



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

Formato SS-T

SOLICITUD DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

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

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

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

Datos del Alumno

Nombre : **Aarón Ángel Mariscal Pérez**

Matrícula : **2132044610** Licenciatura : **Química Farmacéutica Biológica**

Domicilio : **Calle Sauces, mz 154 Lt 22, colonia Tenorios, código postal 09680, delegación Iztapalapa, Ciudad de México**

Teléfono : **55-54-27-19-81** Celular : **55-86-06-90-02**

Correo Electrónico : **aaronmariscal21@gmail.com** CURP : **MAPA930513HDFRRR08**

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : **Hidrolisis biocatalítica de ésteres de AINES usando enzimas de origen vegetal.**

Lugar donde se realizó el Servicio Social : **Laboratorio Biotransformaciones, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.**

Dependencia :

Entidad Federativa : **Distrito Federal**

Municipio : **Coyoacán** Localidad :

Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	25	10	2016		15	5	2017

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: **3.- Público** Tipo: **3.- Interno de Campo**

Orientación: **10.- Otros**

FIRMAS

Dra. Aida Solís Oba

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Aarón Ángel Mariscal Pérez

Alumno
Nombre, firma

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Q.T.B. Mario González Torres.

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

México, D.F. a 07 de agosto del 2020

A QUIEN CORRESPONDA

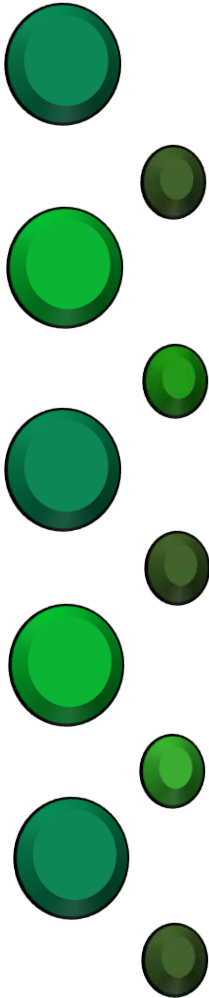
Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el alumno: Aarón Ángel Mariscal Pérez con Matrícula 2132044610 concluyó el proyecto de Servicio Social: "Hidrolisis biocatalítica de ésteres de AINES usando enzimas de origen vegetal". Que se realizó en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, laboratorio de Biotransformaciones. Ubicado en: Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Coyoacán, CDMX. Del 25 de octubre de 2016 al 15 de mayo de 2018 bajo mi asesoría.

ATENTAMENTE

Dra. Aida Solís Oba
Profesora Titular "C"
No. Eco. 21208



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LIC. QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

HIDROLISIS BIOCATALÍTICA DE MOLÉCULAS DE
INTERÉS FARMACÉUTICO USANDO ENZIMAS DE
ORIGEN VEGETAL.

NOMBRE: MARISCAL PÉREZ AARÓN ÁNGEL

MATRÍCULA: 2132044610

ASESOR(A):
DRA. AIDA SOLÍS OBA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Química Farmacéutica Biológica

Datos del proyecto

Nombre del proyecto: Hidrolisis biocatalítica de moléculas de interés farmacéutico usando enzimas de origen vegetal.

Proyecto genérico: Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos

Etapa: Obtención de compuestos orgánicos utilizados en la preparación de insumos para la salud.

Lugar de realización: Laboratorio Biotransformaciones, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Asesor responsable interno: Dra. Aida Solís Oba

Tabla de contenido

1	INTRODUCCIÓN	5
2	MARCO TEÓRICO	6
2.1	La quiralidad en la industria farmacéutica	6
2.2	Biocatálisis en la síntesis de medicamentos	6
2.3	Tipos de biocatalizadores.....	7
2.4	Propiedades catalíticas de las enzimas	8
2.5	Clasificación de las enzimas	9
2.6	Obtención de fuentes enzimáticas	9
2.7	Hidrolasas en la obtención de fármacos enantiopuros.....	9
2.8	Alcoholes y ácidos empleados en la industria farmacéutica	10
2.9	Efecto del pH, temperatura y cosolvente sobre la actividad enzimática.....	11
3	OBJETIVOS.....	12
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1	Reactivos y equipos	13
4.2	Síntesis de sustratos (Esterificación y acetilación).....	13
4.2.1	Ésteres de AINES.....	13
4.2.2	Acetato de 1-feniletanol	14
4.2.3	Acetatos de 1-fenil-1,2-etanodiol	15
4.3	Desarrollo de métodos analíticos para la evaluación de las reacciones de hidrólisis	17
4.4	Reacciones de hidrólisis biocatalítica.....	18
4.4.1	Preparación y tratamiento de las fuentes enzimáticas empleadas en hidrólisis biocatalítica.....	18
4.4.2	Semillas	18
4.4.3	Vegetales.....	18
4.5	Evaluación biocatalítica de las fuentes enzimáticas.....	20
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1	Desarrollo de métodos analíticos para la evaluación de las reacciones de hidrólisis	21
5.2	Biocatálisis de ésteres de naproxeno	24
5.3	Biocatálisis con ésteres de ibuprofeno	26
5.4	Biocatálisis con acetato de 1-feniletanol	28
5.4.1	Optimización en los tiempos de biotransformación.....	30

5.5	Biocatálisis con acetatos de 1-fenil-1,2-etanodiol.....	31
6	CONCLUSIONES	35
7	BIBLIOGRAFÍA.....	36
8	ANEXOS.....	39
8.1	Anexo 1 espectros IR de ésteres de naproxeno e ibuprofeno y 1-feniletanol.....	39
8.2	Anexo 2 espectros de RMN ¹³ C Y ¹ H de acetatos de 1-fenil-1,2-etanodiol 42	
8.3	Anexo 3: métodos COSY, HMBC, HSQC en MOOH1 y MOOH2.....	45

1 INTRODUCCIÓN

Aproximadamente la mitad de los 700 principios activos más frecuentemente utilizados en terapéutica son moléculas quirales que se encuentran comercializadas en forma de compuestos racémicos ⁽¹⁾.

La consecuencia más inmediata de la estereoespecificidad desde el punto de vista de su aplicación terapéutica, se basa en la posibilidad de que cada enantiómero presente distinto comportamiento farmacodinámico, farmacocinético y toxicológico ^(1; 2), donde uno de estos no presente actividad biológica deseada o desencadene reacciones secundarias adversas ⁽²⁾.

La síntesis de principios activos enantiopuros a través de la química tradicional involucra el uso de catalizadores químicos que generan residuos tóxicos, así mismo la separación de los enantiómeros en mezclas racémicas involucra procesos costosos, largos y con bajos rendimientos.

Se han desarrollado métodos sintéticos que permiten la obtención de productos ópticamente activos con potencial actividad terapéutica empleando biocatalizadores, enzimas aisladas o presentes en células animales, vegetales o microorganismos. Los biocatalizadores tienen la ventaja de catalizar reacciones a temperatura moderada (20-40°C) y catalizar reacciones sobre grupos no activados del sustrato, además de ser amigables con el ambiente.

La regio y estereoselectividad que presentan los biocatalizadores permiten la realización de protocolos sintéticos difícilmente alcanzables por las metodologías de química clásica. El uso de enzimas permite una transformación de múltiples sustratos con elevada quimio-, regio- y enantioespecificidad ⁽²⁾, como es el caso de las hidrolasas, las cuales constituyen el grupo más extenso de catalizadores químicos utilizados en la industria farmacéutica para la obtención del eutómero (esteroisómero activo, que presenta la actividad terapéutica deseada) bien de diferentes fármacos quirales, o bien de precursores a través de los cuales se puedan sintetizar. Las reacciones de hidrólisis pueden llevarse a cabo sobre ésteres y ácidos carboxílicos para la obtención de ácidos y alcoholes de interés farmacéutico como son naproxeno e ibuprofeno (ácidos) y 1-feniletanol y 1-fenil-,2-feniletanodiol(alcoholes) enantiopuros.

En el presente trabajo se llevó a cabo la hidrólisis biocatalítica de ésteres de ibuprofeno y naproxeno y acetatos de 1-feniletanol y 1-fenil-,2-etanodiol utilizando diferentes fuentes enzimáticas de origen vegetal para obtener sus ácidos y alcoholes correspondientes.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 La quiralidad en la industria farmacéutica

Aproximadamente la mitad de los 700 principios activos más frecuentemente utilizados en terapéutica son moléculas quirales que se encuentran comercializadas en forma de compuestos racémicos ⁽¹⁾.

La gran demanda de compuestos enantiopuros continúa en aumento en la industria farmacéutica debido al reconocimiento de que los enantiómeros de un compuesto quiral presentan diferente actividad biológica deseada, diferentes propiedades farmacocinéticas (absorción, distribución, biotransformación y excreción) y diferentes efectos farmacológicos o toxicológicos, donde alguno de ellos puede presentar la actividad biológica deseada o, por el contrario, desencadene reacciones secundarias adversas. Es por ello por lo que la política de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) requiere la evaluación de la composición estereoisomérica de un fármaco con un centro quiral y que cada enantiómero por separado se amplifique en estudios farmacológicos, toxicológicos y clínicos con el fin de asegurar la identidad, la resistencia, la calidad y la pureza desde un punto de vista estereoquímico ⁽³⁾.

2.2 Obtención de moléculas enantiopuras por medio de síntesis enantioselectiva

El desarrollo de nuevos procesos para la obtención de moléculas enantiopuras presenta un reto para la síntesis orgánica. Algunos métodos para llevar a cabo la síntesis enantioselectiva de moléculas quirales son:

Síntesis asimétrica: la cual se puede llevar a cabo a partir de reacciones de sustratos aquirales con reactivos quirales o reacción en centros proquirales con reactivos quirales o aquirales ^{(4) (5)}.

Resolución: la cual separa enantiómeros a partir de una mezcla racémica y se pueden llevar a cabo por procesos físicos, químicos o biológicos ^(6; 7).

2.3 Biocatálisis en la síntesis de fármacos

La síntesis de principios activos enantiopuros a través de la química tradicional involucra el uso de catalizadores químicos quirales costosos, además de que generan residuos tóxicos. Así mismo la separación de los enantiómeros en mezclas racémicas involucra procesos costosos, largos y con bajos rendimientos ⁽⁴⁾.

Para enfrentar estos desafíos, la industria farmacéutica está evaluando una variedad de tecnologías quirales de vanguardia en la síntesis asimétrica de éstos, con el fin de obtener fármacos enantiopuros, pues más de la mitad de las moléculas necesarias para la producción de estos presentan al menos un centro estereogénico ⁽⁸⁾.

Para sintetizar estas moléculas enantiopuras en condiciones respetuosas con el medio ambiente, se han desarrollado métodos sintéticos empleando

biocatalizadores. Hoy en día se estima que más de un 10% de los procesos industriales de obtención de fármacos precisa de biocatalizadores. Aunque probablemente sean las enzimas hidrolíticas las más utilizadas en biotransformaciones ⁽⁵⁾.

La biocatálisis presenta ciertos beneficios en la industria farmacéutica como el satisfacer crecientes demandas de procesos industriales altamente selectivos, seguros y sostenibles. A diferencia de sus equivalentes catalizadores químicos, los biocatalizadores tienen una estructura tridimensional muy grande que hace múltiples puntos de contacto con un sustrato de interés, lo que permite exquisita selectividad ^(9; 10). La excelente regio y estereoselectividad de los catalizadores enzimáticos junto con su capacidad para trabajar en condiciones de reacción suaves (protegiendo así la funcionalidad existente dentro de una molécula) permite transformaciones sin la necesidad de múltiples pasos de protección y desprotección dentro de una síntesis. Como resultado directo de las mayores selectividades y leves condiciones de reacción, los procesos biocatalíticos a menudo ofrecen productos en mayor pureza que los procesos químicos o quimio-catalíticos tradicionales ^(3; 9).

La biocatálisis cuenta con características muy atractivas, especialmente en la síntesis de precursores quirales que pueden dar como resultado compuestos enantioméricamente puros ⁽⁴⁾.

2.4 Tipos de biocatalizadores

En primera instancia un catalizador es una sustancia que aumenta la velocidad de una reacción química, sin verse alterada ella misma en el proceso global. Su papel consiste en reducir el valor de ΔG° al facilitar la formación del estado de transición. Una enzima une una molécula de sustrato en una región de la enzima denominada "sitio activo"; que facilita la unión del sustrato y otras cadenas laterales que intervienen en la catálisis ⁽¹¹⁾.

En una biotransformación se pueden emplear células enteras o enzimas aisladas con mayor o menor grado de pureza, que pueden también estar libres o inmovilizadas ^(12; 13). La decisión del biocatalizador a utilizar depende de muchos factores, como por ejemplo su costo, del tipo de reacción, de la necesidad de emplear cofactores y de la escala en la cual la biotransformación se lleva a cabo.

El uso de enzimas incrementa la productividad, ya que la tolerancia a mayor concentración de sustrato es mayor y además pueden ser ventajosas en cuanto a costos, porque en general no es necesario que estén puras ⁽¹³⁾.

El aislamiento y purificación de enzimas proporciona catalizadores altamente específicos que se pueden utilizar para realizar un gran espectro de transformaciones. Desafortunadamente a pesar de tener estas ventajas, la técnica toma demasiado tiempo para su extracción y preparación. Además, las enzimas purificadas son sensibles a la desnaturalización después de cambios de pH o temperatura, y requieren de cofactores adicionales que limita la resolución quiral ⁽¹⁴⁾.

La mayor parte de las enzimas usadas en biotransformaciones se emplean en forma cruda. Las preparaciones enzimáticas contienen 1- 30 % de enzima, y el resto son carbohidratos, lípidos, sales o proteínas del medio del cual han sido aisladas. Se ha encontrado que las preparaciones enzimáticas crudas tienen más actividad que las enzimas purificadas, esto se debe a que en el crudo las enzimas se encuentran más estabilizadas ⁽¹³⁾.

2.5 Propiedades catalíticas de las enzimas

- *Las enzimas son catalizadores muy eficientes:* Las reacciones mediadas por enzimas pueden incrementar su velocidad en un factor de $10^8 - 10^{10}$ y no así la termodinámica de la reacción. En general los biocatalizadores se utilizan en concentraciones de 10^{-3} - 10^{-4} %, mientras que los catalizadores químicos se emplean en valores de 0,1- 1 %. Por lo tanto, las reacciones catalizadas por enzimas son más eficientes por varios órdenes de magnitud que los catalizadores químicos ⁽¹³⁾.
- *Las enzimas son catalizadores sustentables y compatibles con el medio ambiente:* A diferencia de otros catalizadores químicos, las enzimas son biodegradables y su utilización no genera riesgos de contaminación ni formación de residuos tóxicos.
- *Las enzimas actúan bajo condiciones suaves de reacción:* Las enzimas actúan en un rango de pH entre 5-8, típicamente cercano a la neutralidad. Además, son capaces de actuar a temperaturas entre 20 y 60 °C. De esta manera, se minimiza la aparición de productos secundarios, debido a descomposiciones, isomerizaciones o racemizaciones que suelen ocurrir en condiciones más extremas de pH, temperatura y presión. Por otro lado, utilizar condiciones suaves disminuye los costos en los procesos de escalado de las reacciones.
- *Catalizan una gran cantidad de reacciones* y muchas enzimas pueden utilizarse para catalizar tanto una reacción como la inversa, como las hidrolasas. También pueden aceptar sustratos no naturales y convertirlos en productos deseados ⁽¹³⁾.
- *Reconocen como sustratos a moléculas de estructura muy variada:* Las enzimas aceptan una amplia variedad de sustratos no naturales de estructuras diversas y pueden actuar en medios diferentes a los naturales.
- *Los biocatalizadores poseen una alta selectividad:* Esta selectividad a menudo es estereoselectiva, regio-selectiva, y quimio-selectiva. Una alta selectividad es muy deseable en síntesis química, ya que puede ofrecer varios beneficios, tales como el uso reducido o nulo de grupos de protección, y reacciones secundarias minimizadas ⁽¹⁰⁾, Esta ventaja posibilita que las reacciones aumenten su rendimiento y facilita la separación y purificación del producto, con respecto a una reacción no selectiva. De esta manera los costos y tiempos de reacción se reducen de forma significativa ⁽¹³⁾.

