



Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Uso de enzimas para la esterificación y descarboxilación de ácidos: Modelos experimentales para la licenciatura QFB

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

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

Alumno: David Jazahel Porras Ramírez Matrícula: 2152033720

Asesoras: Dra. Liliana Hernández Vázquez N° económico: 27790

Dra. Aida Solís Oba

N° económico: 21208

1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la biocatálisis ha sido un gran avance para las industrias del siglo XX, principalmente la industria química y farmacéutica. La biocatálisis se refiere al uso de enzimas en la síntesis de productos químicos. Este gran avance se ha unido a la aparición de otro concepto a desarrollar: la química verde. Ambos conceptos van directamente de la mano ya que hacen referencia a la aparición de una química sostenible y respetuosa con el medioambiente. Una importante ventaja que presentan los procesos biocatalíticos es que requieren condiciones de reacción relativamente suaves tales como temperatura ambiente y presión atmosférica; esta característica reduce los requerimientos de energía y minimiza los problemas de isomerización, racemización, epimerización y reordenamiento que a menudo afectan a las reacciones químicas efectuadas a través de procesos sintéticos convencionales. Todas estas razones han convertido a la biocatálisis en un popular blanco para la investigación tanto en el ámbito académico como en el industrial y han sido descritas en la literatura un gran número de enzimas con potencial para su explotación práctica.

La responsabilidad de capacitar a los profesionales de carrera de QFB hoy incluye la formación de habilidades relevantes que incluyen la integración de conocimientos, habilidades y actitudes generales y específicas. La conexión entre la teoría y la práctica es una de las más exigentes en el desarrollo de programas disciplinares. Las prácticas de laboratorio son una herramienta educativa para los estudiantes, para que adquieran las habilidades básicas para trabajar en el laboratorio, así como también brindan una mejor comprensión teórica de los contenidos. Contenidos diferentes, comprenden fácilmente las dificultades que encuentran los estudiantes, permitiéndoles cuestionar sus saberes y

enfrentarse a la realidad. Además, los estudiantes se basarán en sus conocimientos previos y los pondrán a prueba a través de la práctica.

2 Objetivo General

Hacer una revisión de las estrategias biocatalíticas informadas en la literatura para la descarboxilación y esterificación de ácidos carboxílicos aromáticos.

2.1 Objetivos específicos

1. Realizar una búsqueda bibliográfica de las metodologías donde se utilizan biocatalizadores en la descarboxilación de compuestos aromáticos.
2. Colectar y analizar resultados obtenidos en el laboratorio de Biocatálisis aplicada para la descarboxilación del ácido *p-hidroxibenzoico*.
3. Realizar una búsqueda bibliográfica de las metodologías donde se utiliza CALB para la síntesis de ésteres a partir de ácidos carboxílicos.
4. Analizar la información colectada para elaborar dos modelos experimentales para su uso en los laboratorios de los módulos de Reactividad de Compuestos Orgánicos de Interés Farmacéutico (IV) y de Obtención de Compuestos Orgánicos de Interés Farmacéutico (V) de la Licenciatura de QFB.

3 Justificación

La Biocatálisis se basa en el desarrollo de procesos amigables con el medio ambiente, buscando una combinación adecuada entre seguridad, tiempo y eficacia en términos económicos y de calidad. En este contexto la biotecnología, y más concretamente la Biocatálisis aplicada, de especial impacto para el mercado industrial al diseñar rutas sintéticas en condiciones suaves de reacción. De esta manera los biocatalizadores se pueden emplear para el desarrollo de procesos quimo-, regio- o estereoselectivos, actuando además en condiciones suaves de reacción tanto de presión (normalmente atmosférica) como de temperatura (10-80 ° C dependiendo la clase de enzima). Este trabajo propone una metodología biocatalítica para reacciones de descarboxilación y esterificación, que va dirigida principalmente los alumnos de 4to y 5to trimestre de la licenciatura de QFB. Debido a que en las últimas décadas se ha incrementado el uso de técnicas biocatalíticas para la obtención de fármacos a nivel industrial. Por lo que a nivel educativo se están implementando prácticas biocatalíticas para que los alumnos tengan el conocimiento y las herramientas necesarias para su formación profesional en esta área.

3.1 Licenciatura en QFB de la UAM-X

El egresado de la Licenciatura en QFB será un profesional caracterizado por un comportamiento ético y responsable en el ejercicio de la profesión farmacéutica, la capacidad de adoptar una perspectiva sustentable en la planeación de la producción de medicamentos y otros insumos para la salud a partir de los principios de la química y la biología. Contará con una sólida formación básica que le permitirá acceder y desenvolverse exitosamente en el campo profesional, en los estudios de posgrado y en la investigación. Asimismo, tendrá la capacidad de desarrollar nuevas formulaciones de interés farmacéutico, adaptar, optimizar las formulaciones de medicamentos ya conocidos y participar en la síntesis de nuevos principios activos con actividad terapéutica a través de la investigación. (Q. Guillermo A. et. Al. /2008).

El campo laboral de esta carrera suele ser muy amplio debido a que se tienen amplios conocimientos en diversas áreas, por ello tiene la probabilidad de ocupar varios cargos en diversos campos laborales como puede ser:

- Químico analista: en hospitales estatales y clínicas privadas.
- Industria farmacéutica y cosmética: En centros de investigación farmacológica puede fungir como coordinador de estudios clínicos, auxiliar de normatividad, supervisor de producción, gerente de calidad. También como asesor de ventas y químico documentador.

- Laboratorios clínicos y forenses: pues sus conocimientos le permiten hacer determinaciones bioquímicas, microbiológicas, bioquímicas, hematológicas e inmunológicas necesarias para el diagnóstico clínico, de esa manera, apoya al médico en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las enfermedades.
- Laboratorios de síntesis: Con los conocimientos adquiridos en química orgánica e inorgánica, puede modificar y/o crear nuevos principios activos con actividad terapéutica a través de síntesis química o enzimática.

Durante la formación de un químico farmacéutico biológico una de las disciplinas más importantes es la química orgánica que se dedica principalmente a la síntesis de moléculas y determinar su estructura , está repetido. Los módulos 4to y 5to están relacionado con la reactividad de las moléculas para poder sintetizar moléculas de interés farmacéutico, mediante métodos químicos o enzimáticos. Además de aislar compuestos heterocíclicos y productos naturales e identificarlos y caracterizarlos. Por lo tanto, a través de las prácticas en el laboratorio de docencia el alumno desarrollará habilidades que le permitirán llevar a cabo una síntesis orgánica o biocatalítica. Las practicas biocatalíticas han tenido un auge tanto en laboratorios de docencia como a nivel industrial, ya que son más económicas tanto en materiales como reactivos y además no generan tantos residuos tóxicos que pueden ser dañinos al medio ambiente (Q. Guillermo A. et. Al. **2008**).

4 Biocatálisis

La biocatálisis se refiere a la utilización de células o enzimas aisladas para catalizar reacciones que se aplican a la obtención de compuestos de interés, que a lo largo de estos años ha tenido un crecimiento importante en el sector farmacéutico. La utilización de células o enzimas ha demostrado su eficacia en la síntesis de fármacos, herbicidas, insecticidas y otros productos químicos, en la producción de bio-combustibles alternativos al petróleo, o en la industria textil y de detergentes, entre otros muchos. Ello se debe a que representan una alternativa más eficiente y a la vez más ecológica a la química sintética tradicional, ya que los procesos que catalizan transcurren a través de reacciones en medios más respetuosos con el medio ambiente, bajo condiciones de pH, temperaturas suaves y obteniendo mayores rendimientos; ya que son procesos quimio-selectivos, regio-selectivos y estereoselectivos, con menor costo económico (Arroyo, M.; Acebal, C. y de la Mata, I. **(2014)**). Las enzimas son catalizadores biológicos que han sido estudiados extensivamente y desempeñan un papel fundamental en la mayoría de los procesos bioquímicos, es posible aprovechar sus propiedades como catalizadores de manera artificial. Las enzimas (biocatalizadores) actúan del mismo modo que cualquier catalizador disminuyendo la energía de activación, pero al mismo tiempo, muestran propiedades diferentes a las encontradas en los catalizadores químicos como son: porcentajes de rendimiento altos, incrementos mucho mayores en la velocidad de reacción, versatilidad química, gran especificidad, posibilidad de regulación, labilidad estructural. Todas estas propiedades son consecuencias de su compleja estructura molecular (*Alberto del Monte-Martínez, et.al. 2013*).

4.1 Aplicaciones Industriales de las enzimas

Las aplicaciones en las industrias de alimentación humana y animal dominan las ventas industriales de enzimas a nivel mundial (figura 1). El mercado de alimentación animal ofrece el mejor escenario para el crecimiento; pero este mercado aún no ha sido penetrado extensamente por las ventas de enzimas en todas las áreas geográficas por igual. En el sector de los detergentes, los catalizadores biológicos han ocupado el mercado casi por completo, especialmente en los detergentes para lavado de ropa. En este campo, los detergentes «lavavajillas» aún representan un tentativo escenario de crecimiento en cuestión de ventas. Debido a que la ingeniería genética ha permitido disponer de las proteasas alcalinas en cantidades mayores que las de cualquier otra enzima recombinante, el precio de estas moléculas ha disminuido. No obstante, la ingeniería genética también ha contribuido a mejorar las propiedades catalíticas de muchas enzimas, con el objetivo de elevar la eficiencia en su funcionamiento. En relación con la comercialización de otros limpiadores (como desinfectantes y blanqueadores), las ventas de enzimas representan un porcentaje escaso. Por tanto, este constituye un mercado casi virgen que ofrece nuevas oportunidades para la venta, si estas cuentan con las propiedades adecuadas (*BCC Report C-144NA, 2002; Biotechnology Center of Excellence Corporation, 2003*).

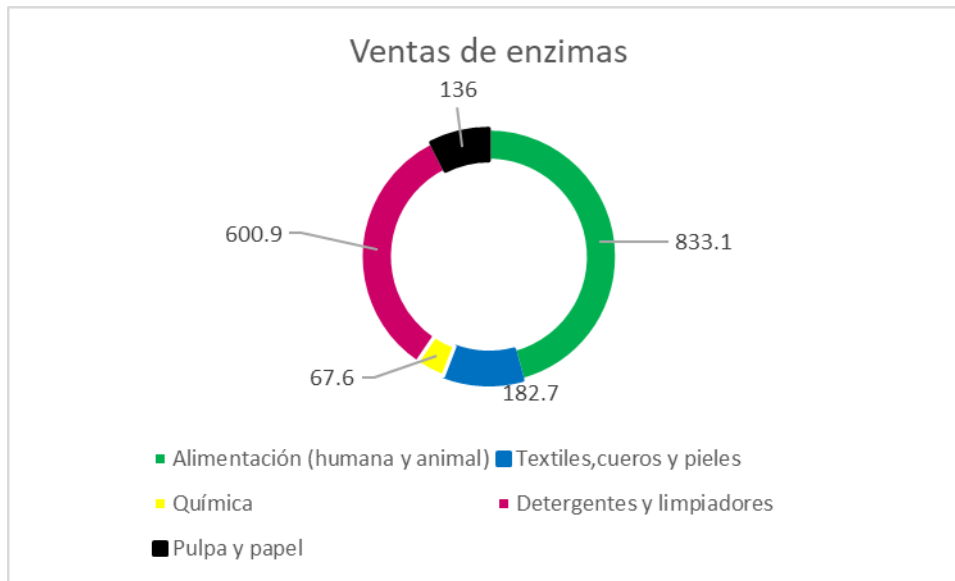


Figura 1. Ventas globales de enzimas (en millones de dólares) estimadas para 2002, clasificadas según el tipo de industria destinataria. (BCC Report C-147NA, 2002)

En el sector textil, las ventas de enzimas para la degradación de materiales celulósicos dominan el mercado. La influencia de la moda, que encarece las ropas de apariencia «prelavada», posiblemente haga florecer el mercado para las enzimas procesadoras de mezclillas. Por otra parte, se espera que la introducción de nuevas fibras celulósicas en el mercado eleve las ventas de las enzimas necesarias para procesarlas. Las ventas de enzimas para el cuero y las pieles se afectan por la tendencia negativa de la moda hacia estos materiales. Aun así, la comercialización de proteasas y lipasas (alcalinas) ha ido en aumento, pero debe competir con las ventas de enzimas tradicionales como la tripsina (BCC Report

C-144NA, 2002). En el tratamiento de la pulpa y el papel, las enzimas más empleadas son las xilanasas, específicamente en el preblanqueamiento. En este campo, las oxidasas han tenido un buen desempeño y han sido muy estudiadas, pero no en términos de incrementar su eficiencia; por ello se necesita un mayor esfuerzo de investigación en esta área antes de incrementar su comercialización.

