

Cap. 3

Biocatálisis y biotransformaciones I (2000-2012): Una alternativa eco- sustentable en química fina en Ecuador



Bio catalysis and biotransformation I (2000- 2012): An eco-sustainable alternative in fine chemistry in Ecuador

 <http://doi.org/10.5281/zenodo.5908386>

Joseph Cruel Sigüenza

Universidad Técnica de Esmeraldas "Luis Vargas Torres"

joseph.cruel@utelvt.edu.ec

 <https://orcid.org/0000-0002-3949-0049>

Elizabeth Canchingre

Universidad Técnica de Esmeraldas "Luis Vargas Torres"

elizabeth.canchingre@utelvt.edu.ec

 <https://orcid.org/0000-0002-5575-9327>

Carla Bernal Villavicencio

Universidad Técnica de Esmeraldas "Luis Vargas Torres"

carla.bernal@utelvt.edu.ec

 <https://orcid.org/0000-0002-1510-2996>

Juan Enrique Tacoronte Morales

Universidad Técnica de Esmeraldas "Luis Vargas Torres"

juan.tacoronte.morales@utelvt.edu.ec

 <https://orcid.org/0000-0001-7325-7788>

Indexado en:



Recibido: 30 de mayo de 2021

Aceptado: 17 de noviembre de 2021

Publicado: 15 de diciembre de 2021

Código JEL: L65, O30, O31, O32, O33, O39

Resumen

En este estudio se desarrolló una búsqueda bibliográfica básica que abarca unos 15 años, desde el 2000 hasta 2015 sobre algunos aspectos conceptuales y metodológicos relacionados con procesos de biocatálisis y biotransformaciones, desde la perspectiva de química eco-sustentable o química verde. Se consideran los principios básicos de la química sustentable y su aplicabilidad en el campo de la quimio-catálisis, biocatálisis y de implementación de sistemas biocatalíticos (enzimas, células completas, sistemas soportados), así como ventajas y desventajas de la utilización de los diversos sistemas biocatalíticos en la química fina. Se destacan conceptos fundamentales y algunas aplicaciones, hoy clásicas y con relevante significación conceptual y metodológica de las biotransformaciones, incluyendo una visión estructural-funcional de mínimo impacto ambiental. Se analiza la aplicabilidad de la biocatálisis en la química fina y otros procesos tecnológicos tales como desulfurización, biooxidación avanzada, etc., y en el desarrollo de estrategias para el fortalecimiento de esta línea de investigación, en Biotransformaciones, a escala nacional y en laboratorios universitarios.

Descriptor en ciencias de la salud: Tecnología química verde, Catálisis, Biocatálisis.

Para citar este capítulo utilice el siguiente formato:

Cruel, J., Canchingre, E., Bernal, C., y Tacoronte, J. (2021, diciembre). Biocatálisis y biotransformaciones I (2000-2012): Una alternativa eco-sustentable en química fina en Ecuador. En P. Navarrete (Ed.), *Un Espacio Para la Ciencia*, 4(1), 38-85. ManglarEditores. <http://doi.org/10.5281/zenodo.5908386>

Abstract

In this study, a basic bibliographic search was developed that covers about 15 years, from 2000 to 2015 on some conceptual and methodological aspects related to bio catalysis and biotransformation processes, from the perspective of eco-sustainable chemistry or green chemistry. The basic principles of sustainable chemistry and their applicability in the field of chemo-catalysis, bio catalysis and the implementation of biocatalytic systems (enzymes, whole cells, supported systems) are considered, as well as advantages and disadvantages of the use of the various systems. biocatalysts in fine chemistry. Fundamental concepts and some applications, now classic and with relevant conceptual and methodological significance, of biotransformation are highlighted, including a structural-functional vision of minimal environmental impact. The applicability of bio catalysis in fine chemistry and other technological processes such as desulfurization, advanced bio-oxidation, etc., and in the development of strategies to strengthen this line of research, in Biotransformation, on a national scale and in university laboratories is analyzed.

DeCS: Green Chemistry Techology, Catalysis, Biocatalysis.

40

To cite this chapter use the following format:

Cruel, J., Canchingre, E., Bernal, C., & Tacoronte, J. (2021, December). Bio catalysis and biotransformation I (2000-2012): An eco-sustainable alternative in fine chemistry in Ecuador. In P. Navarrete (Ed.), *Un Espacio Para la Ciencia*, 4(1), 38-85. ManglarEditores. <http://doi.org/10.5281/zenodo.5908386>

Introducción

El crecimiento sostenido, casi exponencial, de la capacidad destructiva, con relación al medio ambiente, tanto a escala local como global, de las actividades industriales-tecnológicas del *Homo sapiens* en los últimos 250 años, y específicamente desde finales del siglo XX y primera década del siglo XXI ha generado una seria polémica y cambios en los paradigmas conceptuales-metodológicos y en las percepciones de sostenibilidad de la química como recurso, gestor de desarrollo y base de bienestar, intensificándose la preocupación por el cuidado del medio ambiente y el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible y de Horizon 2030. En este contexto, desde 1980, han surgido diferentes propuestas, proyectos e iniciativas, desde posiciones de la sustentabilidad, para la protección y conservación ambiental sobre la fundamentación de una nueva filosofía de la química aplicada. Una de ellas es la llamada Química verde o Química sostenible o eco-sustentable, definida *grosso modo* como el diseño, desarrollo e implementación de productos químicos o procesos para reducir (y/o eliminar) la generación y uso de sustancias peligrosas, a cualquier escala tecnológica, con marcada funcionalidad molecular y control básico de la contaminación ya que cualquier modificación estructural o ingenieril-tecnológica es operacional, funcional y energéticamente viable y escalable (Environmental Protection Agency, 1999).

Para alcanzar sus objetivos, la Química Sustentable considera en los procesos químicos una serie de conceptos significativos, tales como: la aplicación integral de métodos catalíticos (heterogéneos, homogéneos, transferencia de fases, enzimáticos-biocatalíticos, y no convencionales -fase sólida, materiales dopados, microondas-ultrasonido, etc.), utilización de materias primas, insumos, y reactivos renovables, reducción en la generación de desechos y de volúmenes críticos de residuales y su aprovechamiento máximo, eficiencia energética, reducción del uso de disolventes no benignos, economía atómica y eficiencia analítica, uso de reactivos no tóxicos y de reacciones más seguras con mínimo número de operaciones

sintéticas (óptima ingeniería de reacciones), etc., de manera general, la comprensión de la química verde como un proceso o paradigma de reducción ecológicamente racional se destacan en las Figuras 1 y 2.

En esta valoración se tratará el tema de la catálisis, en particular de la Biocatálisis y su aplicación a la química, y petroquímica, en general y la generación de productos AVA (con alto valor agregado) con significación en esta industria y sus relacionadas. Las reacciones catalíticas (tanto en fase hetero-, como homogénea) son fundamentales para alcanzar los objetivos de la Química Sustentable o Química Verde, incluyendo la formación didáctico-educativa de un cuadro químico del mundo donde la perspectiva ecológica sea un punto básico para minimizar la contaminación ambiental actual; y debe destacarse que, mediante la Biocatálisis y Biotransformaciones selectivas se pueden reducir los requerimientos energéticos de los procesos químicos en las industrias petro-, agro- y fármaco-químicas, disminuir o eliminar los costos de separación-purificación de productos e intermediarios avanzados, utilizar materias primas renovables, reducir las cantidades de reactivos tóxicos y de desechos, así como optimizar el uso de facilidades tecnológicas auxiliares, etc.

La filosofía de análisis en nuestro trabajo, y para comprender el alcance y significación de la Biocatálisis como *estrategia ecológicamente inteligente* para implementar en el sector energético, agroquímico y/o químico-farmacéutico en la próxima década se fundamenta en la serie conceptual que se muestra en la ecuación 1.

Puede resumirse, de manera general, que los principales temas de interés en química sustentable (o *sostenible*) son el diseño de reacciones y procesos ecológicamente más seguros; aplicación de sistemas catalíticos, utilización de recursos y materias primas renovables, minimización de desechos y volúmenes críticos de residuales orientada a la inclusión de estos en ciclos cerrados en calidad de nuevas materias primas *ava*, el incremento de la eficiencia energética, minimizar al máximo el uso de disolventes

Donde:

- La estructura (tanto de sistemas catalíticos complejos multicomponentes órgano-inorgánicos, biológicos, células enteras o sus fragmentos) genera propiedades, y estas una aplicabilidad y una funcionalidad específicas en condiciones sustentables con posibilidad de implementarse flexiblemente en diferentes procesos y escalas (**EPAF**)
- La *sostenibilidad-sustentabilidad, escalabilidad y aplicación* tanto de productos como de procesos debe constituir el basamento de implementación tecnológica de la Biocatálisis en los campos de la actividad químico-industrial actual que permita una interacción transversal de procesos de alta flexibilidad para procesos estructuralmente relacionados tales como oxidación, epoxidación, acilaciones, esterificación, hidroxilación, acetoxilación, amidación, desulfuración, desnitrógenación, que permita minimizar toda percepción mega-estructural y/o generadora de volúmenes o cargas muertas no productivas y altamente contaminantes (**SSEA**).
- Toda aplicación de la biocatálisis, biotransformaciones y quimio-catálisis asociadas, debe caracterizarse por una *máxima eficiencia atómica* de los procesos, una *máxima eficiencia analítica* para control *on line – all in house* conjuntamente con una *máxima eficiencia ambiental* y mínimo impacto ecológico, que permita una estrategia multidisciplinaria y participativa para la solución de problemas durante la implementación de secuencias de procesos y de control de calidad *in situ* y *ex situ* (**MEA**)³.
- Y debe sustentarse en una aplicación consecuente, coherente y sistémica de la *Eficiencia, Efectividad y Eficacia* como parámetros de calidad de procesos y servicios, íntimamente relacionadas con la capacidad de *Reciclar, Reutilizar y Regenerar*, incluyendo la obligatoria capacidad educativa-formativa en aras de la sustentabilidad consciente: *Ciencia-Conciencia-Corazón*.

no benignos, incrementar la económica atómica del proceso, y el empleo de reactivos no tóxicos o con mínimo impacto ambiental, todo esto válido, por supuesto, en el campo de la petroquímica, química sintética pesada, agroquímica y química farmacéutica industrial.

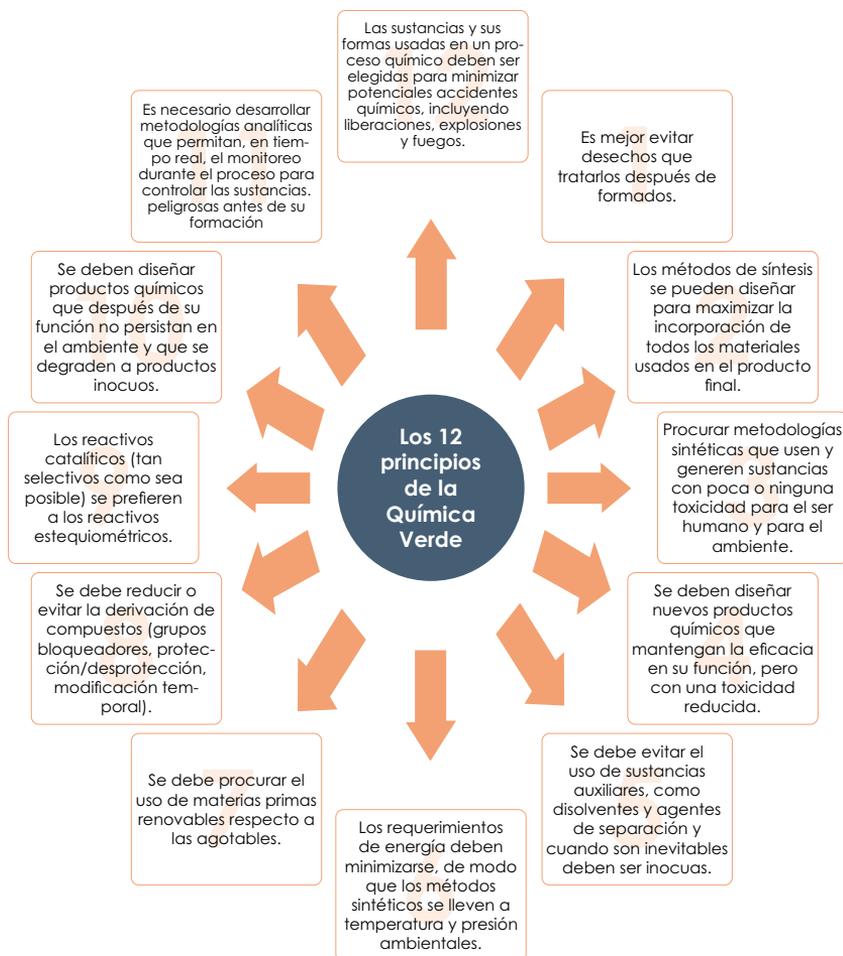
Procesos catalíticos y química sustentable