2.6 Clasificación de las enzimas

La IUB (Internacional Union of Biochemistry) clasifica las enzimas de acuerdo con el tipo de reacción catalizada en: óxidorreductasas, transferasas, liasas, hidrolasas, isomerasas y ligasas (tabla 1).

Las enzimas más usadas en biotransformaciones son las hidrolasas (60%), en segundo lugar, las óxidorreductasas (25%), luego le siguen las liasas (7%) y transferasas (5%). Por último, las menos usadas para la catálisis enzimática son las isomerasas (2%) y las ligasas (1%)⁽¹³⁾.

Tabla 1. Clasificación de enzimas por IUB

Enzima	Tipo de reacción	Subclases representativas
Oxidorreductasas	Catalizar la transferencia de átomos de hidrógeno u hidrogeno u oxígeno o electrones de un sustrato a otro	Oxidasa, oxigenasa, peroxidasa, deshidrogenasa
Transferasas	Catalizar las reacciones de transferencia de grupos	glicoxitransferasas, transketolasas, metiltransferasas, transaldolasas, aciltransferasas, transaminasas
Hidrolasas	catalizar reacciones hidrolíticas	Esterasas, lipasas, proteasas, glicosidasas, fosfatasas
Liasas	catalizar las reacciones de eliminación de grupos no hidrolíticos	descarboxilasas, aldolasas, ketolasas, hidrolasas, deshidrolasas
Isomerasas	catalizar reacciones de isomerización	Racemasas, Isomerasas, epimerasas
Ligasas	Síntesis de varios tipos de enlaces con la ayuda de moléculas que contienen energía	sintetasas y carboxilasas

2.7 Vegetales como fuentes enzimáticas

En los últimos años, el uso de enzimas vegetales se ha incrementado debido a la búsqueda de metodologías sustentables y porque constituye una manera más simple y económica que trabajar con cultivos de microorganismos. Se han utilizado partes de plantas como tallos, raíces, hojas, frutos y semillas como biocatalizadores. El uso de partes de plantas evita el aislamiento de enzimas. El empleo de células vegetales depende de ciertos factores como la solubilidad de los precursores, la actividad enzimática, la localización de las enzimas, reacciones colaterales que dan productos no deseados y presencia de enzimas que degradan los productos esperados. El pH, la permeabilización y efectos osmóticos también influyen en la capacidad de bioconversión de las células⁽¹³⁾.

2.8 Hidrolasas

Las hidrolasas catalizan la adición de agua a un sustrato por medio de una reacción de sustitución nucleófila. Las hidrolasas (enzimas hidrolíticas) son los biocatalizadores más comúnmente utilizados en la síntesis orgánica. Se han utilizado para la obtención de alcoholes secundarios y ácidos ópticamente activos

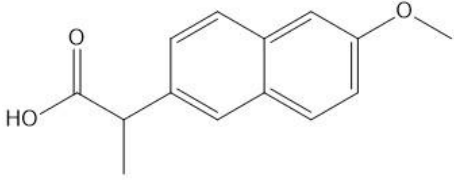
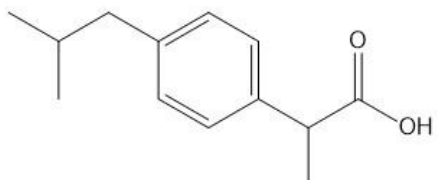
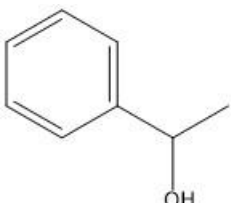
que son utilizados como materiales de partida clave en la síntesis de fármacos, herbicidas, insecticidas y otros productos químicos ^(15; 16).

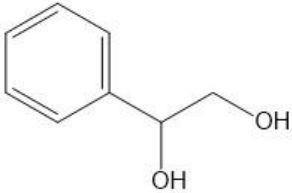
De particular interés entre las hidrolasas son amidasas, proteasas, esterases y lipasas. Estas enzimas catalizan la hidrólisis y la formación de enlaces éster y amida. Las lipasas pueden hidrolizar los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol. Se han usado ampliamente para producir alcoholes ópticamente activos, ácidos, ésteres y lactonas por resolución cinética.

2.9 Alcoholes y ácidos empleados en la industria farmacéutica

Algunos alcoholes y ácidos carboxílicos con centros quirales se encuentran en estructuras de diversos fármacos. En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos.

Tabla 2. Alcoholes y ácidos de interés farmacéutico

Molécula	Actividad terapéutica
 <p style="text-align: center;">Naproxeno</p>	<p>Solo el enantiómero S (+) exhibe actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. La actividad farmacológica de S-naproxeno es 28 veces mayor que R-naproxeno ⁽¹⁷⁾. Usado en el tratamiento de artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, gota aguda y dismenorrea primaria</p>
 <p style="text-align: center;">Ibuprofeno</p>	<p>Pertenciente a la familia de ácidos propiónicos, es usado para el tratamiento de artritis reumatoide, dolor de cabeza, dolor muscular y cefalalgia. El enantiómero (S) es 160 veces más activo en efectos terapéuticos, mientras que el enantiómero (R), causa serios efectos no deseados como dolor gastrointestinal y daños en la función membranal. ⁽¹⁸⁾</p>
 <p style="text-align: center;">1-feniletanol</p>	<p>Usado como agente saborizante ⁽¹⁹⁾, anestésico local, antiséptico y como solvente. Es considerado como repelente de mosquitos y tiene propiedades funguicidas. Se utiliza en procesos de obtención de diferentes productos como pueden ser el estireno, el éster fenilacético, el fenilacetaldehído, los ácidos benzoico y fenilacético entre otros. Además, como posee un alcohol y tiene un anillo aromático, en éste se pueden dar reacciones de nitración, sulfonación y halogenación que permiten la obtención de diferentes compuestos de gran importancia industrial. Es representativo de numerosas</p>

	estructuras químicas de alto valor como el ibuprofeno y el naproxeno ⁽¹⁴⁾ .
 <p data-bbox="363 521 580 551">1-fenil-1,2-etanodiol</p>	Ópticamente puro un valioso y versátil componente quiral para la síntesis de productos farmacéuticos, agroquímicos, feromonas y cristales líquidos (20). También es un ingrediente de fragancias. Se puede encontrar en fragancias usadas en cosméticos decorativos, fragancias finas, champús, jabones de tocador y productos no cosméticos como el hogar limpiadores y detergentes ⁽²¹⁾ .

2.10 Efecto del pH, temperatura y disolvente sobre la actividad enzimática

pH: Las condiciones óptimas de pH depende principalmente de la enzima, entre otros factores, del sustrato y del buffer empleados. El pH óptimo para las hidrolasas se encuentra generalmente en el intervalo entre 7.0 y 9.0.

Las bajas concentraciones de sales de fosfatos estimulan sustancialmente la velocidad de reacción. Se ha demostrado que las sales a concentraciones de alrededor de 10 mM mejoran considerablemente la enantioselectividad de una hidrolasa ⁽²²⁾.

Temperatura: La temperatura óptima para una enzima permite que los ligandos ejerzan un efecto protector frente a la desnaturalización térmica. La temperatura óptima para las hidrolasas puede encontrarse en el intervalo entre 35 y 50 °C, aunque existen lipasas termoestables que exhiben valores de temperatura óptima superiores a 50 °C. El medio en el que se encuentre la enzima también influye en el valor de temperatura óptima. De este modo, las lipasas presentes en preparados crudos, con altas concentraciones de otras proteínas contaminantes distintas de las proteasas, serán más estables y exhibirán valores aparentes de temperatura óptima superiores ⁽²³⁾.

Disolvente: Las enzimas biocatalizan reacciones que contienen disolventes orgánicos en proporciones que van desde 10% hasta el 90%. La posibilidad de utilizar éstos en medios de reacción, permite disolver una mayor cantidad de sustrato, por lo que la unión enzima sustrato se ve favorecida ⁽²⁴⁾.

3 OBJETIVOS

General:

Llevar a cabo la hidrólisis enantioselectiva en moléculas precursoras de fármacos de interés farmacéutico utilizando biocatalizadores de origen vegetal, para obtener moléculas ópticamente activas.

Específicos:

- Desarrollar métodos analíticos para la identificación y cuantificación de materias primas y productos de reacción.
- Evaluar la actividad hidrolasa de diferente material vegetal para la hidrólisis enantioselectiva de diversos ésteres.
- Determinar el efecto del tamaño de la cadena de los ésteres de Naproxeno e ibuprofeno, metílico, etílico, sobre la actividad hidrolasa del material vegetal.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos y equipos

Los reactivos ibuprofeno, naproxeno, 1-fenil-1,2-etanodiol, 1-feniletanol (racémico, (R) / (S)) se obtuvieron de Sigma Aldrich; el bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y sales de fosfato fueron de J. T. Baker; El acetato de etilo (EtOAc grado industrial), isopropanol (iPrOH) y diclorometano (CH_2Cl_2) (ambos grados HPLC) se obtuvieron de Tecsiquim, el Hexano (grado HPLC) de Burdick & Jackson.

El equipo utilizado fue el siguiente: potenciómetro Corning Pinnacle M530; Balanza analítica Mettler Toledo AG345; cromatógrafo de gases (CG) HP 6890, las columnas SUPELCOWAX-10 y SPB-50 de Supelco y la HP-5 de Agilent Technologies y N_2 como gas acarreador; cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent Series 1100, las columnas OJ-H (0.46 cm x 25 cm) y OD (0.46 cm x 5 cm), ambas Daicel Chiralcel; molino de café Hamilton Beach 80374 e incubadora Enviro-Genie.

Las semillas y frutos utilizados se consiguieron en mercados locales de la delegación Tlalpan, Ciudad de México.

4.2 Síntesis de sustratos (Esterificación y acetilación)

Se emplearon como sustratos en la biocatálisis enzimática éster metílico de naproxeno, éster metílico y etílico de ibuprofeno y acetato de 1-feniletanol y diacetato de 1-fenil-1,2-etanodiol. Éstos se obtuvieron por acetilación y esterificación química y fueron empleados como sustancias de referencia para el desarrollo de los métodos analíticos determinando el % de conversión (%conv) por CG y % exceso enantiomérico (% ee) por CLAR.

4.2.1 Ésteres de AINES

4.2.1.1 Éster metílico de naproxeno

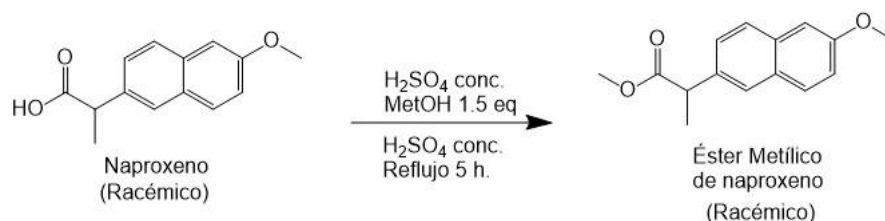


Figura 1. síntesis química de éster metílico de naproxeno

Para la esterificación (figura 1), se colocaron 5g de naproxeno racémico (0.022 mol) y 5 mL de metanol (MetOH) en un matraz bola. En seguida, se adicionó 1.2 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 98%) y se dejó a reflujo por 5 horas. Posteriormente se realizó extracción con CH_2Cl_2 . Finalmente se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio (3x50 mL),

4.2.1.2 Ésteres de ibuprofeno

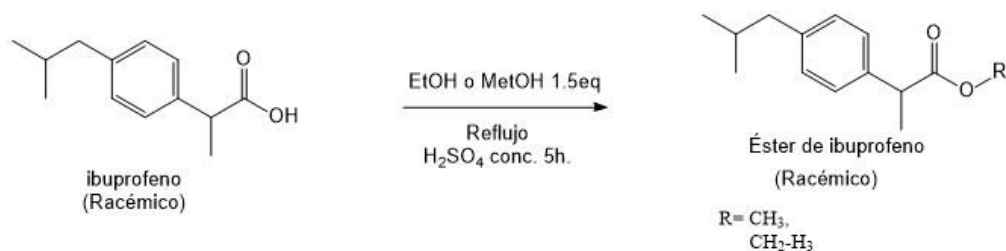


Figura 2. Síntesis química de ésteres de ibuprofeno

Para la esterificación (figura 2) se colocaron 5 g de naproxeno racémico (0.022 mmol) y 5 mL del alcohol correspondiente (metanol o etanol) en un matraz bola. En seguida, se adicionó 1.2 mL de H₂SO₄ 98% y se dejó a reflujo por 5 horas.

Posteriormente, se realizó extracción con CH₂Cl₂ y se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio (3x50 mL). Finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a vacío.

4.2.2 Acetato de 1-feniletanol

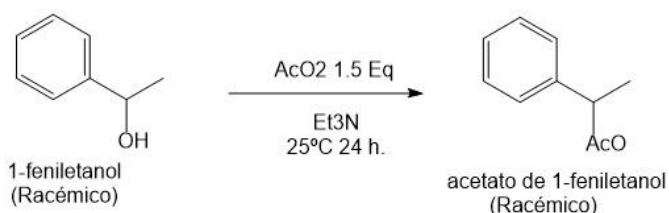


Figura 3. Síntesis química de acetato de 1-feniletanol

Para la acetilación (figura 3), se colocaron 2.5 mL de 1-feniletanol racémico (0.022mol), 0.34 mL de trietilamina (TEA 1.5 eq) y anhídrido acético (Ac₂O 1.5 eq) en un matraz bola. Se dejó en agitación constante y a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente se realizó extracción con CH₂Cl₂. Finalmente se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio (3x50 mL),

4.2.3 Acetatos de 1-fenil-1,2-etanodiol

4.2.3.1 2-hidroxi-1-feniletacetato(MOOH1) y 2-hidroxi-2-feniletacetato(MOOH2)

Para la síntesis de estos acetatos se utilizaron dos diferentes rutas (Imagen 4 y 5). Dado que se desconocía el tipo de acetato sintetizado (2-hidroxi-1-feniletacetato y/o 2-hidroxi-2-feniletacetato), se analizó por RMN para su identificación.

a) A partir de 1-fenil-1,2-etanodiol

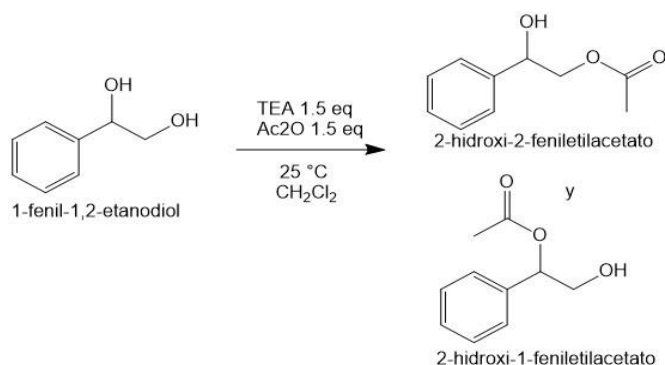


Figura 4. Síntesis química de 2-hidroxi-1-feniletacetato y 2-hidroxi-2-feniletacetato

La primera ruta sintética para la obtención de ambos monoacetatos (Figura 4) fue a partir de 1-fenil-1,2-etanodiol. Se pesaron 50 mg de 1-fenil-1,2-etanodiol racémico (3.619×10^{-4} mol, 1.5 eq) y se disolvieron en CH₂Cl₂ en un matraz Erlenmeyer de 100 ml.

