



**Casa abierta al tiempo**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

**Nombre del proyecto**

Reducción biocatalítica de aldehídos para la obtención de alcoholes

**Alumna.**

Olga Jazmin Morales Alcantar.

Matrícula. 2183030035

**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: 14 de febrero 2022 - 12 de diciembre 2022

## Índice

1.	Introducción.....	4
2.	Marco teórico.....	6
2.1	Biocatalizadores .....	6
2.2	Oxidorreductasas.....	8
2.3	Mecanismo de reacción de la reducción utilizando oxidorreductasas.....	8
2.4	Factores que favorecen la reducción biocatalítica .....	9
2.4.1	Temperatura.....	9
2.4.2	pH.....	9
2.4.3	Concentración enzima-sustrato.....	10
2.5	Inmovilización de enzimas .....	10
2.6	Obtención de Alcoholes.....	11
2.6.1.1	Métodos químicos .....	12
2.7	Obtención de alcoholes ópticamente activos.....	12
2.7.1	Resolución química.....	13
2.7.2	Síntesis asimétrica .....	13
2.7.2.1	Biocatálisis.....	14
3	Planteamiento del problema .....	16
4	Hipótesis .....	17
5	Objetivo general.....	17
5.1	Objetivos específicos .....	17
6	Materiales y métodos.....	18
6.1	Materiales .....	18
6.2	Obtención de los extractos enzimáticos con actividad reductasa .....	18
6.3	Liofilización de los extractos enzimáticos.....	19
6.4	Inmovilización de los extractos enzimáticos.....	19
6.5	Evaluación de la actividad reductasa .....	19
6.6	Influencia del tipo de solución amortiguadora.....	20
6.7	Reducción química de cetonas con borohidruro de sodio en solución.....	20
6.8	Evaluación de la reducción biocatalítica de cetonas .....	21
6.9	Métodos analíticos.....	21
6.9.1	Cromatografía en Capa Fina (CCF) .....	21
6.9.2	Análisis del porcentaje de conversión por cromatografía de gases (CG) .....	21

6.9.3	Análisis del exceso enantiomérico (ee) por cromatografía de líquidos de alta resolución quirál (CLAR) .....	22
6.10	Análisis Estadístico de los datos.....	23
7	Resultados y discusión .....	24
7.1	Evaluación del medio de reacción en la actividad reductasa utilizando benzaldehído.....	24
7.2	Evaluación del tiempo de reacción en la actividad reductasa.....	24
7.3	Evaluación de los medios de reacción con respecto a las diferentes variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	25
7.4	Evaluación de la actividad reductasa de los extractos acuosos liofilizados e inmovilizados.....	26
7.5	Reducción química de 2-acetilpiridna, 3-acetilpiridina y 4-acetilpiridina.....	29
7.6	Reducción biocatalítica de 2-acetilpiridna, 3-acetilpiridina y 4-acetilpiridina con extractos acuosos de frijol.....	30
7.7	Reducción biocatalítica de 4-acetilpiridina con extractos acuosos liofilizados e inmovilizados.....	34
8	Conclusión .....	36
9	Bibliografía.....	377
10	Anexos. ....	40
10.1.1	Anexo 1. Cromatogramas obtenidos por CG.....	40
10.1.2	Anexo 2. Cromatogramas obtenidos por CLAR .....	42
10.1.3	Anexo 3. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H. ....	45
10.1.4	Anexo 4. Trabajos presentados en congresos .....	48

## 1. Introducción

En las últimas décadas, la biocatálisis se ha integrado a la síntesis orgánica, especialmente en la industria farmacéutica, esto puede atribuirse en gran medida a sus numerosas ventajas medioambientales y económicas. Los biocatalizadores son enzimas que proceden de recursos renovables, son baratos, fáciles de utilizar (Sheldon, 2016) y se degradan sin generar productos tóxicos para el ambiente, además los biocatalizadores pueden ser reutilizados cuando se encuentran inmovilizados (Solís et al, 2018). Los biocatalizadores se han obtenido de diferentes fuentes: microorganismos, animales y plantas, se han utilizado como enzimas purificadas, inmovilizadas y extractos crudos.

Las reacciones biocatalizadas presentan ventajas sobre la síntesis química tradicional como son: la regio-, quimio- y estereoselectividad, (Luna H; 2004) disminuyen la formación de subproductos y residuos (Solís et al, 2019), las reacciones enzimáticas se llevan a cabo en condiciones suaves (temperatura y presión ambientales), en estas reacciones es muy importante considerar el pH en el cual las enzimas mantienen su actividad catalítica, las enzimas funcionan de forma óptima en el agua (Abdelraheem, et al; 2019).

Entre los biocatalizadores encontramos a las oxidoreductasas, que catalizan la biotransformación del grupo carbonilo de aldehído o cetona a los alcoholes correspondientes y viceversa, se pueden encontrar clasificados como deshidrogenasas dependientes de nicotinamida (E.C. 1.1.1), específicamente como aldocetoreductasas, son enzimas dependientes del cofactor de nicotinamida [nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)] que juega el papel de aceptor o donador de electrones (Luna H, 2004). Las aldocetoreductasas son enzimas robustas y eficientes para la reducción de aldehídos y cetonas.

La reducción de aldehídos y cetonas constituye una herramienta importante en química orgánica para la preparación de alcoholes, que se puede utilizar en la síntesis de cosméticos, productos farmacéuticos y agroquímicos. Actualmente existe disponibles una amplia gama de sistemas de reducción, sin embargo, la

mayoría de estas reacciones utilizan metales pesados y agentes reductores de hidruro, disolventes orgánicos como medio de reacción, lo que implica daño al medio ambiente (Solís et al, 2019).

El utilizar biocatalizadores como las oxidorreductasas presentes en diversas fuentes vegetales es una alternativa a la química orgánica tradicional para la obtención de alcoholes ópticamente puros, los cuales han incrementado su demanda en la última década y son empleados como productos intermedios tanto en industria química como farmacéutica (Chen, B. & Zeferino, F; 2019).

Se ha demostrado que los extractos de plantas son biocatalizadores útiles para la reducción específica de aldehídos y cetonas a los correspondientes alcoholes, por ejemplo, el uso de frijol ha demostrado tener actividad reductasa, sin embargo, no hay reportes de metodologías de inmovilización para extractos acuosos de frijol (*Phaseolus vulgaris*), ni de su actividad reductasa.

La inmovilización consiste en mantener la enzima (biocatalizador) unida o atrapada en un soporte físico, conservando su actividad catalítica y permitiendo el flujo de sustratos y productos (Sengupta, 2015). Existen 2 tipos de inmovilización: métodos irreversibles (unión por enlaces covalentes o iónicos, entrecruzamiento) y reversibles (adsorción física).

El uso de enzimas inmovilizadas es ahora un proceso de rutina para la fabricación de muchos productos industriales en la industria farmacéutica, química y alimentaria (Basso A. & Serban S., 2019). Por lo anterior, en esta investigación se llevará a cabo la reducción biocatalítica de aldehídos y cetonas, utilizando oxidorreductasas de frijol como fuente de enzima.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Biocatalizadores

Muchas de las reacciones químicas presentes en la naturaleza requieren de catalizadores. Por definición, los catalizadores son moléculas que aumentan la velocidad de una reacción, mediante la disminución de la barrera energética de dicha reacción, los catalizadores que actúan específicamente en reacciones bioquímicas, es decir en reacciones que intervienen en el metabolismo de seres vivos, se conocen como enzimas o biocatalizadores, las enzimas son proteínas de elevado peso molecular y altamente específicas.

En los organismos vivos, las enzimas intervienen en reacciones metabólicas de forma óptima, para luego ser liberadas sin alteración funcional, esto permite que la enzima pueda emplearse en reacciones sucesivas, lo que las hace uno de los catalizadores más eficientes y competentes, ofreciendo procesos mucho más competitivos en comparación con los catalizadores químicos (Choi, Jung-Min, Sang-Soo&Hak-Sung; 2015).

Desde los inicios de la enzimología aplicada existen amplias controversias sobre si las enzimas aisladas de los organismos vivos pueden actuar como catalizadores de la misma forma que actúan en el organismo vivo, hoy en día sabemos que las enzimas han logrado aislarse, purificarse, inmovilizarse y emplearse exitosamente en diversos procesos tecnológico, convirtiéndose en un área de especial interés para la industria (Castañeda; 2019).

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Cornish-Bowden, A; 2014), ha clasificado a los biocatalizadores, en función de su actividad principal. Esto permite agruparlos en 6 grandes grupos como son: las oxidorreductasas (EC 1), transferasas (EC 2), hidrolasas (EC 3), liasas (EC 4), isomerasas (EC 5) y ligasas (EC 6); donde el acrónimo EC representa las siglas de la Comisión Enzimática (Enzyme Commission), ver **Tabla 1**.

Sin lugar a duda, los 4 primeros grupos son las que presentan una mayor aplicabilidad en la síntesis de moléculas de interés a nivel industrial (Fernández & Gómez; 2017).

**Tabla 1.** Clasificación de enzimas (Fernández & Gómez; 2017).

Clase	Función
Oxidorreductasas (EC1)	Catalizan reacciones redox, como el proceso reversible de oxidación tanto de alcoholes como de aminas, extendiéndose a muchos otros procesos selectivos de oxigenación de enlaces C-H no activados, compuestos aromáticos o heteroátomos, entre otros
Transferasas (EC2)	Catalizan la transferencia de grupos funcionales como el metilo, cetonas, aldehídos.
Hidrolasas (EC3)	Hidrólisis de numerosas clases de moléculas orgánicas (ésteres, carbonatos, epóxidos, nitrilos, amidas), también catalizan los procesos reversibles de síntesis al sustituir el nucleófilo empleado el agua, por otros como alcoholes, aminas, amoniaco, hidracinas, tioles o perácidos.
Liasas (EC4)	Catalizan entre otros la formación de enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo
Isomerasas (EC5)	Catalizan reacciones de racemización, epimerización e isomerización, y han sido empleadas en transformaciones de azúcares.
Ligasas (EC6)	Están involucradas en procesos de unión de dos moléculas con la concomitante hidrólisis del enlace de un grupo difosfato o trifosfato del ATP

Las principales clases de enzimas que permiten el pleno desarrollo de la biocatálisis en síntesis orgánica son las oxidorreductasas, transaminasas e hidrolasas. (Sellés, L. et al; 2018).

## 2.2 Oxidorreductasas

Las oxidorreductasas son enzimas que catalizan reacciones redox (Sellés, L. et al; 2018), su uso más habitual incluye tanto la reducción de dobles enlaces, reducción del grupo carbonilo de aldehídos y cetonas, además del proceso reversible de oxidación tanto de alcoholes como de aminas (Gotor, F & Hernáiz, M; 2017).

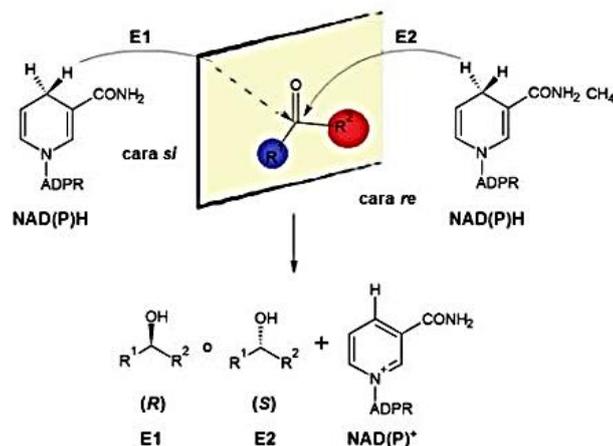
La aplicación de las oxidorreductasas supone grandes ventajas a la industria, ya que:

- Participan en pasos de síntesis complejas en condiciones suaves de reacción.
- Son estereo, regio y químico-específicas, 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, comparado con la química redox tradicional, que normalmente contienen metales de transición (Sellés, L. et al; 2018).

En la literatura, se han reportado diversos estudios realizados con extractos acuosos de materiales vegetales, utilizados como fuente biocatalítica para la obtención de alcoholes secundarios enantiopuros a partir de cetonas proquirales como la acetofenona y sus derivados. Algunos de los materiales vegetales utilizados son: *Daucus carota* (zanahoria), *Apium graveolens* (apio), *Lens culinaris* (lenteja), *Linum usitatissimum* (linaza), *Sinapis alba* (mostaza blanca), *Phaseolus vulgaris* (frijol), *Ligustrum lucidum* (planta silvestre), *Bauhinia variegata* (árbol orquídeo), entre otros (Maczka, W; 2018).

## 2.3 Mecanismo de reacción de la reducción utilizando oxidorreductasas.

Las oxidorreductasas pueden estar acopladas a un cofactor, en este caso NADH/NAD<sup>+</sup> o NADPH/NADP<sup>+</sup>. El mecanismo de esta enzima cuando se encuentra acoplada es oxidando una molécula gracias a la transferencia de un hidruro (H<sup>-</sup>) al cofactor, NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup>, correspondiente, obteniéndose la forma reducida NADH o NADPH, o llevando a cabo la reducción mediante transferencia del hidruro desde el cofactor (Sellés, L. et al; 2018).



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

## 2.4 Factores que favorecen la reducción biocatalítica

### 2.4.1 Temperatura

Las enzimas son muy sensibles a la temperatura. A bajas temperaturas, la mayor parte de las enzimas muestra poca actividad porque no hay suficiente cantidad de energía para que tenga lugar la reacción catalizada. A temperaturas más altas, la actividad enzimática aumenta a medida que las moléculas reactantes se mueven más rápido para generar más colisiones con las enzimas. La mayoría de las enzimas son más activas en un rango entre 35-50°C (Timberlake, K; 2020).

### 2.4.2 pH

Las enzimas son más activas a su pH óptimo, el pH que mantiene la estructura terciaria adecuada de la proteína. Si un valor de pH está arriba o abajo del pH óptimo, se alteran las interacciones de los grupos R, lo que destruye la estructura terciaria y el sitio activo. Como resultado, la enzima ya no puede unirse a un sustrato de manera adecuada y no ocurre la reacción. Si se revierte un pequeño cambio en el pH, una enzima puede recuperar su estructura y por ende su actividad. Sin embargo, grandes variaciones respecto del pH óptimo destruyen de manera

permanente la estructura de la enzima. El pH de las soluciones amortiguadoras utilizado para las oxidorreductasas se encuentra entre 6.0 y 8.0 (Timberlake, K; 2020).

### **2.4.3 Concentración enzima-sustrato**

En cualquier reacción catalizada, el sustrato debe unirse primero con la enzima para formar el complejo enzima-sustrato. Para una concentración de sustrato particular, un aumento en la concentración enzimática aumenta la velocidad de la reacción catalizada. A concentraciones enzimáticas más altas, más moléculas están disponibles para unirse al sustrato y catalizar la reacción. Mientras la concentración de sustrato sea mayor que la concentración de la enzima, hay una relación directa entre la concentración de la enzima y la actividad enzimática. En muchas reacciones catalizadas por enzimas, la concentración del sustrato es mucho mayor que la concentración de la enzima (Timberlake, K; 2020).

## **2.5 Inmovilización de enzimas**

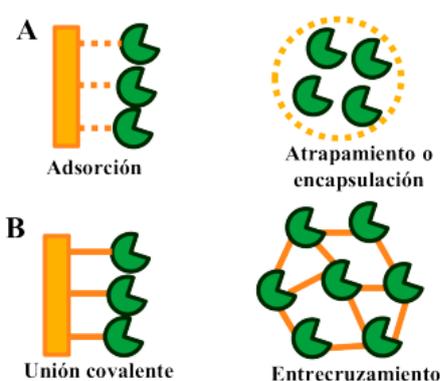
A pesar de las ventajas que las enzimas presentan frente a los catalizadores tradicionales, el empleo de estos biocatalizadores no se ha generalizado en la industria, debido a varias razones como son: su limitada estabilidad, ya que al ser proteínas se pueden desnaturalizar y perder totalmente su actividad, además se ha reportado dificultad para separar la enzima del medio de reacción, lo que impide su reutilización.

La inmovilización de enzimas ha logrado superar estos inconvenientes, permitiendo que aumente la productividad del catalizador (medida como kg de producto obtenidos por kg de enzima) y que muchos procesos industriales sean rentables económicamente.

La mayoría de las enzimas a nivel industrial se suelen emplear como biocatalizadores inmovilizados, permitiendo catalizar reacciones tanto en medios acuosos tamponados, medios orgánicos o en medios no convencionales. El proceso de inmovilización restringe o reduce la movilidad conformacional de las enzimas por

su unión a un soporte, dando lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica, mantienen o aumentan su estabilidad y que permiten ser reutilizadas (Fernández & Gómez; 2017).

