FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

2013

Rol de endófitos en reacciones biocatalíticas mediadas por vegetales. Identificación y caracterización de nuevos biocatalizadores

Presentado para aspirar al título de Doctor en Química

TRIBUNAL

---	---	---
Dra. Matilde Soubes	Dr. Ignacio Carrera	Dr. Adolfo Iribarren

Paula Rodriguez Bonnecarrére

ORIENTADORES:

---	---	---
Dra. Sonia Rodríguez Giordano	Dra. Pilar Menendez (Director Académico)	Dr. David Gonzalez

27 de Junio de 2013

A mis tres soles y a Wilson siempre

Agradecimientos

La finalización de o la concreción de la presente Tesis ha sido posible gracias al apoyo económico de los siguientes instituciones: Facultad de Química, UdelaR (beca de posgrado), PEDECIBA, CSIC (beca de posgrado para docentes), ANII (proyecto Fondo Clemente Estable modalidad III) y Ministerio de Educación y Cultura (proyecto de Cooperación Bilateral).
Por otra parte quiero agradecer a la Cátedra de Microbiología y al Departamento de Química Orgánica de Facultad de Química, UdelaR, cuyo aporte permitió la realización de la Tesis.

La Tesis se enmarca dentro del área de la Biocatálisis y las Biotransformaciones. Esta área involucra la interrelación de diferentes Ciencias, por tanto hace que los que trabajamos en ella formemos parte de un grupo de investigadores con diferentes formaciones. Si bien en Facultad de Química se investiga en esta área desde hace mucho tiempo, la misma se comenzó a consolidar en la última década cuando se formó el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones (LBB). El presente proyecto de Tesis surgió como nueva línea de investigación en el LBB y fue posible su realización gracias al apoyo de TODOS los integrantes de este Laboratorio. Entre ellos debo agradecer especialmente a María Barton, juntas y bajo la dirección de la "jefa" empezamos a buscar respuestas en la zanahoria. A Beatriz Vega por su ayuda con la dicetona terpénica. A Beatriz Reyes y Andrea Camarano porque formaban parte del equipo del LBB cuando arrancó la Tesis. A Lucía Zeballos y Camila Coronel por su ayuda y colaboración en la investigación de endófitos en vegetales. A Nacho, César, Diego, Lari, Victoria, Agustina, Paola, Ale, Emi, Luis y a Facundo, quienes cada cual con su potencial enriquecen el LBB. A Carlos, compañero de terpenos, cuyas discusiones siempre son valiosas y así voy llegando a Pilar. Su apoyo ha sido imprescindible para poder realizar y finalizar este proyecto así como de los anteriores (y ciertamente también lo será en los futuros). A David, quien siempre me alentó en las diferentes propuestas que surgieron en la Tesis, las cuales fueron derivando en algunos casos en nuevos proyectos. También agradecerle por la paciencia que tiene cada vez que le pido ayuda en química orgánica. A Sonia, con quien comencé a trabajar ya hace bastante tiempo y durante todos estos años ha mantenido la capacidad de idear nuevos caminos en investigación, lo cual ha sido sumamente enriquecedor para la Tesis, aparte de ser de las primeras socias para esta búsqueda Por otro lado ella junto a David, con su madera docente, me formaron en el proceso de escritura.

También quiero agradecer a mis compañeros de Facultad quienes de una manera u otra estuvieron presentes durante el desarrollo de la Tesis. Gaby, Lucía, Carmen y Andrés. A las compañeras de LEQ, María Laura, Carolina, Paula, Martina, Vero. A todos mis compañeros de Micro, con quienes siempre aprendo algo nuevo a lo concerniente al mundo de lo microscópico.

A otros compañeros, que están cruzando el charco, Marcela, Cynthia y Alejandro con quienes fue muy grato poder aprender acerca del uso de vegetales en biocatálisis.

Por fuera de nuestra realidad científica, y que a veces cuesta entender, hay muchas personas que a través de su afecto permitieron la realización de esta Tesis. En ese sentido quiero agradecer a Analía, Rossana, Claudia, Cecilia, Ximena y Gastón.

A mi familia, Miguel y Cristina, Ema, Carlos, Andrea y Juan. Aimée y Jorge. Soporte fundamental para todos mis proyectos.

A mis hijos Inés, Lucía y Joaquín, quienes sin saberlo han tenido una paciencia infinita.

A mi esposo Wilson, que siempre está.

Tabla de Contenido

I. RESUMEN **1**

II. INTRODUCCIÓN **2**

A. Biocatálisis 2

B. Reacciones de reducción 6

1. Reducción química 6

2. Bio-reducción 7

C. Microorganismos endófitos, un nicho poco explorado 27

III. OBJETIVOS **35**

A. Objetivo general 35

B. Objetivos específicos 35

IV. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN ..... ¡Error! Marcador no definido.

A. Aislamiento de microorganismos endófitos a partir de cinco especies vegetales. 36

1. Elección de las plantas a estudiar 36

2. Estrategia para el aislamiento de microorganismos endófitos a partir de las plantas seleccionadas 44

V. RESULTADOS **49**

A. Estudio de la participación de los microorganismos endófitos en bio-reducciones mediadas por vegetales. 49

1. Ceibo (*Erythrina crista-galli*) 49

2. Zapallo (*Curcubita maxima*) 53

3. Hinojo (*Foeniculum vulgare*) 54

4. Rabanito (*R. Sativus*) 63

5. Zanahoria (*Daucus carota*) 89

B. Bio-reducción de cetonas proquirales para la obtención de compuestos con potencial utilidad en síntesis orgánica mediante células enteras 92

1. Biotransformación estereoselectiva de α-alquil-β-cetoésteres mediante bacterias y levaduras endófitas 92

2. Biotransformación de cetonas heterocíclicas mediante levaduras endófitas de zanahoria (*D. Carota*) 96

3. Reducción de una dicetona terpénica aquiral mediante zapallo (*Curcubita maxima*) y microorganismo endófitos aislados de esta especie vegetal 99

4. Bio-reducción de 2-acetilpiridina mediante *W. anomalus* sp. Z1 y *Leuconostoc* sp. Z2 103

VI. DISCUSIÓN 104

A. Determinación de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por vegetales 104

B. Obtención de biocatalizadores con actividad de interés 106

C. Empleo de microorganismos endófitos para la obtención de compuestos con potencial utilidad en síntesis orgánica mediante células enteras. 107

VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 109

VIII. EXPERIMENTAL 110

A. Materiales 110

1. Análisis químico 110
2. Material vegetal 111
3. Medios de cultivo 113
4. Reactivos de biología molecular 114

B. Metodología 114

1. Aislamiento de microorganismos endófitos 114
2. Ensayos para sustentar o descartar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por vegetales 116
3. Ensayos de prospección de actividad biocatalítica en partes frescas de *E. crista-galli*; *C. maxima*; *F. vulgare* y *R. sativus* 116
4. Ensayos de prospección de actividad biocatalítica frente a los α-etil acetoacetato de etilo y sustratos 2-acetilpiridina en callos de *D.carota*; plántulas y raíces transformadas de *R. sativus*. Acetofenona en raíces transformadas y plántulas de *R. Sativus*. 117
5. Procedimiento general para las bio-reducciones mediadas por microorganismos endófitos. 119
6. Análisis de las bio-reducciones 121
7. Identificación de las cepas endófitas con actividad biocatalítica de interés 127

IX. BIBLIOGRAFIA 134

Índice de Figuras.

Figura 1. Gráficas descritas por Straathof y colaboradores acerca del incremento de los procesos biocatalíticos en la industria **2**
Figura 2. Diferente aroma de los enantiómeros de α-terpineol **3**
Figura 3. Transferencia de hidruro desde el NAD(P)H hacia el carbono carbonilo del sustrato..... ... **8**
Figura 4. De acuerdo a la regla de Prelog se muestra el modelo de la preferencia estereoquímica para la transferencia del hidruro mediante una reducción catalizada por una deshidrogenasa. L es el sustituyente de mayor tamaño, S es el sustituyente menor…….. **9**
Figura 5. Rango de tamaños de sustratos utilizados por diferentes deshidrogenasas **10**
Figura 6. Bio-reducción estereocomplementaria de cetonas alifáticas mediante ADH con especificidad Prelog y anti-Prelog..... ..... **11**
Figura 7. Modelo utilizado para predecir la diastereoselectividad en reducciones mediadas por levadura. **13**
Figura 8. Bio-reducción estereocomplementaria de β-cetoésteres-α-sustituidos..... **14**
Figura 9. Reducción estereoespecífica del doble enlace C-C y del grupo carbonilo de la (-) carvona mediante células de *N. tabacum* **17**
Figura 10. Bio-reducción del compuesto natural aislado de *Ophryosporus axilliflorus* mediante tejido de *Baccharis crispa* y cultivos celulares de *Tessaria absinthioides*. **19**
Figura 11. Biotransformaciones de acetatos racémicos mediante diferentes sistemas de manzana y zanahoria. **20**
Figura 12. Biotransformación del compuesto 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona mediante RT de Pharbitis nil. **21**
Figura 13. Biotransformación de acetofenona mediante RT de *Pharbitis nil*. **22**
Figura 14. Reacciones de bio-reducción llevadas a cabo mediante zanahoria rallada por Baldasarre y colaboradores..... ..... **22**
Figura 15. Síntesis quimienzimática de 1,2,3-triazoles a partir de azidoacetofenonas……..... **24**
Figura 16. Biotransformaciones de compuestos aromáticos y alifáticos con grupos carbonilo, amidas y nitrobenceno mediadas por agua de coco. **26**
Figura 17. Estructura del paclitaxel. **29**
Figura 18. Biotransformación del compuesto grandisina mediante *Phomopsis* sp. **30**
Figura 19. Reducción de α-propargil acetoacetato de etilo (**43**) mediante microorganismos endófitos de *D. carota* **34**
Figura 20. Oxidación de tres alcoholes isoprenílicos mediante cultivos celulares de zapallo. .. **38**
Figura 21. Metilcetonas heterocíclicas y sus productos de reducción mediante especies vegetales…… **38**
Figura 22. Biotransformación de 1-acetoxi-2-metilciclohexeno (**53**) mediante vegetales (Bruni, Fantin et al. 2002)..... ..... **39**
Figura 23. Reducción de cetonas mediante plántulas de rabanito (Matsuo, Kawabe et al. 2008) **40**
Figura 24. Bio-reducción de (+)/(-)-alcanforquinonas (**56**; **57**) mediante R. sativus (Utsukihara, Watanabe et al. 2006) **41**
Figura 25. Bio-reducción de 1,2-ciclohexanodiona (**58**) mediante partes frescas de vegetales **41**
Figura 26. Bio-reducción de 2-metilciclohexanona (**13**) mediante partes frescas de vegetales. (Utsukihara, Watanabe et al. 2006)…….... **42**
Figura 27. Sustratos utilizados por Orden y colaboradores (Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009)..... .. **43**
Figura 28. Reducción de la dicetona racémica biciclo[3.3.1]nonano-2,6-diona mediante vegetales (Zilinskas and Sereikaite 2013)..... ..... **44**
Figura 29. Esquema planteado para llevar a cabo los experimentos de aislamiento de endófitos junto con la prospección biocatalítica del material vegetal y la incidencia de los microorganismos endófitos en la misma. **45**
Figura 30. Sustratos empleados en los objetivos específicos 1-3. ..... **46**
Figura 31. Estructura genérica de α-alquil-β-hidroxiésteres quirales **46**

Figura 32. 1,8-cineol (**74**) y algunos de sus posibles derivados **48**
Figura 33. 2-acetilpiridina (**44**) y (*S*)-2-piridinetanol (**44a**)..... **50**
Figura 34. Bio-reducción de cetonas proquirales mediante zapallo **54**
Figura 35. Diagrama de la región codificante para el ARN ribosomal en hongos y levaduras **61**
Figura 36. α-Etil acetoacetato de etilo (**72**) y los posibles productos de su reducción **66**
Figura 37. Acetofenona (**9**) y los posibles alcoholes obtenidos de su reducción..... **83**
Figura 38. Bio-reducción de α-etil acetoacetato de etilo (**72**) y α-metil acetoacetato de etilo (**78**) mediante microorganismos endófitos **93**
Figura 39. Estructura de la dicetona 73 y los cuatro productos posibles de monoreducción **99**
Figura 40. Biotransformación de 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**) mediante *C. maxima*; *Wickerhamomyces anomalus* Z1 y *Leuconostoc* sp. Z2..... **100**
Figura 41. Señales claves en el espectro 1H RMN del alcohol **77.**..... **100**
Figura 42. Constantes de acoplamiento determinadas para el espectro de 1H-RMN del compuesto **77**. **101**
Figura 43. Compuesto aromático obtenido de una reacción no enzimática a partir del 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**)..... **102**
Figura 44. α-etil acetoacetato de etilo (**72**) y α-metil acetoacetato de etilo (**78**) y sus posibles productos obtenidos por su reducción..... **124**
Figura 45. 2-acetilpiridina (**44**), 3-acetilpiridina (**45**), 4-acetilpiridina (**46**) y los alcoholes que se obtienen de su reducción **44-46 (a, b)** respectivamente **125**
Figura 46. Biotransformación de 3,5-dioxo-1,8-cineol mediante *C. maxima* y *Wickerhamomyces anomalus* Z1..... **126**
Figura 47. Acetofenona (**9**), (*S*)-1-feniletanol (**9a**), (*R*)-1-feniletanol (**9b**) **127**
Figura 48. Programa de PCR utilizado para la amplificación de ARN ribosomal de las cepas bacterianas endófitas. **129**
Figura 49. Regiones altamente conservadas de los genes de ARN ribosomal en hongos que fueron utilizadas para la amplificación de los ADN de las cepas endófitas aisladas..... **132**
Figura 50. Programa de PCR utilizado para la amplificación de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2 y la región D1-D2..... **133**

Índice de Tablas

Tabla 1. Reacciones biocatalíticas y clasificación enzimática según la Enzyme Comision (EC) de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)……. **4**
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los sistemas utilizando enzimas aisladas o células enteras. Adaptado de *Biotransformations in Organic Chemistry*, Kurt Faber (Faber 2011)…….. …. **5**
Tabla 3. Especies vegetales y órganos utilizados para el aislamiento de endófitos.…. **37**
Tabla 4. Especies vegetales y sustratos empleados.…… ….. **48**
Tabla 5. Bacterias endófitas aisladas a partir de hojas de ceibo…… ….. **49**
Tabla 6. Pruebas bioquímicas en cepas endófitas de ceibo…… …….. **52**
Tabla 7. Identificación a través del estudio filogenético en cepas endófitas de ceibo…. **52**
Tabla 8. Aislamientos de endófitos de zapallo en presencia de **44** (***ensayos a-d***)..…… **53**
Tabla 9. Recuento de microorganismos viables en los ***ensayos a-d*** a diferentes tiempos de incubación y cantidad de microorganismos aislados en cada ensayo…… **55**
Tabla 10. Recuento de microorganismos viables en los ***ensayos a-d*** a diferentes tiempos de incubación y cantidad de microorganismos aislados en cada ensayo…… **57**
Tabla 11. Pruebas bioquímicas en cepas endófitas de hoja de hinojo…….. …… **58**
Tabla 12. Recuento de microorganismos viables en los ***ensayos a-d*** a diferentes tiempos de incubación y cantidad de microorganismos aislados en cada ensayo…..... **59**
Tabla 13. Identificación de cepas endófitas de raíz de hinojo mediante pruebas bioquímicas.…… **60**
Tabla 14. Aislamientos y recuentos de microorganismos endófitos viables a partir de raíces frescas de rabanito…….. **64**
Tabla 15. Porcentajes de área en GC de los compuestos obtenidos en la bio-reducción de **72** mediante las bacterias endófitas aisladas a las 24 horas de reacción……... **65**
Tabla 16. Resultados obtenidos de la bio-reducción de **72** mediante *Cladosporium cladosporioides* vE13 con la adición de sustrato a los 8 días de crecimiento fúngico..... **73**
Tabla 17. Resultados obtenidos de la bio-reducción de **72** mediante *Cladosporium cladosporioides* vE13 con la adición de sustrato a las 48 horas de crecimiento fúngico……..... **75**
Tabla 18. Porcentaje de bio-conversión de **72** mediante raíces transformadas de rabanito con una concentración de sustrato de 10mM. …… **76**
Tabla 19. Bioconversión de acetofenona mediante raíces transformadas de *R. sativus* en las dos condiciones ensayadas…….. **77**
Tabla 20. Aislamientos y recuentos de microorganismos endófitos viables a partir de raíces frescas de rabanito…….. **79**
Tabla 21. Aislamientos y recuentos de microorganismos endófitos viables a partir de raíces frescas de rabanito…….. **82**
Tabla 22. Cepas endófitas utilizadas en la bio-reducción de **72** y **78** y los vegetales de donde se aislaron. …… **92**
Tabla 23. Bio-reducción de α-metil acetoacetato de etilo (**78**) y α-etil acetoacetato de etilo (**72**) mediante cepas de levaduras. …… **93**
Tabla 24. Bio-reducción de α-metil acetoacetato de etilo (**78**) y α-etil acetoacetato de etilo (**72**) mediante las cepas endófitas bacterianas…….. **97**
Tabla 25. Resultados obtenidos en las bio-reducciones de 2-, 3- y 4-acetilpiridina mediante la levadura endófita de zanahoria *Pichia* PDA en los diferentes tiempos evaluados…… **98**
Tabla 26. Resultados obtenidos de las bio-reducciones de los compuestos **44**, **45** y **46** mediante las dos cepas endófitas de levaduras estudiadas a las 24 horas de reacción…… **98**
Tabla 27. Constantes de acoplamiento y ángulos diedros.…… …… **101**
Tabla 28. Material vegetal empleado en las bio-reducciones y en los aislamientos de microorganismos endófitos.…… **111**
Tabla 29. Especies vegetales y sustratos empleados en los aislamientos de **117**

microorganismos endófitos…….....
Tabla 30. Microorganismos endófitos utilizados para la bio-reducción de los sustratos estudiados.…… **119**
Tabla 31. Condiciones para el análisis de las bio-reducciones por cromatografía gaseosa.……... **123**
Tabla 32. Tiempos de retención asignados para los sustratos α-alquil-β-cetoésteres y todos los posibles productos de los mismos.…… **124**
Tabla 33. Tiempos de retención asignados en GC quiral para los sustratos 2-acetilpiridina (**44**), 3-acetilpiridina (**45**) y 4-acetilpiridina (**46**) y los productos de los mismos obtenidos de su reducción……..……. **125**
Tabla 34. Tiempos de retención asignados a los compuestos 3,5-dioxo-1,8-cineol (**74**) y el compuesto obtenido mediante *Wickerhamomyces anomalus* Z1 y *C. maxima* en la biotransformación de **74**: 3-hidroxi-5-oxo-1,8-cineol (**77**) en GC. ……..... …….. **126**
Tabla 35. Primers internos específicos utilizados en la secuenciación de los productos de PCR obtenidos de las cepas endófitas fúngicas..……...…… **133**

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Porcentaje de bioconversión de 2-acetilpiridina (**44**) a (*S*)-2-piridinetanol (**44a**) obtenido con cepas endófitas de ceibo …….... **50**
Gráfica 2. Resultado de la biotransformación de 2-acetilpiridina (**44**) en ensayos ***a-d***…..... **51**
Gráfica 3. Resultados de de la bio-reducción de **44** mediante bacterias endófitas aisladas de tallo de hinojo a las 48 horas de reacción…….....…. **55**
Gráfica 4. Bio-reducción de **44** mediante tallos de hinojo en los ***ensayos a-d*** y en los diferentes tiempos evaluados.……..… **56**
Gráfica 5. Bio-reducción de **44** mediante bacterias endófitas aisladas de hojas de hinojo.…….…. **57**
Gráfica 6. Bio-reducción de 2-acetilpiridina (**44**) mediante hojas de hinojo en los ***ensayos a-d*** en los distintos tiempos ensayados.…… …….. **59**
Gráfica 7. Bio-reducción de 2-acetilpiridina (**44**) a (*S*)-2-piridinetanol (**44a**) mediante cepas endófitas de raíz de hinojo…….... **60**
Gráfica 8. Bio-reducción de 2-acetilpiridina (**44**) a (*S*)-2-piridinetanol (**44a**) mediante raíz de hinojo en los ***ensayos a-d*** en los distintos tiempos ensayados.……..... **62**
Gráfica 9. Estudio comparativo de la bio-reducción de **44** mediante tallos, hojas y raíces de hinojo en los ***ensayos a-d***…… **63**
Gráfica 10. Estudio de la bio-reducción de α-etil acetoacetato de etilo (**72**) mediante la cepa endófita Eiiix1aTSA a distintos tiempos de reacción.……. **67**
Gráfica 11. Estudio de la bio-reducción de α-etil acetoacetato de etilo (**72**) mediante la cepa endófita Eix1a PDA a distintos tiempos de reacción.……. **67**
Gráfica 12. Porcentajes de área en GC de los compuestos obtenidos a las 96 horas de bio-reducción de **72** mediante raíz de rabanito…..... **69**
Gráfica 13. Porcentaje de los compuestos presentes en cada uno de los tiempos ensayados en la bio-reducción de **72** mediante el hongo endófito *Penicillium chrysogenum* vA8.…… …….. **71**
Gráfica 14. Porcentaje de los compuestos presentes en cada uno de los tiempos ensayados en la bio-reducción de **72** mediante el hongo endófito *Cladosporium cladosporioides* vE13.……..……..…… … **71**
Gráfica 15. Porcentajes de área en GC de los compuestos obtenidos a las 96 horas de bio-reducción del compuesto **72** mediante plántulas de rabanito.……. **74**
Gráfica 16. Bio-reducción de α-etil acetoacetato de etilo (**72**) mediante plántulas de rabanito a una concentración de sustrato de 2.5mM..... **74**
Gráfica 17. Porcentaje de bio-reducción de α-etil acetoacetato de etilo mediante raíces transformadas de rabanito a una concentración de sustrato de 2.5mM.…….. **76**
Gráfica 18. Porcentaje de bioconversión de **44** mediante bacterias endófitas aisladas de raíz de *R. sativus* a las 144 horas de reacción…….....…….…. **78**
Gráfica 19. Porcentajes de área en GC de los compuestos obtenidos a las 96 horas de bio-reducción de **44** mediante raíz de rabanito…….. **79**
Gráfica 20. Bio-reducción de 2-acetilpiridina (**44**) mediante el hongo endófito *Penicillium chrysogenum* vA8……. **80**
Gráfica 21. Bio-reducción de 2-acetilpiridina por el hongo endófito *Cladosporium cladosporioides* vE13.……..……..…….. **80**
Gráfica 22. Bio-reducción de 2-acetilpiridina mediante plántulas de rabanito a una concentración de sustrato 2.5mM y 7 días de reacción.…… …….. **82**
Gráfica 23. Resultados obtenidos de la bio-reducción de acetofenona (**9**) mediante plántulas de rabanito a una concentración de sustrato de 10mM y 96 horas de reacción….. **85**
Gráfica 24. Resultados obtenidos de la bio-reducción de acetofenona (**9**) mediante plántulas de rabanito a una concentración de sustrato de 2.5mM y 7 días de reacción……. **86**
Gráfica 25. Bioconversión de acetofenona (**9**) mediante raíces transformadas sin moler de rabanito …… **87**
Gráfica 26. Bio-reducción de acetofenona (**9**) mediante raíces transformadas molidas de rabanito ……..…….. **87**
Gráfica 27. Bio-reducción de α-etil acetoacetato de etilo mediante células indiferenciadas de zanahoria en los ***ensayos a-e*** a las 96 horas de reacción.…….. **90**
Gráfica 28. Bio-reducción de 2-acetilpiridina mediante células indiferenciadas de zanahoria.…… **90**

Índice de Fotos

Foto 1. Células indiferenciadas de *D. carota*……... **112**
Foto 2. Raíces transformadas de *Raphanus sativus*…… **112**
Foto 3. Plántulas de *Raphanus sativus*…… **113**

RESUMEN

La reducción asimétrica de cetonas proquirales es una metodología muy empleada para la preparación de alcoholes secundarios ópticamente activos. Este tipo de compuestos son utilizados como tales o como bloques para la preparación de fármacos, aromas, agroquímicos, auxiliares quirales, entre otras moléculas de interés.

La fabricación de moléculas quirales ópticamente puras requiere de procesos tecnológicamente complejos y puede involucrar costos económicos y ambientales considerables. Desde esa perspectiva los procesos biocatalíticos encuentran un nicho de aplicación ideal ya que las reacciones biocatalizadas son exquisitamente selectivas y en general involucran un bajo impacto ambiental. Incluso la incorporación de una etapa biocatalítica en el paso crucial de introducción de quiralidad de una secuencia de síntesis, puede redundar en un aumento considerable de la eficiencia del proceso total y en una disminución significativa del consumo energético y la generación de residuos ambientalmente agresivos.

El uso de células enteras que lleven a cabo este tipo de reacciones representa una estrategia atractiva ya que no requiere la purificación de enzimas, y evita la adición de cofactores o de sistemas de regeneración de los mismos. Muchos microorganismos, tales como levaduras y hongos filamentosos, han sido utilizados para catalizar reducciones estereoselectivas de cetonas proquirales. Estos biocatalizadores pueden dar lugar a alcoholes *R* o *S*, pero en general siguen la Regla de Prelog de bio-reducciones lo que aporta predictibilidad a la estrategia.

En los últimos años se comenzó a utilizar partes frescas de vegetales para llevar a cabo reacciones biocatalíticas. Dado que los microorganismos endófitos y sus plantas hospederas se interrelacionan mediante un complejo sistema de comunicación químico y bioquímico es razonable pensar que una determinada actividad enzimática observada en una planta pueda deberse total o parcialmente a sus microorganismos endófitos, o bien que la expresión de la/s proteína/s involucradas pueda resultar elicitada por la presencia de estos.

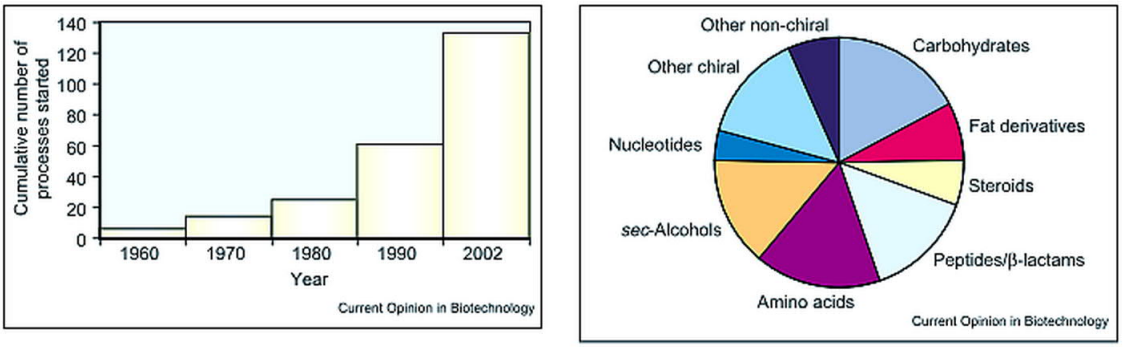
En el marco de la presente tesis se estudió la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones estereoselectivas de los compuestos α-etil acetoacetato de etilo, 2-acetilpiridina, acetofenona y 3,5-dioxo-1,8-cineol cuando se emplearon las especies vegetales ceibo (*E. crista-galli*), zapallo (*C. maxima*), hinojo (*F. vulgare*), rabanito (*R. sativus*) y zanahoria (*D. carota*) como agentes biocatalizadores. De los resultados reunidos en la presente Tesis se pudo inferir que los microorganismos endófitos tuvieron una incidencia importante en las bio-reducciones estudiadas.

Por otra parte, dado que el desarrollo del área de la biocatálisis requiere el continuo descubrimiento o diseño de nuevos biocatalizadores, se trabajó en el aislamiento de microorganismos endófitos como fuente potencial de nuevos biocatalizadores. De esta forma se aislaron, a partir de las especies vegetales estudiadas, setenta y nueve cepas endófitas con actividad reductasa. Entre los cuales, las cepas de levadura *W anomalus* Z1 y *R. glutinis* H93 así como la cepa bacteriana *E. agglomerans* C8 resultaron excelentes biocatalizadores para la obtención de alcoholes con configuración Prelog; mientras que las bacterias *Pseudomonas* sp. Eiiix1a, *Stenotrophomonas* sp. Eix1a PDA y *B. megaterium* CM14 mostraron ser útiles para la obtención de alcoholes anti-Prelog.

INTRODUCCIÓN

Biocatálisis

El empleo de catalizadores naturales, células enteras o enzimas aisladas, para transformar compuestos orgánicos no naturales se ha visto incrementado en los últimos años. En la figura 1 se muestra la evolución del empleo de procesos biocatalíticos a escala industrial así como el tipo de compuestos obtenidos en estas reacciones (Straathof, Panke et al. 2002).



Total acumulado de procesos biocatalíticos que han alcanzado la etapa industrial

Clases de compuestos producidos mediante procesos biocatalíticos (en base a 134 procesos industriales).

Figura 1. Gráficas descritas por Straathof y colaboradores acerca del incremento de los procesos biocatalíticos en la industria (Straathof, Panke et al. 2002).

Esto se debe fundamentalmente a que las reacciones biocatalíticas presentan una serie de ventajas sobre la catálisis convencional como ser que se llevan a cabo bajo condiciones suaves de reacción, por lo general a temperaturas cercana a la ambiente (20-40ºC) y a pH cercano al neutro. El empleo de estas condiciones minimiza los problemas de formación de subproductos por reacciones colaterales, tales como isomerización, racemización y rearreglos, lo cual es muy frecuente en síntesis orgánica clásica (Faber 2011). A su vez gran parte de ellas se realizan en agua y utilizan reactivos biodegradables por lo que son ambientalmente amigables (Nakamura, Yamanaka et al. 2003; Rasmussen, Dumsday et al. 2005). A lo anterior se suman sus principales ventajas que están asociadas a la especificidad de las enzimas como reactivos:

- *Quimioselectividad*, reaccionan selectivamente con un único tipo de grupo funcional en una molécula que presente varios grupos funcionales distintos.
- *Regioselectividad*, actúan sobre un grupo funcional determinado en una molécula en la cual existe un grupo funcional similar o idéntico en reactividad lo cual lleva a la formación de un único isómero estructural de todos los que se podrían formar en la reacción.
- *Estereoselectividad*, reconocen quiralidad o proquiralidad en un sustrato lo cual lleva a la formación de un estereoisómero sobre todos los que pueden formarse en la reacción. Por ende este tipo de metodología es muy interesante para la obtención de productos ópticamente puros.

Este último aspecto es muy importante debido a que es cada vez mayor el requerimiento de productos finales ópticamente puros en las formulaciones farmacéuticas, en el área de

agroquímicos y la industria de alimentos (García-Urdiales, Alfonso et al. 2005; Patel 2008). Dado que las macromoléculas de los seres vivos son enantiomericamente puras, la quiralidad de un compuesto es muchas veces determinante de su actividad biológica. Desde el trágico ejemplo de talidomida, es cada vez mayor la exigencia de rutas sintéticas estereoselectivas para la producción de fármacos (Blaser 2013). Algunos organismos reguladores como la Food and Drug Administration (FDA, EEUU), se ven cada vez más reacios en permitir la producción de drogas no quirales. En el año 2000, el 35% de los intermediarios farmacéuticos fueron quirales, número que se estima se ha duplicado a la fecha (Yu, Xu et al. 2009). En el área de agroquímicos se impulsa el uso de compuestos ópticamente puros debido a que en algunos casos persiste en el ambiente el enantiómero inactivo.

También en el área de la industria perfumera y alimenticia existen requerimientos de estereoisómeros puros dado que los diferentes isómeros presentan distinto aroma o sabor, un ejemplo es la diferencia aromática que presentan los enantiómeros del α-terpineol (Figura 2).

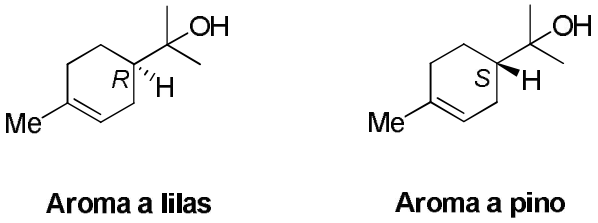


Figura 2. Diferente aroma de los enantiómeros de α-terpineol.

Las ventajas mencionadas han llevado a un crecimiento exponencial del área de biocatálisis. Además esta metodología abarca un amplio espectro de reacciones (Faber 2011) y existen numerosos estudios orientados a la búsqueda de nuevos biocatalizadores así como al mejoramiento de los ya existentes. En la tabla 1 se enumeran algunas reacciones biocatalíticas junto con las enzimas responsables de cada una de las reacciones.

Las hidrolasas son las enzimas más utilizadas en biocatálisis tanto para hidrólisis como para síntesis, ya que son versátiles, están fácilmente disponibles, no necesitan cofactores y son activas en solventes orgánicos. El segundo tipo enzimático más utilizado son las oxido-reductasas, generalmente se emplean en células enteras debido a que necesitan cofactores para llevar a cabo las reacciones.

Las células más utilizadas en biocatálisis son las microbianas frente a las células vegetales o animales debido a que su cultivo es más sencillo, presentan rápido crecimiento y son capaces de utilizar un espectro más amplio de sustratos.

Tabla 1. Reacciones biocatalíticas y clasificación enzimática según la Enzyme Comision (EC) de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB).

Categoría	Ejemplos de enzimas usadas en síntesis
Oxido-reductasas: oxidación de alcanos, alcoholes, aldehídos, sulfuros y sulfóxidos; reducción de alquenos, aldehídos y cetonas. Epoxidación de alquenos, hidroxilación y dihidroxilación de compuestos aromáticos y oxidación Baeyer-Villiger de cetonas.	deshidrogenasas; oxigenasas; citocromos P-450; peroxidasas
Transferasas: transferencia de grupos aldehídos, cetónicos, fosforilos, acilo o metilos	Transaminasas; quinasas
Hidrolasas: hidrólisis-síntesis de esteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilos, éteres, ácidos anhídridos, epóxidos y nitrilos	Lipasas; esterasas; acilasas; proteasas; fosfatasas; glicosilasas
Liasas: adición-eliminación de pequeñas moléculas en enlaces C=C, C=O, C=N.	aldolasas (C=O); fumarasas; hidratasas; amonio liasas; oxinitrilasas
Isomerasas: catalizan procesos de isomerización tales como epimerización, racemización y rearreglos.	Fructosa-glucosa isomerasa
Ligasas: formación-clivaje de enlaces C-O, C-S, C-N, C-C, P-O con concomitante clivaje trifosfato.	T4 ADN ligasa

El estado fisiológico del agente biocatalizador utilizado para realizar las biotransformaciones puede ser diverso. La elección de utilizarlo como enzimas aisladas, o células enteras, tanto en forma libre como inmovilizada, depende de factores como tipo de reacción, necesidad de cofactores, y escala en la que se realizará la biotransformación, entre otros (Hollmann, Arends et al. 2011).

El uso de enzimas aisladas presenta como ventajas la alta especificidad para la reacción seleccionada, evitando reacciones secundarias, el requerimiento de equipamiento sencillo, la recuperación del producto es simple y los solventes orgánicos en general son bien tolerados. Sin embargo presentan una serie de desventajas como ser el alto costo relacionado con el aislamiento de enzimas intracelulares, así como la necesidad de adicionar cofactores (Muñoz Solano, Hoyos et al. 2012).

El empleo de células enteras resulta sumamente económico debido a que no se necesita aislar y purificar la enzima de interés, ni adicionar cofactores. Los mayores inconvenientes se asocian a la existencia de reacciones secundarias importantes, restricciones difusionales y lisis celular en el caso de que el producto o sustrato utilizado resulte tóxico (Tabla 2).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los sistemas utilizando enzimas aisladas o células enteras. Adaptado de *Biotransformations in Organic Chemistry*, Kurt Faber (Faber 2011).

Biocatalizador	Forma	Ventajas	Desventajas
Enzimas aisladas	Cualquiera	• equipamiento sencillo • recuperación del producto simple • alta productividad dada por la tolerancia a alta concentración de sustrato	• alto costo • necesidad de cofactores
	Disueltas en agua	• alta actividad enzimática	• reacciones secundarias • sustratos lipofílicos insolubles • necesidad de extracción de productos
	Suspendidas en disolventes orgánicos	• manipulación simple • sustratos lipofílicos solubles • fácil recuperación enzimática	• baja actividad
	Inmovilizadas	• fácil recuperación enzimática • reuso del biocatalizador	• en algunos casos, perdida de actividad debida a la inmovilización
Células enteras	Cualquiera	• bajo costo • presencia de cofactores enzimáticos	• equipamiento caro • tediosa recuperación del producto • baja productividad debido a la poca tolerancia a concentración de sustrato • poca tolerancia a solventes orgánicos • reacciones secundarias
	células en crecimiento	• alta actividad	• elevada biomasa • formación de subproductos • difícil control del proceso
	células en reposo	• recuperación de productos más sencilla	• baja actividad
	células inmovilizadas	• posible reuso de células	• baja actividad

Reacciones de reducción

La conversión de cetonas a sus correspondientes alcoholes representan una de las reacciones de oxido-reducción más frecuentes en química orgánica (Kroutil, Mang et al. 2004). Los alcoholes ópticamente puros son utilizados como bloques en la síntesis de compuestos bioactivos tales como productos farmacéuticos, agroquímicos y productos naturales (Faber 2011).

La obtención de alcoholes ópticamente puros se puede llevar a cabo mediante la reducción asimétrica de cetonas a través de catálisis química o mediante el uso de la biocatálisis (Soni and Banerjee 2006).

Reducción química

La reducción del grupo carbonílico en aldehídos y cetonas es una reacción clásica que puede llevarse a cabo con hidruros metálicos como hidruro de litio y aluminio ($LiAlH_4$) o el borohidruro de sodio ($NaBH_4$) entre otros. En general el $NaBH_4$ es el reactivo de elección por su selectividad, precio y bajo riesgo de operación. Otras estrategias utilizados menos frecuentemente son la hidrogenación catalizada por platino o rutenio, la reducción con sodio metálico y la reacción de Canizzaro (Geissman 2011).

En el caso de cetonas la reducción da lugar a un alcohol secundario potencialmente quiral. La reducción estereoselectiva de cetonas proquirales es una reacción importante y se han desarrollado varias técnicas para llevarla a cabo.

Una opción es el uso complejo de un hidruro metálico con un ligando quiral. Los complejos así formados poseen discriminación facial y por lo tanto reducen la cetona preferentemente por una de las caras enantiotópicas, dando lugar al alcohol quiral correspondiente en diverso grado de exceso enantiomérico. Ejemplos de estos reactivos son complejos de BINOL e incluso boranos unidos a un compuesto natural no-racémico como el α-pineno. Estos reactivos deben ser usados en cantidad estequiométrica lo que resulta en su principal limitación (Midland and Lee 1985; Chan and Chong 1988).

Una mejor opción es la adición de reactivos quirales en cantidad catalítica, mientras el agente reductor (generalmente un borano o hidrógeno molecular) es adicionado en forma estequiométrica. Entre los ejemplos de estas reacciones se destacan las hidrogenaciones en presencia de Ru(BINAP) y las reducciones con oxazaborolidina utilizando catecolborano como reductor estequiométrico (Noyori, Ohkuma et al. 1987).

Estos y otros varios métodos de reducción se encuentran descritos y revisados en la literatura de síntesis orgánica (Cho 2009; Chen, Ye et al. 2013). El alcance y las limitaciones de estos métodos son variados. En general presentan la ventaja de que dan fácil acceso a ambos enantiómeros del alcohol ya que los catalizadores están disponibles en ambas versiones y su principal limitación se relaciona con el costo de los reactivos, la seguridad de manejo, las condiciones a menudo extremas de temperatura requeridas para obtener elevada enantioselectividad y el riesgo ambiental vinculado al uso de metales pesados como rutenio o rhodio.

Bio-reducción

El empleo de métodos biocatalíticos para la reducción de cetonas proquirales se ha incrementado durante la última década (Rajagopalan and Kroutil 2011). Este aumento se asocia a las ventajas anteriormente mencionadas de los biocatalizadores con respecto a metodologías sintéticas convencionales en lo que respecta a regioselectividad, estereoselectividad, biodegradabilidad de los reactivos y condiciones suaves de reacción.

Por otra parte, muchos de los biocatalizadores utilizados para las reacciones de reducción, enzimas aisladas y células enteras, están disponibles comercialmente y prontos para ser usados de forma semejante a los reactivos químicos o enzimas hidrolíticas. Ejemplos de los mismos son la levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae*, la enzima alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobium brockii* (TBADH), alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH), deshidrogenasas de *Pseudomonas testosteroni* y *Bacillus spherisus.*

Clasificación enzimática y mecanismos de reacción

Las enzimas empleadas en reacciones redox, denominadas como oxidoreductasas EC1.-, se clasifican en tres categorías: deshidrogenasas, oxidasas y oxigenasas. Entre ellas, las alcohol deshidrogenasas, también denominadas carbonilo reductasas, han sido ampliamente utilizadas en la reducción de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas), mientras que las enoatoreductasas se utilizan en la reducción de dobles enlaces carbono-carbono activados (Faber 2011).

Las reacciones de reducción generalmente implican la transformación de un carbono con hibridación sp^2 plano en un carbono sp^3 tetrahédrico, lo cual transcurre con la generación de un centro estereogénico. Dado que el carbono sp^2 posee dos caras enantiotópicas, la reducción controlada desde una sola de las caras da lugar a cada uno de los enantiómeros. En contraste, el proceso correspondiente inverso (oxidación de alcoholes) lleva a la destrucción del centro quiral, lo cual generalmente es de uso limitado.

Las deshidrogenasas catalizan reacciones redox reversiblemente y por tanto son biocatalizadores oxidantes como reductivos. De forma distinta, las oxigenasas y oxidasas catalizan oxidaciones de forma irreversible.

Dependiendo de su especificidad de sustrato las deshidrogenasas catalizan la reducción de compuestos pro-quirales a sus correspondientes productos rindiendo alcoholes enantiomericamente puros, hidroxiácidos, hidroxiésteres, aminas y amino ácidos (Gamenara, Seoane et al. 2013) .

Los sustratos naturales de las alcohol deshidrogenasas, son alcoholes tales como etanol, lactato y glicerol, así como los correspondientes compuestos carbonílicos, sin embargo las cetonas no naturales también pueden ser reducidas enantioselectivamente por estas enzimas (Nakamura, Yamanaka et al. 2003).

Para poder llevar a cabo la catálisis, las deshidrogenasas requieren cofactores tales como NADH o NADPH, a partir de las cuales el hidruro es transferido al carbono del grupo carbonilo. En la figura 3 se muestran cuatro modelos estereoquímicos posibles de la transferencia del hidruro desde la coenzima NAD(P)H al sustrato (Nakamura, Yamanaka et al. 2003; Gamenara, Seoane et al. 2013). En el modelo con las enzimas E1 y E2, el hidruro ataca la cara *si* del grupo carbonilo obteniendo de esta forma los alcoholes *R*, mientras que

con las enzimas E3 y E4 el hidruro ataca la cara *re* resultando la formación de los alcoholes *S*.

Dado que, los cofactores NADH y NADPH poseen dos átomos de hidrógeno diastereotópicos (pro-*R* y pro-*S*) que pueden ser transferidos como hidruro a un sustrato oxidado (aldehído, cetona o imina), surge el modelo en el que las enzimas E1 y E3 trasfieren el hidruro pro-(*R*) de la coenzima, y las enzimas E2 y E4 emplean el hidruro pro-(*S*). Algunos ejemplos de los modelos enzimáticos E1- E3 son: E1, alcohol deshidrogenasa de *Pseudomonas* sp. (Bradshaw, W. et al. 1992), alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir (Bradshaw, W. et al. 1992)*; E2, glicerol deshidrogenasa de *Geotrichum candidum* (Nakamura, Yoneda et al. 1988; Nakamura, Shiraga et al. 1990; Nakamura, Takano et al. 1992), dihidroxiacetona reductasa de *Mucor javanicus (Dutler, Van Der Baan et al. 1977)*; E3, alcohol deshidrogenasa de levadura (Prelog 1964), alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (Davies and Jones 1979; Jones 1986; Lam, Gair et al. 1988), alcohol deshidrogenasa de *Moraxella* sp. (Velonia, Tsigos et al. 1999)

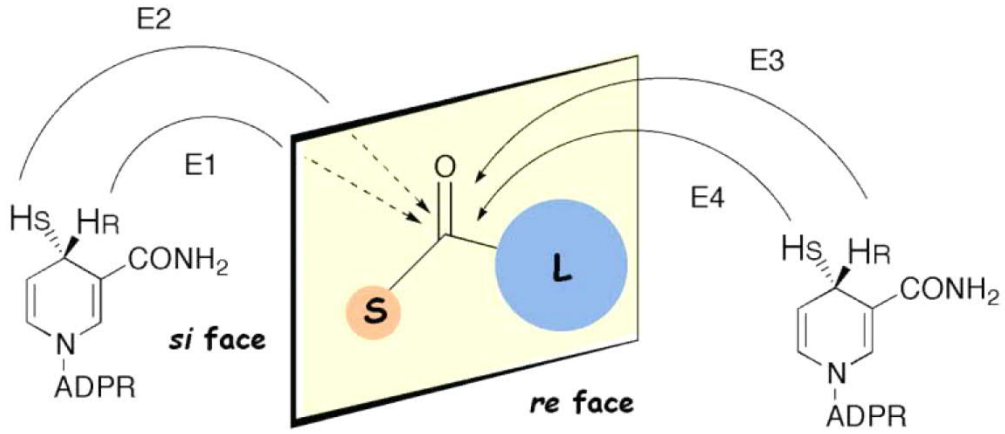


Figura 3. Transferencia de hidruro desde el NAD(P)H hacia el carbono carbonilo del sustrato. Esquema descrito en *Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts* por Nakamura y colaboradores (Nakamura, Yamanaka et al. 2003).

En la mayor parte de los trabajos citados en la literatura se describe que las enzimas alcohol deshidrogenasas (ADHs) catalizan la transferencia del hidruro pro-(*R*) desde el cofactor (NADH o NADPH) a la cara *Re* del grupo carbonilo (mecanismo E3) obteniendo de esta forma los alcoholes *S*. Este comportamiento se describe a través de la regla de Prelog (Prelog 1964). En 1964, Prelog realizó una serie de experimentos para evaluar que características en una molécula dada son las responsables de la estereoespecificidad en la bio-reducción. Para ello, realizó reacciones de bio-reducción de una serie de derivados de ciclohexanona y decalonas mediante una oxidoreductasa obtenida del hongo *Curvularia falcata* y una alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH) . Mediante un modelado con varios sustratos estableció que el curso esteroquímico de una bio-reducción depende principalmente de los requerimientos estéricos del sustrato y puede ser predicho para muchas de las reacciones llevadas a cabo mediante deshidrogenasas descriptas al momento, aunque existen excepciones (Figura 4).

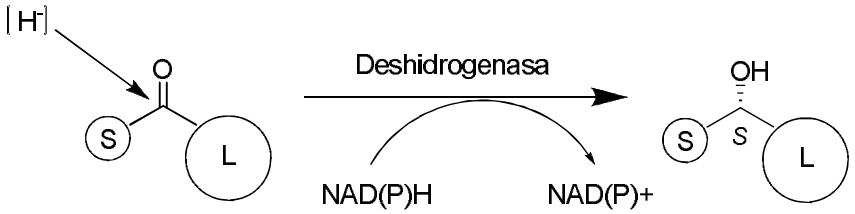


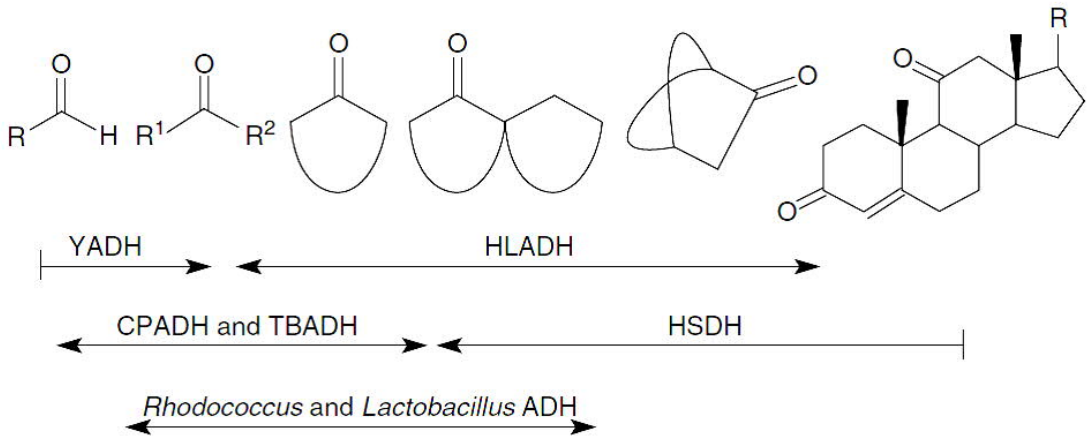
Figura 4. De acuerdo a la regla de Prelog se muestra el modelo de la preferencia estereoquímica para la transferencia del hidruro mediante una reducción catalizada por una deshidrogenasa. **L** es el sustituyente de mayor tamaño, **S** es el sustituyente menor.

Reducción de aldehídos y cetonas mediante enzimas aisladas

Las enzimas redox requieren cofactores que donen o acepten los equivalentes químicos para la reducción (u oxidación). Los cofactores nicotinamida adenín dinucleótido [NAD (H)] y su respectivo fosfato [NADP (H)] son empleados por la mayoría de las enzimas redox. (Faber 2011). Estos compuestos presentan las desventajas de ser moléculas muy inestables y su precio es prohibitivo para ser utilizados en cantidades estequiométricas. Dado que es el estado de oxidación del cofactor lo que cambia durante la reacción mientras que la estructura de complejo permanece intacta, una alternativa para el uso del mismo, es su regeneración *in situ* mediante el empleo de una segunda reacción redox simultánea que permita reinsertar el cofactor en el ciclo de reacción. De esta forma, se posibilita su uso, en lo que refiere al costo de la reacción, pues el cofactor se utilizaría en cantidades catalíticas (Faber 2011). La regeneración de cofactores puede llevarse a cabo mediante metodologías enzimáticas, químicas, electroquímicas y fotoquímicas. La metodología enzimática es la única que posee aplicación comercial ya que presenta adecuados niveles de reciclado del cofactor, no produce reacciones secundarias no deseadas y los reactivos no son caros (Gamenara, Seoane et al. 2013).

Un amplio rango de cetonas pueden ser reducidas estereoselectivamente mediante deshidrogenasas rindiendo alcoholes secundarios quirales. La mayor parte de las alcohol deshidrogenasas (ADHs) catalizan las reacciones de reducción de cetonas siguiendo la regla de Prelog, rindiendo predominantemente los alcoholes *S*, si se asume que el sustituyente de menor tamaño en el sustrato cetona es el de menor prioridad de acuerdo con las reglas de Cahn, Ingold y Prelog (Cahn and Ingold 1951). Las deshidrogenasas que están disponibles comercialmente para la reducción de cetonas, en su gran mayoría, tienen este comportamiento, entre las mismas encontramos la alcohol deshidrogenasa de levadura (YADH) y la deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH) (Faber 2011).

En la figura 5 se muestran las enzimas deshidrogenasas mayormente utilizadas y el tamaño de sustrato que aceptan (Faber 2011). Se observa que cada enzima tiene una marcada especificidad de sustrato. Por ejempo, YADH posee una estrecha especificidad de sustrato, mientras que HLADH es una enzima con amplia especificidad de sustrato y excelente estereoselectividad. Por otra parte, todas las enzimas que figuran presentan, en gran medida, actividad Prelog. Dado que se conocen numerosas enzimas con actividad Prelog y en mucho menor medida enzimas con actividad anti-Prelg, es de gran importancia la búsqueda de enzimas con esta actividad y con especificidades de sustrato diferentes ya que esto posibilitaría ampliar el rango de reacciones biocatalíticas



YADH yeast alcohol dehydrogenase; *HLADH* horse liver alcohol dehydrogenase; *CPADH Candida parapsilosis* alcohol dehydrogenase; *TBADH Thermoanaerobium brockii* alcohol dehydrogenase

Figura 5. Rango de tamaños de sustratos utilizados por diferentes deshidrogenasas. Esquema extraído del libro *Biotransformations in Organic Chemistry* de Kurt Faber (Faber 2011).

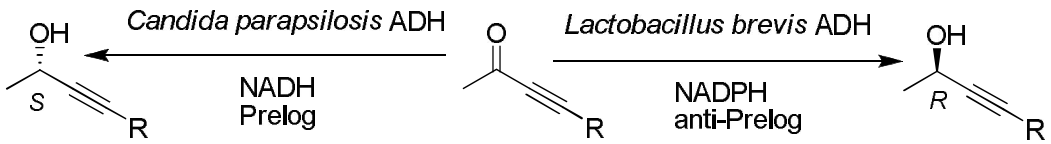
La enzima alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir* (LKADH) es un ejemplo de enzima con actividad anti-Prelog que está disponible comercialmente. Esta enzima, tanto en forma de enzima aislada como en célula entera, acepta un amplio rango de sustratos (acetofenona, derivados halogenados, cetonas cíclicas, α- y β-cetoésteres) (Hou, Patel et al. 1981; Hummel 1990; Bradshaw, W. et al. 1992). Se han descrito otras enzimas alcohol deshidrogenasas con actividad anti-Prelog provenientes de cepas bacterianas. En este sentido, está descrita la alcohol deshidrogenasa de *Leifsonia* sp. (LSADH), que fue empleada en forma parcialmente purificada en la reducción de un amplio rango de cetonas proquirales y cetoésteres rindiendo alcoholes secundarios ópticamente puros con elevados excesos enantioméricos (Inoue, Makino et al. 2005). Por otra parte, Hildebrant y colaboradores emplearon la enzima alcohol deshidrogenasa proveniente de la cepa *Pseudomonas fluorescens* (PFADH) en forma recombinada y sobreexpresada en *E. coli* para la reducción de cetonas alifáticas en la obtención de los alcoholes *R* (Hildebrandt, Riermeier et al. 2001). Sih y colaboradores han reportado la actividad de una β-cetoéster reductasa de la cepa *Paucimonas lemoignei*. Esta enzima, utilizada como enzima aislada, permite acceder al enantiómero *syn* (2*S*, 3*R*) de los α-alquil-β-hidroxiésteres (Shieh and Sih 1993).

Panizza y colaboradores describieron el uso de una cepa recombinante de *Escherichia coli* que expresó una α-aquil-β-cetoéster reductasa. Con la misma se obtuvo el compuesto *anti* (2*R*, 3*R*) α-alquil-β-hidroxiéster como producto mayoritario. Esta enzima fue identificada a partir de una biblioteca genómica de *Paucimonas lemoignei,* posteriormente fue clonada y expresada en *E. coli*, logrando de esta forma un biocatalizador con una novedosa estereoselectividad ya que fue el primer trabajo en donde se describió la obtención del compuesto *anti* (2*R*, 3*R*) α-alquil-β-hidroxiéster en un sistema de célula entera (Panizza, Onetto et al. 2007).

Otra ADH con excelente actividad anti-Prelog provino de la cepa *Comamonas testosteroni* DSM 1455, esta enzima fue utilizada mediante el empleo de células enteras liofilizadas con

la estrategia sustrato acoplado y la adición de 2-propanol como donador de hidrógeno para la reducción asimétrica de diferentes azido-, bromo- y nitrocetonas (Wallner, Lavandera et al. 2008).

En la reducción asimétrica de carbonilos, es posible obtener ambos estereoisómeros de alcoholes secundarios si se utilizan deshidrogenasas estereocomplementarias. Por ejemplo se puede llevar a cabo la reducción de cetonas alifáticas que poseen un sustituyente pequeño y otro grande de cada lado mediante el uso de enzimas con especificidad Prelog y anti-Prelog. En la figura 6 se muestra la bio-reducción estereocomplementaria de varias cetonas alquílicas para la obtención de los correspondientes alcoholes propargílicos mediante el uso de la alcohol deshidrogenasa de *Candida parapsilosis* que presenta especificidad Prelog y la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis* que posee actividad anti-Prelog (Schubert, Hummel et al. 2001; Faber 2011).



R: H; $SiMe_3$; $SiMe_2Ph$; Ph; 2-Piridil

Figura 6. Bio-reducción estereocomplementaria de cetonas alifáticas mediante ADH con especificidad Prelog y anti-Prelog.

Reducción de aldehídos y cetonas mediante células enteras

El uso de células enteras para llevar a cabo reacciones redox evita el problema de reciclado de cofactores, ya que las células poseen los sistemas enzimáticos y cofactores necesarios para llevar a cabo su metabolismo. Por tanto, el reciclado de cofactores se produce naturalmente dentro de la célula. De esta forma se pueden utilizar como sustratos auxiliares para las reacciones de reducción asimétrica fuentes de carbono de bajo costo, por ejemplo sacarosa o glucosa. Por otra parte, tanto las enzimas como los cofactores están protegidos dentro del ambiente celular.

Sin embargo, se deben tener en cuenta algunos inconvenientes en el momento de emplear células enteras para llevar a cabo reacciones redox. Por un lado, la productividad de las conversiones microbianas generalmente es baja debido a que muchas veces el sustrato no natural resulta tóxico en organismos vivos y por tanto debe ser utilizado en concentraciones bajas (~0.1–0.3% por volumen). Otra desventaja representa la gran cantidad de biomasa presente en el medio de reacción que por un lado causa una disminución en el rendimiento de la reacción y por otra parte dificulta la recuperación del producto, especialmente si el producto permanece intracelularmente. Con respecto al sustrato auxiliar, únicamente una fracción del mismo (0.5-2%), se utiliza para el reciclado de cofactores, el resto es metabolizado y como consecuencia se forman productos polares que repercuten en los procesos de purificación del producto (Faber 2011).

Asimismo, la estereoselectividad de la reacción puede variar enormemente. Por un lado, un sustrato puede ser reducido por una única oxidoreductasa vía los estados de transición

hacia dos enantiómeros los cuales tienen valores de energía libre similares. Por tanto, se lleva a cabo un reconocimiento ineficiente del sustrato pro-quiral. Por otra parte, si dos enzimas, cada una con alta pero opuesta estereoquímica, compiten por el mismo sustrato, la pureza óptica del producto será determinada por la velocidad relativa de las reacciones individuales. Esto último, a su vez, depende de la concentración de sustrato ya que: a concentraciones por debajo de la saturación, la velocidad relativa está determinada por la relación Vmáx/Km de cada enzima. Sin embargo, cuando se alcanza la saturación usando una elevada concentración de sustrato, la velocidad relativa depende principalmente de la relación de kcat de las dos reacciones. Consecuentemente, cuando dos (o más) enzimas están involucradas en la biotransformación de sustratos proquirales, la pureza óptica de los productos depende de la concentración de sustrato, dado que los valores de Km y kcat para el sustrato son diferentes para ambas enzimas competidoras. En levaduras este fenómeno es bien conocido, y las concentraciones bajas de sustrato favorecen elevados excesos enantioméricos (Shieh, Gopalan et al. 1985; Faber 2011).

Se han utilizado diferentes técnicas que permiten mejorar la selectividad de las reducciones microbianas como son la modificación del sustrato (Fuganti, Grasselli et al. 1985; Nakamura, Higaki et al. 1985); variación de los parámetros metabólicos mediante inmovilización (Nakamura, Kawai et al. 1989); empleo de células en distintos estados metabólicos (Buisson, Azerad et al. 1991); variación en las condiciones de fermentación (Dahl, Fjeldberg et al. 1999); búsqueda de microorganismos con actividades óptimas (Buisson and Azerad 1986) e inhibición selectiva de las enzimas competidoras (Faber 2011).

Saccharomyces cerevisiae (BY) ha sido el microorganismo más utilizado en la reducción asimétrica de cetonas (Servi 1990; Ward and Young 1990; Csuk and Glaenzer 1991; Kometani, Yoshii et al. 1996; Matsuda, Yamanaka et al. 2009). Esto se debe a que presenta una serie de ventajas como agente biocatalizador. Es un microorganismo fácilmente manejable por lo que no se requieren conocimientos microbiológicos y se opera con equipamiento estándar de laboratorio. Por otra parte se adquiere fácilmente y es de bajo costo. A su vez, *S. cerevisiae* (BY) tolera cetonas con un amplio rango de grupos funcionales, incluyendo grupos heterocíclicos (Dondoni, Fantin et al. 1988; Ticozzi and Zanarotti 1988), fluorados (Bernardi, Bravo et al. 1988; Bucciarelli, Forni et al. 1989), clorados (Takano, Yanase et al. 1987), alquílicos perfluorados (Kitazume and Lin 1987), cianos, nitro, hidroxilo y sulfuro entre otros (Faber 2011). Las reacciones de reducción de cetonas alifáticas y aromáticas simples mediante BY proceden de acuerdo a la regla de Prelog rindiendo los alcoholes correspondientes con buena pureza óptica (MacLeod, Prosser et al. 1964; Faber 2011).

Se ha descrito la reducción de β-cetoésteres alifáticos mediante levaduras para rendir sus correspondientes β-hidroxiésteres (DeShong, Lin et al. 1986), los cuales se utilizaron como bloques quirales para la síntesis de β-lactamas (Tschaen, Fuentes et al. 1988) y feromonas de insectos (Mori 1989). La enantioselectividad y la preferencia estereoquímica hacia la cara *re* o *si* del β-cetoéster depende del tamaño relativo de ambos sustituyentes de la cetona según la regla de Prelog. De esta forma, la configuración absoluta del nuevo alcohol secundario puede ser dirigida mediante la modificación del sustrato, cambiando el tamaño relativo de los sustituyentes adyacentes al grupo carbonilo (Faber 2011).

La reducción diastereoselectiva de cetonas mediadas por levaduras ha sido ampliamente usada en β-cetoésteres-α-sustituidos llevando a la formación de los correspondientes

diasterómeros *syn* y *anti*-β-hidroxiésteres (Frater, Müller et al. 1984; Fujisawa, Itoh et al. 1984; Buisson, Henrot et al. 1987). Debido a que el centro quiral de la posición α de la cetona es lábil esteroquimicamente, ocurre una rápida racemización *in-situ* de los sustratos de cada enantiómero vía enolización llevando a una resolución dinámica (Stecher and Faber 1997). De esta forma, la relación entre los productos *syn* y *anti* está determinada por las selectividades de las enzimas involucradas en el proceso de reducción (Deol, Ridley et al. 1976). Cuando el sustituyente del carbono α es pequeño, predomina la formación del diasterómero *syn*, pero la diastereoselectividad se invierte cuando el sustituyente es de mayor tamaño. De todas formas, la selectividad del nuevo centro quiral del alcohol secundario formado es siempre elevada y su configuración absoluta corresponde según la regla de Prelog (Faber 2011).

Estas observaciones llevaron a la construcción de un modelo simple que permite predecir la diastereoselectividad de las reducciones de β-cetoésteres-α-sustituidos mediadas por levadura (Vanmiddlesworth and Sih 1987). En la figura 7 se representa este modelo. En él se observa que cuando los α-sustituyentes son de menor tamaño que la fracción carboxílica (representado como S en la figura, siendo L la fracción carboxílica), encajan bien en el bolsillo mientras que en sustratos que poseen un grupo grande en α la orientación se invierte y la fracción carboxílica pasa a ocupar el bolsillo. De todas formas, la variación de la selectividad en las reducciones de los compuestos β-cetoésteres-α-sustituidos mediadas por BY se debe a la presencia de múltiples deshidrogenasas que presentan distintas especificidades sobre el sustrato (Shieh and Sih 1993).

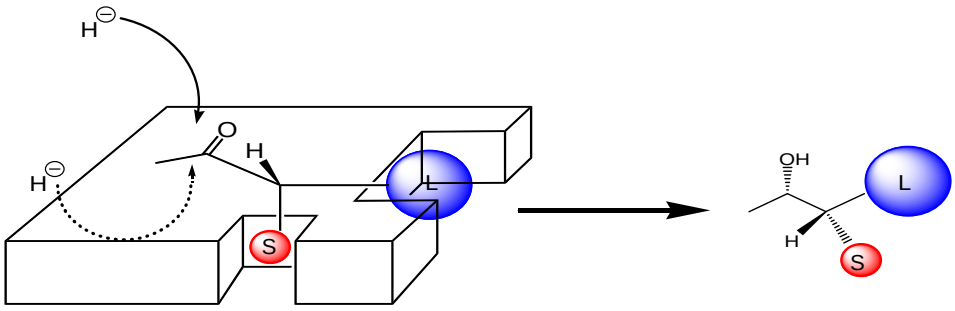


Figura 7. Modelo utilizado para predecir la diastereoselectividad en reducciones mediadas por levadura.