Posteriormente, se adicionó 82 μ l de TEA (8.685×10^{-4} mol 1.5 eq.) y 120 μ l de Ac₂O (8.685×10^{-4} mol 1.5 eq) gota a gota y en agitación constante a temperatura ambiente. Se realizó el seguimiento de reacción por CG muestreando cada hora. Cuando se observó la desaparición de 1-fenil-1,2-etanodiol, se realizó lavado con agua destilada (5 ml x2) y se neutralizó con solución saturada de bicarbonato de sodio (7x10 ml). En seguida, se realizó extracción con CH₂Cl₂ (3x10 ml), se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a vacío. Por último, se analizó por CG, CLAR y RMN.

b) A partir de 1-hidroxiacetofenona

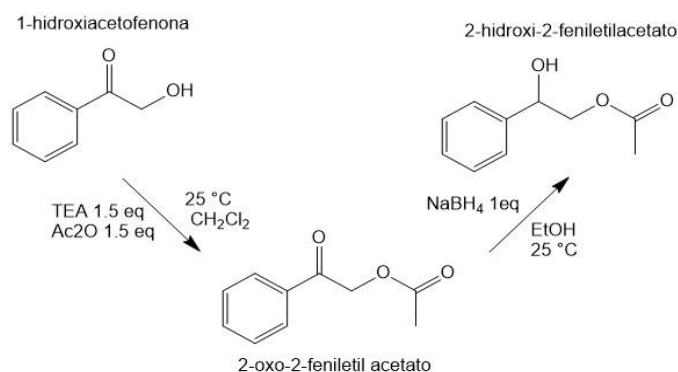


Figura 5. Síntesis química de 2-hidroxi-2-feniletilacetato

La segunda ruta sintética consistió en usar 1-hidroxiacetofenona como punto de partida para la obtención de 2-hidroxi-2-feniletilacetato (MOOH2), acetilando en el primer paso el alcohol primario con TEA y Ac2O en medio orgánico, y posteriormente, reduciendo la cetona en alcohol secundario (Figura 5).

Se pesaron 50 mg de 1-hidroxiacetofenona y se disolvieron en 5 mL de etanol al 95%. Posteriormente, se adicionó 82 μ l de TEA (8.685×10^{-4} mol) y 120 μ l de Ac2O 1.5 eq (8.685×10^{-4} mol) gota a gota y en agitación constante a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar y se realizó el seguimiento de reacción por CG muestreando cada 30 minutos.

Una vez que el alcohol desapareció, se realizó la reducción de la cetona con 20 mg de borohidruro de sodio; se mezclaron en un mortero con pistilo; se dejó reaccionar y se realizó el seguimiento de reacción por CG. Cuando se observó la desaparición de 2-oxo-2-feniletil acetato, se agregaron 10 mL de agua destilada; se extrajo con CH₂Cl₂ (3X5mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro; se evaporó a vacío. Posteriormente se analizó por CG y CLAR quiral.

4.2.3.2 1-feniletano-1,2-diil-diacetato (DIOAc)

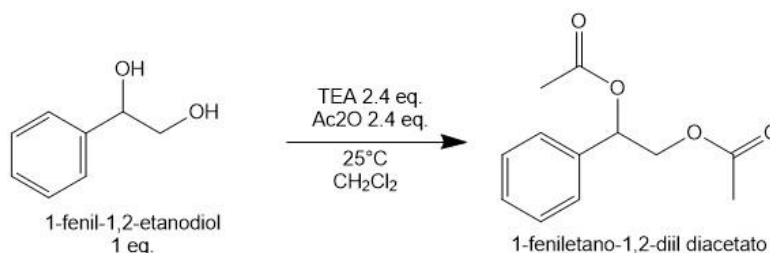


Figura 6. Síntesis química de diacetato de 1-fenil-1,2-etanodiol

Para la diacetilación, (Figura 6) se pesaron 505 mg de 1-fenil-1,2-etanodiol (3.619×10^{-3} mol) y se disolvieron en CH₂Cl₂ en un matraz Erlenmeyer de 100 ml.

Posteriormente, se adicionó 0.820 ml de TEA (8.685×10^{-3} mol 2.4 eq.) y 1.211 ml de Ac₂O (8.685×10^{-3} mol 2.4 eq.) gota a gota y en agitación constante a temperatura ambiente. Transcurrido un tiempo de 5 horas, se adicionó nuevamente 1.211 ml de anhídrido acético (8.685×10^{-3} mol) y se dejó reaccionar hasta las 24 h.

Transcurrido el tiempo de reacción, se realizó lavado con agua (10 ml x2) y se neutralizó con solución saturada de NaHCO₃ (7x10 ml). Se realizó extracción con CH₂Cl₂. se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a vacío. Por último, se analizó por CG y CLAR.

4.3 Desarrollo de métodos analíticos para la evaluación de las reacciones de hidrolisis

Para el desarrollo de métodos analíticos en la evaluación de la hidrolisis biocatalítica de los ésteres y acetatos racémicos, el %conv se determinó utilizando CG HP 6890 con un detector de ionización de flama donde se usó N₂ como gas acarreador y temperaturas de inyector y detector de 250°C. la columna, la temperatura del horno y el flujo variaron dependiendo de cada compuesto. En la tabla 3 se muestran columnas utilizadas para cada compuesto.

En el análisis en CLAR para la determinación de %ee se utilizó un cromatógrafo de Líquidos Agilent Serie 1200, empleando como fase móvil mezclas de hexano: isopropanol a diferentes velocidades de flujo, equipado con un detector de arreglo de diodos. Solo las muestras que presentaron conversión <50% fueron analizadas por CLAR. En la tabla 3 se muestran las columnas utilizadas para el análisis de cada compuesto.

Tabla 3. Columnas empleadas para el desarrollo de métodos analíticos en CG y CLAR

Molécula	Columna en CG	Columna en CLAR
Naproxeno	HP-5	OD
Éster metílico de naproxeno	HP-5	OD
Ibuprofeno	HP-5	OD
Éster metílico de ibuprofeno	HP-5	OD
Éster etílico de ibuprofeno	HP-5	OD
1-feniletanol	HP-5	OJ-H
Acetato de 1-feniletanol	HP-5	OJ-H
1-fenil-1,2-etanodiol	HP-5, SUPELCOWAX-10, SPB-50	OJ-H Y OD
2-hidroxi-1-feniletacetato (MOOH1)	HP-5, SUPELCOWAX-10, SPB	OB-H, OJ-H Y OD
2-hidroxi-2-feniletacetato (MOOH2)	HP-5, SUPELCOWAX-10, SPB-50	OB-H, OJ-H Y OD
1-feniletano-1,2-diil-diacetato (DIOAc)	HP-5, SUPELCOWAX, SPB	OJ-H Y OD y OB-H

4.4 Reacciones de hidrólisis biocatalítica

4.4.1 Preparación y tratamiento de las fuentes enzimáticas empleadas en hidrólisis biocatalítica

El material vegetal se lavó y desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 1%, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. El tratamiento posterior varió dependiendo del tipo de material vegetal.

4.4.2 Semillas

a) Harinas

Se pesaron aproximadamente 20 g de cada semilla (tabla 4), se molieron en un molino de café y se almacenaron a temperatura ambiente para su posterior uso como fuente enzimática.

b) Polvos acetónicos

Se pesaron aproximadamente 20 g de cada semilla (tabla 4), se molieron individualmente con acetona fría (3x20 mL). Posteriormente se filtró a vacío en un embudo büchner y se recuperó el sólido, se dejó secar a temperatura ambiente y se tamizó. El polvo se almacenó en el refrigerador a 4 °C para su posterior uso como fuente enzimática.

4.4.3 Vegetales

a) Vegetal fresco

El material vegetal, (hoja y tallo de apio, cáscara de manzana roja, naranja y verde, cáscara y pulpa de papa amarilla y blanca, naranja, toronja, mandarina, betabel, pulpa de ajo, tallo de hongo, pasto, cáscara de mamey, melón, plátano, mango, sandía, nopal, pepino, jícama y aguacate) se cortó en trozos de aproximadamente 0.5 cm³ e inmediatamente se empleó como fuente de enzima.

b) Liofilizado de extracto vegetal

Los trozos de material vegetal (tabla 4) se molieron en una licuada con agua destilada, en una proporción 1:4 (g/mL). Posteriormente, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante, el cual se liofilizó, utilizando una liofilizadora LABCONCO FreeZone 4.5, con una temperatura de -40°C y una presión de 0.133 mBar. Finalmente, se determinó la pérdida de peso, se recuperó el polvo y se almacenó en el refrigerador a 4 °C.

c) Liofilizados vegetales

A excepción del pasto, se separó la cáscara del fruto, procurando retirar la mayor cantidad de pulpa posible. Pulpa y cáscara fueron cortados en pequeños trozos y se molieron en una licuadora con agua destilada, posteriormente se liofilizó. Finalmente, se determinó la pérdida de peso, se recuperó el polvo y se almacenó a 4 °C.

Tabla 4. Fuentes enzimáticas de origen vegetal, parte de la planta usada y tratamiento realizado

Frutos			
Nombre común	Nombre científico	Parte de la planta usada	Tratamiento realizado
Apio	<i>Apiaceae, Apium graveolens</i>	H y T	F Y L
Mandarina	<i>Citrus reticulata: Clementina</i>	P y C	F y L
Manzana roja	<i>Malus: Red Delicious</i>		F
Manzana naranja	<i>Malus: Royal Gala</i>		F
Manzana verde	<i>Malus: Granny Smith</i>		F
Papa amarilla	<i>tuberosum Solanum: Alpha</i>		F y L
Ajo	<i>Allium: sativum</i>	P	F
Hongo	<i>Agaricus campestris</i>	T	F
Aguacate	<i>Lauraceae, Persea</i>	C	F y L
Jícama	<i>Pachyrhizus erosus</i>		F y L
Mamey	<i>Sapotaceae, Pouteria</i>		F y L
Melón	<i>Cucumis melo</i>		F y L
Pepino	<i>Curcubitaceae, Cucumis</i>		F y L
Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	C y S	PA
Mango	<i>Anacardiaceae, Mangifera)</i>	C	F
Plátano	<i>Platanaceae, Platanus</i>	C	F
Sandía	<i>Citrullus lanatus</i>	C	F
Nopal	<i>Cactaceae, Opuntia</i>	P	F
Betabel	<i>Beta vulgaris</i>	P, C y T	F
Pasto		H y LH	F y L
Naranja	<i>Citrus sinensis Valencia</i>	P y C	F, L, EL
Toronja	<i>Citrus paradisi</i>		F y L
Papa blanca	<i>Solanaceae, Solanum</i>	P y C	F, L, EL
Semillas			
Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	S	PA
Semilla de girasol	<i>Helianthus annuus</i>		PA

Semilla de calabaza	<i>Cucurbita maxima</i>		PA
linaza	<i>Linum usitatissimum</i>		PA
Almendra	<i>Rosaceae, Prunus</i>		PA
Ajonjolí	<i>Sesamum indicum</i>		PA
Frijol morado ayocote	<i>Fabaceae, Phaseolus</i>		H
Haba	<i>Vicia faba</i>		H
Chícharo seco	<i>Pisum sativum</i>	S	H
Chícharo siembra	<i>Fabaceae, Pisum</i>		H
Alverjón	<i>Fabaceae, Pisum</i>		H
alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>		H

Nota: T: tallo, H: hoja, P: pulpa, C: cáscara, S: semilla, F: fresco, L: liofilizado EL: extracto liofilizado, PA: polvo acetónico y H: harina.

4.5 Metodología general para la evaluación de la actividad hidrolasa de las fuentes enzimáticas.

La reacción biocatalítica con cada fuente enzimática se realizó por triplicado. El peso de la fuente de biocatalizador se seleccionó de acuerdo con su tratamiento final.

De los polvos de las semillas se pesaron 25mg/mL, del material vegetal fresco se pesaron 100 mg/mL y del liofilizado se empleó el peso equivalente a 100 mg del material fresco/mL. El sustrato, la cantidad de sustrato, amortiguador, codisolvente, temperatura y tiempo de reacción empleados se describen en los resultados.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, las muestras se extrajeron con CH₂Cl₂ o EtOAc (2x500 µL), se agitaron durante un minuto, se centrifugaron a 13200 rpm a 4°C y se filtraron en pipetas pasteur con algodón y sulfato de sodio anhidro. Posteriormente, se determinó el %conv por CG. Las muestras que presentaron conversión >50% se redisolvieron en iPrOH y se analizaron por CLAR usando una columna quiral ideal para una separación adecuada y así determinar el %ee.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Desarrollo de métodos analíticos para la evaluación de las reacciones de hidrolisis

En la tabla 5 se observan los resultados obtenidos de %de conv en la síntesis de ésteres y acetatos.

Tabla 5. % conv en síntesis química de ésteres y acetatos.

ÉSTER	% conv
Éster metílico de naproxeno	96.5
Éster metílico de ibuprofeno	100
Éster etílico de ibuprofeno	98
Acetato de 1-feniletanol	97.6
2-hidroxi-1-feniletacetato MOOH1	59.4
2-hidroxi-2-feniletacetato MOOH2	16.57
Diacetato de 1-fenil-1,2- etanodiol DIOAc	98%

En la tabla 5 se muestra el %conv en la síntesis química de ésteres y acetatos. Los ésteres de AINES, el acetato de 1-feniletanol, MOOH1 y MOOH2 y DiOAc se analizaron por CG y por IR de acuerdo con los grupos funcionales correspondientes (Anexo 1).

De acuerdo con los resultados de conversión, se puede observar que los ésteres de naproxeno e ibuprofeno, así como el acetato de 1-feniletanol presentaron un % conv cercano al 100 %. Estas reacciones se vieron favorecidas por presentar un exceso de alcohol correspondiente en el medio de reacción, siendo el ibuprofeno, naproxeno y 1-feniletanol el reactivo limitante, además de que los ésteres presentan mayor estabilidad por resonancia.

En la síntesis de MOOH1 Y MOOH2, a partir de 1-fenil-1,2-etanodiol, la identificación de cada uno se vio complicada por la ausencia de estándares, y a su vez, en CG y CLAR, ambos monoacetatos presentaron polaridad similar, por lo que su separación se complicó, además de que la máxima conversión de éstos en conjunto fue de aproximadamente 76 %

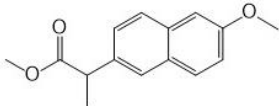
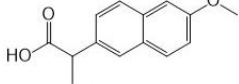
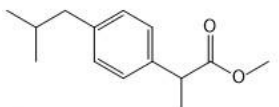
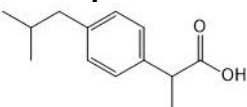
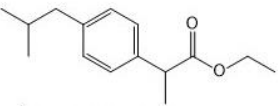
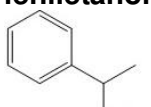
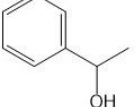
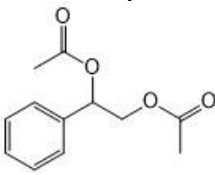
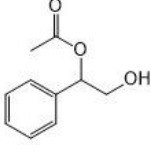
A partir de 2-hidroxiacetofenona se obtuvieron ambos monoacetatos y con la misma proporción que el método anterior (1:3.6), por lo cual, el análisis tuvo que realizarse con RMN para identificar a MOOH1 y MOOH2.

