



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

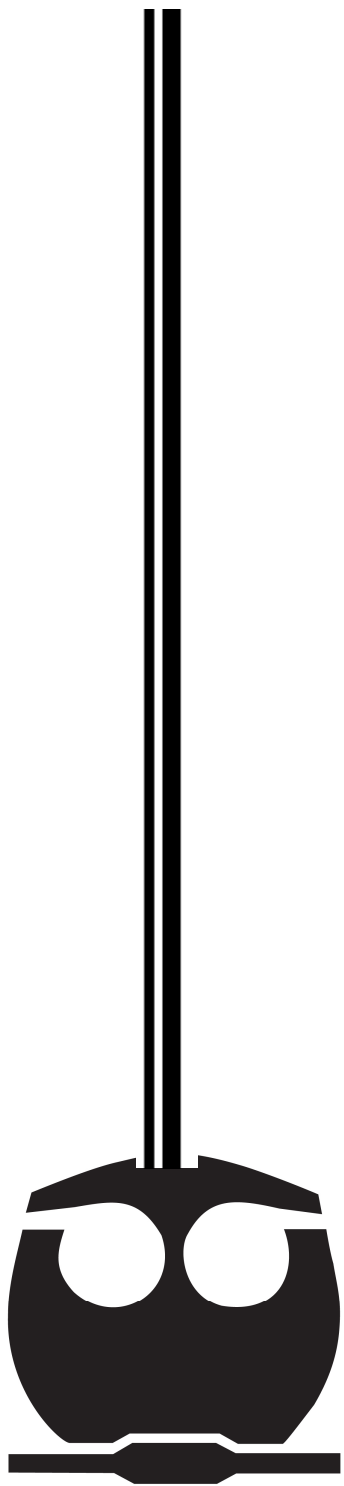
BIORREDUCCIONES ENANTIOSELECTIVAS.
INFLUENCIA DE LA EDAD EN CULTIVOS CELULARES VEGETALES.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

ESTEBAN ALEJANDRO VARGAS GARCÍA.



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 Dra. Rebecca Elizabeth Franco y Bourland.

Vocal M. en C. Elba Rojas Escudero.

Secretario Dr. Héctor Guillermo Barrios López.

1er. Suplente Dr. Rogelio Rodríguez Sotres.

2do. Suplente Dr. Daniel Méndez Iturbide.

Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del **Instituto de Química** en el **Laboratorio de Bioquímica I**.

Asesor.

Dr. Héctor Guillermo Barrios López.

Supervisor técnico.

Dra. María del Consuelo Socorro Sandoval García.

Sustentante.

Esteban Alejandro Vargas García.

Abreviaturas.

AAE: Acetoacetato de etilo.

Abs o A: Absorbencia o Absorbancia.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADH: Alcohol deshidrogenasa.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATP: Trifosfato de adenosina.

BTTB: Biotransformación *Taxus brevifolia*.

BTTG: Biotransformación *Taxus globosa*.

C o [C]: Concentración (g/mL, M o mol/L).

CCV: Cultivos de células vegetales.

°C: Grados centígrados.

FID: Detector de ionización de flama ("Flame ionization detector").

HBE: Hidroxibutanoato de etilo.

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (High performance liquid chromatography).

K_M : Constante de Michaelis-Menten.

m: Masa (g, mg, μ g).

mh: Masa húmeda.

mmHg: Milímetros de mercurio.

min.: Minutos.

NAD^+ : Forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido.

$NADH$: Forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido.

$NADP^+$: Forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

$NADPH$: Forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

nm: Nanómetros.

pH: Potencial de hidrógeno, $pH = -\log [H^+]$.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

RMN^1H : Resonancia Magnética Nuclear de protón.

V: Volumen (L, mL, μ L).

Abreviaturas medios de cultivo.

BA: Benzilaminopurina.

B5NB: Medio Gamborg [51].

NAA: Ácido naftalenacético.

PVP: Polivinilpirrolidona.

SH: Medio Schenk y Hildebrandt [52].

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Abreviaturas cromatografía.

A = Área.

AA = Área del analito.

AAAE = Área del acetoacetato de etilo.

AEI = Área del estándar interno (n-hexanol).

AHBE = Área del 3-hidroxibutanoato de etilo.

b = Ordenada al origen.

CA = Concentración del analito.

CAAE = Concentración del acetoacetato de etilo.

CEI = Concentración del estándar interno (n-hexanol).

CHBE = Concentración del 3-hidroxibutanoato de etilo.

fd = Factor de dilución.

EI = Estándar interno.

m = Pendiente en una línea recta.

r = Correlación entre las variables *x*, *y* en la ecuación de la recta.

y = *mx*+*b*: Ecuación de una línea recta.

Índice

1. Introducción.	1
2. Marco teórico.	3
2.1 Isomería óptica y quiralidad.	3
2.2 Enantiómeros.	6
2.3 Rotación específica.	8
2.4 Excesos enantioméricos.	9
2.5 Catálisis.	11
2.6 Catálisis enzimática.	12
2.7 Mecanismo catalítico.	13
2.8 Biotransformaciones.	14
2.9 Ejemplos de biotransformaciones con sustratos exógenos y células vegetales.	16
2.10 Reducción biocatalítica de cetonas.	20
2.11 Especies vegetales: <i>Taxus brevifolia</i> y <i>Taxus globosa</i>.	26
2.12 Cultivo de células vegetales en un medio en suspensión.	28
2.13 Cultivos de células vegetales, su metabolismo y su efecto en una biorreducción.	30
2.14 Estudios previos realizados en el laboratorio.	31
2.15 Cromatografía de Gases.	32
3. Objetivos.	34
4. Parte experimental.	35
4.1 Cultivo de líneas celulares de las especies <i>Taxus</i>.	36
4.2 Biotransformación de un sustrato exógeno.	37
4.3 Análisis del 3-hidroxi-butanoato de etilo biotransformado.	38

4.4 Síntesis química del 3- hidroxibutanoato de etilo.	39
4.5 Metodología del cálculo de resultados por cromatografía	40
5. Resultados.	42
5.1 Propagación de cultivos de células vegetales en suspensión.	42
5.2 Discusión del mecanismo en la reducción del acetoacetato de etilo.	43
5.3 Cálculo de resultados: Biotransformaciones.	45
5.4 Cálculo de resultados: Exceso enantiomérico.	52
5.5 Comparación entre el rendimiento y exceso enantiomérico por especie.	54
5.6 Comparación del rendimiento y exceso enantiomérico entre especies.	56
6. Discusión de resultados.	58
7. Conclusiones.	61
8. Bibliografía.	64
9. Apéndices.	70
9.1 Especificaciones de reactivos y material.	70
9.2 Medios de cultivo en suspensión.	72
9.3 Caracterización del 3-hidroxibutanoato de etilo por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.	74
9.4 Ejemplo del tipo de cromatograma obtenido en las curvas de calibración y en la cuantificación de la biorreducción del acetoacetato de etilo realizada con cultivos de células vegetales de <i>Taxus brevifolia</i> y <i>Taxus globosa</i> .	75
9.5 Curvas de calibración <i>Taxus brevifolia</i> .	76
9.6 Biorreducciones <i>Taxus brevifolia</i> .	76

9.7 Curvas de calibración <i>Taxus globosa</i>.	77
9.8 Biorreducciones <i>Taxus globosa</i>.	77
9.9 Cálculos por el método de estándar interno.	78
9.10 Ejemplo del tipo de cromatograma obtenido en la cuantificación del exceso enantiomérico del 3-(S)-hidroxibutanoato de etilo obtenido en la biorreducción hecha con cultivos de células vegetales de <i>Taxus brevifolia</i> y <i>Taxus globosa</i>.	80
9.11 Exceso Enantiomérico <i>Taxus brevifolia</i>.	81
9.12 Exceso Enantiomérico <i>Taxus globosa</i>.	81

Biorreducciones enantioselectivas.
Influencia de la edad en cultivos celulares vegetales.

1. Introducción.

Actualmente una cantidad cada vez mayor de plantas, hongos, animales y microorganismos son utilizados para beneficio de la humanidad, gracias a la diversidad biológica con la que compartimos el planeta, muy pocas especies han sido estudiadas, la conservación de esta biodiversidad es esencial si queremos seguir disfrutando de los beneficios que nos brindan.

A lo largo de su historia el hombre no requirió de técnicas de investigación avanzadas para aprovechar los recursos naturales que encontraba. La observación y el método de ensayo y error, han hecho que la manera de aprovechar esos recursos llegue hasta nuestros días en forma de remedios y productos tradicionales: ¿quién no recuerda aquel té de hierbas?, que ayuda a curar esto o aquello o técnicas de producción artesanales usadas para la obtención de vino, pan, cerveza, etc. que posteriormente la ciencia y la tecnología adoptó o transformó para mejor aprovechamiento de estos recursos.

Sin embargo, en la actualidad muchos fármacos, agroquímicos y aditivos para alimentos utilizados comercialmente ven disminuida su eficacia al no tomar en cuenta la quiralidad de las sustancias que los componen, porque de ésta depende su actividad biológica, la cual puede deberse a un sólo enantiómero, lo que hace importante la búsqueda de procedimientos para obtener sustancias enriquecidas o totalmente compuestas por el enantiómero activo.

Los compuestos enantioméricamente puros pueden producirse por métodos químicos o químico-enzimáticos (biotransformaciones). Una biotransformación es la conversión de un sustrato atípico catalizada por enzimas, ya sean purificadas o dentro de las propias células de un organismo. Entre las ventajas que cuentan los procesos biocatalíticos

sobre los químicos es que las reacciones se realizan en condiciones estereoselectivas suaves y generan una menor cantidad de residuos contaminantes.

En este trabajo se plantea la utilización de cultivos de células vegetales para biorreducir un sustrato, el acetoacetato de etilo de forma enantioselectiva, y observar el efecto que produce extender el periodo de propagación de las células en la biotransformación del sustrato.

2. Marco teórico.

La transformación de compuestos orgánicos utilizando organismos vivos y su maquinaria enzimática ha acompañado al ser humano durante la mayor parte de su historia, la elaboración de pan, bebidas alcohólicas y fermentos lácteos son algunos ejemplos de como el hombre ha utilizado microorganismos para realizar reacciones químicas [1].

2.1 Isomería óptica y quiralidad.

Los estudios que llevaron al descubrimiento de propiedades como la isomería óptica y la quiralidad; comenzaron con el estudio de los desechos de producción del vino. La fermentación del mosto de la uva, hace que algunos de los ácidos presentes naturalmente en la uva (y en diversas plantas) se precipiten en forma de sales. Carl Wilhem Scheele (1742-1786) aisló del mosto de la uva, la sal ácida del tartrato de potasio (I) que al ser acidificada forma lo que él llamó ácido tartárico* (II) (Figura 1).

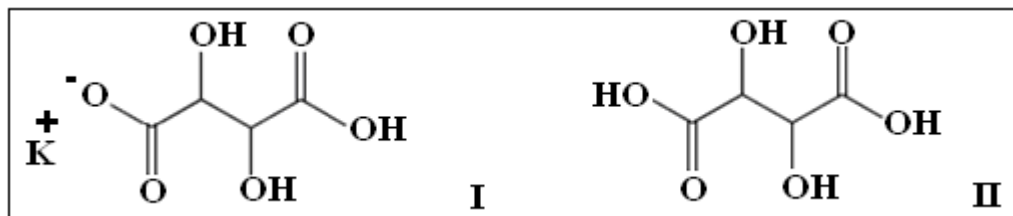


Figura 1. Sal ácida del tartrato de potasio y ácido tartárico.

Posteriormente en 1819 el industrial francés Paul Kestner sintetizó químicamente este compuesto pensando que había obtenido ácido oxálico; en 1828 Louis Joseph Gay-Lussac (1778-1850) al estudiar este compuesto demostró que tenía la misma composición del ácido tartárico y le dio el nombre de ácido racémico**.

*Los vitivinicultores llamaban a este precipitado que contenía las sales “Tártaro o Tártaros” del latín *tartarus* : Lugar de tormento y sufrimiento eternos, parecido al infierno del Cristianismo y al inframundo de las religiones paganas.

**Viene del latín *racemus*: Racimo de uvas.

En 1831 J. Jacob Berzelius (1779-1848) al estudiar el ácido tartárico y el racémico señaló que estos compuestos presentan el fenómeno de isomería ya que tienen la misma composición química, pero difieren en algunas de sus propiedades.

En 1832 Jean Baptiste Biot (1774-1862) observó que el ácido tartárico desviaba la luz polarizada en forma dextrorrotatoria y en 1838 al estudiar este comportamiento en el ácido racémico descubrió que este era ópticamente inactivo. Louis Pasteur (1822-1895) discípulo de Biot estudió cristales de las sales de sodio y amonio del ácido racémico observó la forma hemihedral de los dos tipos de cristales pero se dio cuenta que las caras de los cristales del ácido racémico algunas veces estaban giradas a la derecha y otras a la izquierda, por lo que separó manualmente los dos tipos de cristales bajo la óptica de un microscopio (Figura 2).

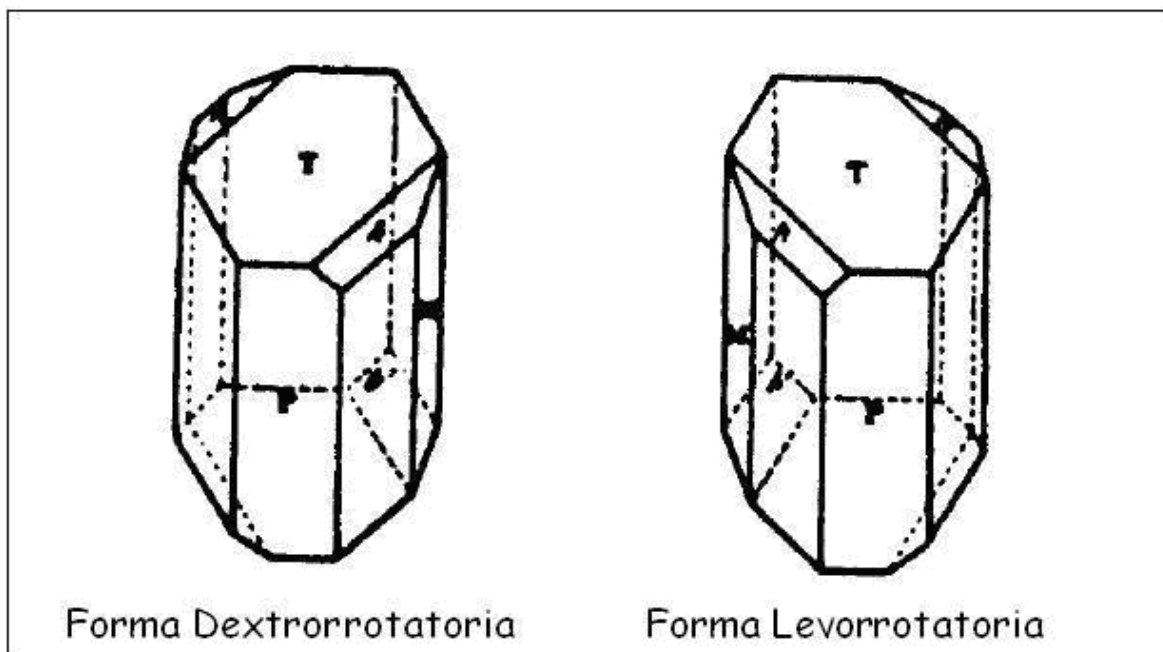


Figura 2. Cristales hemiedrales de las sales de sodio y amonio del ácido racémico

Usando un polarímetro descubrió que soluciones de igual concentración de los dos tipos de cristales desviaban la luz polarizada: una en la misma dirección y magnitud que lo haría una solución de la misma concentración de una sal de sodio y amonio de ácido tartárico y la otra exactamente en la dirección opuesta y con igual magnitud [2].

En el año de 1874 Joseph LeBel (1847-1930) y Jacobus H. Van't Hoff (1852-1911) al estudiar los fenómenos ocurridos con diversas sustancias que desvían el plano de la luz polarizada, proponen en forma independiente que la disposición espacial generada por los cuatro enlaces del carbono debería presentar la forma de un tetraedro para explicar los fenómenos producidos por los diferentes isómeros, proponiendo que una molécula que tuviera un carbono con geometría tetraédrica unido a cuatro sustituyentes diferentes podría tener un isómero que sería el correspondiente a su imagen especular, que se conocerían como enantiómeros y que sus propiedades tanto físicas como químicas serían las mismas con excepción de la desviación del plano de luz polarizada que sería la opuesta lo que daría una explicación lógica del porqué estos no podían ser separados por métodos convencionales.

Descubierta la quiralidad de algunos compuestos se planteó la necesidad de como nombrarlos debido a su configuración espacial, los ingleses R. S. Cahn (1899-1981) y C. K. Ingold (1893-1970) junto con el suizo V. Prelog (1906-1998) propusieron el sistema *R*, *S* para designar la configuración quiral de un átomo de carbono, es decir la configuración estereoquímica absoluta de un carbono estereocéntrico. A los cuatro grupos unidos al estereocentro se les asigna una prioridad en base al número atómico del átomo unido directamente al carbono, el grupo con el átomo que posee el número atómico más bajo se le asigna la menor prioridad "4", al siguiente grupo el "3", y así sucesivamente. Cuando la prioridad no pueda ser asignada en base al número atómico del átomo enlazado directamente por encontrarse dos o tres iguales, se procederá con el número atómico de los siguientes átomos del grupo. Después colocando la molécula con el grupo de más baja prioridad en el lado opuesto de la vista del observador se analiza la posición de los tres grupos restantes de la siguiente forma: Si la prioridad en orden creciente de ellos está en la dirección de las manecillas del reloj el enantiómero será *R*, si es en la dirección contraria se le asigna la configuración *S*. Es importante señalar que esta configuración es independiente de hacia donde la molécula gire el plano de la luz polarizada, este giro se denota con los símbolos (+) o (-).

2.2 Enantiómeros.

Como se mencionó los enantiómeros tienen idénticas propiedades físicas como son: el punto de ebullición, el punto de fusión, la solubilidad, la densidad, el índice de refracción, sus espectros: en el infrarrojo, ultravioleta y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) son idénticos (si se utilizan disolventes aquirales). Los enantiómeros tienen idénticas velocidades de reacción utilizando reactivos aquirales y su única diferencia es el sentido positivo o negativo de su rotación óptica.

Por lo tanto, separar enantiómeros o resolver una mezcla racémica requiere de metodologías especiales como la formación de derivados utilizando sustancias con actividad óptica, por ejemplo: el sintetizar diastereoisómeros o el uso de columnas con soportes quirales en cromatografía.

En la actualidad muchos compuestos utilizados comercialmente son mezclas racémicas, en el caso de medicamentos se pueden presentar las diferentes posibilidades de actividad para cada enantiómero, puede ser que uno de ellos sea el farmacológicamente activo y el otro no o ambos pueden tener efectos diferentes en el organismo esto es, uno farmacológicamente considerado el principio activo y el otro llegar a ser tóxico, como es el caso de la Talidomida (Figura 3).

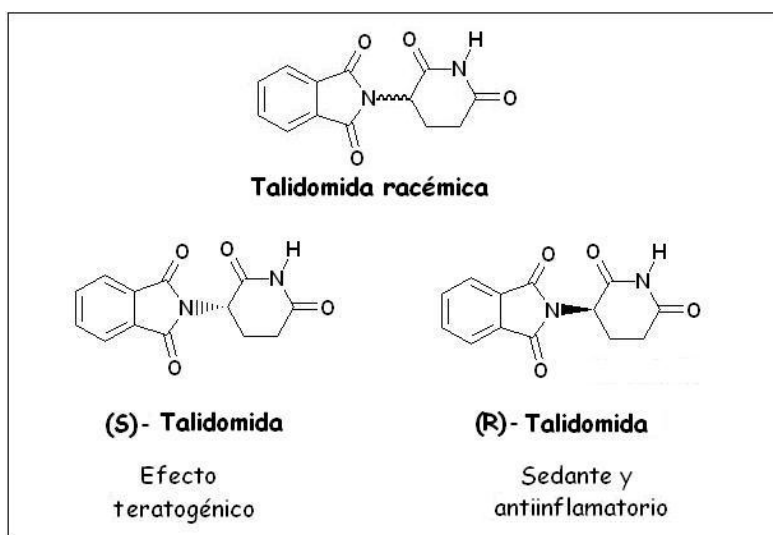


Figura 3. Talidomida.

Este medicamento racémico, se comercializó a mediados del siglo pasado como un inductor de la relajación y del sueño con excelente efecto terapéutico, utilizado por sus propiedades en mujeres embarazadas, su uso durante el primer trimestre de gestación produjo en el feto un efecto teratogénico irreversible, generando un gran número de nacimientos anormales. Estudios posteriores revelarían que solo el enantiómero (*R*) producía el efecto terapéutico y que el (*S*) producía el efecto teratogénico. No obstante la separación y administración del enantiómero (*R*) se ha comprobado que la Talidomida se racemiza *in vivo* sin importar cual enantiómero sea administrado [3].

Ejemplos como este estimulan la necesidad de producir medicamentos enantioméricamente puros para evitar el uso de fármacos que en su forma racémica podrían tener diversos efectos adversos.

2.3 Rotación específica.

La rotación específica de un compuesto es la propiedad que éste presenta al desviar el plano de la luz polarizada y se expresa como su rotación específica.

Rotación específica $[\alpha]_D^T$:

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

Donde:

α : Rotación observada en grados.

l : Longitud del paso óptico (dm).

c : Concentración de la muestra (g/mL).

T : Temperatura.

D : Longitud de onda de la línea D de una lámpara de sodio.

La magnitud de la rotación óptica depende de la temperatura, de la longitud de onda de la luz empleada y del tipo de disolvente utilizado, por lo cual es importante señalar estos valores en cualquier experimento. Generalmente se utiliza la longitud de onda de 589.6 nm de una lámpara de sodio (línea D del sodio). La dirección en que el compuesto desvía el plano de la luz polarizada se suele agregar al valor de la rotación específica obtenido mediante los símbolos (+) y (-).

2.4 Excesos enantioméricos.

Como es sabido, un compuesto racémico es una mezcla 50:50 de sus dos enantiómeros. Ahora supongamos que por algún proceso químico o bioquímico la reacción no genera un compuesto racémico si no una mezcla que tuviera un exceso de cualquiera de los dos enantiómeros, ¿cómo podríamos observar este exceso?