Biocatálisis y quimio-catálisis

Una clasificación general de los métodos catalíticos los agrupa, según la naturaleza y estructuralidad de los catalizadores, en biocatálisis y la quimio-catálisis, según que los catalizadores sean

Figura 1

Los 12 Principios de la Química Verde



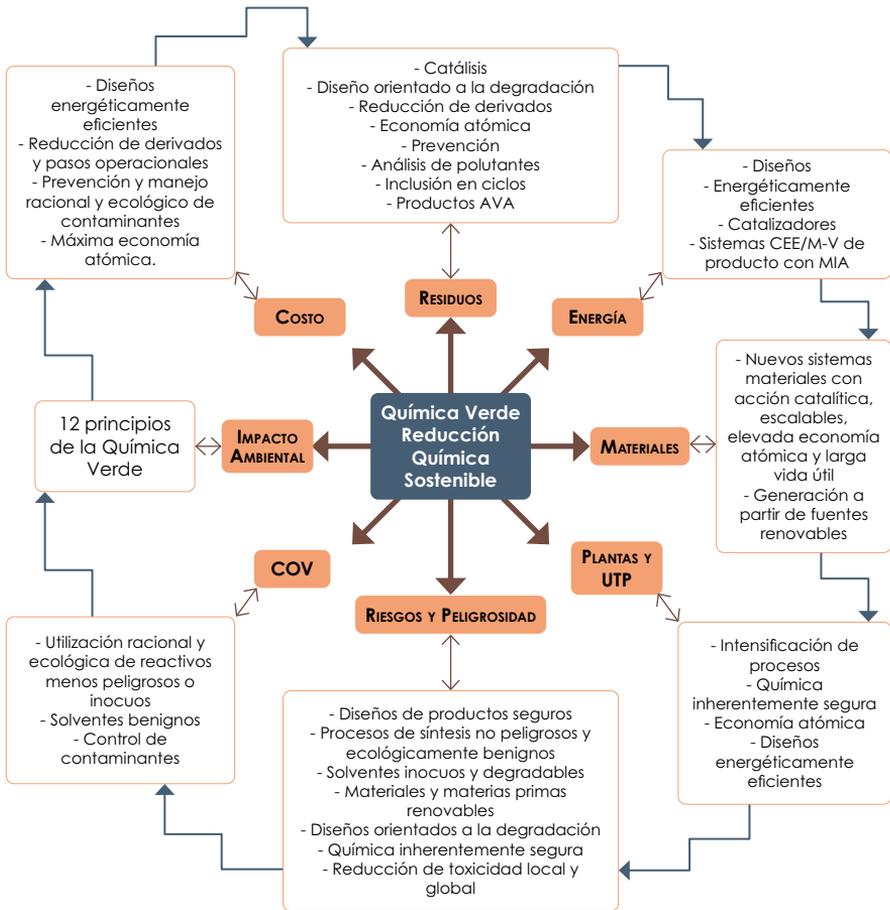
Nota: Basado en Sierra et al., 2014, con modificaciones por los autores (julio, 2021).

de origen biológico (*enzimáticos*), órgano-inorgánicos, o mixtos (*híbridos*).

Los métodos catalíticos se utilizan, extensa e intensivamente, tanto a escala de laboratorio (100 mg-500 g,) planta piloto (hasta 5-10 Kg/batch) como a nivel industrial (>1000 Kg/batch), pero su proporción de aplicación y generalización relativa es muy diferente. Aunque a escala industrial la biocatálisis se ha convertido en una estrategia y herramienta importante en la producción de productos químicos, intermediarios y derivados, tanto a nivel de micro-

Figura 2

Concepción de la Química Sostenible como estrategia de aplicación a la industria química.



producciones ava como producciones masivas, tratamiento de derivados petroquímicos, farmacéuticos y agroquímicos, el número y la diversidad de las aplicaciones biocatalíticas todavía es limitado; situación atribuible a ciertas limitaciones de la biocatálisis, que incluyen: baja estabilidad de los catalizadores, su elevado costo de adquisición comercial y la restricción molecular asociada al tipo y especificidad de sustratos posibles a modificar. Esta percepción genera desinterés en valorar la capacidad del potencial de la biocatálisis en una amplia gama de procesos, reacciones o sus

respectivos escalados. Sin embargo, la mayoría de estas percepciones son injustificadas. Por ejemplo, los biocatalizadores, en sus diferentes variaciones estructurales, o composicionales, son estables en condiciones moderadas de temperatura (incluso algunos toleran temperaturas superiores a 100°C y más de una atm en dependencia del origen extremófilo o barófilo del organismo) y soportan tanto disolventes acuosos, orgánicos, líquidos iónicos, fluidos supercríticos, perfluorocarbonos, o mezclas de estos (mejor que muchos reactivos químicos); existen catalizadores comercialmente asequibles y otros que son costosos, dependiendo de la pureza del catalizador y del protocolo de purificación, tipo de proceso y su capacidad de reutilización, y en ocasiones se pueden emplear preparados baratos de pureza intermedia; los sistemas biocatalíticos, en condiciones y tiempo reales pueden ser poli-funcionales y poli-específicos (*promiscuidad catalítica* funcional efectiva) aceptando una gran variedad de tipos estructurales de sustratos naturales, no naturales, sintéticos y semisintéticos, transformándolos con alta especificidad, estereoselectividad y rendimientos satisfactorios. Por ejemplo, desde una perspectiva comercial, los precios oscilan entre \$100,000. kg⁻¹ para una enzima de diagnóstico médico (láctico-deshidrogenasa) hasta \$100. kg⁻¹ para las preparaciones crudas de amilasas. Para las enzimas más útiles en Biotransformaciones, los precios oscilan entre \$500 hasta \$20,000. kg⁻¹, dependiendo de la pureza y procedimiento. No obstante, no debe considerarse tanto el precio en sí cuanto su contribución al precio final del producto: por ejemplo: Transaminasa (\$20-30. kg⁻¹) para la producción de p-fluoro-L-fenilamina (\$500. kg⁻¹). El costo final de la penicilina acilasa en la producción de Penicilina G es de aproximadamente \$1. kg⁻¹. El costo final de la aspartasa en la producción de ácido L-aspartico es menor de aproximadamente \$0.1. kg⁻¹.

Debe considerarse, además, que los avances alcanzados en el campo de la bioingeniería, metabolómica, proteómica, genómica, biología molecular, clonación-recombinación de operones, así como los adelantos actuales de nanoquímica y nano-biomateriales, y la conjugación de nuevos grupos funcionales (acilación, sililación, pegilación, etc.) en los sitios reactivos de los residuos aminoácidos

de las proteínas, con propiedades únicas y potencialmente escalables, permitirán el diseño y generación de biocatalizadores y sistemas biocatalíticos con mayor resistencia a la temperatura, presión, atmósferas de composición variable, condiciones extremas redox, variaciones de pH del medio de reacción, inertes a disolventes orgánicos y con una mayor selectividad, así como cierto grado de promiscuidad catalítica efectiva, etc. Teniendo esto en consideración, se espera, en los próximos años (2022-2030) un cambio de paradigmas en la filosofía operativa de los investigadores y tecnólogos sobre las capacidades, aplicación, significación y limitaciones de la biocatálisis y de sus variantes bio-químico-catalíticas. De esta forma, tanto la biocatálisis, como transformación química regioselectiva y estereoespecífica que es catalizada por sistemas biológicos como la catálisis química, tendrá el mismo nivel de atención en química fina preparativa, industrial, química ambiental y en programas de estudios relacionados con la química verde aplicada a procesos biotecnológicos.

Biocatálisis

La biocatálisis (Schmid et al., 2001) se diferencia de la quimio-catálisis en el uso de biocatalizadores. Un biocatalizador es una enzima (o grupo de ellas en cascada o en red) que se puede usar en forma pura, parcialmente purificada o dentro de un sistema enzimático en una célula entera o microorganismo. Las enzimas y los sistemas enzimáticos son catalizadores biológicos de estructura proteínica (generalmente 100-400 unidades de aminoácidos, aunque existen verdaderos monstruos moleculares $> 2 \times 10^6$ Daltons como algunas proteínas de toxinas de reptiles) que evolucionaron en condiciones heterogéneas, en una zona espacial interfásica en la naturaleza con el fin de acelerar los procesos metabólicos. Como todo catalizador, modifican la velocidad para alcanzar el equilibrio, pero no cambian las coordenadas del mismo. El incremento de la velocidad de la reacción, o proceso, se logra minimizando la energía de activación del proceso global. El sustrato, en presencia de la enzima o complejo enzimático, forma un complejo sustrato-enzima que luego evoluciona a producto y

enzima con una energía de activación (ΔG^*_{cat}) menor que la de la reacción no catalizada (ΔG^*_{no-cat}). La magnitud del efecto catalítico está directamente relacionada, por supuesto, a la diferencia de estas energías de activación y depende de la secuencia real de aminoácidos que luego determinan la estructura tridimensional del sistema biocatalítico y la orientación espacial y conformacional de los centros catalíticamente activos.

Sus inicios se remontan a descripciones homéricas y bíblicas (manufactura de quesos de cabras) pero, en 1875, en Copenhague, Christian Hansen crea una compañía para la preparación industrialmente del queso usando una mezcla enzimática estandarizada llamada *RENNET*, que es una mezcla de *quimosina* (o *renina*) y *pepsina*. En 1913, Otto Röhm (fundador de Röhm and Haas) patentó un detergente con tripsina. En los años 30 se empezaron a usar pectinasas en las industrias de zumos y el primer proceso realmente industrial, en 1955 con la comercialización de glucoamilasa.

Se usan a concentraciones del 0.001 al 0.0001 Tradicionalmente se asocia el comienzo de la biocatálisis y las biotransformaciones con los trabajos de Zaks y Klibanov (1984, 1985) y Klibanov (1983) a mediados de los años 80, donde se demostraba que ciertas enzimas (lipasas) podían trabajar de manera eficiente en disolventes orgánicos inmiscibles con el agua.

Ventajas y desventajas de los biocatalizadores

Lo sistemas enzimáticos, o biocatalizadores, como resultado de una larga evolución y selección químicas en espacios altamente constreñidos, muestran una gran eficiencia y selectividad. Las ventajas funcionales de su uso como catalizadores se pueden resumir de la manera siguiente:

- Son muy eficientes. Comparada con la reacción no catalizada, el incremento de la velocidad es del orden de 10^8 a 10^{10} , mucho mayor que cualquier catalizador químico convencional en igualdad de condiciones.

- Actúan, generalmente, en condiciones suaves de temperatura (20- 40 °C) en un intervalo de pH entre 5 y 8, minimizándose reacciones secundarias que disminuyan el rendimiento del producto deseado.
- Son benignos desde el punto de vista ambiental, al ser completamente degradables dada su estructura polipeptídica, manifestando baja toxicidad.
- Las enzimas y complejos enzimáticos pueden catalizar un amplio espectro de reacciones orgánicas, mostrando una amplia tolerancia hacia diferentes tipos estructurales de sustrato (solamente para algunas cicloadiciones no existen biocatalizadores enzimáticos).
- Son altamente selectivas en mezclas complejas, sin producir reacciones secundarias. Por ejemplo, con lipasas se puede realizar la hidrólisis de ésteres sin afectar a los grupos funcionales acetales, que son más sensibles químicamente en el rango de parámetros de trabajo.
- Muestran una alta quimio-, regio- y enantio-selectividad, propiedades altamente valoradas en las enzimas y biocatalizadores, ya que, al ser catalizadores quirales, pueden reconocer cualquier tipo de quiralidad o proquiralidad presente en el sustrato una vez que se formó el complejo sustrato-enzima.
- Son reciclables. Cuando se usan en forma liofilizada y las reacciones o procesos se desarrollan en medios orgánicos, los biocatalizadores son insolubles en el medio de reacción, recuperándose por filtración y reutilizables en otros ciclos catalíticos, de manera similar se opera con los biocatalizadores o enzimas inmovilizados sobre soportes insolubles en el medio reaccionante o en lechos (fijos) de reactores, incrementándose estabilidad y actividad de estos sistemas, lo que facilita la direccionalidad funcional durante el diseño de biocatalizadores, frente a los catalizadores químicos (0.1-1%).

La flexibilidad metabólica típica para los sistemas enzimáticos

(biocatalíticos) de los microorganismos (capacidad de producir enzimas diferentes para toda clase de reacciones), su interrelación a escala de microorganismo y su capacidad para actuar simultáneamente sin generar interferencias entre ellas, potencian su capacidad de uso en diferentes procesos.

Estas características permiten considerar que la Biocatálisis (y los procesos biocatalíticos) es menos riesgosa, más productivamente selectiva, consume menos carga energética y genera menos carga contaminante al medio ambiente (Faber, 2000).

Pero también presentan algunas desventajas que limitan la extensión de su aplicación: tienen una limitada estabilidad operacional ya que desarrollan su máxima actividad en sistemas acuosos con limitada actividad catalítica en otros sistemas de solventes, los biocatalizadores o sistemas enzimáticos durante los procesos biotecnológicos se pueden desactivar o sufrir fenómenos de inhibición y solamente están disponibles en una forma enantiomérica. Debido a su alta selectividad, se requieren muchos y estructuralmente diversos catalizadores para cubrir la gran diversidad de reacciones orgánicas, constituyendo esto un serio factor limitante en la disponibilidad de los biocatalizadores.

