

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Nombre del proyecto:

Aplicación de enzimas inmovilizadas en síntesis asimétrica

Alumno:

Saúl Romero Torres

Matrícula: 2193030136

Asesoras:

Dra. Rubria Marlen Martínez Casares

No Eco. 41833

Dra. Aida Solís Oba

No. Eco.2120

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

Fecha inicio: 06/05/2024

Fecha terminación: 06/11/2024

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Métodos para la producción de compuestos enantioméricamente puros	4
2.2 Síntesis asimétrica	Error! Bookmark not defined.
2.3 Biocatalizadores	4
2.4 Fuentes de Obtención de Biocatalizadores	6
2.5 Clasificación de enzimas	6
2.5.1 Oxidoreductasas	Error! Bookmark not defined.
2.5.2 Hidroxinitrilo liasas	7
2.6 Enzimas inmovilizadas	7
2.7 Importancia y aplicación de enzimas inmovilizada en la síntesis asimétrica para la obtención de compuestos con actividad biológica	8
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	9
4. OBJETIVO GENERAL	10
4.1 Objetivos específicos	11
5. Metodología.....	11
5.1 Preparación de los biocatalizadores con actividad hidroxinitriloliasa (HNL)	Error! Bookmark not defined.
5.1.1 Harina desgrasada de semillas como fuente cruda de HNL.....	Error! Bookmark not defined.
5.1.2 HNL semipurificada	Error! Bookmark not defined.
5.1.3 Inmovilización de la HNL semipurificada	Error! Bookmark not defined.
5.2 Evaluación de la actividad enzimática	Error! Bookmark not defined.
5.2.1 Evaluación de la actividad reductasa de los materiales vegetales	Error! Bookmark not defined.
5.2.2 Evaluación de la Actividad enzimática de HNL.....	Error! Bookmark not defined.
5.3 Estudio de reciclado	Error! Bookmark not defined.
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	Error! Bookmark not defined.
7. CONCLUSIÓN.....	18
8. BIBLIOGRAFÍA	15
9. ANEXOS.....	24
9.1 Cartel Congreso LatinXChem 2024	24
9.3 Constancia Diseño de modelos realistas a la hora de estudiar materiales con aplicaciones en catálisis.....	Error! Bookmark not defined.
9.4 Calendario de actividades	28

1. INTRODUCCIÓN

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, las mezclas racémicas son una pareja de compuestos orgánicos estructuralmente idénticos que son imágenes especulares no superponibles (enantiómeros), presentes en el mismo fármaco. Cada enantiómero puede presentar diferentes efectos en el organismo, en donde cada uno de los enantiómeros puede tener actividades biológicas diferentes, uno ser más activo que el otro; también podría ser que un enantiómero sea activo y el otro inactivo y, por último, que uno tenga un efecto beneficioso, mientras que el otro sea tóxico (Guevara-Pulido *et al.*, 2017). 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).

En síntesis asimétrica el utilizar enzimas como biocatalizadores tienen ventajas importantes sobre los catalizadores químicos, ya que los biocatalizadores se pueden usar en condiciones suaves de reacción es decir, las reacciones generalmente se pueden llevar a cabo en un medio acuoso a temperatura ambiental y presión atmosférica, limitando o evitando así la isomerización, la racemización, la epimerización y el reordenamiento (Rossino, 2022); además, los biocatalizadores son recursos renovables, biocompatibles, biodegradables y no peligrosas (Sheldon-Robert, 2016).

Sin embargo, entre los inconvenientes de las enzimas se encuentran que pueden ser desactivadas por la concentración de reactivos, disolvente, temperatura. Una forma de proteger, recuperar y reutilizar la enzima es la inmovilización, además el producto se puede separar fácilmente de la mezcla de reacción, y después del acondicionamiento adecuado, la enzima se puede reciclar, también se ha reportado

que la actividad y la selectividad pueden mejorar (Bolívar, et al., 2016 & Basso, et al., 2020). La inmovilización de las enzimas es un proceso rutinario en la industria para la fabricación de muchos compuestos clave en la industria farmacéutica, química y alimentaria. De acuerdo con diversos estudios se sabe que existen diversas enzimas que provienen de fuentes naturales, como es el caso de las hidroxinitrilo liasas (HNL), las cuales son enzimas que catalizan la adición enantioselectiva de ácido cianhidrico (HCN) a aldehídos o cetonas para obtener cianohidrinas enantiopuras. Las HNL se han encontrado en las semillas de diversas plantas, principalmente en el género *Prunus*, por ejemplo, las (*R*)-HNL que se han obtenido de semilla de almendra, cereza, durazno y capulín, otro género en donde se han reportado es en las semillas de *Pouteria sapota*, que cataliza la adición enantioselectiva de HCN a benzaldehídos orto-sustituídos para dar el correspondiente (*R*)-mandelonitrilo orto-sustituído, con alta porcentaje de conversión y excesos enantiomérico (ee) (Martínez, et al., 2020). Las cianohidrinas son importantes intermediarios para la obtención de compuestos con actividad biológica. Por lo anterior en esta investigación se sintetizarán compuestos enantiopuros utilizando como biocatalizadores enzimas de origen vegetal inmovilizadas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Métodos para la producción de compuestos enantioméricamente puros

En la industria, la síntesis de cualquier producto de interés es realizada a través de métodos químicos, que en general tienen buen rendimiento (cantidad producida/tiempo) pero, en consecuencia, los productos obtenidos son mezclas racémicas, es decir, los estereoisómeros *R* y *S* están presentes en la misma proporción (50:50). Debido a esto existe un interés en la utilización de métodos para producir compuestos enantioméricamente puros, hay tres procesos para obtener moléculas enantiopuras que son: a) resolución cinética, b) fragmentos organometálicos (MOFs), c) síntesis asimétrica. (Fiol Ibars, A. 2015).

- a) La resolución cinética es el método en donde se da la separación total o parcial de dos enantiómeros de una mezcla racémica. La resolución cinética se basa en

la diferencia en la velocidad de reacción de cada uno de los dos enantiómeros de un racemato con un agente quiral (un reactivo, un catalizador), en el caso ideal, la diferencia de la velocidad de reacción es tan elevada que uno de los enantiómeros reacciona muy rápidamente para dar el producto correspondiente, mientras que el otro enantiómero no reacciona y puede ser recuperado al final de la reacción, por lo cual el rendimiento teórico máximo que se puede obtener en una resolución cinética es del 50%. Como ejemplo, se reportó la resolución cinética de los heterociclos racémicos de 1H,3H-tiazolo[3,4-a]bencimidazolina, moléculas de interés industrial (Villamil, *et al.*, 2023).

- b) Las MOFs son soportes sólidos utilizados en la catálisis heterogénea. Son catalizadores con gran adaptabilidad, debido a la gran variedad de topologías y tamaños de poro muestran una excelente estabilidad en amplios rangos de pH y temperatura.
- c) La síntesis asimétrica permite la preparación de compuestos enantioméricamente puros a partir de sustratos proquirales empleando un catalizador homoquiral. Estas reacciones son estereoselectivas; y estereoespecífica si uno de los productos se forma exclusivamente. El catalizador quiral puede ser enzimas, moléculas orgánicas simples, o metales de transición con ligandos quirales.

La síntesis asimétrica se ha desarrollado en tres pilares catalíticos: la catálisis organometálica, la organocatálisis y la biocatálisis (Guevara-Pulido *et al.*, 2017). La biocatálisis y el uso de biocatalizadores presenta ventajas importantes sobre los catalizadores químicos, lo que ha promovido su empleo ya que pueden usarse en condiciones de reacción suaves, es decir, las reacciones generalmente se pueden llevar a cabo 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, biocatalizadores presentan propiedades que los catalizadores inorgánicos no poseen, como selectividad por sustrato, enantioselectividad; otra ventaja de los biocatalizadores es que son recursos renovables, biocompatibles, biodegradables y no peligrosas (Sheldon-Robert, 2016).

