

**EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE CITRONELOL UTILIZANDO
COMO BIOCATALIZADOR *Aspergillus niger***

SINDY JOHANNA LOZANO VERJEL

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2007

**EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE CITRONELOL UTILIZANDO
COMO BIOCATALIZADOR *Aspergillus niger***

SINDY JOHANNA LOZANO VERJEL

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar
al título de Química**

**Directora: Prof. JANETH AIDE PEREA VILLAMIL
Química, M. Sc. Doctora en Química**

**Directora: Prof. CLAUDIA CRISTINA ORTÍZ LÓPEZ
Microbióloga, M. Sc. Doctora en Biocatálisis**

CICTA - CENIVAM

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2007

DEDICATORIA

*Dedico este triunfo a la personita que en medio de sus noches de angustia, anheló
el rápido final de la soledad:*

DAFNE SHAIEL

Por los días solitarios y aquellos por compartir.

A mis papás Martha y David por todo su sacrificio, apoyo, amor y confianza.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme la fuerza necesaria para seguir adelante pese a los tropiezos.

A mi hija, mis papás David y Martha, mis hermanos Andrés, Slendy y Sandra, y mis nonos Toña y Benito (QEPD), por su confianza y apoyo en los momentos más difíciles.

A COLCIENCIAS a través del Centro de Excelencia CENIVAM y a la Doctora Elena Stashenko, así como el grupo de trabajo del laboratorio de cromatografía (CIBIMOL), por la colaboración y financiación del proyecto.

A la Doctora Janeth Aide Perea por su confianza y perseverancia en el transcurso de la ejecución del trabajo de grado.

Al Profesor Gerardo Bautista por su confianza, sus consejos y su enseñanza.

Al equipo de trabajo del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Luis K, Fabi, Yami, Corita, Joha, Gloria y Erick, por su acogedora amistad y colaboración durante el desarrollo del proyecto.

Y a todas aquellas personas que me han ofrecido su mano amiga, su apoyo y que han dejado huella en el transcurso de mi vida y el ciclo universitario, especialmente a mis amigos y familiares.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. ESTADO DEL ARTE	21
1.1 PRODUCTOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE CITRONELOL	24
1.1.1 <i>OXIDO DE ROSA</i>	24
a. Extracción del óxido de rosa	25
b. Rutas sintéticas de obtención del óxido de rosa	27
1.1.2 <i>ÓXIDO DE NEROL</i>	30
1.1.3 <i>LINALOL</i>	31
1.1.4 <i>HIDROXICITRONELOL</i>	32
1.2 HIDROXILACIÓN ENZIMÁTICA CON OXIGENASAS	33
1.3 <i>Aspergillus niger</i>	36
2. METODOLOGÍA	39
2.1 MATERIALES Y REACTIVOS	39
2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
2.2.1 Procesos de rutina para el trabajo con microorganismos	40
a. <i>Reactivación del microorganismo</i>	41

	Pág.
b. <i>Replicación de la cepa de Aspergillus niger</i>	41
c. <i>Preparación de la suspensión</i>	41
d. <i>Cultivo de Aspergillus niger</i>	43
2.2.2 Evaluación de las variables relacionadas con el crecimiento del <i>Aspergillus niger</i>	43
2.2.3 Biotransformación de citronelol utilizando <i>Aspergillus niger</i>	44
2.2.4 Métodos de análisis	47
2.2.5 Tratamiento estadístico de datos	48
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
3.1 EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON EL CRECIMIENTO DEL <i>Aspergillus niger</i>	49
3.1.1 Selección del medio de cultivo	49
3.1.2 Evaluación del efecto de la incubación a temperatura controlada (28°C) y temperatura ambiente no controlada sobre el crecimiento del <i>Aspergillus niger</i>	53
3.1.3 Evaluación del efecto del pH sobre el crecimiento del <i>Aspergillus niger</i>	55
3.1.4 Evaluación del efecto de la disponibilidad de oxígeno en el sistema sobre el crecimiento del <i>Aspergillus niger</i>	56