Se pueden utilizar técnicas espectroscópicas o técnicas de separación ya sea física o química.

La polarimetría es el método clásico, la desviación neta de la luz polarizada de un compuesto racémico es cero, los enantiómeros puros desviarán la luz con la misma magnitud pero en sentido contrario, en una mezcla no racémica, el enantiómero en exceso definirá el sentido de la rotación y la magnitud de ésta la proporción entre uno y otro.

Otra técnica es la Resonancia Magnética Nuclear que requiere el uso de disolventes quirales o reactivos quirales para formar derivados y generar desplazamientos de señales e integraciones diferentes con los que se pueden distinguir y cuantificar los dos enantiómeros.

La separación física de los cristales utilizando un microscopio como lo hizo Pasteur, aunque poco práctica es otra alternativa. También la síntesis química de diastereoisómeros, su posterior separación y cuantificación. De las técnicas más comúnmente empleadas, la cromatografía ha permitido separar a los enantiómeros al utilizar fases móviles y fases estacionarias que interactúan de forma distinta con uno u otro enantiómero haciendo posible su separación.

Cálculo del porcentaje de exceso enantiomérico:

$$\% \text{ de exceso enantiomérico (e.e.)} = \frac{(e_1 - e_2) 100}{e_1 + e_2}$$

Donde e_1 es la fracción molar del enantiómero en exceso y e_2 la del enantiómero de menor concentración.

Otra forma es calcular el porcentaje de pureza óptica:

$$\% \text{ de pureza óptica (p.o.)} = \frac{[\alpha] \text{ mezcla } 100}{[\alpha] \text{ del enantiómero puro}}$$

2.5 Catálisis.

Un catalizador es aquella sustancia que acelera o disminuye la velocidad de una reacción y puede ser recuperado sin cambio aparente. Un catalizador en la mayoría de los casos disminuye la energía de activación de una reacción [4].

La reacción catalítica más antigua conocida por el ser humano es la fermentación del vino; el estudio de la catálisis empezó a partir del siglo XIX. En 1817 Sir Humphrey Davy observó como un hilo de platino al ponerlo en contacto con etanol empezaba a calentarse hasta ponerse al rojo vivo a la vez que se producía ácido acético, ya en 1831, el vendedor de vinagre Peregrine Phillips patentó un proceso de oxidación de SO_2 catalizada por esponja de platino para obtener trióxido de azufre y ácido sulfúrico concentrado de forma económica, ahora conocido como proceso de contacto. En 1836 Jacob Berzelius atribuyó estos fenómenos a una fuerza misteriosa capaz de destruir las uniones moleculares. Para el siglo XX se inició la explotación industrial de procesos catalíticos y para 1915 la síntesis de amoníaco descubierta por Fritz Haber catalizada por el hierro, inició su industrialización dando como resultado el proceso Haber-Bosch y en esa misma década Paul Sabatier publicó el primer libro de catálisis [4].

De acuerdo a las condiciones en que se produce la catálisis, esta se divide en tres tipos: [5].

1. La catálisis homogénea la cual se produce por la reacción catalizada en una sola fase.
2. La catálisis heterogénea en la que la reacción se produce en la interfase entre dos fases.
3. Catálisis enzimática.

2.6 Catálisis enzimática.

El químico Alemán Eduard Büchner en el año de 1897 obtuvo un extracto de levadura, al agregar éste al jugo de uva se produjo una reacción con la que se realiza por primera vez una fermentación sin utilizar microorganismos, a este extracto Büchner lo llamo “enzima” que significa “en el jugo” [1].

Las enzimas son catalizadores de naturaleza proteica, la secuencia y el arreglo espacial de la cadena de aminoácidos que integran una enzima determinan su estructura tridimensional, la cual determina su interacción con otras moléculas o entre diferentes zonas de la misma molécula. Los aminoácidos que tienen residuos hidrofóbicos tienden a agruparse hacia el interior de la molécula mediante enlaces débiles no covalentes, las fuerzas de atracción de estos enlaces son de cuatro tipos: fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas. (Las fuerzas hidrofóbicas se producen cuando los grupos no polares de la proteína tratan de reducir al mínimo su contacto con el agua). También la formación de puentes disulfuro, (enlaces S-S) constituidos por la unión de dos grupos –SH de dos cisteínas cercanas, sirven para estabilizar la estructura tridimensional de una enzima.

Muchas enzimas también están compuestas por varias cadenas de aminoácidos, conocidas como subunidades, la unión de estas subunidades y su disposición espacial determinan las propiedades químicas en la superficie de la enzima y por ende su actividad catalítica.

2.7 Mecanismo catalítico.

La molécula sobre la cual actúa una enzima se le conoce como sustrato, éste se enlaza a un centro activo de la enzima formando el complejo enzima-sustrato y en ese momento el sustrato se transforma en producto y se libera de la enzima. Existen varios esquemas mecanísticos posibles para la catálisis enzimática, el más sencillo en concordancia con el modelo de Michaelis-Menten es el siguiente:

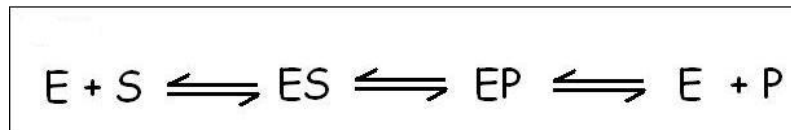


Figura 4. Modelo Michaelis-Menten.

- E = Enzima libre.
- S = Sustrato.
- ES = Complejo Enzima-Sustrato.
- EP = Complejo Producto-Enzima.
- P = Producto.

En la célula se realizan simultáneamente múltiples reacciones químicas, diversos mecanismos de control regulan la actividad de las enzimas en respuesta a las condiciones existentes. Una forma muy común de regulación es la inhibición por retroalimentación ejercida por el producto sobre la propia enzima, otra forma es la modificación de una enzima hecha por otra, por ejemplo: la fosforilación de una enzima modificando la estructura espacial ante el sustrato.

2.8 Biotransformaciones.

Una biotransformación es una reacción química catalizada por un organismo vivo, como: células vegetales, células animales o microorganismos, realizada por las enzimas que los constituyen; todos ellos son considerados biocatalizadores. La especificidad, la velocidad de reacción y su actividad dependerán del tipo de sustrato y del biocatalizador utilizado [6].

Una de las primeras personas en realizar biotransformaciones utilizando una metodología fue Luis Pasteur que en 1862 utilizó *Bacterium Xylinum* para obtener ácido acético de la oxidación de alcohol [7].

Los elementos principales que se deben tomar en cuenta para realizar una biotransformación son: el tipo de sustrato, el biocatalizador y las condiciones experimentales [6].

- *El sustrato:*

Debe estar disuelto en el medio de reacción y ser capaz de entrar en contacto con el biocatalizador, si se trata de células completas es posible que deba atravesar la membrana celular hasta entrar al citoplasma.

- *El biocatalizador:*

Deber ser capaz de realizar la reacción deseada con buen rendimiento.

- *Las condiciones de la biotransformación:*

El uso de un medio acuoso, disolvente orgánico o combinación de ambos, la temperatura, el pH, la agitación, la concentración de los solutos en el medio de crecimiento (sales, gases, azúcares, factores de crecimiento y cofactores enzimáticos, etc.), el uso de sustancias que inmovilicen a las enzimas o células como resinas o

polímeros, son diversos factores que deben tomarse en cuenta para llevar a cabo la biotransformación.

- El momento en que se efectúa la biotransformación:

En caso de utilizarse un organismo vivo, deberá observarse la fase de crecimiento en que éste se encuentra (fase exponencial o estacionaria). Al utilizar un cultivo de células vegetales debe recordarse que éste se encuentra en constante cambio y que el ciclo celular podrá variar con respecto al tiempo y las células se adaptarán durante éste a las condiciones de cambio.

Generalmente la forma en que se extrae el producto y se caracteriza involucra metodología estándar, esto es: se separa la biomasa del producto ya sea por filtración o centrifugación y de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del producto se realiza una extracción, destilación, cromatografía, cristalización, precipitación, etc.

2.9 Ejemplos de biotransformaciones con sustratos exógenos y células vegetales.

Las plantas producen metabolitos secundarios a los cuales el hombre les ha dado una infinidad de usos: fármacos, pigmentos, saborizantes, perfumes y agroquímicos. Así mismo en su búsqueda de conocimiento y también en su afán de desarrollar procesos tecnológicos a gran escala, ha llegado a contaminar el medio ambiente y por lo tanto a sus plantas, llevándolas a situaciones de estrés y estas a su vez han respondido metabolizando una gran cantidad de compuestos que de manera natural no estarían presentes en ellas, dando inicio al estudio de como realizan las plantas este proceso para obtener productos con características especiales [7, 8, 9,10].

Las reacciones producidas por células vegetales se clasifican de acuerdo al tipo de reacción en que participan, por ejemplo:

Hidroxilación.

La hidroxilación que puede ser regio y estereoselectiva, es una de las categorías más importantes ya que produce sustancias que pueden ser utilizadas en la industria farmacéutica o para síntesis química de productos quirales.

Uno de los cultivos celulares más estudiados en reacciones orgánicas, son los derivados de la planta *Nicotiana tabacum*, así se encuentra descrita la biotransformación del linalol (1), al dihidrolinalol (4) y sus respectivos acetatos (3) y (6) a los 8-hidroxiderivados (2) y (5) [11], (Figura 5).

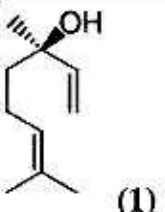
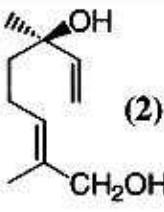
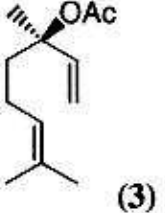
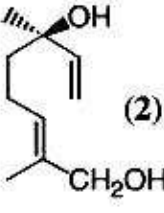
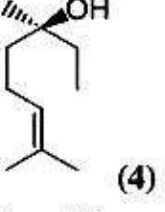
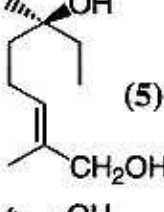
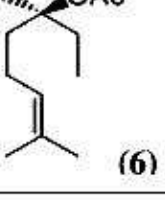
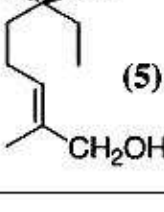
Sustrato	Especie de Planta	Producto	Referencia
 (1)	<i>N. tabacum</i>	 (2)	[11]
 (3)	<i>N. tabacum</i>	 (2)	[11]
 (4)	<i>N. tabacum</i>	 (5)	[11]
 (6)	<i>N. tabacum</i>	 (5)	[11]

Figura 5. Hidroxilaciones regio y estereoselectivas.

Un ejemplo de la formación de un glicol es la biotransformación de acetato de γ -terpinilo (7) con células de cultivos vegetales de *Nicotiana tabacum*. Se describe la formación inicial del epóxido (8) a partir del doble enlace C=C seguido de su hidrólisis para generar el glicol (9) [12], (Figura 6).

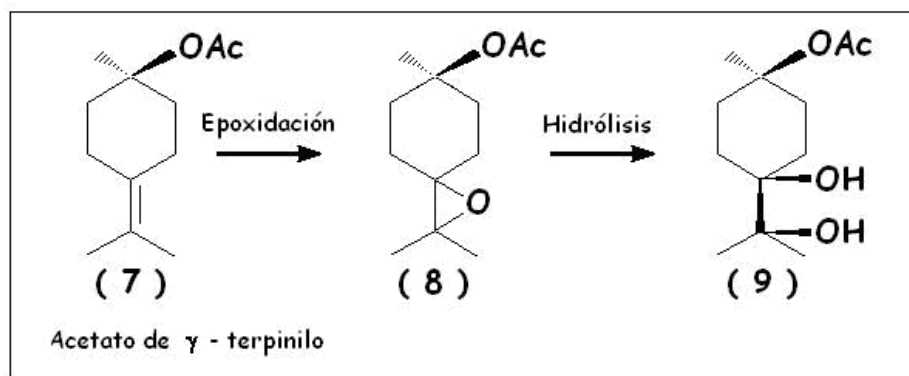


Figura 6. Hidroxilación a partir de un epóxido.

Reducción de un grupo carbonilo.

Dependiendo del sustrato utilizado, se generan centros proquirales o quirales según sea el caso y se estudiará más detenidamente en la siguiente sección.

Glucosilación.

Este tipo de reacciones facilitan la conversión de compuestos insolubles en agua en solubles, los cultivos de células vegetales son capaces de efectuar glucosilaciones con menor dificultad que los microorganismos o algunos métodos de síntesis tradicional. Un ejemplo, es el del ácido butírico un potente inhibidor de la proliferación de células cancerosas contra la leucemia *in vitro*, sin embargo su aplicación es limitada por su corto tiempo de vida media en mamíferos, la glucosilación del ácido butírico por células de cultivos vegetales en suspensión de *Nicotiana plumbaginifolia* para obtener 6-O-butiril-D-glucosa, extiende el tiempo de vida media y aumenta su actividad farmacológica [13].

Hidrólisis.

Las células de cultivos vegetales pueden hidrolizar al grupo acetoxi, un ejemplo es la hidrólisis enantioselectiva para la resolución de acetatos racémicos utilizando cultivos de células vegetales de *Spirodela oligorrhiza*, en este sentido se describe la hidrólisis del acetato de 1-etilfenilo y sus derivados [14]. Otros ejemplos de hidrólisis son los reportados con cultivos de células vegetales de *Nicotiana tabacum*, *Lavandula angustifolia* y *Spirodela oligorrhiza*. [11, 15, 16]. (Figura 7).

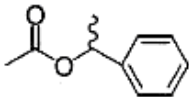
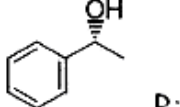
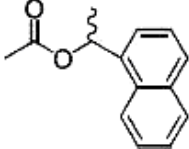
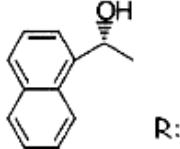
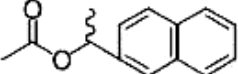
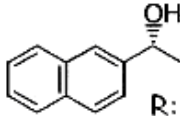
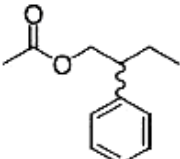
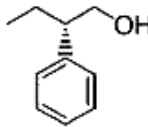
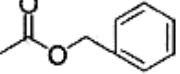
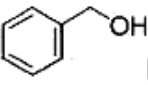
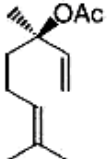
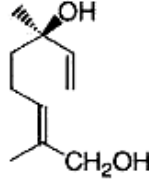
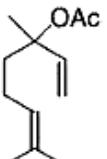
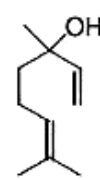
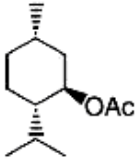
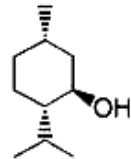
Sustrato	Especie de Planta	Producto	Referencia
	<i>Spirodela oligorrhiza</i>		R: 50% [14]
	<i>S. oligorrhiza</i>		R: 33% [14]
	<i>S. oligorrhiza</i>		R: 15% [14]
	<i>S. oligorrhiza</i>		R: 43% [14]
	<i>S. oligorrhiza</i>		R: 10% [14]
	<i>N. tabacum</i>		R: 15% [11]
	<i>Lavandula angustifolia</i>		R = rendimiento [15]
	<i>Spirodela oligorrhiza</i>		[16]

Figura 7. Hidrólisis estereoselectiva.

2.10 Reducción biocatalítica de cetonas.

La reducción de una cetona en su correspondiente alcohol, es una de las reacciones más comunes en química orgánica, los métodos más usados requieren el uso de metales tóxicos o complejos de hidruros, las biotransformaciones ofrecen ventajas significativas como son: las condiciones de reacción, la estereoselectividad y la baja o nula toxicidad de los reactivos y productos de reacción, algunos ejemplos se muestran en la figura 8 [17, 18, 19, 20, 21, 22].

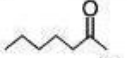

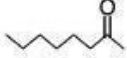

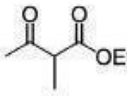
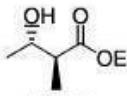
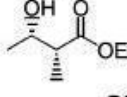
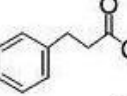
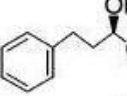
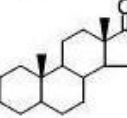
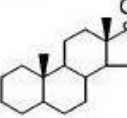
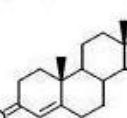
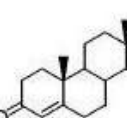
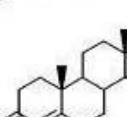
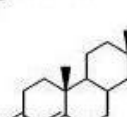
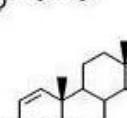
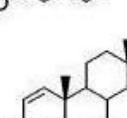
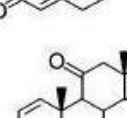
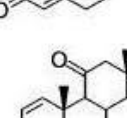
Sustrato	Especie de Planta	Producto	Referencia
	<i>N. tabacum</i>		[17]
	<i>N. tabacum</i>		[17]
	<i>M. polymorpha</i>		[18]
	<i>G. max</i>		[18]
	<i>Daucus carota</i>		[19]
	<i>D. phalaenopsis</i>		[20]
	<i>D. phalaenopsis</i>		[20]
	<i>M. polymorpha</i>		[21]
	<i>M. polymorpha</i>		[22]
	<i>M. polymorpha</i>		[22]

Figura 8. Biorreducción de cetonas.

En nuestro estudio usaremos como sustrato el acetoacetato de etilo que ha sido ya utilizado en otros estudios junto con otros β -ceto-ésteres como sustratos de una biorreducción hecha por hongos [23, 24], bacterias [25] y por supuesto plantas [26]. Las enzimas especializadas en catalizar este tipo de reacciones pertenecen al grupo de las oxidoreductasas, dentro de este grupo las enzimas clasificadas como deshidrogenadas presentes en bacterias, hongos, plantas y animales [27, 28], son capaces de catalizar biorreducciones de cetonas [23, 24, 25, 26], utilizando cofactores como el nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) [29] y el nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) [29,30] (Figura 9).

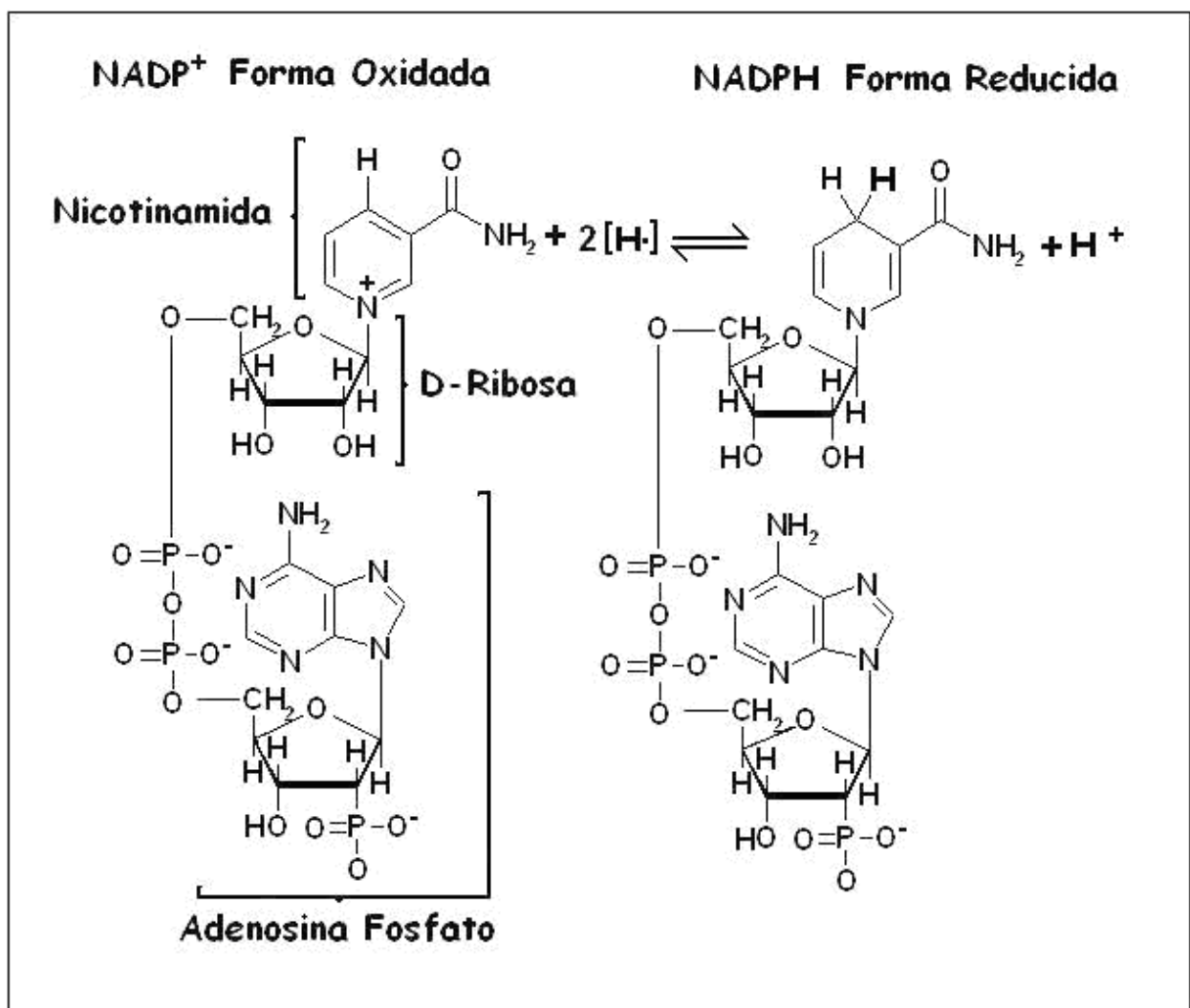


Figura 9. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) y su forma reducida (NADPH).