En la figura 8 se muestra el esquema de la resolución dinámica concomitante con la reducción biocatalítica de β-cetoésteres-α-sustituidos. En este esquema, se pueden obtener los cuatro posibles productos con excelentes purezas enantio- y diastereomericas si se elije el microorganismo apropiado que presente la enantio- y diastereoselectividad deseada. Por ejemplo, si se emplea BY las reducciones procederán según la regla de Prelog y la reacción procederá, según el esquema, a través de la ruta A (Nakamura, Kawai et al. 1991); mientras que con *Geotrichum candidum,* las reducciones también procederán según Prelog pero la reacción seguirá la ruta B (Nakamura, Miyai et al. 1986; Buisson, Azerad et al. 1990) . Sin embargo, para la obtención de los productos en reducciones anti-Prelog se podrá llevar a cabo mediante *Sporotrichum exile*, que en el esquema se representa como la reacción C (Buisson, Henrot et al. 1987) ó *Mucor ambiguus* para llevar a cabo la reacción D (Cabon, Buisson et al. 1995).

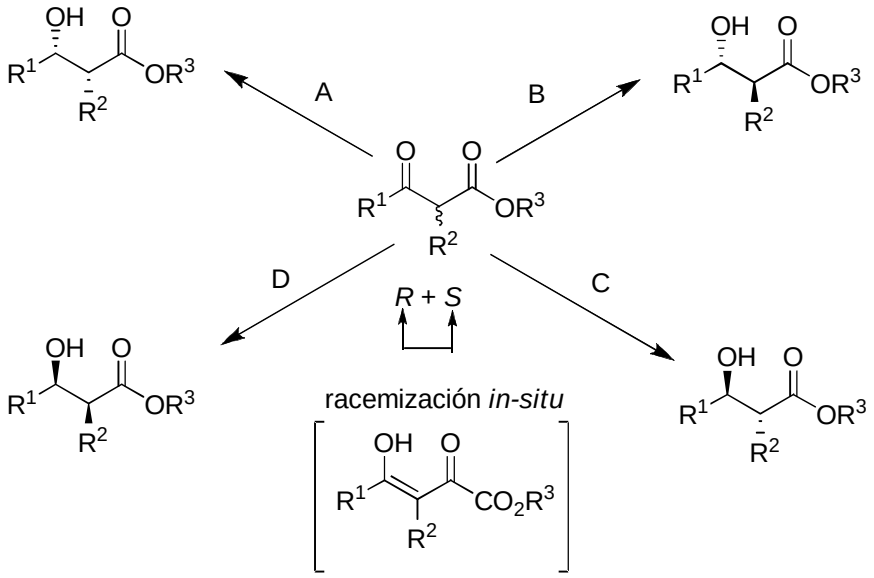


Figura 8. Bio-reducción estereocomplementaria de β-cetoésteres-α-sustituidos.

Células enteras con actividad anti-Prelog

Considerando los trabajos ya citados para la reducción de β-cetoésteres-α-sustituidos, existen pocos trabajos que describen el uso de células enteras con actividad anti-Prelog. Entre ellos, un trabajo de Bradshaw y colaboradores, en donde se describe que reacciones de reducción mediante la cepa bacteriana *Lactobacillus kefir* transcurren de forma anti-Prelog, esta cepa ha sido empleada tanto en forma de célula entera o parcialmente purificada para la reducción cetonas aromáticas, cíclicas y alifáticas (Bradshaw, W. et al. 1992). Bessen y colaboradores, mediante el uso de las cepas BY, *Rhodotorula glutinis* NRRL Y 109, *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Mortierella isabellina* NRRL 1757, *Lactobacillus kefir* DSM20587 realizaron la reducción de las cetonas halogenadas: 4-cloro-3-octanona, 5-cloro-4-nonanona, 4-bromo-5-nonanona y 4-cloro-5-nonanona. En este trabajo lograron reducir el grupo carbonilo situado en una posición central de la cadena alifática, de los compuestos estudiados, obteniendo distintos alcoholes según el microorganismo empleado. Los mejores resultados los obtuvieron con BY, *Rhodotorula glutinis* NRRL Y 109 y *Lactobacillus kefir* DSM20587. Con este último microorganismo se obtuvieron los alcoholes anti-Prelog de la reducción de los compuestos 4-cloro-3-octanona, 5-cloro-4-nonanona y 4-cloro-5-nonanona (Besse, Sokoltchik et al. 1998).

Mediante el uso de una cepa de *Pichia farinosa*, Ikeda y colaboradores, obtuvieron los compuestos (2*R*, 5*R*)-2,5-hexanodiol; (2*R*,4*R*)-2,4-pentanodiol y (*R*)-4-pentanolide mediante la reducción anti Prelog de las cetonas correspondientes. Observaron en este trabajo, que los grupos vecinos carbonilos, hidroxilos y carboxilos favorecen la enantioselectividad de las bio-reducciones (Ikeda, Sato et al. 1996).

Se llevó a cabo la bio-reducción de catorce derivados trifluoroacetil bifenilos mediante la levadura de panificación BY y el hongo filamentoso *Geotrichum.* Con estos dos microorganismos se logró obtener los alcoholes *R* y *S* de todos los compuestos ensayados. La levadura de panificación rindió los (*R*)-trifluorometil bifenil carbinoles, ya que sus reacciones enzimáticas transcurrieron según la regla de Prelog mientras que *Geotrichum* rindió los alcoholes *S* (Fujisawa, Onogawa et al. 1998).

Se observó actividad anti Prelog en otra cepa del hongo *Geotrichum*. En este caso el hongo *Geotrichum* sp. G38 llevó a cabo la reducción de compuestos 2- y 3-oxoésteres y dicetonas rindiendo los alcoholes anti Prelog (Jian-Xin, Zu-Yi et al. 1993). En un trabajo posterior se utilizó esta cepa para la bio-reducción α-aril halocetonas y α-hidroximetilcetonas para la obtención de los alcoholes con configuración Prelog (Wei, Li et al. 1998).

Por otra parte, Wipf y colaboradores obtuvieron el (*R*)-3-hidroxibutirato de etilo mediante la reducción de acetoacetato de etilo con un redindimiento alto de reacción empleando *Geotrichum candidum*, (Wipf, Kupfer et al. 1983).

Para la obtención de los alcoholes opuestos a los que se obtienen mediante BY, Fantin y colaboradores realizaron un screening en cuarenta cepas de la levadura *Yarrowia lipolytica* utilizando para su estudio los compuestos 5-hexen-2-ona, acetofenona, α-acetil-γ-butirolactona, 5-metil-5-hexen-2-ona y 6-metil-5-hepten-2-ona. De las cuarenta cepas, nueve resultaron ser buenos biocatalizadores para la obtención de los alcoholes con configuración anti-Prelog. En particular, la bio-reducción de acetofenona mediante las cepas de levadura evaluadas se llevó a cabo con un rendimiento variable (25-70%) y con un exceso enantiomérico superior al 75% (Fantin, Fogagnolo et al. 1996).

Mandal y colaboradores, emplearon una cepa del hongo *Trichothecium* para la obtención de alcoholes con configuración *R* a partir de acetofenona y derivados, alcanzando con este biocatalizador excelentes excesos enantioméricos (Mandal, Ahmad et al. 2004). Zilbeyaz y colaboradores llevaron a cabo la determinación de actividad anti-Prelog en 120 cepas fúngicas frente a derivados de acetofenona encontrando que con la cepa *Trichothecium roseum* EBK-18 se obtenían los alcoholes *R* con *ee*>99%, utilizaron este microorganismo para obtener (*R*)-1-feniletanol a escala de gramo (Zilbeyaz, Taskin et al. 2010)

Reducción de aldehídos y cetonas mediante vegetales

Los vegetales poseen un gran potencial en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Aunque en cultivos celulares no ocurre la formación y acumulación de estos metabolitos, estos cultivos retienen la habilidad de transformar sustratos exógenos en productos de interés. Las enzimas vegetales se han utilizado en biocatálisis, tanto bajo la forma de enzimas aisladas como mediante células enteras (cultivos celulares, trozos frescos de vegetales, raíces transformadas, etc.) a su vez se las han empleado en forma libres o inmovilizadas (Giri, Dhingra et al. 2001).

El uso de deshidrogenasas de origen vegetal ha sido ampliamente descrito en la reducción de grupos carbonilo para su correspondiente alcohol. Un amplio rango de compuestos carbonilos estructuralmente diversos que incluyen cetonas aromáticas y alifáticas, dicetonas, cetoésteres, aldehídos, esteroides, terpenoides, cumarinas y lignanos se han utilizado como sustratos en reacciones redox mediadas por enzimas vegetales (Giri, Dhingra et al. 2001; Blanchard and van de Weghe 2006; Fonseca, Monte et al. 2009; Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009; Gamenara, Seoane et al. 2013).

Reacciones de reducción mediante cultivos celulares vegetales.

Speiche y colaboradores emplearon cultivos celulares de las briofitas *Marchantia polymorpha, Marchantia plicata*, *Riccia fluitans*, y *Asterella blumeana* para la reducción de cetonas alifáticas, aromáticas, cetoésteres y benzaldehído (Speicher, Roeser et al. 2003). La bio-reducción de acetofenona fue moderadamente efectiva pues obtuvieron el alcohol *S* con

ee comprendidos entre 34-74% y un rendimiento de74% luego de 10 días de reacción. Se obtuvieron mejores resultados en la reducción de acetoacetato de etilo y acetoacetato de *ter*-butilo por medio de *R. fluitans* y *A. blumeana* que rindieron los alcoholes correspondientes con valores de *ee* entre 90–95% y rendimientos de 70-90% para el producto 3*S*. La reducción de 2-metil-3-oxo-butanoato de etilo mediante *M. plicata* rindió el producto *anti*-(2*S*, 3*S*) con buenos rendimientos y muy buenos *ee*. Los mismos autores, utilizaron (-)-(4*R*)-carvona para estudiar la reducción del doble enlace, obteniendo como producto (+)-n-dihidrocarvona.

En el año 1983, Suga y colaboradores describieron la interconversión de una serie de cicloalcanonas con anillos de 5 a 8 miembros y sus correspondientes cicloalcanoles mediante cultivos celulares de *Nicotiana tabacum.* Encontraron que la inverconversión se dio mediante un equilibrio cuyo balance dependía del número de átomos de carbono presente en el anillo de los sustratos. El equilibrio en la interconversión de ciclohexanona conducía a la formación del alcohol, mientras que en los compuestos con anillos de 5, 7 y 8 miembros llevó a la formación de las cicloalcanonas correspondientes (Suga, Hamada et al. 1983).

Los autores continuaron con el estudio del sistema enzimático de *N. tabacum* mediante la oxidación de una serie de alcoholes monoterpénicos bicíclicos. En este trabajo observaron que las células vegetales fueron capaces de discriminar entre los enantiómeros de los alcoholes terpénicos. Las mismas oxidaron (+)-borneol a (+)-alcanfor luego de 10 días de reacción, pero no tuvieron actividad sobre el isómero (-). De forma similar, oxidaron enantioselectivamente (-)-isoborneol. Estos resultados demostraron que este sistema vegetal tiene potencialidad para la resolución de cicloalcanoles racémicos (Suga, Hirata et al. 1983).

Hamada y colaboradores realizaron la biotransformación reductiva de decan-2-ona, decan-3-ona y decan-4-ona mediante células inmovilizadas de *Nicotiana tabacum* obteniendo los alcoholes con elevada pureza óptica (Hamada, Umeda et al. 1988). Las células fueron inmobilizadas en alginato de calcio, la reacción transcurrió durante 7-10 días a 25ºC. Los productos fueron obtenidos con una pureza óptica comprendida entre 98.5-99.2%. La velocidad de reacción dependió de la proximidad del grupo carbonilo al final de la cadena, siendo el compuesto decan-2-ona el que más rápidamente fue reducido.

Suga y colaboradores continuaron sus estudios de la capacidad biocatalítica de las células de *Nicotiana tabacum*, demostrando que las mismas fueron capaces de reducir regioselectivamente el doble enlace α,β-insaturado de la (+) y (-) carvona, y posteriormente el grupo cetona (Hirata, Hamada et al. 1982). El compuesto (4*R*)-(+)-carvona rindió (1*R*, 2*S*, 4*R*)-(+)-neodihidrocarveol como producto mayoritario con un rendimiento del 10.7%. El isómero (4*S*) rindió (1*R*, 4*S*)-(-)-isodihidrocarvona y (1*R*, 2*S*, 4*S*)-(-)-neoisodihidrocarveol con rendimientos del 13.7 y 7.9% respectivamente. El doble enlace α,β-insaturado de la carvona fue reducido inicialmente en el C-1 de la cara *si* , seguido de la reducción del grupo carbonilo en el C-2 de la cara *re (*ver figura 9) (Suga, Hirata et al. 1986).

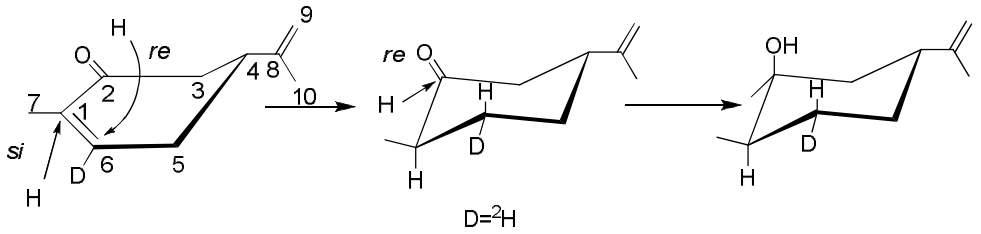


Figura 9. Reducción estereoespecífica del doble enlace C-C y del grupo carbonilo de la (-) carvona mediante células de *N. tabacum* (Suga, Hirata et al. 1986).

En 1987, Suga y colaboradores emplearon las células de *Nicotiana tabacum* para la reducción de verbenona y la oxidación de neoisopinoalcanfor (Suga, Hamada et al. 1987). En la reducción de verberona se obtuvo el derivado dihidro del enantiómero (1 *S*, 5*S*) mientras que el isómero (1*R*, 5*R*) no se atacó. El grupo hidroxilo del neoisopinoalcanfor fue oxidado enantioselectivamente para rendir el enantiómero (1 *S*, 2*S*, 3*R*, 5*R*).

Takemoto y Achiwa describieron el uso de cultivos celulares de *Catharanthus roseus* para la desracemización de piridinetanoles (Takemoto and Achiwa 1995; Takemoto and Achiwa 1998). Cuando se trató el racemato 3-piridilfenilmetanol con células de *C. roseus* se obtuvo a los 17 días el (-)-3-piridilfenilmetanol. En un periodo de tiempo más prolongado (32-52 días) ocurrió la conversión hacia la cetona correspondiente (Takemoto and Achiwa 1995). Se realizó el estudio de esta misma transformación mediante células inmovilizadas de *N. tabacum,* en la misma se observó que (+)-3-piridilfenilmetanol fue rápidamente oxidado a la cetona correspondiente y posteriormente la cetona se redujo a (-)-3-piridilfenilmetanol. Este compuesto se oxida muy lentamente hacia la cetona (Takemoto and Achiwa 1998).

En 1989, Naoshima y colaboradores describieron el uso de células inmovilizadas de *N. tabacum* para llevar a cabo la bio-reducción regio- y estereoselectiva de 3-oxobutanoatos a sus correspondientes (*S*)-3-hidroxibutanoatos (Naoshima, Akakabe et al. 1989). Posteriormente, estos autores realizaron la bio-reducción de cetonas aromáticas mediante células inmovilizadas de *Daucus carota*, *Nicotiana tabacum* y *Gardenia jasminoides*. En este trabajo observaron que las células inmovilizadas de *D. carota* transformaron con elevada pureza óptica las cetonas aromáticas acetofenona y propiofenona en sus correspondientes alcoholes *S*, mientras que las células inmovilizadas de *G. jasminiodes* rindieron los alcoholes *R* con un *ee* del 63-91% (Naoshima and Akakabe 1991). Naoshima y colaboradores ampliaron los resultados obtenidos con células inmovilizadas de *D. carota* al efectuar el estudio de la bio-reducción de un conjunto de cetoésteres, cetonas aromáticas y cetonas heterocíclicas aromáticas mediante este biocatalizador. En este trabajo obtuvieron los alcoholes *S* secundarios correspondientes con rendimientos que fueron de 30-63% y con *ee* de 52-99% al efectuar las reacciones durante 5 a 6 días (Akakabe, Takahashi et al. 1995).

El mecanismo de reducción de acetofenona a (*R*)-1-feniletanol mediante células inmovilizadas de *Gardenia jasminoides* se observó que ocurrió básicamente en dos pasos. El paso inicial fue una reducción no estereoespecífica de la acetofenona que rindió el alcohol racémico, posteriormente ocurrió la oxidación estereoselectiva del alcohol *S* y su reducción, este proceso se repitió consecutivamente hasta rendir exclusivamente el alcohol *R* con un 91% de *ee* y 40% de conversión, lo cual constituye un ejemplo de resolución cinética dinámica con células vegetales *(Akakabe and Naoshima 1993)*.

Recientemente, Magallanes-Noguera y colaboradores emplearon células indiferenciadas de *Gardenia jasminoides* inmovilizadas en alginato de calcio para realizar la resolución de alcoholes secundarios racémicos y la subsecuente reducción de la cetona mediante $NaBH_4$ en el mismo medio de reacción donde el proceso biocatalítico fue llevado a cabo para obtener los alcoholes *R*. Realizaron la desracemización cíclica de 1-feniletanol a escala preparativa, logrando enriquecer el sistema con (*R*)-1-feniletanol en un 87% y con una pureza óptica del 98% luego de repetir el ciclo quimio-enzimático durante 4 días (7 ciclos)(Magallanes-Noguera, Ferrari et al. 2012).

Chadha y colaboradores utilizaron cultivos celulares de *Daucus carota* para la reducción del ester etílico del ácido 2-oxo-4-fenilbutanoico al correspondiente éster (*R*)-(-)-2-hidroxi-4-fenilbutanoico con elevado exceso enantiomérico y muy buen rendimiento (Chadha, Manohar et al. 1996). Posteriormente, empleando esta metodología, llevaron a cabo la reducción de ésteres carboxílicos de 4-aril-2-oxobuta-3-enoico a sus derivados 2-hidroxílicos (Baskar, Ganesh et al. 2004).

El grupo de Aragozzini y colaboradores llevaron a cabo el estudio de dieciocho especies vegetales en la modalidad de cultivo celular para la reducción de los sustratos modelo 2-pentanona, acetofenona y acetoacetato de etilo. El objetivo de su trabajo fue investigar la potencialidad de las especies vegetales en la reducción asimétrica de las tres metilcetonas que poseen grupos adyacentes con diferentes características estéricas y estereoelectrónicas y como característica común el grupo acetilo. Los rendimientos fueron desde 20 a 100% y con purezas ópticas de 65 a 99%. Con la especie vegetal *D. carota* se obtuvo en la reducción de acetoacetato de etilo un porcentaje de conversión 100 con un *ee* >98% hacia el alcohol *S* (Villa, Molinari et al. 1998).

Recientemente, Orden y colaboradores llevaron a cabo un estudio comparativo entre cultivos celulares y tejidos vegetales de especies habituales de Argentina para la reducción de las cetonas comerciales acetofenona y 1,4-benzopirona y el compuesto 6-acetil-2,2-dimetil-2,3-dihidro-4*H*-cromen-4-ona aislado a partir de las partes aéreas de *Ophryosporus axilliflorus*. Este último compuesto se utilizó con la finalidad estudiar la regio- y estereoselectividad de las bio-reducciones ya que presenta en su estructura dos grupos carbonilo (Figura 10). En este trabajo observaron que el tejido vegetal de *Baccharis crispa* redujo regioselectivamente y de forma anti-Prelog la cetona del grupo metilo de la dicetona natural mientras que el cultivo celular de *Tessaria absinthioides* rindió el otro isómero de este alcohol secundario. Por otro lado, encontraron diferencias significativas en la capacidad reductasa entre cultivos celulares y tejidos vegetales en la misma especie vegetal (Orden, Bisogno et al. 2008).

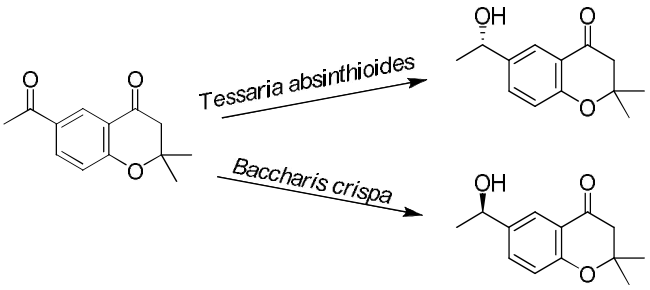


Figura 10. Bio-reducción del compuesto natural aislado de *Ophryosporus axilliflorus* mediante tejido de *Baccharis crispa* y cultivos celulares de *Tessaria absinthioides.*

Reacciones de reducción mediante raíces genéticamente transformadas (RT).

Los cultivos celulares vegetales presentan la desventaja de ser inestables y variables (Casas, Pitta-Alvarez et al. 1998) por lo que, permanentemente, se recurre a un screening para obtener líneas altamente productivas. Este problema puede ser eludido mediante el uso de tejidos vegetales organizados tales como cultivos de brotes y raíces. Las raíces transformadas (RT) se obtienen mediante la transformación de células vegetales por la bacteria de suelo patógena *Agrobacterium rhizogenes* portadora de plásmidos Ri. Estos plásmidos codifican para proteínas que inducen el crecimiento modificado de la raíz, adquiriendo una forma de crecimiento neoplasica, fácil de mantener en el laboratorio. Estas raíces genéticamente trasformadas poseen una alta tasa de crecimiento comparada con los cultivos celulares vegetales. Por otra parte la diferenciación le otorga estabilidad genética (Giri, Dhingra et al. 2001).

En los últimos años, los cultivos de raíces genéticamente transformadas han ido ganando relevancia como agentes biocatalizadores. Esto se debe a que presentan una serie de ventajas sobre los cultivos celulares vegetales como ser su estabilidad genética y bioquímica, su potencial en la biosíntesis de múltiples enzimas similares a las de su planta parental y el relativo bajo costo en las condiciones de cultivo (Banerjee, Singh et al. 2012).

Varios sistemas vegetales RT han sido utilizados para llevar a cabo reacciones regio- y estereoselectivas de reducción. En el año 1998 Mironowicz y Kromer, realizaron un estudio para establecer la capacidad de raíces transformadas de manzana (*Malus pumila*) y zanahoria (*Daucus carota*) así como en plántulas de manzana y raíces frescas de ambos vegetales de biotransformar esteres racémicos (Mironowicz and Kromer 1998). Este trabajo resultó interesante puesto que existen pocos reportes en donde se compara la habilidad biocatalítica de sistemas diferentes (plántulas, RT y raíces frescas) de un mismo vegetal. Con la finalidad de evaluar la enantioselectividad de los sistemas enzimáticos vegetales emplearon los acetatos racémicos: 1-feniletil (**1**), 1-(1-naftil)etil (**2**), 1-(2-naftil)etil (**3**) y mentil (**4**). Cada acetato fue hidrolizado a su alcohol correspondiente el cual fue oxidado a cetona (Figura 11).

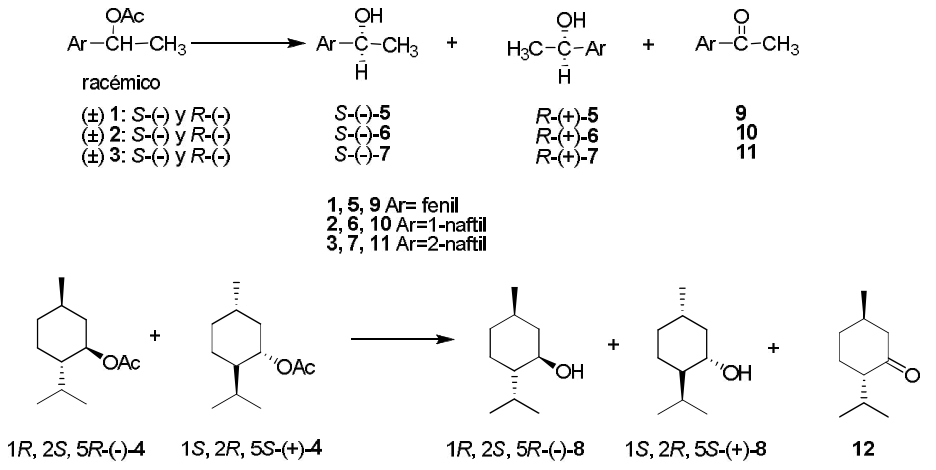


Figura 11. Biotransformaciones de acetatos racémicos mediante diferentes sistemas de manzana y zanahoria.

Las plántulas de manzana llevaron a cabo la hidrólisis de los acetatos (±)- **1**, (±)-**2**, (±)- **3** y (±)-**4** rindiendo 98% de **5**, 15% de **6**, 9% de **7** y 11% de (1*R*, 2*S*, 5*R*)-(-)- **8**. El único alcohol

obtenido de estas biotransformaciones que fue oxidado a la cetona correspondiente fue **5** rindiendo la cetona **9.** Mediante este sistema vegetal el *S* alcohol se oxidó más rapidamente que el *R,* por otra parte cuando evaluaron la reducción del compuesto **9** observaron que obtenían más rapidamente el (*S*)-1-feniletanol que su antípoda. Observaron que el rendimiento de la hidrólisis de los compuestos (±)- **2**, (±)- **3** y (±)-**4** mediante plántulas de manzana fue de 4 a 8 veces inferior que el obtenido con el fruto de esta especie vegetal (Mironowicz 1997).

Respecto a la biotransformación empleando raíces, ya sea en forma de RT o frescas, mostraron ser más activas las de manzana que las de zanahoria. Por otro lado, cuando compararon los resultados de hidrólisis de los compuestos (±)- **1**, (±)-**2**, (±)- **3** y (±)-**4** con cultivos celulares de zanahoria descritos anteriormente, observaron que los cultivos celulares presentaron mayor actividad que las raíces de zanahoria (Mironowicz, Kromer et al. 1994).

Las RT de manzana mostraron mayores rendimientos en la hidrólisis de los compuestos evaluados que la raíz fresca. En la reducción de acetofenona (**9**) mediante RT de manzana se obtuvo un 50% de **5** con un *ee* del 8% para el (*R*)-1-feniletanol. Mientras que utilizando las raíces frescas de manzana se obtuvo un rendimiento en la reducción de **9** del 79% con un *ee* del 9% para el (*R*)-1-feniletanol. El efecto las raíces de zanahoria fue diferente, con las RT de zanahoria no se obtuvo bioconversión mientras que con las raíces frescas se obtuvo el (*S*)-1-feniletanol en un rendimiento del 60% con un *ee* >98%. Este trabajó constituyó a su vez el primer reporte del uso de trozos de vegetales frescos en biotransformaciones.

Caron y colaboradores emplearon cultivos RT de *Daucus carota* para la reducción de cetonas aromáticas, cetoésteres y cetonas simples (Caron, Coughlan et al. 2005) Obtuvieron los mejores resultados en los compuestos que presentaban la función carbonilo conjugada al anillo aromático o heteroaromático. Observaron que el desempeño de las RT fue altamente dependiente del sustrato ya que las cetonas *p*-hidroxiacetofenona, 1-acetonaftona, 3-acetilindol, 6-metoxi-1-tetralona y estrona no fueron reducidas mientras que los compuestos acetofenona, trifluoroacetofenona, 2-acetilpiridina y 1-pentafluoroacetofenona fueron reducidos con rendimientos aislados de 85-96%. La estereoselectividad de las reacciones siguió la regla de Prelog para ocho de los diez sustratos que fueron reducidos. Los autores asignan esta variabilidad en la estereoselectividad de las reducciones a la presencia de varias oxido-reductasas presentes en las RT con selectividad complementaria. La reducción de acetofenona por medio de las RT de *D. carota*, rindió el alcohol *S* en un rendimiento del 96% y con un excelente exceso enantiomérico a los 7 días de reacción. El sistema se pudo reutilizar hasta seis veces con los mismos resultados. Esto representó ser una ventaja sobre el uso de células en reposo de *D. carota* ya que con las mismas luego de un ciclo de uso se perdió la actividad (Yadav, Nanda et al. 2002). Por otro lado, los autores describen como ventajoso el hecho de que el sistema de RT requiere menos cantidad de biocatalizador respecto al sustrato (una relación B/S= 4.5, peso húmedo) en comparación con células vegetales sin transformar en donde B/S=100 o en el caso del uso de levaduras como BY la relación es B/S=360 para la reducción de acetofenona (Caron, Coughlan et al. 2005).

Raíces transformadas de *Pharbitis nil* presentaron el potencial de glicosilar los grupos hidroxifenólicos y de reducir los grupos carbonilo y formilo de varios derivados de

acetofenona y benzaldehídos. En la biotransformación del derivado 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona, el grupo 4-hidroxilo fue glucosilado y se obtuvieron en bajos rendimientos dos glucósidos dimerizados (Figura 12). Con respecto la biotransformación de la acetofenona se obtuvieron los compuestos 1- β-D-glucopiranosiloxi-1-feniletanol y 2 –β-D-glucopiranosiloxiacetofenona (Figura 13) (Kanho, Yaoya et al. 2005).

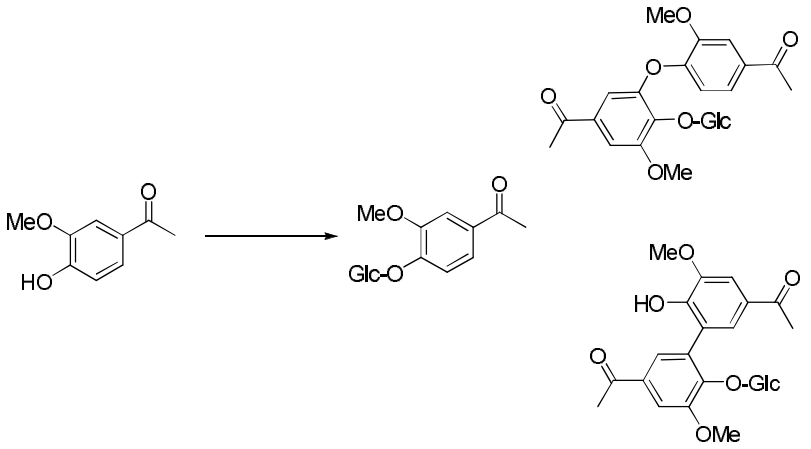


Figura 12. Biotransformación del compuesto 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona mediante RT de *Pharbitis nil.*

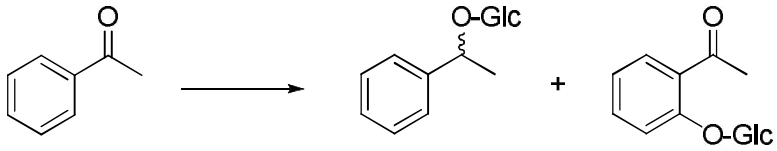


Figura 13. Biotransformación de acetofenona mediante RT de *Pharbitis nil.*

Cultivos de RT de *Brassica napus* mostraron la capacidad de reducir enantioselectivamente las dicetonas naturales 1-(5-acetil-2-hidroxifenil)-3-metillbut-2-en-1-ona y 6-acetil-2,2-dimetil-2,3-dihidro-4*H*-cromen-4-ona al compuesto 6-(1(*S*)-hidroxietil)-2,2-dimetil-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ona con altos excesos enantiómericos (>97%) y con buen rendimiento de conversión (>78%)(Orden, Bisogno et al. 2006).

Se llevó a cabo el estudio de la reducción estereoselectiva de un conjunto de alquil-aril cetonas proquirales por medio del cultivo de RT de la especie vegetal *Rhapanus sativus* (Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009). En el mismo se observó que la posición del sustituyente tuvo una fuerte incidencia sobre la conversión así como en la estereoselectiviadad del proceso.

Reacciones de reducción mediante vegetales frescos

Si bien el primer reporte en el uso de material vegetal fresco para biotransformaciones es el artículo arriba mencionado de Mironowicz y colaboradores; la biocatálisis con vegetales se extendió a partir del reporte de Baldessare y colaboradores en el cual describen la utilización de material vegetal fresco sin ningún procesamiento para llevar a cabo biotransformaciones de sustratos orgánicos exógenos (Baldassarre, Bertoni et al. 2000). Emplearon raíces de zanahoria (*D. carota*) rallada mediante un rallador de cocina y le adicionaron el sustrato, luego incubaron la suspensión de zanahoria rallada con el sustrato en condiciones de

agitación y temperatura ambiente. La relación sustrato/material vegetal que utilizaron fue 1:200. Emplearon como sustratos modelo los compuestos racémicos 2-metilciclohexanona (**13**) y 2-hidroxiciclohexanona (**14**) (Figura 14). El compuesto 2-metilciclohexanona racémico se redujo completamente a una mezcla 1:1 de los diasterómeros (1 *S*, 2*R*)- y (1*S*, 2*S*)-(+)-2-metilciclohexanol con *ee* >99% a las 48 horas de reacción. Pero cuando la reacción se detuvo a las 36 horas se observó un remanente de (*R*)-(-)-2-metilciclohexanona en un 15% (*ee* >99%) y la relación de los diasterómeros (1*S*, 2*R*) y (1*S*, 2*S*) fue de de 35:65. Esto indicó que la reacción ocurrió con enantioselectividad hacia el sustrato *S* ya que primero se redujo el enantiómero *S*, antes que el *R*. Por otra parte, las enzimas involucradas en la bio-reducción transfirieron el hidruro por la cara *re* del grupo carbonilo para ambos sustratos enantioméricos, rindiendo los alcoholes *S*.

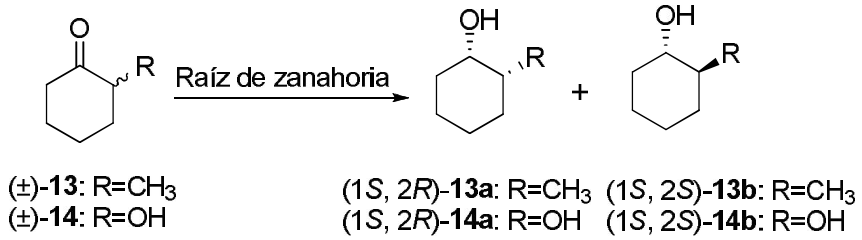


Figura 14. Reacciones de bio-reducción llevadas a cabo mediante zanahoria rallada por Baldasarre y colaboradores.

De forma similar, la reducción del sustrato racémico 2-hidroxiciclohexanona (**14**) resultó en la mezcla diasteromérica (1*S*, 2*R*)- y (1*S*, 2*S*)-(+)-1,2-ciclohexanodiol (*ee* >95%) a las 40 horas de reacción pero con un remanente del enantiómero *R* del material de partida de un 18%. A las 54 horas de reacción se obtuvo una conversión completa con una relación diasteromérica (1*S*, 2*R*)- y (1*S*, 2*S*)-(+)-1,2-ciclohexanodiol 1:2, lo cual indicó que la formación del compuesto (1*S*, 2*S*)-1,2-ciclohexanodiol ocurrió a partir de ambos sustratos *S* y *R* (Baldassarre, Bertoni et al. 2000).

Dada la sencillez y disponibilidad de la raíz de zanahoria como biocatalizador, junto con los buenos resultados obtenidos, incentivaron consiguientes estudios en el área y varios trabajos fueron posteriormente publicados.

En este sentido, Yadav y colaboradores utilizaron la raíz de zanahoria para la reducción asimétrica de azidocetonas obteniendo importantes intermediarios en la síntesis de fármacos. En particular el (*R*)-(-)-azidobencil para la síntesis de (*R*)- (-)-denopamina, (*R*)-(-)-tembamida y (*R*)-(-)-aegelina. El rendimiento en la obtención de este alcohol mediante raíz fresca de zanahoria fue superior al obtenido con BY, con *ee* >99% y rendimientos aislados entre 85-92% (Yadav, Thirupathi Reddy et al. 2000).

Este mismo grupo continuó empleando la raíz fresca de zanahoria como biocatalizador y realizó el estudio más completo disponible del alcance y limitaciones de la reacción. Se estudio la reducción de acetofenonas, α-azido arilcetonas, β-cetoésteres, cetonas acíclicas alifáticas y cetonas cíclicas a sus correspondientes alcoholes (Yadav, Nanda et al. 2002). Emplearon cuarenta y un sustratos diferentes, con los cuales se obtuvieron los alcoholes correspondientes con *ee* >90% y en rendimientos comprendidos entre 50-82%. Los tiempos de conversión fueron entre 40 a 70 horas. En la reducción de derivados de acetofenona, se observó que los sustituyentes dadores de electrones ejercieron un efecto de enlentecimiento

de las reacciones. Con los dos β-cetoésteres estudiados se observó que el isómero *R* se redujo más rápidamente que el enantiómero *S*, rindiendo los productos (1*R*, 2*S*). Un resultado importante de este trabajo fue la reducción quiral de un conjunto de cetonas simples de cadena abierta, este proceso es difícil de llevarse a cabo mediante síntesis química tradicional. Los rendimientos en estas reducciones fueron de bajos a moderados (32-50%) con valores de *ee* que fueron de 71-92% en tiempos largos de reacción de 80-102 horas. La configuración absoluta de los alcoholes obtenidos estuvo acorde a la regla de Prelog.

Comasseto y colaboradores emplearon la raíz fresca de zanahoria para la síntesis de un conjunto de alcoholes *R*-metilbenzil organochalcogenos. En este trabajo no se observó reducción cuando el sustituyente fue selenio en la posición *orto*, y bajos rendimientos para el sustituyente sulfuro en la posición *orto*. Por otro lado, luego de pasadas 48-72 horas de reacción, las conversiones estuvieron en el rango de 72-97% con valores de *ee* >99% para los productos con configuración *S* (Comasseto, Omori et al. 2004).

Recientemente, el grupo de Takeo Omori realizó la síntesis de 1, 2, 3-triazoles disustituídos quirales mediante una reacción enzimática y una reacción química en un solo paso (one-pot). Esta reacción combinó la reducción enantioselectiva de azidoacetofenonas mediante raíz de zanahoria, que rindió los alcoholes con configuración *S* junto con la cicloadición de fenilacetalina con los alcoholes obtenidos (Figura 15) (Oliveira, Andrade et al. 2013).

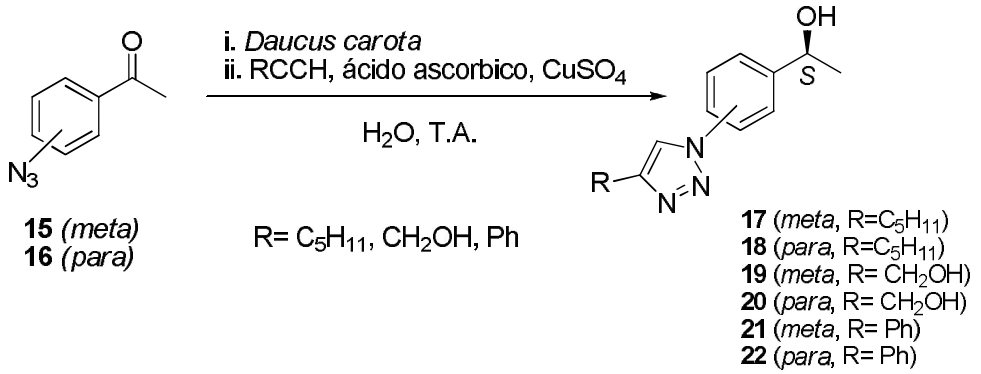


Figura 15. Síntesis quimienzimática de 1,2,3-triazoles a partir de azidoacetofenonas.

Previo a este trabajo, Andrade y colaboradores describieron el uso de varias raíces, tubérculos y bulbos provenientes de plantas comestibles para llevar a cabo el estudio de la reducción de acetofenona y cuatro derivados de este compuesto y la oxidación los alcoholes racémicos correspondientes (Andrade, Utsunomiya et al. 2006). Realizaron la oxidación de los alcoholes racémicos para evaluar la obtención de la cetona y el enriquecimiento enantiomérico de alguno de los alcoholes mediante quince especies vegetales diferentes. Observaron que en la resolución cinética del alcohol racémico cuando emplearon las especies vegetales *A. schoenoprasum* y *R. sativus* se obtenía el (*R*)-1-feniletanol con un *ee* >98% Por otro lado, las especies *A. xanthorrhiza*, *Z. officinale* y *P. sonchifolia* mostraron un comportamiento característico de una reacción de desracemización. En la misma se obtuvo un único enantiómero en rendimientos altos (>90%) a partir del racemato mediante un proceso en dos etapas, en el cual un enantiómero fue oxidado a la cetona correspondiente, la cual fue reducida en una segunda etapa por otra enzima que presentó una estereopreferencia opuesta. Por ejemplo, en el caso de *Z. officinale*, el (*RS*)-1-feniletanol se

transformó en (*S*)-1-feniletanol luego de 6 días de reacción con un *ee* >98%. Con estos resultados, se planteó por parte de los autores, que fue posible obtener ambos enantiomeros *R* y *S* a partir del 1-feniletanol empleando diferentes plantas. Luego de realizado el screening, los autores estudiaron la oxidación de cuatro alcoholes racémicos mediante 12 especies vegetales. Un resultado inesperado, pero interesante, surgido de estos estudios fue la capacidad de la reducción de nitrobenceno a anilina por raíces de *B. vulgaris* (remolacha).

En el trabajo descrito por Andrade y colaboradores, se llevó a cabo la bio-reducción de acetofenona a los 3 y 6 días de reacción por medio de dieciséis plantas. En estas bio-reducciones *Arracacia xanthorrhiza* rindió el alcohol *S* (con un 91% de rendimiento y un *ee* de 66%), mientras que la reducción con *Beta vulgaris* resultó en el alcohol *R* (con un rendimiento de 83%, y un *ee* de 87%) y *Dioscorea alata* produjo el alcohol *S* (con un rendimiento de 47%, y un *ee* >98%).(Andrade, Utsunomiya et al. 2006).

Las especies vegetales del nordeste Brasilero *Solanum melongena* L., *Manihot dulcis*, *Manihote sculenta*, *Daucus carota*, *Colocasia esculenta*, y *Ipomoea batatas* fueron utilizadas para la reducción de acetofenona. Las seis especies vegetales produjeron el (*S*)-1-feniletanol con distintos rendimientos (42.1-89.3%), siendo las dos especies de mandioca (*Manihot* sp.) las que presentaron mejores resultados. Con estas especies se continuó estudiando la bio-reducción de derivados de acetofenonas, benzaldehídos, cinmaldehídos y furfuraldehídos. Los rendimientos obtenidos en estas reducciones estuvieron comprendidos en el rango de 84-100% con *ee*>94%. Se observó quimioselectividad cuando se emplearon derivados del compuesto cinnamaldehído donde la reducción ocurrió, únicamente, en el grupo carbonilo. Posteriormente, ensayaron la bio-reducción de otros compuestos, obteniéndose excelentes rendimientos en la bio-reducción de los sustratos 3-hexanona, ciclopentanona y ciclohexanona. En todos los casos se obtuvieron los alcoholes *S* (Machado, Souza et al. 2006).

Continuando con el programa de la búsqueda de actividad reductasa a partir de plantas Brasileras (Machado, Souza et al. 2006; Cordell, Lemos et al. 2007), el grupo de Machado y colaboradores empleó las cortezas del fruto maracuyá (*P. edulis*), este material vegetal es un desecho industrial en Brasil, por lo tanto su uso como biocatalizador representa una alternativa interesante para la preparación de alcoholes ópticamente puros. De esta forma el grupo Brasilero estudió la reducción de un grupo de cetonas y aldehídos mediante este vegetal en agua. Obtuvieron los alcoholes (*S*)-1-feniletanol, (*S*)-1-(3-metoxifenil)etanol, fenilmetanol, 4-metoxibenzilico, 3-metoxibenzilico, cinamilico, 1-metil-fenilalilico, furfulico, ciclohexan-1-ol, en buenos rendimientos aunque los *ee* fueron de bajos a moderados (Machado, Monte et al. 2008).

En el marco del mismo proyecto de búsqueda de actividad reductasa en vegetales Brasileros, Fonseca y colaboradores estudiaron la actividad reductasa del agua de coco (*Cocos nucifera*). Para ello una serie de cetonas aromáticas y alifáticas simples, aldehídos, amidas y esteres fueron agregados al agua de coco tratada (Figura 16). Obtuvieron productos con excelentes rendimientos y muy altos *ee* (Fonseca, Monte et al. 2009).

El grupo de Assunção llevó a cabo la reducción de un conjunto de cetonas y aldehídos aromáticos y alifáticos mediante la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). El rendimiento de las bio reducciones fue muy variable (2.5–100%) y los *ee* de moderados a buenos.

Cuando se testeó la actividad reductasa de la caña de azúcar frente a compuestos con grupos funcionales éster, nitrilo y amida no se observó conversión (Assunção, Machado et al. 2008).

En un trabajo reciente, Alves Ferreira describe el uso de semillas de lentejas (Lens culinaris) para la reducción de cetonas y aldehídos aromáticos y alifáticos así como compuestos nitro. En las reacciones de reducción de las cetonas estudiadas se obtuvieron rendimientos que fueron de 8 a 82% y con ee de 39 a 75%. Los aldehídos fueron más reactivos que las cetonas con rendimientos >95%, mientras que los compuestos nitro aromáticos presentaron desde muy baja (2%) hasta muy alta (>99%) conversión, dependiendo de la naturaleza y posición del los sustituyentes en el anillo aromático (Alves Ferreira, Costa da Silva et al. 2012).

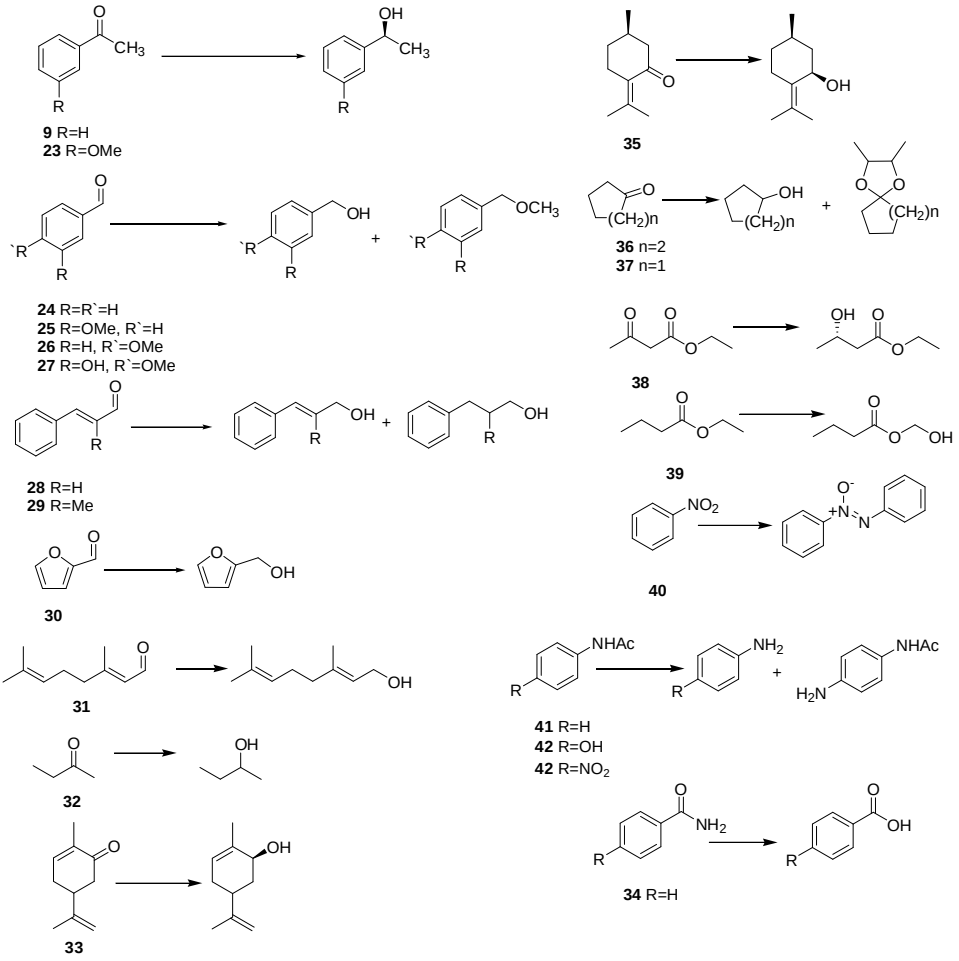


Figura 16. Biotransformaciones de compuestos aromáticos y alifáticos con grupos carbonilo, amidas y nitrobenceno mediadas por agua de coco.

Maczka y Mironowicz describieron la reducción de acetofenonas mediante raíces de zanahoria (*Daucus carota*), apio (*Apium graveolens*) y rábano picante (*Armoracia lapathifolia*), el mejor resultado lo obtuvieron con la raíz de zanahoria en la obtención del alcohol (*S*)-(−)-1-(2-nafil)etanol con un rendimiento del 100% y un ee >98% a partir de la

reducción del compuesto 2-acetonaftona. Los autores observaron que el sistema enzimático de la zanahoria es altamente dependiente del sustrato pues el compuesto 2-acetonaftona se reduce completamente mientras que el compuesto 1-acetonaftona no resultó biotransformado (Mączka and Mironowicz 2002).

Posteriormente, los mismos autores ampliaron este estudio mediante la bio-reducción de *orto*-, *meta*- y *para*-metoxiacetofenona ,y *orto*-, *meta*- y *para*-bromoacetofenona (Maczka and Mironowicz 2004). Observaron que tanto las bio-reducciones con zanahoria como las llevadas a cabo con apio procedieron estereoselectivamente siguiendo la regla de Prelog. Por otra parte, la presencia del sustituyente en la posición *meta* en los sustratos estudiados, sin importar que fueran electrón atrayente o donante, presentaron los mejores resultados de bioconversión para ambos biocatalizadores. En lo concerniente a las acetofenonas *para* sustituidas, la reducción del sustrato que porta el átomo bromo ocurrió tres veces más rápido que las cetonas metoxi-sustituidas para ambos vegetales. Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos por el grupo de Akakabe (Akakabe, Takahashi et al. 1995) y el trabajo de Nakamura y Matsuda (Nakamura and Matsuda 1998).

El grupo de Suárez-Franco y colaboradores utilizaron brócoli (*B. oleracea var. italic*), coliflor (*B. oleracea var. botrytis*), remolacha (*B. vulgaris var. cicla*) y espinaca (*S. oleraceae*) para la reducción de cetonas y aldehídos aromáticos a sus correspondientes alcoholes, los que presentan utilidad como fragancias cosméticas. El brócoli y el coliflor presentaron los máximos rendimientos de conversión en tiempos muy cortos. Los cuatro vegetales ensayados rindieron excelentes conversiones luego de 24 horas para los aldehídos aromáticos (Suárez-Franco, Hernández-Quiroz et al. 2010).

La especie vegetal, *Phaseolus aureus*, que es un frijol muy empleado en India para la preparación de dal y curry, fue estudiado como agente bio-reductor frente a acetofenona. Se observó que a las 24 horas de reacción y a una temperatura de 10-15ºC se llevó a cabo la reducción con un 84% de *ee* para el alcohol *S* y con un rendimiento aislado de 52%. Con este resultado los autores ampliaron el estudio de la bio-reducción hacia una variedad de cetonas aromáticas y alifáticas obteniendo resultados de pureza óptica en los productos en un rango de 72 a 98% y con rendimientos que fueron de 23 a 55% (Kumaraswamy and Ramesh 2003).

Xie y colaboradores emplearon otra especie de la familia Fabaceae, *Phaseolus angularis,* como agente biocatalizador para la reducción asimétrica de cetonas aromáticas. Estudiaron tres concentraciones de sustrato diferentes y observaron que a una concentración 100mM se obtuvo un alto porcentaje de conversión y excelente estereoselectividad. Las bio-reducciones transcurrieron según la regla de Prelog. Por otra parte, los autores destacaron que el cofactor NADPH, se regenero en el sistema enzimático del crudo vegetal utilizando glucosa como sustrato auxiliar (Xie, Xu et al. 2009).

Microorganismos endófitos, un nicho poco explorado

Como fue mencionado al principio de este capítulo, el área de la biocatálisis requiere del continuo descubrimiento de nuevos biocatalizadores y del desarrollo de tecnologías que faciliten el uso de los mismos por los potenciales usuarios. El aislamiento de nuevos microorganismos a partir de hábitats naturales constituye una estrategia interesante para la obtención de los mismos.

Un área poco explorada en búsqueda de nuevos biocatalizadores es la de microorganismos endófitos. Los microorganismos endófitos son, hongos o bacterias, que viven dentro de tejidos vegetales sanos sin causar daño (Bascom-Slack, Arnold et al. 2012). Como organismos simbiontes, ellos forman parte del diverso y ecológicamente importante microbioma vegetal (Rodriguez, White Jr et al. 2009). Exhiben un amplio rango de especificidad hacia el hospedero y resultan ser beneficiosos para la especie vegetal que lo porta (Bascom-Slack, Arnold et al. 2012).

Los microorganismos endófitos forman con sus hospederos relaciones simbióticas complejas. Existen varios ejemplos de ello, tales como hongos endófitos en pastos de las zonas templadas que les proveen protección contra herbívoros y depredación de semillas mediante producción de toxinas. A cambio reciben nutrientes, un nicho donde vivir y, en algunos casos, dispersión a través de la semilla de su hospedero (Johnson, Dahlman et al. 1985; Knoch, Stanley et al. 1993; Clay 1998). Por otro lado se ha determinado que bacterias endófitas protegen de estrés biótico y abiótico a la planta hospedera (Hallmann, Quadt-Hallmann et al. 1997).

Los efectos de los microorganismos endófitos sobre la planta son de diversos tipos estando implicados en la estimulación del crecimiento debido a la fijación de nitrógeno (Hurek, Handley et al. 2002; Gupta, Panwar et al. 2012; Santi, Bogusz et al. 2013), la producción de fitohormonas (Ren and Dai 2012; Lin and Xu 2013), el biocontrol de fitopatógenos (Carroll 1988; Kusari, Kusari et al. 2012; Rakotoniriana, Rafamantanana et al. 2013), la adquisición de minerales (Sessitsch, Howieson et al. 2002), o la producción de compuestos que promueven el crecimiento vegetal (Ryu, Farag et al. 2003; Rosenblueth and Martínez-Romero 2006). Los compuestos bioactivos producidos por los microorganismos endófitos están involucrados en la relación hospedero-microorganismo (Kusari, Hertweck et al. 2012). Este hecho ha promovido la investigación de nuevos microorganismos endófitos que sinteticen productos secundarios bioactivos (Daisy, Strobel et al. 2002; Kumar and Kaushik 2013).

En el área de productos naturales, existe un creciente interés en el aislamiento de microorganismos endófitos capaces de producir compuestos bioactivos (Daisy, Strobel et al. 2002; Strobel and Daisy 2003; Strobel, Daisy et al. 2004). Es de destacar que dado que existen cerca de 300.000 especies vegetales en el planeta, y que se estima que cada una de ellas es hospedera para uno o más endófitos, existe la oportunidad de encontrar microorganismos endófitos capaces de producir compuestos de interés para la industria de agroquímicos y farmacéutica (Strobel and Daisy 2003).

El interés en esta área tiene su origen en el descubrimiento del paclitaxel (Figura 17). Este compuesto, aislado a partir de la corteza de *Taxus brevifolia* por Wani y colaboradores (Wani, Taylor et al. 1971) es una droga sumamente importante en el tratamiento de varios tipos de cáncer. Su producción sin embargo, ha constituido un desafío mayor tanto para el

químico orgánico como para el químico de productos naturales. Se han descrito síntesis muy elegantes de esta molécula (Robert, Holton et al. 1994; Nicolaou and Guy 1995) pero inviables de transferir a la industria farmacéutica. Por otro lado, su aislamiento a partir de la corteza del árbol tampoco resulta viable pues es un árbol de crecimiento muy lento y sería imposible de sustentar sobre esta base la demanda de esta droga. Frente a este desafío, Stroebel y colaboradores aislaron y caracterizaron microorganismos endófitos presentes en la corteza de *Taxus brevifolia*, y estudiaron su capacidad de producir Taxol. En 1995 describieron el aislamiento del primer hongo productor de taxol, *Taxomyces andreanae* (Stierle, Strobel et al. 1995). Si bien problemas asociados al rendimiento obtenido con la producción de Taxol a partir de hongos, no ha permitido la producción comercial por ese medio (Staniek, Woerdenbag et al. 2009), este antecedente sentó las bases de una nueva área: la producción de metabolitos secundarios de plantas en microorganismos endófitos. Con posterioridad se han descrito varios microorganismos productores de paclitaxel, aislados de diferentes especies vegetales. Asimismo se han aislado microorganismos endófitos capaces de biosintetizar numerosos compuestos bioactivos (Strobel, Hess et al. 1997; Li, Sidhu et al. 1998; Daisy, Strobel et al. 2002; Ji, Bi et al. 2006; Gangadevi and Muthumary 2008).

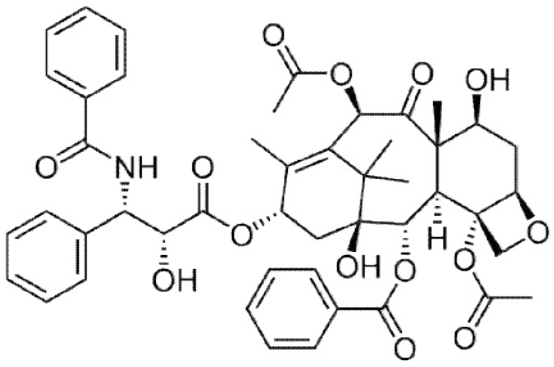


Figura 17. Estructura del paclitaxel.

La presencia constatada de rutas metabólicas similares a las del hospedero en microorganismos endófitos resulta sumamente interesante, dada la gran diversidad metabólica que caracteriza al reino vegetal. La existencia de capacidades biosintéticas similares en los microorganismos endófitos se ha postulado que puede provenir de recombinación génica huésped-hospedero que se han dado a lo largo de mucho tiempo de coevolución (Stierle, Strobel et al. 1995; Strobel and Daisy 2003). Asimismo, los microorganismos endófitos deben convivir con compuestos de defensa tóxicos producidos por la planta por lo que necesitan estar adaptados mediante un conjunto de enzimas capaces de biodegradar los mismos a fin de poder subsistir en estas condiciones ambientales (Zikmundova, Drandarov et al. 2002; Borges, Borges et al. 2009). Ambos antecedentes sustentan la hipótesis de que los microorganismos endófitos pueden albergar enzimas con un enorme potencial de aplicación en biocatálisis, sin embargo esta área ha sido muy poco explorada (Borges, Borges et al. 2009; Pimentel, Molina et al. 2010; Abrahão, Molina et al. 2013).

Empleo de microorganismos endófitos en biotransformaciones

Dada la potencial diversidad de microorganismos endófitos resulta sumamente interesante ahondar en el estudio de los mismos así como de los sistemas enzimáticos implicados en la degradación de compuestos activos producidos por las plantas.

En el año 1997, el grupo de Werner aisló hongos endófitos a partir de tallos y raíces de *Aphelandra tetragona* cultivadas mediante propagación y ensayaron su capacidad de metabolizar el principal alcaloide que se acumula exclusivamente en las raíces de esta planta, afelandrina. Varios endófitos fueron capaces de metabolizar este alcaloide, pero los que resultaron ser los mejores degradadores fueron los hongos aislados de la raíz. La capacidad de los endófitos para metabolizar afelandrina sugirió que existe una adaptación ecológica de los simbiontes a su hospedero (Werner, Petrini et al. 1997). Posteriormente, este grupo realizó la biotransformación de los compuestos 2-benzoxazolinona (BOA) y 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (HBOA) empleando cuatro hongos endófitos aislados de raíces y brotes de *Aphelandra tetragona*. Los compuestos BOA y HBOA, son metabolitos producidos constitutivamente por la planta y constituyen una barrera de defensa química frente a microorganismos. En este trabajo los autores describieron la obtención de productos de acilación, oxidación, reducción, hidrólisis y nitración de la biotransformación de los compuestos BOA y HBOA. Particularmente el hongo endófito *Fusarium sambucinum* detoxificó BOA y HBOA al ácido *N*-(2-hidroxifenil)malonámico mientras que los otros tres hongos endófitos no fueron capaces de metabolizar BOA aunque si HBOA rindiendo una serie de compuestos. La capacidad de *Fusarium sambucinum* de detoxificar BOA se explicó por la adaptación de este microorganismo endófito al ambiente de compuestos tóxicos presentes en de *A. tetragona* (Zikmundova, Drandarov et al. 2002).

El grupo de investigación de Yue y colaboradores, llevó a cabo el estudio de la biotransformación de los compuestos 6-metoxi-benzoxazolinona y 2-benzoxazolinona (BOA) mediante el hongo endófito de maíz *Fusarium moniliforme*, obteniendo los ácidos malonámicos *N*-(2-hidroxi-4-metoxifenil) and *N*-(2-hidroxifenil) (Yue, Bacon et al. 1998). Dado que las benzoxazinonas están presentes en Gramineae, el hecho de que *Fusarium moniliforme* fue capaz de metabolizar estos compuestos estaría indicando que existe una adaptación del hongo endófito frente a las fitoanticipinas producidas por el maíz.

Shibuya y colaboradores postularon la capacidad de hongos endófitos que residen en la especie vegetal *Cinchona* de transformar los alcaloides presentes en esta planta. Estos alcaloides se han utilizado en el tratamiento de varias enfermedades. En particular, la quinina que es un antimalárico muy popular. Luego de realizar un screening en diez hongos endófitos frente a los alcaloides de *Cinchona*, encontraron que el hongo *Xylaria* sp. transformó mediante reacciones de oxidación cuatro clorhidratos de los alcaloides de *Cinchona* (Shibuya, Kitamura et al. 2003).

Siguiendo con esta línea de investigación, Shibuya y colaboradores aislaron treinta y cinco hongos filamentosos a partir de tallos jóvenes de la planta *Camellia sinensis*. Esta planta es rica en compuestos flavanos. Llevaron a cabo un screening para evaluar la capacidad de los endófitos aislados de biotransformar (+)-catechin (flavan-3-ol), el hongo *Diaporthe* sp. fue el único capaz de oxidar estereoselectivamente la posición C-4 de la flavanona. Esta evidencia sustenta la hipótesis planteada por los autores de que los microorganismos endófitos

presenten la capacidad de biotransformar metabolitos secundarios presentes en las plantas (Agusta, Maehara et al. 2005; Shibuya, Agusta et al. 2005).

En el año 2004, el grupo de Bastos aisló microorganismos epifíticos y endófitos del árbol *Platanus orientalis* L., con la finalidad de emplear estos microorganismos como agentes biocatalizadores para la biotransformación del ácido betulínico y el ácido betulónico, compuestos presentes en la especie vegetal *en estudio*, dado que estos compuestos y sus derivados presentan una interesante actividad farmacológica frente a HIV y melanoma (Bastos, Pimentel et al. 2004). Cuatro de los hongos aislados, *Arthrobotrys*, *Chaetophoma*, *Dematium* (aislados de corteza del árbol) y *Colletotrichum* (aislado de hojas) fueron capaces de metabolizar mediante reacciones de oxidación ambos compuestos. Los autores argumentaron que el empleo de microorganismos aislados de la misma fuente donde está el sustrato aumenta la probabilidad de obtener derivados del mismo (Bastos, Pimentel et al. 2007).

