



UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

“ESTUDIO DE BIOTRANSFORMACIÓN DE 1,3 -DICETONAS EMPLEANDO  
*Saccharomyces cerevisiae*”

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA  
EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNA: CARLA IGNACIA ALARCÓN SEPÚLVEDA  
PROFESOR GUÍA: TM. Dr. LUIS GUZMÁN JOFRÉ  
PROFESOR CO-TUTOR: Dr. OSCAR FORERO DORIA.

TALCA-CHILE  
2019

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

Dedico esta memoria a:

Mi familia, quienes han sido un pilar fundamental en mi vida, y me han apoyado en todo momento. A mis amigos y todas esas personas quienes estuvieron siempre apoyándome.

Y sobre todo a mis dos angelitos (Tío Cristian y Sra Marta) que jamás me abandonaron en este proceso.

## ÍNDICE

1. Resumen.....	06
2. Introducción.....	07
3. Revisión Bibliográfica.....	10
3.1 Química verde.....	10
3.2 Bioconversión.....	17
3.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como biotransformador.....	22
4. Hipótesis.....	28
5. Objetivos.....	29
5.1 Objetivo General.....	29
5.2 Objetivos Específicos.....	29
6. Materiales y Métodos.....	30
6.1 Microorganismo.....	30
6.2 Obtención de la dicetona (E)-6-fenilhex-5-eno-2,4-diona (1).....	30
6.3 Composiciones y condiciones del medio.....	31
6.4 Extracción y purificación de los productos obtenidos.....	31
6.5 Análisis de composición y cinética por GC-MS.....	32
7. Resultados.....	33
7.1 Estandarización.....	33
7.2 Monitoreo del progreso de la reacción .....	34
7.3 Biotransformación de la 1,3-dicetonas (1).....	37
8. Discusión.....	40
9. Conclusiones.....	44
10. Bibliografía.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Catalizadores y solventes empleados en química verde.....	<b>14</b>
<b>Tabla 2.</b> Resumen de las reacciones fundamentales de los microorganismos.....	<b>20</b>
<b>Tabla 3.</b> Cuadro resumen de algunos biocatalizadores junto a sus respectivos disolventes y reacción en la que se ven involucrados.....	<b>21</b>
<b>Tabla 4.</b> Protocolo que indica las composiciones de cada medio a utilizar para la estandarización de las biotransformaciones a realizar.....	<b>31</b>
<b>Tabla 5.</b> Estudio de diferentes condiciones de biotransformación de la dicetona 1.....	<b>33</b>
<b>Tabla 6.</b> Estudio de cinética de biotransformación de 1 en (2 a) y (2 b).....	<b>35</b>
<b>Figura 1.</b> Diagrama de coordenada de una reacción.....	<b>20</b>
<b>Figura 2.</b> Representación de la reacción de fermentación de glucosa por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>24</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema de reacción de Fermentación alcohólica y sus respectivos disolventes y reacción en la que se ven involucrados.....	<b>24</b>
<b>Figura 4.</b> Principales componentes de las vías metabólicas energéticas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	<b>26</b>
<b>Figura 5.</b> Monitoreo del progreso de las biotransformaciones.....	<b>37</b>

**Figura 6.** Gráfico porcentaje de conversión v/s recuento de levaduras las primeras 6 horas de reacción, posterior a las 6 horas el recuento y la muestras fueron tomadas a partir del matraz 2 cada 12 horas.....**38**

**Figura 7.** Gráfico porcentaje de conversión v/s recuento de levaduras las primeras 6 horas de reacción, posterior a las 6 horas el recuento y la muestras fueron tomadas a partir del matraz 4 cada 12 horas.....**38**

**Figura 8.** Estructura de las moléculas que forman parte de la reacción, donde 1 corresponde al reactante 1,3-dicetonas a reducir, **(2 a)** y **(2 b)** a los productos de la biotransformación.....**39**

## 1. RESUMEN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) se ha asociado con los seres humanos hace más de 6000 años, dado a su uso en panadería y producción de alimentos, como también a elaboración de vinos y cervezas. Además de su uso en alimentos, esta levadura es quizás el biocatalizador de células completas más conocido por el mundo científico e industrial, y también más comúnmente utilizada por los químicos orgánicos para mediar reducciones enantioselectivas debido a su alta quimio-, regio- y enantioselectividad, su bajo costo, alta biodisponibilidad, y facilidad de tratamiento, especialmente porque actúa en condiciones de reacción moderadas.

Dado a esto la industria química fina se está aprovechando cada vez más de estos biocatalizadores para elaborar productos de alto valor, dado que las enzimas y biocatalizadores de células completas pueden ser a veces más convenientes que la química sintética. El propósito de esta investigación es evidenciar empíricamente el uso de biotransformaciones a partir de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleando química verde, a su vez evaluar el progreso de dichas reacciones y su capacidad de reducción de grupos alquenos a alcanos, como también grupos cetónicos a alcoholes, a partir de medios enzimáticos que contenían agua y una suspensión de levadura, como otro al cual se le añadió un catalizador (PD/C) para evaluar el porcentaje de conversión y que tan efectivo fue. La caracterización de dichas moléculas resultantes fue a partir de espectroscopía de gases masas, esto con el fin de evidenciar la reducción de alquenos a alcanos y grupos cetónicos a alcoholes a partir de una molécula 1,3-dicetonas, sin la necesidad de utilizar productos contaminantes para el medio ambiente. Ya que la reducción de esta no ha sido reportada en literatura.

## 2. INTRODUCCIÓN

Actualmente las industrias tienen un ritmo creciente de producción para abastecer las necesidades de la población en continuo crecimiento a nivel mundial. En este apartado la química contribuye a mejorar la calidad y bienestar del mundo, dando soluciones en diferentes campos, como el caso de la vida cotidiana, en el uso de nuevos materiales, mejoras en salud, uso de reactivos no tóxicos y reducción del uso de disolventes, entre otras (1).

Sin embargo, estos beneficios no se realizan a costas del medio ambiente. En base a esto surge la química verde o también llamada química sostenible, la cual se define como “química que consiste en la utilización de una serie de principios encaminados a reducir o eliminar el uso y generación de sustancias peligrosas en el diseño, fabricación y aplicación de los productos químicos”<sup>(1)</sup>, por lo cual su objetivo principal es el de reducir al máximo la contaminación desde su origen, mediante: el uso de procesos “limpios”, el evitar al mínimo el desperdicio o uso indiscriminado de materias primas no renovables, evitar el uso de materiales tóxicos o contaminantes en la elaboración de productos químicos, diseñar productos y procesos químicos que no atenten contra la salud o el ambiente y reciclar los desechos generados para minimizar los impactos sobre el medio y los humanos, sin sacrificar por ello el avance científico y tecnológico (2).

Una de las prácticas de la química verde es el uso de procesos limpios, como se mencionó anteriormente. Un ejemplo de esto es la biocatálisis, la cual pertenece a una de las clasificaciones de los métodos catalíticos. Ésta consta del uso de biocatalizadores. Un



biocatalizador es una enzima (o grupo de ellas) que puede usarse en forma pura, parcialmente purificada o dentro de un sistema enzimático en una célula entera (3), como todo catalizador, alteran la velocidad para llegar al equilibrio, pero no cambian la posición de este. Por lo tanto, el término biocatálisis se refiere a la utilización de células o sus enzimas aisladas para catalizar reacciones o transformaciones que conducen a la obtención de compuestos de interés, que satisfacen numerosas necesidades humanas (4). En general este proceso requiere de ciertas etapas claves como:

- 1- La selección de la enzima más adecuada.
- 2- Producción, aislamiento y purificación de la enzima.
- 3- Caracterización de dicha enzima para determinar las condiciones idóneas para la catálisis enzimática.
- 4- Inmovilización de esta para reducir los costos.

Todo esto es denominado "ciclo biocatalítico". Hasta ahora los microorganismos han sido la principal fuente de enzimas de aplicación industrial, ya que presentan numerosas ventajas técnicas y económicas en comparación con las enzimas de origen animal y vegetal. Éstas pueden ser aisladas de distintas fuentes naturales y/o de colecciones como, por ejemplo, las tipos ATCC.

Durante años se han utilizado enzimas presentes en los microorganismos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o las bacterias lácticas en la producción de alimentos como el vino, la cerveza, el queso, el vinagre o el pan (4). Por lo tanto el hombre ha hecho uso de la química verde en su beneficio sin saber que las transformaciones obtenidas se debían a la función de determinadas enzimas presentes en los organismos utilizados y además, sin darse cuenta del impacto que esto podía causar en la disminución de los contaminantes en la naturaleza años más tarde.