Procesos biocatalíticos

Los procesos biocatalíticos se pueden diferenciar, *grosso modo*, en biotransformaciones (el precursor se transforma en el producto *ava* enantiopuro o se modifican grupos funcionales proquirales), y fermentaciones (utilización de fuentes de carbono natural para la síntesis *ad novo* del producto). Las fermentaciones se usan comúnmente para la transformación mediante varias etapas biosintéticas de las fuentes de carbono renovables y la generación compuestos *biológicamente activos secundarios* representativos de ciclos metabólicos tales como alcoholes y derivados, esteroides, ácidos grasos, cetonas, vitaminas, antibióticos o aminoácidos. Las biotransformaciones emplean una estrategia diferente: el compuesto precursor puede ser natural o xenobiótico (sustrato no natural) y es convertido en el producto deseado usando el

potencial enzimático del microorganismo a través de uno (o unos pocos) pasos bioquímicos (Straathof et al., 2002).

Sistemas biocatalíticos

En biocatálisis, la diversidad estructural del estado físico del catalizador que se emplea en el proceso biotecnológico permite, condicionalmente, dividir los sistemas biocatalíticos en enzimas aisladas y células enteras. Las enzimas aisladas no requieren facilidades auxiliares especiales (fermentadores, bioreactores) y, al estar solamente una enzima presente, la posibilidad de reacciones secundarias es limitada, alcanzándose una mayor productividad debido a la mayor tolerancia a la concentración en un medio sin células. Si no se dispone comercial o tecnológicamente de la enzima, es más práctico usar células enteras (con sus cofactores metabólicos biogenerados *in situ*). Los sistemas de células enteras se pueden subdividir en tres tipos: células en crecimiento, inmovilizadas, y células en reposo (*resting cells*). Las células en crecimiento se caracterizan por poseer mayor actividad enzimática y generar más reacciones secundarias, siendo el aislamiento de los productos más laborioso y extenso en tiempo; siendo preferible la utilización de células en reposo. Las células en crecimiento se deben usar si el sustrato induce continuamente la enzima que cataliza la reacción o las enzimas necesarias para la regeneración de cofactores. La elección entre una enzima aislada o células enteras (microorganismos) para un proceso de biocatálisis depende de las características y objetivos del proceso o reacción a escalar o implementar. Estas particularidades se detallan, en la Tabla 1.

Biocatálisis y Química sustentable. Importancia

Los procedimientos biocatalíticos y las ventajas de los sistemas biocatalíticos son esenciales para alcanzar los objetivos de la química sustentable en los próximos 5-10 años. En este sentido su alta selectividad (químio-, regio, y estereoselectividad) permite reducir los volúmenes críticos de efluentes y su composición, modificar los contaminantes o fracciones específicas de estos y disminuir o eliminar los costos de separación de productos, sus condiciones



Tabla 1

Comparación entre los sistemas de células enteras y enzimas aisladas

Sistema biocatalítico	Ventajas operacionales	Desventajas operacionales	Ejemplos de procesos
Enzimas aisladas	Equipamiento y operación simples. Mejor productividad (mayor tolerancia a la concentración).	Los costos de aislamiento son caros y es menor la estabilidad. Puede ser necesario agregar cofactores (se requiere su reciclado). Parámetros operacionales estrechos.	Proteasas, hidrolasas y lipasas en la hidrólisis de proteínas y triglicéridos. Industria de detergentes y jabones. Celulasas para degradación de fibras de celulosa (telas y Stonewashed). Oxidoreductasas en la industria panadera. Lactasa en la industria de derivados lácteos y degradación de lactosa.
Células enteras	Menos costoso, ya tienen los cofactores. Mayor estabilidad de los sistemas biocatalíticos enzimáticos (más de 120 días). Se pueden realizar en presencia de solventes orgánicos (suspensión en sistemas bifásicos agua-solvente no polar).	Equipo especial complejo (fermentador). Work-up tedioso. Las reacciones secundarias pueden interferir. Menor tolerancia a la concentración y efecto de los disolventes. Necesitan nutrientes para crecimiento.	Ampliamente utilizadas en procesos de reducción (uso de reductasas celulares). Reducción quimioselectiva y estereoselectiva de -cetoesteres (estereoisomero S>>) en presencia del dimórfico <i>Mucor rouxii</i> . Hidrólisis de grupos ester en núcleos esteroidales 5-en- acetoxi-3,16,17 sustituidos con lipasas de <i>Candida antarctica</i> y <i>Candida rugosa</i> .

Nota: Basado en Liese et al., 2006, con modificaciones por los autores (julio, 2021).

suaves de operación en disolventes acuosos y bifásicos de diferente polaridad media no tóxicos permiten reducir los requerimientos de energía de los procesos químicos, su gran eficiencia ayuda a reducir las cantidades de reactivos tóxicos y operaciones, y además permiten la utilización de materias primas renovables.

De manera general en la Tabla 2 se detallan aspectos relevantes de la biocatálisis relacionados con la química sustentable.

El ciclo de la biocatálisis aplicada y biotransformaciones

La obtención, producción o modificación por medios biocatalíticos de un producto de interés, o una fracción de

Tabla 2

Aspectos relevantes de la biocatálisis relacionados con la química sustentable o química verde.

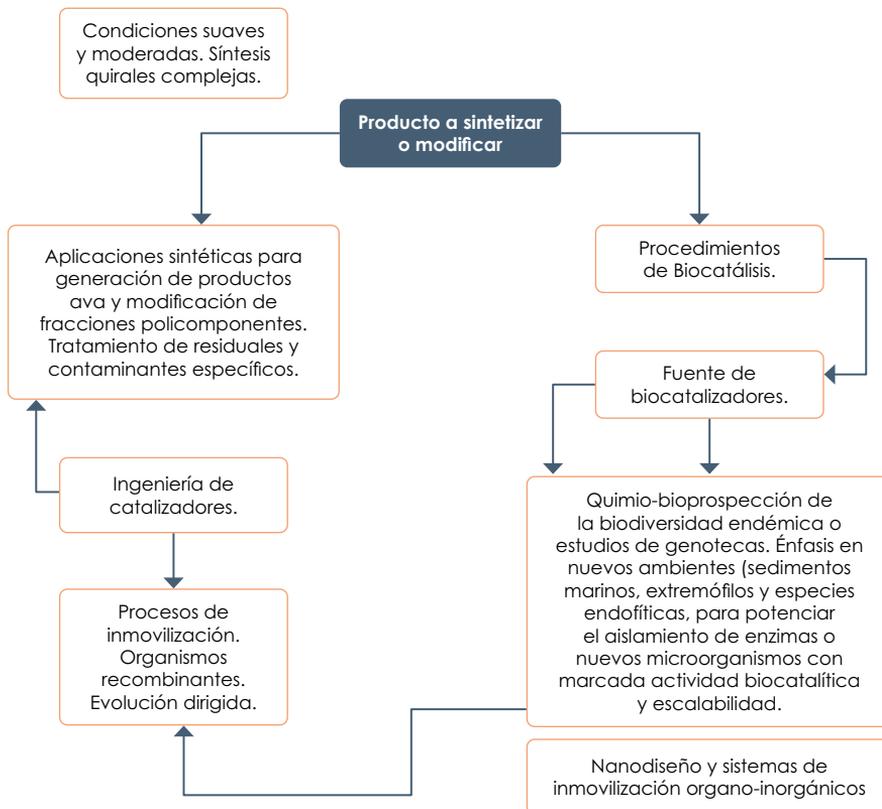
Propiedades	Relevancia para la química sustentable o química verde
Reacciones rápidas debido a la correcta orientación espacial del catalizador.	Procesos de tamizado rápido y generación de quimiotecas aplicables y escalables.
La orientación de los sitios activos permite una elevada estereo-especificidad.	Posibilidades de desarrollar procesos de síntesis quiral y asimétrica en medios acuosos y/o bifásicos.
Elevado grado de especificidad por el sustrato debido a la limitada flexibilidad conformacional del sitio activo.	Alto grado de selectividad.
Solubilidad en agua y en sistemas bifásico de polaridad intermedia.	Oportunidad para diseñar e implementar procesos y reacciones en fase acuosa.
Origen biológico (natural).	Catalizadores no tóxicos, de bajo riesgo ambiental
Operaciones naturales bajo condiciones fisiológicas.	Reacciones y procesos energéticamente eficientes bajo condiciones moderadas de pH, temperatura, presión.
Posibilidades de reacciones y procesos tándem cuando se utilizan organismos completos.	Posibilidades de desarrollar y escalar reacciones y procesos secuenciales en un solo volumen o paso.

componentes, constituyen procesos multietapas que forman un ciclo de biocatálisis (Figura 3). Primeramente, se establecen las reacciones enzimáticas y biocatalizadores involucrados. Posteriormente se determina la disponibilidad y efectividad del catalizador, ya sean enzimas o células enteras. Paralelamente, se valoran alternativas de biocatalizadores mediante el aislamiento-purificación de enzimas o nuevas cepas de microorganismos. Una vez obtenido el catalizador se valora su posible optimización vía *molecular docking* e ingeniería genética, para aumentar su estabilidad, selectividad y/o eficiencia. Finalmente se desarrollan las aplicaciones sintéticas y de campo para preparar el compuesto de interés o tratar fracciones policomponentes. De manera general esta secuencia metodológica se detalla a continuación.

Existen aproximadamente unas 25000 enzimas en la naturaleza y sólo unas 3000 han sido estudiadas y reconocidas por la IUB (*International Union of Biochemistry*); de las cuales solo el 10% está disponible comercialmente, constituyendo esto un desafío conceptual y metodológico real para la aplicación de estos

Figura 3

Clases de enzimas y su utilidad en la academia y la industria



Nota: Basado en Arroyo et al., 2014, con modificaciones por los autores (julio, 2021).

sistemas a diferentes ramas de la química. De acuerdo al tipo de reacción que catalizan, las enzimas se clasifican en seis categorías: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. La importancia de los usos sintéticos no está distribuida en forma homogénea entre las distintas clases, (ver Tabla 3), siendo predominantes las enzimas hidrolíticas en la industria, principalmente debido a su uso en detergentes, alimentos y especialmente productos farmacéuticos y procesamiento de materias primas renovables y biomasa.

Fuentes de biocatalizadores

Poseer un arsenal funcional de biocatalizadores adecuados implica la evaluación de gran cantidad de organismos (plantas,

Tabla 3

Clases de enzimas y su utilidad en la academia y la industria.

Clase de enzimas (biocatalizadores)	Tipo de reacción	Cantidad ¹	Usos [*]	Usos ^{**}
Oxidoreductasas	Oxidación-reducción y peroxidación, oxidaciones selectivas de alcoholes, grupos amino y derivados de azufre, procesos de deshidrogenación de alcanos funcionalizados hasta alquenos e hidroxilación oxidativa de substratos aromáticos. Deshidrogenasas, oxigenasas y oxidasas.	90	25%	30%
Transferasas	Transferencia intra- e intermolecular de grupos funcionales, procesos de transmetilación y transaminación. Transaminasas.	90	5%	14%
Hidrolasas	Hidrólisis-formación de derivados de ácidos. Hidrólisis de glucósidos, ésteres, anhídridos y amidas. Resoluciones quirales y liberación de azúcares. Lipasas, esterasas, acilasas, proteasas, fosfolipasas, glicosidasas.	150	65%	55%
Liasas	Adición – eliminación de moléculas pequeñas en C-sp ² y procesos de descarboxilación y des-aminación, remoción de grupos CN, deshidrataciones, condensaciones aldólicas. Aldolasas, fumarasas.	35	5%	15%
Isomerasas	Isomerización (racemización), incluyendo procesos cis/trans y E/Z y otros procesos de modificaciones geométricas y estructurales, procesos de inversión de monosacáridos. Fosfoglucosa isomerasa.	6	1%	7%
Ligasas	Formación – ruptura de C- sp ³ en procesos de condensación. Piruvato carboxilasa.	5	1%	3%

Nota: (1) número de enzimas disponibles comercialmente en 1990; (*) porcentaje de lo publicado en revistas científicas durante 1987-99; (**) porcentaje de las aplicaciones industriales en 2002-2008.

Basado en Castellanos et al., 2006, con modificaciones por los autores (julio, 2021).

animales o microorganismos), o enzimas, que puedan desarrollar el proceso biocatalítico o la biotransformación deseada. La principal fuente de enzimas son los microorganismos, desde *Archaea* hasta hongos, debido a que pueden cultivarse en forma simple y reproducible mediante procesos fáciles de escalar y han sido aislados con frecuencia de ambientes extremos (extremófilos, de tal forma que sean más resistentes a condiciones variables de aplicación y escalado), y en menor proporción las células animales (deshidrogenasas, esterases y quinasas de hígado o músculo esquelético de vacas y cerdos) y de plantas (papaína del látex de *Carica papaya*, peroxidasa de rábano picante, ascorbato oxidasa de *Papaver sp.*, o ureasa de harina de *Phaseolus*). La explotación o quimio-bioprospección de la biodiversidad autóctona es una herramienta muy importante en la búsqueda y expansión de nuevos biocatalizadores más selectivos y más eficientes, tanto a nivel funcional como genético, para usos industriales, control medioambiental y docente-investigativos.