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: la retención física y la unión química, ver **Figura 1**. En la retención física no hay formación de enlaces covalentes, la inmovilización ocurre por un proceso de adsorción y/o atrapamiento de enzimas en soportes porosos o bien por confinamiento de enzimas en membranas semipermeables. Por otro lado, en la inmovilización por unión química se forman uniones covalentes entre la enzima y el soporte (Fernández & Gómez; 2017).



**Figura 1.** Métodos de inmovilización de enzimas A) retención física, B) unión química. (Fernández & Gómez; 2017).

## 2.6 Obtención de Alcoholes

Se denomina alcohol a un compuesto orgánico que posee uno o varios grupos hidroxilos (-OH) en su estructura, están formados por cadenas de carbono e hidrógeno donde al menos uno de los enlaces es un hidroxilo. Para reconocerlos basta con encontrar aquellos compuestos en la etiqueta que presenten la terminación *-ol*, o en su defecto mencionados como alcohol seguido de una palabra que indique el número de carbonos.

La reducción de aldehídos y cetonas a sus respectivos alcoholes representa una de las transformaciones más empleadas en la síntesis orgánica. Existe una gran variedad de métodos analíticos para la determinación de alcoholes, los más utilizados son los métodos cromatográficos pues son muy amplios, versátiles y fáciles de manipular.

#### **2.6.1.1 Métodos químicos**

La catálisis por compuestos organometálicos ha recibido una creciente atención desde la década de los 70'. Wikilson y sus colaboradores se aproximaron al entendimiento de las reducciones asimétricas a partir de sus estudios de hidrogenación catalítica por complejos de Rodio (Rh), con estas investigaciones han logrado obtener un exceso enantiomérico ( $ee$ ) > 70 % en la hidrogenación de olefinas con diferentes grupos funcionales como sustituyentes (O Guevara-Pulido, J. et al; 2017).

### **2.7 Obtención de alcoholes ópticamente activos**

Los alcoholes quirales son uno de los intermediarios más importantes para la producción de diversos fármacos quirales, debido a la gran importancia de los fármacos enantiopuros, la industria farmacéutica cada vez presta más atención a la obtención de estos compuestos (Bi-Shuang Chen & Ribeiro de Souza; 2019).

La preparación de enantiómeros puros es de vital importancia en el caso de aquellos fármacos que contengan algún carbono asimétrico, ya que actualmente es obligatorio realizar los ensayos clínicos pertinentes con ambos enantiómeros de forma aislada y con la mezcla racémica, de acuerdo con las directrices de organismos internacionales como la Food and Drug Administration (FDA) o la Agencia Europea del Medicamento (EMA), que exigen estos estudios para aprobar su comercialización. En general, solamente uno de los enantiómeros (“eutómero”) es el que interacciona con su diana terapéutica (centro activo de una enzima, un receptor) para producir el efecto farmacológico, mientras que el otro enantiómero (“distómero”) es inactivo o apenas presenta actividad en el mejor de los casos, ya

que incluso puede ser tóxico. Un ejemplo del efecto tóxico o teratogénico causado por uno de los enantiómeros, es el caso de la talidomida, fármaco que fue comercializado entre los años 1958 y 1963 como sedante y calmante de las náuseas durante los tres primeros meses de embarazo, y provocó miles de nacimientos de bebés afectados de focomelia, una anomalía congénita caracterizada por la carencia o excesiva cortedad de las extremidades. Por lo anterior es de suma importancia el obtener fármacos de forma enantiopura.

Existen numerosas metodologías químicas y biológicas disponibles para obtener alcoholes quirales.

### **2.7.1 Resolución química**

Consiste en la separación de los enantiómeros de una mezcla racémica mediante su conversión en una mezcla de diastereoisómeros. Para ello, la mezcla de enantiómeros se hace reaccionar con compuesto quiral que recibe el nombre de agente de resolución, los diastereoisómeros tienen propiedades físicas diferentes y pueden separarse mediante destilación, cristalización o cromatografía, una vez separados los diastereoisómeros por cualquiera de las técnicas de separación, se procede a la eliminación del agente de resolución para obtener cada uno de los enantiómeros puros (Valdivia M; 2017).

### **2.7.2 Síntesis asimétrica**

En la actualidad aproximadamente el 56% de los medicamentos disponibles en el mercado cuenta con al menos un centro quiral; de estos, el 86% se comercializan como mezclas racémicas. Por esta razón, la síntesis orgánica moderna se ha enfocado en la síntesis asimétrica o síntesis enantioselectiva; esta se ha desarrollado en tres pilares catalíticos: la biocatálisis, la catálisis organometálica y la organocatálisis. Estos pilares difieren entre sí según el tipo de catalizador utilizado para inducir la enantioselectividad de la reacción (enzimas, compuestos organometálicos y compuestos orgánicos respectivamente). Cada una de estas categorías se ha desarrollado con distinta intensidad a través de los años a partir

del reconocimiento de la importancia de la enantio y estereoselectividad en la obtención de productos orgánicos con propósitos industriales y farmacéuticos (O Guevara-Pulido, J. et al; 2017).

### **2.7.2.1 Biocatálisis**

Una de las metodologías para la síntesis de alcoholes quirales es la síntesis catalizada por enzimas, dentro de la cual se pueden distinguir siete estrategias principales:

1. Reducción asimétrica de compuestos carbonílicos, que ha sido ampliamente estudiada y aplicada en la síntesis asimétrica de alcoholes quirales.
2. Adición enantioselectiva de agua a cetonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas, que es una reacción muy atractiva porque permite el acceso directo a hidroxilcetonas.
3. Adición de aldol enantioselectiva, que produce hidroxilcetonas mediante la formación biocatalítica de carbono-carbono de manera asimétrica.
4. Acoplamiento enantioselectivo de cetonas o aldehído con cianuro de hidrógeno, que conduce a alcoholes quirales sustituidos con nitrilo (cianohidrinas).
5. Resolución cinética (dinámica) de mezclas racémicas, que juegan un papel esencial en la preparación de alcoholes enantioméricamente puros.
6. Hidrólisis enantioselectiva de epóxidos, que produce los correspondientes dioles vecinales o análogos.
7. Hidrólisis regio y estereoselectiva hidroxilación para funcionalizar los enlaces C–H, lo que produce los productos hidroxilados (Chen, B.-S., & Ribeiro de Souza, F. Z; 2019).

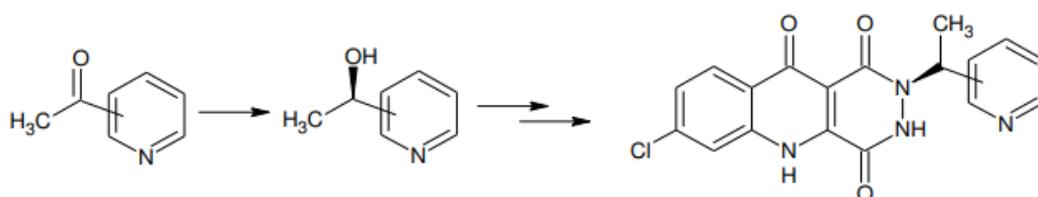
La utilización de enzimas como biocatalizadores en la industria química y farmacéutica está enfocada principalmente a: (1) la obtención de precursores de fármacos y semisíntesis de fármacos; y (2) la resolución enzimática de mezclas racémicas. Por ejemplo, la resolución de mezclas racémicas con el fin de obtener enantiómeros puros, difíciles de separar por los métodos químicos clásicos.

## 2.8 Compuestos con actividad biológica obtenidos a partir de alcoholes ópticamente activos

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; 2004).

Actualmente, los alcoholes ópticamente puros son componentes importantes que se utilizan ampliamente como productos intermedios en las industrias química y farmacéutica para la síntesis de productos finos con centros quirales, como aromatizantes, agroquímicos, fármacos, por lo tanto, su síntesis es continuamente de gran interés para los investigadores, teniendo en cuenta que por métodos de síntesis tradicionales es muy difícil sintetizar alcoholes enantiopuros, una estrategia es utilizar métodos biocatalíticos.

Un ejemplo es el antagonista del receptor de la N-metil-D-aspartato (NMDA), los antagonistas del receptor de la NMDA tienen valor terapéutico potencial en el tratamiento de una amplia gama de trastornos, como accidentes cerebrovasculares, enfermedad de Parkinson, depresión y dolor neuropático, la síntesis de estos antagonistas se muestra en el **esquema 2** en donde los alcoholes derivados de piridina ópticamente activos son los bloques de construcción quirales para la síntesis asimétrica de este producto.



**Esquema 2.** Síntesis de la antagonista del receptor de la (S)-N-metil-D-aspartato (NMDA), a partir de alcoholes heterocíclicos.

### 3 Planteamiento del problema

La preparación de compuestos enantioméricamente puros es uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica (Velasco J., 2021), ya que la quiralidad es un factor importante en la actividad biológica, un enantiómero puede ser el responsable de la actividad biológica y su par enantiomérico puede ser inactivo o tener una actividad biológica diferente, ya sea deseable o indeseable (Cervantes F., 2012).

En la última década la demanda de compuestos ópticamente puros ha ido en aumento, así el desarrollo de nuevos procesos para su obtención es un gran reto para la síntesis química tradicional (Cervantes F; 2012). Se han desarrollado diversos métodos para llevar a cabo la síntesis enantioselectiva de alcoholes quirales como: la biocatálisis, la catálisis organometálica y la organocatálisis (O Guevara-Pulido, J. et al; 2017).

Los procedimientos biocatalíticos se basan en que las reacciones son catalizadas por enzimas, como ventaja estas reacciones son frecuentemente regio-, quimio- y estereoselectivas (Luna, H; 2004). Además, se llevan a cabo generalmente en un rango de temperatura entre 4 y 60 °C y a valores de pH cercanos a la neutralidad (Abdelraheem, E. et al; 2019). Algunas enzimas, como las oxidorreductasas, son robustas y eficientes, son utilizadas para la producción de alcoholes quirales.

Hoy en día, los alcoholes enantioméricamente puros se emplean como productos intermedios tanto en industria química como farmacéutica por medio de ellos se pueden sintetizar productos finos con centros quirales, por ejemplo, aromatizantes, agroquímicos, medicamentos, cristales líquidos, entre otros (Chen, B. & Zeferino, F; 2019).

Por lo anterior, en esta investigación se obtendrán alcoholes enantiomericamente puros mediante reacciones biocatalizadas con oxidorreductasas de frijol inmovilizadas sobre celita, se evaluará y comparará su actividad oxidorreductasa con la oxidorreductasa no inmovilizada.

## **4 Hipótesis**

Las oxidorreductasas presentes en los extractos acuosos de las semillas de *Phaseolus vulgaris* (frijol) de las diferentes variedades: ayocote, flor de mayo, bayo y pinto serán capaces de llevar a cabo la reducción de benzaldehídos (**1a**), 2-acetilpiridina (**1b**), 3-acetilpiridina (**1c**), 4-acetilpiridina (**1d**), para obtener los correspondientes alcoholes.

## **5 Objetivo general**

Llevar a cabo la reducción biocatalítica de aldehídos para la obtención de alcoholes, usando semillas de frijol como fuente de enzima.

### **5.1 Objetivos específicos**

- 1.- Obtener un extracto con actividad oxidorreductasa a partir de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*).
- 2.-Inmovilizar el extracto de frijol con actividad oxidorreductasa.
- 3.-Evaluar la actividad reductasa del extracto inmovilizado de frijol para la reducción de aldehídos al alcohol correspondiente.
- 4.- Comparar la actividad oxidorreductasa del extracto inmovilizado con el extracto de frijol.

## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Materiales

Benzaldehído (**1a**), alcohol bencílico (**2a**), 2-acetilpiridina (**1b**), 3-acetilpiridina (**1c**) y 4-acetilpiridina (**1d**) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, disopropiléter, hexano e Isopropanol (grado CLAR), acetato de etilo, tris(hidroximetil)aminometano (Tris-base), 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), solución de Fosfatos, fueron adquiridos de J.T. Baker o Techrom.

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

Las semillas de frijoles, pinto, flor de mayo, ayocote y bayo fueron adquiridos de un mercado local de la ciudad de México.

En la **tabla 2** se muestran los materiales utilizados de las diferentes variedades de semilla de frijol,

**Tabla 2.** Materiales vegetales utilizados para la reducción de benzaldehído y cetonas.

Familia y genero	Material vegetal
Fabaceae, <i>Phaseolus vulgaris</i>	Frijol pinto Frijol flor de mayo Frijol ayocote Frijol bayo

### 6.2 Obtención de los extractos enzimáticos con actividad reductasa

Las diferentes variedades de frijoles: pinto (f. pinto), flor de mayo (f. mayo), ayocote (f. ayocote) y bayo (f. bayo) 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 1 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 (1:4 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.

### 6.3 Liofilización de los extractos enzimáticos

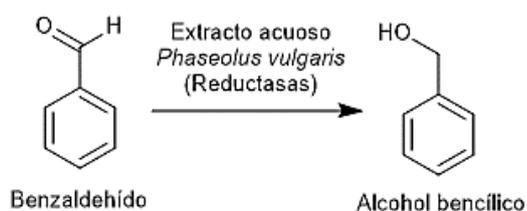
El extracto acuoso (15 mL) se congeló a  $-75^{\circ}\text{C}$  (Revco), se liofilizó a  $-51^{\circ}\text{C}$ , 0.133 mBar, utilizando una liofilizadora LABCONCO FreeZone 4.5. Posteriormente se recuperó el polvo liofilizado, se pesó, tamizó y se calculó la pérdida de agua. Los materiales liofilizados se almacenaron en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ . 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 reductasas.

### 6.4 Inmovilización de los extractos enzimáticos

Al extracto acuoso o el polvo liofilizado (regenerado con el volumen de agua perdida) de las semillas de frijol se le adicionó celita en una relación 1:1, 1:2 y 1:4, se agitó a  $5^{\circ}\text{C}$  por 24h, se congeló a  $-75^{\circ}\text{C}$  (Revco), se liofilizó a  $-51^{\circ}\text{C}$ , 0.133 mBar. El polvo obtenido se consideró como enzima inmovilizada.

### 6.5 Evaluación de la actividad reductasa

La reducción de benzaldehído a alcohol bencílico (**Esquema 3**) se utilizó como reacción de referencia, para poder determinar y comparar la actividad reductasa de los extractos acuosos de las diferentes variedades de frijol.



**Esquema 3.** Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico.

*Biorreduccion:* A 1 mL de extracto acuoso se le agregó 0.015 mmol ( $1.5 \mu\text{L}$ ) de benzaldehído disuelto en  $48.5 \mu\text{L}$  de isopropanol, se agitó mecánicamente a  $35^{\circ}\text{C}$  en una incubadora Enviro-Genie, después de 24 h se extrajo con diisopropil éter (2 x 0.5 mL), se centrifugó a 13000 rpm,  $5^{\circ}\text{C}$  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.

## 6.6 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), Tris-HCl (TR), HEPES (HE), todos en concentración 0.15 M, pH 8.1 y se compararon al utilizar agua como medio de reacción.

- **Preparación de soluciones amortiguadoras**

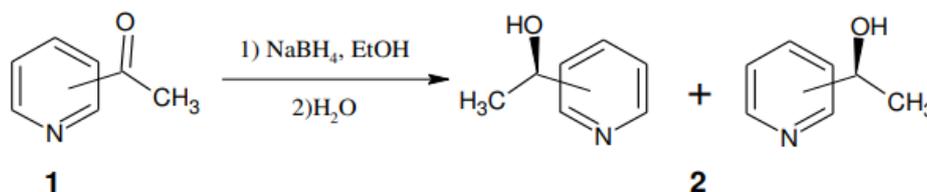
**Fosfatos:** se pesaron 2.04 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se aforo a 100 mL (solución A), se pesaron 2.6 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y aforaron a 100 mL (solución B), posteriormente teniendo ambas soluciones se tomaron 75 mL de la solución B y se ajustó el pH a 8.1 con la solución A, por último,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

**HEPES:** 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.

**Tris-HCl:** se pesaron 1.82 g de Tris y se disolvieron en 30 mL de agua, ajustar el pH a 8.1 con una solución de HCl (0.53 mL de HCl aforados a 50 mL), al finalizar aforar a 100mL con agua destilada.