La forma más sencilla de analizar la biorreducción de una cetona es el esquema de una sola enzima con dos sustratos acoplados (Figura 10a), en éste la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) transforma un sustrato y un cosustrato regenerándose en cada ciclo. Otro esquema utilizado involucra a dos enzimas acopladas (Figura 10b) en este esquema la enzima “A” (ADH) reduce al sustrato y se regenera por oxidación con cofactor el NADPH, este cofactor se regenera interactuando con la enzima “B” que a su vez cataliza la reacción de un cosustrato (Figura 10b) [31].

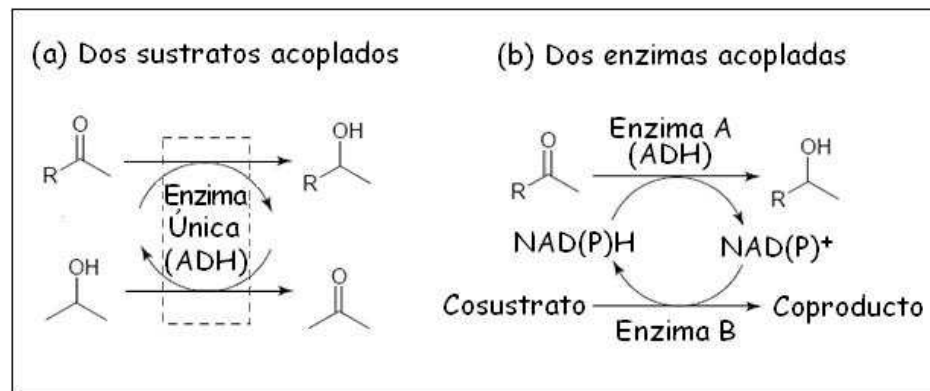


Figura 10. Biorreducción enzimática

El NADH y el NADPH son cofactores utilizados en el anabolismo celular (síntesis de moléculas orgánicas complejas), obteniendo NAD^+ y $NADP^+$ y estos a su vez son utilizados en el catabolismo celular (reacciones de degradación de moléculas orgánicas complejas) reduciéndose a NADH y NADPH. El balance entre la forma oxidada y la reducida del $NAD^+/NADH$ es tan importante en las células que regula el metabolismo de muchas enzimas en distintas vías, así como la transcripción del ADN y envejecimiento [32, 33], es de esperarse que un sustrato exógeno pueda ser biorreducido para mantener este balance.

Con respecto a la estereoselectividad, pocas biorreducciones de cetonas han logrado grandes excesos enantioméricos. Usando cultivos de células vegetales de *Daucus carota* se han reportado excesos enantioméricos superiores al 95% del enantiómero “S” [34], (Figura 11).

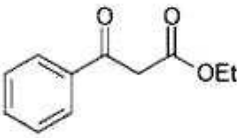
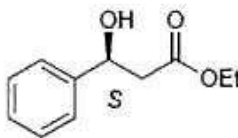
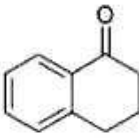
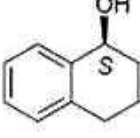
Sustrato	Especie de Planta	Producto	Referencia
	<i>Daucus carota</i>		[34]
98% e.e., 62% rendimiento.			
	<i>Daucus carota</i>		[34]
96% e.e., 52% rendimiento			

Figura 11. Reducción estereoselectiva de cetonas.

Es interesante señalar que la mayoría de las biorreducciones de cetonas que utilizan células vegetales siguen la regla de Prelog (Figura 12), esto es en base a las reglas establecidas para designar la configuración de un átomo quiral de Cahn-Ingold-Prelog (sistema *R*, *S*). En donde el enantiómero “*S*” predomina.

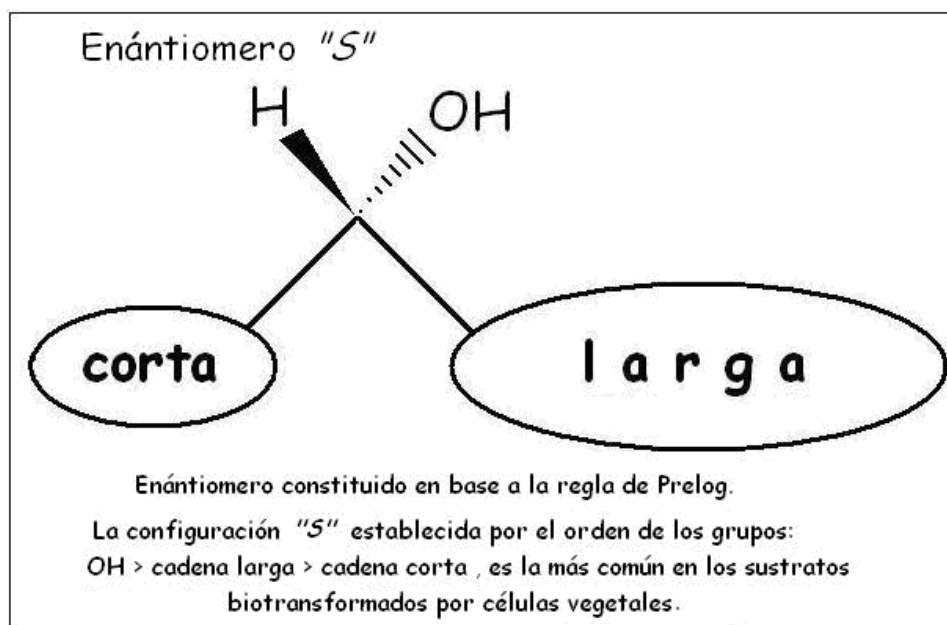


Figura 12. Regla de Prelog.

Se han realizado estudios utilizando enzimas del tipo cetorreductasas para biorreducir acetoacetato de etilo, en las cuales se ha obtenido el 3-hidroxi-butanoato de etilo con un exceso enantiomérico de hasta un 99% del enantiómero *R* o *S* y mezclas de ambos con un exceso enantiomérico de uno u otro enantiómero [35]; estas diferencias se deben a las condiciones en las que se realiza la biotransformación; por ejemplo un estudio en el que se usó el hongo *Geotrichum candidum* para biorreducir distintas cetonas aromáticas se obtuvieron ambos enantiómeros con un exceso enantiomérico mayor al 99% variando las condiciones de biorreducción: el enantiómero *S* se obtuvo utilizando atmosfera de nitrógeno y una resina polimérica para absorber el sustrato, de esta manera su concentración en el medio disminuyó, haciendo que enzimas con una afinidad mayor por el sustrato a bajas concentraciones efectuaran la biorreducción, es decir, enzimas con valores menores de K_M (constante de Michaelis-Menten) que pudieron lograr su máxima eficacia catalítica a bajas concentraciones del sustrato, en cambio el enantiómero *R* se obtuvo con un exceso enantiomérico mayor al 99% cuando la biorreducción se realizó en condiciones moderadamente aeróbicas[36].

En la enantioselectividad de la biorreducción también juega un factor importante la forma en que se acoplan la enzima, el cofactor y el sustrato en el espacio, por ejemplo en las cetorreductasas del tipo alcohol deshidrogenasa que ocupan un cofactor como el NADPH la transferencia del hidruro puede darse de cuatro formas distintas. (Figura 13). Cuando el ataque ocurre por la cara enantiotópica "*S*" casos E_1/E_2 se obtiene el enantiómero "*R*" o cuando ocurre por la cara enantiotópica "*Re*" casos E_3/E_4 se forma el enantiómero "*S*" respetando la regla de prelog, esta transferencia depende de la manera en que se forma el complejo enzima-sustrato-cofactor y puede ayudar a clasificar una enzima en base a estos cuatro patrones de reducción [37].

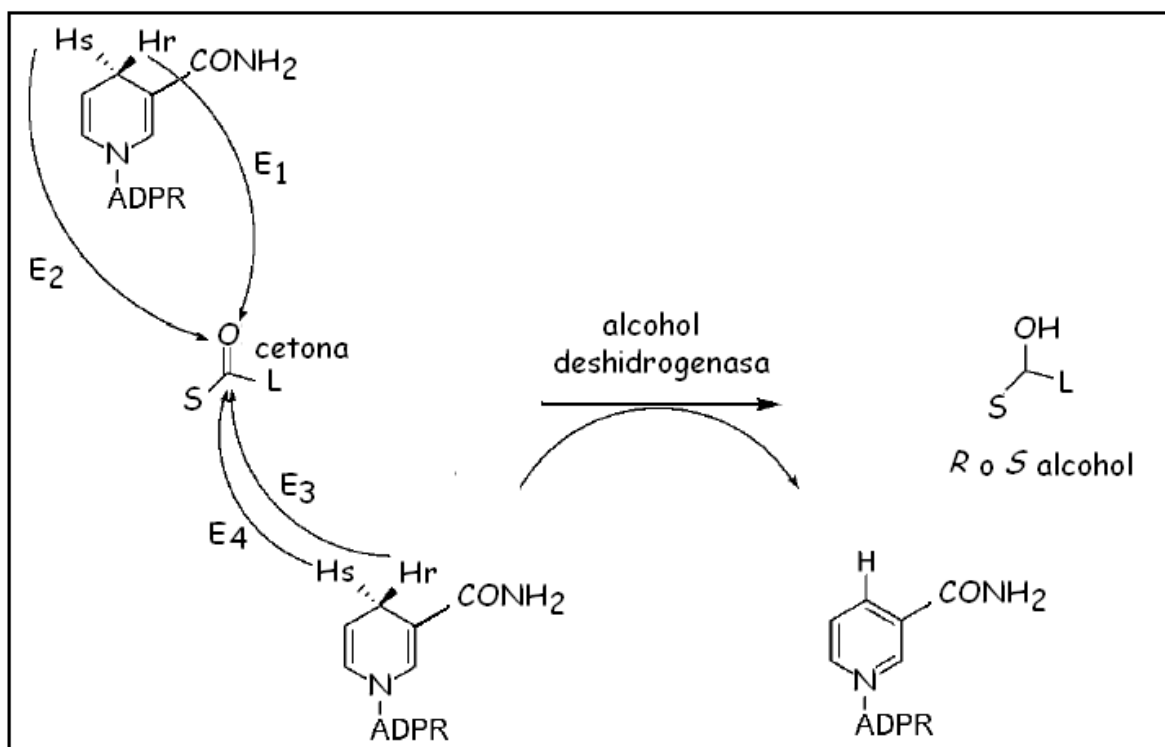


Figura 13. Mecanismo estereoquímico para la transferencia de un hidruro (H) de NADPH.

2.11 Especies vegetales: *Taxus brevifolia* y *Taxus globosa*.

El genero *Taxus* abarca diez especies de plantas leñosas en el mundo, en Norteamérica la más representativa es el árbol conocido como tejo del pacifico o tejo del oeste; la especie *Taxus brevifolia*, encontrada en diferentes lugares de la costa del pacifico desde Alaska hasta California en Estados Unidos, famosa por uno de sus metabolitos secundarios denominado paclitaxel o Taxol® que es utilizado en la quimioterapia contra el cáncer de mama, ovarios y pulmón (Figura 14).

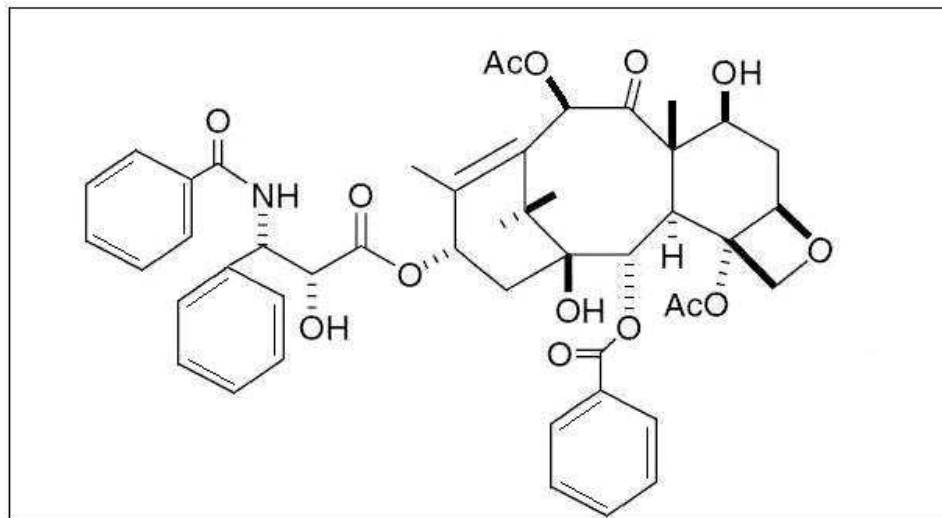


Figura 14. Paclitaxel

Originalmente esta droga se obtenía de la corteza del árbol, un kilogramo de corteza produce entre 100 y 170 miligramos del fármaco y se necesita la corteza de 1000 árboles para obtener un kilogramo de paclitaxel y al menos 3 gramos para el tratamiento de un paciente con cáncer, ya que el descortezamiento mata al árbol y debido a que esta especie necesita más de 100 años para alcanzar su talla completa, momento en el que puede ser descortezado, se hizo necesaria la búsqueda de otros métodos para obtener paclitaxel, como métodos sintéticos y propagación de líneas celulares. [38].

El tejo mexicano o *Taxus globosa* se encuentra esporádicamente desde Nuevo León y Tamaulipas, pasando por la cuenca del golfo (Hidalgo) hasta Centroamérica, los estudios realizados sobre el contenido de paclitaxel en esta planta demuestran que se

puede obtener de la corteza y las hojas, pero estudios de población la podrían catalogar como una especie rara, por la poca cantidad de individuos en las poblaciones estudiadas [39, 40, 41].

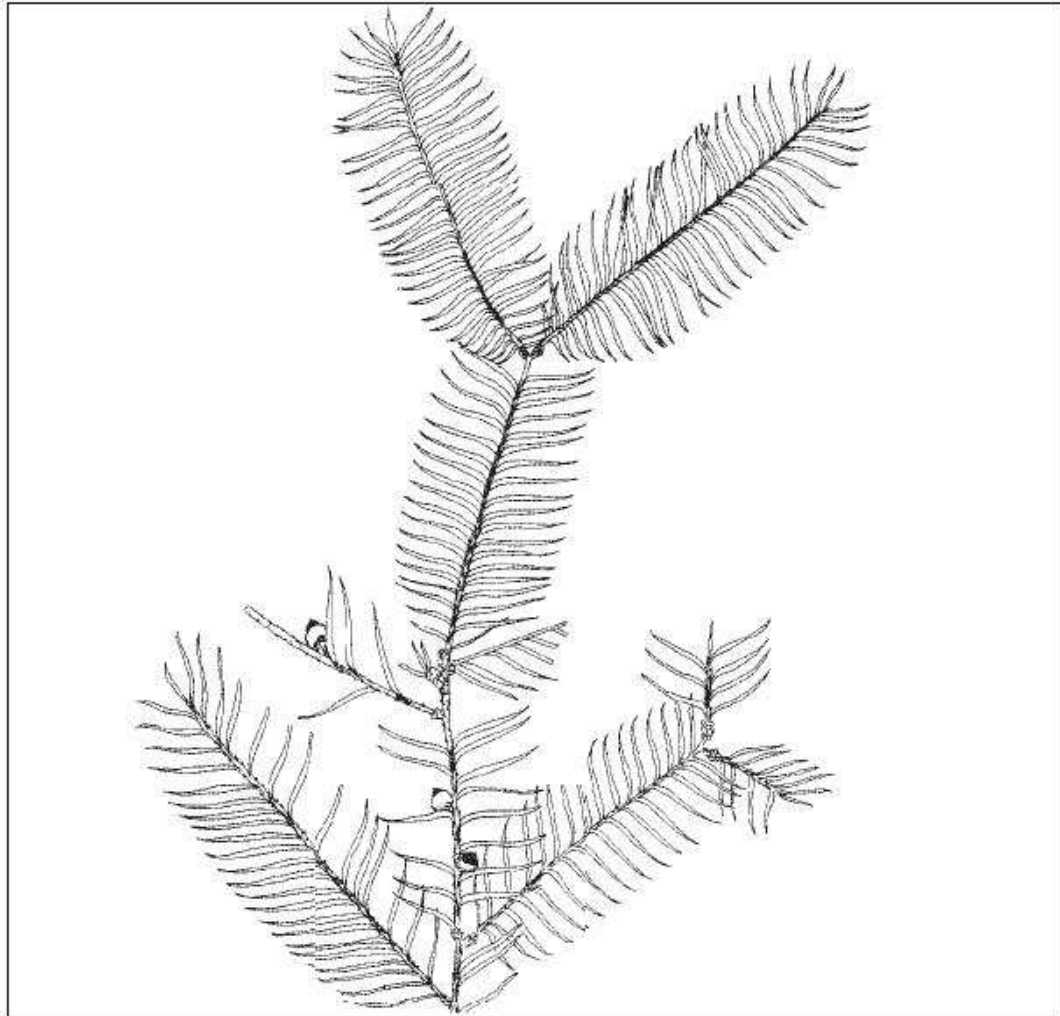


Figura 15. *Taxus globosa*, rama con conos.

2.12 Cultivo de células vegetales en un medio en suspensión.

Para el cultivo de células vegetales, se utilizan medios de cultivo ricos en azúcares y sales minerales que provean los macroelementos esenciales (carbono, hidrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio) y microelementos esenciales (hierro, manganeso, zinc, cobre, boro, molibdeno, cloro y níquel) necesarios para el desarrollo celular, así como vitaminas y factores de crecimiento (auxinas, citoquininas) necesarios para la propagación del cultivo [42].

Debemos tomar en cuenta que los tejidos vegetales durante su desarrollo en medio sólido o líquido en suspensión deben de adaptar su metabolismo a condiciones muy distintas a las presentes de forma natural, como son:

-La inhibición de la fotosíntesis como fuente primaria de carbono, al desarrollarse el cultivo en condiciones de obscuridad.

-La adaptación a un medio con una concentración distinta a la normal de auxinas (ejemplos: ácido naftalenacético y 2,4-diclorofenoxiacético) que inhiben la diferenciación celular de: raíces, tallos, hojas, etc. y estimulan la elongación de las células necesaria para la mitosis [42].

-El uso de citoquininas, también conocidas como citocininas (ejemplo: benzilaminopurina) que promueve un nuevo ciclo de crecimiento celular tras la mitosis [42].

-El uso de sacarosa como fuente primaria de carbono y de energía, estimula rutas metabólicas como la glucólisis, el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa y la vía de las pentosas [42]. Un estudio realizado en la especie *Taxus cuspidata* refleja que el contenido de sacarosa en el medio se consume totalmente en un periodo de 15 días, en este estudio la concentración de sacarosa y contenido celular es similar a la usada en el nuestro[43], además en lo que se refiere al desarrollo celular se presenta una fase de adaptación máxima de cuatro días, seguida de una fase de crecimiento exponencial

que va del día cuarto hasta el día quince, seguida de una fase estacionaria hasta el último día del estudio (día 30), este tipo de desarrollo celular es común en un tejido vegetal en suspensión y debe ser similar al que puedan presentar tanto *Taxus brevifolia* como *Taxus globosa*.

Además debe considerarse la adaptación en la absorción del medio al pasar de un medio sólido a líquido ya que este pasa de ocupar una fracción de la superficie del cúmulo celular hasta ocupar la totalidad de su superficie; al mismo tiempo hay un cambio en la proporción de CO₂ y O₂ disponible para las células ya que la solubilidad del CO₂ es mucho mayor en el agua en forma de ión bicarbonato HCO₃⁻, en cambio la del oxígeno es mucho menor que en el aire [44].

De esta manera los procesos metabólicos ya sean anabólicos o catabólicos se autorregulan unos a otros, y son influidos por las auxinas y citoquininas presentes en el medio en suspensión, que preparan y estimulan las condiciones necesarias para la formación de nuevas células a través de la mitosis, además las vías metabólicas sintetizan o degradan enzimas de acuerdo a las necesidades celulares; teniendo como base un metabolismo orientado a la glucólisis y alternativamente a la vía de las pentosas (producidas en el citosol), así como al ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (producidos en las mitocondrias).

2.13 Cultivos de células vegetales, su metabolismo y su efecto en una biorreducción.

Debido a que la actividad y la concentración de las enzimas cambia constantemente durante el desarrollo del cultivo es necesario efectuar la biorreducción en distintos momentos, por ejemplo en un estudio realizado en cultivos vegetales en suspensión de *Nicotiana tabacum* se observó el cambio en la actividad de enzimas como: malato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, etanol deshidrogenasa, 3-hidroxiacetato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa durante doce días, durante este tiempo se observan variaciones diarias de la actividad de cada enzima [45], este tipo de variaciones deben ser comunes en las enzimas presentes en un cultivo en suspensión.

Así la biorreducción de un sustrato exógeno responde a la degradación, síntesis y cambios en la actividad de las enzimas involucradas, influida por:

-El tipo de carbohidratos presentes, ya que al cambio a medio líquido fresco se tiene un máximo de sacarosa la que ira metabolizándose hasta tener un máximo de fructuosa, un máximo de glucosa y de demás metabolitos involucrados en la degradación de carbohidratos, por ende las enzimas necesarias para metabolizarlos se sintetizan y regulan en respuesta a estos.

-El desarrollo y reproducción del cultivo regulado por las auxinas y citoquininas presentes en el medio, las cuales dirigen la síntesis y degradación de proteínas orientados a la mitosis celular y desarrollo de organelos de la misma [42].

-La formación, trasportación, utilización y acumulación de cofactores con capacidad reductora como el NADH y NADPH [25, 29, 30, 31, 32, 33, 42].

2.14 Estudios previos realizados en el laboratorio.

En nuestro laboratorio el estudio de la propagación de cultivos de las especies *Taxus brevifolia* y *Taxus globosa* ha llevado años de investigación, presentado dificultades para lograr la propagación del callo a partir de un explante de tallo hasta llegar a un medio en suspensión y así obtener la cantidad necesaria de masa celular para realizar los estudios de biotransformación de sustratos exógenos; estos estudios permitieron definir que dos semanas son el periodo óptimo para el cambio de medio en suspensión, este periodo permite el crecimiento constante de masa celular [46, 47].

