UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DESRACEMIZACIÓN DE 3-HIDROXIBUTANOATO DE ETILO CON CULTIVOS CELULARES DE *Taxus globosa* Y *Taxus brevifolia*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Carmen Beatriz Alpízar Muñoz

TUTOR: Dr. Héctor Guillermo Barrios López
AÑO: 2008

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Manuel Jiménez Estrada Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Guillermo Negrón Silva Universidad Autónoma Metropolitana
Secretario	M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez Instituto de Química, UNAM
Primer suplente	Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila Instituto de Biología, UNAM
Segundo suplente	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano FES-Cuautitlán, UNAM

Este trabajo se llevó a cabo

en las instalaciones del Instituto de Química

AGRADECIMIENTOS

Dr. Héctor Guillermo Barrios López, no tengo palabras para agradecerle todo lo que me ha enseñado y, aunque de repente me rehuso a dar el siguiente paso, su motivación me alienta para continuar esta aventura académica. Gracias por su enorme paciencia.

M en C. María del Consuelo Sandoval García, la verdad es que yo no estaría en el Laboratorio sino fuera por usted. Gracias a su incansable esfuerzo y dedicación, esta línea de investigación continúa dando frutos.

M. en C. Carmen Márquez, agradezco la asesoría brindada y la confianza en mí depositada para llevar a cabo el análisis cromatográfico de este proyecto.

A la Coordinación del Posgrado en Ciencias Químicas, un agradecimiento muy especial pues sin su apoyo no habría sido posible la realización de esta tesis.

G R A C I A S

1. ÍNDICE

Página

1. Índice..... 5

2. Introducción..... 7

3. Antecedentes..... 8

3.1. Estereoquímica..... 8
3.2. Separación..... 12
3.3. Composición enantiomérica..... 13
3.4. Catálisis..... 19
3.5. Biocatálisis..... 21
3.6. Resolución cinética y desracemización..... 25
3.6.1. Desracemización con cultivos celulares..... 27

4. Objetivos..... 33

5. Técnica Experimental..... 33

5.1. Preliminares..... 33
5.2. Mantenimiento de cultivos vegetales..... 35
5.3. Síntesis del 3-hidroxibutanoato de etilo..... 36
5.4. Biotransformaciones..... 36
5.5. Análisis del producto..... 37
5.5.1. Análisis quiral..... 37
5.5.2. Análisis no quiral..... 38

6. Resultados..... 39

6.1. *Taxus globosa*..... 39
6.2. *Taxus brevifolia*..... 43

7. Discusión de resultados..... 51

7.1. Síntesis de 3-hidroxibutanoato de etilo..... 51

7.2. Cultivo de células vegetales..... 55
7.3. Proceso de desracemización..... 55
7.4. Influencia del pH..... 56
7.5. Tipo de amortiguador..... 57
7.6. Presencia de sacarosa..... 57
7.7. Efecto de la temperatura..... 58
7.8. Cantidad de sustrato..... 59
7.9. Biotransformación de los enantiómeros puros..... 62
7.10. Mecanismo de desracemización..... 63
7.11. Edad del cultivo en suspensión..... 70

8. Conclusiones..... 74

9. Referencias..... 77

10. Apéndice..... 86

10.1. Lista de fuentes biológicas citadas..... 86
10.2. Especificaciones de material..... 87
10.3. Espectroscopia..... 88
10.4. Curva de calibración para el análisis de cromatografía de gases..... 94
10.5. Cálculo del rendimiento de la biodesracemización..... 103
10.6. Determinación del exceso enantiomérico en la biotransformación del 3-hidroxibutanoato de etilo..... 117
10.7. Determinación de la velocidad de desracemización bajo la influencia del pH..... 123
10.8. Determinación de la velocidad de desracemización bajo la influencia de la temperatura..... 125
10.9. Determinación de la velocidad de desracemización bajo la influencia de la cantidad de sustrato..... 126

2. INTRODUCCIÓN

La naturaleza ha sido una “fuente ilimitada” de compuestos con diversas estructuras, tanto en composición como en disposición espacial, que ha provocado el desarrollo de técnicas experimentales de síntesis dentro de la Química. De igual manera, el estudio de los mecanismos de acción dentro de las diferentes rutas metabólicas ha proporcionado información valiosa acerca de la especificidad y selectividad requerida en dichos procesos pues un pequeño cambio estructural da lugar a importantes diferencias en el comportamiento fisicoquímico de ciertos compuestos.

Respecto a esto, la estereoquímica ha jugado un papel importante en el desarrollo de fármacos debido a su acción dentro del metabolismo. Compuestos con igual forma estructural, pero diferente disposición tridimensional pueden tener efectos farmacológicos distintos e incomparables. Por ello, los estudios en síntesis asimétrica o estereoselectiva se han incrementado y no sólo se limitan al uso de reactivos proquirales, inductores quirales o modificaciones que provocan cierta quiralidad en los productos, sino a valerse de algún medio biológico o enzimático.

Diversos cultivos de bacterias, hongos, levaduras y, en menor grado, plantas se han utilizado para producir o biotransformar compuestos endógenos (de origen biológico) y exógenos (de origen sintético) con diferentes fines. Uno de ellos es obtener productos estereoselectivos a partir de sustratos proquirales o quirales, sin embargo, la utilización de un compuesto racémico para obtener una configuración específica por medio de la desracemización representa otra alternativa.

En este proyecto se investiga la capacidad de los cultivos vegetales en suspensión de *Taxus globosa* y *Taxus brevifolia* para desracemizar una mezcla de 3-hidroxibutanoato de etilo como sustrato racémico. De manera paralela, se determina la influencia de parámetros a considerar cuando se trabaja con una fuente biológica como el pH, tipo de disolución amortiguadora del medio de biorreacción, presencia de sacarosa, temperatura y cantidad de sustrato, además de involucrar una variable, poco estudiada, como lo es la edad de los cultivos.

Así mismo, se utilizan, individualmente, los enantiómeros del 3-hidroxibutanoato de etilo como sustrato para elucidar el posible mecanismo de biorreacción, si es el caso.

3. ANTECEDENTES

Los conocimientos adquiridos a partir del estudio de la materia, la energía y sus cambios han ocasionado que la **Química** se relacione con cualquier fenómeno dentro de la **naturaleza** y, más aún, ésta ha sido el objeto de estudio y la fuente de inspiración para relacionar su diversidad con cierto sistema lógico y uniforme de pensamiento denominado **Ciencia**. Esto ha traído como consecuencia el descubrimiento y aislamiento de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas que el hombre ha decidido incorporar a su vida.

Esta relación bilateral entre la naturaleza y el hombre nos ha proporcionado las herramientas necesarias para conocer, a nivel molecular, la infinidad de cambios conformacionales y estructurales que pueden presentar los compuestos. Por ello, ahora sabemos, que existen compuestos que pueden estar constituidos por una misma clase de átomos, sin que ello implique misma estructura o misma forma física.

Bajo esta premisa, la Medicina y el desarrollo de la Química han requerido un mayor compromiso social pues, en la naturaleza, la distinción entre compuestos con la misma constitución, pero diferente estructura se vuelve clave cuando el resultado puede llegar a ser vital.

3.1. ESTEREOQUÍMICA

El área de la Química que se encarga del estudio de las diferentes formas geométricas en tres dimensiones que puede adoptar una molécula es la **estereoquímica** y el origen de ésta radica en la simetría.

La manifestación de esta propiedad se remonta al siglo XVIII en el cual la fermentación de la uva arrojaba un sólido, hasta ese momento, conocido como “tártaro” (tartrato ácido de potasio). A principios del siglo XIX se encontró un comportamiento alterado de este compuesto por lo que **Gay-Lussac** lo denominó “ácido racémico”[a].

[a] De la palabra latina *racemus*

Estudios posteriores referentes al comportamiento de la luz polarizada[b] indicaron que una disolución de "tártaro" desviaba el haz de luz hacia la derecha, mientras que el "ácido racémico" no desviaba la luz.

Las observaciones de **Eilhard Mitscherlich** en el estudio de tartratos de sodio y amonio sintetizados en el laboratorio llevaron a Louis Pasteur a resolver este enigma. En 1848, **Louis Pasteur** logró distinguir con ayuda del microscopio dos tipos de cristales en las sales del ácido tartárico sintético y pudo darse cuenta que una disolución de ambos cristales no desviaba la luz polarizada, pero si los disolvía individualmente, la luz polarizada se desviaba en un caso hacia la derecha (denominado D por **dextrógira**) y en el otro hacia la izquierda (denominado L por **levógira**) con la misma magnitud.

Posteriormente, **Van't Hoff y LeBel** descubrieron que la disposición de átomos alrededor de un átomo de carbono producía un geometría tetraédrica lo cual se traduciría en la existencia de compuestos con misma fórmula condensada, pero diferente fórmula desarrollada que fueron denominados **isómeros**.

La isomería en los compuestos se puede presentar tanto en conectividad de átomos (**isómeros estructurales**) como en disposición espacial de los mismos (**estereoisómeros**). Dentro de los estereoisómeros se pueden distinguir dos tipos, dependiendo de la capacidad para interconvertirse por rotación de enlaces, isómeros **conformacionales** y **configuracionales**. Los isómeros configuracionales comprenden compuestos **diasteroméricos** y **enantioméricos**.

La existencia de compuestos con centros de quiralidad obligó a adoptar varios tipos de nomenclatura dependiente de la estructura tridimensional y/o de sus manifestaciones físicas como la rotación óptica. La infinidad de compuestos quirales descubiertos ocasionó que la nomenclatura no resultara aplicable para todos y, hoy en día, está sujeta al área de investigación, posición de los sustituyentes y/o a la presencia de centros de quiralidad.

En este proyecto, sólo se hará mención a la propuesta por **Cahn, Ingold y Prelog** en la cual se asigna una **configuración absoluta** en base a una prioridad de los sustituyentes del centro de quiralidad de acuerdo a su **número atómico**. Si la prioridad creciente ocasiona un círculo hacia la **derecha** (mismo sentido que las manecillas del reloj) se denomina **R** y, por el contrario, si la dirección es hacia la **izquierda** (contrario a las manecillas del reloj) se denomina **S**.

---

[b] La luz emitida por cualquier fuente se dispersa o vibra a través de todos los planos perpendicular a su trayectoria. La luz polarizada está limitada a vibrar en un solo plano lo cual se logra haciendo pasar la luz por un filtro polarizante (arreglo de Nicol) de calcita ($CaCO_3$) o un lente Polaroid.

Hoy en día, la definición de compuesto quiral se ha extendido de tal manera que los centros de quiralidad [1] no son tan fáciles de definir y puede ser que no se refieran a un solo átomo (Figura 1).

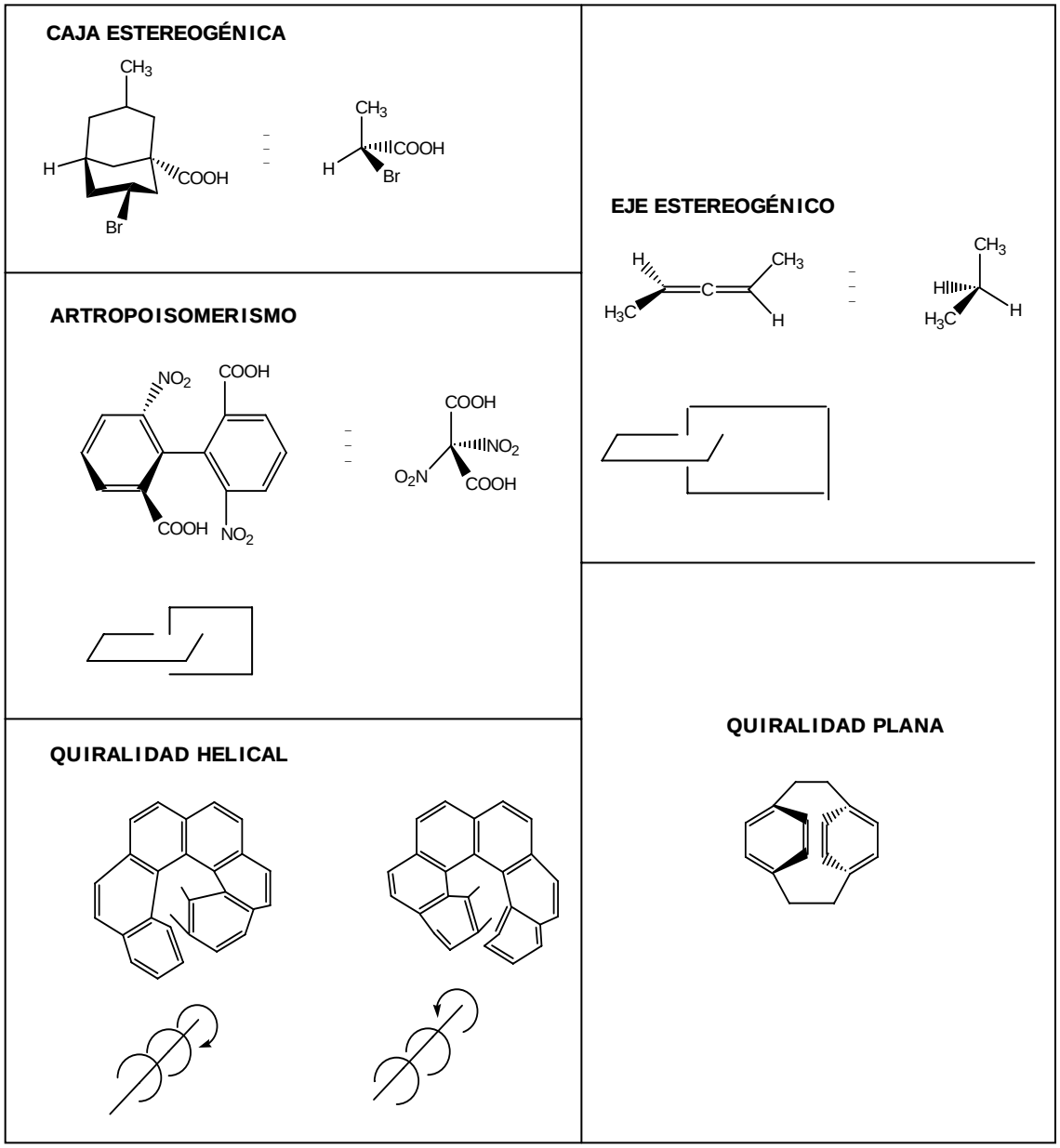


Figura 1. Representación de compuestos quirales

Diversos compuestos y una fracción de fármacos comerciales son mezclas racémicas[c] y, a pesar de que presentan similitud en sus propiedades, los efectos farmacocinéticos y/o farmacodinámicos dentro del cuerpo pueden ser distintos, por ejemplo de **beneficio** (principio activo), **indiferencia** (inactivo), **toxicidad** o, simplemente, diferir en **percepción sensorial**.

Formulaciones racémicas o de un solo enantiómero pueden estar sujetas a la bioconversión en otros compuestos al entrar en las diferentes rutas metabólicas. A partir de 1992, los estatutos políticos de la **FDA**[d] recomiendan realizar pruebas farmacológicas tanto con la mezcla racémica como con los enantiómeros individuales y determinar la composición específica de ambos enantiómeros en el fármaco a comercializar [2].

La necesidad de desarrollar fármacos enantioméricamente puros ha aumentado en los últimos años pues este hecho ha traído consigo la recomercialización de formulaciones, antiguamente racémicas, retiradas del mercado por causar alteraciones fisiológicas, o bien, la potencialización de la acción farmacológica (Figura 2). [3, 4]

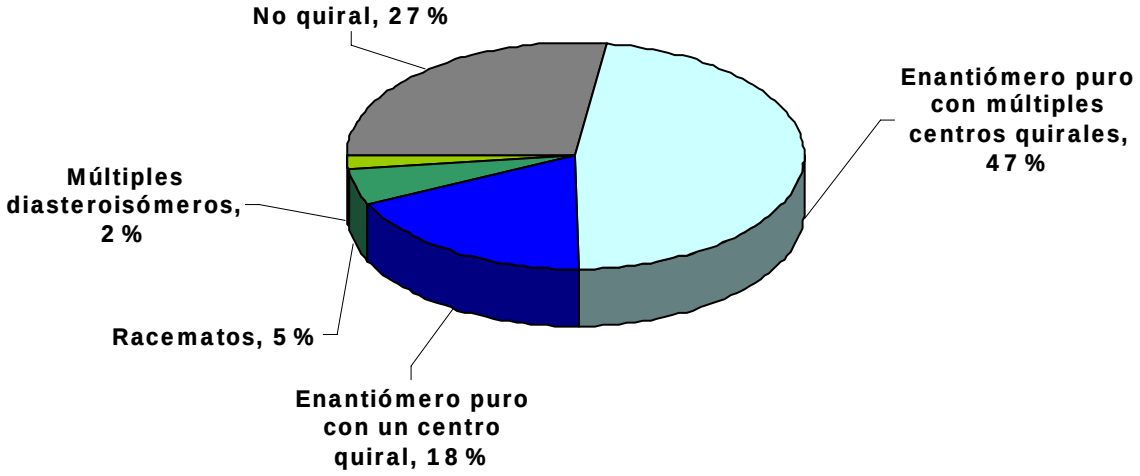


Figura 2. Proporción aproximada de fármacos aprobados (FDA) entre enero 2004 y junio 2006

---

[c] Mezcla equimolar de dos enantiómeros (50R:50S) en cualquier estado de agregación

[d] "U.S. **F**ood and **D**rug **A**dministration"

3.2. SEPARACIÓN DE ESTEREOISÓMEROS

Dado que las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, tales como punto de ebullición, punto de fusión, solubilidad, índice de refracción, momento dipolar, etc., dependen de su estructura tridimensional, los diasteroisómeros tienen propiedades distintas entre sí, sin embargo, los enantiómeros coinciden en sus propiedades, salvo en rotación óptica la cual difiere en sentido (+ y -)[e].

La separación de diasteroisómeros se puede realizar con técnicas de purificación como cristalización, destilación, cromatografía, extracción, etc., pero, al tener propiedades iguales, la separación de enantiómeros se realiza con procesos más específicos.

En **estado sólido**, se pueden definir dos clases de mezclas racémicas: conglomerado y compuesto racémico. El **conglomerado** es una mezcla mecánica de dos enantiómeros puros, donde cada molécula enantiomérica se puede separar en su propio cristal; por el contrario, cuando un compuesto es **racémico** se dice que ambos enantiómeros forman parte de la estructura cristalina de manera ordenada.

La **separación de una mezcla racémica**, en algunos casos, depende principalmente de la presión y temperatura, por lo que la resolución espontánea se ha utilizado como proceso para resolver o separar enantiómeros de naturaleza **conglomérica**. Las técnicas de purificación que se utilizan son cristalización directa y cristalización diasteromérica.

La **cristalización directa** es el método más antiguo y se basa en la cristalización preferente de uno de los enantiómeros mientras que el otro permanece en disolución. Esta metodología se puede llevar a cabo en recipientes individuales para cada enantiómero o en un cristalizador único en los que se induce la cristalización por temperatura o con ayuda de la presencia de un cristal puro del enantiómero deseado.

La **cristalización diasteromérica**, como su nombre lo indica, es el resultado de producir derivados diasteroméricos entre sí por interacción con un compuesto externo óptimamente activo (quiral) denominado agente de resolución. En ésta se aprovecha la diferencia en propiedades fisicoquímicas para llevar a cabo una separación por cristalización. El agente de resolución debe ser un compuesto de bajo costo, recuperable sin que su estructura quiral se vea afectada y fácilmente removible de la estructura a resolver sin que se presenten pérdidas de quiralidad.

---

[e] El símbolo + se asocia con una desviación de luz polarizada hacia la derecha (dextrógiro) y el símbolo – se relaciona con una desviación hacia la izquierda (levógiro). Aún y cuando Pasteur utilizó D y L para diferenciar la rotación, hoy en día, la asignación dextrógiro y levógiro no se relaciona con la nomenclatura D y L.

Aún con estas alternativas, la resolución espontánea a partir de conglomerados está limitada por la presencia de compuestos de esta naturaleza y sólo se conoce un grupo reducido de ellos [5]; además, no todos los compuestos presentan un estado sólido como preferencial, por lo que los métodos utilizados, en estos casos, resultan ser más específicos y se traducen en un alto costo de inversión.

Debido a esto, la exigencia hacia la implementación de metodologías de síntesis más específicas en cuanto a reactivos y productos han originado una **Química estereoselectiva**. La diversidad de metodologías desarrolladas es extensa y enumerar los compuestos que se han utilizado dentro de la síntesis estereoselectiva sería abrumador e implicaría una recopilación extensa.

Algunos ejemplos de los procesos utilizados son la hidrogenación catalítica homogénea (alquenos y cetonas), hidrogenación catalítica heterogénea (alquenos C-C, compuestos carbonílicos y doble enlace C-N), reducciones no catalíticas estereoselectivas, reacciones de formación de enlaces C-C estereoselectivos, oxidaciones asimétricas, formación de enlaces estereoselectivos de C-heteroátomo y reacciones de radicales con estereoselectividad [6]. De esta manera, se pueden identificar metodologías de acuerdo al tipo de síntesis ya sea tradicional o catalítica.

3.3. COMPOSICIÓN ENANTIOMÉRICA

La **composición enantiomérica** de una mezcla se puede expresar de diferentes maneras tales como pureza óptica (P), exceso enantiomérico (e.e.) o pureza enantiomérica (p.e.), y su determinación se puede realizar por técnicas espectroscópicas o técnicas de separación (Figura 9) [26].

$$P\ (\%) = \left(\frac{[\alpha]}{[\alpha_{max}]} \right) \times 100$$

$$e.e. = \left(\frac{R - S}{R - S} \right) \times 100$$

$$p.e. = \left(\frac{R}{R + S} \right) \times 100$$

Figura 9. Expresiones para la composición enantiomérica

Las **técnicas espectroscópicas** aprovechan la interacción materia-energía para obtener una respuesta que se puede relacionar con el entorno de los átomos presentes en un compuesto. Éstas incluyen la polarimetría, la dispersión óptica rotatoria, el dicroísmo circular y la resonancia magnética nuclear.

La **polarimetría** es el método de análisis más antiguo para la determinación de **purezas ópticas**. El fenómeno de rotación óptica está determinado por la dirección de la **refracción de la luz polarizada** al pasar por la muestra en disolución. En un medio racémico, los índices de refracción son idénticos en magnitud, pero de sentido contrario para cada enantiómero, por lo que no se desvía la luz. Sin embargo, si el medio es óptimamente activo, es decir, si existe un enantiómero en mayor proporción, los efectos de adición se reflejarán en un giro hacia la derecha o hacia la izquierda donde la magnitud quedará sujeta a la proporción de ambos enantiómeros. La **rotación específica**, a una determinada longitud de onda (λ) y temperatura (T), depende de la concentración de la muestra y de la longitud del paso óptico; y la determinación de la pureza óptica será la comparación entre $[\alpha]^T_\lambda$ del enantiómero puro y $[\alpha]^T_\lambda$ experimental.

A menudo, la rotación óptica no es un buen descriptor para la determinación de la pureza óptica, por lo tanto, en algunos casos, no describe satisfactoriamente la composición enantiomérica [27].

La dispersión óptica y el dicroísmo circular, también se basan en la interacción de la muestra con luz polarizada. La primera se extiende a determinar la rotación en un rango de longitudes de onda y, la segunda aprovecha tanto la rotación como la absorción de energía.

En lo que respecta a la **resonancia magnética nuclear** (RMN) está técnica no diferencia entre enantiómeros, salvo que sean convertidos en **diasteroisómeros** mediante la interacción con **reactivo quiral**. Esta interacción puede referirse a una interacción coordinada (reactivo derivatizante) o una interacción por solvatación en la muestra (reactivo de solvatación) con lo que se puede determinar la proporción de cada enantiómero en la muestra (Figura 10).

Compuesto	Naturaleza	
(R,R)-2,3-butandiol	**d**	
(R)-2-fluoro-2-feniletilamina	**d**	
Dicamfoil-d-metanato-heptafluorodihidroximetileno-d-camforato (dcm)	$Eu(dcm)_3$	**d**
Pivaloil-d-camforato-trifluorohidroximetileno-d-camforato (hfc)	$Eu\ (hfc)_3$ $Yb(hfc)_3$ $Pr(hfc)_3$	**d**
1-(9-antril)-2,2,2-trifluoroetanol	TFAE	**s**

Figura 10. Agentes quirales derivatizantes (**d**) y solvatantes (**s**)

Los agentes de derivatización provocan desplazamientos diferenciados para los enantiómeros de un compuesto en el espectro de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C.

El grupo de **técnicas de análisis de separación** está constituido por las técnicas habituales como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (GC), pero se ha extendido a cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), cromatografía en capa fina (TLC) y electroforesis capilar (CE)[f].

La posibilidad de formar un derivado diasteromérico siempre será de gran utilidad (Figura 11), sin embargo, la **cromatografía** nos permite determinar la composición enantiomérica de manera **directa** como pureza enantiomérica y/o exceso enantiomérico mediante la adición de un reactivo quiral a la fase móvil o el uso de una fase estacionaria quiral, determinando la pureza enantiomérica y el exceso enantiomérico.

[f] "**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography"; "**G**as **C**hromatography"; "**S**upercritical **F**luid **C**hromatography"; "**T**hin **L**ayer **C**hromatography"; "**C**apillary **E**lectrophoresis"

Auxiliar quiral	Casos
Ácido 2-acetil-D-láctico	Alcoholes para formar ésteres
(R)-(-)-2-butanol	Ácidos carboxílicos
1R,3R,4S-(-)-mentol	Aminoácidos o hidroxiácidos
2R,3R-(-)-butandiol	Cicloalcanonas o hidrocarburos con carbonilo para formar acetales cíclicos

Figura 11. Auxiliares quirales usados en GC y HPLC

La opción más habitual para conseguir la separación es el uso de **fases estacionarias quirales** y se basa en la diferencia de partición por enantiodiscriminación debida a fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones ácido-base, interacciones electrostáticas π-π o formación de complejos metálicos quirales. El **fenómeno de inclusión** también ha sido aprovechado para proponer fases estacionarias con ciclodextrinas o éteres corona quirales.

Mientras que en HPLC la fase móvil es un líquido que interacciona con el compuesto, en **cromatografía de gases**, la muestra se inyecta[g] y se volatiliza siendo acarreada por un gas inerte[h], que no interacciona con el compuesto, a través de la columna, por lo que su separación queda sujeta a la interacción con la fase estacionaria. Existen dos tipos de **fases estacionarias**: gas-sólido y gas-líquido, siendo ésta última la más utilizada. En el caso de gas-líquido, la fase estacionaria consta de moléculas líquidas inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte.

Las **columnas capilares** del tipo quiral tienen como unidad ciclodextrinas o polímeros naturales como proteínas y celulosa. Las ciclodextrinas son oligosacáridos disueltos en la fase estacionaria, no reductores, constituidos por 6 o más unidades de D-glucopiranósidos, identificándose varios tipos como α-, β-, γ–, y δ-.

El **detector** es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar la salida del compuesto de la columna. Aunque existen diversos detectores, el **detector de ionización a la flama** (FID[i]) es el más utilizado pues se caracteriza por una alta sensibilidad (10^{-13} g/s), amplio intervalo lineal de respuesta (10^{7} unidades), respuesta rápida (1 mseg), bajo ruido de fondo y bajo mantenimiento.

---

[g] El volumen de inyección, en columnas capilares puede llegar a ser 10^{-3} μl

[h] Generalmente, se emplean gases inertes como el helio, argón, nitrógeno o dióxido de carbono

[i] "**F**lame **I**onization **D**etector"

La mayoría de los compuesto orgánicos al someterse a altas temperaturas se pirolizan y se producen **iones y electrones** que son conductores eléctricos. La generación de éstos ocasiona una **diferencia de potencial** eléctrico que es medida y amplificada de tal manera que el número de iones equivale al número de átomos de carbono transformados en la flama. Esto produce que sea un **detector sensible a la masa** más que a la concentración. Existen algunos grupos funcionales que no dan respuesta a este detector como halógenos, aminas y gases no inflamables como el CO_2, SO_2, agua y óxidos de nitrógeno.

La **cromatografía de fluidos supercríticos** aprovecha el poder de solvatación del CO_2 supercrítico para aumentar la eficiencia de la separación tanto en resolución como en el tiempo de análisis en comparación con HPLC.

Al igual que en la catálisis, los diversos métodos de análisis para determinar la composición enantiomérica de un compuesto no son aplicables para todos los casos y la selección de éste queda condicionado al tiempo, la naturaleza de las muestras (tipo, cantidad y concentración) y al material de trabajo disponible (Figura 12) [28].

TÉCNICA DE ANÁLISIS	FUNDAMENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Polarimetría	Desviación de luz polarizada	- No destructiva - Se calcula P	- La $[\alpha]^T_\lambda$ del enantiómero puro es imprescindible - La α dependiente de la concentración de compuesto quiral, temperatura, naturaleza o pureza del disolvente - Alto poder rotatorio del compuesto para diferenciar pequeños e.e. - Elevada cantidad de muestra (1 mg/ml) - Afectado por impurezas activas
RMN	Desplazamiento diferenciado	- Se calcula la proporción de cada enantiómero en la muestra (R:S)	- Elevada cantidad de muestra por adquisición sucesivas (>20 mg) - Destructiva por reacción con reactivos de desplazamiento
HPLC - No destructiva	Interacciones diferenciadas con fase móvil o estacionaria	- Alta resolución - Cantidad de muestra (μl) - Alta sensibilidad (ppm y ppb) - Cuantitativa - Exactitud - Manejo accesible - Inyecciones sucesivas para disminuir el tiempo del análisis, previo análisis de estándares - Se calcula el p.e. y e.e.	- Muestra volátil - No compuestos termolábiles - Enantiomerización de compuestos lábiles en la fase estacionaria - Contaminación del pico del compuesto, evitado por utilización de estándares - Respuesta no lineal del detector - Confirmaciones de identificación por estándares
GC - Destructiva	Interacciones diferenciadas con fase estacionaria		

Figura 12. Comparación entre técnicas de análisis quirales

3.4. CATÁLISIS

La catálisis se caracteriza por la utilización de compuestos, denominados **catalizadores**, que tienen la capacidad de modificar la **velocidad de reacción** provocando una aceleración o desaceleración. El mecanismo de acción radica en propiciar las condiciones energéticas adecuadas entre los reactivos disminuyendo (catalizador positivo) o aumentando (catalizador negativo[j]) la **energía de activación** para alcanzar el estado de transición necesario hacia la formación de los productos.

Estos compuestos no permiten que sucedan reacciones energéticamente desfavorables y no se consumen en las reacciones que promueven, es decir, su estructura se regenera y no se ve alterada. En cuanto al medio de reacción, la catálisis se clasifica en homogénea y heterogénea.

La **catálisis homogénea** se lleva a cabo en una sola fase, es decir, el catalizador y el medio de reacción forman una mezcla con propiedades fisicoquímicas idénticas. Por ejemplo, el catalizador puede estar disuelto en un medio de reacción líquido.

La **catálisis heterogénea** se realiza en una mezcla con distintas fases con diferentes propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, el catalizador puede ser un sólido sumergido en un medio de reacción líquido o gaseoso, o bien, un medio de reacción líquido con diferentes fases provocado por las diferencias en propiedades de los disolventes utilizados[k].

El **origen del catalizador** resulta crucial para adoptar una metodología experimental en cuanto a las **condiciones de reacción**. La utilización de catalizadores de origen metálico obliga a adoptar metodologías de sistemas cerrados como atmósfera inerte, disolventes anhidros, grupos protectores, pH extremos, elevada temperatura y altas presiones, por lo que su uso queda restringido a la estabilidad de las materias primas y/o productos e, incluso, al costo o síntesis de los mismos.

Hoy en día, se ha retomado un concepto, introducido por **Wolfgang Langenbeck**, que se refiere a la utilización de compuestos de origen orgánico en síntesis catalítica. El nuevo término fue creado por David MacMillan en el 2000 y trajo consigo un nuevo impulso para una metodología que provee mecanismos para producir compuestos estereoselectivos [7].

---

[j] A menudo se suele referir a un proceso de inhibición, sin embargo, existen inhibidores en los que su estructura se modifica, por lo que no se considerarían catalizadores. De igual manera, en Bioquímica, el término se refiere a la disminución de la actividad enzimática debido a la acción del inhibidor sobre el catalizador.

[k] Este caso recibe el nombre de catálisis por transferencia de fase.

La **organocatálisis** se refiere al uso de catalizadores de origen orgánico constituidos por carbono, hidrógeno, azufre, nitrógeno y otros elementos no metálicos (Figura 3). Este sencillo cambio provocó una revolución dentro de la catálisis estereoselectiva porque este tipo de catalizadores permite el uso de sistemas de reacción abierto lo cual implica condiciones de reacción aerobias, uso de disolventes, temperatura ambiente y los desechos generados están potencialmente sujetos a la biodegración, además, los catalizadores son comercialmente accesibles [8, 9]. Estos cambios se reflejan en la disminución de los costos de producción.

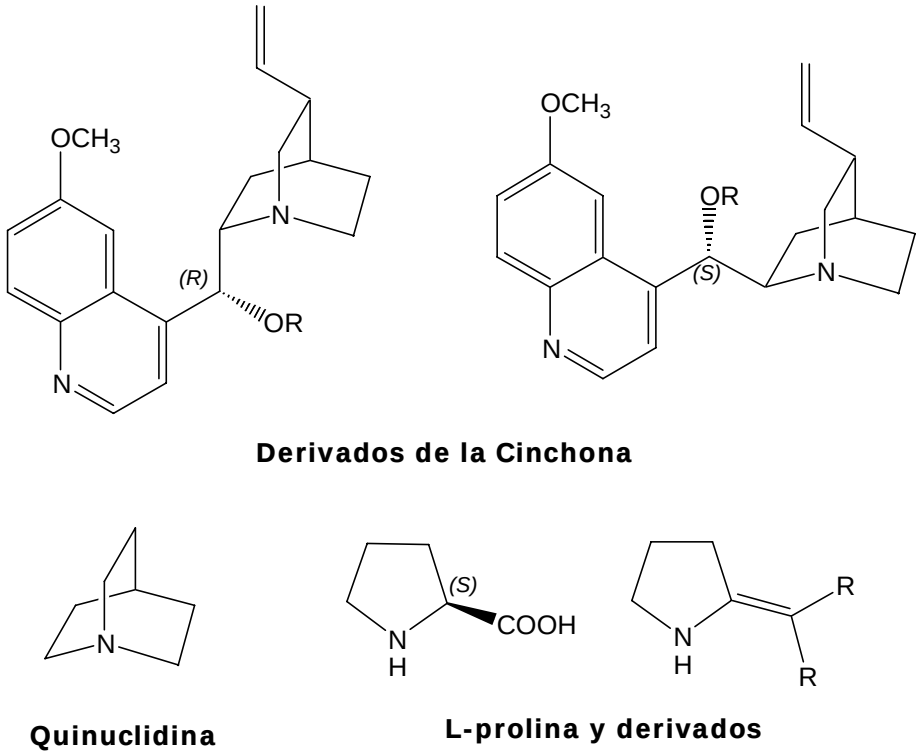


Figura 3. Catalizadores orgánicos

La base de la organocatálisis es la funcionalización de compuestos para la implementación de mecanismos que involucran la formación de enaminas, iones iminio, entre otros bajo condiciones de catálisis homogénea o heterogénea (transferencia de fase).

A menudo, el empleo de compuestos orgánicos como catalizadores puede confundirse con el uso de alguna fuente biológica como enzimas u organismos, pero la distinción radica en el tipo de catálisis que se lleva a cabo en esta última.

3.5. BIOCATÁLISIS

La vida, tal y como la conocemos, no sería posible sin unas moléculas que actúan como catalizadores dentro de los organismos vivos y que reciben el nombre de **enzimas**. Los seres vivos están constituidos por una mínima unidad denominada **célula** que compone los tejidos que nos permiten sobrevivir en el medio ambiente[l]. Las células son fábricas en miniatura, increíblemente complejas, que cuentan con mecanismos que les permiten ganar o perder tanto materia como energía.

La mayoría de las reacciones químicas a temperatura corporal no se llevarían a cabo en un tiempo corto, sin embargo, las enzimas permiten que la velocidad de reacción pueda incrementarse en factores de 10^6 a 10^{12} de orden de magnitud, con respecto a la reacción no catalizada.

La biocatálisis no se puede clasificar dentro de una catálisis homogénea o heterogénea pues es la combinación de ambas ya que, aunque la enzima se encuentra en disolución, la reacción se efectúa en la superficie de la enzima [10].

Las enzimas pueden tener dos orígenes: **proteico** y **ribonucleótido**[m]. La mayoría son de origen proteico, es decir, provienen de proteínas las cuales están constituidas por unidades fundamentales llamadas **aminoácidos**. Estos se encuentran unidos por enlaces peptídicos en los que se genera un grupo amida y se libera agua en la terminación de la proteína[n], generándose así una cadena principal (Figura 4).