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

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 2 mmol (250 mg) de 2-acetilpiridina (**1b**), 3-acetilpiridina (**1c**) o 4-acetilpiridina (**1d**), se disolvieron en 5mL de etanol al 95%, posteriormente se agregaron 2mmol (78 mg) de borohidruro de sodio y se agito; la reacción se monitoreo por cromatografía de capa fina (CCF), cuando ya no se observó la cetona se agregaron 10 mL de agua destilada fría y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 3mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó en un rotavapor. Las cetonas y los alcoholes se analizaron por CLAR y CG.



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

## 6.8 Evaluación de la reducción biocatalítica de cetonas

A 2 mL de extracto acuoso, polvo liofilizado o inmovilizado, se le agregó  $1.8 \times 10^{-5}$  mmol ( $2 \mu\text{L}$ ) de la respectiva cetona (**1b**, **1c** y **1d**) disuelta en  $48 \mu\text{L}$  de isopropanol, se agitó mecánicamente a  $35^\circ\text{C}$  en una incubadora Enviro-Genie, después de 24 h se extrajo con acetato de etilo ( $3 \times 2 \text{ mL}$ ), se centrifugó a 4000 rpm,  $5^\circ\text{C}$  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 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## 6.9 Métodos analíticos

### 6.9.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Se usaron cromatoplasmas de TCL sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck, los eluyentes utilizados fueron mezclas de hexano: acetato de etilo, dependiendo de la cetona, el revelado se realizó con luz UV-Vis.

### 6.9.2 Análisis del porcentaje de conversión por cromatografía de gases (CG)

La reducción se determinó mediante CG, se usó un cromatógrafo HP 6890, equipado con una columna HP-5 ( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ ,  $0.25 \mu\text{m}$ ), se utilizó como gas acarreador  $\text{N}_2$ , temperatura del inyector y detector a  $250^\circ\text{C}$ , la temperatura del horno y la velocidad de flujo dependen del compuesto a analizar. En la **tabla 3** se muestran las condiciones para el análisis de benzaldehído y las cetonas (**1b-1d**) y sus

alcoholes (**2a-2d**) correspondientes. Los cromatogramas de cada uno de los compuestos se encuentran en el **anexo 1**.

**Tabla 3.** Condiciones utilizadas para el análisis de benzaldehído y cetonas con el alcohol correspondientes.

Compuesto	t <sub>R</sub> <sup>*</sup> (min)	Alcohol	t <sub>R</sub> <sup>*</sup> (min)	Temperatura (°C)	Flujo (mL/min)
Benzaldehído ( <b>1a</b> )	2.9	Alcohol bencílico ( <b>2a</b> )	3.5	130	0.8
2-acetilpiridina ( <b>1b</b> )	3.4	1-(2-pridil)etanol ( <b>2b</b> )	3.7	140	0.7
3-acetilpiridina ( <b>1c</b> )	4.0	1-(3-pridil)etanol ( <b>2c</b> )	4.7		
4-acetilpiridina ( <b>1d</b> )	3.8	1-(4-pridil)etanol ( <b>2d</b> )	4.7		

\*t<sub>R</sub> = tiempo de retención

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

El análisis del %ee se realizó por medio de CLAR en un cromatógrafo de líquidos Agilent Serie 1100, utilizando la columna quiral OB-H (0.46 cm x 25 cm) de Daicel Chiralcel®, el flujo, así como la mezcla de eluyentes utilizado dependen de cada cetona.

En la **tabla 4** se muestran las condiciones utilizadas en CLAR quiral de cada cetona y sus alcoholes correspondientes, reportes como el de Martínez R en 2018 menciona que el enantiomero "S" presenta menor tiempo de retención que el "R", por lo que por comparación de los t<sub>R</sub> se determinó la configuración de los alcoholes. Los cromatogramas de ejemplo de cada compuesto se encuentran en el **anexo 2**.

**Tabla 4.** Condiciones utilizadas en HPLC para el análisis de las cetonas y sus respectivos alcoholes.

Cetona	t <sub>R</sub> <sup>*</sup> (min)	Alcohol	t <sub>R</sub> <sup>*</sup> (min)	columna	Eluyente**	Flujo (mL/min)
<b>1b</b>	8.9	R/S	10.6/12.2	OB-H	91:9	0.8
<b>1c</b>	7.0	R/S	11.0/14.2		87:13	1.0
<b>1b</b>	9.0	R/S	11.0/16.0		89:11	1.0

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

## **6.10 Análisis Estadístico de los datos**

Se realizó un análisis estadístico para evaluar la actividad reductasa con base en el % Conv 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 del medio de reacción en la actividad reductasa utilizando benzaldehído

Para evaluar el medio de reacción se probó agua, soluciones amortiguadoras tris (TR), fosfatos (FO) y HEPES (HE) a pH 8.1 y 0.15 M. En la **tabla 5** se muestran los % de conversión de benzaldehído a alcohol bencílico, usando como fuente de biocatalizadores frijol bayo y ayocote, en agua y tres soluciones amortiguadoras (FO, HE y TR) a las 24 horas. Al utilizar agua se obtuvieron % de conversión < 3%, la actividad reductasa mejora significativamente al utilizar soluciones amortiguadoras, para el f. bayo la mejor solución amortiguadora fue fosfatos (FO) con 83.1 % de reducción, mientras que para el f. ayocote fue la solución amortiguadora de Tris-HCl (TR) con 72.2 % de conversión.

**Tabla 5.** Porcentaje de conversión utilizando agua y diferentes soluciones amortiguadoras como medio de reacción a las 24 h.

Frijol	% Conv agua	% Conv TR	% Conv FO	% Conv HE
F. Bayo	2.5 ± 0.51	68.0 ± 6.34	83.1 ± 11.88	74.4 ± 14.82
F. Ayocote	2.4 ± 0.75	72.2 ± 7.93	62.4 ± 0.60	59.6 ± 10.39

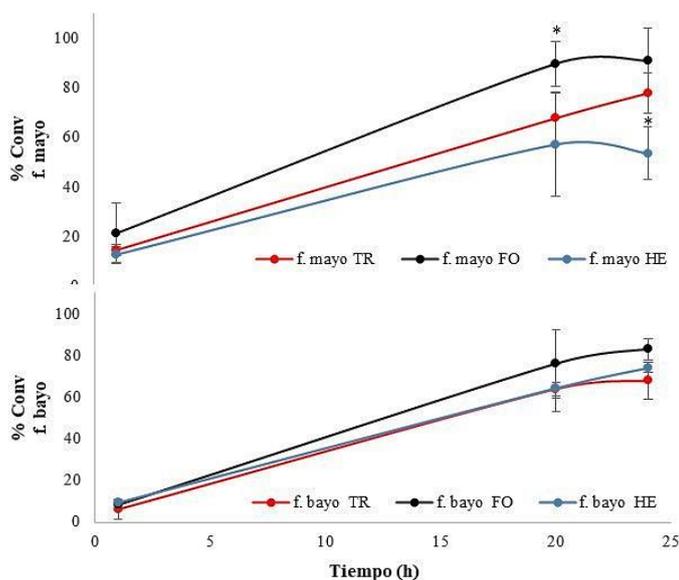
Con los resultados anteriores, se decidió probar las diferentes semillas de frijol con las tres soluciones amortiguadoras, para evaluar el efecto de las soluciones amortiguadoras y las variedades de frijol en el % de conversión a alcohol bencílico.

### 7.2 Evaluación del tiempo de reacción en la actividad reductasa

En la **gráfica 1** se presenta la cinética de la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico, comparando el frijol f. mayo y bayo, en soluciones amortiguadoras FO, TR y HE. En la primera hora el % de conversión fue menor al 20%.

A las 20 h, para f. mayo y f. bayo con la solución de FO se obtuvieron los mayores % de conversión con 89.7% y 76.0%, respectivamente; mientras que con las

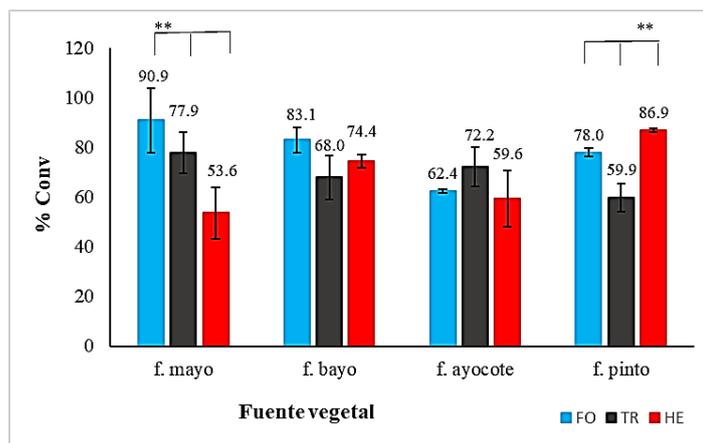
soluciones de TR y HE se obtuvieron % de reducción > 65% para ambos frijoles. A las 24 h, los mayores resultados se obtuvieron con la solución amortiguadora de FO, 90.9% para f. mayo y 83.1 % para f. bayo.



**Gráfica 1.** Cinética de la reacción de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico con f. mayo y f. bayo utilizando diferentes soluciones amortiguadoras (TR, FO y HE). \* $p < 0.05$  diferencia estadísticamente significativa.

### 7.3 Evaluación de los medios de reacción con respecto a las diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris*

En la **gráfica 2** se muestran los mayores % de conversión de alcohol bencílico. Para f. bayo, f. ayocote, f. pinto y f. mayo en la solución amortiguadora de FO se obtuvieron % de reducción de 83.1 y 90.9%, respectivamente. Para f. ayocote el mayor % fue de 72.2% con solución TR y por último, para f. pinto el mayor % de conversión es de 86.9% con solución HE.



**Gráfica 2.** Reducción de benzaldehído para la obtención de alcohol bencílico, utilizando como biocatalizador los frijoles: bayo, flor de mayo, ayocote y pinto con las 3 soluciones amortiguadoras, \*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$  diferencia estadísticamente significativa.

Se puede observar que al utilizar la solución amortiguadora de fosfatos es superior el % de conversión en las variedades f. mayo, f. bayo, además, no existe una diferencia estadísticamente significativa con f. ayocote y con f. pinto la diferencia es del 8%. La solución amortiguadora (SA) de fosfatos se decidió utilizar para los siguientes experimentos, ya que presentar altos % de conversión (<90%), además de ser una sal más barata que HEPES y Tris.

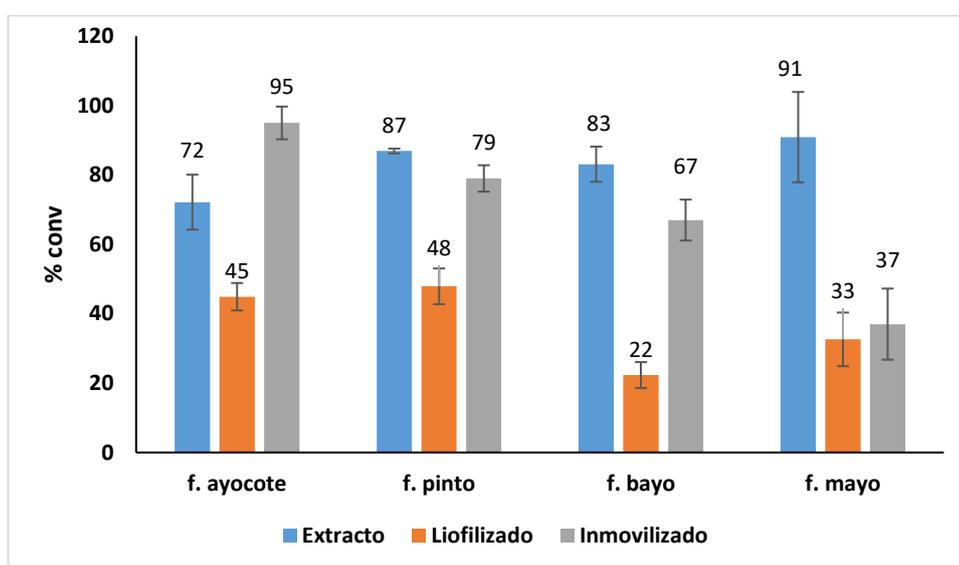
#### 7.4 Evaluación de la actividad reductasa de los extractos acuosos liofilizados e inmovilizados

En la **tabla 6** se presentan la cantidad de sobrenadante y polvo liofilizado, el porcentaje de pérdida de agua, para 10 g de semillas de cada variedad.

**Tabla 6.** Porcentaje de pérdida de agua en polvos liofilizados con las diferentes variedades.

Frijol	Cantidad de semilla (g)	Cantidad recuperada		Pérdida de agua (%)
		sobrenadante (mL)	Liofilizado (g)	
f. mayo	10	20.0	1.4	92.8
f. bayo		23.0	2.5	89.1
f. ayocote		24.5	1.9	92.3
f. pinto		22.0	1.8	91.7

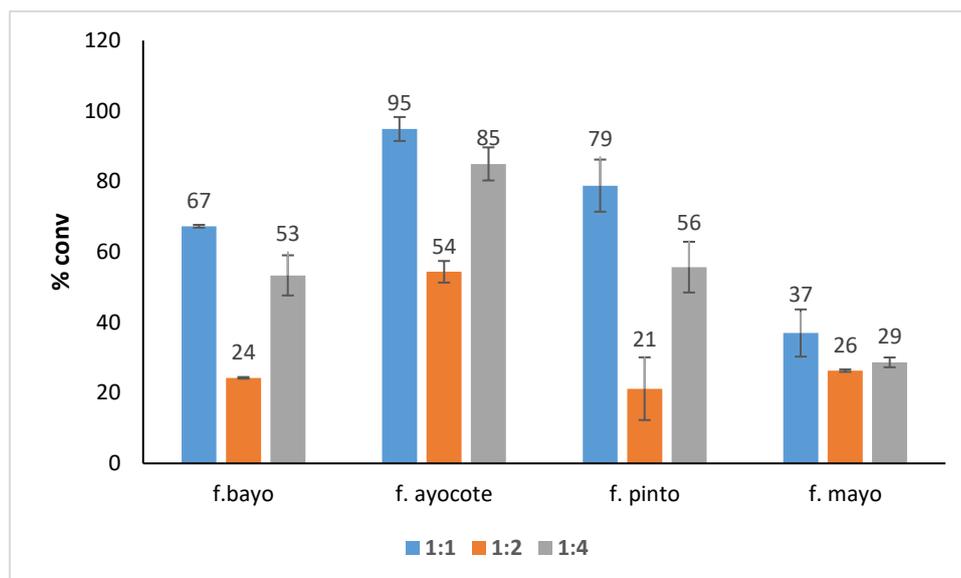
En la **gráfica 3** se muestran los % de conversión de benzaldehído a alcohol bencílico usando como fuentes de biocatalizador los frijoles ayocote, pinto, bayo y flor de mayo. Utilizando el extracto acuoso el mejor % de conv se obtuvo el frijol flor de mayo con 90.9%, mientras que en las demás variedades es menor al 90% de conversión, es decir, la actividad reductasa es mayor en el extracto acuoso del frijol flor de mayo. Debido a que los extractos acuosos no son estables por varios días, se decidió eliminar el agua por liofilización e inmovilizar el extracto acuoso sobre celita relación 1:1. Desafortunadamente se observó una disminución sustancial de la actividad reductasa, en todas las variedades el % Conv para el polvo liofilizado fue menor al 48%.



**Gráfica 3.** Reducción de benzaldehído para la obtención de alcohol bencílico, comparando el extracto acuoso con el polvo liofilizado e inmovilizado, utilizando como biocatalizador los frijoles bayos, flor de mayo, ayocote y pinto.

Manteniendo el objetivo de tener una enzima que sea estable y se pueda almacenar, lo que no se logró con la liofilización del extracto acuoso de los frijoles, se procedió a la inmovilización de la enzima cruda presente en los extractos acuosos por adsorción sobre celita, utilizando diferentes proporciones de celita en cada semilla, las cuales fueron 1:1, 1:2 y 1:4 (extracto acuosos:celita).

En la **gráfica 4** se muestran los % de conversión de benzaldehído a alcohol bencílico utilizando las diferentes variedades de semillas inmovilizadas a diferentes relaciones de Celita (1:1 1:2 y 1:4), los mejores % de conversión se obtuvieron con la relación 1:1 para todas las variedades, para el frijol ayocote y pinto los % de conv fueron de 95% y 87% respectivamente, para el frijol bayo y flor de mayo fueron de 67 y 37% respectivamente, Por otro lado, en la relación 1:2 se obtuvieron % de conv >55%, y para la relación 1:4 fueron > 85%.