*Saccharomyces cerevisiae*, es la levadura más utilizada en biocatálisis. La razón de esto se debe, por un lado, a su disponibilidad y bajo costo, ya que no necesita de medios de crecimiento estériles, siendo viable y sencillo trabajar con ella. Los sistemas enzimáticos que destacan en las levaduras son enzimas vinculadas a reacciones redox (deshidrogenasas, oxigenasas y oxidasas), enzimas hidrolíticas (lipasas, epóxido hidrolasas) y liasas.

Cabe destacar que la levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) es una potente herramienta para reducir compuestos monocarbonílicos como aldehídos y cetonas con sustituyentes alquilo y arilo, o también compuestos dicarbonílicos (dicetonas cíclicas y acíclicas), para así obtener alcoholes secundarios de configuración S (5).

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Química verde

En la actualidad, existe un gran deterioro del medio ambiente lo que ha generado la necesidad de buscar alternativas que conduzcan a la sostenibilidad ambiental. Una de estas herramientas es la “química verde” concepto que contempla el diseño de productos y procesos que reduzcan la generación de sustancias peligrosas y maximicen la eficiencia en la utilización de recursos materiales y energéticos (2), lo que conduce a promover acciones para conservar el medioambiente a nivel de industria química, ya que, la gran mayoría de contaminantes se produce por procesos químicos.

El concepto de “química verde” fue introducido a principios de los 90’ en la comunidad científica y fue prontamente adoptado el concepto por los medios de comunicación como un nuevo enfoque de la química en oposición a la contaminación. El concepto se hizo rápidamente popular y difundido. Los institutos de investigación, los libros y las revistas utilizan esta definición, aunque no siempre con el mismo significado. Una buena definición de “química verde” es la que proviene de Estados Unidos. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) la define como el uso de productos químicos para la prevención de la contaminación y diseño de procesos más ecológicos (6).

La Agencia de Protección Ambiental, “EPA” por sus siglas en inglés, ha clasificado distintas áreas principales para la química verde, estas son:

- Uso de vías sintéticas alternativas (algunos ejemplos como la fotoquímica y síntesis de materias primas alternativas, que son más inocuas y renovables).
- Condiciones de reacción alternativas (Ejemplo: uso de disolventes que tienen un impacto reducido en humanos, salud y el medio ambiente). Mayor selectividad y reducción de residuos y emisiones.
- Diseño de productos químicos eco-compatibles (menos tóxicos que alternativas actuales y también más seguras con respecto a un potencial accidente).

La química verde reduce la contaminación en su fuente, al minimizar o eliminar los peligros de las materias primas químicas, reactivos, disolventes y productos; a diferencia de la "limpieza de contaminación o remediación" la cual está encargada de la fase final de los procesos de tratamientos de desechos. También la limpieza de derrames ambientales o la remoción de materiales peligrosos en el medio ambiente, para separarlos y tratarlos en su eliminación. Por otro lado, la química verde mantiene los materiales peligrosos fuera del medio ambiente en primer lugar.

Para esto se rige por 12 principios que demuestran la amplitud de dicho concepto ("química verde"), y que originalmente fueron definidos por Anastas y Warner (1988) (29). Estos principios se han aplicado en el desarrollo de una amplia gama de productos y procesos, cuyos objetivos han sido minimizar los riesgos para la salud, medio ambiente, generación de desechos y prevenir la contaminación.

Dichos principios son:

- 1. Prevenir el desperdicio:** Diseñar síntesis químicas para prevenir el desperdicio. No dejar residuos para tratar o limpiar.

2. **Maximizar la economía del átomo:** Diseñar síntesis de modo que el producto final contenga la proporción máxima de los materiales de partida. Desperdiciar pocos o ningún átomo.
3. **Maximizar síntesis químicas menos peligrosas:** Diseño de síntesis para usar y generar sustancias con poca o ninguna toxicidad para los seres humanos o el medio ambiente.
4. **Maximizar productos y productos químicos más seguros:** Diseño de productos químicos que sean completamente efectivos pero que, a la vez, tengan poca o ninguna toxicidad.
5. **Use solventes y condiciones de reacción más seguros:** Evite usar solventes, agentes de separación u otros productos químicos auxiliares. Si debe usar estos productos químicos, use los más seguros.
6. **Aumente la eficiencia energética:** Ejecute reacciones químicas a temperatura y presión ambiente siempre que sea posible.
7. **Use materias primas renovables:** Use materiales de partida (también conocidos como materias primas) que son renovables en lugar de ser agotables. La fuente de las materias primas renovables a menudo son los productos agrícolas o los desechos de otros procesos; la fuente de las materias primas de agotamiento son a menudo los combustibles fósiles (petróleo, gas natural o carbón) o también las operaciones mineras.
8. **Evite los derivados químicos:** Evite usar grupos bloqueadores, protectores o cualquier modificación temporal si es posible. Los derivados utilizan reactivos adicionales y generan gran cantidad de residuos.

- 9. Use catalizadores, no reactivos estequiométricos:** Minimice los desechos utilizando reacciones catalíticas. Los catalizadores son efectivos en pequeñas cantidades y pueden llevar a cabo la misma reacción muchas veces. Son preferibles a los reactivos estequiométricos, que se usan en exceso y realizan una reacción solo una vez.
  
- 10. Maximice productos químicos y productos para degradar después del uso:** Diseñe productos químicos para descomponerlos en sustancias inocuas después del uso para que no se acumulen en el ambiente.
  
- 11. Analice en tiempo real para evitar la contaminación:** Incluya en el proceso, monitoreo en tiempo real y control durante las síntesis para minimizar o eliminar la formación de subproductos.
  
- 12. Minimice la posibilidad de accidentes:** Diseñe químicos en sus diferentes formas físicas (sólido, líquido o gas) para minimizar la posibilidad de accidentes químicos, incluidas explosiones, incendios y liberaciones peligrosas de polución al medio ambiente.

Los productos químicos son parte de la vida moderna y están presentes en todos lados. Se utilizan como productos farmacéuticos, plaguicidas, detergentes, fertilizantes, tintes, pinturas, acabados, conservantes, aditivos alimentarios, entre otros (7), por lo tanto, son difíciles de detenerlos de una manera rápida y eficiente una vez liberados a los ecosistemas, ya que estos no se degradan ni descomponen completamente en agua, dióxido de carbono y sales inorgánicas. Es por esto por lo que se ha establecido la aplicación de la química verde, mediante el diseño de procesos con metodologías que prevengan la contaminación y a la vez sean seguras para el medio ambiente y ser humano. Para esto, se ha visto recientemente que la química verde puede utilizar materiales compatibles con el entorno, desarrollando procesos innovadores que reduzcan y/o eliminen la generación de sustancias peligrosas, residuos y tóxicos persistentes de diversas actividades industriales (8).

Uno de los principios de la química verde plantea el uso de solventes y condiciones de reacción más seguros; es decir, que no sean inflamables, tóxicos y que no produzcan emisiones de compuestos orgánicos volátiles derivados de su uso, como medio de reacción de la industria química, minimizando de esta manera la producción de contaminantes y subproductos tóxicos.

En base a lo anterior se han propuesto diferentes tipos de reacciones, con sus respectivos catalizadores y solventes, para ser empleados en la química verde los cuales se observan en la Tabla 1. Lo ideal es que se usen reacciones que utilicen menos solventes o en su defecto que prescindan de los mismos.

**Tabla 1.** Catalizadores y solventes empleados en química verde. (Adaptación desde *“Química verde: un nuevo reto”*.) (2).

Tipo de Reacción	Catalizador	Solvente
Reacciones de Diels-Alder.	Escandio (trifluorometanosulfonato)	Dióxido de carbono supercrítico
Condensación de Knoevenagel.	Piperidina	Libre de solvente
Acilación de alcoholes y fenoles.	Oxido de Zinc	Libre de solvente
Transesterificación de aceite de soja.	Sin catalizador	Metanol supercrítico y propano como cosolvente
Reaccion de Suzuki.	Paladio acoplado con ácido arilborónico y aril haluros Pd (DPPF) Cl <sub>2</sub>	Agua

**Continuación Tabla 1.** Catalizadores y solventes empleados en química verde. (Adaptación desde “*Química verde: un nuevo reto*”). (2).