Análisis por RMN de monoacetatos de 1-fenil-1,2-feniletanediol

El análisis de RMN se realizó COSY, HSQC y HMBC (Anexo 3).

De acuerdo con los desplazamientos teóricos en ^{13}C Y ^1H (Anexo 2), de ambos monoacetatos, se llegó a la conclusión de que el monoacetato correspondiente al 59.4 % conv correspondía a MOOH1 (2-hidroxi-1-feniletilacetato) y el 16.57 %conv a MOOH2 (2-hidroxi-2-feniletilacetato). Los métodos analíticos se detallan en la tabla 6 y 7.

Tabla 6. Condiciones utilizadas para determinar el %conv por CG.

Tiempos de retención (min)		Columna	Temperatura del horno (°C)	Flujo (mL/min)
Sustrato	Producto			
Éster metílico de naproxeno  5.58	Naproxeno  7.20	HP-5	220	1.1
Éster metílico de ibuprofeno  3.98	Ibuprofeno  5.06		190	0.9
Éster etílico de ibuprofeno  4.46			190	0.9
Acetato de 1-feniletanol  2.74	1-feniletanol  2.94		200	0.6
1-feniletano-1,2-diil-diacetato (DIOAc)  4.48	2-hidroxi-1-feniletilacetato (MOOH1)  4.82		180	0.8
	2-hidroxi-2-feniletilacetato (MOOH2)		180	0.8

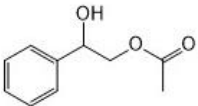
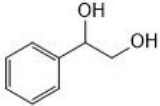
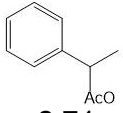
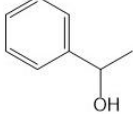
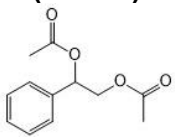
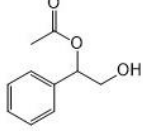
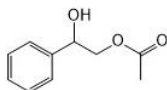
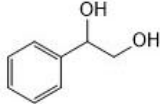
	 4.37			
	1-fenil-1,2-etanodiol 		180	0.8

Tabla 7. Condiciones utilizadas para determinar el %conv por CLAR.

Sustrato	Tiempos de retención (min)		Columna	Fase móvil hexano: IsopOH	Flujo (mL/min)
	Enantiómero				
	1	2			
Acetato de 1-feniletanol  2.74	19.6	23.4	OJ-H	98:02	0.9
1-feniletanol 	13.0	14.1	OJ-H	98:02	0.9
1-feniletano-1,2-diil-diacetato (DIOAc)  4.48	4.2	5.1	OJ-H	72:28	1.80
2-hidroxi-1-feniletilacetato (MOOH1)  4.82	10.0	14.4	OJ-H	72:28	1.80
2-hidroxi-2-feniletilacetato (MOOH2)  4.37	6.1	7.0	OJ-H	72:28	1.80

1-fenil-1,2- etanodiol 	25.6	36.3	OB-H	98:02	1.1
--	-------------	-------------	------	-------	-----

5.2 Hidrólisis biocatalizada del éster metílico de naproxeno

Se seleccionaron como posibles fuentes de hidrolasas los materiales vegetales que se muestran en la tabla 8.

De las fuentes enzimáticas empleadas se usaron diferentes partes del material vegetal, siendo esta una variable de la misma (cáscara, tallo, pulpa, hoja, semilla) y a su vez, se usaron diferentes formas para procesarlo (tratamiento realizado) como material fresco, liofilizado, extracto liofilizado, harina o polvos acetónicos.

Se seleccionó al éster metílico de naproxeno como compuesto modelo. Las condiciones de reacción se indican en la tabla 9.

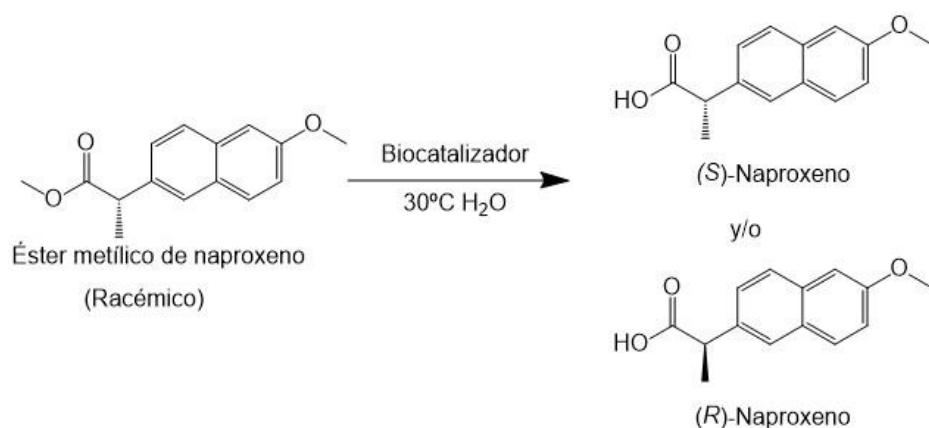


Figura 7. Hidrólisis biocatalizada del éster de naproxeno

Tabla 8. Condiciones de reacción en la hidrólisis biocatalizada de éster metílico de naproxeno

Codisolvente	Dioxano 10 %
Tiempo de reacción (h)	48 h
Temperatura de reacción (°C)	30 °C y 40 °C
Medio de reacción	buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7 y 9
Sustrato	0.0230 mmol /mL de reacción

Tabla 9. Fuentes enzimáticas empleadas en la hidrólisis biocatalizada del éster metílico de naproxeno, parte de la planta usada y tratamiento realizado

Fuente enzimática			% conv
Frutos	Parte de la planta usada	Tratamiento realizado	
Aguacate	C	F	Sin hidrólisis
Jícama	C	F	
Mamey	C	F	
Pasto	H	F	
Naranja	P y C	F Y L	
Toronja	P y C	F Y L	
Apio	T y H	F	
Mandarina	P y C	F	
Manzana roja	P y C	F	
Manzana naranja	P y C	F	
Manzana verde	P y C	F	
Papa amarilla	P y C	F	
Betabel	P, C y T	F	
Papa blanca	P y C	F Y L	
Semillas			
Cacahuete	S	PA	
Semilla de girasol			
Semilla de calabaza			
linaza			
Almendra			
Semilla sésamo			
Frijol morado ayocote			
Haba			
Chícharo seco			H
Chícharo siembra			
Alverjón			
Alubia			

Nota: T: tallo, H: hoja, P: pulpa, C: cáscara, S: semilla, F: fresco, L: liofilizado
PA: polvo acetónico y **H:** harina

De acuerdo con los análisis de CG de las reacciones que se llevaron a cabo, demostraron que, con las condiciones de reacción descritas anteriormente, las fuentes enzimáticas empleadas no presentaron propiedades hidrolíticas para este sustrato.

Yilmaz, Can y otros ⁽²⁵⁾, llevaron a cabo la inmovilización de la lipasa de *Cándida rugosa* en perlas de vidrio para la hidrólisis enantioselectiva del éster metílico de naproxeno. El sistema de reacción que implementaron consistió en 2 mL de isooctano como disolvente, éster metílico de naproxeno racémico (20 mM) y

buffer de fosfatos (2 mL, pH 7, 50 mM). Las conversiones que obtuvieron fueron del 14%.

A su vez, Steenkamp y Brady ⁽²⁶⁾, evaluaron ocho enzimas hidrolasas disponibles comercialmente para hidrolizar al éster etílico de naproxeno a 37°C durante 4 h. Los resultados que obtuvieron fueron bajos, % conv y % ee <20%, a excepción de ChiroCLEC-CR, que presentó 40% conv y 99% ee.

En otro artículo, Steenkamp y Brady ⁽²⁷⁾ usaron la enzima NP Carboxilesterasa para hidrolizar el éster metílico de naproxeno en buffer TRIS 0,1 M (pH 8,75) Tween 80 al 1% a 45 °C por 23 h. La conversión fue de 34% bajo estas condiciones. Los autores señalan que la concentración del buffer y pH fueron puntos críticos para hidrólisis biocatalítica.

De acuerdo con estos resultados se deduce que las condiciones en la hidrólisis biocatalítica de este éster son críticas, ya que las conversiones reportadas en otros trabajos fueron bajas a pesar de ser enzimas purificadas e identificadas, por lo que el sistema enzimático para hidrolizar un éster de naproxeno es muy estricto.

Uno de los factores que posiblemente influyó en la hidrólisis pudo ser el impedimento estérico, pues el enlace éster al estar cerca del anillo aromático, no facilitó el contacto enzima-sustrato para llevar a cabo la hidrólisis de éste. Por lo que las enzimas implementadas para este tipo de molécula tienen que ser altamente regioselectivas y enantioespecíficas, cualidades que las fuentes enzimáticas empleadas para este sustrato no presentaron.

Otras variables que influyeron en la ausencia de conversión fue la solubilidad del ácido y el cosolvente empleado, pues a pesar de utilizar dioxano al 10 %, en algunos casos el medio de reacción presentó ligera turbidez, por lo que posiblemente el éster no se encontraba totalmente disuelto en el medio de reacción y, por lo tanto, el contacto con la enzima fue insuficiente.

5.3 Hidrólisis biocatalítica de éster metílico y etílico de ibuprofeno

Se llevó a cabo la hidrólisis de los ésteres metílico y etílico de ibuprofeno (Figura 8), utilizando como fuentes de enzima los materiales vegetales que se muestran en la Tabla 10 y los parámetros de reacción se señalan en la tabla 11.

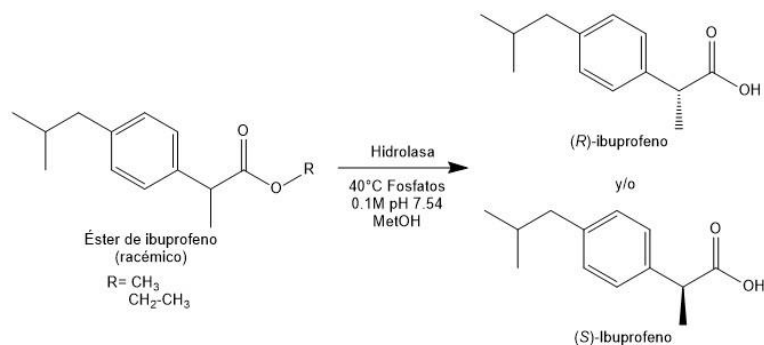


Figura 8. Hidrólisis biocatalítica de ésteres de ibuprofeno

Tabla 10. fuentes enzimáticas empleadas en la hidrólisis de ésteres de ibuprofeno

Frutos		
Nombre comercial	Parte de la planta usada	Tratamiento realizado
Manzana roja	C	F
Naranja	P y C	F y EL
Manzana verde	C	F
Papa blanca	P y C	F
Toronja	C	EL
Mamey	C	F y L
Aguacate	C	F y L
Pasto	H	F y L
jícama	C	F y L
Sésamo	S	F
Girasol	S	F

Tabla 11. Parámetros de la reacción de hidrólisis biocatalítica de los ésteres de ibuprofeno

Codisolvente	Dioxano 10 %
Tiempo de reacción (h)	48 h
Temperatura de reacción (°C)	40 °C
Medio de reacción	buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.54
Sustrato	0.0230 mmol /mL de reacción

Los resultados de la hidrólisis fueron los mismos que con el éster metílico de naproxeno (Tabla 9).

Los análisis en CG de las reacciones que se llevaron a cabo demostraron que, con las condiciones de reacción implementadas, las fuentes enzimáticas empleadas no presentaron propiedades hidrolíticas para estos sustratos.

En un artículo de Gandomkar y otros ⁽¹⁸⁾ evaluaron la hidrólisis enantioselectiva de ésteres de ibuprofeno racémico catalizados por 3 diferentes lipasas inmovilizadas. La reacción se llevó a cabo n-hexano o isooctano y buffer de fosfato de sodio pH 7.0 a 40 °C en agitación constante. El %conv que obtuvieron para los ésteres metílico y etílico de ibuprofeno fueron menores al 1% a excepción de éster metílico en isooctano el cual presentó 21 %conv, pero un 18 %ee. Ellos señalan que a pesar de aumentar la cantidad de enzima las conversiones no fueron considerables.

En otro artículo ⁽²⁸⁾, también emplearon lipasas para la resolución enzimática. Las condiciones empleadas fueron sobre un sistema bifásico, buffer de fosfato, pH

7.0 y con diferentes ésteres de ibuprofeno como sustratos. Para el éster metílico de ibuprofeno, se observó que en isooctano a 50° C obtuvieron 5.5 %conv y 55.5 %ee. Para el éster etílico se obtuvo 45.1 %conv y 92.3 %ee.

Probablemente uno de los factores que afectó la resolución biocatalítica fue el disolvente orgánico. Es posible que la interfase agua/disolvente orgánico no fue la adecuada para que la enzima se activara y mantuviera un contacto interfacial óptimo con el sustrato ⁽²⁹⁾.

La temperatura posiblemente fue otro de los factores cruciales en la resolución enzimática, ya que generalmente las enzimas requieren condiciones de temperatura suave para obtener la actividad catalítica óptima. En base al artículo citado ⁽¹⁸⁾, los resultados de todos los derivados de éster, al aumentar temperatura de reacción entre 40 y 50 °C, la enantioselectividad de la reacción disminuyó, lo que puede ser atribuido al inicio del proceso de desnaturalización de la enzima.

5.4 Hidrólisis biocatalítica del acetato de 1-feniletanol

Posteriormente se llevó a cabo la hidrólisis biocatalítica del acetato de 1-feniletanol (figura 9), En la tabla 12 se describen las condiciones de reacción implementadas en esta reacción.

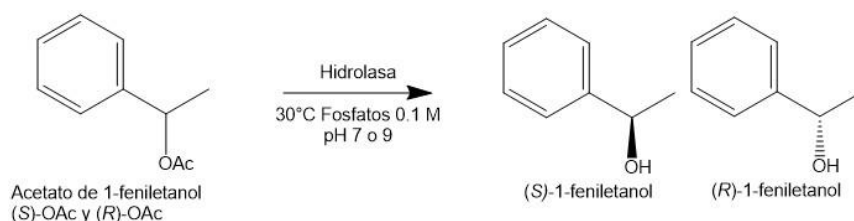


Figura 9. Hidrólisis biocatalítica del acetato de 1-feniletanol

Tabla 12. Condiciones de reacción en la hidrólisis biocatalítica del acetato de 1-feniletanol

Codisolvente	Etanol 10 %
Tiempo de reacción	1-24 h
Temperatura de reacción	30 y 40 °C
Medio de reacción	Buffer de fosfatos 0.1 M. pH 7, 9 y 7.5
Sustrato	0.008mmol/mL de reacción

Tabla 13. % conv, %ee y fuentes enzimáticas empleadas en la hidrólisis del acetato de 1-feniletanol.