**Gráfica 4.** Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico utilizando extractos acuosos de frijol inmovilizados sobre celita en diferentes proporciones (1:1 1:2 y 1:4).

Como se observa en la **gráfica 4** para las variedades de frijol ayocote y pinto, la inmovilización no solo mantuvo la actividad biocatalítica de las reductasas, sino que dicha actividad aumentó de manera apreciable comparada con el extracto acuoso liofilizado, en el caso de la enzima inmovilizada de f. ayocote relación 1:1 el incremento en la reducción fue del 32.5% y con el inmovilizado de f. pinto en la misma relación, el aumento fue del 9%.

Esto se puede deber a que el proceso de inmovilización por adsorción es menos agresivo para la enzima que los procesos de deshidratación, se logró concentrar la enzima, además de aumentar su estabilidad. Para el frijol bayo y flor de mayo la

inmovilización no aumento la actividad reductasa es menor, comparada con el extracto acuoso.

Como se puede observar los % de conversión más altos fueron mayores al 72% para los extractos acuosos, > 22% para liofilizado y el mejor para inmovilizado fue de > 95% de conv. Comparado con otras referencias bibliográficas como A. solis en 2017 reporto un 54% de conv con semillas de frijol, por otro lado, Cervantes F en 2012 reporto un 100% de conversión en semillas de frijol, el mismo Cervantes reporto también un 82.2% de conversión utilizando polvo liofilizado de frijol.

Después de comprobar la actividad reductasa de benzaldehído a alcohol bencílico, se seleccionaron las mismas variedades de frijol para la reducción del extracto acuoso utilizando 2-acetilpiridina (**1b**), 3-acetilpiridina (**1c**) y 4-acetilpiridina (**1d**). Se evaluó el polvo liofilizado con 4-acetilpiridina de todas las variedades y para la reducción utilizando inmovilizado se seleccionaron las mejores variedades f. Ayocote y f. Pinto, que fueron las dos variedades con mayor porcentaje de conversión.

### 7.5 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 (Rf) se muestran en la **tabla 7**.

**Tabla 7.** Rendimientos 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>1c</b>	60.0	0.4	0.6	70:30
<b>1d</b>	65.0	0.5	0.7	90:10

\* Hexano: Acetato de etilo

Los alcoholes correspondientes fueron identificados por CCF, CG, y CLAR, ver **anexo 1 y 2**.

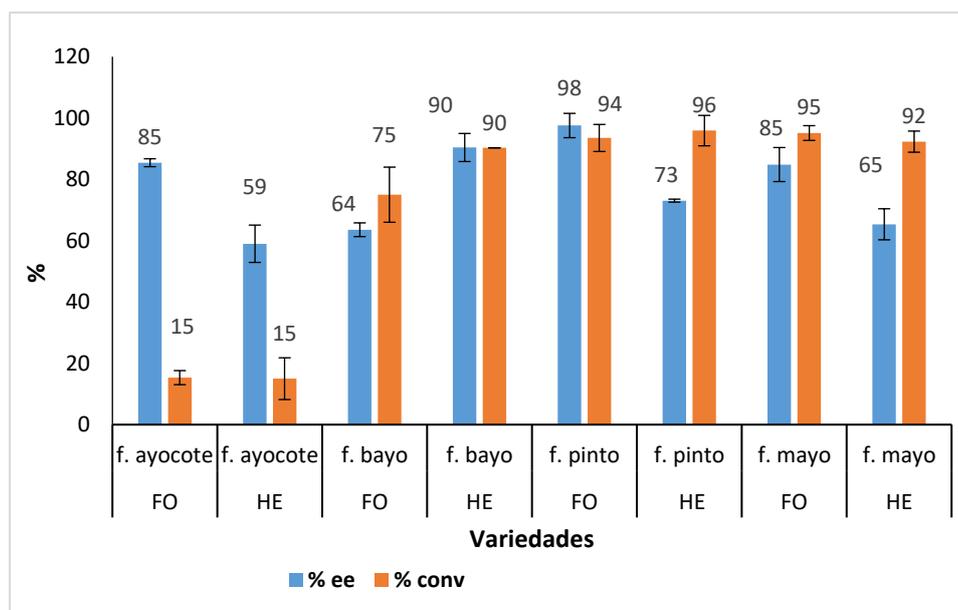
Se identificaron por resonancia magnética de protones  $H^1$  cada una de las estructuras de cada cetona y de su respectivo alcohol, los espectros obtenidos se encuentran en el **anexo 3**.

### **7.6 Reducción biocatalítica de 2-acetilpiridina, 3-acetilpiridina y 4-acetilpiridina con extractos acuosos de frijol**

Se probaron los extractos acuosos de frijol ayocote, f. bayo, f. mayo y f. pinto en solución amortiguadora (SA) de Fosfatos y HEPES a 35 °C, para reducir **1b**, **1c** y **1d** a sus respectivos alcoholes **2b**, **2c** y **2d**.

En la **gráfica 5** se observa los resultados de la reducción de 2-acetilpiridina (**1b**) para obtener 1-(2-piridil)-etanol (**2b**) con las diferentes variedades de frijol. Con f. mayo en SA de fosfatos se obtuvo el mayor % de conversión de 95%, mientras que con f. pinto se obtuvo el mayor % ee de 98%. Mientras que f. ayocote presentó % de reducción de 15% y ee < 85%. Los mejores resultados se obtuvieron con f. bayo en SA de HEPES y f. pinto en SA de fosfatos. Para f. bayo en SA de HEPES se obtuvo > 90% de conversión y ee, mientras que con f. pinto en SA de fosfatos se obtuvo 94% de conversión y 98% ee, es decir >97% de (*R*)-2b.

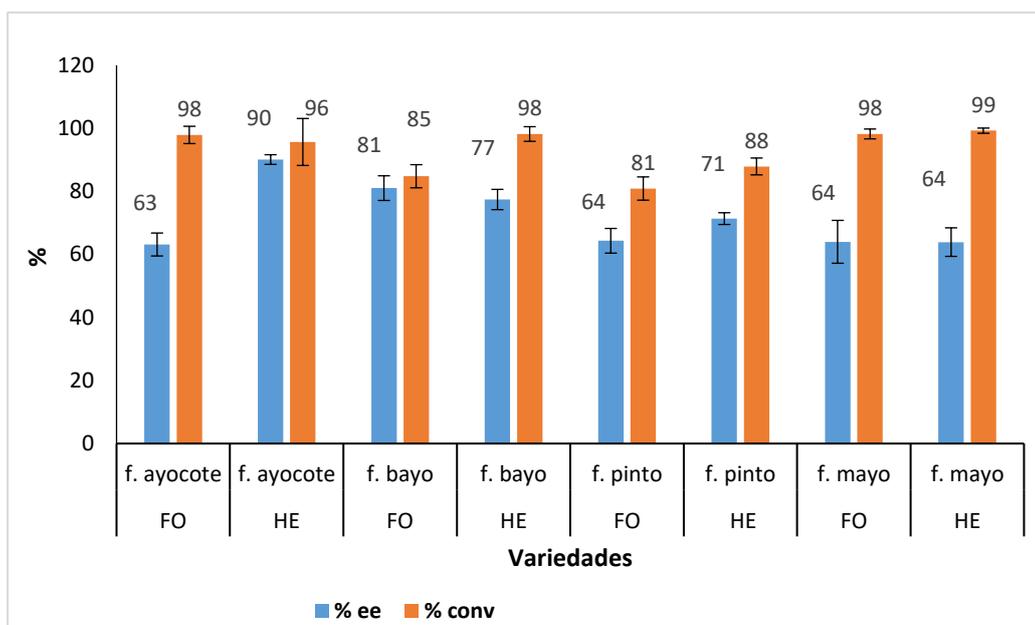
De acuerdo con lo reportado en trabajos previos (Martínez R., 2018) donde evaluaron la actividad reductasa de f. ayocote para la reducción de 2-acetilpiridina reportaron 73% conv y 92% ee en SA de HEPES a 0.2M y 40°C, además reportaron f. pinto y bayo en SA de fosfatos 0.1M y pH 7.6, con 10 y 8% de conversión y 77 y 100% de ee. Con las condiciones evaluadas en esta investigación en SA de fosfatos y HEPES, respectivamente, 0.15 M, pH 8.1, a 35°C durante 24hrs, se logró obtener > 80% conv y > 90% ee, al utilizar f. pinto y f. bayo.



**Grafica 5.** Reducción de 2-acetilpiridina (**1b**) para obtener 1-(2-piridil)-etanol (**2b**) y % de ee de **2b**, utilizando extractos acuosos diferentes variedades de frijol en SA de fosfatos (FO) y HEPES (HE).

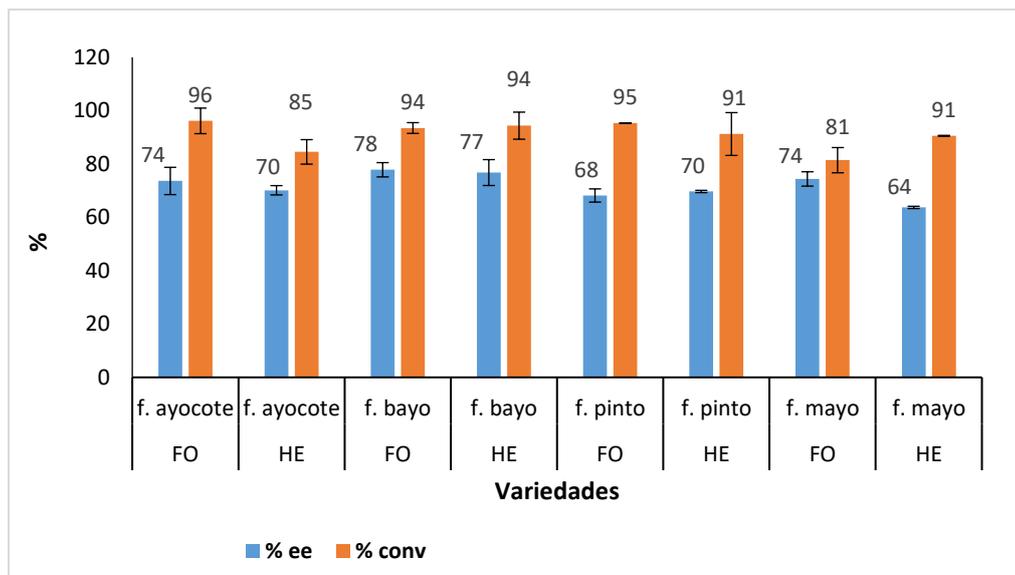
En la **gráfica 6** se observa los resultados de la reducción de 3-acetilpiridina (**1c**) para obtener 1-(3-piridil)-etanol (**2c**) con las diferentes variedades de frijol. Los mayores % de reducción < 98% se obtuvieron con f. mayo en ambas soluciones, sin embargo, el %ee fue < 64%. F. bayo en SA de HEPES presenta % de conversión del 98.2% pero un ee de 77%. Para el f. pinto se obtuvieron bajos % de conversión (<87%) y ee (<71%). Por otro lado, para el f. ayocote en SA de HEPES se obtuvo los mejores resultados tanto en conversión como en ee con un 96 y 90% respectivamente, siendo la variedad que logra reducir casi por completo **1c** y con alta pureza óptica >90 de **2c**, que representa > 95% de (*R*)-**2c**.

De acuerdo con lo reportado por Martínez R en el 2018 para la reducción de **1c** con 96% conv y 75% ee, en la cual utilizaron f. ayocote en SA de HEPES 0.2M, pH 8.1 a 40°C. Se logró un mayor % de ee (> 90%) al utilizar f. ayocote en SA de HEPES 0.15M, pH 8.1 a 35°C.



**Grafica 6.** Reducción de 3-acetilpiridina (**1c**) para obtener 1-(3-piridil)-etanol (**2c**) y % de ee de **2c**, utilizando extractos acuosos diferentes variedades de frijol en SA de fosfatos (FO) y HEPES (HE).

En la **gráfica 7** se observa los resultados de la reducción de 4-acetilpiridina (**1d**) para obtener 1-(4-piridil)-etanol (**2d**) con las diferentes variedades de frijol. En general los % ee fueron mayores al utilizar la SA de fosfatos > 74%, mientras que la conversión fue > 80 %. El mayor porcentaje de reducción se obtuvo con f. ayocote (96%) y un %ee de 74%, en SA de fosfatos. El mayor % ee se obtuvo con f. bayo (78%) y un % conv de 94%, en SA de fosfatos, mientras que para el f. pinto el % ee fue > 68% y > 91% de reducción. Para f. mayo el %ee fue 74% y 81% de conversión. Los resultados para la reducción de **1d** con las variedades de frijol y las condiciones de este experimento, no logran la pureza óptica >78% de (*R*)-**2d**.



**Grafica 7.** Reducción de 4-acetilpiridina (**1d**) para obtener 1-(4-piridil)-etanol (**2d**) y % de ee de **2d**, utilizando extractos acuosos de diferentes variedades de frijol en SA de fosfatos (FO) y HEPES (HE).

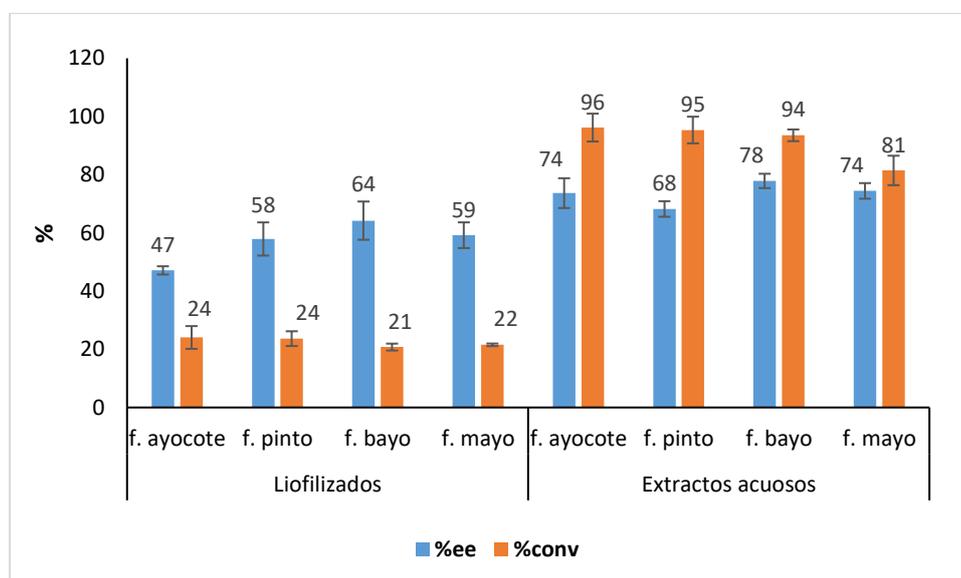
La reducción de **1d** a **2d**, se obtuvo con f. bayo y f. ayocote con SA de fosfatos 0.15 M, pH 8.1 a 35°C durante 24hrs, obteniendo > 94% de conversión y > 74% de reducción. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Martínez, R en 2018, en donde se reportó 100 % conv y 79%ee utilizando extracto acuoso de frijol ayocote con solución de HEPES, 0.2M, pH 8.1 a 40°C.

Al realizar el análisis estadístico para evaluar los efectos de la fuente de reductasas (variedades de frijol), el buffer (FO y HEPES) y el sustrato (**1b**, **1c** y **1d**) sobre el % de conversión y ee, se encontró que el tipo de compuesto y fuente de reductasa tienen un efecto significativo sobre la conversión, siendo f. ayocote el que presenta el más bajo % de conversión para reducir **1b** a **2b**. El mejor % conversión se obtiene con f. mayo para reducir **1c** a **2c**. No se encontró diferencia estadística asociada al tipo de solución amortiguadora.

## 7.7 Reducción biocatalítica de 4-acetilpiridina con extractos acuosos liofilizados e inmovilizados

Al no obtenerse resultados altos con respecto al % de ee, se decidió evaluar los extractos acuosos liofilizados e inmovilizados sobre celita.