La empresa manufacturera de productos químicos, que incluye la químico-farmacéutica, es el sector final a nivel de mercado para el empleo de enzimas industriales. La mayoría de los avances de la tecnología enzimática actualmente ha tenido lugar en el contexto de reacciones en química fina. Estos avances, en su mayoría, corresponden al aspecto de la tecnología quiral, la cual aprovecha la estereoselectividad de algunas enzimas para la síntesis de un enantiómero específico. Si se analiza desde un punto de vista comercial, las enzimas que se utilizan en reacciones de química fina se usan en pequeñas cantidades, por lo que los volúmenes que se producen son pequeños y los valores de las ventas son bajos (Figura 2). En estos casos, el valor real de las enzimas no es el que aparentan, ya que los productos de las reacciones de química fina tienen un costo elevado, por lo que la inversión es muy rentable desde ese punto de vista (*BCC Report C-144NA, 2002*).

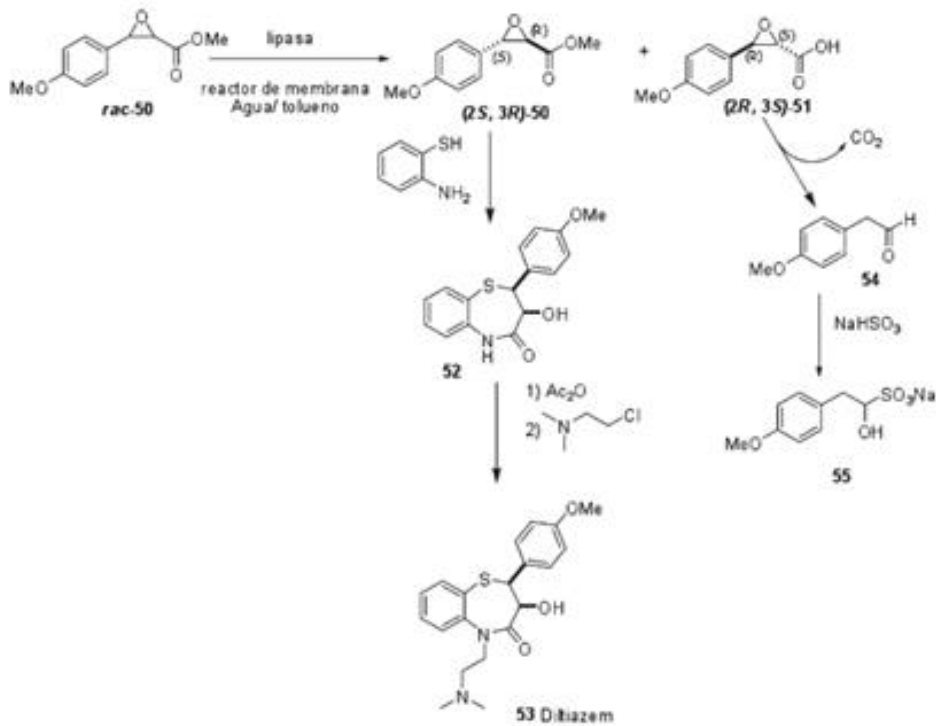
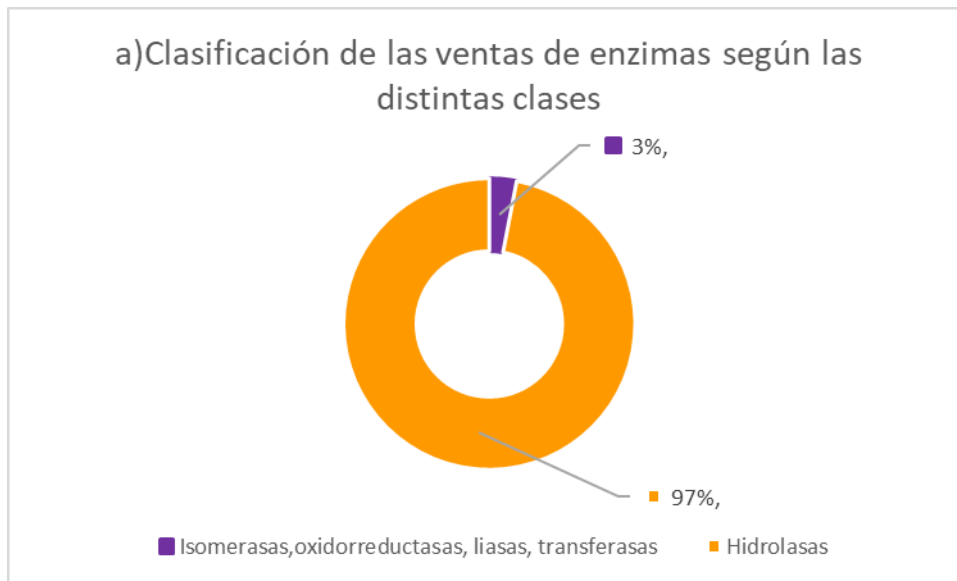


Figura 2. Ejemplo de aplicaciones industriales en la Química Fina: Síntesis de diltiazem. (Zhao. et al. 2010)

Si se analizan las ventas de enzimas, desglosadas según las distintas clases, se comprueba que las hidrolasas dominan las ventas de enzimas industriales de manera global. Las otras clases (isomerasas, oxidoreductasas, liasas y transferasas) se comercializan en menor cantidad. La clase isomerasa está representada prácticamente por una sola

enzima –la glucosa isomerasa– y las ligasas están casi ausentes a nivel industrial. Dentro de las hidrolasas, las carbohidratasas dominan en las aplicaciones industriales y constituyen un elevado porcentaje de las ventas (figura 3).

En segundo lugar, en importancia comercial se encuentran las proteasas; y luego, en menor medida, las lipasas, esterases, fosfatasas y amilasas (*BCC report C-144NA, 2002*)



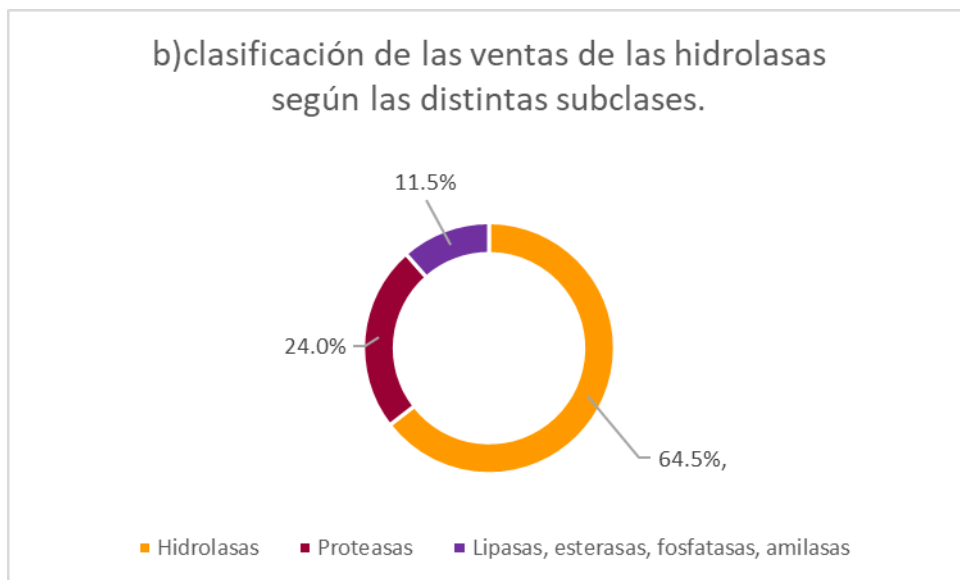


Figura 3. Ventas globales de enzimas (en porciento) para procesos químicos industriales, estimadas para 2002: a) Clasificación de las ventas de las distintas clases de enzimas; b) Clasificación de las ventas de las subclases de las hidrolasas (BCC Report C-147NA, 2002)

4.2 Clases de enzimas y su empleo en biocatálisis

Las enzimas se clasifican de acuerdo con la guía publicada por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (*IUBMB, 1984*). Todas las enzimas informadas están comprendidas en seis clases que se muestran la **tabla 1** (*Monte-Martínez et al. 2013*), sobre la base del tipo de reacción química que catalizan. Según la Comisión de Enzimas (EC) de la IUBMB, cada enzima se identifica con cuatro dígitos por ejemplo la ATP:glucosa fosfotransferasa (glucoquinasa) se define como EC 2.7.1.2. El número 2 indica que es una transferasa, el 7 que es una fosfotransferasa, el 1 indica que el aceptor es un grupo OH, y el último 2 indica que es un OH de la D-glucosa el que acepta el grupo fosfato. El primero asigna la clase; el segundo y el tercero asignan la subclase y la sub-subclase, respectivamente, de acuerdo con el tipo y la posición del enlace o grupo particular involucrado en la reacción; el cuarto dígito asigna el número de identificación de la enzima sobre la base de la reacción específica que ella cataliza. Las seis clases son las siguientes:

Tabla 1. Clases de enzimas

Clases	Grupos funcionales en donde catalizan la reacción
Oxidorreductasas: presentan 23 subclases. Catalizan reacciones de oxidación-reducción sobre diferentes	<ul style="list-style-type: none">• HC-OH• C=O

<p>grupos funcionales.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • HC-CH • HC-NH₂ • C-NH
<p>Transferasas: presentan 9 subclases. Catalizan la transferencia de grupos funcionales.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Grupos mono-carbonados • aldehído o cetona • acilo • glicosilo • alquilos o arilos • nitrogenados con fósforo y azufre
<p>Hidrolasas: presentan 13 subclases. Catalizan reacciones de hidrólisis.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Enlaces ésteres • Glicosídicos • Peptídicos • C-N • anhídrido de ácidos.
<p>Liasas: presentan 4 subclases. Catalizan reacciones de ruptura de enlaces covalentes por mecanismos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Enlaces C-C • Enlaces C-O • Enlaces C-N

distintos de la hidrólisis o la oxidación.	
Isomerasas: presentan 6 subclases. Catalizan reacciones de isomerización.	<ul style="list-style-type: none"> • Racemizaciones • Epimerizaciones
Ligasas: presentan 6 subclases. Catalizan reacciones de formación de enlaces covalentes.	<ul style="list-style-type: none"> • C-O • C-S • C-N • C-C

Las enzimas más utilizadas en biocatálisis, son: oxidorreductasas (peroxidasas, catalasas, glucosa oxidasas y lacasas); transferasas (fructosil y glucosil transferasas) e hidrolasas (amilasas, celulasas, lipasas, pectinasas, proteasas, pululaninas). Las hidrolasas en condiciones apropiadas pueden catalizar la reacción inversa que se conoce como condensación y formar enlaces con eliminación de agua. Este tipo de reacción se considera que posee un prometido potencial tecnológico. Por su parte, las liasas (pectato liasa, α -acetolactato descarboxilasa, nitrilo hidrolasa, aspartato amonio liasa, fumarato hidratasa, L-histidina amonio liasa) usualmente actúan en la formación de enlaces C-C mediante la reacción inversa a la que deben su nombre. Esto les confiere un atractivo potencial para aplicaciones tecnológicas. Estas enzimas se han utilizado con mucha frecuencia en la síntesis asimétrica de compuestos orgánicos ópticamente activos. Las isomerasas (glucosa isomerasa, actualmente D-xilosa aldosa-isomerasa, mutasas) constituyen uno de los ejemplos paradigmáticos de la aplicación de enzimas en procesos tecnológicos. Se emplean en la producción de

siropes ricos en fructosa (HFS) a partir de almidón de maíz. Por último, dentro de las ligasas el caso con aplicación más conocido es la 4 ADN ligasa, utilizada rutinariamente en técnicas de ingeniería genética. Generalmente, las enzimas de esta clase son consideradas complejas e inestables, por lo que se encuentran prácticamente ausentes en aplicaciones a escala industrial (Illanes, 2008).