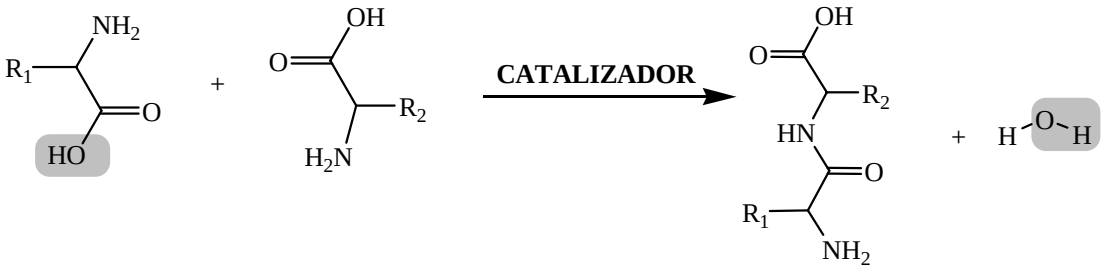


Figura 4. Esquema del enlace peptídico

[l] Cabe señalar que existen organismos unicelulares capaces de reproducirse en los que su unidad fundamental es una célula y no cuentan con tejidos.

[m] En la década de 1980, se descubrió que moléculas de RNA eran capaces de catalizar la ruptura y unión de sustratos oligorribonucleótidos de manera muy específica.

[n] Cuando la cadena continúa elongándose, se liberan moléculas de RNA de transferencia.

Las proteínas están compuestas por una combinación de 20 aminoácidos esenciales en los que el sustituyente R o residuo tiene diferente estructura lo que genera cambios en sus propiedades fisicoquímicas como tamaño, solubilidad en agua, carga eléctrica, etc. La mayoría de las cadenas polipeptídicas naturales contienen de 50 a 2000 aminoácidos y el orden en la secuencia determina la función de la proteína [11a]. De esta manera, existen proteínas estructurales, contráctiles, de defensa, de transporte, hormonales, represoras, receptoras, ribosomales y catalíticas (enzimas).

Recordando el descubriendo de **Louis Pasteur** y el origen biológico del "tártaro", experimentos posteriores en fermentaciones lo llevaron a evidenciar que existía una discriminación hacia cierto tipo de compuestos debido a la modificación de la actividad óptica (dextrógiro o levógiro). Esto se tradujo en la idea de que los organismos contaban con un **metabolismo selectivo**, lo cual fue corroborado con las investigaciones sobre las diversas rutas metabólicas en las que existen procesos que presentan una alta estereoespecificidad en reactivos dando como resultado compuestos estereoselectivos.

En la estructura del aminoácido existe un centro de quiralidad[o] y, de hecho, las enzimas están compuestas de aminoácidos sólo del tipo L[p]. Análogamente, existen macromoléculas cruciales para la vida como el DNA y RNA que tienen carbohidratos en su forma D.

El origen de la quiralidad en las moléculas bioorgánicas, hasta ahora, es incierto. Existen diversas posturas que se basan en la naturaleza del factor que pudo haber desencadenado un **Universo asimétrico** [12].

Por un lado, las teorías relacionadas con factores **bióticos** asumen que la vida se originó en un medio racémico y, que la **evolución**, trajo como consecuencia la selección y homogeneidad quiral de las moléculas necesarias para la materia viviente. Dentro de éstas se incluye la idea de "Panspermia" propuesta por **Arrhenius** (1908), y actualizada por **Crack y Orgel** (1973), según la cual organismos vivos (formados por moléculas quirales) fueron transportados hacia nuestro planeta, siendo los precursores de la vida.

Las teorías **abióticas** postulan que la asimetría es anterior al origen de la vida y que ésta existió, gracias a diversos factores abióticos que originaron un **medio** ambiente **quiral**. El comportamiento de algunos minerales para permitir la cristalización de un solo isómero y el descubrimiento de que es posible sintetizar una mayor proporción de un isómero que del otro bajo la influencia de luz polarizada son las premisas que cimientan estas teorías.

---

[o] Sólo la glicina no cuenta con un centro de quiralidad (H_2NCH_2COOH)

[p] Una rara excepción, es la presencia de aminoácidos del tipo D en la pared celular de algunas bacterias

Esta corriente tomó fuerza cuando en 1969 se descubrió un meteorito de origen extraterrestre en Australia, llamado Murchison, con una antigüedad de cinco mil millones de años en el que se encontraron rastros de aminoácidos en los que la forma L superaba a la D [13].

Posteriormente, se realizaron investigaciones en las que se asemejaron procesos biológicos en un medio racémico. Mediante experimentos sobre la oligomerización de nucleótidos por **Joyce** (l984) y la implementación modelos teóricos moleculares por **Goldanskii** y **Kuzmin** (l988) se concluye que la presencia de aminoácidos L y D en un mismo sistema, impide la formación de polinucleótidos precursores del ADN y RNA [14, 15].

Un grupo multinacional de investigadores descubrieron que una polvorienta región del espacio llena de estrellas en formación, **Orión OMC-1**, irradiaba luz polarizada [16 – 18]. Con esto, se crearon diversas hipótesis referidas a que las nubes de polvo, que sirvieron como materia prima para la formación del Sol, podrían ser las causantes de actuar como filtros polarizantes dando origen a la simetría preferencial de las moléculas. Bajo esta premisa, la **NASA**[q] lanzó una sonda espacial llamada Stardust para reunir evidencias de polvo estelar desprendido del núcleo proveniente del cometa Wild-2 (1999-2006) y analizar su contenido [19].

Sea cual sea el origen, la estereoquímica de los aminoácidos puede ser la causante de la alta especificidad de las enzimas y de la respuesta tan diversa frente a compuestos con naturaleza enantiomérica como los fármacos. Su estructura tridimensional es el resultado de todas las interacciones eléctricas y estéricas de los átomos presentes (cadena principal y residuos) y puede llegar a ser tan compleja que se conozca la secuencia de aminoácidos que la componen, pero no su distribución espacial.

Por ello, la estructura de las proteínas se ha dividido en cuatro niveles: **primaria** (secuencia de aminoácidos), **secundaria** (ordenamiento espacial periódico en cierta secuencia de aminoácidos), **tercearia** (estructura tridimensional debido a interacciones eléctricas y estéricas en una sola cadena polipeptídica) y **cuaternaria** (forma tridimensional que involucra varias cadenas polipeptídicas) [11b].

Aunado a esto, la actividad catalítica de muchas enzimas dentro del organismo está sujeta a diversos **mecanismos de control** como la concentración de sustrato, control alostérico[r], modificaciones covalentes y su propia concentración que están regulados por las condiciones dentro de la célula.

---

[q] "**N**ational **A**eronautics and **S**pace **A**dministration"

[r] Cambios conformacionales en la estructura tridimensional de la enzima que disminuyen la interacción sustrato-enzima.

La utilización de enzimas en síntesis orgánica se ha incrementado tanto en tipo de reacciones [20] como en sustratos utilizados y a pesar de que se han logrado identificar cerca de 3,000 tipos de enzimas, la purificación y otros agentes externos necesarios como cofactores han limitado su uso (Figura 5). Por ello, la utilización, como reactivo, de cultivos celulares de organismos *in vitro* continúa siendo una alternativa, aunque se pierda información acerca del propio mecanismo de reacción [21].

REACCIÓN	ENZIMA
Oxidación Baeyer-Villiger	BV monooxidasa CHMO[s]
Transaminación	Aminotransaminasa
Descarboxilación (β-eliminación)	L-asp descarboxilasa
Reacción de Diels-Alder	Diels-Alderasa
Racemización	Mandelato racemasa
Reacción de Kolbe-Schmitt	Fenol carboxilasa
Adición electrofílica	Fumarasa
Isomerización	Glucosa isomerasa
Reacción de Mannich	Triptofanasa β-tirosinasa
Reacción aldólica	Aldolasa

Figura 5. Ejemplos de reacciones con biocatálisis

En este tipo de **biocatálisis**, la mayoría de las **condiciones de reacción** se centran en un medio acuoso con pH cercano a la neutralidad (pH 7), temperatura ambiente y presión atmosférica [21 – 23][t]. La diferencia con la organocatálisis radica en la utilización de una fuente biológica y la implementación de un medio acuoso de reacción.

A pesar de tales diferencias, la biocatálisis nos ofrece versatilidad, **especificidad** en sustratos, **quimioselectividad** (formación de productos por discriminación entre grupos funcionales en la molécula), **regioselectividad** (formación dirigida hacia un producto de varios posibles) y, en su caso, **enantio-** y **diasteroselectividad** (formación de enantiómeros y diasteroisómeros).

[s] CHMO: ciclohexanona monooxigenasa

[t] Cabe señalar que existen enzimas provenientes de organismos extremófilos que se desarrollan en condiciones extremas de temperatura, pH, concentración de sales, etc.

Al igual que la organocatálisis, los beneficios de la biocatálisis no son exclusivos del aspecto químico, sino que abarcan metodologías que permiten una disminución en productos desecho al cambiar disolvente por un medio acuoso, promover el reciclado de disolventes posterior a la extracción del producto de interés y, tal vez lo más importante, el biocatalizador se desecha de una manera inactiva previa esterilización, contrastando con la disposición de desecho requerida para los catalizadores metálicos comúnmente usados en la catálisis metálica estereoselectiva.

La selección del tipo de catálisis a emplear quedará sujeta al tipo de sustrato y producto que se desee generar. Si bien es cierto que la diferencia de costos entre los procesos sintéticos tradicionales, catálisis y biocatálisis es abismal, el medio ambiente necesita una inversión económica que se traduzca en su conservación fomentando el desarrollo metodologías hacia una **Química sustentable**[u].

3.6. RESOLUCIÓN CINÉTICA Y DESRACEMIZACIÓN

La síntesis estereoselectiva puede llevarse a cabo con **sustratos proquirales** o compuestos **meso-** (desimetrización); sin embargo, el número de compuestos racémicos es mayor por lo que es necesario considerarlos como reactivos iniciales (Figura 6) [24, 25].

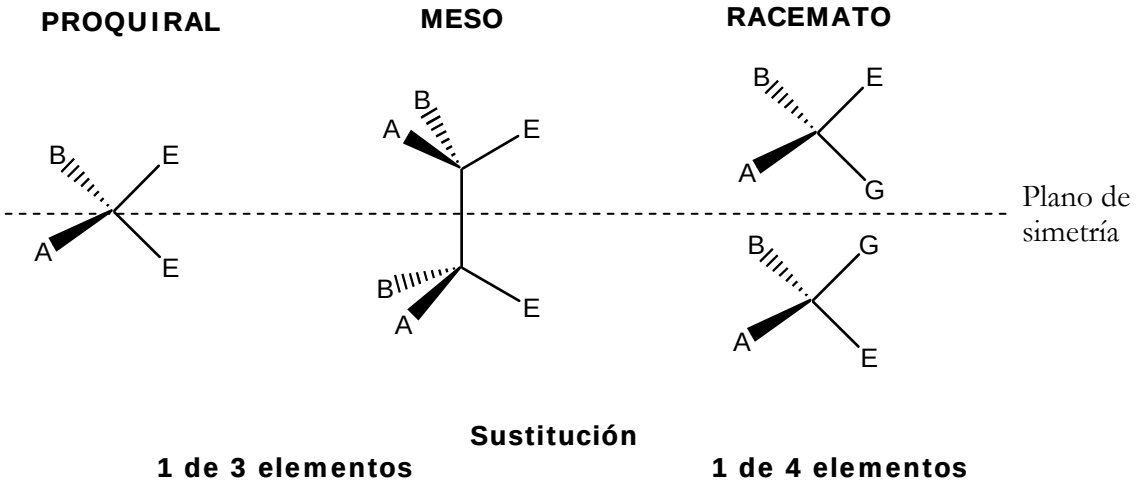


Figura 6. Reactivos en síntesis asimétrica

[u] Proveniente del término "Green Chemistry"

La obtención de un enantiómero a partir de una mezcla racémica se puede llevar a cabo aprovechando sus diferencias en propiedades químicas frente a un agente quiral mediante la **resolución cinética** y la **desracemización**.

La resolución cinética aprovecha las diferencias energéticas significativas en el estado de transición de cada enantiómero dentro de una reacción, por lo que el resultado está íntimamente ligado a la velocidad de reacción de los enantiómeros frente al agente quiral (Figura 7). La naturaleza del agente quiral puede ser sintética o biológica.

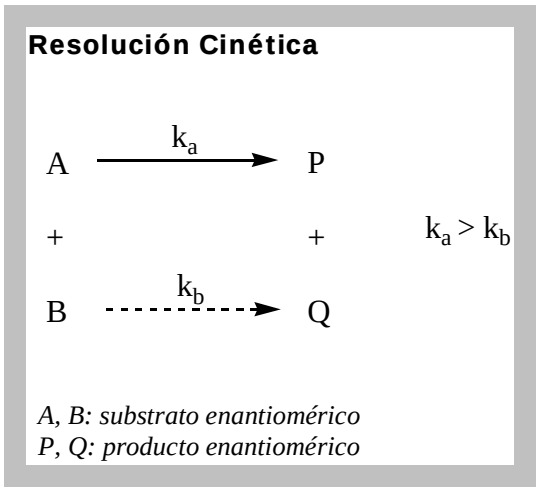


Figura 7. Resolución cinética

La diferencia en el proceso de resolución cinética y desracemización se basa en la eficiencia hacia la obtención de un estereoisómero. Mientras que la resolución cinética sólo arroja, teóricamente, un **50%** pues sólo un estereoisómero es convertido en producto, la desracemización permite tener el **100%** al combinarse mecanismos que permiten convertir un estereoisómero en otro. Hasta ahora, se han identificado tres posibles mecanismos para desracemizar un compuesto (Figura 8).

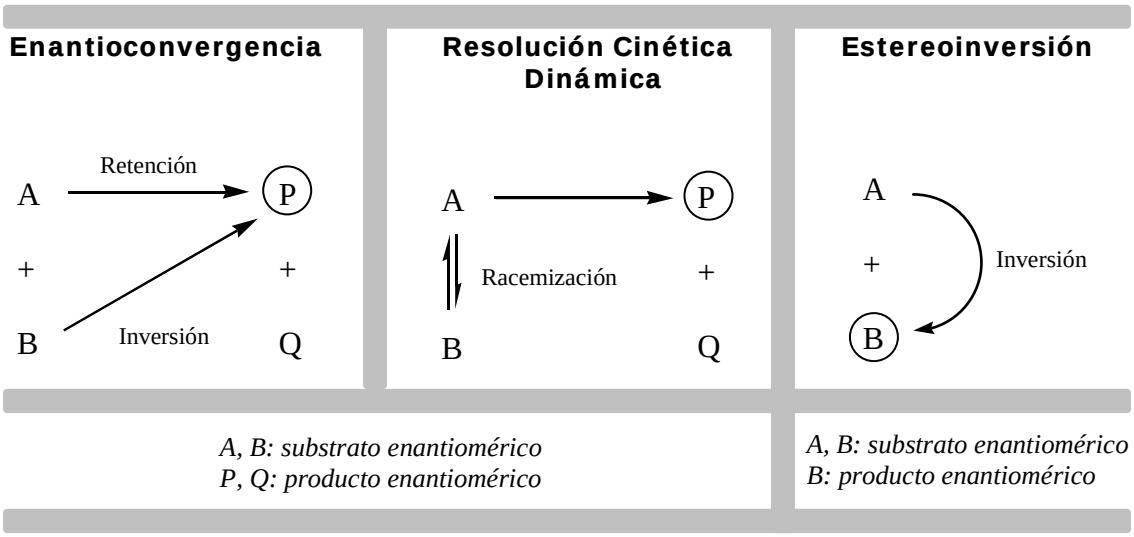


Figura 8. Mecanismos de desracemización[v]

El objetivo primordial de la síntesis estereoselectiva (tradicional, catalítica o biocatalítica) es la obtención de uno de los enantiómeros en mayor proporción y así poder evaluar la eficiencia de la metodología.

3.6.1. DESRACEMIZACIÓN CON CULTIVOS CELULARES

Diversos **sustratos** como alcoholes secundarios aromáticos [29 – 32], alifáticos [24] y derivados heterocíclicos [33], ácidos carboxílicos α-substituidos [34], ácidos α-hidroxicarboxílicos [35], α- y β-hidroxiésteres [36 – 38] y derivados de dienos [39], derivados de 1,2-dioles [40], α-hidroxicetonas [41], aminas [24] y aminoácidos [24, 42] han sido objeto de estudio en cuanto a desracemizar un compuesto quiral mediante una fuente biológica pues esta transformación no es común en la naturaleza, y de hecho, cerca del 80% se refieren a resoluciones cinéticas (Figura 13 y 14).

[v] Desde el punto de vista químico, la desracemización y la resolución cinética ofrecen una desracemización de la mezcla de reacción

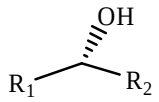
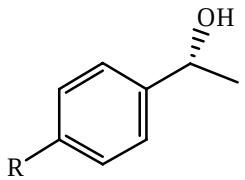
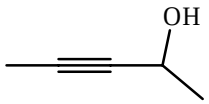
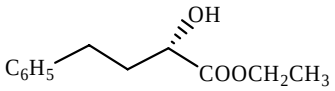
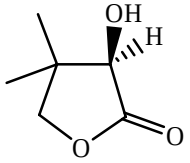
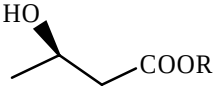
PRODUCTO	ORGANISMO	e.e. MAX (%)	RENDIMIENTO (%)	TIEMPO	REF.
	*Shingomonas paucimobilis*	99 (R)	90	4 – 6 días	33
	*Geotrichum candida*	>99 (R)	55 - 99	24 horas	29, 32
	*Nocardia pseudosporangifero*	98 (S)	70	1 – 5 días	43
	Nocardia fusca	100 (R)	83	1 – 5 días	44
	*Candida parapsilosis*	>99 (S)	85 - 90	1 hora	38
	*Rhodococcus erythropolis*	94 (D)	70	4 días	45
	*Geotrichum candida*	96 (R)	75	70 horas	46

Figura 13. Algunos ejemplos de desracemizaciones con biocatálisis

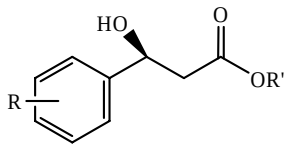
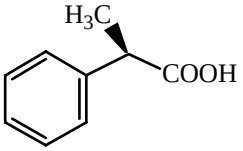
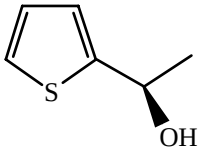
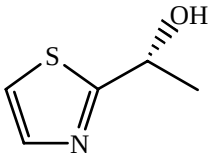
PRODUCTO	ORGANISMO	e.e. MAX (%)	RENDIMIENTO (%)	TIEMPO	REF.
	*Candida parapsilosis*	99 (S)	62 - 75	6 horas	47
	*Nocardia diaphanozonaria JCM 3208*	69(R)	80	48 horas	34
	Varias especies de bacterias	99 (R)	78	4 días	33
		97 (R)	85	5 días	

Figura 14. Algunos ejemplos de desracemizaciones con biocatálisis

Cultivos celulares de **organismos** como hongos, levaduras, bacterias y plantas han sido utilizados en este proceso, aunque de este último sólo existen desracemizaciones de alcoholes secundarios derivados de 4-piridil-1-etanoles con *Catharanthus roseus* [48], dibenzilbutanolidos con *Camellia sinensis*, *Nicotiana tabacum, Catharanthus roseus* y *Dacus carota* [49] y alcoholes bencílicos orto-sustituidos con *Zingiber officinale* [50] (Figura 15).

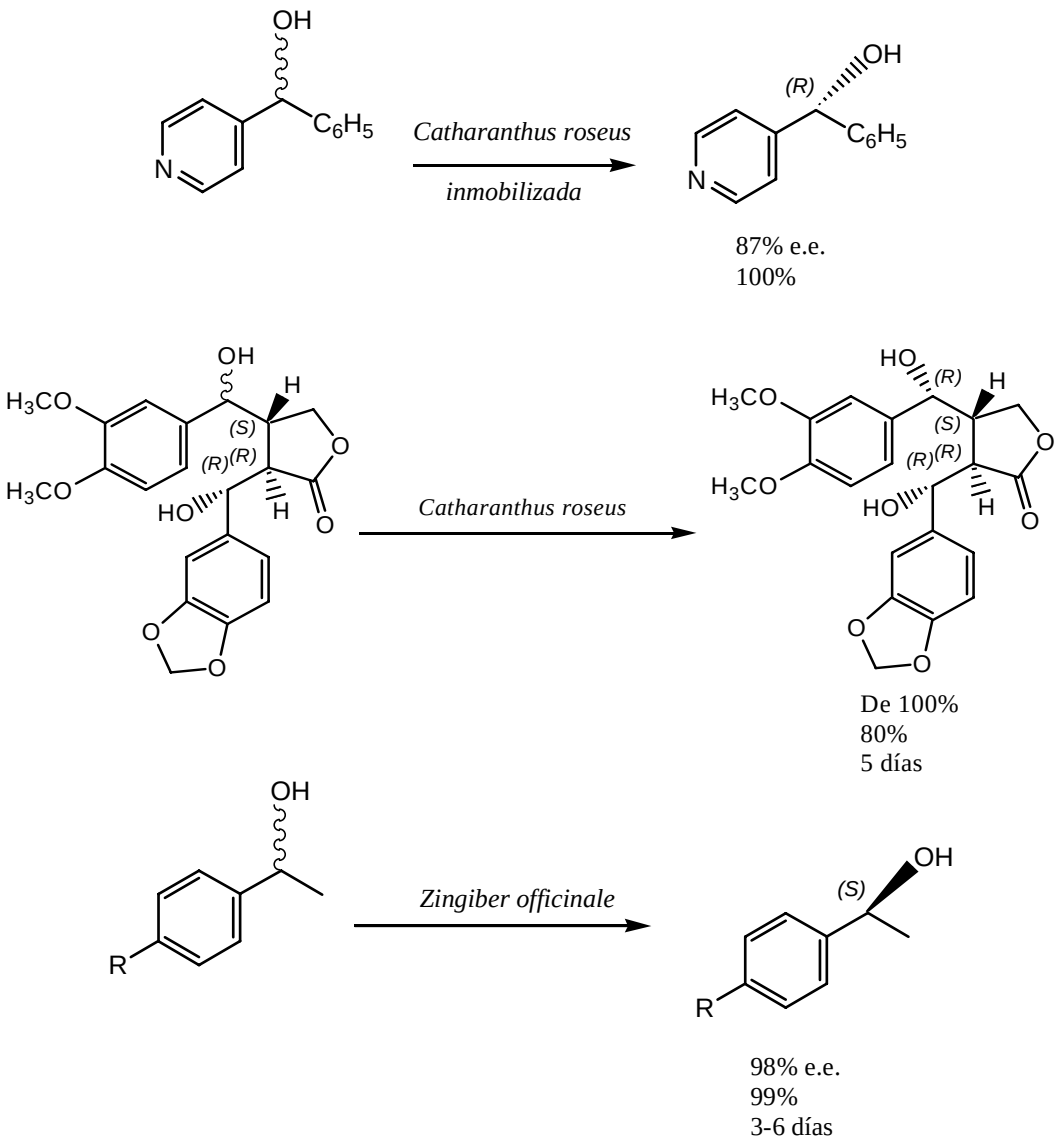


Figura 15. Biodesracemizaciones con células vegetales

Con base en esto, este proyecto propone la desracemización del 3-hidroxibutanoato de etilo con células vegetales en suspensión de *Taxus globosa* y *Taxus brevifolia*. Ambas especies pertenecen a la familia **Taxaceae** y son coníferas que crecen como árbol o arbusto. Sus orígenes son distintos, mientras que ***Taxus globosa*** es reconocida como una especie mexicana localizada en Hidalgo, Querétaro, Puebla, Tlaxcala, Veracruz y Oaxaca, ***Taxus brevifolia*** se ubica en la zona de la costa del Pacífico de Estados Unidos, Canadá y Alaska.

Esta familia de coníferas, y en mayor proporción *Taxus brevifolia*, ha sufrido los estragos de la llamada **"fuente ilimitada de productos naturales"** ya que producen un compuesto, que se aloja en la corteza, con propiedades anticancerígenas muy efectivas: **paclitaxel**, comercialmente conocido como Taxol™ (Figura 16).

En 1985 se reportan cosechas de corteza de 7,000 Kg aislando 1.3 Kg de compuesto; sin embargo, en 1989 se reportaron cifras de hasta 27,000 Kg a partir de la cual quedó bajo supervisión del Servicio Forestal Canadiense. Entre los años 1991 y 1992 se realizó otra recolecta de cerca de 723,000 Kg bajo supervisión, pero se sentaron las bases para la búsqueda de alternativas que implicaban el financiamiento de investigaciones por parte de compañías farmacéuticas enfocadas hacia el descubrimiento de otra fuente o de factores que incrementarán su cantidad [51]. Aproximadamente, se necesitan 3 árboles de 100 años de antigüedad para extraer la dosis requerida para un paciente que equivale a 27 Kg de corteza seca [52].

Bajo este panorama, el propio medicamento **no** está **patentado**, sin embargo, la compañía farmacéutica **Bristol-Myers Squibb** consiguió cierto control adquiriendo una exclusividad para talar los árboles dentro de Estados Unidos otorgada por el Congreso. El vencimiento de una de las tantas patentes alrededor del compuesto (1993-2000) ocasionó una demanda por impedir la competencia referente a la entrada de drogas genéricas con bajo costo lo cual ocasionó que la compañía "donara" cantidades gratuitas a diversos sectores de salud por no acreditar con elementos suficientes su postura en el caso [53].

El estatus ecológico hacia la extinción de *Taxus globosa* y *Taxus brevifolia* se cataloga como de bajo riesgo (LR) y, aunque hoy en día se cuenta con núcleos de plantación en Estados Unidos para *Taxus brevifolia*, están cerca de calificar para especies vulnerables lo cual obligaría a adoptar medidas de conservación [54].

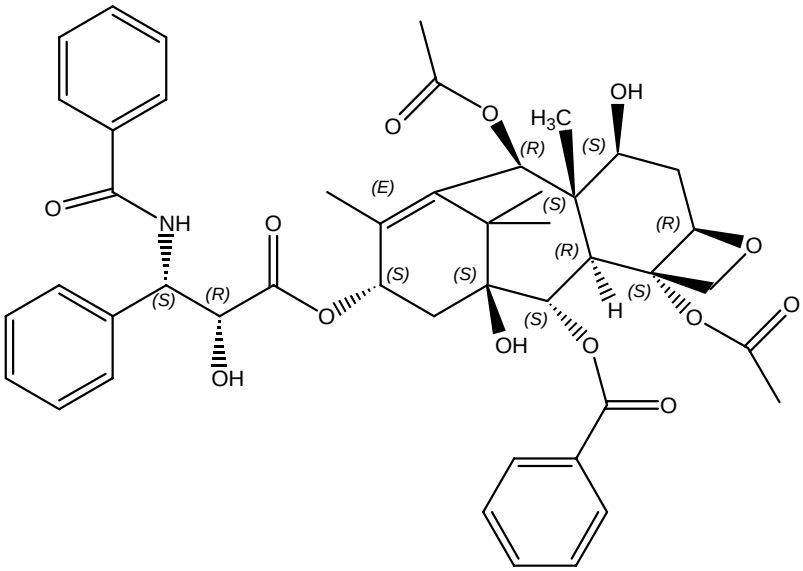


Figura 16. Estructura de paclitaxel

Así pues, las investigaciones alrededor de esta familia, en su mayoría, se centran en la producción de paclitaxel a través de cultivos celulares [55 – 57], sin embargo, la complejidad de esta estructura obliga a proponer que las células cuentan con información especializada y diversa que se puede utilizar para transformar un sustrato de origen exógeno como lo es el 3-hidroxibutanoato de etilo y, más aún, discernir entre ambos enantiómeros.

Este **β-hidroxiéster** es el producto de biorreducción utilizando como sustrato el acetoacetato de etilo con diversos cultivos celulares [58, 59]. Además, ambos enantiómeros son materias primas para la producción de numerosos compuestos comerciales con actividad biológica como por ejemplo, el enantiómero R se utiliza como intermediario en la producción de un compuesto contra el glaucoma [60] y el enantiómero S es utilizado para la síntesis de feromonas [61] y antibióticos carbapenémicos[w] [63]; en tanto que en su forma de β-hidroxiácido se utiliza para la producción de vitaminas [64], feromonas [65], perfumes [66] y otros antibióticos [67].

[w] Compuestos de estructura β-lactámica con amplio rango de actividad antibacterial [62].

4. OBJETIVOS

1. Iniciar y mantener las líneas de cultivo en suspensión de *Taxus globosa* y *Taxus brevifolia*

2. Utilizar células vegetales de *Taxus globosa* y *Taxus brevifolia* para llevar a cabo la desracemización del 3-hidroxibutanoato de etilo

3. Sintetizar y purificar el 3-hidroxibutanoato de etilo utilizado como materia prima

4. Determinar si se lleva a cabo la desracemización con cultivos vegetales de *Taxus globosa* y *Taxus brevifolia*

5. Encontrar las condiciones más favorables modificando el tipo de disolución amortiguadora, pH, presencia de sacarosa, cantidad de sustrato y temperatura

6. Elucidar algún probable mecanismo para la desracemización adicionando los enantiómeros puros en la biotransformación

5. TÉCNICA EXPERIMENTAL

El proyecto consistió en realizar una reacción química utilizando células vegetales como reactivo en medio acuoso. Esto implica que durante el desarrollo del proyecto se mantuvieron **condiciones estériles** en material, medios de cultivo y medios de biorreacción. Las especificaciones del material utilizado se anexan en el apéndice 10.2.

5.1. PRELIMINARES

Dado que estos cultivos no son tomados en cuenta bajo un criterio químico y utilizados como reactivos, en este proyecto se centran las bases para la utilización de los mismos para desracemizar un β-hidroxiéster (con centro de quiralidad base de alcohol secundario). Al tratar a un cultivo celular como "reactivo" es necesario especificar variables que se presentan cuando se planea realizar una reacción o biotransformación, tales como disponibilidad de masa, temporalidad dentro del ciclo celular y condiciones de biorreacción como concentración de masa celular y sustrato, medio de biorreacción y tiempo de biorreacción.

Es bien conocido que *Taxus* sp. es un cultivo que presenta dificultades en la iniciación a partir de un explante (de *in vivo* a *in vitro*), en el mantenimiento tanto en callo como en suspensión y que la propagación de masa celular es lenta [68]. Debido a esto, las biotransformaciones estarían sujetas a la cantidad de masa disponible para continuar con el mantenimiento de la línea del cultivo en suspensión. Sin embargo, se han innovado medios de cultivo [69] con los cuales, en esta investigación, **la masa celular no fue limitante** y sólo se concreta a que no se presente contaminación al realizar las biotransformaciones.

Una vez teniendo el cultivo en suspensión, se debe fijar el **tiempo dentro del ciclo celular del cultivo** en el cual se realizará la biotransformación. Existen diversas posturas acerca de esto y, en general, este tiempo está sujeto a la naturaleza metabólica del compuesto a biotransformar (endógeno o exógeno), la relación con el crecimiento y el propio ciclo [70].

En ambas especies, el ciclo celular es de 15 días [68] y dado que no existen antecedentes de desracemizaciones de sustratos exógenos con estas especies se optó por investigar la reacción de desracemización en sí. Según antecedentes para diversas desracemizaciones de compuestos con cultivos celulares, la naturaleza de esta reacción tiene una relación directa de proporcionalidad entre el exceso enantiomérico y el tiempo de biorreacción [31, 33, 34, 41]. Los tiempos de biorreacción varían y abarcan un rango de horas hasta 21 días y dependen de la naturaleza del organismo utilizado. Así que, enfocándonos a desracemizaciones con células vegetales, tenemos que el rango es de 3 a 6 días, por lo que se fijó un tiempo de **7 días**, teniendo la posibilidad de realizar la biotransformación el mismo día del cambio de medio.

Respecto a las **condiciones de biorreacción**, la variabilidad para realizar una biotransformación en suspensión es muy extensa y, tal vez, la mayor ambigüedad radica en el medio de biorreacción pues se utiliza medio de cultivo [33, 34, 41, 48, 49, 71], disolución amortiguadora [30, 31, 35, 40, 72, 73] y agua destilada [29, 38, 39] y, en ciertas ocasiones, no se considera el pH como variable experimental.

Por ello y, basándonos en estudios anteriores de biotransformaciones con estas especies vegetales [69], se optó por utilizar una **disolución amortiguadora con 10% de sacarosa,** una **concentración celular de 0.35 g/ml** y una **concentración de sustrato de 0.2%** favorable para su conversión respecto al volumen de medio de reacción, fijando un pH inicial cercano a la **neutralidad**, condiciones en las cuales se obtienen los mayores rendimientos.

El uso de sistemas vivos como catalizadores de biotransformaciones ha permitido que el estudio de las proteínas se extienda pues algunas de ellas actúan como catalizadores, por lo que, las proteínas presentes pueden condicionar los resultados. Estudios anteriores acerca del crecimiento y la cantidad de proteínas durante el mantenimiento de cultivos en suspensión de *T. globosa* y *T. brevifolia* en suspensión, arrojan que la concentración máxima de proteínas se alcanza entre la **semana 4 y 5**, a partir de inocular a suspensión [74]. Por ello, se optó por realizar el **primer ensayo de la biotransformación** a este tiempo, manteniendo masa celular para continuar con la línea de suspensiones.

5.2. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS VEGETALES

Los cultivos vegetales se iniciaron sembrando un **explante** (segmento de tejido) de la especie deseada en medio sólido[a]. A las células vegetales obtenidas en medio sólido se les denomina **callo**.

Posteriormente, en un matraz Erlenmeyer, el callo se inocula en medio líquido, de tal manera que el volumen de medio de cultivo no exceda la quinta parte del volumen de la capacidad del matraz (capacidad-volumen). Esta **suspensión** se mantiene en condiciones de obscuridad, temperatura controlada (20°C) y agitación orbital de 100 rpm. El mantenimiento de dicha suspensión consiste en la restauración del medio de cultivo por medio de cultivo fresco (previo almacenamiento de tres a cinco días) cada 15 días, respetando la capacidad del matraz.

El medio de cultivo se esteriliza a una presión de 1.1 Kg/cm^2 por 20 minutos. Una vez estéril, el pH se regula con disoluciones de NaOH y HCl (0.1 y 0.01 M) en condiciones de esterilidad.

---

[a] En este caso, el explante provino del tallo (aprox. 1 cm.)

Taxus globosa

Las células de callo fueron proporcionadas por la M. en C. Ma. del Consuelo Sandoval García[b] y el medio de cultivo en suspensión fue **SH+PVP** con pH 5.6, teniendo una concentración celular de 0.1 g/ml.

Taxus brevifolia

Las células de callo fueron proporcionadas por la M. en C. Ma. del Consuelo Sandoval García[v] y el medio de cultivo fue **B5NB+PVP** a pH 5.5 con una concentración celular de 0.1 g/ml.

La esterilización del material, medio de cultivo y cultivos contaminados se realiza por 3 horas a 1.8 Kg/cm^2. El material de vidrio se sumerge en una disolución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 7% durante dos semanas y se lava con agua y jabón.

5.3. SÍNTESIS DEL 3-HIDROXIBUTANOATO DE ETILO

La síntesis de la materia prima se realizó mediante una **reducción** de acetoacetato de etilo (líquido incoloro) con borohidruro de sodio ($NaBH_4$) en etanol bajo condiciones anhidras durante 4 horas. Posteriormente, se evaporó el etanol y se adicionó una disolución de salmuera.

La purificación del producto se realizó mediante **extracciones múltiples** con acetato de etilo (previamente destilado), secando con sulfato de sodio (Na_2SO_4) y concentrando en rotavapor. El residuo se destiló a presión reducida de 20 mmHg y 74°C.

La caracterización del producto se realizó por **Resonancia Magnética Nuclear de Protón** (RMN-^{1}H) y los espectros correspondientes se anexan en el apéndice 10.3. La pureza se verificó por **Cromatografía de gases** utilizando las condiciones, posteriormente, señaladas para análisis no quiral.

[b] Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Laboratorio de Bioquímica I

5.4. BIOTRANSFORMACIONES

La biotransformación estudiada en este proyecto fue la desracemización del 3-hidroxibutanoato de etilo[c] mediante células vegetales. La **biotransformación** se lleva cabo en matraces Erlenmeyer, respetando la condición de capacidad-volumen antes mencionada, adicionando una mezcla racémica del sustrato.

La **concentración celular** utilizada fue 0.35 g/ml (peso húmedo) con una concentración inicial de sustrato de 0.02% en volumen [69]. Las **variables independientes** que se modificaron fueron pH, el tipo de disolución amortiguadora, la presencia de sacarosa, temperatura y cantidad de sustrato (Tabla 1).