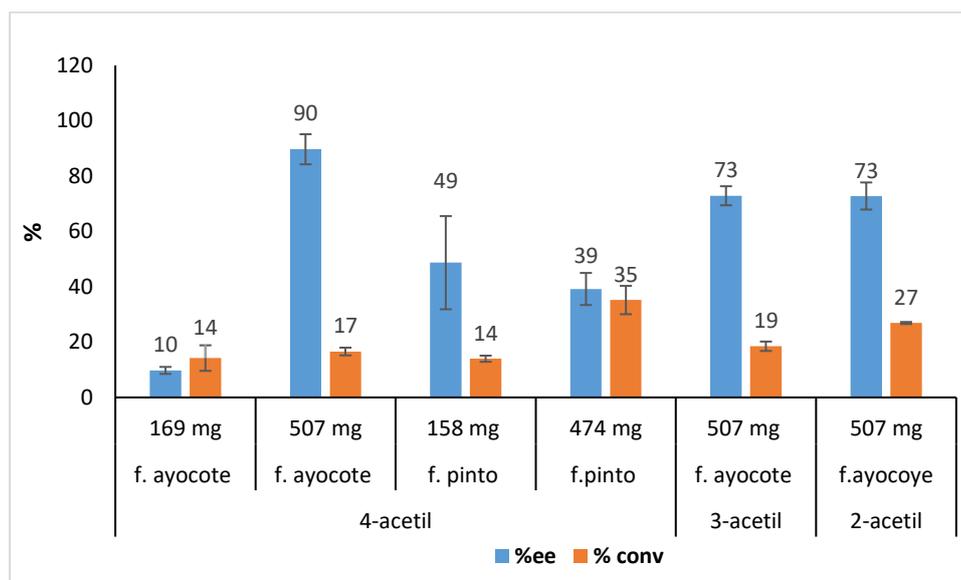
En la **gráfica 8** se observan los % de conversión y exceso enantiomérico de todas las variedades de frijol utilizando el extracto acuoso liofilizado y los extractos acuosos de las diferentes variedades, los % de conv fueron > 20.8% y para el exceso enantiomérico el mayor resultado se obtuvo con el f. bayo con el 64.2%. En general el material liofilizado presentó bajos % de conv y ee enantiomérico comparado con sus extractos acuosos.



**Gráfica 8.** Reducción de 4-acetilpiridina (**1d**) para obtener 1-(4-piridil)-etanol (**2d**) y % de ee de **2d**, utilizando extractos acuosos liofilizados de diferentes variedades de frijol en SA de fosfatos.

En la **gráfica 9** se muestra los resultados obtenidos de la reducción de 4-acetilpiridina utilizando los extractos acuosos inmovilizados sobre celita en relación 1:1. Se evaluó de f. ayocote (169 mg y 507 mg de polvo inmovilizado) y f. pinto (158 mg y 474 mg de polvo inmovilizado), como se observa el mejor resultado se

obtuvo al utilizar 507 mg de polvo inmovilizado de f. ayocote con 90 % de ee y 17% conv, por lo cual se probó 507 mg de polvo inmovilizado con las otras dos cetonas (**1b** y **1c**), los resultados obtenidos fueron 73% de ee y > 19% de conv. EL inmovilizar el extracto acuoso de f. ayocote mejora el % de ee de **2d**, mantiene su actividad reductasa y que entre más cantidad de polvo se utilice aumenta su % de ee y conversión.



**Grafica 9.** Reducción de 4-acetilpiridina (**1d**) para obtener 1-(4-piridil)-etanol (**2d**) y % de ee de **2d**, utilizando extractos acuosos inmovilizados de f. ayocote y f. pinto en SA de fosfatos.

Debido a estos resultados, en donde solo la variedad de f. ayocote presento mejoras con respecto al % ee, pero una disminución importante en el % de conversión, ya no se probó las demás piridinas con los demás extractos acuosos inmovilizados de la variedad f. mayo y f. bayo. Los resultados obtenidos con los polvos inmovilizados no superan los resultados obtenidos con los extractos acuosos. No se recomienda el proceso de liofilización o inmovilización, debido a que los % de conversión son mucho menor a lo obtenido con los extractos acuosos.

## 8 CONCLUSIÓN

Los extractos acuosos inmovilizados sobre celita, de las semillas de frijol de f. ayocote y f. pinto dieron altos % de conv de benzaldehído a alcohol bencílico, utilizando SA de fosfatos 0.15 M, pH8.1 durante 24 horas.

Los extractos acuosos inmovilizados de f. ayocote utilizados para reducir **1d** a **2d**, permitieron mejorar la pureza óptica del alcohol, sin embargo, la actividad reductasa es inferior a lo obtenido con los extractos acuosos. El proceso de liofilización ayuda a mejorar la pureza óptica del alcohol, sin embargo, se afecta el % de conversión.

El % de conversión se ve afectado por el tipo de fuente reductasa y por el tipo de sustrato a reducir. Los mejores resultados para reducir 3-acetilpiridina (**1c**) fue al utilizar los extractos acuosos de las semillas de f. ayocote; para la reducción de 2-acetilpiridina (**1b**) fue las semillas de f. pinto y f. bayo.

## 9 Bibliografía

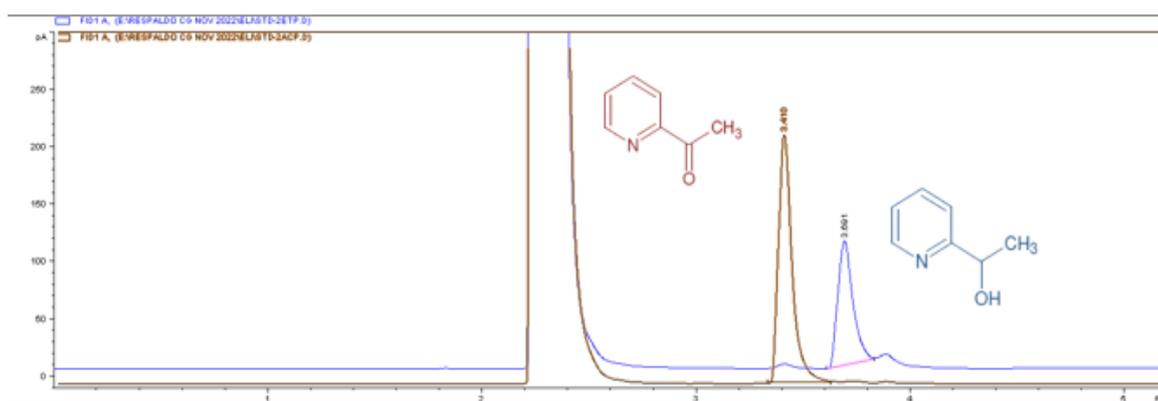
1. Abdelraheem, E. M. M.; Busch, H.; Hanefeld, U.; Tonin, F. (2019). Biocatalysis Explained: From Pharmaceutical to Bulk Chemical Production. *React. Chem. Eng.* 4 (11), 1878–1894
2. Basso A., Serban S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes— A review, *Molecular Catalysis*, 479, 110607.
3. Bi-ShuangChen & FayeneZeferino Ribeiro de Souza (2019). Enzymatic synthesis of enantiopure alcohols: current state and perspectives, Centro de Innovación Colaborativa para la Explotación y Utilización de Recursos Biológicos del Mar Meridional de China, Universidad Sun Yat-Sen, Guangzhou, 510275, China.
4. Buglione M, Agüero M, 2014. Actividad biológica de compuestos orgánicos que presentan estereoisomería. Universidad Nacional de Río Negro, Pacheo 460 - (8360).
5. Carvajal M, 2015. Obtención de alcoholes secundarios enantioméricamente enriquecidos vía reducción enzimática de cetonas. Trabajo de grado para obtener la maestría en ciencias farmacéuticas, Departamento Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
6. Castañeda M. T. (2019). Enzimas de interés biotecnológico, Universidad Tecnológica Nacional, Facultad regional la plata, Copyright.
7. Cervantes F (2012). Reducción de cetonas utilizando biocatalizadores de origen vegetal. Tesis para la obtención de grado de maestro en ciencias farmacéuticas, UAM-X
8. Choi, Jung-Min; Han, Sang-Soo; Kim, Hak-Sung (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*.
9. Cornish-Bowden, A. (2014). Current IUBMB recommendation on enzyme nomenclature and kinetics. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 74-87.
10. Fajardo-Ochoa, R.; Osuna-Castro, J. A.; VillaVelázquez-Mendoza, C. (2011), Inmovilización de células y enzimas. No. 6, 16.

11. Fernández V, Gómez M, 2017. Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en síntesis orgánica. Universidad de Oviedo, An. Quím. 113 (1), 27-35.
12. Luna H, 2004. Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos. Departamento Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
13. Maćzka, W., Sołtysik, D., Wińska, K., Grabarczyk, M., & Szumny, A. (2018). Plant-Mediated Biotransformations of S (+)- and R(-)-Carvones. *Applied Sciences*, 8(12), 2605.
14. Martínez R, 2018. Reducción biocatalítica de cetonas aromáticas y heteroaromáticas para obtener precursores de compuestos con actividad biológica. Trabajo de grado para obtener la maestría en ciencias farmacéuticas, Departamento Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
15. Mateo M. (2018). La química de los alcoholes y la industria, Oxocarbenio-divulgación científica, <https://oxocarbenio.wordpress.com/2018/07/04/la-quimica-de-los-alcoholes-y-la-industria/>
16. Mendez D. (2017). Desarrollo de procesos biocatalíticos para la preparación de compuestos orgánicos de alto valor añadido empleando hidrolasas y oxidorreductasas. Diseño de reacciones en cascada. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo.
17. O Guevara-Pulido, J; Caicedo, J; David, F; Vela, M & Gonzáles, J. (2017). Catálisis asimétrica, una nueva era en la síntesis de Fármacos: historia y evolución. *Fac. Cienc. Básicas*, 13 (2), 105-116
18. Sellés Vidal, L., Kelly, CL, Mordaka, PM, & Heap, JT (2018). Revisión de oxidorreductasas dependientes de NAD (P) H: propiedades, ingeniería y aplicación. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteínas y proteómica*, 1866 (2), 327–347.
19. Sengupta, D.; Naik, D.; Reddy, A. R. (2015). Plant Aldo-Keto Reductases (AKRs) as Multi-Tasking Soldiers Involved in Diverse Plant Metabolic

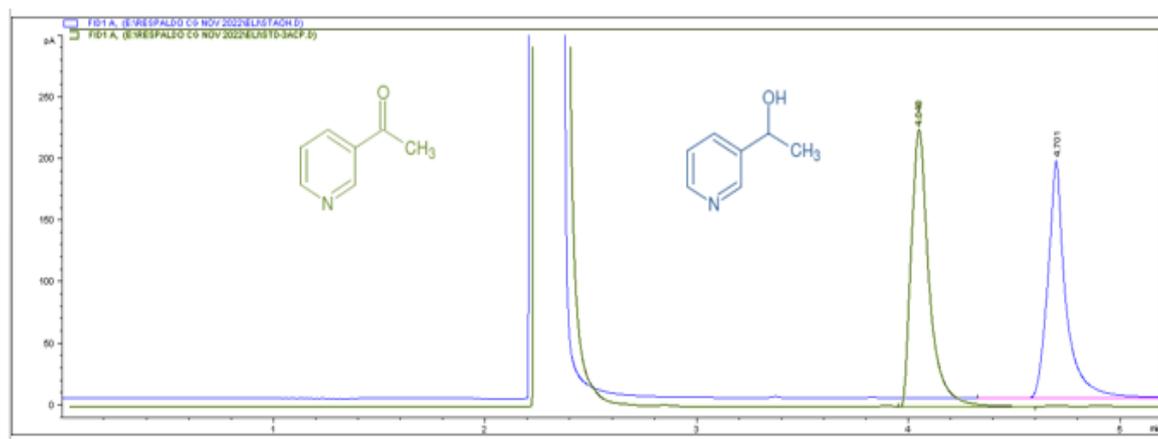
- Processes and Stress Defense: A Structure-Function Update. *J. Plant Physiol.* 179, 40–55.
20. Sheldon, R. A. (2016). Biocatalysis and Biomass Conversion in Alternative Reaction Media. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 22 (37), 12984–12999.
21. Solís, A.; Martínez, R. M.; Cervantes, F.; Pérez, H. I.; Manjarrez, N.; Solís, M. (2019). Reduction of Substituted Benzaldehydes, Acetophenone and 2-Acetylpyridine Using Bean Seeds as Crude Reductase Enzymes. *Biocatal. Biotransformation* 37 (2), 152–157.
22. Solís, A; Martínez, R; Domínguez, F; Pérez, I. & Manjarrez, N. (2018). Estudio para la identificación de reductasas de vegetal. *Frontera Biotecnológica*, 17-20.
23. Timberlake, K. (2020). *Química general, orgánica y biológica: estructuras de la vida*. México: Pearson Educación.
24. Valdivia M, (2017). Resolución de meclaz racemicas, recuperado el 23 de noviembre del 2022, disponible en: <https://es.scribd.com/document/450494750/Resolucion-de-Mezclas-Racemicas>
25. Velasco J. (2021). Reducción enantioselectiva de cetonas usando reductasas de origen vegetal.

## 10 Anexos.

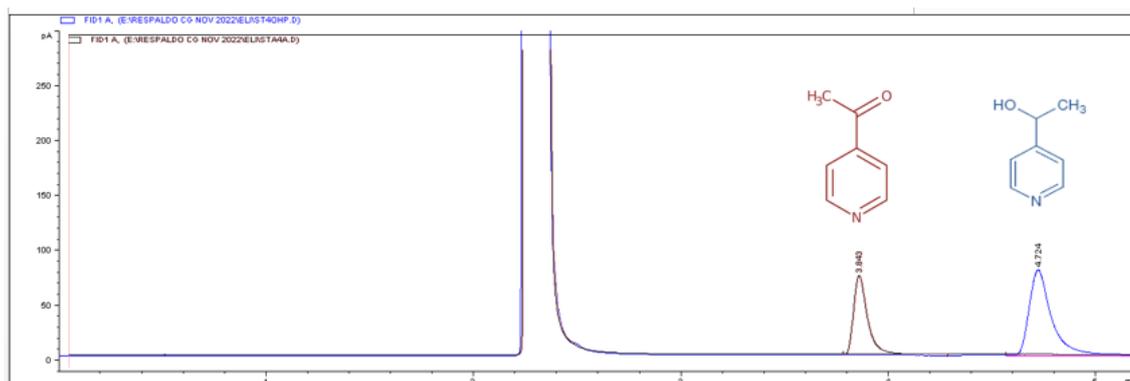
### 10.1.1 Anexo 1. Cromatogramas obtenidos por CG



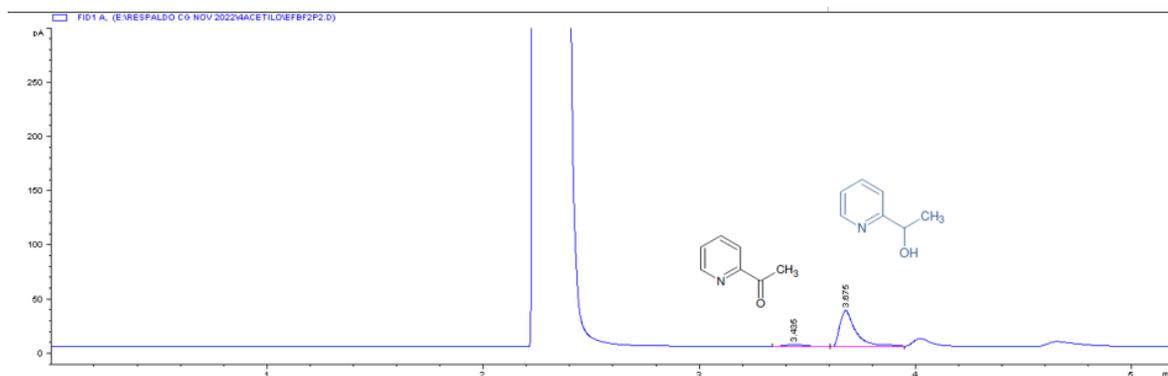
**Figura A1-1.** Cromatograma obtenido por CG del estándar de 2-acetilpiridina (**1b**) y su respectivo alcohol 1-(2-piridil)-etanol (**2b**).



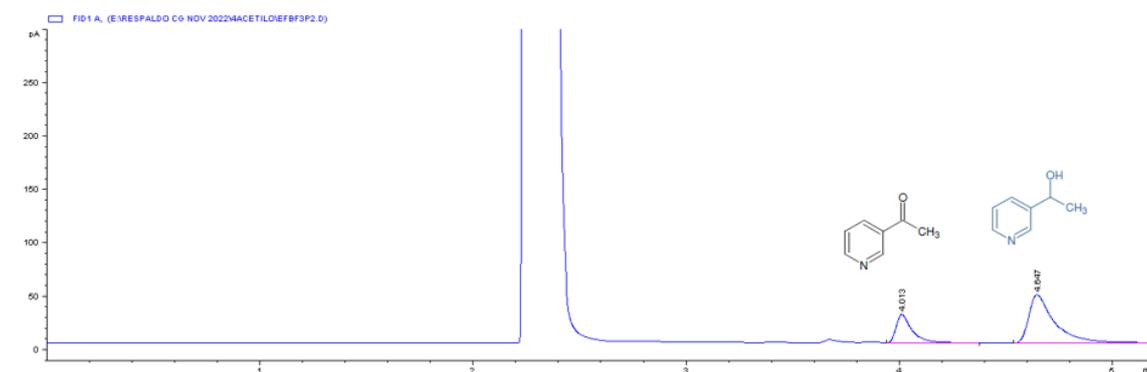
**Figura A1-2.** Cromatograma obtenido por CG del estándar de 3-acetilpiridina (**1c**) y su respectivo alcohol 1-(3-piridil)-etanol (**2c**).