Tipo de Reacción		Catalizador	Solvente
Reacciones de Oxidación de alcoholes.	de	Bromuro de tetraetilamonio/tetrapropilamonio ([Et <sub>4</sub> N][Br]/TRAP)	Líquidos iónicos orgánicos: (cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio, bromuro de tetraetilamonio y cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio)
Reacciones de acilación Friedel-Crafts.	de	Cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio/cloruro de aluminio ([emim][Cl]/AlCl <sub>3</sub> )	Líquidos iónicos orgánicos: (cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio, bromuro de tetraetilamonio y cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio)
Síntesis de 2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-onas.	de	Silíca, ácido sulfúrico	Libre de solvente
Síntesis de oxazolinas, irridazolinas y tiazolinas.	de	Ácido tungstofosfórico (TPA)	Libre de solvente
Cicloadición de azidas y alquinos terminales.	de	SiO <sub>2</sub> -NHC-Cu (II)	Libre de solvente



**Continuación Tabla 1.** Catalizadores y solventes empleados en química verde. (Adaptación desde “*Química verde: un nuevo reto*”). (2).

Tipo de Reacción	Catalizador	Solvente
Síntesis de jasminaldehído.	Chitosan	Libre de solvente
Síntesis de tributílcitrato.	Líquidos iónicos ácidos (1-metil-3-(3-sulfopropil)-imidazolío hidrógeno sulfato)	No registra
Reacción de transesterificación.	Líquido iónico	Líquido iónico: Ácido 4-(3-metilimidazolium) butanosulfónico, Hidróxido de colina
Oxidación de monosacáridos.	Au/TiO <sub>2</sub> ; Au/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	No registra
Síntesis de derivados de quinoxalina.	Celulosa de ácido sulfúrico	Etol; Agua
Polimerización química oxidativa de 2,5-Dimetoxianilina.	Sin catalizador	HCl/NaCl/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Sistema oxidante)

La mayoría de las industrias usan en gran cantidad solventes, donde más de la mitad de ellos corresponden a solventes orgánicos que pueden reutilizarse. En algunas son utilizadas las técnicas que involucran procesos naturales como fotoquímica. Se utilizan catalizadores que puedan ser recuperados y reutilizados fácilmente, en las cuales utilizan el

agua como solvente natural. Esto posee muchas ventajas, una de ellas es la ausencia de toxicidad e inflamabilidad.

Estudios recientes proponen otros solventes y catalizadores, tales como el dióxido de carbono supercrítico que se utiliza como catalizador y se considera como un buen "disolvente verde" en diferentes tipos de síntesis. Por ejemplo: en las reacciones de bromación de compuestos aromáticos y en las de polimerización del metacrilato de metilo. Entre las ventajas que presenta, se encuentran su alta difusión, baja viscosidad y densidad intermedia, así como su baja toxicidad, inflamabilidad y empleo de baja temperatura (2), (6). A su vez se ha visto el uso de biocatalizadores en base a microorganismos, tales como las levaduras, dada su gran producción de enzimas, que ayudan a dicho microorganismo a biotransformar nutrientes en el medio que se les otorgue. Un ejemplo típico en las levaduras son los procesos de fermentación.

### 3.2 Bioconversión

La bioconversión en los últimos años ha tomado gran importancia en la "química verde", esta es definida como el proceso por el cual se produce la transformación de un compuesto químico en otro mediante el uso de un sistema biológico, que puede ser un organismo completo, o una enzima o sistema enzimático (8).

Existen 2 tipos de bioconversión y esto depende del tipo. Si la conversión química de la sustancia se lleva a cabo mediante una enzima libre o inmovilizada, se denominará "biocatálisis", por el contrario, si se lleva a cabo con una célula completa conteniendo la enzima necesaria, se habla de biotransformación. En el caso de las biotransformaciones, éstas

son llevadas a cabo en cultivos celulares, también llamados fermentaciones, donde los microorganismos que son utilizados para producir enzimas varían desde los sistemas procariotas que incluyen tanto las bacterias Gram negativas y Gram positivas, hasta los sistemas eucariotas tales como levaduras y hongos (9).

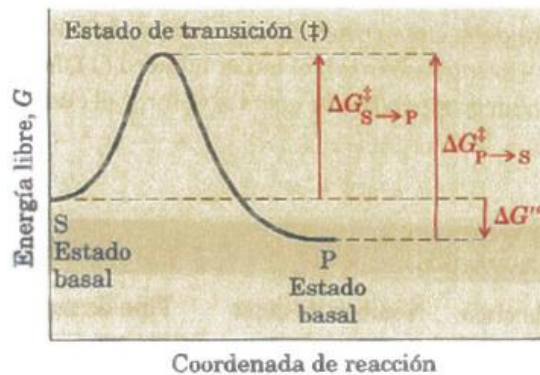
Desde el punto de vista comercial y ambiental son reacciones más económicas, directas y amigables para el medio ambiente que sus análogas químicas, ya que las transformaciones tienen lugar principalmente en agua y los subproductos son biodegradables o reutilizables, causando un bajo impacto ambiental. Adicionalmente, cuando el biocatalizador, microorganismo o enzimas aisladas, están inmovilizados se pueden reciclar varias veces sin pérdida significativa de sus propiedades catalíticas (10), permitiendo utilizar temperatura ambiente y presión atmosférica, evitando con ello el uso de condiciones de reacción extremas, que pudiesen causar isomerizaciones, racemizaciones, epimerizaciones o transposiciones. En dichos procesos es necesario el uso de un biocatalizador, los cuales son sustancias, que realizan catálisis en las reacciones químicas que se llevan a cabo en los seres vivos (11).

Los biocatalizadores como se mencionó anteriormente, permiten que las reacciones químicas se realicen a la temperatura corporal del organismo, posibilitando el control de las mismas, evitando la destrucción de la célula por el calor desprendido en ellas y permitiendo el aprovechamiento de esta energía liberada <sup>(11)</sup>; aceleran las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos, ya que disminuyen la energía de activación que se necesita para que tengan lugar estas reacciones, permitiendo que se produzcan a velocidades y temperaturas adecuadas.

Un ejemplo clásico son las enzimas o fermentos (las vitaminas y hormonas) donde las enzimas son consideradas biocatalizadores por excelencia, ya que regulan y controlan la mayoría de las reacciones metabólicas. Otra característica de estos biocatalizadores es que necesitan una pequeña cantidad para transformar una gran cantidad de sustrato. Luego de realizar su acción éstas permanecen inalteradas, provocando que dichas enzimas puedan utilizarse a partir de un microorganismo en pleno crecimiento; como, por ejemplo: extractos de plantas, insectos, células completas o enzimas puras obtenidas de algún microorganismo.

Estas pueden usarse de varias maneras, pueden ser del tipo salvaje, recombinadas, o genéticamente modificadas para incrementar su actividad o especificidad; en cuanto a los medios de reacción que utilizan microorganismos vivos, estos pueden estar en pleno crecimiento, en fase estacionaria o inmovilizados (10).

Las enzimas pueden ser de dos tipos; enzimas extracelulares, exocelulares o exoenzimas, que tienen su acción catalítica fuera de la célula. Por otro lado, las enzimas intracelulares (endocelulares o endoenzimas), cuya acción catalítica se limita al interior de la célula (12). En el caso de las intracelulares su función es sintetizar el material celular y degradar nutrientes que penetraron la célula gracias a enzimas extracelulares quienes proporcionaron sus requerimientos energéticos, como por ejemplo hexoquinasas, que catalizan la fosforilación de la glucosa. Por el contrario, la función de las enzimas extracelulares es efectuar cambios en los nutrientes del medio ambiente externo para que puedan ser transportados al interior de la célula. Una reacción enzimática sencilla posee distintos componentes, estos son: enzima (E), sustrato (S) (14), producto (P), complejo enzima- sustrato, complejo enzima-producto (ambos considerados como complejos transitorios), energía de transición y estado basal, (Figura 1), dando origen a una variedad de reacciones fundamentales. (Tabla 2)



**Figura 1.** Diagrama de la coordenada de una reacción, donde se presenta la energía libre del sistema frente al progreso de la reacción  $S \rightarrow P$  (Obtenido desde ‘Lehninger Principios de Bioquímica’) (14).