VARIABLE	CONDICIONES
Tipo de amortiguador	Citratos (0.05M)-fosfatos (0.1M) Fosfatos (0.2M) Carbonatos (0.2M)
pH	4, 5, 6, 7, 8, 9
Presencia de sacarosa	10% m/V
Temperatura	10, 20, 30, 40 y 50°C
Cantidad de sustrato ($V_{sustrato}$ /$V_{medio\ de\ reacción}$)	0.025, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3%

TABLA 1

Finalmente, se adicionaron los **isómeros puros** en la biotransformación, colocando 0.35 g/ml de células con 0.1 y 0.2% de cantidad de sustrato a 20°C.

5.5. ANÁLISIS DEL PRODUCTO

El producto de biotransformación se caracterizó por Resonancia Magnética Nuclear de Protón. Una vez caracterizado, se realizó un análisis quiral y no quiral del producto mediante Cromatografía de Gases.

[c] Punto de ebullición 170°C y densidad de 1.017 g/ml a 25°C

5.5.1. Análisis quiral – De las biotransformaciones, se tomó 1 ml de muestra cada 24 horas durante un tiempo variado (mínimo 7 días). El tratamiento de las muestras consistió en centrifugar la fase acuosa y realizar extracciones múltiples 1:1 con éter etílico e inyectando 2 μl de fase orgánica. Se utilizó una columna quiral (apéndice 10.2) para determinar el exceso enantiomérico, utilizando helio como gas acarreador con un flujo constante de 20 ml/min con temperatura de inyector y detector FID de 200°C, y una temperatura de horno de 90°C. El tiempo de retención de los enantiómeros es: (S)-3-hidroxibutanoato de etilo 32.2±0.1 min. y (R)-3-hidroxibutanoato de etilo 33.3±0.1 min.

5.5.2. Análisis no quiral – Al día 7, se tomó 1 ml de muestra de las biotransformaciones. Tras la centrifugación, el tratamiento de las muestras fue realizar una mezcla 1:1 con una disolución de hexanol como estándar interno, inyectándose de la mezcla resultante 1 μl. Se utilizó una columna no quiral (apéndice 10.2) para determinar el rendimiento de la biotransformación. En el análisis, se utilizó helio como gas acarreador con un flujo constante de 20 ml/min con una temperatura de horno de 130°C y temperatura del inyector y detector FID de 230°C. El tiempo de retención del hexanol es 3.2±0.1 min. y del 3-hidroxibutanoato de etilo 5.3±0.1 minutos.

Mediante el análisis quiral se determinará la relación entre los enantiómeros del 3-hidroxibutanoato de etilo calculando el **exceso enantiomérico** (e.e.), mientras que con el análisis no quiral se calculará **rendimiento** de la reacción.

6. RESULTADOS

El inicio de los cultivos en suspensión de células vegetales de *Taxus globosa* y *Taxus brevifolia* resultó en **cúmulos de células** en medio traslúcido que se tornó de amarillo a una coloración café rojizo cercano a los 15 días.

Durante la síntesis del 3-hidroxibutanoato de etilo, la mezcla de reacción fue una suspensión blanca que adquirió una coloración ligeramente amarilla, obteniendo un residuo de reacción amarillento traslúcido que se destiló para obtener el **producto** como **líquido incoloro**.

Siendo una reacción conocida, no se determinó el rendimiento debido a que el paso limitante de la técnica fue obtener el producto con un alto grado de pureza para utilizarlo como reactivo, por lo que la atención se centró en la destilación a presión reducida. La **pureza** obtenida durante el proyecto fue de 93 a 97.8%.

Una vez teniendo la materia prima, se planificó el seguimiento de la biotransformación con ambas especies vegetales. Se determinó si ambos cultivos tenían la capacidad de **desracemizar** el 3-hidroxibutanoato de etilo y, posteriormente, se modificaron las variables planteadas conforme al mayor exceso enantiomérico posible. Las variables que se plantearon fueron pH, tipo de amortiguador, presencia de sacarosa, temperatura y cantidad de sustrato, además de elucidar el posible mecanismo en el proceso adicionando los enantiómeros puros.

Para el análisis no quiral del producto se obtuvo una **curva de calibración** que representa una **relación directa** de proporcionalidad entre el factor de concentración (C 3hidro/C hex) y el factor de área (Área 3hidro/Área hex) con un coeficiente de linealidad de R^2= 0.9936 y una ecuación de (Área 3hidro/Área hex)=0.5213 (C 3hidro/C hex)+0.0084.[a]

6.1. *Taxus globosa*

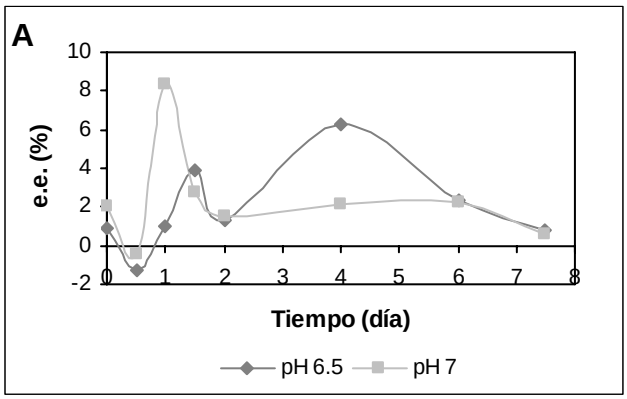
Inicialmente, el medio de biorreacción fue una disolución amortiguadora de fosfatos con 10% de sacarosa y los resultados muestran que existe una variación en el exceso enantiomérico con un valor máximo de **8%** al día 1 (Figura 17A), lo que equivale a decir que existe una **mezcla 54S:46R**. Este valor **no** es **significativo** para un proceso de desracemización el cual tiene como objetivo obtener un enantiómero con la pureza más alta posible, por ejemplo 80:20, 90:10 o 99:1. Además los valores obtenidos a través del tiempo fueron muy variables (8 a 1%) y muestran que el exceso enantiomérico (e.e.) que llega a presentarse en el día 1 y 1.5 **no** se mantiene **estable**, sino que disminuye y aumenta mientras las células continúan en contacto con el 3-hidroxibutanoato de etilo.

---

[a] Los cromatogramas correspondientes y los cálculos se anexan en el apéndice 10.4..

En cuanto a los valores de e.e., el pH 7 muestra una **mayor selectividad**, por lo que se propuso probar con **pH más básico** (8 y 9) y los resultados indican que se mantiene el incremento del e.e. al día 1 y continúa la disminución al día 2 a pH 7 y 9, sin embargo, a **pH 8** se presenta un **aumento progresivo** del e.e. hasta un 16% al día 7 (Figura 17B).

Respecto a los valores máximos de e.e. obtenidos en ambas pruebas, si bien a pH 8 obtenemos el e.e. máximo al día 7, podemos observar que los **resultados** son **ambiguos** pues observando el caso del pH 7 al día 1 teníamos valores aproximados al 8% de e.e. (Figura 17A), en cambio, en el segundo ensayo se tienen valores de 1.5% (Figura 17B). Esto causó cierta incertidumbre en cuanto a la **reproducibilidad** de los experimentos, sin embargo esto se disipará más adelante.



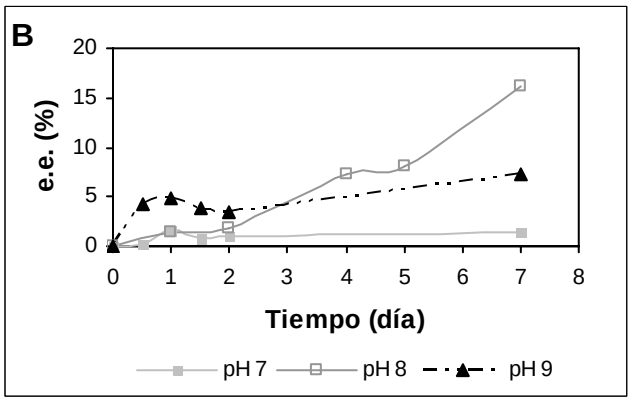


Figura 17. Influencia del pH en la biotransformación con 10% de sacarosa

Hasta ahora, el **pH 8** resulta ser el **óptimo** para la reacción de desracemización y se decidió investigar si la presencia de sacarosa afecta la cuantitatividad del exceso enantiomérico.

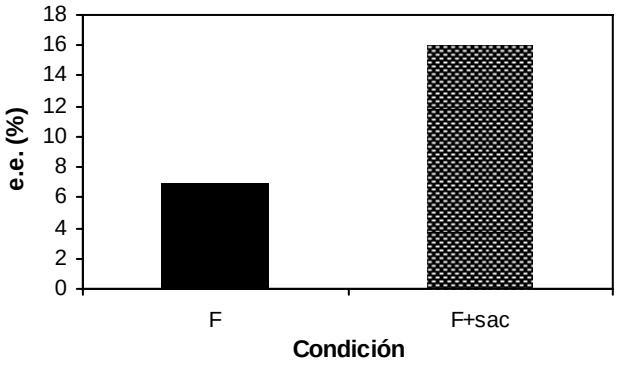


Figura 18. Influencia de la presencia de sacarosa. F: disolución amortiguadora, F+sac: disolución amortiguadora con 10% de sacarosa

La **presencia de sacarosa** aumenta un 50% el e.e. obtenido en la biotransformación por tanto, los siguientes ensayos para optimizar la biotransformación se realizaron adicionando **10%** de sacarosa (Figura 18).

Si bien a pH 8 se obtiene un e.e. de 16%, se decidió colocar la biotransformación usando disoluciones amortiguadoras con **pH ácidos** para continuar la optimización del medio de reacción e incrementar el exceso enantiomérico.

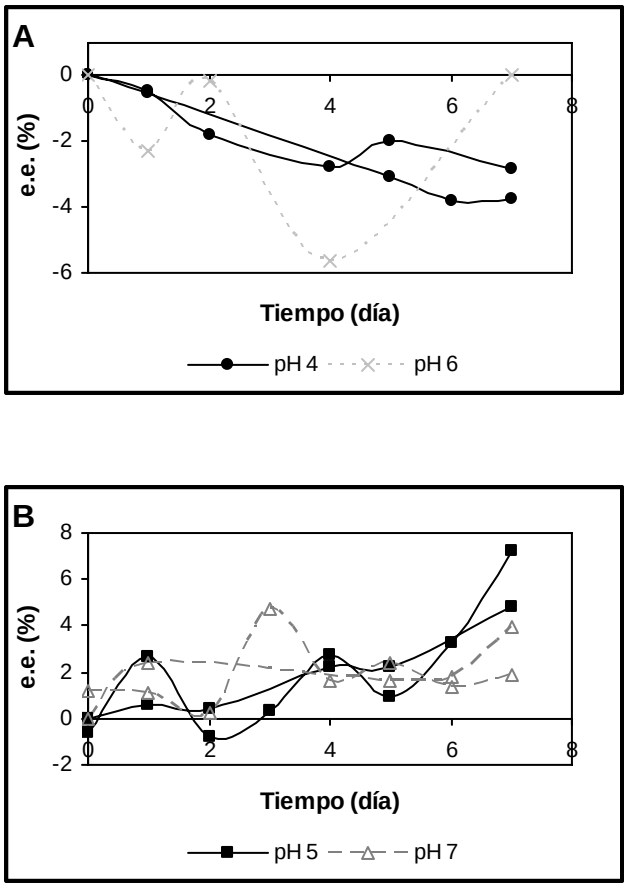


Figura 19. Influencia de pH ácido en el producto de la biotransformación
A) enantiómero R y B) enantiómero S

El resultado más evidente que se observa en la Figura 19A es la obtención del **enantiómero R** a pH de 6 y 4, teniendo en este último, mayor estabilidad pues el aumento de e.e. es progresivo; a pH de 5 y 7 se obtiene el **enantiómero S**, conservándose la inestabilidad del producto (Figura 19B).

Aún y cuando modificando el pH se pueden obtener ambos enantiómeros, los valores de e.e. no representan un proceso rentable hacia una desracemización (0 - 16%), además, el aumento y la disminución que se presentan en el curso de biorreacción hacen suponer que el enantiómero S no es estable y se **racemiza** por acción de las mismas células, perdiéndose el poco e.e. que se presenta en ciertos días, lo cual dificulta la determinación del tiempo óptimo de biorreacción.

El análisis no quiral para obtener el rendimiento de la biotransformación sí se llevó a cabo, sin embargo, se considera irrelevante anexar los resultados pues no se presenta un proceso viable de desracemización del 3-hidroxibutanoato de etilo.

6.2. *Taxus brevifolia*

Al igual que con *Taxus globosa*, la biotransformación del 3-hidroxibutanoato de etilo se realizó en una disolución amortiguadora de fosfatos y 10% sacarosa probando los pH de 6.5 y 7.

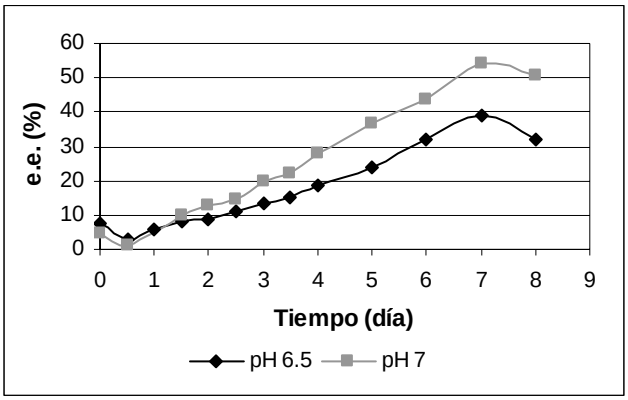


Figura 20. Biotransformación del 3-hidroxibutanoato de etilo

Los resultados muestran una cinética de reacción muy diferente a la que se obtiene con *Taxus globosa*. En la Figura 20 podemos observar que se mantiene un **aumento progresivo** en el e.e. y se **conserva** a través del tiempo en ambos pH, obteniendo un valor de **54%** a pH 7 en el día 7. Esto implica una proporción de **77S:23R**, o bien, una **pureza** del enantiómero S de 77%.

Debido a que tenemos un valor mayor de e.e. a pH 7 se probaron disoluciones amortiguadoras de pH básico y los resultados muestran que a pH 8 se tiene un mayor e.e. (73%) que a pH 7 (67%) y 9 (66%), e incluso, en un tiempo menor de biorreacción (5 días) que en los casos anteriores (Figura 21).

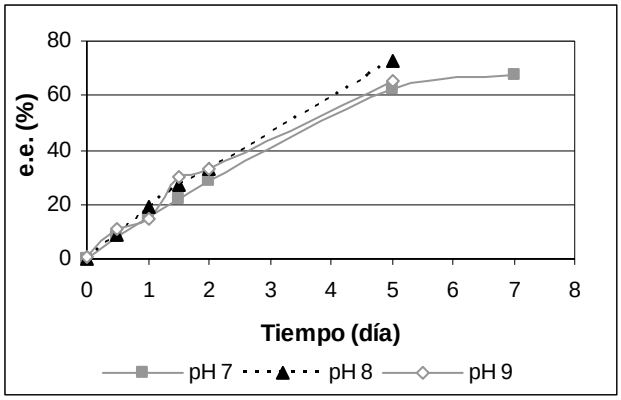


Figura 21. Biotransformación a disoluciones amortiguadoras básicas

Con este resultado, correspondiente a una mezcla 86.5S:36.5R, se decidió investigar si la presencia de sacarosa modificaba el exceso enantiomérico. Los resultados indican que la **presencia de sacarosa** facilita el proceso de desracemización al aumentar la rapidez con que se alcanza un máximo en el exceso enantiomérico con un **aumento de 4 veces** comparando el día 5 y 7 de ambas condiciones (Figura 22). Así pues, al igual que con *Taxus globosa*, la biotransformación se realizará adicionando **10 % de sacarosa**.

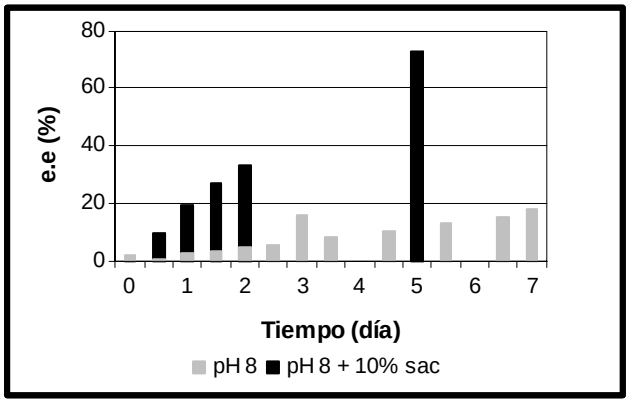


Figura 22. Efecto de la presencia de sacarosa

La metodología empleada en el caso de *Taxus globosa* para encontrar condiciones favorables para la desracemización se continuó con *Taxus brevifolia*, por lo que la biotransformación se realizó en una disolución amortiguadora con **pH ácido** (4).

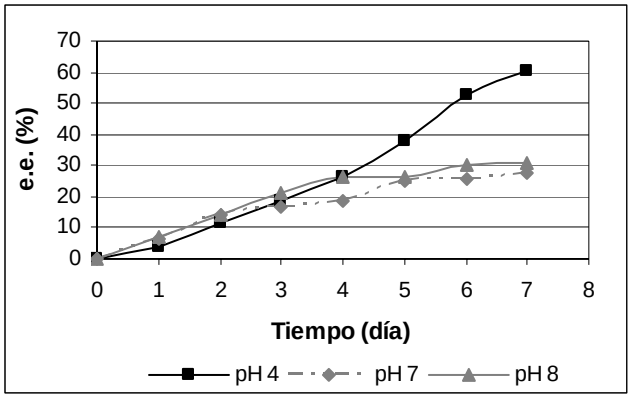


Figura 23. Biotransformación a diferentes pH

Los resultados son **sorpresivos** por dos hechos (Figura 23). El más evidente es que a **pH 4**, también, se obtiene un **alto e.e.** (60%), conservándose la selectividad del proceso hacia el enantiómero S (80S:20R); sin embargo, el valor obtenido a **pH 8**, durante este experimento, sólo ofrece un 27% de e.e. al día 5 lo cual resulta **incongruente** con el resultado anterior de 73% (Figura 22).

Recordando los resultados incongruentes con *Taxus globosa* y esta última experiencia, se decidió colocar la biotransformación con diferentes disoluciones amortiguadoras (Citratos-Fosfatos y Fosfatos) a diversos valores de pH (4, 5, 6, 7 y 8) utilizando células de una **misma línea de cultivo en suspensión**.

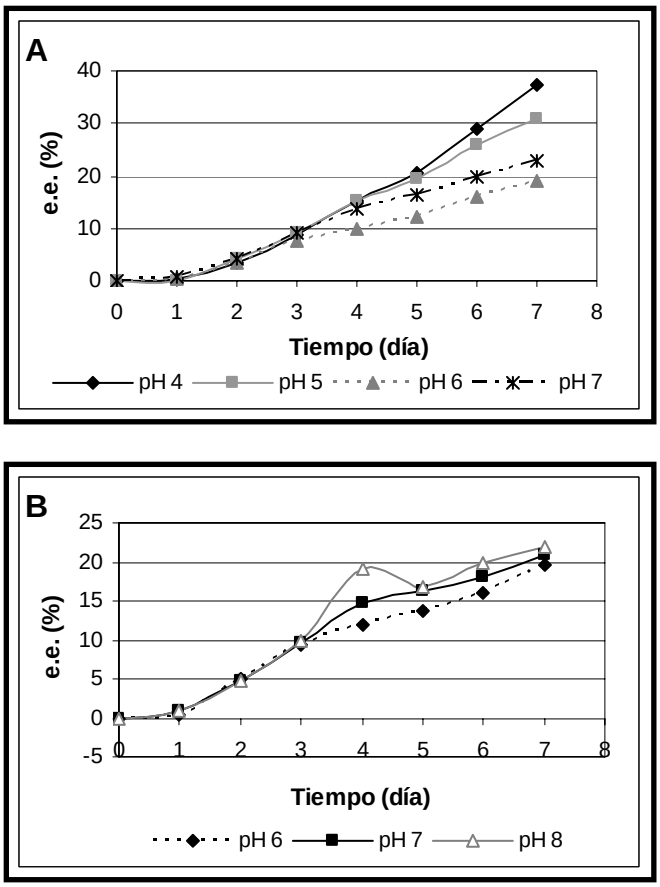


Figura 24. Biotransformación con una misma línea de cultivo
A) Citratos-Fosfatos y B) Fosfatos

En esta figura, podemos observar que el aumento progresivo del e.e. se mantiene y se ratifica que a **pH 4** se obtiene el **mayor exceso enantiomérico**; sin embargo, al día 7, el valor de e.e. es 37%, contrario al 60% de la Figura 23, de manera similar, el valor de e.e. a pH 8 fue 22% a diferencia del 27% de la misma figura al día 7.

Este hecho no fue fácil de aclarar pues durante toda la experimentación se utilizaron condiciones constantes en parámetros como concentración del amortiguador, concentración de sustrato, concentración celular, cantidad de sacarosa, tiempo de biorreacción y, por último, línea de cultivo. Así pues, tendría que atribuirse a otra **variable que no controlamos** y que interviene en el proceso de desracemización al variar los resultados.

Se realizó un último ensayo para fijar un pH y continuar con la investigación sobre la influencia de otras variables. Los resultados muestran que el mayor e.e. se obtiene en pH 4 (32%, día 7),

manteniéndose la relación **directa de proporcionalidad entre el e.e. y tiempo de biorreacción** (Figura 25).

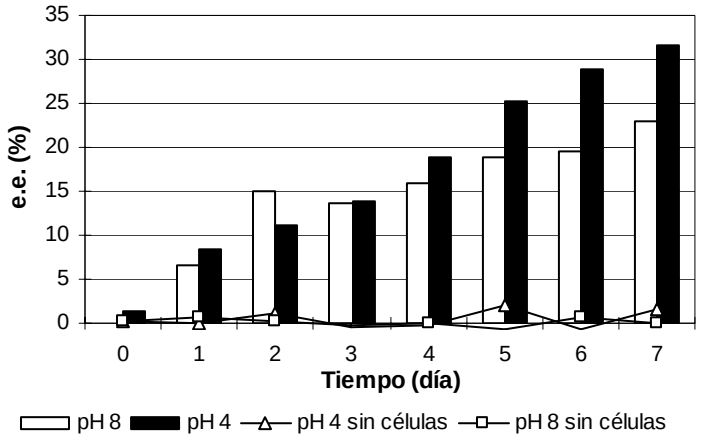


Figura 25. Elección del pH de desracemización

También podemos observar que las **células** son las **responsables** de que se presente un **cambio en la proporción de los enantiómeros**. Cuando se inocula el sustrato racémico sin células, la proporción de ambos enantiómeros se conserva a través del tiempo (50:50) por lo que se tiene un e.e. de cero. En cambio, en presencia de células, la proporción cambia.

Así pues, se investigó la influencia de la **temperatura** en la desracemización del 3-hidroxibutanoato de etilo, tomando como **temperatura control** 20°C y fijando un tiempo de biorreacción de 7 días. Los resultados muestran que la **selectividad no se modifica** y la desracemización arroja el enantiómero S, teniendo un exceso enantiomérico máximo en 20°C. Una variación de 10°C implica una pérdida entre 54-32% de actividad, pero existe una pérdida total a 40°C y 50°C (Figura 26).

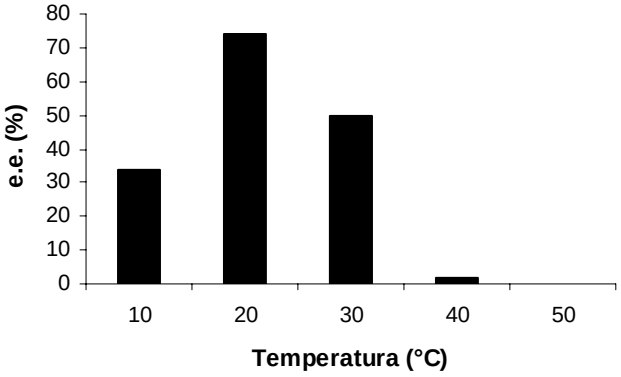


Figura 26. Exceso enantiomérico a los 7 días

Sin embargo, el efecto más relevante de la temperatura se observa en el tiempo de biorreacción (Figura 27).

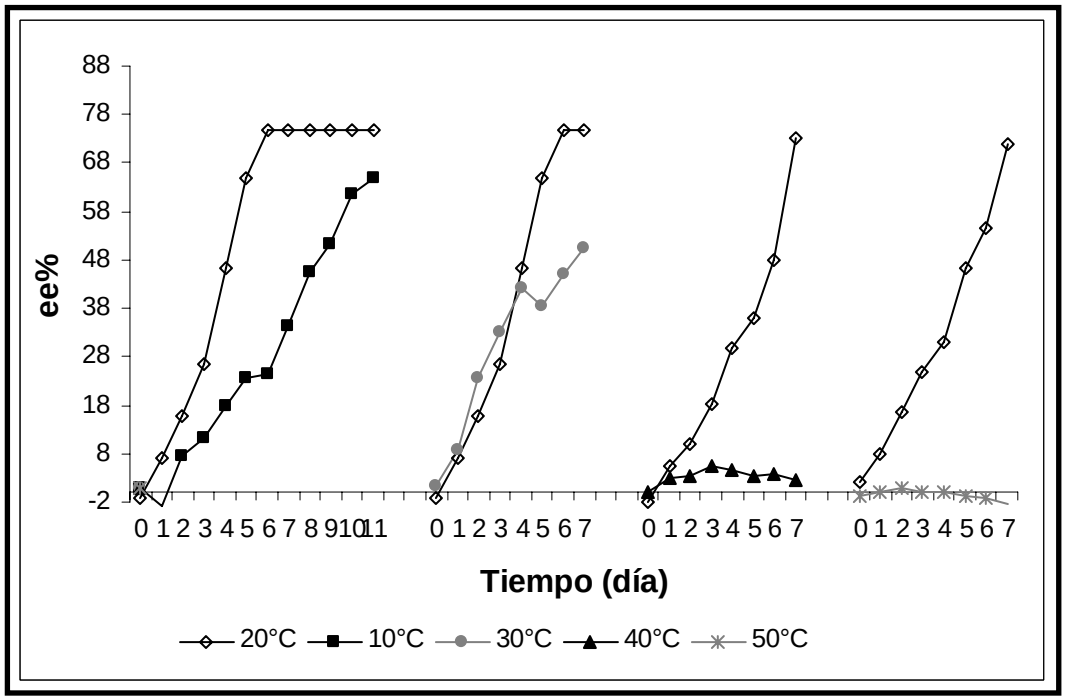


Figura 27. Influencia de la temperatura

A **10°C**, podemos observar que en la desracemización el valor de e.e. a 7 días es menor que a 20°C (34% y 75%, respectivamente); sin embargo, si el tiempo de biorreacción se prolonga hasta los **11 días**, es posible continuar enriqueciendo el producto enantiomérico hasta alcanzar un **86% de la actividad total**.

En cambio a **30°C**, en los primeros días (0 – 3 días), se obtiene un e.e. mayor que a 20°C, pero en el día 4 se presenta un efecto negativo pues el e.e. disminuye y sólo se obtiene un **66% del e.e. total** al día 7.

Cabe señalar que los ensayos de temperatura se realizaron **con una sola línea celular**, obteniendo un **e.e. constante** de 74% (±1%) a 20°C.

Posteriormente, se realizaron ensayos para determinar la influencia de la **cantidad de sustrato** en la desracemización. Los resultados muestran que con **0.05%** de 3-hidroxibutanoato de etilo racémico se alcanza un exceso enantiomérico del **66%** (día 7), mientras que 12 veces más concentrado (**0.6%**) el exceso disminuye a **4%** (Figura 28). Así pues, la cantidad de sustrato y el e.e. presentan una **relación inversa de proporcionalidad**.

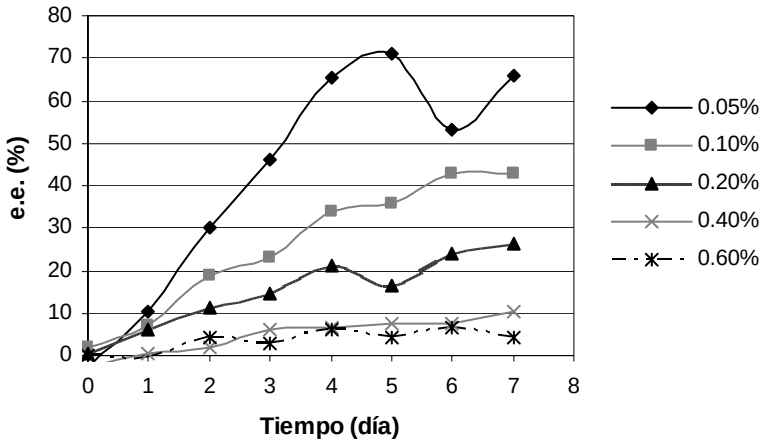


Figura 28. Efecto de la cantidad de sustrato

Finalmente, se propuso investigar el proceso de desracemización adicionando los enantiómeros puros del 3-hidroxibutanoato de etilo.

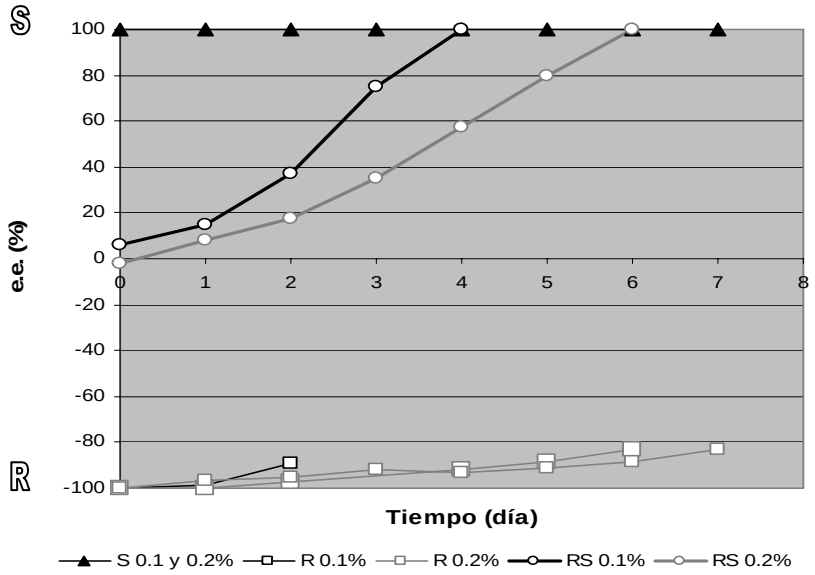


Figura 29. Curso de la biodesracemización del 3-hidroxibutanoato de etilo

Los resultados muestran que la **mezcla racémica** (RS) se resuelve hacia la obtención del enantiómero S, alcanzando un exceso enantiomérico de **80%**, lo que equivale a tener el enantiómero S con una **pureza del 90%** (Figura 29). **El exceso enantiomérico es directamente proporcional al tiempo de biorreacción e inversamente proporcional a la cantidad de sustrato a tiempo de biorreacción constante.**

Por otra parte, el **enantiómero S** permanece **intacto** (100:0) mientras que sólo el **10%** del **enantiómero R** se convierte en su imagen especular (10:90).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. SÍNTESIS DE 3-HIDROXIBUTANOATO DE ETILO

La síntesis de la materia prima se llevó a cabo mediante una reducción del carbono del grupo carbonilo. La reducción puede efectuarse mediante hidrógenación catalítica empleando hidrógeno molecular o por reducción química. La elección de éstas depende de las características del agente reductor y la presencia de otros grupos funcionales lábiles químicamente (Figura 30).

AGENTE REDUCTOR	GRUPOS FUNCIONALES	PRODUCTO
H_2 + Ni, Pd o Pt	alqueno > cetona	alcano > alcohol
$NaBH_4$ / H^+	aldehído, cetona	alcohol
$NaBH_3CN$ / H^+	aldehído, cetona	alcohol
$LiAlH_4$ / H^+	aldehído, cetona, ácido carboxílico, éster	alcohol
Zn(Hg) / HCl	ácido carboxílico, éster	alcano
$(H_2N)_2$ / OH^-	ácido carboxílico, éster	alcano
Hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL)	ácido carboxílico, éster	aldehído

Figura 30. Algunos agentes reductores

El acetoacetato de etilo es un β-cetoéster que contiene un grupo cetona y un éster, por lo que existen dos carbonos que pueden ser susceptibles a reducción para formar alcoholes. El criterio de selección se basa en la **reactividad** del carbono en ambos grupos funcionales y el **poder de reducción** de los agentes antes mencionados.

El poder de los agentes reductores está ligado a la electronegatividad, mientras que la regioselectividad de la reacción involucra tanto electronegatividad como un fenómeno de resonancia.

La **electronegatividad** es una medida de la capacidad de un átomo para atraer densidad electrónica en una molécula. En ese sentido, el carbono es menos electronegativo que el oxígeno, según los estándares de **Pauling**, por lo que se genera un dipolo entre ambos núcleos que ocasiona una carga parcial positiva en el carbono y una carga parcial negativa en el oxígeno. Este fenómeno se presenta en ambos grupos funcionales, pero el efecto se incrementa por la presencia de dos átomos de oxígeno en el éster.

Sin embargo, el efecto de resonancia ocasiona una disminución en la carga parcial negativa en los oxígenos disminuyendo la carga parcial positiva en el carbono. La **resonancia** se manifiesta cuando se puede representar una molécula en dos o más estructuras que sólo difieran en el ordenamiento de los electrones, conservando el ordenamiento de los núcleos atómicos.

El acetoacetato de etilo puede representarse en dos estructuras y la estructura real será un híbrido entre ellas (Figura 31). El carbono, base de éster, se encuentra unido a tres átomos mediante enlaces σ mediante orbitales sp^2. El orbital p sobrante del carbono interactúa con los orbitales p de los oxígenos de tal manera que la densidad electrónica se distribuye entre tres núcleos (O-C-O), ocasionando una menor carga parcial positiva sobre este carbono.

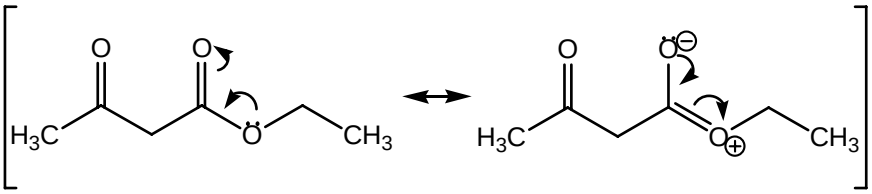


Figura 31. Estructuras resonantes del acetoacetato de etilo

El carbono de la cetona no tiene esta posibilidad, por lo que su carga parcial resulta ser mayor que la del carbono del éster, ofreciendo la posibilidad de utilizar un agente reductor suave como el borohidruro de sodio (Figura 32).

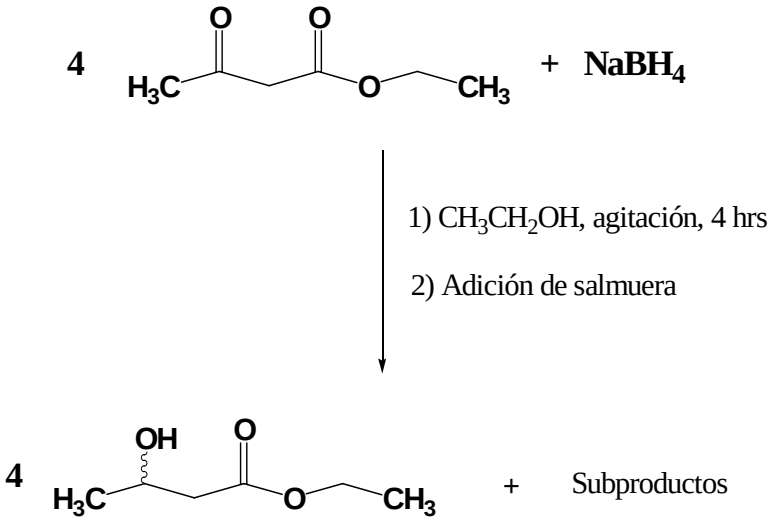


Figura 32. Reducción del acetoacetato de etilo en etanol[b]

[b] Los subproductos pueden ser NaOH, $NaOCH_2CH_3$, $B(OH)_3$ y $B(OCH_2CH_3)_3$

El borohidruro de sodio provee **grupos hidruros** (H^-) para el ataque nucleofílico al carbono del grupo cetona, **1**. El borano resultante es un ácido de Lewis es estabilizado por la unión del oxianión, **2**. Posteriormente, se presenta otro ataque nucleofílico hacia el carbono de otra molécula de acetoacetato de etilo, generando el correspondiente dialcoxiborato, **3**.