	Pág.
3.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE CITRONELOL UTILIZANDO	
<i>Aspergillus niger</i>	59
3.2.1. Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la evaporación del citronelol	59
3.2.2 Autooxidación de citronelol	61
3.2.3 Biotransformación de citronelol	63
3.2.4 Estudio del efecto del volumen de citronelol adicionado en el medio de biotransformación	66
4. CONCLUSIONES	75
5. RECOMENDACIONES	76
BIBLIOGRAFIA	77

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Catálisis ácida del 3,7-dimetil-5-octen-1,7-diol.	27
Esquema 2. Ruta sintética para la obtención de óxido de rosa.	27
Esquema 3. Síntesis del óxido de rosa por múltiples etapas.	28
Esquema 4. Síntesis del óxido de rosa catalizada por complejos de Paladio.	29
Esquema 5. Síntesis “ <i>one-pot</i> ” del óxido de rosa catalizada por KHSO ₄ .	29
Esquema 6. Biotransformación de citronelol con <i>Aspergillus niger</i> .	36
Esquema 7. Bioconversión de citronelol a hidroxicitronelol utilizando <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 en medio PDA.	64
Esquema 8. Ciclo catalítico general concertado para la activación y transferencia de oxígeno por la Citocromo P450.	73
Esquema 9. Ruta de formación de hidroxicitronelol y óxido de rosa a partir de citronelol.	74

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Citronelol componente mayoritario del aceite de Rosa Búlgara.	22
Figura 2. Óxido de rosa.	24
Figura 3. Estructura química de las formas isoméricas del óxido de rosa, olor y umbral.	26
Figura 4. Óxido de nerol.	30
Figura 5. Linalol.	31
Figura 6. Hidroxicitronelol.	32
Figura 7. <i>Aspergillus niger</i> . Conidióforo.	37
Figura 8. Características microscópicas, Colonias de <i>Aspergillus niger</i> en: a. PDA y b. MEA.	38
Figura 9. Cepa liofilizada de <i>Aspergillus niger</i> .	39
Figura 10 Cámara de Neubauer	42
Figura 11. Crecimiento del <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 en MEA: a. A los 2 días, b. A los 4 días y c. A los 8 días.	50
Figura 12. Crecimiento del <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 en PDA: a. A los 2 días, b. A los 4 días y c. A los 8 días.	51
Figura 13. Crecimiento superficial de <i>Aspergillus niger</i> en: a. MEA y b. PDA.	53

	Pág.
Figura 14. Crecimiento del <i>A. niger</i> en MEA a temperatura controlada (28°C): a., b. y c.; y a temperatura ambiente no controlada: d., e. y f.	54
Figura 15. Crecimiento del <i>A. niger</i> en PDA a temperatura controlada (28°C): a., b. y c.; y a temperatura ambiente no controlada: d., e. y f.	55
Figura 16. Efecto del pH del medio sobre el crecimiento del hongo: a. MEA y b. PDA	56
Figura 17. Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre el crecimiento del hongo en viales de 20mL y tubos: MEA (a) y PDA (b)	58
Figura 18. Evolución del citronelol en sistemas con diferente disponibilidad de oxígeno en MEA.	59
Figura 19. Evolución del citronelol en sistemas con diferente disponibilidad de oxígeno en PDA.	60
Figura 20. Perfil cromatográfico del extracto obtenido con DCM de un cultivo en MEA de <i>Aspergillus niger</i> tratado con citronelol a los 6 días de reacción	65
Figura 21. Perfil cromatográfico del extracto obtenido con DCM de un cultivo en PDA de <i>Aspergillus niger</i> tratado con citronelol a los 6 días de reacción	65

	Pág.
Figura 22. Evaluación del efecto del volumen de solución de sustrato sobre la biotransformación de citronelol.	69
Figura 23. Evaluación del pH durante la biotransformación	70

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentración de óxido de rosa en producto final (%).	25
Tabla 2. Concentración de hidroxicitronelol en producto final (%).	33
Tabla 3. Comparación del efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento radial del <i>Aspergillus niger</i> en MEA y PDA.	52
Tabla 4. Autooxidación de citronelol en PDA.	62
Tabla 5. Concentración total de citronelol remanente (%) y productos de bioconversión (%) obtenidos durante la extracción con DCM.	64
Tabla 6. Cantidad de citronelol remanente (%) y productos de bioconversión (%) durante la evaluación del efecto de la concentración y el volumen de sustrato en la biotransformación de citronelol en PDA.	68
Tabla 7. Biotransformación de citronelol por diferentes microorganismos	72