2.2 Biocatálisis

Los biocatalizadores son proteínas que denominamos enzimas, son producidas por los sistemas vivos con finalidad catalítica, para facilitar las transformaciones químicas que tienen lugar a partir de los nutrientes en todos los organismos vivos y, debido a su amplia distribución en la naturaleza, se han empleado en las últimas décadas como catalizadores en síntesis orgánica para la preparación de compuestos como: fármacos, productos agroquímicos y otros productos con actividad biológica. Los principales biocatalizadores son: enzimas, uno de los factores que ha promovido el empleo de biocatalizadores es la elevada estereoselectividad, que rara vez es alcanzable a través de métodos químicos convencionales utilizando catalizadores químicos (Cui, J. *et al.*, 2019).

En los procesos biocatalizados se pueden usar como fuentes enzimáticas células enteras y/o enzimas aisladas, que pueden ser de origen animal, vegetal o microbiana y las enzimas pueden estar en forma libre o inmovilizada. La elección de usar una u otra dependerá de diversos factores como el tipo de reacción, la necesidad de cofactores, el costo y la escala a la cual se lleve a cabo el proceso (Singh, *et al.*, 2024)

También se han reportado una gran variedad de plantas como fuentes ricas de enzimas que han sido utilizadas como biocatalizadores.

2.3 Fuentes de Obtención de Biocatalizadores

Los microorganismos han sido la fuente principal de enzimas, debido a que son una fuente muy versátil, los cuales pueden ser aislados de nuevas y diferentes fuentes naturales, encontrando nuevos biocatalizadores (Cano, *et al.*, 2020).

2.4 Clasificación de enzimas

La International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) ha clasificado a las enzimas en seis grupos, de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan (Cornish-Bowden, A., 2014), se clasifican en 4 grandes grupos: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas.

2.4.1 Hidroxinitrilo liasas

Las hidroxinitrilo liasas (HNL) ´tambi3n conocidas como oxinitrilasas son enzimas que catalizan la adici3n enantioselectiva de cianuro a aldeh3dos o cetonas, para formar cianohidrinan3s 3pticamente puras, las cuales son intermediarias importantes en la s3ntesis de compuestos con actividad biol3gica como f3rmacos y agroqu3micos. Las cianohidrinan3s son bloques sint3ticos importantes para la obtenci3n de sustancias con actividad biol3gica. Los grupos hidroxilo y nitrilo de las cianohidrinan3s pueden transformarse en otros compuestos quirales como α -hidroxialdeh3dos y cetonas, β -aminoalcoholes, α -fluorocianuros, etc (Wu, *et al.*, 2020). Esto ha provocado inter3s en el desarrollo de procedimientos m3s eficientes, enantioselectivos y vers3tiles para la adici3n de cianuro a aldeh3dos y cetonas.

Las plantas son las principales fuentes de HNL con diferente esereoespecificidad (*R*)-HNL o (*S*)-HNL; plantas reportadas como fuentes de (*R*)-HNL son plantas del g3nero *Pronus* (Bhunya *et al.*, 2009; Liu, *et al.*, 2005; Nanda, *et al.*, 2006; Roberge, *et al.*, 2007; Sol3s, *et al.*, 2011), *Eriobotrya japonica* (Ueatrongchit, *et al.*, 2008), *Passiflora edulis*, *Chaenomeles sinensis*, *Sorbus aucuparia* (Asano, *et al.*, 2005), *Vicia sativa* L. (Han, *et al.*, 2006), *Cydonia oblonga*, *Cucumis melo* (Hern3ndez, *et al.*, 2004). Mientras que se han reportado otras plantas como fuentes de (*S*)-HNL en *Ximenia americana* L., *Sorghum bicolor*, *Manihot esculenta* (Zheng, *et al.*, 2013), *Hevea brasiliensis* (Hanefeld, *et al.*, 1999), *Anona muricata* (Sol3s, *et al.*, 2003), *Baliospermum montanum* (Dadashipour, *et al.*, 2011).

Las semillas de *Pouteria sapota* son una de las pocas fuentes de HNL que cataliza la adici3n enantioselectiva de HCN a aldeh3dos o cetonas, para formar cianohidrinan3s 3pticamente puras, las cuales son intermediarias importantes en la s3ntesis de compuestos con actividad biol3gica como f3rmacos y agroqu3micos.

2.5 Cianohidrinan3s

Las cianohidrinan3s son intermediarios importantes en la preparaci3n de compuestos quirales como α -hidrox3cidos y sus 3steres, α -amino3cidos, α -hidroxialdeh3dos, glicoles y α -hidroxicetonas, presentes en f3rmacos, vitaminas, aditivos alimenticio y

agroquímico (**Figura 1a**), por ejemplo (*R*)-salbutamol y (*R*)-terbutilna, los cuales son broncodilatadores; la norstatina que es un intermediario para la síntesis de agentes anticancerígeno y antivirales inhibidores de la proteasa de virus de inmunodeficiencia humana VIH; enalapril que se utiliza en el tratamiento de la hipertensión renovascular (**Figura 1b**) y algunos tipos de insuficiencia cardíaca (Nanjo, *et al.*, 2019; Yerabolu, *et al.*, 2017; Tchesnokov, *et al.*, 2019; Wu, *et al.*, 2020; Wu, *et al.*, 2021).

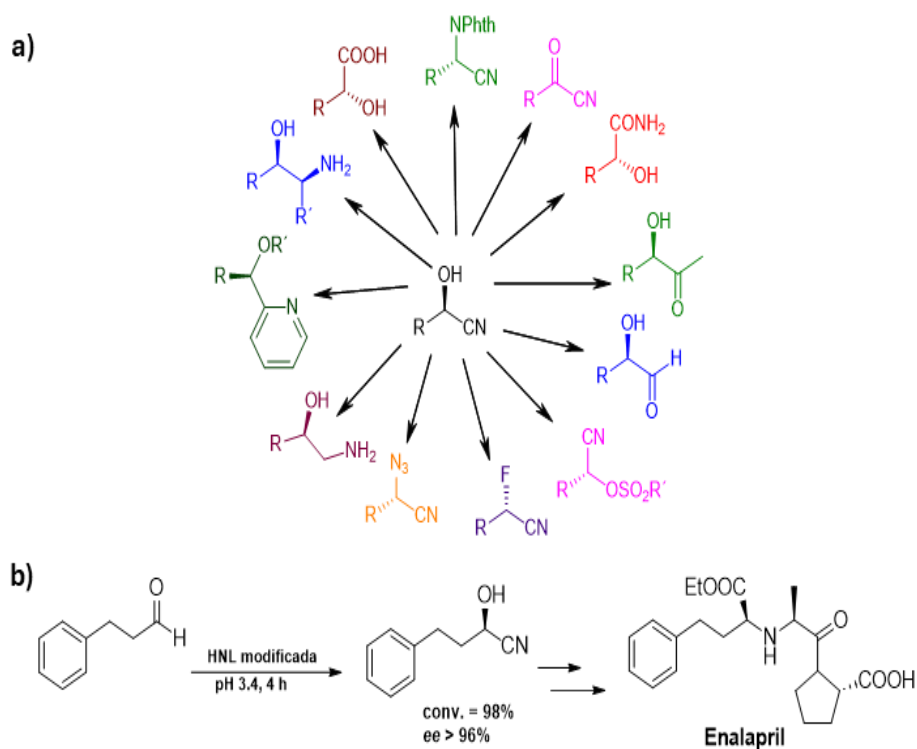


Figura 1. a) Obtención de diferentes intermediarios a partir de cianohidrina, b) Síntesis de Enalapril catalizada por hidroxinitrilo liasas (HNL).