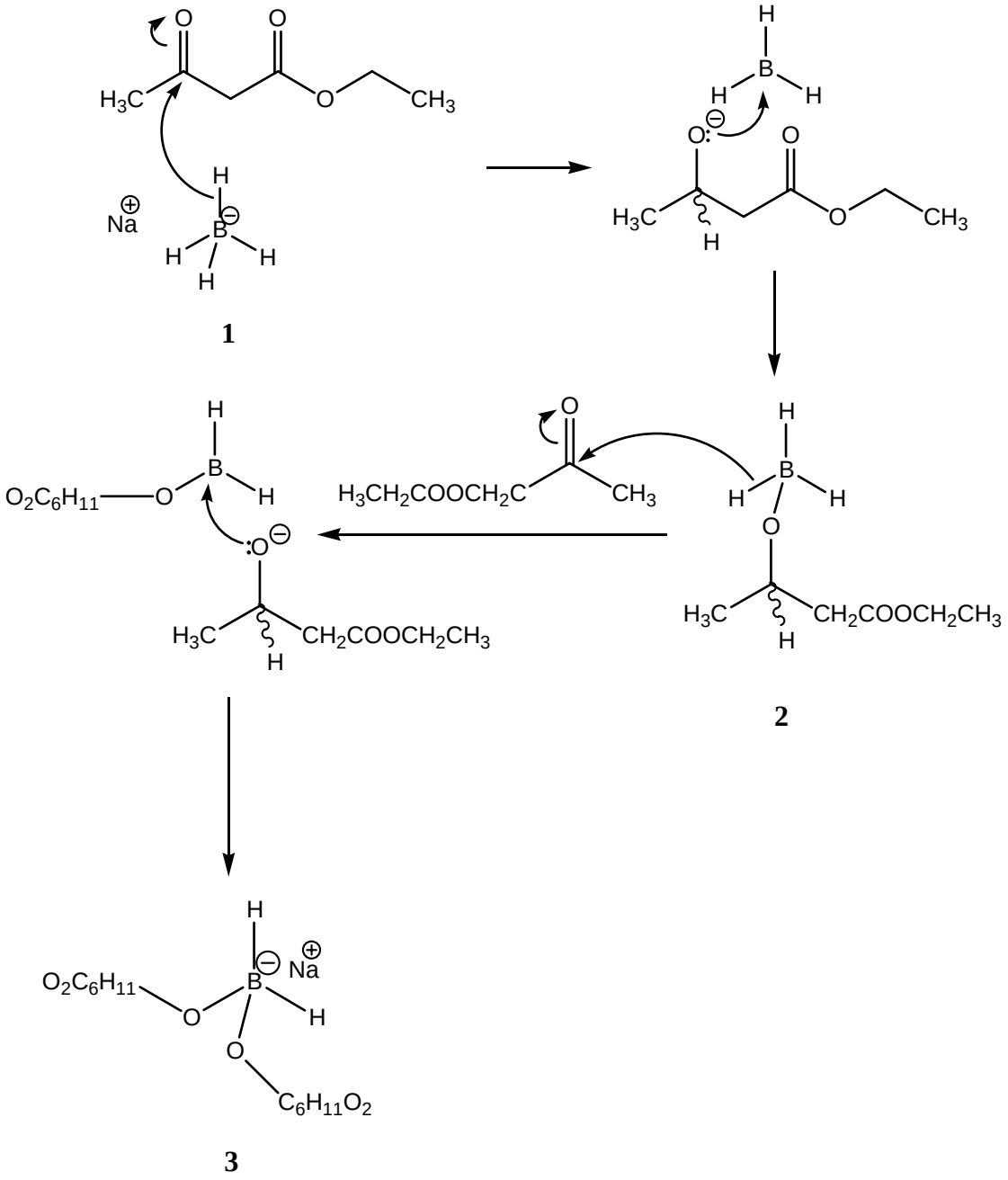


Figura 33. Mecanismo de reducción con $NaBH_4$

Esto se repite hasta la formación de un **tetraalcoxiborato**, **4**. La adición de salmuera provee al medio moléculas de agua propiciando el ataque nucleofílico de un par de electrones del oxígeno para sustraer un protón, **5**. La estructura resultante se estabiliza mediante la ruptura heterolítica del enlace B-O, formándose el alcohol, **6**.

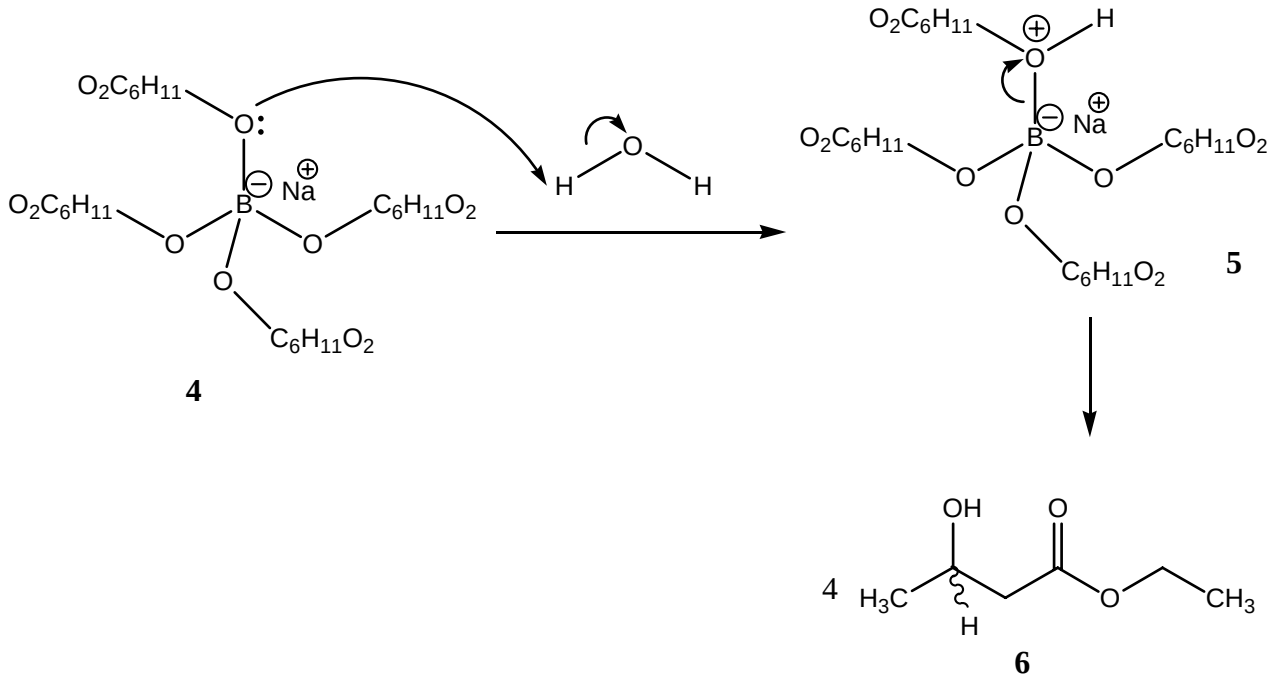


Figura 34. Mecanismo de reacción en la reducción

El producto de la reacción es una **mezcla racémica** (50S:50R) de 3-hidroxibutanoato de etilo debido a la naturaleza del ataque nucleofílico del hidruro frente a un carbono con hibridación sp^2 (Figura 35).

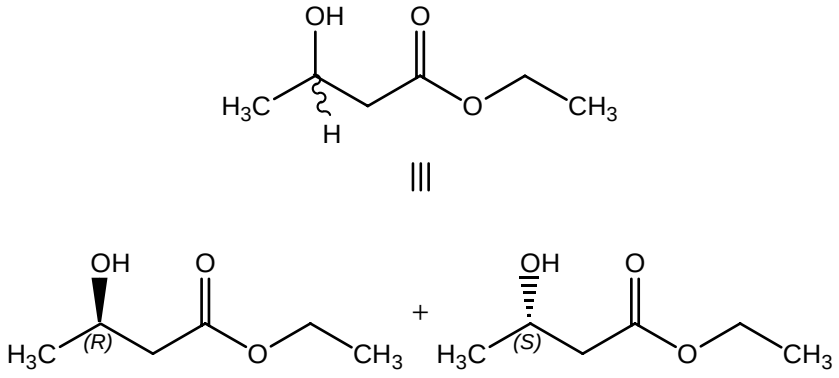


Figura 35. Enantiómeros del 3-hidroxibutanoato de etilo en la mezcla racémica

7.2. CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES

El cultivo de *Taxus globosa* se inició en Septiembre de 2005 con células en callo con un año de antigüedad (2004) y el cultivo de *Taxus brevifolia* se inició en la misma fecha con células provenientes de callo con dos años de antigüedad (2003). El medio de cultivo de éstas cambia de color debido a la acumulación de compuestos fenólicos secretados por las células [68].

Las células completas de ambos cultivos se utilizaron como reactivo en la biotransformación de desracemización del 3-hidroxibutanoato de etilo. Inicialmente, se agregó el sustrato en un pH cercano a la neutralidad para detectar cualquier actividad que modificara el exceso enantiomérico.

Cabe señalar que el **efecto** de las variables independientes aquí presentadas se reportan, en su mayoría, para **enzimas puras**, sin embargo, al trabajar con **células completas**, el efecto puede reflejarse tanto en el **metabolismo** del organismo como en las **enzimas** relacionadas con el proceso de reacción.

7.3. PROCESO DE DESRACEMIZACIÓN

La biotransformación de un metabolito secundario o derivados puede ser un proceso viable pues el origen del compuesto es **endógeno** y las células tendrían la posibilidad de reconocerlo ante el inicio del cultivo a partir de un explante. Sin embargo, la biotransformación de un sustrato **exógeno** implicaría introducir una sustancia ajena al contenido celular, por lo que se podrían presentar **mecanismos de defensa** para convertir el compuesto en otro.

Así pues, lo que se plantea en el proyecto es investigar si estos cultivos tienen la **capacidad** de discernir entre un enantiómero de otro en una mezcla racémica de 3-hidroxibutanoato de etilo provocando un efecto de desracemización.

Los cultivos de ***Taxus globosa*** presentan cierta selectividad al sustrato, pero el valor de exceso enantiomérico **no** es **viable** para un proceso de desracemización. A medida que las células están en contacto con el sustrato, el exceso enantiomérico se pierde y se recupera de manera **oscilante** a través del tiempo. El valor máximo de **exceso enantiomérico** fue **16%** y una selectividad hacia el enantiómero R, produciendo una **pureza del enantiómero S de 58%**.

Por otro lado, ***Taxus brevifolia*** presentó una mayor actividad en el proceso obteniéndose un **exceso enantiomérico del 80%** y una **pureza del 90% para el enantiómero S**.

7.4. INFLUENCIA DEL pH

Los efectos al variar el pH pueden modificar varios aspectos en una reacción enzimática como la unión del sustrato y la enzima, la actividad catalítica, la ionización del sustrato o la conformación de la enzima. Casi todas las enzimas funcionan óptimamente en un rango de pH entre 6 y 8, en el cual se realizan las funciones dentro de la célula [75a].

Si bien con ***Taxus globosa*** no se obtiene un exceso enantiomérico favorable, es de señalar que la **selectividad** hacia los enantiómeros del 3-hidroxibutanoato de etilo **cambia** al modificar el **pH**. A valores de pH 5, 6.5, 7 y 8, el producto es el enantiómero S, en cambio, a valores de pH 4 y 6, el producto es el enantiómero R.

Hasta ahora, en la literatura sólo se reporta una inversión de la enantioselectividad al trabajar con cultivos de *Rhizopus oryzae* (hongo) utilizando benzoina como sustrato. Se suministra una mezcla racémica en medio de cultivo y se prueban valores de pH de 7.5-8 y 4-5 obteniendo el enantiómero R (95% e.e.) y S (97% e.e.), respectivamente [41].

En lo que respecta a ***Taxus brevifolia***, el pH **no** cambia la **enantioselectividad** del proceso y el enantiómero S es el producto resultante. Durante la experimentación se obtuvieron resultados poco reproducibles con respecto al pH, pero al experimentar con una sola línea celular (Figura 24), la modificación del pH arroja un **valor óptimo** para la desracemización de **4** obteniendo un exceso enantiomérico de 37%.

La influencia del pH en este ensayo se puede observar en la velocidad con la que se desracemiza el 3-hidroxibutanoato de etilo (Figura 36). La **velocidad de desracemización** es máxima cuando la biodesracemización se realiza en pH 4 con una disolución amortiguadora de citratos-fosfatos, y a medida que aumenta el pH, la velocidad disminuye hasta llegar a pH 6 en el cual comienza un aumento de la velocidad hasta el pH 7.

De igual manera, este aumento en la velocidad a partir del pH 6 se observa cuando se utiliza, como medio de biorreacción, una disolución de fosfatos y se mantiene en forma ascendente a medida que aumenta el pH.

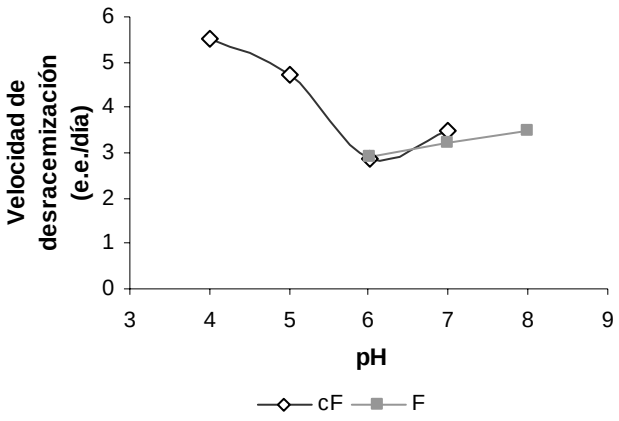


Figura 36. Efecto del pH en la velocidad de desracemización

A pesar de que el pH 4 resulta óptimo para la desracemización tanto en velocidad como en e.e. resultante, a través del tiempo se presentaron **dos** valores de pH en los cuales se obtuvieron altos excesos enantioméricos. Los valores de **pH** fueron **4 y 8** con **80% y 73%** de exceso enantiomérico, respectivamente. Este fenómeno se intentará explicar más adelante.

7.5. TIPO DE AMORTIGUADOR

Las disoluciones amortiguadoras están compuestas por un ácido o base débil y su sal correspondiente. Su función es impedir cambios bruscos de pH bajo el principio de Le Châtelier lo cual es crucial para la actividad de algunas enzimas ya que ésta puede verse disminuida, o incluso, nulificarse por desnaturalización. Así mismo, el tipo de iones de la disolución amortiguadora puede afectar el gradiente eléctrico de la membrana celular modificando el transporte de substancias [75b, 76].

Sin embargo, en el caso de pH 6 y 7 de la Figura 24 se puede observar que se obtienen e.e. similares, además la velocidad de desracemización **no** presenta modificaciones por **diferencia** en el tipo de sal (Figura 36).

7.6. PRESENCIA DE SACAROSA

En ambos cultivos, la **presencia de sacarosa aumenta el exceso enantiomérico** en la biodesracemización del 3-hidroxibutanoato de etilo.

Antecedentes indican que cuando se utilizan células de *Dacus carota* (vegetal) para reducir compuestos cetónicos a alcoholes secundarios, la sacarosa ayuda a restaurar moléculas de

cofactores como NADH y NADPH con mayor rapidez [58]. En procesos de desracemización se ha reportado que diversas especies de levadura disminuyen el exceso enantiomérico de derivados 1,2-diol en presencia de glucosa [40], pero no se pudo sistematizar el fenómeno.

En este caso, no se determinó si la presencia de sacarosa tiene una participación directa en el proceso y será de gran utilidad despejar esta incógnita pues, hasta ahora, no se ha reportado algún mecanismo de participación activa de una fuente de carbono frente a una biotransformación.

7.7. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Al igual que con el pH, los procesos enzimáticos son susceptibles a cambios de temperatura modificando la velocidad de reacción pues su efecto radica en la probabilidad de que el sustrato interactúe con el sitio activo de la (as) enzima (as) involucrada (as).

Aunque la mayoría de las reacciones tienen una relación directa de proporcionalidad entre velocidad y temperatura, es decir, al aumentar la temperatura aumenta la velocidad y viceversa, existe una temperatura a la cual las uniones que regulan la forma enzimática activa se rompen debido al movimiento molecular excesivo, ocasionando la desnaturalización de la enzima y la pérdida de su actividad [75c]. La desracemización de un compuesto es una reacción que requiere de una gran especificidad entre la enzima y el sustrato, por lo que debería ser más sensible a cambios de temperatura.

En el caso de ***Taxus brevifolia***, la temperatura no modifica la **enantioselectividad** de la biodesracemización y la actividad se mantiene entre 10 y 30°C, perdiéndose a 40 y 50°C.

No debemos olvidar que uno de los reactivos es una fuente biológica viva y que su **fisiología** se puede alterar debido a la temperatura. El cultivo se propaga a una temperatura de 20°C, temperatura a la cual presenta su mayor actividad, por lo que no es sorpresivo que a 40 o 50°C, éste sufra alteraciones que ocasionen su muerte.

Centrándonos en el rango en el cual se presenta una actividad (10 - 30°C), en ambos extremos, el exceso enantiomérico es inferior que a 20°C (34%<50%<74%), sin embargo, las consecuencias de disminuir o aumentar la temperatura tienen diferente explicación.

A 10°C, siguiendo el curso de biotransformación (Figura 26), es cierto que a 7 días el exceso enantiomérico es inferior que a 20°C, sin embargo, la cinética plantea que existe una disminución en la velocidad de desracemización ocasionado, tal vez, por la **dinámica reducida** en la célula a causa de una **baja temperatura**. Por ello, se decidió **extender el tiempo de**

biorreacción observando que la actividad no se pierde con la temperatura y que es posible llegar casi al mismo exceso enantiomérico que a 20°C.

Por el contrario, a 30°C, la velocidad de desracemización parece incrementarse en los primeros días, pero existe un momento en el tiempo (día 4) en el cual se registra un cambio en el exceso enantiomérico y la velocidad de desracemización cambia disminuyendo y alejándose de la temperatura control. Esto sólo puede deberse a **modificaciones en el proceso** de interacción enzima (as) y sustrato, que si bien, continúa, su efectividad se reduce.

Lo anterior se refleja en la Figura 37 en la cual se muestra el efecto de la temperatura en la velocidad de desracemización (Δe.e./Δt). A 10°C existe una menor velocidad de reacción, mientras que a 30°C existe una velocidad similar a 20°C, por lo que la **temperatura óptima** propuesta es **25°C**, determinada gráficamente.

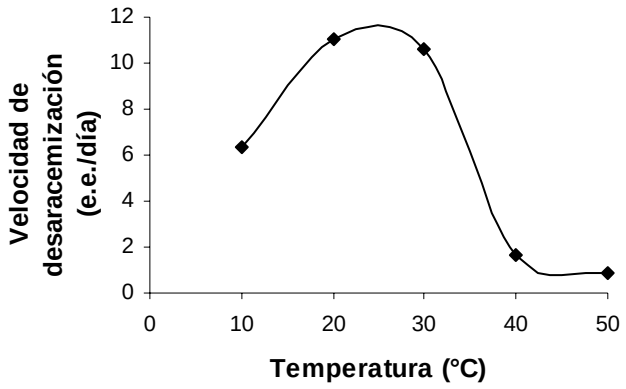


Figura 37. Efecto de la temperatura en la velocidad de desracemización

El efecto de la temperatura en la literatura se restringe a la termoestabilidad de las enzimas correspondientes sin mencionar el efecto de la temperatura en el proceso que se investiga. Se reportan actividades amidohidrolizantes estereoespecíficas con microorganismos en medio de cultivo [77] y derivados (3E,5E)-alquil-2-hidroxi-6-arilhexa-3,5-dienoatos que han sido desracemizados en agua destilada con levadura [39].

7.8. CANTIDAD DE SUSTRATO

El comportamiento presentado en la Figura 28 se podría explicar haciendo referencia a un **mecanismo saturable**, como lo es el enzimático. A mayor sustrato, la vía enzimática se satura y disminuye, en este caso, el exceso enantiomérico obtenido; sin embargo, existen otros elementos que podrían sugerir otro comportamiento.

En 1913**, Leonor Michaelis** y **Maud Menten** propusieron un modelo sencillo que explica la cinética de una reacción enzimática que plantea un equilibrio entre **enzima** (E), **sustrato** y un complejo activado **enzima-sustrato** (ESustrato) que se disociará para formar un **producto** (P) y reestablecer la enzima.

$$E + \text{Sustrato} \rightleftharpoons \text{ESustrato} \longrightarrow E + P$$

Figura 38. Reacción enzimática propuesta por Michaelis-Menten

La velocidad de catálisis y la cantidad de sustrato se relacionan con una **constante de equilibrio** (K_M) y una **velocidad máxima** (V_{max}) en la reacción.

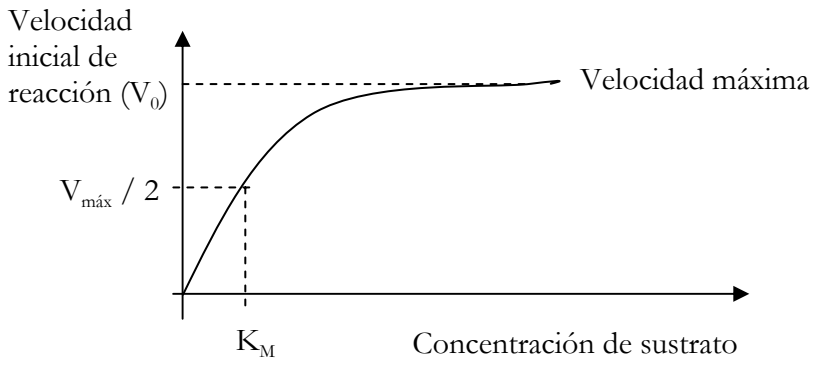


Figura 39. Representación de una reacción enzimática con una cinética de Michaelis-Menten

A una concentración constante de enzima, cuando se aumenta la concentración de sustrato, el número de interacciones **ESustrato** aumentan hasta un punto (velocidad máxima) en el que se saturarán todas las enzimas posibles y esto continuará a través del tiempo aunque la concentración de sustrato aumente. Esto se traduce a partir de la relación entre **conversión** y **tiempo** en la cual se tiene un incremento en la velocidad del proceso a medida que se saturan más rápido los sitios enzimáticos por la presencia de una mayor cantidad de sustrato.

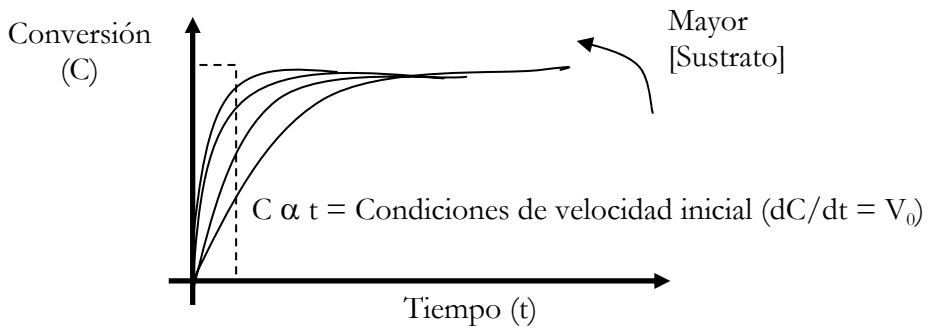


Figura 40. Relación de conversión y tiempo para una reacción enzimática para diferentes concentraciones de sustrato

La conversión con respecto al tiempo presentará un mayor valor de **velocidad inicial** (dC/dt = pendiente creciente) a mayor cantidad de sustrato ya que se alcanzará la saturación enzimática. Comparando con la Figura 28, podemos observar que los perfiles son contrarios y calculando las velocidades iniciales para las diferentes concentraciones experimentales de sustrato presentan una disminución en la velocidad de desracemización (Figura 41).

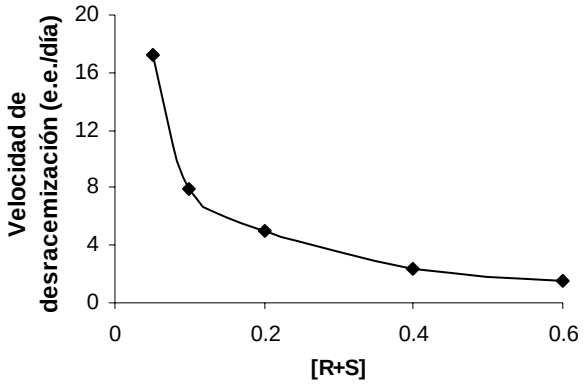


Figura 41. Relación experimental entre velocidad inicial y concentración de sustrato

El comportamiento que describe la figura anterior se asemeja a un perfil de **inhibición por sustrato** pues la actividad de desracemización se pierde a medida que aumenta la concentración de sustrato como mezcla racémica.

Generalmente, esta inhibición se caracteriza por el hecho de que más de una molécula interactúa con la enzima ocasionando un intermediario inactivo (**ESustratoSustrato**) reduciendo la velocidad de reacción [78, 79].

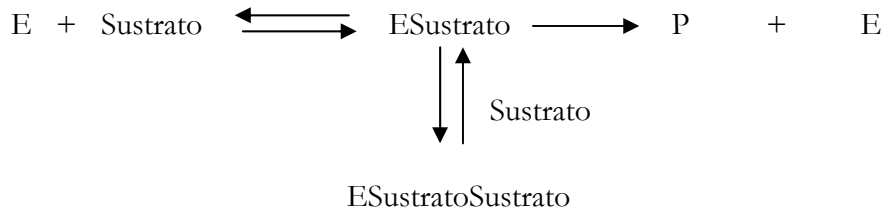


Figura 42. Reacción enzimática con inhibición de sustrato

Sin embargo, no debemos olvidar que el sustrato es una mezcla racémica (R y S), por lo que el proceso de inhibición puede involucrar a ambos enantiómeros en proporción 50:50 o sólo a uno.

Este tipo de inhibición se reporta en relación a la actividad enzimática con enzimas puras [80, 83] y con el crecimiento de cultivos [84], o bien, en relación al tipo de inhibición y el inhibidor como tal.

En particular, se tiene registro de un cambio en la enantioselectividad de la ciclohexanona monooxigenasa de *Acinetobacter calcoaceticus* (bacteria) debido a la concentración de sustrato del tipo biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona para producir lactonas. En éste se indica que la enzima tiene la capacidad de transformar el sustrato racémico en dos enantiómeros, teniendo que la producción de uno de ellos decae a medida que aumenta la cantidad de sustrato [73].

7.9. BIOTRANSFORMACIÓN CON LOS ENANTIÓMEROS PUROS

Dado que existe un cambio en el exceso enantiomérico al colocar una mezcla racémica de 3-hidroxibutanoato de etilo con células de *Taxus brevifolia*, se decidió investigar el posible **mecanismo de desracemización**.

Las condiciones iniciales del ensayo fueron 0.2%V de los diferentes sustratos (R, S y R+S) con lo que se obtuvo que sólo el 10% del enantiómero R reaccionaba y que el isómero S permanecía intacto. Debido a que se podría presentar una **saturación enzimática** pues en el ensayo de la mezcla racémica (0.2%V) sólo existe 0.1% del enantiómero R, se realizó el ensayo con la mitad de sustrato racémico (Figura 29).

Los resultados confirmaban que no se presentaba ningún fenómeno de saturación en el caso del isómero R y ratifica que el isómero S permanece intacto. Por lo que, el proceso de desracemización sólo tiene un carácter de **estereoinversión del 10% del isómero R al isómero S** (Figura 43).

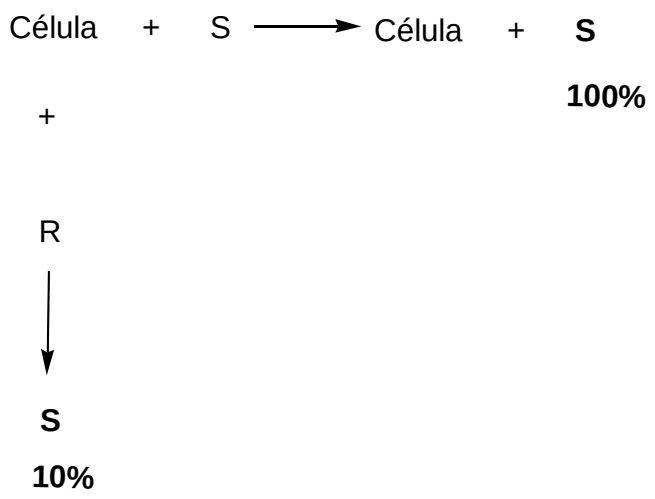


Figura 43. Esquema de biorreacción con enantiómeros puros

7.10. MECANISMO DEL PROCESO DE DESRACEMIZACIÓN

En resumen, con ***Taxus globosa*** no se lleva a cabo un mecanismo de desracemización viable pues durante el tiempo de biorreacción, el poco exceso enantiomérico se pierde a medida que el 3-hidroxibutanoato está en contacto con las células (Figura 44).

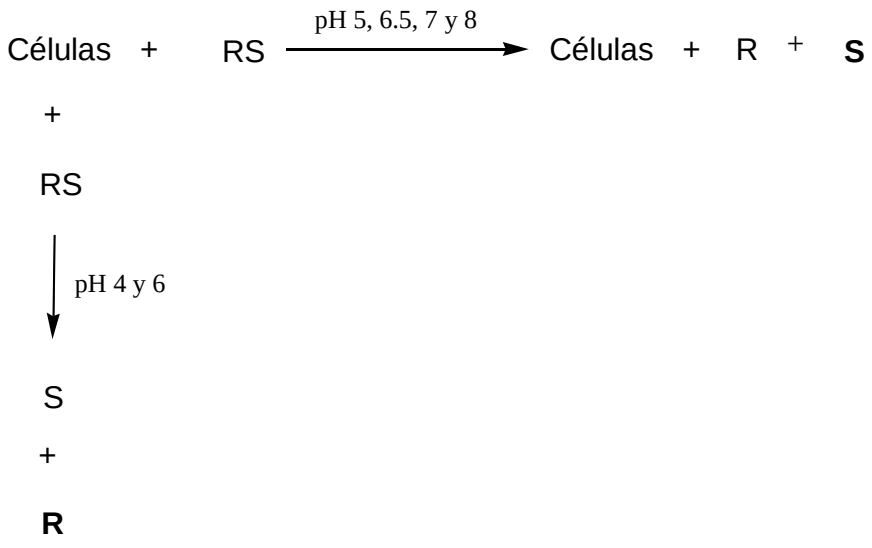


Figura 44. Esquema representativo de la biotransformación con *Taxus globosa*

En el caso de ***Taxus brevifolia***, el exceso enantiomérico aumenta con el tiempo de biorreacción, permitiendo una estabilidad en el proceso hacia la obtención del **enantiómero S**.

Sabemos que el proceso se lleva a cabo en un rango de pH de 4 – 8, pero los de mayor actividad fueron 4 y 8 adicionando 10% de sacarosa. El tipo de disolución amortiguadora no afecta el proceso y la temperatura óptima de desracemización fue 25°C, aunque a 10 y 30°C se presenta actividad. Frente a la cantidad de sustrato, la desracemización parece presentar una inhibición por sustrato pues a medida que ésta aumenta, el exceso enantiomérico disminuye, incluso, perdiéndose la actividad. El proceso frente a los enantiómeros puros sólo arroja un 10% de estereoinversión del isómero R, mientras que el isómero S permanece intacto.

Con esto, se deben tomar en cuenta varios elementos para indagar en el mecanismo de desracemización. El proceso de desracemización, en su mayoría, no se desarrolla bajo un panorama de estereoinversión, por lo que teniendo esto en cuenta, los mecanismos favorables serían resolución cinética, resolución cinética dinámica y enantioconvergencia. La **resolución dinámica** implica una **racemización** de uno de los isómeros lo cual arrojaría un comportamiento oscilatorio en el exceso enantiomérico y los resultados no muestran esto, por lo que, tampoco, se presenta este mecanismo.

Ahora bien, el proceso de **enantioconvergencia** implica una retención y una inversión. En el caso experimental, la retención sí existe, pero **no se presenta una inversión** en la configuración del isómero R. Debido a esto, sólo nos queda el proceso de resolución cinética.

El esquema mostrado en la Figura 7 muestra que un enantiómero (A) es convertido en un producto enantiomérico (P) y debido a la diferencia en constantes de reacción (k_A y k_B) no se observa cambio en el otro enantiómero (B). Es curioso, pero una resolución cinética no se considera un proceso de desracemización, aun y cuando podemos obtener un enantiómero puro debido a que las células tienen la capacidad para distinguir y biotransformar sólo uno de ellos.

Experimentalmente, el proceso de desracemización tendría que desarrollarse **vía resolución cinética** y la acumulación del isómero S favorece a plantear que el exceso enantiomérico aumenta a expensas de una biotransformación del enantiómero R y, para ello, es necesario analizar el rendimiento al final de la biotransformación. Si el proceso sigue una resolución cinética, el **rendimiento máximo** esperado sería de **50%**.

pH	Disolución amortiguadora[c]	Rendimiento (%)
6.5	F	49
7	F	39
4	cF	30
5	cF	56
6	cF	42
7	cF	41
6	F	37
7	F	53
8	F	38
4 sin células	cF	70
8 sin células	F	71

Figura 45. Tabla de rendimientos experimentales al día 7

En la Figura 45 podemos observar los rendimientos más representativos del proceso dentro de la modificación de pH correspondientes a una disolución amortiguadora de fosfatos (F) y citratos-fosfatos (cF). El primer y segundo registro (6.5 y 7) se refieren al ensayo inicial del proyecto y, los posteriores (4-8) corresponden al ensayo realizado con una sola línea de cultivo.

Es claro que, en la mayoría, la cuantitatividad del proceso **no ofrece rendimientos mayores al 50%**, por lo que podría pensarse que sí ocurre una resolución cinética. Por otro lado, anteriormente se propuso que el tipo de amortiguador no tenía influencia sobre el exceso enantiomérico del proceso y, con estos resultados, podemos observar que tampoco existe una influencia sobre el rendimiento de la reacción.

Una vez determinado esto, sólo faltaría ratificar que la cantidad del isómero R disminuye y para ello, no se puede continuar el estudio analizando el exceso enantiomérico como variable dependiente pues ésta se basa en la diferencia entre un enantiómero y otro, sin lograr descifrar entre el aumento o disminución de cada uno de ellos.

La alternativa es el análisis del área resultante en la Cromatografía de gases para cada enantiómero pues el área del isómero S tendría que permanecer constante y la del R disminuir frente una resolución cinética. Sin embargo, para observar este fenómeno, es necesario que

[c] F: fosfatos y cF: citratos-fosfatos

todas las muestras contengan un volumen de disolvente constante después de la extracción de la fase acuosa proveniente de las biotransformaciones. Si bien existe una cantidad nominal para llevar a cabo la extracción (1:1), el éter etílico es un líquido volátil (p.eb. 34.6°C y P_{vap} 604 g/cm^2)[d] por lo que no existe la certeza de que el volumen se conserve durante el tratamiento de las muestras.

Por ello, se decidió relacionar la **pureza** de cada enantiómero (obtenido en el análisis quiral) con el **rendimiento** del 3-hidroxibutanoato de la biotransformación y determinar la fracción de cada enantiómero. La pureza no depende de la cantidad de disolvente en la muestra y la relación entre S y R se conserva.

El análisis se realizó con los datos más representativos del proceso que fueron pH 4 y 8 a temperatura ambiente con 0.2% de sustrato racémico.

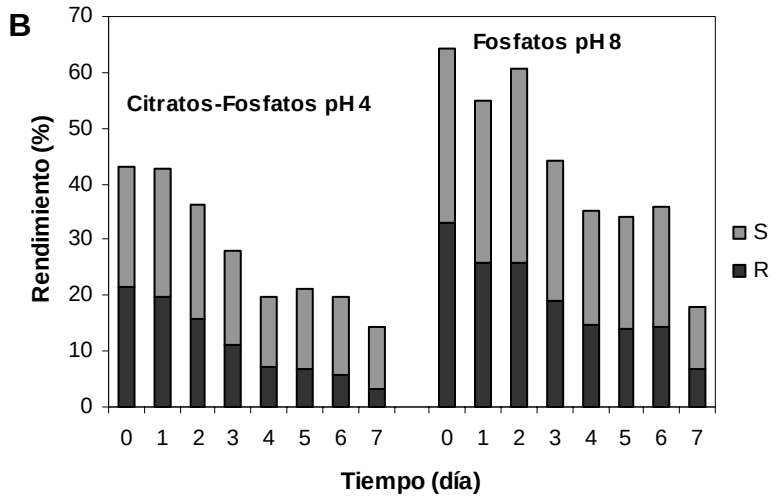


Figura 46. Relación entre los isómeros en la biotransformación

El perfil esperado para una relación rendimiento vs. tiempo (Figura 46) involucraba una disminución por tratarse de un compuesto orgánico en fase acuosa. Sin embargo, los resultados muestran un comportamiento oscilatorio el cual puede ser atribuible a un fenómeno de solubilidad y/o a la presencia de una relación dinámica entre el sustrato y las células de la reacción. Además, cabe señalar que aunque la pureza de la materia prima es alta, las impurezas del acetoacetato de etilo son susceptibles a reducción con este tipo de células [69] lo cual explica el aumento en los primeros días.