Deben destacarse tres líneas actuales en este campo de la búsqueda mediante la quimio-bioprospección, de nuevos biocatalizadores: *microorganismos endofíticos* que habitan en especies botánicas típicas endémicas o de reducida distribución ecogeográfica, para hábitats desérticos o costeros capaces de desarrollar procesos metabólicos en sistemas bifásicos multicomponentes; *microorganismos extremófilos* que habitan en entornos ecológicos con temperatura, pH, presión, salinidad, fuerza iónica, concentración de gases y xenobióticos extremos. En este grupo existen ejemplos espectaculares como *Pyrolobus fumarii* con capacidad de crecimiento a temperaturas superiores a 105 °C y *Thermus aquaticus* localizado en los geiseres del parque Yellowstone en Wyoming, USA, donde una de sus enzimas, la polimerasa *taq* constituye la base de la técnica PCR en biología molecular; y *microorganismos marinos* que habitan en sedimentos bentos y abisales, o como simbioses intra- y extracelulares cuya biodiversidad ha generado el concepto de hiperbiocatalizadores o extremoenzimas para procesos industriales y farmacéuticos que requieren parámetros tecnológicos donde las enzimas mesófilas u

organismos mesófilos son no funcionales y/o se inactivan. En este campo un ejemplo clásico es la bacteria marina Gram-negativa *Marinomonas mediterranea* y especies del género *Thermotoga* sp con glicosidasas hipertermoresistentes

Ingeniería de biocatalizadores

Esta etapa incluye distintos procesos orientados a la optimización del desempeño de los biocatalizadores, desde mejoras en su diseño y formulación, incluyendo la inmovilización, hasta técnicas de ingeniería genética como la sobre-expresión, la producción de organismos recombinantes o la evolución dirigida.

- *Inmovilización de biocatalizadores.* En el caso de las enzimas (biocatálisis) pueden usarse de varias maneras: pueden ser de tipo salvaje, recombinadas, o genéticamente modificadas para incrementar su actividad o especificidad. Alternativamente, las enzimas pueden estar en solución, en condiciones de proceso continuo, en un reactor de membrana, como suspensión, *cross-linked* o inmovilizadas (Brena y Batista-Viera, 2006). El medio de reacción puede ser acuoso, orgánico o en dos fases. Los biocatalizadores inmovilizados (tanto enzimas como células enteras) se caracterizan por su restringida movilidad espacial y constreñimiento de los grados de libertad. La inmovilización se lleva a cabo mediante la unión del catalizador a un soporte sólido de naturaleza polimérica, inorgánica o mixta (Ogawa, 1999). La principal ventaja de esta técnica consiste en la obtención de un sistema catalítico reutilizable, recuperable y que facilita los pasos de separación y purificación de la mezcla de reacción. Además, los catalizadores inmovilizados son más fáciles de manipular y conservar, y resultan en una estabilización de la enzima involucrada (debido a los enlaces con el soporte) por lo que se prefiere usar enzimas inmovilizadas cuando se hacen reacciones en disolventes orgánicos o a altas temperaturas. Cuando las células son usadas como los agentes biocatalíticos, el sistema permite velocidades adecuadas de penetración y difusión de los reactivos y productos al interior de la célula; mientras que en las reacciones con enzimas la formación de

subproductos indeseables o la degradación de los productos deseados, son inhibidos o minimizados. Adicionalmente, el uso de células o enzimas inmovilizadas es más ventajoso, puesto que permite el uso de concentraciones mayores de compuestos que, normalmente son tóxicos, unido a que la densidad celular es superior, lo que implica una mayor proporción de bioconversión y se evita la pérdida de biocatalizadores en el caldo de extracción. No obstante, la inmovilización produce una inevitable pérdida de actividad que incrementa los costos de producción y una menor eficiencia de producción debida a limitaciones en la transferencia de masa durante el proceso. En dependencia del tipo de enlace con el soporte hay varios métodos de inmovilización, clasificados en tres tipos:

- 1 *De unión covalente entre el catalizador y el soporte.*
 - 2 *De unión no covalente (fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces electrostáticos) mediante el establecimiento de interacciones multipuntuales.*
 - 3 *Inmovilización mecánica por medios físicos con gran movilidad espacial dentro de una jaula producida por polimerización, encapsulación, membranas, o generación in situ de subestructuras tipo somas.*
- *Producción de organismos recombinantes y evolución dirigida.* Los genes que codifican una determinada enzima (o conjunto de ellas) se sobreexpresan en un organismo hospedero (generalmente un microorganismo) haciendo los procesos de biotransformación-biotransformación más económicos y eficientes. El organismo recombinante resultante posee un nivel elevado de la enzima deseada, así como niveles reducidos o nulos de enzimas que catalicen reacciones secundarias. Así, una vez una enzima ha sido encontrada y su secuencia de aminoácidos (o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína) analizada, se puede hacer uso de la precisión quirúrgica de la ingeniería genética o el clonado de genes. En los procesos de evolución dirigida se realizan distintas mutaciones sobre la enzima,

ya sea específica en un sitio o de menor selectividad, con el fin de mejorar las características deseadas del biocatalizador. Cuando la ingeniería genética se aplica a la modificación de las proteínas se utiliza el término de ingeniería de proteínas. De manera similar, cuando se modifica un proceso metabólico se emplea el término de ingeniería metabólica. Las herramientas de la ingeniería de proteínas y de la metabólica se han desarrollado no solo para ampliar el conocimiento de la bioquímica, sino para optimizar diversos procesos biocatalíticos y producir compuestos de interés químico y sobre todo farmacéutico (Kulla & Chimia, 1991, como se citó en Luna, 2004, pp. 81-85). Junto con estas herramientas se han desarrollado nuevos conceptos y metodologías, como la evolución dirigida o la genética combinatorial en sus distintas versiones, que pretenden conseguir nuevas formas de proteínas o de sistemas metabólicos mediante la inclusión al azar en un organismo de distintos genes o librerías génicas (biblioteca o conjunto de genes clonados en un vector). La posterior selección del organismo recombinante mediante el empleo de sistemas robotizados de cribado masivo (*high-throughput screening*) de muestras permite obtener en poco tiempo la proteína, el biocatalizador o el organismo deseado

Los procesos biocatalíticos están favorecidos particularmente si el sustrato o el producto son inestables ya que la reacción enzimática se realiza en condiciones suaves de temperatura y pH. Otra característica de los biocatalizadores es su habilidad para promover reacciones que son verdaderos desafíos en síntesis orgánica convencional, como la formación de enlaces C-C sin usar grupos protectores, la funcionalización remota, la dioxigenación de aromáticos, etc. Pero la mayor ventaja derivada del uso de biocatalizadores proviene de su naturaleza quiral, que les permite promover reacciones estero- y enantioselectivas con gran eficiencia.

Las aplicaciones industriales de la biocatálisis han crecido sostenidamente en los últimos años, desde algo más de 50 en 1990 a 134 ejemplos en 2002, hasta más de 600 en 2009-2015.



Un ejemplo impactante de lo que pueden hacer los procesos biocatalíticos es la producción de L-carnitina o vitamina Bt, utilizando células de un microorganismo, el cual utiliza una ruta natural que involucra cuatro enzimas en el proceso. En este proceso la 4-butirobetaina, es transformada a L-carnitina, la cual es excretada por las células al medio, facilitando su aislamiento. En este proceso se utilizó un nuevo microorganismo, relacionado con los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*, en su fase de crecimiento estacionaria. Como se observa en la (Figura 4), las cuatro enzimas tienen una función particular, la introducción de la quiralidad por la liasa, crotonobetainil-CoA hidrolasa. Bajo este procedimiento se produce L-carnitina a escala de 50 m³, con un rendimiento volumétrico de 80 g.L⁻¹, con una conversión analítica del 99.5% y un ee del 100%.

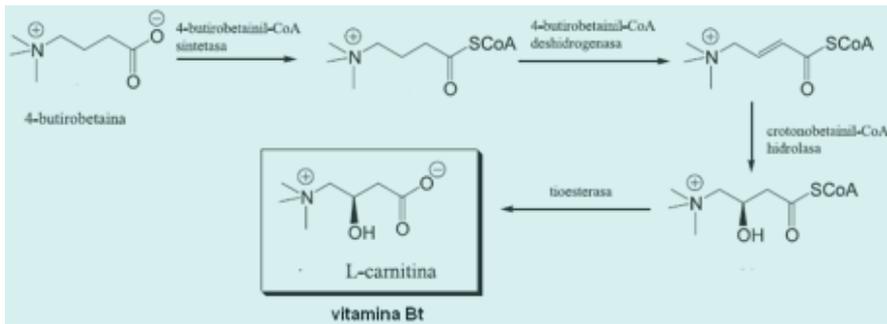
Otro ejemplo de la capacidad de la biocatálisis aplicada es la generación de ácido adípico. Este ácido de gran importancia comercial (> 9 000 000 t. año⁻¹) se produce a partir de benceno. La etapa inicial involucra la hidrogenación hasta ciclohexano seguida de una ineficiente oxidación para obtener una mezcla de ciclohexanol y ciclohexanona (KA mezcla) que se oxida después hasta ácido adípico utilizando grandes volúmenes de ácido nítrico (HNO₃), proceso altamente contaminante, pero una de las preocupaciones tecnológicas graves es la generación de cantidades estequiométricas de óxido nitroso, un gas con potente efecto invernadero y reductor de la capa de ozono. Alternativamente el ácido adípico puede ser producido mediante una simple hidrogenación catalítica del ácido *cis*, *cis*-mucónico el cual puede ser directamente sintetizado a partir de un material sustentable y ecológicamente viable como la glucosa utilizando *E.coli* genéticamente modificada.

La vía del ácido shikímico es una ruta metabólica natural ampliamente conocida para la síntesis de importantes aminoácidos aromáticos como triptófano, tirosina y fenilalanina a partir de glucosa. El intermediario clave en este proceso es el ácido 3-dehidroshikímico; a partir de la producción de este sustrato, la vía natural puede divergir en varias direcciones utilizando *E. coli* genéticamente

modificada. Mediante la inserción de genes que producen el ácido dehidroshikímico dehidrogenasa y decarboxilasa PCA a partir de *Klebsiella pneumoniae* y 1,2-deoxigenasa de *Acinetobacter calcoaceticus* la vía biosintética puede modificarse para producir ácido mucónico con elevado rendimiento como se evidencia en la (Figura 5), el catecol es un intermediario en la síntesis del ácido

Figura 4

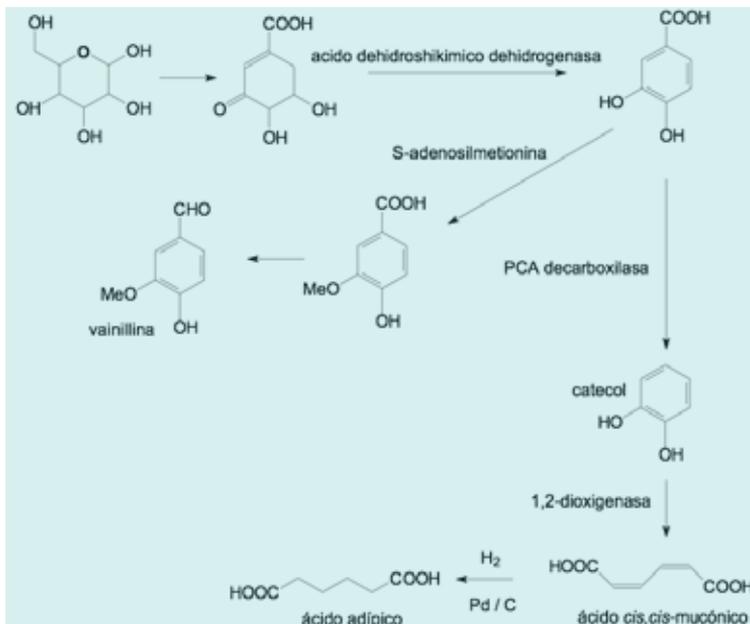
Síntesis de vitamina Bt a partir de 4-butirotetaina



Nota: Tomado de Luna (2004).

Figura 5

Síntesis del ácido adípico a partir de glucosa utilizando *E. coli*.



Nota: Tomado de Lancaster (2002/2016).



mucónico, y mediante la remoción del gen de la 1,2-dioxigenasa el proceso puede dirigirse hacia la producción de catecol. Este derivado es un derivado químico de gran importancia ampliamente utilizado en química fina industrial de perfumes y fragancias, en la producción de saborizantes como vainillina, y en la producción de L-Dopa, un fármaco de amplio uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Actualmente se desarrollan estudios de factibilidad técnico-económica para su comparación con las rutas petroquímicas y validar el diseño de plantas pilotos multipropósito.