En sus estudios de microorganismos endófitos en plantas tropicales, Murgu y colaboradores, aislaron un hongo Xylareaceous a partir del interior del fruto de *Sapindus saponaria*. Llevaron a cabo el estudio de la biotransformación de 3-*O*-(β-D-xilopiranosil)-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-hederagenina, compuesto aislado de los frutos de *Sapindus saponaria*, mediante el hongo endófito. De la biotransformación, obtuvieron el el compuesto 3-*O*-(β-D-xilopiranosil)-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-hidroxihederagenina, que también estaba presente en el fruto de *Sapindus saponaria* (Murgu and Rodrigues-Filho 2006).

Los hongos endófitos están siendo cada vez más utilizados en la obtención de compuestos de alto valor agregado que tradicionalmente se obtenían a partir de la planta que los alberga. Ejemplos de estos compuestos son, entre otros, el paclitaxel, vinblastina, vincristina y podofilotoxina. Esta nueva modalidad de producción de moléculas mediante endófitos se ve favorecida ya que la producción mediante células vegetales requiere largos tiempos (2 a 3 semanas), mientras que si se incuba el hongo endófito productor del compuesto de interés en presencia de un precursor de la droga el tiempo requerido en el proceso se reduce sustancialmente. El compuesto vincristina, que es una droga muy empleada para distintos tipos de cáncer, está presente en las hojas de *Catharanthus roseus*. Kumar y Ahmad, aislaron el hongo endófito *Fusarium oxysporum* a partir de *Catharanthus roseus* y llevaron a cabo la biotransformación de vinblastine a vincristine, compuesto menos abundante y utilizado como fármaco para tratamiento de cáncer, (Kumar and Ahmad 2013).

Dadas las características de los hongos endófitos en relación a la producción de compuestos naturales, y a su potencial uso como biocatalizadores por poseer enzimas degradadoras de compuestos tóxicos de los vegetales, Verza y colaboradores llevaron a cabo el estudio de la biotransformación del compuesto grandisina (compuesto con actividad tripanocida) mediante el screening de veinte cepas endófitas de su colección. De este estudio resultó que con el hongo *Phomopsis* sp., aislado a partir de *Viguiera arenaria,* se obtuvo el derivado 4-dimetil-2-(4'-hidroxi-3',5'-dimetoxiphenil)-5-metoxi-tetrahidrofurano que también presentó actividad tripanocida (ver figura 18). Este resultado sirvió para simplificar la síntesis de análogos tripanocidas (Verza, Arakawa et al. 2009).

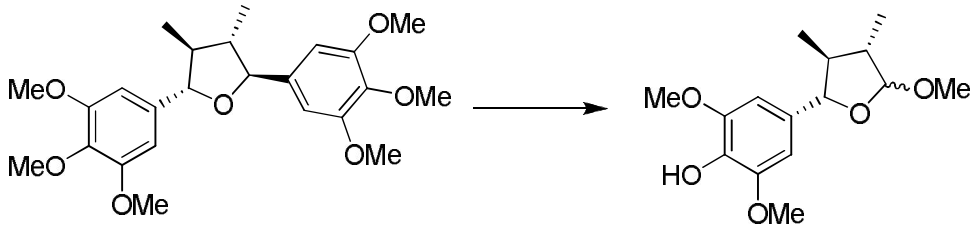


Figura 18. Biotransformación del compuesto grandisina mediante *Phomopsis* sp.

Recientemente, Prado y colaboradores, aislaron (+)-(4S)-isosclerona (una dihidronaftalona comúnmente encontrada en sus dos formas enantioméricas tanto en plantas como en hongos) a partir del hongo endófito *Paraconiothyrium variabile* (1E2a) aislado de *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea*. Este compuesto es un componente estructural importante de varios productos naturales con un sistema de anillo espirobisnaftaleno. Con la finalidad de aportar datos en la biosíntesis de tetralonas, Prado y colaboradores utilizaron el hongo endófito *Paraconiothyrium variabile* para llevar a cabo la biotransformación del compuesto 5-hidroxi-1,4-naftalenodiona (juglona) obteniendo (+)-(4S)-isosclerona. A su vez cuando realizaron la biotransformación de otros derivados naftalenos obtuvieron los correspondientes (4*S*)-hidroxi-1-tetralona. Los autores de este trabajo postulan que estos últimos compuestos podrían ser componentes estructurales de varios productos naturales con esqueleto espirobisnaftaleno (Prado, Buisson et al. 2013).

Borges y colaboradores, en el marco de un proyecto en donde estudiaron la biotransformación estereoespecífica de drogas, recurrieron al aislamiento de hongos endófitos como fuente potencial de nuevos biocatalizadores por ser un nicho poco explorado. De esta forma estudiaron la biotransformación del compuesto Thioridazine (THD), una droga usada en el tratamiento de la esquizofrenia y otros desordenes psiquiátricos. Esta droga se comercializa en forma racémica. Se metaboliza mediante la oxidación del enantiómero *S* a thioridazine-5-sulfoxido (THD-5-SO) y thiaridazina-2-sulfoxido (THD-2-SO) el cual se continúa metabolizando a thioridazine-2-sulfone (THD-2-SO_2). El objetivo de su trabajo fue el desarrollo de un método de análisis estereoselectivo de THD-2-SO y THD-5-SO y el estudio de la biotransformación de THD racémico a través de hongos endófitos. Para ello evaluaron doce hongos endófitos aislados de las especies vegetales *Tithonia diversifolia, Viguiera arenaria* y *Viguiera robusta.* Cuatro de estos hongos fueron capaces de biotransformar THD a los principales metabolitos humanos THD-2-SO y THD-5-SO mediante la oxidación del átomo de azufre en la cadena lateral (posición 2) o en el anillo (posición 5) (Borges, Borges et al. 2007; Borges, Borges et al. 2008).

Posteriormente, este grupo de investigación llevó a cabo el estudio de la biotransformación del compuesto racémico propranolol (Prop). Este compuesto se emplea para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Los enantiómeros del compuesto Prop poseen diferente actividad β-bloqueante, siendo el (-)-(*S*)-Prop cien veces más potente que el (+)-(*R*)-Prop. El compuesto 4-hidroxipropanolol (4-OH-Prop), que se obtiene en la fase I del metabolismo de mamíferos, posee también actividad biológica. Dada la potencialidad de los hongos endófitos de ser utilizados como agentes biocatalizadores ya que con los mismos se obtienen cantidades sustanciales y en forma ópticamente pura, los autores realizaron este ensayo de biotransformación con cinco hongos endófitos aislados a partir de la especies vegetales *Tithonia diversifolia*, *Viguiera robusta* y *V. arenaria* (Asteraceae). Todos los

hongos presentaron actividad biocatalítica frente a rac-propranolol, en particular, con la cepa *Glomerella cingulata* (VA1) lograron biotransformar el 47.8% de (-)-(*S*)-Prop a (-)-(*S*)-4-OH-Prop sin la obtención de (+)-(R)-4-OH-Prop a las 72 horas de incubación (Borges, Pupo et al. 2009).

Las biotransformaciones han mostrado utilidad en la modificación de moléculas con actividad biológica pero tóxicas a variantes menos tóxicas sin comprometer su actividad biológica (Shu, Johnson et al. 2008). En un trabajo de Tang y colaboradores se utilizó el hongo endófito *Alternaria alternata* y el hongo fitopatógeno *Gibberella fujikuroi* para llevar a cabo la biotransformación en tándem del compuesto podofilotoxina (un lignano con actividad anticancerígena pero con gran toxicidad en humanos) rindiendo el nuevo derivado 4-(2,3,5,6-tetra-metilpirazina-1)-4-demetilepipodopilotoxina. Este nuevo compuesto presentó alta actividad antitumoral pero con baja toxicidad (Tang, Zhao et al. 2011).

Torres y colaboradores recurrieron a los microorganismos endófitos de plantas Mediterráneas, como fuente potencial de biocatalizadores, para la obtención de nuevas lipasas. Aislaron noventa y cuatro hongos endófitos con los cuales realizaron un screening de actividad hidrolítica empleando tributirina como sustrato. De esta forma detectaron setenta y seis microorganismos activos. Posteriormente realizaron un segundo screening para evaluar actividad lipasa unida a micelio, para ello ensayaron la esterificación de un alcohol con un ácido carboxílico en solvente orgánico observando que las setenta y seis cepas presentaron actividad de síntesis de propiloleato. Sin embargo, únicamente la cepa *Rhizopus oryzae* aislada a partir de hinojo (*F. vulgare*) presentó alta actividad hidrolítica y sintética (Torres, Dolcet et al. 2003).

En un trabajo reciente se utilizó la cepa endófita *Rhizopus oryzae* aislada por Torres y colaboradores, junto con una cepa de *Aspergillus fumigatus* aislada de suelo forestado con olivos para llevar a cabo la síntesis de acrilatos dicloropropilos a partir de dodecanoatos dicloropropilos mediante transesterificación. Los hongos filamentosos que fueron empleados en forma de células en reposo llevaron a cabo la reacción pero siempre con rendimientos bajos a moderados si se los compara con enzimas comerciales como CAL-B. (Edinson, Jordi et al. 2013).

La demanda industrial hacia la obtención de nuevas lipasas llevó a la búsqueda de nuevos microorganismos lipolíticos. La inmensa diversidad biológica en la región del Amazona constituye una fuente sumamente interesante de vegetales, metabolitos secundarios, y por ende, microorganismos con novedosa actividad catalítica. Zanotto y colaboradores aislaron doscientas doce cepas fúngicas a partir de plantas del Amazona. De las cuales 74 endófitas, 41 fitopatógenas y 70 degradadoras de madera mostraron actividad hidrolítica. El 30% de estas cepas mostraron buenos crecimientos cuando fueron cultivadas en un medio inductor de lipasas. La evaluación de la capacidad de estas cepas en reacciones de esterificación y transesterificación en solventes orgánicos resultó en 9 hongos con buena actividad en las reacciones evaluadas. Para verificar la enantioselectividad de las lipasas unidas a micelio se llevó a cabo la resolución del compuesto (*R*,*S*)-2-octanol por medio de los nueve hongos seleccionados. Se encontró que la cepa UEA_115, un hongo degradador de madera, resultó ser el mejor candidato como biocatalizador ya que mostró un buen desempeño en las reacciones de esterificación (conversión > 90%) y buena actividad en la resolución de la mezcla racémica 2-octanol (*ee*s 29%; *ee*p 99%; c 22%; E > 200). Este estudio demostró el

gran potencial que poseen los hongos de la región amazónica para la obtención de lipasas (Zanotto, Romano et al. 2009).

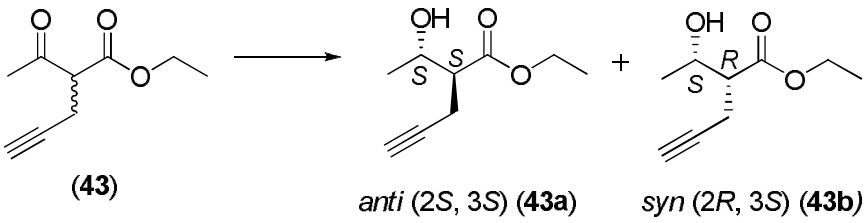
En la búsqueda de nuevas lipasas, Oliveira y colaboradores emplearon la levadura endófita de ricino *Candida guillermondi*. Esta levadura, que fue aislada a partir de hojas de ricino (*Ricinus communis*), produce lipasas extracelulares cuando se incubó en medio líquido. El crudo enzimático fue inmovilizado y se evaluó su actividad de síntesis de oleato de metilo observando que fue un proceso eficiente y que pudo reusarse frente a estos resultados los autores indicaron que el crudo enzimático usado en este trabajo presenta potencial para ser utilizado en síntesis de esteres en las industrias alimenticias, de biocombustibles o para aplicaciones de laboratorio (Defranceschi Oliveira, Farion Watanabe et al. 2012).

Continuando en la búsqueda de nuevas lipasas con aplicación industrial, Venkatesagowda y colaboradores aislaron 1279 hongos endófitos a partir de semillas oleaginosas de ricino, de coco, nim, cacahuete, pongamia, caucho y sésamo colectadas de diferentes zonas de Tamil Nadu, India. Los hongos endófitos de semillas oleaginosas constituyen una comunidad microbiana importante que puede deteriorar la calidad del aceite extraído. Por otra parte, se ha descrito que los hongos que están presentes durante el almacenamiento de las semillas son productores de lipasas extracelulares (Ward and Diener 1961; Roberts, Morrison et al. 1987; Guehi, Dingkuhn et al. 2007). Los autores de este trabajo realizaron la determinación de actividad lipolítica en endófitos aislados, detectando 40 aislamientos con actividad lipolítica, los cuales fueron identificados como pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chalaropsis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Stachybotrys* y *Trichoderma*. Estos aislamientos también presentaron actividad amilolítica, proteolítca y celulolítica. Las cepas *Aspergillus niger*, *Chalaropsis thielavioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Phoma glomerata* exhibieron fuerte actividad lipasa siendo la cepa *Lasiodiplodia theobromae* la mejor productora de lipasa (Venkatesagowda, Ponugupaty et al. 2012).

Pedrini y colaboradores emplearon hongos filamentosos endófitos para la reducción enantioselectiva de cetonas proquirales. Los autores de este trabajo llevaron a cabo el screening de actividad reductasa en doce cepas fúngicas endófitas aisladas a partir de varias plantas de la región Amazónica y de Italia (entre las que se encuentran las especies *Eugenia hallii*, *Schinus molle*, *Crataegus monogyna*, *Juniperus communis* y *Sambucus nigra*). Los hongos aislados fueron testeados frente a un cóctel de las cetonas 5-hexen-2-ona, acetofenona, *cis*-biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona, 2-metilciclohexanona. Las cuatro cepas que presentaron mejor actividad fueron *Phomopsis* (FE86 y FE290), *Pestalotia* y *Epicoccum*. Con estas cepas se llevó a cabo la bio-reducción de cada una de las cetonas testeadas en el cóctel por separado y a su vez, se estudió la bio-reducción de los compuestos 6-metil-5-hepten-2-ona, 2-furil metil cetona, 1-indanona y 2,4,4-trimetil-2-ciclohexen-1-ona. En todas las bio-reducciones analizadas se obtuvieron los alcoholes *S* en rendimientos y *ee* variables dependiendo de la cepa empleada (Pedrini, Giovannini et al. 2009).

En el año 2006 nuestro grupo comenzó a trabajar en una nueva línea de investigación que surgió por el interés que despertó en nuestro grupo los antecedentes del uso de vegetales en biocatálisis. En aquel momento nos planteamos el interrogante de si realmente eran las enzimas vegetales las responsables de las biotransformaciones o si los microorganismos endófitos presentes en el vegetal pudieran estar participando como biocatalizadores. Surette

y colaboradores estudiaron la comunidad de endófitos en zanahoria (*D. carota*), aislando 360 cepas de bacterias (Surette, Sturz et al. 2003). Estos resultados, aunados con los antecedentes en el uso de raíz de zanahoria como biocatalizador, nos llevaron a aislar endófitos a partir de raíz de *D. carota* y a probar su actividad como biocatalizadores. Los resultados obtenidos fueron sumamente interesantes, ya que se aislaron tres cepas bacterianas y dos levaduras capaces de reducir acetofenona (el sustrato más utilizado en la caracterización de plantas con potencial bioreductor). Con estas cepas se ensayó inicialmente la reducción de α-propargil-acetoacetato de etilo (**43**) obteniéndose, con las cinco cepas, los alcoholes correspondientes **43a** y **43b** (Figura 19). Con las tres cepas bacterianas y la cepa de levadura *Rhodotorula* sp. se obtuvo igual estereoselectividad a la obtenida con *D. carota*, mientras que con la cepa de levadura *Pichia* sp. se obtuvo el compuesto *syn* (2*R*, 3*S)* en una relación 94/6, es decir que con esta cepa obtuvimos como diasterómero mayoritario el opuesto al que se obtenía con la raíz de zanahoria. El hecho de que con las cepas bacterianas, así como también con *Rhodotorula* sp. se obtuvo la misma diasteroselectividad a la presentada con la raíz de zanahoria favorece la hipótesis de que los microorganismos endófitos podrían estar involucrados en la biotransformación del compuesto **43** cuando se utiliza la raíz de zanahoria como biocatalizador. Para fortalecer esta hipótesis se ensayó la biotransformación, utilizando *D. carota* como biocatalizador, en presencia de cloranfenicol como inhibidor bacteriano y cicloheximida para la inhibición del crecimiento de levaduras. La biotransformación en presencia únicamente del inhibidor bacteriano afecto la estereoquímica de la reacción. Por otro lado cuando adicionamos únicamente cicloheximida al medio de reacción se observó que la estereoquímica de la reacción era similar a la obtenida con *D. carota*. Por último cuando agregamos conjuntamente la cicloheximida y el cloranfenicol se obtuvo una drástica disminución del porcentaje de bioconversión. Estos resultados fortalecen la hipótesis de que los microorganismos endófitos pueden estar involucrados en la biotransformaciones mediadas por vegetales (Rodríguez, Barton et al. 2007). Este trabajo publicado por nuestro grupo constituyó la primera evidencia de que los microorganismos endófitos pueden estar involucrados en las reacciones mediadas por vegetales. Además, constituye el primer reporte de reducciones de cetonas proquirales por microorganismos endófitos, y sentó las bases para el presente trabajo de tesis.



(**43**) *anti* (2*S*, 3*S*) (**43a**) *syn* (2*R*, 3*S*) (**43b***)*

Figura 19. Reducción de α-propargil acetoacetato de etilo (**43**) mediante microorganismos endófitos de *D. carota*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por vegetales y obtener biocatalizadores con actividad reductasa para la producción de compuestos con potencial utilidad en síntesis orgánica.

Objetivos específicos

1. Aislar microorganismos endófitos a partir de las especies vegetales: ceibo (*Erythrina crista-galli*), zapallo (*Cucurbita maxima*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), rabanito (*Raphanus sativus*) y zanahoria (*Daucus carota*).

2. Evaluar la actividad biocatalítica en las cinco especies vegetales utilizadas en el objetivo 1.

3. Realizar ensayos que aporten datos para sustentar o descartar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por vegetales.

4. Determinar la actividad biocatalítica en los microorganismos endófitos aislados.

5. Identificar los microorganismos endófitos con actividad biocatalítica.

6. Estudiar la bio-reducción de cetonas proquirales mediante microorganismos endófitos y tejidos vegetales.

Antecedentes de los vegetales y sustratos utilizados

Aislamiento de microorganismos endófitos a partir de cinco especies vegetales.

Elección de las plantas a estudiar

Se llevó a cabo el aislamiento de microorganismos endófitos en cinco especies vegetales utilizando diferentes órganos de las mismas. Para algunas de las especies en estudio se incluyeron ensayos con cultivos de laboratorio como ser raíces transformadas, cultivos celulares o plántulas. En la tabla 3 se muestra los materiales vegetales utilizados para cada especie en estudio.

Tabla 3. Especies vegetales y órganos utilizados para el aislamiento de endófitos.

Especie vegetal	Órganos y formas de crecimiento
Ceibo (*Erythrina crista-galli*)	Hojas
Zapallo (*Cucurbita maxima*)	Fruto (pulpa)
Hinojo (*Foeniculum vulgare*)	Hojas, tallos y raíz
Zanahoria (*Daucus carota*)	Raíz y callos (cultivos celulares)
Rabanito (*Raphanus sativus*)	Raíz, raíces transformadas y plántulas

La elección de las plantas a estudiar tuvo en cuenta dos grandes criterios. En primer término se seleccionó una planta nativa, de distribución nacional, pues se consideró interesante estudiar una especie autóctona y no cultivada, eligiéndose para ello el ceibo (*Erythrina crista-galli* L.).

El estudio de plantas nativas tiene importancia desde el punto de vista de conocimiento y preservación de la diversidad existente, a su vez permite un nicho de trabajo científico original. Por otro lado, se considera que las especies nativas en su habitat natural, tienen más tiempo de coevolución con los microorganismos que la habitan, hecho que ha sido señalado como importante en la probabilidad de encontrar microorganismos endófitos con capacidades biosintéticas similares a las de sus hospederos (Strobel 2002; Strobel 2002; Borges, Borges et al. 2009). En este sentido Redko y colaboradores aislaron a partir de ramas de ceibo el hongo endófito *Phomopsis* (Redko, Clavin et al. 2006). En este trabajo reportaron la presencia de dos compuestos isoflavonoides, comunes, con actividad antimicrobiana en los extractos obtenidos a partir de ramas envejecidas de ceibo y en los extractos obtenidos a partir del micelio endófito. La aparición de los mismos metabolitos secundarios en la planta y en el hongo endófito, sugiere una posible interacción entre estos organismos en la producción y/o transferencia de los metabolitos, probablemente asociado a la transferencia horizontal de información genética entre un vegetal y sus microorganismos endófitos (Redko, Clavin et al. 2006). El caso mas emblemático en este sentido lo constituye el aislamiento del hongo *Taxomyces andreanae* productor de taxol, a partir de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* (Stierle, Strobel et al. 1995)

Ceibo (Erythrina crista-galli L.)

El ceibo es un árbol generalmente de poca altura (eventualmente puede superar los 15 m) con aguijones recurvos y follaje caduco. Esta especie está distribuida en el Sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y en Argentina, es común a orillas de ríos y arroyos en todo el país. Es una planta medicinal que es usada tradicionalmente como sedante y analgésica (Carrere).

Un preparado obtenido por decocción y maceración de la corteza y de las hojas es utilizado en medicina popular, que le atribuye propiedades antiinflamatorias, narcóticas y sedantes, mencionándose también su uso como emoliente y antitusivo (Miño, Gorzalczany et al. 2002). Externamente se aplica como desinfectante y cicatrizate de heridas y úlceras. Por otro lado, se han descrito actividades antibacterianas (Mitscher, Ward et al. 1984; Mistscher, Gollapudi et al. 1988) y antiinflamatorias(Miño, Gorzalczany et al. 2002) de esta planta.

Como segundo criterio, se eligió trabajar con plantas con probada actividad biocatalítica, en especial con actividad reductasa. En la bibliografía hay numerosos trabajos que describen el empleo de la especie vegetal zanahoria (*Daucus carota*) para la reducción de grupos carbonilo. Las reacciones de reducción llevadas a cabo por este biocatalizador, generalmente, transcurren según la regla de Prelog (Giri, Dhingra et al. 2001; Cordell, Lemos et al. 2007). Otras dos especies vegetales utilizadas para la obtención de alcoholes *S* a partir de cetonas proquirales fueron zapallo (*Curcubita maxima*) e hinojo (*Foeniculum vulgare*) (Aldabalde, Arcia et al. 2007). Para la búsqueda de biocatalizadores con actividad anti-Prelog se decidió trabajar con la especie vegetal rabanito (*Raphanus sativus* L.), ya que tiene reconocida actividad anti-Prelog frente a distintas cetonas proquirales (Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009).

Zanahoria (Daucus carota)

Como se describió en el capítulo Introducción y Antedecedentes, se observa que en la literatura existen numerosos trabajos que describen el empleo de zanahoria como agente biocatalizador (Jones and Veliky 1981; Pras, Woerdenbag et al. 1995; Mironowicz and Kromer 1998; Maczka and Mironowicz 2007; Bohman, Cavonius et al. 2009; Solis, Pérez et al. 2010; Vandenberghea, Markó et al. 2013). Inicialmente se utilizó este vegetal bajo la forma de células inmobilizadas (Akakabe and Naoshima 1994; Akakabe, Takahashi et al. 1995) y cultivos celulares (Naoshima and Akakabe 1991; Chadha, Manohar et al. 1996; Orden, Bisogno et al. 2008). En el año 2000 Baldassarre y colaboradores describieron el empleo de este biocatalizador mediante la forma de raíz fresca (Baldassarre, Bertoni et al. 2000). A partir de este trabajo muchos grupos de investigación comenzaron a utilizar la raíz de zanahoria para llevar a cabo, principalmente, reacciones de reducción (Bruni, Fantin et al. 2002; Yadav, Nanda et al. 2002; Comasseto, Omori et al. 2004; Maczka and Mironowicz 2004; Andrade, Utsunomiya et al. 2006; Blanchard and van de Weghe 2006; Bruni, Fantin et al. 2006; Ravía, Gamenara et al. 2006; Utsukihara, Watanabe et al. 2006; Aldabalde, Arcia et al. 2007; Yadav, Reddy et al. 2007; Ferraz, Bianco et al. 2008; Lacheretz, Gomez Pardo et al. 2008; Tong, Cui et al. 2008; Yadav, Subba Reddy et al. 2008; Yang, Zeng et al. 2008; Liu, Pan et al. 2010; Lakshmi, Reddy et al. 2011; Salvano, Cantero et al. 2011; Liu, Wang et al. 2012; Zilinskas and Sereikaite 2013). Otra forma de emplear *Daucus carota* como biocatalizador es mediante el uso de raíces transformadas (Caron, Coughlan et al. 2005).

Zapallo (Curcubita maxima)

Curcubita maxima se empleó como agente biocatalizador en varias reacciones y se utilizó en diferentes formas. Nagaki y colaboradores describieron el empleo de cultivos celulares de *C. maxima* para la obtención de los ácidos geranilgeranoico, farnesoico y geránico mediante la de oxidación de alcoholes isoprenilicos (Nagaki, Imaruoka et al. 2007) (Figura 20).

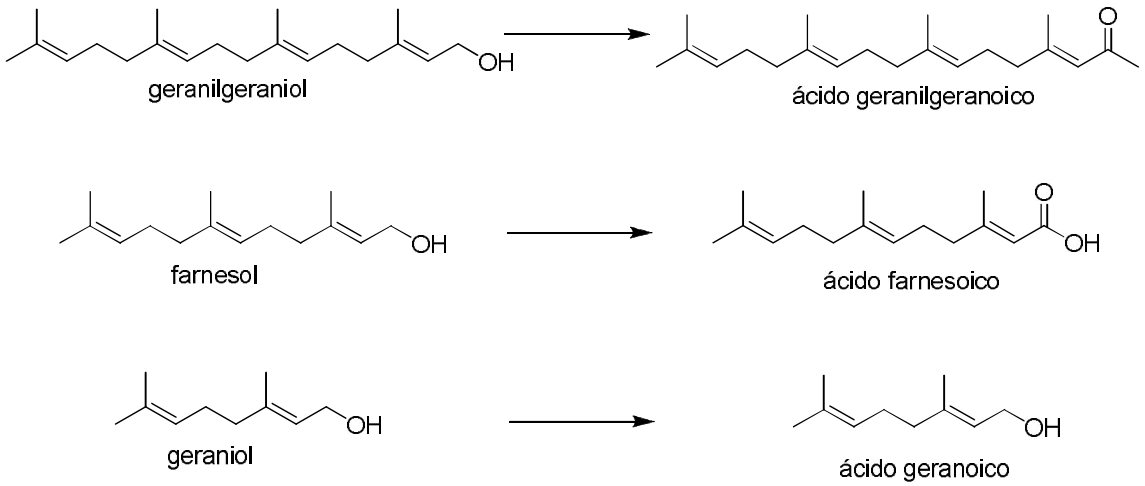


Figura 20. Oxidación de tres alcoholes isoprenílicos mediante cultivos celulares de zapallo.

Por otro lado se utilizó esta especie vegetal para realizar reacciones de reducción. En este sentido Bruni y colaboradores emplearon el fruto del zapallo para la reducción de los compuestos 5-hexen-2-ona, 6-metil-5-hepten-2-ona, acetofenona, cis-biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona y 2-metilciclohexanona obteniendo en todos los casos los alcoholes *S* (Bruni, Fantin et al. 2006).

Siguiendo en esta linea Aldabalde y colaboradores utilizaron diez especies vegetales, entre ellas el fruto del zapallo para la reducción del compuesto 4-acetilpiridina. En este trabajo utilizaron raíz fresca de zanahoria para reducir una serie de metilcetonas heterocíclicas (Figura 21) de forma de optimizar las condiciones de reacción. Posteriormente seleccionaron el sustrato 4-acetipiridina (**46**) para llevar a cabo el estudio de la capacidad biocatalítica en los vegetales estudiados. En el estudio de la especie vegetal *C. maxima* emplearon dos frutos, zapallo y calabaza, en ambos *casos* obtuvieron el alcohol **46a**, mediante el empleo de zapallo este alcohol se obtuvo con un excelente exceso enantiomérico mientras que con la calabaza el *ee* fue del 60%.(Aldabalde, Arcia et al. 2007).

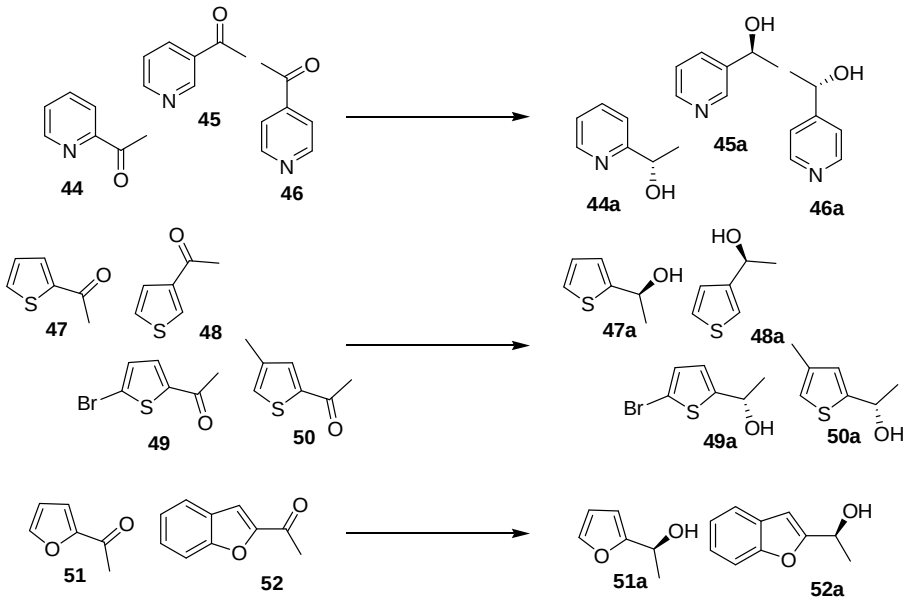


Figura 21. Metilcetonas heterocíclicas y sus productos de reducción mediante especies vegetales.

Hinojo (Foeniculum vulgare)

Esta descrito el uso de *Foeniculum vulgare* como agente biocatalizador en reacciones de reducción e hidrólisis. En este sentido Bruni y colaboradores describieron la reducción de acetofenona (**9**) a su correspondiente alcohol *S* mediante la raíz de zanahoria, el fruto del calabacín (*Curcubita pepo*) y los tallos de hinojo. Por otra parte llevaron a cabo la hidrólisis de 1-acetoxi-2-metilciclohexeno (**53**) a la cetona **53a** mediante el uso de dieciséis especies vegetales diferentes entre las que se encuentra el hinojo. Estos autores observaron que con una posterior incubación de **53a** en presencia de la raíz de zanahoria; el fruto de chirimoya (*Annona cherimola*), el fruto de pepino silvestre (*Cylanthera pedata*); el fruto de granadilla (*Passiflora quadrangualris*) y el tubérculo de oca (*Oxalis tuberosa*) se obtenían los alcoholes en configuración *cis* o *trans* respecto al metilo según el biocatalizador utilizado, y enantiomericamente puros **53b; 53c** (Figura 22) (Bruni, Fantin et al. 2002).

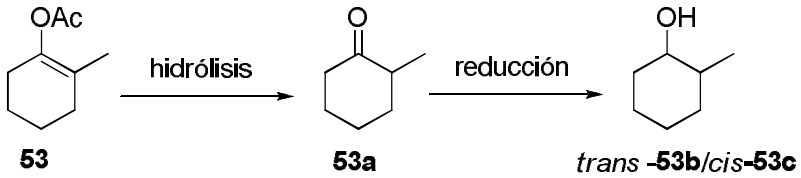


Figura 22. Biotransformación de 1-acetoxi-2-metilciclohexeno (**53**) mediante vegetales (Bruni, Fantin et al. 2002).

En el trabajo de Bruni, descrito anteriormente, se reportó la obtención de los alcoholes *S* cuando se utilizaron tallos de hinojo frente a los compuestos 5-hexen-2-ona, 6-metil-5-hepten-2-ona, acetofenona, cis-biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona y 2-metilciclohexanona.

Asimismo, en el trabajo descrito por Aldabalde y colaboradores emplearon tallos de hinojo para llevar a cabo la reducción de **46**, obtuvieron de esta bio-reducción el alcohol **46a** (Aldabalde, Arcia et al. 2007).

Rabanito (Raphanus sativus L.)

Se decidió trabajar con la especie vegetal *Raphanus sativus L.* debido a la existencia de reportes anteriores que atribuían actividad anti-Prelog de esta planta cuando se ensayó la reducción de distintas cetonas.

En el año 2006, Andrade y colaboradores reportaron la reducción de acetofenona mediante el empleo de raíz de rabanito. Observaron que a los seis días obtuvieron (*R*)-1-feniletanol con un *ee* del 79% aunque en un porcentaje de conversión muy minoritario (4%) (Andrade, Utsunomiya et al. 2006). En este mismo trabajo los autores realizaron la resolución racémica de la mezca (*RS*)-1-feniletanol al llevar a cabo la oxidación del racemato mediante la raíz de rabanito. A los tres días de reacción obtuvieron un 49% de conversión a **9** siendo el alcohol mayoritario en ese tiempo el (*S*)-1-feniletanol con un *ee* del 89%. Sin embargo cuando transcurrió la reacción a los seis días se observó un 74% de conversión a **9** y el 26% de alcohol remanente en la reacción correspondió al (*R*)-1-feniletanol. Este hecho podría explicarse por la presencia de distintas enzimas alcohol deshidrogenasas en el cultivo que presentaron diferente estereoselección.

Posteriormente, Matsuo y colaboradores emplearon plántulas de rabanito para llevar a cabo la reducción de α,α,α-trifluoracetofenona (**54**) y *o*-cloroacetofenona (**55**). En este trabajo, observaron una diferencia en la estereoselectividad de las reducciones de los dos

sustratos ya que si bien ambos rindieron los alcoholes *S*, el producto obtenido resultó del ataque por hidruro desde caras opuestas de la molécula. La producción de *o*-cloro-1-feniletanol (**55a**) siguió la regla de Prelog, mientras que en la reducción de α,α,α-trifluoracetofenona se observó actividad anti-Prelog (Figura 23) (Matsuo, Kawabe et al. 2008).

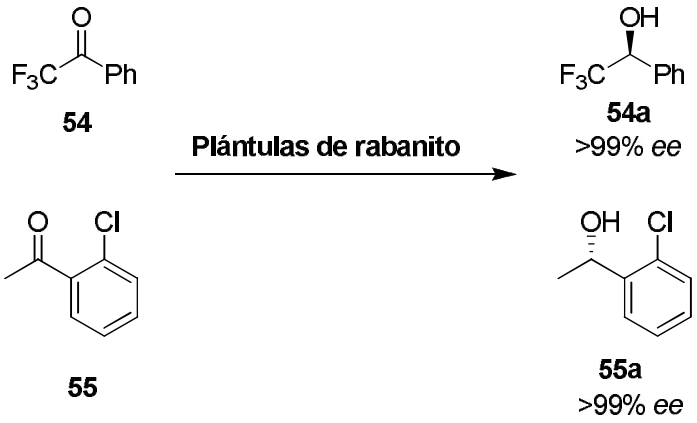


Figura 23. Reducción de cetonas mediante plántulas de rabanito (Matsuo, Kawabe et al. 2008).

Los autores explicaron que esta diferencia en la estereoselectividad pudo deberse a la existencia de varias enzimas que participaron en las bio-reducciones. Este fenómeno se observó, anteriormente, en *Geotrichium candidum* (APG4). El empleo de células de este hongo rindió alcoholes *S* con excelentes excesos enantioméricos en la reducción de metilcetonas mientras que en la reducción del sustrato trifluormetilcetona rindió el alcohol con configuración opuesta, también con excelente *ee* (Matsuda, Harada et al. 2000). Los autores explicaron que la inversión de la estereoquímica fue causada por un factor electrónico ejercido por los halógenos del sustrato trifluorometilcetona. Ellos observaron la presencia de varias enzimas con distinta estereoselectividad en el crudo enzimático, que en las mismas condiciones, unas catalizaron la reducción de acetofenona (**9**) mientras que otras con estereoselectividad opuesta catalizaron la reducción de trifluoroacetofenona (**54**).

En el trabajo de Matsuo y colaboradores se observó que la adición de sacarosa en el medio de cultivo, durante la incubación de las plántulas de rabanito (un periodo de diez días), afectó drasticamente la selectividad en la reducción del sustrato α,α,α-trifluoracetofenona (**54**). La selectividad de la reducción cambió de *R* a *S* posiblemente debido a que se indujo la síntesis de las enzimas responsables de la reducción de **54** al alcohol *S*. Sin embargo, el agregado de sacarosa en el momento de la reducción cambió moderadamente la selección ya que se obtuvo el alcohol *S* en un 46% de *ee* con respecto a un 40% de *ee* que se obtuvo sin el agregado de sacarosa. El efecto observado con la presencia de sacarosa en el medio de cultivo también podría asociarse a un cambio en la comunidad de endófitos, posibilidad que no es considerada por los autores.

Siguiendo con la metodología del uso de partes frescas de vegetales, Utsukihara y colaboradores realizaron la bio-reducción de (+)/(-)-alcanforquinonas, 1,2-ciclohexanodiona y 2-metilciclohexanona mediante ocho especies vegetales diferentes entre ellas emplearon *R. sativus* (Utsukihara, Watanabe et al. 2006).

En la reducción de (+)-alcanforquinona (**56**) mediante rabanito obtuvieron como producto mayoritario (−)-3*S-exo*-hidroxialcanfor (**56c**), mientras que en la reducción de (-)-alcanforquinona (**57**) obtuvieron como productos mayoritarios (+)-3 *R-exo*hidroxialcanfor (**57c**) y (−)-2*S-exo*hidroxiepialcanfor (**57a**) (Figura 24).

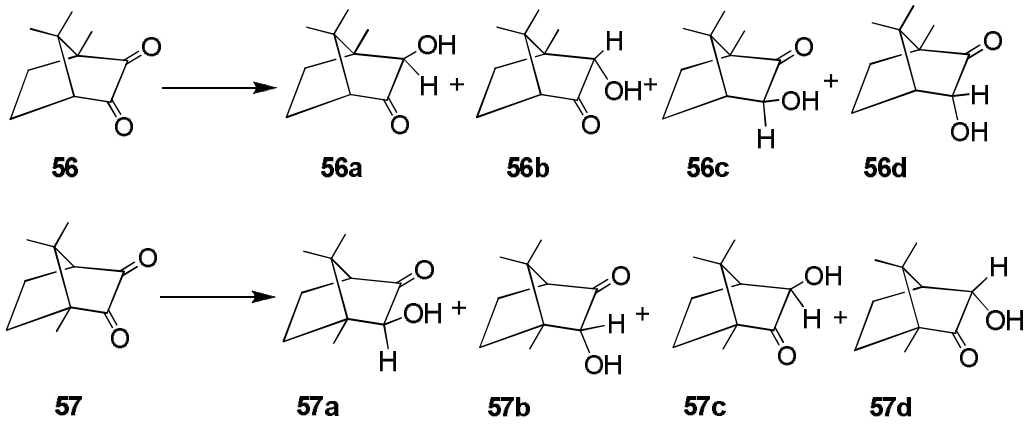


Figura 24. Bio-reducción de (+)/(-)-alcanforquinonas (**56**; **57**) mediante *R. sativus* (Utsukihara, Watanabe et al. 2006).

Por otro lado en la bio-reducción de 1,2-ciclohexanodiona (**58**) utilizando rabanito obtuvieron como compuesto mayoritario el (1*R*, 2*R*)-*trans*-1,2-ciclohexanediol (**58c**) con un *de* del 80%. No se observó producción de hidroxicetonas con ninguno de los vegetales ensayados (Figura 25).

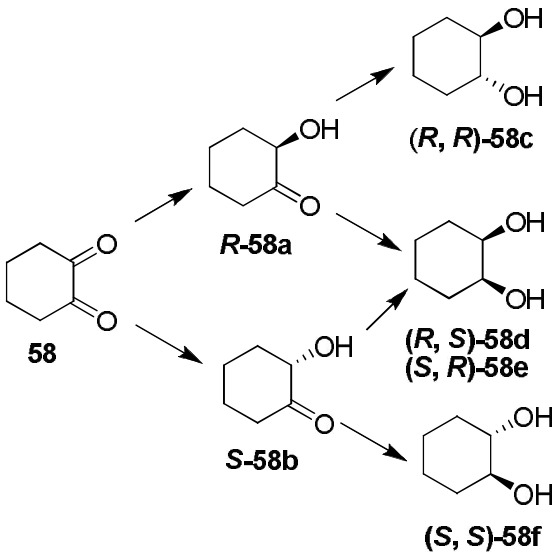


Figura 25. Bio-reducción de 1,2-ciclohexanodiona (**58**) mediante partes frescas de vegetales.

Estos autores ensayaron la bio-reducción de 2-metilciclohexanona (**13**). Observaron que con rabanito se obtuvo como producto mayoritario el *trans-(1S, 2S)*-2-metilciclohexanol (**13b**).

En este trabajo las bio-reducciones resultaron en la obtención de los alcoholes con configuración *S* (Figura 26).

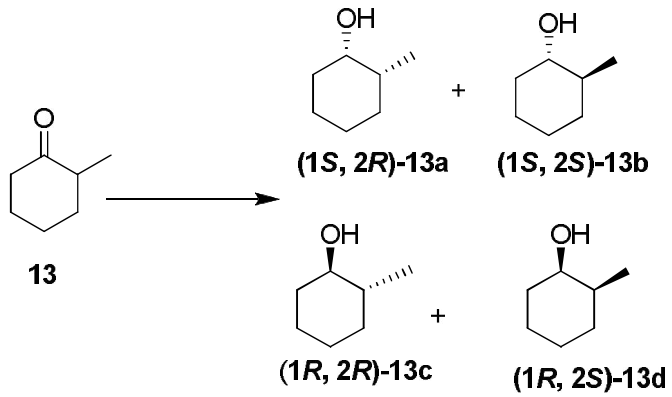


Figura 26. Bio-reducción de 2-metilciclohexanona (**13**) mediante partes frescas de vegetales. (Utsukihara, Watanabe et al. 2006).

Posterior al trabajo presentado por Utsukihara y colaboradores, el grupo de Yang realizó la reducción de los sustratos acetofenona, 4´-cloroacetofenona y del β-cetoéster 4-cloroacetoacetato de etilo mediante el empleo de partes frescas de siete vegetales entre los que utilizaron *Raphanus sativus* L. (Yang, Zeng et al. 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo están en contraposición a los descritos por Andrade y colaboradores (Andrade, Utsunomiya et al. 2006) ya que las reducciones de estos tres compuestos mediante el sistema de raíz fresca de rabanito rindieron los alcoholes S. Este hecho denota que, en algunos casos, el empleo de una misma especie vegetal para llevar a cabo una reacción química particular, en este caso una bio-reducción, rinde productos con configuración opuesta.

Si bien en muchos casos el uso de los sistemas de vegetales frescos, como es el caso de zanahoria, es robusto pues las reacciones generalmente transcurren con la misma estereopreferencia sobre los carbonilos de las cetonas proquirales (Baldassarre, Bertoni et al. 2000; Yadav, Nanda et al. 2002; Maczka and Mironowicz 2004), en otros casos, como el que se evidencia con rabanito no lo es (Andrade, Utsunomiya et al. 2006; Yang, Zeng et al. 2008). Siendo este un aspecto débil en el empleo de vegetales frescos para ser utilizados en biocatálisis. La falta de reproducibilidad de los experimentos cuando se utilizan tejidos vegetales frescos como biocatalizadores podría deberse a que las características bioquímicas de los mismos varían dependiendo de varios factores tales como el lugar de donde provienen, la estación del año, las condiciones climáticas de su cultivo, etc.

Para evitar el problema de variabilidad del sistema enzimático en el tejido vegetal, Orden y colaboradores utilizaron raíces transformadas (RT) de rabanito (*R. sativus* L.) en la reducción de un conjunto de cetonas proquirales (Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009). Estos autores testearon la capacidad de llevar a cabo reducciones estereoselectivas mediante RT de rabanito utilizando el sustrato acetofenona (**9**) como sustrato modelo. A los siete días de reacción obtuvieron el (*R*)-1-feniletanol (**9b**) con un *ee* >98%. Este resultado lo consideraron de sumo interés pues la mayor parte de los biocatalizadores que llevan a cabo esta reacción o reacciones con sustratos relacionados de acuerdo a la regla de Prelog. En los tiempos de reacción de 48 a 96 horas observaron que en la reducción se formaron los dos alcoholes (*S* y *R*) por lo que asumieron que posiblemente ocurrió una oxidación

enantioselectiva del alcohol *S* para que a los siete días se lograse obtener únicamente el (*R*)-1-feniletanol (**9b**). Esto estaría de acuerdo con lo observado por Andrade y colaboradores cuando llevaron a cabo la reducción de acetofenona o la oxidación del racemato (*RS*)-1-feniletanol (Andrade, Utsunomiya et al. 2006).

Con el resultado obtenido en la reducción de acetofenona (**9**) mediante RT de rabanito, Orden y colaboradores, llevaron a cabo la reducción de un conjunto de alquilarilcetonas proquirales (Figura 27).

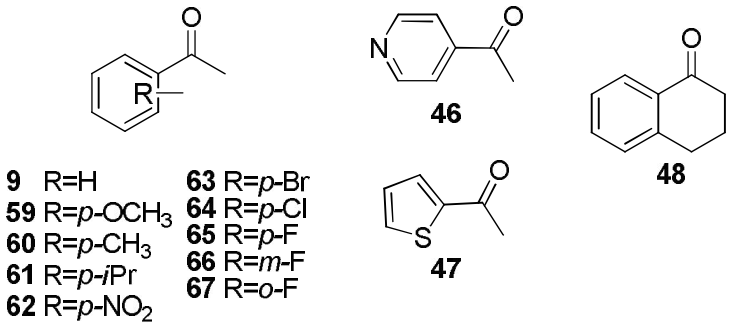


Figura 27. Sustratos utilizados por Orden y colaboradores (Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009).

En la reducción de todos los compuestos ensayados obtuvieron los alcoholes *R* con muy buenos a excelentes *ee* a excepción de la reducción de *m*-fluoroacetofenona (**66**) y 4-acetilpiridina (**46**).

Si bien, en la reducción de *m*-fluoroacetofenona (**66**) el rendimiento fue del 78%, la estereoselección fue muy baja. Con este resultado y en comparación con los obtenidos en la reducción de los sustratos relacionados a **66**, *p*-fluoroacetofenona (**65**) y *o*-fluoroacetofenona (**67**), los autores pudieron comprobar que la posición del sustituyente tuvo una gran incidencia en la biotransformación. De hecho en la bio-reducción de *p*-fluoroacetofenona (**66**) se obtuvo un muy buen rendimiento con una esteroselección moderada y en la reducción de *o*-fluoroacetofenona (**67**) se obtuvo el alcohol *R* con un excelente *ee* pero su bioconversión fue moderada.

El trabajo más reciente que está descrito en la literatura referente al uso de *Raphanus sativus* como biocatalizador es el presentado por Zilinskas y Sereikaite (Zilinskas and Sereikaite 2013). En el mismo realizaron la determinación de actividad biocatalítica en varios vegetales mediante el empleo de partes frescas de los mismos para la reducción de biciclo[3.3.1]nonane-2,6-diona (**68; 69**). Entre los vegetales estudiados utilizaron *Raphanus sativus* var. niger, para llevar a cabo la enantioseparación de biciclo[3.3.1]nonano-2,6-diona (**68; 69**). Realizaron la reducción esteroselectiva de la dicetona racémica mediante los biocatalizadores vegetales, posteriormente realizaron la extracción del (+)-enantiómero (**69**) de la mezcla de reacción utilizando disolventes orgánicos, y dejaron el (-)-enantiómero (**68**) para que prosiguiera su bio-reducción al producto 6-hidroxibiciclo[3.3.1]nonano-2-ona (**70**) (Figura 28).

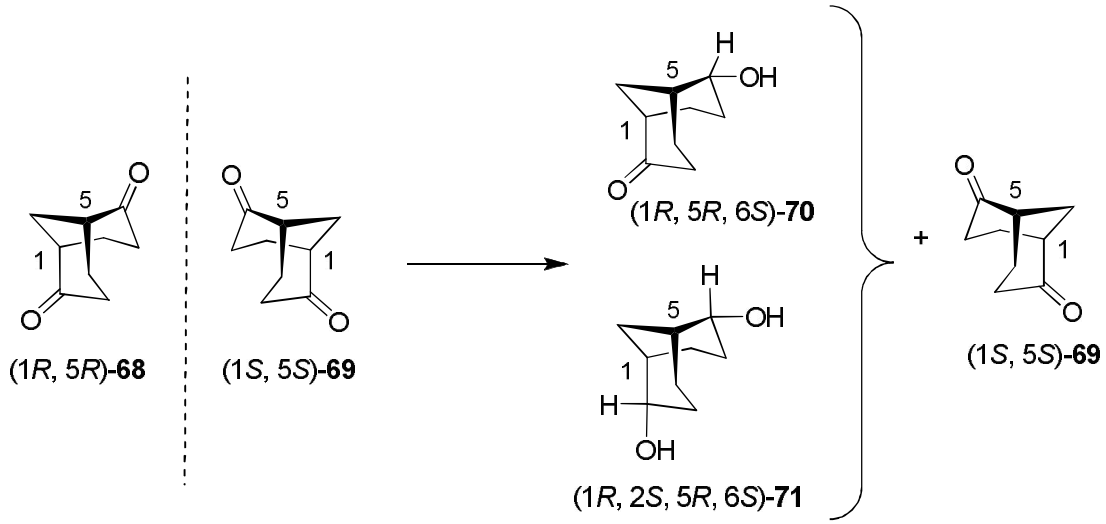


Figura 28. Reducción de la dicetona racémica biciclo[3.3.1]nonano-2,6-diona mediante vegetales (Zilinskas and Sereikaite 2013).

En este trabajo se observó que mediante el empleo de *R. sativus var. niger* se perdió aproximadamente el 50% de la dicetona pero la pureza óptica aumento levemente. Es posible que se haya dado la reacción reversa o que dos enzimas presentaron diferente enantioselectividad, una para **68** y otra para **69**, y la velocidad de la reacción que catalizaron haya sido diferente. De esta forma el producto de una reacción lenta disminuyó la pureza óptica en una reacción prolongada en el tiempo.

Estrategia para el aislamiento de microorganismos endófitos a partir de las plantas seleccionadas

A los efectos de recabar datos que avalaran la hipótesis de la participación de microorganismos endófitos en las biotransformaciones mediadas por vegetales (objetivo específico 3), se llevaron a cabo ensayos de actividad biocatalítica de los vegetales en estudio, en presencia y ausencia de inhibidores microbianos. Se buscó así establecer si la inhibición del crecimiento de endófitos ejercía una influencia en el rendimiento y estereoselectividad de la reacciones de reducción. Asimismo, a partir de dichos ensayos se realizaron aislamientos de microorganismos endófitos.

Los ensayos realizados consistieron en cuatro experimentos en paralelo designados con las letras ***a***-***d***. Estos experimentos variaron respecto a los compuestos que se adicionaron al cultivo vegetal:

- ***a.*** Medio vegetal en presencia del sustrato en estudio.
- ***b.*** Medio vegetal en presencia del sustrato en estudio y adicionado con el inhibidor bacteriano cloranfenicol.
- ***c.*** Medio vegetal en presencia del sustrato en estudio y adicionado con el inhibidor fúngico cicloheximida.
- ***d.*** Medio vegetal en presencia del sustrato en estudio y adicionado con los dos inhibidores microbianos.

La adición de inhibidores bacterianos y fúngicos se realizó a los efectos de evaluar si los microorganismos endófitos participaron en las bio-reducciones cuando se utilizó material vegetal como agente biocatalizador. La correlación entre diferencias en la población

microbiana y los resultados de la biotransformación, nos permitió realizar inferencias sobre la incidencia de dichos microorganismos.

Por otro lado los aislamientos bajo la presión selectiva del sustrato nos permitió recuperar microorganismos endófitos que son capaces de crecer en presencia del compuesto de interés y por tanto, potencialmente, tengan la capacidad de transformarlo.

Los aislamientos de microorganismos endófitos se realizaron junto con la extracción del medio de cultivo para evaluar la bio-reducción del sustrato en estudio. De esta forma se pudo analizar los microorganismos endófitos que predominaron frente a cada sustrato, y asociarlos con las transformaciones químicas de los mismos. Una vez aislados los microorganismos endófitos, bajo presión selectiva de sustrato, se evaluó la capacidad de los mismos en la reducción del sustrato en estudio.

En la figura 29 se muestra el esquema de trabajo diseñado para llevar a cabo los aislamientos de microorganismos endófitos en paralelo con los ensayos de prospección de actividad biocatalítica del sistema y de evaluación de la incidencia de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones.

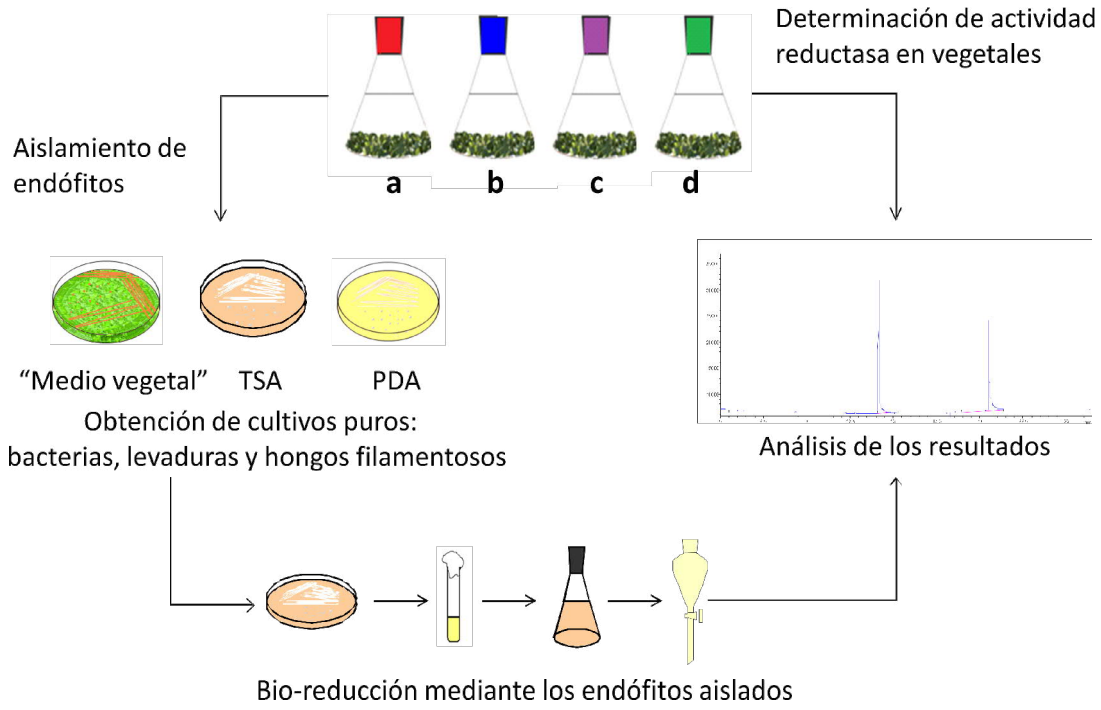


Figura 29. Esquema planteado para llevar a cabo los experimentos de aislamiento de endófitos junto con la prospección biocatalítica del material vegetal y la incidencia de los microorganismos endófitos en la misma.

Sustratos seleccionados

Los sustratos elegidos para llevar a cabo los objetivos específicos 1-3 fueron: 2-acetilpiridina (**44**), α-etilacetoacetato de etilo (**72**), 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**) y acetofenona (**9**) (Figura 30).

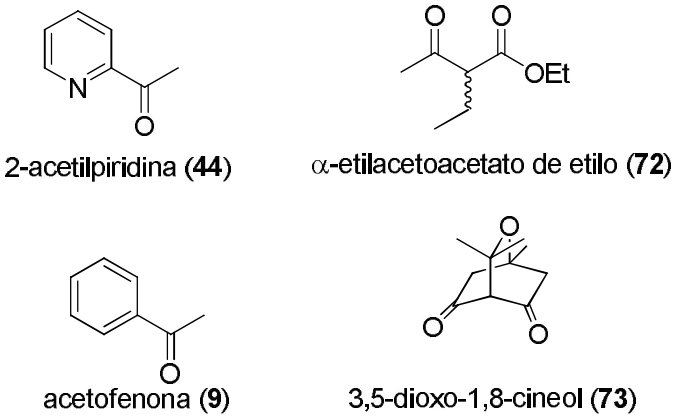


Figura 30. Sustratos empleados en los objetivos específicos 1-3.

En la tabla 4 se muestran los sustratos utilizados con cada especie vegetal ensayada.

Tabla 4. Especies vegetales y sustratos empleados.

Especie vegetal	Sustrato
Ceibo (*E. crista-galli*)	2-acetilpiridina (**44**)
Zapallo (*C. maxima*)	2-acetilpiridina (**44**) y 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**)
Hinojo (*F. vulgare*)	2-acetilpiridina (**44**)
Zanahoria (*D. carota*)	α-etilacetoaceto de etilo (**72**) y 2-acetilpiridina (**44**)
Rabanito (*R. sativus*)	α-etilacetoaceto de etilo (**72**), 2-acetilpiridina (**44**) y acetofenona (**9**)

α-etilacetoacetato de etilo (72)

Los β-cetoésteres-α-sustituidos son sustratos modelo que han sido empleados para evaluar la capacidad reductora de agentes biocatalizadores. La reducción de estos compuestos rinde α-alquil-β-hidroxiésteres (Figura 31). Estas moléculas son muy interesantes como precursores en la síntesis de compuestos ópticamente activos ya que son moléculas pequeñas, con dos estereocentros y con posibilidades de derivatización posterior. Por otro lado, dado que estos productos poseen dos estereocentros contiguos la reducción del carbonilo permite analizar la enantio y diasteroselectividad del biocatalizador en un único experimento.

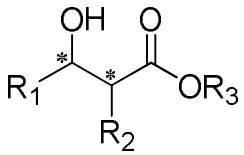


Figura 31. Estructura genérica de α-alquil-β-hidroxiésteres quirales

Esta descrito el uso de deshidrogenasas purificadas de *S. cerevisieae* para la reducción de β-cetoésteres-α-sustituidos cíclicos y no cíclicos con resultados muy interesantes (Kaluzna, Matsuda et al. 2004; Kaluzna, Feske et al. 2005; Padhi, Kaluzna et al. 2007). Algunas de estas enzimas se han utilizado en la síntesis de importantes bloques quirales como es el caso de la síntesis de (1*R*,2*S*)-2-metill-1-ciclohexanol o en la fabricación de intermediarios de la síntesis de la cadena del taxol (Feske, Kaluzna et al. 2005; Padhi, Kaluzna et al. 2007) .

Dada la importancia de estas moléculas resultó de interés profundizar en la búsqueda de nuevos biocatalizadores capaces de reducir β-cetoésteres-α-sustituidos, haciendo especial énfasis en la búsqueda de agentes biocatalizadores con actividad anti-Prelog ya que son pocos los biocatalizadores que presentan esta actividad (Panizza, Onetto et al. 2007).

2-acetilpiridina (44)

La reducción del compuesto 2-acetilpiridina (**44**) puede llevarse a cabo a través de metodologías químicas tradicionales así como mediante el empleo de la biocatálisis.

Existen algunos trabajos que describen la bio-reducción del compuesto 2-acetilpiridina a sus correspondientes alcoholes mediante el uso de biocatalizadores. Entre ellos se describen tanto el empleo de enzimas ya sea en la forma de enzimas aisladas (Singh, Bhattacharyya et al. 2009; Ni, Li et al. 2011) o mediante el empleo de crudo enzimático (Yang, Xua et al. 2008), cepas bacterianas (Janssen, Kamerbeek et al. 2003; Ni, Li et al. 2011), hongos filamentosos (Nakamura, Fujii et al. 2002; Swizdor, Janeczko et al. 2010; Pal, Srivastava et al. 2012), levaduras (Yang, Xu et al. 2006) así como el uso de vegetales (Aldabalde, Arcia et al. 2007; Lakshmi, Reddy et al. 2011; Mohammadi, Yousefi et al. 2011).

Los compuestos piridinetanoles quirales constituyen intermediarios importantes en la síntesis de una variedad de compuestos, ejemplo de ello son los alcaloides con actividad farmacológica tales como akuamidina y heteroyohimidina (Soni, Kaur et al. 2005), o el compuesto (*R*)-5-(1-hidroxietil)furo[2,3-c]piridina, derivado del 2-piridinetanol, que es un intermediario importante para la síntesis de un inhibidor (no nucleósido) de la transcriptasa reversa del HIV(Kawano, Horikawa et al. 2003; Pal, Srivastava et al. 2012). Por otro lado, también se utilizan como auxiliares quirales en síntesis asimétrica (Okano, Murata et al. 2000; Yang, Xu et al. 2006).

Existen antecedentes de la reducción asimétrica de la 2-acetilpiridina mediante el uso de microorganismos como agentes biocatalizadores, tales como la levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae* (Bailey, O'Hap et al. 1993; Akihiro, Akihiro et al. 2001); *Candida viswanathii* (Soni, Kaur et al. 2005), *Rhodotorula* sp. AS2.2241(Yang, Xu et al. 2006). En todas estas bio-reducciones se obtuvo el alcohol *S*. En cuanto al uso de cepas bacterianas Ema y colaboradores describieron el empleo de una cepa recombinante de *Escherichia coli* que expresa el gen codificante de una carbonil reductasa proveniente de la levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae* (Ema, Yagasaki et al. 2006), en esta bio-reducción se obtuvo (*S)*-2-piridinetanol con un rendimiento aislado de 52% y un excelente *ee*.

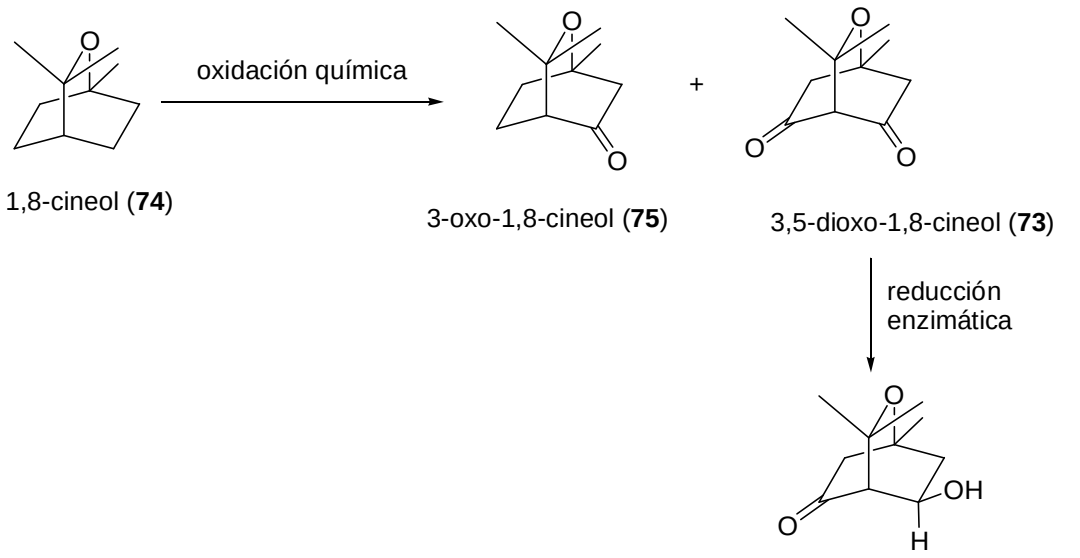
3,5-dioxo-1,8-cineol (73)

Los terpenos son compuestos naturales muy importantes. Los más abundantes son hidrocarburos de bajo valor agregado y que encuentran aplicación como disolventes y diluyentes de pinturas. Los oxigenados poseen aromas intensos que los hacen útiles como saborizantes y aromatizantes en una amplia gama de productos.

El 1,8-cineol (**74**), un producto natural barato y de fácil obtención a partir de la esencia bruta de *Eucalyptus* , es atractivo para ser utilizado como sustrato para la obtención de compuestos de mayor interés, sustancias con propiedades aromáticas, saborizantes y farmacológicas valiosas.

