidad es un factor clave en la seguridad y eficacia de muchos productos con actividad biológica, por lo tanto, la producción de enantiómeros puros como intermediarios en la producción de sustancias con actividad biológica, como son los alcoholes enantiopuros, se han vuelto cada vez más importante en las industrias química, farmacéutica, agroquímica y de alimentos (Ötvös, 2021).

En los últimos años, se ha resaltado la importancia potencial y diferencial de las propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas y toxicológicas de cada uno de los enantiómeros presentes en los fármacos, por lo cual se ha presentado un progreso en las tecnologías químicas asociadas con la síntesis, tanto en el descubrimiento como en el desarrollo de nuevos fármacos y en el análisis de los enantiómeros ópticamente puros. (Bell *et al.*, 2021).

Los alcoholes quirales son intermediarios importantes para la obtención de productos en química fina, farmacéuticos y agroquímicos. En particular, en la industria farmacéutica, los alcoholes quirales pueden servir como intermediarios de muchos fármacos, por ejemplo, Irutinib, Duloxetina, Atorvastatina, Enalapril, Crizotinib. Fluoxetina, etc (Wang, 2021; Wojaczyńska, 2020; Qin, 2016).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Alrededor del 57% de los principios activos en la industria farmacéutica son moléculas quirales (Rossino *et al.*, 2022). La quiralidad es factor importante en la actividad biológica, ya que cada enantiómero puede tener actividad diferente, por ejemplo, uno de los enantiómeros puede ser inactivo, poseer alguna actividad de interés ya sea deseable o indeseable (Leek, 2017), en consecuencia, la mayoría de los fármacos quirales se comercializan en forma enantiopura (Rossino *et al.*, 2022).

El uso de enantiómeros puros aún está limitado, en algunos casos por el laborioso proceso que implican los métodos de síntesis, los altos costos para obtener enantiómeros puros y las dificultades para desarrollar métodos enantioselectivos eficientes (Hancu, 2022).

Por lo anterior, tanto la academia como las compañías farmacéuticas trabajan en el desarrollo de procedimientos eficientes para la obtención de compuestos homoquirales con buenos rendimientos y con excelente exceso enantiomérico.

La biocatálisis se ha convertido en una tecnología madura para la síntesis química y farmacéutica, así como en otras áreas donde se requieren una alta selectividad y pureza óptica. Las enzimas son biocatalizadores efectivos y precisos, ya que son enantioselectivos, se utilizan bajo condiciones de reacción suaves, a menudo permite acortar las rutas sintéticas, ya que evita pasos de protección, desprotección y formación de subproductos (Kuo, 2020; Adams *et al.*, 2019).

El uso de oxidorreductasas como biocatalizadores se ha convertido en un método eficaz para obtener alcoholes ópticamente puros, mediante la reducción de cetonas proquirales (Wang *et al.*, 2020). Los alcoholes quirales son importantes intermediarios de muchos productos farmacéuticos, químicos y agroquímicos.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo la reducción de cetonas para la obtención de alcoholes quirales, utilizando biocatalizadores de origen vegetal.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las oxidorreductasas presentes en los extractos acuoso y/o liofilizados de vainas de chícharo (*Pisum sativum*), haba (*Vicia faba*), tallos de zanahoria (*Daucus carota*), betabel (*Beta bulgaris*) y rábano (*Raphanus sativus*) serán capaces de reducir cetonas para obtener alcoholes enantiopuros.

#### **5. OBJETIVO.**

Llevar a cabo la reducción de cetonas para la obtención de alcoholes quirales, utilizando biocatalizadores de origen vegetal.

##### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Reducir químicamente las cetonas para obtener los alcoholes de referencia.
2. Implementar técnicas analíticas para la identificación y cuantificación de las cetonas y sus respectivos alcoholes.
3. Obtener extractos vegetales actividad reductasa.
4. Determinar las condiciones óptimas de reacción (Temperatura, pH, tipo de solución amortiguadora, cantidad de biocatalizador) para las diferentes fuentes del biocatalizador.
5. Reducir cetonas para obtener alcoholes quirales, utilizando biocatalizadores de origen vegetal.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

2-acetilpiridina (**1a**), 3-acetilpiridina (**2a**), 4-acetilpiridina (**3a**), 2-acetiltiofeno (**4a**), 2-acetil-5-bromotiofeno (**5a**), benzaldehído (**6a**), 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 reactivo), isopropanol y diclorometano (grado HPLC) se obtuvieron de Tecsiquim, el Hexano (grado HPLC) de Burdick & Jackson.

2-(1-hidroxietil)piridina (**1b**), 3-(1-hidroxietil)piridina (**2b**), 4-(1-hidroxietil)piridina (**3b**), 2-(1-hidroxietil)tiofeno (**4b**) y 2-(5-bromo-1- hidroxietil)tiofeno (**5b**) fueron sintetizados y caracterizados en el laboratorio.

Los materiales vegetales, vainas y semillas de chícharo (*Pisum sativum*) y haba (*Vicia faba*), tallos de zanahoria (*Daucus carota*), betabel (*Beta bulgaris*) y rábano (*Raphanus sativus*) se adquirieron de un mercado local de la ciudad de México. En la **tabla 1** se muestran familia y genero de los materiales vegetales que fueron utilizados para la reducción de benzaldehído y cetonas.

**Tabla 1.** Materiales vegetales utilizados para la reducción de benzaldehído y cetonas.

Familia	Genero	Material vegetal	Parte vegetal evaluada
Fabaceae	<i>Vicia faba</i>	Haba	Semilla y vaina
Fabaceae	<i>Pisum sativum</i>	Chícharo	Semilla y vaina
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	Rábano	Tallo
Apiaceae	<i>Daucus carota</i>	Zanahoria	Tallo
Amaranthaceae	<i>Beta bulgaris</i>	Betabel	Tallo

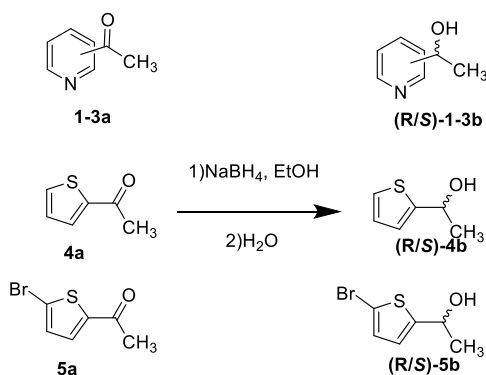
El equipo utilizado fue el siguiente: potenciómetro Corning Pinnacle M530; Balanza analítica Mettler Toledo AG345; cromatógrafo de gases (CG) HP 6890, la columna HP-5 (30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m) de Agilent Technologies; el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent Series 1100, las columnas Chiracel OB-H y OJ-H (25.0 cm x 0.46 cm, Daicel Chemical Industries); molino de café Hamilton Beach 80374; incubadora Enviro-Genie y liofilizadora Labconco FreeZone 4.5.



## 6.1 Reducción de cetonas

### 6.1.1 Reducción química de cetonas con borohidruro de sodio en solución

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 2 mmol (250 mg) de 2-acetilpiridina (**1a**), 3-acetilpiridina (**2a**), 4-acetilpiridina (**3a**), 2-acetiltiofeno (**4a**) y 2-acetil-5-bromotiofeno (**5a**), se disolvieron en 10 mL de etanol al 95%, posteriormente se agregaron 2mmol (156 mg) de borohidruro de sodio y se agito; la reacción se monitoreo por cromatografía de capa fina (CCF), al término de la reacción se agregaron 10 mL de agua destilada fría y se extrajo con cloruro de metileno (4 x 10mL), **ver esquema 1** la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. Las cetonas y los alcoholes se analizaron por CLAR y CG.



**Esquema 1.** Reducción química de cetonas

### 6.1.2 Desarrollo de los métodos analíticos

#### 6.1.2.1 Análisis de porcentaje de conversión por cromatografía de gases (CG)

La reducción se determinó mediante CG, se empleó un cromatógrafo HP 6890, equipado con una columna HP-5 (30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m), se utilizó N<sub>2</sub> como gas acarreador, la temperatura del inyector y detector fue 250°C, la temperatura del horno y la velocidad de flujo dependen del compuesto a analizar. En la **tabla 2** se muestran las condiciones para cada compuesto y sus tiempos de retención.

**Tabla 2.** Condiciones utilizadas para determinar el % Conversión por CG

Cetona/Aldehído	t <sub>R</sub> (min)	Alcohol	t <sub>R</sub> (min)	Temperatura (°C)	Flujo (mL/min)
<b>1a</b>	3.4	<b>1b</b>	3.7	140	0.7
<b>2a</b>	4.0	<b>2b</b>	4.7		
<b>3a</b>	3.8	<b>3b</b>	4.7		
<b>4a</b>	3.6	<b>4b</b>	3.9		
<b>5a</b>	6.7	<b>5b</b>	7.1		
Benzaldehído ( <b>6a</b> )	3.0	Alcohol bencílico ( <b>6b</b> )	3.5	130	0.8

\*t<sub>R</sub> = tiempo de retención

### 6.1.2.2 Análisis del exceso enantiomérico (ee) por cromatografía de líquidos de alta resolución quiral (CLAR)

El exceso enantiomérico (ee) se determinó por CLAR en un cromatógrafo líquido Agilent 1100 equipado con un detector de arreglo de diodos usando las columnas Chiracel OB-H y OJ-H (25,0 cm x 0,46 cm, Daicel Chemical Industries) y la fase móvil fue una mezcla de hexano y alcohol isopropílico, en la **tabla 3** se describen las condiciones utilizadas para la cuantificación del % ee de los alcoholes correspondientes.

**Tabla 3.** Condiciones utilizadas para determinar el % ee por CLAR.

Cetona	t <sub>R</sub> (min)	Alcohol	t <sub>R</sub> (min)	Columna	Eluyente*	Flujo (mL/min)
<b>1a</b>	12.2	(S/R)- <b>1b</b>	8.9/10.6	OB-H	91:9	0.8
<b>2a</b>	14.2	(S/R)- <b>2b</b>	7.1/11.0		87:13	1.0
<b>3a</b>	15.9	(S/R)- <b>3b</b>	9.0/11.5		89:11	1.0
<b>4a</b>	9.8	(S/R)- <b>4b</b>	11.8/14.6	OJ-H	95:5	1.0
<b>5a</b>	10.8	(S/R)- <b>5b</b>	12.9/15.7		93:7	0.8

t<sub>R</sub> = Tiempo de retención, \*Hexano: Isopropanol

## 6.2 Evaluación de la actividad reductasa

### 6.2.1 Obtención de los materiales vegetales con actividad reductasa

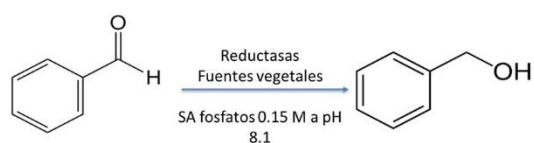
**Material vegetal fresco:** Las diferentes fuentes vegetales se sumergieron durante 1 minuto en solución de hipoclorito de sodio al 5%, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. El material vegetal se pesó y se colocó en un vaso de licuadora, se licuo con solución amortiguadora (SA) a 0.15M y pH 8.1 (relación 1:3, p/v), se centrifugó a 4000 rpm, 5°C durante 10 min. El sobrenadante (extracto acuoso), se decantó y se midió el volumen, este se utilizó como fuente de enzima reductasa.

**Harina de semillas vegetales:** Las semillas de haba seca (*Vicia faba*) se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 10 min, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Se pesaron 25 g de semillas y se pulverizaron en un molino para café Hamilton Beach 80374, la harina obtenida se tamizó y se mezcló con solución amortiguadora (1:3 p/v) se agitó mecánicamente por 1 h, se centrifugó a 4000 rpm, 5°C, 10 min. El sobrenadante (extracto acuoso), se decantó y se midió el volumen, este se utilizó como fuente de enzima reductasa.