En uno de estos estudios se evaluó durante varias semanas el contenido de proteína y masa húmeda en cultivos de células vegetales de *Taxus brevifolia* y *Taxus globosa*, como una aproximación a la concentración de enzimas capaces de realizar una biorreducción [46], para *Taxus brevifolia* se utilizaron tres líneas celulares, los resultados muestran una relación inversa entre las dos variables (proteína y masa húmeda), observándose un porcentaje mayor de proteína en relación a la masa húmeda en la primera semana disminuyendo paulatinamente y volviendo aumentar entre la cuarta y quinta semana, momento en que se terminó el estudio. Para *Taxus globosa* se utilizaron dos líneas celulares, los resultados también muestran una relación inversa entre las dos variables, observándose en una de las líneas celulares un porcentaje mayor de proteína en relación a la masa húmeda en la primera semana y en la tercera semana y disminuyendo en la segunda y cuarta semana, la otra línea celular tuvo también un porcentaje mayor de proteína en relación a su masa húmeda en la primera semana para disminuir después, presentando un incremento importante entre la cuarta y quinta semana, incrementando el mismo en la sexta semana en la cual se terminó el estudio.

2.15 Cromatografía de Gases

La Cromatografía de Gases es un tipo de cromatografía instrumental utilizada para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles térmicamente estables, la mezcla es introducida en el inyector y eluida por la fase móvil, constituida por un gas acarreador generalmente He, N₂ o H₂ a través de la fase estacionaria contenida dentro de una columna. Los componentes de la mezcla se separan gracias a su diferente afinidad por la fase estacionaria, lo cual provoca que se transporten a diferentes velocidades en la fase móvil, a la salida de la columna, los componentes pasan por el detector donde se adquieren los cambios en la composición de la fase móvil, produciendo una respuesta que esta en función de la concentración de cada componente de la mezcla. Esta respuesta se registra en un conjunto de picos llamado cromatograma [48,49].

La duración y eficiencia del análisis está en función de:

- La presión de vapor de cada componente en la mezcla.

- Las propiedades fisicoquímicas de la fase estacionaria (naturaleza, composición, longitud, diámetro interno y diámetro de partícula).

- La naturaleza del gas portador de la fase móvil, generalmente un gas inerte (He, N₂ o H₂).

- La presión y la temperatura (isotérmica o gradiente).a la cuál se lleva a cabo el análisis.

La instrumentación básica consiste de un flujo regulado de fase móvil, un inyector, una columna conteniendo la fase estacionaria, un detector y un sistema de registro y manejo de datos, además el inyector, la columna y el detector deberán de contar con un horno con control de temperatura.

El equipo utilizado en este trabajo cuenta con un inyector con divisor de flujo “split/splitless”, que permite introducir la menor cantidad de muestra que pueda detectarse bien, para obtener una mejor resolución de los componentes.

Las columnas utilizadas son columnas tubulares abiertas, que comparadas con las columnas empacadas ofrecen mejor resolución, rapidez, y sensibilidad, pero menor capacidad de muestra.

Para la cuantificación de los analitos de este trabajo se utilizara una columna tubular abierta de sílice fundida con pared recubierta con una fase estacionaria líquida de polietilenglicol de alta polaridad.

Para la cuantificación del exceso enantiomérico de los analitos se utiliza también una columna tubular abierta de sílice fundida con una fase estacionaria quiral compuesta por β -ciclodextrina formada por un azúcar cíclico compuesto por siete moléculas de glucosa que contienen una cavidad quiral hidrófoba, cada enantiómero de un analito quiral tiene diferente afinidad por la cavidad interior de la β -ciclodextrina, haciendo que los analitos se separen al pasar por la columna.

El detector se selecciona dependiendo de la naturaleza de los analitos que se quieren cuantificar, tomando en cuenta la sensibilidad y selectividad requerida, para nuestro análisis se utilizara el detector de ionización de flama que mide la variación de la corriente de ionización en una flama aire-hidrógeno, el eluato se quema en presencia de la flama produciendo radicales y iones positivos los cuales conducen la corriente eléctrica desde la punta del quemador que actúa como ánodo hasta un colector catódico generando la señal en el detector.

3. Objetivos.

Principal:

El estudio de la actividad de las enzimas contenidas en las células de las líneas celulares de las dos especies *Taxus* frente a un sustrato exógeno. En este contexto se escogió la biorreducción del acetoacetato de etilo, cuyo producto el 3-hidroxibutanoato de etilo presenta la formación de un centro enantiogénico que indica la estereoselectividad de la biorreducción.

Particulares:

- Establecer la tendencia de enantioselectividad de la biorreducción mediante el cálculo de los excesos enantioméricos obtenidos y el conocimiento del rendimiento químico de la biorreducción.
- Describir la influencia que presenta la edad de los cultivos sobre la variación en el rendimiento y la enantioselectividad en la biorreducción del sustrato exógeno.

4. Parte experimental.

Los pasos seguidos para la realización de este trabajo se presentan a continuación:

1. Iniciación y propagación de los cultivos de células vegetales en suspensión de las especies de *Taxus brevifolia* y *Taxus globosa*, además de su mantenimiento durante el tiempo requerido para el estudio.
2. Síntesis química del 3-hidroxibutanoato de etilo para ser utilizado como referencia.
3. Biorreducción del sustrato acetoacetato de etilo utilizando las líneas de cultivos vegetales en suspensión de *Taxus brevifolia* y *Taxus globosa*, observando el efecto de la edad de los cultivos.
4. Cálculo, valoración e interpretación de los resultados obtenidos experimentalmente por Cromatografía de Gases [48, 49. 50].

El trabajo experimental inicia con el mantenimiento de dos líneas celulares: una de la especie *Taxus brevifolia* y otra de *Taxus globosa*, con el objetivo de obtener la cantidad de masa celular necesaria para efectuar las biotransformaciones del sustrato acetoacetato de etilo con cada una, durante un periodo de hasta 7 semanas para evaluar la forma en que ambos cultivos llevan a cabo la biorreducción del acetoacetato de etilo.

4.1 Cultivo de líneas celulares de las especies *Taxus*.

La propagación de cultivos vegetales requiere de condiciones estériles, por esto todo el material utilizado se lava perfectamente, se sumerge en una solución de hipoclorito de sodio durante al menos dos semanas, después se enjuaga con agua destilada, se seca y se esteriliza en una autoclave por un tiempo mínimo de dos horas a una presión superior a 1.6 kg/cm^2 , los medios de cultivo, soluciones reguladoras de pH, etc. son esterilizados por el mismo periodo, después de este tiempo se trata de tener un periodo de ventana de al menos dos días para observar el desarrollo de cualquier microorganismo y desecharlo antes de que pueda contaminar los cultivos, ver apéndices 9.1 y 9.2.

Las líneas celulares utilizadas para este trabajo fueron proporcionadas por la Dra. María del Consuelo Socorro Sandoval García como un callo en medio de cultivo sólido, la especie *Taxus brevifolia* se cambió a un medio en suspensión B₅NB desarrollado por Gamborg y colaboradores [51] con un pH 5.5 y una concentración de 0.1 g/mL, masa celular húmeda/medio de cultivo, en tanto la especie *Taxus globosa* se cambió a un medio en suspensión Schenk-Hildebrandt conocido como SH [52] con polivinil pirrolidona con un pH de 5.6 y una concentración de 0.1 g/mL, masa celular húmeda/medio de cultivo, ver apéndice 9.2.

4.2 Biotransformación de un sustrato exógeno.

Estudios previos en nuestro laboratorio, definieron las condiciones de la biotransformación:

- Tiempo: 48 horas.
- Concentración del sustrato: 0.2% V/V.
- Relación de masa celular húmeda / medio de cultivo en suspensión: 0.1 g de células/ mL de medio.
- Temperatura 20°C.
- Condiciones de obscuridad.
- Agitador orbital, 100 rpm.
- El volumen del matraz debe ser mínimo cinco veces mayor al volumen del medio líquido en suspensión, ejemplo: matraz de 250mL con un volumen de 40mL. de medio de cultivo en suspensión.
- Composición y el pH del medio del cultivo, ver apéndice 9.2.

La biotransformación del acetoacetato de etilo, tiene como producto de la biorreducción al 3-hidroxi-butanoato de etilo con un exceso de alguno de los dos enantiómeros (*R* o *S*), esta biotransformación se realizará semanalmente utilizando las dos líneas celulares de *Taxus* durante un periodo de siete semanas, haciendo una biotransformación por semana, para analizar los cambios en el rendimiento químico y el exceso enantiomérico.

El medio de la suspensión es el mismo en todo el estudio, conforme se propagan las células, cada dos semanas se cambia el medio por otro fresco, las condiciones de propagación y las de la biotransformación son las mismas, se utiliza el mismo medio en suspensión y se mantiene la relación de masa celular húmeda / mL de medio.

4.3 Análisis del 3-hidroxi-butanoato de etilo biotransformado.

Al concluir las 48 horas de cada biotransformación, la mezcla se filtra sobre celita (tierra de diatomeas) para separar las células, a la fase líquida se le realizan extracciones sucesivas con acetato de etilo, se reúnen los extractos de la fase orgánica a los cuales se les agrega sulfato de sodio anhidro como agente desecante, se filtra y se concentra en el rotovapor a una presión reducida de 40 mmHg, las muestras se colocan en refrigeración hasta su análisis por Cromatografía de Gases, ver apéndice 9.1.

El rendimiento de las biorreducciones y el exceso enantiomérico de cada una se analizó por Cromatografía de Gases con un detector de ionización de flama.

En el análisis cromatográfico para determinar el rendimiento se utilizó una columna (ver apéndice 9.1). con fase estacionaria de polietilenglicol, helio como gas acarreador con un flujo de 2.0 mL/ min, una temperatura del horno de 130°C, con una relación de split de 100:1, y una temperatura del inyector y del detector de 200°C.

En el análisis cromatográfico para determinar el exceso enantiomérico se utilizó una columna (ver apéndice 9.1) con fase estacionaria de 2,3-di-acetoxi-6-O-tert-butil dimetilsilil beta ciclodextrina unida a cianopropilfenil/ dimetilpolisiloxano 14%/ 86%, helio como gas acarreador con un flujo de 2.0 mL/ min, una temperatura del horno de 90°C, con un relación de split de 100:1, y una temperatura del inyector y del detector de 200°C.

4.4 Síntesis química del 3-hidroxi-butanoato de etilo.

La síntesis del 3-hidroxi-butanoato de sodio se realizó a partir de la reducción del acetoacetato de etilo con borohidruro de sodio (NaBH_4)

A un matraz bola de dos bocas en baño de hielo se le agregan 15 mL de etanol y se adicionan 0.4 g (10.6 mmoles) de borohidruro de sodio, a esta mezcla en agitación se le agregan por goteo lento 5 mL (40 mmoles) de acetoacetato de etilo, vigilando que la temperatura no aumente a más de 35°C.

La adición duro alrededor de 3 horas, al terminar la reacción se adicionó salmuera y se continuó la agitación durante 15 minutos más, se realizaron tres extracciones sucesivas con 15 mL de acetato de etilo cada una, se utilizó como agente desecante sulfato de sodio anhidro y se concentro en el rotovapor a presión reducida de 40 mm Hg.

El producto se purificó por destilación a presión reducida de 20 mmHg y temperatura de 72°C, el rendimiento de la reacción fue del 95%.

La caracterización del producto se realizó por Resonancia Magnética Nuclear de protón [53, 54, 55], ver apéndice 9.3.

4.5 Metodología del cálculo de resultados por cromatografía.

Para el cálculo de los resultados se utiliza el método de estándar interno [48, 49, 50].

Un estándar interno es una sustancia que se añade a la muestra en una cantidad conocida, con características fisicoquímicas similares a los analitos. Si los analitos y el estándar interno responden en una proporción similar a los errores instrumentales y las variaciones del método, la relación entre la señal del estándar interno y las señales de los analitos serán independientes de las variaciones del método, compensando los errores sistemáticos o aleatorios que se tengan.

Cuando se realiza una calibración se observa la relación entre la señal del analito y la del estándar interno como una función de la concentración del analito en la muestra con respecto al estándar interno.

Procedimiento de la medición:

La determinación de la cantidad de acetoacetato de etilo y 3-hidroxibutanoato de etilo en la muestra, se realiza a través de la curva de calibración.

Las etapas involucradas en la medición son las siguientes:

-Se prepara una disolución “stock” del estándar interno, con la cual se preparan las disoluciones utilizadas en la curva de calibración.

-Se preparan las disoluciones de acetoacetato de etilo y 3-hidroxibutanoato de etilo para la curva de calibración.

-Se mezcla el estándar interno y las disoluciones de calibración para realizar las mediciones por Cromatografía de Gases con detector de ionización de flama, de esta manera se obtienen los datos para la construcción de la curva de calibración.

-Posteriormente a las muestras se les agrega el estándar interno en la misma concentración utilizada en la curva de calibración, la relación de concentraciones analito / estándar interno debe estar dentro del intervalo de la curva de calibración, para asegurar la linealidad de los resultados

-Se realizan las determinaciones por Cromatografía de Gases con detector de ionización de flama de cada una de las muestras y se interpolan los resultados obtenidos utilizando la curva de calibración, ver apéndice 9.9.

5. Resultados.

5.1 Propagación de cultivos de células vegetales en suspensión

Después del cambio de medio sólido de *Taxus brevifolia* y *Taxus globosa* a medio líquido en suspensión, se presentaron incrementos en masa celular húmeda en cada cambio de medio, correspondiendo a *Taxus globosa* el mayor incremento. El desarrollo de las dos líneas celulares fue en forma de cúmulos de entre 1 a 3 cm. de diámetro de apariencia y de color uniforme. Conforme transcurría el tiempo el medio en suspensión cambió de un aspecto translucido hasta uno turbio ligeramente amarillo o rojizo al terminar el periodo de cambio de medio.

En las biotransformaciones realizadas semanalmente al agregar el acetoacetato de etilo no se observó un cambio sustancial en el aspecto de la masa celular y del medio al compararlo con el resto de la línea celular que continuaba su periodo de cambio de medio.

5.2 Discusión del mecanismo en la reducción del acetoacetato de etilo.

La síntesis del 3-hidroxibutanoato de etilo para utilizarlo como producto de referencia de la reacción de biosíntesis, se realizó según se describe en la parte experimental (Figura 16).

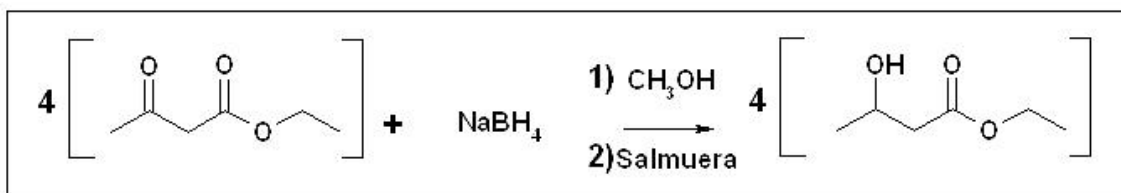


Figura 16. Reacción de reducción del acetoacetato de etilo.

Dentro del mecanismo de síntesis el borohidruro de sodio es un agente reductor de fuerza media, que reacciona rápidamente con aldehídos y cetonas, pero muy lentamente con ésteres. Una explicación sencilla del porqué el borohidruro de sodio prácticamente no reacciona con el carbonilo del éster en el acetoacetato de etilo que es un β -cetoéster, es porque se encuentra estabilizado por resonancia distribuyendo la densidad electrónica, lo que provoca una disminución de la carga parcial positiva en el carbono del carbonilo según se observa en la figura 17.

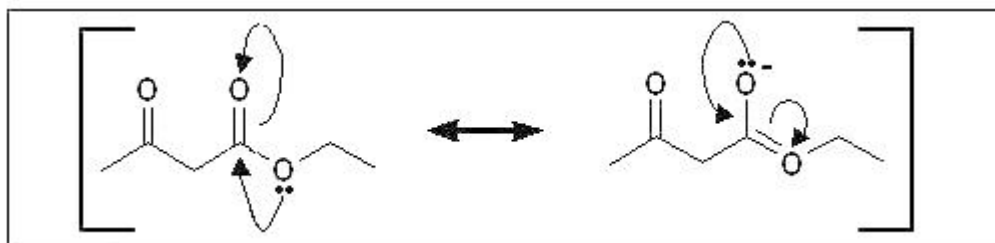


Figura 17. Estructuras de resonancia del acetoacetato de etilo

En esta reacción pueden ser utilizados disolventes prácticos como alcoholes o agua. El mecanismo de reacción involucra la activación del grupo carbonilo por coordinación del catión metálico (Na^+) con el oxígeno del carbonilo y el ataque nucleofílico del hidruro (H^-) al carbono del carbonilo, posteriormente se forma un alcoxiborano, el cual realiza otro ataque nucleofílico por parte del hidruro a otra molécula de acetoacetato de etilo, esto se repite hasta la formación del tetraalcoxiborano, el cual al agregar la salmuera se hidroliza hasta obtener el 3-hidroxibutanoato de etilo (Figura 18).

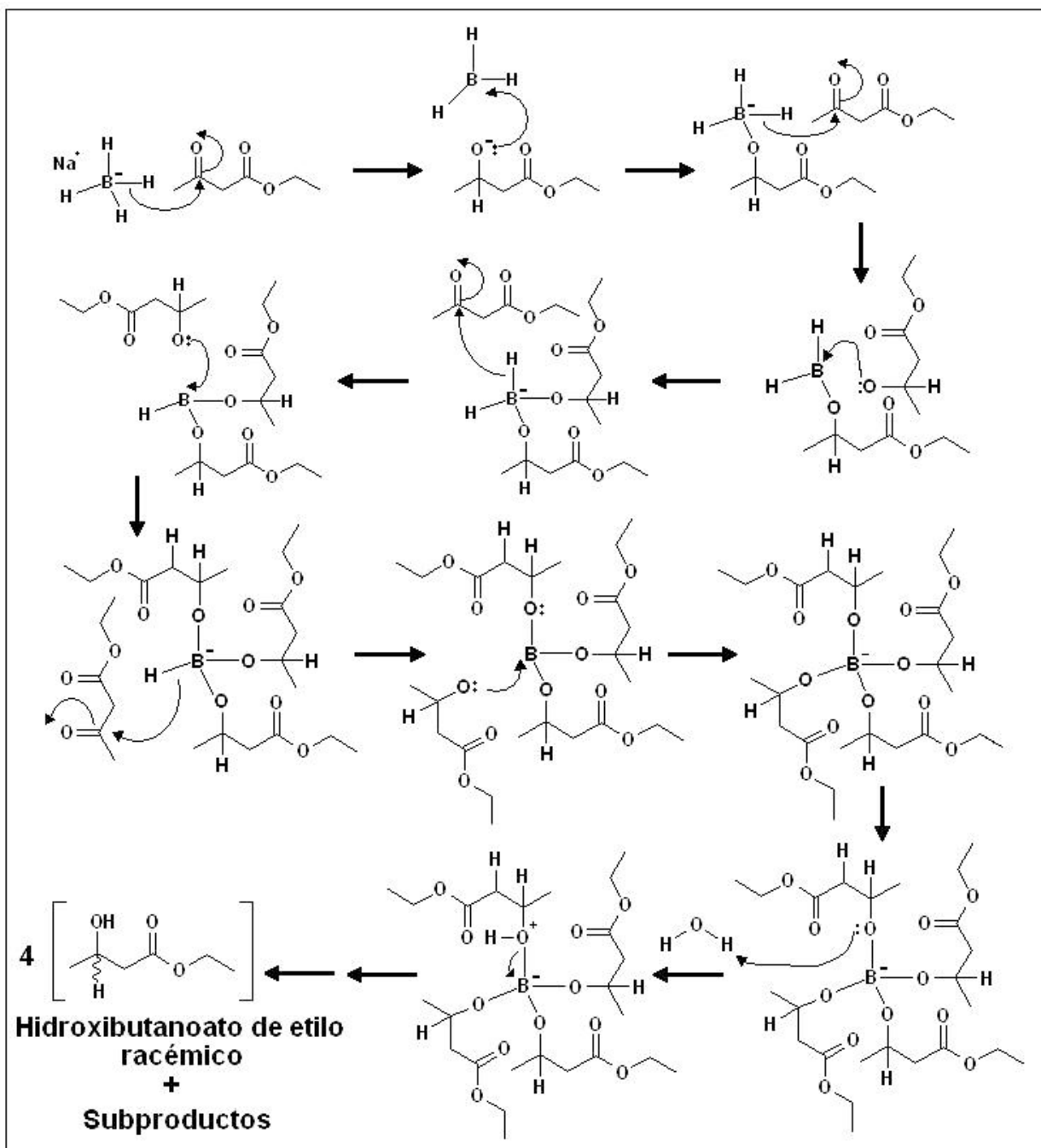


Figura 18. Mecanismo de reacción. Obtención del 3-hidroxibutanoato de etilo.

5.3 Cálculo de resultados: Biotransformaciones.

Al realizar el análisis cromatográfico del rendimiento de las biorreducciones, se hicieron curvas de calibración por duplicado (Figuras 19 y 20) utilizando el método de estándar interno [48, 49, 50]. Una vez obtenidos los cromatogramas se utilizó el método de mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta con la que se calculó la relación entre el acetoacetato de etilo y el 3-hidroxi-butanoato de etilo biotransformado (Figura 21) (ver apéndices del 9.4 al 9.9).

Para *Taxus brevifolia*:

Tabla 1. Curva de calibración 1, *Taxus brevifolia*.

Estándar.	Área AAE.	Área HBE.	Área EI.	X= CAAE/CEI.	Y= AAAE/AEI.	X= CHBE/CEI.	Y= AHBE/AEI.
1	6342	4568	131147	0.153846154	0.048357949	0.153846154	0.034831144
2	64464	60541	745045	0.230769231	0.086523633	0.230769231	0.081258179
3	19878	17615	150497	0.461538462	0.132082367	0.461538462	0.117045523
4	19590	18081	93655	0.692307692	0.209171961	0.692307692	0.193059634
5	58182	52846	193843	0.923076923	0.300150121	0.923076923	0.272622689
6	198747	186573	598427	1.153846154	0.332115697	1.153846154	0.311772363
7	61388	56549	147177	1.384615385	0.417103216	1.384615385	0.384224437
8	75249	68921	157416	1.538461538	0.478026376	1.538461538	0.437827159

Donde:

AAAE = Área del acetoacetato de etilo.

AEI = Área del estándar interno (n-hexanol).

AHBE = Área del 3-hidroxi-butanoato de etilo.

CAAE = Concentración del acetoacetato de etilo.

CEI = Concentración del estándar interno (n-hexanol).

CHBE = Concentración del 3-hidroxi-butanoato de etilo.