Estructuralmente, el 1,8-cineol (**74**) es un compuesto aquiral que puede ser oxidado química o enzimáticamente para dar derivados asimétricos como el 3-oxocineol (**75**). Un subproducto

importante de la oxidación química del 1,8-cineol es el 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**). Este compuesto no es quiral ya que al igual que el 1,8-cineol presenta un plano de simetría. La dicetona **73** es un excelente candidato para la desimetrización por reducción enzimática selectiva de un único grupo hidroxilo para dar un compuesto del tipo de **77**. Esta operación es muy difícil de lograr mediante una reducción química tradicional ya que requiere un alta regia- y estereoselectividad. La dicetona **73** es un sustrato muy interesante ya que presenta dos grupos carbonilo químicamente equivalentes y resulta ideal para testear simultáneamente la regioselectividad y estereoselectividad tanto relativa como absoluta de la reacción biocatalítica. Esto ofrece otro elemento interesante ya que permite evaluar la capacidad de las enzimas para desimetrizar la molécula y generar un compuesto ópticamente puro (o enriquecido) a partir de un sustrato aquiral (Figura 32).



1,8-cineol (**74**) 3-oxo-1,8-cineol (**75**) 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**)

β-3-hidroxi-5-oxo-1,8-cineol (**77**)

Figura 32. 1,8-cineol (**74**) y algunos de sus posibles derivados

Acetofenona (9)

El compuesto acetofenona (**9**) ha sido ampliamente utilizado como sustrato modelo para testear la actividad reductora de microorganismos (Andrade, Keppler et al. 2004; Soni and Banerjee 2006; Kurbanoglu, Zilbeyaz et al. 2007; Ma, Liu et al. 2011); así como células vegetales (Akakabe and Naoshima 1994; Caron, Coughlan et al. 2005; Andrade, Utsunomiya et al. 2006; Fonseca, Monte et al. 2009; Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009; Alves Ferreira, Costa da Silva et al. 2012) por lo cual su uso permite realizar comparaciones con trabajos previamente publicados.

En particular, su inclusión en el presente trabajo nos permitió correlacionar resultados entre nuestros experimentos y los desarrollados por el grupo de la Dra. Marcela Kurina Sanz de la Universidad de San Luis con quienes hemos establecido una colaboración en el marco experimental de la presente Tesis Doctoral.

RESULTADOS

Estudio de la participación de los microorganismos endófitos en bio-reducciones mediadas por vegetales.

Ceibo (Erythrina crista-galli)

Aislamiento de microorganismos endófitos de hojas de ceibo (E. crista-galli) y evaluación de su potencial en biocatalítico.

Aislamientos de microorganismos endófitos a partir de hojas de ceibo.

Los aislamientos realizados empleando la estrategia de prospección de actividad biocatalítica así como los realizados para llevar a cabo el estudio que permita avalar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por hojas de ceibo se dividieron en cuatro grupos dependiendo de los compuestos que se adicionaron al cultivo vegetal desinfectado (ver figura 27):

- ***a.*** Adicionado con 2-acetilpiridina (**44**)
- ***b.*** Adicionado con 2-acetilpiridina (**44**) y cloranfenicol (inhibidor bacteriano).
- ***c.*** Adicionado con 2-acetilpiridina (**44**) y cicloheximida (inhibidor fúngico).
- ***d.*** Adicionado con 2-acetilpiridina (**44**) y los dos inhibidores microbianos juntos.

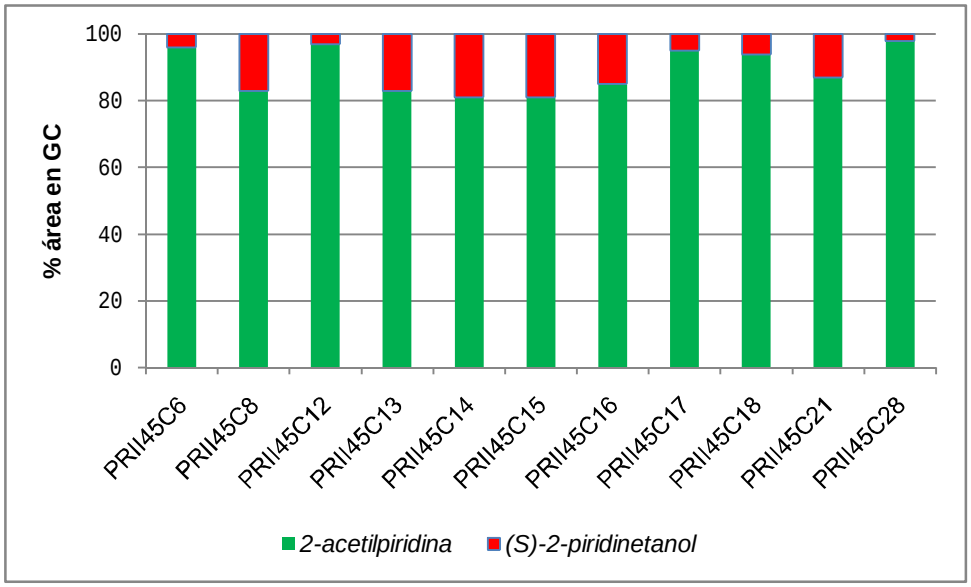
De los aislamientos realizados en los ***ensayos a-d*** se obtuvieron un total de dieciocho cepas bacterianas. En la tabla 5 se muestran la cantidad de cepas que se obtuvieron en cada aislamiento y como fueron denominadas.

Tabla 5. Bacterias endófitas aisladas a partir de hojas de ceibo.

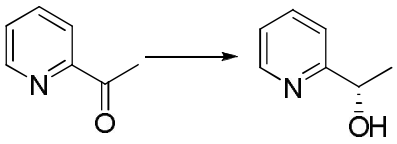
Aislamientos	Bacterias: nomenclatura asignada
Ensayo a	10 cepas: PRII45C6-15
Ensayo b	3 cepas: PRII45C18-20
Ensayo c	2 cepas: PRII45C16 y 17
Ensayo d	3 cepas: PRII45C21; PRII45C27 y 28

Determinación de la capacidad biocatalítica de los microorganismos endófitos aislados.

En las cepas aisladas se llevó a cabo la determinación de la actividad reductasa. Se observó que once de las bacterias endófitas presentaron actividad reductasa frente al compuesto **44**. En la gráfica 1 se presentan los porcentajes de bioconversión obtenidos en la biotransformación de la 2-acetilpiridina (**44)** con las cepas que presentaron actividad reductasa. Del análisis en cromatografía gaseosa quiral se determinó que en todos los casos se obtuvo el alcohol con configuración *S* (Figura 33).



Gráfica 1. Porcentaje de bioconversión de 2-acetilpiridina (**44**) a (*S*)-2-piridinetanol (**44a**) obtenido con cepas endófitas de ceibo.

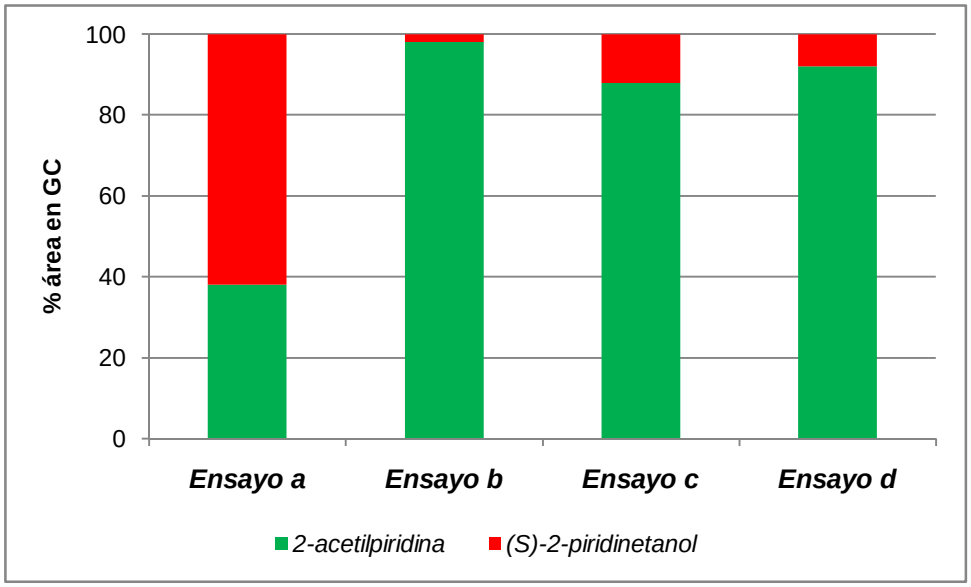


44 **44a**

Figura 33. 2-acetilpiridina (**44**) y (*S*)-2-piridinetanol (**44a**).

Biotransformaciones de 2-acetilpiridina para evaluar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por hojas de ceibo (E. crista-galli).

Los ensayos destinados a recabar datos que nos permitieron evaluar la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones del compuesto 2-acetilpiridina (**44**) cuando se emplearon hojas de ceibo como agente biocatalizador se llevaron a cabo en paralelo con los aislamientos realizados durante los ensayos de prospección de actividad bio-reductora de 2-acetilpiridina (**44**) en hojas de ceibo. En la gráfica 2 se muestran los resultados obtenidos en estas bio-reducciones. Del análisis cromatográfico en GC con columna quiral se pudo observar que todas las bio-reducciones rindieron el enantiómero (*S*) del alcohol **44a**.



Gráfica 2. Resultado de la biotransformación de 2-acetilpiridina (**44**) con los sistemas a-d.

En la gráfica 2 se observa que el mayor porcentaje de bioconversión (62%) del compuesto **44** a (*S*)-2-piridinetanol (**44a**)**,** se obtuvo en el ensayo con hojas de ceibo sin la adición de inhibidores microbianos (***ensayo a***), mientras que en los ensayos adicionados con los inhibidores microbianos (***b-d***) se observó que la biotransformación se redujo considerablemente. Esta disminución en el porcentaje de conversión en los ***ensayos b-d***, posiblemente, se deba a la reducción en la población endófita que conllevaría al descenso de potenciales agentes biocatalizadores sobre el sustrato 2-acetilpiridina. Por otro lado, los porcentajes de conversión obtenidos en los ***ensayos b-d***, quizás se debieron al resultado de la actividad deshidrogenasa del sistema vegetal. Cuando se ensayaron las bio-reducciones con las cepas endófitas aisladas frente a **44 (ver gráfica 1)** se obtuvieron los mayores porcentajes de bio-reducción con las cepas aisladas en el ***ensayo a***, cepas PRII45C8, PRII45C13, PRII45C14 y PRII45C15, lo cual podría indicar la participación de las mismas en la bio-reducción de **44** en el ***ensayo a***. En la gráfica 2 también se observa que en el ensayo en presencia de cicloheximida (***ensayo c***) se obtuvo un porcentaje de bio-reducción del 12% lo cual podría deberse a la presencia de la cepa PRII45C16, cepa endófita aislada en este ensayo, con la cual se obtuvo un porcentaje de conversión del 15% cuando fue evaluada individualmente. Por otra parte en el ensayo en presencia de los dos inhibidores microbianos juntos (***ensayo d***) se obtuvo un porcentaje de bio-reducción del 8% que podría explicarse a la presencia en este ensayo de la cepa PRII45C21, ya que cuando se la evaluó individualmente frente a **44** se obtuvo un porcentaje de bioconversión del 13%. Es de destacar que en el ensayo en presencia de cloranfenicol (***ensayo b***) la bio-reducción de **44** fue muy minoritaria y al evaluar la bio-reducción de **44** por parte de las cepas aisladas en este ensayo, unicamente la cepa PRII45C18 rindió el (*S*)-2-piridinetanol (**44a**) pero en un porcentaje de bioconversión del 6%, las otras cepas aisladas en este ensayo (***ensayo b***) no presentaron actividad reductasa frente a **44**. La suma de estos resultados si bien no descarta la participación de enzimas del vegetal, permite establecer una relación entre las bio-reducciones mediadas por las hojas de ceibo y las cepas bacterianas endófitas presentes en las mismas en el momento de las bio-reducciones del compuesto **44**.

Identificación de los microorganismos endófitos de hojas de ceibo (E. crista-galli) que presentaron actividad biocatalítica.

La identificación de las cepas que presentaron alguna de las actividades biocatalíticas estudiadas se realizó a través de pruebas bioquímicas primarias y estudios filogenéticos.

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas.

Tabla 6. Pruebas bioquímicas en cepas endófitas de ceibo.

Cepas	Morfología	Gram	Catalasa	Oxidasa	OF/glucosa	Caldo tioglicolato
PRII45C6	Bastón	+	+	-	fermenta	anaerobio facult.
PRII45C8	Bastón	-	+	-	fermenta	anaerobio facult.
PRII45C13	Bastón	-	ND	ND	fermenta	anaerobio facult.
PRII45C14	Bastón	-	+	-	fermenta	anaerobio facult.
PRII45C15	Bastón	-	ND	ND	fermenta	anaerobio facult.
PRII45C19	Bastón	-	+	+	fermenta	anaerobio facult.
PRII45C20	Coco	+	+	-	NC	aerobio
PRII45C27	Bastón	-	+	-	NC	aerobio
PRII45C28	Bastón	+	+	-	NC	aerobio
PRII45C37	Bastón	-	+	-	NC	aerobio
PRII45C12	Bastón	-	+	-	fermenta	anaerobio facult.
PRII45C16	Coco	+	+	-	fermenta	anaerobio facult.
PRII45C17	Bastón	-	+	-	fermenta	anaerobio facult.
PRII45C18	Coco	+	+	-	fermenta	anaerobio facult.
PRII45C21	Coco	+	+	-	NR	aerobio

ND: no se determinó; NC: no creció; NR: no reaccionó

Se completó la identificación de las seis bacterias endófitas que presentaron mejores resultados de bio-reducción del sustrato en estudio mediante estudios filogenéticos. Se amplificó por PCR y se secuenció el gen de ARN ribosomal de cada cepa. La comparación de las secuencias de los genes del ARN ribosomal 16S con respecto a secuencias relacionadas en la base de datos del GenBank usando BLAST (National Center for Biotechnology Information) (Altschul, Gish et al. 1990) permitió completar dicha identificación (Tabla 7).

Tabla 7. Identificación a través del estudio filogenético en cepas endófitas de ceibo.

Cepa	Identificación
PRII45C8	*Pantoea agglomerans*
PRII45C13	*Pantoea agglomerans*
PRII45C14	*Pantoea agglomerans*
PRII45C15	*Pantoea agglomerans*
PRII45C21	*Micrococcus luteus*
PRII45C28	*Bacillus subtilus*

Las cepas PRII45C8 y PRII45C13-15 posiblemente correspondan a una única cepa *Pantoea agglomerans* pues provienen del mismo aislamiento y presentaron el mismo perfil de bio-reducción frente al sustrato 2-acetilpirina.

Zapallo (Curcubita maxima)

Aislamiento de microorganismos endófitos de zapallo (C. maxima) y evaluación de su potencial biocatalítico.

Se llevó a cabo el aislamiento de microorganismos endófitos a partir de pulpa de zapallo. Los aislamientos se realizaron de forma análoga a la empleada en el ensayo con hojas de ceibo. Se utilizó el sustrato 2-acetilpiridina y como material vegetal trozos de la pulpa del zapallo. En los aislamientos se obtuvieron nueve cepas bacterianas (Tabla 8).

Tabla 8. Aislamientos de endófitos de zapallo en presencia de **44** (ensayos a-d).

Aislamientos	Bacterias: nomenclatura asignada
a	2 cepas: PRII32Z6-7
b	0
c	3 cepas: PRII32Z10-12
d	4 cepas: PRII32Z13-16

Determinación de la actividad reductasa de los microorganismos aislados.

No se evaluó la actividad reductasa frente a **44** en las cepas endófitas aisladas debido a que en las bio-reducciones de este compuesto mediante zapallo (donde fueron aislados los microorganismos endófitos: PRII32Z6-7; PRII32Z10-12; PRII32Z13-16 y PRII32Z1-5), no se otuvieron porcentajes de bioconversión significativos. En los ***ensayos a*** y ***b*** se obtuvo un porcentaje de conversión de 3, en el ***ensayo c*** un porcetaje de 2 mientras que en el ***d*** un porcentaje de 4. Por tanto se descartó la posibilidad de que las cepas aisladas presetaran actividad reductasa frente a la 2-acetilpiridina (**44**).

En los trabajos que están descritos en la literatura en donde se utilizó zapallo para llevar a cabo reacciones de reducción se observa que con esta especie vegetal los rendimientos alcanzados en las reducciones fueron variados dependiendo del sustrato estudiado. En el trabajo de Aldabalde y colaboradores obtuvieron un rendimiento del 27% en la reducción del compuesto 4-acetilpiridina (**46a**) (Aldabalde, Arcia et al. 2007), mientras que en un trabajo de Bruni y colaboradores obtuvieron rendimientos en un rango comprendido entre 10 a 79 dependiento de la cetona utilizada como sustrato, en la figura 34 se muestran los alcoholes obtenidos en el trabajo de Bruni junto con los datos de rendimiento y *ee* (Bruni, Fantin et al. 2006).

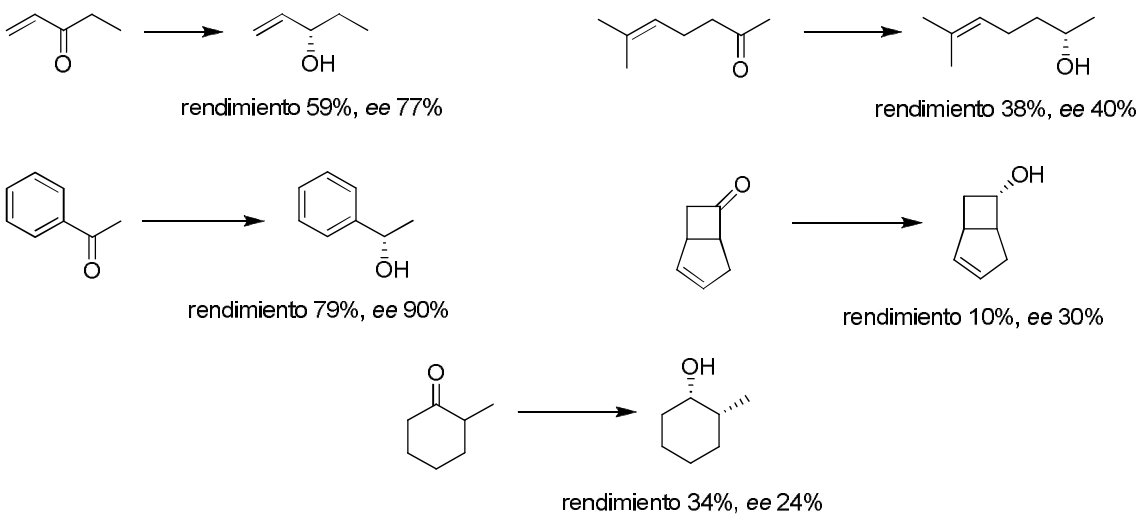


Figura 34. Bio-reducción de cetonas proquirales mediante zapallo.

Por otra parte al haber obtenido muy bajos porcentajes de conversión, este ensayo no resultó útil como aporte en relación al estudio de la participación de endófitos en las bioreducciones mediadas por plantas.

Hinojo (Foeniculum vulgare)

Aislamiento de microorganismos endófitos en tallos, hojas, y raíces de hinojo (Foeniculum vulgare) y evaluación de su potencial biocatalítico frente a la 2-acetilpiridina.

Los aislamientos fueron realizados siguiendo el mismo procedimiento al empleado en los ensayos con ceibo (*E. crista-galli*) y zapallo (*C. maxima*) (Figura 27). En estos ensayos se utilizó el sustrato 2-acetilpiridina (**44**) para los aislamientos con presión selectiva. Se utilizaron los tallos, hojas y raíces de hinojo como material vegetal para realizar los aislamientos así como los ensayos destinados a estudiar la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones de **44** mediante hinojo.

Ensayos con tallos de hinojo

Aislamientos de microorganismos endófitos a partir tallos de hinojo.

En cada uno de los ensayos realizados (***a-d***) se llevó a cabo el recuento de microorganismos viables en los tiempos de incubación de 24, 48, 72 y 96 horas. A las 96 horas de incubación se realizó el aislamiento de microorganismos de cada matraz. Se decidió realizar los aislamientos a las 96 horas puesto que fue el tiempo en que se observó el mayor porcentaje de bio-reducción del compuesto 2-acetilpiridina (Gráfica 4).

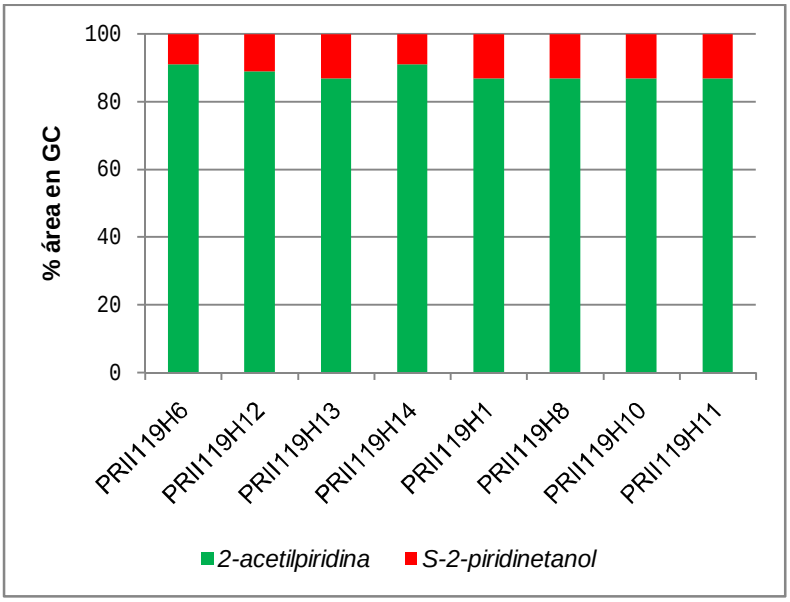
En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de los recuentos así como de los microorganismos endófitos aislados. En los resultados obtenidos de los recuentos de microorganismos viables se observó que existió una marcada reducción en el número de microorganismos en presencia de cloranfenicol, este hecho indicaría que existió un predominio de cepas bacterianas en los ensayos realizados con tallos de hinojo.

Tabla 9. Recuento de microorganismos viables en los ensayos a-d a diferentes tiempos de incubación y cantidad de microorganismos aislados en cada ensayo.

Ensayo	24hs; ufc/mL	48hs; ufc/mL	72h; ufc/mL	96hs;ufc/mL	Microorganismos aislados
a	1,0 x 10^5	1,0 x 10^6	1,0 x 10^7	1,0 x 10^8	PRII119H5,6; PRII119H12-14
b	<100	<100	<100	<100	0
c	1,0 x 10^5	1,0 x 10^6	1,0 x 10^7	1,0 x 10^8	PRIIH1-2; PRIIH8; PRIIH10-11
d	<100	<100	<100	<100	0
Control tallos de hinojo	1,0 x 10^5	1,0 x 10^6	1,0 x 10^7	1,0 x 10^8	PRII119H3, 4; PRII119H15-18

Determinación de la capacidad biocatalítica de los microorganismos endófitos aislados.

Se realizó la evaluación de actividad reductasa en las cepas aisladas y en ocho de las mismas se observó que fueron capaces de convertir de **44** a **44a** aunque con porcentajes de conversión bajos (Gráfica 3).

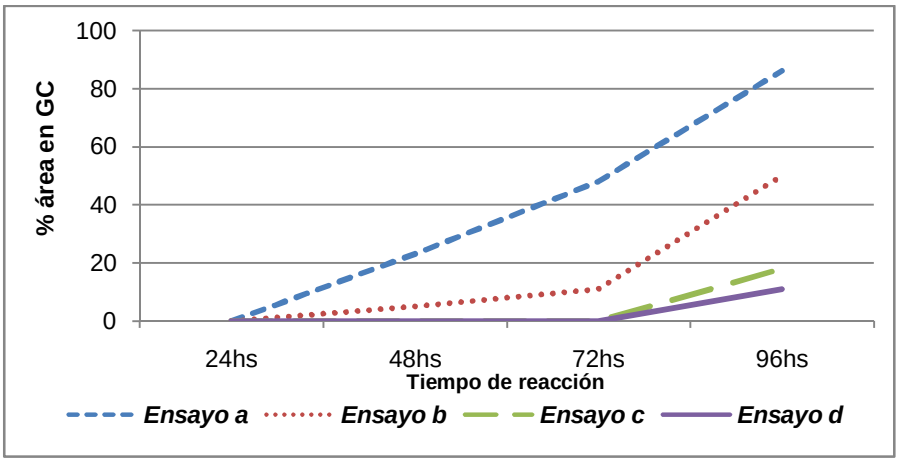


Gráfica 3. Resultados de de la bio-reducción de **44** mediante bacterias endófitas aisladas de tallo de hinojo a las 48 horas de reacción.

Biotransformaciones de 2-acetilpiridina para evaluar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por tallos de F. vulgare (hinojo).

En los ensayos destinados a evaluar la capacidad reductasa frente a 2-acetilpiridina (**44**) de los tallos de hinojo en presencia y ausencia de inhibidores microbianos (ensayos a-d) se observó que a las 96 horas de reacción se obtuvo el (*S)*-2-piridinetanol (**44a**) en todos los ensayos aunque en forma mayoritaria en los ***ensayos a*** y ***b*** (ver gráfica 4). En el ***ensayo b*** no se recuperaron microorganismos endófitos pero se observó una conversión de **44** a **44a**

del 50%, esta bio-reducción posiblemente sea llevada a cabo por las enzimas propias del tejido vegetal. Por otro lado se observó que el porcentaje de conversión aumentó considerablemente en el ***ensayo a***. En este ensayo se obtuvo un recuento de viables al final del periodo de incubación (96 horas) de 1,0 x 10^{8} ufc/mL y se aislaron cinco cepas bacterianas de las cuales cuatro fueron capaces de reducir **44** a **44a** (ver gráfica 3). El aumento en el porcentaje de conversión en el ***ensayo a*** posiblemente se debió a que las bacterias tuvieron incidencia en la bio-reducción de **44**.



Gráfica 4. Bio-reducción de **44** mediante tallos de hinojo en los ensayos a-d y en los diferentes tiempos evaluados.

Ensayos con hojas de hinojo

Aislamientos de microorganismos endófitos a partir hojas de hinojo.

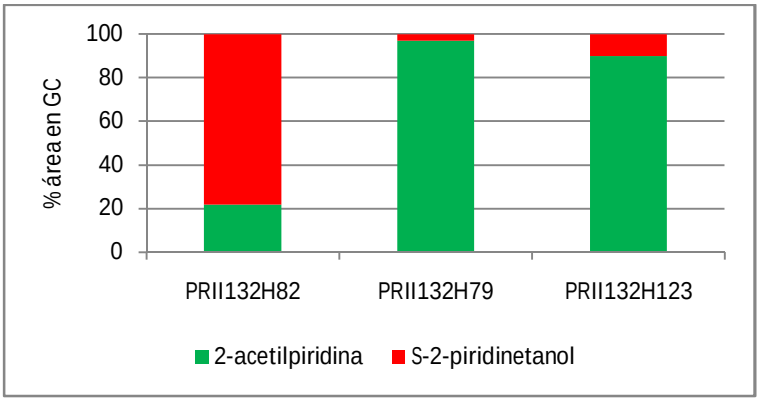
En cada uno de los ensayos realizados (a-d) se llevó a cabo el recuento de microorganismos viables en los tiempos de incubación de 24, 48, 72 y 96 horas y los correspondientes aislamientos (ver tabla 10). En los recuentos de microorganismos viables realizados a partir de hojas de hinojo se observó que el número de endófitos en los ***ensayos b*** y ***d*** fue superior que el observado en los mismos ensayos realizados con tallos de este vegetal. Por otro lado, se observó que la diversidad endófita también fue superior en las hojas de hinojo, donde se recuperaron un total de 50 endófitos mientras que en los tallos se recuperaron 16 microorganismos (ver tablas 9 y 10).

Tabla 10. Recuento de microorganismos viables en los ensayos a-d a diferentes tiempos de incubación y cantidad de microorganismos aislados en cada ensayo.

Ensayo	24hs; ufc/mL	48hs; ufc/mL	72h; ufc/mL	96hs;ufc/mL	Bacterias	Hongos filamentosos
a	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	PRII132H23-29; PRII132H42-44; PRII132H49-52	0
b	<100	<100	$5,0 \times 10^2$ (estimado)	$5,0 \times 10^2$ (estimado)	PRII132H122 y 123;	PRII132H83-85
c	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	PRII132H1-4; PRII132H34 PRII132H38-41 PRII132H76-82;	0
d	<100	<100	<100	$2,0 \times 10^2$ (estimado)	0	PRII132H86 y 87
Control hojas de hinojo	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	PRII132H14-48; PRII132H61-63; PRII132H56-58; PRII132H68- 69	

Determinación de la capacidad biocatalítica de los microorganismos endófitos aislados a partir de hojas de hinojo.

Se llevó a cabo la determinación de actividad reductasa frente a la 2-acetilipiridina en tres de las cepas bacterianas aisladas. Las cepas provinieron de los ***ensayos b*** (cepa PRII132H123) y c (PRII132H82 y PRII132H79). En la grafica 5 se muestran los resultados obtenidos en estas bio-reducciones. En las tres bio-reducciones se obtuvo el alcohol con configuración Prelog.



Gráfica 5. Bio-reducción de **44** mediante bacterias endófitas aisladas de hojas de hinojo.

Identificación de los microorganismos endófitos de hojas de hinojo (F. vulgare) que presentaron actividad biocatalítica.

Se llevó a cabo la identificación de las cepas que presentaron actividad biocatalítica frente a la 2-acetilpiridina mediante pruebas bioquímicas y el empleo del manual de Bergey´s (Breed, Murray et al. 1957). En la tabla 11 se muestran los resultados de estas identificaciones.

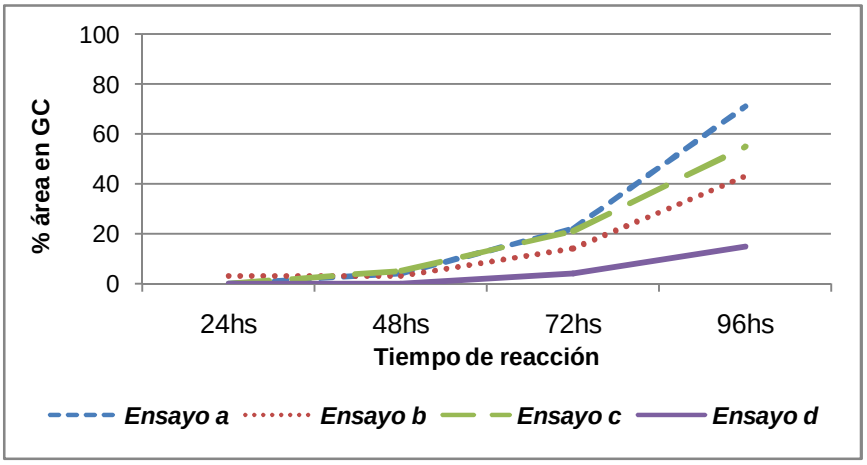
Tabla 11. Pruebas bioquímicas en cepas endófitas de hoja de hinojo.

Cepas	Morfología	Gram	Catalasa	Oxidasa	OF/glu-cosa	Caldo tioglicolato	Endos-poras	Identificación
PRII132H82	Bastón	+	+	-	oxidativo	aerobio	+	*Bacillus* sp.
PRII132H79	Bastón	+	-	-	oxidativo	anerobio facultativo	-	*Eubacteriales*
PRII132H123	Bastón	+	+	-	oxidativo	aerobio	-	*Eubacteriales*

Biotransformaciones de 2-acetilpiridina para evaluar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por hojas de hinojo (F. vulgare).

Los resultados obtenidos de los ensayos destinados a evaluar la capacidad reductasa frente a 2-acetilpiridina de las hojas de hinojo en presencia y ausencia de inhibidores microbianos (***ensayos a-d***) se muestran en la gráfica 6. Estos ensayos se realizaron en los tiempos 24, 48, 72 y 96 horas. A las 96 horas fue cuando se obtuvo el mayor porcentaje de conversión en cada uno de los ensayos realizados, siendo el ***ensayo a*** en el que se obtuvo el mayor porcentaje de conversión (71% de conversión a las 96 horas). En el ***ensayo b***, a las 96 horas, se obtuvo un porcentaje de conversión de 43 mientras que en el ***ensayo c*** se obtuvo un porcentaje de bioconversión mayor. Posiblemente, la diferencia en los porcentajes de conversión en estos ensayos este asociado con la carga microbiana en el momento de la bio-reducción, en el ***ensayo c*** el recuento de microorganismos endófitos viables fue superior que en el ***ensayo b*** (ver tabla 10). Por otra parte, en estos ensayos se recuperaron microorganismos con actividad biocatalítica frente a **44**, ver gráfica 5. La cepa *Bacillus* sp. que rindió un 80% de conversión fue aislada del ensayo adicionado con cicloheximida (ensayo c), el hecho de haberla aislado de este ensayo estaría indicando que la bioconversión observada en el ***ensayo c*** se debió en parte a la cepa de *Bacillus* sp. con actividad reductasa frente a **44**.

En el ensayo con los dos inhibidores microbianos juntos se evidencia que el efecto de cada uno de los inhibidores fue aditivo puesto que se logró una drástica disminución el el porcentaje de bio-reducción del compuesto 2-acetilpiridina lo cual estaría indicando una fuerte participación de los microorganismos endófitos en la bio-reducción de **44**.



Gráfica 6. Bio-reducción de 2-acetilpiridina **(44)** mediante hojas de hinojo en los ensayos **a-d** en los distintos tiempos ensayados.

Ensayos con raíces de hinojo

Aislamientos de microorganismos endófitos a partir raíces de hinojo.

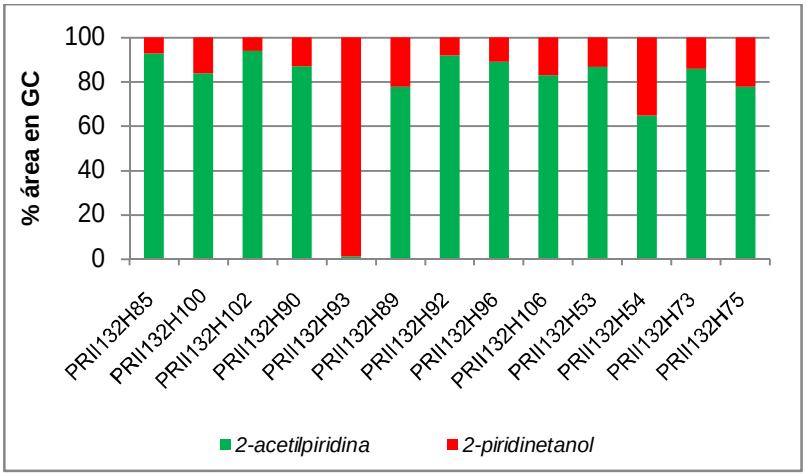
En cada uno de los ensayos realizados (***a-d***) se llevó a cabo el recuento de microorganismos viables en los tiempos de incubación de 24, 48, 72 y 96 horas y se realizaron los correspondientes aislamientos (Tabla 12). De los resultados obtenidos en los recuentos de microorganismos viables se aprecia que en el ensayo adicionado con cloranfenicol (***ensayo b***) se obtuvo un mayor número de microorganismos a los obtenidos en tallos y hojas. Con respecto al ensayo adicionado con los dos inhibidores juntos (***ensayo d***) se obtuvo un número similar al obtenido en hojas pero superior al de tallos.

Tabla 12. Recuento de microorganismos viables en los ensayos a-d a diferentes tiempos de incubación y cantidad de microorganismos aislados en cada ensayo.

Ensayo	24hs; ufc/mL	48hs; ufc/mL	72h; ufc/mL	96hs;ufc/mL	Bacterias	Hongos filamentosos
a	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	PRII132H19-22, PRII132H 30-32; PRII132H35; PRII132H45-48; PRII132H53 y H54	0
b	<100	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	PRII132H85; 100; 102; 92; 89; 90; 96; 106 y 93	PRII132H107-111
c	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	PRII132H5-9; PRII132H33; PRII132H36 y37 PRII132H70-76	0
d	<100	<100	<100	$2,0 \times 10^2$ (estimado)	0	PRII132H112 y 113
Control raíces de hinojo	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	PRII132H10-13; PRII132H55; PRII132H59 y 60; PRII132H64-67	

Determinación de la capacidad biocatalítica de los microorganismos endófitos aislados a partir de raíces de hinojo.

Se determinó de actividad reductasa frente al compuesto **44** en trece cepas aisladas. En la gráfica 7 se presentan los porcentajes de conversión obtenidos en cada una de las bio-reducciones realizadas con las cepas endófitas. La cepa PRII132H93 presentó un porcentaje de conversión superior al 98% rindiendo el alcohol *S*. Esta cepa fue aislada a partir del ensayo adicionado con cloranfenicol (ensayo b).



Gráfica 7. Bio-reducción de 2-acetilpiridina (**44**) a (*S*)-2-piridinetanol (**44a)** mediante cepas endófitas de raíz de hinojo

Identificación de los microorganismos endófitos de raíz de hinojo (F. vulgare) que presentaron actividad biocatalítica.

Se llevó a cabo la identificación de ocho cepas bacterianas que presentaron actividad biocatalítica frente a la 2-acetilpiridina (**44**) mediante pruebas bioquímicas y el empleo del manual de Bergey´s (Breed, Murray et al. 1993). En la tabla 13 se muestran los resultados de estas identificaciones.

Tabla 13. Identificación de cepas endófitas de raíz de hinojo mediante pruebas bioquímicas.

Cepas	Morfología	Gram	Catalasa	Oxidasa	OF/glucosa	Caldo Tioglicolato	Endos-poras	Identificación
PRII132H54	Bastón	+	+	-	oxidativo	aerobio	+	*Bacillus* sp.
PRII132H92	Bastón	+	+	-	fermentador	anerobio facultativo	ND	*ND*
PRII132H100	Bastón	+	+	-	oxidativo	aerobio	ND	*ND*
PRII132H75	Bastón	+	+	-	oxidativo	aerobio	+	*Bacillus* sp.
PRII132H85	Bastón	+	+	-	Inactivo	aerobio	+	*Bacillus* sp.
PRII132H106	Bastón	+	+	-	oxidativo	anerobio facultativo	ND	*ND*
PRII132H102	Bastón	+	+	-	oxidativo	aerobio	ND	*ND*
PRII132H73	Bastón	+	+	+	no crece	microaerofilico	+	*Clostridium* sp.

ND. No determinado

Los aislamientos PRIIH53 y PRII132H93 correspondieron a cepas de levaduras endófitas. Se realizó la identificación de la cepa PRII132H93 ya que se obtuvo, con la misma, un excelente porcentaje de bio-reducción de **44** a **44a** y con un *ee* >98%.

Identificación de la levadura endófita PRII132H93.

Las características macroscópicas de las colonias de la levadura PRII132H93 se observaron a las 48 horas de crecimiento en placas de PDA. La coloración de las colonias fue rosada y con una textura cremosa y brillante.

Análisis filogenético

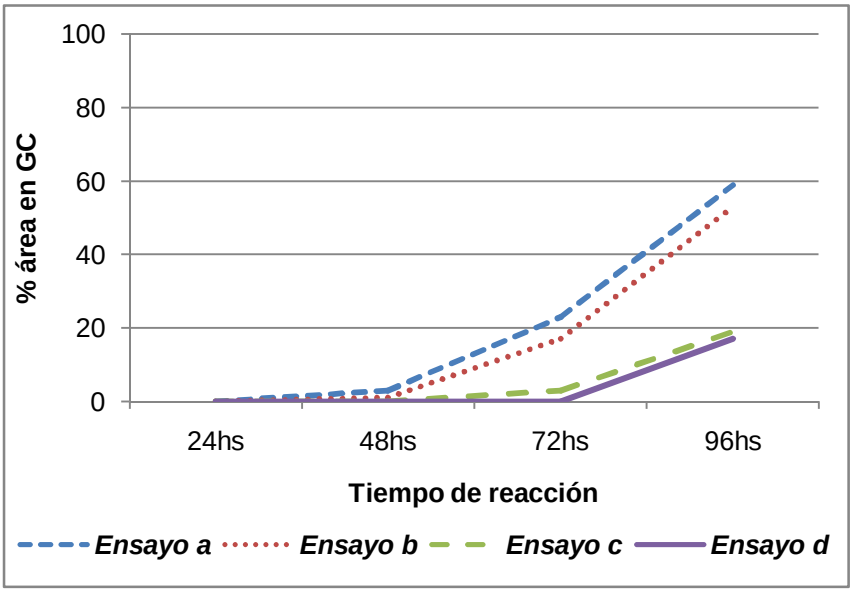
El estudio en la taxonomía de levaduras Ascomicetes ha progresado mucho en los últimos diez años. Si bien la caracterización fenotípica continúa siendo muy importante para la descripción a nivel de especie y su empleo en ciencia aplicada, está siendo reemplazada por la caracterización molecular para la identificación a nivel de especie (Weiss, Samson et al. 2013). En la década de 1990, Kurtzman y Robnett construyeron una base de datos exhaustiva de levaduras Ascomicetes a partir del análisis de las secuencias D1/D2 del gen 26S rDNA (Kurtzman and Robnett 1997; Kurtzman and Robnett 1998). Ellos determinaron que las sustituciones nucleotídicas en la región D1/D2, generalmente, no exceden un 1% en cepas de la misma especie. Si bien este marcador es muy útil para ser utilizado en la identificación de levaduras el empleo del mismo junto con las secuencias de las regiones ITS lo hace una herramienta más robusta para la identificación de levaduras (Seifert 2009; Schoch, Seifert et al. 2012). Es así que, una de las zonas más utilizadas para la identificación de hongos a nivel de especie, es la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2 (ver figura 35).

Para la identificación de la levadura PRII132H93 se utilizaron las secuencias de sus regiones ITS1-5.8SrDNA-ITS2 y D1-D2 para compararlas con respecto a secuencias relacionadas en la base de datos del GenBank usando BLAST (National Center for Biotechnology Information). De esta forma se identificó la cepa de levadura como *Rhodotorula glutinis* mostrando 99.5 de identidad con la cepa HB 1212 con un 100% de cobertura entre la secuencia de PRII132H93 con *R. glutinis*, con 99 % de identidad (839/840) y ningún gap= 0/840 (0%).

Figura 35. Diagrama de la región codificante para el ARN ribosomal en hongos y levaduras.

Biotransformaciones de 2-acetilpiridina para evaluar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por raíces de hinojo (F. vulgare).

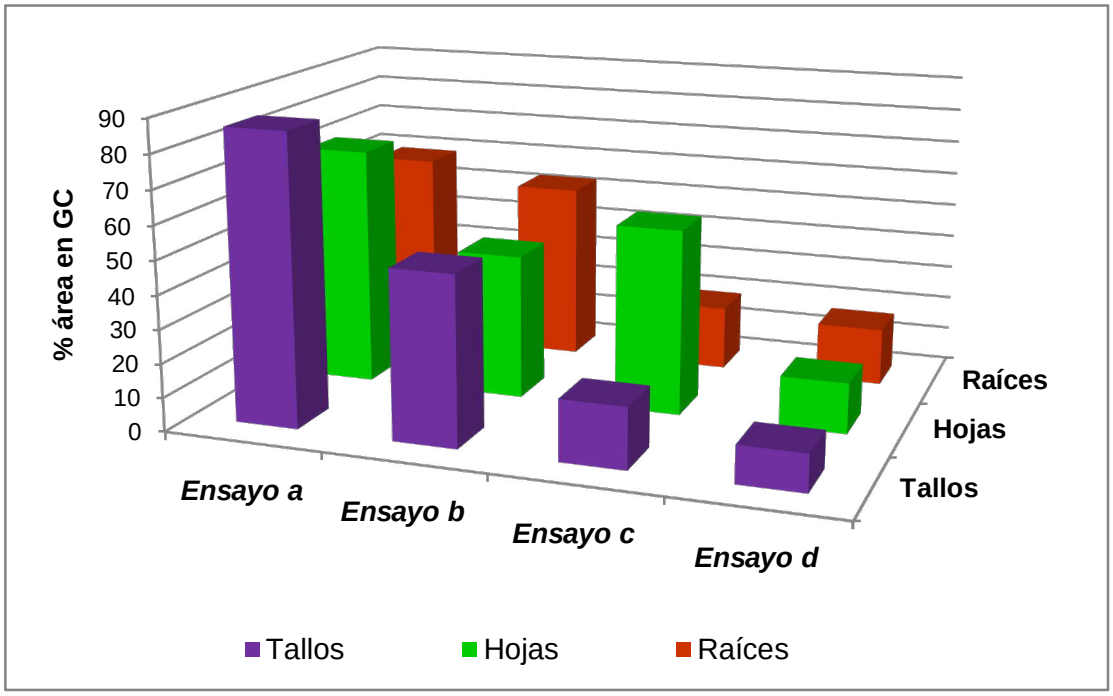
Los resultados obtenidos de los ensayos destinados a evaluar la capacidad reductasa frente a 2-acetilpiridina (**44**) de las raíces de hinojo en presencia y ausencia de inhibidores microbianos (ensayos a-d) se muestran en la gráfica 8.



Gráfica 8. Bio-reducción de 2-acetilpiridina (**44**) a (*S*)-2-piridinetanol (**44a)** mediante raíz de hinojo en los ensayos a-d en los distintos tiempos ensayados.

Se observó que los mayores porcentajes de bioconversión se obtuvieron en los ***ensayos a*** y ***b***. Es de destacar que en el ensayo adicionado con cloranfenicol se aislaron catorce cepas de las cuales nueve presentaron actividad reductasa. La cepa PRII132H93, identificada como *Rhodotorula glutinis* fue la que mejor biocatalizador resultó en la bioconversión de 2-acetilpiridina a (*S*)-2-piridinetanol.

Del conjunto de resultados obtenidos en el estudio de la especie vegetal hinojo (*F. vulgare*) en la bio-reducción del compuesto 2-acetilpiridina mediante los ***ensayos a-d*** se desprende que los microorganismos endófitos pudieron haber sido responsables junto con las enzimas vegetales de la bio-reducción del compuesto **44**. En la gráfica 9 se muestra un comparativo de las bio-reducciones de **44** mediante tallos, hojas y raíces de hinojo en cada uno de los ensayos realizados a las 96 horas de reacción. En la misma se observa que las conversiones en cada ensayo (***a-d***) son diferentes dependiendo de la parte vegetal ensayada. Por ejemplo, el mayor porcentaje de conversión obtenido en el ***ensayo a*** fue dado en tallos de hinojo, sin embargo en el ensayo adicionado con cloranfenicol el mayor porcentaje de conversión se obtuvo en el ensayo de raíces, mientras que en el ensayo con cicloheximida se observó la mayor conversión de **44** en el ensayo con hojas. Sin embargo, en el ensayo con los dos inhibidores juntos (***ensayo d***) la conversión se mantuvo en un porcentaje aproximado de 10 tanto en tallos, hojas como raíces. Esta última observación representa un fuerte indicio de la participación de los endófitos en la bio-reducción de **44** puesto que en el ensayo d, tanto de tallos, hojas y raíces no se recuperaron microorganismos endófitos con actividad reductasa frente a **44**. Posiblemente la bio-reducción observada en los ***ensayos d*** se debió a la actividad reductasa vegetal. Por otra parte, los ensayos con mayor porcentaje de conversión en presencia de inhibidores (***ensayo b*** en raíces; ***ensayo c*** en hojas) fueron en los que se aislaron las cepas con muy buena actividad reductasa frente a la 2-acetilpiridina (*Rhodotorula glutinis* H93 y *Bacillus* sp. H82).



Gráfica 9. Estudio comparativo de la bio-reducción de **44** mediante tallos, hojas y raíces de hinojo en los ***ensayos a-d.***

Rabanito (R. Sativus)

Se utilizaron los sistemas raíces frescas, plántulas y raíces transformadas de rabanito para realizar el estudio de la bio-reducción de los sustratos α-etil acetoacetato de etilo (**72**), 2-acetilpiridina (**44**) y acetofenona (**9**) (ver figura 28). En paralelo a los ensayos de bio-reducción se llevaron a cabo experimentos pertinentes a reunir datos que permitieron evaluar si los microorganismos endófitos participaron en las bio-reducciones cuando se empleó rabanito como biocatalizador (ensayos a-d). Por otra parte se realizaron aislamientos de microorganismos endófitos en los tres sistemas ensayados. Los microorganismos aislados fueron evaluados en sus actividades reductasa frente a los sustratos **72**, **44** y **9**.

Los ensayos con las plántulas de rabanito y las raíces transformadas se llevaron a cabo durante la pasantía: "Bio-reducciones selectivas con catalizadores de origen vegetal" en el Departamento de Química de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis, Argentina. Se trabajó en conjunto con la estudiante de Doctorado Cynthia Magallanes-Noguera, bajo la dirección de la Dra. Marcela Kurina-Sanz. El grupo Argentino posee amplia experiencia en el empleo de cultivos *in vitro* de vegetales en sus modalidades células indiferenciadas, raíces genéticamente modificadas y plántulas germinadas *in vitro* para llevar a cabo reacciones biocatalíticas (Orden, Bisogno et al. 2008; Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009; Magallanes-Noguera, Ferrari et al. 2012). La colaboración con el grupo Argentino surgió con el objetivo de obtener nuevos biocatalizadores a célula entera para generar alcoholes secundarios de alta pureza óptica, colocando especial énfasis en el empleo de tejidos vegetales y sus microorganismos endófitos. Se llevó a cabo el estudio conjunto para determinar el rol de los microorganismos endófitos en la capacidad de sistemas biocatalizadores vegetales, particularmente en rabanito (*R. sativus*), basándonos en la experiencia previa de cada uno

de los grupos, por un lado el aislamiento de microorganismos endófitos y la determinación de su capacidad bio-reductora (Rodríguez, Barton et al. 2007; Rodríguez, Reyes et al. 2011), y por otra parte el uso de cultivos de raíces genéticamente transformadas de la especie *Raphanus sativus* para producir alcoholes quirales no racémicos de configuración *R*, (Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009).

Ensayos con el sustrato α-etil acetoacetato de etilo

Raíces frescas de rabanito (R. sativus)

Aislamiento y recuento de microorganismos endófitos viables a partir de los ensayos a-d con raíz de rabanito frente al sustrato α-etil acetoacetato de etilo.

Se aislaron cepas bacterianas endófitas en los ***ensayos a*** y ***c***. En la tabla 14 se muestran los recuentos de microorganismos endófitos viables en los ensayos con α–etil acetoacetato de etilo (**72**) realizados en cada uno de los ***experimentos a-d*** así como los aislamientos de microorganismos endófitos. De los datos analizados se observa que en los ***ensayos a*** y ***c*** se obtuvo una población microbiana del orden de 10^8 pero variable en cuanto a la diversidad de microorganismos presentes a las 96 horas de bio-reducción del compuesto **72**, mientras que en los ensayos adicionados con cloranfenicol el recuento microbiano fue menor a 100 ufc/mL, y por otro lado no se aislaron hongos ni levaduras, lo cual puede explicar la baja carga en los recuentos.

Tabla 14. Aislamientos y recuentos de microorganismos endófitos viables a partir de raíces frescas de rabanito.

Ensayo	Microorganismos aislados	96 hrs.; ufc/mL
a	Eix1a TSA; Eix2b AR; Eix2a AR; Eix1c PDA; Eix2a PDA; Eix1a PDA; Eix2b TSA; Eix2c TSA; Eix2c AR; Eix1b TSA; Eix1a AR; Eix2a TSA; Eix2b PDA; Eix2d TSA y Eix2F TSA	$1,0 \times 10^8$
b	0	<100
c	Eiiix1b TSA; Eiiix1a TSA; Eiiix2a TSA; Eiiix2b TSA y Eiiix2c TSA.	$1,0 \times 10^8$
d	0	<100
Blanco rabanito	B1; B2; B3 y B4	$2,5 \times 10^8$

Determinación de la capacidad biocatalítica frente a α-etil acetoacetato de etilo de los microorganismos endófitos aislados.

De las 20 bacterias endófitas aisladas en los ***ensayos a*** y ***c*** de bio-reducción de **72** mediante raíz de rabanito se determinó actividad reductasa frente a este compuesto en 18 cepas a las 24 horas de reacción. En la tabla 15 se muestran los porcentajes de los compuestos obtenidos en cada una de las cepas ensayadas. Sólo ocho de las cepas aisladas muestran un porcentaje de conversión significativo, mayor o igual al 20%, en la tabla 15 se muestran en gris las cepas que resultaron presentar una actividad reductasa de interés.

Tabla 15. Porcentajes de área en GC de los compuestos obtenidos en la bio-reducción de **72** mediante las bacterias endófitas aisladas a las 24 horas de reacción.

Entrada	Cepas	72	*anti* (2*S*, 3*S*)	*syn* (2*S*, 3*R*)	*syn* (2*R*, 3*S*)	*anti* (2*R*, 3*R*)
1	Eix1a TSA	92	4	1	3	0
2	Eix2b AR	93	5	0	2	0
3	Eix2a AR	81	6	0	13	0
4	Eix1c PDA	75	13	0	12	0
5	Eix2a PDA	93	2	0	5	0
6	Eix1a PDA	90	5	3	2	0
7	Eix2b TSA	93	5	0	2	0
8	Eix2c TSA	91	3	0	6	0
9	Eix2c AR	80	8	0	12	0
10	Eix1b TSA	80	7	0	13	0
11	Eix1a AR	77	8	0	15	0
12	Eix2a TSA	79	8	0	13	0
13	Eix2b PDA	97	0	0	3	0
14	Eix2d TSA	100	0	0	0	0
15	Eix2F TSA	98	1	0	1	0
16	Eiiix1b TSA	94	4	0	2	0
17	Eiiix1a TSA	59	32	0	6	3
18	Eiiix2a TSA	69	24	0	7	0
19	Eiiix2b TSA	87	0	0	13	0
20	Eiiix2c TSA	100	0	0	0	0

En la tabla 15, en color gris oscuro, se muestra que con la cepa Eiiix1aTSA se obtuvo el mejor porcentaje de bio-reducción a las 24 horas de reacción. A su vez con este microorganismos se obtuvo el alcohol *anti* (2*R*, 3*R*), isómero de interés por ser compuesto anti-Prelog (señalado en azul en la tabla 15) (Figura 36). Por otro lado, también señalado en gris oscuro en la tabla 15, se muestra que la cepa Eix1a PDA rindió el alcohol *syn* (2*S*, 3*R*), aunque en un porcentaje muy bajo, pero resultó de interés por ser una cepa con actividad anti-Prelog.

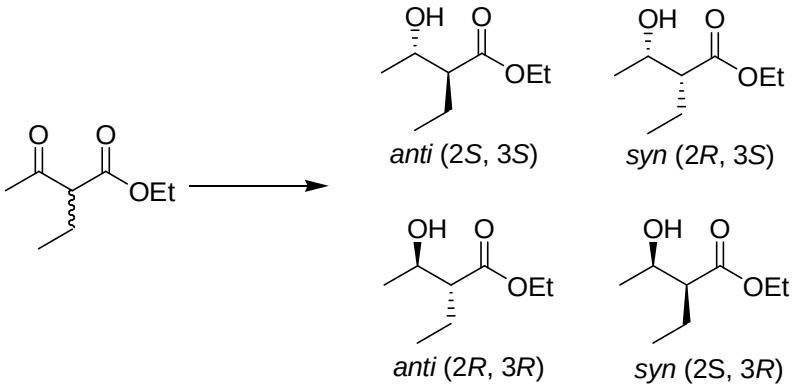
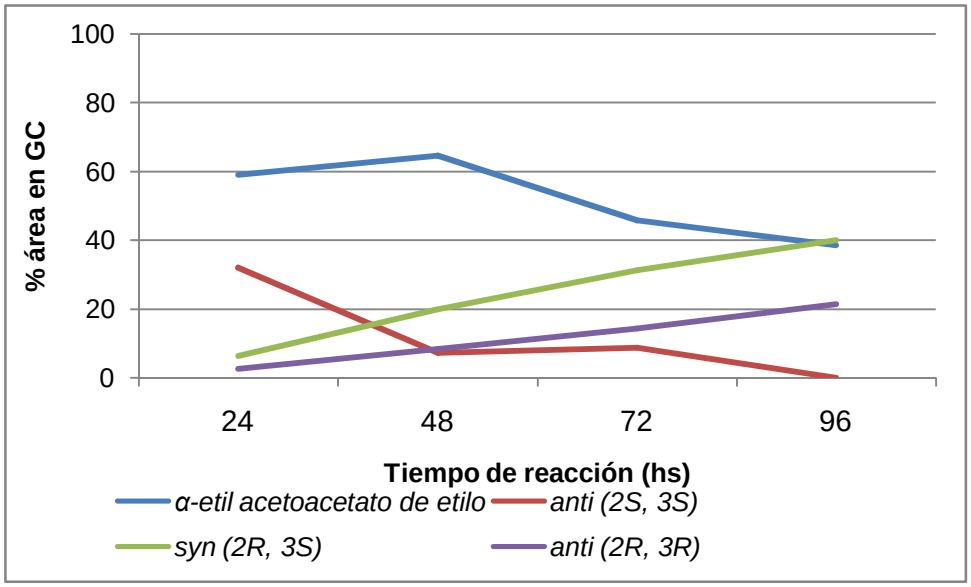


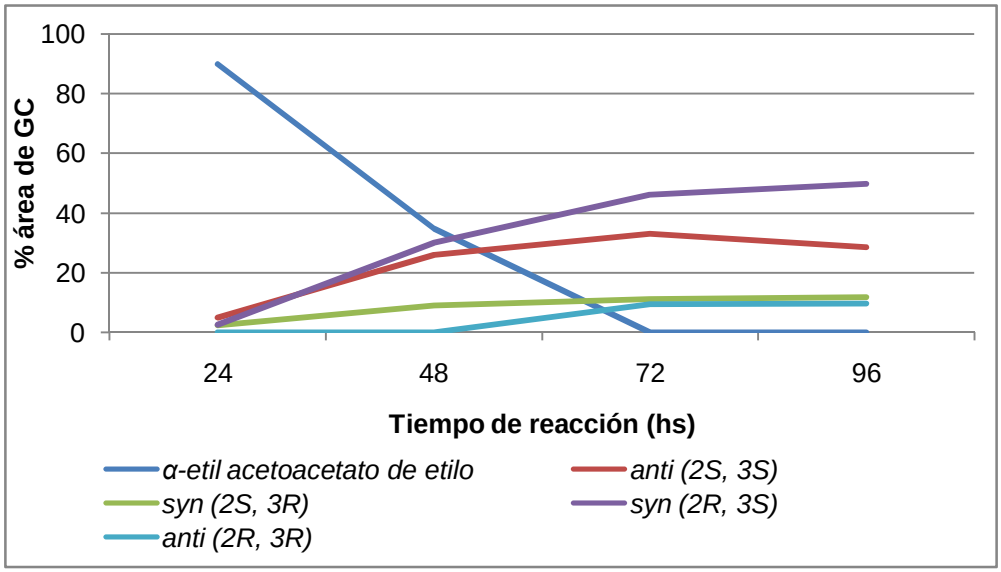
Figura 36. α-etil acetoacetato de etilo (**72**) y los posibles productos de su reducción.

Se decidió llevar a cabo el estudio de la bio-reducción de **72** mediante ambas cepas endófitas a distintos tiempos de reacción con la finalidad de evaluar el comportamiento enzimático presente en las mismas frente al compuesto estudiado. En la gráfica 10 se observa que con la cepa Eiiix1aTSA a las 24 horas de reacción se obtuvo un 40% de conversión con predominio del isómero *anti* (2*S*, 3*S*). Este compuesto desaparece a las 96 horas, sin embargo en este tiempo se obtuvieron como productos mayoritarios los alcoholes *syn* (2*R*, 3*S*) y *anti* (2*R*, 3*R*) finalizando con una conversión del 60%. Si bien la conversión no se incrementa sustancialmente en el periodo evaluado se observó una inversión de configuración en los alcoholes obtenidos. El comportamiento observado en este biocatalizador podría explicarse por la presencia de varias enzimas reductasas que se expresen en etapas distintas del cultivo y de esta forma se obtenga un cambio en la configuración de los alcoholes obtenidos. La desaparición del isómero *anti* (2*S*, 3*S*) probablemente se asocie a la oxidación del mismo y una posterior reducción con distinta estereoselección. Otra explicación posible sería la degradación específica del alcohol *anti* (2*S*, 3*S*).



Gráfica 10. Estudio de la bio-reducción de α-etilacetoacetato de etilo (**72**) mediante la cepa endófita Eiiix1aTSA a distintos tiempos de reacción.

Los resultados obtenidos en la bio-reducción de **72** mediante la cepa Eix1aPDA en los tiempos de reacción evaluados se presentan en la gráfica 11. Con este microorganismo endófito se observó un comportamiento diferente al observado con la cepa Eiiix1aTSA. La bio-reducción transcurrió con una clara evolución global hasta las 72 horas de reacción, mostrando una homogénea distribución en los productos. Si bien, a las 24 horas de reacción se obtuvo el isómero *syn* (2*S*, 3*R*), se observa que a partir de las 48 horas se obtuvo el otro isómero anti Prelog. Esto podría deberse a la expresión tardía de una enzima reductasa responsable de la reducción de **72** al alcohol *anti* (2*R*, 3*R*).



Gráfica 11. Estudio de la bio-reducción de α-etilacetoacetato de etilo (**72**) mediante la cepa endófita Eix1a PDA a distintos tiempos de reacción.

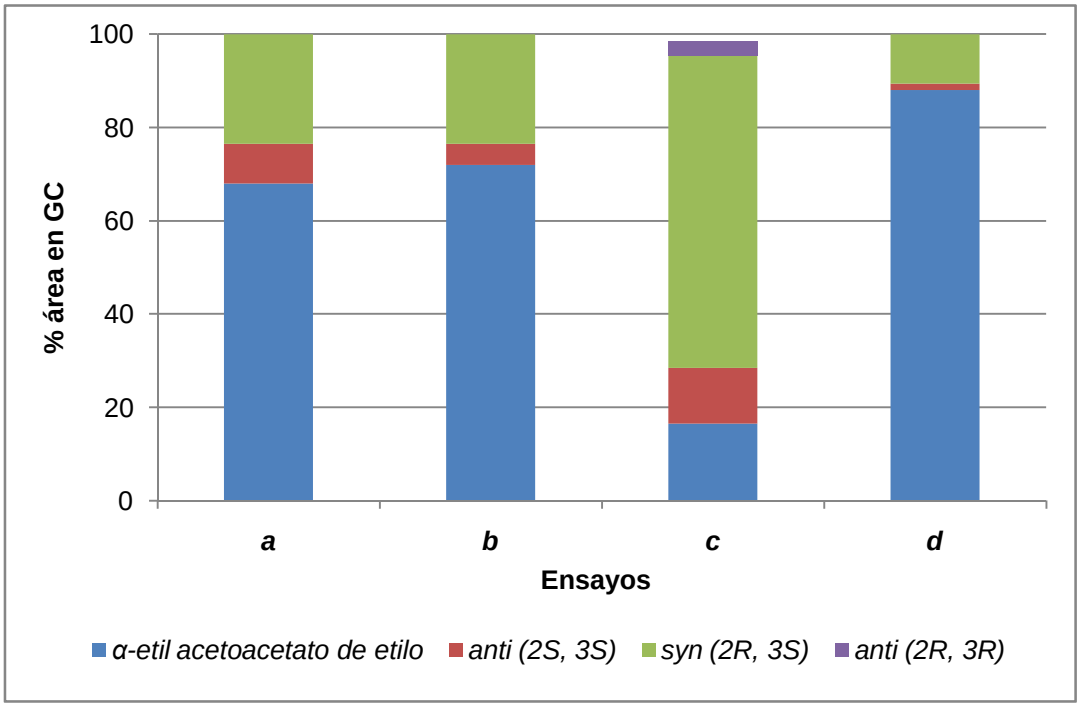
Identificación de las cepas Eiiix1a TSA y Eix1a PDA.