Aunque es lógico que haya una relación directa entre el porcentaje de ventas y el empleo de enzimas, a mayor uso de enzimas mayores ventas, existen variaciones en dependencia del tipo de proceso biocatalítico donde se utilizan. En la figura 4 se muestra un esquema con los tipos de enzimas más utilizados en síntesis orgánica. (Alberto del Monte-Martínez, et al. 2013).

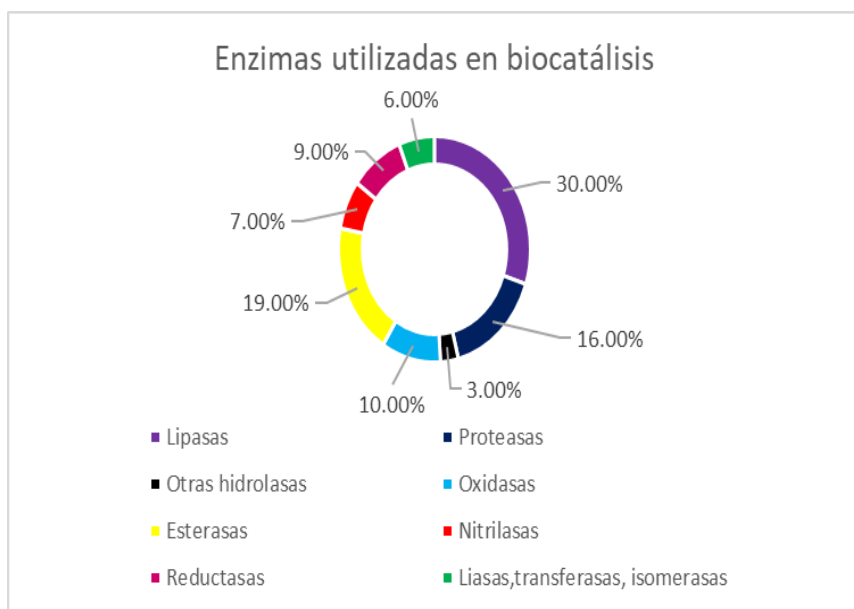


Figura 4. Tipos de enzimas más utilizadas en biocatálisis con énfasis en síntesis orgánica (BCC Report C-147NA, 2002)

4.4 Reacción de esterificación química

La esterificación de Fischer o esterificación de Fischer-Speier es una reacción de esterificación carboxílica que utiliza un ácido inorgánico como catalizador, principalmente ácido sulfúrico (H_2SO_4). Los ésteres carboxílicos se forman por reacción entre un ácido carboxílico y un alcohol orgánico. Por ejemplo, la esterificación entre ácidos grasos y glicerol forma los triglicéridos. La reacción de esterificación es una forma de reacción de condensación en la que se produce agua. El ácido carboxílico aporta un grupo $-COOH$ (grupo carboxilo), el alcohol aporta un grupo $-OH$ (grupo hidroxilo), al combinarse ambos grupos funcionales se combinan, se desprende una molécula de agua (H_2O) y se forma el grupo $-COO-$ (grupo éster) que une a las dos moléculas. (McMurry, J. 2009).

La reacción de esterificación tiene una gran variedad de aplicaciones en la industria farmacéutica ya que se pueden obtener esencias y aromatizantes como por ejemplo el formiato de etilo (ron, aguardiente de arroz), acetato de isobutilo (plátano), butirato de metilo (manzana), butirato de etilo (piña), y butirato de isopentilo (pera). En la medicina encontramos algunos ésteres como el ácido acetilsalicílico (aspirina) utilizado para disminuir el dolor. La novocaína, otro éster, es un anestésico local. El compuesto acetilado del ácido salicílico es un antipirético y anti neurálgico muy valioso, la aspirina (ácido acetilsalicílico). Que también ha adquirido importancia como antiinflamatorio no esteroideo. En la industria alimenticia y producción de cosméticos. Los mono ésteres del glicerol, como el monolaurato de glicerol. Son surfactantes no jónicos usados en fármacos, alimentos y producción de cosméticos. Como disolventes de Resinas: Los ésteres, en particular los acetatos de etilo y butilo, se utilizan como disolventes de nitrocelulosa y resinas en la industria de las lacas, así como materia prima para las condensaciones de ésteres. (Jiménez Islas. Et al.2010).



Figura 5. Reacción general de esterificación

Los métodos más empleados para llevar a cabo una síntesis de esteres, son la esterificación y transesterificación. (Aljawish.et al. 2019)

4.5 Reacción de esterificación catalizadas por lipasas

Las lipasas son enzimas que se utilizan principalmente para hidrolizar los enlaces éster de los triacilgliceroles (aceites y grasas) y para liberar ácidos grasos, diacilgliceroles, monoacilgliceroles y glicerol.

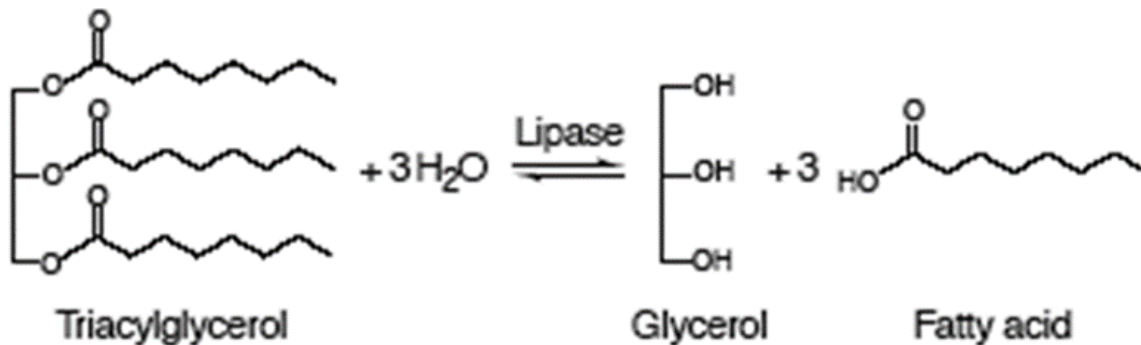
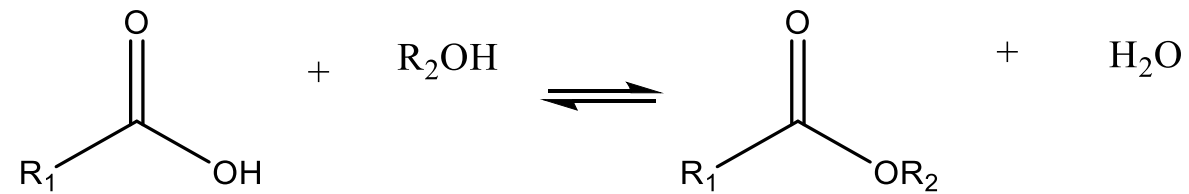


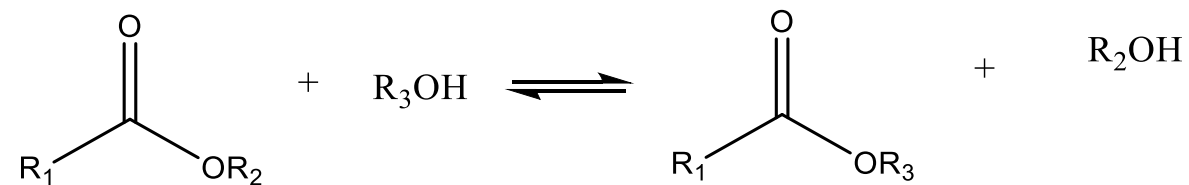
Figura 6. Reacción que catalizan las lipasas en la naturaleza (Aljawish. et al. 2019)

En determinadas condiciones como la falta de agua o la presencia de moléculas nucleófilas (alcoholes) en el medio de reacción, son capaces de catalizar la reacción inversa (esterificación y transesterificación).

Esterificación



Transesterificación



Acidolisis

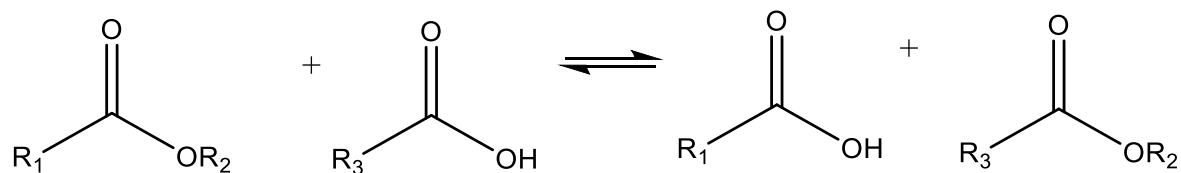


Figura 7. Reacciones que pueden catalizar las lipasas en la síntesis orgánica. (Aljawish. et al. 2019)

La síntesis de ésteres catalizada por la lipasa suele producirse en medio orgánico con una cantidad mínima de agua que es necesaria para polarizar los grupos reactivos en el sitio activo y en la superficie de la enzima. La presencia de agua influye especialmente en la reactividad de las reacciones de transferencia de grupo acilo. En general, las lipasas requieren una baja cantidad de agua en el medio de reacción para mantener su actividad y catalizar la reacción de síntesis.

Varios estudios han informado de la síntesis de ésteres a partir de ácidos carboxílicos como el láctico, málico, glicólico, glicérico y acético con diferentes nucleófilos como alcoholes, ésteres y ácidos grasos utilizando lipasas en presencia de una baja cantidad de agua, casi el 1%, en medio orgánico (hexano, acetonitrilo) o en un sistema sin disolventes (Aljawish. et al.2019).

4.6 *Candida antarctica*

La lipasa B de *Candida Antártica* (CALB) es uno de los biocatalizadores más utilizados en la síntesis orgánica utilizado para catalizar muchas reacciones con buen rendimiento como: la alcoholisis de aceites vegetales, para la producción de biodiesel y la síntesis de ésteres aromáticos, la eficacia de la esterificación de los ácidos fenólicos depende en gran medida de las diferentes características de los sustratos, presenta una actividad y estabilidad tanto en condiciones acuosas como no acuosas (*Cassani, J. et al.2007*). La CALB es una de las lipasas más importantes porque conserva su actividad enzimática en medios orgánicos y posee una alta enantioselectividad hacia los alcoholes secundarios (*Heinsman. et al. 2001*).