[d] En comparación con el agua que tiene un punto de ebullición de 100°C (1 atm) y presión de vapor de 23.84 g/cm^2 (20°C), el éter tiende a "escaparse" del estado líquido como vapor.

Ambos ensayos de pH inician con una proporción 50R:50S en la mezcla de reacción y la evolución de la biotransformación indica que el enantiómero R presenta una mayor disminución que el enantiómero S en la mezcla resultante.

Este resultado avala los ensayos con los enantiómeros puros (Figura 29) y confirma que a través del tiempo y en presencia de células de *Taxus brevifolia*, **el enantiómero S** del 3-hidroxibutanoato de etilo permanece **intacto**, mientras que la cantidad del enantiómero R se modifica de manera decreciente provocando un cambio en el exceso enantiomérico de la mezcla final mediante un proceso de resolución cinética.

$$\text{Células} + R + S \xrightarrow{\text{pH 4 y 8}} \text{Células} + \mathbf{S} + Z$$

Figura 47. Esquema propuesto del proceso de desracemización

En otras palabras, **la variación en el exceso enantiomérico es resultado de la biotransformación del enantiómero R vía resolución cinética.**

Ahora bien, referente a la inhibición por sustrato antes propuesta, sabemos que el **enantiómero S** permanece intacto por lo que se podría sugerir que a la célula le es indiferente tanto como precursor de algún metabolito como en toxicidad.

Sin embargo, el **enantiómero R** sí es biotransformado, no en su contraparte, sino en otro compuesto no caracterizado (Z) lo cual nos da un indicio de que la célula no lo tolera o es precursor de un metabolito. Así pues, no podemos descartar la posibilidad de que a mayores concentraciones se presente un fenómeno de **toxicidad** y no de inhibición (Figura 48).

$$\begin{array}{ccccccc} \text{Célula} & + & R & \longrightarrow & \text{Célula} & + & \mathbf{Z} \\ & & \downarrow R & & & & \\ & & \mathbf{[Célula+R+R\ ]_{muerte}} & & & & \end{array}$$

Figura 48. Esquema de toxicidad

La diferencia entre ambos radica en la **remoción del sustrato**. Si la actividad continúa al eliminar cierta cantidad de sustrato, correspondería a un proceso de inhibición; pero, si la actividad disminuye o cesa, se presentaría un fenómeno de toxicidad. Este hecho no fue posible aclararlo, sin embargo, existe varios elementos para descifrarlo.

En el caso de que R represente una **fuente** para producir un **compuesto de utilidad** para las células, a pesar de la inhibición, debería existir una fracción de R que se convirtiera en el producto benéfico y esto no sucede, pues al aumentar la cantidad de sustrato, cesa la actividad.

En el supuesto caso de que R represente una **toxicidad** para las células sería absurdo pensar que su degradación está sujeta a una **inhibición por él mismo**, pues las células lo que necesitan sería degradarlo y entre más rápido mejor. Con esto, el fenómeno referente a la **toxicidad del enantiómero R** puede ser el responsable de la **pérdida de la actividad** de desracemización en el medio de reacción.

En cuanto a la identidad de Z, la mayoría de las investigaciones especulaban sobre el mecanismo de desracemización de sec-alcoholes pues la fuerza motriz, hoy en día, es incierta.

La investigación para desracemizar 1-d-feniletanol racémico con células de *Geotrichum candidum* (hongo) aportó elementos contundentes a cerca de la naturaleza del mecanismo que se lleva a cabo [29]. La reacción muestra que al inocular el sustrato racémico se obtiene un compuesto en el cual el deuterio del centro de quiralidad es sustituido por un hidrógeno, mientras que su imagen especular permanece intacta (Figura 49).

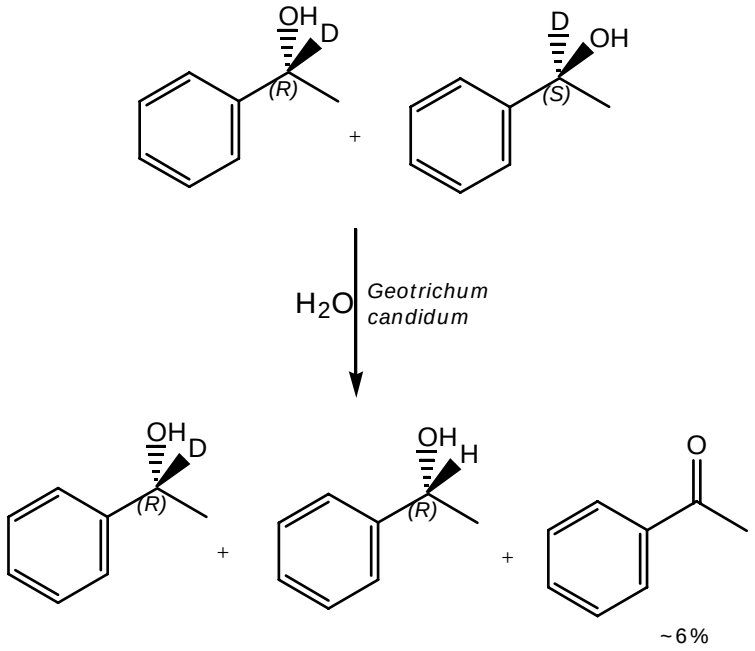
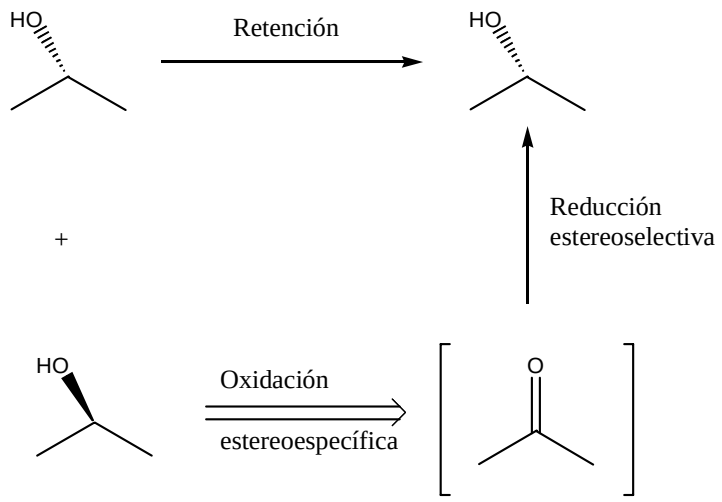


Figura 49. Desracemización de 1-d-feniletanol mediante células de *Geotrichum candidum*

En este sentido, la desracemización se podría llevar a cabo de varias maneras relacionadas con el tipo de enzimas involucradas: en un paso o en dos pasos. La estereoinversión en un paso implica una reacción de oxidación mediante una enzima de naturaleza redox (reversible), mientras que la desracemización en dos pasos involucra un proceso de oxidación estereoespecífica irreversible y reducción enantioselectiva; en ambos casos, se plantea una reducción irreversible (Figura 50) [24, 85].



Reacción	Mecanismo enzimático propuesto
Oxidación enantioespecífica	Alcohol deshidrogenasa + NAD^+ (redox) Alcohol oxidasa + O_2 (O_2 + NADH oxidasa + NADH) acoplado a Alcohol deshidrogenasa + NAD^+
Reducción enantioselectiva	Alcohol dehidrogenasa + NADPH

Figura 50. Mecanismos de desracemización en alcoholes secundarios

Sin embargo, investigaciones similares con derivados de alcoholes secundarios no han detectado la presencia del intermediario cetónico, por lo que esto es ambiguo [31, 48, 49]. De manera que el mecanismo de desracemización parece seguir diferentes rutas en diferentes organismos.

En este caso, el compuesto resultante de la oxidación selectiva sería el acetoacetato de etilo y, durante la experimentación, no se obtuvo una señal correspondiente a este compuesto (tiempo de retención 4.9 min.) en el análisis no quiral por cromatografía de gases.

7.11. EDAD DEL CULTIVO EN SUSPENSIÓN

El análisis de la variación de los resultados a pH 4 y pH 8 con *Taxus brevifolia* se disipó al final del proyecto. Como ya se mencionó, las condiciones de reacción se mantuvieron constantes en los diferentes ensayos, sin embargo, dado que el cultivo es difícil de propagar, las biotransformaciones se realizaron con células en suspensión en **tiempo real**, es decir, una vez subcultivadas en suspensión, éstas se mantuvieron durante un año y 9 meses en el cual se

colocaron los diferentes ensayos sin comprometer la continuidad de las diferentes líneas de cultivo.

Así pues, se realizó una relación entre el exceso enantiomérico y la fecha en la cual se realizó la biotransformación. El cultivo en suspensión se inició en Septiembre de 2005 con células de 2 años de antigüedad en callo (2003).

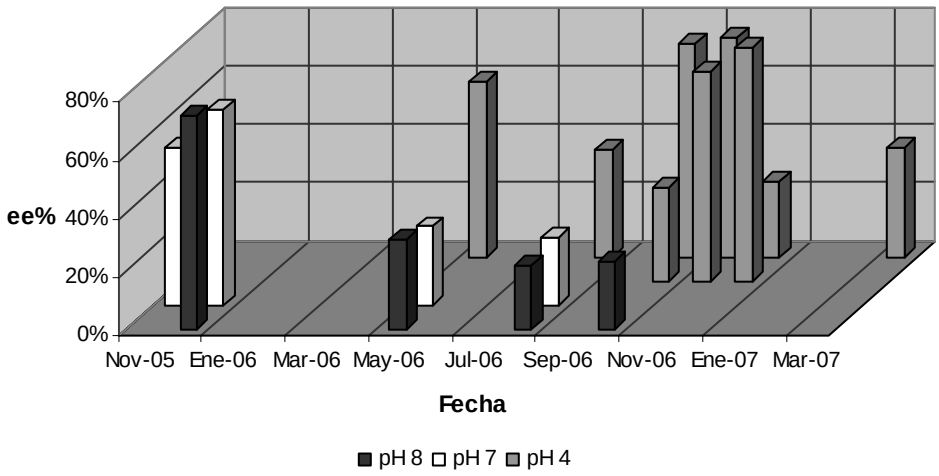


Figura 51. Relación de exceso enantiomérico y fecha de las biotransformaciones con *Taxus brevifolia*

La Figura 51 muestra los resultados obtenidos en valores de pH de 4, 7 y 8 a través del tiempo. Tanto a pH 7 y 8, los resultados de e.e. presentan una tendencia de disminución a través del tiempo (Nov-05 a Oct-06), mientras que a partir de la experimentación a pH 4, los resultados de e.e. son mayores que en los pH anteriores y se mantiene constante en un periodo de tres meses (Oct-06 a Dic-06). Posteriormente, se presenta una disminución en el e.e. cercano al 50% (Mar-07).

Así pues, **tras 3 meses** de mantener el cultivo en suspensión, la actividad de desracemización se lleva a cabo a **pH 8**, pero después de **5 meses** la actividad se incrementa a **pH 4**, teniendo su valor máximo a los 10 meses y permaneciendo **constante por tres meses**.

El comportamiento de células en suspensión frente a la producción de metabolitos secundarios ha sido estudiada y, en la mayoría de los casos, éstos disminuyen en cultivos *in vitro* [86]. En particular, estudios acerca de la producción de paclitaxel en *Taxus* sp. indican que su concentración no es constante y varía tanto por la época del año *in vivo* [57, 87, 88] como por el tiempo del cultivo en suspensión *in vitro* [56, 57].

Estos estudios se basan en la relación de producción de metabolitos secundarios y las alteraciones a nivel genético que pueden sufrir las células en los cultivos. Usualmente, las especies animales y vegetales tienen un número de cromosomas constante y determinado, que constituye su cariotipo. Sin embargo, existen especies con una alta variabilidad cariotípica, no sólo en número sino en forma y tamaño de los cromosomas debido a que se presentan **mutaciones cromosómicas**.

En la naturaleza, las mutaciones cromosómicas traen como consecuencia una variación en el fenotipo de la especie (características físicas) y en la fisiología. A pesar de esto, el **reino vegetal tiene una mayor capacidad para soportar las mutaciones que el reino animal** y su viabilidad como organismo queda condicionada a los cromosomas implicados en dicha mutación.

En el reino vegetal, el tipo de mutaciones que se presentan son las numéricas, siendo la haploidía, poliploidía y aneploidía las más comunes en la naturaleza (*in vivo*)[e]. Los antecedentes mencionan que no sólo en la naturaleza se presentan estas alteraciones, sino que durante el cultivo celular (*in vitro*) también; de hecho, sugieren que la producción de metabolitos secundarios está asociada a dichas alteraciones genéticas [90, 91].

Al iniciar la investigación no había antecedentes claros sobre la injerencia del tiempo de cultivo en cualquier tipo de proceso; se sabía que a través del tiempo la producción específica de algún compuesto variaba, pero no se comprometían a plantear una respuesta. **Esto no es de extrañar porque mantener una línea de cultivo por un largo periodo de tiempo requiere un extremo cuidado y la inversión de dinero.**

Fue hasta el estudio publicado en 2005 en el cual se mantienen líneas de cultivo de *Taxus brevifolia* en suspensión para monitorear el contenido genético de los cultivos a través del tiempo y su posible relación con la producción de taxanos, que se pudo vislumbrar una potencial respuesta al comportamiento de la biotransformación [55].

El estudio refiere la presencia de un fenómeno de inestabilidad en el contenido genético en las suspensiones del cultivo, resultando en una condición de **aneuploidía**. Así mismo, se plantea una **coexistencia** entre poblaciones de células con diferente contenido genético en suspensiones mantenidas alrededor de un año, no así en un periodo de 3 a 7 meses en el que se registran diferentes proporciones de poblaciones debidas a las diferentes velocidades de crecimiento en los nuevos arreglos cromosómicos.

---

[e] La haploidía y poliploidía es la disminución y aumento en el número de juegos de cromosomas, respectivamente. En la aneuploidía no hay un número exacto de cromosomas básicos [89].

Tantos cambios genéticos podrían afectar la actividad metabólica de las células y, siendo que la desracemización del 3-hidroxibutanoato de etilo está ligada a un proceso de resolución cinética, las modificaciones de pH en las condiciones de biotransformación tendrían que obedecer a este fenómeno. **Este es el primer registro de la variabilidad de resultados a causa de la temporalidad en biotransformaciones de sustratos exógenos y, este hecho puede incrementar la dificultad para escalar procesos a nivel industrial**.

El microambiente tan dinámico generado en las células ha ocasionado que, aún en células no diferenciadas, se presenten ciertas desventajas que no se han podido controlar y que afectan en algún momento el proceso de biocatálisis. Por ello, si bien es cierto que la biocatálisis ofrece ventajas, también se presentan desventajas como las mencionadas en este trabajo.

Actualmente, se han ideado alternativas de síntesis en las que se comparte la selectividad y especificidad dentro de las reacciones químicas mediante la utilización de más de una fuente biológica (enzimas o células de **diferente organismo**) y/o la conjunción de la **biocatálisis** y **síntesis estereoselectiva**.

La mayoría de los procesos que asocian biocatálisis y catálisis estereoselectiva siguen el principio de resolución cinética dinámica. Durante este proceso, un enantiómero permanece intacto y el otro se convierte en producto asimétrico de interés por medio de reacciones secuenciales de oxidación y reducción en un paso (**adición sincrónica**) o dos pasos (**adición asincrónica**).

Las técnicas de síntesis bajo este proceso abarcan la utilización de cultivos con diferente actividad [92 - 94], la utilización de enzimas con diferente actividad sin importar su origen [95, 96], el uso de enzimas y agentes reductores comunes como el borohidruro de sodio [97], el empleo de enzimas y catalizadores metálicos con un donador de grupos funcionales [98], etc. Todo ello, enfocado al cómo o qué alternativas idear para mejorar la mayoría de los procesos biocatalíticos que siguen una resolución cinética y que sólo ofrecen, teóricamente, el 50% de rendimiento.

En este proyecto, las células de *Taxus globosa* tienen cierta capacidad para distinguir ambos enantiómeros del 3-hidroxibutanoato de etilo, sin embargo, también tienen la capacidad de racemizar el sustrato disminuyendo el poco e.e. obtenido. Por el contrario, *Taxus brevifolia*, sí tiene la capacidad de distinguir entre los enantiómeros ocasionando un incremento en el e.e. vía resolución cinética, con las desventajas en el rendimiento y que las condiciones de reacción varían con el tiempo del cultivo suspensión. Aún así, no se puede descartar el aprovechamiento de ambas especies con capacidades distintas en investigaciones futuras hacia un sistema de reacción conformado por estos dos organismos.

8. CONCLUSIONES

En este proyecto, se utilizaron cultivos celulares en suspensión de *Taxus globosa* y *Taxus brevifolia* para desracemizar el alcohol secundario de un β-hidroxiéster, determinando la influencia de variables como pH, tipo de disolución amortiguadora, presencia de sacarosa, temperatura y cantidad de sustrato, sobre el exceso enantiomérico resultante.

La síntesis del 3-hidroxibutanoato de etilo se realizó mediante síntesis tradicional por medio de una reducción de un compuesto β-cetoéster, obteniendo el 3-hidroxibutanoato de etilo con una pureza de 93 a 97.8%.

Respecto a los cultivos celulares, se logró iniciar y mantener la línea en suspensión de *Taxus globosa* para su utilización en la desracemización del 3-hidroxibutanoato de etilo. En este caso, sólo se obtuvo un **16% de exceso enantiomérico** del 3-hidroxibutanoato de etilo, pero éste se modifica cuando el tiempo de biorreacción se prolonga produciendo un comportamiento oscilatorio hacia una mezcla racémica.

Aunque la presencia de sacarosa aumentó el exceso enantiomérico un 50%, no se lograron obtener valores superiores al utilizar un pH ácido (4 – 6.5), neutro (7) y básico (8 y 9) por lo que **no** se considera un **proceso viable de desracemización**.

Por otro lado, el cultivo celular de *Taxus brevifolia* se inició y el mantenimiento se logró extender por un año y nueve meses, tiempo en el cual se colocaron las reacciones de desracemización del 3-hidroxibutanoato de etilo.

Al contrario de *Taxus globosa*, ***Taxus brevifolia,*** sí tiene la capacidad de distinguir entre los enantiómeros del 3-hidroxibutanoato de etilo y, por medio de una **resolución cinética**, se logra tener el **enantiómero S** con una **pureza** aproximada del **90%** correspondiente a un valor de **exceso enantiomérico de 80%** con una concentración de sustrato racémico de 0.2%V.

La desracemización se lleva a cabo a valores de **pH de 4 y 8** utilizando disoluciones amortiguadoras de fosfatos-citratos y fosfatos, respectivamente. La actividad presentada en ambos valores indica que el **tipo de disolución amortiguadora** no altera el proceso.

La influencia de la temperatura sobre el exceso enantiomérico se pudo determinar comparando la actividad a **20°C** y la presentada en un rango de **±10°C** pues la actividad se reduce a 40°C y se pierde a 50°C. En este rango, el **cambio térmico** modificó la **velocidad de desracemización** ocasionando una variación en el exceso enantiomérico a los 7 días.

Aunque la velocidad de desracemización disminuyó a 10°C, fue posible incrementar el exceso enantiomérico prolongando el tiempo de biorreacción hasta los 11 días, lo cual significa que no existe pérdida de la actividad.

A 30°C, la velocidad de desracemización fue mayor que a 20°C, sin embargo, en un cierto tiempo, la velocidad comenzó a disminuir y el exceso enantiomérico fue menor, por lo que la efectividad del proceso disminuye.

La **temperatura óptima** de biocatálisis fue **25°C**, determinándose gráficamente.

La **presencia de sacarosa** aumentó la velocidad de desracemización produciendo un incremento en el valor de exceso enantiomérico hasta cuatro veces en comparación con la desracemización con disolución amortiguadora.

La **cantidad de sustrato** afectó de manera circunstancial el proceso, incluso nulificándolo. Los valores superiores a 0.2%V ocasionaron un exceso enantiomérico menor al 10%.

Se elucidó el **mecanismo de desracemización** que se lleva a cabo con células de *Taxus brevifolia*, el cual sólo presentó un **10% de estereoinversión** del isómero R y, en su mayoría, la desracemización del medio de biorreacción se originó por una **resolución cinética** del mismo enantiómero; debido a esto, la mayoría de los rendimientos no superaron el **50%**.

Bajo un panorama de resolución cinética, la disminución del exceso enantiomérico a medida que aumenta la cantidad de sustrato podría sugerir un mecanismo de **inhibición por sustrato**, sin embargo, los elementos presentados en este trabajo sugirieron que el **enantiómero R** pudo presentar cierta **toxicidad** provocando la **muerte del cultivo** y **supresión de la actividad**.

La realización de las biodesracemizaciones en tiempo real nos permitió determinar la influencia de la **edad de los cultivos** pues, a través del tiempo, se registraron dos valores de pH, 4 y 8, en los cuales se obtuvieron excesos enantioméricos favorables para considerarlo como un proceso viable de desracemización.

Este trabajo es el primer registro de la variabilidad de resultados en una reacción de desracemización, e incluso en biotransformaciones, a causa de la **temporalidad** en los cultivos celulares en suspensión sobre sustratos exógenos.

Con base en este trabajo, podemos observar que, a pesar de que ambos cultivos pertenecen al género *Taxus*, la **respuesta** frente a un sustrato exógeno racémico como lo es el 3-hidroxibutanoato de etilo no es la misma. Mientras que ***Taxus globosa*** tiende a **racemizar**, ***Taxus brevifolia*** permite el enriquecimiento del **enantiómero S vía resolución cinética**.

Es un hecho que la biocatálisis mediante cultivos celulares y la síntesis enantioselectiva tradicional no se pueden comparar tanto en tiempo invertido como efectivo. Mientras que en la síntesis tradicional se tiene cierto control sobre las variables que pueden afectar una reacción, en biocatálisis se tiene poco control debido a las innumerables variables fisicoquímicas que se vuelven inherentes al trabajar con un **organismo con metabolismo propio** como producción de masa celular, transporte celular, solubilidad de reactivos en medio acuoso, condiciones de biorreacción, fisiología celular, presencia de contaminación, toxicidad, etc.

La incorporación de la biocatálisis en el desarrollo de procesos más eficientes, tanto en productos benéficos como dañinos, implica elevar los costos y la infraestructura de producción, pero a pesar de esto, la investigación debe apostar por descubrir o mejorar los procesos ya existentes.

9. REFERENCIAS

1. http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/stereo

2. http://www.fda.gov/caer/guidance/stereo.htm

3. Hutt, A.J.; Valentorá, J.; The chiral switch: The development of single enantiomer drugs from racemate. **Acta Facult. Pharma. Univ. Comenianae**, 2003, 50, 7 – 23.

4. http://pubs.acs.org/cen/coverstory/8118/8118chiral2.html

5. Jacques, J.; Collet, A.; Wilen, S.; **Enantiomers, racemates and resolutions**. E.U.: Ed. Krieger Publishing Company, 1991. 447 pp.

6. Atta-ur-Rahman; Zahir, Shah; **Stereoselective synthesis in Organic Chemistry**. E.U.: Springer-Verlag, 1993. 522 pp.

7. http://en.wikipedia.org/wiki/Organocatalysis

8. Gaunt, Matthew J.; Johansson, Carin C. C.; McNally, Andy; Vo, Ngoc T.; Enantioselective organocatalysis. **Drug Discov. Today**, 2007, 12, 8 – 27.

9. http://www.chem.wisc.edu/areas/organic/studsemin/mainfeld/mainfeld-abs.pdf

10. http://en.wikipedia.org/wiki/Catalyst

11. Stryer, Lubert. **Bioquímica**. España: Ed. Reverté, S. A., 1995. 11a. pág. 24; 11b pág. 36.

12. http:/www.ucm.es/info/crismine/Cristóbal_quiralidad/Cristales_origen_vida.htm

13. Engel, M. H.; Nagy, B.; Distribution and enantiomeric composition of amino acids in the Murchison meteorite. **Nature**, 1982, 296, 837.

14. Goldanskii, V. I.; Kuzmin, V. V.; Spontaneous mirror symmetry breaking in nature and the origin of life. **Z. Phys. Chem.**, 1988, 269, 216 – 274.

15. Joyce, G. F.; Visser, G. M.; van Boeckel, C. A. A.; van Boom, J. H.; Orgel, L. E.; Westrenon, J.; Chiral selection in poly(C)-directed synthesis of oligo(G). **Nature***,* 1984, 310, 602 – 603.

16. Kletetschka, G.; Kohout, T.; Wasilewski, P. J.; Magnetic remanence in the Murchison meteorite. **Meteorit. Planet. Sci.**, 2003, 38, 399 - 405.

17. Bailey, J.; Astronomical sources of circularly polarized light and the origin of homochirality. **Origins Life Evol. Biosphere**, 2001, 31, 167 – 183.

18. Bailey, J. M.; RNA-Directed amino acid homochirality. **FASEB J.**, 1998, 12, 503 – 507.

19. http://www.pagina12.com.ar/2000/suple/futuro/00-03-11/NOTA_A.HTM

20. Bommarius, Andreas S.; Riebel, Bettina R.; **Biocatalysis**. Alemania: Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2004. pág. 15.

21. Koeller, Kathryn M.; Wong, Chi-Huey; Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, 2001, 409, 232 – 240.

22. Thomas, Stuart M.; DiCosimo, Robert; Nagarajan, Vasantha; Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. **Trends Biotechnol.**, 2002, 20, 238 – 242.

23. Burton, Stephanie G.; Cowan, Don A.; Woodley, John M.; The search for the ideal biocatalyst. **Nat. Biotechnol.**, 2002, 20, 37 – 45.

24. Gruber, Christian C.; Lavandera, Iván; Faber, Kurt; Kroutil, Wolfgang; From a racemate to a single enantiomer: Deracemization by stereoinversion. **Adv. Synth. Catal.**, 2006, 348, 1789 – 1805.

25. Strauss, U. T.; Felfer, U.; Faber, K.; Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess. **Tetrahedron: Asymmetry**, 1999, 10, 107 – 117.

26. http://www.tesisenxarxa.met/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0406103-215825//ivm05de14.pdf

27. Gawley, Robert E.; Do the terms “%ee” and “%de” make sense as expressions of stereisomer composition or stereoselectivity?. **J. Org. Chem.**, 2006, 71, 2411 – 2416.

28. http://mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/farmacognosiaPE80/GC.doc

29. Nakamura, Kaoru; Fujii, Mikio; Ida, Yoshiteru; Stereinversion of arylethanols by *Geotrichum candidum*. **Tetrahedron: Asymmetry**, 2001, 12, 3147 – 3153.

30. Comasseto, João Valdir; Andrade, Leandro Helgueira; Takeo Omori, Álvaro; Fernandes Assis, Leonardo; Meleiro Porto, André Luiz; Deracemization of aryl ethanols and reduction of acetophenones by whole fungal cells of *Aspergillus terreus* CCT 4083, *A. terreus* CCT 3320 and *Rhizopus oryzae* CCT 4964. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 2004, 29, 55 – 61.

31. Comasseto, João V.; Omori, Álvaro T.; Andrade, Leandro H.; Porto, André L. M.; Bioreduction of fluoroacetophenones by the fungi *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*. **Tetrahedron: Asymmetry**, 2003, 14, 711 – 715.

32. Nakamura, Kaoru; Inoue, Yuko; Matsuda, Tomoko; Ohno, Atsuyoshi; Microbial deracemization of 1-arylethanol. **Tetrahedron Lett.**, 1995, 36: 6263-6266.

33. Allan, Graham R.; Carnell, Andrew J.; Microbial deracemization of 1-aryl and 1-heteroaryl secondary alcohols. **J. Org. Chem.**, 2001, 66, 6495 – 6497.

34. Kato, Dai-ichiro; Mitsuda, Satoshi; Ohta, Hiromichi; Microbial deracemization of α-substituted carboxylic acids. **Org. Lett.**, 2002, 4, 371 – 373.

35. Strauss, Ulrike T.; Faber, Kurt; Deracemization of (±)-mandelic acid using a lipase-mandelate racemase two-enzyme system. **Tetrahedron: Asymmetry**, 1999, 10, 4079 – 4081.

36. Baskar, B.; Pandian, N. G.; Priya, K.; Chadha, Anju; Deracemisation of aryl substituted α-hydroxy esters using *Candida parapsilosis* ATCC 7330: effect of substrate structure and mechanism. **Tetrahedron**, 2005, 61, 12296 – 12306.

37. Padhi, Santosh Kumar; Chadha, Anju; Deracemisation of aromatic β-hydroxy esters using immobilised whole cells of *Candida parapsilosis* ATCC 7330 and determination of absolute configuration by ^{1}H NMR. **Tetrahedron: Asymmetry**, 2005, 16, 2790 – 2798.

38. Chadha, Anju; Baskar, Baburaj; Biocatalytic deracemisation of α-hydroxy esters: high yield preparation of (S)-ethyl 2-hydroxy-4-phenylbutanoate from the racemate. **Tetrahedron: Asymmetric**, 2002, 13, 1461 – 1464.

39. Thangavel, Vaijayanthi; Chadha, Anju; Preparation of optically pure (3E,5E)-alkyl-2-hydroxy-6-arylhexa-3,5-dienoates by *Candida parapsilosis* ATCC 7330 mediated deracemisation of the racemates. **Tetrahedron**, 2007, xx, 1 – 8.

40. Goswami, Animesh; Mirfakhrae, David; Patel, Ramesh N.; Deracemization of racemic 1,2-diol by biocatalytic stereoinversion. **Tetrahedron: Asymmetry**, 1999, 10, 4239 – 4244.

41. Demir, Ayhan S.; Mamamci, Haluk; Sesenoglu, Ozge; Neslihanoglu, Rahsan; Asikoglu, Beril; Capanoglu, Doga; Fungal deracemization of benzoin. **Tetrahedron Lett.**, 2002, 43, 6447 – 6449.

42. Kato, Dai-Ichiro; Miyamoto, Kenji; Ohta, Hiromihi; Microbial deracemization of α-amino acids. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 2005, 32, 157 – 165.

43. Xie, S.-X.; Ogawa, J.; Shimizu, S.; Production of (R)-3-pentyn-2-ol through stereoinversion of racemic 3-pentyn-2-ol by *Nocardia fusca* AKU 2123. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 1999, 52, 327 – 331.

44. Ogawa, A. J.; Xie, S.-X.; Shimizu, S.; Stereinversion of optically active 3-pentyn-2-ol by *Nocardia* species. **Biotechnol. Lett.**, 1999, 21, 331 – 335.

45. Shimizu, S.; Hattori, S.; Hata, M.; Yamada, H.; One-step microbial conversion of a racemic mixture of pantoyl lactone to optically active D-(-)-pantoyl lactone. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1987, 53, 519 – 522.

46. Buisson, D.; Azerad, R.; Sanner, C.; Larcheveque, M. A.; A study of the stereocontrolled reduction of aliphatic β-ketoesters by *Geotrichum candidum*. **Biocatalysis**, 1992, 5, 249 – 265.

47. Padhi, S. K.; Pandian, N. G.; Chadha, A.; Microbial deracemisation of aromatic β-hydroxy acid esters. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 2004, 29, 25 – 29.

48. Takemoto, Masumi; Achiwa, Kazuo; Deracemization of racemic 4-pyridyl-1-ethanol by *Catharanthus roseus* cell cultures. **Phytochemistry**, 1998, 49, 1627 – 1629.

49. Takemoto, Masumi; Matsuoka, Yuki; Achiwa, Kazuo; Kutney, James Peter; Biocatalytic dediastereomerization of dibenzylbutanolides by plant cell cultures. **Tetrahedron Lett.**, 2000, 41, 499 – 502.

50. Andrade, L. H.; Utsunomiya, R. S.; Omori, A. T.; Porto, A. L. M.; Comasseto, J. V.; Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 2006, 38, 84 – 90.

51. http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/423/cap9.html

52. http://www.pagina12.com.mar/1999/suple/futuro/99-01-23/pagina2.htm

53. http://oag.state.ny.us/press/2004/aug/aug9a_04_spanish.html

54. http://www.iucnredlist.org/search/details.php/34041/all

55. Baebler, Špela; Hren, Matjaž; Camloh, Marjana; Ravnikar, Maja; Bohanec, Borut; Plaper, Igor; Ucman, Robert; Žel, Jana; Establisment of cell suspension cultures of Yew (*Taxus x media* Rehd.) and assessment of their genomic stability. **In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, 2005, 41, 338 – 343.

56. Kim, Beum Jun; Gibson, Donna M.; Shuler, Michael L.; Effect of subculture and elicitation on instability of Taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures. **Biotechnol. Prog.**, 2004, 20, 1666 – 1673.

57. Ketchum, R. E. B.; Gibson, D. M.; Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, 1996, 46, 9 – 16.

58. Villa Molinari, Levati; Aragozzini, F.; Stereoselective reduction of ketones by plant cell cultures. **Biotechnol. Lett.**, 1998, 20, 1105 – 1108.

59. Akakabe, Yoshihiko; Takahashi, Mirai; Kamezawa, Makoto; Kikuchi, Keiichi; Tachibana, Hojun; Ohtani, Takehiko; Naoshima, Yoshinobu; Biocatalytic preparation of chiral alcohol by enantioselective reduction with immobilized of carrot. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1**, 1995, 1295 – 1298.

60. Blacker, A. J.; Holt, R. A.; Development of a multi-stage chemical and biological process for an optically active intermediate for an antiglaucoma drug, 1997. In: Collins, A. N. Sheldrake, G.N. Crosby, J. **Chirality in industry II**. UK: Ed. Wiley, 245 – 262.

61. Mori, K.; Synthesis of optically active pheromones. **Tetrahedron**, 1989, 45, 3233 – 3298.

62. http://en.wikipedia.org/wiki/Carbapenem

63. Bucciarelli, María; Davoli, Paolo; Forni, Arrigo; Moretti, Irene; Prati, Fabio; Enantioselective lipase-catalized acetylation of β-lactam precursors of carbapenem antiobiotics. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, 1999, 2489-2494.

64. Seebach, D.; Chow, H-F.; Jackson R. F. W.; Sutter, M. A.; Thaiseivongs, S.; Zimmermann, J.; (+)-11,11'-di-*O*-methylelaiophylidene – preparation from Elaiophylin and total synthesis from (R)-3-hydroxybutyrate and (S)-malate. **Liebig's Ann. Chem.**, 1986, 1281 – 1308.

65. Seebach, D.; Zuger, M. F.; Uber die depolymerisierung von poly-(R)-3-hydroxy-buttersaureester (PHB). **Helv. Chim. Acta**, 1982, 65, 495 – 503.

66. Seebach, D.; Roggo, S.; Zimmermann, J.; Biological-chemical preparation of 3-hydroxycarboxylic acids and their use in epc-syntheses, 1987. In: Bartmann, W. Sharpless, K. B. **Stereochemistry of organic and bioorganic transformation**. Workshop Conferences Hoechst, vol 17. Alemania: Ed. VCH, 85 – 126.

67. Chiba, T.; Nakai, T.; A synthetic approach to (+)-thienamycin from methylene (R)-3-hydroxybutanoate. A new entry to (3R,4R)-3[(R)-1-hycroxyethyle]-4-acetoxy-2-azetidinone. **Chem. Lett.**, 1985, 651 – 654.

68. Wickremesinhe, Enaksha R. M.; Arteca, Richard N.; *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, 1993, 35, 181 – 193.

69. Sandoval, Consuelo; Méndez, José M.; Sánchez-Obregón, Rubén; Alpízar, Carmen B.; Barrios, Héctor; Biotransformations by cell suspension of *Taxus* species. Reductions and cyclization. **Biocatal. Biotransform.** aceptado.

70. http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema08MI.html

71. Kato, Dai-ichiro; Mitsuda, Satoshi; Ohta, Hiromichi; Microbial Deracemization of α-substituted carboxilic acid: substrate specificity and mechanistic investigation. **J. Org. Chem.**, 2003, 68, 7234 – 7242.

72. Larissegger-Schnell, Barbara; Glueck, Silvia M.; Kroutil, Wolfgang; Faber, Kurt; Enantio-complementary deracemization of (±)-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid and (±)-3-phenyllactic acid using lipase-catalysed kinetic resolution combined with biocatalytic racemization. **Tetrahedron**, 2006, 62, 2912 – 2916.

73. Zambianchi, F.; Pasta, P.; Ottolina, G.; Carrea, G.; Colonna, S.; Gaggero, N.; Ward, J. M.; Effect of sustrate concentration on the enantioselectivity of cyclohexanone monooxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus* and its rationalization. **Tetrahedron: Asymmetric**, 2000, 11, 3653 – 3657.

74. Alpízar Muñoz, Carmen Beatriz; Cuantificación de proteínas en cultivos vegetales utilizados como medios de biorreducción. Tesis de Licenciatura, **UNAM,** 2004.

75. Audersik, Teresa; Audersik, Gerald; **Biología**. México: Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana S. A., 1997. 75a pág. 63 – 68; 75b pág. 110; 75c pág. 66.