Se llevó a cabo la identificación de las bacterias endófitas que presentan mayor interés desde el punto de vista biocatalítico mediante la comparación de las secuencias de los genes del ARN ribosomal 16S con respecto a secuencias relacionadas en la base de datos del GenBank usando BLAST (National Center for Biotechnology Information) (Altschul, Gish et al. 1990). De esta manera se identificó la cepa Eiiix1a TSA como *Pseudomonas* sp. y la cepa Eix1a PDA como *Stenotrophomonas* sp.

Biotransformaciones de α-etil acetoacetato de etilo para evaluar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por raíces frescas de rabanito (R. sativus).

En la gráfica 12 se muestran los resultados obtenidos de la bio-reducción de **72** en los ***ensayos a-d*** mediante raíces frescas de rabanito a las 96 horas de reacción. Se observó que en el ***ensayo d***, el porcentaje de bioconversión fue bajo. En este experimento no se observó crecimiento microbiano a las 96 horas de reacción (Tabla 14), por lo tanto, la actividad reductasa observada probablemente esté asociada a enzimas del sistema vegetal. Por otro lado, los ***ensayos a*** y ***b*** presentaron porcentajes de conversión similares. Estos resultados estarían indicando que bacterias que fueron sensibles al inhibidor microbiano no estuvieron participando en la bio-reducción del compuesto **72**, por tanto la bioconversión podría haberse dado mediante las células vegetales.

En el ***ensayo c*** fue donde se obtuvo el mayor porcentaje de conversión de **72**. Si bien probablemente existió una actividad basal de sistema reductor del vegetal, se puede asociar el incremento en el porcentaje de conversión con los microorganismos endófitos aislados. En este ensayo se aisló la cepa *Pseudomonas* sp. Eiiix1a TSA, la cual rindió en la bioconversión del sustrato **72 l**os dos diasterómeros con configuración Prelog y el isoméro anti-Prelog *anti* (2*R*, 3*R*). Los mismos compuestos se obtuvieron en el ***ensayo c***. Por tanto la cepa bacteriana pudo haber tenido participación en la bio-reducción de **72** cuando se utilizó la raíz fresca de rabanito como biocatalizador en presencia de cicloheximida. Por otra parte, en el ***ensayo c*** también se aisló la bacteria Eiiix2a TSA que presenta actividad reductasa. La presencia de estas dos bacterias, y la gran cantidad de biomasa al final de la reacción pudieron ser responsables de la actividad reductasa observada en el ensayo adicionado con cicloheximida (***ensayo c***).



Gráfica 12. Porcentajes de área en GC de los compuestos obtenidos a las 96 horas de bio-reducción de **72** mediante raíz de rabanito.

Plántulas de rabanito (R. sativus)

Aislamiento e identificación de microorganismos endófitos de plántulas de rabanito en presencia del sustrato α-etil acetoacetato de etilo.

Se aislaron dos hongos filamentosos que fueron identicados como *Cladosporium cladosporioides* vE13 y *Penicillium chrysogenum* vA8. Ambos hongos fueron aislados de los ensayos en presencia de α-etilacetoacetato de etilo y sin inhibidores microbianos.

Identificación de hongos endófitos de plántulas de rabanito.

Morfología macro y microscópica.

Se llevó a cabo el estudio de las características macro y microscópicas de los hongos aislados a partir de cultivos en placa con medio PDA y con un tiempo de crecimiento de siete días. Se utilizó el manual de identificación " *Introduction to food-borne fungi*" de Samson Robert, Hoeksta Ellen, Frisvad Jens, Filtenborg Ole para comparar con las especies conocidas y llegar a una aproximación del género (Samson and van Reenen Hoekstra 1988).

La cepa PRII153vE13 formó colonias de color oliváceo-marrón y aterciopeladas. Las características microscópicas revelaron hifas vegetativas, conidióforos y conidios pigmentados. Se identificó una estructura típica del género *Cladosporium* tal como la presencia de conidióforos elongados simpodialmente, geniculado en la porción de arriba y con cicatrices en la base.

La cepa PRII153VA8 formó colonias de color blanco que esporularon de color verde-azul verdosa. La superficie de las colonias fue aterciopelada. El examen microscópico dejó ver la característica fundamental del género *Penicillium*, que se caracteriza por formar conidios en

una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides.

Análisis filogenético.

La identificación filogenética de ambos hongos la realizó la estudiante de doctorado Cynthia Magallanes-Noguera durante una pasantía realizada en la Cátedra de Microbiología y el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones de Facultad de Química, UdelaR. El objetivo de dicha pasantía fue la identificación de microorganismos endófitos mediante técnicas bioquímicas y de biología molecular. En el marco del trabajo conjunto de ambos grupos argentino y uruguayo, como se mencionó anteriormente, fue que la estudiante llevó a cabo estos trabajos.

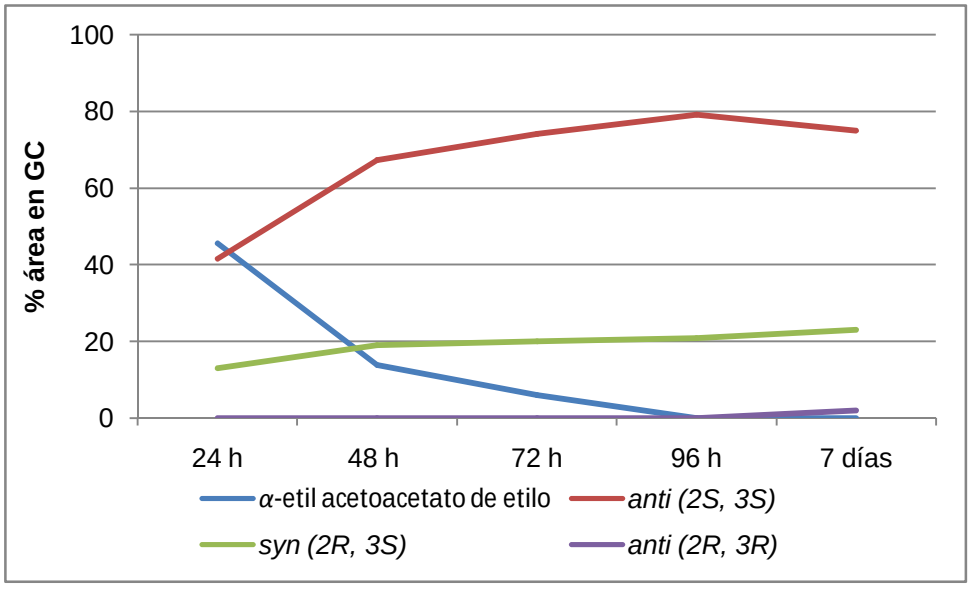
La cepa fúngica PRII153vE13 fue identificada como *Cladosporium cladosporioides* presentando 99 % de identidad con la cepa STE-U 3683 con 100% de cobertura entre la secuencia de PRII153vE13 y la del ITS1-5.8rDNA-ITS2 de *C. cladosporioides*, con 99% de identidad (855/861) y 4 gaps = 4/861 (0%). El análisis de BLAST también mostró homología con varios clones de *Cladosporium* no cultivado SW_2d_G02, lo que confirma las características fenotípicas y genotípicas asignadas.

La cepa PRII153VA8 fue identificada como *Penicillium chrysogenum* registrándose 99 % de identidad con la cepa ATCC 10002 por presentar 99 % de identidad (816/820) y cuatro gaps = 4/820 (0%). Las características morfológicas de esta cepa coinciden con los datos reportados de las especies identificadas.

Determinación de la capacidad biocatalítica frente a α-etil acetoacetato de etilo de los hongos endófitos aislados.

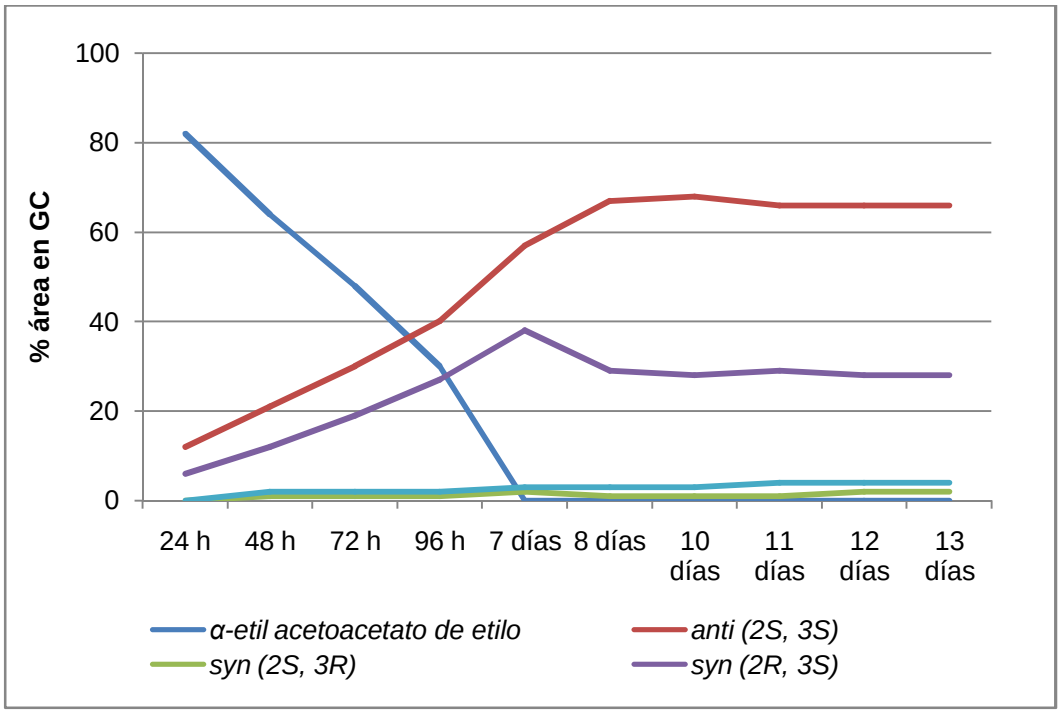
Se llevó a cabo la determinación de la actividad reductasa frente al sustrato **72** de los hongos endófitos aislados a partir de plántulas de rabanito.

En la gráfica 13 se observan los porcentajes de cada uno de los compuestos obtenidos de la bio-reducción de **72** mediante el hongo *Penicillium chrysogenum* vA8 en los diferentes tiempos ensayados. La bioconversión se completó a las 96 horas de reacción, obteniéndose en este tiempo los dos alcoholes con configuración Prelog. Sin embargo a los 7 días de reacción se observó la aparición del compuesto anti-Prelog *anti* (2*R*, 3*R*), la aparición de este isómero pudo deberse a la actividad sobre el compuesto **72** de una alcohol deshidrogenasa que se comenzó a expresar durante el metabolismo secundario del hongo.



Gráfica 13. Porcentaje de los compuestos presentes en cada uno de los tiempos ensayados en la bio-reducción de **72** mediante el hongo endófito *Penicillium chrysogenum* vA8.

La gráfica 14 muestra los porcentajes de los compuestos obtenidos en la bio-reducción de **72** en los distintos tiempos ensayados por medio del hongo endófito *Cladosporium cladosporioide*s vE13. Con este biocatalizador se observó desaparición de sustrato a los 7 días, y a los 8 días de reacción se obtuvieron los cuatro alcoholes posibles de la bio-reducción de **72**.



Gráfica 14. Porcentaje de los compuestos presentes en cada uno de los tiempos ensayados en la bio-reducción de **72** mediante el hongo endófito *Cladosporium cladosporioides* vE13.

Posteriormente a este ensayo se realizó un experimento con la finalidad de evaluar la posible participación de más de un sistema enzimático en la bio-reducción de **72** mediante *Cladosporium cladosporioides* vE13. Para ello, se llevó a cabo la bio-reducción de **72** mediante el endófito *Cladosporium cladosporioides* vE13 de forma análoga a la ensayada anteriormente variando la edad del cultivo cuando se le adicionó el sustrato. En este ensayo se dejó crecer el hongo durante 8 días, pasado ese periodo de tiempo se le adicionó el sustrato y se fueron sacando muestras a diferentes tiempos. En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 16. Resultados obtenidos de la bio-reducción de 72 mediante *Cladosporium cladosporioides* vE13 con la adición de sustrato a los 8 días de crecimiento fúngico.

Tiempo de reacción	**% conversión**	***anti* (2*S*, 3*S*), (% *ee*)**	***syn* (2*R*, 3*S*) (% ee)**	**% *de***
48 h	> 99	76 (79)	15 (> 98)	70
72 h	> 99	74 (74)	15 (> 98)	70
96 h	> 99	75 (79)	16 (> 98)	68
6 días	> 99	75 (74)	14 (> 98)	72
9 días	> 99	74 (72)	14 (> 98)	72
11 días	> 99	76 (77)	14 (> 98)	72

En las tablas 16 y 17 se comparan los resultados obtenidos en las bio-reducciones de **72** mediante *Cladosporium cladosporioides* vE13 en el ensayo con inóculo de 48 horas (ensayo 1, tabla 17) y el ensayo con inóculo de 8 días (ensayo 2, tabla 17). En gris se marcan los tiempos en los que el hongo tiene un periodo de crecimiento de 10 días en ambos ensayos, pero la diferencia radica en que en 1 el sustrato se le adicionó a las 48 horas mientras que en 2 el sustrato se le adicionó a los 8 días. Se observa que en el ensayo 2 se obtiene un mejor porcentaje de exceso diasteromérico pero un peor porcentaje de exceso enantiomérico para el alcohol *anti* (2*S*, 3*S*). De los resultados obtenidos se observó que la reducción del β-cetoéster fue llevada a cabo por distintas enzimas.

Tabla 17. Resultados obtenidos de la bio-reducción de **72** mediante *Cladosporium cladosporioides* vE13 con la adición de sustrato a las 48 horas de crecimiento fúngico.

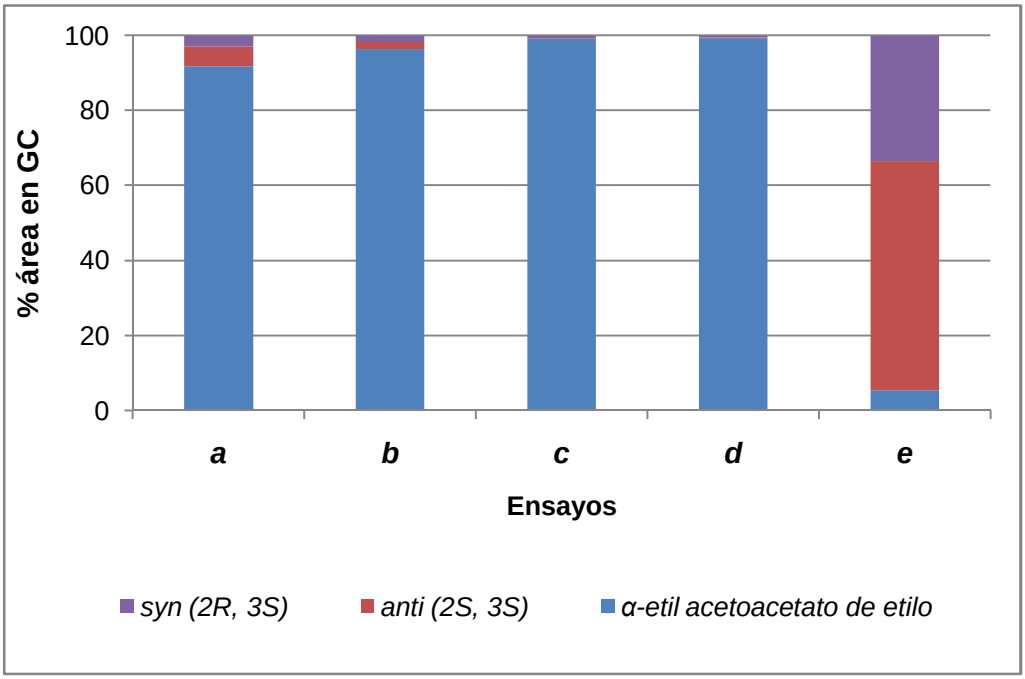
Ensayo (1)	% conversión	*anti* (2*S*, 3*S*) (%ee)	*syn* (2*R*, 3*S*) (%*ee*)	% *de*
48 h	36	21 (83)	12 (85)	28
72 h	52	30 (88)	19 (90)	23
96 h	70	40 (90)	27 (93)	20
7 días	> 99	57 (90)	38 (90)	20
10 días	> 99	68 (92)	28 (93)	42
11 días	> 99	66 (89)	29 (93)	40

Biotransformaciones de α-etilacetoacetato de etilo para evaluar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por plántulas de rabanito (R. sativus).

Se llevó a cabo el estudio de la bio-reducción de **72** mediante plántulas de rabanito utilizando la estrategia de los ***ensayos a-d***. A su vez se incorporó como variante a los experimentos llevados a cabo hasta este momento, la molienda del material vegetal. Se decidió moler el tejido vegetal con la finalidad de recuperar mayor número de microorganismos endófitos en los aislamientos. Por tanto este estudio comprendió cinco ensayos: los ***ensayos a-d***, que se efectuaron con el material vegetal molido y se añadió un experimento adicional, denominado ***ensayo e***, que consistió en el vegetal sin moler con la adición del sustrato **72** pero sin inhibidores microbianos. En estos ensayos se empleó el sustrato α-etil acetoacetato de etilo (**72**) a una concentración 10mM. Esta concentración es superior a la que se emplea habitualmente (2.5mM) cuando se utilizan plántulas germinadas *in vitro* como agente biocatalizador. Sin embargo se decidió trabajar con una concentración de sustrato 10mM ya que era la concentración habitual en los ensayos con todos los sistemas biocatalíticos utilizados en la presente tesis.

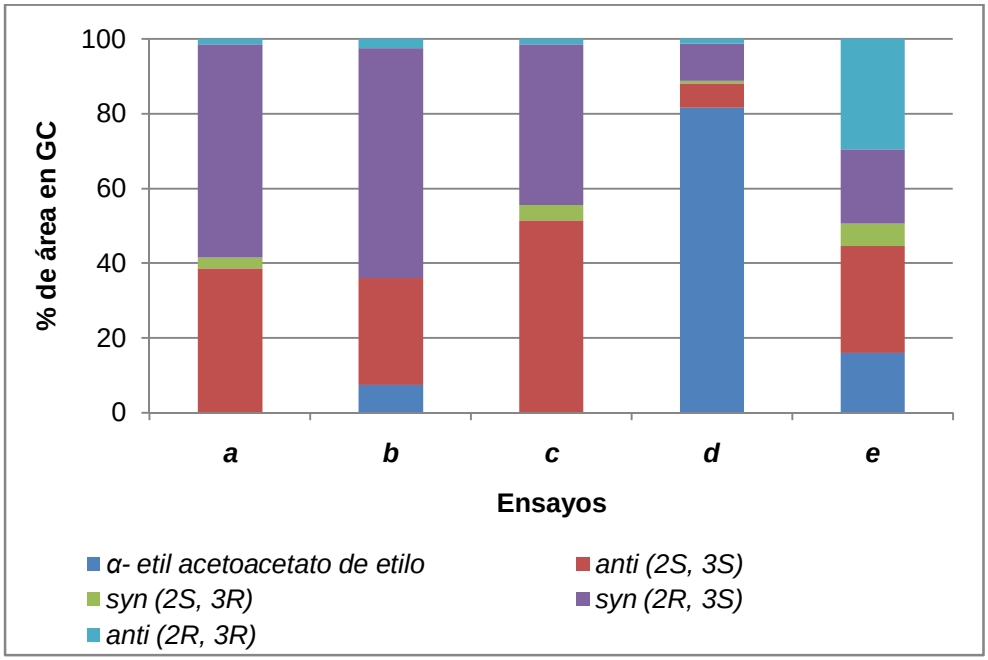
En el único ensayo en que se observó un alto porcentaje de conversión de **72** fue en el ***ensayo e*** (plántulas sin moler y sin inhibidores microbianos). Los alcoholes obtenidos en todos los casos fueron los alcoholes con configuración Prelog (Gráfica 15). El hecho de no observar conversión en los ***ensayos a-d*** podría haberse debido a que la molienda afectó la actividad enzimática. Una posible explicación sería que las células, tanto vegetales como microbianas, quedaron expuestas a una concentración de sustrato que les fue tóxica, mientras que en el sistema plántula entera el ingreso del sustrato estuvo limitado y la concentración efectiva en el interior del sistema fue menor.

En el ***ensayo a*** se aisló el hongo *Penicillium chrysogenum* vA8 en tanto en el ***ensayo e*** se aisló la cepa *Cladosporium cladosporioides* vE13. Ambos hongos endófitos presentaron actividad reductasa frente al sustrato **72** siguiendo la regla de Prelog (ver gráficas 13 y 14). Estos resultados podrían estar indicando que en el momento de la bio-reducción de **72** mediante el tejido vegetal de rabanito, las cepas fúngicas podrían haber estado actuando en la misma.



Gráfica 15. Porcentajes de área en GC de los compuestos obtenidos a las 96 horas de bio-reducción del compuesto **72** mediante plántulas de rabanito.

Para comprobar si la concentración 10mM de sustrato tuvo un efecto negativo en la bio-reducción de **72** se realizó el mismo experimento pero a una concentración de 2.5mM y en un periodo de tiempo de 7 días, estas condiciones son las que utiliza el grupo de la Dra. Kurina-Sanz cuando emplean plántulas germinadas *in vitro* como agentes biocatalizadores. En la gráfica 16 se muestran los resultados obtenidos en estos ensayos.



Gráfica 16. Bio-reducción de α-etilacetoacetato de etilo (**72**) mediante plántulas de rabanito a una concentración de sustrato de 2.5mM.

Se observó bio-reducción de **72** en todos los ensayos realizados, con lo cual se puede concluir que una concentración 10 mM resultó tóxica o inhibitoria para el biocatalizador. En los experimentos con una concentración de 2.5mM de sustrato se observó que los ***ensayos a*** y ***c*** la conversión fue >99%, a su vez presentaron un perfil de reducción similiar ya que los 4 alcoholes se obtuvieron en las mismas proporciones (siendo los productos mayoritarios los alcoholes con configuración Prelog, y detectándose los alcoholes anti-Prelog en baja proporción). En el ***ensayo b*** se obtuvo un perfil diferente de bio-reducción, en este caso se obtuvieron mayoritariamente los alcoholes con configuración Prelog sin la aparición del isómero *syn* (2*S*, 3*R*). Estos resultados podrían estar indicando que la obtención del isómero *syn* (2*S*, 3*R*) fue dada mediante una alcohol deshidrogenasa fúngica. En en ***ensayo e*** donde no se efectuó la molienda del material se obtuvo el isómero *anti* (2*R*, 3*R*) en mayor proporción que lo obtenido en los ***ensayos a-b***. Por otra parte, en el ensayo con los dos inhibidores microbianos (***ensayo d***) se observó una importante disminución en el porcentaje de conversión, este resultado puede ser un indicativo de la contribución de los microorganismos endófitos a la reacción ya que en este ensayo no estuvieron activos.

Raíces transformadas (RT) de rabanito (*R. sativus*)

Se llevó a cabo el estudio de la biotransformación de α-etilacetoacetato de etilo mediante raíces transformadas de rabanito en los ***ensayos a-e***. Estos experimentos fueron llevados a cabo con raíces transformadas molidas (***ensayos a-d***) y raíces transformadas sin moler. La concentración de sustrato **72** utilizada fue de 10mM y la reacción se evaluó a las 96 horas. En estas condiciones no se observó bio-reducción significativa en ninguno de los ensayos realizados (Tabla 18).

Por otro lado, no se recuperaron microorganismos endófitos en ninguno de los ensayos (***a-e***) realizados.

Tabla 18. Porcentaje de bio-conversión de **72** mediante raíces transformadas de rabanito con una concentración de sustrato de 10mM.

Ensayo	% conversión	*anti* (2*S*, 3*S*)	*syn* (2*R*, 3*S*)
Ensayo a. RT molidas mediante mortero en ausencia de inhibidores microbianos y en presencia de **72**.	3	2	1
Ensayo b. RT molidas mediante mortero con cloranfenicol y en presencia de **72**.	2	1	1
Ensayo c. RT molidas mediante mortero con cicloheximida y en presencia de **72**.	4	3	1
Ensayo d. RT molidas mediante mortero en presencia de los dos inhibidores microbianos y en presencia de **72**.	0	0	0
Ensayo e. RT en ausencia de inhibidores microbianos y en presencia de **72**.	3	2	1

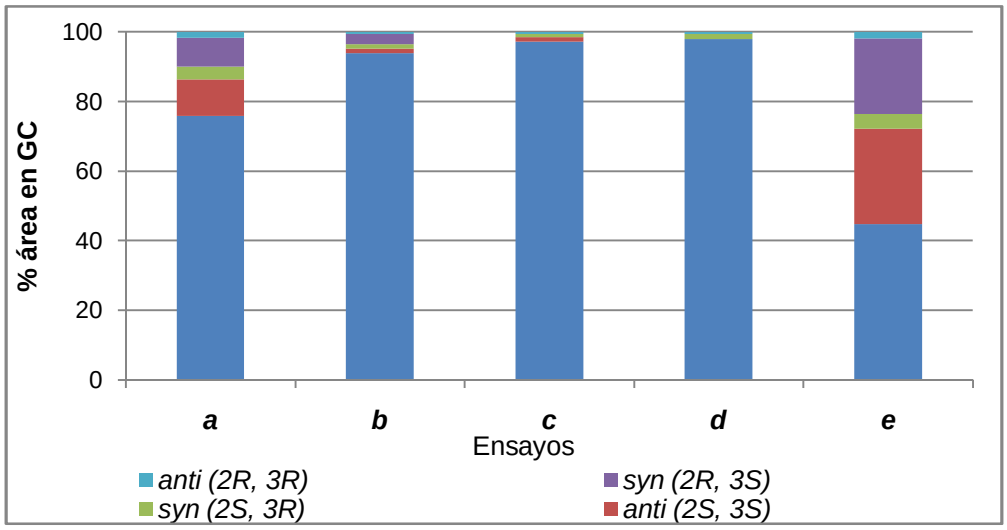
Se realizó la bio-reducción de acetofenona (**9**), como control positivo de la actividad reductasa de las raíces transformadas de rabanito sin moler. En este control se evaluó la incidencia de la concentración de sustrato empleada. Para ello se usaron las concentraciones 10mM y 2.5mM (concentración de sustrato habitual en las bio-reducciones con raíces transformadas). En la tabla 19 se muestran los porcentajes de conversión y de exceso enantiomérico (*ee*) obtenidos en estas bio-reducciones.

Tabla 19. Bioconversión de acetofenona mediante raíces transformadas de *R. sativus* en las dos condiciones ensayadas.

Biocatalizador	Concentración de 72	% conversión	% *ee*	Configuración
RT, *R. sativus*	10 mM	2	-	-
RT, *R. sativus*	2.5 mM	44	94	*R*

En estos controles se observó que la adición de sustrato a una concentración final 10mM resultó inhibitoria para la bio-reducción pues se alcanzó un porcentaje de bioconversión de únicamente 2%. Sin embargo cuando se empleó la concentración de sustrato que se emplea usualmente (2,5mM) para las bio-reducciones de cetonas proquirales a través de raíces transformadas de *R. sativus* (Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009) se alcanzó una bioconversión del 44% y con un excelente exceso enantiomérico. El alcohol mayoritario obtenido con este biocatalizador fue el (*R*)-1-feniletanol, producto de la reducción anti-Prelog, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente para este biocatalizador (Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009).

En base a estos antecedentes, se procedió a llevar a cabo el estudio de la bio-reducción de α-etilacetoacetato de etilo en las condiciones en las que se observó conversión de acetofenona (una concentración de sustrato de 2.5mM, durante 7 días de reacción). En la gráfica 17 se muestran los resultados obtenidos en los ***ensayos a-e.***



Gráfica 17. Porcentaje de bio-reducción de α-etilacetoacetato de etilo mediante raíces transformadas de rabanito a una concentración de sustrato de 2.5mM.

El empleo de una concentración menor de sustrato llevó a un mayor porcentaje de conversión en los ***ensayos a y e***. Si bien en el ***ensayo a*** se observó un aumento en la biocoversión también se observó que el sistema se vió afectado por la molienda pues la conversión se redujo a la mitad si se compara con el ***ensayo e***. El ***ensayo e*** se llevó a cabo en las mismas condiciones a las empleadas con el sustrato acetofenona mediante RT con una concentración de sustrato 2.5mM. En ambos ensayos, con los sustratos **72** y **9**, se obtuvieron porcentajes de conversión superiores al 40%.

En estas biotransformaciones empleando sistemas *in vitro*, plántula y RT, se obtuvieron los cuatro alcoholes posibles de la reducción de **72**, mientras que las biotransformaciones llevadas a cabo mediante raíz fresca de rabanito rindieron los alcoholes con configuración Prelog.

En los ensayos adicionados con cloranfenicol y cicloheximida la bioconversión no fue significativa. Si bien no se recuperaron microorganismos endófitos en los ***ensayos a-e***, la adición de compuestos antimicrobianos ejerció un efecto negativo en la bio-reducción lo cual podría indicar la presencia de microorganismos endófitos no cultivables.

Ensayos con el sustrato 2-acetilpiridina

Raíces frescas de rabanito (R. sativus)

Aislamiento y recuento de microorganismos endófitos viables a partir de los ensayos a-d con raíz de rabanito frente al sustrato 2-acetilpiridina.

Se aislaron bacterias endófitas de raíces frescas de rabanito en presencia del sustrato **44** en los ***ensayos a*** y ***c***. En la tabla 20 se muestran la cantidad de cepas que se obtuvieron en cada aislamiento, como fueron denominadas y el recuento de microorganismos endófitos viables presentes a las 96 horas de bio-reducción de **44**.

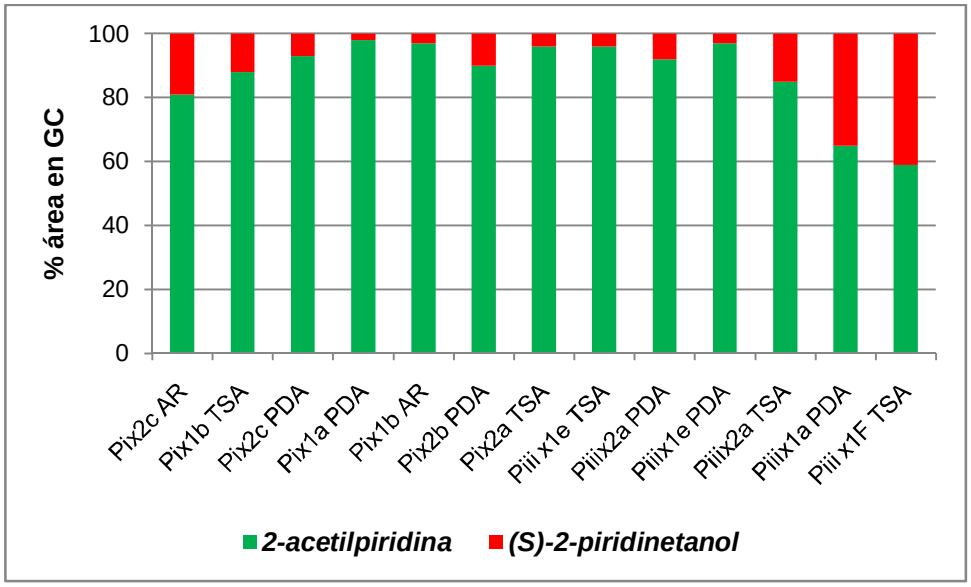
Tabla 20. Aislamientos y recuentos de microorganismos endófitos viables a partir de raíces frescas de rabanito.

Aislamientos	Bacterias: nomenclatura asignada	96 hrs.; ufc/mL
Ensayo a	10 cepas: Pix2c AR; Pix1b TSA; Pix2c PDA; Pix2e TSA; Pix1a PDA; Pix1b AR; Pix2b PDA; Pix2a TSA; Pix1a AR y Pix2a AR.	7×10^8 (estimado)
Ensayo b	0	<100
Ensayo c	6 cepas: Piii x1e TSA; Piiix2a PDA; Piiix1e PDA; Piiix2a TSA; Piiix1a PDA y Piii x1F PDA.	7×10^8 (estimado)
Ensayo d	0	<100
Blanco rabanito	B1; B2; B3 y B4	$2{,}5 \times 10^8$

Bio-reducción de 2-acetilpiridina mediante las cepas endófitas aisladas en raíz de rabanito.

De las 16 cepas aisladas, 13 presentaron actividad reductasa frente al compuesto **44**, rindiendo en todos los casos el (*S*)-2-piridinetanol (**44a**) (Figura 31). Con la cepa Piii x1F TSA fue con la que se obtuvo mayor porcentaje de bio-reducción. En la gráfica 18 se

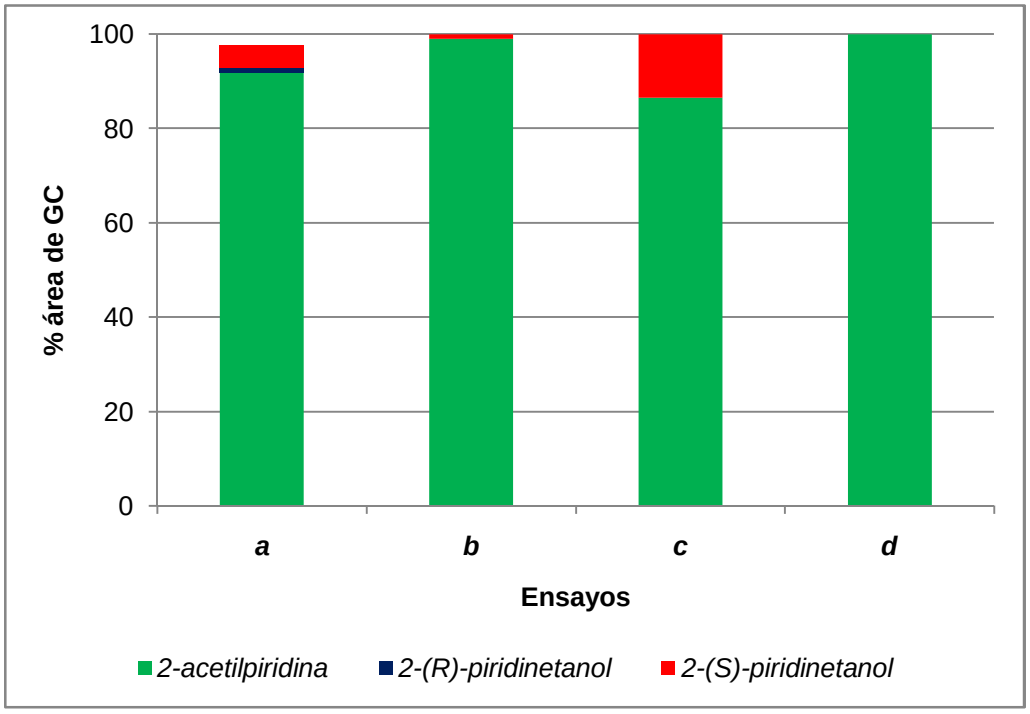
muestran los porcentajes de conversión obtenidos de la bio-reducción de **44** mediante las bacterias endófitas.



Gráfica 18. Porcentaje de bioconversión de **44** mediante bacterias endófitas aisladas de raíz de *R. sativus* a las 144 horas de reacción.

Biotransformaciones de 2-acetilpiridina para evaluar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por raíz fresca de rabanito (R. sativus).

En los ensayos que se obtuvo mayor porcentaje de bio-reducción de **44** fue, al igual que con el sustrato **72**, en los que se adicionó cicloheximida, ver gráfica 19. En los ensayos sin inhibidores microbianos se obtuvo, en uno de los duplicados, el (*R*)-2-piridinetanol. En estos dos ensayos, ***a*** y ***c***, donde se observó bioconversión del sustrato **44** fue donde se recuperaron microorganismos endófitos que fueron evaluados con actividad reductasa frente al compuesto **44**. En los experimentos donde se adicionó cloranfenicol y los dos inhibidores microbianos juntos no se obtuvo bio-reducción y no se recuperaron microorganismos endófitos.



Gráfica 19. Porcentajes de área en GC de los compuestos obtenidos a las 96 horas de bio-reducción de **44** mediante raíz de rabanito.

Plántulas de rabanito (R. sativus)

Aislamiento e identificación de microorganismos endófitos de plántulas de rabanito en presencia del sustrato 2-acetilpiridina.

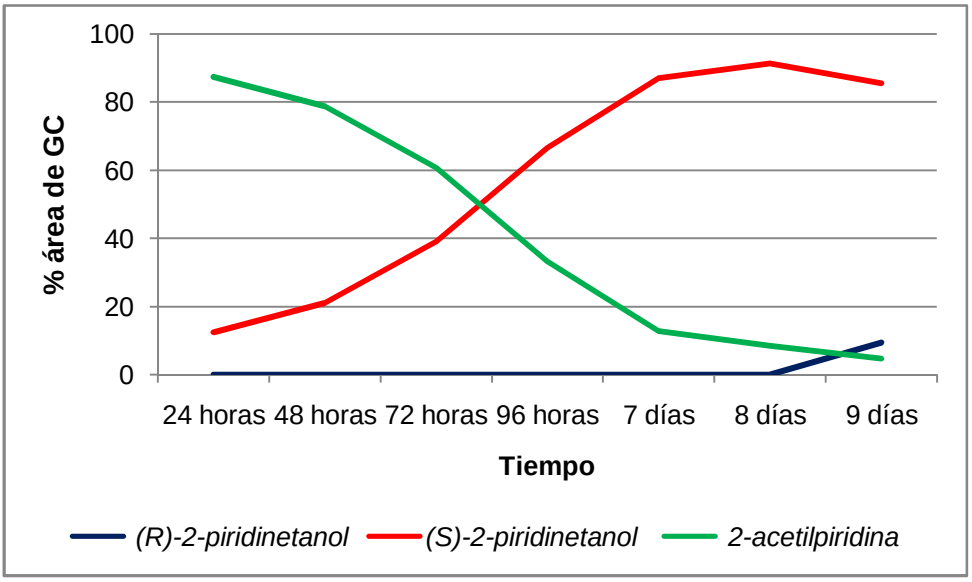
Se realizaron los *ensayos a-e* de igual forma a la llevada a cabo frente al sustrato α-etilacetoacetato de etilo (**72**) mediante plántulas de rabanito.

Los hongos endófitos *Penicillium chrysogenum* vA8 y *Cladosporium cladosporioides* vE13 aislados en de las plántulas de rabanito frente al sustrato α-etilacetoacetato de etilo (**72**) también fueron recuperados en los ensayos ***a*** y ***e*** con plántulas de rabanito en presencia del sustrato 2-acetilpiridina (**44**). El hecho de recuperar los mismos hongos filamentosos en ambos experimentos se explica debido a que los ***ensayos (a-e)*** con plántulas de rabanito frente a los sustratos **72** y **44** se realizaron empleando las mismas plántulas. Por otra parte la presencia de uno u otro sustrato no alteró la presencia de estos hongos filamentosos en los medios de reacción.

Determinación de la capacidad biocatalítica frente a 2-acetilpiridina de los hongos endófitos aislados.

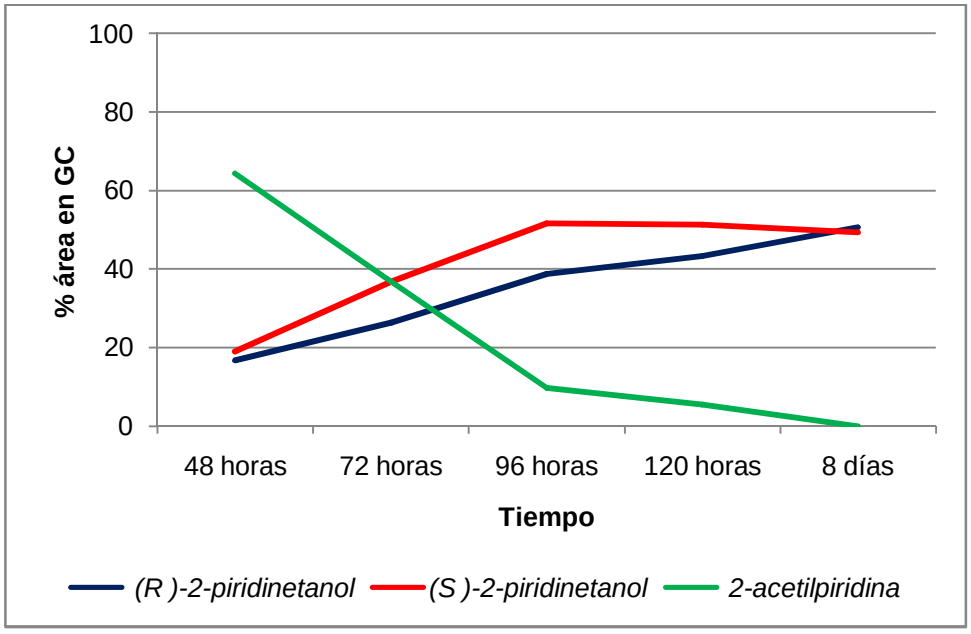
Al igual que para los demás sustratos, se llevo a cabo la determinación de la actividad reductasa frente al compuesto **44** para los hongos aislados *Penicillium chrysogenum* vA8 y *Cladosporium cladosporioides* vE13.

La bio-reducción de **44** mediante *Penicillium chrysogenum* vA8 se realizó en diferentes tiempos de reacción, ver gráfica 20. A los 9 días se obtuvieron los dos alcoholes de la reducción de **44,** (*S*) y (*R*)-2-piridinetanol, con un *ee* del 79% para el alcohol *S*, siendo la bioconversión en ese tiempo estudiado del 95%.



Gráfica 20. Bio-reducción de 2-acetilpiridina (**44**) mediante el hongo endófito *Penicillium chrysogenum* vA8.

Los resultados obtenidos de la bio-reducción del compuesto **44** mediante *Cladosporium cladosporioides* vE13 se presentan en la gráfica 21. A los 8 días se completó la conversión del compuesto **44** a una mezcla racémica de los alcoholes (*RS*)-2-piridinetanol. Mostrando claramente la presencia en el hongo endófito de actividad reductasa tanto Prelog como anti-Prelog, correspondiente a la acción de más de una enzima, o a la presencia de enzimas que no presentan estereoselectividad en la reducción de este sustrato.



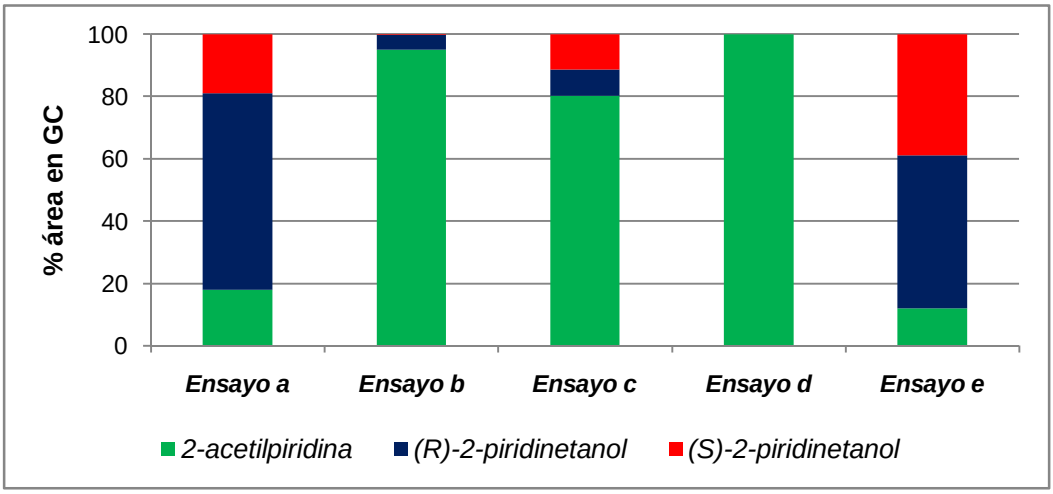
Gráfica 21. Bio-reducción de 2-acetilpiridina por el hongo endófito *Cladosporium cladosporioides* vE13.

Biotransformaciones de 2-acetilpiridina para evaluar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por plántulas de rabanito (R. sativus).

Se llevó a cabo la bio-reducción de **44** en los cinco ***ensayos a-e*** utilizando una concentración de sustrato 10mM y deteniendo las reacciones a las 96 horas. En estas condiciones, únicamente, se obtuvo conversión en los ensayos con las plántulas intactas sin la adición de inhibidores microbianos. El porcentaje de conversión fue de 24 obteniendo el (*S*)-2-piridinetanol en un 18% frente al alcohol *R* que se obtuvo en un 6%.

A partir de este ensayo (***ensayo e***) se aislaron los hongos endófitos *Penicillium chrysogenum* vA8 y *Cladosporium cladosporioides* vE13 que presentaron actividad reductasa, Prelog mayoritariamente en el hongo *Penicillium chrysogenum* vA8 (ver grafica 20) y actividad Prelog y anti-Prelog con el hongo *Cladosporium cladosporioides* vE13 (ver grafica 21). Ambos hongos podrían haber estado participando en la reducción de **44** cuando se emplearon las plántulas como biocatalizadores ya que ambos fueron capaces de reducir este compuesto en los tiempos ensayados.

Como se evidenció en el experimento control realizado con RT de rabanito adicionado con acetofenona y con los sustratos anteriormente mencionados, la concentración 10 mM resultó tóxica. Por tanto, se decidió emplear una concentración de 2-acetilpiridina 2.5 mM. Se llevó a cabo el mismo experimento, ***ensayos a-e***, pero a una concentración de sustrato 2.5 mM y durante 7 días de reacción. En estas condiciones se observó bio-reducción de **44** en todos los ensayos a excepción del ensayo adicionado con los dos inhibidores microbianos juntos (***ensayo d***). En la gráfica 22 se muestran los resultados obtenidos en estas bio-reducciones. En la misma se observa que en los ensayos sin la adición de inhibidores microbianos se obtuvo un porcentaje de conversión superior al 85%, siendo el alcohol mayoritario en estas bio-reducciones el alcohol *R*. Sin embargo no se obtuvieron buenos excesos enantioméricos, en el ***ensayo a*** se obtuvo un *ee* del 54% mientras que el *ee* del ***ensayo e*** fue del 12%. En el ensayo adicionado con cloranfenicol se obtuvo un porcentaje de bioconversión muy bajo pero el *ee* para el alcohol *R* fue del 90%. La bioconversión llevada a cabo en presencia de cicloheximida mostró un perfil de reducción similar al obtenido en el ***ensayo e***, aunque se obtuvo un porcentaje de conversión del 20%. En el ensayo con los dos inhibidores microbianos juntos no se obtuvo reducción de la 2-acetilpiridina. El conjunto de resultados obtenidos indicaría que la bio-reducción, posiblemente, fue llevada a cabo principalmente por los microorganismos endófitos.



Gráfica 22. Bio-reducción de 2-acetilpiridina mediante plántulas de rabanito a una concentración de sustrato 2.5mM y 7 días de reacción.

Ensayos con el sustrato acetofenona

El estudio de las bio-reducciones de acetofenona que fueron realizadas mediante raíces frescas de rabanito y sus endófitos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biocatálisis y Biotrasnformaciones de Facultad de Química, UdelaR. Mientras que los estudios correspodientes a las bio-reducciones de acetofenona en las que se emplearon plántulas y RT fueron llevadas a cabo por la estudiante de doctorado Cynthia Magallanes Noguera en el Departamento de Química de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis, Argentina.

Raíces frescas de rabanito (R. sativus)

Aislamiento y recuento de microorganismos endófitos viables a partir de los ensayos a-d con raíz de rabanito frente al sustrato acetofenona.

Se aislaron bacterias endófitas de raíces frescas de rabanito en presencia del sustrato **9**, únicamente, en el ***ensayo a***. En la tabla 21 se muestran la cantidad de cepas que se obtuvieron en el aislamiento, como fueron denominadas y el recuento de microorganismos endófitos viables presentes a las 96 horas de bio-reducción de **9**.

Tabla 21. Aislamientos y recuentos de microorganismos endófitos viables a partir de raíces frescas de rabanito.

Aislamientos	microorganismos: nomenclatura asignada	96 hrs.; ufc/mL
Ensayo a	cepas: Aix1-7	>2,5 x 10^8 (estimado)
Ensayo b	0	<100
Ensayo c	0	<100
Ensayo d	0	<100
Blanco rabanito	ND	>2,5 x 10^8 (estimado)

ND. No determinado

Bio-reducción de acetofenona mediante las cepas endófitas aisladas en raíz de rabanito.

Se llevó a cabo la determinación de actividad reductasa de las cepas bacterianas aisladas en el ***ensayo a*** frente al compuesto **9**. No se observó bio-reducción de acetofenona con ninguna de las bacterias endófitas. Este resultado no es sorprendente pues, como se menciona en el párrafo siguiente, cuando se analizó la bio-reducción de acetofenona por medio de la raíz fresca de rabanito no se obtuvo un porcentaje de conversión significativo.

Biotransformaciones de acetofenona para evaluar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por raíces frescas de rabanito (R. sativus).

Al realizarse los ***ensayos a-d***, orientados a evaluar la participación de microorganismos endófitos en la bio-reducción, se obtuvo bioconversión únicamente en el ensayo sin inhibidores microbianos (***ensayo a***), aunque en un porcentaje muy bajo (6% de conversión). Por otra parte, la estereoselectividad hacia el (*R*)-1-feniletanol (compuesto anti-Prelog, ver figura 37) fue también baja (*ee*=33%). La adición de inhibidores microbianos detuvo completamente la bio-reducción. A pesar de que estos resultados difieren de los obtenidos con RT de rabanito cuando se utilizó este sustrato, están de acuerdo con los resultados que están descritos en la literatura (Bruni, Fantin et al. 2002; Andrade, Utsunomiya et al. 2006). Bruni y colaboradores describieron la reducción de acetofenona con varios vegetales, incluyendo *Daucus carota* y *Foeniculum vulgare* sin embargo no obtuvieron reducción de acetofenona mediante raíces frescas de *Raphanus sativus* (Bruni, Fantin et al. 2002). Andrade y colaboradores llevaron a cabo un estudio sistemático de la reducción de acetofenona y derivados de este compuesto a través de vegetales frescos. De todos los vegetales ensayados los que presentaron mejor actividad fueron *Arracacia xanthorrhiza* y *Beta vulgaris*. Las raíces frescas de *R. sativus* rindieron un 10% de conversión a los 3 días de reacción con un *ee* para el alcohol *S* del 15%. Cuando detuvieron la reacción a los 6 días observaron que el porcentaje de conversión fue menor y el exceso enantiómerico cambió a 79% para el alcohol *R*. Los autores demostraron que este resultado se debió a una bio-oxidación selectiva del (*S*)-1-feniletanol (Andrade, Utsunomiya et al. 2006). Esta explicación podría aplicarse a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis con la raíz fresca de rabanito así como con sus microorganismos endófitos frente a la acetofenona.

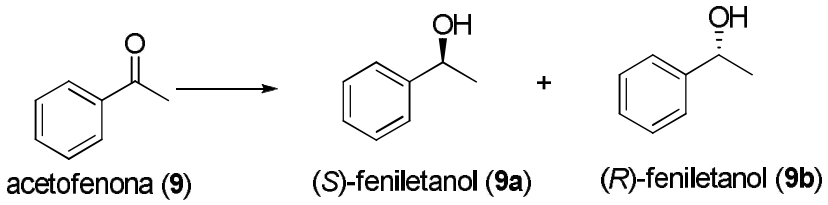


Figura 37. Acetofenona (**9**) y los posibles alcoholes obtenidos de su reducción.

Plántulas de rabanito (R. sativus)

Aislamiento e identificación de microorganismos endófitos a partir plántulas rabanito en los ensayos con presión selectiva frente al sustrato acetofenona.

Se llevó a cabo el estudio de la bio-reducción del sustrato acetofenona (**9**) mediante los ***ensayos a-e*** utilizando plántulas de rabanito germinadas *in vitro*. Se aislaron dos cepas bacterianas endófitas de los ensayos sin inhibidores microbianos denominadas CM14 y CM15 y un hongo filamentoso denominado CM16 del ensayo con cicloheximida.

Identificación de las bacterias endófitas CM14 y CM15 de plántulas de rabanito.

Morfología macro y microscópica.

Las características macroscópicas de las colonias se observaron a las 24 horas de crecimiento en placas de TSA. La coloración de las colonias de CM14 fue rosada y con una textura cremosa y las colonias de CM15 fueron de color blanco y de superficie rugosa.

Posteriormente, se evaluaron las características microscópicas de las cepas bacterianas por la tinción de Gram. Se detectaron bacilos Gram positivos para la cepa CM15 mientras que los bacilos más cortos observados para la cepa CM14 dieron negativa la tinción.

Análisis filogenético.

Se llevó a cabo la identificación de las bacterias endófitas mediante la comparación de las secuencias de los genes del ARN ribosomal 16S con respecto a secuencias relacionadas en la base de datos del GenBank usando BLAST (National Center for Biotechnology Information) (Altschul, Gish et al. 1990). De esta manera se identificó la cepa CM14 como *Roseomonas mucosa* y la cepa CM15 como *Bacillus megaterium*.

Identificación del hongo endófito CM16 de plántulas de rabanito.

Morfología macro y microscópica.

Las características macroscópicas del hongo filamentoso CM16 se observaron a los 5 días de cultivo en placa en PDA. Se observaron colonias de color blanco que esporularon de color verde-azul verdosa. La superficie de las colonias fue aterciopelada. El examen microscópico dejó ver la característica fundamental del género *Penicillium*, que se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides.

Análisis filogenético.

La cepa CM16 fue identificada como *Penicillium brevicompactum* mostrando 99. 5 de identidad con la cepa KUC1628-1 con 100% de cobertura entre la secuencia de CM16 y la del ITS1-5.8rDNA-ITS2 de *P. brevicompactum* strain KUC1628-1, con 100% de identidad (718/718) y ningún gap = 0/718 (0%).

Determinación de la capacidad biocatalítica frente al sustrato acetofenona de los microorganismos endófitos aislados.

Bio-reducción de acetofenona mediante cepas bacterianas endófitas

El monitoreo de la reacción por cromatografía en capa fina (TLC) a las 24 horas evidenció la presencia de 1-feniletanol en la bio-reducción mediada por la cepa endófita aislada *Bacillus megaterium* quedando sustrato sin biotransformar. Por lo tanto, se decidió extraer el medio de reacción a las 48 hs. La cepa *R. mucosa* sp. nov. no mostró actividad de alcohol deshidrogenasa sobre acetofenona.

A través del análisis por cromatografía gaseosa quiral se determinó que *B. megaterium* rindió el alcohol anti-Prelog (*R*)-1-feniletanol (**9b**) con 90 % *ee* y en un porcentaje de conversión de 30%.

El resultado obtenido con esta cepa endófita es sumamente interesante puesto que la mayor parte de las biotransformaciones de acetofenona que están descritas en la literatura mediante el empleo de células enteras refieren a la obtención del (*S*)-1-feniletanol como

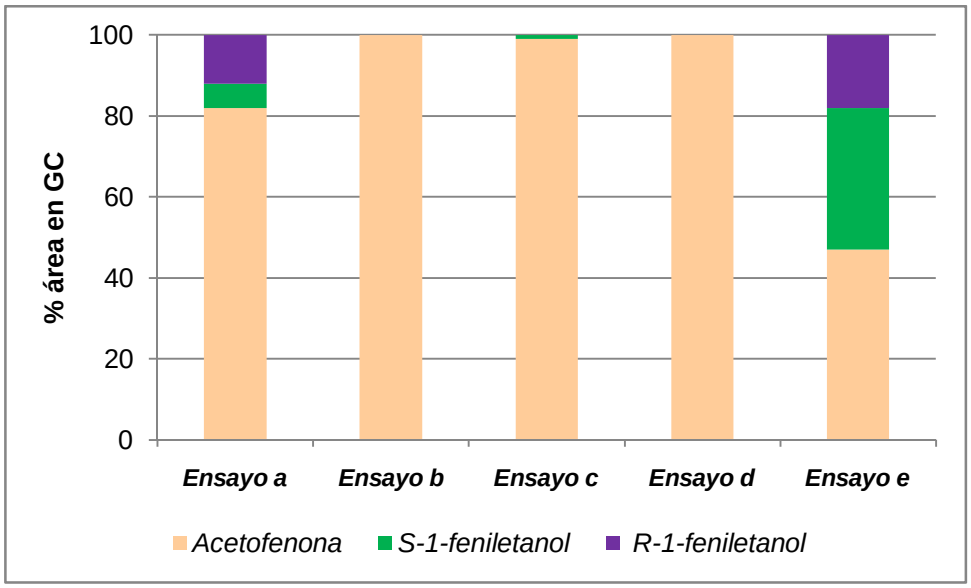
compuesto mayoritario. Por tanto este nuevo biocatalizador puede ser útil para llevar a cabo reducciones de cetonas proquirales rindiendo el alcohol anti-Prelog.

Bio-reducción de acetofenona mediante la cepa fúngica endófita

La cepa endófita *Penicillium brevicompactum* redujo el sustrato en estudio rindiendo 15% del alcohol (*S*)-1-feniletanol (**9a**) con 40 % *ee* a los 7 días de bio-reducción. El bajo exceso enantiomérico evidencia la presencia de reductasas con diferente estereoselectividad, o con baja discriminación frente a este sustrato. Esta cepa constituye también una fuente de potenciales biocatalizadores con actividad anti-Prelog.

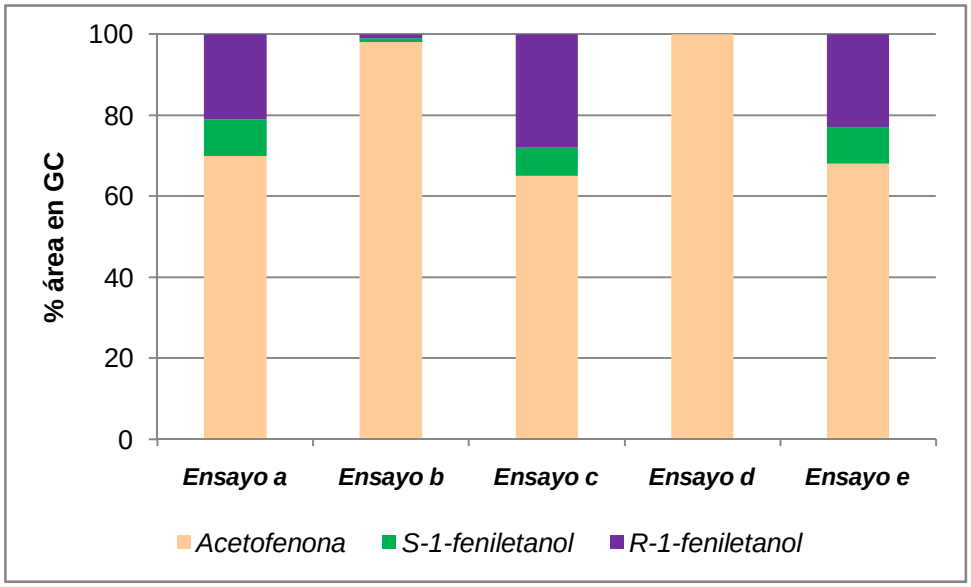
Biotransformaciones de acetofenona para evaluar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por plántulas germinadas in vitro de rabanito (R. sativus).

Se realizó el estudio de la bio-reducción de acetofenona (**9**) mediante plántulas de rabanito en los ***ensayos a-e***. En las reacciones se empleó una concentración de sustrato 10 mM y se llevaron a cabo durante 96 horas. En estas condiciones se observó bio-reducción únicamente en los ensayos sin inhibidores, obteniendo el mayor porcentaje de conversión en el ensayo con las plántulas sin moler (***ensayo e***). En este ensayo se obtuvo el alcohol *S* mayoritario frente al *R* con un *ee*=32%. En la gráfica 23 se muestran los resultados obtenidos en estas bio-reducciones.



Gráfica 23. Resultados obtenidos de la bio-reducción de acetofenona (**9**) mediante plántulas de rabanito a una concentración de sustrato de 10mM y 96 horas de reacción.

Se decidió trabajar con las condiciones habituales de uso de plántulas cuando se utilizan como biocatalizadores (Matsuo, Kawabe et al. 2008). Para ello se ensayó una concentración de sustrato de 2.5mM y la reacción se llevo a cabo durante 7 días. En la gráfica 24 se muestran los resultados obtenidos en estos ensayos. Se observó que la adición del inhibidores bacteriano afectó fuertemente la bio-reducción de **9**. Por otro lado, la adición de una menor concentración del sustrato modificó la estereoselección de la reducción ya que en todos los casos el alcohol mayoritario obtenido fue el (*R*)-1-feniletanol (**9b**) frente al alcohol *S*.



Gráfica 24. Resultados obtenidos de la bio-reducción de acetofenona (**9**) mediante plántulas de rabanito a una concentración de sustrato de 2.5mM y 7 días de reacción.

En estas condiciones se obtuvo un 30% de conversión en los ensayos sin inhibidores microbianos (ensayos a y e) con un *ee*=40% para el alcohol *R*. La adición de cloranfenicol afectó fuertemente la biotransformación ya que se obtuvo únicamente un 2% de conversión hacia 1-feniletanol racémico. Por el contrario, la adición de cicloheximida favoreció la producción del enantiómero anti-Prelog y, a su vez, se obtuvo un porcentaje de conversión mayor.

Los tres microorganismos endófitos aislados, *Bacillus megaterium, Roseomonas mucosa* y *Penicillium brevicompactum* fueron recuperados de estos sistemas. Cuando se llevó a cabo la bio-reducción de acetofenona con el hongo filamentoso endófito se observó que rindió una esteropreferencia opuesta a la obtenida con las plántulas germinadas *in vitro*. Este resultado estaría indicando que *Penicillium brevicompactum* no tuvo una gran incidencia en la bio-reducción de acetofenona cuando se realizó el ensayo con las plántulas. Sin embargo, la cepa *B. megaterium* rindió como compuesto mayoritario el alcohol *R*, posiblemente esta cepa tuvo una incidencia importante en la bio-reducción cuando se ensayo con las plántulas como agente biocatalizador.

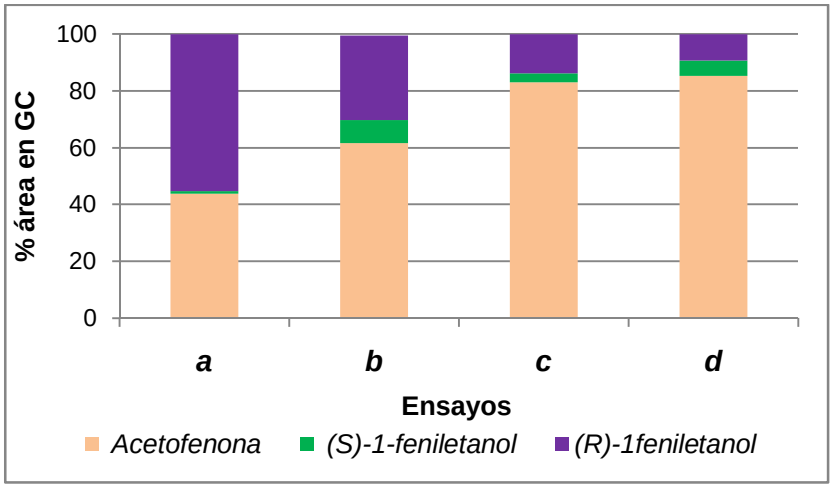
Raíces transformadas de rabanito (R. sativus)

Se llevó a cabo el estudio de la bio-reducción del compuesto acetofenona (**9**) mediante raíces transformadas de rabanito. Debido a que anteriormente se comprobó que la adición del sustrato acetofenona (**9)** a una concentración 10mM afectó drásticamente la bioconversión de la misma (ver punto bio-reducción de α-etilacetoacetato de etilo (**72**) mediante RT) se decidió trabajar con las condiciones que se utilizan habitualmente cuando se ensayan estos biocatalizadores. Por tanto se utilizó una concentración de sustrato de 2.5 mM y un tiempo de reacción de 7 días.

Por otra parte, se evaluó si la molienda del material vegetal afectó la conversión del compuesto **9** en los ensayos realizados (***a-d***) (ver gráficas 25 y 26).