2.6 Enzimas inmovilizadas

El término enzimas inmovilizadas se refiere a enzimas físicamente confinadas o localizadas en una región definida del espacio con retención de sus actividades catalíticas que pueden utilizarse de forma repetida (Chauhan, S. *et al.* 2015). La inmovilización de enzimas se utiliza para mejorar las características catalíticas de las enzimas frente a varias formas de desnaturalización, así como para hacer

económicamente viable el uso de enzimas costosas reforzando su uso repetido. En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: la retención física y la unión química.

Durante los últimos años, se han logrado abundantes avances en el desarrollo de enzimas oxidativas inmovilizadas con enfoque en encontrar nuevos materiales de soporte, mejorar los métodos de inmovilización y sus aplicaciones. Hoy en día, las enzimas oxidativas inmovilizadas son ampliamente aceptadas como una forma ecológica de afrontar el desafío de las altas cantidades de microcontaminantes en la naturaleza (Shakerian, *et al.*, 2020).

2.7 Importancia y aplicación de enzimas inmovilizada en la síntesis asimétrica para la obtención de compuestos con actividad biológica

El uso de enzimas inmovilizadas en la industria se está convirtiendo en un proceso rutinario para la fabricación de muchos compuestos clave en la industria farmacéutica, química y alimentaria. Algunas enzimas, como las lipasas, son naturalmente robustas y eficientes, pueden usarse para la producción de muchas moléculas diferentes y han encontrado amplias aplicaciones industriales. Algunas enzimas como las transaminasas, han requerido ingeniería de proteínas para poder aplicarse en la fabricación industrial. Para todas las enzimas, la posibilidad de ser inmovilizadas y utilizadas en una forma heterogénea aporta importantes ventajas industriales y ambientales, como un procesamiento posterior simplificado u operaciones de proceso continuo y con un gran número de aplicaciones a gran escala con beneficios para las industrias alimentaria, química, farmacéutica, cosmética y de dispositivos médicos, algunas de ellas apenas reportadas antes (Basso, A., & Serban, S. 2020).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Dada la diferente actividad farmacológica de los enantiómeros de un fármaco, en donde uno puede ser activo y el otro inactivo o tóxico, surge la necesidad de obtener fármacos enantioméricamente puros. Sin embargo, los compuestos que son obtenidos mediante un proceso sintético convencional suelen ser mezclas

racémicas. En este caso, para poder desarrollar comercialmente uno de los enantiómeros, se suelen utilizar diferentes estrategias, como la síntesis asimétrica. La síntesis asimétrica garantiza altos rendimientos, sin embargo, implica el uso de metales pesados o hidruros, algunas sustancias inflamables, condiciones duras de reacción y gasto intensivo de energía e implica el uso de materia primas no renovables. El uso de enzimas como biocatalizadores es una alternativa verde para la producción de compuestos enantioméricamente puros.

Los procesos biocatalíticos desempeñan un rol importante en síntesis orgánica, ofreciendo alternativas sostenibles a los procesos químicos convencionales, estos procesos presentan un menor impacto ecológico al tener en cuenta los reactivos y disolventes empleados, además con el proceso de inmovilización las enzimas pueden ser reutilizadas en varios ciclos de síntesis. El uso de hidroxinitriloliasas (HNL) como biocatalizadores se ha convertido en un método eficaz para obtener productos de interés como lo son las cianohidrinan ópticamente activas, que forman parte de intermediarios importantes en la preparación de compuestos quirales como α -hidroxiácidos y sus ésteres, α -aminoácidos, α -hidroxialdehídos, glicoles y α -hidroxicetonas presentes en fármacos, vitaminas, aditivos alimenticio y agroquímico, ejemplo de ellos es el (*R*)-salbutamol, el (*R*)-terbutilna, los cuales son broncodilatadores o la norstatina la cual es un intermediario para agentes anticancerígeno e inhibidores de la proteasa de VIH, todo estos se obtienen a partir de las cianohidrinan.

4. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar compuestos enantiopuros utilizando como biocatalizadores enzimas de origen vegetal inmovilizadas

4.1 Objetivos específicos

1. Utilizar desechos vegetales como semillas y vainas como fuentes de biocatalizadores con aplicación en síntesis asimétrica.
2. Llevar a cabo el estudio de enzimas inmovilizadas como biocatalizadores aplicados en síntesis asimétrica.
3. Desarrollar una metodología para llevar a cabo transformaciones químicas empleando enzimas inmovilizadas, con la finalidad de obtener compuestos ópticamente puros.
4. Determinar la cantidad de proteína en los materiales vegetales utilizados como fuente de biocatalizador.
5. Reutilizar las enzimas inmovilizadas en varios ciclos de síntesis.

5. Metodología

Las semillas de mamey (*Pouteria sapta*) se obtuvieron de frutos disponibles comercialmente. Los disolventes fueron grado analítico de Tecsiquim, el 2-clorobenzaldehído se adquirió de Aldrich, y se utilizaron sin ninguna purificación adicional.

5.1 Preparación de Harina desengrasada de semillas como fuente cruda de HNL

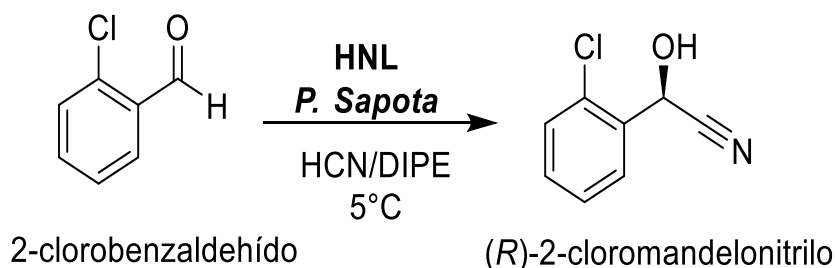
Las semillas se obtuvieron de frutos maduros adquiridos en un mercado local. Se quita la capa superior y el tegumento de las semillas, se molió con acetona en una licuadora, a 4 °C, se filtró la suspensión y el proceso se repitió tres veces, el polvo resultante se secó, tamizó y se utilizó como fuente de *R*-HNL (HNL-HD), se almacenó a 4 °C hasta su uso. La harina se colocó en pequeñas bolsas de nailon (0.025 mm) para manipular fácilmente la fuente de HNL y realizar el reciclado, ver **figura 2**.



Figura 2. Preparación de la harina desengrasada (HNL-HD) de semillas de mamey (*Pouteria sapota*).

5.2 Evaluación de la Actividad enzimática de HNL

El HCN de solución amortiguadora de KCN/ácido cítrico (0.55 mL, 1 N, pH 5.0, 1.5 eq.) se extrajo con diisopropil éter (DIPE) (2 × 2 mL). Al DIPE saturado con HCN se le añadió 5 % (v/v) de la solución amortiguadora KCN/citratos y 100 mg de la harina desengrasada (HNL-HD) en la bolsa de nailon. La mezcla se agitó durante 10 min a 5 °C, posteriormente se adicionó el 2-clorobenzaldehído (0.54 mmol ó 0.35 mmol), se continuó la agitación a 5 °C por 48h, ver **esquema 1**.



Esquema 1. Adición biocatalizada de HCN a 2-clorobenzaldehído.

Se tomaron 400 μL de la fase orgánica, se secó con sulfato de sodio anhidro. 50 μL de la muestra anterior se diluyeron con 200 μL con hexano: alcohol isopropílico (90:10) y se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), para determinar el % ee. Los 350 μL restantes se utilizaron para la formación de acetatos y determinación del % conversión por cromatografía de gases (CG). Las reacciones se realizaron por triplicado.