**Extracto enzimático liofilizado:** El extracto acuoso preparado con agua (20 mL) se congeló a -75°C (Revco), se liofilizó a -51 °C, 0.133 mBar, durante 24h utilizando una liofilizadora LABCONCO FreeZone 4.5. Posteriormente se recuperó el polvo liofilizado, se pesó, tamizó y se calculó la pérdida de agua. Los materiales liofilizados se almacenaron en refrigeración a 4°C. Para su utilización fueron regenerados con SA con la cantidad de agua que perdieron, se dejaron agitar durante 5 min, se usó la suspensión como fuente de enzima, con esta metodología fueron preparados los tallos de rábano y zanahoria.

### 6.2.2 Evaluación de la actividad reductasa utilizando benzaldehído

La reducción de benzaldehído a alcohol bencílico (**Esquema 1**) se utilizó como reacción de referencia, para poder determinar la actividad reductasa de los materiales vegetales.



**Esquema 2.** Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico

**Biorreduccion:** A 1 mL de extracto acuoso se le agregó 0.015 mmol (1.5  $\mu$ L) de benzaldehído disuelto en 48.5  $\mu$ L de isopropanol, se agitó mecánicamente a 25°C en una incubadora Enviro-Genie, después de 20 h se extrajo con acetato de etilo (2 x 1 mL), se centrifugó a 4000 rpm, 5°C durante 5 min, se secó con sulfato de sodio

anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), el % de conversión (% Conv) se determinó por Cromatografía de gases (CG). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### **6.3 Influencia del tipo de solución amortiguadora**

Se comparó la influencia de diferentes tipos de solución amortiguadora en la actividad reductasa. Se prepararon soluciones amortiguadoras de: Fosfatos (FO) a 0.15 M, pH 8.1 y HEPES (HE) a 0.15 y 0.2 M, pH 8.1.

#### **6.3.1 Preparación de soluciones amortiguadoras**

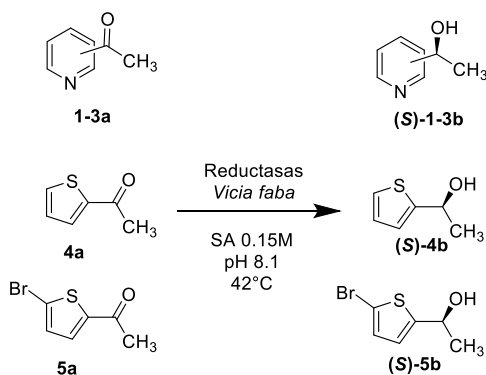
**Fosfatos:** se pesaron 2.04 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se aforo a 100 mL (solución A), se pesaron 2.6 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y aforaron a 100 mL (solución B), posteriormente teniendo ambas soluciones se tomaron 75 mL de la solución B y se ajustó el pH a 8.1 con la solución A, por último, se aforo a 100 mL con agua destilada.

**HEPES 0.15 M:** se pesaron 3.57 g de HE, se disolvieron en 50 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 8.1 con solución de NaOH al 2%, por último, se aforo a 100 mL con agua destilada.

**HEPES 0.20 M:** se pesaron 4.76 g de HE, se disolvieron en 50 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 8.1 con solución de NaOH al 2%, por último, se aforo a 100 mL con agua destilada.

### **6.4 Reducción de cetonas para obtener alcoholes quirales, utilizando biocatalizadores de origen vegetal**

A 3 mL de extracto acuoso o su equivalente en peso de los liofilizados, se le agregó  $1.8 \times 10^{-5}$  mmol (2  $\mu\text{L}$ ) de la respectiva cetona (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**) y 3.63 mg de **5a**, disuelta en 48  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se agitó mecánicamente a 42°C en una incubadora Enviro-Genie, después de 20 h se extrajo con acetato de etilo (3 x 2 mL), se centrifugó a 4000 rpm, 5°C durante 5 min, se secó con sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se evaporó a sequedad, y reconstituyó con fase móvil (90:10 hexano-isopropanol), el % Conv se determinó por CG y el exceso enantiomérico (%ee) fue determinado por CLAR. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.



**Esquema 3.** Reducción de cetonas con extracto acuoso de haba (*Vicia faba*) para la obtención de alcoholes quirales

### 6.5 Análisis estadístico de los datos

Se realizó un análisis estadístico para evaluar la actividad reductasa con base en el % Conv y ee de los extractos acuosos y liofilizados 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 Reducción química de cetonas

En la **tabla 4** se muestran los rendimientos y factores de retención (Rf) por Cromatografía de capa fina (CCF) de los alcoholes sintetizados.

**Tabla 4.** Rendimiento de reacción

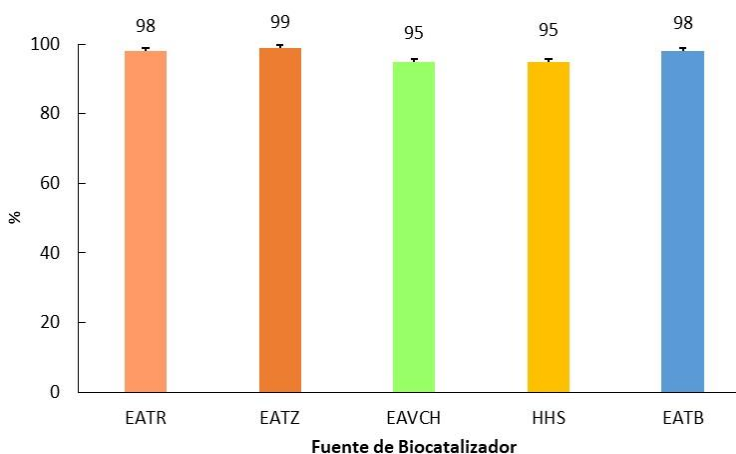
Compuesto	Rendimiento de reacción (%)	Identificación por TLC		
		Rf cetona	Rf alcohol	Fase móvil de elución*
<b>1b</b>	57.3	0.4	0.6	50:50
<b>2b</b>	60.0	0.4	0.6	70:30
<b>3b</b>	65.0	0.5	0.7	90:10
<b>4b</b>	15.9	0.3	0.5	90:10
<b>5b</b>	32.1	0.3	0.3	70:30

\*hexano:acetato de etilo

Todos los alcoholes fueron identificados por CCF, CG y CLAR, ver anexos **1 y 2**

### 7.2 Evaluación de la actividad reductasa sobre benzaldehído

En la **gráfica 1** se presenta la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico utilizando extractos acuosos de rábano (EATR), zanahoria (EATZ), vaina de chícharo (EAVCH), betabel (EATB) y harina de haba seca (HHS). Los porcentajes obtenidos superan el 90% de conversión siendo el EATZ con mayor porcentaje de reducción (99 %).



**Gráfica 1.** Porcentaje de conversión de benzaldehído a alcohol bencílico utilizando las siguientes fuentes vegetales, extracto acuoso de tallo de rábano (EATR),

zanahoria (EATZ) vaina de chícharo (EAVCH), betabel (EATB) y harina de haba seca (HHS).

Álvarez E., (2022) reportó la reducción de benzaldehído utilizando extracto acuoso de vaina de chícharo con 96.5% de conversión, este resultado es similar obtenido en este trabajo (95%).

### 7.3 Evaluación de la actividad reductasa de los extractos acuosos liofilizados sobre 4-acetilpiridina (3a)

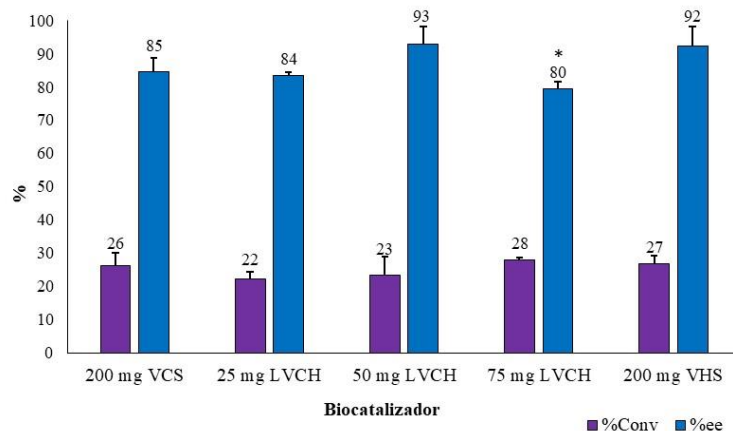
En la **tabla 5** se presentan la cantidad de material fresco y la cantidad de agua utilizado para la preparación del extracto acuoso, la cantidad de liofilizado obtenida de cada extracto acuoso y el porcentaje de pérdida de agua.

**Tabla 5.** Cantidad de liofilizado y pérdida de agua obtenida de diferentes materiales vegetales

Material vegetal	Cantidad de materia fresca (g)	Cantidad agua <sup>a</sup> (ml)	Cantidad de liofilizado (g)	Perdida de agua (%)	
Tallos	Rábano	49.31	50	0.790	96.1
	Zanahoria	48.85	100	0.720	96.3
Vaina	Chícharo	220	220	2.98	98.6

<sup>a</sup> Cantidad de agua utilizada para preparar el extracto acuoso

En la **gráfica 2** se presentan los porcentajes de reducción de 4-acetilpiridina a 4-(1-hidroxietil)piridina y el % de exceso enantiomérico (ee) del alcohol con configuración S, utilizando como fuente de biocatalizador: 200mg de vainas secas de chícharo (VCS) y haba seca (VHS); 25, 50 y 75 mg de liofilizados del extracto acuosos de las vainas de chícharo (LVCH). Los mayores porcentajes de ee se obtuvieron al utilizar 50 mg de LVCH y 200 mg VHS con 93 y 92%, respectivamente. Además, al utilizar 50 mg de LVCH se observa un aumento en el % ee en comparación con 25 y 75 mg de LVCH (84 y 80 %, respectivamente). El mayor porcentaje de conversión fue de 28% con 75 mg de LVCH, sin diferencia estadísticamente significativa con respecto a las fuentes vegetales.



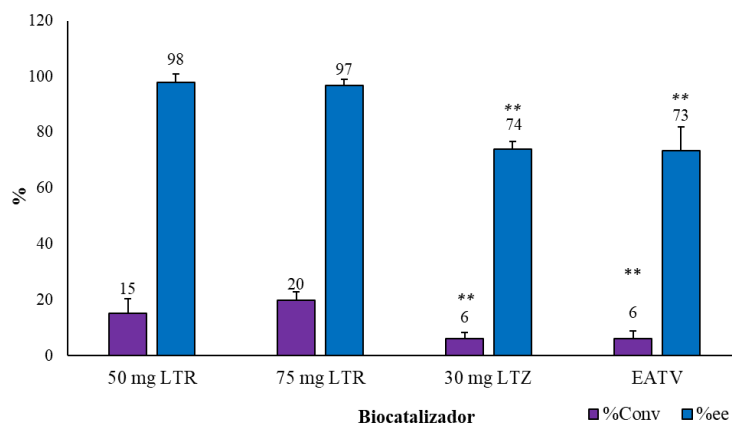
**Gráfica 2.** Porcentaje de reducción de 4-acetilpiridina a (S)-4-(1-hidroxi)etil piridina y porcentaje de exceso enantiomérico (%ee) de alcohol con configuración (S) utilizando liofilizado del extracto acuoso de vaina de chícharo (LVCH), vaina de haba seca (VHS) y vaina de chícharo seca (VCS). \*  $p < 0.05$  diferencia estadísticamente significativa

Hay poca información en la literatura sobre la actividad reductasa de la vaina de chícharo, pero hay varios reportes sobre la semilla, en los cuales se menciona que se obtiene de forma enantioselectiva el alcohol con configuración S (Yadav et al., 2009). Álvarez E., (2022) reportó la reducción 4-acetilpiridina con SA fosfatos 0.15M y pH 8.1, 42°C y como biocatalizador liofilizado de vaina de chícharo en diferentes cantidades (50, 75 y 100 mg), los %Conv fueron 9.9, 19.3 y 19.8 % y 97.7, 94.2 y 77.3 % ee, respectivamente. Al comparar los resultados con esta investigación observamos que al aumentar la cantidad de biocatalizador incrementa el %Conv, sin embargo, disminuye el ee. Además, el utilizar 50 mg de LVCH mejora los %Conv sin afectar el ee, estos resultados concuerdan con lo reportado por Álvarez E. (2022).