GLOSARIO

ATCC:	american Type Culture Collection (Colección Americana de tipos de cultivo).
A_w:	actividad acuosa.
C:	carbono.
C-C:	enlace Carbono- Carbono.
CENIVAM:	centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
CICTA:	centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
CG:	cromatografía de gases.
CG-EM:	cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
CV:	coeficiente de variación
[]:	concentración.
DCM:	diclorometano
σ:	desviación estándar
DSM:	deutsche Sammlung von Mikroorganismen.
EPA:	U.S. Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos).
EtOEt:	éter dietílico.
EtOH:	etanol.
°C:	grados centígrados.
g/L:	gramos por litro.
H:	hidrógeno.
HgCl₂:	dicloruro de Mercurio.
KOH:	hidróxido de Potasio.
KHSO₄:	sulfato ácido de potasio.

L:	una de las cuatro áreas de la cámara de Neubauer.
MEA:	extracto de malta agar.
MEFS:	microextracción en fase sólida
mg/kg:	miligramos por kilogramos.
mL:	mililitros.
NaCl:	cloruro de sodio.
NAC's:	químicos de aroma natural.
NaSO₄:	sulfato de sodio anhidro.
PDA:	papa dextrosa agar.
pH:	potencial de hidrógeno.
ppb:	partes por billón.
psi:	presión.
rpm:	revoluciones por minuto.
SDSE:	extracción por destilación con solvente.
sp.:	especie.
Σ:	Sumatoria.
US FDA:	united States Food and Drug Administration (Administración de Drogas y Alimentos de los Estados).
V:	volumen.
V/V:	volumen por volumen.
X_i:	área de cada componente en la muestra
X_t:	área total de la muestra
\bar{x}.	promedio

RESUMEN

TÍTULO

EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE CITRONELOL UTILIZANDO COMO BIOCATALIZADOR *Aspergillus niger**

AUTOR

Sindy Johanna Lozano Verjel**

PALABRAS CLAVES

Biotransformación, *Aspergillus niger*, citronelol, hidroxilación, hidroxicitronelol.

DESCRIPCIÓN

En la evaluación de la biotransformación de citronelol en medio sólido, inicialmente se seleccionaron las mejores condiciones para el crecimiento del hongo *Aspergillus niger*, estableciendo que el crecimiento radial uniforme del micelio del microorganismo y la formación de esporas consecuente con la edad del hongo en MEA y PDA, se obtiene bajo las siguientes condiciones: Temperatura constante de incubación de 28° C, pH inicial del medio (5.5 - 6.0), alta disponibilidad de oxígeno, sea cual sea el sistema utilizado; sin embargo, a mayor espacio de cabeza del sistema, ocurre un crecimiento más abundante del microorganismo.

El sistema de reacción utilizado influye en la evaporación del citronelol, observándose que un sistema no sellado permite fácilmente la pérdida del sustrato. El medio también influye en la pérdida del sustrato, pues la recuperación en medio MEA, fue menor que en PDA. En estos dos medios de cultivo, el nivel de autooxidación del citronelol es prácticamente nulo, al igual que la biotransformación en medio MEA. La biotransformación del citronelol utilizando *Aspergillus niger* en PDA tuvo lugar después de 2 días de reacción, obteniéndose hidroxicitronelol como producto mayoritario por la hidroxilación que ocurre en el carbono C₇ del citronelol. Luego de 15 días de proceso, se alcanzaron rendimientos hasta del 60%, sin embargo, después de ocho días de reacción, la producción permanece casi constante.

El hidroxicitronelol sintetizado químicamente, se utiliza en la industria cosmética y en alimenticia como aromatizante aprobado por la Comisión de las Comunidades Europeas y la Secretaría de Salud de México. No existen reportes sobre su obtención por procesos biocatalíticos con microorganismos completos. Otros compuestos formados aunque en muy bajas concentraciones fueron el óxido de rosa, linalol, α -terpineol, 2,6-dimetil-7-octen-2,6-diol, 3,7-dimetil-1,7-octadienol y 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol.