5.3 Reciclado de la HNL

Se pesaron 100 mg de HNL y se colocaron en bolsitas de malla de nailon (0.025 mm) para manipular fácilmente la fuente de HNL durante el reciclado, después de las 48 h, las bolsitas se separaron del medio de reacción, ver **figura 3**. Las bolsitas de nailon se lavaron con DIPE entre cada ciclo de reacción y se almacenaron a 5°C hasta su reutilización. Los experimentos se realizaron por triplicado.

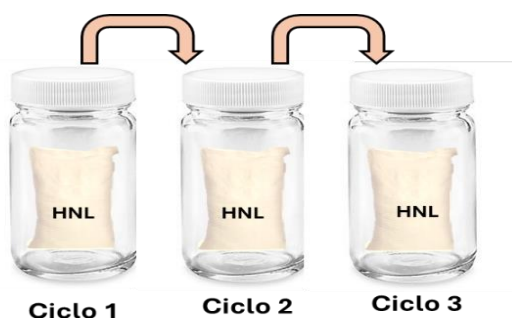
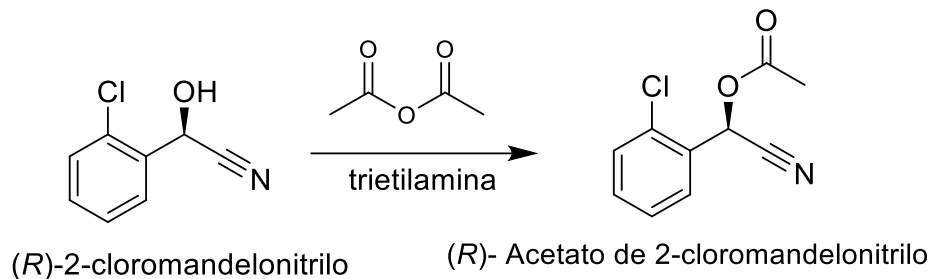


Figura 3. Reciclado de la HNL durante 3 ciclos de reacción

5.4 Síntesis del acetato del 2-cloromadelonitrilo para determinar el % de conversión por GC

El 2-cloromandelonitrilo (3.25 mg) obtenido por medio de biocatálisis, se mezcló con 350 μL de diclorometano, 10 μL de anhídrido acético y 10 μL de trietilamina, se agitó 24 h a temperatura ambiente, se lavó con agua, se secó con Na_2SO_4 y se analizó por GC, para determinar el % conversión, ver **esquema 2**.



Esquema 2. Acetilación de (R)-2-cloromandelonitrilo.

5.5 Métodos de CG para determinar el % de conversión

Para determinar el porcentaje de conversión se utilizó un cromatógrafo de gases HP 6890 equipado con un detector de ionización de flama (FID), la temperatura del inyector y detector fue de 250 °C, columna HP-5 (30 m × 0,32 mm, 0,25 μm, Agilent Technolgies), se empleó una rampa de temperatura de 160°C por 3 minutos con un incremento de 10°C por min hasta 170°C durante 3 min, el tiempo de análisis fue de 7 min se utilizó N₂ como gas portador a 0.8 mLmin⁻¹. Los tiempos de retención (t_R) para 2-clorobenzaldehído y el acetato del 2-cloromandelonitrilo fueron de 2.6 y 5.8 min, respectivamente, ver **figura 4**.

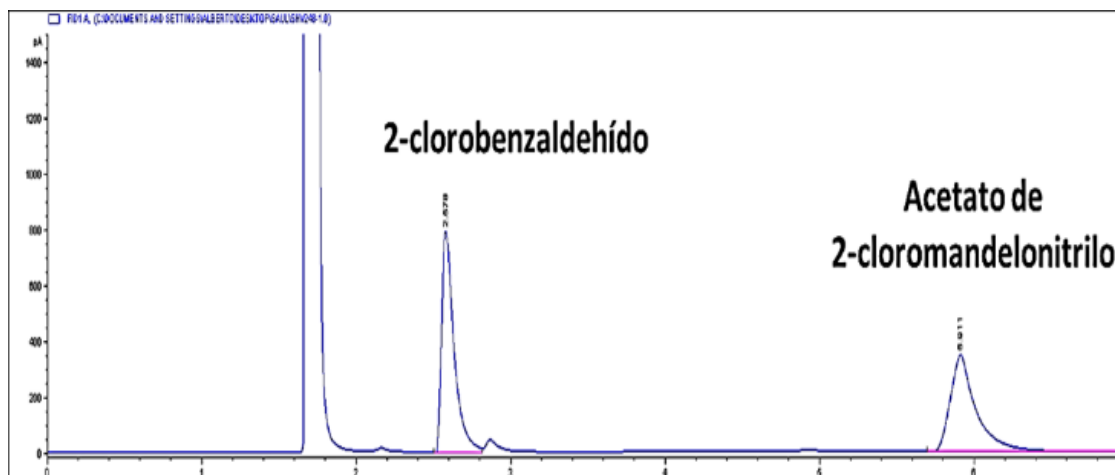


Figura 4. Cromatograma de 2-clorobenzandehído y acetato de 2-cloromandelonitrilo por CG.

5.6 Métodos de HPLC para determinar el % de exceso enantiomérico

El porcentaje de exceso enantiomérico se determinó por HPLC en un equipo Agilent 1100, se utilizó una columna quiral Chiralcel OJ-H, fase móvil hexano:isopropanol

(96:4) con una velocidad de flujo de 1 mL/min, el tiempo de análisis fue de 21 min. Los tiempos de retención para (*R*)-2-cloromandelonitrilo y (*S*)-2-cloromandelonitrilo fueron de 16.6 y 18.0 min, respectivamente, ver **figura 5**.



Figura 5. Cromatograma de 2-clorobenzaldehído y (*R*) y (*S*)-2-cloromandelonitrilo por HPLC.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la determinación de la actividad enzimática, se llevaron a cabo 10 ciclos con una concentración de 0.35 mmol de sustrato (2-Clorobenzaldehído) donde el porcentaje de conversión de 2-Clorobenzaldehído a (*R*)-2-Cloromandelonitrilo se analizó mediante CG, en la **figura 6** se muestra un cromatograma de los resultados obtenidos después de la adición biocatalizada de HCN a 2-clorobenzaldehído, el tiempo de retención (t_R) de 2-Clorobenzaldehído es de 2.6 min., mientras que el tiempo de retención del Acetato de (*R*)-2-Cloromandelonitrilo es 5.8 min.

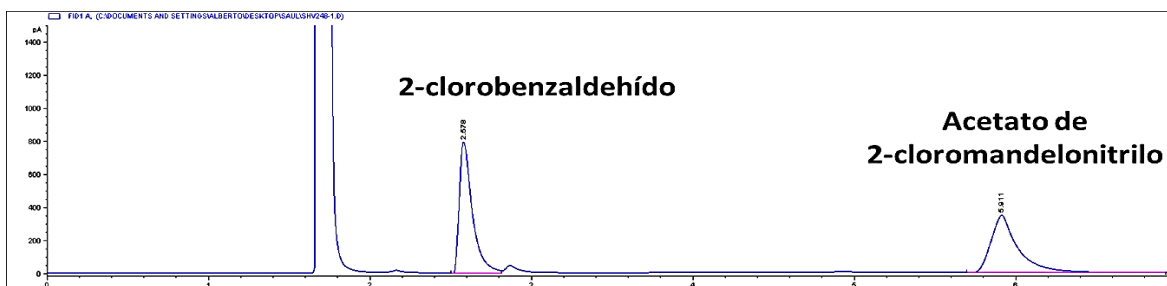


Figura 6. Cromatograma de los compuestos obtenidos después de llevar a cabo la adición de HCN biocatalizada a 2-Clorobenzaldehído y Acetato de (*R*)-2-Cloromandelonitrilo

El ee se determinó por HPLC, en la **figura 7** se observan 2 picos, el tiempo de retención (t_R) de 2-Clorobenzaldehído es de 5.2 min, mientras que el tiempo de retención del (*R*)-2-Cloromandelonitrilo (***R*-2a**) es 16.0 min.