En la **gráfica 3** se observa el porcentaje de reducción de 4-acetilpiridina a 4-(1-hidroxi)etil piridina y el ee del alcohol con configuración S, utilizando 50 y 75 mg del liofilizado de tallo de rábano (LTR), 30 mg zanahoria (LTZ) y extracto acuoso de tallo de betabel (EATV). El mayor %Conv (20 %) y ee (97 %) se obtuvo al utilizar 75 mg del LTR. Al aumentar la cantidad del biocatalizador LTR aumento en 5% la conversión y no se ve afectado el ee. Por otro lado, el LTZ y EATV mostraron un bajo porcentaje de conversión del 6% en ambos casos y un ee de 74 y 73%,



respectivamente.



**Gráfica 3.** Porcentaje de reducción de 4-acetilpiridina a (S)-4-(1-hidroxietil) piridina y el % de exceso enantiomérico (%ee) de alcohol con configuración (S) utilizando liofilizado de tallo de rábano (LTR), liofilizado de tallo de zanahoria (LTZ) y extracto acuoso de tallo de betabel (EATV). \*\*  $p < 0.001$  diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto

Está bien documentada la biorreducción del grupo carbonilo mediante sistemas enzimáticos de tallos de zanahoria, rábano y betabel, se ha reportado que se obtiene de forma enantioselectiva el alcohol con configuración S (Javidnia et al., 2016; Majewska & Kozłowska, 2013). Pavoković *et al.* (2017) reportaron la reducción de 1-(3,4-dimetilfenil)etanona en donde utilizaron como biocatalizadores los extractos acuosos de los tallos de zanahoria (*Daucus carota*), rábano (*Raphanus sativus*) y betabel (*Beta vulgaris* L) con rendimientos de 72, 56 y 71% y ee de 96, 70 y 97% del alcohol con configuración S, respectivamente. En contraste nosotros encontramos que al reducir 4-acetilpiridina con LTR, LTZ y EATB se obtuvo un menor %Conv, esto puede deberse a la región de donde se obtienen los materiales vegetales y que el sustrato utilizado tiene una estructura y un entorno químicos diferentes, cabe mencionar que con el LTR se obtuvo el mayor % ee del alcohol (S)-**3b** con 97%.

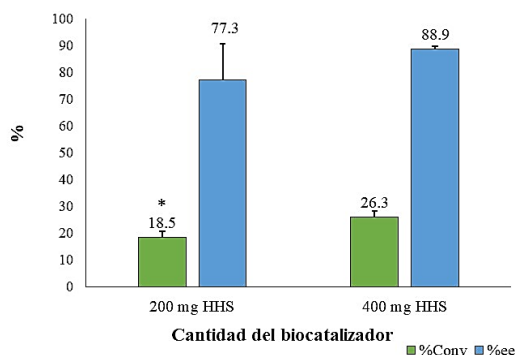
Por otro lado, Rodríguez da costa et al., (2017) reportaron el uso de tallo de zanahoria (*Daucus carota*) para la reducción de 4-bromoacetofenona con un

rendimiento de 34% y un ee del 98% a las 48 horas de reacción, estos resultados son superiores a lo reportado en este trabajo. Las principales diferencias son la región de donde se obtiene el material vegetal y un aumento del tiempo de reacción de más de 24 horas lo que puede incrementar el %Conv.

#### 7.4 Reducción biocatalítica de cetonas (1-5a) con harina de haba seca

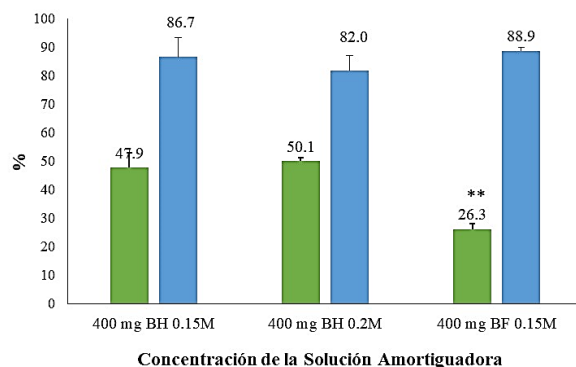
En la **gráfica 4** se muestran los % de conversión de 4-acetilpiridina (**3a**) y el % de exceso enantiomérico del alcohol **S-3b**, utilizando 200 y 400 mg de harina de haba seca como bicatalizador y SA de fosfatos 0.15M a pH 8.1 a las 20 horas de reacción.

Al utilizarse 200 mg y 400 mg de harina de haba seca (HHS) con SA fosfatos se obtuvo 18.5 y 26.3 % de conversión, mientras que el ee fue de 77.3 y 88.9%, respectivamente. El aumentar la cantidad de biocatalizador mejora el porcentaje de conversión y ee, por lo cual en los siguientes experimentos se utilizó 400 mg de HHS.



**Gráfica 4.** Reducción de **3a** al alcohol (**S-3b**) y % ee, utilizando 200 mg y 400 mg HHS en SA de fosfatos 0.15 M, pH 8.1. \*  $p < 0.05$  diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto

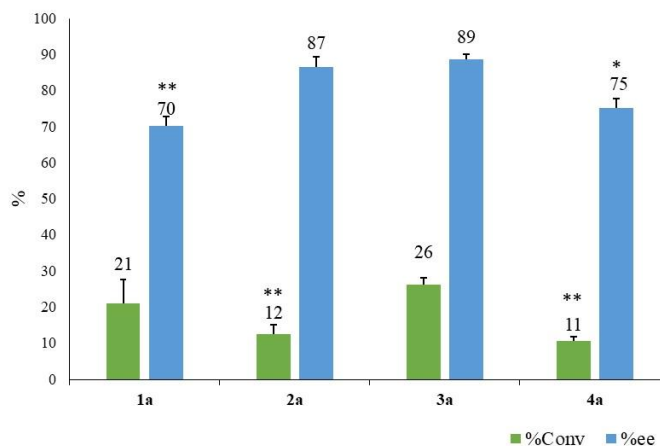
En la **gráfica 5** se muestran los % de conversión de 4-acetilpiridina (**3a**) y el % de exceso enantiomérico (ee) del alcohol **S-3b**, utilizando 400 mg de harina de haba seca como bicatalizador y SA de fosfatos, HEPES 0.15 y 0.20 M a pH 8.1 a las 20 horas de reacción.



**Gráfica 5.** Reducción de **3a** al alcohol (S)-**3b** y % ee, utilizando 400 mg HHS en SA de fosfatos 0.15 M, SA HEPES 0.15 y 0.2M a pH 8.1. \*\*  $p < 0.001$  diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto

El ee no muestra diferencia estadísticamente significativa al utilizar las SA de fosfatos, HEPES 0.15 y 0.2M, con un promedio del 85%ee. Sin embargo, el porcentaje de conversión si presenta una mejora significativa al utiliza SA HEPES 0.15 y 0.2 M con 47.9 y 50.1%, respectivamente. El cambiar la concentración de la SA de 0.15M a 0.2M no presenta una diferencia estadista en la reducción y ee, pero el utilizar la SA HEPES si representa una ventaja en el % conversión respecto a la SA de fosfatos (26.3 %). Reportes previos (Álvarez E., 2022) concuerdan que al utilizar la SA HEPES incrementa el %Conv.

En la **Gráfica 6** se presenta la reducción de las cetonas **1a**, **2a**, **3a**, **4a** con SA fosfatos 0.15M a pH 8.1 y 400mg de HHS. Los mayores %Conv se obtuvieron para la reducción de 2-acetilpiridina (**1a**) y 4-acetilpiridina (**3a**) con 21 y 26%, respectivamente, los más bajos %Conv se obtuvieron en la reducción de 3-acetilpiridina (**2a**) y 2-acetiltiofeno (**4a**) con 12 y 11%, respectivamente. No se observó reducción de **5a** en las condiciones de reacción estudiadas. El mayor ee se obtuvo (S)-**3b** con 89%, para los demás alcoholes el %ee fue de: (S)-**1b** con 70 %, (S)-**2b** con 87 %, (S)-**4b** con 75% ee.

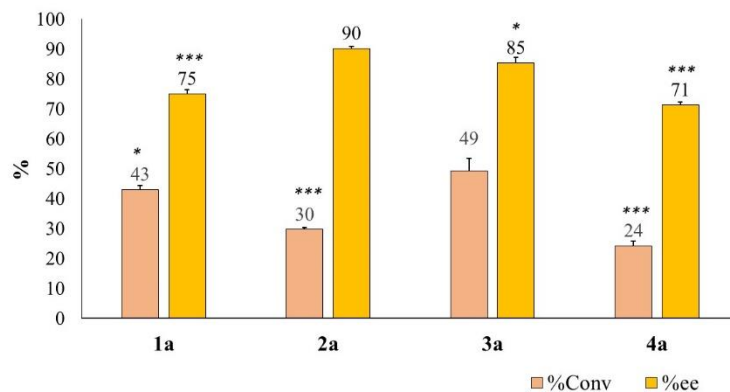


**Gráfica 6.** Reducción de las cetonas **1a**, **2a**, **3a**, **4a** y **5a** a sus correspondientes alcoholes (**1b**, **2b**, **3b**, **4b** y **5b**), utilizando 400 mg de HHS y SA de fosfatos 0.15M. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.001$  diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto

Hasta el momento no hay reportes de la harina de haba como fuente de reductasas, por lo que estos resultados son pioneros en demostrar la actividad reductasa con enantioselectividad al alcohol con configuración *S*. Diversos autores (Pal et al., 2012) han asignado los enantiómeros de los alcoholes **3b** utilizando columnas quirales OB-H y OJ-H, todos coinciden en que el enantiómero *S* tienen el menor  $t_R$  con respecto al enantiómero *R*.

### 7.5 Evaluación de la actividad reductasa de cetonas (1-5a) con el extracto acuoso de harina de haba seca

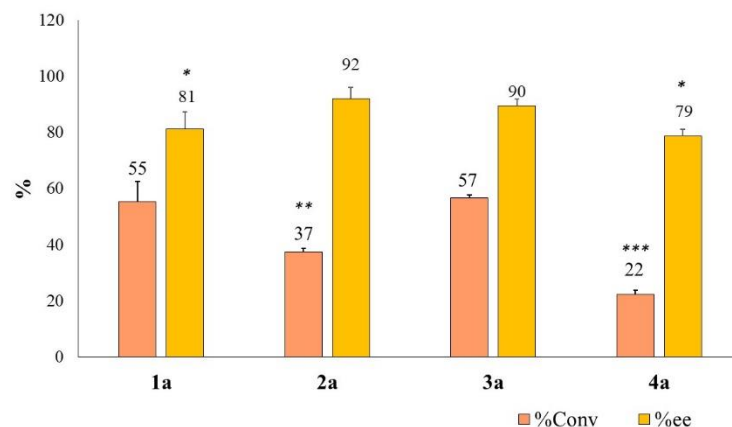
En la **gráfica 7** se muestran los %Conv de 2-acetilpiridina (**1a**), 3-acetilpiridina (**2a**), 4-acetilpiridina (**3a**), 2-acetil-tiofeno (**4a**) y los porcentajes del ee de los alcoholes correspondientes, utilizando extracto acuoso de haba seca como bicatalizador y solución amortiguadora de fosfatos 0.15M a pH 8.1 a las 20 horas. Para 3-acetilpiridina (**2a**) y 4-acetilpiridina (**3a**) se obtuvieron los mayores ee con 90% y 85%, respectivamente, mientras que la reducción fue de 30 y 49%, respectivamente. Para 2-acetilpiridina (**1a**) el % ee fue de 75% y 43% de reducción; mientras que para 2-acetil-tiofeno (**4a**) % ee fue de 71% y 24% de reducción. Sin embargo, para 2-acetil-5-bromotiofeno (**5a**) no hubo reducción.