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora, Janeth Aidé Perea Villamil.

ABSTRACT

TITLE

EVALUATION OF THE BIOTRANSFORMATION OF CITRONELLOL USING *Aspergillus niger* AS BIOCATALYST*

AUTHOR

Sindy Johanna Lozano Verjel**

KEY WORDS

Biotransformation, *Aspergillus niger*, citronellol, hydroxylation, hydroxycitronellol.

DESCRIPTION

The biotransformation of citronellol was evaluated using solid surface cultures. Initially, the best conditions for the growth of the fungus *Aspergillus niger* were selected, establishing that radial growth and spore formation are strongly correlated with changes in culture composition, MEA and PDA. The best growth was observed under the following conditions: incubation, 28°C (constant temperature), culture pH (5.5-6.0), and high oxygen availability.

The reaction system affects citronellol recovery and a free-seal system allows substantial loss of substrate. Culture medium also influence as observed where recover is better in PDA than MEA. Autooxidation of citronellol is very low and practically no detected the same as biotransformation in MEA. Oxidation of citronellol using *Aspergillus niger* in PDA was carried out after 2 days, obtaining hydroxycitronellol like major product (hydroxylation in the C₇ carbon). After 15 days, production yield was approximately 60%, nevertheless after 8 days, the yield is almost constant.

Hydroxycitronellol is chemically synthesized and used in cosmetics and foods as flavouring agent (approved by the Commission of the European Communities and the Secretary of Health, Mexico). This compound has not been reported yet by means of microbial, fungal or enzymatic process. Other minor compounds produced were: (-terpineol, rose oxide, linalool, 2,6-dimethyl-7-octen-2,6-diol, 3,7-dimethyl-1,7-octadienol and 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol.

* Undergraduate thesis

** Universidad Industrial de Santander, Science Faculty, Chemistry Department. Directed by Janeth Aidé Perea Villamil.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son sustancias líquidas odoríferas, que se encuentran presentes en un gran número de especies vegetales, y están compuestas principalmente por una fracción con elevada presión de vapor que constituye el 90-95% del aceite total. Los aceites esenciales son una mezcla de componentes volátiles, producto del metabolismo de las plantas. Estos compuestos se difunden a través de la epidermis de las hojas, la corteza, los frutos y las flores, produciendo un aroma perfumado [Bouwmeester y col., 1998; Stashenko y col., 1998; Muñoz y col., 2005].

Industrialmente, los aceites esenciales se utilizan en cosméticos como fragancias, en el sector alimenticio como aditivos saborizantes, y en medicina, como insumos farmacéuticos. En el último caso son usados como anticancerígenos y agentes químico preventivos. En estas industrias se consume casi la totalidad de las esencias en forma natural por lo que se requiere del desarrollo de procesos para su purificación [Demyttenaere y col., 2004; Belanger, 1998; Bouwmeester y col., 1998; Vanek y col., 1999; Grayson, 2000; Schelz y col., 2006].

Los compuestos terpénicos obtenidos a partir de aceites esenciales vegetales son en su gran mayoría económicos y fácilmente disponibles. Constituyen el grupo más grande de productos naturales. Por lo tanto, ha sido necesario clasificarlos estructuralmente de acuerdo con sus unidades isoprénicas $(C_5H_8)_n$ en hemiterpenos, C_5 ; monoterpenos, C_{10} ; sesquiterpenos, C_{15} ; diterpenos, C_{20} ; triterpenos, C_{30} ; etc. [Dubey y col., 2003].

Los monoterpenos a nivel estructural presentan características apolares y se caracterizan por ser incoloros o amarillentos. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza tanto en la fauna como en la flora. En las plantas, actúan como repelentes contra los herbívoros, como defensa contra los hongos y para atraer agentes polinizadores. En los mamíferos, tienen un papel muy importante en la estabilización de la membrana celular, ruta metabólica y regulación enzimática [Bouwmeester y col., 1998; De Carvalho y col., 2006].