Biocatálisis y biotransformaciones en América Latina

Se han descrito varios procesos biocatalíticos y biotransformaciones de sustratos aromáticos carboxílicos, sustratos de gran importancia para la industria química pesada, agroquímica, farmacéutica y petroquímica por la amplia distribución en la naturaleza de estos derivados y su importancia económica. Casos clásicos se detallan en la Tabla 4.

En Latinoamérica, a escala continental, se investiga profusamente en todas las etapas del ciclo biocatalítico. En varios países (Brasil, México, Argentina, Venezuela, Colombia, Cuba, etc.) se estudian las distintas reacciones biocatalíticas, principalmente las reacciones de oxidoreductasas, lipasas y algunas liasas (Solis et al., 1998; Menéndez et al., 2002; Vidal et al., 2001). La evaluación, cribado composicional, explotación y quimio-bioprospección de la biodiversidad endémica

Tabla 4

Biocatálisis aplicada y biotransformaciones de sustratos aromáticos carboxílicos

Sustrato	Producto generado vía biocatalítica o mediante biotransformación selectiva	Organismo
Acetofenona	Alcohol R- y S fenilefílico	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Acido p-cumárico	Acido p-hidroxibenzoico	Bacteria <i>Streptomyces caeruleus</i>
Acido cinámico	Esteres con alcoholes alifáticos (1-octanol)	Lipasas inmovilizadas de <i>Candida antarctica</i> y <i>Rhizomucor miehei</i>

Nota: Tomado de Velasco et al. (2009).

es una línea de investigación-aplicación obligatoria de los grupos de investigación que trabajan en el aislamiento e identificación de nuevas cepas de microorganismos obtenidos de distintos hábitats, desde ambientes contaminados hasta la selva tropical amazónica; así como de nuevas enzimas de origen vegetal o animal, total o parcialmente purificadas.

En la región, algunos colectivos de investigadores realizan mutaciones aleatorias en microorganismos, aplican técnicas de ingeniería genética para la producción de organismos recombinantes que expresen varios tipos de enzimas, o desarrollan procesos de inmovilización de enzimas o de células enteras, con el objetivo de optimizar la eficiencia catalítica de los biocatalizadores (Trelles et al., 2003; Cagnon et al., 1999; Rodríguez y Kayser, 2001; Ovsejevi et al., 1998; De-Lima et al., 1996; Porto et al., 2002).

Las aplicaciones sintéticas también son diversas; se han descrito síntesis quimioenzimáticas de productos de química fina (aromas, fármacos, polímeros sintéticos y biodegradables), de compuestos con actividad biológica y productos naturales, tales como nucleósidos (naturales y modificados) (Rogert et al., 2002), feromonas, compuestos polioxigenados de estructura diversa (ciclitoles, precursores de alcaloides y metabolitos marinos, etc.), así como sistemas para tratamiento ambiental, y algunas vinculadas a la problemática energética (Baldessari, Maier et al., 1995; Seeger et al., 2003; Santos et al., 2003; Limberger et al., 2003; Baldessari, Bruttomesso et al., 1996; Pilli y Riatto, 1998).

Enzimas hidrolíticas

Las enzimas hidrolíticas representan prácticamente el 50% de las enzimas aplicadas a escala industrial, principalmente amidasas, esterases y lipasas dado que no requieren de cofactores, y muestran una pobre especificidad de sustrato, permitiendo la ruptura o formación de enlaces éster R-O-CO- y amida R-NH-CO- en compuestos orgánicos con estructuras muy variadas. En los últimos años la creciente atención de los investigadores ha estado orientada hacia la catálisis enzimática aplicada a la hidrólisis

regio- y enantioespecífica de epóxidos y epóxidos sustituidos y la transformación enzimática de nitrilos para generar amidas, con el objetivo de substituir el proceso vía química convencional. Un caso de estudio y aplicación clásico es el uso comercial de la biocatálisis en la producción de acrilamida a escala industrial utilizando nitrilohidratasa para transformar el acrilonitrilo en acrilamida (Baldessari y Mangone, 2001). El proceso inicial desarrollado por Nitto Chemicals en 1985 utilizando *Rhodococcus* sp N-774 sufría de inestabilidad térmica. Los desarrollos posteriores utilizan la especie *Rhodococcus rhodococcus* J1 con concentraciones de acrilamida superiores al 50% sin generar ácido acrílico como producto colateral. En comparación con el proceso convencional que emplea cobre como catalizador, opera a 80-140 °C, la ruta biotecnológica opera a temperaturas más bajas evita el uso de reactores de presión y genera un producto con menos ácido acrílico residual (Figura 6).

Un ejemplo interesante es el Proceso *one pot* de LONZA en un biorreactor de 15m³, empleando amidasa de *Comomonas acidovorans* expresada en *E.coli*, el enantiómero no reconocido del ácido se recicla y el producto generado es un inhibidor de la beta-galactosidasa (Figura 7).

Un ejemplo fehaciente de la aplicación de esterases a escala industrial es la producción de naproxiderivados según el proceso Chirotec de la planta piloto de Shansun, India, con una concentración de sustrato de 150 g.L⁻¹ donde se emplea una esterasa recombinante (Figura 8).

El mecanismo de acción hidrolítica de este grupo de sistemas catalíticos enzimáticos (tipo serina-hidrolasas) ha sido completamente elucidado y la *tríada catalítica* Asp-His-Ser juega un rol preponderante (Figura 9).

Aproximadamente, el 35-37% de todas las biotransformaciones descritas se desarrollan con sistemas enzimáticos tipo lipasas, serina-hidrolasas ubicuas fisiológicamente relevantes y con gran potencial industrial y académico (Roberts et al., 1992). Fisiológicamente, catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos a glicerol y ácidos grasos

Figura 6

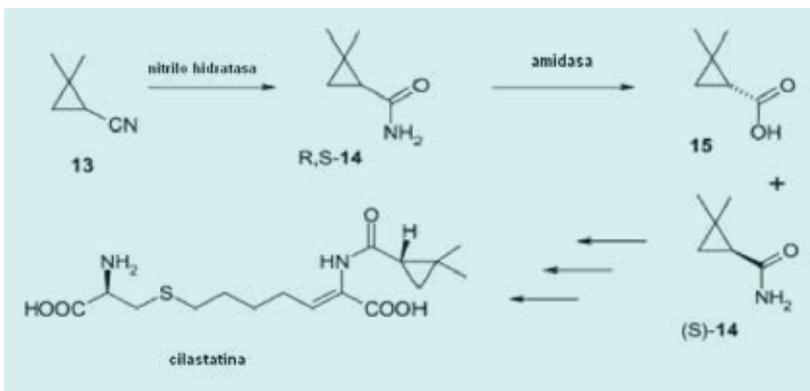
Transformación de acrilamida



Nota: Tomado de Lancaster (2002/2016)

Figura 7

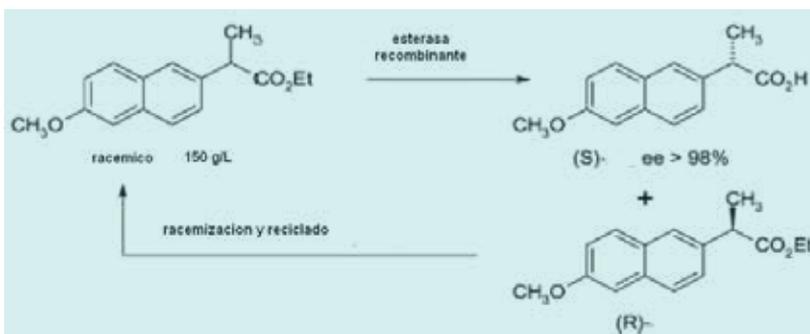
Transformación con amidasa



Nota: Tomado de Luna (2004).

Figura 8

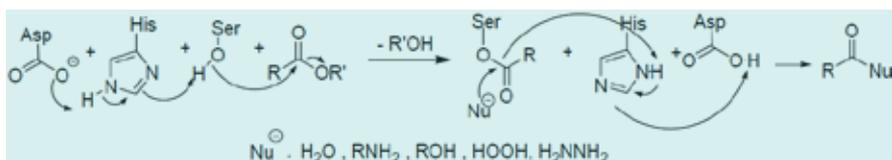
Reacción con esterasa recombinante



Nota: Proceso Chirotec (India).

Figura 9

Coordinación de la triada catalítica de serina hidrolasas



Nota: Tomado de Roberts et al. (1992).

de ahí su significativa importancia en el diseño de biocatalizadores aplicables a la síntesis de biodiesel o combustibles alternativos a partir de sustratos naturales o aceites (Pessagno y Baldessari, 2000; Patel, 2001; Monteiro et al., 2003). Estos sistemas enzimáticos no hidrolizan sustratos disueltos en el medio de reacción y se activan en presencia de una interfase agua-aceite, mostrando muy baja actividad en soluciones acuosas que contengan sustratos hidrosolubles (Martinelle et al., 1995). La interacción lipasa-lípidos a nivel de la interfase aún no está totalmente esclarecida y sigue siendo objeto de investigación (Fernández-Llorente et al., 2001). Numerosos intentos al respecto han sido impulsados en Latinoamérica. Investigadores cubanos y europeos, han logrado lipasas inmovilizadas con una excelente selectividad, reportando excelentes resultados para la hidrólisis enantioselectiva de α -hidroxiésteres vía procesos de inmovilización: (a) unión a dextrano covalentemente unido a agarosa; (b) inmovilización covalente multipunto sobre agarosa activada con glutaraldehído; (c) adsorción interfacial sobre soporte hidrofóbico de cadenas de octilo, (d) adsorción iónica sobre resinas poliméricas recubiertas de polietilenimina. Las lipasas inmovilizadas se encuentran en un entorno hidrofílico (acuoso) observándose complejos cambios conformacionales entre sus conformaciones activa e inactiva. En la Tabla 5 se detallan algunas reacciones y procesos biocatalíticos en los que se emplean actualmente biocatalizadores.

Tabla 5

Productos fabricados utilizando procesos de biocatálisis

Producto	Mercado mundial aprox. MM \$
Aceites Ácidos Grasos/Triglicéridos	1000
Sirope de fructosa de maíz	1000
Aspartame	800
Acilamida	300
6-Apa/7-Adca	200
Aminoácidos	150
Acido S-2-Cloropropanoico	10
Ciclodextrinas	10

Nota: Tomado de Gavrilescu y Chisti (2005).

Actualmente se observa un creciente interés por las compañías farmacéuticas y agroquímicas en la utilización de bloques de construcción quirales, ya que el concepto de quiralidad a nivel molecular es clave para la eficacia de muchos principios bioactivos, aditivos industriales y derivados químicos de amplio espectro funcional (enantio-funcionalidad específica). Esto fundamenta la tendencia a generar, vía biotecnológica o mediante biocatálisis, los derivados e intermediarios homoquirales, fomentando el desarrollo de procedimientos y rutas sintéticas aplicando sistemas enzimáticos a partir de una perspectiva polifuncional: obtención a partir del *pool quiral*, constituido por sintones quirales existentes en la naturaleza generados mayoritariamente por procesos de fermentación económicamente accesibles; resolución química o bioquímica de compuestos racémicos; y preparación de los sintones quirales vía síntesis asimétrica mediante procesos convencionales o biológicos empleando tanto enzimas aisladas como células enteras. En este contexto, un ejemplo clásico es la preparación de la cadena lateral del taxol, un diterpeno policíclico reconocido agente antimitótico y efectivo agente utilizado en la terapia del cáncer, como se muestra en la (Figura 10).

En síntesis orgánica asimétrica (petroquímica, agroquímica y farmacéutica industrial) la elevada estereoselectividad de las hidrolasas (hidrólisis enzimáticas) se aplica de tres formas diferentes: (a) Preparación de moléculas quirales a partir de sustratos proquirales con lipasas, esterases, amidasas y proteasas, (b) Asimetrización de compuestos meso y su conversión a sistemas quirales, y (c) Resolución de mezclas racémicas.

En el escenario latinoamericano continental, la Universidad Federal Fluminense, en Río de Janeiro, Brasil desarrolla resoluciones cinéticas con satisfactoria estereoselectividad (> enantiómero S) de mezclas racémicas con lipasas de *Pseudomonas* (Amano PS) en presencia de ultrasonido, específicamente acilaciones estereoselectivas de 1,2-azidoalcoholes, compuestos a los que se sintetizan por métodos sintéticos convencionales en forma racémica, siendo precursores de 1,2-aminoalcoholes como la

efedrina y el Salmeterol, con importantes propiedades biológicas y farmacológicas. En la Universidad Federal de Santa Catarina se desarrollan interesantes trabajos sobre la aplicabilidad de la regioselectividad de lipasas de *Rhizomucor miehiei* (Lipozyme 1M) en la obtención de monoacilglicerolos (Figura 11).