La lipasa de *Candida antártica* (CALB) es un biocatalizador muy eficiente con un peso molecular de 33 kDa, con un P_i de 6,0 que realiza hidrólisis en medios acuosos y esterificación en disolventes orgánicos. Se utiliza mucho a nivel industrial debido a su alta enantioselectividad, amplia cantidad de sustratos y por su gran estabilidad térmica y estabilidad en disolventes orgánicos. Es quizás la lipasa más empleada en biotecnología para la síntesis de muchos productos como formulaciones de cosmética, fragancias, lubricantes y biodiesel (*Ortiz. et al. 2019*).

La CALB pertenece a la familia de las α/β hidrolasas, con una triada catalítica muy conservada de Serina, Histidina, y Asp/Glu, la cadena polipeptídica está compuesta por 317 aminoácidos que se pliega de forma similar a muchas otras hidrolasas. A diferencia de la mayoría de las lipasas, la CALB no tiene una tapa en el sitio activo, y no muestra activación por interfase.

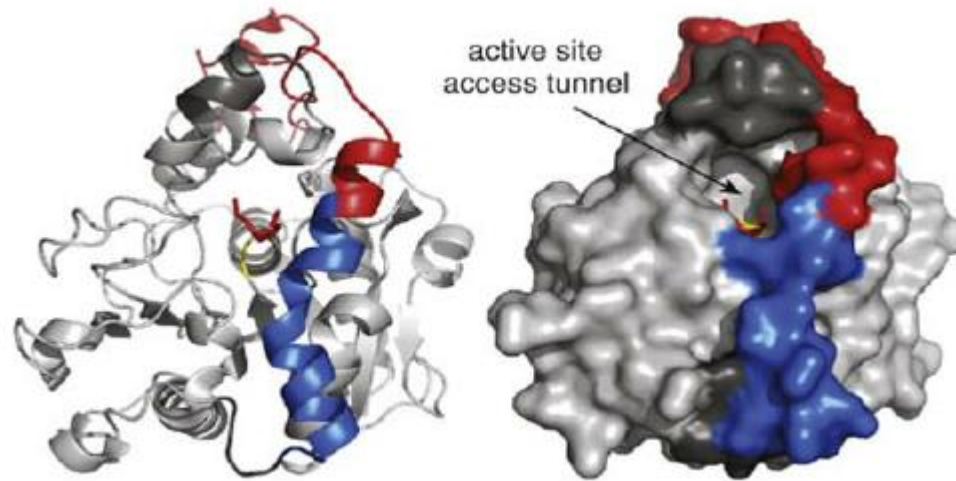


Figura 8. Estructura de la lipasa *Candida antártica* (Abraham Casas. et al. julio 2013)

Muestra una gran estabilidad en todo tipo de disolventes y su estructura es independiente del medio, debido en gran medida a que esta enzima no sufre cambios conformacionales. Sin embargo, su flexibilidad si es dependiente del medio, disminuyendo en gran medida en solventes orgánicos.

CALB, en disolución, tiene un Ph óptimo de actividad de 7 y es estable entre 3.5 y 9.5. La temperatura de desnaturalización varía entre 50° C y 60° C, dependiendo del Ph.

Se recomienda el uso de enzimas inmovilizadas por ser la formulación más conveniente al permitir una recuperación sencilla de la enzima y los productos. Además, la inmovilización tendrá en la mayoría de los casos un efecto altamente estabilizador sobre la enzima y permitirá el uso del catalizador en disolventes orgánicos. Casi todos los estudios en los que se ha utilizado CALB como catalizador han empleado la enzima inmovilizada en diferentes materiales portadores

macro porosos. Cuando se inmoviliza, la CALB es altamente termoestable y puede utilizarse en funcionamiento continuo a 60-80°C sin ninguna pérdida significativa de actividad incluso después de varios miles de horas en uso (*EMILY M. et al. 1998*).

La lipasa CALB mas empleada es la comercializada por Novozymes bajo el nombre de Novozym 435 (N435) es una lipasa inmovilizada disponible. Se basa en la inmovilización *mediante la* activación interfacial de la lipasa B de *Candida Antártica*.sobre una resina Lewatit VP OC 1600. Esta resina es un soporte macroporoso formado por poli (metacrilato de metilo) reticulado con divinilbenceno. El N435 es quizás el biocatalizador comercial más utilizado tanto en la academia como en la industria (*Ortiz. et al. 2019*).

Esta enzima es obtenida de un hongo específicamente del *Aspergillus Niger* que se utiliza comercialmente para producir enzimas, que son obtenidas cultivando el hongo en fermentadores y posteriormente concentrando y purificando las enzimas generadas.

Algunas características a destacar de esta enzima SON que su velocidad de reacción es mayor con mono glicéridos de ácidos de cadena larga, que los mono glicéridos con ácidos cortos; así también la lipasa está constituida por una cadena proteica sencilla compuesta por 269 aminoácidos.

El sitio activo de la enzima se encuentra en los aminoácidos 238 el cual es serina, el 297 el cual es acido aspártico y el 351 el cual es histidina.

4.7 Mecanismo de reacción de *Cándida antártica*; lipasa tipo B

- Primera etapa: El sustrato éster carboxílico, se une al sitio activo donde la Serina 105 ataca al carbono del carbonilo del sustrato.
- Este ataque de la serina 105, es promovido por la Histidina 224 la cual actúa como base y acepta un protón de Serina 105.
- Lo que sucede durante el ataque es que se rompe el doble enlace entre el Carbono y el Oxígeno convirtiéndolo en un enlace sencillo y el átomo de Oxígeno se transforma en un oxianion el cual forma 3 enlaces de hidrógeno con el agujero del oxianión.
- Como primer producto tenemos al alcohol el cual deja el sitio activo y se forma el complejo acil-enzima.
- Este nucleófilo (alcohol) lleva a cabo un nuevo ataque sobre el carbón del carbonilo del complejo acil-enzima, pasando al segundo estado de transición, llevándose una reacción de transición-acilación y formando el producto 2 el cual es liberado regenerándose la enzima (*Emily M. et al. 1998*).

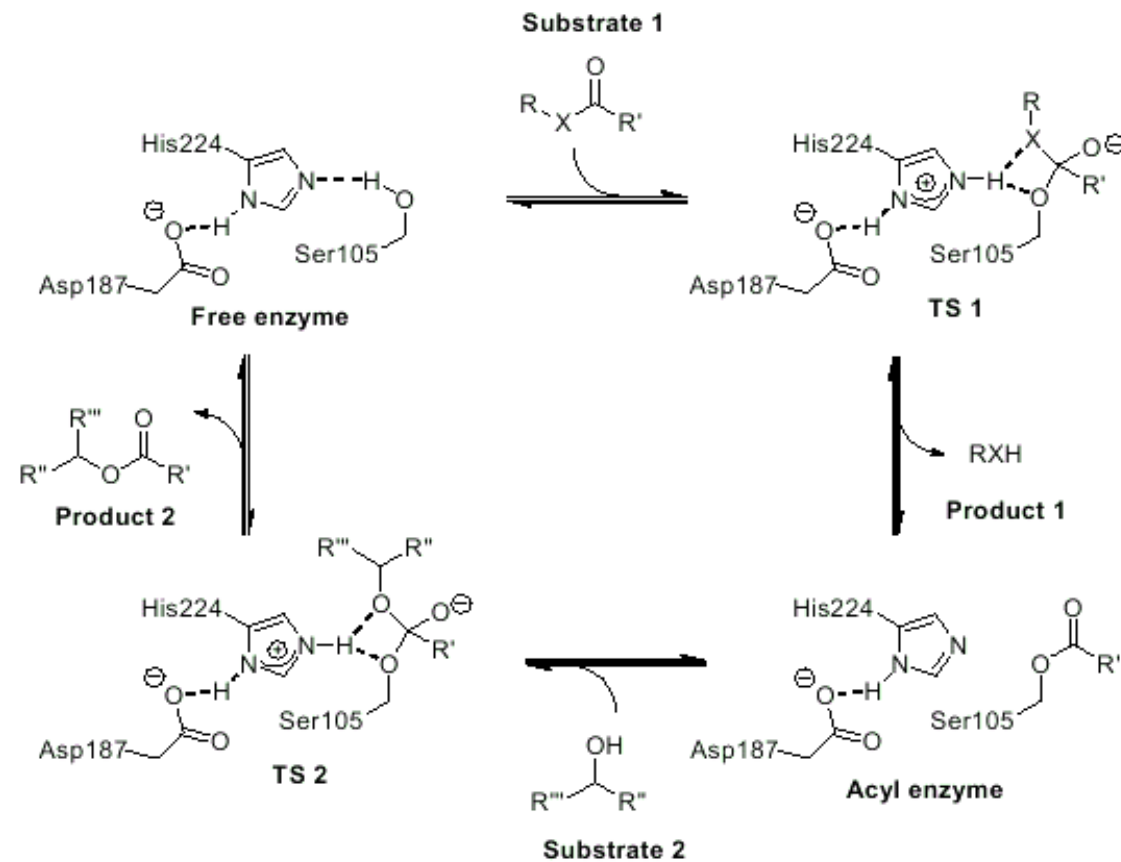


Figura 9. Mecanismo de reacción de lipasas (Emily M. et al. 1998)

Las lipasas son ampliamente utilizadas como biocatalizadores para reacciones de esterificación debido a que presentan una buena actividad y estabilidad tanto en condiciones acuosas como no acuosas, además conserva su actividad enzimática en medios orgánicos y posee una alta enantioselectividad hacia los alcoholes secundarios. Existen en forma libre o inmovilizada. Entre las lipasas no inmovilizadas (libres) más utilizadas para las reacciones de esterificación se

encuentran las de los microorganismos *Rhizomucor miehei* , *Candida. Rugosa* y *Pseudomonas cepacian* . Las lipasas inmovilizadas como Novozyme 435 (lipasa B de *C. 27ntárctica* , CALB) , Lipozyme RM-IM (lipasa de *R. miehei*) y Lipozyme TL-IM (lipasa de *T. lanuginosus*) también están disponibles en el mercado.

En la industria farmacéutica los ácidos benzoicos simples y sustituidos son intermediarios clave en la síntesis de una amplia gama de ésteres orgánicos con importantes actividades biológicas. Por ejemplo, el éster 2-(acetil-oxi)-3 [(nitrooxi)metil]fenil del ácido benzoico (NCX 4016) se está probando clínicamente como inhibidor específico de la COX-1 y el éster del ácido 4-(trifluorometil) benzoico de salicilanilida muestra actividad antifúngica. Los benzoatos de alquilo también se encuentran en la industria cosmética como portadores de filtros fotoprotectores y aceites de perfume, así como agentes de dispersión. Entre los benzoatos que presentan importantes actividades biológicas, nos interesamos por los anestésicos locales. Estos fármacos, basados en ésteres o aminoésteres, suelen prepararse mediante una síntesis de dos pasos a partir de los correspondientes ácidos benzoicos sustituidos (*Daniela Giunta. et al. 2013*).

En recientes investigaciones F. Zappaterra y colaboradores utilizaron CALB inmovilizado para la esterificación de ibuprofeno con sorbitol obteniendo un rendimiento del 61 %. (*Federico Zappaterra. et al. 2020*).



Figura 10. Éster 3-nitrooximetilfenílico del ácido 2-acetoxibenzoico (Daniela Giunta. et al. 2013).