76. http://en.wikipedia. org/wiki/Buffer_solution

77. Kawasaki, Hisashi; Koyama, Koutaro; Kurokawa, Sachio; Watanabe, Kunihiko; Nakazawa, Masakasu; Izawa, Kunisuke; Nakamatsu, Tsuyoshi; Production of (R)-3-amino-3-phenylpropionic acid and (S)-3-amino-3-phenylpropionic acid form (R,S)-N-acetyl-3-amino-3-phenylpropionic acid using microorganisms having enantiomer-specific amidohydrolyzing activity. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 2006, 70, 99 – 106.

78. http://www-biolpaisley.ac.uk/KINETICS/Chapter_3/chapter3_6.html

79. http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/inhibition.html

80. Pan, Jian-Lian; Syu, Mei-Jywan; Kinetic study on substrate and product inhibitions for the formation of 7-amino-3-deacetoxy cephalosporanic acid from cephalosporin G by immobilized penicillin G acylase. **Biochem. Eng. J.**, 2005, 23, 203 – 210.

81. Brunhuber, Norbert M. W.; Mort, Jessica L.; Christoffersen, Rolf E.; Reich, Norbert O.; Steady-state kinetic mechanism of recombinant avocado ACC Oxidase: initial velocity and inhibitor studies. **Biochemistry**, 2000, 39, 10730 – 10738.

82. Kuriyama, Isoko; Asano, Naoki; Kato, Ikuo; Oshige, Masahiko; Sugino, Akio; Kadota, Yasuhiro; Kuchitsu, Kazuyuki; Yoshida, Hiromi; Sakaguchi, Kengo; Mizushina, Yoshiyuki; L-Homoserylaminoethanol, a novel dipeptide alcohol inhibitor of eukaryotic DNA polymerase ε from a plant cultured cells, *Nicotina tabacum* L. **Bioorg. Med. Chem.**, 2004, 12, 957 – 962.

83. Bódalo, A.; Gómez, J. L.; Gómez, E.; Bastida, J.; León, G.; Máximo, M. F.; Hidalgo, A. M.; Montiel, M. C.; Kinetic calculations in the enzymatic resolution of DL-amino acids. **Enzyme Microb. Technol.**, 1999, 24, 381 – 387.

84. Onysko, Kira A.; Budman, Hector M.; Robinson, Campbell W.; Effect of temperature on the inhibition kinetics of phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* Q5. **Biotechnol. Bioeng.**, 2000, 70, 291 – 299.

85. Kroutil, Wolfgang; Faber, Kurt; Deracemization of compounds possessing a sec-alcohol or –amino group through a cyclic oxidation-reduction sequence: a kinetic treatment. **Tetrahedron: Asymmetry**, 1998, 9, 2901 – 2913.

86. Namdeo, A. G.; Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Phcog. Rev.**, 2007, 1, 69 – 79.

87. Ramos-Lobato, N. A.; Soto-Hernández, M.; Zavala-Chávez, F.; Rodríguez-González, M. T.; Taxoides en el follaje del Tejo Mexicano. **Revista Chapingo**, Serie Horticultura, 2003, 9, 29 – 38.

88. Soto Hernández, Marcos; Sanjurjo, Marisol; González Garza, María Teresa; Cruz Vega, Delia; Giral González, Francisco; El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.). Potencial de su aprovechamiento en taxol. **Ciencia Ergo Sum.**, 2001, 7, 277 – 278.

89. http://sivb.org/plant_archives/P-VOLUMEN.HTM

90. Košuth, Ján; Koperdáková, Jana; Tolonen, Ari; Hohtola, Anja; Cellárová, Eva; The content of hypericins and phloroglucinols in *Hypericum perforatum* L. seedlings at early stage of development. **Plant Sci.**, 2003, 165, 515 – 521.

91. Griesbach, R. J.; Kamo, K. K.; The effect of induced polyploidy on the flavonols of *Petunia* 'Mitchell'. **Phytochemistry**, 1996, 42, 361 – 363.

92. Fantin, Giancarlo; Fogagnolo, Marco; Giovannini, Pier Paolo; Medici, Alessandro; Petrini, Paola; Combined microbial oxidation and reduction: a new approach to the high yield synthesis of homochiral unsaturated secondary alcohols from racemates. **Tetrahedron: Asymmetry**, 1995, 6, 3047 – 3053.

93. Shimizu, Sakayu; Hattori, Shizuo; Hata, Hiroyuki; Yamada, Hideaki; Stereoselective enzymatic oxidation and reduction system for the production of D(-)-pantoyl lactone

from a racemic mixture of pantoyl lactone. **Enzyme Microb. Technol.**, 1987, 9, 411 – 416.

94. Takahashi, Eiji; Nakamichi, Katsuhiko; Furui, Masakatsu; R-(-)-mandelic acid production from racemic mandelic acids using *Pseudomonas polycolor* IFO 3918 and *Micrococcus freudenreichii* FERM-P 13221. **J. Ferment. Bioeng.**, 1995, 80, 247 – 250.

95. Gadler, P.; Glueck, S. M.[†]; Kroutil, W.; Nestl, B. M.[†]; Larissegger-Schnell, B.; Ueberbacher; Wallner, B. T.[†]; Faber, K.; Biocatalytic approaches for the quantitative production of single estereoisomers from racemates. **Biochem. Soc. Trans.**, 2006, 34, 296 – 300.

96. Schnell, Barbara; Faber, Kurt; Kroutil, Wolfgang; Enzymatic racemisation and its application to synthetic biotransformations. **Adv. Synth. Catal.**, 2003, 345, 653 – 666.

97. Soda, Kenji; Oikawa, Tadao; Yokoigawa, Kumio; One-pot chemo-enzymatic enantiomerization of racemates. J**. Mol. Catal. B: Enzym.**, 2001, 11, 149 – 153.

98. Páimies, Oscar; Bäckvall, Jan-E[†]; Combines metal catalysis and biocatalysis for an efficient deracemization process. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 2003, 14, 407 – 413.

10. APÉNDICE

10.1. LISTA DE FUENTES BIOLÓGICAS CITADAS

ORGANISMO O ENZIMA	REINO
Acinetobacter calcoaceticus	BACTERIA
Aspergillus terreus	FUNGI (HONGO)
Camellia sinensis	PLANTAE
Candida parapsilosis	FUNGI (LEVADURA)
Catharanthus roseus	PLANTAE
Daucus carota	PLANTAE
Geotrichum candidum	FUNGI (HONGO)
Hypericum perforatum L.	PLANTAE
Micrococcus freudenreichii	BACTERIA
Nocardia diaphanozonaria	BACTERIA
Nocardia fusca	BACTERIA
Nocardia pseudosporangifero	BACTERIA
Nicotiana tabacum	PLANTAE
Petunia 'Mitchell'	PLANTAE
Pseudomonas polycolor	BACTERIA
Rhizopus oryzae	FUNGI (HONGO)
Rhodococcus erythropolis	BACTERIA
Shingomonas paucimobilis	BACTERIA
Zingiber officinale	PLANTAE

TABLA 2

10.2. ESPECIFICACIONES DE MATERIAL

- Matraces Erlenmeyer, papel aluminio, material de vidrio y termómetro

- Tubos, puntas y micropipetas EPPENDORF

- Balanza SCIENTECH modelo N° SA120 y ACCULAB V-600

- Autoclaves MARKET FORGE STERILMATIC y TecCCA

- Campana de condiciones estériles con flujo laminar en posición horizontal VECO modelo HOR N° GHFL-A-12

- Agitadoras orbitales GALLEBKAMP, ESEVE^{MR} 6090 y LAB LINE

- Medidor de pH Φ340 BECKMAN con electrodo HI 1131B

- Centrífuga Biofuge primo R HARAEUS

- Rotavapor BUCHI modelo R-200

- Recirculador SEV modelo ECO 10

- Cromatógrafo de Gases AGILENT 6890 con software de Hewlett Packard 6890 Driver

- Columna quiral de RESTEK RT-γDEXsa 30mx0.32mmIDx0.25μm No. 13112. Las condiciones del análisis fueron: velocidad de flujo constante de 20 ml/min utilizando helio como gas acarreador, temperatura del inyector y del detector de ionización a flama de 200°C, temperatura del horno de 90°C y split de 20

- Columna no quiral de ALLTECH AT™ - AquaWax 30mx0.25mmIDx0.25μm No. 12437. Las condiciones del análisis fueron: velocidad de flujo constante 20 ml/min utilizando helio como gas acarreador, temperatura del inyector y del detector de ionización a la flama de 230°C, temperatura del horno de 130°C y split de 200

- Espectrofotómetro VARIAN 300 MHz

- Las Figuras y Tablas fueron diseñadas mediante el SOFTWARE de Windows XP con programas como CS ChemDraw Ultra, Microsoft Office 2003 (Word y Excel) y Paint.

10.3. ESPECTROSCOPIA

Acetoacetato de etilo. Líquido incoloro. RMN-^{1}H ($CDCl_3$): d 4.207 (2H, c, J=7.07 Hz), 3.453 (2H, s), 2.278 (3H, s), 1.288 (3H, t, J=7.07 Hz); Espectro 1.

3-Hidroxibutanoato de etilo. Líquido incoloro. $[\alpha]^{25}_D$ = -6.15° (c=1, $CHCl_3$); RMN-^{1}H ($CDCl_3$): δ 4.230-4.182 (1H, m), 4.176 (2H, c, J=7.07 Hz), 2.571 (1H, s,+D2O), 2.498 (1H, dd, J=16.4, 3.9 Hz), 2.426 (1H, dd, J=16.4, 8.4 Hz), 1.279 (3H, t, J=7.07 Hz), 1.230 (3H, d, J=6.6 Hz); Espectro 2 y 3.

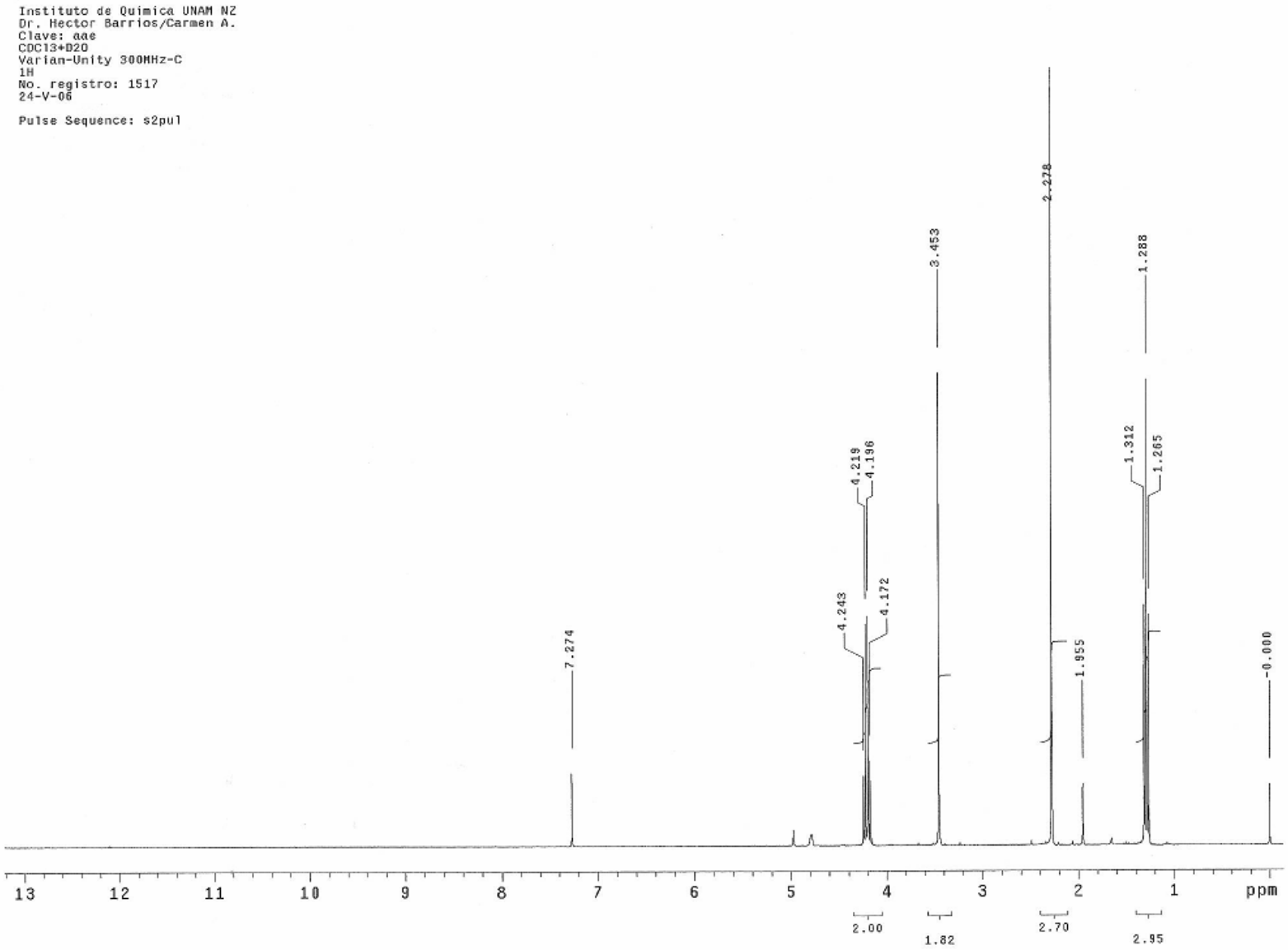
3-Hidroxibutanoato de etilo (desracemizado). Líquido incoloro. $[\alpha]^{25}_D$ = +3.55° Exp.[a] ($CHCl_3$), (S) $[\alpha]^{25}_D$ = +43° (c=1, $CHCl_3$) Lit., (R) $[\alpha]^{25}_D$ = -46° (c=1, $CHCl_3$) Lit.; RMN-^{1}H ($CDCl_3$): δ 4.275-4.199 (1H, m), 4.178 (2H, c, J=7.12 Hz), 2.821 (1H, s,+D2O), 2.500 (1H, dd, J=16.4, 3.9 Hz), 2.412 (1H, dd, J=16.4, 8.5 Hz), 1.280 (3H, t, J=7.12 Hz), 1.233 (3H, d, J=6.6 Hz); Espectro 4 y 5.

Cabe señalar que la utilización de la RMN-1H sólo fue indicativo de que el compuesto aislado de la biotransformación era 3-hidroxibutanoato de etilo.

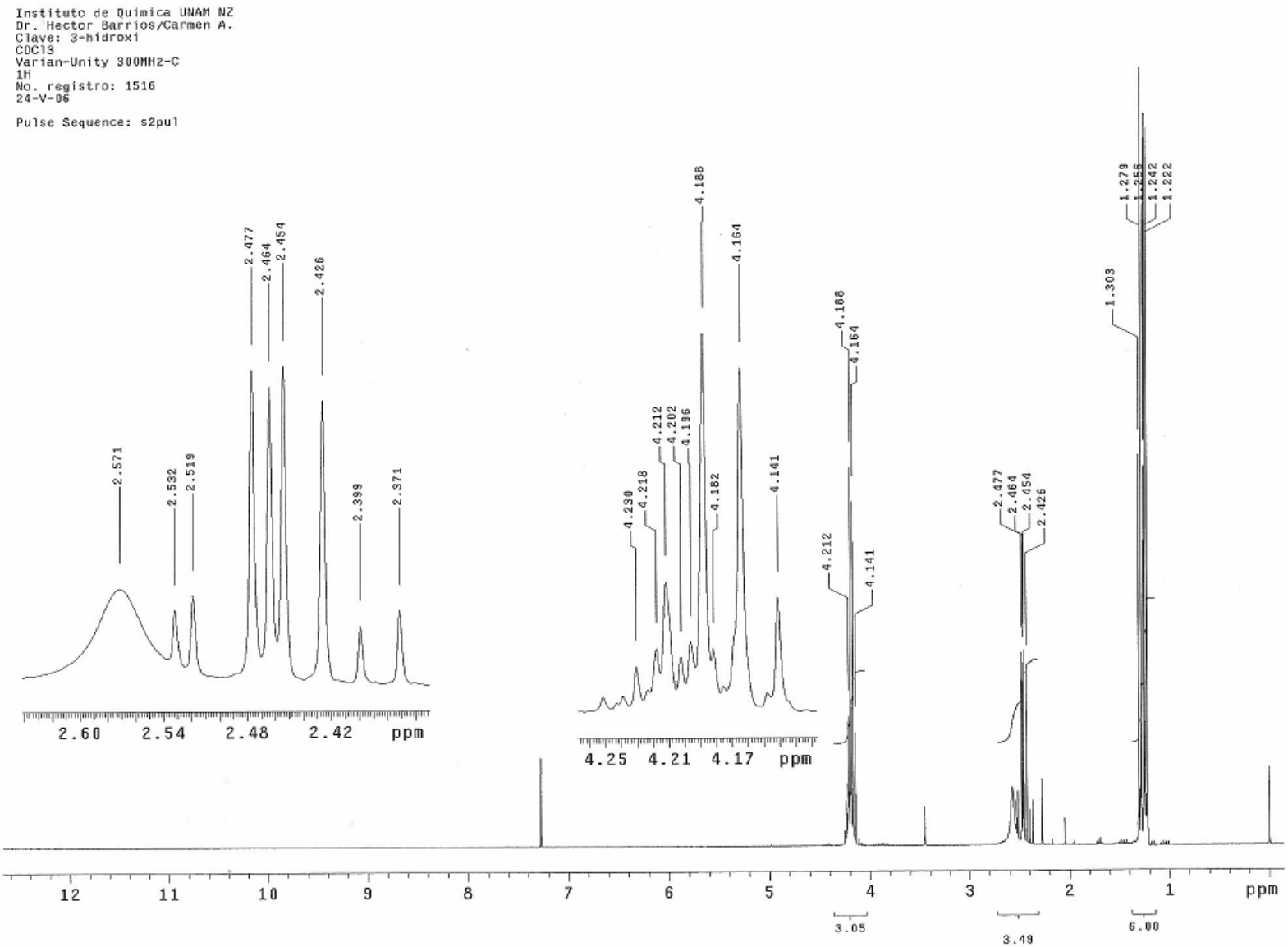
---

[a] Valor proveniente de colocar 245.5 g de células de *Taxus brevifolia* (peso húmedo), 701 ml de amortiguador de fosfatos + 10% Sacarosa pH 8 y 1.405 ml de sustrato racémico. La fecha de colocación fue Mayo de 2006.

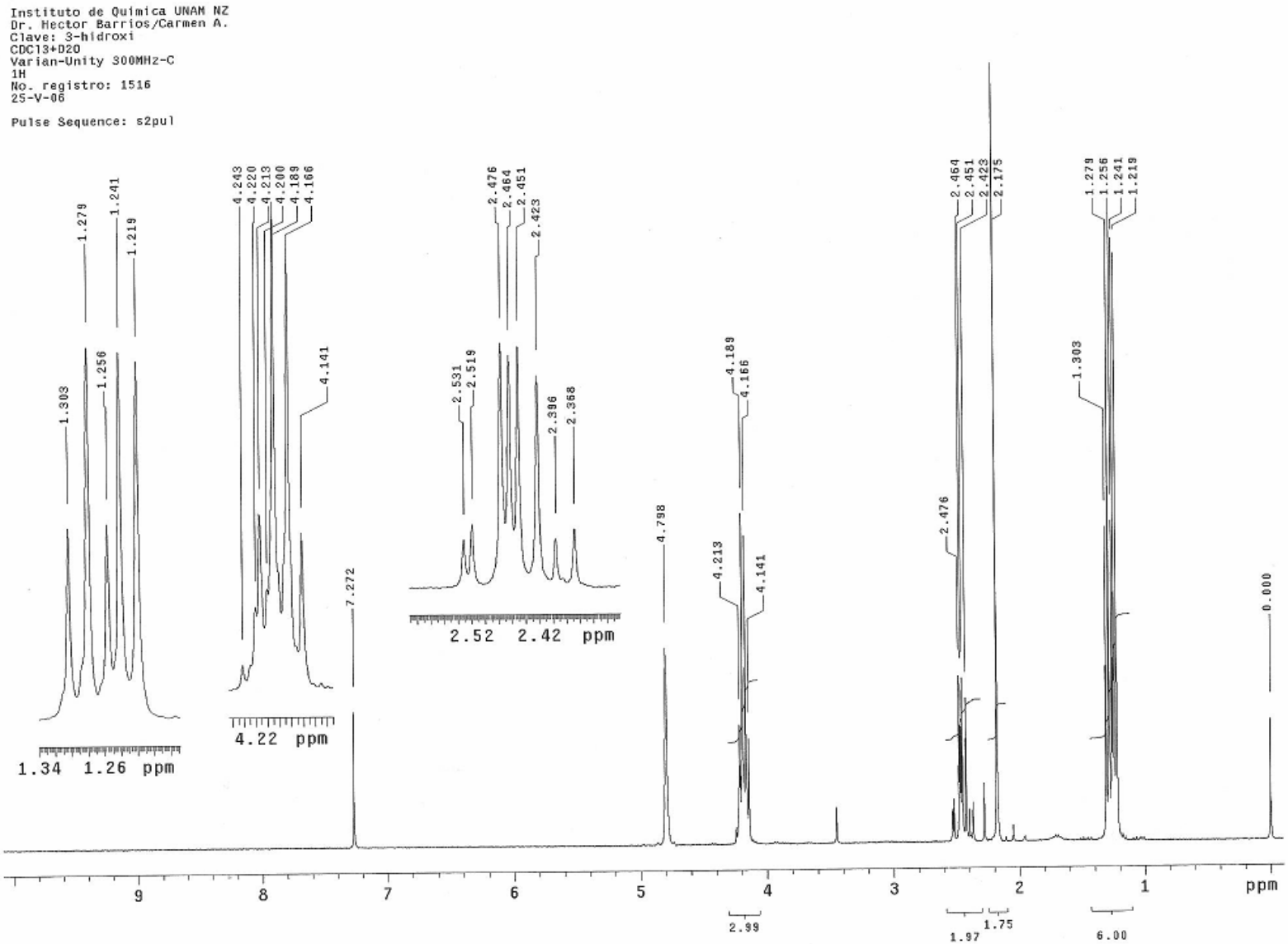
Espectro 1


Instituto de Quimica UNAM NZ
Dr. Hector Barrios/Carmen A.
Clave: aae
CDCl3+D2O
Varian-Unity 300MHz-C
1H
No. registro: 1517
24-V-06
Pulse Sequence: s2pul
7.274
4.243
4.219
4.196
4.172
3.453
2.278
1.955
1.312
1.288
1.265
-0.000
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
2.00
1.82
2.70
2.95

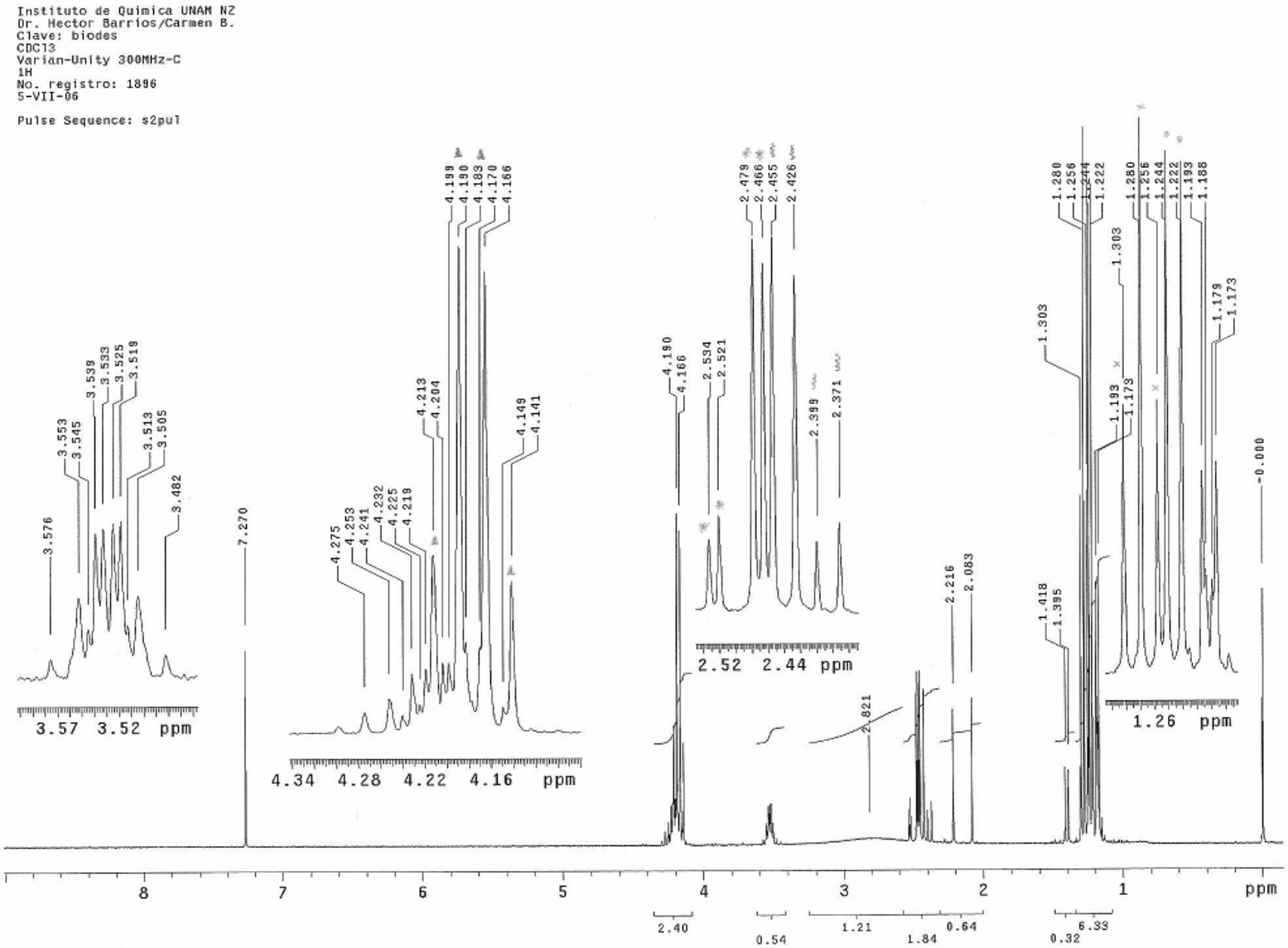
Espectro 2


Instituto de Quimica UNAM NZ
Dr. Hector Barrios/Carmen A.
Clave: 3-hidroxi
CDCl3
Varian-Unity 300MHz-C
1H
No. registro: 1516
24-V-06
Pulse Sequence: s2pul
2.571
2.532
2.519
2.477
2.464
2.454
2.426
2.399
2.371
2.60 2.54 2.48 2.42 ppm
4.230
4.218
4.212
4.202
4.196
4.188
4.182
4.164
4.141
4.25 4.21 4.17 ppm
4.188
4.164
4.212
4.141
2.477
2.464
2.454
2.426
1.303
1.279
1.256
1.242
1.222
12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 ppm
3.05
3.49
6.00

Espectro 3


Instituto de Quimica UNAM NZ
Dr. Hector Barrios/Carmen A.
Clave: 3-hidroxi
CDCl3+D2O
Varian-Unity 300MHz-C
1H
No. registro: 1516
25-V-06
Pulse Sequence: s2pul
1.279
1.241
1.219
1.303
1.256
1.34 1.26 ppm
4.243
4.220
4.213
4.200
4.189
4.166
4.141
4.22 ppm
7.272
2.476
2.464
2.451
2.423
2.531
2.519
2.396
2.368
2.52 2.42 ppm
4.798
4.189
4.166
4.213
4.141
2.464
2.451
2.423
2.175
2.476
1.279
1.256
1.241
1.219
1.303
0.000
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
2.99
1.97
1.75
6.00

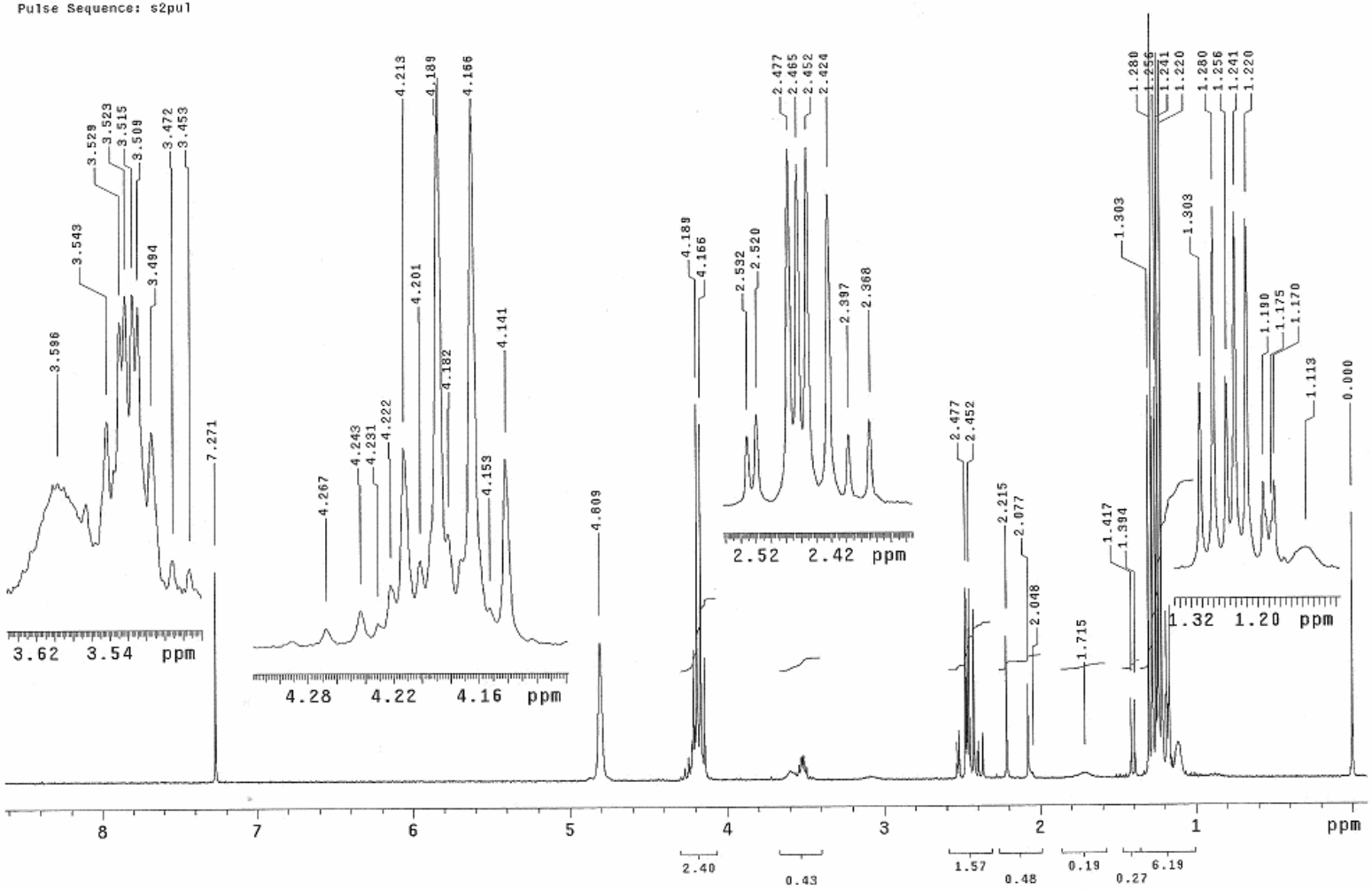
Espectro 4


Instituto de Quimica UNAM NZ
Dr. Hector Barrios/Carmen B.
Clave: biodes
CDCl3
Varian-Unity 300MHz-C
1H
No. registro: 1896
5-VII-06
Pulse Sequence: s2pul
3.576
3.553
3.545
3.539
3.533
3.525
3.519
3.513
3.505
3.482
7.270
4.275
4.253
4.241
4.232
4.225
4.219
4.213
4.204
4.199
4.190
4.183
4.170
4.166
4.149
4.141
4.190
4.166
2.534
2.521
2.479
2.466
2.455
2.426
2.399
2.371
2.821
2.216
2.083
1.418
1.395
1.303
1.280
1.256
1.244
1.222
1.193
1.173
1.179
1.173
-0.000
3.57 3.52 ppm
4.34 4.28 4.22 4.16 ppm
2.52 2.44 ppm
1.26 ppm
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
2.40
0.54
1.21
1.84
0.64
0.32
6.33

Espectro 5

Instituto de Quimica UNAM NZ
Dr. Hector Barrios/Carmen B.
Clave: biodes
CDCl3+D2O
Varian-Unity 300MHz-C
1H
No. registro: 1896
5-VII-06

Pulse Sequence: s2pul

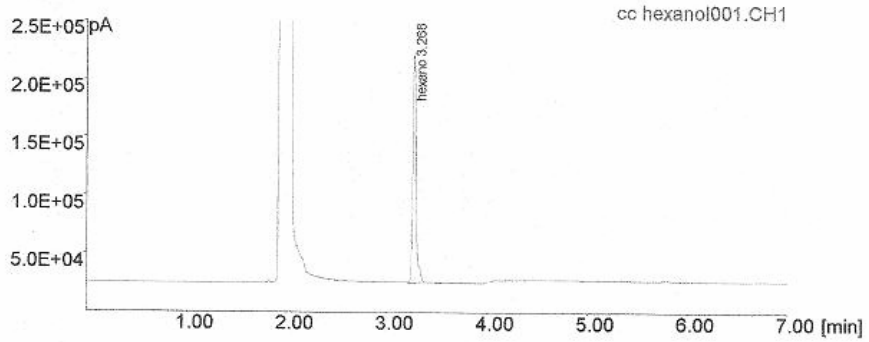


10.4. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA DE GASES

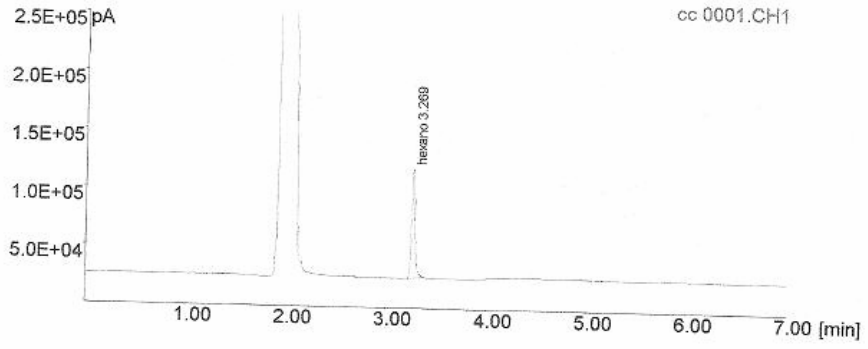
Para el análisis cromatográfico, se realizó una disolución nominal de 3-hidroxibutanoato de etilo en etanol de la cual se tomó cierto volumen para tener una serie de mezclas con un gradiente de concentración adicionando una cantidad constante de estándar interno (hexanol).

Estas disoluciones se inyectaron en el cromatógrafo de gases obteniendo los siguientes perfiles cromatográficos.