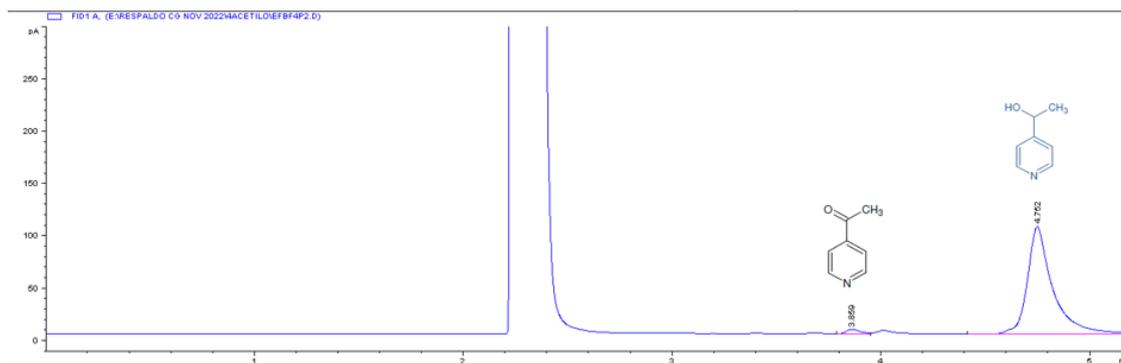
**Figura A1-3.** Cromatograma obtenido por CG del estándar de 4-acetilpiridina (**1d**) y su respectivo alcohol 1-(4-piridil)-etanol (**2d**).



**Figura A1-4.** Cromatograma obtenido por CG de la reducción de **1b** a **2b**, utilizando frijol bayo con SA de fosfatos.

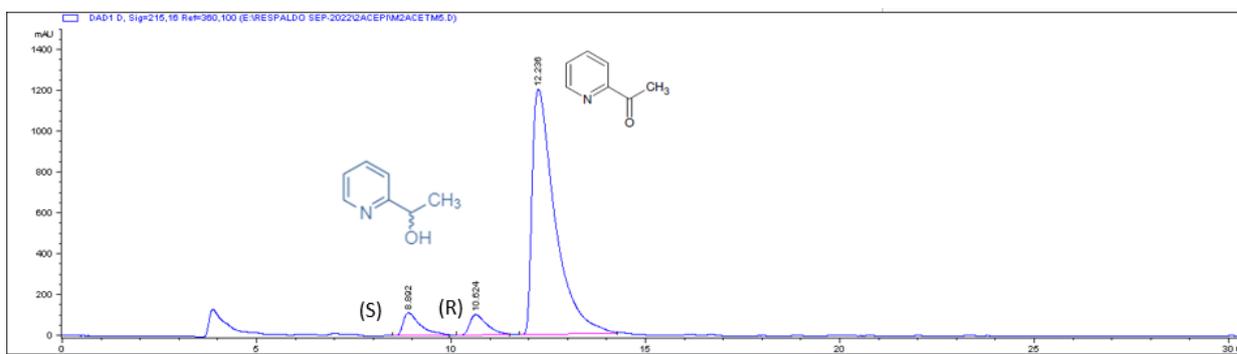


**Figura A1-5.** Cromatograma obtenido por CG de la reducción de **1c** a **2c**, utilizando frijol bayo con SA de fosfatos.

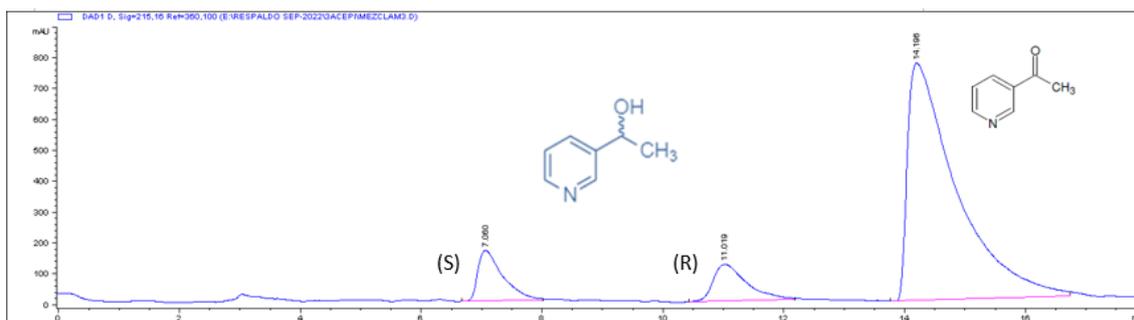


**Figura A1-6.** Cromatograma obtenido por CG de la reducción de **1d** a **2d** utilizando frijol bayo con SA de fosfatos.

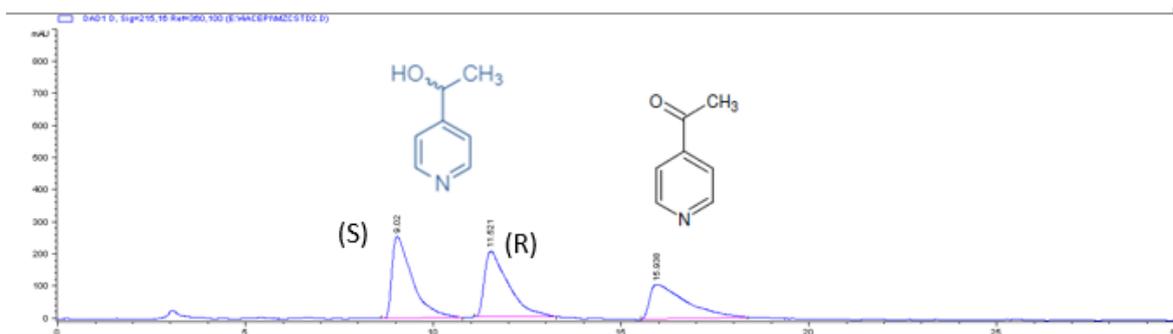
### 10.1.2 Anexo 2. Cromatogramas obtenidos por CLAR



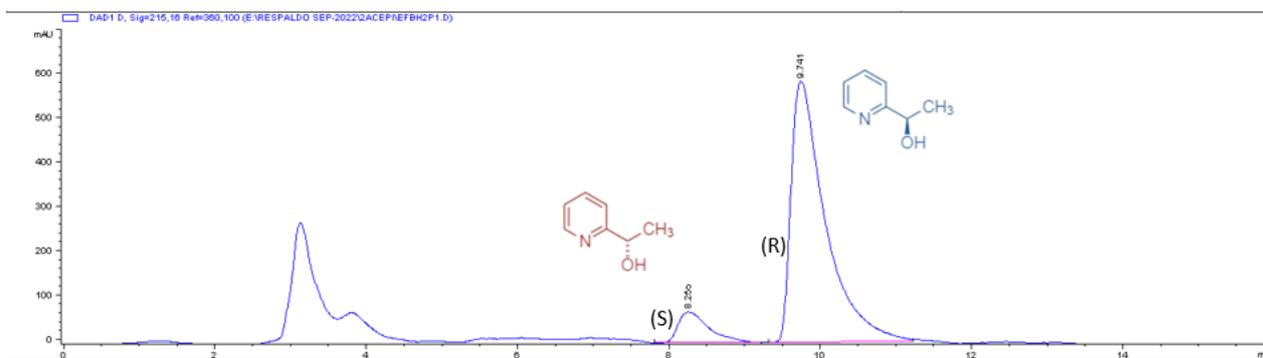
**Figura A2-1.** Cromatograma obtenido por HPLC de la mezcla de estándares de 2-acetilpiridina (**1b**) y su respectivo alcohol 1-(2-piridil)-etanol (**2b**).



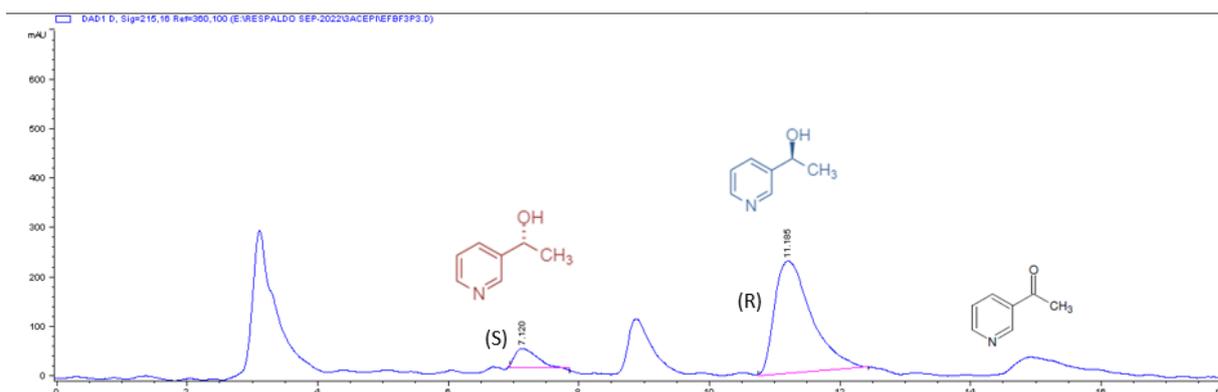
**Figura A2-2.** Cromatograma obtenido por HPLC de la mezcla de estándares de 3-acetilpiridina (**1c**) y su respectivo alcohol 1-(3-piridil)-etanol (**2c**).



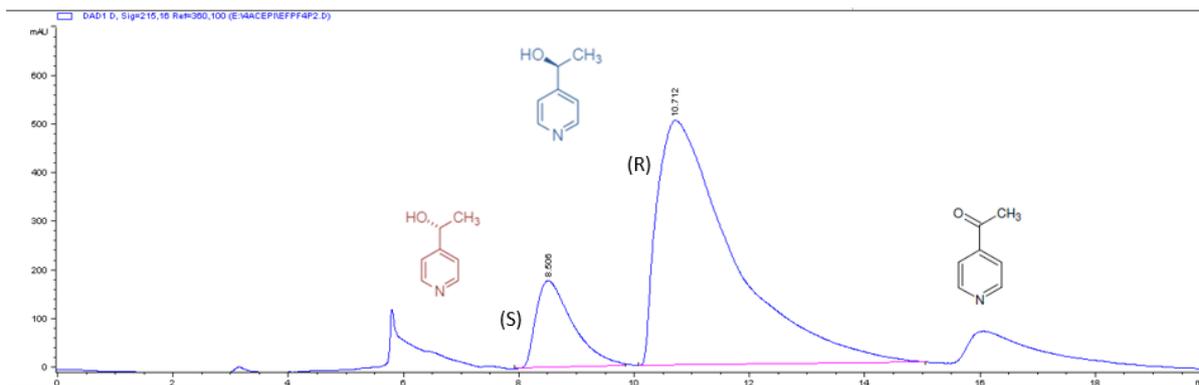
**Figura A2-3.** Cromatograma obtenido por HPLC de la mezcla de estándares de 4-acetilpiridina (**1d**) y su respectivo alcohol 1-(4-piridil)-etanol (**2d**).



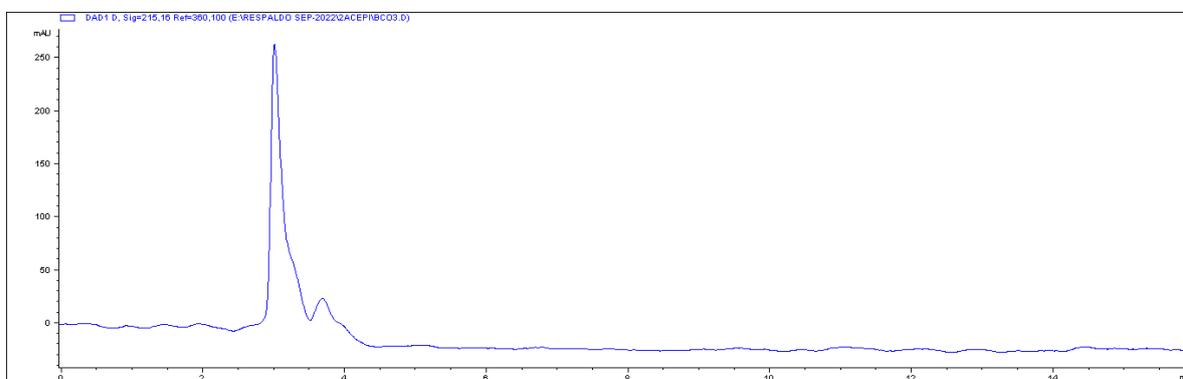
**Figura A2-4.** Cromatograma obtenido por HPLC de la reducción 2-acetilpiridina (**1b**) a 1-(4-piridil)-etanol (**2b**), utilizando de frijol Pinto con SA de fosfatos.



**Figura A2-5.** Cromatograma obtenido por HPLC de la reducción 3-acetilpiridina (**1c**) a 1-(3-piridil)-etanol (**2c**), utilizando de frijol Pinto con SA de fosfatos.



**Figura A2-6.** Cromatograma obtenido por HPLC de la reducción 4-acetilpiridina (**1d**) a 1-(4-piridil)-etanol (**2d**), utilizando de frijol Pinto con SA de fosfatos.



**Figura A2-7.** Cromatograma obtenido por HPLC de la fase móvil (90:10) Hexano: Isopropanol.

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

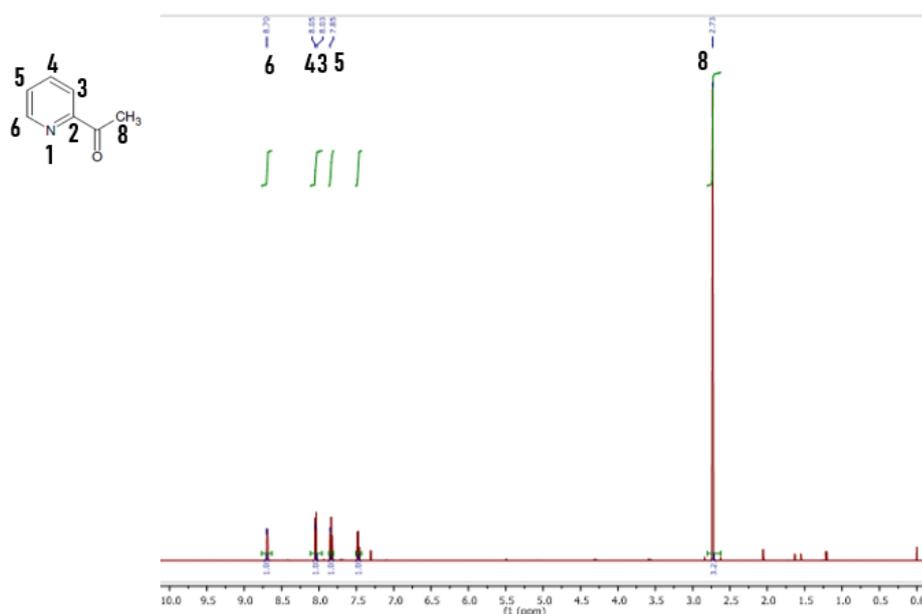


Figura A3-1. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) de 2-acetilpiridina (**1b**)