		Fuente enzimática		
Frutos	Parte de la planta usada	Tratamiento realizado	% conv	%ee
Apio	H	F	19,81	NA
Mandarina	C	F	95,16	7,27
Ajo	P	F	32,51	NA
Hongo	T	F	15,33	NA
Aguacate	C	F	100	4,13
Jícama	C	F	92,76	14,54
Mamey	C	F	92,53	14,97
Melón	C	F	71,28	35,42
Pepino	C	F	68,39	39,79
Cacahuete	C	F	15,35	NA
Mango	C	F	40,04	NA
Plátano	C	F	38,13	NA
Sandía	C	F	15,57	NA
Nopal	P	F	45,79	NA
Pasto	H	F	95,45	5,58
Naranja	P	F	44,21	NA
	C	F	99,38	3,09
	C	L	97,31	NA
	P	L	4,46	NA
Toronja	P	F	28,87	NA
	C	F	98,81	3,70
	P	L	24,15	NA
	C	L	93,52	11,30
Papa blanca	P	F	65,58	NA
	C	L	76,96	31,89
Semillas				
Semilla de girasol	S	PA	26,6	NA
Semilla de calabaza		PA	73,97	3,98
linaza		PA	78,94	23,83
Semilla sésamo		PA	70,37	24,33

Nota: T: tallo, H: hoja, P: pulpa, C: cáscara, S: semilla, F: fresco, L: liofilizado
PA: polvo acetónico y H: harina

De acuerdo con la tabla 13, todas las fuentes vegetales empleadas presentaron actividad hidrolítica para este sustrato. Las fuentes enzimáticas que mostraron mayor actividad biocatalítica para la hidrólisis del acetato de 1-feniletanol a 1-feniletanol fueron las cáscaras de cítricos (*citrus*), mandarina (95.2%), naranja

(99.4%) y toronja (98.8%), cáscaras de aguacate (100%), jícama (92.8%), mamey (92.5%), pepino (68.4%), melón (71.3%) pasto (95.5%), papa blanca (65.6%) presentaron también conversiones altas y respecto a las semillas fueron: semilla de calabaza (74%), linaza (79%), y sésamo (70.4%). Con Las pulpas vegetales se obtuvieron menores porcentajes de conversión.

Sin embargo, en cuanto a los excesos enantioméricos, no todas las enzimas fueron enantioselectivas. La cáscara de pepino fue la que presentó mayor % ee (39.8 %) seguido de la cáscara de melón (35.4%ee), cáscara de papa blanca (31.9% ee), sésamo (24.3% ee), linaza (23.8%ee), mamey (15% ee) y jícama (14.5%) entre otros.

Para determinar cuál enantiómero de 1-feniletanol era el obtenido en la biocatálisis, se realizó la acetilación de (*R*)-1-feniletanol ((*R*)-OH) y (*S*)-1-feniletanol ((*S*)-OH) para obtener acetato de (*R*)-1-feniletanol ((*R*)-OAc) y acetato de (*S*)-1-feniletanol ((*S*)-OAc) respectivamente. Posteriormente fueron analizados por CLAR y usados como referencia (Tabla 7).

Se observó que la mayoría de los biocatalizadores transformaron en mayor proporción el enantiómero (*R*)-OAc, a (*R*)-OH con excepción de la cáscara de mamey, jícama, melón, papa blanca y semilla de linaza que presentaron estereoselectividad contraria. Vandenberghe y otros ⁽¹⁴⁾, utilizaron diversas especies de vegetales para la hidrólisis del acetato de 1-feniletanol con cáscara de naranja obtuvieron un 78% conv y 3% ee, y con cáscaras de papas de diversas especies entre 68-86 % conv, y entre 12-36 %ee. Esto significa que la cáscara de diversos frutos representa una fuente exquisita de enzimas capaces de biocatalizar diversas reacciones hidrolíticas.

5.4.1 Optimización en los tiempos de biocatálisis de acetato de 1-feniletanol

Para maximizar la enantioselectividad se optó por disminuir el tiempo de reacción al utilizar las fuentes vegetales de enzima con las que se lograron %conv mayores a 75%, para llegar al máximo de 50 % de conversión y un %ee máximo.

Dado que se desconocía el tiempo en el cual la reacción alcanzaría una conversión cercana al 50 %, se optó por monitorear la reacción durante la primera media hora, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 8 horas.

Por otra parte, la actividad biocatalítica del material vegetal liofilizado fue similar a la del material fresco (tabla13), por lo que se decidió utilizar el material liofilizado disponible por su estabilidad, manipulación y fácil almacenamiento, así como polvos acetónicos (Tabla 14).

Tabla 14. % conv, %ee y fuentes enzimáticas empleadas en la biocatálisis del acetato de 1-feniletanol 1-8 h

Fuente enzimática	Parte de la planta usada	Tratamiento realizado	% conv					% ee
			30 min	1h	2h	4h	8h	
Naranja	C	L	12.10	20.44	39.25	59,98	76,69	20,44
Toronja	C	L	9.12	25.98	32.87	56,15	69,71	9,34
Mamey	C	L	6.50	19.30	28.35	47,23	67,7	-0,96
Aguacate	C	L	58,59	62,66	71,24	85,26	94,42	63,77
Pasto	H	L	18.64	35.15	52,42	78.18	82.74	-10,18
jícama	C	L	3.15	14.22	25.58	35,83	47,49	41,62
Linaza	S	PA	---	---	---	38,20	---	64,86

Nota: H: hoja, C: cáscara, S: semilla, L: liofilizado PA: polvo acetónico y H: hoja.

En la tabla 14 se muestran los % de conv utilizando materiales liofilizados y polvos acetónicos. Los tiempos en los cuales se alcanzó un % conv cercano al 50% fueron: naranja 4h (59.98%), toronja 4h (56.15%), mamey 4h (47.23%), aguacate 0.5h (58.59%), pasto 4h (52.42%), jícama 8h (47.49%) y linaza 4h (38.20%).

Las fuentes enzimáticas que presentaron mayor %ee fueron linaza (64.86%) y cáscara de aguacate (63.77%), seguido de la cáscara de jícama (41.62%) y cáscara de naranja (20.44%).

De acuerdo con los resultados, se destaca que ninguna fuente enzimática presentó alta enantioselectividad bajo estos parámetros, sin embargo, los tiempos de conversión fueron cortos, principalmente con la cáscara de aguacate, la cual alcanzó más del 50% de conversión en media hora.

Nuevamente se observó que la mayoría de los biocatalizadores transformaron en mayor proporción el enantiómero (*R*)-OAc, a (*R*)-OH.

5.5 Hidrólisis biocatalítica de 1-fenil-1,2-etanodiol

Se llevó a cabo la hidrólisis biocatalítica 1-fenil-1,2-etanodiol, bajo las condiciones de reacción que se muestran en la tabla 15. se utilizó el material biológico que se indica en la tabla 16.

La reacción hidrolítica de 1-fenil-1,2-etanodiol en general consiste en dos pasos:

- 1) Hidrólisis del éster para la obtención de monoacetato del alcohol primario o secundario:

De acuerdo con los análisis de RMN, el éster más susceptible a la hidrólisis es el que se encuentra en el carbono primario y da origen al alcohol primario (MOOH1) en una proporción de 3.6:1 con el éster que da origen a un alcohol secundario (MOOH2). Este hecho concuerda con un análisis realizado por Virsu y otros⁽³⁰⁾, quienes señalan que en la hidrólisis del diacetato, el primer alcohol formado es el primario de una manera altamente regioselectiva.

- 2) Hidrolisis del segundo éster: obtención de 1-fenil-1,2-etanodiol

Posteriormente, el sustrato de la segunda reacción son ambos monoacetatos, para dar origen al diol.

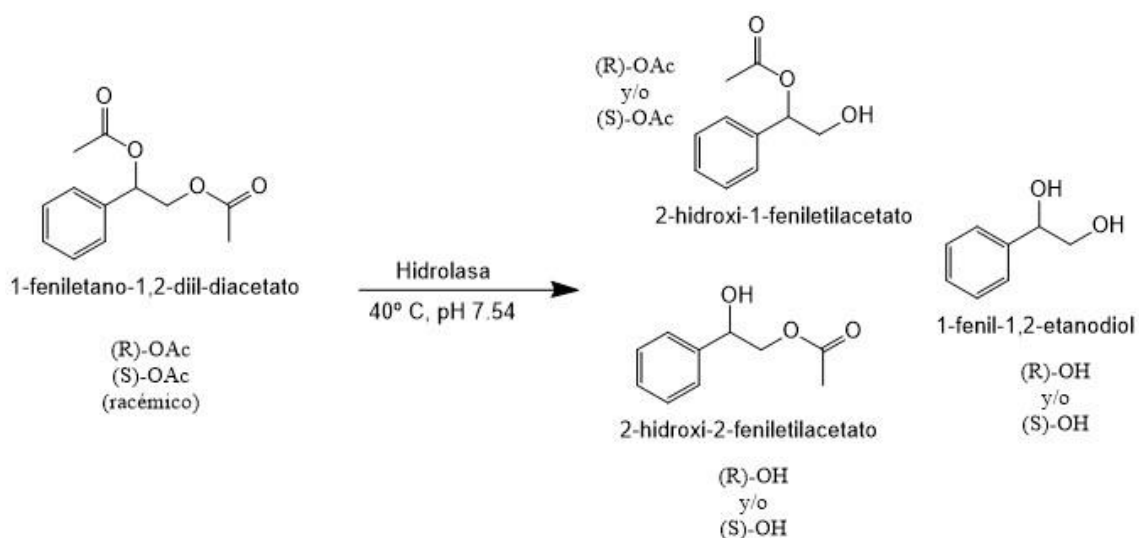


Figura 10. Hidrólisis biocatalítica de 1-feniletano-1,2-diil-diacetato

Tabla 15. Condiciones de reacción en la biocatálisis de diacetato de 1-fenil-1,2-etanodiol

Codisolvente	Etanol 10 %
Tiempo de reacción	1-8 h
Temperatura de reacción	30 °C
Medio de reacción	Buffer de fosfatos 0.1 M. pH 7.5
sustrato	0.008mmol/mL de reacción

Tabla 16. %conv, %ee y fuentes enzimáticas empleadas en la biocatálisis del acetato de 1-fenil-1,2-etanodiol.

Fruto	parte de la planta usada	% conv						
		Producto	tiempo (h)					%ee
			0,5	1	2	4	8	
Naranja	C	MOOH1	28.49	66.70	75.87	75.20	75.70	0
		MOOH2	8.05	18.71	21.28	21.13	21.17	0
Aguacate	C	DIOH	8,65	28,75	64,77	66,66	76	2.1
		MOOH1	66.18	54.75	26.90	24.40	15.39	0
		MOOH2	18.52	15.32	7.61	6.92	4.27	1.3
Pasto	H	DiOH	---	---	5,86	---	---	0.8
		MOOH1	12.88	26.09	59.00			2.2
		MOOH2	3.62	7.31	16.33	---	---	2.4
jícama	C	MOOH1	---	---	46.01	58.00	61.10	0
		MOOH2			12.39	16.30	17.52	0
Pepino	C	MOOH1	---	---	42.20	57.80	63.04	3.4
		MOOH2	---	---	11.87	16.30	17.31	3.1
Melón	C	MOOH1	---	---	---	44.70	53.10	0
		MOOH2	---	---	---	12.46	14.9	0
Linaza	P	MOOH1	---	---	31.40	54.20	62.70	0
		MOOH2	---	---	8.69	15.23	17.48	0
Toronja	C	MOOH1	---	28.6	44.50	66.00	76.2	0
		MOOH2	---	8.6	12.47	18.43	21.65	0
Mamey	C	MOOH1	---	38.80	55.50	74.36	77.9	0
		MOOH2	---	10.93	15.49	20.86	22.1	0

De acuerdo con la tabla 16, todas las fuentes enzimáticas empleadas en la hidrólisis del diacetato (tabla 16) presentaron actividad hidrolítica. Se puede observar que las reacciones en general alcanzaron más del 50% de conversión en un lapso de 4 horas.

Cabe destacar que de acuerdo con el análisis realizado en RMN, en estas reacciones se obtuvieron ambos monoacetatos, y es curioso observar que la proporción de éstos fue similar a la síntesis química, es decir, que conforme avanzaba la reacción, el diacetato fue desapareciendo y la obtención de ambos monoacetatos se fue presentando, en una proporción 1:3.6 (MOOH1 y MOOH2 respectivamente), por lo que se deduce que las enzimas presentaron regioselectividad.

Por otra parte, las enzimas presentes en el pasto y la cáscara de aguacate hidrolizaron el diacetato para dar lugar a ambos monoacetatos. Las proporciones obtenidas también fueron 1:3.6. Conforme fue transcurriendo la reacción, MOOH1 Y MOOH2 fueron hidrolizados y la obtención del diol fue en aumento. Por lo tanto, en el medio de reacción se encontraban como sustratos, MOOH1, MOOH2 y el diacetato y el diol como producto. De acuerdo con este comportamiento, se deduce que las enzimas presentes en el pasto y cáscara de aguacate son regioselectivas para la obtención de MOOH1 Y MOOH2

Sin embargo, MOOH1 Y MOOH2 fueron sucesivamente hidrolizados para dar lugar al diol y la proporción 1:3.6 no cambió en el transcurso de la reacción, por lo que se deduce que las enzimas presentes en el pasto y cáscara de aguacate no son regioselectivas con MOOH1 Y MOOH2.

De acuerdo con la tabla 16 se observa que en ningún caso alguna enzima presentó enantioselectividad.

Virsu, y otros, ⁽³⁰⁾ señalan que estas reacciones, que ocurren lejos del estereocentro, a menudo proceden con muy poca enantioselectividad. En su artículo ⁽³⁰⁾, realizaron transesterificación de 1-fenil-1,2-etanodiol catalizada por una acilasa I de *Aspergillus melleus*, Indican una regioselectividad más alta para la acetilación de alcoholes secundarios en lugar de primarios. La catálisis con Acilasa I en medio orgánico, condujo a la formación quimio y enantioselectiva de (S) MOOH1 (ee 97%) a través de la acetilación del grupo hidroxilo secundario, aunque tuvieron bajo rendimiento químico (aproximadamente el 25%). Con lipasa A *Cándida antártica* obtuvieron MOOH1 con un 80% ee. y 35% conv.

También ellos realizaron la hidrólisis de cada monoacetato por separado, con lipasa A de *Candida antarctica* y en acetonitrilo como medio de reacción, sin embargo, obtuvieron enantioselectividades demasiado bajas para ser de valores prácticos. Con lipasa B de *Candida antarctica*, realizaron hidrólisis del diacetato y observaron también alta regioselectividad al obtener MOOH1 sobre MOOH2.

Por otra parte, uno de los factores que posiblemente afectó la resolución biocatalítica fue el disolvente orgánico. Es posible que el medio de reacción no fue el adecuado para que la enzima fuera enantioselectiva y mantuviera un contacto interfacial óptimo con el sustrato.

En otro artículo ⁽²⁰⁾, se realizó la hidrólisis enantioselectiva del diacetato de 1-fenil-1,2-etanodiol utilizando células recombinantes de utilizando buffer de fosfatos 0.2M pH 7.0 a 30°C. EN sus resultados discuten que el primer monoacetato que apareció en la reacción inicial fue MOOH1, sin enantioselectividad. Sin embargo, ellos ocuparon un complejo enzimático para biocatalizar la segunda reacción y obtener el diol, con un 49% conv y 96%ee. Señalan que la primera reacción fue 6 veces más rápida que la segunda reacción.

Por otra parte, en el mismo artículo señalan que el MOOH1 no es estable en medio acuoso, y que cuando la reacción se mantiene por más tiempo, tiende a favorecer la obtención de MOOH2 sin enantioselectividad.

De acuerdo con este artículo ⁽²⁰⁾ la hidrólisis biocatalítica se llevó a cabo en medio de reacción acuoso lo que, posiblemente favoreció a la aparición de MOOH2 en la misma proporción que la síntesis convencional.

Otro posible factor que pudo influir en la hidrólisis fue la concentración del buffer y pH, pues es conocido que éstos juegan un papel importante en la reacción, alterando el estado iónico del sustrato y la configuración estereoquímica de la enzima que alteran la actividad enzimática y enantioselectividad.