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI

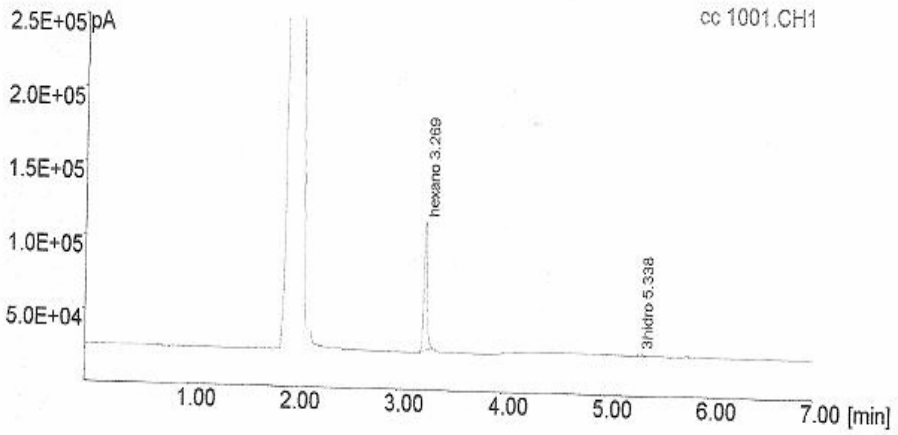


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.268	382051	100.000

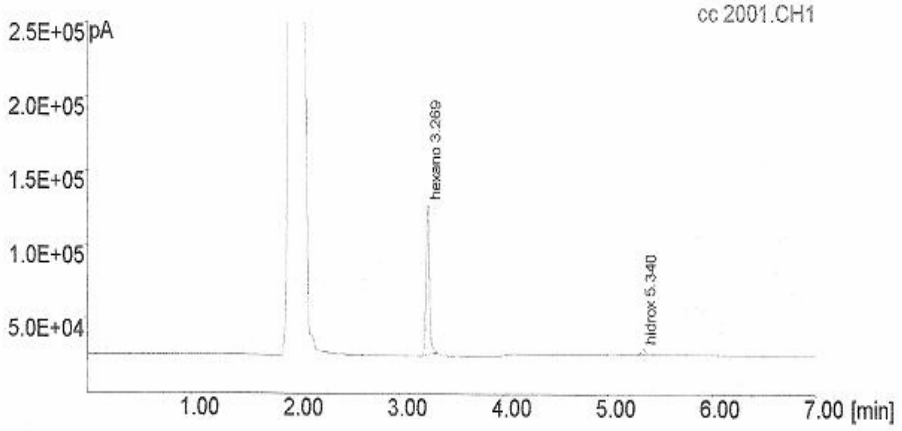


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.269	189652	100.000

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI

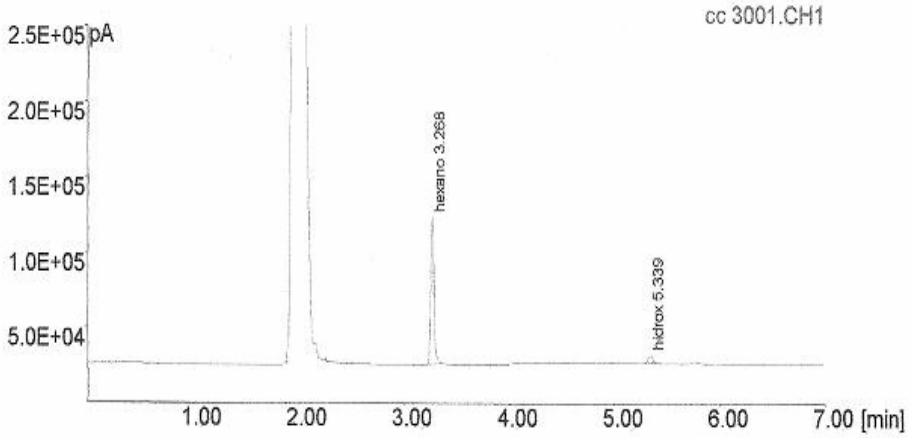


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.269	165498	97.486
2	3hidrox	5.338	4268	2.514

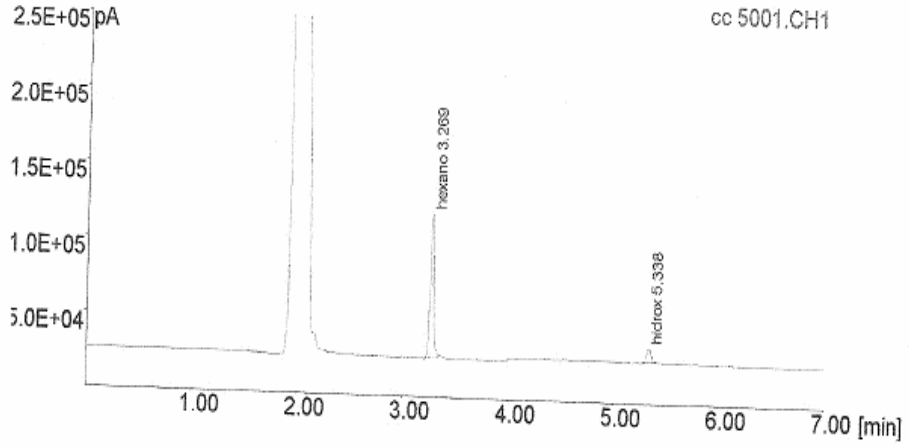


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.269	197030	96.250
2	hidroxibutanoato d etilo	5.340	7676	3.750

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI

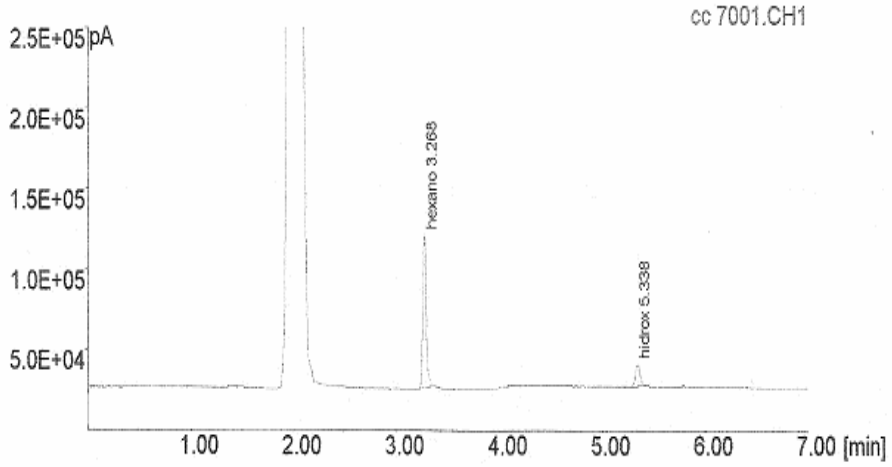


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.268	185797	93.285
2	hidroxibutanoato d etilo	5.339	13375	6.715

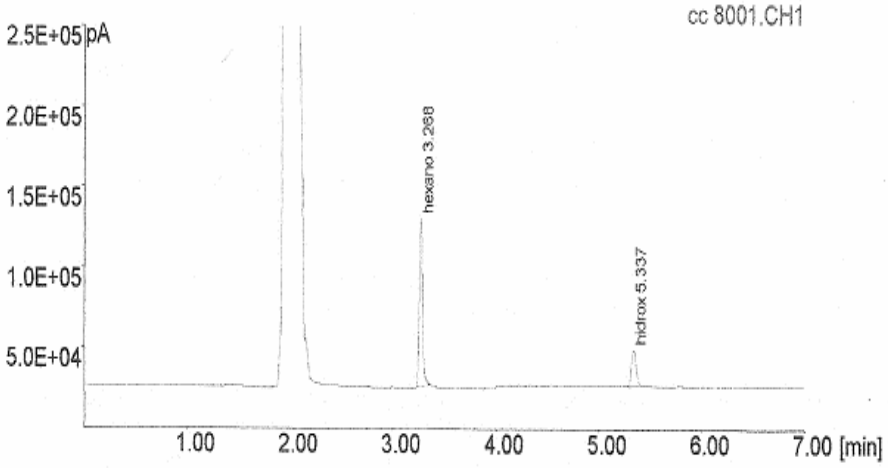


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.269	187724	87.821
2	hidroxibutanoato d etilo	5.338	26033	12.179

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI

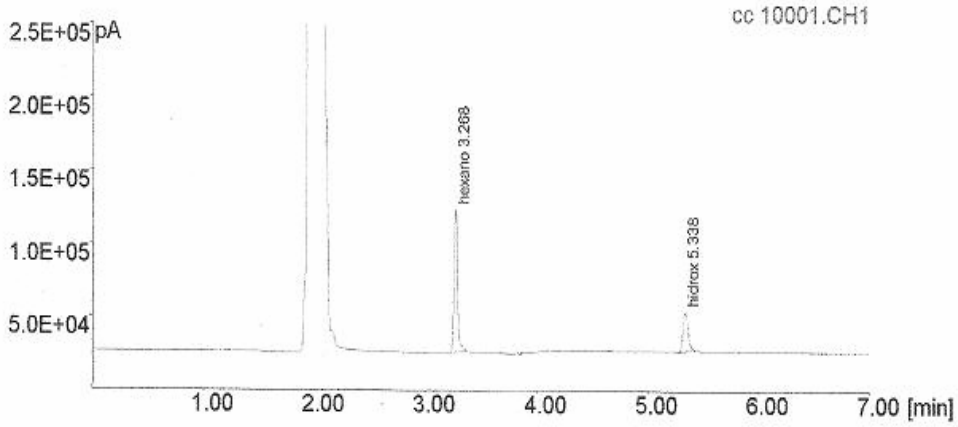


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.268	189867	82.688
2	hidroxibutanoato d etilo	5.338	39752	17.312

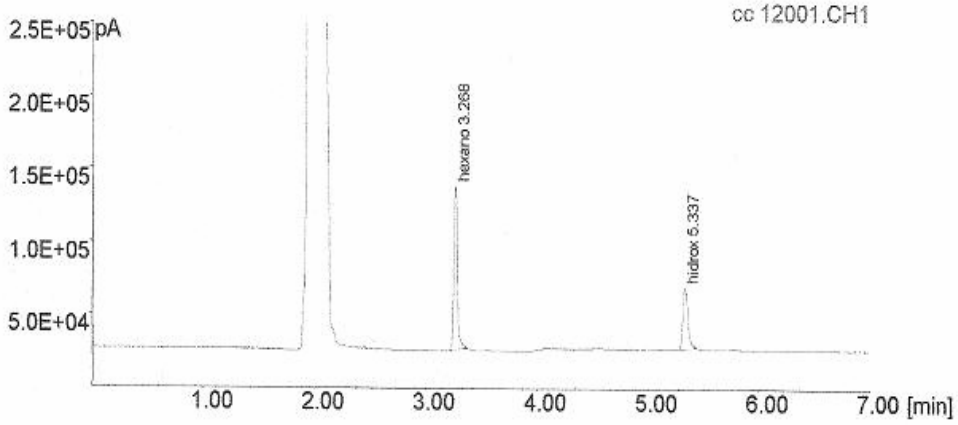


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.268	202355	75.759
2	hidroxibutanoato d etilo	5.337	64750	24.241

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI

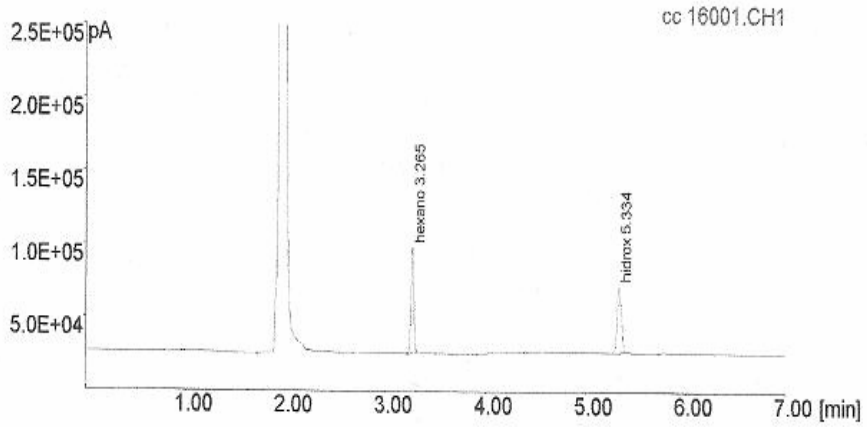


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.268	177927	69.427
2	hidroxibutanoato d etilo	5.338	78351	30.573

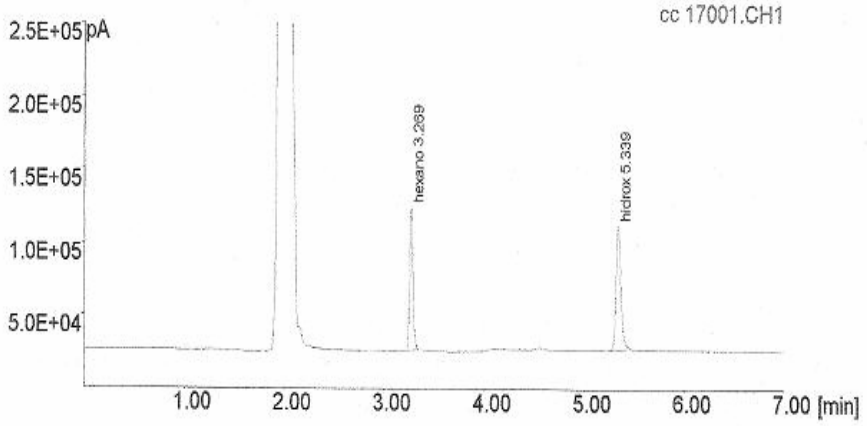


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.268	211542	63.779
2	hidroxibutanoato d etilo	5.337	120140	36.221

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.265	129103	50.643
2	hidroxibutanoato d etilo	5.334	125825	49.357



#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1	hexanol	3.269	196627	42.610
2	hidroxibutanoato d etilo	5.339	264825	57.390

En un análisis cromatográfico, existe un rango de concentraciones en el cual el área del pico generado por cierto compuesto es proporcional a la concentración del mismo, por lo que el tratamiento de los resultados consistió en relacionar el área de los cromatogramas de ambos compuestos (3-hidroxibutanoato de etilo y hexanol) y su concentración.

En este caso, la forma de la ecuación cuando se adiciona un estándar interno es:

$$f\,(A\ 3hidro\ /A\ hex) = k\,(C\ 3hidro\ /C\ hex\ )$$

donde C 3hidro: concentración de 3-hidroxibutanoato de etilo (gradiente)
C hex: concentración de hexanol (constante)
f: función
k: constante de proporcionalidad calculada experimentalmente

Los valores de las variables de concentración y área son conocidas, excepto el de la constante de proporcionalidad (k) que se determina de manera gráfica relacionando (Área 3hidro / Área hex) y (C 3hidro /C hex).

TABLA DE RESULTADOS

Muestra	Área hex	Área 3hidro	Á 3hidro/Á hex	C hex en 100 µl (mol/L)	C 3hidro en 100 µl (mol/L)	C 3hidro/C hexanol
cc 0001	189652	0	0.0000	0.0077	0.0000	0.0000
cc 1001	165498	4268	0.0258	0.0077	0.0004	0.0500
cc 2001	197030	7676	0.0390	0.0077	0.0008	0.1000
cc 3001	185797	13375	0.0720	0.0077	0.0012	0.1501
cc 5001	187724	26033	0.1387	0.0077	0.0019	0.2501
cc 7001	189867	39752	0.2094	0.0077	0.0031	0.4002
cc 8001	202355	64750	0.3200	0.0077	0.0039	0.5002
cc 10001	177927	78351	0.4404	0.0077	0.0062	0.8004
cc 12001	211542	120140	0.5679	0.0077	0.0077	1.0005
cc 16001	129103	125825	0.9746	0.0077	0.0154	2.0009
cc 17001	196627	264825	1.3468	0.0077	0.0193	2.5011

Variables independientes

TABLA 6

Obteniendo la siguiente gráfica

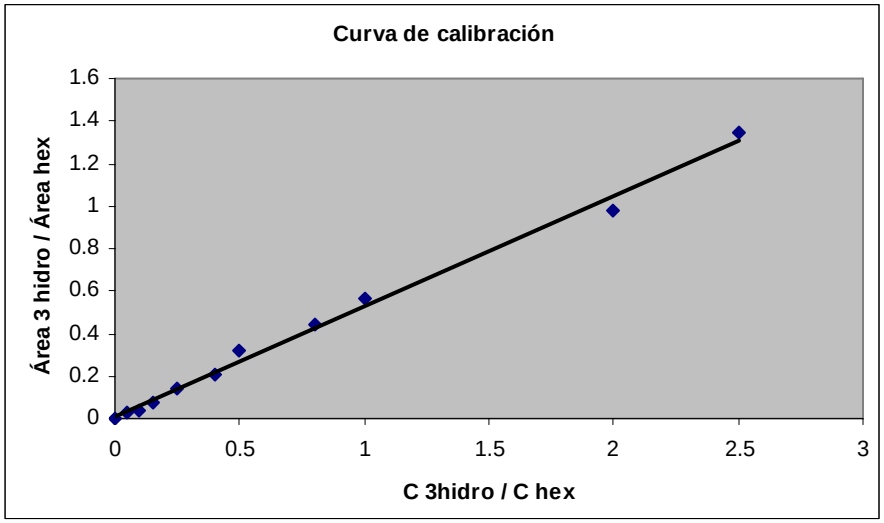


Figura 51. Curva de calibración para el análisis no quiral

El comportamiento entre ambas variables presenta un perfil lineal con una ecuación general y = m x + b, donde m = k (constante de proporcionalidad o pendiente de la recta) y b es la ordenada al origen. Mediante un análisis de mínimos cuadrados podemos determinar el valor de éstas, sabiendo que

$$m = \frac{N\,\Sigma(C_i\,A_i) - \Sigma C_i\;\Sigma A_i}{N\,\Sigma(C_i)^2 - (\Sigma C_i)^2} \qquad b = \frac{\Sigma(C_i)^2\,\Sigma A_i\;-\Sigma C_i\;\Sigma(C_i\,A_i)}{N\,\Sigma(C_i)^2 - (\Sigma C_i)^2}$$

$$r, R = \frac{\Sigma(C_i\,A_i)}{\sqrt{(\Sigma(C_i)^2 - \Sigma(A_i)^2)}}$$

donde N = 11; C= (C 3hidro / C hex); A=(A 3hidro / A hex)

Entonces

C A	C	A	C^2	A^2
0	0.0000	0.0000	0	0
0.00129003	0.0500	0.0258	0.002502286	0.00066506
0.00389758	0.1000	0.0390	0.010008884	0.00151777
0.01080292	0.1501	0.0720	0.022520184	0.00518215
0.03468491	0.2501	0.1387	0.062556498	0.01923131
0.08378478	0.4002	0.2094	0.16014422	0.0438348
0.16006299	0.5002	0.3200	0.250224694	0.10238861
0.35244254	0.8004	0.4404	0.64057688	0.19391231
0.56818094	1.0005	0.5679	1.000901375	0.32253886
1.95009587	2.0009	0.9746	4.003600305	0.94986352
3.36861316	2.5011	1.3468	6.255623853	1.8139765
$\Sigma(C_i A_i)$ 6.53385572	ΣC_i 7.7535	ΣA_i 4.1345	$\Sigma C_i^{\ 2}$ 12.40865918	$\Sigma(A_i^2)$ 3.45311089
	$\Sigma(C_i^2)$ 60.1165734			

TABLA 7

Realizando las operaciones tenemos que la ecuación de la línea recta es

(Área 3hidro/Área hex)=0.5213 (C 3hidro/C hex)+0.0084

R^2= 0.9936

donde a medida que R^2 se acerca a 1, el comportamiento de la dispersión x, y se asemeja a una línea recta “perfecta”.

10.5. CÁLCULO DEL RENDIMIENTO DE LA BIODESRACEMIZACIÓN

Una vez determinada una metodología que nos proporciona una relación lineal entre el compuesto a cuantificar y otro de referencia (estándar interno) con un análisis cromatográfico, podemos calcular el rendimiento de las biotransformaciones.

El rendimiento se calcula interpolando el área experimental del 3-hidroxibutanoato resultante de la biotransformación en la ecuación de la curva de calibración.

(Área 3hidro/Área hex)=0.5213 (C 3hidro/C hex)+0.0084

conocidas

a calcular

conocida

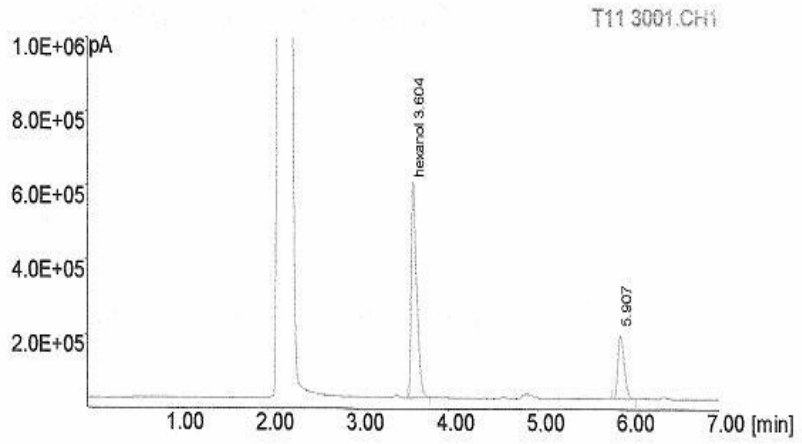
Despejando C 3hidro,

{[(Área 3hidro/Área hex) - 0.0084]/ 0.5213} C hex = C 3hidro

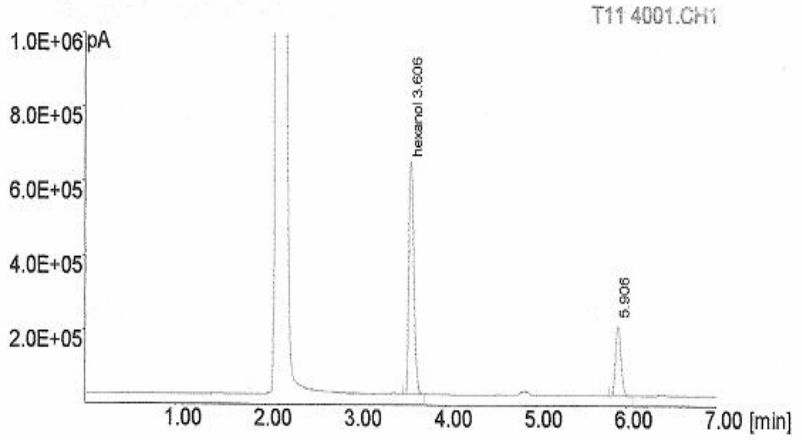
Así pues, a continuación se muestran los cromatogramas obtenidos para las biotransformaciones que hacen referencia a la Figura 45.

F 6.5

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



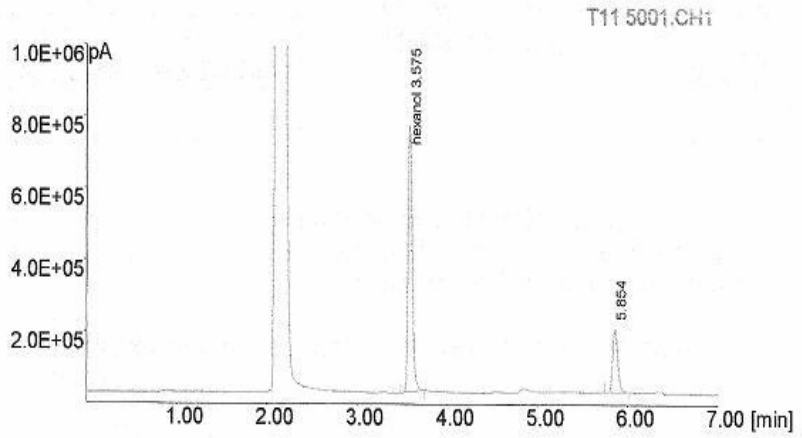
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1	hexanol	3.604	1883200
2		5.907	502457



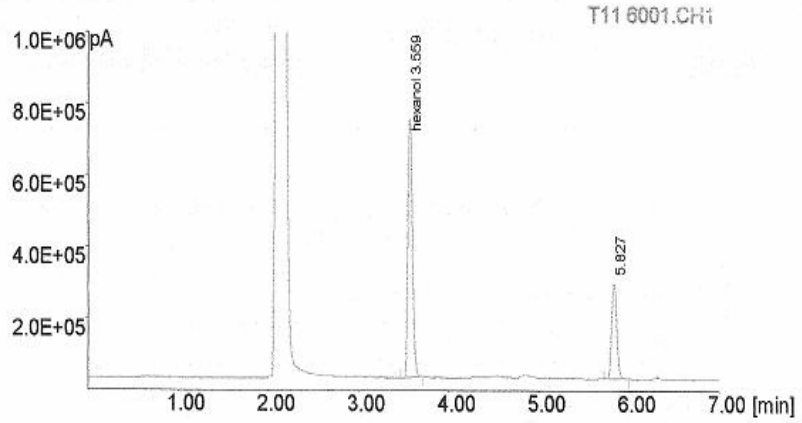
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1	hexanol	3.606	2034087
2		5.906	520433

F 7

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



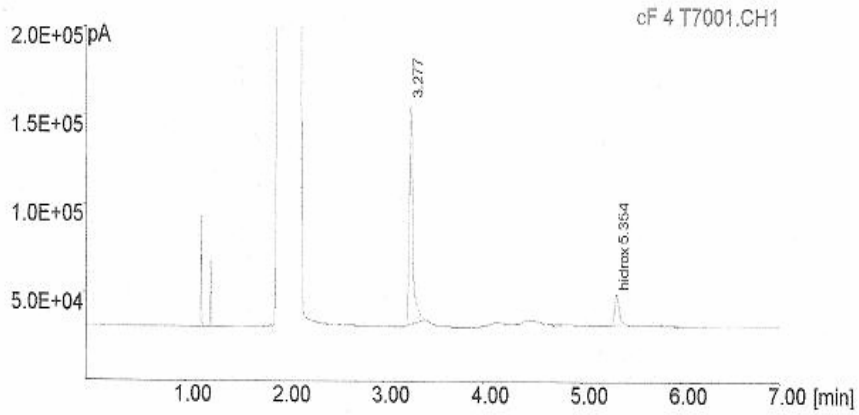
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1	hexanol	3.575	1872921
2		5.854	296281



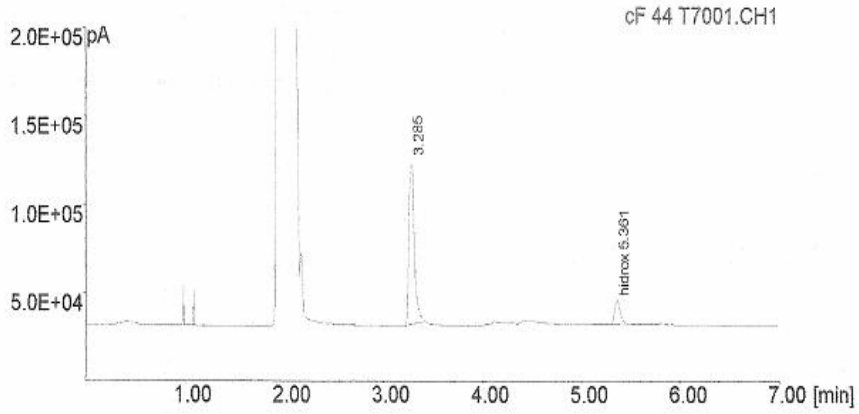
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1	hexanol	3.559	1798807
2		5.827	471562

cF 4

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



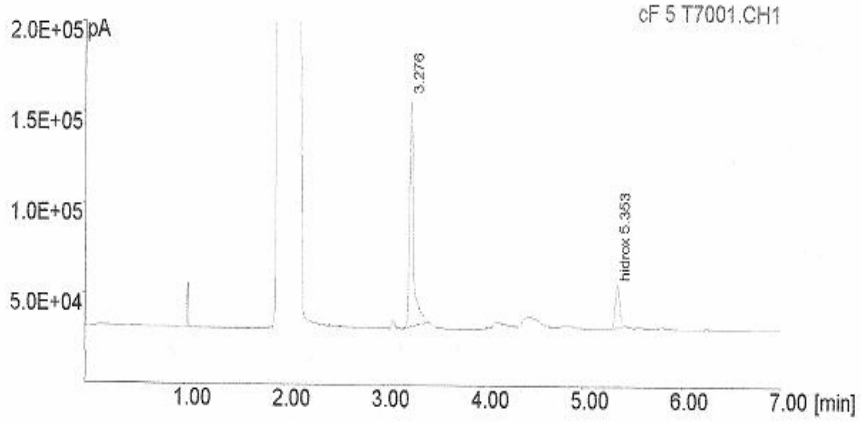
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.277	283056
2	hidroxibutanoato d etilo	5.354	48269



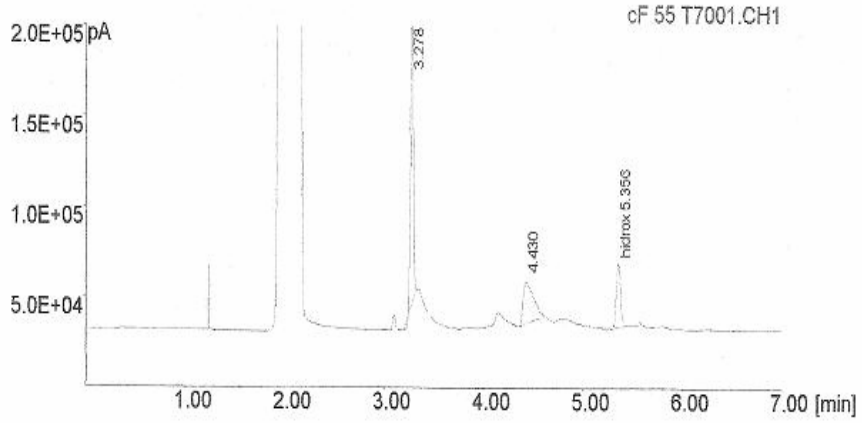
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.285	320324
2	hidroxibutanoato d etilo	5.361	49406

cF 5

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



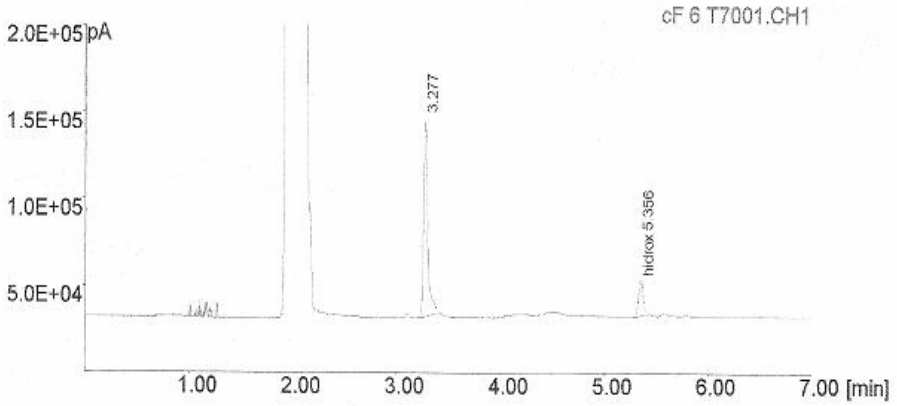
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.276	302227
2	hidroxibutanoato d etilo	5.353	66855



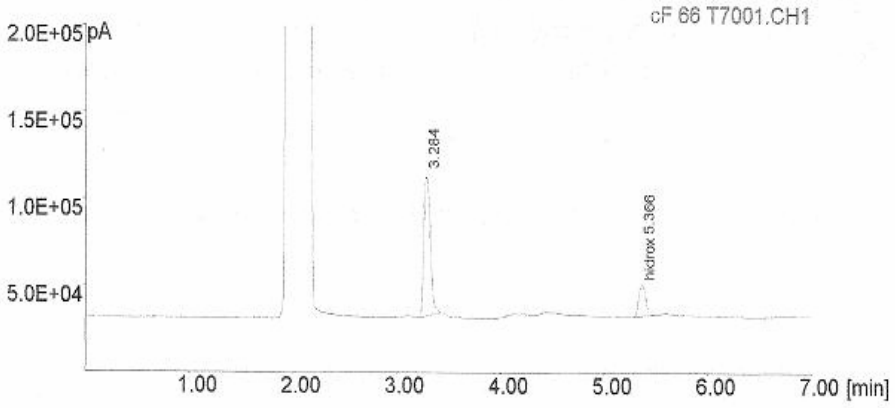
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.278	262041
2		4.430	161558
3	hidroxibutanoato d etilo	5.356	99317

cF 6

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



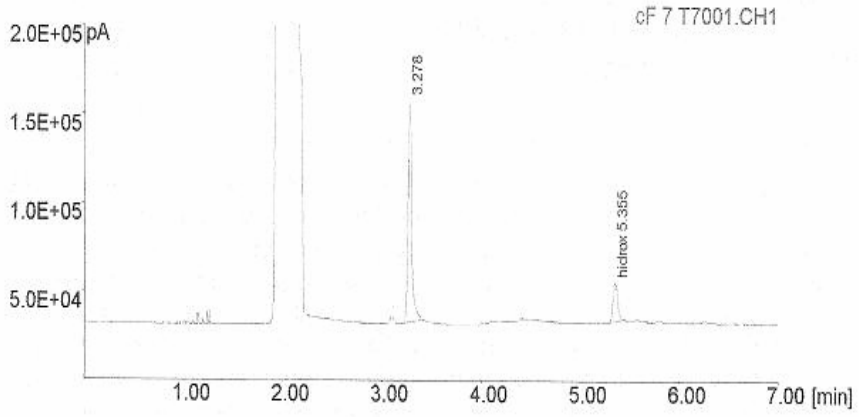
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.277	274995
2	hidroxibutanoato d etilo	5.356	59626



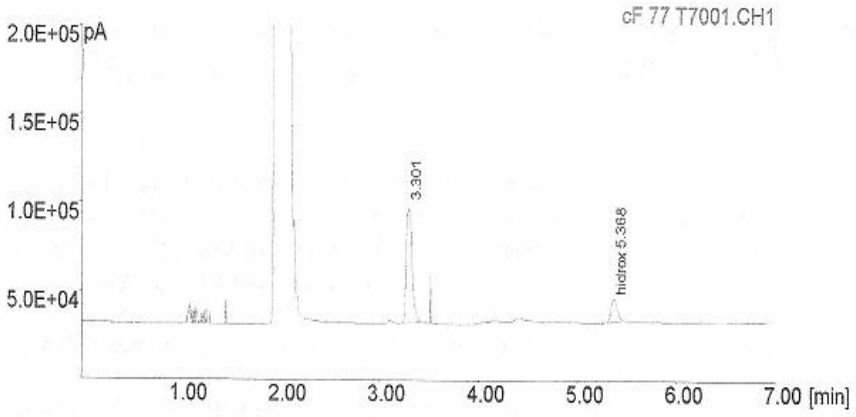
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.284	330752
2	hidroxibutanoato d etilo	5.366	79262

cF 7

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



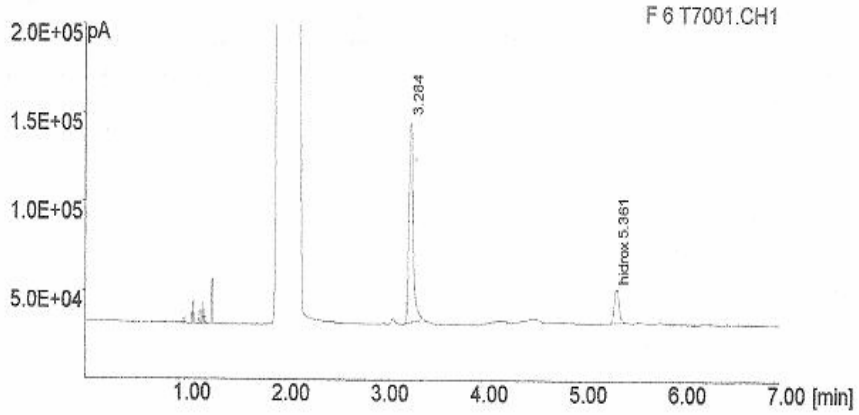
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.278	285010
2	hidroxibutanoato d etilo	5.355	66704



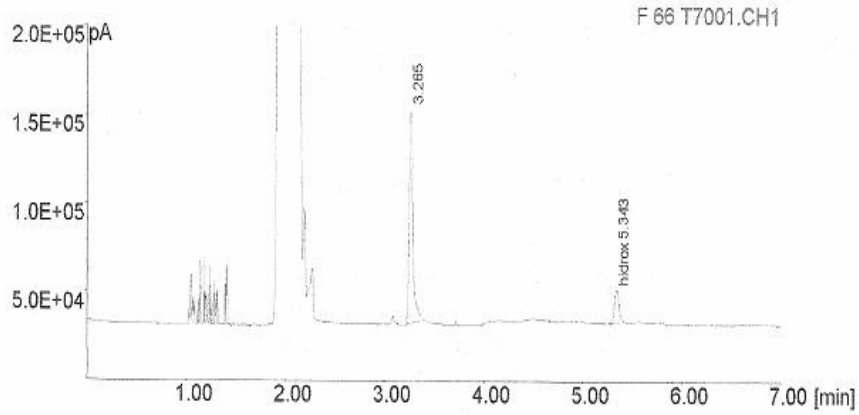
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.301	251347
2	hidroxibutanoato d etilo	5.368	53131

F 6

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



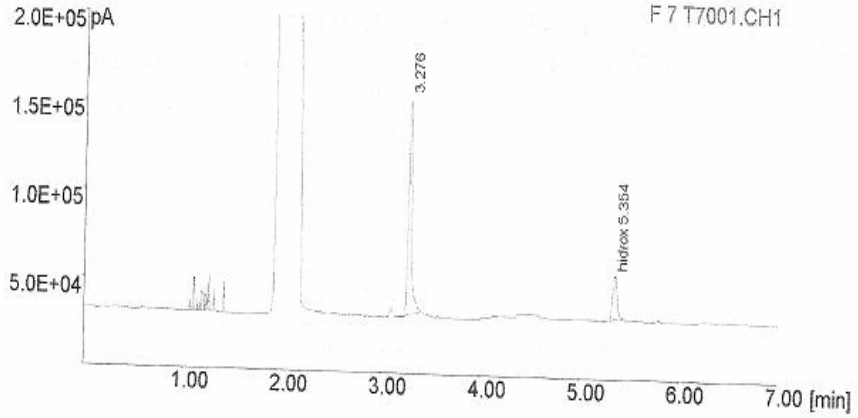
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.284	298869
2	hidroxibutanoato d etilo	5.361	59929