**Gráfica 7.** Porcentaje de reducción de **1a**, **2a**, **3a**, **4a** al alcohol (**S**)-**1b**, **2b**, **3b** y **4b**, y % ee utilizando extracto acuoso de harina de haba seca en presencia de SA de fosfatos 0.15 M a pH 8.1. \*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$  diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto.

Es importante mencionar que los %Conv de todos los alcoholes son superiores al utilizar el extracto acuoso de harina de haba que al utilizar la harina de haba seca.

En la **gráfica 8** se muestran los %conv de **1a**, **2a**, **3a**, **4a** y el ee de los alcoholes correspondientes, utilizando solución amortiguadora de HEPES al 0.15M y pH 8.1 a las 20 horas. El alcohol (**S**)-**1b** se obtuvo con un 81 % ee y 55 %conv; el alcohol (**S**)-**2b** se obtuvo con 92% ee y 37 %conv; mientras que (**S**)-**3b** se obtuvo con un 90 %ee y 57%conv. La conversión de (**S**)-**4b** fue de 22% y 79 %ee. La reducción de **1a-3a** aumentó >7% al utilizar la SA de HEPES y el ee no se ve afectado.



**Gráfica 8.** Porcentaje de reducción de **1a**, **2a**, **3a**, **4a** a su alcohol correspondiente (**S**)-**1b**, **2b**, **3b** y **4b**, así como porcentaje del exceso enantiómero utilizando extracto acuoso de harina de haba seca en presencia de SA de HEPES 0.15 M a pH 8.1. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*  $p < 0.001$  diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor más alto.

Todos los resultados obtenidos al utilizar el biocatalizador del extracto acuoso de la harina de haba se utilizaron para realizar un análisis estadístico factorial completo, se evaluó la influencia de los factores: 1) las soluciones amortiguadoras (FO y HE) y 2) los diferentes sustratos (**1-4b**) sobre él % Conv y ee, si alguna variable mostró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) se realizó una prueba post hoc HSD Tukey–Kramer.

Al realizar el análisis estadístico factorial se encontró que hay un efecto significativo de las soluciones amortiguadoras, de los diferentes sustratos ( $p < 0.001$ ) y de la interacción de ambos factores ( $p < 0.01$ ), sobre él % conversión, es decir, la solución amortiguadora afecta la actividad reductasa en cada una de las reacciones con los diferentes sustratos.

El efecto principal sobre la reducción esta dado por el tipo de cetona, como era de esperarse la capacidad enzimática depende de la estructura química de la cetona, siendo la 2-acetilpiridina y 4-acetilpiridina las más favorecidas en la conversión al correspondiente (**S**)-alcohol, mientras que el heteroátomo de tiofeno arroja los más bajos % de conversión.

El utilizar la SA de HEPES aumenta significativamente el % de reducción de las cetonas heterocíclicas. El mayor % Conv se obtuvo con SA HEPES para (S)-**1b** y (S)-**3b** (56.6 y 55.3%, respectivamente) y el más bajo % Conv se obtuvo con SA Fosfatos para (S)-**2b**, (S)-**4b** y SA HEPES para (S)-**4b** (29.7, 24.2 y 22.2%, respectivamente). En la **tabla 6** se muestra las medias de la interacción ambos efectos y su comparación de medias por prueba post hoc HSD Tukey–Kramer.

**Tabla 6.** Interacción de los factores: SA y los diferentes alcoholes sobre el % conversión

Factor 1 SA	Factor 2 Alcohol	Conversión (%)
HE	(S)- <b>3b</b>	56.64 <sup>a</sup>
HE	(S)- <b>1b</b>	55.29 <sup>a</sup>
FO	(S)- <b>3b</b>	49.27 <sup>ab</sup>
FO	(S)- <b>1b</b>	43.10 <sup>bc</sup>
HE	(S)- <b>2b</b>	37.39 <sup>cd</sup>
FO	(S)- <b>2b</b>	29.69 <sup>de</sup>
FO	(S)- <b>4b</b>	24.25 <sup>e</sup>
HE	(S)- <b>4b</b>	22.18 <sup>e</sup>

Letras iguales representan igualdad estadística

La reducción de las cetonas dependerá de la estructura correspondiente, además de dos factores: el primero es el impedimento estérico y el segundo factor es debido a la presencia del heteroátomo. Pal *et al.*, 2012 proponen que el nitrógeno del heterociclo puede formar un puente de hidrogeno con residuos de aminoácidos en el sitio activo de la enzima favoreciendo una mejor orientación, en estrecha proximidad con respecto a la fuente de hidruro (NADPH) lo cual permite la liberación selectiva del hidruro desde el cofactor favoreciendo la reacción de reducción de **1a**, y **3a**.

Por otro lado, para el ee hay un efecto significativo de las soluciones amortiguadoras ( $p < 0.001$ ) y de los diferentes sustratos ( $p < 0.0001$ ), sobre el ee, es decir, la estructura de la cetona afecta diferente la enantioselectividad en cada una de las reacciones y se mejora al utilizar la SA HEPES.

Como parte de las perspectivas, se puede evaluar con otros heteroátomos y otros sustituyentes para evaluar de manera más amplia el efecto de la estructura sobre la reducción y ee.

## 8. Conclusiones

Con estos resultados se confirmó la actividad reductasa de la vaina de haba y chícharo, los tallos de rábano, zanahoria y betabel. Estos materiales son desechos vegetales, a los cuales se le puede dar un valor agregado y los vuelve atractivos como biocatalizadores para la reducción de cetonas heterocíclicas.

El aumentar la cantidad del LTR y LVCH aumenta el porcentaje de reducción sin afectar el ee.

La SA HEPES tiene una mejora significativa sobre la reducción sin afectar el %ee. La harina del haba seca es una atractiva fuente de reductasas que favorece la obtención del enantiómero (S) del alcohol con un exceso enantiomérico de hasta 90 % en el caso de **2b** y **3b** y hasta 50% de reducción utilizando SA de HEPES. Además, un aumento en la cantidad del biocatalizador HHS aumenta la reducción y ee.

La fuente de biocatalizador, la cantidad, tipo de sustrato y la solución amortiguadora tienen una influencia importante sobre la reducción de las diferentes cetonas



## 9. BIBLIOGRAFIA

Adams J., Brown M., Diaz-Rodriguez A., Lloyd R., Roiban G., (2019). *Biocatalysis: a pharma perspective. Advanced Synthesis & Catalysis*, *adsc.201900424*–. Doi:10.1002/adsc.201900424

Álvarez E. (2022). Reducción de aldehídos para la obtención de alcoholes utilizando biocatalizadores inmovilizados de origen vegetal. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Antenucci, A., Dughera, S., & Renzi, P. (2021). Green Chemistry Meets Asymmetric Organocatalysis: A Critical Overview on Catalysts Synthesis. *ChemSusChem*. 14(14), 2785–2853.

Basso, A., & Serban., (2019). Industrial applications of immobilized enzymes-A review. *Mol Catal*, 479, 110607.

Bell, E.L., Finnigan, W., France, S.P. et al. (2021). Biocatalysis. *Nat Rev Methods Primers*. 1, 46.

Bhardwaj, K. K., & Gupta, R. (2017). Synthesis of Chirally Pure Enantiomers by Lipase. *J Oleo Sci*. 66(10), 1073–1084.

Calcaterra, A., & D'Acquarica, I. (2018). The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *J Pharm Biomed Anal*. 147, 323–340.

Chánique, A. M., & Parra, L. P. (2018). Protein Engineering for Nicotinamide Coenzyme Specificity in Oxidoreductases: Attempts and Challenges. *Front Microbiol*. 9.

Dong, J., Fernández-Fueyo, E., Hollmann, F., et al. (2018). Biocatalytic Oxidation Reactions: A Chemist's Perspective. *Angew Chem Int Ed*. 57(30), 9238–9261.

Espina G., Atalah J., and Blamey JM (2021) Extremophilic Oxidoreductases for the Industry: Five Successful Examples With Promising Projections. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 9:710035. doi: 10.3389/fbioe.2021.710035

Ferraccioli, R. (2021). Progress on the Stereoselective Synthesis of Chiral Molecules Based on Metal-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution of Alcohols with Lipases. *Symmetry*. 13, 1744.

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.

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

Garzón-Posse, F., Becerra-Figueroa, L., Hernández-Arias, J., & Gamba-Sánchez, D. (2018). Whole Cells as Biocatalysts in Organic Transformations. *Molecules*. 23(6), 1265

Hancu, G., & Modroiu, A. (2022). Chiral Switch: Between Therapeutical Benefit and Marketing Strategy. *Pharmaceuticals*. 15(2), 240.

Javidnia, K., Faghieh-Mirzaei, E., Miri, R., Attaroshan, M., & Zomorodian, K. (2016). Stereoselective Reduction of Prochiral Ketones by Plant and Microbial Biocatalysts. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(1), 73-79.

Kim, J., De Castro, K., Lim M., Rhee H., (2010). Reduction of aromatic and aliphatic keto esters using sodium borohydride/ MeOH at room temperature: a thorough investigation, *Tetrahedron*. 66,3995-4001.

Kuo, C. Shieh, C. (2020). Biocatalytic Process Optimization. *Catalysts*.10, 1303.

Leek, H., & Andersson, S. (2017). Preparative Scale Resolution of Enantiomers Enables Accelerated Drug Discovery and Development. *Molecules*. 22(1), 158.

Majewska, E., & Kozłowska, M. (2013). Regio- and stereoselective reduction of trans-4-phenylbut-3-en-2-one using carrot, celeriac, and beetroot enzyme systems in an organic solvent. *Tetrahedron Letters*, 54(47), 6331-6332. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.09.041>

Melena S. (2016). Resolución de fármacos racémicos: una guía completa. *Métodos analíticos*. 8(42), 7567–7586.

Mokhtari, J., Azarnoosh, S. y Karimian, K. (2017). Resolución de Mezclas Racémicas por Transición de Fase de Agentes de Resolución PEGilados. *ACS Omega*. 2(12), 8717–8722.

Musa M. (2022). Alcohol Dehydrogenases with anti-Prelog Stereopreference in Synthesis of Enantiopure Alcohols. *ChemistryOpen*, 11(4), e202100251. <https://doi.org/10.1002/open.202100251>

Nadar, S., Pawar, R., & Rathod, V, (2017). Recent advances in enzyme extraction strategies : A comprehensive review. *Int J Biol Macromolecules*, 101, 931-957.

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

Okpara M. (2022) Microbial Enzymes and Their Applications in Food Industry: A Mini-Review. *Advances in Enzyme Research*. 10, 23-47.

Oliveira, V. Cardoso, M. Forezi, L. (2018). Organocatalysis: A Brief Overview on Its Evolution and Applications. *Catalysts*. 8, 605.