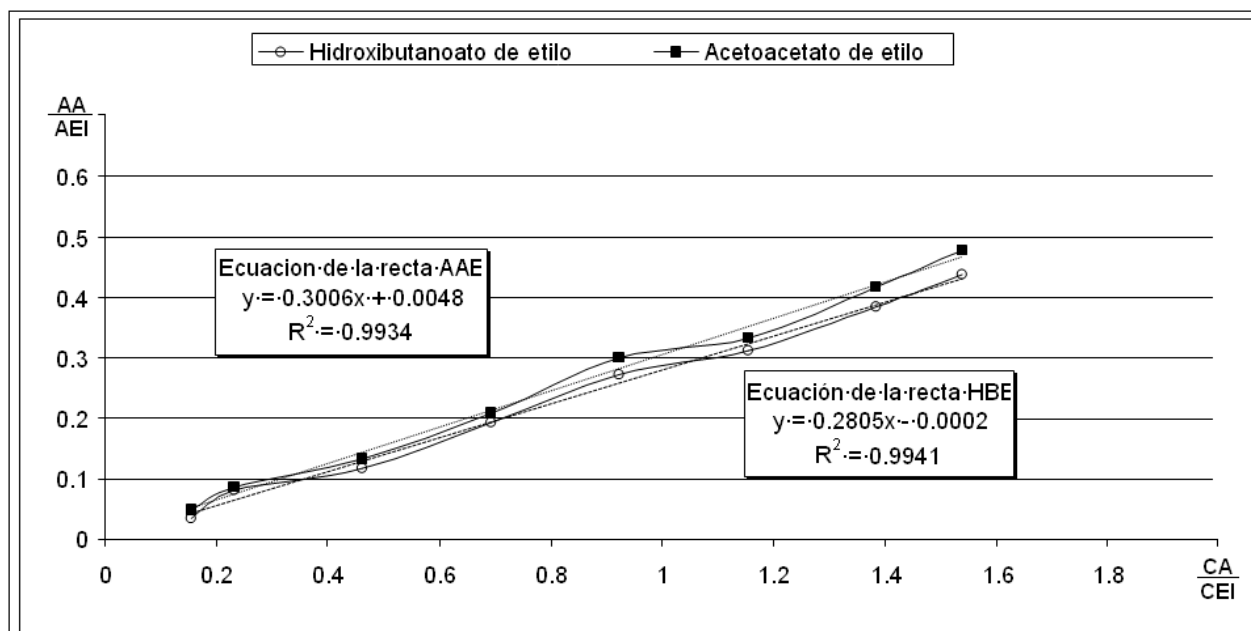


Figura 19. Curva de calibración 1, *Taxus brevifolia*.

Donde:

AA = Área del analito.

AEI = Área del estándar interno (n-hexanol).

CA = Concentración del analito.

CEI = Concentración del estándar interno (n-hexanol).

Tabla 2. Curva de calibración 2, *Taxus brevifolia*.

Estándar.	Área AAE.	Área HBE.	Área EI.	X= CAA/CEI.	Y= AAA/AEI.	X= CHBE/CEI.	Y= AHBE/AEI.
1	28442	24983	629132	0.153846154	0.045208319	0.153846154	0.039710267
2	17269	17000	203774	0.230769231	0.084745846	0.230769231	0.083425756
3	61887	56738	468407	0.461538462	0.132122278	0.461538462	0.121129701
4	100676	95983	482286	0.692307692	0.208747507	0.692307692	0.199016766
5	93857	86400	309697	0.923076923	0.303060734	0.923076923	0.27898236
6	158195	150904	482113	1.153846154	0.328128468	1.153846154	0.313005457
7	278646	266055	674117	1.384615385	0.413349611	1.384615385	0.394671845
8	322252	297036	672206	1.538461538	0.479394709	1.538461538	0.441882399

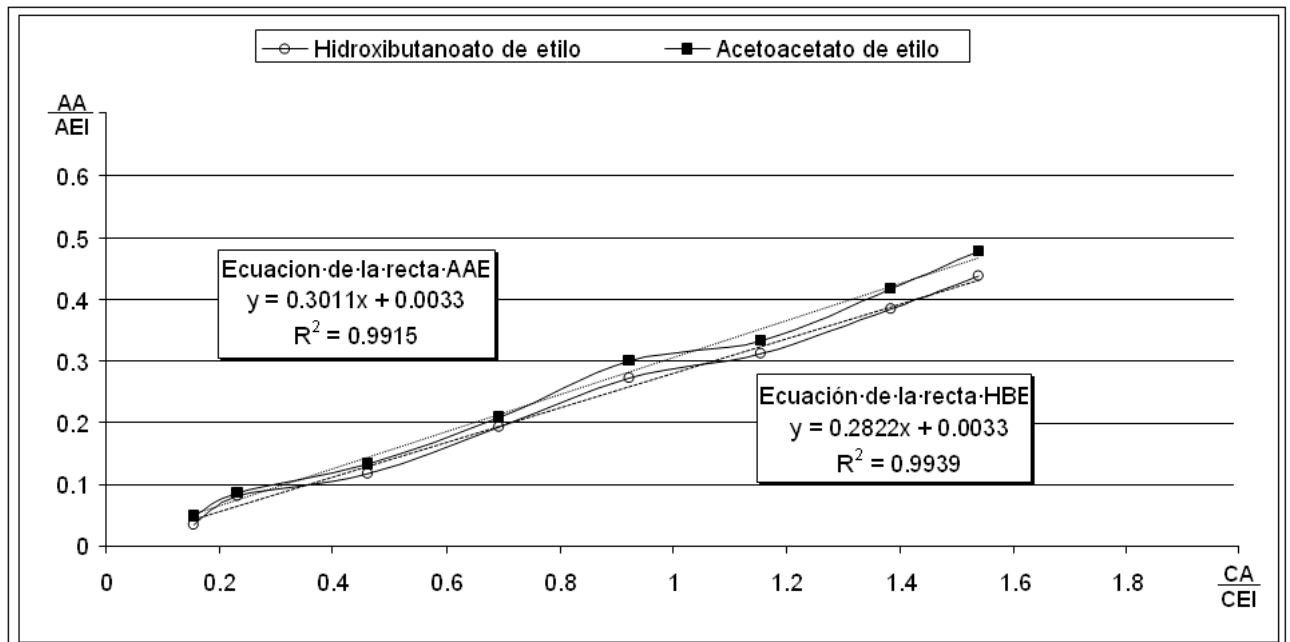


Figura 20. Curva de calibración 2, *Taxus brevifolia*.

Tabla 3. Rendimiento de la biotransformación del acetoacetato de etilo para *T. brevifolia*.

Biotransformación <i>Taxus brevifolia</i> .	Área AAE.	Área HBE.	Área EI.	% AAE en la biotransformación.	% HBE en la biotransformación.
BT1	12741	34644	307973	23.95	76.05
BT2	68962	87080	391875	42.18	57.82
BT3	178346	109869	569433	60.19	39.81
BT4	26782	60500	427114	28.16	71.84
BT5	22641	21954	322024	48.21	51.79
BT6	108273	71656	652123	58.33	41.67
BT7	151398	82364	477222	63.16	36.84

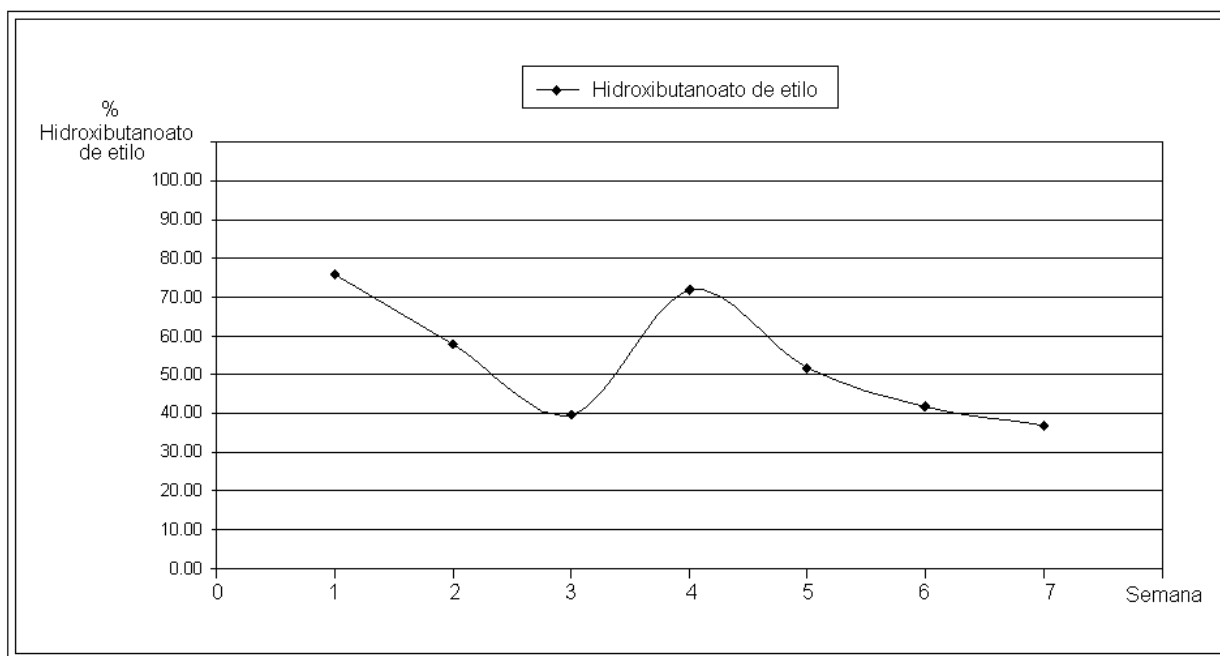


Figura 21. Cambio en el rendimiento de la biotransformación durante el desarrollo del cultivo en suspensión, *Taxus brevifolia*

En la figura 21 se observa el cambio en el rendimiento del 3-hidroxibutanoato de etilo, obteniendo el mayor porcentaje biorreducido en la primera y cuarta semana para *Taxus brevifolia*.

Para *Taxus globosa*:

También se hicieron dos curvas de calibración (Figuras 22 y 23) para calcular después la relación entre el acetoacetato de etilo y el 3-hidroxi butanoato de etilo biotransformado (Figura 24) (ver apéndices del 9.4 al 9.9).

Tabla 4 Curva de calibración 1, *Taxus globosa*.

Estándar.	Área AAE.	Área HBE.	Área EI.	X= CAAE/CEI.	Y= AAAE/AEI.	X= CHBE/CEI.	Y= AHBE/AEI.
1	26342	32169	297455	0.153846154	0.088557933	0.153846154	0.108147451
2	32234	39742	249016	0.230769231	0.129445497	0.230769231	0.159596171
3	71613	87528	277539	0.461538462	0.258028601	0.461538462	0.315371894
4	116361	139239	289530	0.692307692	0.401896177	0.692307692	0.480913895
5	120101	143394	224209	0.923076923	0.535665384	0.923076923	0.639555058
6	230866	270139	336205	1.153846154	0.686682233	1.153846154	0.803494892
7	159447	191546	195726	1.384615385	0.814643941	1.384615385	0.978643614
8	359416	434201	395144	1.538461538	0.909582329	1.538461538	1.098842447

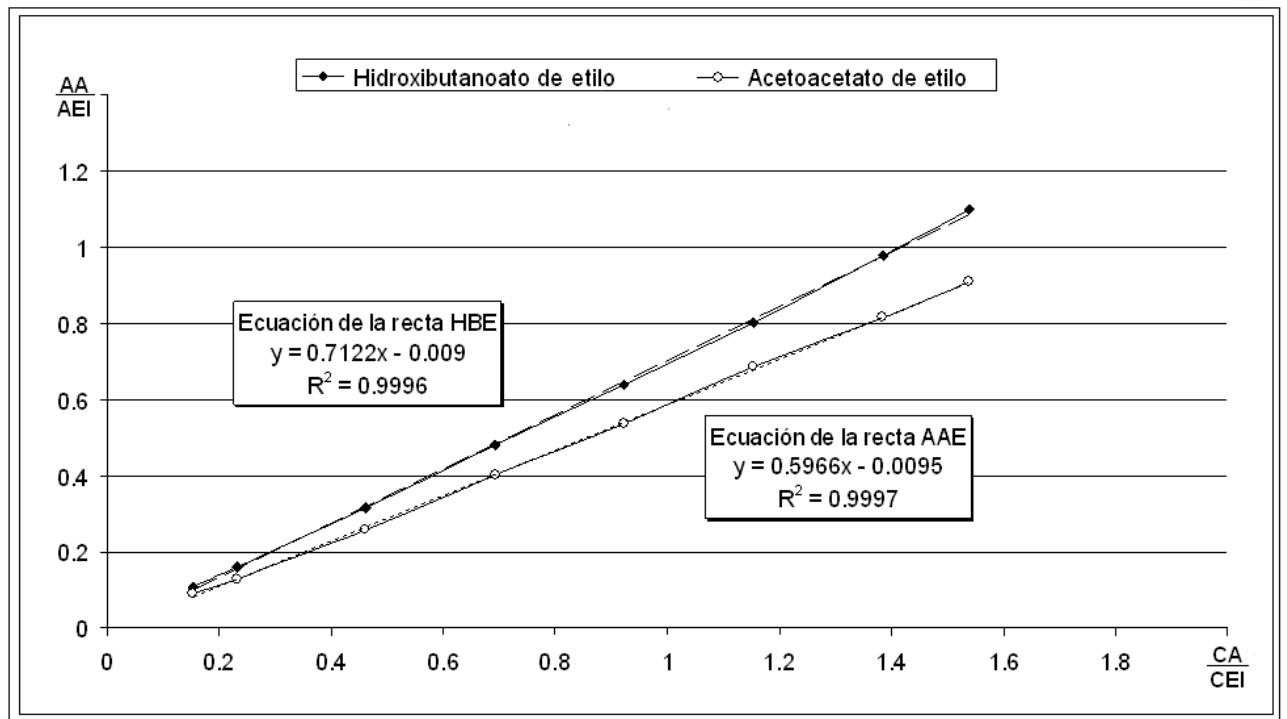


Figura 22. Curva de calibración 1, *Taxus globosa*.

Tabla 5. Curva de calibración 2, *Taxus globosa*.

Estándar.	Área AAE.	Área HBE.	Área EI.	X= CAA/CEI.	Y= AAA/AEI.	X= CHA/CEI.	Y= AHA/AEI.
1	23325	27589	252038	0.153846154	0.092545569	0.153846154	0.109463652
2	51646	60868	384361	0.230769231	0.134368471	0.230769231	0.15836154
3	65171	77641	250134	0.461538462	0.260544348	0.461538462	0.310397627
4	127575	149877	309753	0.692307692	0.411860418	0.692307692	0.48385972
5	142580	169272	265433	0.923076923	0.537160037	0.923076923	0.637720253
6	193048	225820	283608	1.153846154	0.680686017	1.153846154	0.79623988
7	233949	279425	289823	1.384615385	0.807213368	1.384615385	0.96412293
8	330068	382105	355873	1.538461538	0.927488177	1.538461538	1.073711689

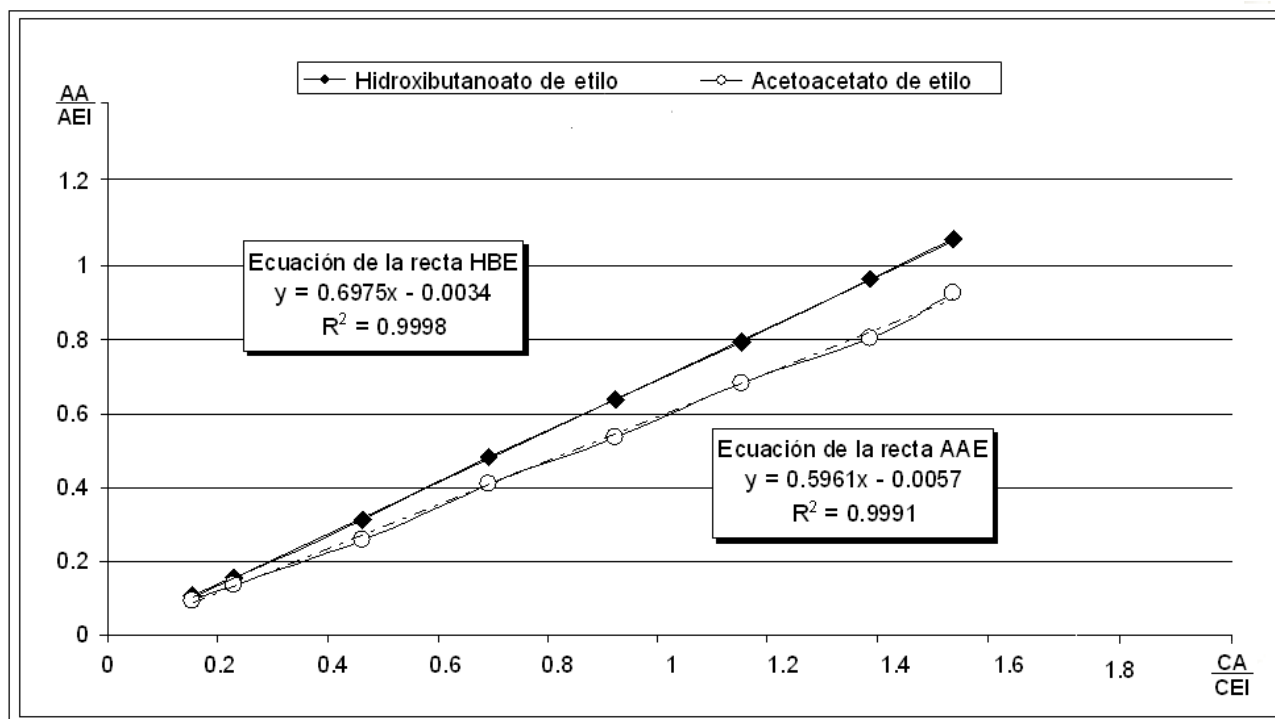


Figura 23. Curva de calibración 2, *Taxus globosa*.

Tabla 6. Rendimiento de la biotransformación del acetoacetato de etilo con *T. globosa*.

Biotransformación <i>Taxus globosa</i> .	Área AAE.	Área HBE.	Área EI.	% AAE en la biotransformación.	% HBE en la biotransformación.
BT1	46424	84146	508811	40.51	59.49
BT2	118861	27829	422727	82.57	17.43
BT3	129910	110081	600019	58.27	41.73
BT4	109616	61956	662286	67.23	32.77
BT5	76011	68502	566763	56.86	43.14
BT6	56075	41717	413909	61.25	38.75
BT7	54252	53198	446505	54.90	45.10
BT7 DUP	69528	62583	480590	56.88	43.12

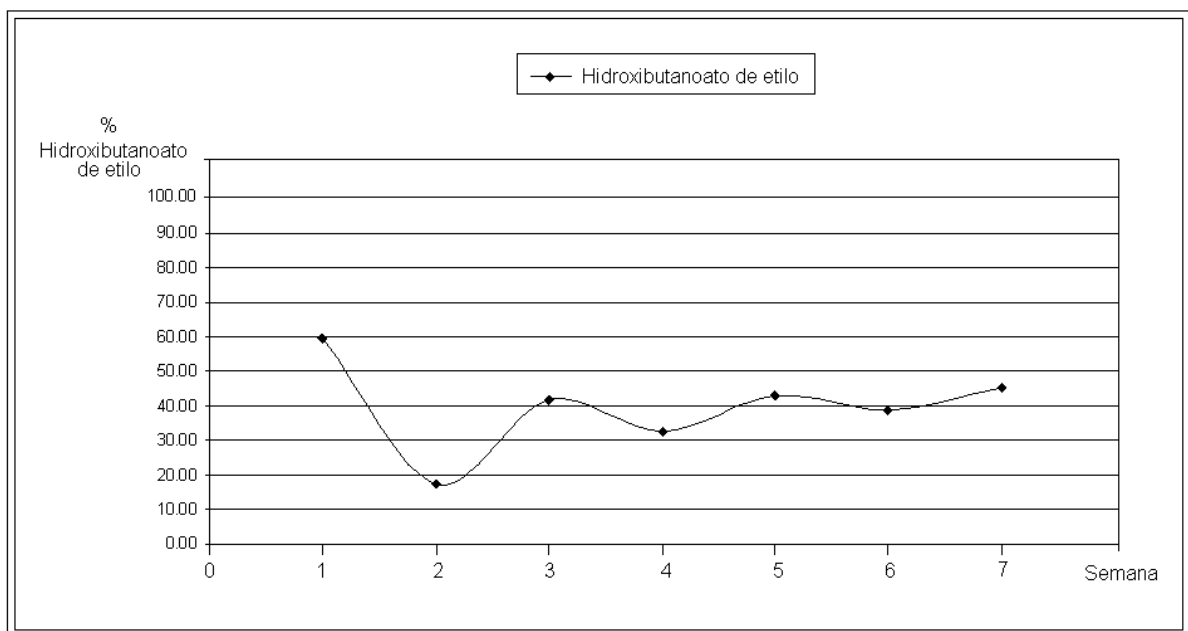


Figura 24. Cambio en el rendimiento de la biotransformación durante el desarrollo del cultivo en suspensión, *Taxus globosa*.

En la figura 24 se observa el cambio en el rendimiento de la biotransformación del 3-(S)-hidroxibutanoato de etilo, obteniendo el mayor porcentaje biorreducido en la primera semana y manteniendo un rendimiento muy semejante entre la quinta y la séptima semana para *Taxus globosa*. En la tabla 6 se observa una biotransformación con el nombre “BT7DUP”, la cual es el duplicado de la biorreducción de la séptima semana, y tiene un rendimiento muy similar a esta última, lo que permitió verificar el resultado obtenido.

5.4 Cálculo de resultados: Exceso enantiomérico.

Para el análisis del exceso enantiomérico se utilizó una columna compuesta por β -ciclodextrina (ver apéndice 9.1), Cada enantiómero de un analito quiral tendrá diferente afinidad por la fase estacionaria, logrando su separación en la columna (ver apéndices del 9.10 al 9.12). Cada semana se obtuvo un exceso enantiomérico del 3-(S)-hidroxibutanoato de etilo para las dos especies (Figura 25 y 26).