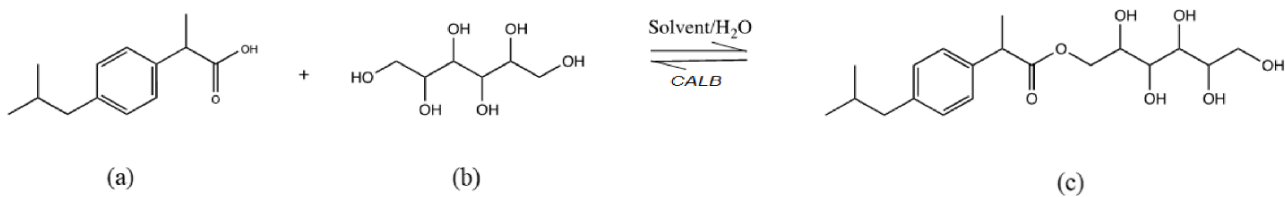


Figura 11. Reacción de esterificación paracetamol(a) y sorbitol(b) utilizando CALB (Federico Zappaterra, et. al. 2020).

4.7 Reacción de Descarboxilación de ácidos alifáticos y aromáticos por catálisis química.

La descarboxilación es una reacción en la cual un grupo carboxilo es eliminado de un compuesto en forma de dióxido de carbono (CO_2), esta reacción es de gran utilidad en la síntesis orgánica, ya que muchas estrategias de síntesis emplean al grupo ácido carboxílico para dirigir una reacción, pero este debe ser eliminado posteriormente. Existen numerosas reacciones de descarboxilación que son importantes en bioquímica, por ejemplo, en el ciclo de Krebs y en la biosíntesis de muchos neurotransmisores como la dopamina y la serotonina. También es uno de los mecanismos de degradación importantes de aminoácidos y ácidos grasos en el medio ambiente (*Gargaud M. et al. 2011*). En la industria farmacéutica esta reacción se emplea para la obtención de monómeros para la fabricación de polímeros a partir de ácido acético. También se utiliza en la producción de acetato de celulosa para la obtención de lacas y películas fotográficas, así como en la fabricación de disolventes de resinas y lacas. La sal alumínica del ácido acético se emplea como mordiente en tintorería. El ácido fórmico se suele emplear en la industria del curtido al objeto de suavizar las pieles y también en los procesos de tintorería en la industria del curtido. Algunos derivados clorados de los ácidos carboxílicos se emplean en la producción de herbicidas. El ácido benzoico tiene una amplia utilidad como intermediario de síntesis en muchos procesos orgánicos y algunos de sus ésteres se emplean como plastificantes y en la industria de la perfumería (benzoato de bencilo). El benzoato de sodio se emplea en la industria de la alimentación como conservante (zumos, refrescos, mermeladas, etc.). Entre los ácidos dicarboxílicos, el ácido propanodioico (ácido malónico) se emplea en la elaboración de medicamentos, plaguicidas y colorantes. El ácido 1-4-butanodioico (ácido succínico) se emplea en la obtención de resinas de poliéster para barnices y el ácido trans-butenodioico (ácido fumárico) se emplea como acidulante en la fabricación de refrescos. (*Gargaud M. et al. 2011*)

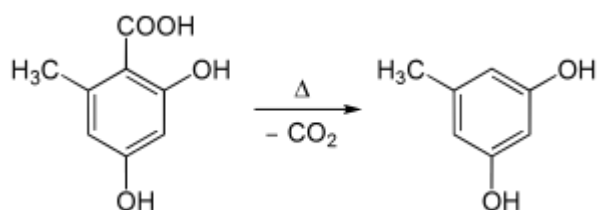


Figura 12. Reacción general de descarboxilación (Gargaud M. et al. 2011)

En el caso de ácidos carboxílicos alifáticos la presencia de dobles enlaces en posición beta al carbonilo permiten la descarboxilación por calentamiento a 100 °C y además se pueden convertir en halogenuros de alquilo con pérdida de un átomo de carbono mediante la reacción de Hunsdiecker (Xue, L. et al. 2011).

En la literatura se reporta que en compuestos aromáticos la reacción es catalizada por metales como plata (Ag) y paladio (Pd), produciendo buenos rendimientos que van del 82-100%, además, proporciona un producto de alta pureza después de retirar el disolvente, eliminando así la necesidad de hacer una cromatografía en columna u otro proceso de purificación, aplicándolo también a compuestos heterocíclicos (Cisneros-Pérez, P. et al. 2013)

4.8 Reacción de Descarboxilación de ácidos alifáticos y aromáticos por catálisis enzimática

Las decarboxilasas son útiles para la descarboxilación de moléculas orgánicas en condiciones de reacción suaves. Estas enzimas pueden ser aplicadas para la síntesis de alcoholes, aminas, olefinas terminales y otras moléculas importantes, en la transformación de aminoácidos en estireno. (Kourist, R. et al. 2014).

La fotodecarboxilasa de *Chlorella variabilis* (CvFAP) es una enzima activada por la luz, que cataliza la descarboxilación de los ácidos grasos en los correspondientes alcanos acortados en C1. En particular, la conversión de ácidos dicarboxílicos en alcanos sigue siendo una reacción químicamente muy difícil. Diversos ácidos dicarboxílicos son descarboxilados en alcanos con buenos rendimientos por medio de este enfoque, incluso a escala preparativa. (Miyamoto, K., & Ohta, H. (2007).

Para la descarboxilación de ácidos dicarboxílicos alifáticos está bien estudiado el mecanismo de reacción, la termostabilidad, la estabilidad de almacenamiento y la reciclabilidad de la CvFAP. (Zeng. Et al. 2021).



Figura 13. Descarboxilación catalizada por enzimas (Zeng. Et al. 2021)

Recientemente, las plantas han sido consideradas como una fuente potencial de enzimas para la biotransformación catalítica, y está bien establecido que las preparaciones crudas de ciertos vegetales comunes pueden servir como agentes reductores selectivos y de alto rendimiento en la síntesis orgánica. Se ha informado de que varias muestras de

plantas enteras son fuentes de actividad reductora con sistemas de alcohol deshidrogenasa, como *Daucus Carota* especies de *Manihot*, *Saccharum officinarum* y *Passiflora edulis*. El jugo de coco es una bebida agradable y refrescante derivada del fruto de *C. nucifera*, se consume ampliamente como refresco nutritivo en los países tropicales. El zumo es sabroso, dulce, ligeramente ácido y rico en fósforo y potasio. También contiene proteínas, grasas y minerales, y es muy rico en carbohidratos.

En recientes investigaciones se ha desarrollado un procedimiento sencillo, selectivo en cuanto al sustrato y satisfactorio para la preparación de polifenoles, 4-vinilfenoles y alcoholes bencílicos sustituidos de gran valor biológico a partir de sus correspondientes ácidos y aldehídos ricos en electrones, utilizando los zumos de coco conocidos como ACC (água-de-coco do Ceará) y BFJ (Borassus flabellifer juice). Además, también se utiliza para la producción de análogos del estireno, benceno poli-hidroxilado a partir de ácido cinámico sustituido, ácido benzoico sustituido y benzaldehído sustituido en muy buen rendimiento bajo condiciones de reacción seguras, sin formación de subproductos tóxicos (*Kaushik Misra, et al. 2012*). Debido a la importancia de las reacciones de descarboxilación en la síntesis de compuestos de interés farmacéutico y ser una metodología sencilla con materiales de bajo costo y de fácil acceso fue elegida como una alternativa para el desarrollo de una práctica de laboratorio para los alumnos de QFB de la UAM Xochimilco. A continuación, se propone la práctica de laboratorio para ser llevada a cabo por los alumnos de QFB.

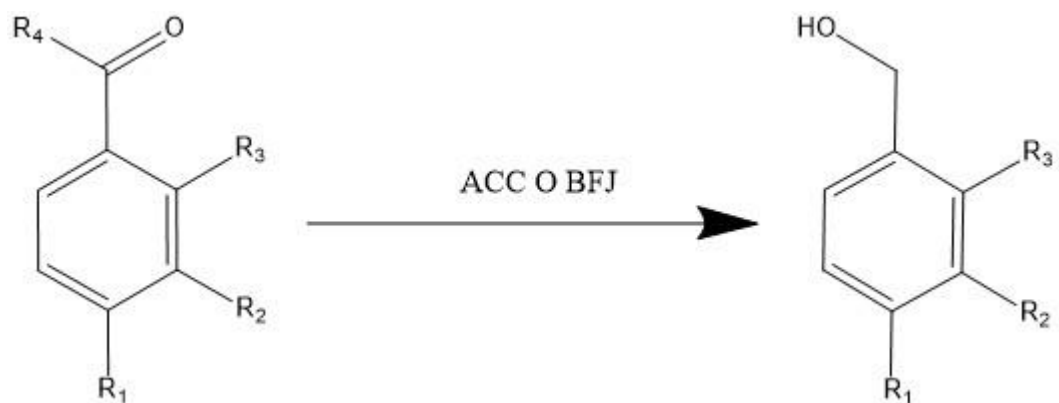


Figura 14. Reducción de aldehídos aromáticos sustituidos por ACC y BFJ a temperatura ambiente

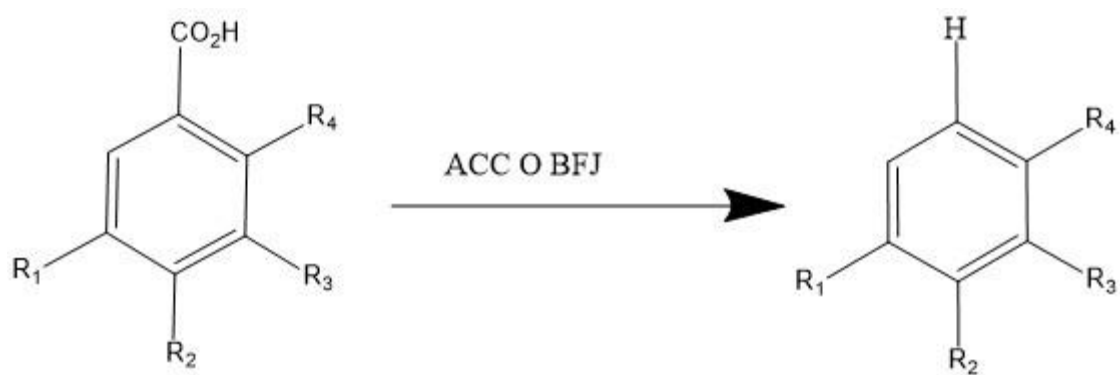


Figura 15. La descarboxilación del ácido benzoico sustituido por ACC y BFJ a temperatura ambiente

5 Discusión de resultados

De acuerdo a la bibliografía consultada en bases de datos electrónicas se seleccionaron las metodologías para llevar a cabo la reacción de descarboxilación de ácidos aromáticos y la reacción de esterificación utilizando enzimas como biocatalizadores. Se analizaron y se establecieron, los materiales y reactivos empleados, así como el biocatalizador, proporción reactivo/ biocatalizador y tiempo de reacción, que fueran de fácil implementación en los laboratorios de docencia de la licenciatura de QFB de la UAM Xochimilco. La primera metodología es la esterificación de ácido benzoico con heptanol utilizando CALB como biocatalizador, la segunda es la descarboxilación de ácido gálico utilizando agua de coco como biocatalizador. A partir de estas metodologías se construyó un modelo experimental para que se lleven a cabo en los laboratorios de los módulos de Reactividad de Compuestos Orgánicos de Interés Farmacéutico (IV) y de Obtención de Compuestos Orgánicos de Interés Farmacéutico (V) de la Licenciatura de QFB.

5.1 Modelos experimentales propuestos

Biocatálisis aplicada a la química orgánica usando enzimas como catalizadores de para la reacción de esterificación.