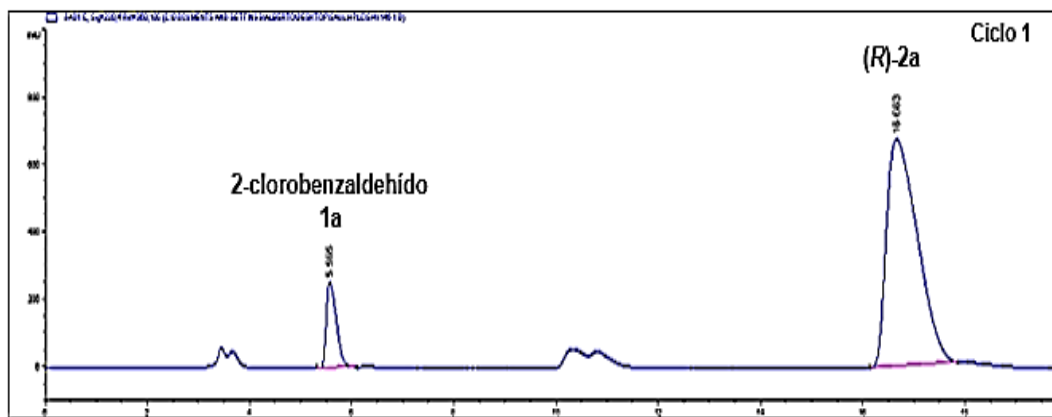
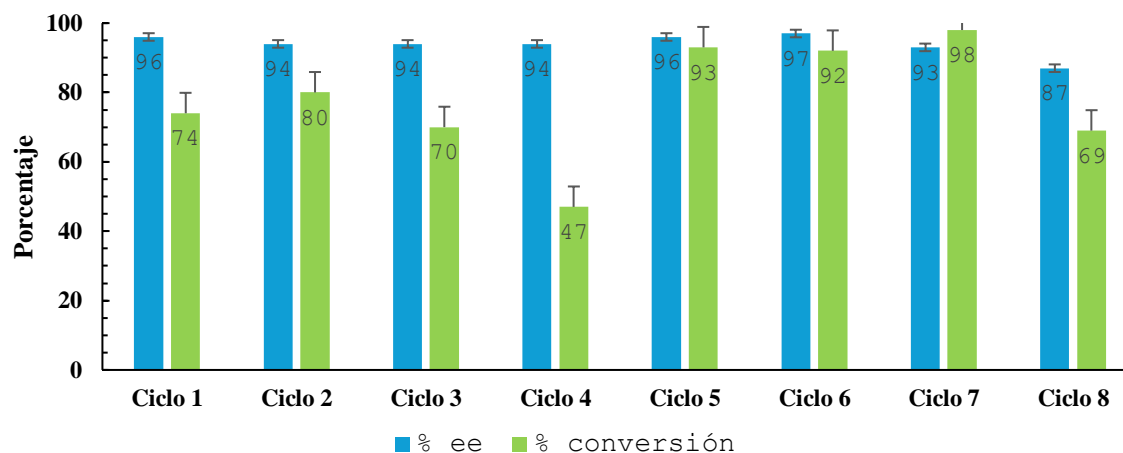


Figura 7. Cromatograma obtenido para determinar el % ee de (*R*)-2-Cloromandelonitrilo

Los resultados de la adición biocatalizada de HCN a 2-Clorobenzaldehído utilizando harina desengrasada de mamey como fuente de HNL se muestran en la **gráfica 1**.



Grafica 1. Resultados de la conversión de 2-Clorobenzaldehído a (*R*)-2-Cloromandelonitrilo

Se puede observar que en la mayoría de los ciclos se obtuvo un % de conversión >60%, aunque en el ciclo 4 se encuentra una disminución de más del 20% en la

conversión. Se observa que el %ee es > 90% a excepción del ciclo 8 donde se obtuvo un ee de 87%.

De acuerdo con (Martínez-Casares *et al.*, 2020) las condiciones de reacción (pH, temperatura, tiempo y concentración de sustrato) afectan el porcentaje de ee y de conversión, por lo que la enzima HNL al retenerse en harina de semillas desgrasada aumenta su estabilidad y mantiene el %ee del 90% y una conversión mayor al 60%. En el ciclo 3 y 4 se observa una disminución en la conversión, lo cual se puede atribuir a algún cambio en las condiciones de la reacción, como lo podría ser el pH, la temperatura y el tiempo de muestreo.

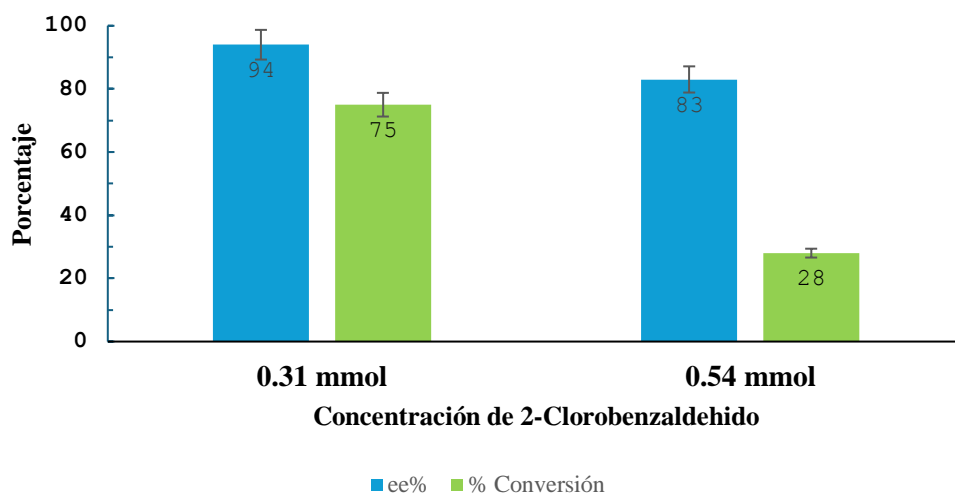
Estos resultados concuerdan con lo reportado por (Martínez *et al.*, 2020) donde también se señala que el contenido de agua del sistema bifásico (micro acuosa) de esta reacción tiene un importante influencia en la actividad de la HNL y %ee de los productos; una fase acuosa insuficiente evita la suficiente hidratación de la enzima y causa la agregación de la enzima, llevando a una pérdida de velocidad inicial; mientras que, un mayor contenido de agua podría ofrecer más flexibilidad a la enzima y aumentar la transferencia de masa mejorando la reacción. Y un exceso de fase acuosa puede acelerar la reacción no enzimática espontánea y provocar una caída en el ee del producto (Zheng, *et al.*, 2013).

En la **tabla 1** se puede observar que a una mayor concentración de sustrato (0.54 mmol) se tiene un % de conversión y un exceso enantiomérico más bajos que al utilizar 0.35 mmol, lo que se puede deber a la alta concentración del sustrato, ya que al saturar todas las moléculas de la enzima genera que la velocidad de la reacción alcance su máximo y la adición de más sustrato no aumenta más la velocidad de la reacción.

Tabla 1. Resultados de la conversión de 2-Clorobenzaldehído a (*R*)-2-Cloromandelonitrilo con una concentración de 0.54 mmol.