Con más de 400 representantes los monoterpenos, constituyen sustratos con estructura simple, aptos como materiales de partida para la producción biotecnológica de químicos de aroma natural (NAC's) y productos farmacéuticos [Demyttenaere y col., 2001]. También se utilizan como sustratos en procesos de oxidación enzimática, para la obtención de derivados oxigenados, que se emplean como saborizantes, fragancias y productos farmacéuticos, por lo cual se han intensificado las investigaciones tendientes a incrementar su producción [Adams y col., 2003].

El alcohol terpénico conocido como citronelol, se encuentra en concentraciones hasta del 80% en los aceites de rosa y geranio. Puede ser utilizado como precursor en transformaciones tanto químicas como bioquímicas, para obtener compuestos con mayor valor agregado [Demyttenaere y col., 2004]. Las transformaciones bioquímicas generalmente se realizan utilizando microorganismos, debido a que estos promueven la oxidación de componentes con alta estereoespecificidad y estereoselectividad, usualmente en condiciones de

reacción muy suaves dando lugar a compuestos naturales¹ [Demyttenaere y col., 2001; De Carvalho y col., 2002].

En el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM) a través del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) se esta desarrollando la línea de investigación relacionada con la transformación de los aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales, utilizando biocatalizadores (microorganismos o enzimas).

En este trabajo, que constituye el primero del grupo en esta área de investigación, se hizo una evaluación del proceso de transformación del citronelol usando como biocatalizador el hongo *Aspergillus niger* DSM 821, teniendo en cuenta que este microorganismo produce enzimas oxigenasas, por lo que se espera que al tratar el citronelol se pueda obtener compuestos oxidados de mayor valor agregado. En primera instancia se evaluaron las condiciones de crecimiento del hongo, y en segunda instancia el proceso de biotransformación del citronelol utilizando *Aspergillus niger*.

¹ **Un saborizante obtenido mediante un proceso, según la US FDA, debe tener como materiales de partida, sustancias naturales y el producto final debe ser idéntico a aquel existente en la naturaleza, para poder ser considerado como “natural”.**

1. ESTADO DEL ARTE

El alcohol terpénico conocido como citronelol² (3,7-dimetil-6-octen-1-ol), es un compuesto químico fragante que se encuentra naturalmente en más de 30 aceites esenciales, en el té negro, en el vino y en ciertas frutas. Es un líquido aceitoso amarillo pálido con un aroma descrito como dulce, de rosa, de cuero, mohoso, y floral. Su peculiar olor a rosa, lo hace uno de los alcoholes terpénicos comercialmente más importantes debido a su amplio uso a través de la historia en cosméticos, condimentos y fragancias.

Las investigaciones han demostrado en este compuesto cierta toxicidad cutánea y oral al probarse en animales de laboratorio, en altas concentraciones. En bajas concentraciones, se utiliza en alimentos o condimentos, de manera que las personas no se ven expuestas a ningún riesgo. Se conoce que es el ingrediente activo de algunos pesticidas y que se metaboliza fácilmente en las plantas a sustancias inofensivas [Demyttenaere y col., 2004].

Las dos formas enantioméricas del citronelol, se pueden encontrar abundantemente en diferentes esencias como el aceite de Rosa Búlgara (**Figura 1.**), y el aceite de Geranio de Reunión y Madagascar, los cuales contienen más del 80% de (-)-citronelol; mientras que en los aceites de Geranio Africano Oriental, *Boronia citridora* y *Eucalyptus citridora* predomina el (+)-citronelol [Demyttenaere y col., 2004].

² U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Biopesticides Registration Action Document : Citronellol (Pc Code 167004), 2006.

El citronelol se puede obtener además por hidrogenación del citronelal, usando estabilizantes poliméricos de metales nobles coloidales, por hidrogenación en fase líquida de citral, utilizando catálisis química [Arvela y col., 2003], así como por la biotransformación del citronelal con células de *Rhodotorula minuta*, libres e inmovilizadas [Velankar y col., 2003].