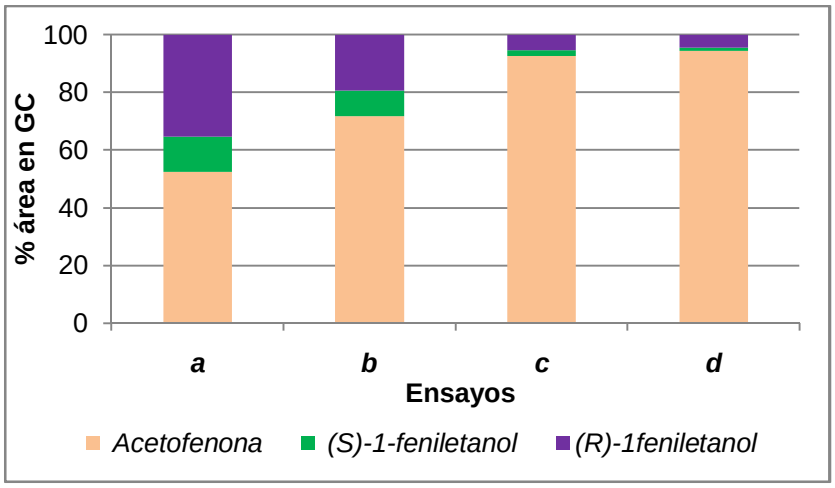
En ninguno de los ensayos realizados se recuperaron microorganismos endófitos.

En la gráfica 25 se muestran los porcentajes obtenidos en las bioconversiones empleando raíces transformadas sin moler. En el ***ensayo a*** fue en el que se obtuvo mayor porcentaje de conversión y un *ee* del 98% para el alcohol *R*. La adición de inhibidores en estos ensayos produjo una disminución en el porcentaje de conversión, por otro lado, también se observó que la enantioselectividad en estos ensayos se vió afectada. En todos los casos la bio-reducción del compuesto **9** rindió el (*R)*-1-feniletanol como alcohol mayoritario.



Gráfica 25. Bioconversión de acetofenona (**9**) mediante raíces transformadas sin moler de rabanito.

Cuando se utilizaron las raíces transformadas molidas se observó que en el ***ensayo a***, si bien el porcentaje fue similar al alcanzado cuando se utilizaron las raíces transformadas intactas, el porcentaje de exceso enantiomérico disminuyó. Con respecto a los ensayos adicionados con inhibidores microbianos (***ensayos b-d***) se mantuvo el mismo perfil de conversión que con las raíces transformadas sin moler. Es decir, en este experimento tanto el cloranfenicol como la cicloheximida afectaron notoriamente la bio-reducción de **9**. Estos resultados se muestran en la gráfica 26.



Gráfica 26. Bio-reducción de acetofenona (**9**) mediante raíces transformadas molidas de rabanito.

Si bien no se pudieron aislar microorganismos endófitos a partir de los ensayos con RT no se puede afirmar que estos tejidos vegetales sean axénicos. Para poder afirmar esto se debieron realizar otros estudios, como por ejemplo el análisis de los tejidos vegetales

mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) o análisis moleculares independientes de cultivo que implique la extracción de ADN microbiano y un análisis de los genes de la posible comunidad endófita. Recientemente de Almeida y colaboradores detectaron microorganismos endófitos en tejidos vegetales de *Bactris gasipaes* que se consideraban axénicos (de Almeida, Andreote et al. 2009). Estos investigadores llevaron a cabo el aislamiento de microorganismos endófitos mediante técnicas de cultivo tradicional, empleando los medios TSA, LB y BG-11 durante un periodo de 6 meses. Únicamente pudieron recuperar cianobacterias en el medio BG-11 a los 5 meses de incubación. Sin embargo, cuando realizaron análisis de microscopía SEM y TEM de los tejidos vegetales así como la extracción de ADN microbiano, la amplificación del gen del ARNr 16S, y el estudio filogenético de las secuencias obtenidas puedieron confirmar la presencia de endófitos en los tejidos vegetales estudiados. Posterior a este trabajo se publicaron otras investigaciones referentes al estudio de microorganismos endófitos en cultivos vegetales propagados en laboratorio (Abreu-Tarazi, Navarrete et al. 2010; Esposito-Polesi 2011; Lucero, Unc et al. 2011).

Por otra parte hay que tener presente que la capacidad de recuperar microorganismos en el laboratorio es muy limitada (Torsvik and Øvreås 2002; Torsvik, Ovreas et al. 2002; Curtis and Sloan 2004). En nuestro trabajo los ensayos de aislamientos se realizaron en tres medios de cultivo diferentes (TSA, PDA, medio vegetal) con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de endófitos posibles, sin embargo el tiempo de incubación de estos aislamientos fue muy corto comparado con lo descrito en la literatura cuando se aíslan microorganismos endófitos de especies vegetales cultivadas en laboratorio (de Almeida, Andreote et al. 2009). Es posible que mediante la metodología seguida en este trabajo no se pudieran recuperar endófitos que tuviesen una estrecha relación con su hospedero.

Zanahoria (Daucus carota)

En el año 2006, nuestro grupo de trabajo comenzó a estudiar la incidencia de los microorganismos endófitos cuando se utilizaba raíz fresca de zanahoria frente a la reducción de β-cetoésteres (Rodríguez, Barton et al. 2007; Rodríguez, Barton et al. 2007; Rodríguez, Coronel et al. 2010). Este trabajo fue el que dio inicio al proyecto de la presente tesis de Doctorado.

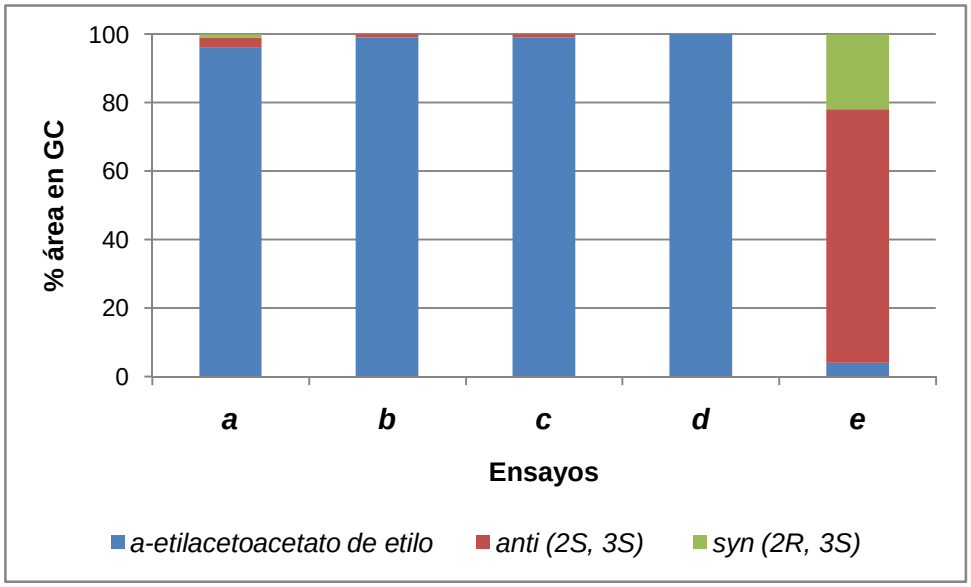
En el marco de la pasantía realizada con el grupo argentino que dirige la Dra. Marcela Kurina-Sanz, además de trabajarse con la especie vegetal rabanito, se trabajó con *D. carota* en la forma de células indiferenciadas (callos) para el estudio de la bio-reducción de los sustratos α–etilacetoacetato de etilo (**72**) y 2-acetilpiridina (**44**).

En paralelo a los ensayos de bio-reducción mediante callos de zanahoria, se llevaron a cabo experimentos pertinentes a reunir datos que permitieran evaluar si los microorganismos endófitos participaron en las bio-reducciones cuando se empleó el material vegetal como biocatalizador. A su vez, estas bio-reducciones, fueron utilizadas para el aislamiento de microorganismos endófitos.

Bio-reducción de α-etilacetoacetato de etilo

Al igual que en los experimentos realizados con plántulas y RT de rabanito (*R. sativus*), se llevaron a cabo cinco ensayos diferentes (**a-e**). Los ***ensayos a-d*** se realizaron utilizando el material vegetal molido con mortero con el propósito de aislar la mayor cantidad de microorganismos endófitos posibles. En el ***ensayo e*** se emplearon las células intactas para poder evaluar si la rotura del material vegetal tenía alguna incidencia en el rendimiento de la bioconversión. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

De estos experimentos se pudo observar que las bio-reducciones fueron fuertemente afectadas por la rotura del material vegetal (ver gráfica 27), ya que en los ensayos *a-d* la bioconversión fue mínima o nula. A su vez, en el ensayo *e* se obtuvo muy buena conversión del sustrato **72** rindiendo los alcoholes *syn* (2*R*, 3*S*) y *anti* (2*S*, 3*S*). Las células indiferenciadas de zanahoria presentaron actividad alcohol deshidrogenasa Prelog en lo que se refiere a la reducción del β-cetoéster **72.** Este resultado es coincidente con lo observado con el empleo de raíz de zanahoria en la reducción de **72** (Rodríguez, Reyes et al. 2011) y de los compuestos relacionados a **72** como ser α-metil acetoacetato de etilo (Rodríguez, Reyes et al. 2011), α-propargil acetoacetato de etilo (Rodríguez, Barton et al. 2007) y α-alil acetoacetato de etilo (Rodríguez, Barton et al. 2007) .

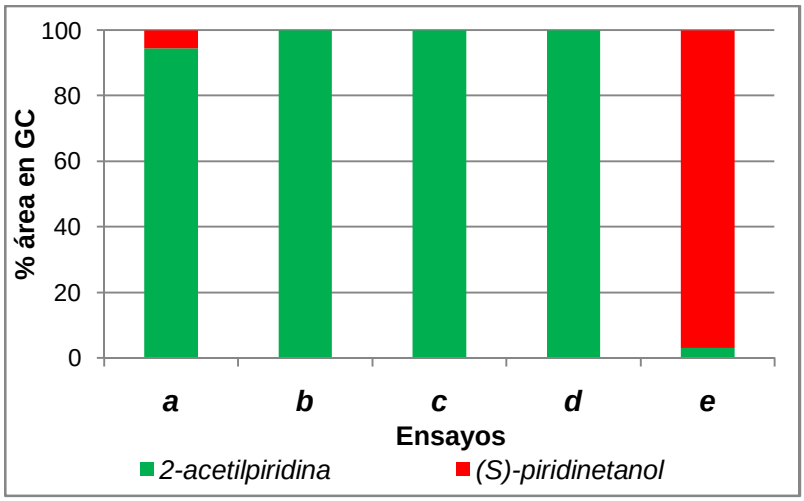


Gráfica 27. Bio-reducción de α-etilacetoacetato de etilo mediante células indiferenciadas de zanahoria en los ensayos *a-e* a las 96 horas de reacción.

Bio-reducción de 2-acetilpiridina

Los ensayos de bio-reducción del compuesto **44** fueron realizados de igual forma que los llevados a cabo para el compuesto **72**. En la gráfica 28 se muestran los resultados obtenidos referidos al porcentaje de área en GC de los compuestos presentes a las 96 horas en cada uno de los ensayos de bio-reducción. En estos ensayos se pudo determinar que de igual forma a la que sucedió para el sustrato **72**, la rotura del material vegetal afectó significativamente la bioconversión. En los ensayos con las células indiferenciadas intactas de *D. carota* se obtuvo un porcentaje de conversión superior al 96%, mientras que en los ensayos con las células molidas el porcentaje de bioconversión no superó el 8% en los experimentos donde no hubo adición de inhibidores microbianos. En los experimentos adicionados con los inhibidores microbianos el porcentaje de conversión fue nulo.

Las bio-reducciones del compuesto **44**, llevadas a cabo por medio de los callos de *D. carota* siguieron la regla de Prelog rindiendo el (*S*)-2-piridinetanol.



Gráfica 28. Bio-reducción de 2-acetilpiridina mediante células indiferenciadas de zanahoria.

En los ensayos con células indiferenciadas de zanahoria, al igual que ocurrió con las raíces transformadas de *R. sativus*, no se logró recuperar microorganismos endófitos con la metodología aplicada. Por otra parte, el efecto negativo que tuvo la molienda de los cultivos celulares de zanahoria sobre las bio-reducciones de los sustratos **72** y **44** no permitió establecer una relación entre el agregado de inhibidores microbianos y las bio-reducciones sin la adición de los mismos. En este estudio, por tanto, no se pudieron reunir datos que nos permitieran evaluar la incidencia de los microorganismos endófitos sobre la reducción de **72** y **44** cuando empleamos células indiferenciadas de zanahoria como biocatalizadores.

Sin embargo, se pudo comprobar que las enzimas alcohol deshidrogenasas de células indiferenciadas de zanahoria implicadas en la reducción de los compuestos **72** y **44** actúan según la regla de Prelog lo cual está de acuerdo con lo descrito para este vegetal cuando se lo utiliza para la reducción de grupos carbonilos en sus formas de raíces frescas (Bruni, Fantin et al. 2002; Blanchard and van de Weghe 2006; Aldabalde, Arcia et al. 2007; Liu, Wang et al. 2012), células inmovilizadas (Akakabe and Naoshima 1994) y raíces transformadas (Caron, Coughlan et al. 2005).

Bio-reducción de cetonas proquirales para la obtención de compuestos con potencial utilidad en síntesis orgánica mediante células enteras

Biotransformación estereoselectiva de α-alquil-β-cetoésteres mediante bacterias y levaduras endófitas

Con la finalidad de evaluar el potencial biocatalítico en microorganismos endófitos, se seleccionaron las cepas *Enterobacter agglomerans* C8, *Leuconostoc* sp. Z2 y *Wickerhamomyces anomalus* Z1 aisladas en la presente tesis así como las cepas *Pseudomonas* sp. EB, *Pichia* sp. PDA (Rodríguez, Barton et al. 2007) , *Rhodotorula* sp. Ro y *Aureobasidium pullulans* CQA aisladas en trabajos previos para realizar el estudio de la biotransformación de los compuestos α-etil acetoacetato de etilo (**72**) y α-metil acetoacetato de etilo (**78**).

Se utilizaron los sustratos modelo α-alquil-β-cetoésteres para evaluar las actividades reductasas. La reducción de los compuestos α-alquil-β-cetoésteres rinden hidroxiésteres ópticamente activos que presentan dos estereocentros contiguos. La presencia de estos estereocentros contiguos permitieron evaluar la enantio-y diasteroselectividad de las cepas endófitas en un único ensayo.

En la tabla 22 se muestran las cepas endófitas utilizadas en las reducciones de α-etil acetoacetato de etilo (**72**) y α-metil acetoacetato de etilo (**78**) y la fuente de su aislamiento.

Tabla 22. Cepas endófitas utilizadas en la bio-reducción de **72** y **78** y los vegetales de donde se aislaron.

Vegetal empleado para el aislamiento	**Cepa endófita aislada**
Raíz de zanahoria (*Daucus carota*)	*Pseudomonas* sp. EB
Hojas de ceibo (Erythrina crista-galli)	*Enterobacter agglomerans* C8
Fruto de zapallo (*Curcubita maxima*)	*Leuconostoc* sp. Z2
Raíz de zanahoria (*Daucus carota*)	*Pichia* sp. PDA
Raíz de zanahoria (*Daucus carota*)	*Rhodotorula* sp. Ro
Fruto de quinoto (Fortunella margarita)	*Aureobasidium pullulans* CQA
Fruto de zapallo (*Curcubita maxima*)	*Wickerhamomyces anomalus* Z1

En la tabla 23 se muestran los porcentajes de bioconversión alcanzados con las cepas de levaduras ensayadas así como los alcoholes obtenidos. Se llevó a cabo la biotransformación de los compuestos **72** y **78** mediante raíz de zanahoria *(Daucus carota*) para poder comparar los resultados obtenidos con los microorganismos endófitos respecto al biocatalizador vegetal. De igual forma, se incorporó en la tabla resultados que están descritos en la literatura respecto a la a la biotransformación de ambos sustratos con la levadura de panificación *S. cerevisiae* (Kawai, Tsujimoto et al. 1994; Faber 2011).

Tabla 23. Bio-reducción de α-metil acetoacetato de etilo (**78**) y α-etil acetoacetato de etilo (**72**) mediante cepas de levaduras.

Entrada	Biocatalizador	Sustrato	% conversión	t (h)	*anti* (2*S*, 3*S*) (% *ee*)	*syn* (2*R*, 3*S*) (%*ee*)	% de
1	*Daucus carota*	78	95	48	62 (>98)	33 (>98)	31
2	*Daucus carota*	72	90	48	54 (>98)	36 (>98)	20
3	*S. cereviseae*	78	>99	*a*	17 (>98)	83 (>98)	66
4	*S. cereviseae*	72	>99	*b*	34 (>98)	66 (>98)	32
5	*Pichia* sp. PDA	78	>99	4	86 (>98)	14 (>98)	72
6	*Pichia* sp. PDA	72	>99	4	90 (>98)	10 (>98)	80
7	*Rhodotorula* sp. Ro	78	>99	4	23 (>98)	77 (>98)	54
8	*Rhodotorula* sp. Ro	72	>99	4	21 (>98)	79 (>98)	58
9	*A. pullulans* CQA	78	>99	4	94 (>98)	6 (>98)	88
10	*A. pullulans* CQA	72	>99	4	73 (>98)	27 (>98)	46
11	*W. anomalus* Z1	78	86	4	57 (>98)	29 (>98)	32
12	*W. anomalus* Z1	72	90	4	68 (>98)	22 (>98)	51

a: (Faber 2011), *b*: (Kawai, Tsujimoto et al. 1994)

En la tabla 24 se muestran los resultados obtenidos en las biotransformaciones de **78** y **72** mediante las bacterias endófitas ensayadas.

Tabla 24. Bio-reducción de α-metil acetoacetato de etilo (**78**) y α-etil acetoacetato de etilo (**72**) mediante las cepas endófitas bacterianas.

Entrada	Biocatalizador	Sustrato	% conversión	t (h)	*anti* (2*S*, 3*S*) (% *ee*)	*syn* (2*R*, 3*S*) (%*ee*)	% de
1	*Daucus carota*	78	95	48	62 (>98)	33 (>98)	31
2	*Daucus carota*	72	90	48	54 (>98)	36 (>98)	20
3	*Pseudomonas* sp. EB	78	>11	48	6 (>98)	5 (>98)	0
4	*Pseudomonas* sp. EB	72	25	48	9 (>98)	16 (>98)	28
5	*E. agglomerans* C8	78	50	20	5 (>98)	45 (>98)	80
6	*E. agglomerans* C8	72	89	20	9 (>98)	80 (>98)	79
7	*Leuconostoc* sp. Z2	78	11	48	9 (>98)	2 (>98)	63
8	*Leuconostoc* sp. Z2	72	11	48	7 (>98)	4 (>98)	27

Las siete cepas endófias presentaron actividad reductasa y siguieron la regla de Prelog en la reducción de los compuesos **72** y **78** (Figura 38). Con las cepas de levadura se obuvieron porcenajes de bionversión atlos en tiempos de reacción cortos (4 horas) con excelentes excesos enantioméricos y con muy buena diasteroselecividad (Tabla 23).

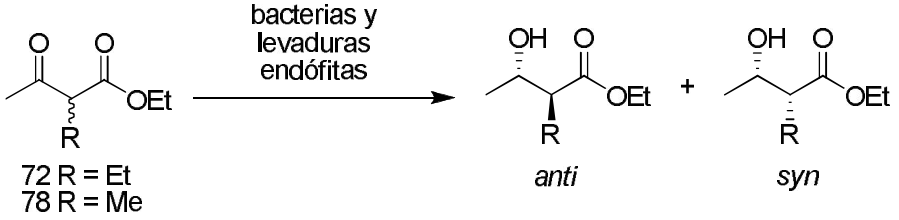


Figura 38. Bio-reducción de α-etil acetoacetato de etilo (**72**) y α-metil acetoacetato de etilo (**78**) mediante microorganismos endófitos.

La cepa de levadura *Rhodotorula* sp. Ro rindió el alcohol *syn* (2*R*, 3*S*) como producto mayoritario en la bioconversión de ambos sustratos, de forma similar a la biotransformación de los compuestos **72** y **78** cuando se utilizó la levadura de panificación *S. cerevisia*e (entradas 3 y 4 de la tabla 23) pero con la cepa endófita de zanahoria (entradas 7 y 8 de la tabla 23) se obtuvo un mejor exceso diasteromérico en la bioreducción de **72**.

Ramos y colaboradores presentaron resultados obtenidos de la bio-reducción de **78** mediante dos cepas de levadura del género *Rhodotorula*. Estas bio-reducciones procedieron de igual forma a la realizada con la cepa endófita de zanahoria *Rhodotorula* sp. Ro. Con las tres cepas de *Rhodotorula* se obtuvo el alcohol *syn* (2*R*, 3*S*), sin embargo con la cepa aislada de raíz de zanahoria se obtuvo el alcohol con un excelente *ee* mientras que las cepas *Rhodotorula minuta* y *Rhodotorula rubra* rindieron el alcohol con un 80% de *ee* (Ramos, Ribeiro et al. 2009).

Con las otras levaduras endófitas se obtuvo el alcohol *anti* (2*S*, 3*S*), al igual que cuando se empleó raíz de zanahoria como biocatalizador pero con una mejor diasteroselectividad que la obtenida con el vegetal. De las cepas de levadura endófitas, *Pichia* sp. PDA resultó ser la mejor candidata para la bio-reducción de los compuestos en estudio dado que con ella se obtuvo el alcohol *anti* (2*S*, 3*S*) con una muy buena diasteroselectividad y un excelente exceso enantiomérico para los compuestos **72** y **78**. Los resultados obtenidos con esta levadura son comparables con los mejores resultados descritos en la literatura para la biotransformación del compuesto α-metil acetoacetato de etilo (**78**) mediante levaduras. Ramos y colaboradores describieron la bio-reducción de **78** mediante una cepa de *Candida* sp. En la bio-reducción obtuvieron el diaterómero *anti* (2*S*, 3*S*) con un 75% *de* y una excelente enantioselectividad. Sin embargo, describieron los resultados obtenidos de la bio-reducción de **78** mediante una cepa de *Pichia* sp. con la que obtuvieron el alcohol *syn* (2*R*, 3*S*) como producto mayoritario con un 78% *ee* y un 27% *de* (Ramos, Ribeiro et al. 2009).

A su vez, la cepa *Aureobasidium pullulans* CQA aislada de quinoto resultó ser, también, un muy buen biocatalizador para la reducción de **78** dado que con la misma se obtuvo el alcohol *anti* (2*S*, 3*S*) como producto mayoritario con un 88% *de* y un exceso enantiomérico >98% a las 4 horas de reacción. Resultados similares se obtuvieron con otra cepa de *A. pullulans* en un trabajo publicado por Ravía y colaboradores. Estos autores describieron la obtención del isómero *anti* (2*S*, 3*S*) con un 94% *de* y un excelente *ee* a las 24 horas de reacción (Ravía, Carrera et al. 2009).

Entre las bacterias endófitas estudiadas, la cepa *E. agglomerans* C8 rindió el alcohol *syn* (2*R*, 3*S*) como producto mayoritario en las bio-reducciones de **72** y **78** con una excelente enantioselectividad y un buen exceso diasteromérico (Tabla 24). Si se compara la bio-reducción de **72** y **78** mediante levaduras con respecto a los resultados obtenidos con la bacteria endófita de ceibo, se observa que *E. agglomerans* C8 presentó una mejor diastereoselectividad para la reducción de los sustratos en estudio.

De los resultados obtenidos en este estudio se pudo comprobar que las levaduras resultaron ser biocatalizadores útiles para la bio-reducción de compuestos α-alquil-β-cetoésteres. Este hecho sumado a las ventajas que implican el uso de levaduras como biocatalizadores, fácil manejo en el laboratorio y tiempo de reacción cortos, las convierten en reactivos útiles para la síntesis orgánica.

Por otro lado, en el presente trabajo se observó que el mejor biocatalizador para la obtención de los compuestos *syn* (2*R*, 3*S*)-α-alquil-β-hidroxiesteres resultó ser la bacteria endófita de ceibo *E. agglomerans* C8. Este fue un hallazgo interesante dado que son pocas las bacterias que presentan una actividad reductasa significativa. Maconi y Aragozzini realizaron el estudio de la bio-reducción de los compuestos acetofenona, acetoacetato de etilo y 2-pentanona mediante bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas. En estos estudios observaron que ninguna de las bacterias acido lácticas homofermentativas fueron capaces de reducir los sustratos ensayados. Mientras que de las especies heterofermentativas, tres cepas de *Lactobacillus fermentum* y una de *Leuconostoc paramesenteroides* redujeron 2-pentanona en un 91-100%. Tres cepas de *Lactobacillus fermentum* llevaron a cabo la reducción de acetofenona con un rendimiento del 100%. El sustrato acetoacetato de etilo fue reducido con un buen rendimiento únicamente mediante una cepa de *L. brevis* (Maconi and Aragozzini 1989).

Los resultados obtenidos de la biotransformación de α-etil acetoaceto de etilo (**72**) y α-metil acetoacetato de etilo (**78**) mediante microorganismos endófitos mostraron que los mismos representan una fuente potencial de biocatalizadores. Por otro lado se evidenció que para la obtención de los compuestos *anti* (2*S*, 3*S*)-α-alquil-β-hidroxiesteres resultó apropiado el uso de las levaduras endófitas *Pichia* sp. PDA y A. *pullulans* CQA mientras que para la obtención de los alcoholes *syn* (2*R*, 3*S*)-α-alquil-β-hidroxiésteres el mejor biocatalizador lo constituyó la bacteria endófita de ceibo *E. agglomerans* C8.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron publicados en *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (Rodríguez, Reyes et al. 2011) (en el anexo se adjunta esta publicación).

Biotransformación de cetonas heterocíclicas mediante levaduras endófitas de zanahoria (D. carota)

Continuando con la evaluación del potencial biocatalítico de los microorganismos endófitos, se trabajó con las levaduras endófitas de zanahoria *Pichia* sp. PDA y *Rhodotorula* sp. Ro. Se decidió profundizar en el estudio de la capacidad biocatalítica de estos microorganismos puesto que, como se describió en el punto anterior, los mismos resultaron ser muy buenos biocatalizadores en la reducción enantio-y diasteroselectiva de los compuestos α-alquil$-\beta$-cetoesteres. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, las levaduras resultaron ser un reactivo útil para llevar a cabo reacciones de síntesis orgánica dado que son de fácil manejo y las reacciones se llevan a cabo en periodos de tiempo cortos.

Se emplearon los sustratos 2-acetilpiridina (**44**), 3-acetilpiridina (**45**) y 4-acetilpiridina (**46**) para llevar a cabo el estudio de los sistemas biocatalíticos en las levaduras endófitas. Con estos sustratos se evaluó la incidencia de la posición del grupo carbonilo en el anillo piridínico con respecto al tiempo de bio-reducción. Algunos autores han postulado que en solución acuosa, donde se lleva a cabo la bio-reducción, la hidratación del nitrógeno en el anillo ejerce un impedimento estérico sobre el grupo carbonilo (Soni, Kaur et al. 2005; Yang, Xu et al. 2006; Swizdor, Janeczko et al. 2010). Swizdor y colaboradores evidenciaron esto al observar que la conversión completa del compuesto 4-acetilpiridina por medio del hongo filamentoso *Didymosphaeria igniaria* ocurrió en un día mientras que la bio-reducción de 3-acetilpiridina por medio de este biocatalizador transcurrió en tres días y la bio-reducción de 2-acetilpiridina insumió cinco días (Swizdor, Janeczko et al. 2010).

La levadura endófita de zanahoria, *Pichia* sp. PDA llevó a cabo la conversión completa del compuesto 4-acetilpiridina a (*S*)-4-piridinetanol en las primeras 24 horas de reacción (Tabla 25). Por otro lado, si bien la conversión de 2-acetilpiridina a (*S*)-2-piridinetanol por medio de este biocatalizador, se completó a las 48 horas, a las 24 horas se obtuvo un porcentaje de conversión del 88% (Tabla 25). La bio-reducción de 3-acetilpiridina fue del 97% a las 48 horas de reacción, siendo el porcentaje de conversión observado a las 24 horas del 48% (Tabla 25). Los resultados obtenidos en cuanto a los tiempos requeridos para llevar a cabo las bio-reducciones en el presente trabajo coinciden respecto a lo postulado por Swizdor y colaboradores para el compuesto 4-acetilpiridina. Sin embargo no fueron concordantes con respecto a los compuestos 2 y 3-acetilpiridina, siendo este último el que requirió más tiempo para su bio-reducción. Por otro lado, los resultados obtenidos mediante *Pichia* sp. PDA se ajustan a los resultados presentados por Yang y colaboradores en la bio-reducción de los compuestos 2-, 3- y 4-acetilpiridinas por medio del empleo de células en resposo de la levadura *Rhodotorula* sp. AS2.2241 (Yang, Xu et al. 2006). En su trabajo describieron que el compuesto 3-acetilpiridina se redujo más lentamente que los compuestos 2-, y 4-acetilpiridinas.Resultados similares fueron obtenidos mediante el uso de raíces frescas de zanahoria en el trabajo de Aldabalde y colaboradores, en él se describe que la bio-reducción del sustrato 3-acetilpiridina transcurre más lentamente y con un rendimiento menor en comparación a las bio-reducciones de los sustratos 2- y 4-acetilpiridina (Aldabalde, Arcia et al. 2007).

Tabla 25. Resultados obtenidos en las bio-reducciones de 2-, 3- y 4-acetilpiridina mediante la levadura endófita de zanahoria *Pichia* PDA en los diferentes tiempos evaluados.

Tiempo de reacción (hs)	% conversión 2-acetilpiridina	% conversión 3-acetilpiridina	% conversión 4-acetilpiridina
2	8	3	13
7	38	7	-
24	88	48	>98
48	>98	97	>98

Con respecto a la enantioselectividad de la levadura endófita *Pichia* sp. PDA en la bio-reducción de los sustratos ensayados, se observó que se comportó según la regla de Prelog para los compuestos 2- y 4-acetilpiridina, rindiendo únicamente los alcoholes con configuración *S*. Sin embargo, para la biotransformación del compuesto 3-acetilpiridina, a las 24 horas de reacción se obtuvo el alcohol *S* con un exceso enantiomérico del 76% por lo que el biocatalizador mostró una actividad anti-Prelog minoritaria. Estos resultados coinciden, parcialmente, con lo descrito por Swizdor y colaboradores, quienes obtuvieron el (*S*)-2-piridinetanol con un *ee* >99%, mientras que el (*S*)-3-piridinetanol lo obtuvieron con un *ee* del 57%, y el (*S*)-4-piridinetanol con un ee del 82% (Swizdor, Janeczko et al. 2010). Esta diferencia en la enantioselectividad se debió posiblemente a la presencia de más de una deshidrogenasa presente tanto en el hongo filamentoso *Didymosphaeria igniaria* como en la levadura endófita de zanahoria. Yang y colaboradores observaron que la levadura *Rhodotorula* sp. AS2.2241 no presentó la misma enantioselectividad en la bio-reducción del compuesto 4-acetilpiridina que la observada para la 2- y 3-acetilpiridinas con los cuales obtuvieron los (*S*)-alcoholes correspondientes con un *ee*>99% (Yang, Xu et al. 2006). En este trabajo los autores discuten la posibilidad de la coexistencia de más de una deshidrogenasa en *Rhodotorula* sp. AS2.2241 para la reducción de 4-acetilpiridina con diferentes estereopreferencias. Observaron que una variación en la concentración de sustrato utilizado afectó la enantioselectividad en la bio-reducción de la 4-acetilpiridina, siendo una concentración 20 mM la adecuada para la obtención del (*S*)-4-piridinetanol con un *ee*>99%, mientras que el empleo de una concentración de sustrato cinco veces mayor llevó a una reducción en la enantioselectividad de la reacción. En general, la obtención de alcoholes ópticamente puros se ve potenciada mediante el uso de concentraciones bajas de sustrato cuando se utilizan levaduras para llevar a cabo reacciones de reducción (Faber 2011).

Si bien en las bio-reducciones llevadas a cabo mediante *Pichia* sp. PDA se empleó una concentración de sustrato de 10 mM, no se obtuvo el (*S*)-3-piridinetanol ópticamente puro. Se deberán ensayar concentraciones inferiores de sustrato con la finalidad de obtener el alcohol *S* como único producto en la bio-reducción.

En nuestro trabajo, las bio-reducciones de los compuestos 2-, 3- y 4-acetilpiridina mediante la cepa endófita *Rhodotorula* sp. Ro rindieron el alcohol (*S*) correspondiente con un ee >99%. Las biotransformaciones fueron superiores al 98% con los tres sustratos a las 24 horas de reacción. En la tabla 26 se comparan de los resultados obtenidos en las bio-reducciones de los tres sustratos en estudio a las 24 horas de reacción. Estos resultados indican que la cepa *Rhodotorula* sp. Ro constituye un buen biocatalizador para la bio-reducción de las

cetonas heterocíclicas puesto que rinde alcoholes enantiomericamente puros en tiempos de reacción cortos.

Tabla 26. Resultados obtenidos de las bio-reducciones de los compuestos **44**, **45** y **46** mediante las dos cepas endófitas de levaduras estudiadas a las 24 horas de reacción.

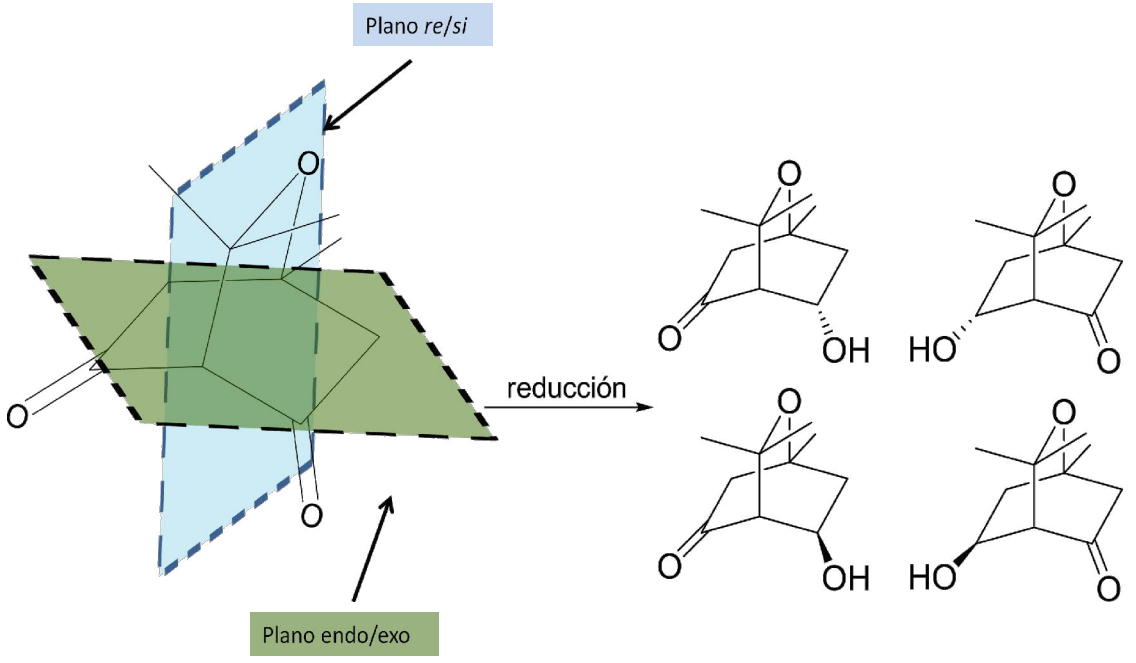
Cepa	(*S*)-2-piridinetanol; % *ee*	(*S*)-3-piridinetanol; % *ee*	(*S*)-4-piridinetanol; % *ee*
Pichia sp. PDA	88; >99	48; 76	>99; >99
Rhodotorula sp. Ro	>99; >99	>99; >99	>99; >99

Reducción de una dicetona terpénica aquiral mediante zapallo (Curcubita maxima) y microorganismo endófitos aislados de esta especie vegetal

A los efectos de demostrar como prueba de concepto el valor de utilizar la reducción con un vegetal como estrategia para identificar biocatalizadores microbianos endófitos adecuados para la reducción de un sustrato específico se realizó la reducción del compuesto 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**) mediante la especie vegetal *Curcubita maxima***.**

El compuesto 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**) es una dicetona terpénica obtenida mediante la oxidación química de 1,8-cineol con dicromato de potasio (de Boggiatto, de Heluani et al. 1987). Este compuesto se ha utilizado para la síntesis de derivados con actividad biológica (Silvestre, Cavaleiro et al. 1999; Luzzio and Duveau 2002). Estructuralmente se trata de un compuesto aquiral con un plano de simetría que pasa por el anillo de éter y divide la molécula en dos conteniendo cada mitad un grupo cetona (Figura 39).

El compuesto **73** es ideal para someterlo a una desimetrización por reducción estereoselectiva de un solo grupo carbonilo. En ese caso el reductor debe ser capaz de discriminar tanto entre las caras *endo* y *exo* como las como las caras *re* y s*i* del material de partida.



3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**)

Figura 39. Estructura de la dicetona **73** y los cuatro productos posibles de monoreducción.

Inicialmente se expuso el compuesto a una suspensión en agua de fragmentos de fruto de *C. maxima*. Se monitoreó el progreso de la reacción y se observaron dos productos. Asimismo, se intentó aislar microorganismos al final de la reacción y se recuperaron las cepas endófitas PRII83Z1 (levadura) y PRII83Z2 (bacteria). La baja diversidad de los microorganismos aislados es consistente con la acción antimicrobiana de los derivados del 1,8-cineol (Silvestre, Cavaleiro et al. 1999). Posteriormente se realizó la biotransformación con ambas cepas por separado. Se observó que la cepa de levadura dió lugar a uno de los

productos observados en la bio-reducción con el vegetal y la reacción con la cepa bacteriana dio lugar al otro.

En primer lugar se estudió el producto de biotransformación obtenido con la levadura. El mismo fue purificado mediante cromatografia líquida y se sometió a estudios mediante cromatografía gaseosa (GC) y espectrométricos (1H-RMN, HRMS, rotación óptica). Del estudio en GC se observó la formación de un único producto con tiempo de retención distinto del material de partida.

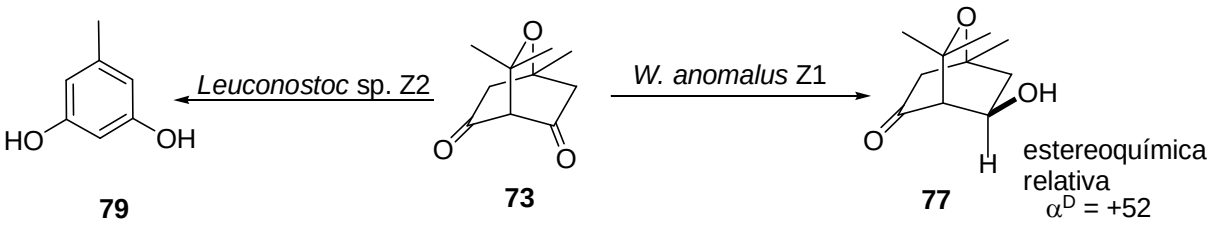


Figura 40. Biotransformación de 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**) mediante *C. maxima*; *Wickerhamomyces anomalus* Z1 y *Leuconostoc* sp. Z2.

El producto aislado analizado por HRMS (ESI-QTOF) dió lugar a un ión de masa 207.1002, consistente con la estructura **77** (Figura 40) (Calculado para $[M+Na]^+$ = 206.0992). El espectro de 1H-RMN (Figura 41) muestra las señales acordes para la reducción de un solo grupo carbonilo. En particular se destaca la señal a 4.24 ppm que corresponde al protón base del hidroxilo y las señales a 2.11 ppm y 2.26 ppm que se asignan a los protones geminales en posición α respecto al carbono que soporta el hidroxilo. Las constantes de acoplamiento de las tres señales así como el doblete en 2.37 ppm asignado al protón angular Hb son consistentes con la configuración del hidroxilo en la estructura **77**.

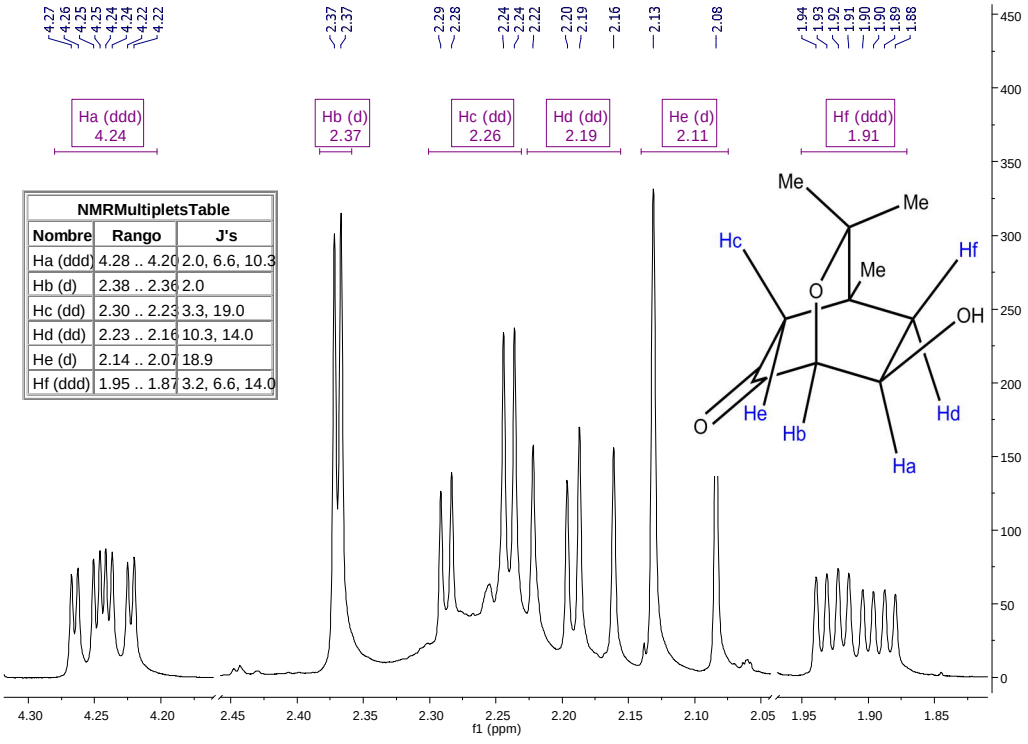


Figura 41. Señales claves en el espectro 1H RMN del alcohol **77.**

La presencia del acoplamiento "W" (3.2 Hz) entre los protones Hc y Hf es crucial para confirmar la estructura. Este acoplamiento se observa únicamente para protones ecuatoriales y pseudoecuatoriales por lo que permite asignar las señales de los correspondientes protones germinales Hd y He vinculados con Hc y Hf con constantes de 19.0 Hz y 14.0 Hz respectivamente. Una vez asignadas estas señales puede estudiarse el ángulo diedro que forman con la base del hidroxilo (Ha) y las correspondientes constantes de acoplamiento entre ellos. De esta manera se determinó la constante de acoplamiento de 6.6 Hz entre Hf y el protón Ha, mientras que Hd se acopla con Ha con una constante de 10.3 Hz. Los valores de *J* indican la orientación β del hidroxilo respecto al plano de la molécula. Estos valores y el de la pequeña constante de acoplamiento de 2.0 Hz entre Ha y el protón angular Hb coinciden con los valores calculados para los ángulos diedros de la estructura **77** (Figura 42 y Tabla 27)

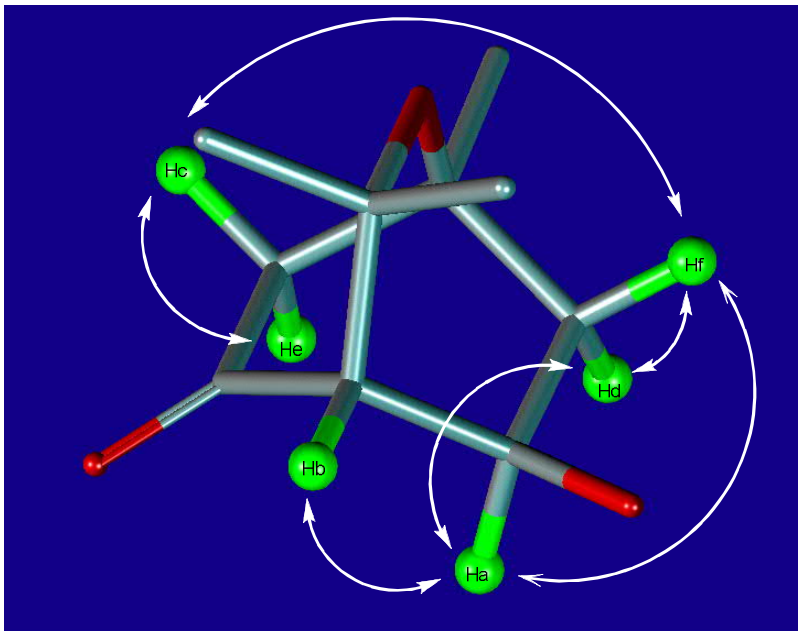


Figura 42. Constantes de acoplamiento determinadas para el espectro de 1H-RMN del compuesto **77**.

A los efectos de determinar la estereoquímica relativa de la reducción se realizó un estudio teórico del modelo molecular de la hidroxicetona y se calcularon las constantes de acoplamiento 1H-1H utilizando métodos semiempíricos (AM1, Chem-3D) y la ecuación de Altona (Mestre J). Los resultados obtenidos se ajustan dentro del error experimental a la estructura propuesta (Tabla 27).

Tabla 27. Constantes de acoplamiento y ángulos diedros.

Hx-Hy	Ángulo dihedro calc.	J calc (Hz)	J obs (Hz)	Dif (Hz)	Dif (%)
Ha-Hb	69,6º	2,2	2,0	-0,2	-11%
Ha-Hf	133,2º	6,9	6,6	-0,2	-3%
Ha-Hd	13,0º	9	10,3	1,4	14%

Se determinó la rotación óptica del producto **77** encontrandose un valor de +52º (c = 1.5, AcOEt). El valor hallado indica que la reacción fue estereoselectiva pero no suministra datos de pureza óptica o estereoquímica absoluta ya que no existe un valor descrito en la literatura para ninguno de los enantiómeros que pueda servir de comparación. Se concluye entonces que la reacción fue regioselectiva ya que reaccionó sobre un solo grupo carbonilo y estereselectiva ya que se formó unicamente el alcohol β. Con los datos disponibles no pueden obtenerse conclusiones sobre la enantioselectividad de la reacción.

En la biotransformación de **73** mediante la bacteria endófita PRII83Z2 se obtuvo un único compuesto que fue identificado mediante métodos espectrométricos (RMN y HRMS) como orcinol (**79**). Este compuesto se formó, posiblemente, mediante una reacción no-enzimática (Figura 43) como producto de la descomposición del compuesto **73** tal como se ha descrito previamente en un trabajo de De Boggiatto y colaboradores (de Boggiatto, de Heluani et al. 1987).

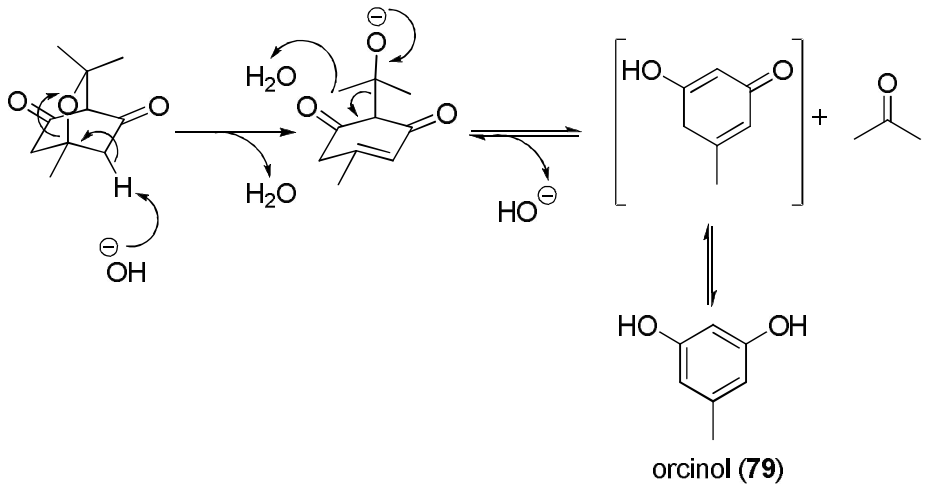


Figura 43. Compuesto aromático obtenido de una reacción no enzimática a partir del 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**).

Identificación de los microorganismos aislados de la pulpa de zapallo (C. maxima) en presencia del compuesto

Levadura endófita PRII83Z1

Características macroscópicas y microscópicas.

Las características macroscópicas de las colonias de la cepa PRII83Z1 se observaron a las 48 horas de crecimiento en placas de PDA. La coloración de las colonias fue blanca ligeramente amarronadas, su textura fue cremosa (mantecosa) y opaca. Estás características al igual que las microscópicas: células esféricas-elongadas que se presentaron aisladas, en pares o en grupos están de acuerdo a lo descrito para levaduras en el libro *The Yeasts: A Taxonomic Study* de Kurtzman y colaboradores (Kurtzman, Fell et al. 2011).

Análisis filogenético.

Para la identificación de la levadura PRII83Z1 se utilizaron las secuencias de sus regiones ITS1-5.8SrDNA-ITS2 y D1-D2 comparándolas con secuencias relacionadas en la base de

datos del GenBank usando BLAST (National Center for Biotechnology Information). De esta forma se identificó como *Wickerhamomyces anomalus.*

Bacteria endófita PRII83Z2

Se realizó tinción de Gram a la cepa PRII83Z2 y se observó que correspondió a una bacteria con morfología de cocos, Gram positiva.

Se llevó a cabo la identificación filogenética de esta cepa mediante la comparación de la secuencia del gen del ARN ribosomal *16S* con respecto a secuencias relacionadas en la base de datos del GenBank usando BLAST (National Center for Biotechnology Information). Mediante esta metodología se identificó la bacteria endófita de zapallo PRII83Z2 como *Leuconostoc* sp.

Biotransformación de 3,5-dioxo-1,8-cineol mediada por pulpa de C. maxima (zapallo)

Se estudió la la biotransformación de 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**) mediante pulpa de zapallo en los tiempos de reacción 24, 48 y 72 horas. En el análisis de la biotransformación por cromatografía en capa fina (TLC) se observó la presencia de dos compuestos a las 24 horas de reacción. Los mismos fueron identificados como 3-hidroxi-5-oxo-1,8-cineol (**77**) y orcinol (**79**). Dejando de lado el orcinol cuya formación es posiblemente no enzimática es destacable que el único otro compuesto aislado coicide con el producto de biotransformación suministrado por *W. anomalus.*

Bio-reducción de 2-acetilpiridina mediante W. anomalus sp. Z1 y Leuconostoc sp. Z2

Se llevó a cabo el estudio de la bio-reducción de la 2-acetilpiridina (**44**) mediante la levadura y bacteria endófitas aisaldas de la pulpa de zapallo. Se observó que ambos microorganismos fueron capaces de reducir la cetona rindiendo el (*S*)-2-piridinetanol **44a** con excelente enantioselectividad, aunque en bajo rendimiento. Con la levadura se obtuvo el *S* alcohol en un 15% mientras que la bacteria rindió este producto en un 16% de conversión.

DISCUSIÓN

Determinación de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por vegetales

En los estudios realizados con las especies vegetales ceibo (*E. crista-galli*) e hinojo (*F. vulgare*) se observó que en los ensayos sin el agregado de inhibidores microbianos (***ensayo a***) fue donde se obtuvieron los mayores porcentajes de bio-reducción de 2-acetilpiridina (**44**). El hecho de observar una disminución en las bio-reducciones en los ensayos adicionados con inhibidores microbianos (***ensayos b***, ***c*** y ***d***) podría deberse a la reducción en la población endófita que condujo al descenso de potenciales agentes biocatalizadores. La adición de los dos inhibidores (***ensayo d***) ejerció una drástica diminución en la recuperación de endófitos y en todos los casos se obtuvieron los menores porcentajes de conversión. En estos ensayos no se recuperaron microorganismos endófitos con actividad reductasa frente a **44**. En los ***ensayos d*** donde se observó bio-reducción, posiblemente, la misma se debió mayoritariamente a la actividad reductasa de las enzimas del vegetal.

En los ensayos realizados con hinojo (tallos, hojas y raíces) se observó una clara correlación entre el recuento de microorganismos viables y la evolución de la bio-reducción de 2-acetilpiridina, obteniéndose a las 96 horas de reacción los mayores porcentajes de conversión de **44** a **44a,** siendo ese tiempo en el que se obtuvo una mayor carga microbiana. Por otra parte, a partir de estos experimentos se obtuvieron 24 cepas endófitas con actividad reductasa frente a **44**. Es de destacar que en el ensayo con raíces de hinojo, adicionado con cloranfenicol se aislaron catorce cepas de las cuales nueve presentaron actividad reductasa. La cepa *Rhodotorula glutinis* H93 resultó el mejor biocatalizador en la bioconversión de 2-acetilpiridina (**44**) a (*S*)-2-piridinetanol (**44a**). Esto resulta consistente con el resultado observado para la reducción con raíz de hinojo en presencia de cloranfenicol. En estas condiciones la cepa de levadura podría haber medrado y potenciar la reducción del sustrato.

Por otra parte, la cepa *Bacillus* sp. H82, aislada de hojas de hinojo en el ensayo ***c*** mostró una muy buena actividad reductasa frente a **44** ya que rindió un porcentaje de conversión elevado y un excelentente exceso enantiomérico para el alcohol *S*. Esto puede explicar la conversión elevada del sustrato en el ensayo con hojas de hinojo en presencia de cicloheximide, y la drástica disminución en la bio-reducción asociada al ***ensayo d***, donde se adicionaron ambos inhibidores.

Los resultados obtenidos de los estudios con ceibo e hinojo estarían indicando que, al menos en estos ensayos, los microorganismos endófitos participaron en la bio-reducción de **44** por estas especies vegetales, y están en concordancia con los antecedentes reportados por nuestro grupo en los estudios previos realizados con *D. carota* (Rodríguez, Barton et al. 2007).

Con ambas especies vegetales, así como con los endófitos aislados de las mismas, se obtuvo el alcohol (*S*) a partir de la 2-acetilpiridina. La actividad Prelog evidenciada en hinojo está de acuerdo a lo descrito en la literatura. Bruni y colaboradores describieron la obtención de (*S*)-1-feniletanol a partir de acetofenona (**9**) con un *ee*>99% y un rendimiento de 37% a las 72 horas de reacción cuando emplearon tallos de hinojo. El bajo rendimiento obtenido en este trabajo, tal vez se debió a que el material vegetal fue cortado en condiciones asépticas

y se adicionó al medio de reacción cloranfenicol, lo cual probablemente contribuyó a un descenso en la población de microorganismos tanto epifíticos como endófitos (Bruni, Fantin et al. 2002). Aldabalde y colaboradores describieron la obtención (*S*)-4-piridinetanol a partir de 4-acetilpiridina mediante tallos de hinojo. En este trabajo obtuvieron el alcohol *S* en un rendimiento de 33% y con un *ee*>99% a las 48 horas de reacción. Los autores realizaron una desinfección superficial del material vegetal previo a su uso en la reacción (Aldabalde, Arcia et al. 2007).

Respecto a los ensayos realizados con el sustrato 2-acetilpiridina (**44**) mediante la especie vegetal *R. sativus* se observó que en las raíces frescas de rabanito el mayor porcentaje de conversión se obtuvo en los ensayos donde se aislaron microorganismos endófitos con actividad reductasa (***ensayo a*** y ***c***) frente a **44**. Los ensayos realizados con plántulas de rabanito a una concentración de sustrato 2.5 mM mostraron que la adición de inhibidores microbianos (***ensayos b***, ***c*** y ***d***) afectó fuertemente la bio-reducción del compuesto **44**. Este resultado sumando al hecho del aislamiento de los hongos *Penicillium chrysogenum* vA8 y *Cladosporium cladosporioides* vE13 que presentaron la misma actividad a la observada en las plántulas estarían indicando que la presencia de endófitos en las plántulas germinadas *in vitro* ejercieron un importante rol en la bio-reducción de 2-acetilpiridina.

En los estudios realizados con la raíz fresca de la especie vegetal *R. sativus* empleando el sustrato modelo α-etil acetoacetato de etilo (**72**) se observó que el mayor porcentaje de conversión se obtuvo en el ***ensayo c***. En este ensayo se alcanzó una alta concentración de microorganismos al final del periodo evaluado, este resultado junto con el hecho de haberse aislado las cepas con actividad reductasa *Pseudomonas* sp. Eiiix1a TSA y Eiiix2a TSA; particularmente la cepa *Pseudomonas* sp. Eiiix1a TSA que rindió los mismos alcoholes que se obtuvieron en el ***ensayo c***, indicaron que probablemente estas cepas participaron en la bio-reducción del β-cetoéster cuando se ensayó la raíz fresca de rabanito. Por otro lado, en el ***ensayo d*** no se detectó bio-reducción del compuesto **72** y tampoco se recuperaron microorganismos endófitos. Este resultado evidencia que los microorganismos endófitos de raíz de rabanito incidieron en la bio-reducción de α-etil acetoacetato de etilo (**72**).

En los ensayos donde se emplearon plántulas germinadas *in vitro* de *R. sativus* frente al sustrato **72** se obtuvieron los hongos filamentosos *Penicillium chrysogenum* vA8 y *Cladosporium cladosporioides* vE13, ambos presentaron actividad reductasa frente a α-etil acetoacetato de etilo (**72**) siguiendo la regla de Prelog. Esta misma actividad se determinó en las plántulas, de donde fueron aislados, cuando se utilizó una concentración de sustrato 10 mM. Estos resultados permitieron establecer que estos hongos endófitos participaron en la bio-reducción de **72** cuando se emplearon plántulas de rabanito en la reducción. Al disminuir la concentración de sustrato (2.5 mM) se observó que en todos los ensayos a excepción del ***ensayo d*** se obtuvieron porcentajes de conversión elevados (entre el 80-100), a su vez se detectó en estos sistemas actividad anti-Prelog.

En los estudios de bio-reducción empleando RT de rabanito, tanto frente al sustrato α-etil acetoacetato de etilo como acetofenona (**9**) se observó que en los ensayos sin adición de inhibidores microbianos fue donde se obtuvieron porcentajes de bioconversión significativos. Si bien en estos sistemas no se lograron aislar microorganismos endófitos, el bajo o nulo porcentaje de conversión obtenido en los ***ensayos b***, ***c*** y ***d*** podría estar indicando una posible participación de microorganismos endófitos que no pudieron ser cultivados. Para corrobar este supuesto se deberán realizar otros análisis que involucren estudios de

microscopía electrónica a efectos de visualizar estos microorganismos *in situ* en el tejido vegetal. Por otro lado, para evidenciar la presencia de los endófitos en RT de rabanito se pueden llevar a cabo técnicas moleculares que involucren la detección de genes procariotas y fúngicos en el material vegetal (de Almeida, Andreote et al. 2009).

En los estudios realizados con el sustrato acetofenona (**9**), se aislaron los endófitos *Bacillus megaterium* CM15 y *Penicillium brevicompactum* CM16 a partir de plántulas geminadas *in vitro*. Estos dos endófitos mostraron actividad reductasa frente a **9**. En particular, la bacteria endófita mostró una interesante actividad anti-Prelog frente a **9** rindiento el alcohol *R* con elevada enantioselectividad. Este hallazgo permitió correlacionar la actividad observada en *Bacillus megaterium* CM15 con la obtenida en el sistema vegetal, indicando que la bacteria endófita tuvo una participación en la bio-reducción de la acetofenona cuando fue ensayada con el sistema de plántula de rabanito. Este hecho también se evidenció cuando se observó que el mayor porcentaje de conversión se obtuvo en el ensayo con el inhibidor fúngico (***ensayo c***), en este experimento, probablemente al estar inhibidos los microorganismos fúngicos permitió un mayor desarrollo de la población bacteriana (posiblemente aumentando la concentración celular de *Bacillus megaterium* CM15) lo cual repercutió en el aumento de bioconversión y obtención del alcohol *R*.

Obtención de biocatalizadores con actividad de interés

La estrategia utilizada en la búsqueda de nuevos biocatalizadores a partir de un nicho poco explorado en la naturaleza como lo constituyen microorganismos endófitos permitió obtener 72 cepas microbianas con actividad alcohol deshidrogenasa.

En particular las cepas *Enterobacter agglomerans* C8, *Wickerhamomyces anomalus* Z1, *Rhodotorula glutinis* H93, *Bacillus* sp. H82, *Penicillium chrysogenum* vA8, *Cladosporium cladosporioides* vE13 y *Bacillus megaterium* CM15 mostraron actividades de interés.

La bacteria endófita *E. agglomerans* C8 mostró una excelente enantioselectividad y un muy buen exceso diastereomérico cuando se la ensayó frente a los sustratos α-etil acetoacetato de etilo y α-metil acetoacetato de etilo. Con esta cepa se obtuvo el alcohol *syn* (2*R*, 3*S*), en ambas reacciones, en forma mayoritaria. Este nuevo biocatalizador es útil, por tanto para la obtención de los compuestos *syn* (2*R*, 3*S*)-α-alquil-β-hidroxiesteres.

La levadura *Wickerhamomyces anomalus* Z1 mostró una muy buena actividad frente al compuesto 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**) dando lugar la hidroxicetona monoterpénica **77** en 66% de rendimiento aislado y con completa regioselectividad ya que redujo únicamente un grupo carbonilo. Asimismo, la reducción fue estereoespecífica rindiendo únicamente el hidroxilo β. La cromatografía gaseosa quiral mostro una única señal y el compuesto puro desvió el plano de la luz polarizada con un valor de rotación óptica específica de +52. Estos datos sugieren que la reacción fue enantioselectiva pero al no disponerse de estándares ni valores de literatura del compuesto no fue posible determinar la configuración absoluta en esta etapa. Para hacerlo debería disponerse de mayor cantidad de compuesto que permita obtener un derivado cristalino o diastereomérico y estudiar sus datos cristalográficos o de RMN.

Cuando se testeó la actividad de *Wickerhamomyces anomalus* Z1 frente a 2-acetilpiridina la cepa no mostró un porcentaje de conversión importante lo cual sería consistente en que la levadura endófita presenta una alta especificidad de sustrato.

Las cepas aisladas de hinojo, *Rhodotorula glutinis* H93 y *Bacillus* sp. H82, resultaron ser útiles para la obtención de (*S*)-2-piridinetanol, ya que este alcohol se obtuvo con un *ee*>99% y en altos porcentajes de conversión.

Los hongos endófitos de plántulas de rabanito, *Penicillium chrysogenum* vA8, *Cladosporium cladosporioides* vE13 mostraron actividad Prelog y anti-Prelog cuando fueron ensayados frente a los compuestos α-etil acetoacetato de etilo (**72**) y 2-acetilpiridina (**44**). En el perfil de bio-reducción obtenido con la cepa *Penicillium chrysogenum* vA8 se observó que al final del periodo estudiado se produjo, posiblemente, una oxidación del alcohol mayoritario, *anti* (2*S*, 3*S*) y (*S*)-2-piridinetanol con una posterior reducción con actividad anti-Prelog para rendir los alcoholes *anti* (2*R*, 3*R*) y (*R*)-2-piridinetanol. Se deberán realizar ensayos con periodos de tiempo mayores o evaluar la adición de sustrato en un inóculo envejecido para poder corroborar este hallazgo. Esta cepa, por tanto constituye un potencial biocatalizador para reacciones de reducción con actividad anti-Prelog.

Bacillus megaterium CM15 mostró ser un nuevo biocatalizador útil para la obtención de alcoholes con configuración anti-Prelog, aunque deberá extenderse el estudio a otros sustratos.

Se determinó en este trabajo que las cepas endófitas de hinojo mostraron actividad frente a la 2-acetilpiridina siguiendo la regla de Prelog, de igual forma a la evidenciada con las diferentes partes del hinojo evaluados. Por otro lado, como se describió anteriormente, el hinojo redujo diferentes sustratos rindiendo los alcoholes esperados según la regla de Prelog (Bruni, Fantin et al. 2006; Aldabalde, Arcia et al. 2007). De forma similar, se aislaron endófitos con actividad anti-Prelog a partir del rabanito, siendo que esta especie vegetal presentó actividad anti-Prelog cuando fue evaluada frente a distintos sustratos (Matsuo, Kawabe et al. 2008; Orden, Magallanes-Noguera et al. 2009).