Reacciones enzimáticas de óxido-reducción

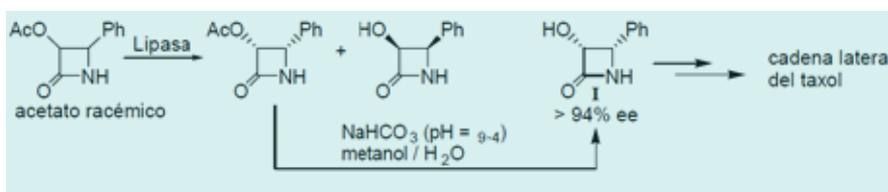
Aunque las reacciones hidrolíticas se aplican más extensamente en biocatálisis que las transformaciones óxido-reductoras, las reacciones enzimáticas redox son de gran importancia dados las extraordinarias modificaciones moleculares prácticamente inalcanzables por medios convencionales. En este contexto, debe destacarse que una de las reacciones biocatalíticas de óxido-reducción más reconocidas e importantes, la hidroxilación del C-17 del núcleo esteroide, se concibió y fue desarrollada en Latinoamérica, por la compañía Syntex durante la segunda mitad del siglo XX. Esta biotransformación permitió la preparación comercial de antiinflamatorios esteroidales y anticonceptivos orales. Para los procesos redox enzimáticos se requiere de cofactores en cantidades estequiométricas. En la Figura 12, se representa esquemáticamente una reacción clásica de óxido-reducción enzimática: la reducción de una cetona al alcohol correspondiente catalizada por una deshidrogenasa con participación de un cofactor. Este se transforma reversiblemente en la forma reducida (cofactor-H₂) u oxidada (cofactor⁺) en sentido inverso a la transformación del sustrato.

Los cofactores más utilizados en los procesos redox enzimáticos son nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), que pueden existir tanto en forma oxidada (NAD⁺ y NADP⁺) como reducida (NADH y NADPH) con una mínima modificación de la estructura molecular permitiendo la reversibilidad del proceso en el sitio activo de la enzima. Estos cofactores catalíticos de procesos redox se regeneran vía enzimática (método de *substrato acoplado auxiliar*), dada la imposibilidad de cantidades estequiométricas. Este procedimiento, no obstante, posee una dificultad: se observa, en ocasiones, una inhibición competitiva y retardo del proceso redox debido a la

saturación del sitio activo por el sustrato auxiliar. Más eficiente es el procedimiento de *enzima acoplada* o *reacción acoplada* el cofactor se regenera mediante el acoplamiento de una segunda reacción enzimática catalizada por un complejo enzimático diferente al utilizada para acelerar la reacción principal, evitándose la inhibición de la actividad enzimática por inhibición competitiva y

Figura 10

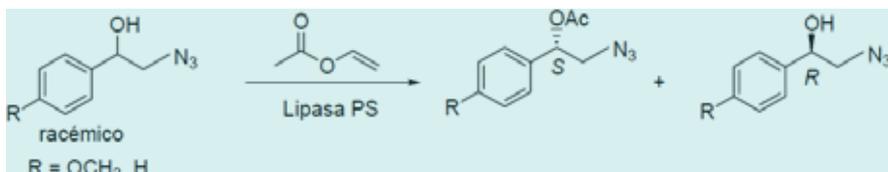
Hidrólisis enzimática estereoselectiva de cis-3-acetiloxi-4-fenil-2-azetidiona y generación de la lactama homoquiral I, precursora de la cadena lateral del taxol en C13



Nota: Tomado de Patel (2001).

Figura 11

Reacción con lipasas



Nota: Tomado de Souza & Nogueira (2003).

Figura 12

Ejemplo teórico de una reacción redox catalizada enzimáticamente.



Nota: Tomado de Castellanos et al. (2006).

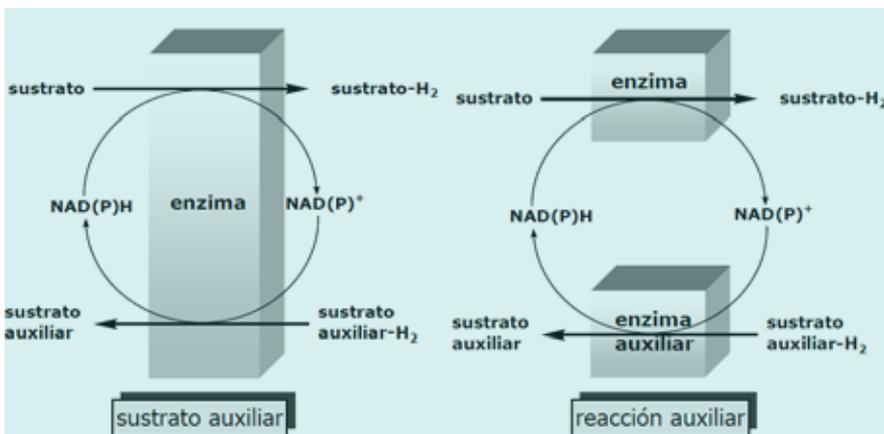
se alcanzan velocidades de reacción aceptables con cantidades catalíticas de cofactor. Esquemáticamente, esta percepción se detalla en la Figura 13.

Este proceso ha sido ampliamente utilizado en la deshidrogenación reductiva de cetonas hasta alcoholes secundarios, vía biocatálisis con deshidrogenasa, con elevado exceso enantiomérico y satisfactorio rendimiento global (Neuberg y Lewite, 1918). Detalles de este proceso se muestran en la Tabla 6.

No obstante, la eficiencia de los procedimientos de regeneración de cofactores, resulta muy promisoría la utilización de cultivos de microorganismos y cultivos celulares capaces de regenerar eficientemente los cofactores utilizando el complejo metabólico de un organismo vivo para desarrollar las reacciones biocatalíticas redox. Debe destacarse que la reducción enantioselectiva de cetonas y cetoésteres mediante levaduras como la oxidación regioselectiva de polioles están entre las reacciones más antiguas descritas en la literatura de biotransformaciones (Magasanik y Chargaff, 1948). Las reducciones de cetonas (aromáticas y alifáticas) catalizadas por *Saccharomyces cerevisiae* se caracterizan por elevados rendimientos y estereoselectividad (Navarro-Ocaña et al., 2001). En la Tabla 7 se presentan algunos ejemplos seleccionados de reducciones de cetonas con levaduras.

Figura 13

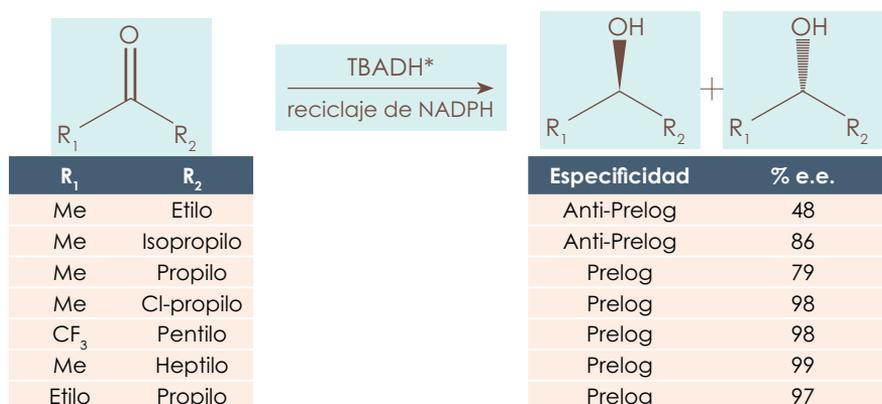
Dos estrategias para la regeneración enzimática de cofactores



Un ejemplo fehaciente de la viabilidad de reducción de cetonas con levaduras (células intactas de *Saccharomyces cerevisiae*) para obtener materiales de partida asimétricos (sintones) para productos naturales, es la síntesis de la feromona de insectos (-)-serriconina por el grupo de R. A. Pilli en la Universidad de Campinas, Brasil, alcanzando un rendimiento estereoselectivo del 80% ee a partir de (R)-3-hidroxipentanoato de metilo mediante reducción de 3-oxopentanoato de metilo. *Saccharomyces* se ha

Tabla 6

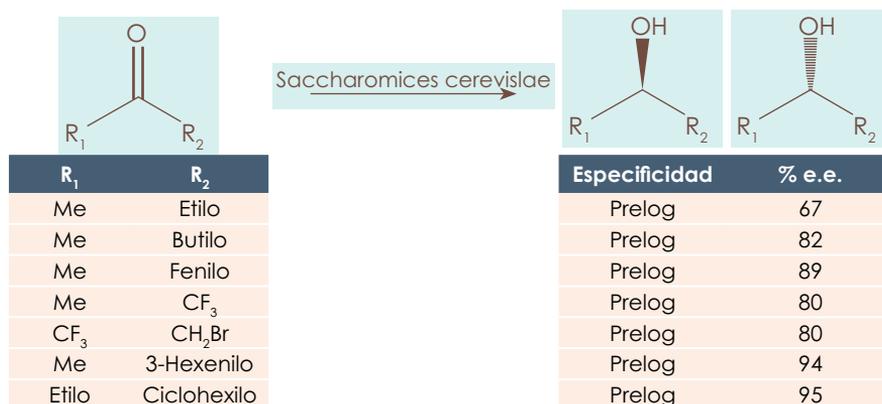
Reducción de cetonas con una deshidrogenasa aislada de *Thermoanaerobium*



Nota: (*) *Thermoanaerobium brockii*-alcohol deshidrogenasa. Tomado de Faber (2000).

Tabla 7

Reducción de cetonas catalizada por levaduras del género *Saccharomyces*



Nota: Tomado de Faber (2000).

utilizado también para la reducción de otros grupos funcionales. Por ejemplo, un grupo de investigadores mexicanos ha descrito la reducción de nitroacetanilidas para la producción de bencimidazoles. Frecuentemente, las reducciones enzimáticas de cetonas permiten obtener el isómero termodinámicamente menos estable de un alcohol secundario. Por ejemplo, en la reducción de 4-*tert*-butilciclohexanona mediante una cepa brasileña de la bacteria *Serratia rubidaea* (CCT 5742) se aisló el compuesto *cis*-4-metilciclohexanol con 96% de exceso diastereomérico (Souza y Nogueira, 2003).

Las oxidaciones de alcoholes catalizadas por deshidrogenasas no han sido objeto de estudio continuo (González et al., 1997). Mas significativas son las reacciones de hidroxilación y dihidroxilación (catalizadas por oxigenasas) donde sustratos acquirales son oxidados para proporcionar alcoholes, dioles y epóxidos con estereoquímica definida, incorporándose, al menos, un átomo de oxígeno al sustrato utilizando oxígeno molecular como co-sustrato en la reacción. Los productos obtenidos vía oxigenación enzimática mediante oxigenasas se utilizan en síntesis orgánica y modificación de mezclas policomponentes como fracciones aromáticas de petróleo permitiendo minimizar el número de etapas en procedimientos sintéticos asimétricos (Figura 14).

Se destaca la oxigenación catalítica regioespecífica del núcleo esteroidal por cepas de hongos, que permitió la transformación de progesterona en cortisona desarrollada en Syntex en los años cincuenta del siglo XX (Mancera et al., 1952). Esta transformación enzimática habilitó la síntesis de antiinflamatorios esteroidales (Figura 15).

En Latinoamérica las reacciones enzimáticas de oxigenación o hidroxilación han recibido, como objeto de estudio de procesos enzimáticos, una especial consideración, específicamente la hidroxilación de varios hidrocarburos bioactivos de origen natural, especialmente terpenos, mediante cepas de microorganismos (bacterias y hongos). La capacidad de enzimas monooxigenasas de hidroxilar metilenos no-activados permite obtener alcoholes

secundarios derivados de productos naturales a menudo con alto grado de estéreo- y regioselectividad. En la Universidad Nacional de San Juan, Argentina, se ha estudiado la hidroxilación regio- y estereoselectiva del compuesto antimicrobiano ácido dehidroabiético catalizada por dos cepas de hongos del género *Fusarium* (Figura 16).

Otro ejemplo que avala la aplicabilidad y versatilidad de procesos de hidroxilación enzimática se describe por químicos de Minas Gerais, Brasil, donde la hidroxilación remota de esqueletos de kaurano catalizada por *Verticillium lecanii* produce tres trioles isómeros, (Figura 17).

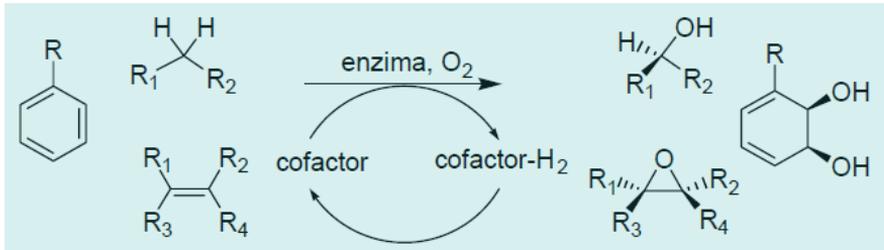
La combinación de estrategias sintéticas tipo combinación de hidroxilaciones enzimáticas y químicas se describe por el grupo de Aranda *et al.*, de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Para acceder al diterpeno buscado, hidroxilado en C-1, se preparó primero el isómero correspondiente hidroxilado en C-3 utilizando células intactas de una cepa de *Aspergillus niger*. Este producto fue consecutivamente transformado mediante dos pasos de síntesis en el compuesto blanco (Figura 18).