6 CONCLUSIONES

Los esteroides empleados en este trabajo presentaron diferente respuesta a la hidrólisis, siendo los acetatos los sustratos más adecuados para llevar a cabo la hidrólisis utilizando diversas fuentes enzimáticas.

A su vez, cada fuente enzimática presentó diferente actividad hidrolítica. Es por ello que deben buscarse condiciones óptimas para cada fuente, de las cuales se obtenga la mayor actividad biocatalítica posible.

Por otra parte, por la ausencia de hidrólisis enzimática, no se logró observar el efecto biocatalítico por el tamaño de cadena en ésteres de ibuprofeno y naproxeno.

Se observa que el tamaño de la molécula e impedimento estérico son puntos críticos para que la reacción de hidrólisis suceda.

A pesar de que los resultados reflejaron que las fuentes enzimáticas empleadas no mostraron enantioselectividad, se observa que las conversiones en muchos casos fueron excelentes, siendo de mayor interés las fuentes enzimáticas provenientes de cáscaras, como es el caso de la cáscara de aguacate y cítricos (Tabla 13, 14 y 16), pues éstas al ser considerado un material basura, puede traer grandes ventajas en la industria alimentaria y farmacéutica.

PERSPECTIVAS

Se propone utilizar variaciones en las condiciones de reacción, como en el caso del medio de reacción, donde puede implementarse un sistema bifásico como optimización. En el artículo de Yousefi, Maryam, y otros, (28) Fue implementado un sistema bifásico en la hidrólisis de ésteres de ibuprofeno donde obtuvieron %conv y %ee mayores, en comparación a otros artículos citados en este documento. Es posible que, usando diferentes disolventes orgánicos en mayor proporción en el medio de reacción, la interfase agua/disolvente sea la adecuada para la activación de la enzima y así optimizar la reacción.

Esta investigación abre nuevas puertas para el descubrimiento de fuentes enzimáticas y condiciones óptimas de reacción que favorezcan este tipo de reacciones con % de conversión y excesos enantioméricos considerables.

7 BIBLIOGRAFÍA

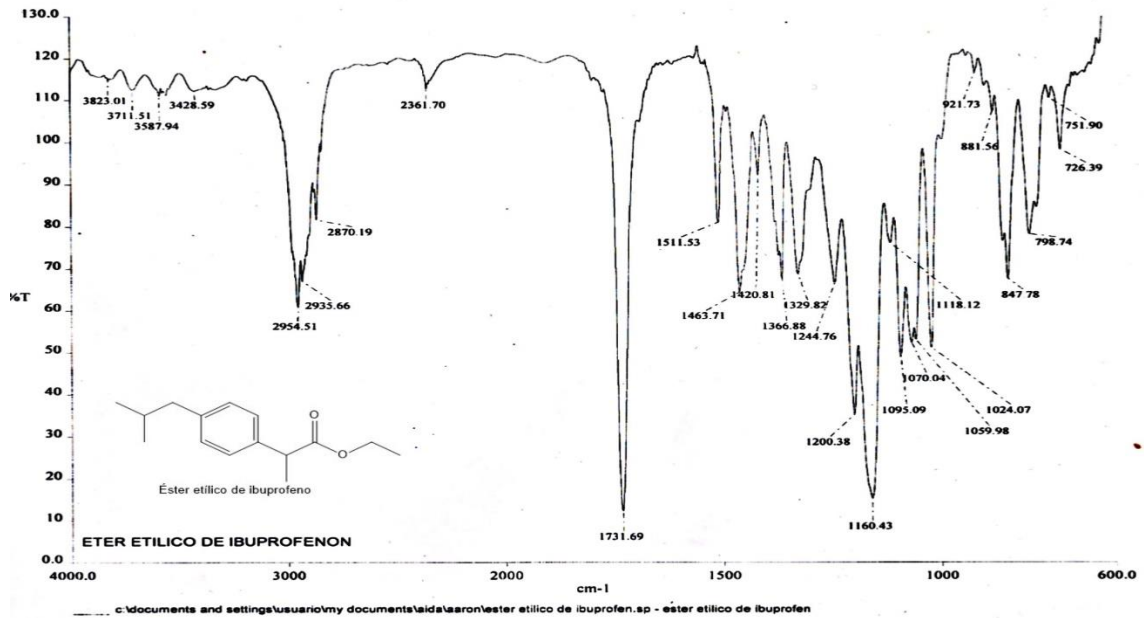
1. Álvarez Álvarez, C. (2002). *Influencia del enantiomorfismo en la solubilidad y velocidad de disolución de distintos fármacos racémicos*. Recuperado el 10 de Octubre de 2016, de <http://biblioteca.ucm.es/tesis/far/ucm-t26427.pdf>. Tesis.
2. Hernáiz, M. (2008). *Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (i) enzimas hidrolíticas*. Recuperado el Octubre de 2016, de <http://analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1318/1376>. Artículo.
3. Patel, R. (2017). Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *ELSEVIER. Bioorganic & Medicinal Chemistry*, ISSN 0968-0896, 1-23. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.023>.
4. Muñoz, D., Hoyos, P., Hernáiz, M., Alcántara, A., & Sánchez Montero, J. (2012). Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresourse Technol*, 115, 196-207.
5. Alcántara León, A. R. (2012). BIOCÁTÁLISIS APLICADA A LA SÍNTESIS DE FÁRMACOS (II). Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XXXV, 238-288.
6. Mazón, A. (1996). *Resolución y cinética de alcoholes y ácidos carboxílicos, vía reacciones de esterificación y síntesis de α -aminoácidos vía alilaciones catalizadas por paladio*. España: Universidad de Alicante. Tesis.
7. Gao-Wei, Z., & Jian-He, X. (2011). New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. *Curr Opin Biotech*, 22, 784-792.
8. Alcántara León, A. (2012). Biocatálisis aplicada a la obtención de fármacos y productos de alto valor añadido. biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (II) Enzimas redox.. *Real Academia Nacional de Farmacia*, Monografía XXXV 238-288.
9. Truppo, M. (2017). Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. *ACS Med Chem Lett*(126), 476-480.
10. Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409, 258-268.
11. Wanda, K., Mironowicz, M., & Mironowicz, A. (2002). Enantioselective hydrolysis of 1-aryl ethyl acetates and reduction of aryl methyl ketones

- using carrot, celeriac and horseradish enzyme systems. *Tetrahedron-Asymmetr*, 13(21), 2299-2302.
12. Caner, H., Groner, E., & Levy, L. (2004). Trends in the development of chiral drugs. *Drugs Disc Tod*, 9(3), 105-110.
 13. Dolian, S. (2010). *Ensayos con partes de plantas como potenciales biocatalizadores de reacciones de hidroxilación*. Buenos Aires: Universidad de Belgrano. Tesis.
 14. Vandenberghe, A., Markó, I. E., Lucaccioni, F., & Lutts, S. (2013). Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. *ELSEVIER*(42), 380-385.
 15. Arroyo, M., Acebal, C., & de la Mata, I. (2014). Biocatálisis y biotecnología. *Arbor*, 190(768) 1-11. Rodríguez, P. (2013). Rol de endófitos en reacciones biocatalíticas mediadas por vegetales. Identificación y caracterización de nuevos biocatalizadores. Facultad de Química, Universidad de la República, tesis.
 16. Jafari, M., Tashkhourian, J., & Absalan, G. (2017). Chiral recognition of naproxen enantiomers based on fluorescence quenching of bovine serum albumin-stabilized gold nanoclusters. *ELSEVIER*(185), 77-84. Artículo.
 17. Gandomkar, S., Habibi, Z., Mohammadi, M., Yousefi, M., & Salimi, S. (2015). Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on epoxy-functionalized silica. *ELSEVIER*(4), 550-554. Artículo.
 18. National Center for Biotechnology Information. (16 de Septiembre de 2004). *Compound Summary for CID 7409*. Recuperado el Enero de 2018, de 1-Phenylethanol: [?https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Phenylethanol#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Phenylethanol#section=Top). Artículo.
 19. Xin, T., Gao-Wei, Z., Chun-Xiu, L., Zhi-long, W., & Jian-He, X. (2011). Enantioselective production of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol from dicarboxyesters by recombinant *Bacillus subtilis* esterase. *ELSEVIER*(73), 80-84. Artículo.
 20. McGinty, D., Letizia, C. S., & Api, A. M. (2012). Fragrance material review on 1,2-ethanediol, 1-phenyl-, 1,2-diacetate. *ELSEVIER*, 327-329. Revista.
 21. Halling, P. (2000). Biocatalysis in low-water media: understanding effects of reaction conditions. *ELSEVIER*(4), 74-80. Revista.
 22. González Bacerio, J., Rodríguez Hernández, J., & Del Monte Martínez, A. (2010). Lipases: enzymes having the potential for developing immobilised biocatalysts by interfacial adsorption. *Rev Col Biotec*, XII(1), 124-140.

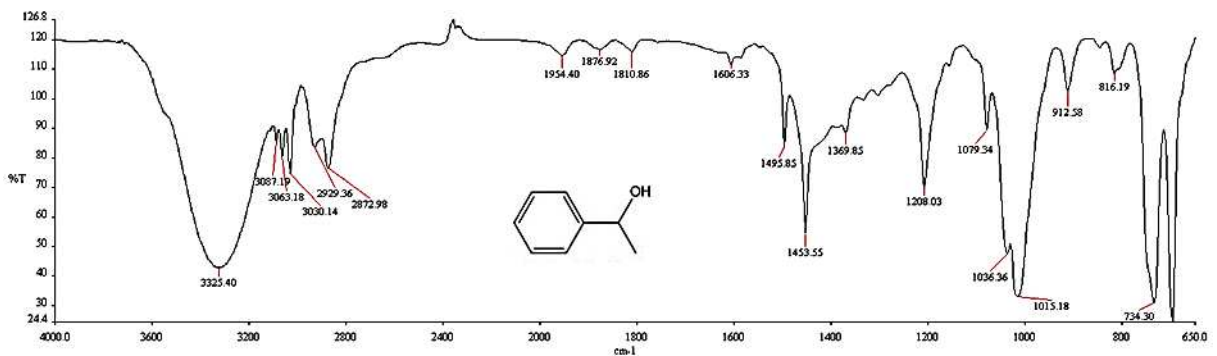
23. Tinoco Valencia, R., & Vázquez Duhalt, R. (2007). Biocatálisis ambiental. *Biotecnología*, 14, 347-360.
24. Yilmaz, E., Can, K., Sezgin, M., & Yilmaz, M. (1 de 2011). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester. *ELSEVIER*(102), 499-456. Revista.
25. Steenkamp, L., & Brady, D. (2003). Screening of commercial enzymes for the enantioselective hydrolysis of R,S-naproxen ester. (477, Ed.) *ELSEVIER*(32), 472. Revista.
26. Steenkamp, L., & Brady, D. (2008). Optimisation of stabilised Carboxylesterase NP for enantioselective hydrolysis of naproxen methyl ester. (43), 1419-1426. Johannesburg.Revista.
27. Yousefi, M., Mohammadi, M., & Habibi, Z. (2014). Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. (104), 87-94.Tesis.
28. Habibi, Z., Mohammadi, M., & Yousefi, M. (2013). Enzymatic hydrolysis of racemic ibuprofen esters using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on different supports. *ELSEVIER*(48), 669-676. Revista.
29. Virsu, P., Liljeblad, A., Kanerva, A., & Kanerva, L. T. (Octubre de 2001). Preparation of the enantiomers of 1-phenylethan-1,2-diol. Regio- and enantioselectivity of acylase I and *Candida antarctica* lipases A and B. *Elsevier*, 12, 2447-2455. Artículo.
30. Luna, H. (2004). Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos. *Rev Soc Quím Méx* (48), 211-219.
31. Salazar Vallejo, M., Peralta Rodrigo, M., & Pastor Ruíz, F. (2009). *Tratado de psicofarmacología: bases y aplicación clínica* (2 ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 espectros IR de éster de ibuprofeno, 1-feniletanol, Espectro de IR de éster etílico de ibuprofeno

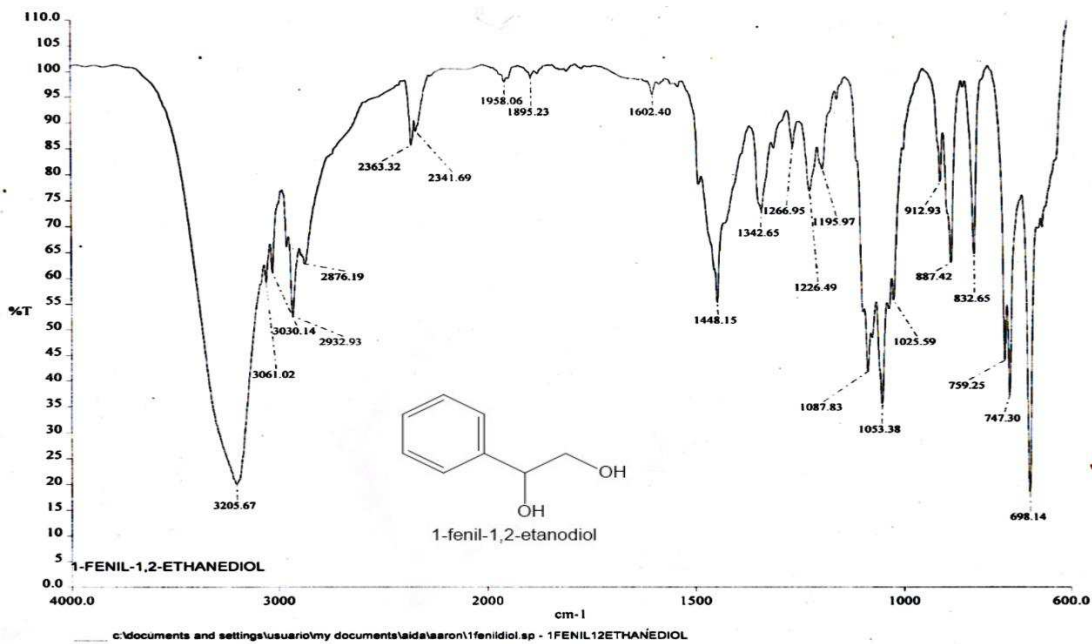


Espectro de IR de 1-feniletanol



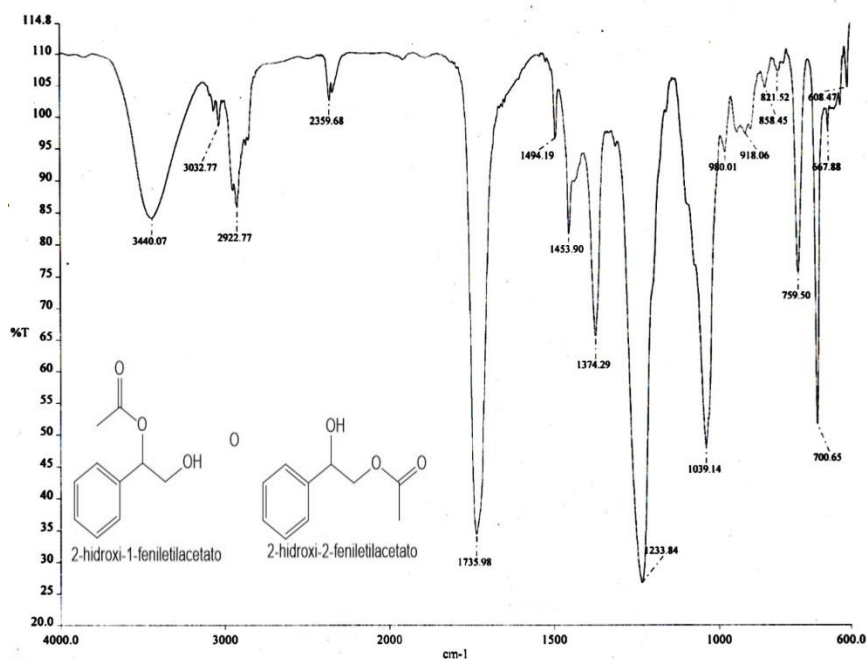
Se observan las señales de alargamiento del enlace O-H a 3325.40 cm⁻¹ y el enlace C-O en 1208.03 cm⁻¹.