Muestra	Sustrato	Ciclo	% de Conversión	% ee
HMC1		1	28.26	80.37
HMC2	2-Clorobenzaldehído (0.54 mmol)	2	27.72	81.47
HMC3		3	28.71	89.27

En la **gráfica 2** se muestra una comparación de ambas concentraciones de sustrato, a una mayor concentración de sustrato (0.54 mmol) se tiene un % de conversión y un exceso enantiomérico más bajos, lo que se puede deber a la alta concentración del sustrato, ya que se pueden saturar todas las moléculas de la enzima generando que la velocidad de la reacción alcance su máximo y la adición de más sustrato no aumenta más la velocidad de la reacción.



Grafica 2. Resultados de la conversión de 2-Clorobenzaldehído a (*R*)-2-Cloromandelonitrilo a diferentes concentraciones de sustrato.

7. CONCLUSIÓN

La reducción biocatalítica de 2-clorobenzaldehído a (*R*)-2-cloromandelonitrilo con harina semipurificada de mamey (fuente de HNL) como enzima se realizó con el propósito de encontrar una alternativa respetuosa con el medio ambiente y sobre todo con un sistema de reacción que fuera económicamente viable al igual que funcional. La HNL presente en la harina de mamey se logró reutilizar en siete ciclos de reacción sin pérdida de su actividad biocatalítica, por lo que se concluye que los constituyentes naturales de la harina actúan como soporte de la enzima y ayudan a mantener su estabilidad, por lo que no es necesario purificar e inmovilizar la enzima. Se demostró que la metodología presentada es una alternativa a la síntesis de

cianohidrinas ópticamente activas, aunque se debe tener un control de todos los parámetros que puedan afectar la actividad enzimática.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Asano, Y., Tamura, K., Doi, N., Ueatrongchit, T., H-Kittikun, A., Ohmiya, T., 2005. Screening for new hydroxynitrilases from plants. *Biosci. Biotechnol. Bioch.* 69, 2349–2357. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.2349>.
2. Basso, A., & Serban, S. (2020). Overview of immobilized enzymes' applications in pharmaceutical, chemical, and food industry. *Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols*, 27-63.
3. 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>.
4. Bolivar, J. M.; Eisl, I.; Nidetzky, B. Advanced Characterization of Immobilized Enzymes as Heterogeneous Biocatalysts. *Catal. Today* 2016, 259, 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.05.004>.
5. Bhunya, R., Mahapatra, T., Nanda, S., 2009. Prunus armeniaca hydroxynitrile lyase (ParsHNL)-catalyzed asymmetric synthesis of cyanohydrins from sterically demanding aromatic aldehydes. *Tetrahedron-Asymmetr.* 20, 1526–1530. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.05.022>.
6. Cano-Flores, A., Gómez, J., Escalona-Torres, I. S., & Velasco-Bejarano, B. (2020). Microorganisms as Biocatalysts and Enzyme Sources. En *Microorganisms*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90338>
7. Chauhan, S., Vohra, A., Lakhanpal, A., & Gupta, R. (2015). Immobilization of commercial pectinase (Polygalacturonase) on celite and its application in juice clarification. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2135-2141.
8. Cornish-Bowden, A. (2014). Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 74-87.
9. Cui, Y., Jiang, L., Yu, R., Shao, Y., Mei, L., & Tao, Y. (2019). β -carboline alkaloids attenuate bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice through

- inhibiting NF-kb/p65 phosphorylation and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Ethnopharmacology*, 243, 112096. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112096>
10. Dadashipour, M., Yamazaki, M., Momonoi, K., Tamura, K., Fuhshuku, K., Kanase, Y., Uchimura, E., Kaiyun, G., Asano, Y., 2011. S-selective hydroxynitrile lyase from a plant *Baliospermum montanum*: molecular characterization of recombinant enzyme. *J. Biotechnol.* 153, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.02.004>.
 11. Fernández, V. G., & Gómez-Dégano, M. J. H. (2017). Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en síntesis orgánica. *Anales de Química de la RSEQ*, 113(1), 27-27.
 12. Fiol Ibars, A. (2015). Rutas de acceso a compuestos enantioméricamente puros. La desracemización Viedma.
 13. García, C., Hoyos, P., & Hernáiz, M. J. (2018). Enzymatic synthesis of carbohydrates and glycoconjugates using lipases and glycosidases in green solvents. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36(2), 131-140.
 14. Guevara-Pulido, J. O., Caicedo, J., David, F., Vela, M., & González, J. (2017). Catálisis asimétrica, una nueva era en la síntesis de fármacos: Historia y evolución. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13(2), 105-116. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2747>
 15. Han, S.-Q., Ouyang, P.-K., Wei, P., Hu, Y., 2006. Enzymatic synthesis of (R)-cyanohydrins by a novel (R)-oxynitrilase from *Vicia sativa* L. *Biotechnol. Lett.* 28, 1909–1912. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9175-7>.
 16. Hanefeld, U., Straathof, A.J.J., Heijnen, J.J., 1999. Study of the (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*: mechanistic implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1432, 185–193. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00108-9).
 17. Hernández, L., Luna, H., Ruiz-Terán, F., Vázquez, A., 2004. Screening for hydroxynitrile lyase activity in crude preparations of some edible plants. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 30, 105–108. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.03.008>.

18. Liu, S.-L., Zong, M.-H., Huang, S.-R., 2005. Synthesis of (R)-2-trimethylsilyl-2-hydroxypropionitrile catalyzed by (R)-hydroxynitrile lyase from *Prunus japonica* seed meal. *Biocatal. Biotransfor.* 23, 453–456. <https://doi.org/10.1080/10242420500444176>.
19. Martínez-Casares, R. M.; Pérez, H.; Manjarrez, N.; Solís-Oba, M.; Ortega, L.; Solís, A. *Pouteria Sapota Hydroxynitrile Lyase Catalyzed Synthesis of Optically Active Cyanohydrins from Ortho-Substituted Benzaldehydes.* *Ind. Crops Prod.* 2020, 153, 112606. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112606>.
20. Nanda, S., Kato, Y., Asano, Y., 2006. PmHNL catalyzed synthesis of (R)-cyanohydrins derived from aliphatic aldehydes. *Tetrahedron-Asymmetr.* 17, 735–741. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2006.02.003>.
21. Nanjo T, Zhang X, Tokuhiko Y, Takemoto Y. (2019). Divergent and scalable synthesis of α -hydroxy/keto- β -amino acid analogues by the catalytic enantioselective addition of glyoxylate cyanohydrin to imines. *ACS Catal.* 9(11):10087–10092.
22. Patil, D. (2015). Biocatalysis using plant material: A green access to asymmetric reduction. *International Journal of ChemTech Research*, 8(8), 318-324
23. Roberge, C., Fleitz, F., Pollard, D., Devine, P., 2007. Synthesis of optically active cyanohydrins from aromatic ketones: evidence of an increased substrate range and inverted stereoselectivity for the hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum*. *Tetrahedron-Asymmetr.* 18, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2006.12.026>.
24. Rossino, G., Robescu, M. S., Licastro, E., Tedesco, C., Martello, I., Maffei, L., ... & Collina, S. (2022). Biocatalysis: A smart and green tool for the preparation of chiral drugs. *Chirality*, 34(11), 1403-1418.
25. Shakerian, F., Zhao, J., & Li, S. P. (2020). Recent development in the application of immobilized oxidative enzymes for bioremediation of hazardous micropollutants—A review. *Chemosphere*, 239, 124716.