Para *Taxus brevifolia*:

Tabla 7. % Exceso enantiomérico *Taxus brevifolia*

Biotransformación <i>Taxus brevifolia</i> .	Área 3-(S)-HBE.	Área 3-(R)-HBE.	% 3-(S)-HBE.	% 3-(R)-HBE.	% Exceso enantiomérico 3-(S)-HBE.
BTTB1	80425	67418	54.40	45.60	8.80
BTTB2	158710	106498	59.84	40.16	19.69
BTTB3	152695	95292	61.57	38.43	23.15
BTTB4	89626	75847	54.16	45.84	8.33
BTTB5	80516	43383	64.99	35.02	29.97
BTTB6	113333	88880	56.05	43.95	12.09
BTTB7	105841	83937	55.77	44.28	11.49

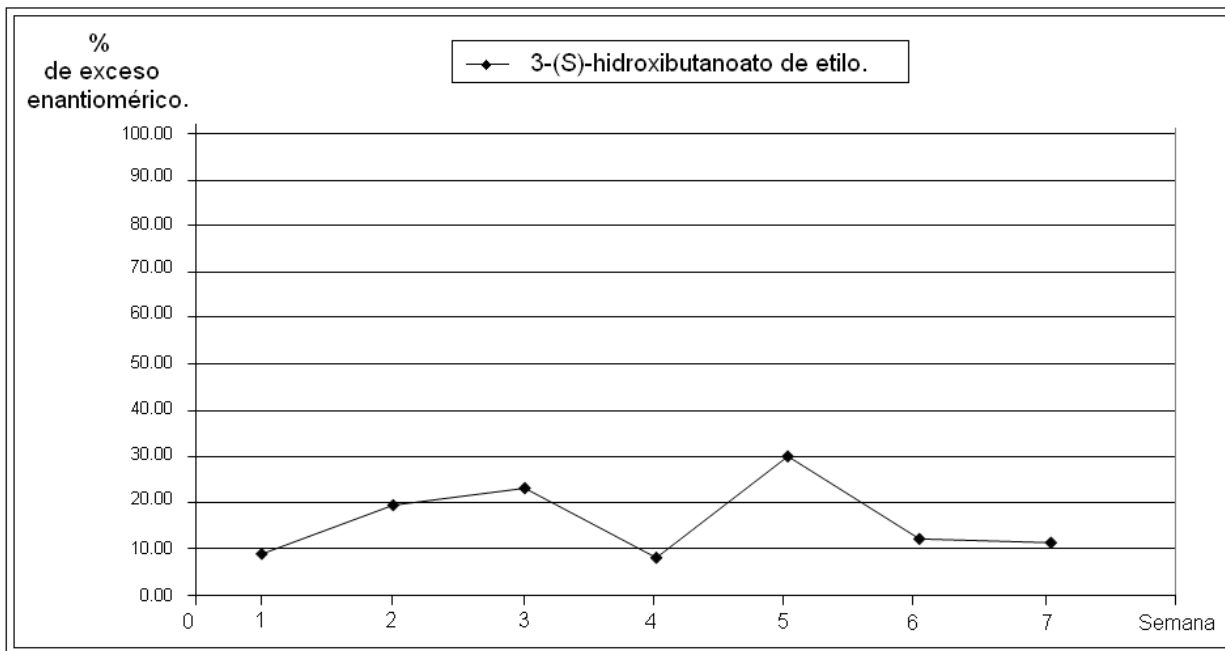


Figura 25. % Exceso enantiomérico *Taxus brevifolia*.

En la figura 25 se observa el exceso enantiomérico del 3-(S)-hidroxibutanoato de etilo, obteniendo el mayor exceso en la quinta semana para *Taxus brevifolia*.

Para *Taxus globosa*:

Tabla 8. % Exceso enantiomérico *Taxus globosa*

Biotransformación <i>Taxus globosa</i> .	Área 3-(S)-HBE.	Área 3-(R)-HBE.	% 3-(S)-HBE.	% 3-(R)-HBE.	% Exceso enantiomérico 3-(S)-HBE.
BTTG1	262055	95510	73.29	26.71	46.58
BTTG2	125881	36518	77.51	22.49	55.03
BTTG3	527833	136027	79.51	20.49	59.02
BTTG4	269228	83197	76.39	23.61	52.79
BTTG5	326960	126018	72.18	27.82	44.36
BTTG6	173855	67562	72.01	27.99	44.03
BTTG7	258964	109346	70.31	29.69	40.62
BTTG7D	564455	238514	70.30	29.70	40.59

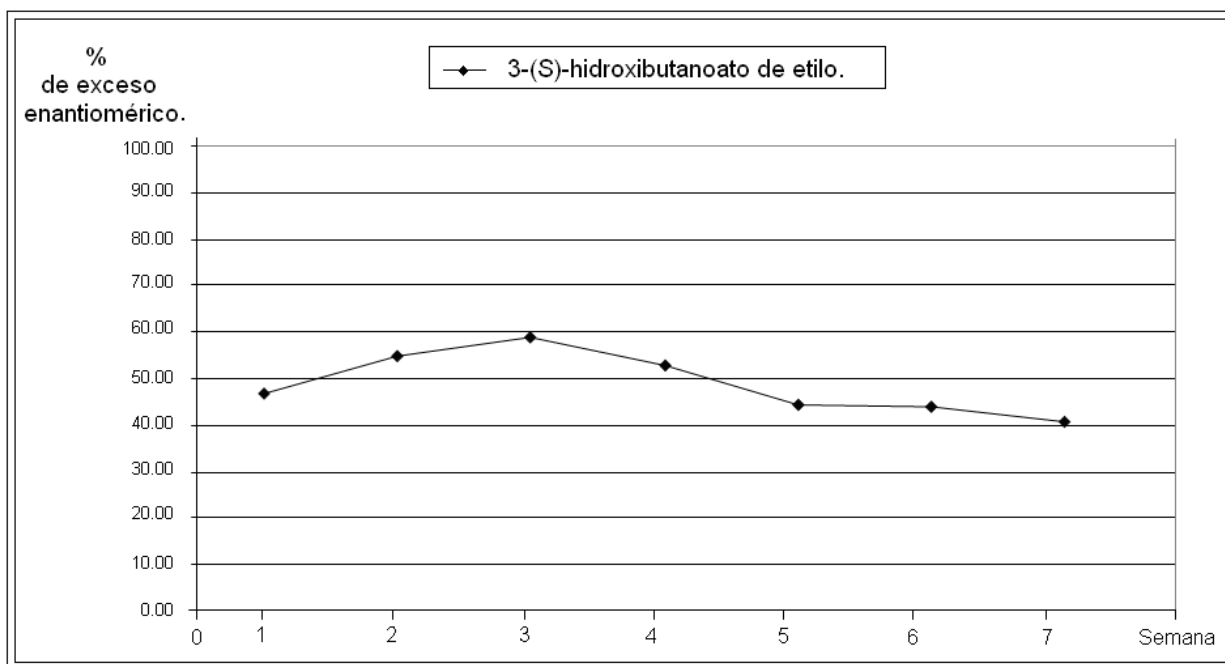


Figura 26. % Exceso enantiomérico *Taxus globosa*

En la figura 26 se observa el cambio en el exceso enantiomérico del 3-(S)-hidroxibutanoato de etilo, obteniendo el mayor exceso en la tercera semana para *Taxus globosa*. En la tabla 8 se observa una biotransformación con el nombre “BTTG7DUP”, la cual es el duplicado de la biorreducción de la séptima semana, y tiene un exceso enantiomérico muy similar a esta última, lo que permitió verificar el resultado obtenido.

5.5 Comparación entre el rendimiento y exceso enantiomérico por especie.

Para *Taxus brevifolia*:

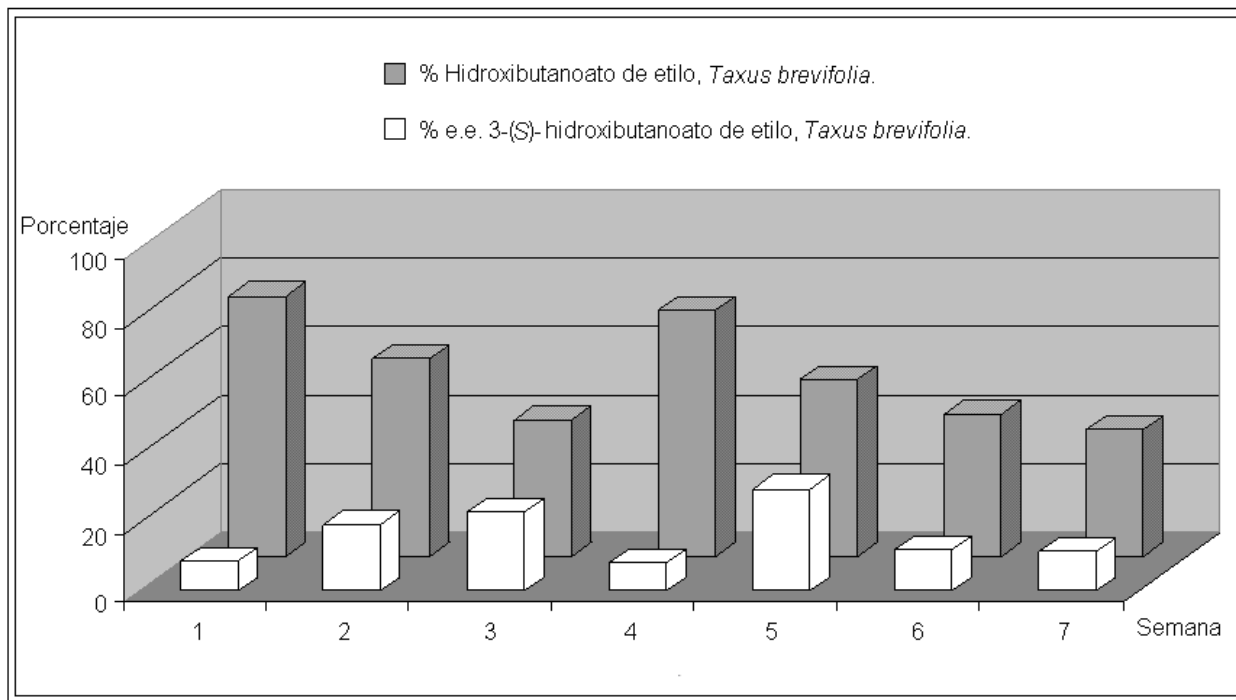


Figura 27. Comparación entre el rendimiento y el % exceso enantiomérico
Taxus brevifolia

En la figura 27 se observa que el rendimiento de la biotransformación y el exceso enantiomérico cambian de una semana a otra, y es hasta la sexta y séptima semana cuando el cultivo vegetal en suspensión de *Taxus brevifolia* logra un rendimiento y un exceso enantiomérico con menor variabilidad.

Para *Taxus globosa*:

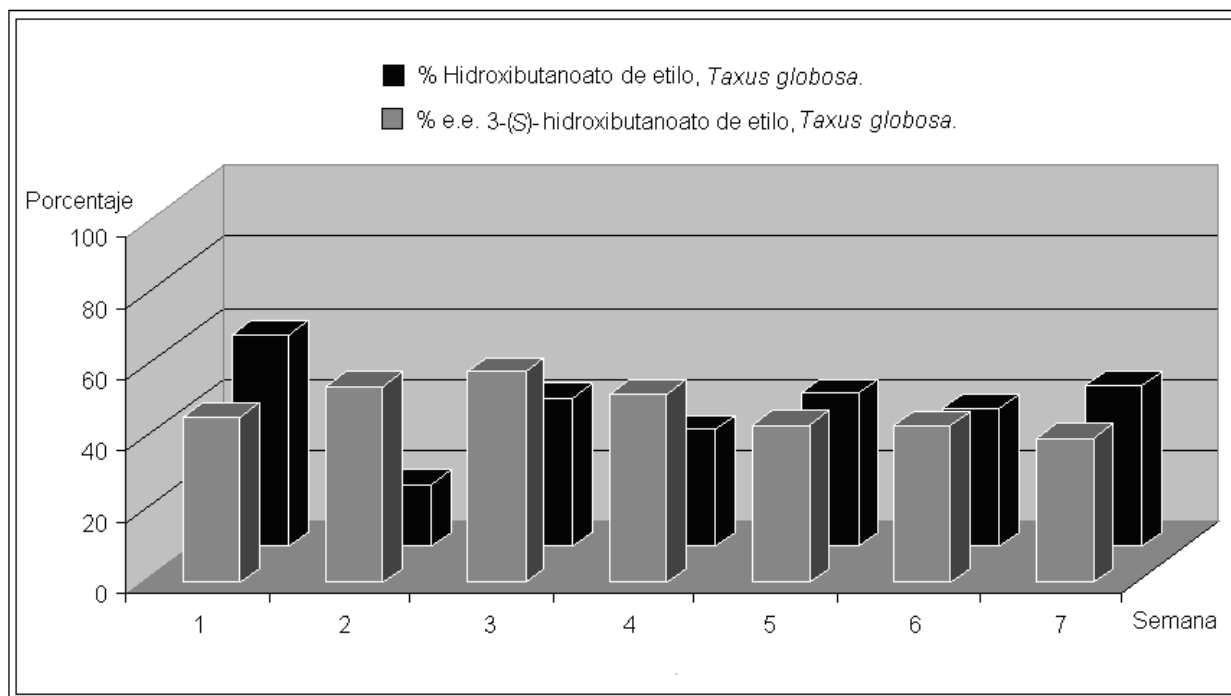


Figura 28. Comparación entre el rendimiento y el % exceso enantiomérico *Taxus globosa*.

En la figura 28 se observa en el caso de *Taxus globosa* que el rendimiento de la biotransformación y el exceso enantiomérico también cambian de una semana a otra, lográndose un rendimiento y un exceso enantiomérico con menor variabilidad desde la quinta semana hasta la séptima semana.

5.6 Comparación del rendimiento y exceso enantiomérico entre especies.

Comparando el rendimiento entre especies:

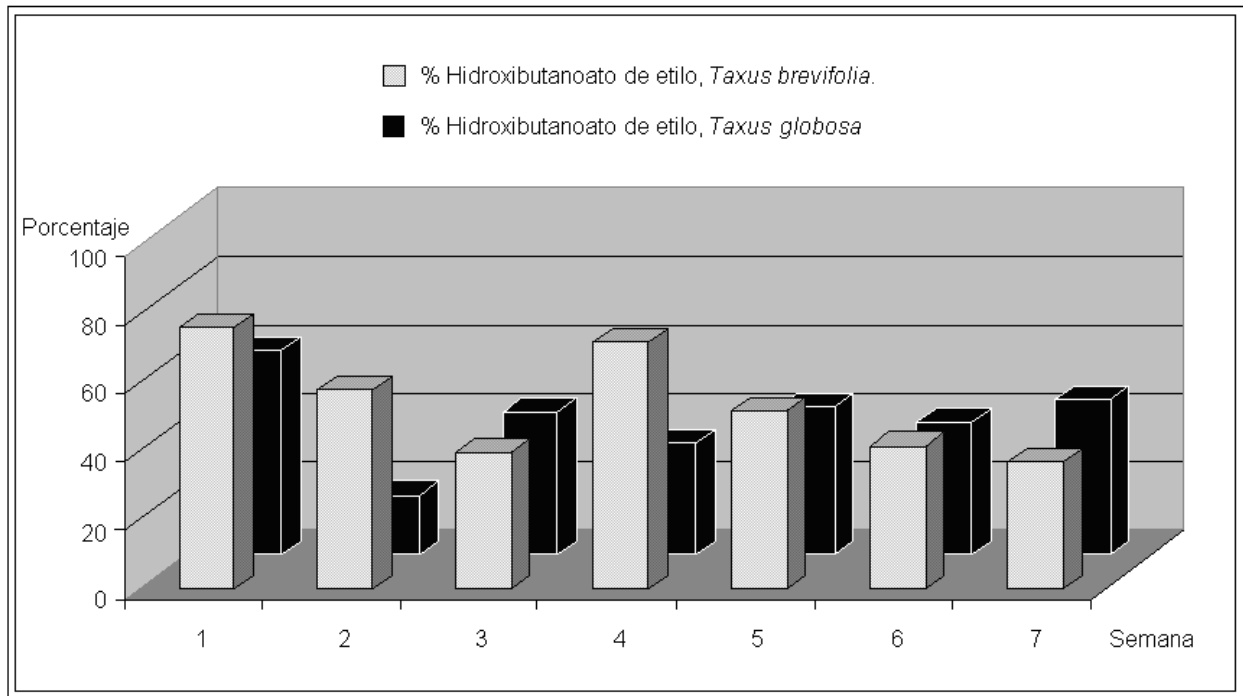


Figura 29. Comparación del rendimiento
Taxus brevifolia vs *Taxus globosa*.

En la figura 29 se observa que el rendimiento de la biorreducción de una semana a otra para *Taxus brevifolia*, tiene mayor variabilidad, aunque logra mejores rendimientos en la biorreducción respecto a los que muestra *Taxus globosa*, especie que presenta menor variabilidad en el rendimiento.

Comparando el exceso enantiomérico entre especies:

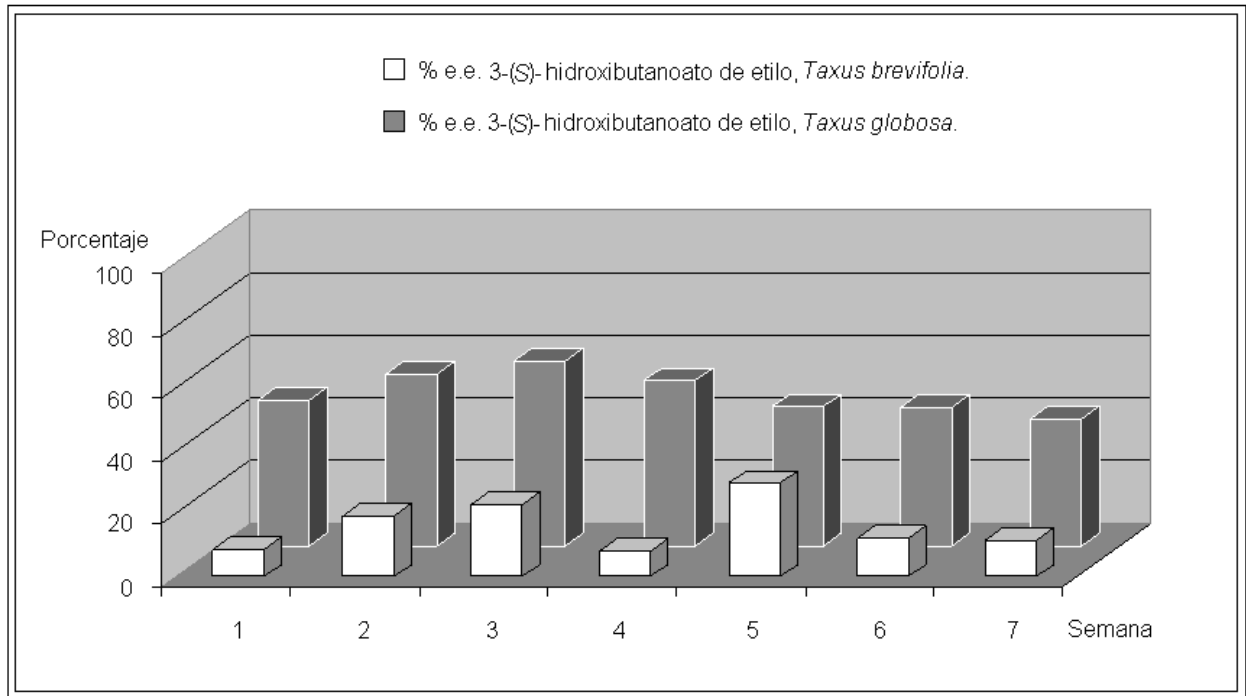


Figura 30. Comparación del % exceso enantiomérico *Taxus brevifolia* vs *Taxus globosa*.

En la figura 30 se observa que *Taxus globosa* logra un mayor exceso enantiomérico que *Taxus brevifolia* en todas las semanas del estudio, así como una menor variabilidad a lo largo de las semanas en que se realizó el estudio.

6. Discusión de resultados.

Para las dos especies se presentaron incrementos en masa celular húmeda en cada cambio de medio en suspensión, correspondiendo a *Taxus globosa* el mayor incremento de masa celular. El desarrollo de las dos líneas celulares fue en forma de cúmulos de entre 1 a 3 cm. de diámetro de apariencia y de color uniforme, conforme transcurría el periodo de dos semanas entre cada cambio de medio en suspensión, se observa un cambio en la coloración del medio que pasa de un aspecto translucido ligeramente amarillo por la concentración de sacarosa hasta uno turbio ligeramente amarillo o rojizo al terminar el periodo para el cambio de medio.

En las biotransformaciones realizadas semanalmente al agregar el acetoacetato de etilo no se observó un cambio sustancial en el aspecto del callo y del medio al compararlo con el resto de la línea celular que continuaba su periodo de cambio de medio, en ninguna de las dos especies.

Los resultados muestran un cambio constante en la capacidad de las dos especies para realizar la biotransformación de una semana a otra, tanto en el rendimiento como en el exceso enantiomérico. En todos los experimentos el enantiómero que se obtuvo mayoritariamente fue el 3-(S)-hidroxibutanoato de etilo, por lo que las dos especies cumplen la regla de Prelog, común en la mayoría de las biorreducciones vegetales.

Para *Taxus brevifolia* la biorreducción tuvo su mejor rendimiento en la primera (76%) y en la cuarta semana (72%), con respecto al exceso enantiomérico de la biotransformación el enantiómero (S) tuvo su mayor exceso enantiomérico en la segunda semana (20%) tercera semana (23%) y quinta semana (30%), para *Taxus brevifolia* en la quinta semana con un rendimiento y exceso enantiomérico de 52% y 30% respectivamente se obtendrá una mayor cantidad de 3-(S)-hidroxibutanoato de etilo, si se realiza la biotransformación en esta semana.

Para *Taxus globosa* la biorreducción tuvo su mayor rendimiento en la primera (59.5%), tercera semana (42%), quinta semana (43%) y séptima semana (45%) con respecto al exceso enantiomérico de la biotransformación el enantiómero (S) tuvo su mayor excesos enantiomérico en la segunda semana (55%) tercera semana (59%) y cuarta semana (53%), para *Taxus globosa* la tercera semana con un rendimiento y exceso enantiomérico de 42% y 59% respectivamente se obtendrá una mayor cantidad de 3-(S)-hidroxibutanoato de etilo, si se realiza la biotransformación en esta semana.