Modelo experimental 1: Esterificación de ácido benzoico con heptanol catalizada por la enzima CALB **Introducción**

La esterificación de Fischer o esterificación de Fischer-Speier es una reacción de esterificación carboxílica que utiliza un ácido inorgánico como catalizador, principalmente ácido sulfúrico (H_2SO_4). Los ésteres carboxílicos se forman por reacción entre un ácido carboxílico y un alcohol orgánico. Las lipasas son enzimas que se utilizan principalmente para hidrolizar los enlaces éster de los triacilglicerol (aceites y grasas) y para liberar ácidos grasos, diacilglicerol,

monoacilgliceroles y glicerol. En determinadas condiciones como la falta de agua o la presencia de moléculas nucleófilas (alcoholes) en el medio de reacción, son capaces de catalizar la reacción inversa (esterificación y transesterificación).

Objetivo: Emplear la lipasa CALB para la reacción de esterificación de ácido benzoico

Objetivo específico:

Obtención de benzoato de heptilo

Antecedentes:

Reacción de esterificación química y enzimática

Lipasas: *Candida antarctica*

Usos de lipasas para la obtención de esteres

Condiciones de reacción para la esterificación de esteres utilizando lipasa

Mecanismo de esterificación vía lipasas

Reacción



R = H, CH₃, OCH₃, *i*Pr, Cl, CF₃, NO₂, ⁿBu

Figura 16. Reacción de esterificación ácido benzoico (1a-1o), heptanol y éster del ácido benzoico (3a-3o) utilizando CAL

Parte experimental

Materiales y reactivos

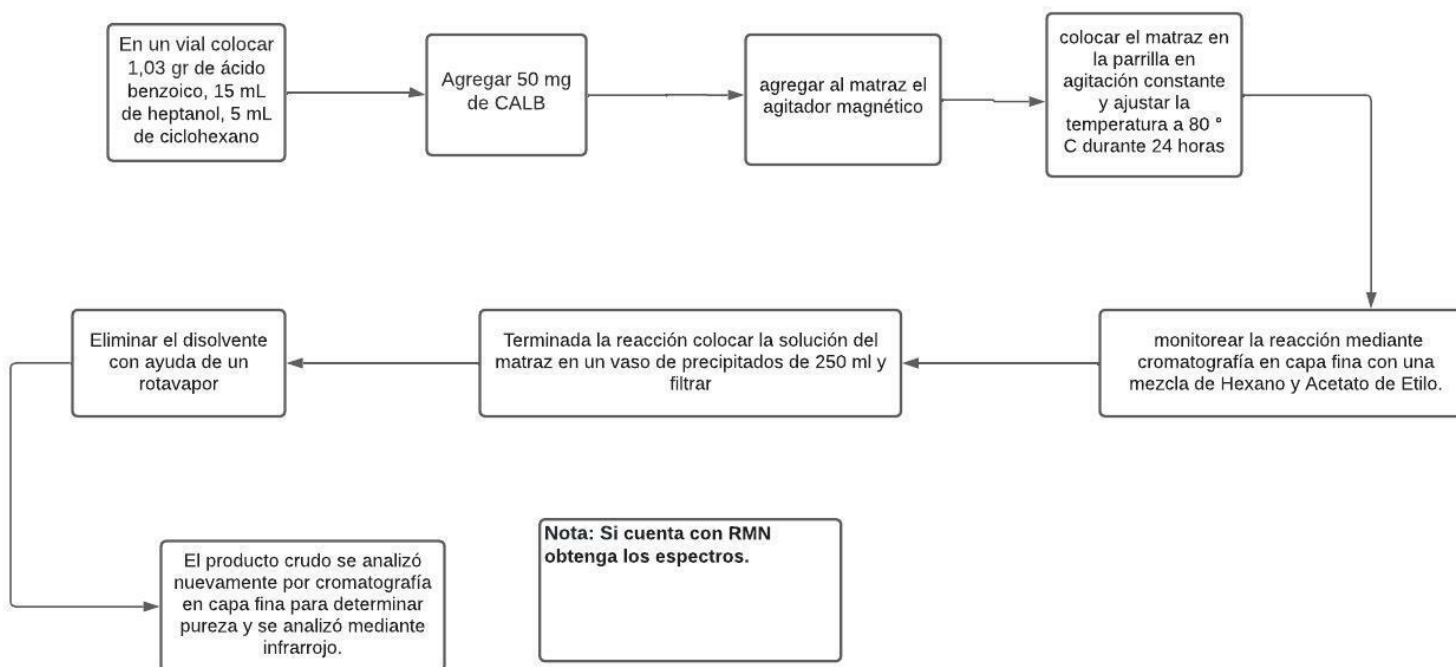
CALB (lipasa B de <i>C. antarctica</i> inmovilizada en resina acrílica imobead 150, recombinante de <i>Aspergillus oryzae</i> ; ≥ 1800 U / g)	acetato de etilo
Ciclohexano	Hexano
Ácido benzoico	Vaso de precipitado
Heptanol	Parilla de agitación

Matraz Erlenmeyer	Agitador magnético
gel de sílice	Papel Filtro
Embudo	

Metodología

En un matraz bola de 250 mL se colocarán 1.03 g de ácido benzoico, 15 mL de heptanol, 5 mL de ciclohexano y 50 mg de enzima CALB. Posteriormente tapar el matraz con un corcho y agregar una barra magnética, ponerlo en la parrilla en agitación constante y ajustar la temperatura a 80° C durante 24 horas (Nota1). Para monitorear la reacción realizar una cromatografía en capa fina con una mezcla de Hexano y Acetato de Etilo. Una vez terminada la reacción, filtrar al vacío, el filtrado se coloca en un matraz bola y con ayuda de un rotavapor eliminar el disolvente (Nota 2). El producto crudo se analizá nuevamente por cromatografía en capa fina para corroborar que se terminó la reacción utilizando una mezcla de Hexano- AcOEt 1:1 (Nota 3). El producto obtenido se analizá por infrarrojo, y si se cuenta con RMN obtenga los espectros de RMN1H y 13C.

Diagrama de flujo



Cuestionario

¿Por qué se utiliza ciclohexano como disolvente en la reacción de esterificación del ácido benzoico?

¿Qué ventajas se tienen en una síntesis enzimática?

¿Qué otros disolventes se pueden utilizar como medio de reacción?

Anexo 1 Información de reactivos

ÁCIDO BENZOICO

INFORMACIÓN FÍSICO-QUÍMICA	
Estado físico; aspecto POLVO BLANCO O CRISTALES.	Fórmula: $C_7H_6O_2$ / C_6H_5COOH
Peligros físicos Es posible la explosión del polvo si se encuentra mezclado con el aire en forma pulverulenta o granular.	Masa molecular: 122.1 Punto de ebullición: 249°C Punto de fusión: 122°C Ver Notas.
Peligros químicos La disolución en agua es un ácido débil. Reacciona con oxidantes.	Densidad: 1.3 g/cm ³ Solubilidad en agua, g/100ml a 20°C: 0.29 Presión de vapor, Pa a 25°C: 0.1 Densidad relativa de vapor (aire = 1): 4.2 Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1): 1 Punto de inflamación: 121°C c.c. Temperatura de autoignición: 570°C Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 1.87

	SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS
Inhalación	Tos. Dolor de garganta.	Usar extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo.
Piel	Enrojecimiento. Sensación de quemazón. Picor.	Guantes de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar y lavar la piel con agua y jabón.
Ojos	Enrojecimiento. Dolor.	Utilizar gafas de protección de montura integral.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Dolor abdominal. Náuseas. Vómitos.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Enjuagar la boca. Provocar el vómito (¡ÚNICAMENTE EN PERSONAS CONSCIENTES!). Proporcionar asistencia médica.

Ciclohexano

	SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS
Inhalación	Tos. Vértigo. Somnolencia. Dolor de cabeza. Náuseas. Dolor de garganta.	Usar ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Puede ser necesaria respiración artificial. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Piel seca. Enrojecimiento.	Guantes de protección. Traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar la piel

			con agua abundante o ducharse. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Enrojecimiento. Dolor.	Utilizar gafas de protección o protección ocular en combinación con protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Dolor abdominal. Diarrea. Además, ver Inhalación.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. Dar a beber uno o dos vasos de agua. Proporcionar asistencia médica.

INFORMACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

<p>Estado físico; aspecto LÍQUIDO INCOLORO HIGROSCÓPICO O CRISTALES BLANCOS DE OLOR CARACTERÍSTICO.</p> <p>Peligros físicos</p> <p>Peligros químicos Reacciona violentamente con oxidantes fuertes. Ataca los plásticos.</p>	<p>Fórmula: C₆H₁₁OH</p> <p>Masa molecular: 100.2</p> <p>Punto de ebullición: 161°C</p> <p>Punto de fusión: 23°C</p> <p>Densidad relativa (agua = 1): 0.96</p> <p>Solubilidad en agua, g/100ml a 20°C: 4</p> <p>Presión de vapor, kPa a 20°C: 0.13</p> <p>Densidad relativa de vapor (aire = 1): 3.5</p> <p>Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1): 1.00</p> <p>Punto de inflamación: 68°C c.c.</p> <p>Temperatura de autoignición: 300°C</p> <p>Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 2.4-12</p> <p>Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 1.2</p>
---	---

Hexanol

	SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS
Inhalación	Tos. Dolor de garganta.	Usar ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo.
Piel	Piel seca.	Guantes de protección.	Aclarar y lavar la piel con agua y jabón.
Ojos	Enrojecimiento. Dolor.	Utilizar gafas de protección de montura integral.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Sensación de quemazón.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. NO provocar el vómito. Dar a beber uno o dos vasos de agua.

INFORMACIÓN FÍSICO-QUÍMICA	
Estado físico; aspecto LÍQUIDO INCOLORO DE OLOR CARACTERÍSTICO.	Fórmula: $C_6H_{14}O$ / $CH_3(CH_2)_4CH_2OH$ Masa molecular: 102.2 Punto de ebullición: 157°C Punto de fusión: -44.6°C Densidad relativa (agua = 1): 0.82 Solubilidad en agua, g/100ml a 20°C: 0.59 Presión de vapor, kPa a 25°C: 0.124 Densidad relativa de vapor (aire = 1): 3.52 Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1): 1 Punto de inflamación: 63°C c.c.
Peligros físicos	
Peligros químicos Reacciona con oxidantes fuertes.	

	Temperatura de autoignición: 290°C Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 1.2-7.7 (calculado) Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 2.03
--	---

Acetato de etilo

¡EVITAR LA FORMACIÓN DE NIEBLAS DEL PRODUCTO!			
	SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS
Inhalación	Dolor de garganta. Tos. Dolor de cabeza. Somnolencia.	Usar ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Enrojecimiento. Piel seca.	Guantes de protección.	Enjuagar la ropa contaminada con agua abundante (peligro de incendio). Quitar las ropas contaminadas. Aclarar la piel con agua abundante o ducharse.
Ojos	Enrojecimiento.	Utilizar gafas de protección o protección ocular en combinación con protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad).
Ingestión		No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. Proporcionar asistencia médica si se siente mal.

INFORMACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

Estado físico; aspecto

LÍQUIDO INCOLORO DE OLOR CARACTERÍSTICO.

Peligros físicos

El vapor es más denso que el aire y puede extenderse a ras del suelo; posible ignición en punto distante.

Peligros químicos

Reacciona con oxidantes fuertes. Esto genera peligro de incendio y explosión.
Reacciona violentamente con bases fuertes y ácidos fuertes. Ataca el caucho y algunas formas de plásticos.