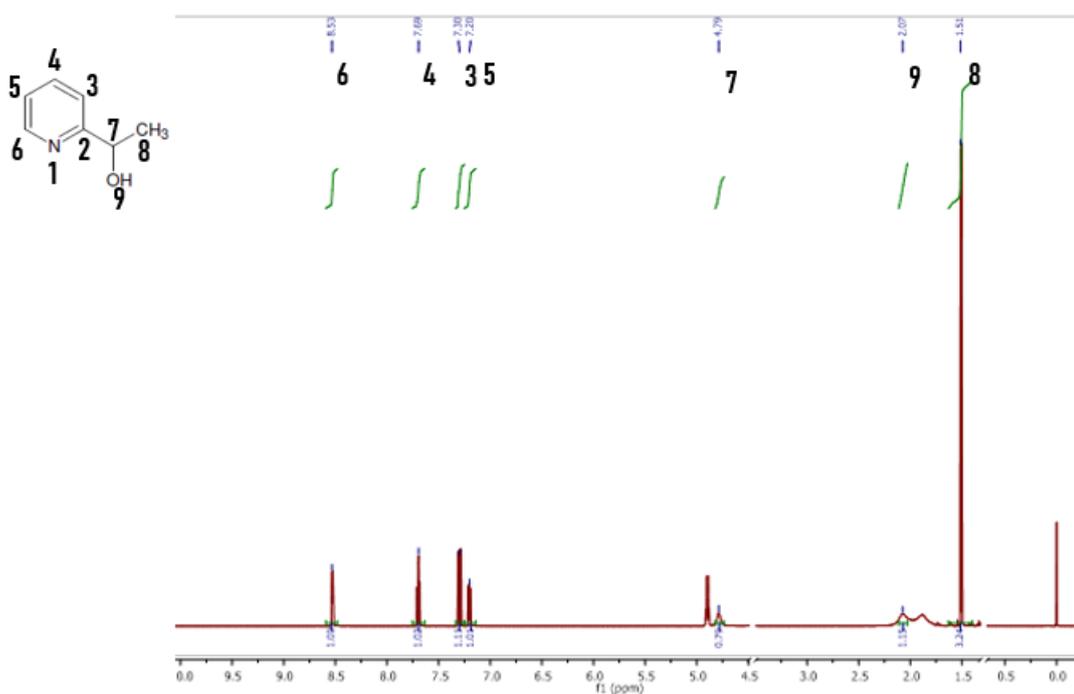


Figura A3-2. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) de 1-(4-piridil)-etanol (**2b**)

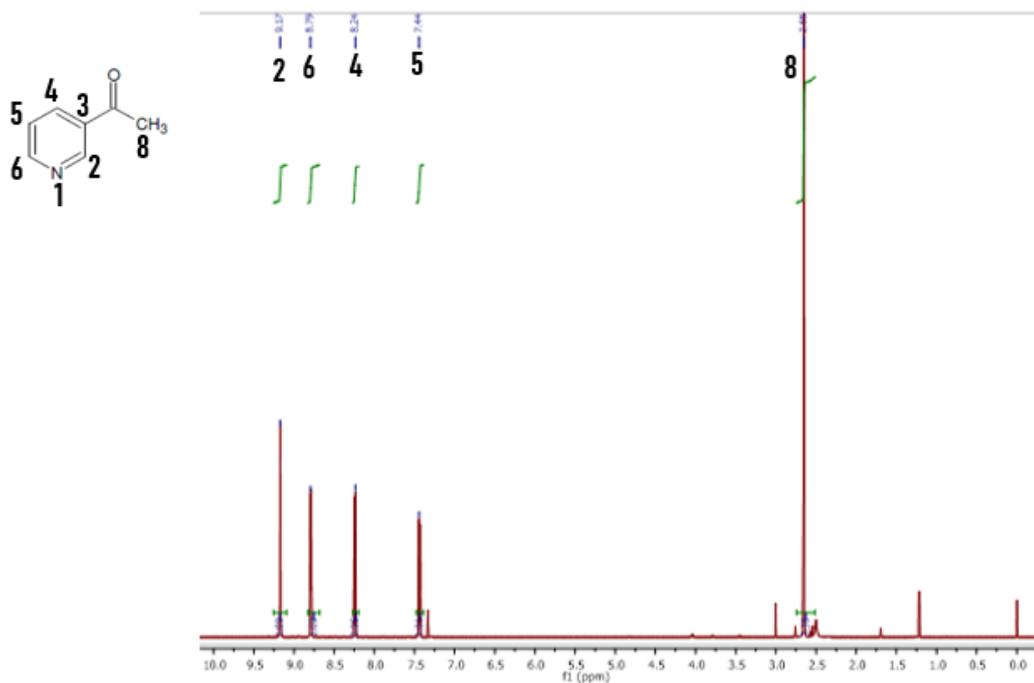


Figura A3-3. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) de 3-acetilpiridina (1c)

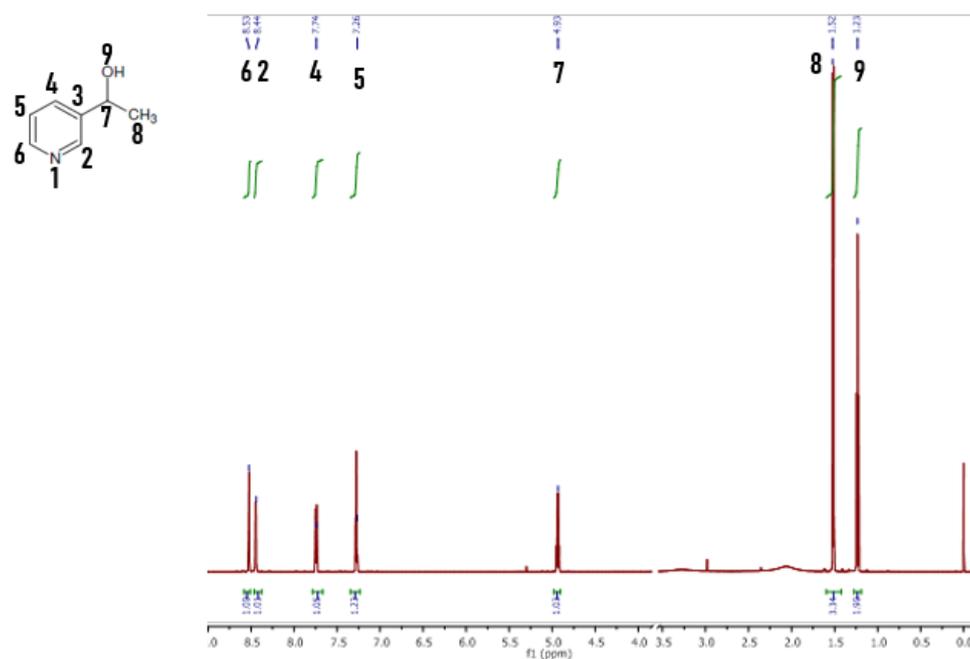


Figura A3-4. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) de 1-(3-piridil)-etanol (2c)

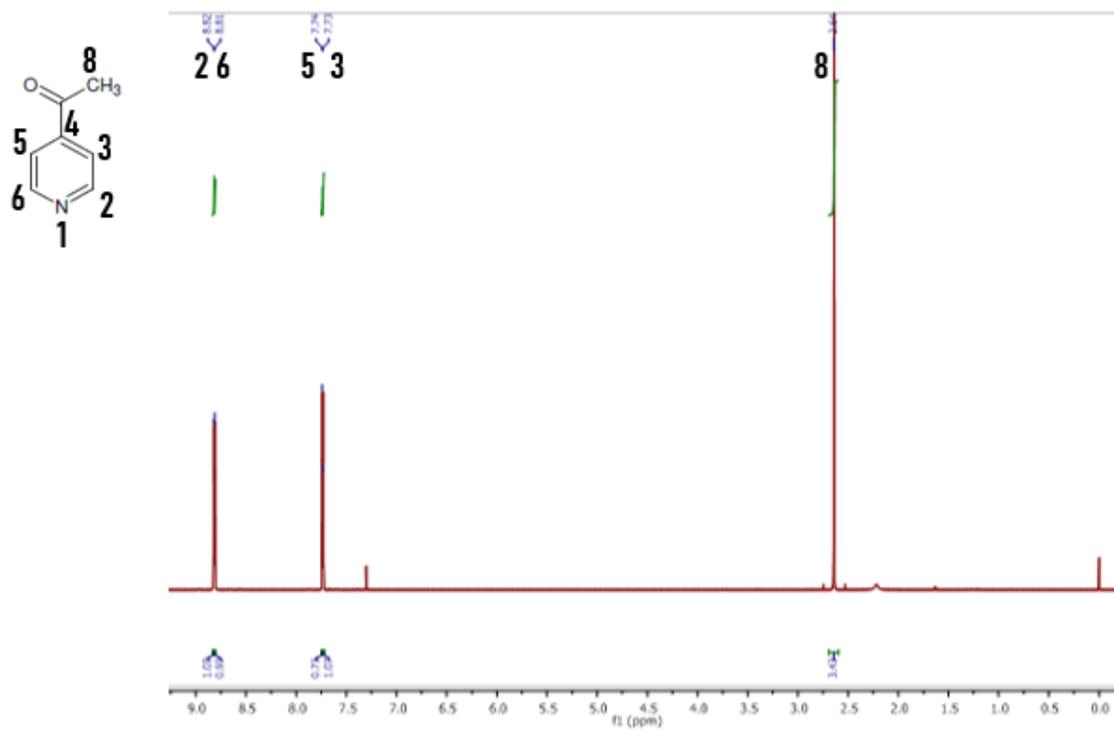


Figura A3-5. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) de 4-acetilpiridina (1d)

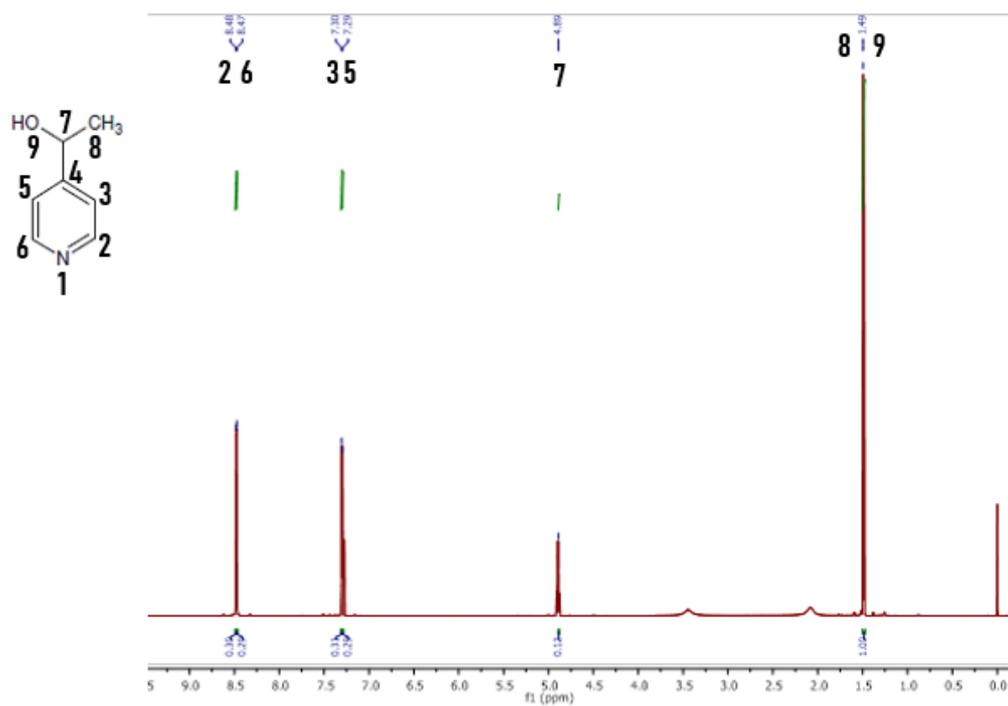


Figura A3-6. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) de 1-(4-piridil)-etanol (2d)

## 10.1.4 Anexo 4. Trabajos presentados en congresos



### Evaluación del efecto del medio de reacción en la actividad reductasa de *Phaseolus vulgaris* (Frijol)



SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO A.C.  
"La química nos une"

**Olga Jazmín Morales Alcantar, R. Marlen Martínez Casares\*, Aida Solís Oba, Liliana Hernández Vázquez, Julia Cassani Hernández, Hector Luna Contla**  
 Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México.  
 2183030035@alumnos.xoc.uam.mx ; \*rmartinezc@correo.xoc.uam.mx

Introducción

Una alternativa atractiva a la síntesis orgánica tradicional, es el uso de extractos de plantas como fuentes de biocatalizadores, estos presentan ventajas como son: la regio-, quimio- y estereoselectivas,<sup>1</sup> disminuyen la formación de subproductos y residuos, son baratos, fáciles de utilizar<sup>2</sup> y se degradan sin generar productos tóxicos.<sup>4</sup> Entre los biocatalizadores encontramos a las reductasas, que catalizan la reacción de aldehídos o cetonas a los correspondientes alcoholes.<sup>3</sup>

Objetivo

Evaluar la actividad reductasa de los extractos acuosos de las variedades de *Phaseolus vulgaris* de las variedades: bayo, ayocote, flor de mayo y pinto, así como el efecto de la solución amortiguadora sobre la reacción biocatalizada.

Metodología

La reducción de benzaldehído a alcohol bencílico (**Esquema 1**) se utilizó como reacción de referencia, para poder determinar y comparar la actividad reductasa con base en el % de conversión (% Conv) de los extractos acuosos de las diferentes variedades de frijol.



Benzaldehído → Alcohol bencílico

**Esquema 1.** Reacción de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico.

Se comparó la influencia de diferentes tipos de solución amortiguadora en la actividad reductasa. Se prepararon soluciones amortiguadoras de: Fosfatos (FO), Tris-HCL (TR), HEPES (HE), todos en concentración 0.15 M, pH 8.1 y se compararon al utilizar agua como medio de reacción.

Resultados

**Tabla 1.** Porcentaje de conversión de benzaldehído utilizando agua y diferentes soluciones amortiguadoras como medio de reacción a las 24 h.

Frijol	% Conv agua	% Conv TR	% Conv FO	% Conv HE
F. Bayo	2.5 ± 0.5	68.0 ± 6.3	83.1 ± 11.9	74.4 ± 14.8
F. Ayocote	2.4 ± 0.7	72.2 ± 7.9	62.4 ± 0.6	59.6 ± 10.4

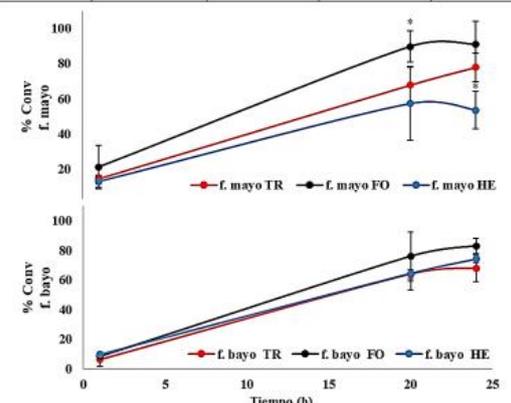
Conclusión

Las soluciones amortiguadoras que se utilicen como medio de reacción, tienen un efecto muy importante sobre el % de conversión. Para cada variedad de frijol bayo, mayo, ayocote y pinto, la solución amortiguadora afectó de manera diferente la actividad reductasa. La solución amortiguadora de fosfatos da las mayores % de reducción con f. mayo y bayo, con f. ayocote el mayor % de conversión se obtuvo con la solución amortiguadora de TR, mientras que con f. pinto el mayor % de conversión se obtuvo con la solución amortiguadora de HE.

Referencias

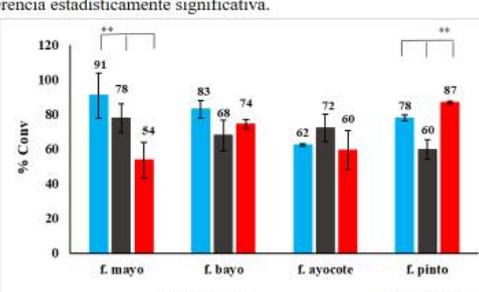
1. Luna, H. Rev. Soc. Quím. Mex 2004, 48, 211–219.
2. Solís, A.; Martínez, R. M.; Cervantes, F.; Pérez, H. I.; Manjarrez, N.; Solís, M. Biocatal. Biotransformation 2019, 37 (2), 152–157.
3. Abdelrahem, E. M. M.; Busch, H.; Hanefeld, U.; Tonin, F. React. Chem. Eng. 2019, 4 (11), 1878–1894.

Gráfica 1.



**Gráfica 1.** Cinética de la reacción de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico con Frijol bayo y flor de mayo en TR, FO y HE. \* p < 0.05 diferencia estadísticamente significativa.

Gráfica 2.



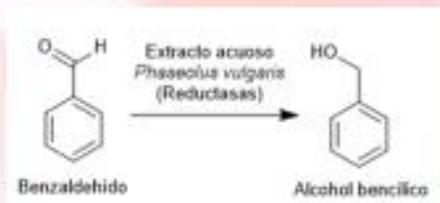
**Gráfica 2.** Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico, utilizando como biocatalizador los frijoles bayo, flor de mayo, ayocote y pinto con las 3 soluciones amortiguadoras, \* p < 0.05 y \*\*\* p < 0.001 diferencia estadísticamente significativa.