El cambio en el rendimiento y el exceso enantiomérico para *Taxus brevifolia* no muestra una relación directa con la renovación del medio de cultivo en suspensión, ocurrido en la tercera, quinta y séptima semana. Sin embargo para *Taxus globosa* se observa que el mayor rendimiento en la biorreducción se presenta siempre después del cambio de medio de cultivo.

Relacionando el cambio en el rendimiento y el exceso enantiomérico con el análisis del contenido de proteína realizado previamente en nuestro laboratorio [46], para *Taxus brevifolia* se observó una mayor cantidad de proteína en la primera semana, disminuyendo paulatinamente y volviendo aumentar entre la cuarta y quinta semana, estos resultados se relacionan directamente con el rendimiento obtenido en la biorreducción ya que este también es mayor en la primera y cuarta semana, el exceso enantiomérico en cambio fue mayor en la segunda y quinta semana una semana posterior al incremento de proteína. En el estudio previo para *Taxus globosa*, se estudiaron dos líneas celulares, en una de las líneas se observó un porcentaje mayor de proteína en la primera semana y en la tercera semana en la cual se termino el estudio, en la otra línea celular estudiada se tuvo también un porcentaje mayor de proteína en la primera semana para disminuir después y presentando un incremento importante en la quinta y sexta semana en la cual se termino el estudio, en nuestro estudio los mayores rendimiento de la biorreducción se obtienen en la primera, tercera y quinta semana observándose una relación directa con el contenido de proteína observado en los dos estudios, con respecto al exceso enantiomérico este es mayor en la segunda, tercera y cuarta semana no relacionándose con el incremento de proteína observado.

Aunque no se cuantificó el aumento en la masa celular, fue evidente al final del experimento que la especie que más se propagó fue *Taxus globosa* gracias a este incremento se tuvo una cantidad suficiente de masa celular para realizar un duplicado en la última semana, comparando los resultados obtenidos en esta séptima semana en estos dos experimentos, los rendimientos fueron del 45% y 43% y se obtuvo un exceso enantiomérico de 40.62% y 40.59% respectivamente, resultados muy similares, que reflejan la uniformidad del callo después de siete semanas de desarrollo en medio acuoso.

7. Conclusiones.

En este trabajo se utilizaron cultivos de células vegetales en suspensión de *Taxus globosa* y *Taxus brevifolia* para biorreducir el acetoacetato de etilo en el 3-hidroxiacetato de etilo durante siete semanas, para ver como durante este tiempo se producían cambios en el rendimiento químico y el exceso enantiomérico de la biotransformación.

También se sintetizó el 3-hidroxiacetato de etilo mediante una reducción química la reducción del β -cetoéster el acetoacetato de etilo para obtener el β -hidroxiéster el 3-hidroxiacetato de etilo con un rendimiento del 95%.

En relación a los cultivos celulares se logro mantener dos líneas de cultivos en suspensión, se obtuvo un incremento de masa celular suficiente para la realización del estudio durante las siete semanas que duro el estudio y no se presento contaminación por microorganismos en ningún momento.

Se estableció una metodología para la cuantificación del acetoacetato de etilo y el 3-hidroxiacetato de etilo, por Cromatografía de Gases por el método de estándar interno. Además se realizo la cuantificación de los excesos enantioméricos por Cromatografía de Gases.

Si se desea obtener un mayor rendimiento y exceso enantiomérico al realizar la biorreducción utilizando *Taxus brevifolia* se debe realizar la biotransformación en la quinta semana, para *Taxus globosa* se debe realizar en la tercera semana

Se observa un aumento en el rendimiento de la biorreducción en las dos especies si se compara con el incremento en la cantidad de proteína reportada [46], este aumento en la cantidad de proteína seria un indicador de una mayor cantidad de enzimas capaces de realizar la biotransformación del sustrato. El cambio en el exceso enantiomérico no muestra una relación con el aumento en la cantidad de proteína.

Para *Taxus globosa* se observa además un mayor rendimiento en la biorreducción después del cambio de medio de cultivo, esto puede deberse al aumento en la cantidad de sacarosa.

Esto refleja que cada una de las especies tiene una adaptación distinta al medio de cultivo en suspensión, *Taxus brevifolia* efectuó la biorreducción con rendimientos más altos durante las siete semanas, esto puede ser debido a un metabolismo más eficiente en vías como la glucólisis y el ciclo de Krebs para producir metabolitos como el NADH, e indirectamente NADPH (utilizado en procesos anabólicos) los cuales son cofactores comunes empleados por las enzimas para reducir desde oxígeno molecular hasta moléculas como el oxalacetato, el cual es reducido a malato en la lanzadera malato-aspartato[56], en la cual un carbonilo es reducido a su alcohol para ser transportado del citosol a la mitocondria. El acetoacetato de etilo reducido a 3-hidroxiacetato de etilo podría ser una de las moléculas reducidas de esta forma, en cambio *Taxus globosa* presentó un menor rendimiento lo que indicaría una mayor regulación en el metabolismo productor de cofactores reductores, esto puede deberse a que algunas de sus enzimas requieren sustratos más específicos para poder ser biorreducidos, disminuyendo por lo tanto el rendimiento.

El exceso enantiomérico de la biorreducción para *Taxus brevifolia* muestra una mayor variabilidad y valores menores en comparación con *Taxus globosa* esto podría deberse a que la biorreducción es realizada por varias enzimas con una enantioselectividad distinta, en cambio la menor variabilidad del exceso enantiomérico y valores mayores reflejan que las enzimas involucradas pueden ser sintetizadas en mayor cantidad y no son degradadas tan rápidamente como ocurriría en *Taxus brevifolia*

Existen dos tipos de enzimas alcohol deshidrogenasa una de ellas es dependiente de Zn [28, 57], en caso de que este tipo de enzimas participaran en la biorreducción en *Taxus brevifolia* y *Taxus globosa*, este podría ser uno de los factores por el cual la biorreducción presenta un mayor rendimiento absoluto en la especie *Taxus brevifolia* ya que la concentración de Zn en el medio usado para esta, es el doble que en el medio utilizado para *Taxus globosa*.

La aparición de un color amarillo o rojizo en el medio puede deberse a la acumulación de flavonoides en el medio, esto puede deberse a que participan en el transporte de auxinas en las células vegetales y las concentraciones de auxinas usadas estimulan su biosíntesis. [58].

El estudio de la viabilidad de un cultivo en suspensión a través del tiempo es importante, estudios en cultivos de *Taxus brevifolia* reflejan que después del primer año en suspensión las células empiezan a presentar aneuploidía y poliploidía [59], estos fenómenos pueden llevar incluso a la muerte de la línea celular y también a producir un cambio en la regulación enzimática y en sus vías metabólicas. Realizar cambios en el medio de cultivo como el uso de Níquel a nivel de trazas como nutriente esencial, o de otros metales que podrían ser beneficiosos como Silicio, Aluminio, Selenio o Titanio, así como determinar las concentraciones y tipo de auxinas y citoquininas utilizadas para el tipo de cultivo y sus efectos a largo plazo, la introducción de otro tipo de reguladores como lo son las giberelinas [42], podrían extender la viabilidad de un cultivo en suspensión.

También el evitar condiciones que produzcan estrés al cultivo en suspensión, por ejemplo un cambio drástico en: la relación $NAD^+/NADH$, en el contenido de azúcares y la concentración de oxígeno, pueden contribuir a prolongar el tiempo en que un cultivo vegetal en suspensión pueda ser viable.

8. Bibliografía.

- [1] Córdova, J. L. (1996). "La Química y la Cocina". México. Ed. Fondo de Cultura Económica.
- [2] Kauffman, G. y Myers, R. (1998). Pasteur's Resolution of Racemic Acid: A Sesquicentennial Retrospect and a New Translation. *The Chemical Educator*. Publicación en línea. Doi: 10.1333/s00897980257a.
- [3] Talidomida. (2008). Wikipedia, la enciclopedia libre, en línea, obtenido de <http://en.wikipedia.org/wiki/Thalidomide>.
- [4] Fuentes S. y Díaz, G. (1998). "Catalizadores". México. Ed. Fondo de Cultura Económica.
- [5] Levine, I. N. (2004). "Fisicoquímica". México. 5ta. Edición. Vol. 2, Ed. Mc Graw Hill.
- [6] Whitesides, G.M. y Wong, C. H. (1985). Enzymes as Catalysts in Synthetic Organic Chemistry, *Angewandte Chemie International Edition in English*, Vol. 24, pp. 617-638.
- [7] Liese, A., Seelbach, K. y Wandrey, C. (2006). "Industrial Biotransformations" Estados Unidos, 2da. Edición, Ed. Wiley-VCH. pp.3.
- [8] Ramachandra Rao, S. y Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories. *Biotechnology Advances Vol. 20*, pp.101–153.
- [9] Suga, T. y Hirata, T. (1990). Biotransformation of exogenous substrates by plant cell cultures. *Phytochemistry*, Vol. 29, pp. 2343-2406.
- [10] Ishihara, K., Hamada, H., Hirata, T. y Nakajima, N. (2003). Biotransformation using plant cultured cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 23, pp. 145–170. Doi:10.1016/S1381-1177(03)00080-8.
- [11] Hirata, T., Aoki, T., Hirano, Y., Ito, T. y Suga T. (1981). The biotransformation of foreign substrates by tissue cultures. *Bulletin of Chemical Society of Japan*. Vol. 54, pp. 3527-3529.
- [12] Lee, S.Y., Hirata, T. y Suga, T. (1983). Biotransformation of 1-acetoxy-p-menth-4(8)-ene with a suspension of cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions 1*. pp 2475-2478.

- [13] Kamel, S., Brazier, M., Desmet, G., Fliniaux, M. A. y Dubreuil, A. J. (1992). Glucosylation of butyric acid by cell suspension culture of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Phytochemistry*. Vol.31, pp. 1581–1583.
- [14] Pawłowicz, P. y Siewinski, A. (1987). Enantioselective hydrolysis of esters and the oxidation of aromatic-aliphatic alcohols obtained therefrom by *Spirodela oligorrhiza*. *Phytochemistry*. Vol. 26, pp. 1001-1004
- [15] Lappin, G. J., Stride, J.D. y Tampion, J. (1987). Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia*. *Phytochemistry*. Vol.26, pp. 995-997.
- [16] Pawłowicz, P., Piatkowski, K. y Siewinski A. (1988). Enantioselective hydrolysis of acetates of racemic monoterpene alcohols by *Spirodela oligorrhiza*. *Phytochemistry*. Vol. 27, pp. 2809-2811.
- [17] Hamada, H., Imura, M. y Okano, T. (1994) Biotransformation of 1,1,1-trifluoroheptane-2-one and octane-2-one by the cell suspension culture of *Nicotiana tabacum*. *Journal of Biotechnology*. Vol. 32, pp.89-92.
- [18] Nakamura, K., Miyoshi, H., Sugiyama, T. y Hamada, H. (1995). Diastereo- and enantio-selective reduction of ethyl 2-methyl-3-oxobutanoate by plant cell cultures. *Phytochemistry*. Vol. 40, pp.1419-1420.
- [19] Chadha, A., Manohar, M., Soundararajan, T. y Lokeswari, T.S. (1996). Asymmetric reduction of 2-oxo-4-phenylbutanoic acid ethyl ester by *Daucus carota* cell cultures. *Tetrahedron:Asymmetry*. Vol.7, pp.1571-1572.
- [20] Mironowicz, A., Kukulczanka, K., Krasinski, K. y Siewinski, A. (1987). Transformation of isoprenoids by orchids in tissue culture. *Phytochemistry*. Vol. 26, pp. 1959-1960.
- [21] Hamada, H. y Kawabe, S. (1991) Biotransformation of 4-androstene-3,17-dione by green suspension of *Marchantia polymorpha*: Stereoselective reduction at carbon 17. *Life Sciences*. Vol.48, pp.613-615.
- [22] Hamada, H., Naka S. y Kurban H. (1993). Stereoselective reduction in the biotransformation of androstane derivatives by cell suspension cultures of *Marchantia polymorpha*. *Chemistry Letters*. pp. 2111-2112.

- [23] Benzaquem, R. J., Klaus, V.R. MdC., de Aquino, N. F. R., Gomes, F. L. S., y Antunes, O. A. C. (2003) Microbiological enantioselective reduction of ethyl acetoacetate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 24, pp.121–124.
- [24] Vitinius, U., Schaffner, K. y Demuth, M. (2005). New strategies improve the efficiency of the baker's yeast reduction of ketoesters: near UV irradiation and a two-substrate application. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Vol. 169. pp. 197–210.
- [25] Amidjojo, M. y Weuster-Botz, D. (2005). Asymmetric synthesis of the chiral synthon ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate using *Lactobacillus kefir*. *Tetrahedron: Asymmetry*. Vol.16, pp. 899–901.
- [26] Machado, L. L., Souza, J. S. N., de Mattos, M. C., Sakata, S. K., Cordell, G. A. y Lemos, T. L.G. (2006) Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species. *Phytochemistry*. Vol.67, pp. 1637–1643.
- [27] Seery, L.T., Nestor, P.V. y Fitzgerald, G. A. (1998). Molecular evolution of the aldo-keto reductase gene superfamily. *Journal of Molecular Evolution*. Vol.46, pp. 139–146
- [28] Chase, T. Jr (1999). Alcohol dehydrogenases: Identification and names for gene families. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. 17, pp. 333–350.
- [29] Itoh, N., Asako, H., Banno, K., Makino, Y., Shinohara, M., Dairi, T., Wakita, R. y Shimizu, M. (2004). Purification and characterization of NADPH-dependent aldo–ketoreductase specific for β -keto esters from *Penicillium citrinum*, and production of methyl (S)-4-bromo-3-hydroxybutyrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol.66, pp. 53–62.
- [30] Nakamura, K. y Matsuda, T. (2006). Biocatalytic reduction of carbonyl groups. *Current Organic Chemistry*. Vol.10, pp. 1217-1246.
- [31] Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K. y Faber, K. (2004) Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Current Opinion in Chemical Biology*. Vol.8, pp.120–126.

- [32] Yang, H., Yang, T., Baur, J. A., Perez, E., Matsui, T., Carmona, J.J., Lamming, D. W., Souza-Pinto, N.C., Bohr, W. A., Rosenzweig, A., de Cabo, R., Sauve, A. A. y Sinclair, D. A. (2007). Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ Levels dictate cell survival. *Cell*. Vol. 130, pp.1095–1107.
- [33] Lin, S. J. y Guarente, L. (2003). Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Current Opinion in Cell Biology: Cell regulation*. Vol.15, pp. 241–246
- [34] Yadav, J. S., Nanda, S., Thirupathi, R. P. y Bhaskar, R. A. (2002). Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root. *Journal of Organic Chemistry*. Vol. 67, pp.3900-3903.
- [35] Kaluzna, I. A., Rozzell, J. D. y Kambourakis, S. (2005). Ketoreductases: stereoselective catalysts for the facile synthesis of chiral alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*. Vol. 16, pp. 3682–3689.
- [36] Nakamura, K., Takenaka, K., Fujii, M. y Ida, Y. (2002). Asymmetric synthesis of both enantiomers of secondary alcohols by reduction with a single microbe. *Tetrahedron Letters*. Vol.43, pp. 3629–3631.
- [37] De Wildeman, S. M. A., Sonke, T., Schoemaker, Hans E. y May, O. (2007). Biocatalytic reductions: from lab curiosity to “first choice”. *Accounts of Chemical Research*. Vol. 40, pp. 260–266.
- [38] Jürgen, R. (1997). Biosynthesis of taxol. *Angewandte Chemie International Edition in English*. Vol. 36, pp. 2190-2195.
- [39] Soto, M., Sanjurjo, M., González, M. T., Cruz, D. y Giral, F. (2000). El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.). Potencial de su aprovechamiento en taxol. *Ciencia Ergo Sum*. Vol.7, No.3, pp. 277–279.
- [40] Zavala, C. F. (2001). Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht en el parque nacional El Chico, Hidalgo, México. I: Población de adultos y algunas características del hábitat. *Ciencia Ergo Sum*, Vol. 8, pp. 169–174.
- [41] Zamudio, R. S. (1992). Taxaceae. *Flora del bajo y regiones adyacentes*. Vol.9, pp.1-6.
- [42] Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2000) “Fundamentos de Fisiología Vegetal” España. Editorial McGraw-Hill Interamericana.

- [43] Naill, M. C. y Roberts, S. C. (2005). Cell cycle analysis of *Taxus* suspension cultures at the single cell level as an indicator of culture heterogeneity. *Biotechnology and bioengineering*. Vol.90, pp. 492-501.
- [44] Fuentes, F. y Massol-Deyá, A. (2009). "Manual de Laboratorios: Ecología de Microorganismos". Universidad de Puerto Rico, obtenido de <http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/>.
- [45] Jong, D. W., Jansen, E. F. y Olson, A. C. (1967). Oxidoreductive and hydrolytic enzyme patterns in plant suspension culture cells. *Experimental Cell Research*. Vol. 47, pp. 139-156.
- [46] Alpizar, C. B. (2008). Cuantificación de proteínas en cultivos vegetales utilizados como medios de biorreducción. Tesis de licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México.
- [47] Sandoval, C., Méndez, J. M., Sánchez-Obregón, R., Alpizar, C. B. y Barrios, H. (2009). Reduction and cyclization in biotransformation of carbonyl compounds by cultured cells of *Taxus* species. *Biocatalysis and Biotransformation*, Vol.27, pp.36 – 44.
- [48] Harris, D. C. (2001). "Análisis Químico Cuantitativo" España. 2da. Edición. Editorial Reverté S.A.
- [49] Entidad mexicana de acreditación (EMA). Centro nacional de metrología (CENAM). (2006). *Guía Técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de Cromatografía de Gases (CG) Cromatografía de Líquidos de alta resolución (CLAR)*. Distrito Federal, México.
- [50] Miller J. N. y Miller J. C., (2000). "Estadística y Quimiometría para Química Analítica.". España. Ed. Prentice Hall.
- [51] Gamborg, O. L., Miller, R. A. y Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. Vol.50, pp.151-158.
- [52] Schenk, R. U. y Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian journal of botany* Vol.50, pp.199–204.

- [53] Pretsch, E., Bühlmann, P. y Badertscher, M. (1989). "Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds." New York. 4ta. Edición. Ed. Springer.
- [54] Horst, F. (1991). "Basic One and Two Dimensional NMR Spectroscopy" Estados Unidos, Ed. Wiley-VCH.
- [55] Base de datos de espectros para química orgánica. (2008). Spectral Database for Organic Compounds, obtenido de http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng.
- [56] Voet, D. y Voet, J. (2004) "Bioquímica" Capítulo 22: Transporte electrónico y fosforilación oxidativa. pp.829-875. Argentina. 3ra. Edición. Ed. Médica panamericana.
- [57] Danielsson, O., Atrian, S., Luque, T., Hjelmqvist, L., González-Duarte, R. y Jörnvall, H. (2005). Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. Vol.91, pp. 4980-4984.
- [58] Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B. W., Peer, W. A., Taiz, L. y Muday, G. K. (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. Vol.126, pp. 524-535.
- [59] Baebler, S., Hren, M., Camloh, M., Ravnikar, M., Bohanec, B., Plaper, I., Uzman, R. y Zel, J. (2005). Establishment of cell suspension cultures of yew (*Taxus x media* reh.) and assessment of their genomic stability. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. Vol.41, pp.338–343.
- [60] Asociación de Psicología de los Estados Unidos de América (APA). (2003) Manual de publicación de la Asociación de Psicología de los Estados Unidos de América. 5ta. Edición. Washington D.C., Estados Unidos de América.

Algunas normas de redacción y estilo utilizados en la elaboración de la bibliografía de este trabajo se tomaron del manual de publicación de la Asociación de Psicología de los Estados Unidos [60].

9. Apéndices.

9.1 Especificaciones de reactivos y material.

Acetoacetato de etilo, F.M. $C_6H_{10}O_3$, P.M.130.14, pureza > 98% Sigma-Aldrich.

1-Hexanol o n-hexanol, F.M. $C_6H_{14}O$, P.M. 102.17, pureza > 99% G.C. Sigma-Aldrich.

Matraces erlenmeyer, matraces aforados, vasos de precipitado, embudos de vidrio, embudos Büchner, embudos de separación, papel filtro, ligas, papel aluminio, algodón, pipetas Pasteur, pipetas volumétricas, tubos de ensaye, vidrios de reloj, mecheros, espátulas, pinzas, bisturí, puntas para micropipeta y micropipetas.

Agitador orbital marca Server, modelo 6090.

Autoclave Market Forge Sterilmatic.

Autoclave tecSA.

Balanza Scientech modelo SA120 \pm .0001 gramos.

Balanza Acculab modelo V-6000 \pm .0001 gramos.

Campana de flujo laminar horizontal marca Veco, modelo HOR, No. GHFL-A-12. calibrada para condiciones estériles.

Campana de flujo laminar vertical hecha por industrias Alder, modelo CFV-13 calibrada para condiciones estériles.

Columna capilar marca Alltech AT modelo AquaWax (30m x 0.25 mm x 0.25 μ m) (longitud x diámetro interno x espesor de película) No. 13112.

Columna capilar quiral marca Restek modelo RT- β -DEXsa (30m x 0.32mm x 0.25 μ m) (longitud x diámetro interno x espesor de película) No. 13112.

Cromatógrafo de Gases marca Agilent, modelo 6890 con inyector split/splitless y detector de ionización de flama (FID), software Hewlett Packard 6890 driver.

Potenciometro Beckman para medición de pH con electrodo HI 1131B.

Rotovapor Büchi modelo R-200 con recirculador SEV modelo ECO 10.