**Tabla 2.** Tabla resumen de reacciones fundamentales de los microorganismos. (Elaboración propia, 2019).

Reacción	Función
Reducción	Incorporación de hidrógenos o electrones.
Oxidación	Separación de hidrógenos o electrones.
Deshidratación	Pérdida de una molécula de agua del sustrato.
Hidrólisis	Adición de una molécula de agua del sustrato.
Desaminación	Separación de un grupo amino ( $\text{NH}_2$ ).
Descarboxilación	Separación de $\text{CO}_2$ de un grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ).
Fosforilación	Adición de un grupo fosfato a una molécula orgánica.

Las reacciones enzimáticas generalmente se realizan en un medio acuoso, ya que es el óptimo para mantener la conformación y actividad catalítica de la enzima. En este tipo de

medio, los pliegues de la enzima están dirigidos por los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos que la constituyen y su parte hidrófila se sitúa al exterior formando una superficie que está en contacto con el medio acuoso (13). También son usados los disolventes apolares, con los cuales la parte hidrófoba de una enzima tiende a dispersarse, y como resultado hay una reorganización de la estructura terciaria de la enzima, causando una nueva conformación, y esto implica una pérdida en la actividad catalítica. Según el tipo de biocatalizador, se utilizará un determinado solvente, ya que éste influye en la estabilidad de la enzima. Algunos ejemplos se pueden observar en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Cuadro resumen de algunos biocatalizadores junto a sus respectivos disolventes y reacciones en la que se ven involucrados. (Adaptado de “Química orgánica avanzada”) (13).

Biocatalizador	Disolvente	Reacción catalizada
<b>Lipasas</b>	Disolventes apolares	Síntesis de ésteres Síntesis de péptidos Formación de lactonas macrocíclicas
<b>Proteasas</b>	Acetato de etilo	Síntesis de péptidos
<b>Carboxiesterasa inmovilizada</b>	Propionato de metilo	Acilación enantioselectiva de alcoholes racémicos
<b>Alcoholdehidrogenasa inmovilizada</b>	Isopropanol	Reducción asimétrica de cetonas

Además del solvente, también existen diversos factores capaces de alterar una reacción enzimática, tales como: pH, temperatura, concentración de la enzima y sustrato.

- a) **pH:** Las variaciones de pH modifican las cargas de la enzima, generando un cambio en su actividad. Por lo cual, si un medio enzimático se torna muy ácido o básico, inactivará la enzima.
- b) **Temperatura:** Al igual que con el pH, muchas enzimas necesitan de una temperatura óptima para que la reacción alcance su máxima velocidad. Así las temperaturas altas inactivan rápidamente a la mayoría de las enzimas provocando alteración molecular irreversible (12).
- c) **Concentración de la enzima y concentración del sustrato:** Ambas van correlacionadas, ya que una es dependiente de la otra. En este caso la concentración de la enzima es el factor limitante de la velocidad de la reacción, por lo cual la velocidad inicial de la reacción es directamente proporcional a la concentración de esta. Al mismo tiempo, la concentración de sustrato por más que aumente no incrementará la velocidad de reacción, debido a que las moléculas de la enzima se saturarán de él, por ende, es dependiente de la concentración de enzima.

### 3.3 *Saccharomyces cerevisiae* como biotransformador

El término deriva del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza). Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa (16).

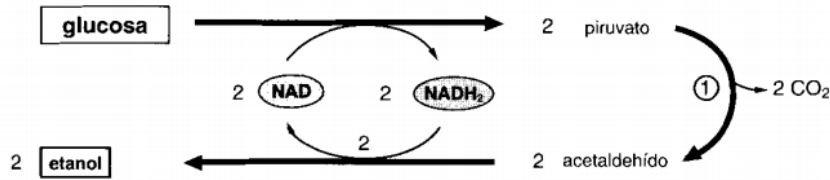
*Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más utilizada en los estudios del laboratorio, siendo el primer organismo eucariota cuyo genoma ha sido secuenciado. Es un organismo que ha evolucionado consiguiendo una eficiente utilización del carbono disponible, lo que

significa que combina los metabolismos fermentativos y oxidativos de forma adecuada. (17) Dicho género es utilizado en la industria para muchos procesos fermentativos como la producción de pan, vino y cerveza, además es ampliamente conocido por su actividad catalítica en sustratos como el aldehído y la cetona. (18)

Los principales productores de alcohol son las levaduras, sobre todo las que pertenecen al género mencionado anteriormente, ya que estos microorganismos realizan respiración aeróbica y en ausencia de aire fermentan los hidratos de carbono a etanol y anhídrido carbónico. (19)

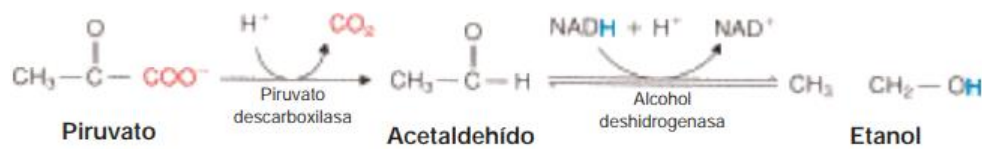
Las condiciones anaeróbicas para levadura *Saccharomyces cerevisiae* son la única manera de producir energía, aunque en presencia de oxígeno, da lugar a la fermentación. Sin embargo, en condiciones aeróbicas puede producir fermentación alcohólica cuando la concentración de glucosa sobrepasa un valor límite crítico, lo cual es conocido como "Efecto Crabtree" (20). La fermentación de la glucosa a etanol y anhídrido carbónico es realizada por la vía de la fructosabifosfato. Lo primero que ocurre es que se descarboxila el piruvato por la piruvato-descarboxilasa (1) con participación de la tiaminapirofosfato, formándose acetaldehído; reduciéndose éste a etanol con  $\text{NADH}_2$  mediante la alcohol-deshidrogenasa (2) consumiendo en este proceso el hidrógeno liberado en la deshidrogenación de la triosa-fosfato (Figura 2).





**Figura 2.** Representación de la reacción de fermentación de glucosa por *Saccharomyces cerevisiae*. (Obtenida de: “Microbiología General, Hans G. Shlegel”) (19).

Durante el transporte de azúcares, se realiza glucólisis, donde participan 10 enzimas para obtener piruvato a partir de glucosa o fructosa. Las levaduras convierten el piruvato en etanol en una ruta de dos pasos. Esta fermentación alcohólica comienza con la descarboxilación no oxidativa del piruvato a acetaldehído, catalizada por la piruvato descarboxilasa. Esta reacción va seguida de la reducción del acetaldehído a etanol, que depende del NADH, catalizada por la alcohol deshidrogenasa (Figura 3).



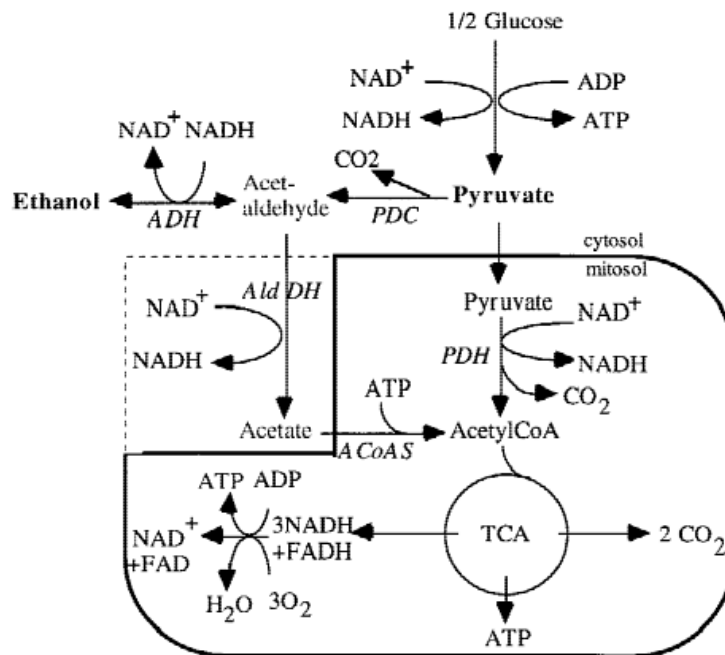
**Figura 3.** Esquema de la reacción de Fermentación alcohólica. (Obtenido de: “Bioquímica”) (21).