Espectro de IR de 1-fenil-1,2-etanodiol



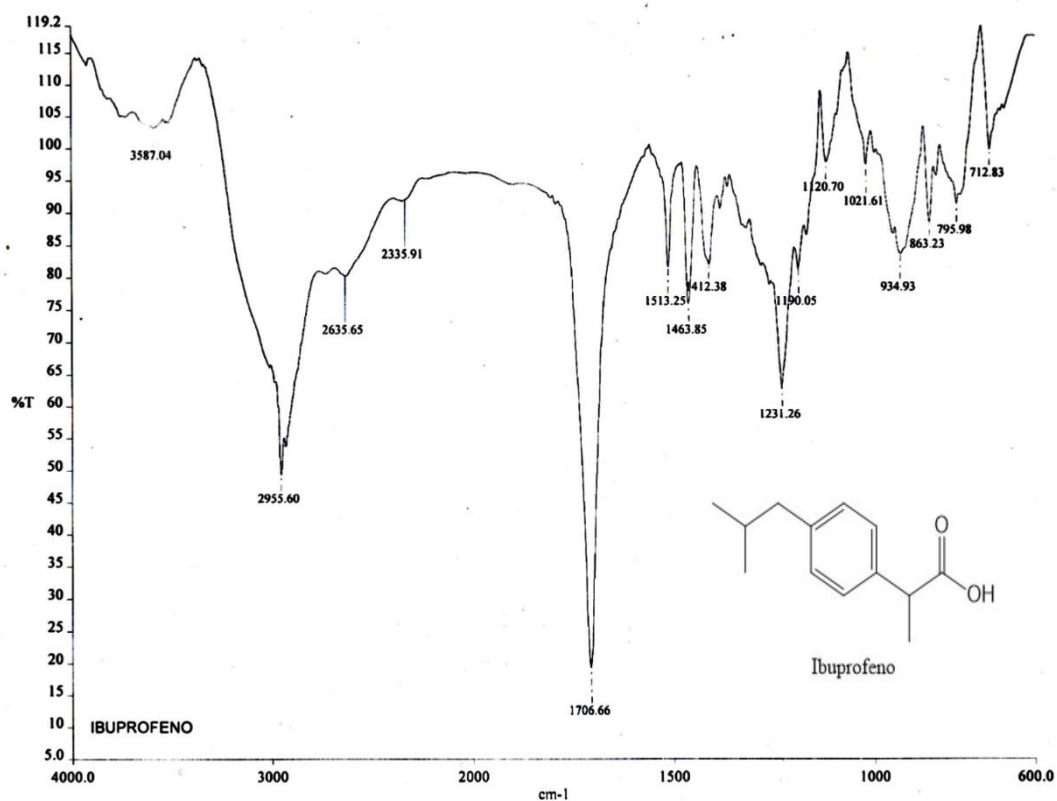
Se observan las señales de alargamiento de ambos enlaces de O-H a 3205.7 cm^{-1} , de CH-CO y de CH₂-O en $1087.8 \text{ Y } 1053.3 \text{ cm}^{-1}$ como señales características.

Espectro de IR de éster etílico de MOOH1 y/o MOOH2



Se observan las señales de alargamiento de enlace de O-H a 3440.07 cm^{-1} y de O-C=O en $1735.9 \text{ y } 1233.8 \text{ cm}^{-1}$ como señales características.

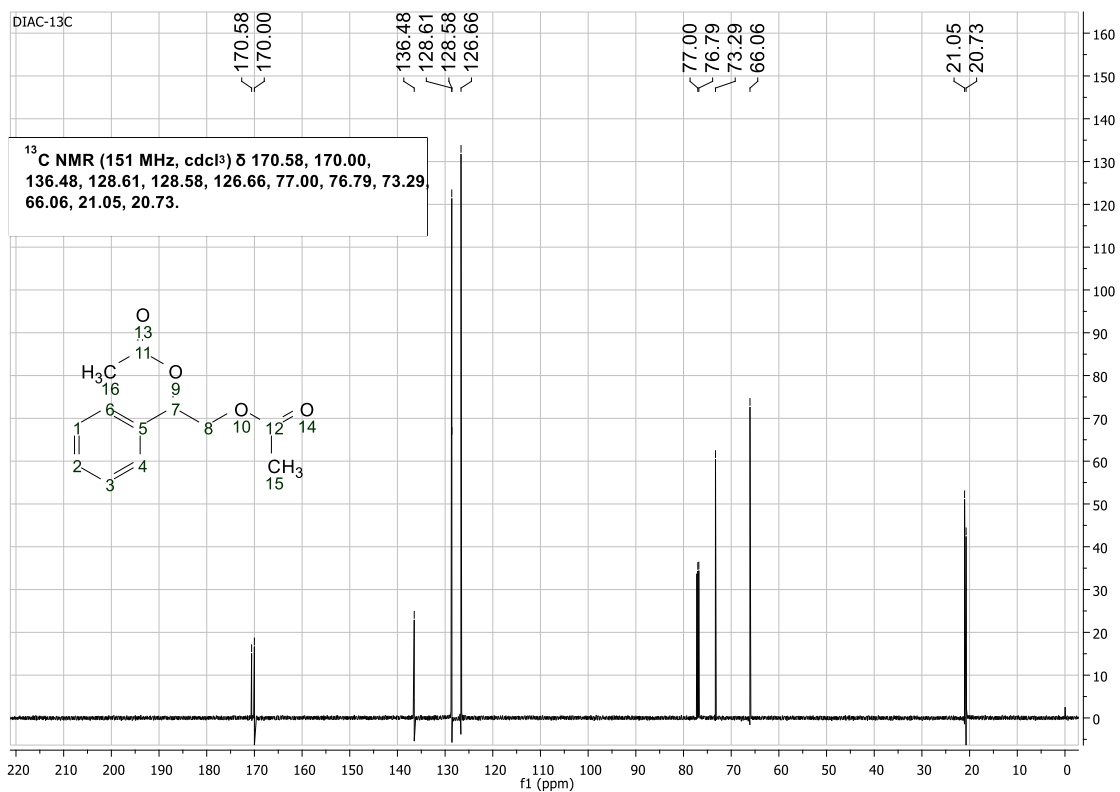
Espectro de IR de ibuprofeno



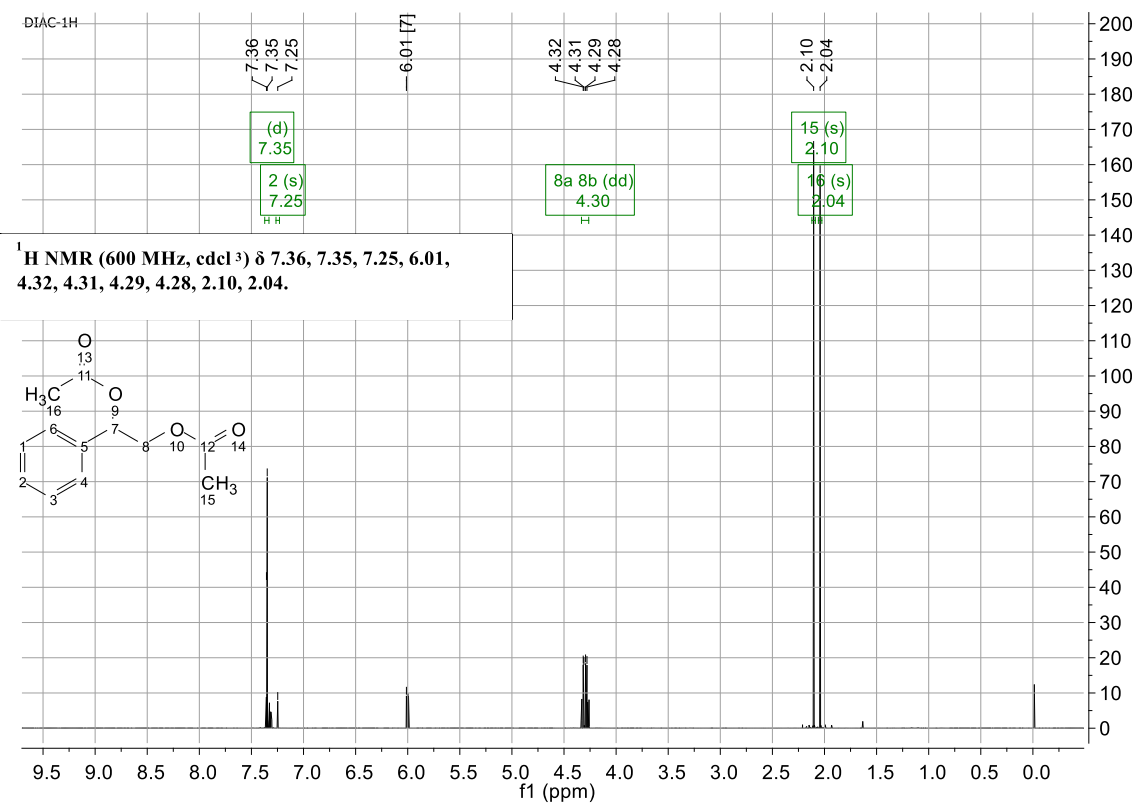
Se observan las señales de alargamiento de enlace de C=O a 1706.6 cm^{-1} , de alcano CH en 2955.6 y CH_3 en 1463.8 cm^{-1} como señales características.

8.2 Anexo 2 espectros de RMN ¹³C Y ¹H de acetatos de 1-fenil-1,2-etanodiol

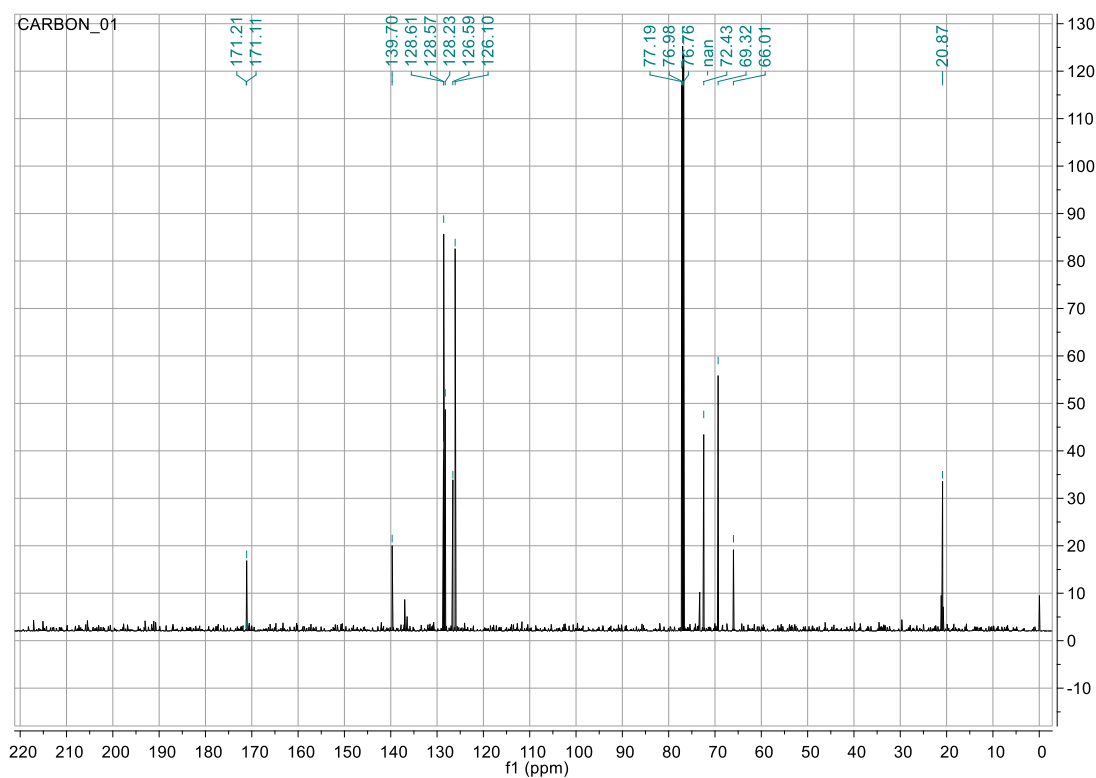
Espectro RMN-¹³C de Diacetato de 1-fenil-1,2-etanodiol



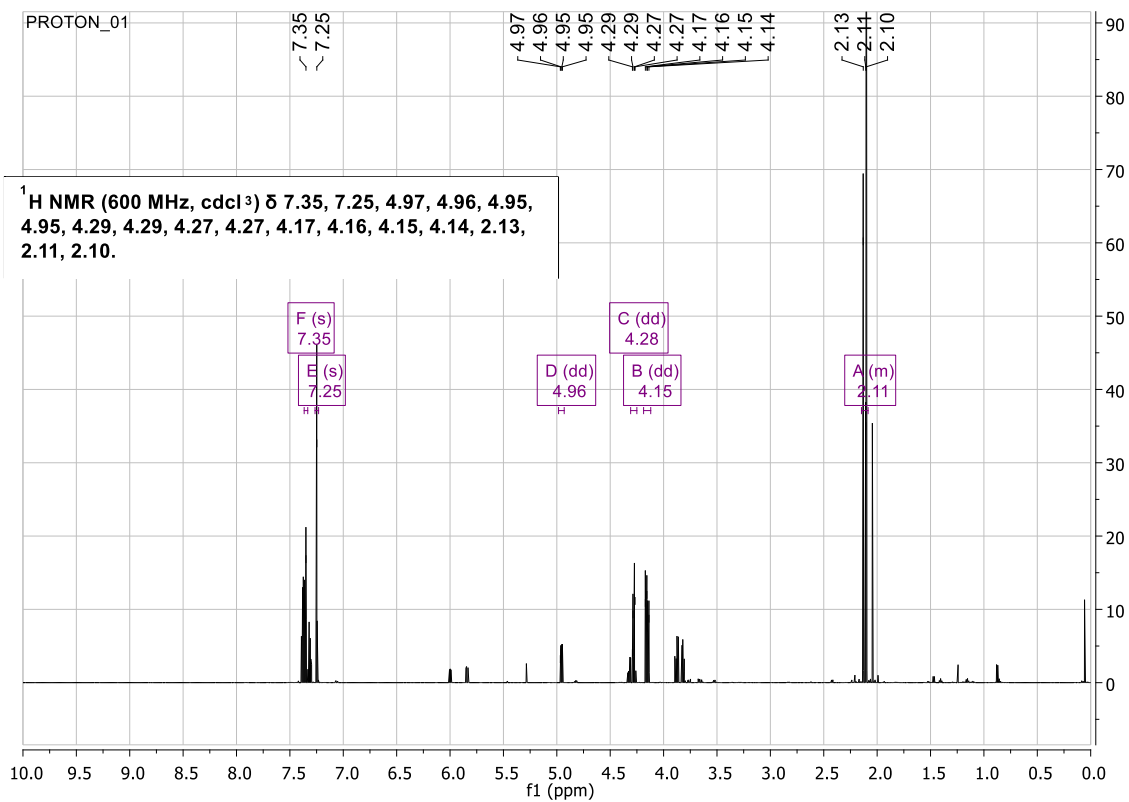
Espectro RMN-¹H de Diacetato de 1-fenil-1,2-etanodiol