Empleo de microorganismos endófitos para la obtención de compuestos con potencial utilidad en síntesis orgánica mediante células enteras.

En las biotransformaciones empleando microorganismos endófitos como agentes biocatalizadores se constató que los mismos son candidatos potenciales para ser utilizados con fines biotecnológicos. En este sentido se determinó que las levaduras endófitas *Pichia* sp. PDA y *Rhodotorula* sp. Ro resultaron buenos biocatalizadores en la reducción de los α-alquil-β-cetoésteres evaluados. Por un lado *Pichia* sp. PDA rindió el alcohol *anti* (2*S*, 3*S*) con una muy buena diasteroselectividad y un excelente exceso enantiomérico para los dos compuestos evaluados, **72** y **78**, en un tiempo de reacción de 4 horas. Por otra parte, *Rhodotorula* sp. Ro rindió el isómero *syn* (2*R*, 3*S*) con los dos sustratos evaluados, también con excelentes exceso enantiomérico y en el mismo tiempo de reacción que *Pichia* sp. PDA. Cuando se evaluó estas cepas frente a los compuestos 2-, 3- y 4-acetilpiridina, se determinó que *Rhodotorula* sp. Ro rindió los alcoholes *S* con un porcentaje de conversión >99% a las 24 horas de reacción y con *ee*>99%, mientras que *Pichia* sp. PDA rindió los *S* alcoholes para la 2- y 4-acetilpiridina con *ee*>99%, en la bio-reducción de 3-acetilpiridina se constató una actividad anti-Prelog minoritaria en esta cepa.

La cepa de levadura endófita de zapallo *Wickerhamomyces anomalus* Z1 mostró ser un potencial biocatalizador en la reducción de cetonas monoterpénicas ya que presentó regio- y estereoselectividad frente a la dicetona terpénica **77** en tiempos de reacción cortos y buen rendimiento.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De los ensayos realizados con las especies vegetales ceibo (*E. crista-galli*), hinojo (*F. vulgare*) y rabanito (*R. sativus*), mediante la metodología que implicó la evaluación de las bio-reducciones en sistemas con y sin inhibidores microbianos y una posterior determinación de actividad biocatalítica en los endófitos aislados, se pudo determinar que los microorganismos endófitos participaron en las bio-reducciones de las cetonas proquirales cuando se empleó las especies vegetales como agentes biocatalizadores. Estos datos sustentan la hipótesis postulada por nuestro grupo y sobre la cual ya se habían obtenido resultados preliminares con raíces de zanahoria (*D. carota*).

A partir de las especies vegetales de ceibo (*E. crista-galli*), hinojo (*F. vulgare*), rabanito (*R. sativus*) y zapallo (C. máxima) se aislaron 72 microorganismos endófitos que presentaron actividad alcohol deshidrogenasa frente a las cetonas evaluadas.

Las cepas *Enterobacter agglomerans* C8, *Wickerhamomyces anomalus* Z1, *Rhodotorula glutinis* H93 y *Bacillus* sp. H82, *Penicillium chrysogenum* vA8, *Cladosporium cladosporioides* vE13, *Bacillus megaterium* CM15, *Pichia* sp. PDA y *Rhodotorula* sp. Ro mostraron ser agentes biocatalizadores con potencial para ser utilizados en procesos biotecnológicos.

Con estos resultados se constató que los microorganismos endófitos constituyen una fuente potencial de biocatalizadores poco explorada. Particularmente, se determinó que la búsqueda de microorganismos endófitos a partir de especies vegetales con probada actividad biocatalítica es una estrategia útil para la obtención de nuevos biocatalizadores con actividades similares a las de la planta hospedera. Particularmente interesante resulta la obtención de cepas con actividad anti-Prelog a partir de tejidos vegetales que presentaban dicha actividad. Son muy escasos los antecedentes de biocatalizadores a célula entera que presenten dicha estereoselectividad. Resta estudiar la utilidad de este biocatalizador ampliando el rango de sustratos.

Dado que las levaduras endófitas *Wickerhamomyces anomalus* Z1, *Rhodotorula glutinis* H93, *Pichia* sp. PDA y *Rhodotorula* sp. Ro mostraron actividades alcohol deshidrogenasa interesantes son candidatas a ser empleadas como reactivos en síntesis orgánica. Para ello, sería necesario realizar el escalado para la obtención de biomasa de levadura con una posterior adecuación para ser utilizada fácilmente en el laboratorio. Existen diferentes metodologías para la obtención de estos reactivos, entre ellas el secado a vacío de las levaduras utilizando acetona en frío (Yasohara, Kizaki et al. 1999); levaduras liofilizadas (Molinari, Gandolfi et al. 1999) o inmovilizar células de levadura en reposo en perlas de alginato de calcio (Ni, Guan et al. 2009) entre otras. Una vez obtenido este catalizador se deberá evaluar su actividad frente a sustratos modelo para poder determinar si las selectividades de las levaduras se mantienen respecto a la levadura en forma de célula en reposo.

EXPERIMENTAL

Materiales

Análisis químico

Disolventes orgánicos

Los disolventes utilizados fueron acetato de etilo y hexano. Los mismos fueron destilados previos a su uso. Para las extracciones de muestras pequeñas se utilizó acetato de etilo calidad HPLC, controlado previamente por GC.

Cromatografía en capa fina

Las cromatografías en capa fina (TLC) fueron llevadas a cabo en placas de 20 x 20 cm de sílica gel 60F-254 sobre fondo de poliéster de marca Mallinckrodt y visualizadas con luz UV (254 nm) y/o reveladas con anisaldehído- H_2SO_4-EtOH.

Cromatografía en columna

Las columnas cromatográficas Flash se realizaron con silica gel (Kieselgel 60, EM Reagents, 230-400 mesh).

Sustratos

Los sustratos empleados en las biotransformaciones fueron: α-etil acetoacetato de etilo (**72**) (90%, GC) Sigma-Aldrich; α–metil acetoacetato de etilo (**78**) (90%, GC) Sigma-Aldrich; 2-acetilpiridina (**44**) (>99%, GC) Sigma-Aldrich; 3-acetilpiridina (**45**) (>99%, GC), Sigma-Aldrich; 4-acetilpiridina (**46**) (97%, GC) Sigma-Aldrich; 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**) este compuesto fue sintetizado por la estudiante de Doctorado Carmela Molinaro en su pasantía en el Laboratorio de Biocatálisis y Biotrasnformaciones de Facultad de Química, UdelaR. El procedimiento empleado consistió en la oxidación química de 1,8-cineol con trióxido de cromo según Carman y colaboradores (Carman, Robinson et al. 2005) y acetofenona (**9**) (>98%, GC) Fluka.

Estándares para la identificación de los productos de bio-reducción de α-etil acetoacetato de etilo

Los estándares utilizados para identificar los productos de reducción de α-etilacetoaceato de etilo (**72**) se obtuvieron mediante:

1. Reducción de **72** con $NaBH_4$ en etanol, para la obtención de los cuatro alcoholes posibles. Estos alcoholes fueron sintetizados y cedidos por la M. Sc.. Paola Panizza (Panizza 2005) .
2. Biotransformación d**e 72** mediante la cep*a E. coli* BL21 (DE3) Δ*yqhE* (pPP4) (Panizza 2005; Panizza, Onetto et al. 2007). Con esta cepa se obtuvo como producto mayoritario el isómer*o anti (*2*S*, 3*S*).
3. Biotransformaciónde **72** mediante la cepa *E. coli* JM105 (pKTS3) (Rodríguez, Schroeder et al. 2000). En esta biotransformación se obtuvo como único producto el alcohol con configuración *syn* (2*R*, 3*S*).

Estándares para la identificación de los productos de bio-reducción de α-metil acetoacetato de etilo

Los estándares utilizados para identificar los productos de reducción de α-metilacetoacetato de etilo (**78**) se obtuvieron mediante:

1. Reducción de **78** con $NaBH_4$ en etanol, para la obtención de los cuatro alcoholes posibles. Estos alcoholes fueron sintetizados y cedidos por la M. Sc. Paola Panizza (Panizza 2005).
2. Biotransformación de **78** mediante la cepa *Escherichia coli* JM105 (pKTS3). Con esta cepa se obtuvo como único producto el isómero *syn* (2*R*, 3*S*) (Rodríguez, Schroeder et al. 2000).
3. Biotransformación de **78** con *E. coli* BL21 (DE3) *ΔyqhE* (pPP4) que rindió como producto mayoritario el isómero *anti* (2*S*, 3*S*) (Panizza, Onetto et al. 2007).

Estándares para la identificación de los productos de bio-reducción de los compuestos 2-acetilpiridina , 3-acetilpiridina , 4-acetilpiridina y acetofenona .

Los estándares utilizados para identificar los productos de reducción de 2-acetilpiridina (**44**), 3-acetilpiridina **(45),** 4-acetilpiridina **(46)** y acetofenona (**9**) fueron los alcoholes con configuración *S* y *R* correspondientes. La mezcla racémica de alcoholes se obtuvo mediante la reducción de cada uno de los sustratos ensayados, **44, 45, 46 y 9** con $NaBH_4$ en metanol.

Los alcoholes con configuración *S* fueron sintetizados mediante reducción con *D. carota* por Aldabalde y colaboradores y cedidos como estándares para el desarrollo de este trabajo (Aldabalde, Arcia et al. 2007).

Inhibidores microbianos empleados en los estudios de prospección de actividad reductasa en los vegetales estudiados

Los inhibidores microbianos, cloranfenicol y cicloheximida fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

Material vegetal

En la tabla 28 se muestran las especies vegetales y las partes empleadas para el aislamiento de los microorganismos endófitos.

Tabla 28. Material vegetal empleado en las bio-reducciones y en los aislamientos de microorganismos endófitos.

Especie vegetal	Órganos y formas de crecimiento
Ceibo (*Erythrina crista-galli*)	Hojas
Zapallo (*Cucurbita maxima*)	Fruto (pulpa)
Hinojo (*Foeniculum vulgare*)	Hojas, tallos y raíz
Zanahoria (*Daucus carota*)	Callos (cultivos celulares)
Rabanito (*Raphanus sativus*)	Raíz, raíces transformadas y plántulas germinadas in vitro

Las hojas de *Erythrina crista-galli* se obtuvieron de un árbol plantado, en la zona del Prado, Montevideo, Uruguay.

Cucurbita maxima, *Foeniculum vulgare* y *Raphanus sativus* se adquirieron en mercados de venta de vegetales frescos de Montevideo, Uruguay.

Los callos de zanahoria (*Daucus carota*) que se emplearon (foto 1) pertenecen a la colección del laboratorio del Área de Química Orgánica, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (UNSL), Argentina. Son mantenidos de acuerdo a procedimientos ya publicados por el grupo de la Dra. Kurina-Sanz (Kurina-Sanz, Hernandez et al. 2000).

Foto 1. Células indiferenciadas de *D. carota*.

Las raíces transformadas (RT) de rabanito **(***Raphanus sativus*) (foto 2) se obtuvieron por infección del material vegetal con *A. rhizogenes* LBA 9402 de acuerdo a lo publicado por Agostini y colaboradores (Agostini, Milrad de Forchetti et al. 1997), en el laboratorio del Área de Química Orgánica, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (UNSL), Argentina.

Foto 2. Raíces transformadas de *Raphanus sativus*.

La plántulas de rabanito **(***Raphanus sativus*) (foto 3) fueron obtenidas y utilizadas de acuerdo a Matsuda y colaboradores. Este procedimiento se realizó en el laboratorio del Área de Química Orgánica, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (UNSL), Argentina.

Foto 3. Plántulas de *R. sativus*.

Medios de cultivo

YPD: extracto de levadura (10 g.), glucosa (20 g.), bacto-peptona (20 g.) y agua destilada (1 L.).

YES: sacarosa (150 g.), extracto de levadura (20 g.) y agua destilada (1 L.).

YM: extracto de levadura (3 g.), extracto de malta (3 g.), peptona (5 g.), glucosa (10 g.) y agua destilada (1 L.)

Caldo Vegetal: El material vegetal se molió y se suspendió en una cantidad adecuada de agua destilada. Se esterilizó mediante autoclave a 121 ºC y 1.05 atm. Durante 15 minutos. Las cantidades utilizadas de material vegetal variaron según la especie vegetal empleada:

- *Erythrina crista-galli*: se molieron 150 g. de hojas frescas en una picadora Ufesa 400Wmax. Las hojas molidas se suspendieron en 1 litro de agua destilada.
- *Daucus carota*: se molieron 300 g. de raíces frescas de zanahoria, que previamente fueron lavadas y removidas sus capas externas, en una picadora Ufesa 400Wmax. El material vegetal molido fue suspendido en 1 litro de agua destilada.
- *Curcubita maxima*: se cortó al medio una calabaza fresca y la pulpa se molió en una trituradora Ufesa 400Wmax. 300 g. de material vegetal molido fue suspendido en 1 litro de agua destilada.
- *Foeniculum vulgare*: se molieron 150 g. de hojas y tallos de plantas frescas de hinojo mediante una trituradora Ufesa 400Wmax. El material vegetal molido se suspendió en 1 litro de agua destilada.
- *Raphanus sativus*: se removieron las capas externas y se lavaron raíces frescas de rabanito. Las raíces peladas y limpias se molieron en una trituradora Ufesa 400Wmax. 300 g. de raíces molidas se suspendieron en 1 litro de agua destilada.

Agar-vegetal: A los medios descritos en el párrafo anterior se les adicionó 20 g/ L de Agar (Difco).

Tryptic Soy Agar (TSA) y *Tryptic Soy Broth* (TSB) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

Potato Dextrose Agar (PDA) y *Potato Dextrose Broth* (PDB) fueron adquiridos de Difco.

Reactivos de biología molecular

Para la extracción de ADN genómico bacteriano se utilizó el kit comercial PureLink ™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen).

Las enzimas empleadas fueron: RNAsa A (Amresco), Lisozima (Sigma-Aldrich), liticasa (Sigma-Aldrich), proteinasa K (New England Biolabs).

Para la extracción de ADN genómico de bacterias Gram positivas se utilizó CTAB 10 % (bromuro de hexadecil trimetil amonio, Sigma-Aldrich).

Los disolventes empleados fueron: cloroformo, isopropanol, etanol calidad PPA o HPLC.

Se utilizó agarosa (Sigma-Aldrich) para las corridas electroforéticas y se empleó buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Se utilizó Gene Ruler 1Kb DNA LADDER (Fermentas ®) como marcador de peso molecular y como estándar en la cuantificación de ADN.

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de las secuencias genómicas y su secuenciación fueron obtenidos de Operon o Macrogen.

Para las reacciones de PCR se emplearon como polimerasas Taq (Invitrogen) o Kappa2G Robust (KappaBiosystems). Se usaron los reactivos suministrados por el proveedor y los dNTPs de New England Biolabs.

Metodología

Aislamiento de microorganismos endófitos

Los aislamientos se realizaron a partir de un enriquecimiento en Caldo Vegetal adicionado con diferentes sustratos, en paralelo con la prospección de la actividad biocatalítica y del estudio de la incidencia de la actividad de antimicrobianos.

En la tabla 29 se muestran para cada especie vegetal estudiada los sustratos que se emplearon para llevar a cabo los aislamientos de microorganismos endófitos.

Tabla 29. Especies vegetales y sustratos empleados en los aislamientos de microorganismos endófitos.

Especie vegetal	Sustrato
Ceibo (*E. crista-galli*)	2-acetilpiridina (**44**)
Zapallo (*C. maxima*)	2-acetilpiridina (**44**) y 3,5-dioxo-1,8-cineol (**74**)
Hinojo(*F. vulgare*)	2-acetilpiridina (**44**)
Zanahoria (*D. carota*)	2-acetilpiridina (**44**) y α-etil acetoaceto de etilo (**72**)
Rabanito (*R. sativus*)	2-acetilpiridina (**44**), α-etilacetoaceto de etilo (**72**) y acetofenona (**9**)

Aislamiento de microorganismos endófitos a partir de partes frescas de Erythrina crista-galli; Curcubita maxima; Foeniculum vulgare y Raphanus sativus.

Las hojas de *Erythrina crista-galli* así como los tallos, raíces y hojas de *Foeniculum vulgare* se desinfectaron de la siguiente forma:

1. Se lavaron con agua destilada estéril.
2. Se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio 10% durante 3 minutos.
3. Se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril.
4. Se sumergieron en etanol 70% durante 3 minutos.
5. Se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

El fruto de *Cucurbita maxima* y las raíces de *Raphanus sativus* se desinfectaron como se describe en el párrafo anterior previo lavado con agua corriente para remover la tierra y remoción de la capa externa mediante cuchillo estéril.

Para verificar que el proceso de desinfección fue adecuado se llevó a cabo el control del mismo mediante dos técnicas descritas por Surette y colaboradores (Surette, Sturz et al. 2003):

- Impresión del material vegetal desinfectado en los medios de cultivo TSA (tryptic soy agar, Sigma) y PDA (potate dextrose agar, Difco) por duplicado.
- Siembra en superficie de 100uL del último volumen de agua utilizado en el lavado (paso 5 de la desinfección) en TSA y PDA por duplicado.

Las placas se incubaron a 28 ºC durante 96 horas. No se observó crecimiento luego de transcurrido el tiempo de incubación en ninguno de los procedimientos de desinfección.

El material vegetal desinfectado se cortó con cuchillo estéril. Los trozos vegetales desinfectados se inocularon en los medios de reacción utilizados para los ensayos de prospección de actividad biocatalítica y se incubaron de acuerdo a estos experimentos. A las 96 horas, tiempo final de los experimentos, se realizaron diluciones seriadas 10^{-2}, 10^{-3} y 10^{-4} en suero fisiológico de cada uno de los cultivos y se sembraron 100uL de las mismas en superficie en los medios de cultivo TSA, PDA y agar-planta (medio consistente en una suspensión del vegetal utilizado, triturado y esterilizado) descrito previamente (Rodríguez, Barton et al. 2007). Las placas se incubaron a 28 ºC y se fueron observando cada 24 horas hasta 96 horas.

Las colonias obtenidas se caracterizaron como bacterias, hongos filamentosos y levaduras mediante observación macro y microscópica. Las levaduras y hongos filamentosos fueron transferidos a PDA mientras que las bacterias se repicaron en TSA.

Aislamiento de microorganismos endófitos a partir de callos de D. carota; plántulas y raíces transformadas de R. sativus.

El aislamiento de microorganismos endófitos a partir de cultivos celulares de *D. carota*; raíces transformadas y plántulas de *R. sativus* se llevó a cabo en los ensayos de prospección de actividad biocatalítica realizados con estos vegetales.

De cada uno de los cultivos de los ensayos, al tiempo de incubación 96 horas, se tomó con ansa un inóculo que se sembró mediante estrías en los medios de cultivo TSA, PDA y Agar-Vegetal. Las placas sembradas se incubaron en las mismas condiciones de temperatura que

las utilizadas en las bio-reducciones para cada caso en particular. Se fueron observando diariamente hasta constatar la aparición de colonias. Los cultivos obtenidos fueron aislados y conservados.

Mantenimiento de los microorganismos endófitos aislados

Las levaduras y bacterias aisladas fueron conservadas en cultivos al 15% con glicerol a -20 y -70 ºC. Para la conservación de los hongos filamentosos se realizó la siembra de los mismos en tubos de ensayo con 5mL de PDA, se incubaron a 28 ºC durante 7 días. Posteriormente se le agregó vaselina estéril hasta cubrir el cultivo. También se conservaron en tubos de PDA a 4 ºC.

Ensayos para sustentar o descartar la hipótesis de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por vegetales

Estos ensayos se realizaron con las cinco especies vegetales estudiadas. En la tabla 29 se muestran las especies vegetales utilizadas frente a los sustratos ensayados.

En este estudio se diseñó un experimento para evaluar si las bio-reducciones eran llevadas a cabo únicamente por el material vegetal o si los microorganismos endófitos pudieran tener un rol en las mismas. Estos ensayos consistieron en cuatro tipos de experimentos (***a-d***) en paralelo que variaron respecto a los compuestos que se adicionaron al cultivo vegetal:

Ensayo a: material vegetal adicionado con el sustrato ensayado.

Ensayo b: material vegetal adicionado con el sustrato y cloranfenicol a una concentración del inhibidor bacteriano de 170ug/mL. (Weisblum and Davies 1968)

Ensayo c: material vegetal adicionado con el sustrato y cicloheximida a una concentración del inhibidor fúngico de 100ug/mL (Herrero, de la Roza et al. 1999)

Ensayo d: material vegetal adicionado con el sustrato en estudio y los dos inhibidores microbianos (en la concentración, de cada uno, utilizada en b y c).

En todos los casos se realizaron tres controles de los experimentos. Los mismos fueron llevados a cabo en las mismas condiciones que los experimentos:

- Matraz con material vegetal procesado de idéntica forma a los experimentos, ensayo a, pero esterilizado en autoclave.
- Matraz sin material vegetal y con el sustrato en estudio.
- Matraz con material vegetal sin sustrato adicionado.

Ensayos de prospección de actividad biocatalítica en partes frescas de *E. crista-galli*; *C. maxima*; *F. vulgare* y *R. sativus*.

Hojas de *E. crista-galli*.

Los ensayos de se llevaron a cabo en matraces estériles de 100mL con 30mL de agua destilada estéril y 5 g. de hojas desinfectadas y troceadas mediante cuchillo estéril. El sustrato empleado en este estudio fue 2-acetilpiridina (**44**) en una concentración 10 mM.

Fruto de C. maxima.

Los ensayos se llevaron a cabo en matraces de 250mL estériles con 30mL de agua destilada estéril y 15 g. de pulpa de la calabaza desinfectada y troceada con cuchillo estéril. Se ensayó el sustrato 2-acetilpiridina (**44**) a una concentración 10 mM.

Hojas, tallos y raíces de F. vulgare.

Los ensayos se llevaron a cabo en matraces estériles de 100mL con 20mL de agua destilada estéril y se agregó 1 g. de cada una de las partes vegetales estudiadas (tallos, raíces y hojas). El sustrato adicionado fue 2-acetilpiridina (**44**) a una concentración 10 mM.

Raíces de R. sativus.

Los ensayos se llevaron a cabo en matraces estériles de 50 mL con 10 mL de agua destilada estéril y 2 g. de raíces de rabanito cortadas con cuchillo estéril. Con este material vegetal se llevo a cabo el estudio de la bio-reduccion de 2-acetilpiridina (**44**) y α-etilacetoacetato de etilo (**72**) y acetofenona (**9**), a una concentración 10 mM.

En todos los casos los matraces fueron incubados en shaker orbital ZHICHENG ZHWY-211B a 28 ºC y 150 rpm durante 96 horas. El medio se filtró con papel de filtro Whatman No. 2 para remover el material vegetal y se procedió a su extracción con acetato de etilo (3x). En el caso de la bio-reducción de 2-acetilpiridina (**44**), dado que las piridinas en su forma protonada son muy solubles en agua, el pH se ajustó a 9 antes de realizar la extracción. El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en un evaporador rotatorio a temperatura ambiente y presión reducida (20 torr). El concentrado crudo correspondiente a los ensayos con hojas de ceibo, hojas y tallos de hinojo y fruto del zapallo se purificó, para eliminar los pigmentos vegetales, mediante cromatografía en columna Flash utilizando sílica gel como fase estacionaria. La separación se realizó de acuerdo *Still et al* (Still , Kahn et al. 1978). Las fases móviles empleadas fueron: hexano:acetato de etilo 9:1 y acetato de etilo:hexano 2:1.

Los extractos purificados fueron analizados mediante cromatografía gaseosa.

Ensayos de prospección de actividad biocatalítica frente a los sustratos α-etil acetoacetato de etilo y 2-acetilpiridina en callos de D. carota; plántulas y raíces transformadas de R. Sativus. Acetofenona en raíces transformadas y plántulas de R. sativus.

Para llevar a cabo el estudio de la participación de los microorganismos endófitos en las bio-reducciones mediadas por callos de *D. carota*; plántulas y raíces transformadas de *R. sativus* frente a los sustratos α-etilacetoacetato de etilo y sustratos 2-acetilpiridina y para acetofenona mediante RT y plántulas de *R. sativus* se procedió a realizar los cuatro ensayos descritos anteriormente (a-d) pero en estos biocatalizadores se realizó una molienda de los vegetales mediante mortero para poder recuperar el mayor número de microorganismos endófitos posible. A su vez, se agregó un ensayo adicional consistente en la bio-reducción de los compuestos con el material vegetal intacto, es decir sin la rotura del mismo, con la finalidad de evaluar la incidencia de la rotura del material vegetal en la biotransformación. Por tanto, con estos biocatalizadores se realizaron los siguientes cinco ensayos:

- ***a.*** Material vegetal molido con mortero y adicionado con el sustrato en estudio.
- ***b.*** Material vegetal molido con mortero, adicionado con el sustrato en estudio y cloranfenicol (inhibidor bacteriano)(Weisblum and Davies 1968).

c. Material vegetal molido con mortero, adicionado con el sustrato en estudio y cicloheximida (inhibidor fúngico)(Herrero, de la Roza et al. 1999).
d. Material vegetal molido con mortero adicionado con el sustrato en estudio y los dos inhibidores microbianos.
e. Material vegetal sin moler adicionado con el sustrato en estudio.

En todos los casos se realizaron los controles en las mismas condiciones que los experimentos: material vegetal sin sustrato y medio de reacción con sustrato.

Los ensayos se realizaron por duplicado. Los resultados se expresan como los promedios de ambos ensayos.

Callos de D. carota.

Se utilizaron 2 g. de células indiferenciadas resuspendidas en un matraz de 50 mL con 10 mL de medio MS (Murashige and Skoog 1962) y adicionadas con el sustrato en estudio a una concentración final de 10mM. Se incubó en shaker orbital a 120rpm durante 96 horas a una temperatura de 22 ± 2 °C y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Pasadas las 96 horas de incubación se filtró el material vegetal a través de papel de filtro Whatman No. 2. El medio líquido de reacción se extrajo con acetato de etilo (3x). El extracto se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a vacío. En el caso de la bio-reducción de 2-acetilpiridina el pH se ajustó a 9 antes de realizar la extracción.

Plántulas de R. sativus.

Se transfirió 1 g. de plántulas de *R. sativus* germinadas en condiciones asépticas en medio líquido (Matsuo, Kawabe et al. 2008) a un matraz de 50 mL con 10 mL de medio MS (Murashige and Skoog 1962). Se agregó el sustrato a una concentración final de 2.5 y 10 mM y se incubó en shaker orbital a 120 rpm, 22 ± 2º C y en oscuridad durante 96 horas. Pasadas las 96 horas de incubación se procedió de igual forma a la descrita con los callos de *D. carota*.

Raíces transformadas (RT) de R. sativus.

Se transfirieron 2 g. de raíces transformadas a un matraz de 50 mL con 10 mL de medio MSRT(Agostini, Milrad de Forchetti et al. 1997) Se añadió el sustrato a una concentración final de 2.5 y 10 mM. Se incubó durante 96 horas en shaker orbital a 120 rpm a 22 ± 2°C en oscuridad. Pasadas las 96 horas se procedió de igual forma a lo realizado con los callos de zanahoria y plántulas de rabanito.

Se llevó a cabo el control de la actividad reductasa de RT de *R. sativus* (control positivo) mediante la biotransformación de acetofenona **.** Este control se realizó bajo dos condiciones de reacción diferentes:

a) RT de *R. sativus* de 30 días de edad, 30 mL de medio MSRT, 15 µL acetofenona.
b) RT de *R. sativus* de 30 días de edad, 30 mL de medio MSRT, 30 µL de sol. (3 µL acetofenona/ 27 µL DMSO).

El tiempo de bio-reacción fue para ambos casos de 7 días. La extracción del medio líquido se realizó con acetato de etilo (x3). Los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron a vacío. Las muestras se derivatizaron con anhídrido acético y se analizaron mediante GC quiral.

Procedimiento general para las bio-reducciones mediadas por microorganismos endófitos.

Se ensayaron microorganismos endófitos aislados de las especies vegetales *E. crista-galli*, *C. maxima*, *F. vulgare*, *R. sativus*, *D. carota* y *F. margarita* como agentes biocatalizadores frente a los sustratos: α-etil acetoacetato de etilo (**72**), α-metilacetoacetato de etilo (**78**)**,** 2-acetilpiridina (**44**), 3-acetilpiridina (**45**), 4-acetilpiridina (**46**), 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**) y acetofenona (**9**).

En la tabla 30 se muestra las cepas que se utilizaron para la biotransformación de los compuestos en estudio así como la especie vegetal de la que fueron aislados.

Tabla 30. Microorganismos endófitos utilizados para la bio-reducción de los sustratos estudiados.

	72	**78**	**44**	**45**	**46**	**74**	**9**
Hojas de *ceibo*	*E. agglomerans* C8	*E. agglomerans* C8	Todos los endófitos aislados	-	-	-	-
Fruto de *zapallo*	*Leuconostoc* sp. Z2 *W. anomalus* Z1	*Leuconostoc* sp. Z2 *W. anomalus* Z1	Todos los endófitos aislados	-	-	*Leuconostoc* sp. Z2 *W. anomalus* Z1	-
Hojas, tallos y raíces de *hinojo*	-	-	Todos los endófitos aislados	-	-	-	-
Plántulas de *rabanito*	*C. cladosporioides*, *P. chrysogenum*	-	*C. cladosporioides*, *P. chrysogenum*	-	-	-	*Bacillus* sp. *P. breviscompactum*
Raíces de *rabanito*	Todos los endófitos aislados	-	Todos los endófitos aislados	-	-	-	-
Raíz de *zanahoria*	*Pichia* sp. *Rhodotorula* sp. *Pseudomonas* sp. EB	*Pichia* sp. *Rhodotorula* sp. *Pseudomonas* sp. EB	*Pichia* sp. *Rhodotorula* sp.	*Pichia* sp. *Rhodotorula* sp.	*Pichia* sp. *Rhodotorula* sp.	-	-
Fruto de *quinoto*	*A. pullulans* CQA	*A. pullulans* CQA	-	-	-	-	-

Los ensayos de bio-reducción mediante los microorganismos endófitos aislados se llevaron a cabo mediante los siguientes protocolos experimentales:

Bacterias

Se toma ascepticamente una muestra del stock guardado en freezer a -70 con el cual se inocula una placa de TSA, incubándola 24 hs a 28 °C. Se tomó una colonia aislada y se sembró en 5 mL de TSB. Cada cultivo se incubó a 28 °C en un shaker orbital a 150 rpm durante 12 horas. Se tomaron 500 μL de los cultivos y se sembraron en 5 mL de TSB, en matraces de 25 mL, conteniendo el sustrato en estudio en una concentración de 10 mM. Las bio-reducciones fueron incubadas a 28 ºC y 150 rpm. Se monitoreó el transcurso de la bio-reducción tomando 200 μL de las bio-reducciones, y se extrajeron con 400 μL de acetato de

etilo. Se agitó la muestra con el disolvente de extracción mediante vortex y se separaron las fases mediante centrífuga. Los extractos fueron secados con sulfato de sodio anhidro y analizados mediante GC. A las 96 horas de reacción se extrajeron todas las bio-reducciones con acetato de etilo (x3). Los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron a vacío. En el caso de la bio-reducción de **44** el pH se ajustó a 9 con NaOH al 10% antes de realizar las extracciones.

Hongos filamentosos

A partir de cultivos puros de 7 días en PDA (Potato Dextros Agar, Sigma) se prepararon suspensiones de esporas, a una concentración de 10^7 esporas/ mL, en suero fisiológico estéril de cada uno de los hongos endófitos ensayados. Se inocularon 5 mL de la suspensión de esporas en un matraz de 250 mL con 50 mL de PDB (Potato Dextrose Broth, Sigma). Se agregó el sustrato en estudio a una concentración final de 10 mM. Los matraces se incubaron en shaker orbital a 28°C y 150 rpm. Se tomaron muestras día a día y se procesaron de la misma forma a la descrita en el protocolo utilizado con bacterias. Las bio-reducciones se monitorearon a través de GC hasta observar la ausencia de sustrato. Una vez determinada la ausencia de sustrato, se filtró el hongo a través de papel de filtro Whatman No. 2. El medio líquido de reacción se extrajo con acetato de etilo (3x). El extracto se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. En el caso de la bio-reducción de **44** el pH se ajustó a 9 con NaOH al 10% antes de realizar la extracción.

Bio-reducción de α-etil acetoaceto de etilo mediante Cladosporium sp. VE13

Se realizaron dos ensayos (1) y (2) para estudiar la evolución de la bio-reducción del betacetoéster **72** a través *Cladosporium* sp. VE13 aislado de plántula de rabanito.

Ambos ensayos se realizaron a partir de cultivo puro del hongo con un crecimiento en PDA de 7 días a 28ºC. Se prepararon suspensiones de esporas a una concentración de 10^7 esporas/ mL en suero fisiológico y se inocularon en matraces de 500 mL con 100 mL de medio PDB. Los matraces se incubaron en shaker orbital a 28ºC y 150 rpm. En el ensayo (1) se agregó el sustrato a las 48 horas de iniciada la incubación a una concentración 10 mM. En el ensayo (2) se adicionó el sustrato en la misma concentración que en la del ensayo (1) a los 8 días de comenzada la incubación. En el ensayo (1), en los días de incubación: 8, 10, 11, 12, 13, 14 y 17 se tomaron muestras de 400uL y se extrajeron con 800uL de acetato de etilo. Se agitaron mediante vortex y se separaron las fases mediante centrífuga. Los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro. A 19 días se procedió a realizar la extracción final para ello se filtró el hongo a través de papel de filtro Whatman No. 2. El medio líquido de reacción se extrajo con acetato de etilo (3x). El extracto se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a vacío.

En el ensayo (2) se tomaron muestras a los 2, 3, 4, 5, 6, 9 días para monitorear la bio-reducción y a los 11 días se procedió a realizar la extracción final. Se procedió de igual forma a la descrita en el ensayo (1).

Ambos ensayos se realizaron por duplicado. Los resultados se expresan como el promedio de los duplicados.

Levaduras

Las biotransformaciones con levaduras se hicieron con células en reposo (resting cells). A partir de un cultivo puro de 48 horas en placa de PDA (Potate Dextrose agar, Difco) se tomó una colonia y se sembró en 100 mL de medio YM en un matraz de 500 mL. Cada cultivo se

incubó a 28°C en un shaker orbital a 150 rpm durante 48 horas. Pasado este tiempo el cultivo se centrifugó a 4000 rpm y 4ºC durante 15 minutos. El pellet se lavó tres veces con 50 mL de suero fisiológico. Se tomaron 0.5 gramos (peso húmedo) y se resuspendieron en un matraz de 25 mL con 5 mL de una solución de dextrosa al 10%. Se agregó el sustrato a una concentración final 10 mM. La reacción se llevó a cabo a 28ºC y 150 rpm. Se monitoreó el transcurso de la bio-reducción tomando 200 μL de las bio-reducciones, se mezclaron con 400 μL de acetato de etilo. Se agitó la muestra con el disolvente de extracción mediante vortex y se separaron las fases mediante centrífuga. Los extractos fueron secados con sulfato de sodio anhidro y analizados mediante GC. Cuando se observó ausencia de sustratos se procedió a realizar la extracción final con acetato de etilo (x3). Los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron a vacío. En el caso de la biorreducción de **44** el pH se ajustó a 9 con NaOH al 10% antes de realizar las extracciones.

Bio-reducción de 3,5-dioxo-1,8-cineol (73) mediante Wickerhamomyces anomala Z1

La bio-reducción de la cetona terpénica **73** se realizó mediante la cepa de levadura endófita *W. anomala Z1* a través de la metodología de células en crecimiento. Se partió de un cultivo puro en PDA. Se inoculó una colonia en un tubo de ensayo con 5 mL de medio PDB (Potate Dextrose Broth, Difco). Se incubó en shaker orbital a 28ºC y 150 rpm durante 24 horas. Pasado este tiempo de incubación se tomó 2 mL del cultivo y se sembró en un matraz de 1000 mL con 200 mL de PDB. Se adicionó el sustrato a una concentración 10 mM. Se incubó en shaker orbital a 28ºC y 150 rpm. Se tomaron muestras de 400 µL a las 24 y 48 horas. Se extrajeron con 800 µL de acetato de etilo y se analizaron mediante TLC y GC. A las 72 horas de incubación se centrifugó el cultivo para descartar las células y el medio de reacción se extrajo con acetato de etilo (x3). Se secó el extracto orgánico con sulfato de sodio anhidro. Se concentró el extracto a vacío. El extracto concentrado fue utilizado para el análisis de los compuestos de bio-reducción mediante TLC, GC, RMN y rotación óptica.

Las bio-reducciones con las cepas endófitas fueron realizadas en forma paralela con los ensayos de control: sustrato sin microorganismo endófito y microorganismo endófito sin sustrato. Los controles fueron tratados en las mismas condiciones que las bio-reducciones.

Análisis de las bio-reducciones

Cromatografía en columna

Los extractos de las bio-reducciones llevadas a cabo mediante el uso de material vegetal con pigmentos (clorofilas y carotenos), tales como hojas de ceibo, raíces de zanahoria, hojas y tallos de hinojo y fruto del zapallo fueron purificados mediante cromatografía líquida flash para remover los pigmentos de los extractos y poder de esta forma analizarlos mediante cromatografía gaseosa (GC). Para ello se utilizó silica gel (Kieselgel 60, EM Reagents, 230-400 mesh) y se empleó como eluyente una mezcla acetato de etilo:hexano en una relación 2:1.

Cromatografía en capa fina

Las bio-reducciones de los compuestos 2-acetilpiridina (**44**), 3-acetilpiridina (**45**), 4-acetilpiridina (**46**) y 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**) se analizaron inicialmente a través de cromatografía en capa fina. Para ello se emplearon placas de TLC de silica gel 60F-254.

En el análisis de las bio-reducciones de las acetilpiridinas se empleó la fase móvil acetato de etilo:hexano en una relación 2:1, se visualizaron con luz UV (254nm) y se revelaron con anisaldehido-H_2SO_4-EtOH.

Para el análisis de las bio-reducciones de 3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**) se empleó la fase móvil acetato de etilo:hexano en una relación 1:1, se visualizaron con luz UV (254nm) y se revelaron con anisaldehído-H_2SO_4-EtOH.

Cromatografía gaseosa

Las bio-reducciones de los sustratos estudiados fueron analizadas mediante cromatografía gaseosa (GC) en diferentes equipos según el tipo de análisis (tabla 31). Para ello se inyectó 1µL de las muestras tomadas a diferentes tiempos para evaluar la evolución de las bio-reducciones ó 0.5 µL del extracto final de las mismas.

Los equipos, las columnas y los programas utilizados se muestran en la tabla 31. El gas carrier empleado en todos los análisis fue hidrógeno (3mL/min), excepto para el análisis del sustrato acetofenona que se empleó nitrógeno (28 cm/s); el sistema de inyección fue split (relación 1:50) y se utilizó un detector FID. Los datos fueron analizados con el software GC Solution en los análisis realizados en los cromatógrafos Shimadzu.

Tabla 31. Condiciones para el análisis de las bio-reducciones por cromatografía gaseosa.

Tipo de análisis	Sustrato	Columna (Proveedor)	Programa de temperatura
No quiral. Cromatógrafo: Shimadzu 2014	α-etil acetoacetato de etilo (**72**); α-metil acetoacetato de etilo (**78**)	Carbowax 20 (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 um)	60 °C (5 min)/8 °C/min/140 °C/25 °C/min/240 °C (5 min). TSPLIT: 220 °C, TFID: 250 °C.
	2-acetilpiridina (**44**), 3-acetilpiridina (**45**), 4-acetilpiridina (**46**)		100 °C (4 min)/15 °C/ min/230 °C (5 min). TSPLIT: 220 °C, TFID: 250 °C.
	3,5-dioxo-1,8-cineol (**73**)		70 ºC (2min)/9ºC/min/160ºC/8ºC/min/ 240 ºC(3min)
Quiral. Cromatógrafo: Perkin-Elmer Clarus 500	Acetofenona (**9**)	β-DEX (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 um) (Restek, USA)	120°C (2 min)/ 1°C/min/120°C. TSPLIT: 200ºC, TFID: 300ºC.
Quiral Cromatógrafo: Shimadzu 2010	α-etil acetoacetato de etilo (**72**); α-metil acetoacetato de etilo (**78**)	Megadex DET-TBS (25 m, 0.25 mm ID, 0.25 um). (MEGA, Italia)	60 °C (6 min)/15 °C/min/90 °C (20 min)/45 °C/min/180 °C (5 min). TSPLIT: 220 °C, TFID: 220 °C.
	2-acetilpiridina (**44**), 3-acetilpiridina (**45**)		70 °C (2 min)/1°C/min/ 110 °C (2 min)/20 °C/min/ 180 °C (5 min). TSPLIT: 220 °C, TFID: 220 °C.
	4-acetilpiridina (**46**)	Elite Cyclodex B (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 um). (Perkin Elmer, USA)	

Análisis de la bio-reducción de α-etil acetoacetato de etilo (72) y α-metil acetoacetato de etilo (78).

Las condiciones analíticas para la separación de los cuatros posibles isómeros ópticos **72-78 (a-d)**, ver figura 44, fueron establecidas mediante el análisis de la mezcla racémica obtenida de la reducción de **72 y 78** mediante $NaBH_4$. Los compuestos **72a; 72b** y **78a; 78b** fueron obtenidos respectivamente de la reducción de **72 y 78** mediante *E. coli* BL21 (DE3) ΔyqhE (pPP4) y *E. coli* JM105 (pKTS3) como fue descrito previamente (Rodríguez,

Schroeder et al. 2000; Panizza, Onetto et al. 2007). Los compuestos **72c** y **72d** así como **78c** y **78d**, fueron asignados en base al patrón de áreas obtenido con de la reducción con $NaBH_4$. Los isómeros *syn* son los productos mas abundantes de la reducción química y están en igual proporción entre si, mientras que los *anti* son los menos abundantes y también están en relación estequiométrica. Los tiempos de retención asignados para cada compuesto se muestran en la tabla 32. La asignación de la configuración absoluta se realizó a través de la comparación de los tiempos de retención y mediante la co-inyección de las muestras con los estándares obtenidos.

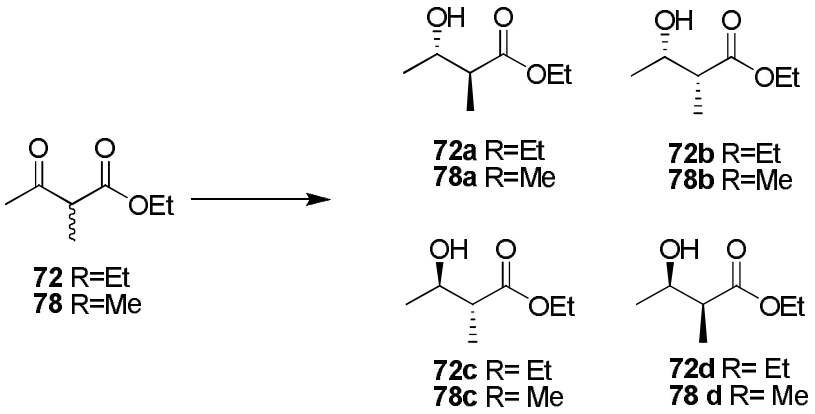


Figura 44. α-Etilacetoacetato de etilo (**72**), α-metilacetoacetato de etilo (**78**) y sus posibles productos obtenidos por su reducción.

Tabla 32. Tiempos de retención asignados para los sustratos α-alquil-β-cetoésteres y todos los posibles productos de los mismos.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
α-etil acetoacetato de etilo (**72**)	16.3/16.9
anti (2*S*, 3*S*) α-etil-β-hidroxibutirato de etilo (**72a**)	22.1
syn (2*R*, 3*S*) α-etil-β-hidroxibutirato de etilo (**72b**)	25.0
anti (2*R*, 3*R*) α-etil-β-hidroxibutirato de etilo (**72c**)	26.0
syn (2*S*, 3*R*) α-etil-β-hidroxibutirato de etilo (**72d**)	29.2
α-metilacetoacetato de etilo (**78**)	14.3
anti (2*S*, 3*S*) α-metil-β-hidroxibutirato de etilo (**78a**)	23.9
syn (2*R*, 3*S*) α-metil-β-hidroxibutirato de etilo (**78b**)	26.6
anti (2*R*, 3*R*) α-metil-β-hidroxibutirato de etilo (**78c**)	20.2
syn (2*S*, 3*R*) α-metil-β-hidroxibutirato de etilo (**78d**)	18.9

Análisis de la bio-reducción de 2-acetilpiridina (44); 3-acetilpiridina (45) y 4-acetilpiridina (46).

Las condiciones analíticas para la separación de los dos enantiómeros **44-46 (a y b)**, ver figura 45, fueron establecidas mediante el análisis de la mezcla racémica obtenida de la reducción de **44- 46** mediante $NaBH_4$.

El procedimiento utilizado para la reducción química de **44**, **45** y **46** con $NaBH_4$ fue el siguiente: en un balón seco, provisto de agitación magnética, se adicionan 100 µl del

material de partida disuelto en 5 mL de metanol y se agregó, cuidadosamente, un exceso de $NaBH_4$ (punta de espátula), se tapó con un septo de goma provisto de una vía de desprendimiento de gases y se agitó a 0°C. Transcurridos 30 minutos, se realizó el monitoreo de la reacción por TLC utilizando como fase móvil una mezcla de n-hexano: acetato de etilo en relación 8:2. Se evidenció la presencia de material de partida y productos bajo lámpara UV y mediante el revelado en cámara de iodo. Una vez completada la reacción, se adicionó gota a gota acetona hasta que no se observó desprendimiento de burbujas. Se agregó 5 mL de agua y se realizó la extracción con 20 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con 10 mL de solución de HCl al 10 % y luego nuevamente con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó el solvente en evaporador rotatorio de vacío.

Los alcoholes **44a-46a** fueron obtenidos mediante la reducción de **44-46** con *D. carota* como fue descrito previamente. Los tiempos de retención se presentan en la tabla 33. La asignación de la configuración absoluta se realizó a través de la comparación de los tiempos de retención y mediante la co-inyección de las muestras con los alcoholes, **44a-46a.**

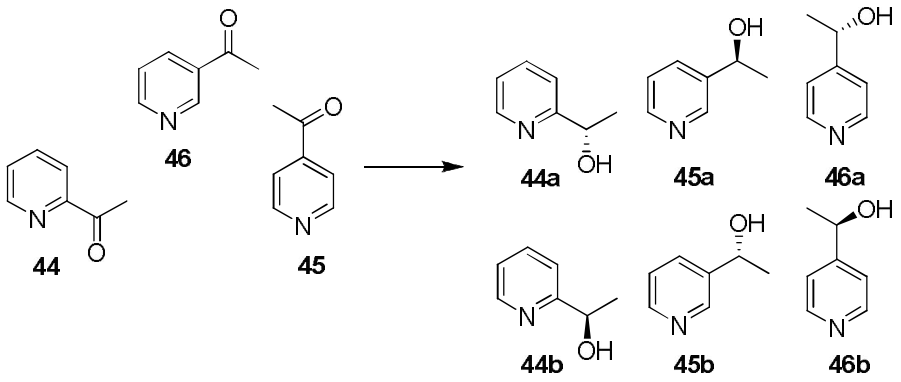


Figura 45. 2-Acetilpiridina (**44**), 3-acetilpiridina (**45**), 4-acetilpiridina (**46**) y los alcoholes que se obtienen de su reducción **44-46 (a, b)** respectivamente.

Tabla 33. Tiempos de retención asignados en GC quiral para los sustratos 2-acetilpiridina (**44**), 3-acetilpiridina (**45**) y 4-acetilpiridina (**46**) y los productos de los mismos obtenidos de su reducción.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
2-acetilpiridina (3)	23.0
(*S*)-2-piridinetanol (3a)	37.3
(*R*)-2-piridinetanol (3b)	36.3
3-acetilpiridina (4)	35.7
(*S*)-3-piridinetanol (4a)	57.9
(*R*)-3-piridinetanol (4b)	57.0
(*S*)-4-piridinetanol (5a)	58.3
(*R*)-4-piridinetanol (5b)	57.5

Análisis de la biotransformación de 3,5-dioxo-1,8-cineol (73).

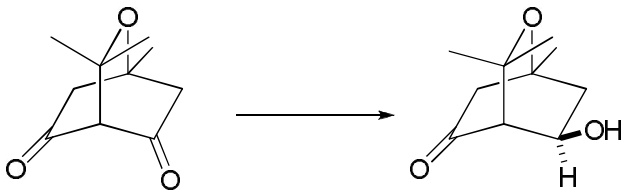
Los productos obtenidos de la biotransformación de la dicetona terpénica **74** mediante *C. máxima* (compuesto mayoritario) y *Wickerhamomyces anomalus* Z1 fueron purificados por

cromatografía en columna empleando como fase móvil hexano/acetato de etilo 1:1. Se inyectaron en GC en forma aislada. Los tiempos de retención se presentan en la tabla 34.

Tabla 34. Tiempos de retención de 3,5-dioxo-1,8-cineol **(73)** y 3-hidroxi-5-oxo-1,8-cineol (**77**).

Compuesto	Tiempo de retención (min)
3,5-dioxo-1,8-cineol	16.7
3-hidroxi-5-oxo-1,8-cineol	22.2

El compuesto obtenido de la biotransformación de **73** mediante *C. maxima* y *Wickerhamomyces anomalus* Z1 fue identificado mediante métodos espectrométricos (RMN y HRMS) como 3-hidroxi-5-oxo-1,8-cineol (**77**) (ver figura 46).



3,5-dioxo-1,8-cineol (**74**) 3-hidroxi-5-oxo-1,8-cineol (**77**)

Figura 46. Biotransformación de 3,5-dioxo-1,8-cineol mediante *C. maxima* y *Wickerhamomyces anomalus* Z1.

Los espectros de RMN fueron realizados en un espectrómetro Bruker Avance DPX-400. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano como referencia. Las constantes de acoplamiento (*J*) están expresadas en Herz. Los espectros de masa de alta resolución (HRMS) fueron realizados en un equipo Bruker Daltonics modelo MicrO TofQ (modo ESI+). La rotación óptica de 77 fue determinada en un polarímetro Kruss Optronic GmbH P8000 en una celda de 0.5 dm (concentración expresada en porcentaje w/v).

3β-Hidroxi-5-oxo-1,8-cineol (8β-hidroxi-1,3,3-trimetil-2-oxabiciclo[2.2.2]octan-5-ona) (77)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.24 (ddd, *J* = 10.3, 6.6, 2.0 Hz, 1H), 2.37 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.26 (dd, *J* = 19.0, 3.3 Hz, 2H), 2.19 (dd, *J* = 14.0, 10.3 Hz, 1H), 2.11 (d, *J* = 18.9 Hz, 1H), 1.91 (ddd, *J* = 14.0, 6.6, 3.2 Hz, 1H), 1.49 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.08 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 211.41, 73.80, 73.08, 65.55, 60.82, 48.30, 42.06, 31.90, 29.97, 26.08. HRMS (ESI-QTOF) Calcd. para $[M+Na]^+$ ($[C_{10}H_{16}NaO_3]^+$): 207.0992; encontrado 207.1002, Δ = 4.8 ppm. $[\alpha]^{D}_{21}$ = +52 (c = 1.5, AcOEt)

Orcinol (5-metilbenzen-1,3-diol) (79)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.24 (dd, *J* = 2.3, 0.6 Hz, 4H), 6.17 (td, *J* = 2.3, 2.3, 0.5 Hz, 2H), 2.23 (d, *J* = 0.6 Hz, 6H), 2.06 (s, 2H).

Análisis de la bio-reducción de acetofenona.

El extracto de las bio-reducciones empleando el sustrato acetofenona fueron sometidas a la siguiente reacción de forma de obtener los derivados acetilados de los alcoholes presentes

en la mezcla. A 800 µL del extracto de biotransformación se le agregaron 200 µL de anhídrido acético y 2 mg de 4,4-Dimetilaminopiridina. La reacción se dejo en agitación por 90 minutos y luego se realizó el workup con 300 µL de agua (x2). Se secó con sulfato de sodio anhidro. Posteriormente se analizaron en Cromatógrafo Perkin-Elemer según lo descrito en la tabla 31. Los tiempos de retención para cada compuesto fueron: acetofenona (**9**) (tR=3.94 min), (*S*)-*1*-feniletanol (**9a**) (tR=5.33min), (*R*)-*1*-feniletanol (**9b**) (tR=5.92) (ver figura 47).

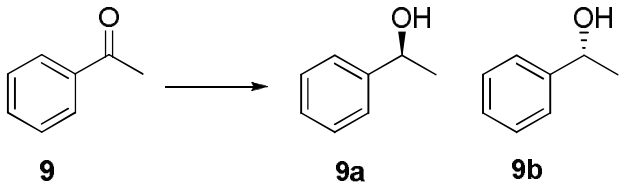


Figura 47. Acetofenona (**9**), (*S*)-1-feniletanol (**9a**), (*R*)-1-feniletanol (**9b**)

Los parámetros utilizados para caracterizar las biotransformaciones se calcularon a partir de áreas obtenidas en los cromatogramas, según las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ conversión} = 100 \times (\sum \text{área}_{\text{productos}} / \text{área}_{\text{sustrato}} + \sum \text{área}_{\text{productos}})$$

$$\% \text{ exceso diastereomérico} = 100 \times ((\text{área}_{\text{diasterómero mayoritario}} - \text{área}_{\text{diasterómero minoritario}}) / (\text{área}_{\text{diasterómero mayoritario}} + \text{área}_{\text{diasterómero minoritario}}))$$

$$\% \text{ exceso enantiomérico} = 100 \times ((\text{área}_{\text{enantiómero mayoritario}} - \text{área}_{\text{enantiómero minoritario}}) / (\text{área}_{\text{enantiómero mayoritario}} + \text{área}_{\text{enantiómero minoritario}}))$$

Identificación de las cepas endófitas con actividad biocatalítica de interés

Identificación de las cepas bacterianas

Pruebas bioquímicas

Se realizó el examen microscópico de células vivas y de frotis teñido por coloración Gram. Se determinó así la forma, movilidad y el Gram de las bacterias en estudio.

En las cepas endófitas de *E. crista-galli* y *F. vulgare* se llevaron a cabo pruebas bioquímicas primarias que comprendieron: morfología, catalasa, oxidasa, prueba de oxido-fermentación (O/F), fermentación de glucosa, presencia de esporas, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis. Con los datos obtenidos de las pruebas bioquímicas primarias se utilizó en manual de Bergey´s (Breed, Murray et al. 1957) para caracterizar las cepas aisladas.

Estudio filogenético

Se realizó la amplificación y el secuenciado de los genes del ARN ribosomal 16S de cada una de las cepas aisladas.

Extracción de ADN genómico bacteriano

A partir de un cultivo de 24 horas en placa de TSA se tomó una colonia y se sembró en 5 mL de TSB. Cada cultivo se incubó a 28°C en un shaker orbital a 150 rpm durante 12 horas. Se

tomó 1 mL de los cultivos y se realizó la extracción del ADN genómico con el kit comercial PureLink ™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) y se siguieron los pasos que se describen a continuación:

Bacterias Gram negativas

1. Se centrifugó 1 mL de cultivo overnight (2 x 10^9 células) a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C.
2. Se suspendió el pellet en 180 µL de buffer de digestión genómico Pure Link ™, 20 µL de Proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó a 55°C por 30 minutos.
3. Se agregaron 20 µL de RNAsa A (20 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos.
4. Se agregaron 200 µL de buffer de lisis Pure Link ™ Genomic Lysis/Binding Buffer y se mezcló con vórtex hasta obtener una solución homogénea.
5. Se agregaron 200 µL de etanol 95% frío y se siguieron con los pasos de purificación.

Bacterias Gram positivas

1. Se centrifugó 1 mL de cultivo overnight (2 x 10^9 células) a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
2. Se suspendió el pellet en 100 µL de una solución de lisozima (10 mg/mL) y se colocaron 5 bolitas de vidrio de 2.5 mm de diámetro a cada eppendorff.
3. Se realizó la rotura mecánica de las células agitando en vortex y luego colocando el tubo Eppendorf en baño de ultrasonido durante 10 minutos (Transsonic 460 Lab-Line).
4. Se incubó a 37°C durante 2 horas agitando con vortex cada 30 minutos.
5. Pasados los 30 minutos se realizó una última exposición a ultrasonido por 10 minutos. 6. Se agregaron 70 µL de SDS 10 % y 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL). Se agitó con vórtex y se incubó durante 2 horas a 65°C, agitando con vortex cada 30 minutos.
6. Se agregaron 100 µL de NaCl 5 M y se agitó con vortex.
7. Se agregaron 80 µL de CTAB 10 % (bromuro de hexadecil trimetil amonio). Se incubó durante 30 minutos a 65°C.
8. Se realizó una extracción con 750 µL cloroformo. Se centrifugó y la fase acuosa se transfirió a un tubo con 420 µL de isopropanol mezclando vigorosamente.
9. Los tubos se enfriaron en hielo y se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante y el precipitado de ADN se lavó con etanol 75 %.
10. Se removió el etanol y el ADN se secó a temperatura ambiente.
11. Se disolvió el ADN en agua miliQ.

Concentración de ADN genómico

1. Se agregaron 500 µL de EtOH 96% y 5 µL de NaCl 4M cada 200 µL de muestra.
2. Se dejó reposar a –20°C overnight.
3. Se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
4. Se descartó el sobrenadante y se suspendió el pellet con 200 µL de EtOH 70%.
5. Se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
6. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente.
7. Se disolvió el ADN genómico en 30 µL de agua miliQ.

Amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction)

A partir de los ADN genómicos obtenidos se amplificó por PCR el gen de ARN ribosomal 16S para cada cepa utilizando los oligonucleótidos universales para Eubacterias (Weisburg, Barns et al. 1991): 27 forward (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') y 1492 reverse (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3'). El tamaño del fragmento obtenido fue de 1.5 Kb. Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo con el protocolo provisto por Invitrogen para la enzima Taq polimerasa.

En la figura 48 se muestra el programa de PCR empleado para la amplificación de ARN ribosomal de las cepas bacterianas endófitas.

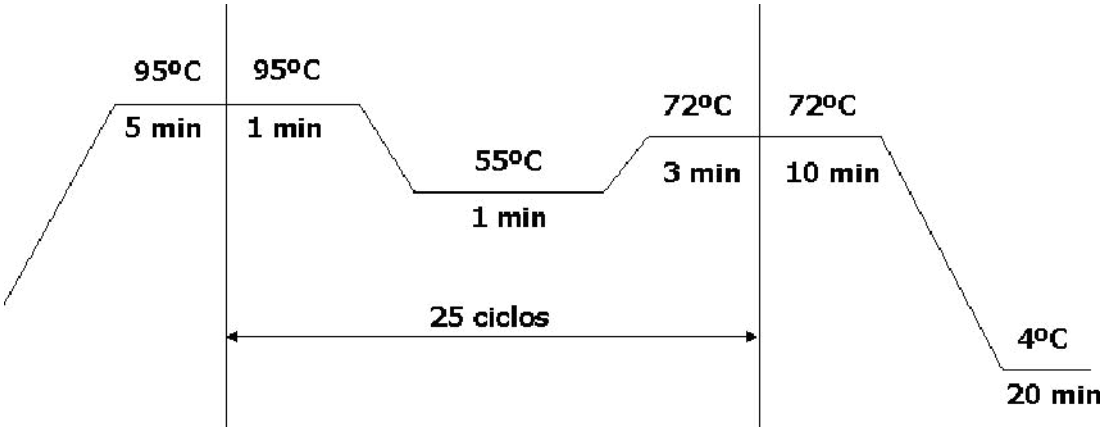


Figura 48. Programa de PCR utilizado para la amplificación de ARN ribosomal de las cepas bacterianas endófitas.

Visualización y determinación de tamaños de los productos de amplificación

Tanto la integridad y cantidad de ADN genómico como de los productos de amplificación se les realizó realizó la electroforesis en gel de agarosa 0.8% p/v en buffer TBE 0.5X y teñido con bromuro de etidio (5 µg/µL). Se corrió en paralelo un marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb DNA LADDER, Fermentas ®) de forma de determinar sus tamaños y poder estimar concentración de ADN. Se fotografió bajo luz UV con cámara digital Kodak DC120 (Kodak digital Science) y se convirtió a un archivo de imagen usando el Sistema de Análisis y Documentación de Electroforesis 120 de Kodak (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

Secuenciado de los genes del ARN ribosomal 16S.

Los productos de PCR fueron secuenciados con un secuenciador automático ABI 3730XL Applied Biosystems en Macrogen Corp. Seoul, Korea.

Para el secuenciado de las cepas endófitas aisladas a partir de hojas de *E. crista-galli* y la cepa bacteriana aislada del fruto de *C. maxima* se emplearon los primers generales para Eubacterias: 27 forward (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') y 1492 reverse (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3').

Para el secuenciado de las cepas endófitas aisladas a partir de la raíz de *R. sativus* se utilizaron los primers generales para Eubacterias: 27 forward (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG), 357 forward (CTCCTACGGGAGGCAGCAG), 1525 reverse (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA), 15 forward (GTGCCAGCCGCCGCGGTAA), 926

foward (AAACTCAAAGGAATTGACGG), 905 reverse (CCGTCAATTCACTTTAG), 519 reverse (GTATTACCGCGGCTGCTG).

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron analizadas, alineadas y ensambladas utilizando el programa Vector NTI 10.3 Advance™. La secuencias depuradas fueron comparadas con secuencias relacionadas en la base de datos del GenBank usando BLAST (National Center for Biotechnology Information) (Altschul, Gish et al. 1990).

Identificación de l as cepas fúngicas

Levaduras

Observación al microscopio: morfología

A partir de un cultivo de 48 horas en placa de PDA se realizó un frotis y se tiñó con cristal violeta. Se observó la morfología al microscopio (40X).

Estudio filogenético

Para la extracción del ADN genómico de las cepas de levadura endófitas de *D. carota* y para la cepa endófita de *F. margarita* se utilizó el protocolo modificado de Wach y colaboradores (Wach, Pick et al. 1994):

1. Se inoculó la levadura en un matraz con 30 mL del medio YPD y se incubó a 30ºC durante 48 horas (hasta alcanzar una densidad celular aproximada de 2 x 10^8 cél./ mL).
2. Las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos.
3. Las células se resuspendieron en 10 mL de EDTA 10 mM, pH 8.0 y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos.
4. Se suspendieron las células en 3.0 mL de una solución de sorbitol 1.0 M, EDTA 0.1 mM y ditiotreitol 50 mM, pH 7.5. Se agregó 1.0 mg de liticasa (Sigma-Aldrich) disuelta en 200 µl de una solución de sorbitol 1.0 M y se incubó a 37ºC, agitando ocasionalmente, hasta que ocurrió la conversión de las células en protoplastos (15-20 min).
5. Los protoplastos se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente.
6. Se suspendieron los protoplastos en 3.0 mL de Tris-HCL 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8.0 mediante la toma y descarga, en forma suave, con pipeta automática. Posteriormente se mezclo con 0.3 mL de SDS 10% y se incubó a 65 ºC durante 30 minutos.
7. Se adicionaron 1.9 mL de acetato de potasio 5 M, se mezcló y se dejó reposar en hielo por más de 60 minutos.
8. Se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo de polipropileno de 15 mL.
9. Se agregaron al sobrenadante, 4.0 mL de etanol absoluto enfriado en hielo. Se mezcló para que los ácidos nucleícos y las proteínas precipitaran a temperatura ambiente.
10. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 4.0mL de etanol 50% durante 5 minutos para permitir que las sales difundan fuera del pellet. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos.
11. Se descartó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente. Se disolvieron los ácidos nucleicos en 3.0 mL de Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7.5 durante 1 hora.

12. Se agregaron 150 µL de RNAsa A (1 mg/mL) y se incubó durante 30 minutos a 37 ºC.
13. Se agregaron 3.0 mL de isopropanol, se mezcló y se centrifugó durante 15 minutos a 10000 rpm. El ADN precipitado se lavó con 2 mL de isopropanol 50%.
14. Se removió el isopropanol 50% y el ADN se secó a 45 ºC. Se resuspendió con 0.5 mL de agua miliQ estéril y se conservó a 4°C.