En *Saccharomyces cerevisiae* se conocen 4 deshidrogenasas dependientes de NAD o NADP; ADH I, ADH II, ADH III y ADH IV, las primeras dos son constitutivas, la ADH I

transforma el acetaldehído a alcohol y la ADH II realiza la reacción inversa. La función de las demás no está bien definida. Entre los compuestos que se forman están las grandes familias de alcoholes superiores. Carbonilos como los aldehídos, los ésteres, los ácidos orgánicos, las grasas y los compuestos con azufre (22).

Los principales alcoholes producidos son: el isobutanol, 3-metil-butanol, 2-feniletanol e isobutanol. En cuanto a los aldehídos éstos son formados en la fase fermentativa como se mencionó anteriormente y son consecuencia de la descarboxilación de cetoácidos y en éstos se destaca el acetaldehído, el cual está relacionado con la actividad de la piruvato descarboxilasa.

Las levaduras no generan acetales. Se sintetizan a partir de los aldehídos (los cuales son reactivos) y de los alcoholes, que se liberan de dos moléculas de alcohol y un aldehído. Los ésteres se sintetizan a partir de un alcohol y un ácido (orgánico o graso). Cuando éstos reaccionan, el proceso es lento y reversible y son producidos por las levaduras mediante la esterificación enzimática entre los alcoholes libres y los ácidos carboxílicos en forma activa como Acil-CoA. El más abundante es el acetato de etilo (22).



**Figura 4.** Principales componentes de las vías metabólicas energéticas de *Saccharomyces cerevisiae*. Las enzimas clave en el metabolismo son: PDH: complejo de piruvato deshidrogenasa; PDC: piruvato descarboxilasa; ADH: alcohol deshidrogenasa; AldDH: acetaldehído deshidrogenasa; ACoAS: acetilCoA sintetasa (Obtenida de: ‘‘Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: simulation and model verification’’) (23).

Tanto la reducción enantioselectiva de cetonas y cetoésteres mediante levaduras, como la oxidación regioselectiva de polioles, se cuentan entre las reacciones más antiguas descritas en la literatura de biotransformaciones. Sin duda la reducción con levaduras, y en particular las reducciones catalizadas por *Saccharomyces cerevisiae*, se cuentan entre las más exitosas de las reacciones bioquímicas. *Saccharomyces* es capaz de reducir una amplia gama de cetonas tanto aromáticas como alifáticas. La razón obvia para esto es que en la reducción de cetonas para dar alcoholes secundarios se transfiere quiralidad desde la enzima hacia el producto para generar un alcohol quiral enriquecido ópticamente. Por el contrario, en la

síntesis de cetonas esto no tiene interés ya que el producto no es quiral y por lo tanto la ventaja de la utilización de enzimas es relativa (3).

Los Biocatalizadores son estables en condiciones moderadas de temperatura (y algunos toleran temperaturas mayores que 100°C) y soportan tanto disolventes acuosos como orgánicos (mejor que muchos reactivos químicos). También son muy eficientes y no dañan el medioambiente, las enzimas que poseen trabajan en condiciones “suaves” de pH, presión y temperatura, tal como lo hacen las levaduras. Es por lo anterior mencionado que *Saccharomyces cerevisiae* es muy útil como un bioconversor.

#### 4. HIPÓTESIS

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* transformará los grupos cetonas y alquenos contenidos en 1,3-dicetonas del tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado empleando diferentes condiciones "verdes" de reacción.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general:

- Estudiar la biotransformación de 1,3-dicetonas del tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado empleando protocolos de química verde.

### 5.2 Objetivos específicos:

- Biotransformar la 1,3-dicetona (*E*)-6-fenilhex-5-eno-2,4-diona empleando *S. cerevisiae* (cepas puras) y "wild type" en diferentes condiciones de reacción.
- Identificar y caracterizar los diferentes productos obtenidos empleando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-MS).
- Estudiar la cinética de las mejores condiciones de biotransformación obtenidas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Microorganismo.

Cepas puras de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas de una suspensión en agua, suplementada con glucosa, a partir del cepario del laboratorio de microbiología de la escuela de Tecnología Médica. Estas fueron sembradas en medio Sabouraud maltosa y se mantuvieron en incubación por 48 horas a 30°C, de estos cultivos se realizaron 3 repiques que también fueron incubados 48 horas a 30°C. Al término se ajustó una suspensión de levaduras a DO<sub>600</sub>= 0,867, en espectrofotómetro Genesis 10 UV. Además, se disponía de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* del tipo comercial, a la cual denominamos "cepa wild type".

### 6.2 Obtención de la dicetona (*E*)-6-fenilhex-5-eno-2,4-diona (**1**):

Este compuesto fue obtenido siguiendo los protocolos descritos por Pabon et al. (28). Así la dicetona (*E*)-6-fenilhex-5-eno-2,4-diona (**1**) fue obtenida, a través de la reacción de condensación aldólica entre la 2,4-pentadiona y benzaldehído en una relación equivalente molar 1:1. El producto **1** resultante fue purificado por cromatografía en columna (CC) y caracterizado por RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Este compuesto fue donado a esta investigación por el proyecto Fondecyt N° 3170757 a cargo de Oscar Forero Doria.

### 6.3 Composiciones y condiciones del medio.

Se realizaron 4 medios para el estudio de la bioconversión. Los cuales variaban su composición, el primer matraz contenía 100 mL de agua y una suspensión de levadura ajustada al 0,3 Mc Farland; el segundo matraz contenía 100 mL de agua y se le añadió una suspensión de levadura a 0,86 Mc Farland; posteriormente el tercer matraz contenía 100 mL de agua al cual se le añadieron 2,5 g de levadura tipo "wild type"; a su vez el cuarto matraz constó de una mezcla igual a la del matraz número 2, pero a diferencia de este se añadieron 0,01 g de Paladio/Carbono. A cada matraz se le añadieron 0,1 g de dicetona (1) y 2,5 g de glucosa, cada día y se dejaron en agitación constante a 37°C por 3 días.

Matraz	Solvente	Aditivo	<i>S. cerevisiae</i> (cepa pura) (UFC)	<i>S. cerevisiae</i> "wild type" (g)
1	Agua	N7A	0,3	-
2	Agua	N/A	0,86	-
3	Agua	N/A	-	2,5
4	Agua	Pd/C 10%	0,86	-

**Tabla 4:** Protocolo que indica las composiciones de cada medio a utilizar para la estandarización de las biotransformaciones a realizar.

### 6.4 Extracción y purificación de los productos obtenidos

Se extrajeron 2 mL de cada matraz en tubos eppendorf de 2 mL, los cuales fueron centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos, se rescató el sobrenadante y se almacenó en otro tubo. El tercer día de evaluación se realizó extracción con diclorometano en embudo de decantación en proporción 1:1 (100 mL de lo que contenía cada matraz y 100 mL de diclorometano). La fase orgánica resultante (fase de diclorometano), fue secada con sulfato



de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y concentrada a presión reducida en un rotavapor. El extracto crudo resultante fue mantenido en refrigeración hasta su posterior análisis.

#### 6.5 Análisis de composición y cinética por GC-MS:

Para caracterizar los productos de la reacción se utilizó espectrometría de gases masas, utilizando un cromatógrafo de gases GC Trace 1300 Thermo Fisher Scientific serie 713100331 acoplado a un espectrómetro de masas ISQ serie: ISQ 130729 2215 Grand Avenue Parkway Austin TX U.S.A 78728 equipado con una columna capilar Rtx-5MS w/integra-guard (Crossbond 5% diphenyl – 95% dimethyl polysiloxane) de 30 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor.

Se inyectaron 3  $\mu\text{L}$  de muestra a  $250^\circ\text{C}$  de temperatura en el puerto de inyección, en modo splitless, con las siguientes condiciones:  $60^\circ\text{C}$ , con una rampa de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta 300 con un tiempo de espera de 5 minutos. Se utilizó un flujo de arrastre de 1,5  $\text{mL}/\text{min}$ . Todos los ensayos fueron desarrollados en modo scan y el análisis de cada muestra fue realizado por duplicado.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Estandarización:

En la tabla 4 se presentan las diferentes condiciones de los medios a utilizar para estandarizar el proceso de biotransformación, en el cual se designaron 6 medios con sus respectivas composiciones, y posteriormente se evaluó el porcentaje de bioconversión de cada uno, donde las composiciones de los matraces 2 y 4, fueron utilizadas posteriormente para evaluar la cinética de la reacción, ya que esta fue más eficiente en esas condiciones.