Rosa Bulgara

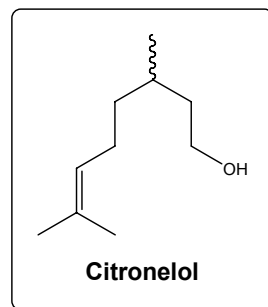


Figura. 1. Citronelol componente mayoritario del aceite de Rosa Búlgara

El citronelol se ha utilizado en transformaciones biotecnológicas obteniendo, por ejemplo, ésteres terpénicos como citronelol laurato [Yadav y col., 2004] y citronelol butirato, donde la reacción es catalizada por lipasas inmovilizadas de *Rhizopus sp.* [Melo y col., 2005], *Candida rugosa* y *Pseudomonas fluorescens* [Wang y col., 1995].

En 1989, Kaminska y col., analizaron la biotransformación de citronelol utilizando una peroxidasa de rábano, encontrando que el producto de la reacción, favorecía la epoxidación del doble enlace C-C, seguido de la solvólisis del epóxido con metanol o agua, obteniendo como productos principales 6-metoxi-3,7-dimetil-1,7-octanediol; 7-metoxi-3,7-dimetil-1,6-octanediol y 3,7-dimetil-1,6,7-octanetriol.

Adicionalmente se observó una reacción lateral con adición de metanol o agua al doble enlace del citronelol.

Estudios de la bioconversión de terpenos alcohólicos por *Botrytis cinerea* [Brunerie y col., 1987; Farooq y col., 2002], reportan la biotransformación por éste hongo usando jugo de uva como medio de cultivo. El producto principal de la conversión fue el resultante de la ω -hidroxilación, 2,6-dimetil-2-octen-1,8-diol y el resultante de la reducción, 2,6-dimetil-1,8-octanediol. Al utilizar un medio sintético provisto de jugo de uva, se identificaron otros productos de degradación tales como 6-metil-5-hepten-2-ona y ácido citronélico [Bock y col., 1988].

El estudio realizado por Maróstica y col., 2006, muestra la biotransformación de citronelol utilizando *Penicillium sp.*, en medio líquido de almidón, a óxido de rosa, obteniendo los isómeros *cis* y *trans* como productos mayoritarios.

Demyttenaere y col., (1996, 1998a, 1998b, 2000, 2001a, 2001b, 2001c y 2004); han evaluado la hidroxilación de terpenos alcohólicos como el citronelol, linalol, geraniol, nerol y citral, utilizando microorganismos como el *Aspergillus niger*, en especial la cepa proveniente del cepario DSM 821, por su habilidad para catalizar la hidroxilación de terpenos

1.1 PRODUCTOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE CITRONELOL

1.1.1 OXIDO DE ROSA

El óxido de rosa (**Figura 2.**) [*cis* y *trans*-2-(2-metil-1-propenil)-4-metiltetrahidropirano], es un éter cíclico monoterpénico, líquido incoloro a temperatura ambiente, el cual se encuentra presente en muy pequeñas proporciones en el aceite de Rosa Búlgara y Geranio de Reunión. Se ha usado desde 1960, cuando en Estados Unidos, su consumo anual alcanzaba las 5000 libras. El óxido de rosa es un compuesto bastante apreciado en perfumería fina para la fabricación de jabones, detergentes, cremas, lociones y perfumes. En la **Tabla 1.**, se presenta la concentración final de óxido de rosa en los productos mencionados [Rose Oxide Levo, 1975; Miyazawa y col., 1995; Wust y col., 1999].

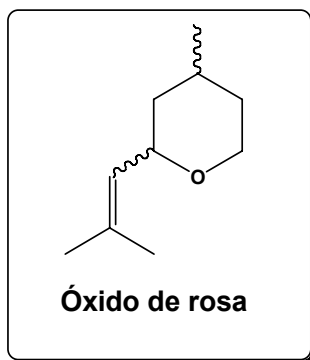


Figura 2. Óxido de rosa.