Para la extracción del ADN genómico de la cepa de levadura endófita de *F. vulgare* se realizó el siguiente protocolo:

1. Se inoculó la levadura en una placa de PDA y se incubó por 24 horas a 25°C.
2. Se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL, 100 µL de buffer de extracción (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1mM EDTA) y se agregaron 2 ansadas bien cargadas de la cepa correspondiente. Se agregaron 5-10 perlas de vidrio y 100 µL de una solución de fenol, cloroformo, alcohol isoamílico en una relación 25:24:1.
3. Para la ruptura de la pared celular se agitó en vortex a máxima velocidad durante 5 minutos, enfriando en baño de hielo cada minuto.
4. Se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm
5. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf estéril de 1.5 mL.
6. Se agregó un volumen de isopropanol y se invirtió el tubo suavemente 2 o 3 veces. Se dejó reposar a -20ºC por dos horas. Se centrifugó por 10 minutos a máxima velocidad.
7. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente.
8. El ADN se disolvió en 30 µL de agua miliQ estéril y se conservó a 4°C.

Hongos filamentosos

Observación al microscopio: morfología

A partir de un cultivo de 7 días en placa de PDA se tomó mediante cinta adhesiva micelio del borde de las colonias, se colocó en el portaobjetos sobre una gota de agua y se observó la morfología al microscopio (40X). Se utilizó el manual de identificación “Introduction to food-borne fungi” (Samson and van Reenen Hoekstra 1988) para comparar con las especies conocidas y llegar a una aproximación del género.

Estudio filogenético

Extracción de ADN

1. Se inocularon las cepas fúngicas en medio YES y se incubaron a 25°C durante 3 días.
2. Se separó el micelio y se secó con papel absorbente estéril hasta la extracción completa del líquido.
3. Se transfirió una porción del micelio a un tubo eppendorf de 2 mL de fondo plano. Posteriormente, se congeló con nitrógeno líquido y se molió con una varilla de vidrio estéril.
4. Se agregaron 500 µL de buffer de lisis (100 mM Tris, 20 mM EDTA, 250 mM NaCl, 2% SDS) y se agitó la mezcla mediante vórtex.
5. Se incubó durante una hora a 65 ºC.
6. Se agregó 1 volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1).
7. Se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm y a 4ºC.
8. Se separó el sobrenadante a nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL estéril y se agregaron 150 µL de NaCl 1M y 150 µL de H_2O miliQ estéril.

9. El ADN se precipitó con 600 µL de isopropanol frío. Se invirtió el tubo suavemente 2 o 3 veces y se incubó a -20°C durante dos horas.
10. Se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm a 4°C.
11. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 µL de EtOH 70%.
12. Se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante.
13. El pellet se secó a temperatura ambiente y se suspendió en 30 µL agua miliQ.
14. Se agregó 1 µL de RNAsa (10mg/ml) y se agitó mediante vórtex para asegurar una buena interacción con todo el ADN.
15. Se incubó durante una hora a 37 °C.
16. Se agregaron 150 µL de NaCl 1M y 150 µL de H2O miliQ estéril.
17. Se agregaron 300 µL de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1), se agitó mediante vórtex y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 r.p.m a 4°C.
18. Se separó el sobrenadante a nuevo tubo eppendorf 1.5 mL estéril y se agregaron 200 µL de isopropanol frío. Se invirtió el tubo suavemente 2 o 3 veces y se dejó reposar a -20°C por dos horas.
19. Se agregaron 100 µL de EtOH 70% y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 r.p.m a 4°C.
20. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente.
21. El ADN se disolvió en 30 µl agua miliQ estéril.

Visualización y cuantificación de ADN

Los ADN extraídos de las cepas fúngicas fueron visualizados y cuantificados en gel de agarosa de acuerdo a lo descrito anteriormente.

Amplificación de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2 y la región D1-D2

A partir de los ADN genómicos de las cepas endófitas fúngicas, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de la región ITS1–5.8S–ITS2 para lo cual se empleó el par de primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)–ITS4 (TCCTCCCGCTTATTGATATGC) (White, Bruns et al. 1990) y el dominio D1/D2 de los genes de la LSU RNA $_a$ para lo cual se emplearon los primers ITS1-F y NL-4 (5´-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3) (Kurtzman and Robnett 1997). El tamaño de los fragmentos esperados fue de 600 pb para la región ITS1-ITS4 y de 1200 pb para la región ITS1-D1-D2.

En la figura 49 se muestran las zonas que codifican para el ARN ribosomal que fueron amplificadas.

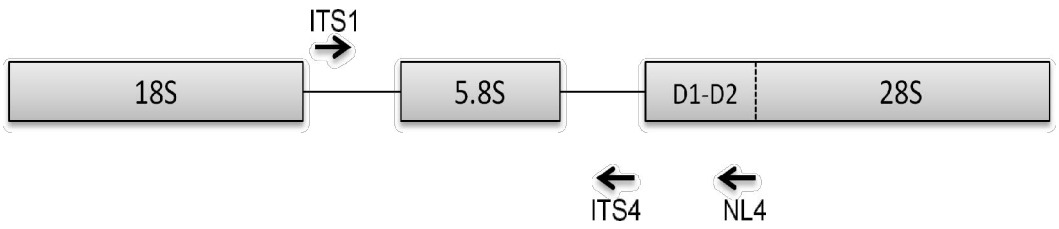


Figura 49. Regiones altamente conservadas de los genes de ARN ribosomal en hongos que fueron utilizadas para la amplificación de los ADN de las cepas endófitas aisladas.

En la figura 50 se muestra el programa de PCR empleado para la amplificación de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2 y la región D1-D2.

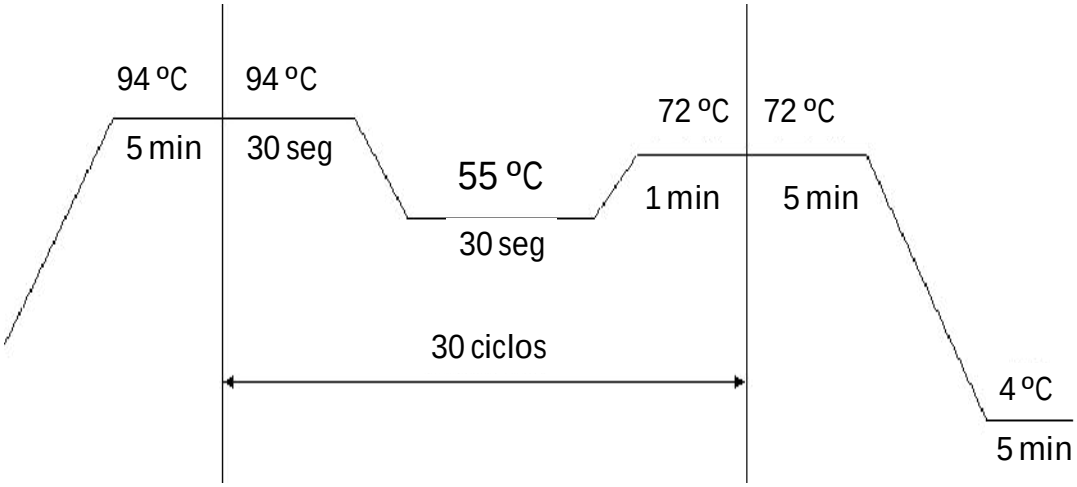


Figura 50. Programa de PCR utilizado para la amplificación de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2 y la región D1-D2.

Secuenciado

Los productos de PCR fueron secuenciados con un secuenciador automático ABI 3730XL Applied Biosystems en Macrogen Corp. Seoul, Korea.

En la tabla 35 se muestran los primers internos específicos que se utilizaron para secuenciar los amplicones generados, además de los primers universales utilizados para la PCR anteriormente descriptos.

Tabla 35. Primers internos específicos utilizados en la secuenciación de los productos de PCR obtenidos de las cepas endófitas fúngicas.

NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL2A	CTTGTTCGCTATCGGTCTC
NL3A	GAGACCGATAGCGAACAAG

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron analizadas, alineadas y solapadas utilizando el programa Vector NTI 10.3 Advance™. La secuencias depuradas fueron comparadas con secuencias relacionadas en la base de datos del GenBank usando BLAST (National Center for Biotechnology Information) (Altschul, Gish et al. 1990).

BIBLIOGRAFIA

Abrahão, M. R., Molina, G., et al. (2013). "*Endophytes: Recent developments in biotechnology and the potential for flavor production.*" Food Res. Int. **52**: 367–372.

Abreu-Tarazi, M. F., Navarrete, A. A., et al. (2010). "*Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated "axenic" pineapple microplants revealed by PCR–DGGE.*" World J. Microb. Biot. **26**: 555-560.

Agostini, E., Milrad de Forchetti, S. R., et al. (1997). "*Production of peroxidases by hairy roots of Brassica napus.*" Plant Cell Tiss. Org. Cult. **47**: 177-182.

Agusta, A., Maehara, S., et al. (2005). "*Stereoselective Oxidation at C-4 of Flavans by the Endophytic Fungus Diaporthe sp. Isolated from a Tea Plant.*" Chem. Pharm. Bull. **53**: 1565-1569.

Akakabe, Y. and Naoshima, Y. (1993). "*The mechanistic pathway of the biotransformation of acetophenone by immobilized cell cultures of Gardenia.*" Phytochemistry **32**: 1189-1191.

Akakabe, Y. and Naoshima, Y. (1994). "*Biotransformation of acetophenone with immobilized cells of carrot, tobacco and gardenia.*" Phytochemistry **35**: 661–664.

Akakabe, Y., Takahashi, M., et al. (1995). "*Biocatalytic preparation of chiral alcohols by enantioselective reduction with immobilized cells of carrot.*" J. Chem. Soc. Perk. T. 1 **10**: 1295 - 1298.

Akihiro, O., Akihiro, I., et al. (2001). "*Convenient Synthesis of a Central 2,3,6-Trisubstituted Pyridine Skeleton of a Macrobicyclic Antibiotic, Cyclothiazomycin.* " **5**: 380 - 381.

Aldabalde, A., Arcia, P., et al. (2007). "*Enzymatic synthesis of chiral heteroaryl using plant fragments as the only biocatalyst and reducing agent.*" Green Chem. Lett. Rev. **1**: 25-30.

Altschul, S. F., Gish, W., et al. (1990). "*Basic local alignment search tool.*" J. Mol. Biol. **215**: 403-410.

Alves Ferreira, D., Costa da Silva, R., et al. (2012). "*Lens culinaris: A New Biocatalyst for Reducing Carbonyl and Nitro Groups.*" Biotechnol. Bioproc. E. **17**: 407-412.

Andrade, L. H., Keppler, A. F., et al. (2004). "*Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives.*" J. Mol. Catal. B: Enzym. **31**: 129–135.

Andrade, L. H., Utsunomiya, R. S., et al. (2006). "*Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants.*" J. Mol. Catal. B: Enzym. **38**: 84-90.

Assunção, J. C. C., Machado, L. L., et al. (2008). "*Sugar cane juice for the bioreduction of carbonyl compounds.*" J. Mol. Catal. B: Enzym. **52**: 194-198.

Bailey, D., O'Hap, D., et al. (1993). "*Preparation of Highly Enantiopure Pyridylethanols by Baker's Yeast Reductions.*" Tetrahedron-Asymmetr. **4**: 1255-1258.

Baldassarre, F., Bertoni, G., et al. (2000). "*Preparative synthesis of chiral alcohols by enantioselective reduction with Daucus carota root as biocatalyst.* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **11**: 55-58.

Banerjee, S., Singh, S., et al. (2012). "*Biotransformation studies using hairy root cultures—a review.*" Biotechnol. Adv. **30**: 461-468.

Bascom-Slack, C. A., Arnold, A. E., et al. (2012). "*Student-Directed Discovery of the Plant Microbiome and Its Products.* " Science **338**: 485-486.

Baskar, B., Ganesh, S., et al. (2004). "*Highly stereoselective reduction of 4-Aryl-2-oxo but-3-enoic carboxylic esters by plant cell culture of Daucus carota.* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **27**: 13-17.

Bastos, D. Z., Pimentel, I. C., et al. (2007). "*Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi.*" Phytochemistry **68**: 834-839.

Bastos, D. Z. L., Pimentel, I. C., et al. (2004). "*Fungi Associated With Bark of Platanus orientalis L.*" Estud. Biol. **26**: 37-41.

Bernardi, R., Bravo, P., et al. (1988). "*Homochiral fluoro-organic compounds. Microbial reduction of 1-fluoro-3-(p-tolylsulphonyl) propan-2-one and of 1-fluoro-3-(p-tolylsulphenyl) propan-2-one.*" J. Chem. Soc. Perk. T. **10**: 2831-2834.

Besse, P., Sokoltchik, T., et al. (1998). "*Chemoenzymatic synthesis of [alpha]-halogeno-3-octanol and 4-or 5-nonanols. Application to the preparation of chiral epoxides.* " Tetrahedron-Asymmetr. **9**: 4441-4457.

Blanchard, N. and van de Weghe, P. (2006). "*Daucus carota L. mediated bioreduction of prochiral ketones.*" Org. Biomol. Chem. **4**: 2348-2353.

Blaser, H.-U. (2013). Chirality and its implications for the pharmaceutical industry. Rend. Lincei. Milan, Springer **24**.

Bohman, B., Cavonius, L. R., et al. (2009). "*Vegetables as biocatalysts in stereoselective hydrolysis of labile organic compounds.* " Green Chem. Lett. Rev. **11**: 1900-1905.

Borges, K. B., Borges, W. D. S., et al. (2007). "*Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine.* " Appl. Microbiol. Biotechnol. **77**: 669–674.

Borges, K. B., Borges, W. D. S., et al. (2008). "*Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi.*" J. Pharm. Biomed. **46**: 945-952.

Borges, K. B., Pupo, M. T., et al. (2009). "*Enantioselective analysis of propranolol and 4-hydroxypropranolol by CE with application to biotransformation studies employing endophytic fungi.*" Electrophoresis **30**: 3910-3917.

Borges, W. d. S., Borges, K. B., et al. (2009). "*Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions.*" Curr. Org. Chem. **13**: 1137-1163.

Borges, W. D. S., Borges, K. B. B., P.S. , et al. (2009). "*Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions.*" Curr. Org. Chem. **13**: 1137–1163.

Bradshaw, C. W., W., H., et al. (1992). "*Lactobacillus kefir alcohol dehydrogenase: a useful catalyst for synthesis.*" J. Org. Chem. **57**: 1532–1536.

Breed, R. S., Murray, E. G. D., et al. (1993). Bergey's manual of determinative bacteriology . Baltimore, U.S.A, Williams & Wilkins Co.

Bruni, R., Fantin, G., et al. (2006). "*Plants-mediated reduction in the synthesis of homochiral secondary alcohols.*" Tetrahedron-Asymmetr. **17**: 2287–2291.

Bruni, R., Fantin, G., et al. (2002). "*Plants in organic synthesis: an alternative to baker's yeast.*" Tetrahedron Lett. **43** 3377–3379.

Bucciarelli, M., Forni, A., et al. (1989). "*Biotransformations of fluorinated sulphenyl and sulphonyl compounds.*" Tetrahedron **45**: 7505-7514.

Buisson, D. and Azerad, R. (1986). "*Diastereoselective and enantioselective microbial reduction of cyclic alpha-alkyl beta-ketoesters.*" Tetrahedron Lett. **27**: 2631-2634.

Buisson, D., Azerad, R., et al. (1990). "*Stereocontrolled reduction of alpha-methyl beta-ketoesters by Geotrichum candidum.*" Biocatal. Biotransform. **3**: 85-93.

Buisson, D., Azerad, R., et al. (1991). "*Stereocontrolled reduction of β-ketoesters by< i> Geotrichum candidum</i>. Preparation of D-3-hydroxyalkanoates.*" Tetrahedron-Asymmetr. **2**: 987-988.

Buisson, D., Henrot, S., et al. (1987). "*New chiral building blocks by microbial asymmetric reduction: a direct access to functionalized 2R, 3R-and 2S, 3R-2-methyl-3-hydroxy butyrate synthons.*" Tetrahedron Lett. **28**: 5033-5036.

Cabon, O., Buisson, D., et al. (1995). "*The microbial reduction of 2-chloro-3-oxoesters.*" Tetrahedron-Asymmetr. **6**: 2199-2210.

Cahn, R. S. and Ingold, C. K. (1951). "*Specification of configuration about quadricovalent asymmetric atoms.*" J. Chem. Soc.: 612-622.

Carman, R. M., Robinson, W. T., et al. (2005). "*The 3-hydroxycineoles.*" Aust. J. Chem. **58**: 785-791.

Caron, D., Coughlan, A. P., et al. (2005). "*Stereoselective reduction of ketones by Daucus carota hairy root cultures.*" Biotechnol. Lett. **27**: 713-716.

Carrere, R. (1990). El bosque natural uruguayo: utilización tradicional y usos alternativos CIEDUR. Montevideo, Uruguay.

Carroll, G. (1988). "*Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont.*" Ecology **69**: 2-9.

Casas, D. A., Pitta-Alvarez, S. I., et al. (1998). "*Biotransformation of hydroquinone by hairy roots ofBrugmansia candida and effect of sugars and free-radical scavengers.*" Appl. Biochem. Biotech. **69**: 127-136.

Clay, K. (1998). "*Fungal Endophytes of Grasses: A Defensive Mutualism Between Plants and Fungi.*" Ecology **69**: 10-16.

Comasseto, J. V., Omori, A. T., et al. (2004). "*Preparation of chiral organochalcogeno-a-methylbenzyl alcohols via biocatalysis. The role of Daucus carota root.* " Tetrahedron Lett. **45**: 473-476.

Cordell, G. A., Lemos, T. l. G., et al. (2007). "*Vegetables as Chemical Reagents.*" J. Nat. Prod. **70**: 478-492.

Csuk, R. and Glaenzer, B. I. (1991). "*Baker's yeast mediat ed transformations in organic chemistry.*" Chem. Rev. **91**: 49-97.

Curtis, T. P. and Sloan, W. T. (2004). "*Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology.* " Curr. Opin. Microbiol. **7**: 221-226.

Chadha, A., Manohar, M., et al. (1996). "*Asymmetric reduction of 2-oxo-4-phenylbutanoic acid ethyl ester by Daucus carota cell cultures.* " Tetrahedron-Asymmetr. **7**: 1571-1572.

Chan, P. C. M. and Chong, J. M. (1988). "*Asymmetric reduction of acylstannanes. Preparation of enantiomerically enriched .alpha.-alkoxystannanes.* " J. Org. Chem. **53**: 5584-5586.

Chen, Q.-A., Ye, Z.-S., et al. (2013). "*Homogeneous palladium-catalyzed asymmetric hydrogenation.*" Chem. Soc. Rev. **42**: 497-511.

Cho, B. T. (2009). "*Recent development and improvement for boron hydride-based catalytic asymmetric reduction of unsymmetrical ketones.* " Chem. Soc. Rev. **38**: 443.

Dahl, A. C., Fjeldberg, M., et al. (1999). "*Baker's yeast: improving the d-stereoselectivity in reduction of 3-oxo esters.*" Tetrahedron-Asymmetr. **10**: 551-559.

Daisy, B., Strobel, et al. (2002). "*Naphthalene, an insect repellent, is produced by Muscodor vitigenus, a novel endophytic fungus.* " Microbiol. Mol. Biol. R. **148**.

Davies, J. and Jones, J. B. (1979). "*Enzymes in organic synthesis. 16. Heterocyclic ketones as substrates of horse liver alcohol dehydrogenase. Stereospecific reductions of 2-substituted tetrahydrothiopyran-4-ones.* " J. Am. Chem. Soc. **101**: 5405–5410.

de Almeida, C. V., Andreote, F. D., et al. (2009). "*Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts.*" World J. Microb. Biot. **25**: 1757-1764.

de Boggiatto, M. V., de Heluani, C. S., et al. (1987). "*Regiospecific Functionalization of the Monoterpene Ether 1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane (1,8-cineole). Synthesis of the Useful Bridged γ-lactone 1,3-dimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octan-3→5-olide.* " J. Org. Chem. **52**: 1505-1511.

Defranceschi Oliveira, A. C., Farion Watanabe, F. M., et al. (2012). "*Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves.* " Biocatal. Agr. Biotechnol.

Deol, B. S., Ridley, D., et al. (1976). "*Asymmetric reductinon of carbonyl compounds by yeast. II. Preparation of optically active α-and β-hydroxy carboxylic acid derivatives.* " Aust. J. Chem. **29**: 2459-2467.

DeShong, P., Lin, M.-T., et al. (1986). "*Total synthesis of the (+)-pheromone of the male swift moth hepialus hecta L.*" Tetrahedron Lett. **27**: 2091-2094.

Dondoni, A., Fantin, G., et al. (1988). "*Preparation and reactivity of metallated (silicon and tin) thiazoles and oxazoles with carbon electrophiles-new approaches towards heterocyclic and acyclic building-blocks.*" Gazz. Chim. Ital **118**: 211.

Dutler, H., Van Der Baan, J. L., et al. (1977). "*Dihydroxyacetone Reductase from Mucor javanicus.*" Eur. J. Biochem. **75**: 423–432.

Edinson, Y.-V., Jordi, E. J., et al. (2013). "*Biocatalytic preparation of dichloropropyl acrylates. Application to the synthesis of poly(dichloropropyl acrylates).* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **92**: 7-13.

Ema, T., Yagasaki, H., et al. (2006). "*Asymmetric reduction of ketones using recombinant E. coli cells that produce a versatile carbonyl reductase with high enantioselectivity and broad substrate specificity.*" Tetrahedron-Asymmetr. **62**: 6143–6149.

Esposito-Polesi, N. P. (2011). "*Microrganismos endófitos ea cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas.*" Rev. Bras. Bioc. **9**: 533-541.

Faber, K. (2011). Biotransformations in Organic Chemistry . Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.

Fantin, G., Fogagnolo, M., et al. (1996). "*Anti-Prelog microbial reduction of prochiral carbonyl compounds.*" Tetrahedron **52**: 3547-3552.

Ferraz, H. M. C., Bianco, G. G., et al. (2008). "*Bioreduction of substituted a-tetralones promoted by Daucus carota root.*" Quim. Nova **31**: 813-817.

Feske, B. D., Kaluzna, I. A., et al. (2005). "*Enantiodivergent, Biocatalytic Routes to Both Taxol Side Chain Antipodes.*" J. Org. Chem. **70**: 9654-9657.

Fonseca, A. M., Monte, F. J. Q., et al. (2009). "*Coconut water (Cocos nucifera L.) A new biocatalyst system for organic synthesis.* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **57**: 78–82.

Frater, G., Müller, U., et al. (1984). "*The stereoselective α-alkylation of chiral β-hydroxy esters and some applications thereof.* " Tetrahedron **40**: 1269-1277.

Fuganti, C., Grasselli, P., et al. (1985). "*On the steric course of baker's yeast mediated reduction of alkyl 4-azido-and 4-bromo-3-oxobutyrate. Synthesis of (R)-and (S)-carnitin.* " Tetrahedron Lett. **26**: 101-104.

Fujisawa, T., Itoh, T., et al. (1984). "*Enantiospecific synthesis of optically pure (3S)-hydroxy esters by the stereocontrolled yeast reduction of α-sulfenyl-β-ketoesters.* " Tetrahedron Lett. **25**: 5083-5086.

Fujisawa, T., Onogawa, Y., et al. (1998). "*Asymmetric reductions of (trifluoroacetyl) biphenyl derivatives with bakers' yeast and with< i> Geotrichum candidum</i> acetone powder.* " Tetrahedron **54**: 4267-4276.

Gamenara, D., Seoane, G., et al. (2013). Redox Biocatalysis. Fundamentals and Applications. Hoboken, New Jersey. USA, John Wiley & Sons, Inc. .

Gangadevi, V. and Muthumary, J. (2008). "*Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus Bartalinia robillardoides Tassi, isolated from a medicinal plant, Aegle marmelos Correa ex Roxb.*" World J. Microb. Biot. **24**: 717-724.

García-Urdiales, E., Alfonso, I., et al. (2005). "*Enantioselective Enzymatic Desymmetrizations in Organic Synthesis.* " Chem. Rev. **105**: 313-354.

Geissman, T. A. (2011). The Cannizzaro Reaction. Organic Reactions , John Wiley & Sons, Inc.**:** 94–113.

Giri, A., Dhingra, V., et al. (2001). "*Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects.* " Biotechnol. Adv. **19**: 175–199.

Guehi, T. S., Dingkuhn, M., et al. (2007). "*Identification and lipase-producing abilities of moulds isolated from ivorian raw cocoa beans.* " Res. J. Agric. Biol. Sci. **3**: 838–843.

Gupta, G., Panwar, J., et al. (2012). Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria as Biofertilizer. Sust. Agric. Rev., Springer **11:** 183-221.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., et al. (1997). "*Bacterial endophytes in agricultural crops.*" Can. J. Microbiol. **43**: 895-914.

Hamada, H., Umeda, N., et al. (1988). "*The reductive transformation of decanones with immobilized cells of Nicotiana tabacum.* " Plant Cell Rep. **7**: 493-494.

Herrero, M., de la Roza, C., et al. (1999). "*Simultaneous and sequential fermentations with yeast and lactic acid bacteria in apple juice.* " J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **22**: 48-51.

Hildebrandt, P., Riermeier, T., et al. (2001). "*Efficient resolution of prostereogenic arylaliphatic ketones using a recombinant alcohol dehydrogenase from Pseudomonas fluorescens.*" Tetrahedron-Asymmetr. **12**: 1207–1210

Hirata, T., Hamada, H., et al. (1982). "*Stereoselectivity of the reduction of carvone and dihydrocarvone by suspension cells of Nicotiana tabacum.* " Phytochemistry **21**: 2209-2212.

Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., et al. (2011). "*Enzymatic reductions for the chemist.*" Green Chemistry **13**: 2285-2314.

Hou, C., Patel, R., et al. (1981). "*Stereopecificity and Other Properties of a Novel Secondary-Alcohol-Specific Alcohol Dehydrogenase.* " Eur. J. Biochem. **119**: 359-364.

Hummel, W. (1990). "*Reduction of acetophenone to R(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from Lactobacillus kefir.* " Appl. Microbiol. Biotechnol. **34**: 15-19.

Hurek, T., Handley, L., et al. (2002). "*Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state.*" Mol. Plant-Microbe Interact. **15**: 233-242.

Ikeda, H., Sato, E., et al. (1996). "*Yeast-mediated synthesis of optically active diols with C_2-symmetry and (R)-4-pentanolide.*" Tetrahedron **52**: 8113-8122.

Inoue, K., Makino, Y., et al. (2005). "*Production of (R)-chiral alcohols by a hydrogen-transfer bioreduction with NADH-dependent Leifsonia alcohol dehydrogenase (LSADH).*" Tetrahedron-Asymmetr. **16**: 2539–2549.

Janssen, F. a. D. B., Kamerbeek, N. M., et al. (2003). "*Substrate Specificity and Enantioselectivity of 4-Hydroxyacetophenone Monooxygenase.* " Appl. Environ. Microbiol. **69**: 419-426.

Ji, Y., Bi, J.-N., et al. (2006). "*Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol.*" Chinese J. Biotech. **22**: 1-6.

Jian-Xin, G., Zu-Yi, L., et al. (1993). "*Reductive biotransformation of carbonyl compounds—application of fungus, Geotrichum sp. G38 in organic synthesis.* " Tetrahedron **49**: 5805-5816.

Johnson, M., Dahlman, D., et al. (1985). "*Insect Feeding Deterrents in Endophyte-Infected Tall Fescue.*" Appl. Environ Microbiol. **49**: 568-571.

Jones, A. and Veliky, I. A. (1981). "*Biotransformation of cardenolides by plant cell cultures II. Metabolism of gitoxigenin and its derivatives by suspension cultures of Daucus carota.* " Planta Med. **62**: 160-166

Jones, J. B. (1986). "*Enzymes in organic synthesis.*" Tetrahedron-Asymmetr. **42**: 3351–3403

Kaluzna, I. A., Feske, B. D., et al. (2005). "*Stereoselective, Biocatalytic Reductions of α-Chloro-β-keto Esters.*" J. Org. Chem. **70**: 342-345.

Kaluzna, I. A., Matsuda, T., et al. (2004). "*Systematic Investigation of Saccharomyces cerevisiae Enzymes Catalyzing Carbonyl Reductions.* " J. Am. Chem. Soc **126**: 12827-12832.

Kanho, H., Yaoya, S., et al. (2005). "*Biotransformation of benzaldehyde-type and acetophenone-type derivatives by Pharbitis nil hairy roots.* " Chem. Pharm. Bull. **53**: 361-365.

Kawai, Y., Tsujimoto, M., et al. (1994). "*Asymmetric Reduction of β-Keto Esters with an Enzyme from Bakers' Yeast.*" Bull. Chem. Soc. Jpn. **67**: 524-528.

Kawano, S., Horikawa, M., et al. (2003). "*Microbial enantioselective reduction of acetylpyridine derivatives.*" Biosci., Biotechnol. Biochem. **67**: 809-814.

Kitazume, T. and Lin, J. T. (1987). "*Synthetic approach to optically pure trifluoromethylated compounds.*" J. Fluorine Chem. **34**: 461-470.

Knoch, T., Stanley, H., et al. (1993). "*Endophytic Fungi Alter Foraging and Dispersal by Desert Seed-Harvesting Ants.*" Oecologia **95**: 470-473.

Kometani, T., Yoshii, H., et al. (1996). "*Large-scale production of chiral alcohols with bakers' yeast.*" J. Mol. Catal. B: Enzym. **1**: 45-52.

Kroutil, W., Mang, H., et al. (2004). "*Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols.*" Curr. Opin. Chem. Biol. **8**: 120–126.

Kumar, A. and Ahmad, A. (2013). "*Biotransformation of vinblastine to vincristine by the endophytic fungus Fusarium oxysporum isolated from Catharanthus roseus.*" Biocatal. Biotransform.**31**: 89-93.

Kumar, S. and Kaushik, N. (2013). "*Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review.*" Phytochem. Rev.**11**: 507-522.

Kumaraswamy, G. and Ramesh, S. (2003). "*Soaked Phaseolus aureus L: an efficient biocatalyst for asymmetric reduction of prochiral aromatic ketones.* " Green Chem. **5**: 306-308.

Kurbanoglu, E. B., Zilbeyaz, K., et al. (2007). "*Highly enantioselective reduction of acetophenone by locally isolated Alternaria alternata using ram horn peptone.* " Tetrahedron-Asymmetr. **18**: 1529–1532.

Kurina-Sanz, M., Hernandez, T. C., et al. (2000). "*Enhancement of tessaric acid production in tessaria absinthioides cell suspension culture.* " Plant. Cell. Rep. **19**: 812-824.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., et al. (2011). The Yeasts: A Taxonomic Study . San Diego, USA.

Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (1997). " *Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S)ribosomal DNA gene.* " J. Clin. Microbiol. **35**: 1216–1223.

Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (1998). " *Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences.* " A. Van Leeuw. J. Microb. **73**: 331–371.

Kusari, P., Kusari, S., et al. (2012). "*Endophytic fungi harbored in Cannabis sativa L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens.* " Fungal Divers. : 1-15.

Kusari, S., Hertweck, C., et al. (2012). "*Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites.*" Chem. Biol. **19**: 792-798.

Lacheretz, R., Gomez Pardo, D., et al. (2008). "*Daucus carota mediated-reduction of cyclic 3-oxo-amines.*" Org. Lett. **11**: 1245-1248.

Lakshmi, C. S., Reddy, G. R., et al. (2011). "*Asymmetric Reduction of Heteroaryl Methyl Ketones Using Daucus carota.*" Green Sust. Chem. **1**: 117-122.

Lam, L. K. P., Gair, I. A., et al. (1988). "*Enzymes in organic synthesis. 42. Stereoselective horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed reductions of heterocyclic bicyclic ketones.* " J. Org. Chem. **53**: 1611–1615.

Li, J., Sidhu, R., et al. (1998). "*The induction of taxol production in the endophytic fungus Periconia sp. from Torreya grandifolia.* " J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **20**: 259-264.

Lin, L. and Xu, X. (2013). "*Indole-3-acetic acid production by endophytic Streptomyces sp. En-1 isolated from medicinal plants.* " Curr. Microbiol. : 1-9.

Liu, X., Pan, Z. G., et al. (2010). "*Enantioselective reduction of acetophenone analogues using carrot and celeriac enzymes system.* " Chinese Chem. Lett. **21**: 305–308

Liu, X., Wang, Y., et al. (2012). "*Asymmetric reduction of a-hydroxy aromatic ketones to chiral aryl vicinal diols using carrot enzymes system.* " Chinese Chem. Lett. **23**: 635–638.

Lucero, M. E., Unc, A., et al. (2011). "*Endophyte microbiome diversity in micropropagated Atriplex canescens and Atriplex torreyi var griffithsii.* " Plos one **6**: e17693.

Luzzio, F. A. and Duveau, D. Y. (2002). "*Enzymatic resolution of the 1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane (1,8-cineole) system.* " Tetrahedron-Asymmetr. **13**: 1173–1180.

Ma, L., Liu, X., et al. (2011). "*Biotransformations of cinnamaldehyde, cinnamic acid and acetophenone with Mucor.* " World J. Microbiol. Biotechnol. **27**: 2133–2137.

MacLeod, R., Prosser, H., et al. (1964). "*Asymmetric Reductions. XII. Stereoselective Ketone Reductions by Fermenting Yeast.* " Biochemistry **3**: 838–846.

Maconi, E. and Aragozzini, F. (1989). "*Stereoselective reduction of non-cyclic ketones with lactic acid bacteria.*" Appl. Microbiol. Biotechnol. **31**: 29-31.

Maczka, W. and Mironowicz, A. (2004). "*Enantioselective reduction of bromo- and methoxy-acetophenone derivatives using carrot and celeriac enzymatic system.* " Tetrahedron-Asymmetr. **15**: 1956-1967.

Maczka, W. K. and Mironowicz, A. (2007). "*Enantioselective Hydrolysis of Bromo- and Methoxy-Substituted 1-Phenylethanol Acetates Using Carrot and Celeriac Enzymatic Systems.*" Z. Naturforsch. **62c**: 397-402.

Mączka, W. K. and Mironowicz, A. (2002). "*Enantioselective hydrolysis of 1-aryl ethyl acetates and reduction of aryl methyl ketones using carrot, celeriac and horseradish enzyme systems.*" Tetrahedron-Asymmetr. **13**: 2299-2302.

Machado, L. L., Monte, F. J. Q., et al. (2008). "*Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of Passiflora edulis.* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **54**: 130-133.

Machado, L. L., Souza, J. S. N., et al. (2006). "*Bioreduction of aldehydes and ketones using Manihot species.*" Phytochemistry **67**: 1637-1643.

Magallanes-Noguera, C., Ferrari, M. M., et al. (2012). " *Deracemization of secondary alcohols by chemo-enzymatic sequence with plant cells.* " J. Biotechnol. **160**: 189– 194.

Mandal, D., Ahmad, A., et al. (2004). "*Enantioselective bioreduction of acetophenone and its analogous by the fungus Trichothecium sp. .* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **27**: 61-63.

Matsuda, T., Harada, T., et al. (2000). "*Two Classes of Enzymes of Opposite Stereochemistry in an Organism: One for Fluorinated and Another for Nonfluorinated Substrates.*" J. Org. Chem. **65**: 157-163.

Matsuda, T., Yamanaka, R., et al. (2009). "*Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction.*" Tetrahedron-Asymmetr. **20**: 513-557.

Matsuo, K., Kawabe, S., et al. (2008). "*Asymmetric reduction of ketones with a germinated plant.*" Tetrahedron-Asymmetr. **19**: 157-159.

Midland, M. M. and Lee, P. E. (1985). "*Efficient asymmetric reduction of acyl cyanides with B-3-pinanyl 9-BBN (Alpine-borane).*" J. Org. Chem. **50**: 3237-3239.

Miño, J., Gorzalczany, S., et al. (2002). "*Actividad Antinociceptiva y Antiinflamatoria de Erythrina crista-galli L. (Ceibo).* " Acta Farm. Bonaerense **21**: 93-98.

Mironowicz, A. (1997). "*Apples as enantiospecific bioreagents in the hydrolysis of racemic esters and oxygenation of alcohols obtained during the process.* " Acta Soc. Bot. Pol. **66**: 325-328.

Mironowicz, A. and Kromer, K. (1998). "*Apple-Tree Shoots and Transformed Carrot and Apple Roots Used as Biocatalysts in Enantioselective Acetate Hydrolysis, Alcohol Oxidation and Ketone Reduction.*" Collect. Czech. Chem. Commun. **63**: 1655-1662.

Mironowicz, A., Kromer, K., et al. (1994). "*Apples as enantiospecific bioreagents in the hydrolysis of racemic esters and oxygenation of alcohols obtained during the process.* " Acta Soc. Bot. Pol. **63**: 43-48.

Mistscher, L. A., Gollapudi, R. S. R., et al. (1988). "*Erycristin, a new antimicrobial petrocarpan from Erythrina crista-galli. .* " Phytochemistry **27**: 381-385.

Mitscher, L. A., Ward, J. A., et al. (1984). "*Antimicrobial agents from higher plants. Erycristagallin, a new pterocarpene from the roots of the Bolivian coral tree, Erythrina crista-galli.*" Heterocycles **22**: 1673-1675.

Mohammadi, M., Yousefi, M., et al. (2011). "*Highly enantioselective bioreduction of prochiral ketones by stem and germinated plant of Brassica oleracea variety italica.* " Biocatal. Biotransform. **29**: 328-336

Molinari, F., Gandolfi, R., et al. (1999). "*Lyophilised yeasts: easy-to-handle biocatalysts for stereoselective reduction of ketones.* " Tetrahedron-Asymmetr. **10**: 3515-3520.

Mori, K. (1989). "*Synthesis of optically active pheromones.*" Tetrahedron **45**: 3233-3298.

Muñoz Solano, D., Hoyos, P., et al. (2012). "*Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs.* " Bioresource Technol. **115**: 196–207.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). "*A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.*" Physiol. Plant. **15**: 473-497.

Murgu, M. and Rodrigues-Filho, E. (2006). "*Hydroxilation of a hederagenin derived saponin by a Xylareaceous fungus found in fruits of Sapindus saponaria.* " J. Braz. Chem. Soc. **17**: 1281-1290.

Nagaki, M., Imaruoka, H., et al. (2007). "*Biotransformation of prenyl alcohols by cultured cells of Cucurbita maxima.*" J. Mol. Catal. B: Enzym. **47** 33–36.

Nakamura, K., Fujii, M., et al. (2002). "*Synthesis of both enantiomers of 1-phenylethanol by reduction of acetophenone with Geotrichum candidum IFO 5767.*" Tetrahedron Lett. **43**: 3629–3631.

Nakamura, K., Higaki, M., et al. (1985). "*Stereochemical control of microbial reduction. 2. Reduction of β-keto esters by immobilized bakers' yeast.*" Tetrahedron Lett. **26**: 4213-4216.

Nakamura, K., Kawai, Y., et al. (1991). "*Stereochemical control in microbial reduction. XIX, Effect of heat-treatment on the diastereoselectivity in the reduction with baker's yeast.*" Tetrahedron Lett. **32**: 2927-2928.

Nakamura, K., Kawai, Y., et al. (1989). "*A new method for stereochemical control of microbial reduction. Reduction of β-keto esters with bakers' yeast immobilized by magnesium alginate.*" Tetrahedron Lett. **30**: 2245-2246.

Nakamura, K. and Matsuda, T. (1998). "*Asymmetric Reduction of Ketones by the Acetone Powder of Geotrichum c andidum.*" J. Org. Chem. **63**: 8957-8964.

Nakamura, K., Miyai, T., et al. (1986). "*Diastereo-and enantio-selective reduction of 2-methyl-3-oxobutanoate by bakers' yeast.*" Tetrahedron Lett. **27**: 3155-3156.

Nakamura, K., Shiraga, T., et al. (1990). "*Stereochemistry of NAD(P)-Coenzyme in the Reaction Catalyzed by Glycerol Dehydrogenase.*" Bull. Chem. Soc. Jpn. **63**: 1735–1737.

Nakamura, K., Takano, S., et al. (1992). "*Asymmetric reductions of butyl piruvate catalyzed by immobilized gricerol dehydrogenase inorganic aqueous biphasic media.*" Chem. Lett.: 951–995.

Nakamura, K., Yamanaka, R., et al. (2003). "*Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts.*" Tetrahedron-Asymmetr. **14**: 2659–2681.

Nakamura, K., Yoneda, T., et al. (1988). "*Asymmetric reduction of ketones by glycerol dehydrogenase from geotricum.*" Tetrahedron Lett. **29**: 2453–2454.

Naoshima, Y. and Akakabe, Y. (1991). "*Biotransformation of aromatic ketones with cell cultures of carrot, tobacco y gardenia.*" Phytochemistry **30**: 3595-3597.

Naoshima, Y., Akakabe, Y., et al. (1989). "*Biotransformation of acetoacetic esters with immobilized cells of Nicotiana tabacum. .*" Agric. Biol. Chem. **53**: 545–547.

Ni, H. L., Guan, Y. X., et al. (2009). "*A combined process of biocatalysis and cell activity regeneration for the asymmetric reduction of 3 -oxo ester with immobilized baker's yeast.*" J. Chem. Technol. Biotechnol. **84**: 186-191.

Ni, Y., Li, C.-H., et al. (2011). "*Biocatalytic properties of a recombinant aldo-keto reductase with broad substrate spectrum and excellent stereoselectivity.*" Appl. Microbiol. Biotechnol. **89**: 1111–1118.

Nicolaou, K. C. and Guy, R. K. (1995). "*The conquest of Taxol.*" Angew. Chem., Int. Ed. **34**: 2079-2090.

Noyori, R., Ohkuma, T., et al. (1987). "*Asymmetric hydrogenation of .beta.-keto carboxylic esters. A practical, purely chemical access to .beta.-hydroxy esters in high enantiomeric purity.*" J. Am. Chem. Soc. **109**: 5856-5858.

Okano, K., Murata, K., et al. (2000). "*Stereoselective synthesis of optically active pyridyl alcohols via asymmetric transfer hydrogenation of pyridyl ketones.* " Tetrahedron Lett. **41**: 9277–9280.

Oliveira, C. d. S. d., Andrade, K. T. d., et al. (2013). " *One-pot chemoenzymatic synthesis of chiral disubstituted 1, 2, 3-triazoles in aqueous media.* " J. Mol. Catal. B: Enzym.

Orden, A., Bisogno, F., et al. (2006). "*Asymmetric bioreduction of natural xenobiotics by Brassica napus hairy roots. .* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **42**: 71-77

Orden, A. A., Bisogno, F. R., et al. (2008). "*Comparative study in the asymmetric bioreduction of ketones by plant organs and undifferentiated cells.* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **51**: 49-55.

Orden, A. A., Magallanes-Noguera, C., et al. (2009). "*Anti-Prelog reduction of ketones by hairy root cultures.*" J. Mol. Catal. B: Enzym. **61**: 216–220.

Padhi, S. K., Kaluzna, I. A., et al. (2007). "*Reductions of cyclic β-keto esters by individual Saccharomyces cerevisiae dehydrogenases and a chemo-enzymatic route to (1R,2S)-2-methyl-1-cyclohexanol.*" Tetrahedron-Asymmetr. **18**: 2133-2138.

Pal, M., Srivastava, G., et al. (2012). "*Bioreduction of methyl heteroaryl and aryl heteroaryl ketones in high enantiomeric excess with newly isolated fungal strains.* " Bioresource Technol. **118**: 306–314.

Panizza, P. (2005). a-alquil-b-hidroxiésteres quirales: ampliando el repertorio de

biocatalizadores hacia las síntesis enantiodivergentes. Biociencias, Facultad de Química . Montevideo, Uruguay, Universidad de la República. **M. Sc.**

Panizza, P., Onetto, S., et al. (2007). "*A recombinant Escherichia coli expressing an α-alkyl-β-ketoester reductase with unusual stereoselectivity.* " Biocatal. Biotransform. **25**: 414-417.

Patel, R. N. (2008). "*Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis.* " Coordin. Chem. Rev. **252**: 659-701.

Pedrini, P., Giovannini, P. P., et al. (2009). "*Reduction screening with endophytic fungi: Synthesis of homochiral secondary alcohols.* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **60**: 145-150.

Pimentel, M. R., Molina, G., et al. (2010). "*The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process.* " Biotechnol. Res. Int. **2011**.

Prado, S., Buisson, D., et al. (2013). "*One-step enantioselective synthesis of (4S)-isosclerone through biotranformation of juglone by an endophytic fungus.* " Tetrahedron Lett. **54**: 1189-1191.

Pras, N., Woerdenbag, H. J., et al. (1995). "*Bioconversion potential of plant enzymes for the production of pharmaceuticals.*" Plant Cell Tiss. Org. Cult. **43**: 117-121.

Prelog, V. (1964). "*Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections.*" Pure Appl. Chem. **9**: 119-130.

Rajagopalan, A. and Kroutil, W. (2011). "*Biocatalytic reactions: selected highlights.*" Mater. Today **144-152**.

Rakotoniriana, E. F., Rafamantanana, M., et al. (2013). "*Study in vitro of the impact of endophytic bacteria isolated from Centella asiatica on the disease incidence caused by the hemibiotrophic fungus Colletotrichum higginsianum.*" A. Van Leeuw. J. Microb. **103**: 121-133.

Ramos, A. d. S., Ribeiro, J. B., et al. (2009). "*On the microbial reduction of ethyl α-methylacetoacetate.*" Tetrahedron-Asymmetr. **45**: 559-561.

Rasmussen, J., Dumsday, G., et al. (2005). "*New technology for biotransformations.*" Chem. Aust. **4-7**.

Ravía, S., Gamenara, D., et al. (2006). "*Enantioselective Reduction by Crude Plant Parts: Reduction of Benzofuran-2-yl Methyl Ketone with Carrot (Daucus carota)* " J. Chem. Educ. **83**: 1049-1051.

Ravía, S. P., Carrera, I., et al. (2009). "*Novel fungi-catalyzed reduction of α-alkyl-β-keto esters.*" Tetrahedron-Asymmetr. **20**: 1393-1397.

Redko, F., Clavin, M., et al. (2006). "*Search for active metabolites of Erythrina crista-galli and its endophyte Phomopsis sp.*" Mol. Med. Chem. **10**: 24-26.

Ren, C.-G. and Dai, C.-C. (2012). "*Jasmonic acid is involved in the signaling pathway for fungal endophyte-induced volatile oil accumulation of Atractylodes lancea plantlets.*" BMC Plant Biol. **12**: 128.

Robert, A., Holton, C., et al. (1994). "*First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring.*" J. Am. Chem. Soc. **116**: 1597–1598.

Roberts, R. G., Morrison, W. H., et al. (1987). "*Extracellular lipase production by fungi from sunflower seed.*" Mycologia **79**: 265–273.

Rodríguez, P., Barton, M., et al. (2007). Biotransformation of ketones and b-ketoesters by carrot endophytes III Workshop de Biocatálise. II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones., San Pablo, Brasil.

Rodríguez, P., Barton, M., et al. (2007). "*Are endophytic microorganisms involved in the stereoselective reduction of ketones by Daucus carota root?*" J. Mol. Catal. B: Enzym. **49**: 8-11.

Rodríguez, P., Coronel, C., et al. (2010). Evaluación de actividad reductasa en vegetales y microorganismos endófitos. IV EnReBB, Montevideo, Uruguay.

Rodríguez, P., Reyes, B., et al. (2011). "*Stereoselective biotransformation of a-alkyl-b-keto esters by endophytic bacteria and yeast.*" J. Mol. Catal. B: Enzym. **71**: 90–94.

Rodriguez, R., White Jr, J., et al. (2009). "*Fungal endophytes: diversity and functional roles.*" New Phytol. **182**: 314-330.

Rodríguez, S., Schroeder, K. T., et al. (2000). "*Asymmetric Synthesis of β-Hydroxy Esters and α-Alkyl-β-hydroxy Esters by Recombinant Escherichia coli Expressing Enzymes from Baker's Yeast.*" J. Org. Chem. **65**: 2586-2587.

Rosenblueth, M. and Martínez-Romero, E. (2006). "*Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts.*" APS Symp. Ser. **19**: 827-837.

Ryu, C., Farag, M., et al. (2003). "*Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis.* " Proc. Natl. Acad. Sci. **100**: 4927-4932.

Salvano, M. S., Cantero, J. J., et al. (2011). "*Searching for local biocatalysts: Bioreduction of aldehydes using plant roots of the Province of Córdoba (Argentina).* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **71**: 16–21.

Samson, R. A. and van Reenen Hoekstra, E. S. (1988). Introduction to Food-borne Fungi , Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.

Santi, C., Bogusz, D., et al. (2013). "*Biological nitrogen fixation in non-legume plants.* " Ann. Bot.-London **111**:743-767.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., et al. (2012). "*Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi.* " Proc. Natl. Acad. Sci. **109**: 6241–6246.

Schubert, T., Hummel, W., et al. (2001). "*Enantioselective Synthesis of Both Enantiomers of Various Propargylic Alcohols by Use of Two Oxidoreductases.* " Eur. J. Org. Chem. **22**:4181-4187.

Seifert, K. A. (2009). "*Progress towards DNA barcoding of fungi.* " Mol. Ecol. Resources **9**: 83-89.

Servi, S. (1990). "*Baker's yeast as a reagent in organic synthesis.* " Synthesis **1**: 1-25.

Sessitsch, A., Howieson, J., et al. (2002). " *Advances in Rhizobium research.*" Crit. Rev. Plant Sci. **21**: 323-378.

Shibuya, H., Agusta, A., et al. (2005). "*Biooxidation of (+)-catechin and (-)-epicatechin into 3, 4-dihydroxyflavan derivatives by the endophytic fungus Diaporthe sp. isolated from a tea plant.*" Chem. Pharm. Bull. **53**: 866-867.

Shibuya, H., Kitamura, C., et al. (2003). "*Transformation of Cinchona Alkaloids into 1-N-Oxide Derivatives by Endophytic Xylaria sp. Isolated from Cinchona pubescens.* " Chem. Pharm. Bull. **51**: 71-74.

Shieh, W.-R. and Sih, C. J. (1993). "*Stereochemical control of yeast reductions. 6. Diastereoselectivity of 2-alkyl-3-oxobutanoate oxido-reductases.* " Tetrahedron-Asymmetr. **4**: 1259-1269.

Shieh, W., Gopalan, A. S., et al. (1985). "*Stereochemical control of yeast reductions. 5. Characterization of the oxidoreductases involved in the reduction of .beta.-keto esters.* " J. Am. Chem. Soc. **107**: 2993–2994.

Shu, Y. Z., Johnson, B. M., et al. (2008). "*Role of biotransformation studies in minimizing metabolism-related liabilities in drug discovery.*" AAPS J **10**: 178–192.

Silvestre, A. J. D., Cavaleiro, J. A. S., et al. (1999). " *Synthesis of Some New Benzylic Ethers from 1,8-Cineole with Antimicrobial Activity. .* " Monatsh. Chem. **130**: 589-595

Singh, A., Bhattacharyya, M. S., et al. (2009). "*Purification and characterization of carbonyl reductase from Geotrichum candidum.*" Process Biochem. **44**: 986–991.

Solis, A., Pérez, H. I., et al. (2010). "*Plant dried powders as biocatalysts: Hydrolysis of 1-phenylpropanol acetate.*" Afr. J. Biotechnol. **9**: 2442-2445.

Soni, P. and Banerjee, U. C. (2006). "*Enantioselective reduction of acetophenone and its derivatives with a new yeast isolate Candida tropicalis PBR-2 MTCC 5158.* " Biotechnol. J. **1**: 80–85.

Soni, P., Kaur, G., et al. (2005). "*Candida viswanathii as a novel biocatalyst for stereoselective reduction of heteroaryl methyl ketones: a highly efficient enantioselective synthesis of (S)-a-(3-pyridyl)ethanol.*" Tetrahedron-Asymmetr. **16**: 2425–2428.

Speicher, A., Roeser, H., et al. (2003). "*Stereoselective oxidoreductase type bioconversions of exogenous substrates by cell suspension cultures of bryophytes.* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **22**: 71-77.

Staniek, A., Woerdenbag, H. J., et al. (2009). "*Taxomyces andreanae: a presumed paclitaxel producer demystified?*" Planta Med. **75**: 1561-1566.

Stecher, H. and Faber, K. (1997). "*Biocatalytic deracemization techniques: dynamic resolutions and stereoinversions.*" Synthesis **1**: 1-16.

Stierle, A., Strobel, G., et al. (1995). "*The search for taxol producing microorganisms among the endophytic fungi of the Pacific yew, Taxus brevifolia.* " J. Nat. Prod. **58**: 1315-1324.

Still , W. C., Kahn , M., et al. (1978). "*Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution.* " J. Org. Chem. **43** 2923–2925.

Straathof, A. J. J., Panke, S., et al. (2002). "*The production of fine chemicals by biotransformations. .*" Curr. Opin. Biotechnol. **13**: 548–556.

Strobel, G. and Daisy, B. (2003). "*Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products.*" Microbiol. Mol. Biol. R. **67**: 491-502.

Strobel, G., Daisy, B., et al. (2004). "*Natural products from endophytic microorganisms.* " J. Nat. Prod. **67**: 257-268.

Strobel, G. A. (2002). "*Microbial gifts from rain forests.*" Can. J. Plant Pathol. **24**: 14–20.

Strobel, G. A. (2002). "*Rainforest Endophytes and Bioactive Products.*" Crc. CR. Rev. Biotechn. **22**: 315–333.

Strobel, G. A., Hess, W., et al. (1997). "*Pestalotiopsis guepinii, a taxol-producing endophyte of the wollemi pine, Wollemia nobilis.*" Aust. J. Bot. **45**: 1073-1082.

Suárez-Franco, G., Hernández-Quiroz, T., et al. (2010). "*Plants as a green alternative for alcohol preparation from aromatic aldehydes.*" Biotechnol. Bioproc. E. **15**: 441-445.

Suga, T., Hamada, H., et al. (1983). "*Oxidation-reduction relationship between cycloalkanones and the corresponding cycloalkanols in a cell suspension culture of Nicotiana tabacum.*" Plant Cell Rep. **2**: 66-68.

Suga, T., Hamada, H., et al. (1987). "*Enantioselectivity in the biotransformation of bicyclo [3.1. 1] heptanes with the cultured cells of Nicotiana tabacum.* " Chem. Lett.: 471-474.

Suga, T., Hirata, T., et al. (1986). "*The stereochemistry of the reduction of carbon-carbon double bond with cultured cells of Nicotiana tabacum.* " Bull. Chem. Soc. Jpn **59**: 2865-2867.

Suga, T., Hirata, T., et al. (1983). "*Enantioselectivity in the biotransformation of bicyclic monoterpene alcohols with the cultured suspension cells of Nicotiana tabacum.* " Plant Cell Rep. **2**: 186-188.

Surette, M., Sturz, A., et al. (2003). "*Bacterial endophytes in processing carrots (Daucus carota L. var. sativus): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth.*" Plant Soil **253**: 381-390.

Swizdor, A., Janeczko, T., et al. (2010). "*Didymosphaeria igniaria: a new microorganism useful for the enantioselective reduction of aryl-aliphatic ketones.* " J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **37**: 1121–1130.

Takano, S., Yanase, M., et al. (1987). "*Practical synthesis of (R)-γ-amino-β-hydroxybutanoic acid (GABOB) from (R)-epichlorohydrin.* " Tetrahedron Lett. **28**: 1783-1784.

Takemoto, M. and Achiwa, K. (1995). "*The synthesis of optically active pyridyl alcohols from the corresponding racemates by< i> Catharanthus roseus</i> cell cultures.* " Tetrahedron-Asymmetr. **6**: 2925-2928.

Takemoto, M. and Achiwa, K. (1998). "*Bioconversion of optically active pyridyl alcohols from the corresponding racemates with plant cell cultures.* " Chem. Pharm. Bull. **46**: 577-580.

Takemoto, M. and Achiwa, K. (1998). "*Deracemization of racemic 4-pyridyl-1-ethanol by Catharanthus roseus cell cultures.*" Phytochemistry **49**: 1627-1629.

Tang, Y. J., Zhao, W., et al. (2011). "*Novel tandem biotransformation process for the biosynthesis of a novel compound 4-(2, 3, 5, 6-tetramethylpyrazine-1)-4'-demethylpodophyllotoxin.*" Appl. Environ. Microbiol. **77**: 3023–3034.

Ticozzi, C. and Zanarotti, A. (1988). "*Baker's yeast reduction of 5-acetyl-2-isoxazolines synthesis of enantiomerically pure 2, 3-dihydroxy ketones and 1, 2, 4-triols.* " Tetrahedron Lett. **29**: 6167-6170.

Tong, L. P., Cui, J. N., et al. (2008). "*Asymmetric bioreduction of substituted acenaphthenequinones using plant enzymatic systems: A novel strategy for the preparation of (+)- and ()-mono hydroxyacenaphthenones.* " Chinese Chem. Lett. **19**: 1179–1182.

Torres, M., Dolcet, M. M., et al. (2003). "*Endophytic fungi associated with Mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases.* " J. Agric. Food Chem. **51**: 3328-3333.

Torsvik, V. and Øvreås, L. (2002). "*Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems.*" Curr. Opin. Microbiol. **5**: 240-245.

Torsvik, V., Ovreas, L., et al. (2002). "*Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors.*" Sci. Sig. **296**: 1064.

Tschaen, D., Fuentes, L., et al. (1988). "*An efficient synthesis of 4-benzoyloxyazetidinone: an important carbapenem intermediate.*" Tetrahedron Lett. **29**: 2779-2782.

Utsukihara, T., Watanabe, S., et al. (2006). "*Stereoselective reduction of ketones by various vegetables.*" J. Mol. Catal. B: Enzym. **41**: 103–109.

Vandenberghea, A., Markó, I. E., et al. (2013). "*Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables.* " Ind. Crops Prod. **42**: 380– 385.

Vanmiddlesworth, F. and Sih, C. J. (1987). "*A model for predicting diastereoselectivity in yeast reductions.*" Biocatal. Biotransform. **1**: 117-127.

Velonia, K., Tsigos, I., et al. (1999). "*Stereospecifity of hydrogen transfer by the NAD+ linked alcohol dehydrogenase from the Antartic sychrophile Moraxella sp. (TAE123).* " Bioorg. Med. Chem. Lett. **9**: 65–68.

Venkatesagowda, B., Ponugupaty, E., et al. (2012). "*Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. .*" World J. Microbiol. Biotechnol. **28**: 71–80.

Verza, M., Arakawa, N. S., et al. (2009). "*Biotransformation of a tetrahydrofuran lignan by the endophytic fungus Phomopsis sp.*" J Braz Chem Soc **20**: 195-200.

Villa, R., Molinari, F., et al. (1998). "*Stereoselective reduction of ketones by plant cell cultures.*" Biotechnol. Lett. **20**: 1105-1108.

Wach, A., Pick, H., et al. (1994). Molecular genetics of yeast. The practical approach. New, York. United States, Oxford University Press Inc.

Wallner, S. R., Lavandera, I., et al. (2008). "*Stereoselective anti-Prelog reduction of ketones by whole cells of Comamonas testosteroni in a 'substrate-coupled' approach.* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **55**: 126–129

Wani, M. C., Taylor, H. L., et al. (1971). "*Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia.* " J. Am. Chem. Soc. **93**: 2325-2327.

Ward, H. J. and Diener, U. (1961). "*Biochemical changes in shelled peanuts caused by storage fungi I. Effects of Aspergillus tamari, four species of A. glaucus groups and Penicillium cunnum.*" Phytopathol. **51**: 244–250.

Ward, O. and Young, C. (1990). "*Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeast.*" Enzyme Microb. Tech. **12**: 482-493.

Wei, Z.-L., Li, Z.-Y., et al. (1998). "*anti-Prelog microbial reduction of aryl α-halomethyl or α-hydroxymethyl ketones with Geotrichum sp. 38.* " Tetrahedron **54**: 13059-13072.

Weisblum, B. and Davies, J. (1968). "*Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome.*" Bacteriol. Rev. **32**: 493-528.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., et al. (1991). "*16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.*" J. Bacteriol. **173**: 697-703.

Weiss, S., Samson, F., et al. (2013). "*YeastIP: a database for identification and phylogeny of Saccharomycotina yeasts.*" FEMS Yeast Res. **13**: 117–125.

Werner, C., Petrini, O., et al. (1997). "*Degradation of the polyamine alkaloid aphelandrine by endophytic fungi isolated from Aphelandra tetragona.* " FEMS Microbiol. Lett. **155**: 147-153.

White, T. J., Bruns, T., et al. (1990). PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications . San Diego, CA.

Wipf, B., Kupfer, E., et al. (1983). "*Production of (+)-(S)-Ethyl 3-Hydroxybutyrate and (-)-(R)-Ethyl 3-Hydroxybutyrate by Microbial Reduction of Ethyl Acetoacetate.* " Helv. Chimi.Acta **66**: 485-488.

Xie, Y., Xu, J.-H., et al. (2009). "*Adzuki bean: A new resource of biocatalyst for asymmetric reduction of aromatic ketones with high stereoselectivity and substrate tolerance.* " Bioresource Technol. **100**: 2463-2468.

Yadav, J. S., Nanda, S., et al. (2002). "*Efficient enantioselective reduction of ketones with Daucus carota root.*" J. Org. Chem. **67**: 3900-3903.

Yadav, J. S., Reddy, G. S., et al. (2007). "*Daucus carota and baker's yeast mediated bio-reduction of prochiral ketones.*" Tetrahedron-Asymmetr. **18**: 717–723.

Yadav, J. S., Subba Reddy, B. V., et al. (2008). "*Enantioselective reduction of 2-substituted tetrahydropyran-4-ones using Daucus carota plant cells.* " Tetrahedron Lett. **49**: 2768–2771.

Yadav, J. S., Thirupathi Reddy, P., et al. (2001). Tetrahedron-Asymmetr. **12**: 3381-3385.

Yang, W., Xu, J., et al. (2006). "*Asymmetric reduction of ketones by employing Rhodotorula sp. AS2.2241 and synthesis of the b-blocker (R)-nifenalol.* " Tetrahedron-Asymmetr. **17**: 1769–1774.

Yang, W., Xua, J.-H., et al. (2008). "*Efficient reduction of aromatic ketones with NADPH regeneration by using crude enzyme from Rhodotorula cells and mannitol as cosubstrate.* " Biochem. Eng. J. **42**: 1–5.

Yang, Z.-H., Zeng, R., et al. (2008). "*Asymmetric reduction of prochiral ketones to chiral alcohols catalyzed by plants tissue.*" J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **35**: 1047–1051.

Yasohara, Y., Kizaki, N., et al. (1999). "*Synthesis of optically active ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate by microbial reduction.* " Appl. Microbiol. Biotechnol. **51**: 847±851.

Yu, H.-L., Xu, J.-H., et al. (2009). "*Discovery and Utilization of Biocatalysts for Chiral Synthesis: An Overview of Chinese Scientists Research and Development.* " Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. **113**: 1-31.

Yue, Q., Bacon, C. W., et al. (1998). "*Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 6-methoxy-benzoxazolinone by Fusarium moniliforme.* " Phytochemistry **48**: 451-454.

Zanotto, S. P., Romano, I. P., et al. (2009). "*Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian fungi.* " J. Braz. Chem. Soc **20**: 1046-1059.

Zikmundova, M., Drandarov, K., et al. (2002). "*Biotransformation of 2-Benzoxazolinone and 2-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-one by Endophytic Fungi Isolated from Aphelandra Terragona.* " Appl. Environ Microbiol. **68**: 4863-4870.

Zilbeyaz, K., Taskin, M., et al. (2010). "*Production of (R)-1-phenylethanols through bioreduction of acetophenones by a new fungus isolate Trichothecium roseum.* " Chirality **22**: 543-547.

Zilinskas, A. and Sereikaite, J. (2013). "*Stereoselective bioreduction for the resolution of racemic mixtures of 2 bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-dione using vegetables.* " J. Mol. Catal. B: Enzym. **90** 66–69.