Matraz	Solvente	Aditivo	<i>S. cerevisiae</i> (cepa pura) (UFC)	<i>S. cerevisiae</i> "wild type" (g)	Producto (2 a) (% de conversión)	Producto (2 b) (% de conversión)
1	Agua	N7A	0,3	-	0	0
2	Agua	N/A	0,86	-	38	5
3	Agua	N/A	-	2,5	3	18
4	Agua	Pd/C 10%	0,86	-	16	69

**Tabla 5:** Estudio de diferentes condiciones de biotransformación de la dicetona (1) y porcentaje de conversión obtenido para los productos (2 a) y (2 b).

Tras la elección de los medios más favorables para la reacción (2 y 4), se realizó un montaje de ambos medios, a una temperatura de 37°C y en constante agitación, a los cuales cada día se les añadió 2,5 g de glucosa. En primer lugar, se extrajeron 2 mL de muestra cada 1 hora, durante un período de 6 horas, estas fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, y se utilizó el sobrenadante para realizar extracción de los productos de la reacción a partir de la 1,3-dicetona (1).

## 7.2 Monitoreo del progreso de la reacción:

Al recolectar los datos en la Tabla 5, observamos que durante las primeras 5 horas la bioconversión de la molécula principal no se ve afectada, ya que el porcentaje de esto es nulo, por el contrario, al cabo de 6 horas hasta las 42 horas se observó que hubo conversión de la 1,3-dicetona, en el caso del matraz 2 el pick máximo de conversión de la molécula (**2 a**) fue a las 42 horas, mientras que (**2 b**) al cabo de 6 horas. A su vez en el caso del medio que contenía Pd/C como catalizador, se observó un pick máximo de conversión de (**2 a**) las 30 horas y de (**2 b**) a las 42 horas.

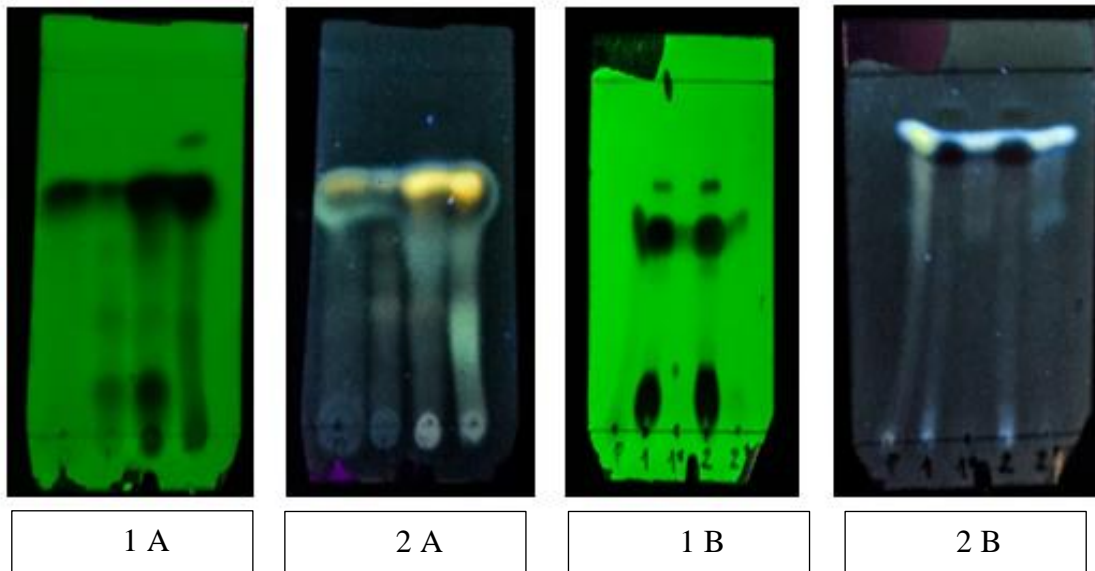
**Tabla 6:** Estudio de cinética de biotransformación de la 1,3-dicetona (1) en (2 a) y (2 b), utilizando condiciones de los matraces 2 y 4.

<b>Matraz 2: Agua- Levadura 0,86 UFC</b>					
<b>Recuento levaduras</b>					
<b>%Conversión (2 a)</b>	<b>Tiempo (horas)</b>	<b>%Conversión (2 b)</b>	<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Levaduras/uL</b>	<b>Tiempo (horas)</b>
0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	30,4	1
0	2	0	2	40,4	2
0	3	0	3	84	3
0	4	0	4	102,4	4
0	5	0	5	103,6	5
30	6	18	6	113,6	6
24	18	7	18	114	18
32	30	1	30	116	30
37	42	8	42	116,4	42

<b>Matraz 4: Agua- Levadura 0,86 UFC- Pd/C</b>					
<b>Recuento levaduras</b>					
<b>%Conversión (2 a)</b>	<b>Tiempo (horas)</b>	<b>%Conversión (2 b)</b>	<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Levaduras/uL</b>	<b>Tiempo (horas)</b>
0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	31,6	1
0	2	0	2	38,4	2
0	3	0	3	72	3
0	4	0	4	77,6	4
0	5	0	5	92	5
28	6	17	6	105,6	6
24	18	15	18	106	18
41	30	15	30	107,6	30
16	42	69	42	107,6	42

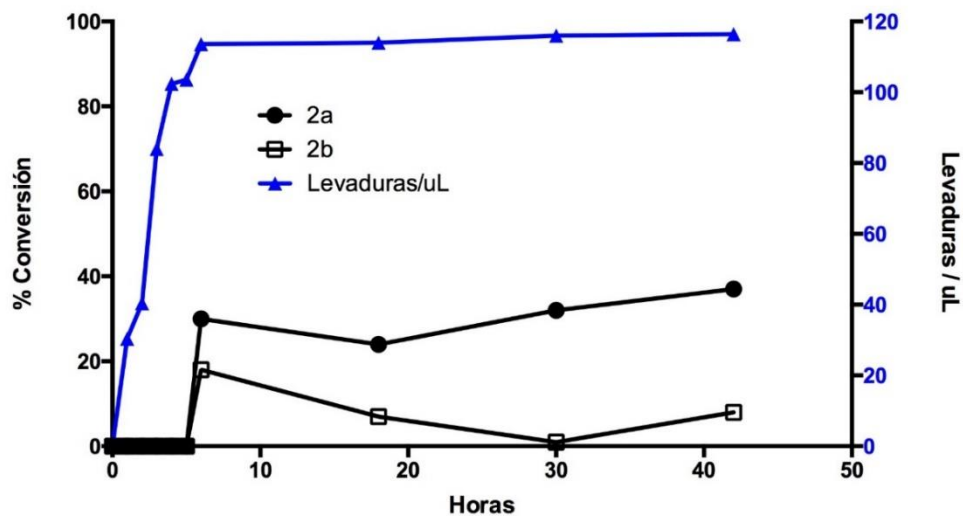
Además de los 2 mL extraídos, se ocuparon 25 uL de muestra de cada matraz, para realizar recuento de levaduras en cámara de Neubauer y así evaluar el crecimiento de esta a medida que avanzaba el tiempo de reacción.

Durante el progreso de la reacción se realizó un monitoreo mediante TLC tanto en el proceso de estandarización, como en la evaluación de la cinética de reacción, para evaluar si dichas muestras estaban contaminadas e ir observando el desarrollo de estos productos, como se observa en la figura 5, donde la figura 1 A representa los compuestos que pertenecen a las reacciones de los matraces 1, 2 y 6, reveladas a una longitud de onda de 245 nm, donde P es el patrón (1,3-dicetona), 1 corresponde al matraz 1; 2 corresponde al matraz 2 y 3 corresponde al matraz 6. Figura 2 A corresponde a los compuestos anteriores, pero revelados a una longitud de onda de 365 nm. Figura 1 B representa los compuestos que pertenecen a la reacción de los matraces 2 y 4 reveladas a una longitud de onda de 245 nm, así también la figura 2 B revelados a longitud de onda de 365 nm. En la figura 1 A al revelar a una longitud de onda corta observamos que hay productos al mismo nivel del patrón, y además dos compuestos más que poseen un  $r_f$  menor, al ser revelados a longitud de onda larga como se observa en la figura 1 B se ve que estos no presentan color, por ende, son compuestos diferentes al producto. A su vez en la figura 2 A se observan 4 compuestos, 2 al mismo nivel del patrón que poseen un  $r_f$  mayor y otros dos con un  $r_f$  menor, que al ser revelados a longitud de onda larga (Figura 2 B) se observa que estos emiten distinto color al del patrón, por lo cual aquí es bastante interesante ya que se generan 4 moléculas diferentes.