26. Sheldon, R. A. Biocatalysis and Biomass Conversion in Alternative Reaction Media. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 2016, 22 (37), 12984–12999. <https://doi.org/10.1002/chem.201601940>.
27. Singh, S., Kumar Sharma, P., Chaturvedi, S., Kumar, P., Deepak Nannaware, A., Kalra, A., & Kumar Rout, P. (2024). Biocatalyst for the synthesis of natural flavouring compounds as food additives: Bridging the gap for a more sustainable industrial future. *Food Chemistry*, 435, 137217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137217>
28. Solís, A., Luna, H., Pérez, H.I., Manjarrez, N., 2003. Evaluation of guanabana (*Annona muricata*) seed meal as a source of (S)-oxynitrilase. *Tetrahedron-Asymmetr.* 14, 2351–2353. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(03\)00500-7](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(03)00500-7).
29. Solís Oba, A., Martínez Pérez, R. M., Cervantes Domínguez, F., Pérez Méndez, H. I., Solís Oba, M., & Manjarrez Álvarez, N. (2017). Biocatalytic reduction of benzaldehyde using vegetable wastes as enzyme sources. *Acta universitaria*, 27(4), 13-18.
30. Solís, A., Solís-Oba, M., Pérez, H.I., Manjarrez, N., Cassani, J., 2011. Hydroxynitrile lyases from Prunus seeds in the preparation of cyanohydrins. *Biosci. Biotech. Bioch.* 75, 985–986. <https://doi.org/10.1271/bbb.100725>.
31. Ueatrongchit, T., Kayo, A., Komedia, H., Asano, Y., H-Kittikun, A., 2008. Purification and characterization of a novel (R)-hydroxynitrile lyase from *Eriobotrya japonica* (Loquat). *Biosci. Biotech. Bioch.* 72, 1513–1522. <https://doi.org/10.1271/bbb.80023>.
32. Yerabolu JR, Liotta CL, Krishnamurthy R. (2017). Anchimeric-assisted spontaneous hydrolysis of cyanohydrins under ambient conditions: implications for cyanide-initiated selective transformations. *Chemistry*. 23(36):8756–8765.
33. Tchesnokov E, Feng J, Porter D, G€otte M. (2019). Mechanism of inhibition of ebola virus RNA-dependent RNA polymerase by remdesivir. *Viruses*. 11(4):326.

34. Villamil, V., Vairoletti, F., Tijman, A., López, G., Peixoto de Abreu Lima, A., Saiz, C., ... & Mahler, G. (2023). Novel Kinetic Resolution of Thiazolo-Benzimidazolines Using MAO Enzymes. *ACS omega*, 8(45), 42114-42125.
35. Wu, G., Wu, J. R., Huang, Y., Yang, Y. W. (2021). Enantioselective synthesis of quaternary carbon stereocenters by asymmetric allylic alkylation: a review. *Chemistry—An Asian Journal*, 16(14), 1864-1877.
36. Wu, W.-B.; Yu, J.-S.; Zhou, J. Catalytic Enantioselective Cyanation: Recent Advances and Perspectives. *ACS Catal.* 2020, 10 (14), 7668–7690. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c01918>.
37. Zheng, Z., Zi, Y., Li, Z., Zou, X., 2013. A simple separation method for (S)-hydroxynitrile lyase from cassava and its application in asymmetric cyanohydrination. *TetrahedronAsymmetr.* 24, 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2013.03.015>.

9. ANEXOS

9.1 Trabajo presentado en Congreso



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA, UNIDAD XOCHIMILCO



14 DE OCTUBRE, 2024
NUMERO DE POSTER:
CATEGORÍA: #LatinXChemGreen



DEPARTAMENTO DE
SISTEMAS BIOLÓGICOS

Síntesis asimétrica (*R*)-2-cloromandelonitrilo empleando hidroxinitrilo liasa de mamey

Romero Torres Saúl, Fuentes Moreno Evelyn, Solís Oba Aida*, Martínez Casares Rubria Marlen, Solís Oba Myrna, Hernández Vázquez Liliana

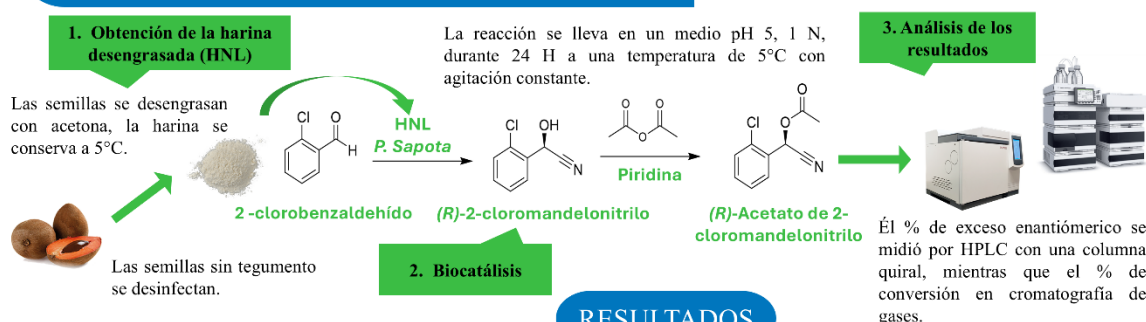
Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Coapa, colonia Villa Quietud, Coyoacán, C. P. 04960, CDMX.

RESUMEN

asolis@correo.xoc.uam.mx

Las hidroxinitrilo liasas (HNL) son enzimas que catalizan la adición enantioselectiva de cianuro a aldehídos o cetonas, para formar cianohidrinás ópticamente activas, útiles en la síntesis de compuestos con actividad biológica como fármacos y agroquímicos. En este trabajo se evaluó la eficiencia de la HNL presente en las semillas de mamey (*Pouteria sapota*, Ps) y su reciclado. La HNL se recicló 8 veces, la conversión a (*R*)-2-cloromandelonitrilo estuvo entre 48 y 98 %, mientras que el exceso enantiomérico fue excelente. La enzima no perdió actividad durante el reciclado.

METODOLOGÍA



RESULTADOS

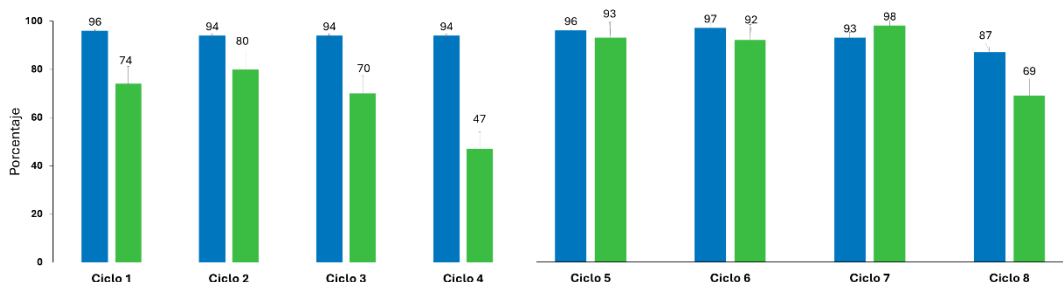


Figura 1. Adición de HCN a 2-clorobenzaldehído utilizando HNL de semilla de mamey. (■ % ee) Porcentaje de exceso enantiomérico y porcentaje de conversión (■ % conversión).

Como se puede observar la actividad de la enzima HNL se mantiene durante el reciclado, con una conversión >90% y una conversión >60% y aunque se presenten fluctuaciones en el % de conversión se observa una estabilidad en la enzima.

CONCLUSIÓN

La HNL presente en la harina de mamey se logró reutilizar en siete ciclos de reacción sin pérdida de su actividad biocatalítica, por lo que se concluye que los constituyentes naturales de la harina actúan como soporte de la enzima y ayudan a mantener su estabilidad, por lo que no es necesario purificar e inmovilizar la enzima. Se demostró que la metodología presentada es una alternativa a la síntesis de cianohidrinás ópticamente activas, aunque se debe tener un control de todos los parámetros que puedan afectar la actividad enzimática.

REFERENCIAS

- Basso A, Serban S. 2019. Mol Catal. 479:110607.
- Martínez-Casares R.M., Pérez H., Manjarrez N., Solís-Oba M., Ortega L., Solís A. 2020. Ind Crops Prod.153:112606.
- Nanjo T, Zhang X, Tokuhito Y, Takemoto Y. 2019. ACS Catal.9(11):10087–10092.
- Solís, A., Cuno, A., Martínez-Casares, R. M., Solís-Oba, M., Castro-Rivera, R., & Velázquez Flores, O. (2023). 41(5), 344–352.