Tabla 1. Concentración de óxido de rosa en producto final (%)³

Producto final	Jabones	Detergentes	Cremas y lociones	Perfumes
Usual	0,005	0,0005	0,003	0,04
Máxima	0,05	0,005	0,02	0,2

Éste compuesto se aisló por primera vez en 1959 del aceite de Rosa Búlgara y su estructura fue elucidada en 1961 por Seidel según lo reporta Wüst y col., 1998. En la naturaleza se han encontrado cuatro formas isoméricas del óxido de rosa (**Figura 3.**) [Yamamoto y col., 2002], de las cuales el estereoisómero *l-cis* es aquel que presenta mayor poder odorante. Desde entonces el óxido de rosa se ha detectado en varias plantas (*Pelargonium spp.*, *Nigrum ribes L.*, *Cymbopogon winterianus Jowitt*) [Wüst y col., 1998], donde los isómeros *l-cis/trans*-óxido de rosa, se encuentran en mayor proporción [Ohloff y col., 1980].

a. Extracción del óxido de rosa

El aceite de geranio es uno de los materiales de mayor importancia en la industria de las fragancias, además se utiliza como sustancia saborizante en bebidas y dulces, en variadas concentraciones. Este se obtiene por destilación con arrastre de vapor de uvas y ramas de varias especies de *Pelargonium* e híbridos artificiales, donde el óxido de rosa es encontrado como un componente minoritario pero olfativamente importante. [Wüst y col., 1998].

³ ROSE OXIDE Levo. Fragrance raw materials monographs. Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, 1975: P.855.

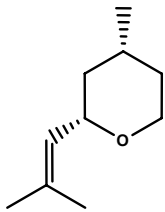
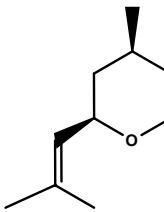
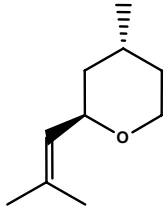
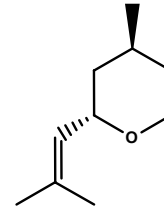
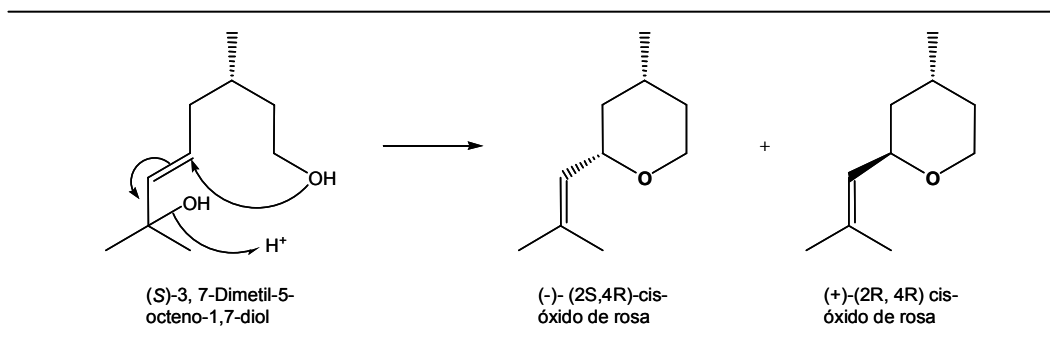
<i>forma-l</i>	Olor	Umbral (ppb)	<i>forma-d</i>	Olor	Umbral (ppb)
 <i>l-cis</i> , (2S,4R)	Verde-Floral	0,5	 <i>d-cis</i> , (2R,4S)	Verde-Floral Herbal	50
 <i>l-trans</i> , (2R, 4R)	Verde-Floral	160	 <i>d-trans</i> , (2S, 4S)	Verde-Floral Herbal	80

Figura 3. Estructura química de las formas isoméricas del óxido de rosa, olor y umbral.

En 1959, Seidel y Stoll, [Wúst y col., 1998] encontraron que la fracción volátil del aceite de Rosa Búlgara estaba principalmente constituida por algunos aldehídos alifáticos, metilfenona y alcoholes hexílicos. A su vez se encontró un óxido desconocido, el cual fue aislado y caracterizado como óxido de rosa. Más adelante, en 1987, se estudió la composición del aceite de Rosa Búlgara, encontrando porcentajes de *cis*-óxido de rosa del 0.39% y de *trans*-óxido de rosa del 0.18%, en la fracción destilada [Kovats, 1987]. Al mismo tiempo, Ohloff y Demole, 1987, estudiaron la importancia del principio odorífero de este aceite en sabores y fragancias, atribuyendo el olor característico a la β -Damascenona y a los diastereoisómeros de la serie *4R* del óxido de rosa.