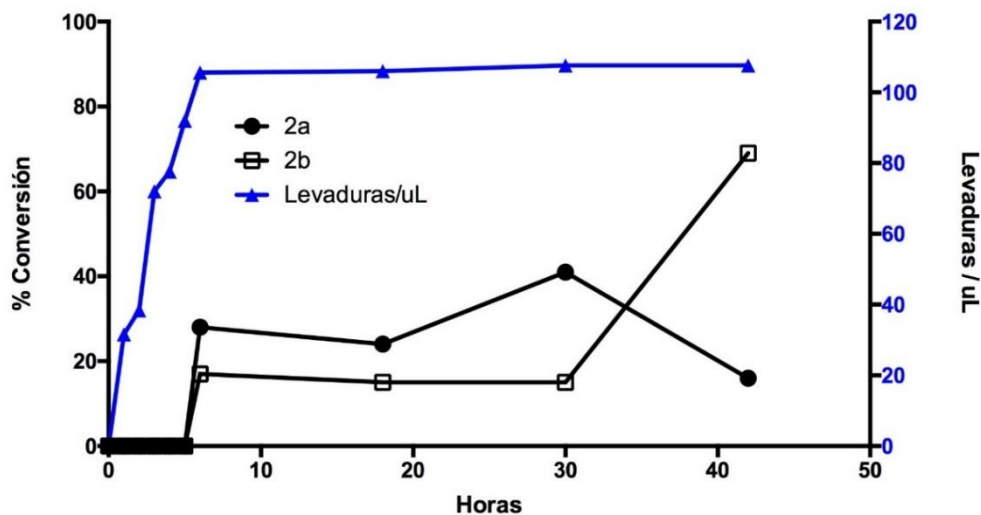


**Figura 5:** Monitoreo del progreso de las biotransformaciones por capa fina (TLC).

En la figura 6 se observa el gráfico correspondiente a los datos extraídos de la tabla 5 para el medio número 2, donde podemos ver que a medida que aumenta la producción de **(2 a)**, a partir de las 6 horas, cuando esta presenta un pick de bioconversión a las 30 horas, en este mismo momento aumenta la producción de **(2 b)**. Algo similar ocurrió con el medio número 4, donde la molécula **(2 a)** presentó un pick de producción a las 30 horas junto a **(2 b)** que disminuye al cabo de 6 horas y luego aumenta mientras que **(2 a)** desaparece, como se observa en el gráfico de la figura 7. A medida que avanzaba la reacción en ambos casos se vió un aumento en el crecimiento de la levadura.



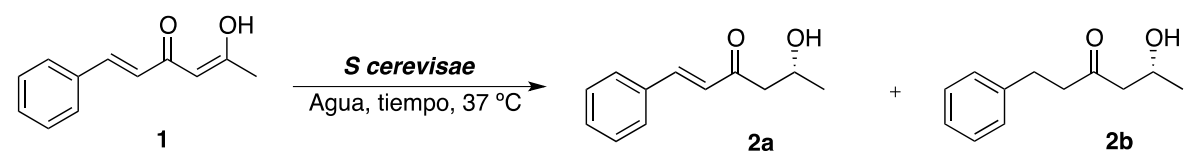
**Figura 6:** Gráfico porcentaje de conversión v/s recuento de levaduras las primeras 6 horas de reacción, posterior a las 6 horas el recuento y la muestras fueron tomadas a partir del matraz 2 cada 12 horas.



**Figura 7:** Gráfico porcentaje de conversión v/s recuento de levaduras las primeras 6 horas de reacción, posterior a las 6 horas el recuento y la muestras fueron tomadas a partir del matraz 4 cada 12 horas.

### 7.3 Biotransformación de 1,3-dicetona (1):

En la figura 5 se observa la reacción propuesta, a partir de los resultados recolectados, donde observamos que a partir de la 1,3-dicetona (1), en condiciones favorables es transformada por la levadura *S. cerevisiae* en dos productos (2 a) y (2 b), la proporción de cada uno varía según las condiciones del medio, ya que en el medio 2 aumentó la concentración de (2 a) sobre (2 b), y en el medio número 4 ocurrió lo contrario.



**Figura 8:** Estructura de las moléculas que forman parte de la reacción, donde 1 corresponde al reactante 1,3-dicetona a reducir, (2 a) y (2 b) a los productos de la biotransformación.



## 8. DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar la reducción de cetonas a alcoholes y a su vez de los grupos alquenos a alcano, decidimos estudiar la biotransformación de la "dicetona (**1**)", que posee un grupo alqueno y cetona en su estructura

En este sentido se evaluó la biotransformación de la 1,3-dicetona (*E*)-6-fenilhex-5-eno-2,4-diona (**1**), empleando *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes condiciones de biotransformación. Para esto se evaluó de forma preliminar diferentes 4 medios de reacción como se observa en la tabla 4, los cuales fueron analizados por GC-MS a fin de identificar los compuestos resultantes (**2a** y **2b**) y su porcentaje de conversión. a partir de estos elegimos los matraces 2 y 4 como base de estudio, debido a que presentaron una biotransformación más eficaz de la dicetona (**1**). En el matraz 2 el porcentaje de bioconversión fue mayor para (**2a**) (**38%**) que (**2b**) (**5%**), mientras que en el matraz 4 ocurrió lo opuesto (aumentó la biotransformación de (**2b**) (**69%**) sobre (**2 a**) (**16%**).

A partir de esto se realizó un estudio de cinética, empleando las condiciones de los matraces 2 y 4, donde se tomaron muestras cada hora en un periodo de 6 horas y posteriormente cada 12 horas. Para cada muestra se realizó un recuento en cámara de Neubauer con el fin de monitorear el crecimiento de la levadura como se observa en la tabla 5. A partir de esto se obtuvieron los gráficos que se observan en las figuras 6 y 7. En el gráfico de la figura 6 se observa que, al transcurrir 6 horas, comienza la transformación de la dicetona (**1**) en (**2 a**) y (**2 b**), la cual aumenta al cabo de 30 horas. Por otra parte, en el gráfico de la figura 7, que corresponde a la reacción donde se empleó Paladio sobre Carbono (Pd/C) como catalizador, se observó que a medida que incrementa el crecimiento de la levadura, la

producción de los compuestos **2a** y **2b** es observada posterior a las 6 horas de reacción, por consiguiente, al paso de 30 horas disminuyó la producción de **2a** y aumentó la producción de **2b**.

Para evaluar el progreso de la biotransformación de forma preliminar y cualitativamente, realizamos Cromatografía en capa fina (TLC); los resultados se observan en la figura 8, donde 1 A corresponde a los compuestos obtenidos de las biotransformaciones ocurridas en los matraces 1, 2 y 5, los cuales fueron revelados a 245 nm y se observaron dos compuestos distintos al producto los cuales al ser revelados a 365 nm como se vé en la figura 2 A, no se observan, por ende podemos decir que son moléculas diferentes al compuesto de partida (1,3-dicetona). A su vez en la figura 1 B se revelaron los compuestos de los matraces utilizados para evaluar la cinética de la reacción, donde 1 corresponde a las condiciones de agua y suspensión de levadura ajustada a 0,86 MC Farland y 2 corresponde a los productos de una reacción de Paladio sobre Carbono, en ambos observamos 2 compuestos diferentes al producto, donde aquí hay 2 con un rf mayor, los cuales están a la altura del producto, pero al revelar a 365 nm se ve que no emiten la misma luz, por lo cual estos compuestos son distintos al producto, además hay dos moléculas con un rf menor que se revelan en onda corta, por lo cual en este caso se han generado 2 compuestos diferentes, en donde se obtuvo la reducción de un grupo cetónico en un alcohol y a su vez el grupo alqueno en alcanos, como se observa en la figura 5.

*Saccharomyces cerevisiae*, es el microorganismo más ampliamente explotado y comercialmente significativo. Los investigadores consideran la levadura como un biocatalizador útil, dado que posee paredes celulares relativamente rígidas que permiten retener estructuras en presencia de diversos compuestos orgánicos. También se sabe que las cepas de *cerevisiae* producen aldo-ceto reductasas, que catalizan la reducción de grupos carbonilo (26).