Ötvös, S. B., & Kappe, C. O. (2021). Continuous flow asymmetric synthesis of chiral active pharmaceutical ingredients and their advanced intermediates. *Green Chem*. 23(17), 6117–6138.

Pal M., Srivastava G., Moon L., Jolly R., (2012). Bioreduction of methyl heteroaryl and aryl heteroaryl ketones in high enantiomeric excess with newly isolated fungal strains, *Bioresource Technology*, 118, 306-314.

Pavoković, D., Buđa, R., Andrašec, F., Roje, M., Bubalo, M. C., & Redovniković, I. R. (2017). Plant-mediated asymmetric reduction of 1-(3,4-dimethylphenyl)ethanone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 28(5), 730-733. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.04.003>

- Penning T. (2017). Aldo-Keto Reductase Regulation by the Nrf2 System: Implications for Stress Response, Chemotherapy Drug Resistance, and Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 30(1), 162–176.
- Qie, F., Guo, J., Tu, B., Zhao, X., Zhang, Y., & Yan, Y. (2018).  $\beta$ -Cyclodextrin Functionalized Nanoporous Graphene Oxides for Efficient Resolution of Asparagine Enantiomers. *Chem Asian J.* 13(19), 2812-2817.
- Qin, F., Qin, B., Mori, T., Wang, Y., Meng, L., Zhang, X., You, S. (2016). Engineering of *Candida glabrata* Ketoreductase 1 for Asymmetric Reduction of  $\alpha$ -Halo Ketones. *ACS Catal.* 6(9), 6135–6140.
- Qiu, S., Xu, S. Y., Li, S. F., Meng, K. M., Cheng, F., Wang, Y. J., & Zheng, Y. G. (2021). Fluorescence-based screening for engineered aldo-keto reductase KmAKR with improved catalytic performance and extended substrate scope. *Biotechnol J.* 16(9), e2100130.
- Rossino, G., Robescu, M. et al. (2022). Biocatalysis: A smart and green tool for the preparation of chiral drugs. *Chirality.* 34(11).
- Salvi, N. Chattopadhyay, S. (2017). Biocatalysis using Rajma - a green process for the synthesis of chiral carbinols. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 9 (2) 92-101.
- Sellés L., Kelly, C. L., Mordaka, P. M., & Heap, J. T. (2018). Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 1866 (2), 327-347.
- Sheldon, R. A., & Brady, D., (2018). The limits to biocatalysis: pushing the envelope. *Chemical communications.* 54(48), 6088–6104.
- Sinibaldi, A. Nori, V.; Baschieri, A. Fini, F.; Arcadi, A. (2019). Organocatalysis and Beyond: Activating Reactions with Two Catalytic Species. *Catalysts.* 9, 928.
- Solís, A., Martínez, R. M., Cervantes, F., Pérez, H. I., Manjarrez, N. & Solís, M. (2019) Reduction of substituted benzaldehydes, acetophenone and 2-acetylpyridine using bean seeds as crude reductase enzymes. *Biocatal Biotransform.* 37:2, 152-157.

- 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.
- Soy, S., Prabha, R., & Nigam, V. K. (2020). Potential of Biocatalysis in Pharmaceuticals. In (Ed.), *Molecular Biotechnology*. IntechOpen.
- Suárez-Franco, G.; Hernández-Quiroz, T.; Navarro-Ocaña, A.; Oliart-Ros, R. M.; Valerio-Alfaro, G. (2010). Plants as a Green Alternative for Alcohol Preparation from Aromatic Aldehydes. *Biotechnol. Bioprocess Eng*, 15 (3), 441–445. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0207-8>.
- Truppo M. D. (2017). Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. *ACS medicinal chemistry letters*, 8(5), 476–480.
- Vandenberghe A., Markó I., Lucaccioni F., Lutts S., (2013). *Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables*, *Industrial Crops and Products*, 42, 380-385.
- Varjosaar, S. (2018). Reduction of ketones to alcohols and tertiary amines using 1-hydrosilatrane. *Graduate Research Theses & Dissertations*. 4664.
- Vogel, P. Lam, Y.-h. Simon, A.; Houk, K. (2016) Organocatalysis: Fundamentals and Comparisons to Metal and Enzyme Catalysis. *Catalysts*. 6, 128.
- Wachtmeister, J., & Rother, D. (2016). Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. *Curr Opin Biotechnol*. 42, 169–177.
- Wang J-W, Li Y, Nie W, Chang Z, Yu Z-A, et al. (2021) Catalytic asymmetric reductive hydroalkylation of enamides and enecarbamates to chiral aliphatic amines. *Nature Communications*. 12, 1–10.
- Wang, N., Luo, Z., Li, K., Xu, Y., & Peng, C. (2020). Identification of a newly isolated *Sphingomonas* sp. LZ1 and its application to biosynthesize chiral alcohols. *J Gen Appl Microbiol*. 66(5), 289–296.

Wojaczyńska Eb, Wojaczyński J (2020) Modern stereoselective synthesis of chiral sulfinyl compounds. *Chemical Reviews*. 120, 4578–4611.

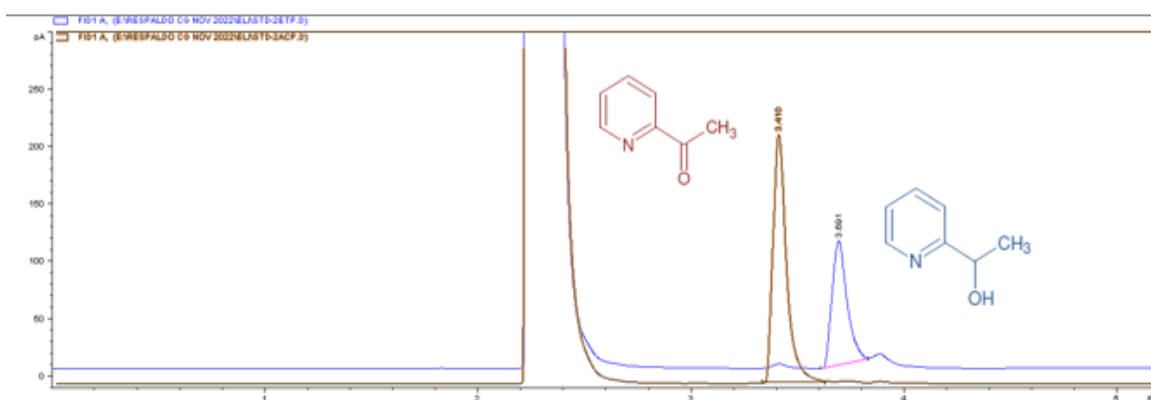
Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J. C., Baldenius, K., & Bornscheuer, U. (2020). Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angewandte Chemie International Edition*. 60, 88-119

Xiang, S.-H., & Tan, B. (2020). Advances in asymmetric organocatalysis over the last 10 years. *Nature Communications*, 11(1).

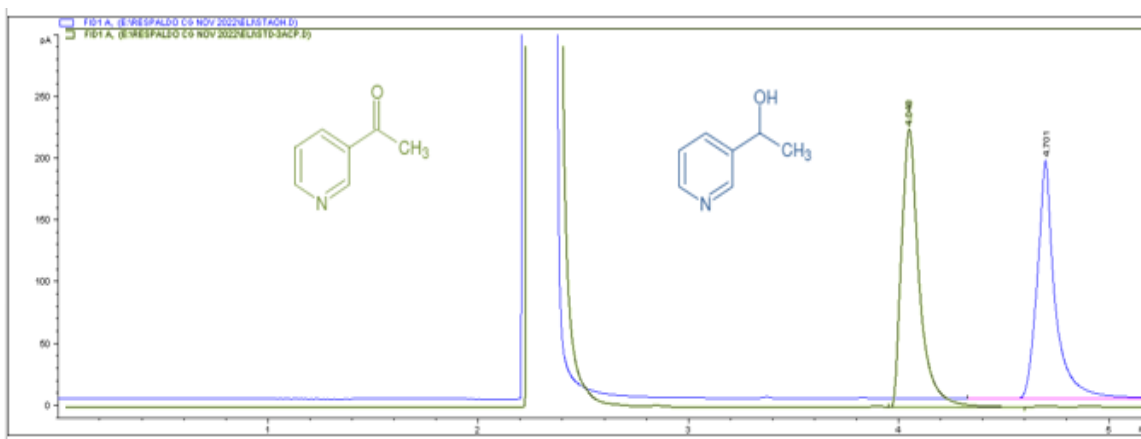
Xu G., Yu H., Zhang X., Xu J., (2012). Access to optically active aryl halohydrins using a substrate-tolerant carbonyl reductase discovered from *Kluyveromyces thermotolerans*. *ACS Catalysis*, 2, 2566-2571

## 10. Anexos

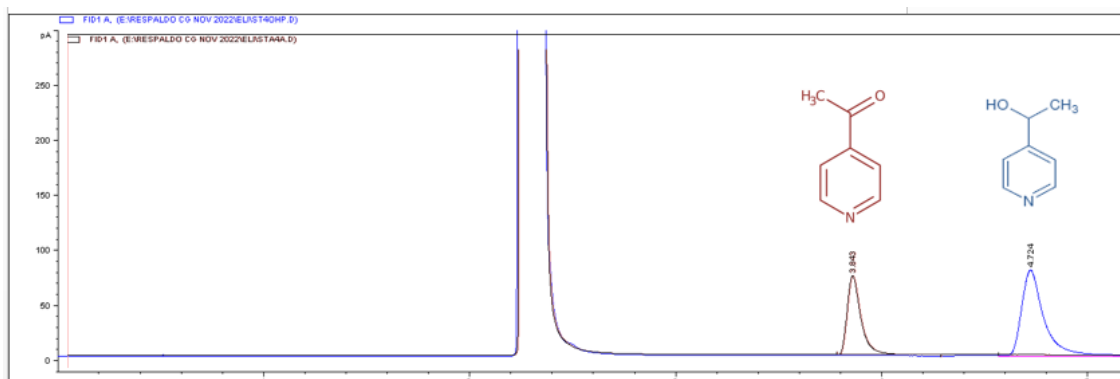
### Anexo 1. Cromatogramas obtenidos por CG



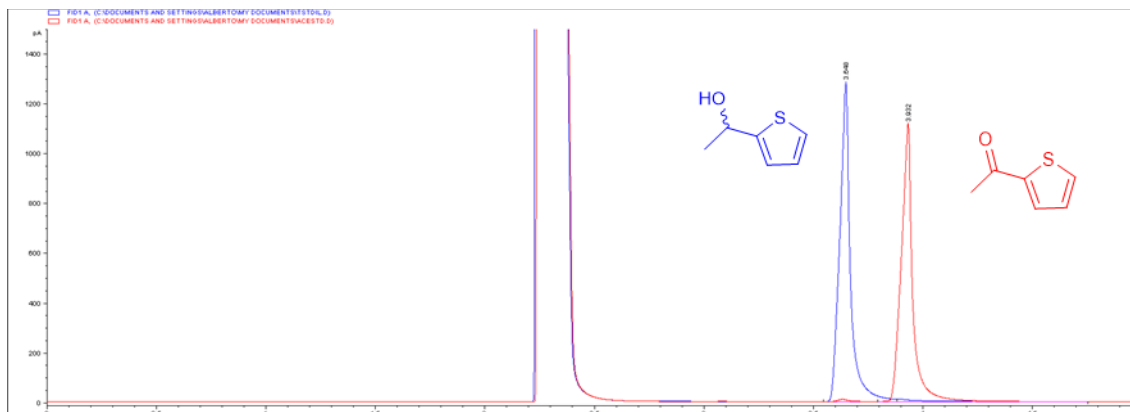
**Figura A1-1.** Cromatograma obtenido por CG del estándar de 2-acetilpiridina (**1a**) y su respectivo alcohol 1-(2-piridil)-etanol (**1b**). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 3.4 min para **1a** y 3.7 para **1b**