Fórmula: $C_4H_8O_2$ / $CH_3COOC_2H_5$

Masa molecular: 88.1

Punto de ebullición: 77°C

Punto de fusión: -84°C

Densidad relativa (agua = 1): 0.9

Solubilidad en agua, g/100ml a 20°C: 8.7 (escasa)

Presión de vapor, kPa a 20°C: 10

Densidad relativa de vapor (aire = 1): 3.0

Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1): 1.2

Punto de inflamación: -4°C c.c.

Temperatura de autoignición: 427°C

Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 2.0-12.8

Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 0.73

Nota 1. Cuidar que los disolventes no pierdan por evaporación.

Nota 2. La enzima recuperada puede ser utilizada nuevamente para la misma reacción.

Nota 3. Si observa que las manchas no tienen el Rf adecuado, pruebe con otra proporción de eluyente.

Modelo experimental 2: Uso de enzimas para la descarboxilación de ácidos fenólicos

Introducción

La descarboxilación es una reacción de gran utilidad en la síntesis orgánica, muchas estrategias de síntesis emplean al grupo ácido carboxílico para dirigir una reacción y este debe ser eliminado posteriormente. En el caso de ácidos carboxílicos alifáticos la presencia de dobles enlaces en posición beta al carbonilo permiten la descarboxilación por calentamiento a 100° C. Recientemente se ha informado el uso de enzimas y células completas para la descarboxilación.

Objetivo: Descarboxilación de ácido gálico usando agua de coco (*Cocos nucifera*) como biocatalizador.

Objetivo específico: Obtención de pirogalol

Antecedentes:

Reacción de descarboxilación química y enzimática

Cocos nucifera

Enzimas que se utilizan para la reacción de descarboxilación

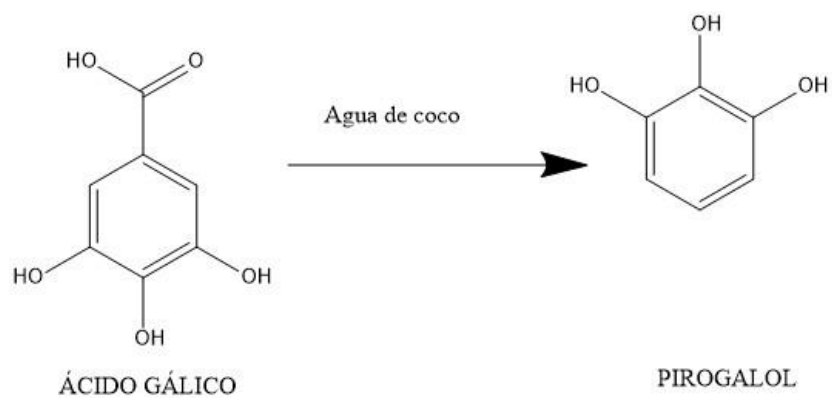


Figura 17. *Reacción de descarboxilación del Ácido Gálico*

Parte experimental

Material:

Para la preparación del biocatalizador

Coco tierno	Matraz de fondo redondo
Picahielo	Agitador magnético
Vaso de precipitados 500 mL	Barra magnética
Kitazato con manguera	Tapón

Embudo Büchner	Aguja
Vaso deprecitados 250 mL	Globo con N2
Papel filtro	Embudo de separación de 250 o 500 mL
Vial de 5 mL	Espátula
Pipeta pasteur	Pipeta graduada de 5 mL

Reactivos: Para la reacción de descarboxilación

Acido gálico
Acetona RA
Acetato de etilo RA
Sulfato de sodio anhidro

Descarboxilación enzimática de ácidos fenólicos

Procedimiento.

a) Preparación del biocatalizador:

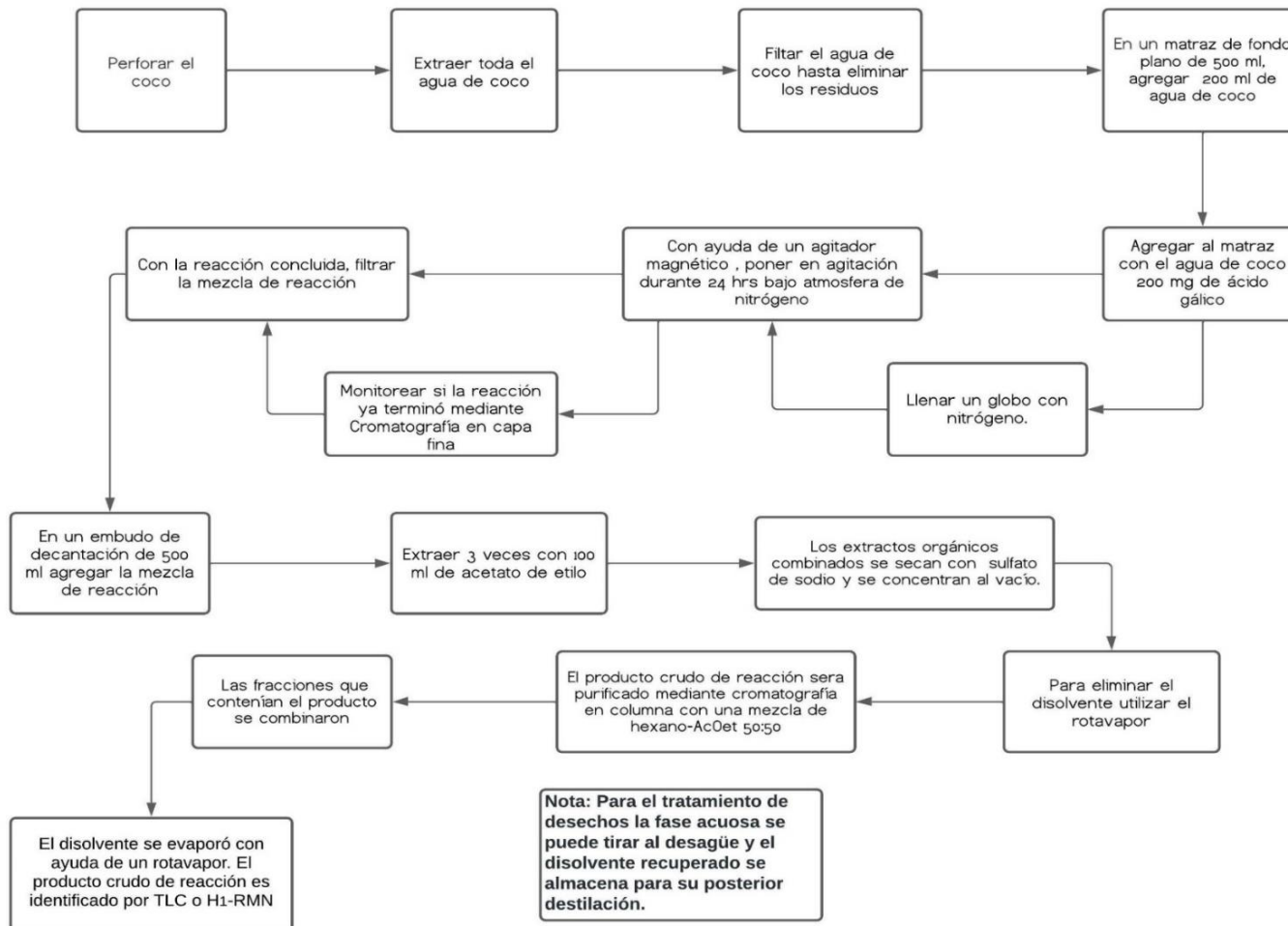
El agua de *Cocos nucifera* fue obtenida por perforación con una pica hielo de un coco tierno. El agua de coco se filtra al vacío usando papel filtro tantas veces como sea necesario para la eliminación de residuos.

b) Reacción de descarboxilación:

En un matraz de fondo plano de 250 mL se colocaron 100 mL de agua de coco y se luego se añaden 100 mg del ácido gálico y tapar el matraz con un tapón. Inflar un globo con nitrógeno para la atmosfera de nitrógeno. La mezcla de reacción que está en el matraz de fondo plano se mantiene en agitación bajo atmosfera de nitrógeno por 24 horas a temperatura ambiente. Para analizar si la reacción ya concluyo hacer una cromatografía en capa fina con una mezcla de hexano-AcOEt 1:1 utilizar ácido gálico como referencia. Posteriormente se filtra al vacío. El filtrado se extrae usando embudo de separación de 500 mL extraer tres veces con 50 mL acetato de etilo. Colocar los extractos orgánicos en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, secar con sulfato de sodio anhidro y se concentra al vacío. El producto crudo de reacción será purificado por cromatografía en columna con una mezcla de hexano-AcOEt con incremento de polaridad. (Nota 1)

Nota 1.. Se pueden utilizar otros aldehídos como sustratos como los ácidos 3,4 dihidroxibenzoico y 3,4,5 trihidroxibenzoico y ácidos cinámicos además otro tipo de hojas o tejidos vegetales.

Diagrama de flujo



Cuestionario

¿Qué otra zuma de fruta se puede utilizar para esta reacción?

¿Cómo se llama la enzima que cataliza la reacción?

¿Qué función tiene el sulfato de sodio anhidro?

Anexo 2 Información de reactivos

Ácido gálico

	SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS
Inhalación		Usar extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo.
Piel		Guantes de protección.	Aclarar y lavar la piel con agua y jabón.
Ojos		Utilizar gafas de protección de montura integral.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión		No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca.

INFORMACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

<p>Estado físico; aspecto CRISTALES BLANCOS HIGROSCÓPICOS.</p> <p>Peligros físicos</p> <p>Peligros químicos Reacciona con reductores fuertes. Esto genera calor y gas inflamable/explosivo (hidrógeno - ver FISQ 0001).</p>	<p>Fórmula: $C_7H_6O_5/C_6H_2(OH)_3COOH$</p> <p>Masa molecular: 170.1</p> <p>Punto de sublimación: 210°C</p> <p>Densidad relativa (agua = 1): 1.7</p> <p>Solubilidad en agua, g/100ml: 1.1 (moderada)</p> <p>Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 0.7</p>
--	--

Acetona

	SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS
Inhalación	Dolor de garganta. Tos. Confusión mental. Dolor de cabeza. Vértigo. Somnolencia. Pérdida del conocimiento.	Usar ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Piel seca.	Guantes de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar la piel con agua abundante o ducharse.
Ojos	Enrojecimiento. Dolor. Visión borrosa.	Utilizar gafas de protección.	Enjuagar con agua abundante (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con

			facilidad). Proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Náuseas. Vómitos. Además, ver Inhalación.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Enjuagar la boca. Proporcionar asistencia médica.

INFORMACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

<p>Estado físico; aspecto LÍQUIDO INCOLORO DE OLOR CARACTERÍSTICO.</p> <p>Peligros físicos El vapor es más denso que el aire y puede extenderse a ras del suelo; posible ignición en punto distante.</p> <p>Peligros químicos El contacto con oxidantes fuertes tales como ácido acético, ácido nítrico y peróxido de hidrógeno genera peróxidos explosivos. Reacciona con cloroformo y bromoformo en condiciones básicas. Esto genera peligro de incendio y explosión. Ataca los plásticos.</p>	<p>Fórmula: C₃H₆O / CH₃-CO-CH₃</p> <p>Masa molecular: 58.1</p> <p>Punto de ebullición: 56°C</p> <p>Punto de fusión: -95°C</p> <p>Densidad relativa (agua = 1): 0.8</p> <p>Solubilidad en agua: miscible</p> <p>Presión de vapor, kPa a 20°C: 24</p> <p>Densidad relativa de vapor (aire = 1): 2.0</p> <p>Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1): 1.2</p> <p>Punto de inflamación: -18°C c.c.</p> <p>Temperatura de autoignición: 465°C</p> <p>Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 2.2-13</p> <p>Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow: -0.24</p> <p>Viscosidad: 0.34 mm²/s a 40°C</p>
---	---

Acetato de etilo

¡EVITAR LA FORMACIÓN DE NIEBLAS DEL PRODUCTO!			
	SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS
Inhalación	Dolor de garganta. Tos. Dolor de cabeza. Somnolencia.	Usar ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Enrojecimiento. Piel seca.	Guantes de protección.	Enjuagar la ropa contaminada con agua abundante (peligro de incendio). Quitar las ropas contaminadas. Aclarar la piel con agua abundante o ducharse.
Ojos	Enrojecimiento.	Utilizar gafas de protección o protección ocular en combinación con protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad).
Ingestión		No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. Proporcionar asistencia médica si se siente mal.