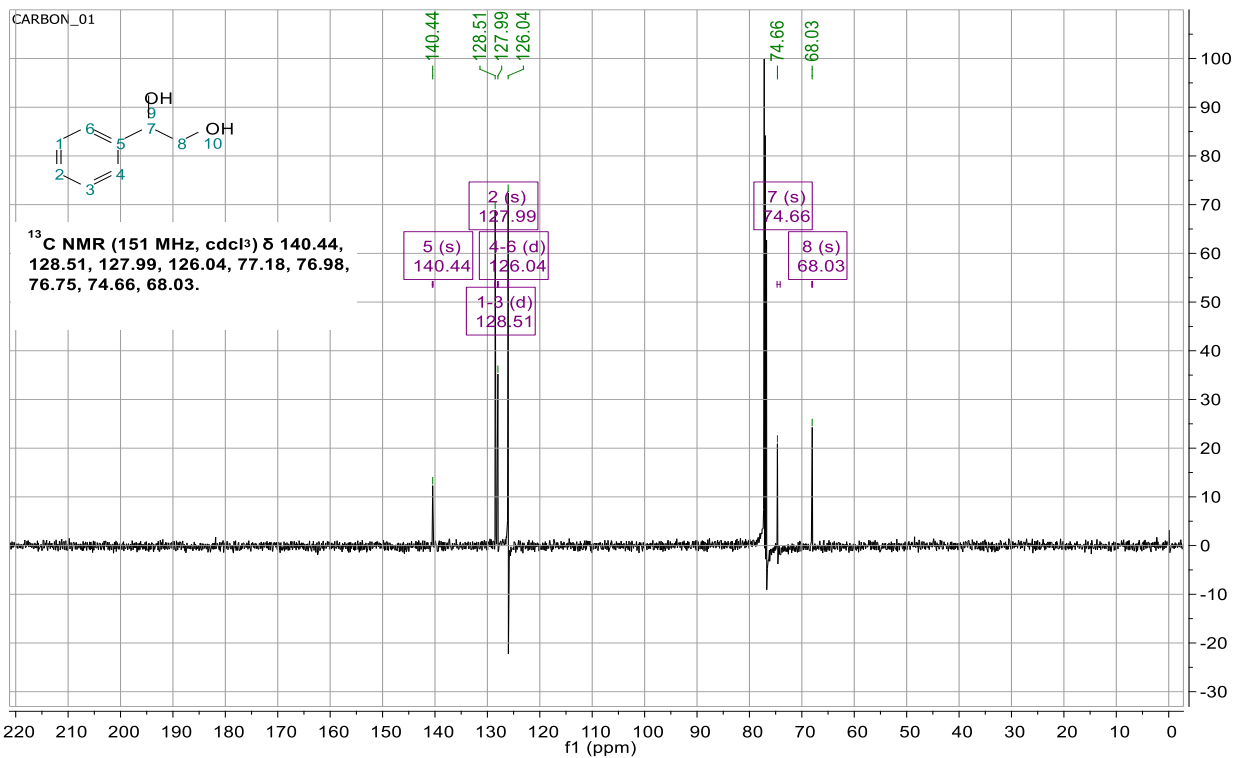
Espectro RMN-¹³C de Monoacetatos de 1-fenil-1,2-etanodiol



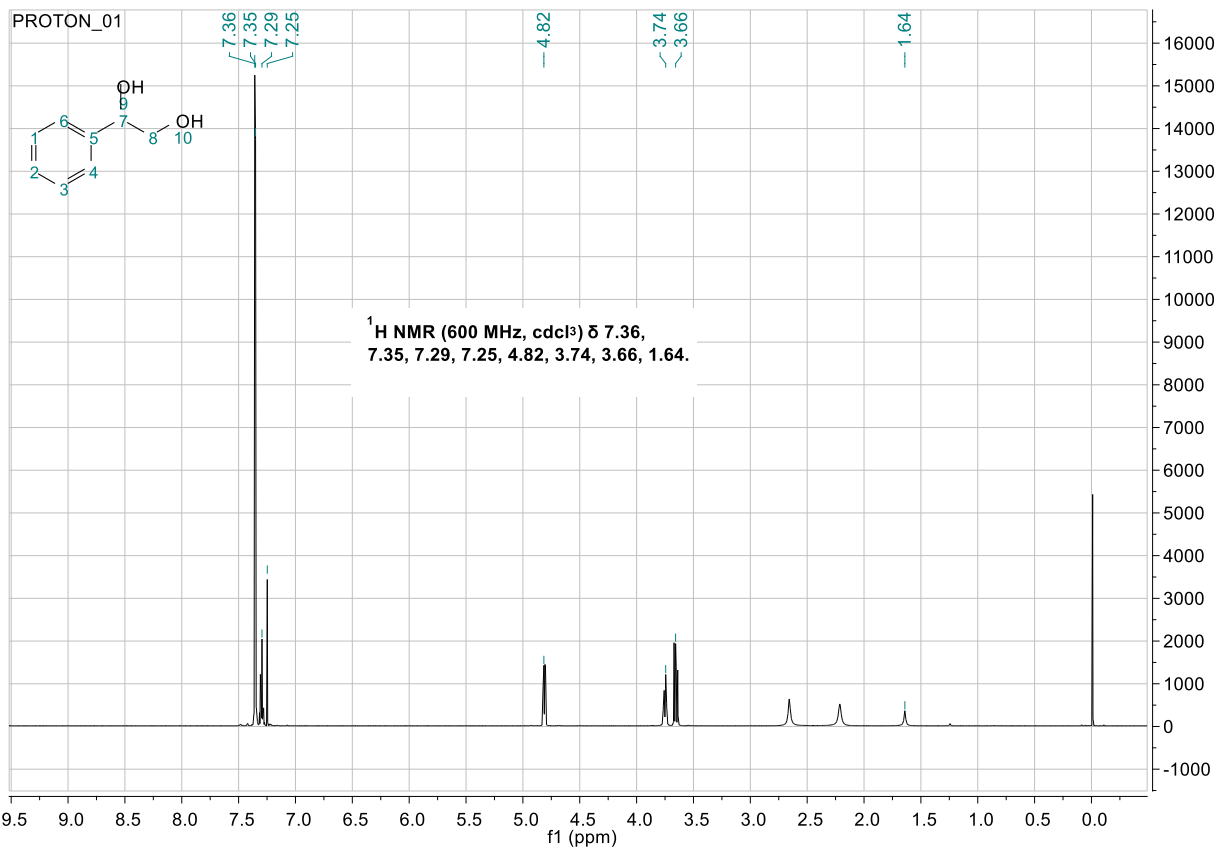
Espectro RMN-¹H de Monoacetatos de 1-fenil-1,2-etanodiol (MOOH1 y MOOH2)



Espectro RMN-¹³C de Diol 1-fenil-1,2-etanodiol

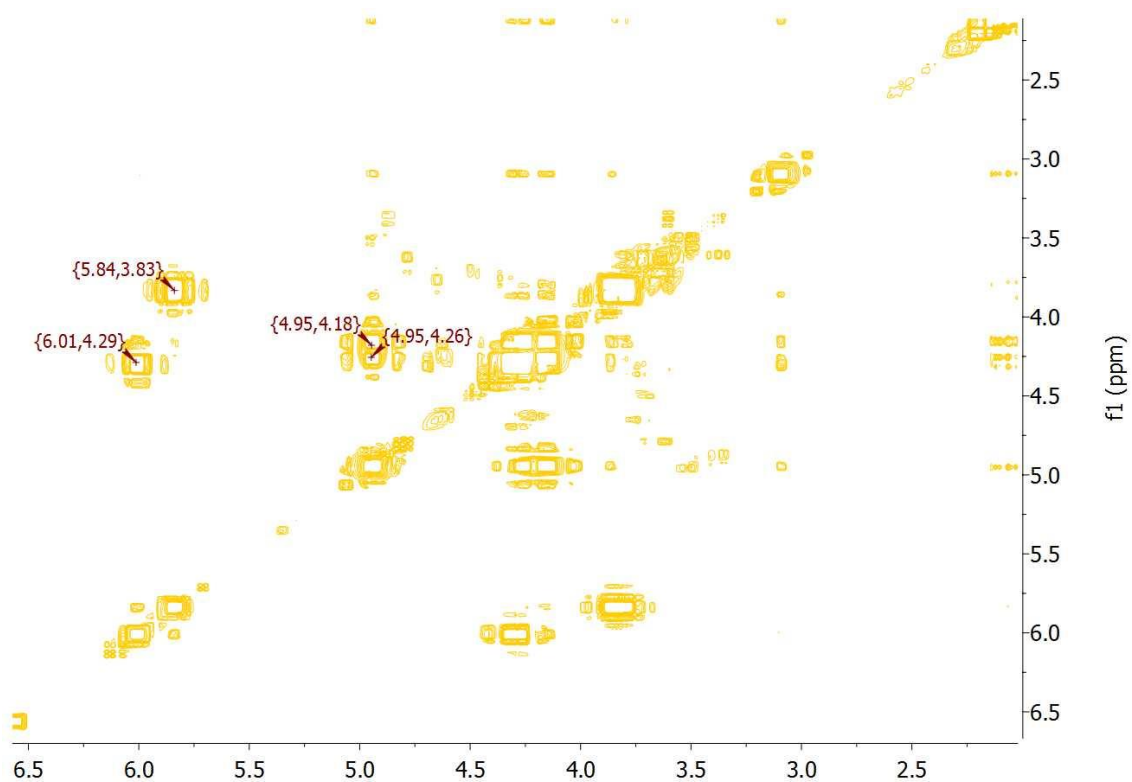


Espectro RMN-¹H de Diol 1-fenil-1,2-etanodiol

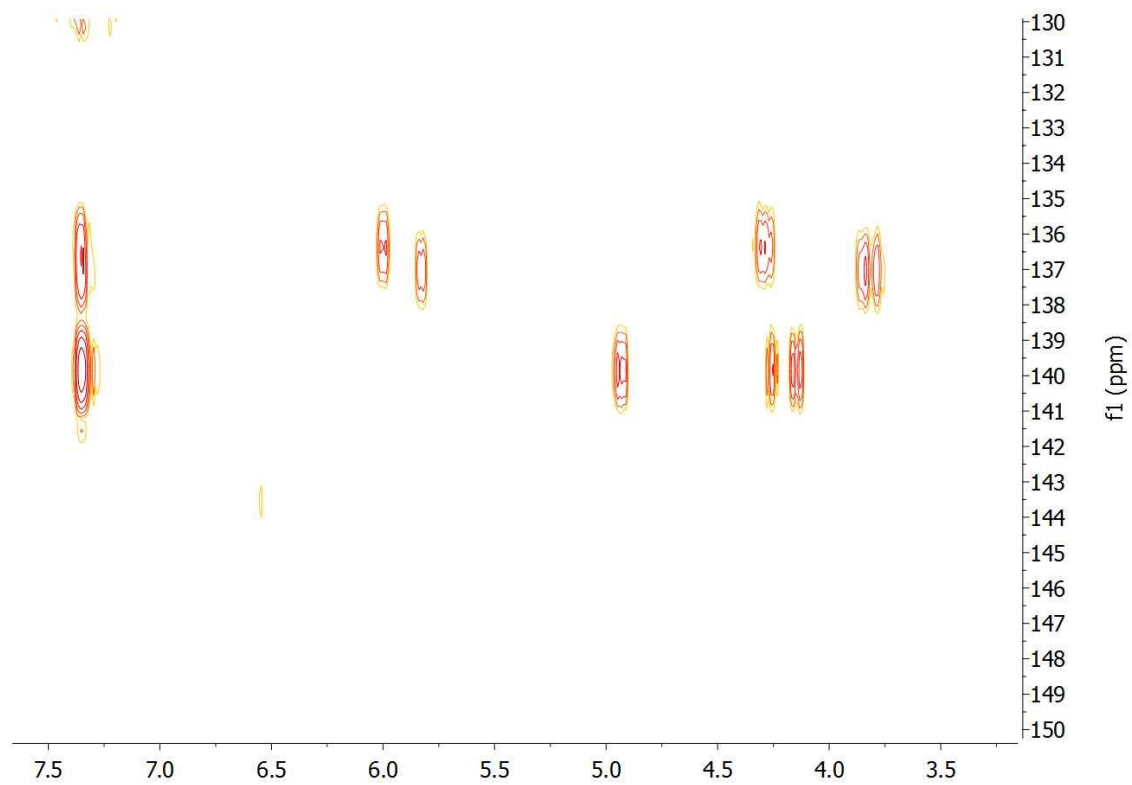


8.3 Anexo 3: métodos COSY, HMBC, HSQC en MOOH1 y MOOH2

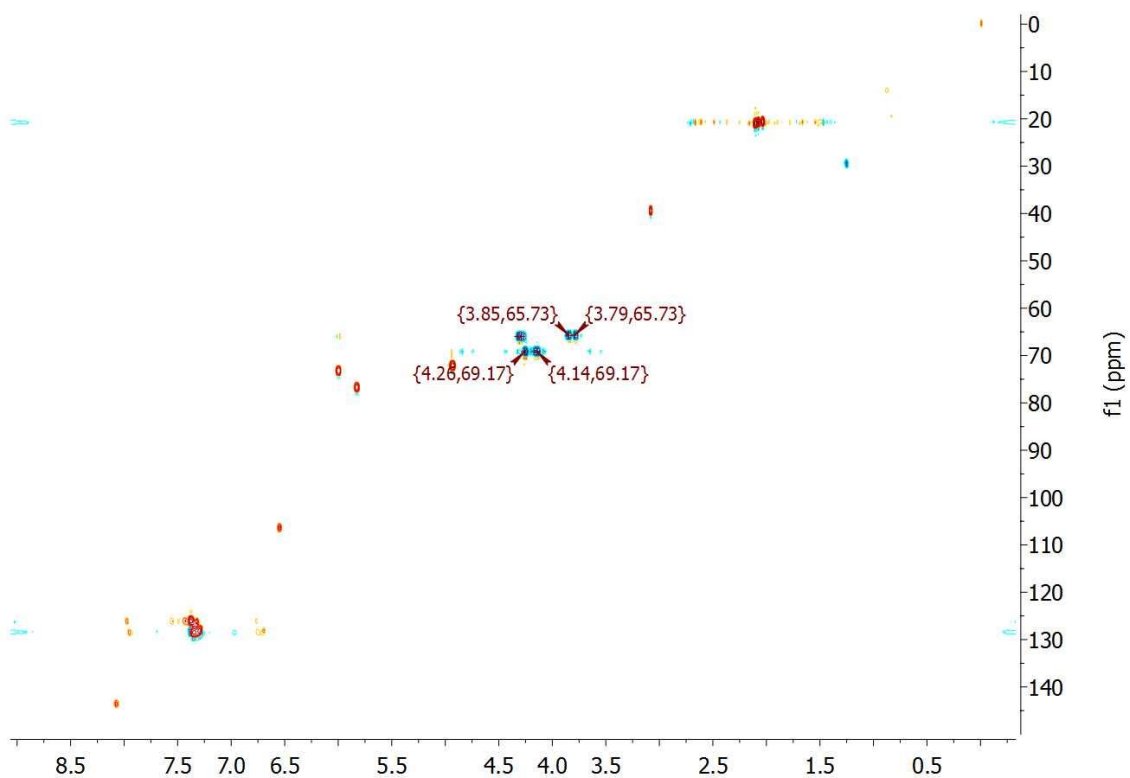
Análisis COSY



Análisis HMBC



Análisis HSQC



Vo. Bo del asesor (a)

Dra. Aida Solís Oba
Asesora interna
No. Eco. 21208