## Introducción

La biocatálisis juega un papel relevante en el diseño de procesos sostenibles para la preparación de moléculas orgánicas, en el descubrimiento de actividad enzimática en disolventes orgánicos, así como, en la posibilidad de modificar la actividad y estabilidad de los biocatalizadores por medio de la inmovilización.<sup>4</sup> La inmovilización consiste en mantener la enzima (biocatalizador) unida o atrapada en un soporte físico, conservando su actividad catalítica y permitiendo el flujo de sustratos y productos.<sup>5</sup> El uso de enzimas inmovilizadas actualmente es considerado de gran interés debido a las ventajas que presenta, por ejemplo, permiten un uso continuo, reutilización, control de las concentraciones de proteína empleada, mejora la estabilidad, especialmente frente a disolventes orgánicos y temperaturas más altas, por lo anterior, se convirtió en un proceso de rutina para la fabricación de muchos productos, en la industria farmacéutica, química y alimentaria.<sup>5,6</sup>

## Metodología

La reducción de benzaldehído a alcohol bencílico (Esquema 1) se utilizó como reacción de referencia, para poder determinar y comparar la actividad reductasa con base en el % de conversión de los extractos acuosos de las diferentes variedades de frijol.



**Esquema 1.** Reacción de reducción de benzaldehído a alcohol bencílico.

A 1 mL de extracto acuoso o su equivalente en peso para el liofilizado o inmovilizado, 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 24 h se extrajo con éter etílico (2 x 0.5 mL), se centrifugó a 13000 rpm, 5°C durante 5 min, se secó con sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), el % de conversión se determinó por Cromatografía de gases (CG). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## Conclusion

Se comparó la actividad reductasa de los extractos acuosos, polvo liofilizado e inmovilizados de los frijoles ayocote y pinto. La reducción de benzaldehído con el extracto de frijol pinto fue mayor que con ayocote, pero cuando se inmovilizó la reductasa cruda ese orden se invirtió, la enzima de f. ayocote inmovilizada fue más activa que la f. pinto.

## Objetivo

Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico, para evaluar la actividad reductasa de los extractos enzimáticos de frijol ayocote y pinto inmovilizados

## Resultados

Como se observa en la Tabla 2, la inmovilización no solo mantuvo la actividad biocatalítica de las reductasas, sino que dicha actividad aumentó de manera apreciable, en el caso de la enzima inmovilizada de f. ayocote el incremento en la reducción fue del 35% y con el inmovilizado de f. pinto el aumento fue del 12. Esto se puede deber a que el proceso de inmovilización por adsorción es menos agresivo para la enzima que los procesos químicos, se logró concentrar la enzima, además de aumentar su estabilidad.

Frijol	% Conv. Extracto Acuoso	% Conv. Liofilizado	% Conv. Inmovilizado
F. ayocote	62.4 ± 0.78	44.9 ± 3.96	93.5 ± 4.71
F. pinto	78.0 ± 1.77	47.9 ± 5.15	88.0 ± 3.80

**Tabla 2.** Porcentajes de conversión de los polvos liofilizados, inmovilizados y extracto acuoso

## Referencias

- (4) Fernández V.; Gómez M. Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en la síntesis orgánica. An. Quím. 2017, 113 (1), 27-35.  
(5) Fajardo-Ochoa, R.; Osuna-Castro, J. A.; Villalvázquez-Mendoza, C. INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS Y ENZIMAS. 2011, No. 6, 16.  
(6) Basso, A.; Serban, S. Industrial Applications of Immobilized Enzymes—A Review. Mol. Catal. 2019, 479, 110607.  
<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>



**UADY**  
UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

**Sociedad Química de México, A. C.**

otorga la presente

## CONSTANCIA

a

**Olga Jazmín Morales Alcantar, R. Marlen Martínez Casares, Aida Solis Oba,  
Liliana Hernandez Vazquez, Julia Cassani Hernandez, Hector Luna Contla**

por su participación presentando el Trabajo Estudiantil en Modalidad Cartel Virtual titulado

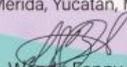
**Evaluación del efecto del medio de reacción en la actividad reductasa  
de *Phaseolus vulgaris* (Frijol). CISQM-QP-CE02**

en el Marco de las Actividades del  
**Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2022,  
"Una Química: Muchas Voces"**

29 de agosto al 2 de septiembre de 2022

Mérida, Yucatán, México.

  
Dr. David Quintanar Guerrero  
Presidente Nacional Electo  
Presidente de Congresos  
Sociedad Química de México, A.C.

  
M. en C. Wendy Fanny Brito Loeza  
Presidente del Comité Organizador Local CISQM 2022  
Pro-secretaria, Comité Ejecutivo Nacional  
Sociedad Química de México, A.C.

  
Dr. Alfonso Ramón García Márquez  
Cordinador del CISQM2022  
Tesorero, Comité Ejecutivo Nacional  
Sociedad Química de México, A.C.



SOCIEDAD QUÍMICA  
DE MÉXICO, A.C.  
"La química nos une"



**UADY**  
UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

**Sociedad Química de México, A. C.**

otorga la presente

## CONSTANCIA

a

**Olga Jazmín Morales Alcantar, R. Marlen Martínez Casares, Aida Solis Oba,  
Liliana Hernandez Vazquez, Julia Cassani Hernandez, Hector Luna Contla**

por su participación presentando el Trabajo Estudiantil en Modalidad Cartel Virtual titulado

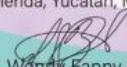
**Inmovilización de reductasas presentes en los extractos acuosos de  
frijoles y su aplicación en la reducción de benzaldehído. CISQM-QP-CE05**

en el Marco de las Actividades del  
**Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2022,  
"Una Química: Muchas Voces"**

29 de agosto al 2 de septiembre de 2022

Mérida, Yucatán, México.

  
Dr. David Quintanar Guerrero  
Presidente Nacional Electo  
Presidente de Congresos  
Sociedad Química de México, A.C.

  
M. en C. Wendy Fanny Brito Loeza  
Presidente del Comité Organizador Local CISQM 2022  
Pro-secretaria, Comité Ejecutivo Nacional  
Sociedad Química de México, A.C.

  
Dr. Alfonso Ramón García Márquez  
Cordinador del CISQM2022  
Tesorero, Comité Ejecutivo Nacional  
Sociedad Química de México, A.C.



SOCIEDAD QUÍMICA  
DE MÉXICO, A.C.  
"La química nos une"

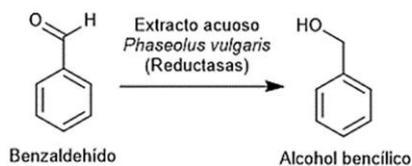
Olga Jazmín Morales Alcantar, R. Marlen Martínez Casares\*, Aida Solís Oba, Liliana Hernández Vázquez, Julia Cassani Hernández, Héctor Luna Contla  
Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México.  
\*rmartinez@correo.xoc.uam.mx

## Introducción

Una alternativa atractiva a la síntesis orgánica tradicional de alcoholes, es el uso de extractos de plantas como fuentes de reductasas, las cuales son más selectivas,<sup>1</sup> generan menos subproductos y residuos, son baratas, fáciles de usar,<sup>2</sup> se degradan sin generar productos tóxicos.<sup>3</sup> Entre los biocatalizadores encontramos a las reductasas, que catalizan la reacción de aldehídos o cetonas a los correspondientes alcoholes.<sup>4</sup>

## Metodología

Los extractos de las variedades de frijol se prepararon con las soluciones amortiguadoras (0.15 M, pH 8.1) de: Fosfatos (FO), Tris-HCL (TR), HEPES (HE) y con agua. Los extractos se mezclaron con benzaldehído disuelto en isopropanol, a 25°C, 24 h, la mezcla se extrajo con éter etílico, el % de conversión se determinó por Cromatografía de gases (CG).



Esquema 1. Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico.

## Conclusión

El tipo de solución amortiguadora tiene un efecto importante sobre el % de conversión. La solución amortiguadora afectó de manera diferente la actividad reductasa de cada variedad de frijol. Los mayores % se obtuvieron con los extractos de los frijoles: a) f. mayo y bayo preparados con la solución amortiguadora FO, b) ayocote con la solución amortiguadora de TR y, c) pinto con la solución amortiguadora de HE. Los frijoles f. mayo y pinto presentaron la mayor actividad reductasa

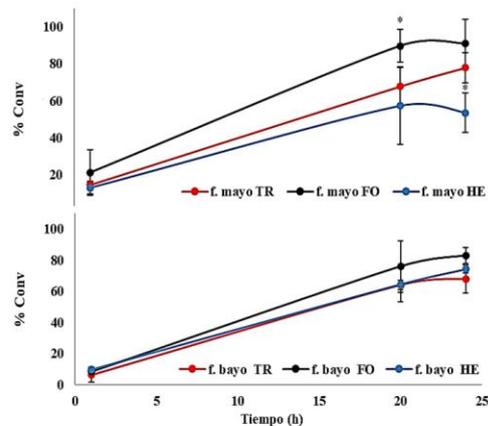
## Referencias

- Luna, H. Rev. Soc. Quim. Mex 2004, 48, 211–219.
- Solís, A.; Martínez, R. M.; Cervantes, F.; Pérez, H. I.; Manjarrez, N.; Solís, M. Biocatal. Biotransformation 2019, 37 (2), 152–157.
- Abdelraheem, E. M. M.; Busch, H.; Hanefeld, U.; Tonin, F. React. Chem. Eng. 2019, 4 (11), 1878–1894.

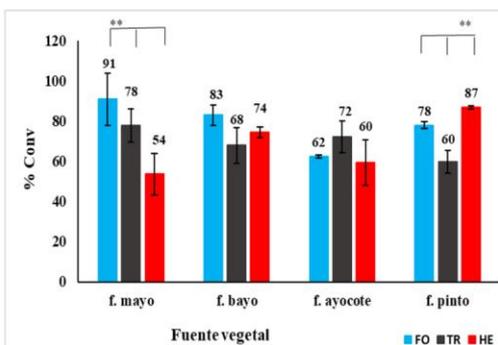
## Objetivo

Evaluar la actividad reductasa de los extractos acuosos de las variedades de *Phaseolus vulgaris*: bayo, ayocote, flor de mayo y pinto, así como el efecto del tipo de solución amortiguadora sobre la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico (Esquema 1)

## Resultados



Gráfica 1. Cinética de la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico con frijoles bayo y flor de mayo en TR, FO y HP.\*  $p < 0.05$  diferencia estadísticamente significativa.



Gráfica 2. Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico, utilizando como fuente de reductasa los frijoles bayo, flor de mayo, ayocote y pinto con las 3 soluciones amortiguadoras, \* $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$  diferencia estadísticamente significativa.

Olga Jazmín Morales Alcantar, R. Marlen Martínez Casares\*, Aida Solís Oba, Liliana Hernández Vázquez, Julia Cassani Hernández, Héctor Luna Contla

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

## Introducción

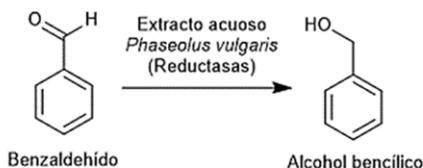
Actualmente, existe una amplia gama de sistemas de reducción, que presentan altos rendimientos, sin embargo, la mayoría de estas reacciones utilizan metales pesados, disolventes orgánicos como medio de reacción, lo que implica daño al medio ambiente.<sup>1</sup> Una alternativa atractiva es el uso de biocatalizadores de origen vegetal. Las aldolceto-reductasas presentes en los extractos de plantas son catalizadores útiles para la reducción específica de aldehídos y cetonas a los correspondientes alcoholes, por ejemplo, la semilla de frijol ha demostrado tener actividad reductasa, sin embargo, no hay reportes de metodologías de inmovilización de la reductasa presente en el extractos acuosos de frijol, ni de su actividad biocatalítica.<sup>2-4</sup> El uso de enzimas inmovilizadas presenta ventajas como la reutilización y aumento en su estabilidad.

## Objetivo

Reducir benzaldehído a alcohol bencílico, usando los extractos acuosos e inmovilizados de frijol ayocote y pinto como fuentes de reductasa

## Metodología

A 1 mL de extracto acuoso o su equivalente en peso del extracto acuoso liofilizado o inmovilizado, se le agregó 0.015 mmol (1.5  $\mu$ L) de benzaldehído, se agitó mecánicamente a 25°C 24h, el % de conversión (% Conv) se determinó por Cromatografía de gases (CG). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.



Esquema 1. Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico.

## Conclusión

Se comparó la actividad reductasa de los extractos acuosos, polvo liofilizado e inmovilizados de los frijoles ayocote y pinto. La reducción de benzaldehído con el extracto acuoso de frijol pinto fue mayor que con ayocote. Pero la reductasa inmovilizada de f. ayocote inmovilizada fue más activa que la de f. pinto. La proporción de celita 1:1 favoreció la conversión con respecto a la proporción 1:4

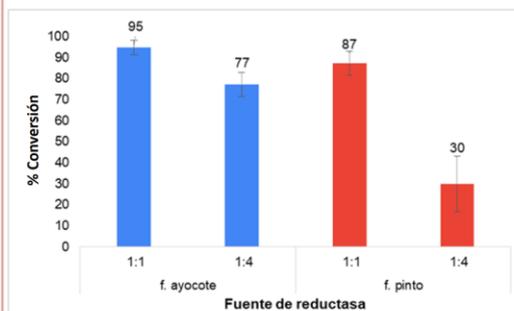
## Referencias

- Solis, A. et al. *Biocatal. Biotransformation* **2019**, 37 (2), 152–157.
- Sengupta, D.; Naik, D.; Reddy, A. R. Update. *J. Plant Physiol.* **2015**, 179, 40–55.
- Abdelraheem, E. M. M.; et al. *React. Chem. Eng.* **2019**, 4 (11), 1878–1894.
- Fajardo-Ochoa, R.; Osuna-Castro, J. A.; Villa Velázquez-Mendoza, **2011**, No. 6, 16.

## Resultados

Tabla 1. Porcentajes de conversión del benzaldehído utilizando los extractos acuosos de frijol ayocote y pinto o los correspondientes liofilizados o inmovilizados

Frijol	% Conv Extracto Acuoso	% Conv Liofilizado
f. ayocote	62.4 $\pm$ 0.78	44.9 $\pm$ 3.96
f. pinto	78.0 $\pm$ 1.77	47.9 $\pm$ 5.15



Grafica 1. Porcentajes de conversión de los extractos acuosos de frijoles ayocote (f. ayocote) y pinto (f. pinto), inmovilizados sobre Celita en relación 1:1 y 1:4.



**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS  
BIOLÓGICOS**  
**Jefaturas de Áreas de Investigación**



Otorgan la presente **CONSTANCIA** a:

Olga Jazmín Morales Alcantar, R. Marlen Martínez Casares, Aida Solís Oba, Liliana Hernández Vázquez, Julia Cassani Hernández, Héctor Luna Contla

Por presentar el cartel titulado

*“Inmovilización de reductasas presentes en los extractos acuosos de Phaseolus vulgaris (frijol)”*

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



**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS  
BIOLÓGICOS**  
**Jefaturas de Áreas de Investigación**



Otorgan la presente **CONSTANCIA** a:

Olga Jazmín Morales Alcantar, Rubria Marlen Martínez Casares, Aida Solís Oba, Liliana Hernández Vázquez,  
Julia Cassani Hernández, Héctor Luna Contla

Por presentar el cartel titulado

*“Evaluación de la actividad reductasa de Phaseolus vulgaris (frijol) en diferentes medios de reacción”*

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

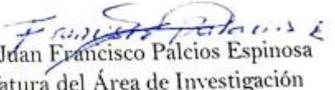
**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS  
BIOLÓGICOS**  
**Jefaturas de Áreas de Investigación**

Otorgan la presente **CONSTANCIA** a:

**Olga Jazmín Morales Alcantar**, Rubria Marlen Martínez Casares, Aida Solís Oba,  
Liliana Hernández Vázquez, Julia Cassani Hernández, Hector Luna Contla  
Por obtener el premio al **mejor cartel** (Eje Biotransformaciones) titulado:  
“Evaluación de la actividad reductasa de *Phaseolus vulgaris* (frijol) en diferentes medios de  
reacción”

En la sesión de carteles del 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 Palcios Espinosa  
Jefatura del Área de Investigación  
Obtención y Producción de Compuestos Orgánicos