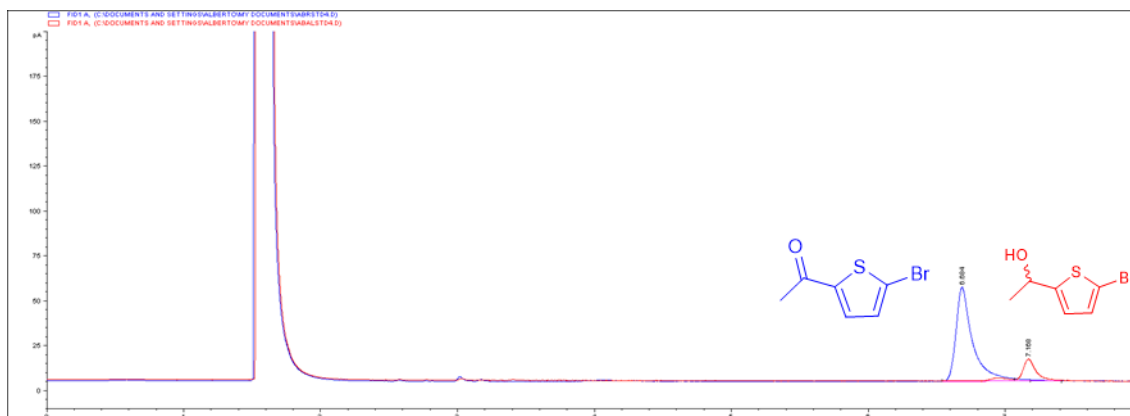
**Figura A1-2.** Cromatograma obtenido por CG del estándar de 3-acetilpiridina (**2a**) y su respectivo alcohol 1-(3-piridil)-etanol (**2b**). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 4.0 min para **2a** y 4.7 para **2b**



**Figura A1-3.** Cromatograma obtenido por CG del estándar de 4-acetilpiridina (**3a**) y su respectivo alcohol 1-(4-piridil)-etanol (**3b**). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 3.8 min para **3a** y 4.7 para **3b**



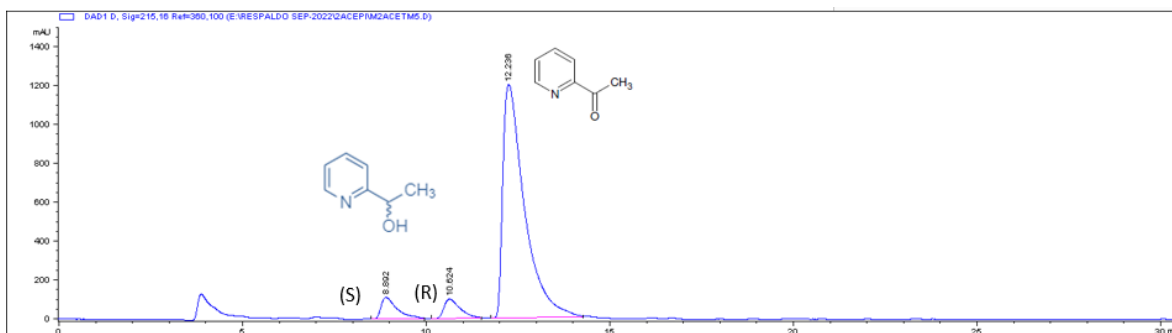
**Figura A1-4.** Cromatograma obtenido por CG del estándar de 2-acetiltiofeno (**4a**) y su respectivo alcohol 2-(1-hidroxiethyl)tiofeno (**4b**). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 3.9 min para **4a** y 3.6 para **4b**



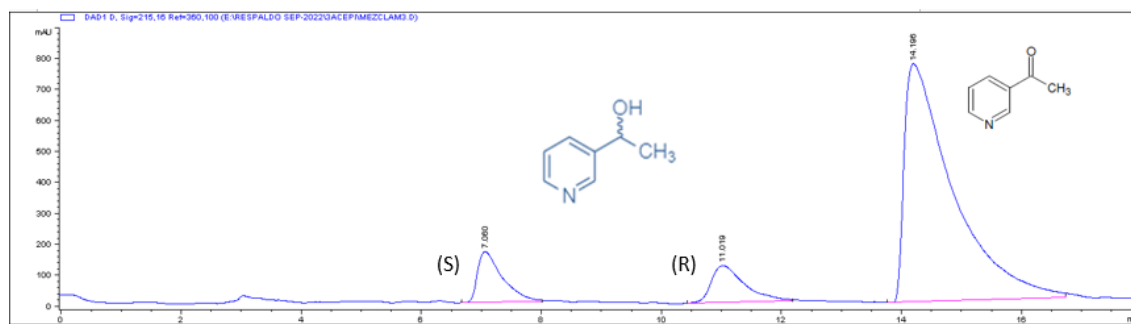
**Figura A1-5.** Cromatograma obtenido por CG del estándar de 2-acetilbromotiofeno (**5a**) y su respectivo alcohol 2-(5-bromo-1-hidroxiethyl)tiofeno (**5b**). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 6.7 min para **5a** y 7.1 para **5b**



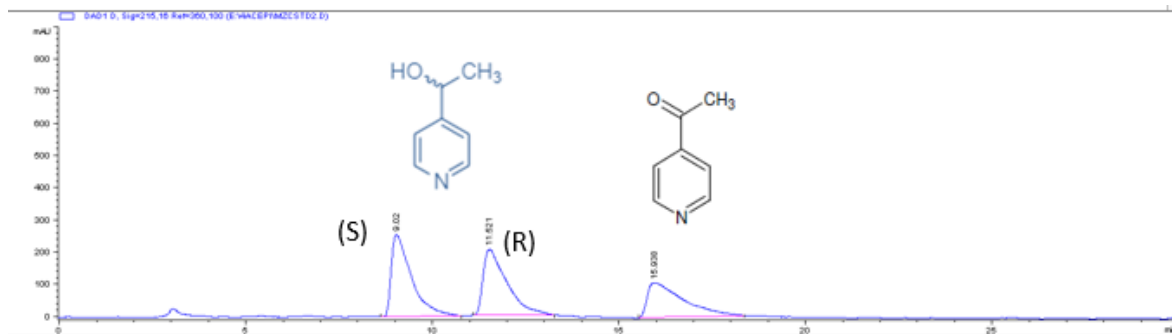
## Anexo 2. Cromatogramas obtenidos por CLAR



**Figura A2-1.** Cromatograma obtenido por HPLC de la mezcla de estándares de 2-acetilpiridina (**1a**) y su respectivo alcohol 1-(2-piridil)-etanol (**1b**). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 12.2 min para **1a**, 8.9 min para (S)-**1b** y 10.6 para (R)-**1b**

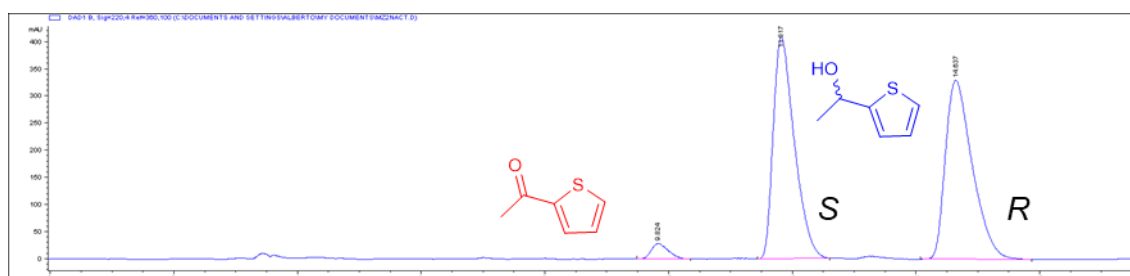


**Figura A2-2.** Cromatograma obtenido por HPLC de la mezcla de estándares de 3-acetilpiridina (**2a**) y su respectivo alcohol 1-(3-piridil)-etanol (**2b**). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 14.2 min para **2a**, 7.1 min para (S)-**2b** y 11.0 para (R)-**2b**



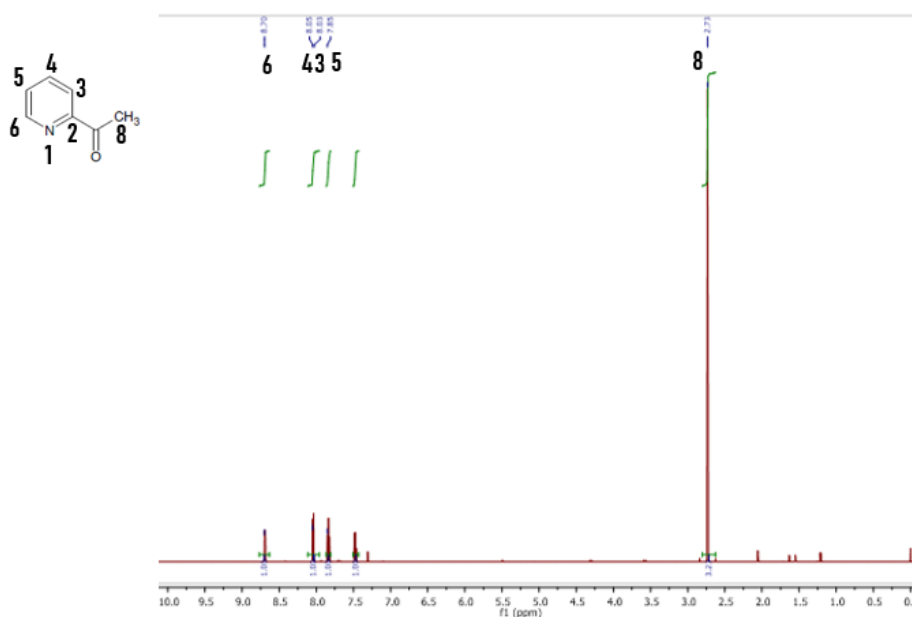
**Figura A2-3.** Cromatograma obtenido por HPLC de la mezcla de estándares de 4-acetilpiridina (**3a**) y su respectivo alcohol 1-(4-piridil)-etanol (**3b**). Los tiempos de

retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 15.9 min para **3a**, 9.0 min para (*S*)-**3b** y 11.5 para (*R*)-**3b**



**Figura A2-4.** Cromatograma obtenido por HPLC de la mezcla de estándares de 2-acetiltiofeno (**4b**) y su respectivo alcohol 2-(1-hidroxiethyl)tiofeno (**4b**). Los tiempos de retención de los diferentes compuestos en la mezcla fueron: 9.8 min para **4a**, 11.8 min para (*S*)-**4b** y 14.6 para (*R*)-**4b**