INFORMACIÓN FÍSICO-QUÍMICA	
<p>Estado físico; aspecto LÍQUIDO INCOLORO DE OLOR CARACTERÍSTICO.</p> <p>Peligros físicos El vapor es más denso que el aire y puede extenderse a ras del suelo; posible</p>	<p>Fórmula: $C_4H_8O_2$ / $CH_3COOC_2H_5$</p> <p>Masa molecular: 88.1</p> <p>Punto de ebullición: 77°C</p> <p>Punto de fusión: -84°C</p> <p>Densidad relativa (agua = 1): 0.9</p> <p>Solubilidad en agua, g/100ml a 20°C: 8.7 (escasa)</p>

<p>ignición en punto distante.</p> <p>Peligros químicos</p> <p>Reacciona con oxidantes fuertes. Esto genera peligro de incendio y explosión.</p> <p>Reacciona violentamente con bases fuertes y ácidos fuertes. Ataca el caucho y algunas formas de plásticos.</p>	<p>Presión de vapor, kPa a 20°C: 10</p> <p>Densidad relativa de vapor (aire = 1): 3.0</p> <p>Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1): 1.2</p> <p>Punto de inflamación: -4°C c.c.</p> <p>Temperatura de autoignición: 427°C</p> <p>Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 2.0-12.8</p> <p>Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 0.73</p>
---	---

Sulfato de sodio anhidro

	SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS
Inhalación		Usar ventilación.	Aire limpio, reposo.
Piel		Guantes de protección.	Aclarar y lavar la piel con agua y jabón.
Ojos		Utilizar gafas de protección.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Náuseas. Vómitos. Dolor abdominal. Diarrea.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Dar a beber uno o dos vasos de agua.

INFORMACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

Estado físico; aspecto

SÓLIDO BLANCO HIGROSCÓPICO EN DIVERSAS FORMAS.

Peligros físicos

Peligros químicos

Se descompone por calentamiento. Esto produce óxidos de azufre y óxidos de sodio.

Fórmula: Na_2SO_4

Masa molecular: 142.1

Punto de fusión: 884°C

Densidad relativa (agua = 1): 2.7

Solubilidad en agua: muy elevada

6 Conclusiones

Al analizar toda la información encontrada proponemos estas dos metodologías, debido a que los materiales y reactivos de estos modelos propuestos son de fácil acceso, para que tanto los alumnos como los maestros de la carrera de QFB de la UAM-Xochimilco lleven a cabo el desarrollo de estas prácticas en los laboratorios de docencia de los módulos de Reactividad de Compuestos Orgánicos de Interés Farmacéutico (IV) y de Obtención de Compuestos Orgánicos de Interés Farmacéutico (V) de la Licenciatura de QFB.

7 Bibliografía

1. Alberto Del Monte-Martínez, Bessy V. Cutiño-Avila, Jorge O. González-Bacerio, Darío González-Abradelo, Viviana Figueroa Espí, Roberto Cao-Vázquez. (6 De Junio 2013). *Application Of Enzymes On Biocatalysis. Perspectives Of The Use Of Nanoarrays As Biocatalysts. Revista Cubana De Ciencias Biologicas*, 2, 7-23.
2. Alberto Del Monte-Martínez, Bessy V. Cutiño-Avila, Jorge O. González-Bacerio, Darío González-Abradelo, Viviana Figueroa Espí, Roberto Cao-Vázquez. (6 De Junio 2013). *Application Of Enzymes On Biocatalysis. Perspectives Of The Use Of Nanoarrays As Biocatalysts. Revista Cubana De Ciencias Biologicas*, 2, 7-23.
3. McMurry, J. (2009). *Química Orgánica (7a. Ed.--)*. México D.F.: S.A. Ediciones
4. Aljawish, A., Heuson, E., Bigan, M., & Froidevaux, R. (2019). *Lipase Catalyzed Esterification Of Formic Acid In Solvent And Solvent-Free Systems. Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 20, 101221
5. González-Bacerio, Jorge, & Rodríguez Hernández, Jairo, & Monte Martínez, Alberto Del (2010). *Las Lipasas: Enzimas Con Potencial Para El Desarrollo De Biocatalizadores Inmovilizados Por Adsorción Interfacial. Revista Colombiana De Biotecnología*, XII (1), 124-140
6. Aljawish, A., Heuson, E., Bigan, M., & Froidevaux, R. (2019). *Lipase Catalyzed Esterification Of Formic Acid In Solvent And Solvent-Free Systems. Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 20, 101221.
7. Cassani, J., Luna, H., Navarro, A. Y Castillo, E. (2007). *Esterificación Comparativa De Ácidos Fenilpropanoides Versus Ácidos Hidrofenilpropanoides Catalizados Por Lipasa En Medio Solvente Orgánico. Revista Electrónica De Biotecnología*, 10 (4), 508-513.
8. Heinsman, N. W., Valente, A. M., Smienk, H. G., Van Der Padt, A., Franssen, M. C., De Groot, A., & Van 'T Riet, K. (2001). *The Effect Of Ethanol On The Kinetics Of Lipase-Mediated Enantioselective Esterification Of 4-Methyloctanoic Acid And The Hydrolysis Of Its Ethyl Ester. Biotechnology And Bioengineering*, 76(3), 193-199.

9. Ortiz, C., Lujan Ferreira, M., Barbosa, O., S. Dos Santos, J. C., L C. Rodrigues, R., Berenguer-Murcia, Ángel, E. Briand, L., & Fernandez-Lafuente, R. (2019). *Novozym 435: The "Perfect" Lipase Immobilized Biocatalyst? Catalysis Science & Technology*, (9), 2380–2420.
10. Emily M. Anderson, Karin M. Larsson, Ole K Rk. (18 August 1998). *One Biocatalyst -* Many Applications: The Use Of Candida Antarctica B-Lipase In Organic Synthesis. Biocatalysis And Biotransformation*, 16, 181-204.
11. Ortiz, C., Lujan Ferreira, M., Barbosa, O., S. Dos Santos, J. C., L C. Rodrigues, R., Berenguer-Murcia, Ángel, E. Briand, L., & Fernandez-Lafuente, R. (2019). *Novozym 435: The "Perfect" Lipase Immobilized Biocatalyst? Catalysis Science & Technology*, (9), 2380–2420.
12. Federico Zappaterra, Daniela Summa, Bruno Semeraro, Raissa Buzzi, Claudio Trapella, Miguel Ladero, Stefania Costa, Elena Tamburini. (3 De Octubre De 2020). *La Esterificación Enzimática Como Estrategia Potencial Para Mejorar El Comportamiento Del Ácido Sórbico Como Conservante De Alimentos Y Bebidas. 17/11/2021, De Tecnologías Microbianas Para La Producción Alimentaria Sostenible: Soluciones Ecológicas De Base Biológica*
13. Xue, L., Su, W., & Lin, Z. (2011). *Mechanism Of Silver-And Copper-Catalyzed Decarboxylation Reactions Of Aryl Carboxylic Acids. Dalton Transactions*, 40(44), 11926-11936
14. Cisneros-Pérez, P. A., & Frontana-Uribe, B. A. (2018). *Descarboxilación De Dos Ésteres Alílicos De Ácidos Areno Carboxílicos Mediada Por Catalizadores De Paladio, Hacia La Síntesis De 3, 4-Dialcoxitiofenos. Avances En Química*, 13(2), 33-40
15. Robert Kourist, Jan-Karl Guterl, Kenji Miyamoto, Volker Sieber. (31 De Enero De 2014). *Enzymatic Decarboxylation—An Emerging Reaction For Chemicals Production From Renewable Resources. CHEMCATCHEM*, 6, 689-701.
16. Zeng, YY, Liu, L., Chen, BS Y Zhang, W. (2021). *Descarboxilación Enzimática Impulsada Por Luz De Ácidos Dicarboxílicos. Chemistryopen*, 10 (5), 553–559.

17. Kaushik Misra, Himadri Sekhar Maity, Subhankar Chanda, Ahindra Nag. (9 June 2012). *New Greener Alternatives For Bioreduction Of Aromatic Aldehydes And Decarboxylation Of Aromatic Acids Using Juice Of Fruits*. 16/02/2022, *De Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*
18. K. Farber, W.D. Fessner, N. J. Tuner, Eds. *Biocatalysis In Organic Synthesis 2015*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart-New York.
19. Kaushik Misra, Himadri Sekhar Maity, Subhankar Chanda, Ahindra Nag. *New Greener Alternatives For Bioreduction Of Aromatic Aldehydes And Decarboxylation Of Aromatic Acids Using Juice Of Fruits*, *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2012, 82, 92– 95
20. Ni Y, Xu J-H “*Biocatalytic Ketone Reduction: A Green And Efficient Acces To Enantiopure Alcohols*” *Biotechnology Advances* 2012, 30(6), 1279-1288
21. Cleaves HJ (2011) *Descarboxilación*. En: Gargaud M. Et Al. (Eds) *Enciclopedia De Astrobiología*. Springer, Berlín, Heidelberg.
22. Jiménez Islas, Donaji, & Medina Moreno, Sergio A., & Gracida Rodríguez, Jorge Noel (2010). *Propiedades, Aplicaciones Y Producción De Biotensoactivos*. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 26 (1),65-84. 22 De Marzo De 2022. ISSN: 0188-4999.
23. Osorio, Y. W. (2004). *El Experimento Como Indicador De Aprendizaje*. *Boletín PPDQ* (43), 7-10.
24. Abraham Casas, María Jesús Ramos, Ángel Pérez. (Julio 2013). *Producción De Biodiesel A Través De Interesterificación De Triglicéridos Con Acetato De Metilo*. 14/03/2022, *De Departamento De Ingeniería*

Química, Instituto De Química Y Ambientales (ITQUIMA), Universidad De Castilla-La Mancha Ciudad Real.

25. Zhao, LL., Pan, J. & Xu, JH. Efficient Production Of Diltiazem Chiral Intermediate Using Immobilized Lipase From *Serratia Marcescens*. *Biotechnol Bioproc E* 15, 199–207 (2010).
26. Q. Guillermo A. James Molina Dr. Cuauhtémoc Pérez González Dra. Maria Salud Pérez Gutiérrez Q. Artemisa Romero Martínez M. En C. Olivia Soria Arteché. (4/11/2008). Plan De Estudios Licenciatura En Química Farmacéutica Biológica 14/04/2022, De El Consejo Académico De La Unidad Xochimilco
27. Daniela Giunta A, Maria Paola Masia A , Mauro Marchetti A , Raffaele Morrone B , Maurizio Solinas. (18/Julio/2013). Immobilised *Candida Antarctica B* As Efficient Catalyst For The Synthesis Of Local Anaesthetic Intermediates. 3/04/2022, De *Tetrahedron Letters*



Dra. Liliana Hernández Vázquez

Profesora Titular Tiempo Completo

No. Eco. 27790



Dra. Aida Solís Oba

Profesora Titular C, Tiempo Completo

No. Eco. 21208