Los procedimientos de dihidroxilación enzimática de compuestos aromáticos catalizadas por dioxigenasas producen cis-ciclohexadiendiol ópticamente puros, siendo altamente enantioselectivos y muy tolerantes a una variada serie de sustratos aromáticos. Este hecho ha permitido la preparación de un universo de más de doscientos metabolitos homoquirales, que se enriquece continuamente con el descubrimiento de nuevas dioxigenasas con selectividades más amplias. El cis-ciclohexadiendiol producto de la dihidroxilación es una molécula particularmente apta para su funcionalización controlada, que facilita la transformación de estos sintones quirales en una diversa gama de productos naturales y no-naturales ópticamente puros, (Figura 19).

La Universidad de la República de Uruguay ha sintetizado una serie estructural de ciclohexenonas asimétricas empleando una dioxigenasa de *Pseudomonas* para la transferencia de quiralidad

Figura 14

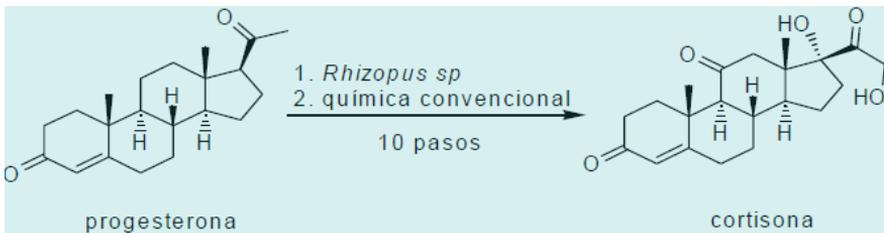
Empleo de cofactores en enzimas en la hidroxilación-oxigenación de hidrocarburos



Nota: Tomado de Hudlicky et al., (1999).

Figura 15

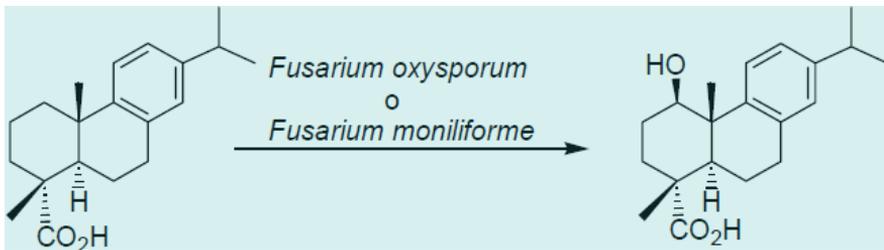
Oxigenación enzimática del anillo esteroidal



Nota: Tomado de Peterson y Murray (1952).

Figura 16

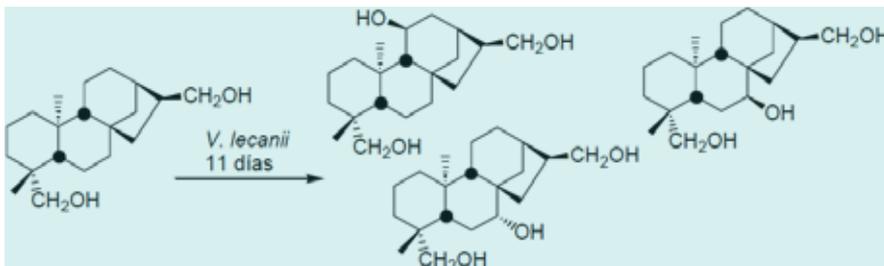
Obtención enzimática del ácido 1-β-hidroxiesteroide



Nota: Tomado de Tapia (1997).

Figura 17

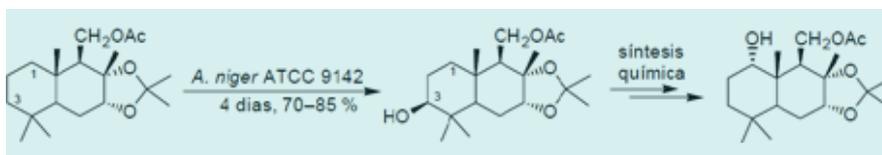
Productos de hidroxilación de un derivado reducido del ácido kauránico



Nota: Tomado de Vieira et al. (2002).

Figura 18

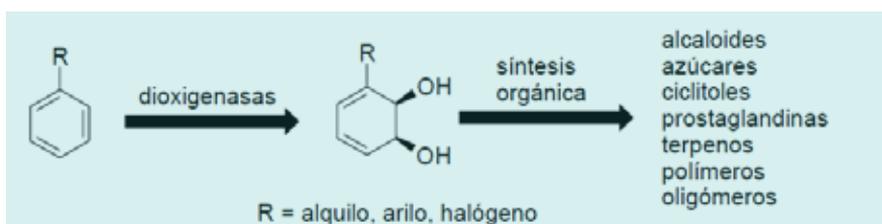
Síntesis quimioenzimática de un kaurano hidroxilado



Nota: Tomado de Aranda et al. (2001).

Figura 19

Uso de productos metabólicos de dioxigenasas en síntesis asimétrica



Nota: Tomado de Hudlicky et al. (1999).

(De-Conti et al., 2001; Shapiro, 2002). Estas enonas pueden ser utilizadas como sintones para la preparación de productos naturales como forscolina, inhibidores de tirosinasas, agentes *antifouling* y diterpenos relacionados (Figura 20).

García-Garibay et al. (2000), de la Facultad de Química de la UNAM, demuestran la importancia del agua en la biocatálisis en medios de humedad baja, considerando la significación de la saturación previa con agua de los solventes o medios hidrófobos en estos procesos biocatalíticos para alcanzar un grado de activación de los biocatalizadores, dada su participación en todas las interacciones covalentes y de menor contenido energético entre el substrato y el complejo catalítico enzimático. Este argumento se fundamenta en los resultados de hidratación progresiva de enzimas y biocatalizadores para generar estructuras moleculares activas y en la necesidad de correlacionarlo con la actividad acuosa (A_w) relacionada a su vez con el deterioro de productos por microorganismos y la posibilidad de desarrollar procesos biocatalíticos a elevadas temperaturas o temperaturas críticas de

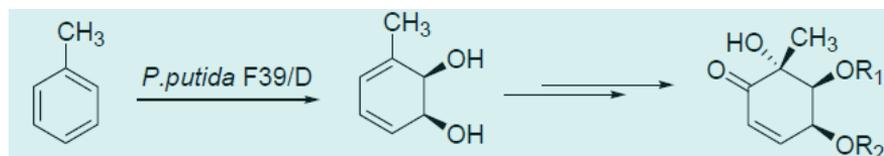
reacción superiores a 80 °C. En este contexto, debe destacarse, que es factible desarrollar reacciones de síntesis de glicósidos con actividad tensioactiva a 90 °C, mediada por una glicosidasa hipertermófila siendo la conversión del proceso una función del contenido de agua en el sistema (Figura 21).

Hasta ahora hemos descrito algunos conceptos básicos que ejemplifican la importancia de la biocatálisis en la química orgánica fina y presentado algunos ejemplos seleccionados de trabajos que se están llevando adelante en Latinoamérica. La lista no pretende ser exhaustiva, sino confrontar al lector con ejemplos que dada su belleza conceptual pueden constituir materiales de referencia para proyectos de I + D en esta fascinante temática.

En este contexto deben destacarse los trabajos del grupo de la Dra. Alicia Baldessari, de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, sobre la biocatálisis aplicada a esteroides, terpenos, dicetonas y la síntesis de poliamidoamidas lineales con actividad tensioactiva, emulsionante y catalítica. Bajo su liderazgo se logró sintetizar el cloruro de 1-[(2-Dodecanoiloxietilcarbamoil)-metil] piridinio, conocido comercialmente como cloruro de lapirio. Este compuesto es un

Figura 20

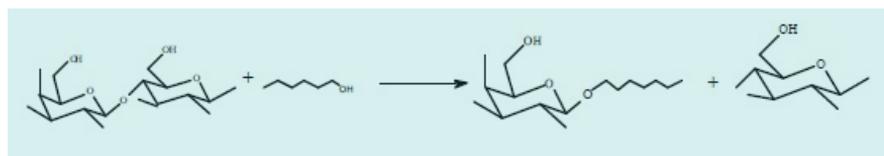
Síntesis quimioenzimática de enonas quirales a partir de tolueno



Nota: Tomado de Schapiro et al. (2002).

Figura 21

Síntesis de glicósidos mediada por una glicosidasa hipertermófila



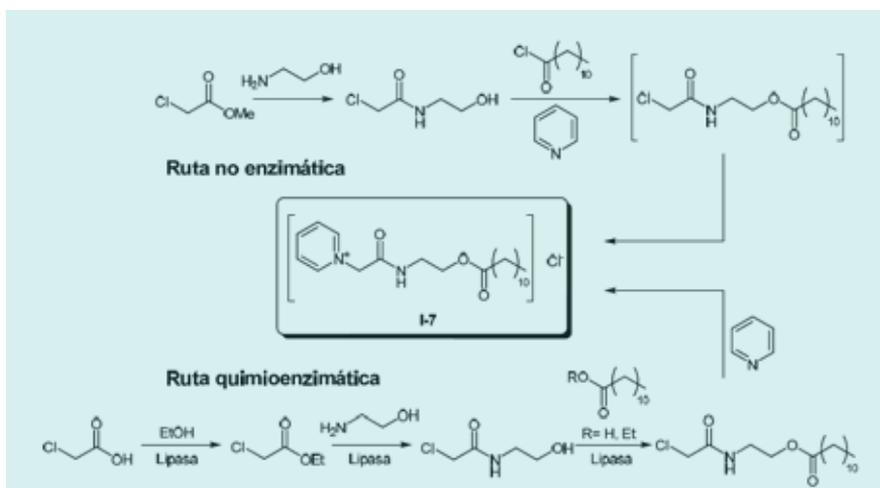
Nota: Tomado de Ramírez et al. (2006).

tensioactivo y bactericida de amplio espectro, útil en cosmética y esterilización, así como en el tratamiento de efluentes domiciliarios e inhibidores de corrosión.

Este grupo de trabajo desarrolló una ruta sintética alternativa en cuatro pasos, tres de los cuales fueron catalizados por lipasas, ventajas claras con respecto a sus predecesores no enzimáticos tales como empleo de reactivos y solventes más económicos y los pasos proceden en condiciones suaves y se evita el uso de cloruros de ácido, además el producto final tiene menor acidez, con lo que su aislamiento resulta más sencillo y posee una mejor aptitud para su uso en formulaciones farmacéuticas y cosméticas. La Figura 22 muestra ambas rutas, tradicional (no enzimática) y quimioenzimática más benigna y eficiente.

Figura 22

Ruta sintética tradicional y quimioenzimática para la obtención de cloruro de lapirio I-7



Nota: Tomado de Monsalve (2009).

Conclusiones

Las biotransformaciones y la biocatálisis constituyen hoy una alternativa conceptual, y metodológica, para fundamentar el desarrollo sustentable a escala mundial y en especial para los países en vías de desarrollo con economías emergentes. La degradación del medio ambiente asociada a los modelos de desarrollo clásicos no puede ser una opción para las sociedades latinoamericanas, que aún buscan un modelo de crecimiento económico asociado a un aumento de la calidad de vida de sus habitantes y la aplicación sistémica e integral de la ciencia y la tecnología en condiciones de sostenibilidad. La química sustentable, la química verde, y en especial las biotransformaciones y los procesos de biocatálisis centradas en la convergencia con la química eco-sustentable, por la relativamente baja inversión económica requerida para su despegue y por la enorme riqueza representada por la biodiversidad autóctona que existe en los ecosistemas latinoamericanos, es capaz de contribuir a la transición desde una economía esencialmente basada en la extracción de productos naturales hacia una de elaboración de productos de alto valor agregado.

Se ha intentado demostrar, en el curso de este trabajo, la significación de la biocatálisis, las biotransformaciones y la biotecnología en la química sustentable y en la química fina, remarcando su potencial impacto futuro en el desarrollo de procesos ecológicamente benignos, energéticamente más eficientes y sustentables. Esperamos que la lectura de este material, junto al disfrute conceptual de todo el número, le aporte al lector interesado en química sostenible y química biotecnológica aplicada elementos para la construcción de nuevas ideas científicas unidas a una ética de sustentabilidad en aras del progreso de la industria química nacional, petroquímica y biotecnológica ambiental en condiciones de excelencia competitiva en la República de Ecuador.

La aplicación de la biocatálisis, desde una perspectiva de química verde, a procesos petroquímicos y agroquímicos, ambiental y tecnológicamente benignos, será analizada en próximos trabajos.

Agradecimientos

Los autores agradecen, profunda y respetuosamente, a los profesores, Dra. Rita Hoyos de Rossi (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y al Dr. Gustavo Seoane (Universidad de la República, Uruguay) por su esfuerzo en el desarrollo de la química sustentable y la química verde a escala continental, y la aplicación de una percepción de la Biocatálisis en la sostenibilidad de la química básica e industrial en Latinoamérica, así como por la gentileza de los excelentes materiales didácticos facilitados.