Latin Chem

This is to certify that

**Romero Torres Saúl, Fuentes Moreno Evelyn, Solís Oba Aida,
Martínez Casares Rubria Marlen, Hernández Vázquez Liliana y Luna Contla Héctor**

participated in the #LatinXChem Conference 2024 on October 14 and 15,
with the poster # Green12 entitled:

***Síntesis asimétrica de (R)-2-cloromandelonitrilo empleando hidroxinitrilo
liasa de mamey***



Gabriel Merino
on behalf of the
#LatinXChem Organizing Committee



Juliana Vidal
on behalf of the
#LatinXChemGreen Category

Síntesis de (R)-2-cloromandelonitrilo utilizando hidroxinitrilo liasa de mamey

BIT 24004

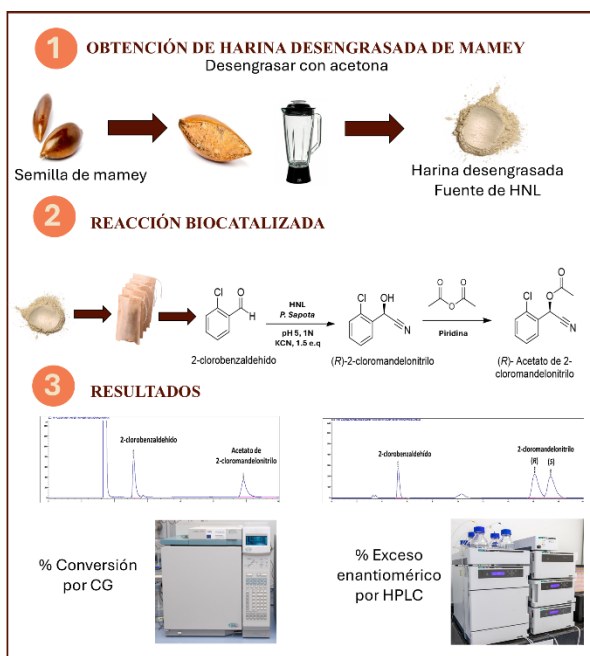
Romero Torres Saúl, Fuentes Moreno Evelyn, Solís Oba Aida*, Martínez Casares Rubria Marlen, Solís Oba Myrna, Hernández Vázquez Liliana
*asolis@correo.xoc.uam.mx

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

INTRODUCCIÓN

Los biocatalizadores tienen ventajas importantes sobre los catalizadores químicos, además son ecoamigables. Las hidroxinitrilo liasas (HNL) son enzimas presentes en las semillas del género *Prunus* (almendra, capulín, cereza) y *Pouteria sapota* (mamey), catalizan la adición enantioselectiva de cianuro a aldehídos o cetonas, para formar cianohidrinás ópticamente activas². Las cianohidrinás son intermediarios importantes en la síntesis de compuestos con actividad biológica como fármacos y agroquímicos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de la HNL presente en la harina desengrasada de la semilla de mamey, después de reciclarla tres veces consecutivas, para catalizar la síntesis enantioselectiva de (R)-2-cloromandelonitrilo.

METODOLOGÍA



RESULTADOS

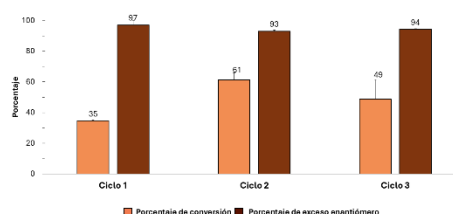


Figura 1. Adición de HCN a 2-clorobenzaldehído reciclando la harina desengrasada de mamey, fuente de HNL.

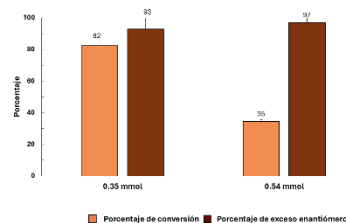


Figura 2. Efecto de la cantidad de 2-clorobenzaldehído (0.35 y 0.54 mmol) sobre la adición de HCN usando HNL presente en la semilla de mamey.

CONCLUSIÓN

La HNL presente en la harina de mamey se logró reutilizar en tres ciclos de reacción sin pérdida de su actividad biocatalítica, por lo que se concluye que los constituyentes naturales de la harina actúan como soporte de la enzima y ayudan a mantener su estabilidad, por lo que no es necesario purificar e inmovilizar la enzima. La HNL es más eficiente con menores concentraciones del aldehído, pero la enantioselectividad no depende de la concentración del aldehído.

REFERENCIAS

- Basso A, Serban S. 2019. Mol Catal. 479:110607.
- Martínez-Casares R.M., Pérez H., Manjarrez N., Solís-Oba M., Ortega L., Solís A. 2020. Ind Crops Prod. 153:112606.
- Nanjo T, Zhang X, Tokuhito Y, Takenoto Y. 2019. ACS Catal 9(11):10087-10092.
- Solís A, Cano A., Martínez-Casares, R. M., Solís-Oba, M., Castro-Rivera, R., & Velázquez Flores, O. (2023). 41(5), 344-352.

Otorga la presente Constancia

a: **Saul Romero Torres**

Por presentar la ponencia del trabajo de investigación

Síntesis de (R)-2-cloromandelonitrilo utilizando hidroxinitrilo liasa de mamey

En la modalidad Cartel

dentro de las actividades del XV Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química,
celebrado los días del 24 al 26 de julio del 2024.

Coautores

Fuentes Moreno Evelyn, Solís Oba Aida, Martínez Casares Rubria Marlen, Solís Oba Myrna, Hernández Vázquez
Liliana

Ciudad de México, a 24 de julio de 2024.



Dr. Rafael Escarela Pérez
Director de la
División de Ciencias Básicas e Ingeniería



Dr. Ricardo Teodoro Páez Hernández
Jefe del
Departamento de Ciencias Básicas



Dr. Gerardo Chávez Esquivel
Presidente del Comité Organizador del
XV Congreso Internacional de Docencia e
Investigación en Química

9.4 Calendario de actividades



Objetivos	Actividades a realizar	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Utilizar desechos vegetales como semillas y vainas como fuentes de biocatalizadores con aplicación en síntesis asimétrica.	Preparación de los biocatalizadores	X					
Llevar a cabo el estudio de enzimas inmovilizadas como biocatalizadores aplicados en síntesis asimétrica.	Realizar la síntesis asimétricas utilizando enzimas inmovilizadas	X	X	X			
Desarrollar una metodología para llevar a cabo transformaciones químicas empleando enzimas inmovilizadas, con la finalidad de obtener compuestos ópticamente puros.	Desarrollar los métodos analíticos por CG para la identificación de las cetonas y la cuantificación del % Conversión a los alcoholes correspondientes	X	X	X			
	Desarrollar los métodos analíticos por HPLC para la cuantificación del exceso enantiomérico de los alcoholes obtenidos por síntesis química y biocatálisis.	X	X	X			
Determinar la cantidad de proteína en los materiales vegetales utilizados como fuente de biocatalizador.	Determinar la cantidad de proteína de los materiales vegetales utilizados.				X		
Reutilizar las enzimas inmovilizadas en varios ciclos de síntesis	Evaluar en número de ciclos que las enzimas mantienen su actividad catalítica		X	X	X	X	
Análisis de Resultados y Redacción de tesis	Analizar los resultados e integrarlos al reporte final del servicio social.						X

Vo. Bo. Dra. Rubria Marlen Martínez Casares

Vo. Bo. QFB. Aida Solís Oba