9.2 Medios de cultivo en suspensión.

Tabla 9.1 Composición de 1L de medio de cultivo vegetal en suspensión

Componente	<i>Taxus. brevifolia</i>	<i>Taxus. globosa</i>
Tipo de medio	B ₅ NB [51]	SH+PVP [52]
Macronutrientes 10x	100 mL	100 mL
Micronutrientes 1000x	1 mL (1000x)	2 mL (500x)
Hierro	5 mL (200x)	10 mL (100x)
Vitaminas 100x	10 mL	10 mL
Sacarosa	20 g (2.0%)	15 g (1.5%)
Mioinositol	1 g	-
Glutamina	0.2922 g	-
Ácido ascórbico	0.0880 g	-
Ácido cítrico	0.1050 g	-
Ácido naftalenacético ⁽¹⁾	1 mL (5 mg/10 ml)	2 mL (1 mg/2 mL)
Benzilaminopurina ⁽¹⁾	0.28 mL (2 mg/250ml)	0.1 mL (5 mg/10 mL)
2,4-diclorofenoxiacético ⁽²⁾	-	1 mL (5 mg/10 mL)
Polivinilpirrolidona	-	10 g
Aforo a 1 L.		
pH final	5.5	5.6

(1) El ácido naftalenacético y la benzilaminopurina se disuelven en máximo cuatro gotas de solución de hidróxido de sodio 1M, después se llevan al aforo con agua deionizada.

(2) El 2,4-diclorofenoxiacético se disuelve en máximo cuatro gotas de una solución de etanol al 70%, después se lleva al aforo con agua deionizada.

Tabla 9.2. Composición de las disoluciones “stock” para el medio de cultivo en suspensión B₅NB

Disoluciones stock	Componente	Concentración [g/L]
Macronutrientes 10x	NaH ₂ PO ₄	1.50
	KNO ₃	25.00
	(NH ₄)SO ₄	1.34
	MgSO ₄ • 7H ₂ O	2.50
	CaCl ₂ • 2H ₂ O ⁽³⁾	1.50
Micronutrientes 1000x	MnSO ₄ • H ₂ O	10.00
	H ₃ BO ₃	3.00
	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	2.00
	Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O ⁽³⁾	0.25
	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.039
	CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.025
	KI	0.75
Hierro 200x	FeSO ₄ • 7H ₂ O ⁽⁴⁾	5.57
	Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	8.259
Vitaminas 100x	Tiamina • HCl (Vitamina B ₁)	1.00
	Ácido nicotínico (Vitamina B ₃)	0.10
	Piridoxina • HCl (Vitamina B ₆)	0.10

Tabla 9.3 Composición de las disoluciones “stock” para el medio de cultivo en suspensión SH

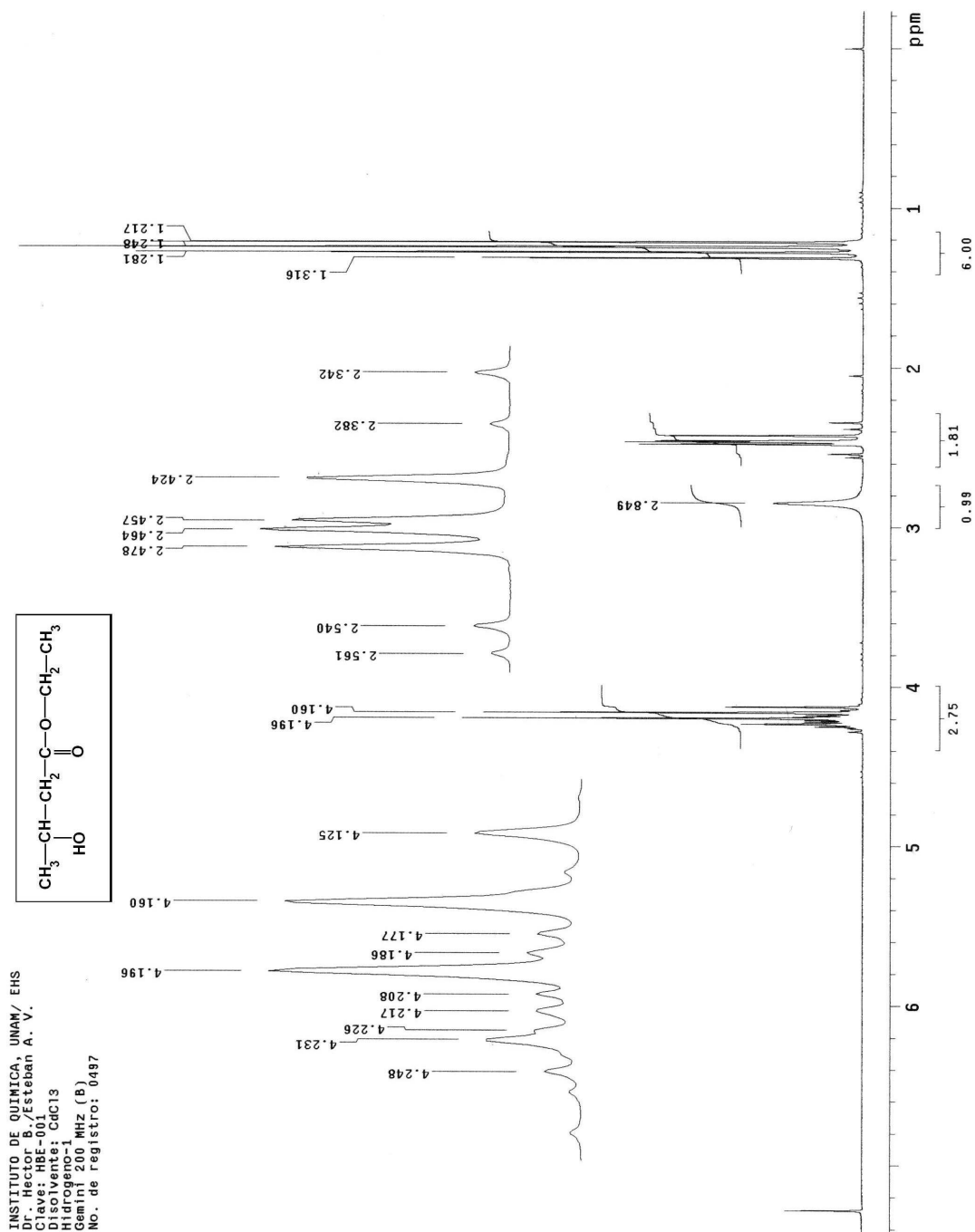
Disoluciones stock	Componente	Concentración [g/L]
Macronutrientes 10x	KNO ₃	25.00
	NH ₄ H ₂ PO ₄	3.00
	CaCl ₂ • 2H ₂ O ⁽³⁾	2.00
	MgSO ₄ 7H ₂ O	4.00
Micronutrientes 500x	MnSO ₄ • H ₂ O	5.00
	H ₃ BO ₃	2.50
	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.50
	Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O ⁽³⁾	0.05
	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.10
	CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.092
	KI	0.50
Hierro 100x	FeSO ₄ • 7H ₂ O ⁽⁴⁾	1.5
	Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	2.102
Vitaminas 100x	Tiamina • HCl (Vitamina B ₁)	0.5
	Ácido nicotínico (Vitamina B ₃)	0.5
	Piridoxina • HCl (Vitamina B ₆)	0.05

(3) Se disuelven completamente en agua deionizada tibia, antes de incorporarse a la disolución “stock”.

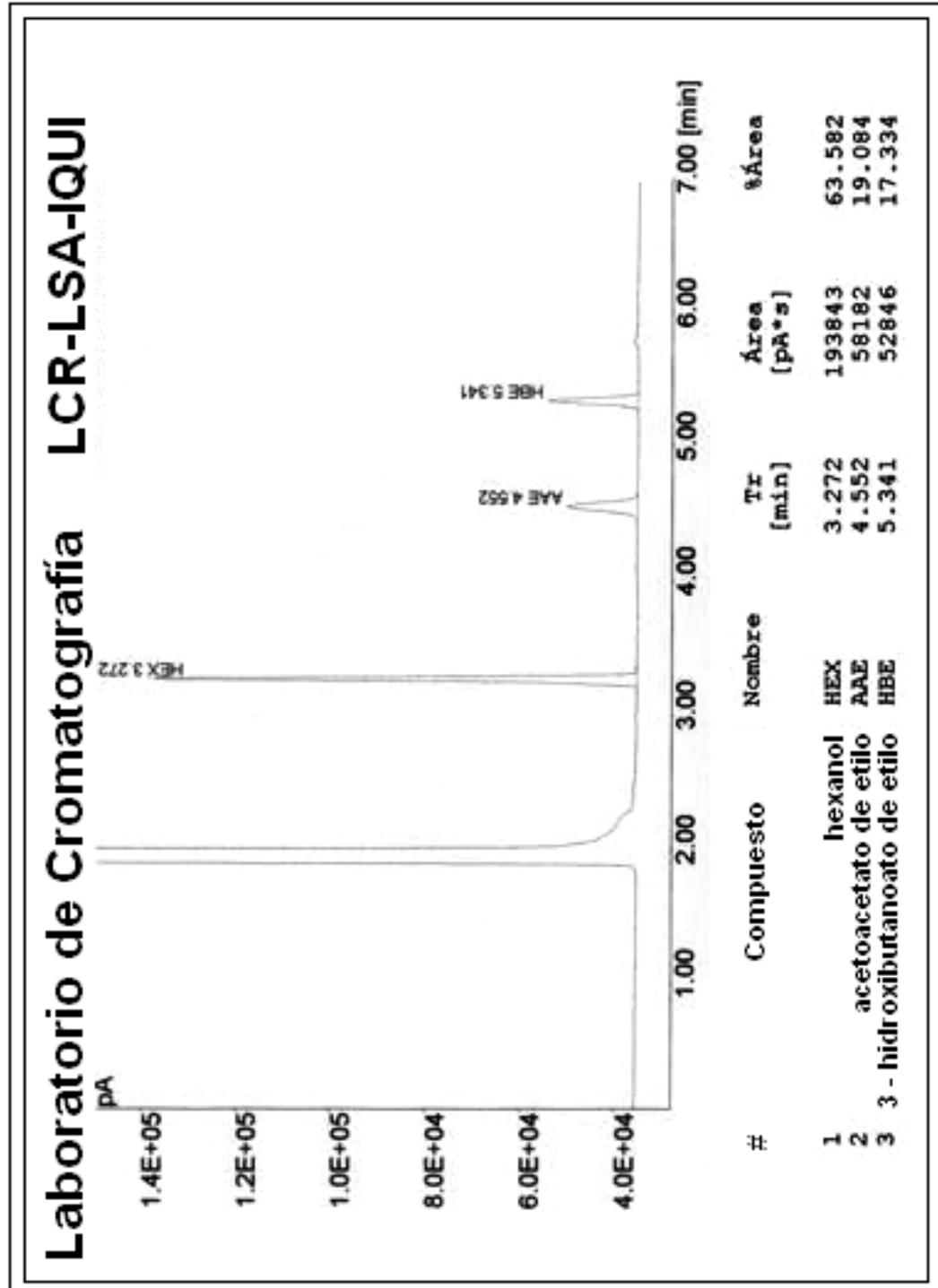
(4) Se disuelve en agua deionizada caliente, solo entonces se agrega el Na₂EDTA • 2H₂O

9.3 Caracterización del 3-hidroxibutanoato de etilo por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) 4.217 (1H, m J= 8.0, 6.2Hz), 4.178 (2H, c J=7, 7.2Hz), 2.849 (1H, s), 2.509 (1H, dd, J=16.6, 4.2Hz), 2.403 (1H, dd J= 16.4, 8.0 Hz) 1.281(3H, t, J= 7Hz) 1.232 (3H, d, J=6.2Hz).



9.4 Ejemplo del tipo de cromatograma obtenido en las curvas de calibración y en la cuantificación de la biorreducción del acetoacetato de etilo realizada con cultivos de células vegetales de *Taxus brevifolia* y *Taxus globosa*.



9.5 Curvas de calibración *Taxus brevifolia*.

Tabla 9.4. Curva de calibración 1, *Taxus brevifolia*

Estándar.	Área del acetoacetato de etilo.	Área del 3-hidroxi butanoato de etilo.	Área del estándar interno n-hexanol.
Estándar 1	6342	4568	131147
Estándar 2	64464	60541	745045
Estándar 3	19878	17615	150497
Estándar 4	19590	18081	93655
Estándar 5	58182	52846	193843
Estándar 6	198747	186573	598427
Estándar 7	61388	56549	147177
Estándar 8	75249	68921	157416

Tabla 9.5 Curva de calibración 2, *Taxus brevifolia*.

Estándar	Área del acetoacetato de etilo.	Área del 3-hidroxi butanoato de etilo.	Área del estándar interno n-hexanol.
Estándar 1	28442	24983	629132
Estándar 2	17269	17000	203774
Estándar 3	61887	56738	468407
Estándar 4	100676	95983	482286
Estándar 5	93857	86400	309697
Estándar 6	158195	150904	482113
Estándar 7	278646	266055	674117
Estándar 8	322252	297036	672206

9.6 Biorreducciones *Taxus brevifolia*.

Tabla 9.6 Rendimiento de la biotransformación del acetoacetato de etilo, *Taxus brevifolia*.

Biotransformación <i>Taxus brevifolia</i> .	Área del acetoacetato de etilo.	Área del 3-hidroxi butanoato de etilo.	Área del estándar interno n-hexanol.
BT1	12741	34644	307973
BT2	68962	87080	391875
BT3	178346	109869	569433
BT4	26782	60500	427114
BT5	22641	21954	322024
BT6	108273	71656	652123
BT7	151398	82364	477222

9.7 Curvas de calibración *Taxus globosa*.

Tabla 9.7 Curva de calibración 1, *Taxus globosa*.

Estándar.	Área del acetoacetato de etilo.	Área del 3-hidroxi-butanoato de etilo.	Área del estándar interno n-hexanol.
Estándar 1	26342	32169	297455
Estándar 2	32234	39742	249016
Estándar 3	71613	87528	277539
Estándar 4	116361	139239	289530
Estándar 5	120101	143394	224209
Estándar 6	230866	270139	336205
Estándar 7	159447	191546	195726
Estándar 8	359416	434201	395144

Tabla 9.8 Curva de calibración 2, *Taxus globosa*.

Estándar	Área del acetoacetato de etilo.	Área del 3-hidroxi-butanoato de etilo.	Área del estándar interno n-hexanol.
Estándar 1	23325	27589	252038
Estándar 2	51646	60868	384361
Estándar 3	65171	77641	250134
Estándar 4	127575	149877	309753
Estándar 5	142580	169272	265433
Estándar 6	193048	225820	283608
Estándar 7	233949	279425	289823
Estándar 8	330068	382105	355873

9.8 Biorreducciones *Taxus globosa*.

Tabla 9.9 Rendimiento de la biotransformación del acetoacetato de etilo
Taxus globosa.

Biotransformación <i>Taxus brevifolia</i> .	Área del acetoacetato de etilo.	Área del 3-hidroxi-butanoato de etilo.	Área del estándar interno n-hexanol.
BT1	46424	84146	508811
BT2	118861	27829	422727
BT3	129910	110081	600019
BT4	109616	61956	662286
BT5	76011	68502	566763
BT6	56075	41717	413909
BT7	54252	53198	446505
BT7 DUP	69528	62583	480590

9.9 Cálculos por el método de estándar interno.

Se utilizó como estándar interno n-hexanol de grado analítico, las curvas de calibración se hicieron por duplicado se utilizaron las siguientes concentraciones:

Tabla 9.10 Concentraciones utilizadas en las curvas de calibración.

Estándar	Concentración del acetoacetato de etilo [μL/mL].	Concentración del 3-hidroxi butanoato de etilo [μL/mL].	Concentración del estándar interno, n-hexanol [μL/mL].
Estándar 1	0.2	0.2	1.3
Estándar 2	0.3	0.3	1.3
Estándar 3	0.6	0.6	1.3
Estándar 4	0.9	0.9	1.3
Estándar 5	1.2	1.2	1.3
Estándar 6	1.5	1.5	1.3
Estándar 7	1.8	1.8	1.3
Estándar 8	2	2	1.3

Ya que la concentración inicial del acetoacetato de etilo al realizar la biorreducción es de 2 μL/mL esta concentración será la más alta en la curva.

También al adicionar el estándar interno n-hexanol se busco que este tuviera la misma concentración que en las curvas de calibración 1.3 μL/mL.

La concentración de los analitos en la muestra se calcula utilizando el método de mínimos cuadrados, para ajustar los valores a una línea recta, así la ecuación de la función de la calibración sera $y = mx + b$, sustituyendo las igualdades

$$\text{Obtenemos: } Y = AA / AEI \quad \text{y} \quad x = CA / CEI$$

Donde:

AA= Área del analito (acetoacetato de etilo o 3-hidroxi butanoato de etilo).

AEI= Área del estándar interno (n-hexanol).

CA= Concentración del analito (acetoacetato de etilo o 3-hidroxi butanoato de etilo).

CEI= Concentración del estándar interno (n-hexanol).

Una vez obtenida la ecuación de la recta y reordenando la ecuación se puede despejar la concentración del analito, obteniéndose:

$$CA = \left(\frac{\left(\frac{AA}{AEI} \right) - b}{m} \right) \times CEI \times fd$$

Donde:

AA = Área del analito (acetoacetato de etilo o 3-hidroxi-butanoato de etilo).

AEI = Área del estándar interno (n-hexanol).

CA = Concentración del analito (acetoacetato de etilo o 3-hidroxi-butanoato de etilo).

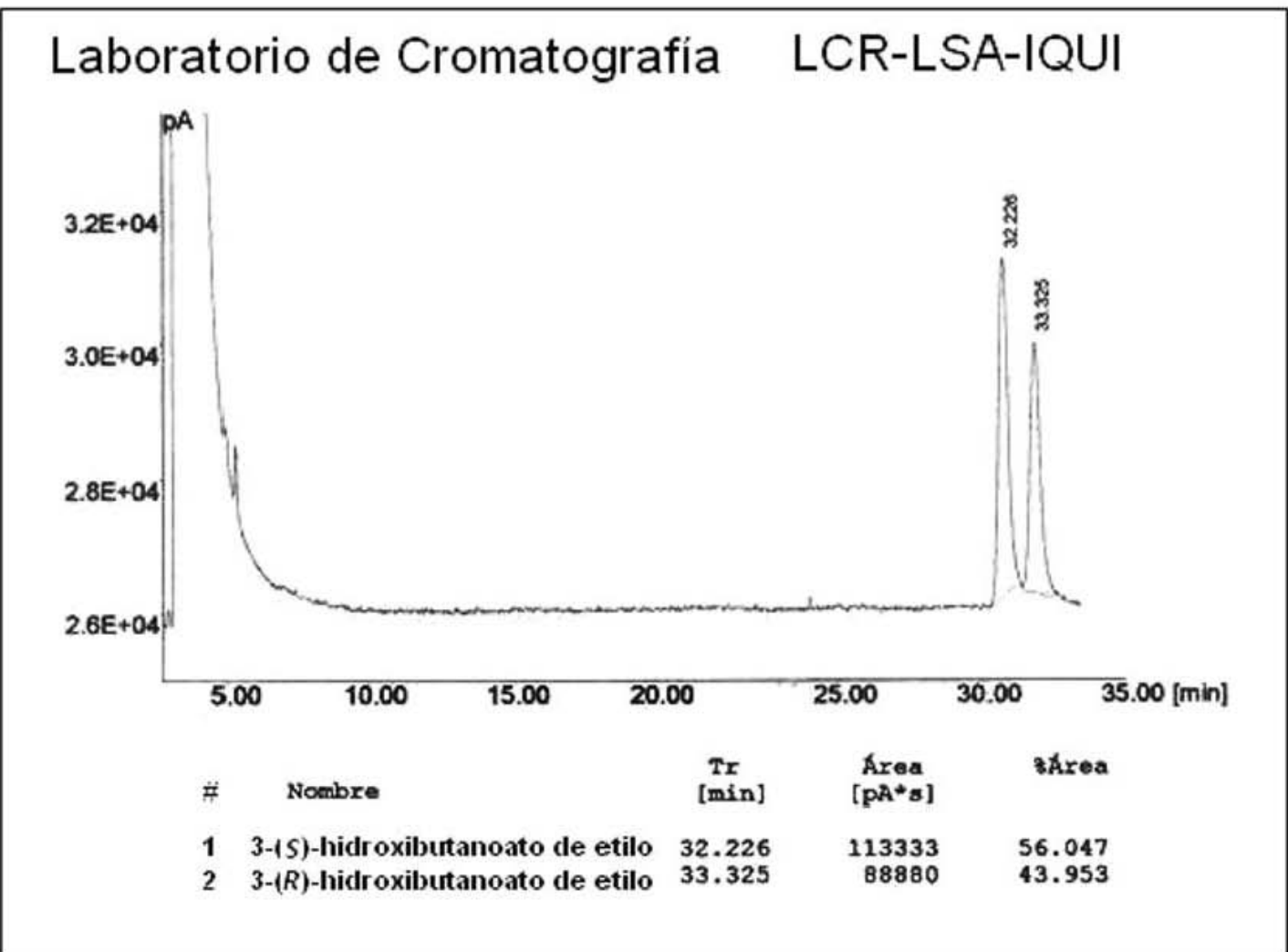
CEI = Concentración del estándar interno (n-hexanol).

m = pendiente de la regresión lineal.

b = Ordenada al origen.

fd = Factor de dilución.

9.10 Ejemplo del tipo de cromatograma obtenido en la cuantificación del exceso enantiomérico del 3-(*S*)-hidroxibutanoato de etilo obtenido en la biorreducción hecha con cultivos de células vegetales de *Taxus brevifolia* y *Taxus globosa*.



9.11 Exceso Enantiomérico *Taxus brevifolia*.

Tabla 7. % Exceso enantiomérico *Taxus brevifolia*

Biotransformación <i>Taxus brevifolia</i>	Área del 3-(S)-hidroxibutanoato de etilo.	Área del 3-(R)-hidroxibutanoato de etilo.
BTTB1	80425	67418
BTTB2	158710	106498
BTTB3	152695	95292
BTTB4	89626	75847
BTTB5	80516	43383
BTTB6	113333	88880
BTTB7	105841	83937

9.12 Exceso Enantiomérico *Taxus globosa*.

Tabla 8. % Exceso enantiomérico *Taxus globosa*

Biotransformación <i>Taxus globosa</i> .	Área del 3-(S)-hidroxibutanoato de etilo.	Área del 3-(R)-hidroxibutanoato de etilo.
BTTG1	262055	95510
BTTG2	125881	36518
BTTG3	527833	136027
BTTG4	269228	83197
BTTG5	326960	126018
BTTG6	173855	67562
BTTG7	258964	109346
BTTG7D	564455	238514