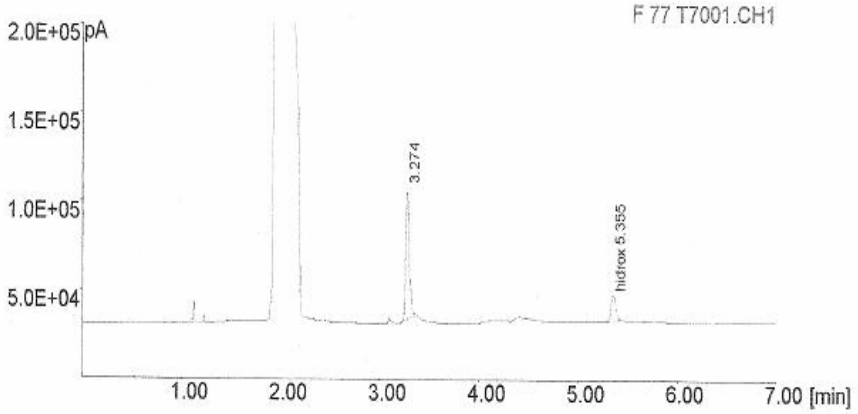
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.265	272549
2	hidroxibutanoato d etilo	5.343	53749

F 7

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



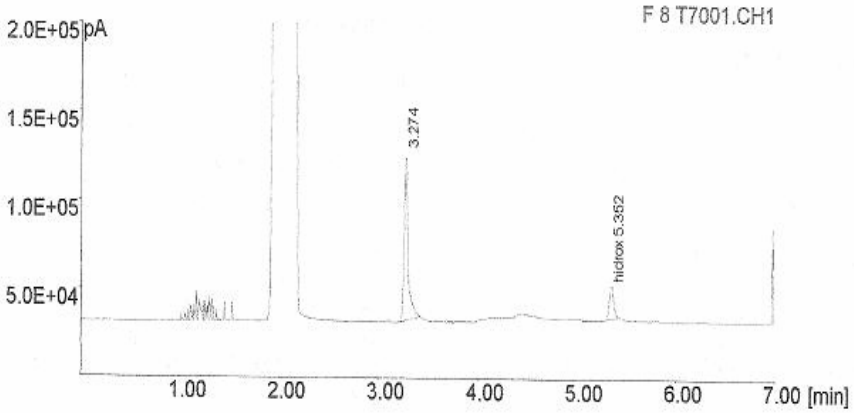
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.276	251879
2	hidroxibutanoato d etilo	5.354	71701



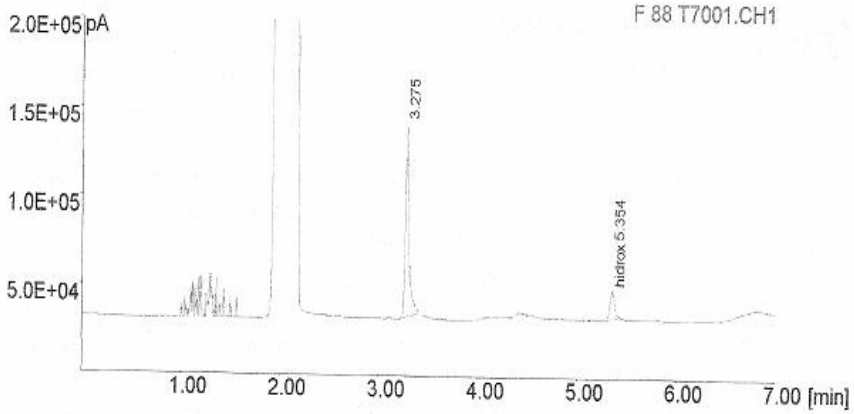
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.274	156811
2	hidroxibutanoato d etilo	5.355	44013

F 8

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



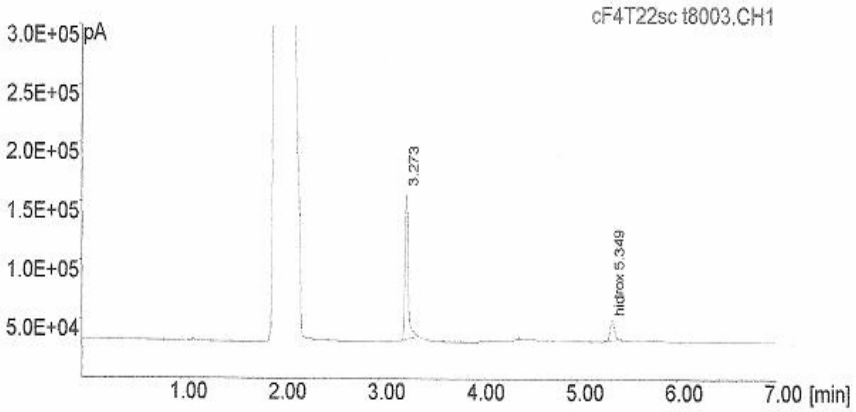
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.274	227556
2	hidroxibutanoato d etilo	5.352	52626



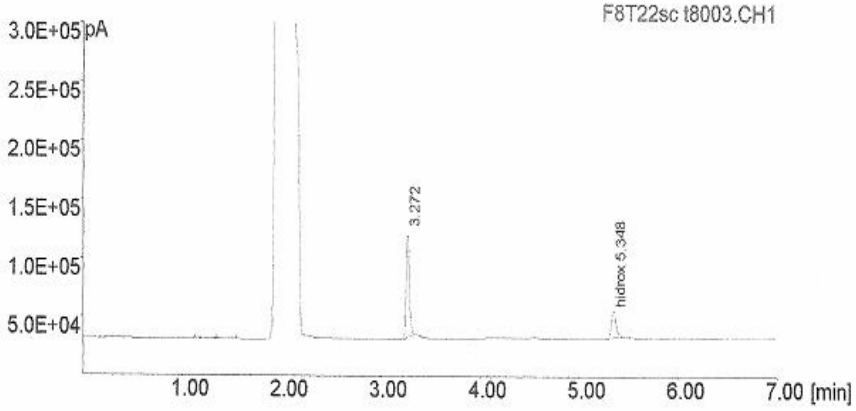
#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.275	243627
2	hidroxibutanoato d etilo	5.354	44367

cF 4 y F 8 sin células

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.273	247348
2	hidroxibutanoato d etilo	5.349	47868



#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]
1		3.272	178030
2	hidroxibutanoato d etilo	5.348	66558

Una vez teniendo las áreas experimentales de ambos compuestos, se procede a sustituir en la ecuación de la curva de calibración y determinar la concentración de 3-hidroxibutanoato de etilo en la mezcla con el estándar interno. Posteriormente, se calcula la concentración del producto en la biotransformación con ayuda de la relación

$$(C\ 3hidro)\ (V\ mezcla) = (C\ 3hidro)\ (V\ muestra)$$

La concentración resultante se compara con la concentración inicial de la biotransformación, obteniendo el rendimiento químico de la biotransformación.

$$\%R = (C3hidro\ /\ C3hidro_{\ inicial})\ X\ 100$$

A continuación se muestra la tabla de resultados que se obtuvo en el cálculo del rendimiento de las biotransformaciones.

TABLA 8

Tipo de amotiguador Fosfatos (Na2HPO4/NaH2PO4) 0.2M + 10% de Sacarosa
pH 6.5

Tiempo (día)	Área de hex	Área de 3-h	A 3 / A hex	C hex (mol/L) en 100 µl	C 3h (mol/L) en 100 µl	V (µl)	V muestra (µl)	C 3h (mol/L) muestra	C 3h (mol/L) nominal	Rend	Prom Rend
7	1883200	502457	0.2668	0.0077	0.0038	100	50	0.0076	0.0154	49.5773	49
7	2034087	520433	0.2559	0.0077	0.0037	100	50	0.0073	0.0154	47.4756	±2

Tipo de amotiguador Fosfatos (Na2HPO4/NaH2PO4) 0.2M + 10% de Sacarosa
pH 7

Tiempo (día)	Área de hex	Área de 3-h	A 3 / A hex	C hex (mol/L) en 100 µl	C 3h (mol/L) en 100 µl	V (µl)	V muestra (µl)	C 3h (mol/L) muestra	C 3h (mol/L) nominal	Rend	Prom Rend
7	1872921	296281	0.1582	0.0077	0.0022	100	50	0.0044	0.0154	28.7383	39
7	1798807	471562	0.2622	0.0077	0.0037	100	50	0.0075	0.0154	48.6837	±11

Tipo de amortiguador Citratos/Fosfatos (ácido cítrico/Na2HPO4) 0.05/0.1 M + 10% de Sacarosa
pH 4

Tiempo (día)	Área de hex	Área de 3-h	A 3 / A hex	C hex (mol/L) en 100 µl	C 3h (mol/L) en 100 µl	V (µl)	V muestra (µl)	C 3h (mol/L) muestra	C 3h (mol/L) nominal	Rend	Prom Rend
7	283056	48269	0.1705	0.0077	0.0024	100	50	0.0048	0.0154	31.1051	30
7	320324	49406	0.1542	0.0077	0.0022	100	50	0.0043	0.0154	27.9797	±3

Tipo de amortiguador Citratos/Fosfatos (ácido cítrico/Na2HPO4) 0.05/0.1 M + 10% de Sacarosa
pH 5

Tiempo (día)	Área de hex	Área de 3-h	A 3 / A hex	C hex (mol/L) en 100 µl	C 3h (mol/L) en 100 µl	V (µl)	V muestra (µl)	C 3h (mol/L) muestra	C 3h (mol/L) nominal	Rend	Prom Rend
7	302227	66855	0.2212	0.0077	0.0031	100	50	0.0063	0.0154	40.8283	56
7	262041	99317	0.3790	0.0077	0.0055	100	50	0.0110	0.0154	71.1040	±16

Tipo de amortiguador Citratos/Fosfatos (ácido cítrico/Na2HPO4) 0.05/0.1 M + 10% de Sacarosa
pH 6

Tiempo (día)	Área de hex	Área de 3-h	A 3 / A hex	C hex (mol/L) en 100 µl	C 3h (mol/L) en 100 µl	V (µl)	V muestra (µl)	C 3h (mol/L) muestra	C 3h (mol/L) nominal	Rend	Prom Rend
7	274995	59626	0.2168	0.0077	0.0031	100	50	0.0062	0.0154	39.9875	42
7	330752	79262	0.2396	0.0077	0.0034	100	50	0.0068	0.0154	44.3649	±2

Tipo de amortiguador Citratos/Fosfatos (ácido cítrico/Na2HPO4) 0.05/0.1 M + 10% de Sacarosa
pH 7

Tiempo (día)	Área de hex	Área de 3-h	A 3 / A hex	C hex (mol/L) en 100 µl	C 3h (mol/L) en 100 µl	V (µl)	V muestra (µl)	C 3h (mol/L) muestra	C 3h (mol/L) nominal	Rend	Prom Rend
7	285010	66704	0.2340	0.0077	0.0033	100	50	0.0067	0.0154	43.2903	41
7	251347	53131	0.2114	0.0077	0.0030	100	50	0.0060	0.0154	38.9437	±2

Tipo de amortiguador Fosfatos (Na2HPO4/NaH2PO4) 0.2M + 10% Sacarosa
pH 6

Tiempo (día)	Área de hex	Área de 3-h	A 3 / A hex	C hex (mol/L) en 100 µl	C 3h (mol/L) en 100 µl	V (µl)	V muestra (µl)	C 3h (mol/L) muestra	C 3h (mol/L) nominal	Rend	Prom Rend
7	298869	59929	0.2005	0.0077	0.0028	100	50	0.0057	0.0154	36.8590	37
7	272549	53749	0.1972	0.0077	0.0028	100	50	0.0056	0.0154	36.2239	±1

Tipo de amortiguador Fosfatos (Na2HPO4/NaH2PO4) 0.2M + 10% Sacarosa
pH 7

Tiempo (día)	Área de hex	Área de 3-h	A 3 / A hex	C hex (mol/L) en 100 µl	C 3h (mol/L) en 100 µl	V (µl)	V muestra (µl)	C 3h (mol/L) muestra	C 3h (mol/L) nominal	Rend	Prom Rend
7	251879	71701	0.2847	0.0077	0.0041	100	50	0.0082	0.0154	53.0027	53
7	156811	44013	0.2807	0.0077	0.0040	100	50	0.0080	0.0154	52.2374	±1

Tipo de amortiguador Fosfatos (Na2HPO4/NaH2PO4) 0.2M + 10% Sacarosa
pH 8

Tiempo (día)	Área de hex	Área de 3-h	A 3 / A hex	C hex (mol/L) en 100 µl	C 3h (mol/L) en 100 µl	V (µl)	V muestra (µl)	C 3h (mol/L) muestra	C 3h (mol/L) nominal	Rend	Prom Rend
7	227556	52626	0.2313	0.0077	0.0033	100	50	0.0066	0.0154	42.7580	38
7	243627	44367	0.1821	0.0077	0.0026	100	50	0.0051	0.0154	33.3272	±5

Tipo de amortiguador Fosfatos (Na2HPO4/NaH2PO4) 0.2M + 10% Sacarosa
pH 8
T 20°C
Sin células

Tiempo (día)	Área de hex	Área de 3-h	A 3 / A hex	C hex (mol/L) en 100 µl	C 3h (mol/L) en 100 µl	V (µl)	V muestra (µl)	C 3h (mol/L) muestra	C 3h (mol/L) nominal	Rend	Prom Rend
7	178030	66558	0.3739	0.0077	0.0054	100	50	0.0108	0.0154	70.1150	70
											±1

Tipo de amortiguador Citratos/Fosfatos (ácido cítrico/Na2HPO4) 0.05/0.1 M + 10% de Sacarosa
pH 4
T 20°C
Sin células

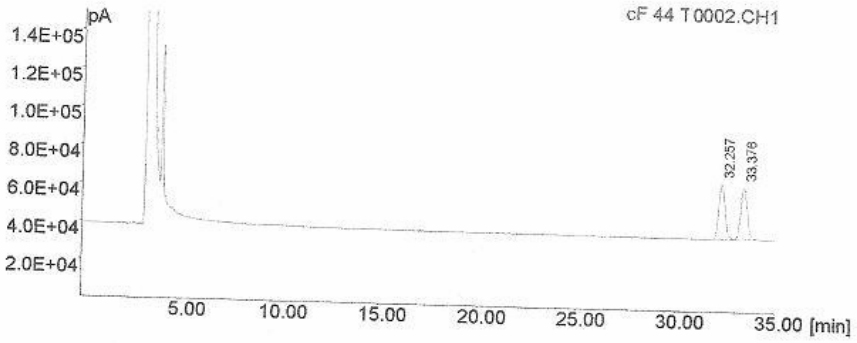
Tiempo (día)	Área de hex	Área de 3-h	A 3 / A hex	C hex (mol/L) en 100 µl	C 3h (mol/L) en 100 µl	V (µl)	V muestra (µl)	C 3h (mol/L) muestra	C 3h (mol/L) nominal	Rend	Prom Rend
7	247348	47868	0.1935	0.0154	0.0055	100	50	0.0109	0.0154	71.0343	71
											±1

10.6. DETERMINACIÓN DEL EXCESO ENANTIOMÉRICO EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL 3-HIDROXIBUTANOATO DE ETILO

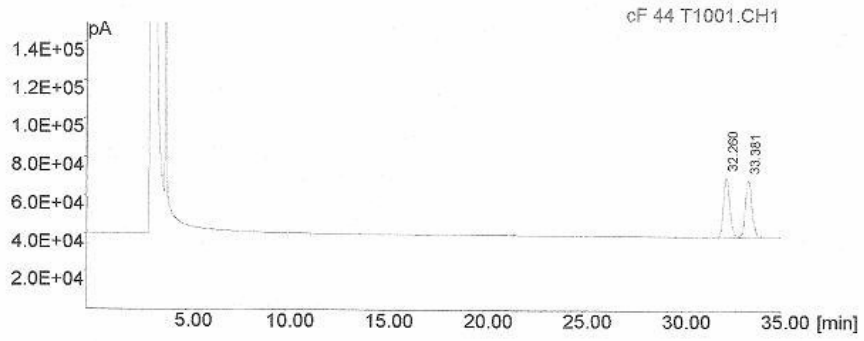
Para ilustrar el cálculo se hará mención a los resultados expuestos en la Figura 24 correspondientes al ensayo con una sola línea de cultivo en una disolución amortiguadora de citratos-fosfatos con pH 4.

Los cromatogramas obtenidos fueron

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI

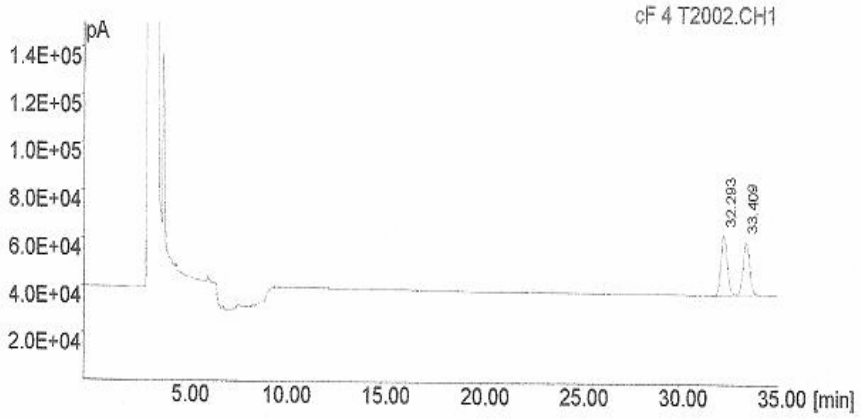


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1		32.257	589711	50.045
2		33.376	588660	49.955

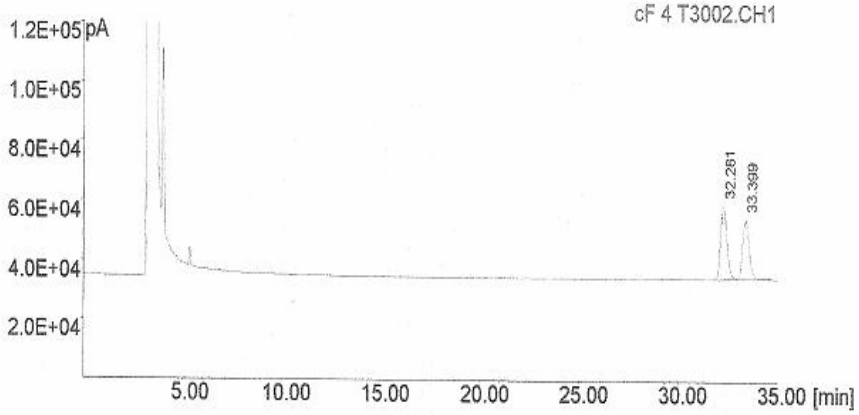


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1		32.260	651204	50.157
2		33.381	647135	49.843

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI

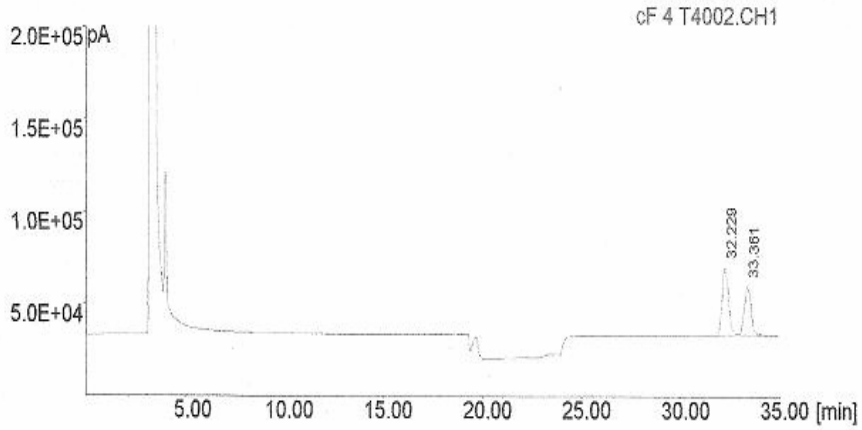


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1		32.293	525953	51.602
2		33.409	493303	48.398

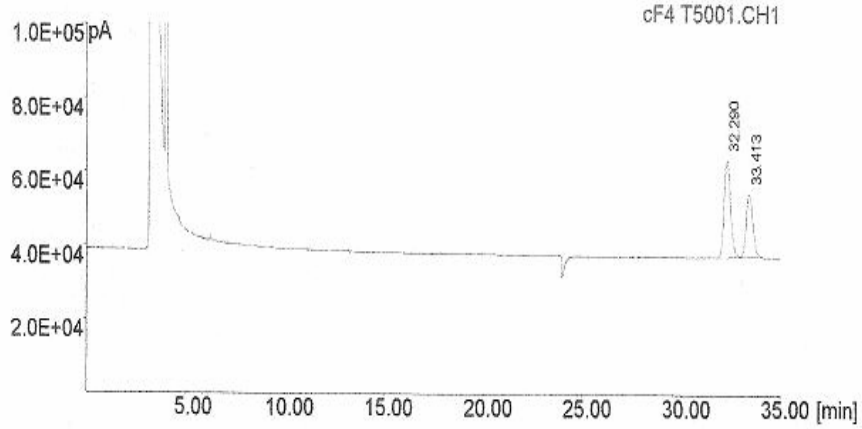


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1		32.281	517689	54.118
2		33.399	438907	45.882

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI

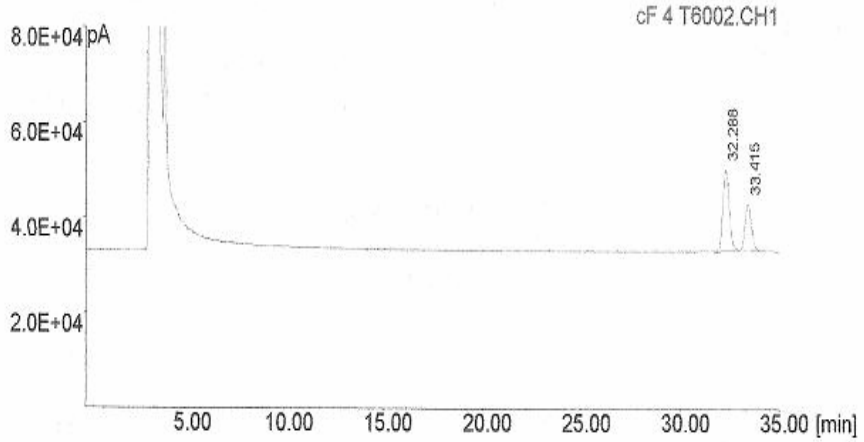


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1		32.229	773970	57.037
2		33.361	582988	42.963

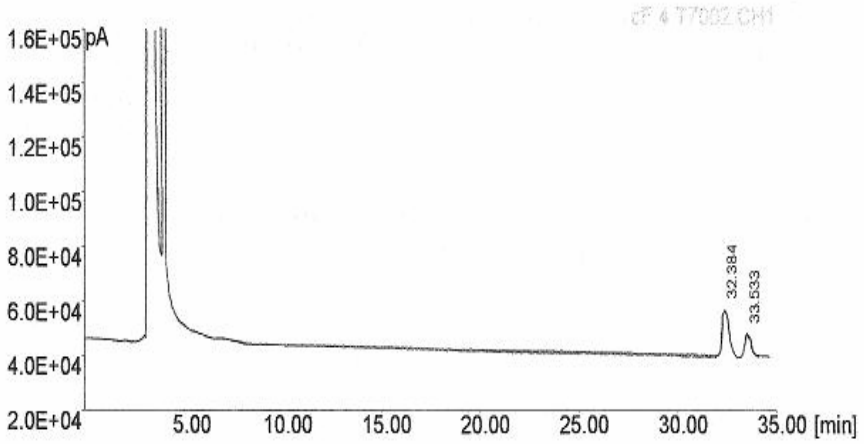


#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1		32.290	561145	59.653
2		33.413	379544	40.347

Laboratorio de Cromatografía LCR-LSA-IQUI



#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1		32.288	364024	63.645
2		33.415	207934	36.355



#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1		32.384	370171	67.466
2		33.533	178511	32.534

Los cálculos se realizan con la ecuación

$$e.e. = \left(\frac{S - R}{S + R} \right) \bullet 100 = S - R\ (\%)$$

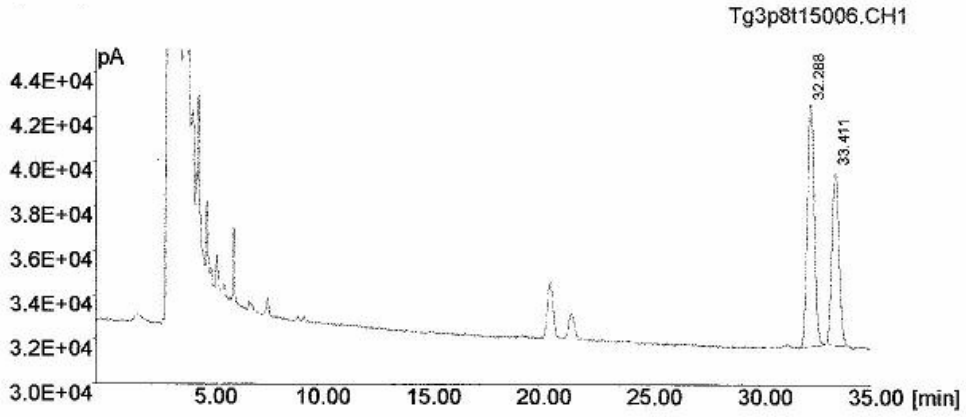
Con la cual se calcula el exceso enantiomérico en forma de porcentaje. En este caso, dado que se obtiene el enantiómero S del 3-hidroxibutanoato de etilo, se resta la propiedad de R a S para obtener valores positivos. Sin embargo, en algunos casos de *Taxus globosa* y en el ensayo con los enantiómeros puros para *Taxus brevifolia*, se resta la propiedad de S a R obteniendo excesos enantioméricos negativos.

Tiempo (día)	Área S	Área R	Área total	Pureza S (%)	Pureza R (%)	ee (%)
0	0	0	0	0	0	0
1	651204	647135	1298339	50.1567002	49.8432998	0
2	525953	493303	1019256	51.6016585	48.3983415	3
3	517689	438907	956596	54.1178303	45.8821697	8
4	773970	582988	1356958	57.0371375	42.9628625	14
5	561145	379544	940689	59.6525525	40.3474475	19
6	364024	207934	571958	63.6452327	36.3547673	27
7	370171	178511	548682	67.46549	32.53451	35

TABLA 9

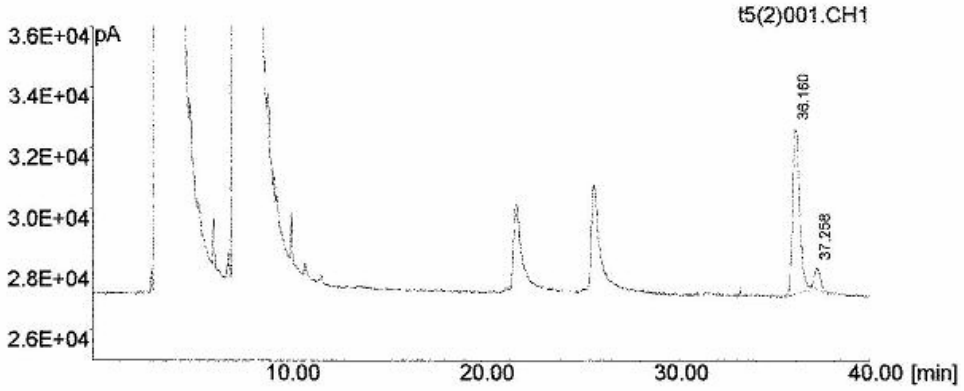
A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a la determinación del máximo exceso enantiomérico en ambas especies

Taxus globosa



#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1		32.288	226776	58.084
2		33.411	163650	41.916

Taxus brevifolia



#	Nombre	Tr [min]	Área [pA*s]	%Área
1		36.160	128284	89.984
2		37.258	14279	10.016

El desplazamiento del tiempo de retención se debe a la metodología de inyecciones sucesivas. Las señales alrededor de 20 minutos son impurezas de la muestra, pero no afectan la determinación del e.e.

10.7. DETEMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE DESRACEMIZACIÓN BAJO LA INFLUENCIA DEL pH

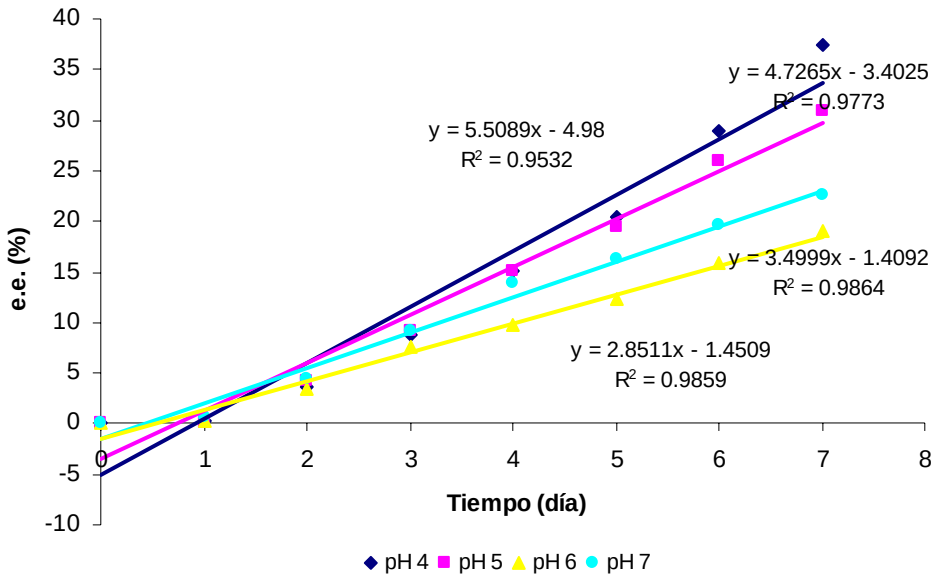
La influencia de la temperatura en el proceso de biodesracemización se determinó mediante una gráfica e.e. vs. tiempo en la cual se observa un comportamiento lineal en un rango específico de tiempo.

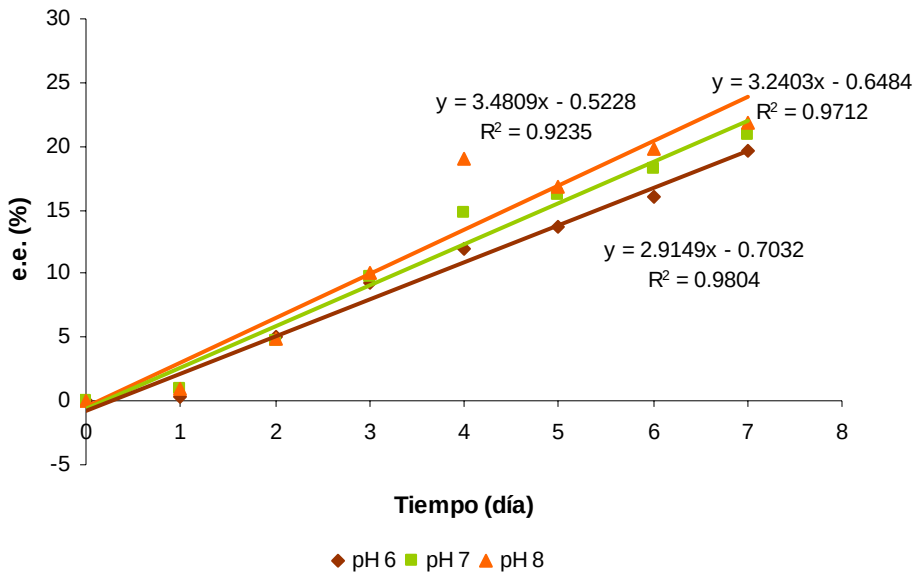
Por otro lado, la velocidad de cualquier proceso se define como el cambio de cierta propiedad (p) con respecto al tiempo (t), lo cual se expresa como

$$v = \frac{p_1 - p_0}{t_1 - t_0}$$

Si la velocidad es constante, el cambio en el proceso será proporcional y de igual magnitud a través del tiempo, presentándose un comportamiento lineal al relacionar las variables p vs. t.

Experimentalmente, tenemos un comportamiento lineal de e.e. vs. t cuando se varía el pH utilizando una sola línea de cultivo, por lo que se puede calcular la velocidad del proceso determinando la pendiente de cada recta correspondiente a un valor de pH específico.





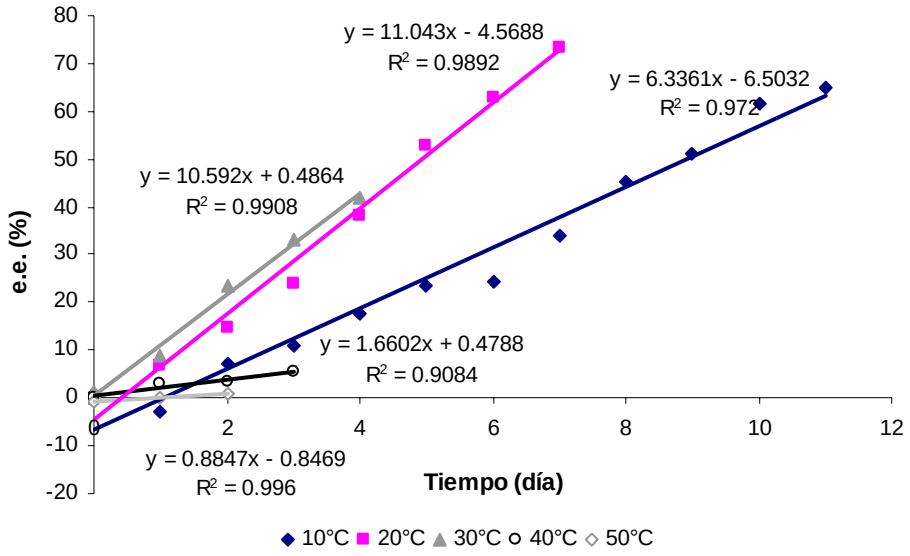
Generando la siguiente tabla

pH	DISOLUCIÓN AMORTIGUADORA	VELOCIDAD DE DESRACEMIZACIÓN (e.e./día)
4	Citratos-Fosfatos	5.5
5	Citratos-Fosfatos	4.7
6	Citratos-Fosfatos	2.8
7	Citratos-Fosfatos	3.4
6	Fosfatos	2.9
7	Fosfatos	3.2
8	Fosfatos	3.4

TABLA 10

10.8. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE DESRACEMIZACIÓN BAJO LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Experimentalmente, tenemos un comportamiento lineal de e.e. vs. t, por lo que se puede calcular la velocidad del proceso determinando la pendiente de dicha línea recta.



Así pues, se puede apreciar la influencia de la temperatura sobre la velocidad en el proceso de desracemización.

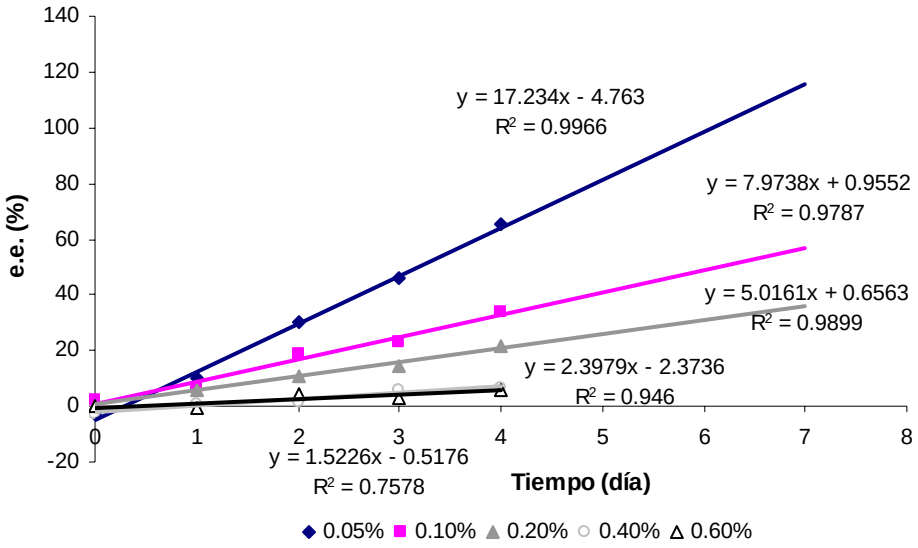
Temperatura (°C)	Velocidad de desracemización (e.e./día)
10	6.3
20	11
30	10.5
40	1.6
50	0.8

TABLA 11

10.9. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE DESRACEMIZACIÓN BAJO LA INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE SUSTRATO

Al igual que con la temperatura, se determinó la velocidad de desracemización bajo la influencia de la cantidad de sustrato.

Los resultados experimentales muestran un comportamiento lineal en un rango de tiempo específico, por lo que podemos calcular la pendiente y determinar el efecto al incrementar la cantidad de sustrato.



Generando los siguientes resultados

Cantidad de sustrato (%V)	Velocidad de desracemización (e.e./día)
0.05	17.2
0.1	7.9
0.2	5.0
0.4	2.3
0.6	1.5

TABLA 12