### Anexo 3. Espectros de Resonancia Magnética nuclear de $^1\text{H}$



**Figura A3-1.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) de 2-acetilpiridina (**1a**)

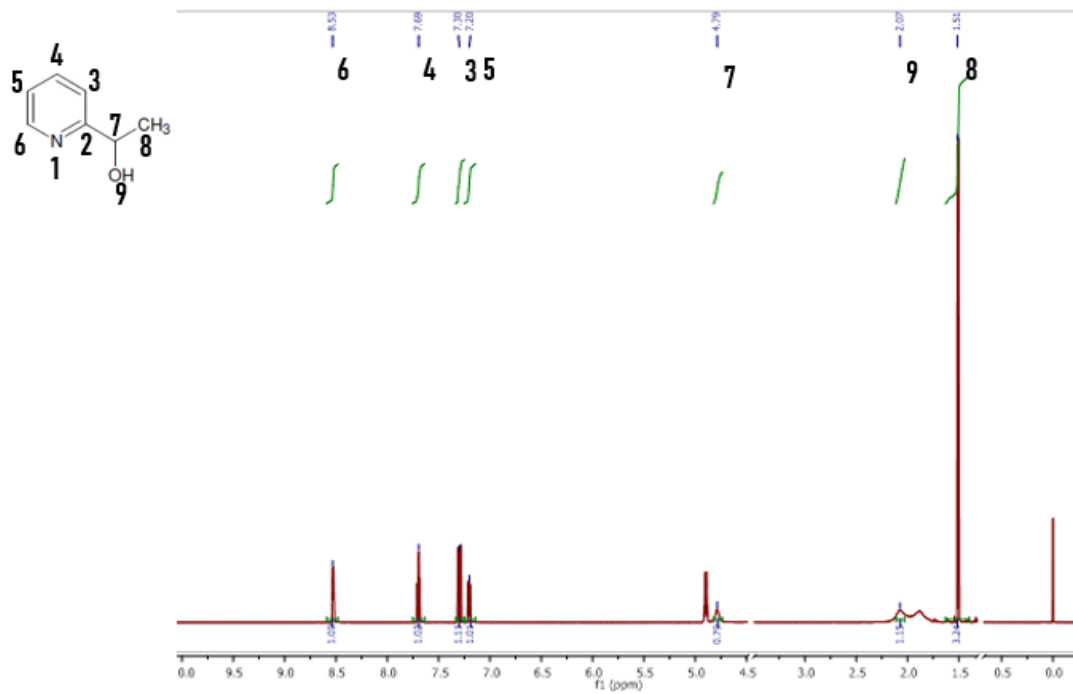


Figura A3-2. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) de 1-(2-piridil)-etanol (1b)

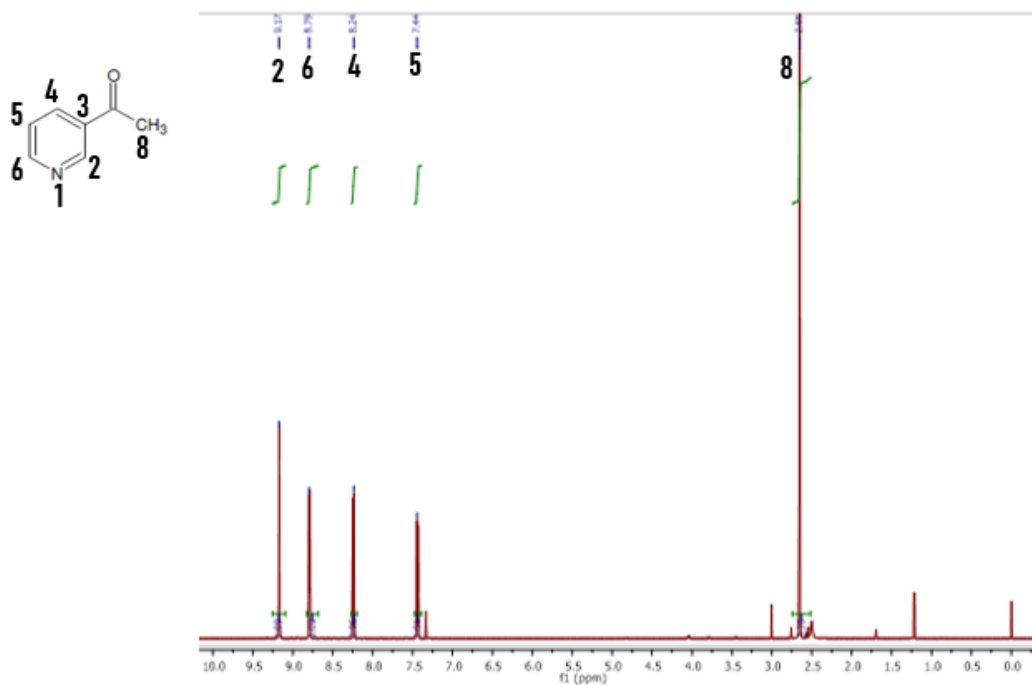


Figura A3-3. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) de 3-acetilpiridina (2a)

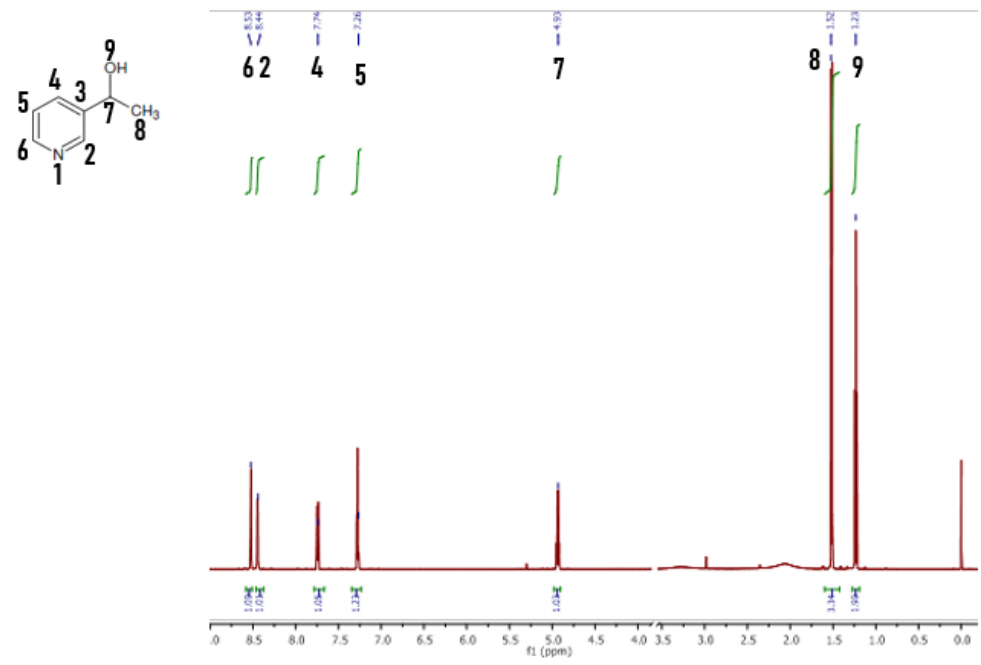


Figura A3-4. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) de 1-(3-piridil)-etanol (2b)

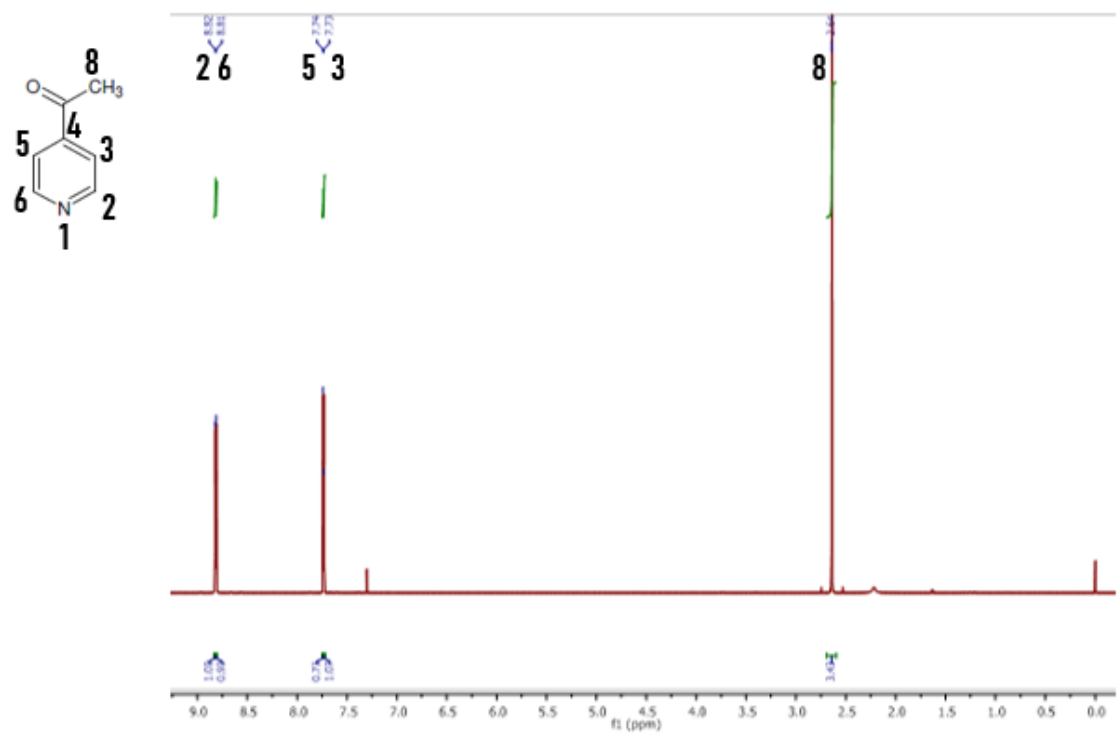


Figura A3-5. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) de 4-acetilpiridina (3a)

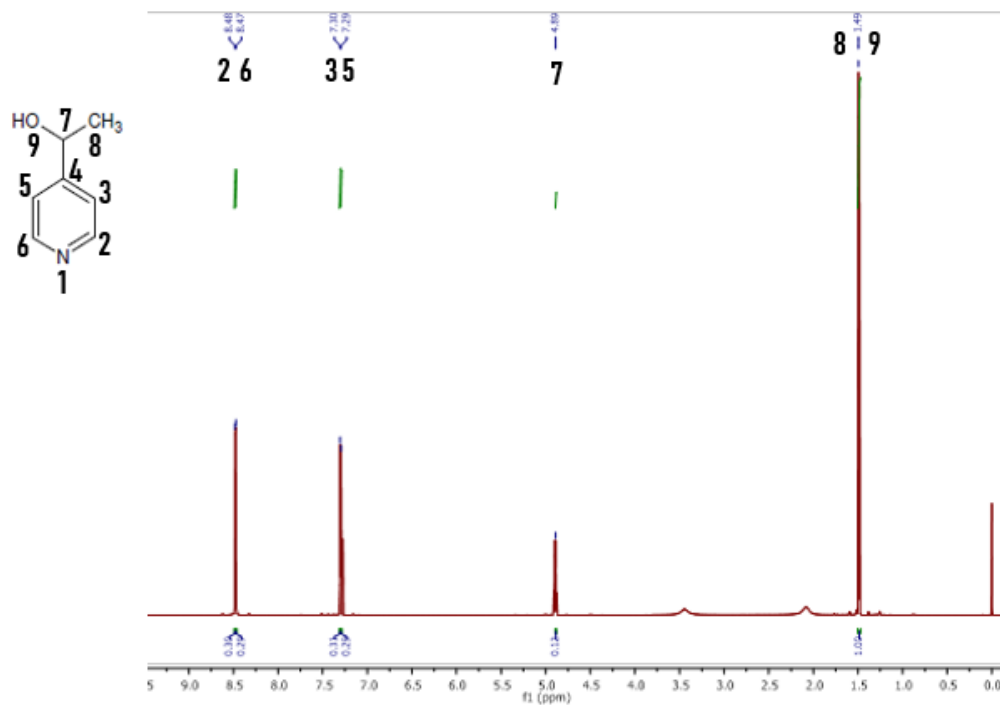



Figura A3-6. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) de 1-(4-piridil)-etanol (3b)

## Anexo 4. Trabajos presentados en congresos



Avances de las  
**MUJERES EN LAS CIENCIAS**  
las humanidades y todas las disciplinas

Jesús Ariel Santana Martínez<sup>1</sup>, R. Marlen Martínez Casares<sup>2\*</sup>,  
Liliana Hernández Vázquez<sup>3</sup>, Ernesto Sánchez Mendoza<sup>4</sup>.