Se han reportado diferentes estudios similares a este, donde se ha visto el uso de *Saccharomyces cerevisiae* en reducciones de 1,2 dicetona, como también de la reducción enantioselectiva de citral natural como se describe en el estudio realizado por Xiangxian Ying y colaboradores (2019) (24), en el cual emplearon paladio como biocatalizador “...se requiere el uso de un sistema de catalizador dual que comprenda Pd/BaSO<sub>4</sub> y 2-diarilmetilpirrolidina quiral...” (24). observaron que la reacción era más favorable, ya que aumentaba considerablemente la bioconversión, tal como ocurre en nuestro caso, el mecanismo que favorece la reacción al utilizar Paladio como catalizador aún no está bien descrito, ya que este ingresa a la célula y no se sabe bien el nivel en el que actúa para acelerar la conversión, pero la mayoría de las reducciones están dadas por NADP y NADPH, y posiblemente el paladio actúe como soporte, y la oxidoreducción se realice sobre esta superficie.

Por otra parte Muthinen y colaboradores (2016) (25), utilizó la inmovilización de células / enzimas completas y demuestra varias ventajas como la separación fácil de las células de la mezcla de reacción, el uso repetido o continuo de biocatalizadores con estabilidad mejorada y propiedades enantio-selectivas. Aquí utilizaron la levadura inmovilizada sobre perlas de alginato funcionalizadas para proporcionar una estabilidad óptima de las perlas y una gran cantidad de actividad enzimática con un potencial para proceso continuo, lo cual aceleró el proceso de la bioreducción (25).

En las biotransformaciones de células enteras (que utilizan, por ejemplo, levadura de panadería), la reducción de carbonilo es una reacción secundaria dominante que forma alcoholes primarios saturados mediante la sobre reducción del producto a alcoholes alílicos al agotar el sustrato (27).

En estudios recientes se redujeron alquenos a alcanos, de manera quimioselectiva sin reducir la cetona a alcohol, esto puede ser debido al sistema bifásico que promovió la reducción del alqueno por sobre el grupo cetónico. Este trabajo describe la biorreducción quimioselectiva de “(1 *E*, 4 *E*) -1,5-bis (4-metoxifenil) -1,4-pentadien-3-one (**1 a**) mediada por levadura de panadería (células de *Saccharomyces cerevisiae*) en un sistema bifásico solvente acuoso / orgánico. La biotransformación de este compuesto fue quimioselectiva y formó solo la cetona saturada correspondiente 1,5-bis (4-metoxifenil) -3-pentanona. La influencia de varios factores puede alterar la biorreducción de (**1 a**), tales como el tipo y el porcentaje de co-disolventes y el uso de seis diferentes *S. cerevisiae*. Estas evidencias experimentales podrían explicar la reducción que ocurrió en nuestro caso, ya que, los compuestos carbonílicos no saturado en muchos casos proporcionan una mezcla de cetonas saturada o aldehídos, alcohol saturado o alcohol alílico, lo que indica que varias enzimas pueden catalizar la reducción del doble enlace de C=C y C=O. Sin embargo, muchos estudios sobre la reducción enantioselectiva de enonas por biocatalizadores han revelado que varias enonas reductasas se pueden usar para la producción de cetonas quirales (27).

Adicionalmente, hay estudios que han demostrado el uso de otros microorganismos como bacterias para realizar biotransformaciones, pero a diferencia de ellos el uso de la levadura es mejor, ya que es de fácil obtención, aumenta la costo efectividad en el laboratorio, y además no es un microorganismo que cause daño en el ser humano.

## 9. CONCLUSIONES

La molécula (**2 a**) se obtuvo en una buena conversión (38%) después de la optimización de las condiciones experimentales utilizando bioreducción mediada por levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de la dicetona (**1**) en un sistema enzimático empleando agua como solvente. Al contrario, al utilizar Pd/C como catalizador se obtuvo una mayor conversión de la molécula (**2 b**) (69%).

Desde el punto de vista de la reacción, el uso de Paladio como biocatalizador en la biorreducción de los dobles enlaces C = C y grupos cetónicos de un compuesto dicetónico mostró ventajas considerables, ya que el producto se obtuvo con un mayor rendimiento en condiciones de reacción suaves y ecológicas.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Cabildo Miranda María P. Procesos orgánicos de bajo impacto ambiental. Química verde. 2012.
2. Pájaro Castro NP, Olivero Verbel JT. QUÍMICA VERDE: UN NUEVO RETO. Ciencia e Ingeniería Neogranadina. 2011; 21: 169-82.
3. Seoane G, Gonzalez D, Schapiro V. BIOTRANSFORMACIONES- UNA ALTERNATIVA SUSTENTABLE EN SÍNTESIS ORGÁNICA. 2004. p. 30-51.
4. Arroyo M, Acebal C, De la Mata I. Biocatálisis y biotecnología. 2014. 2014;190(768).
5. Claramunt Vallespi Rosa M. Química Bioorgánica y productos naturales, 2017.
6. Centi G, Perathoner S. Catalysis and sustainable (green) chemistry. Catalysis Today. 2003;77(4):287-97.
7. Kümmerer K. Sustainable from the very beginning: rational design of molecules by life cycle engineering as an important approach for green pharmacy and green chemistry. Green Chemistry. 2007;9(8):899-907.
8. Reyes-Cuellar Julia C. La Química Verde y la problemática de los residuos químicos de los laboratorios. Ciencia en Desarrollo. 2016:131-46.
9. Velasco B. R, Montenegro M. DL, Vélez S. JF, García P. CM, Durango R. DL. Biotransformación de compuestos aromáticos sustituidos mediante hongos filamentosos fitopatógenos de los géneros Botryodiplodia y Colletotrichum. Revista de la Sociedad Química del Perú. 2009;75:94-111.
10. Luna Héctor. Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos. México: Revista de la Sociedad Química; 2004. p. 211
11. Jaramillo S. Juan A. Biología Para el Acceso a Ciclos Formativos de Grado Superior, Prueba de acceso. Título de Bachiller, prueba libre. Primera ed: Editorial MAD; 2004.

12. Moya V. Humberto. Microbiología básica para el área de la salud y afines. Segunda ed. Colombia; 2008.
13. Ballesteros G. Paloma. Química orgánica avanzada.: UNED; 2013.
14. Nelson David. Lehninger: "Principios de Bioquímica". In: Michael C, editor. Quinta ed; 2009. p. 185-8.
15. David N. Lehninger: "Principios de Bioquímica". In: Michael C, editor. Quinta ed 2009. p. 185-8.
16. Machín C, Antonio N, Carralero G, Amarilys C, Rodríguez G. LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL. Revisión bibliográfica. *YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE AND THE PRODUCTION OF ALCOHOL. A Review* 2016. 20-29 p.
17. Hernando CL. Estudio estructural y funcional de las cinamil alcohol deshidrogenasas de *Saccharomyces cerevisiae*. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2006.
18. Verma S, Ray AK, De BK. Bioconversion of heptanal to heptanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2010;27(5):269-75.
19. Shlegel Hans G. Microbiología General. Ediciones OMEGA; 1997.
20. Martín AMD. Control del Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* En la Síntesis de Glutación. Granada: Universidad de Granada; 2005.
21. Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG, de Buitrago JMG. Bioquímica: Pearson Educación; 2002.
22. Ainza Á. Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bancora. *Revista Latinoamericana de Microbiología*; 2009. p. 58-63.
23. Pham HT, Larsson G, Enfors SO. Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: simulation and model verification. *Biotechnol Bioeng*. 1998;60(4):474-82.

24. Ying X, Yu S, Huang M, Wei R, Meng S, Cheng F, et al. Engineering the Enantioselectivity of Yeast Old Yellow Enzyme OYE2y in Asymmetric Reduction of (Molecules. 2019;24(6).
25. Muthineni N, Arnipally MS, Bojja S, Meshram HM, Srivastava AK, Adari BR. A Green approach towards the synthesis of chiral alcohols using functionalized alginate immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2016;134:233-7
26. Shin, Y., Son, K & Yoo, D.I. Fibers Polym (2019) 20:80. “Using *Saccharomyces cerevisiae* Strains as Biocatalyst for Indigo Reduction”.
27. Winkler CK, Tasnádi G, Clay D, Hall M, Faber K. Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds. J Biotechnol. 2012;162(4):381-9.
28. Pabon, H. A synthesis of curcumin and related compounds. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 1964, 83, 379-386
29. Doria Serrano MdC. Química verde: un nuevo enfoque para el cuidado del medio ambiente. Educación química. 2009;20:412-20.