Nuestro sincero agradecimiento a nuestro colectivo de colegas por sus interesantes valoraciones y consideraciones durante la lectura de este manuscrito...a todos ¡Gracias!

Referencias

- Aranda, G., Moreno, L., Cortes, M., Prange, T., Maurs, M., & Azerad, R. (2001). A new example of 1 α -hydroxylation of drimanic terpenes through combined microbial and chemical processes. *Tetrahedron*, (57), 6051-6056.
- Arroyo, M., Acebal, C., y De-la-Mata, I. (2014). Biocatálisis y biotecnología. *Arbor*, 190(768), a156. <https://doi.org/hb6d>
- Baldessari, A., & Mangone, C. P. (2001). One-pot biocatalyzed preparation of substituted amides as intermediates of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 11(4-6), 335-341. <https://doi.org/fk8zpc>
- Baldessari, A., Bruttomesso, A. C., & Gros, E. G. (1996, June 26). Lipase-Catalysed Regioselective Deacetylation of androstane derivatives. *Helvetica Chimica Acta*, 79(4), 999-1004. <https://doi.org/bkxh5q>
- Baldessari, A., Maier, M. S., & Gros, E. G. (1995). Enzymatic deacetylation of steroids bearing labile functions. *Tetrahedron Letters*, 36(25), 4349-4352. <https://doi.org/fvvtbp>
- Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1051, 15-31. <https://doi.org/f5ck6h>
- Cagnon, J. R., Porto, A. L., Marsaioli, A. J., Manfio, G. P., & Eguchi, S. Y. (1999). First evaluation of the Brazilian microorganisms biocatalytic potential. *Chemosphere*, 38(10), 2237-2242. <https://doi.org/bj8crp>
- Castellanos, O., Ramírez, D., y Montañez, V. (2006, mayo/agosto). Perspectiva en el desarrollo de las enzimas industriales a partir de la inteligencia tecnológica. *Ingeniería e Investigación*, 26(2), 52-67. <https://bit.ly/3qO5aSc>
- De-Conti, R., Porto, A., Augusto, J., Rodrigues, R., Moran, P., Manfio, G., & Marsaioli, A. (2001, January 22). Microbial reduction of cyclohexanones. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 233-236. <https://doi.org/dk552p>
- De-Lima, C., Da-Silva, P., Nascimento, M., & Rezende, M. (1996). The use of immobilized lipases on chrysotile for esterification reactions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 7(3), 173-175. <https://bit.ly/3t6eHH0>
- Environmental Protection Agency. (1999). *Green Chemistry: Frontiers in Benign Chemical Synthesis & Processes* (P. Anastas & T. Williamson, Eds). Oxford University Press.

- Faber, K. (2004). Biocatalytic Applications. *Biotransformations in organic chemistry* (pp. 29-176). Springer.
- Fernandez-Llorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J. M., Mateo, C., Bastida, A., Coca, J., Haramboure, T., Hernández-Justiz, O., Terreni, M., & Guisan, J. M. (2001, Januray 22). Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 649-656. <https://doi.org/c4nhhx>
- Gamenara, D., Seoane, G., Saenz, P., & Domínguez, P. (2013). *Redox Biocatalysis. Fundamentals and Applications*. Wiley.
- García-Garibay, M, López-Munguía, A., & Barzana, E. (2000, October 24). Effect of β -galactosidase hydration on alcoholysis reaction in organic one-phase liquid systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(6), 647-653. <https://doi.org/frp672>
- Gavrilescu, M., & Chisti, Y. (2005). Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology advances*, 23(7-8), 471-499. <https://doi.org/bbp6zg>
- Gonzalez, D., Schapiro, V., Seoane, G., & Hudlicky, T. (1997). New metabolites from toluene dioxygenase dihydroxylation of oxygenated biphenyls. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(7), 975-977. <https://bit.ly/3q48j0Q>
- Hudlicky, T., D. Gonzalez, & D. T. Gibson. (1999). Enzymatic dihydroxylation of aromatics in enantioselective synthesis: Expanding asymmetric methodology. *The Tetrahedron Letter*, 32(2), 35-62. EPA Number: R826113
- Klibanov A. M. (1983). Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4585), 722-727. <https://doi.org/c67n2p>
- Lancaster, M. (2016, August 6). *Green Chemistry: And Introductory Text* (3rd ed.). Royal Society of Chemistry. (Original work published 2002).
- Leise, A., Seelbach, K., & Wandrey, C. (Eds). (2006, March). *Industrial Biotransformations* (2nd ed.). Wiley,
- Limberger, R. P., Ferreira, L., Castilhos, T., Aleixo, A. M., Petersen, R. Z., Germani, J. C., Zuanazzi, J. A., Fett-Neto, A. G., & Henriques, A. T. (2003). The ability of *Bipolaris sorokiniana* to modify geraniol and (-)-alpha-bisabolol as exogenous substrates. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5-6), 552-555. <https://doi.org/b7dd9c>
- Luna, H. (2004). Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 48(3), 211-219. <https://bit.ly/3HFk1QW>
- Magasanik, B., & chargaff, E. (1948). The structure of a new cyclohexose

- produced from d-inositol by biological oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 175(2), 929-937. <https://bit.ly/3f0G5y2>
- Mancera, O., Zaffaroni, A., Rubin, B., Sondheimer, F., Rosenkranz G., & Djerassi, C. (1952, July 20). Steroids. XXXVII. A ten step conversion of progesterone to cortisone. *Journal of the American Chemical Society*, 74(14), 3711-3712.
- Martinelle, M., Holmquist, M., & Hult, K. (1995). On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et biophysica acta*, 1258(3), 272-276. <https://doi.org/czwnw9>
- Menéndez, P., García C., Rodríguez, P., Moyna, P., & Heinzen, H. (2002, June). Enzymatic systems involved in D-limonene biooxidation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(2), 111-114. <https://bit.ly/3q096js>
- Monsalve, L. (2009). Biotransformación aplicada a reacciones de esteroides, terpenos y dicetonas y a la síntesis de poliamidoaminas lineales (Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina). <https://bit.ly/3q3QcZg>
- Monteiro, J. B., Nascimento, M. G., & Ninow, J. L. (2003). Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system. *Biotechnology letters*, 25(8), 641-644. <https://doi.org/dvnjfw>
- Navarro-Ocaña, A., Olgún, L., Luna, H., Jiménez-Estrada, M., & Bárcana, E. (2001). Reductive cyclization with baker's yeast of 4-alkyl-2-nitroacetanilides to 6-alkylbenzimidazoles and 1-hydroxy-2-methyl-6-alkylbenzimidazoles [Abstract]. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (21), 2754-2756. <https://rsc.li/3f0gANi>
- Neuberg, C., & Lewite, A. (1918). XIV. Hydrogenation of a ketone by yeast. Transformation of methylheptenone into methylheptenol. *Biochem. Z.*, 91, 257-266.
- Ogawa, J., & Shimizu, S. (1999). Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Trends in biotechnology*, 17(1), 13-21. <https://doi.org/bd6c3t>
- Ovsejevi, K., Grazu, V., & Batista-Viera, D. (1998). β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* immobilized on to thiosulfinate/thiosulfonate supports for lactose hydrolysis in milk and dairy by-products. *Biotechnology Techniques*, 12, 143-148.
- Patel, R. (2001). Enzymatic preparations of chiral pharmaceutical intermediates by lipases. *Journal. Liposome Research*, (11), 355-393.
- Pessagno, R., & Baldessari, A. (2000). Lipase-Catalyzed Polymerization

of Glycerol and Dicarboxylic Acids in an Organic Medium. *Molecules*, 5(12), 372–373. MDPI AG. <https://doi.org/bz44mc>

- Peterson, D., & Murray, H. (1952, April 5). Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11. *Journal of the American Chemical Society*, 74(7), 1871-1872. <https://doi.org/bc4kzb>
- Pilli, R., & Riatto, V. (1998, December). A Chemoenzymatic Synthesis of the Sex Pheromone of *Lasioderma serricorne* F. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 9(6), 571-576. <https://bit.ly/3eWprzh>
- Porto, A., Cassiola, F., Dias, S., Joekes, I., Gushikem, Y., Rodrigues, J., Moran, P., Manfio, G., & Marsaioli, A. (2002). *Aspergillus terreus* CCT 3320 immobilized on chrysotile or cellulose/TiO₂ for sulfide oxidation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20, 327-334. <https://bit.ly/32OeJJ3>
- Ramírez, N., Serrano, J., & Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56-71. <https://bit.ly/3F2vn4B>
- Roberts, S., Davies, H., Green, R., Kelly, D., (1992). *Biotransformations in preparative organic chemistry. The use of isolated enzymes and whole cell systems in synthesis*. Academic Press.
- Rodríguez, S., Kayser, M. M., & Stewart, J. D. (2001). Highly stereoselective reagents for beta-keto ester reductions by genetic engineering of baker's yeast. *Journal of the American Chemical Society*, 123(8), 1547–1555. <https://doi.org/df5qjv>
- Rogert, M., Trelles, J., Porro, S., Lewkowicz, E., & Iribarren, A., (2002). Microbial Synthesis of Antiviral Nucleosides Using *Escherichia coli* BL21 as Biocatalyst. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(5), 347-351. <https://doi.org/dsvx77>
- Santos, A., Pereira, N., Da Silva, I., Sarquis, M., & Antunes, O. (2003). Microbiologic Oxidation of Isosafrole into Piperonal [Abstract]. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 105, 649-657. <https://bit.ly/3eWnRxt>
- Schapiro, V., Cavalli, G., Seoane, G., Faccio, R., & Mombru, A. (2002, November 13). Chemoenzymatic synthesis of chiral enones from aromatic compounds. *Tetrahedron: Asymmetry*, 13(22), 2453-2459. <https://doi.org/c7vmfx>
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(6817), 258–268. <https://doi.org/bqxxgv7>

- Seeger, M., González, M., Cámara, B., Muñoz, L., Ponce, E., Mejías, L., Mascayano, C., Vásquez, Y., & Sepúlveda-Boza, S. (2003). Biotransformation of natural and synthetic isoflavonoids by two recombinant microbial enzymes. *Applied and environmental microbiology*, 69(9), 5045–5050. <https://doi.org/djgk32>
- Sierra, A., Meléndez, L., Ramírez-Monroy, A., y Arroyo, M. (2014, julio/diciembre). La química verde y el desarrollo sustentable RIDE Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo, 5(9), 1-15. <https://bit.ly/3pZNKmr>
- Solis, A., Luna, H., Perez, H., Manjarrez, N., Sánchez, R., Albores-Velasco, M., & Castillo, R. (1998). New sources of (R)-oxynitrilase: capulin (*Prunus capuli*) and mamey (*Mammea americana*). *Biotechnology Letters*, 20(12), 1183-1185.
- Souza, E., & Nogueira, J. (2003). Stereoselective acylations of 1,2-azidoalcohols with vinyl acetate catalyzed by lipase Amano PS. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14(10), 1255-1259. <https://bit.ly/3eXH163>
- Straathof, A. J., Panke, S., & Schmid, A. (2002). The production of fine chemicals by biotransformations. *Current opinion in biotechnology*, 13(6), 548–556. <https://doi.org/dsk9mv>
- Tapia, A. A., Vallejo, M. D., Gouiric, S. C., Feresin, G. E., Rossomando, P. C., & Bustos, D. A. (1997). Hydroxylation of dehydroabietic acid by *Fusarium* species. *Phytochemistry*, 46(1), 131–133. <https://doi.org/djhjmi>
- Trelles, J., Fernández, M., Lewkowicz, E., Iribarren, A., & Sinisterra, J. (2003, March). Purine nucleoside synthesis from uridine using immobilized *Enterobacter gergoviae* CECT 875 whole cells. *Tetrahedron Letter*, 44(12), 2605-2609. <https://doi.org/cg36b7>
- Velasco, R., Montenegro, D., Vélez, J., García, C., & Durango, D. (2009, enero/marzo). Biotransformación de compuestos aromáticos sustituidos mediante hongos filamentosos fitopatógenos de los géneros *Botryodiplodia* y *Colletotrichum*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(1), 94-111. <https://bit.ly/3zxf6DF>
- Vidal, M., Becerra, J., Mondaca, M. A., & Silva, M. (2001). Selection of *Mycobacterium* sp. strains with capacity to biotransform high concentrations of beta-sitosterol. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(3), 385–389. <https://doi.org/fmrjkz>
- Vieira, H. S., Takahashi, J. A., & Boaventura, M. A. (2002). Novel derivatives of ent-17,19-dihydroxy-16betaH-kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(13), 3704–3707. <https://doi.org/d5thpr>

Zaks, A., & Klivanov, A. M. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science (New York, N.Y.)*, 224(4654), 1249–1251. <https://doi.org/cxrp4t>

Zaks, A., & Klivanov, A. M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), 3192–3196. <https://doi.org/ftq4dc>