<sup>1,2,3,4</sup>Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud,  
Universidad Autónoma Metropolitana  
\*rmartinez@correo.xoc.uam.mx

### Obtención de alcoholes enantiopuros utilizando haba (*Vicia faba*) como fuente de biocatalizador

**Resumen**

Se evaluó la reducción de 2-acetilpiridina (**1a**), 3-acetilpiridina (**2a**), 4-acetilpiridina (**3a**), 2-acetilfenol (**4a**) y 2-acetil-5-bromotifenol (**5a**) a los alcoholes correspondientes (**1b**, **2b**, **3b**, **4b** y **5a**), utilizando como fuente de biocatalizador el extracto acuoso de harina de semilla de haba en soluciones amortiguadoras (SA) de fosfatos y HEPES. La reducción de **1a-3a** aumentó >8% al utilizar la SA de HEPES. El alcohol (**5-1b**) en HEPES se obtuvo con un 81.2% de exceso enantiomérico (%ee) y 55.3% de conversión (%conv); el alcohol (**5-2b**) se obtuvo con 92.0 %ee y 32.4 %conv; se obtuvo (**5-3b**) con un 89.5 %ee y 56.6 %conv. La conversión de (**5-4b**) fue de 22% y 75 %ee, sin diferencia estadísticamente significativa entre el uso de SA de fosfatos y HEPES.

**Palabra clave**


Biocatálisis, alcoholes quirales, haba, reducción.

**Introducción**

La reducción de cetonas proquirales es un método eficaz para obtener alcoholes ópticamente puros, intermediarios importantes de productos farmacéuticos, químicos y agroquímicos. El objetivo de esta investigación fue la reducción de cetonas para la obtención de su correspondiente alcohol, utilizando reductasas de origen vegetal.

**Metodología**

1. Obtención del extracto acuoso de haba con actividad reductasa

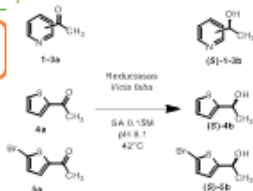


**Harina**  
Las semillas de haba secas se pulverizan


Material vegetal fresco  
Obtención del extracto acuoso

El % de Conversión se determinó por CG y el % de exceso enantiomérico (%ee) se determinó por HPLC quiral.

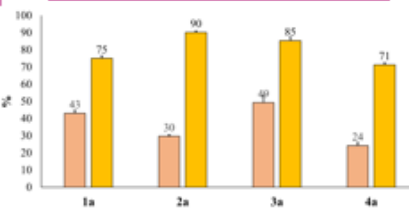
2. Evaluación de la actividad reductasa



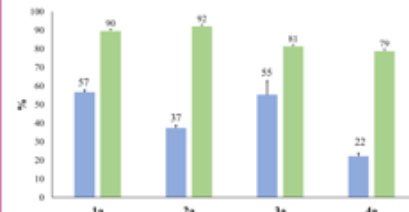
Reducción  
*Vicia faba*



**Resultados**



Substrato	%Conv	%ee
1a	43	75
2a	30	90
3a	49	85
4a	24	71



Substrato	%Conv	%ee
1a	57	90
2a	37	92
3a	55	89
4a	22	79

**Conclusiones**

El extracto acuoso de harina de haba seca demostró tener actividad reductasa. Se observó un aumento en la reducción de **1a-3a** al utilizar la SA de HEPES en comparación al buffer de fosfatos. No se observó reducción de **5a** en las condiciones estudiadas.

**Referencias**

- Órvos, S. B., & Kappe, C. O. (2021). *Green Chem.* 23(17), 6117–6138.
- Rossino, G., Robescu, M. et al. (2022). *Chirality.* 34(11).
- Wang, N., Luo, Z., Li, K., Xu, Y., & Peng, C. (2020). *J Gen Appl Microbiol.* 66(5), 289–296.





## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

El comité multidisciplinario y organizador otorgan la presente

### CONSTANCIA

a:

**Jesús Ariel Santana Martínez**

Por su participación como **ponente** con el tema:

Obtención de alcoholes enantiopuros utilizando Haba  
(Vicia faba) como fuente de biocatalizador

En el "VIII Congreso de Avances de las Mujeres en las Ciencias, las Humanidades y todas las disciplinas" Cambio Climático, Educación y Desarrollo Científico. Celebrado en la Ciudad de México los días 23, 24 y 25 de agosto del 2023. En la Universidad Autónoma Metropolitana Metropolitana, Unidad Xochimilco.



Mtra. Gabriela del Valle Díaz Muñoz  
Coordinadora General



Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde  
Comité multidisciplinario y organizador

Jesús Ariel Santana Martínez<sup>1</sup>, R. Marlen Martínez Casares<sup>2\*</sup>,  
Liliana Hernández Vázquez<sup>3</sup>, Ernesto Sánchez Mendoza<sup>4</sup>.

<sup>1,2,3,4</sup>Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud,  
Universidad Autónoma Metropolitana  
\*rmartinez@correo.xoc.uam.mx

## Reducción de 4-Acetilpiridina a 4-(1-hidroxi)piridina utilizando desechos vegetales como biocatalizadores

### Resumen

Se evaluó la reducción de 4-acetilpiridina y el % de exceso enantiomérico (ee) de la 4-(1-hidroxi)piridina obtenida, utilizando los extractos acuosos liofilizados de vaina de chicharo (LVCH), tallo de rábano (LTR) y de zanahoria (LTZ), vaina seca de chicharo (VCS), vaina seca de haba (VHS) y el extracto acuoso de tallo de betabel como fuente de aldooacetoreductasa. Los mayores ee fueron 92, 93 y 98 % con VHS, LVCH y LTR, respectivamente y los % de reducción fueron de 27, 23 y 15 %, respectivamente.

### Palabra clave

Biocatálisis, 4-(1-hidroxi)piridina, 4-acetilpiridina, desechos vegetales.

### Introducción

La reducción de cetonas es una herramienta importante en química orgánica para obtener alcoholes quirales, empleados en la síntesis de cosméticos, productos farmacéuticos y agroquímicos.<sup>1</sup> La reducción química garantiza altos rendimientos, pero los metales residuales son difíciles de disponer. Los biocatalizadores de origen vegetal son una alternativa atractiva a los catalizadores metálicos, además son baratos y fáciles de conseguir.<sup>2</sup> Las aldooacetoreductasas catalizan la reducción de aldehído o cetona al alcohol correspondiente.<sup>2</sup>

### Metodología

#### 1. Obtención del material vegetal con actividad reductasa

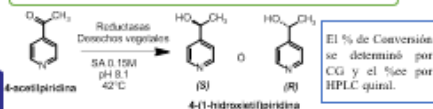


**Material vegetal fresco**  
Preparación de extracto acuoso en solución amortiguadora de fosfatos

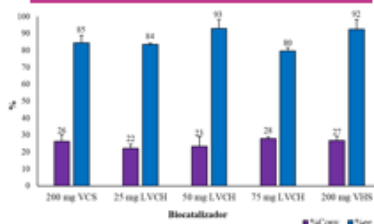


**Liofilización del extracto acuoso**  
El extracto acuoso se congeló a -75°C, luego se liofilizó

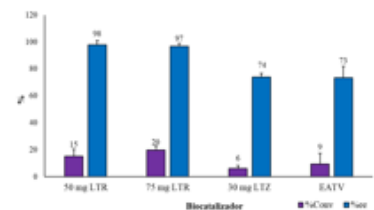
#### 2. Evaluación de la actividad reductasa



### Resultados



**Grafica 1.** % de conversión y %ee de 4-(1-hidroxi)piridina, utilizando diferentes biocatalizadores, SA de fosfatos 0.15 M a pH 8.1. VCS= Vaina de chicharo seca, LVCH=Extracto acuoso liofilizado de vaina de chicharo, VHS = Vaina de haba seca.



**Grafica 2.** % de conversión y %ee de 4-(1-hidroxi)piridina, utilizando diferentes biocatalizadores, SA de fosfatos 0.15 M a pH 8.1. Extractos acuosos liofilizados de: LTR= tallo de rábano, LTZ= tallo zanahoria, EATB= tallo de betabel

### Conclusiones

El tallo de rábano, las vainas de haba y chicharo son fuentes enantioselectivas de aldooacetoreductasas. Al aumentar la cantidad de biocatalizador incrementó el % de reducción. Los desechos vegetales son fuentes de enzimas a los que se les da un valor agregado.

### Referencias

- Wu, S., Srajčeva, R., Moore, J. C., Bédélec, K., & Bornscheuer U. (2020). *Angewandte Chemie International Edition*, 59, 88-110.
- Sola, O. A., Martínez, R. M., Cervantes, F., Pérez, H. I. & Solís-Delgado (2017). *Acta Universitaria*, 27(4), 53-58.



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

El comité multidisciplinario y organizador otorgan la presente

### CONSTANCIA

a:

**Jesús Ariel Santana Martínez**

Por su participación como **ponente** con el tema:

Reducción de 4-acetilpiridina a 4-(1-hidroxietil)  
piridina utilizando desechos vegetales como biocatalizadores

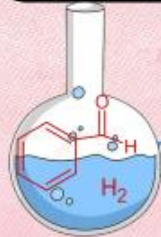
En el "VIII Congreso de Avances de las Mujeres en las Ciencias, las Humanidades y todas las disciplinas" Cambio Climático, Educación y Desarrollo Científico.  
Celebrado en la Ciudad de México los días 23, 24 y 25 de agosto del 2023.  
En la Universidad Autónoma Metropolitana Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Mtra. Gabriela del Valle Díaz Muñoz  
Coordinadora General

Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde  
Comité multidisciplinario y organizador

## Las plantas como catalizadores eco-amigables en síntesis química.

Jesús Ariel Santana Martínez, Evelyn Fuentes Moreno, Aida Solís Oba, Rubría  
 Marlen Martínez Casares. Universidad Autónoma Metropolitana



Sin enzimas

No hay reacción

El uso de enzimas favorece  
 la reacción química.

De las distintas partes de las plantas  
 pueden preparar extractos acuosos.



Extracto acuoso



Oxidorreductasas

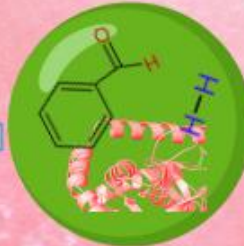
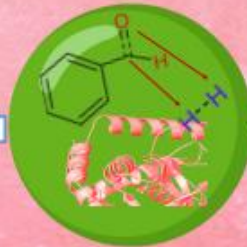
¿Qué sucede a nivel molecular?

Las oxidorreductasas se emplean para  
 reducir aldehidos al correspondiente  
 alcohol.

Reducción de  
 benzaldehido



Alcohol bencílico





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**

Maestría y Doctorado en Ciencias Farmacéuticas

Otorgan el presente

**RECONOCIMIENTO**

A Jesús Ariel Santana Martínez, Aida Solís Oba, Rubria Marlen Martínez Casares,  
Evelyn Fuentes Moreno

Por haber presentado la INFOGRAFÍA titulada:  
Las plantas como catalizadores eco-amigables en síntesis química

En el evento

**PRIMERA SEMANA CON-CIENCIA EN LA UAM-XOCHIMILCO**

Llevado a cabo los días 16,17 y 18 de agosto  
Ciudad de México, 18 de agosto de 2023



  
**DR. MARTÍN GÓMEZ HERNÁNDEZ**  
Coordinador de la Maestría y Doctorado  
en Ciencias Farmacéuticas

  
**DR. LUIS A. AYALA PÉREZ**  
Director de la División de Ciencias  
Biológicas y de la Salud

  
**DRA. BEATRÍZ GODÍNEZ CHAPARRO**  
Presidente del comité Organizador