Knapp y col., en 1998, extrajeron el óxido de los pétalos de Rosa damascena, utilizando como solvente de extracción, metanol. El prefraccionamiento del eluato metabólico usando cromatografía a contracorriente, proporcionó cinco

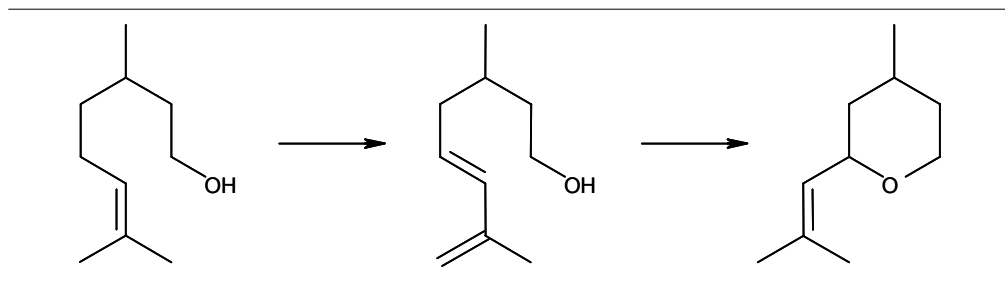
subfracciones, de las cuales la de menor polaridad, con mayor cantidad de odorantes del aceite, contenía los respectivos óxidos de rosa. Paralelamente se identificó el 3,7-dimetil-5-octen-1,7-diol, importante precursor del óxido de rosa (**Esquema 1**).



Esquema 1. Catálisis ácida del 3,7-dimetil-5-octen-1,7-diol.

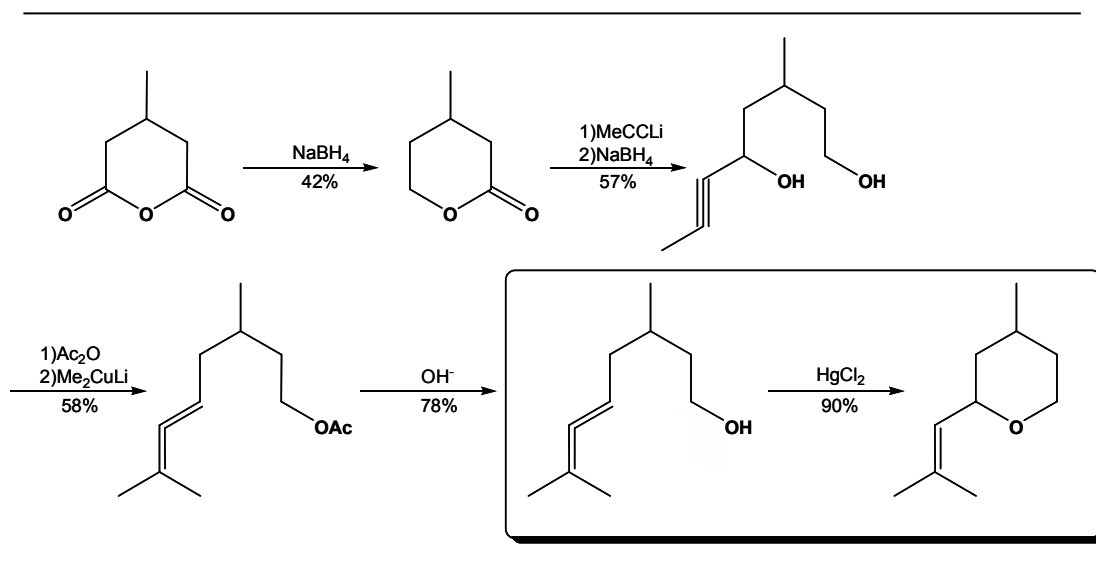
b. Rutas sintéticas de obtención del óxido de rosa

La mayor estrategia sintética para la obtención del óxido de rosa ha sido enfocada a la síntesis del 3,7-dimetil-5,7-octadien-1-ol, a partir del citronelol, para su posterior ciclación (**Esquema 2**).



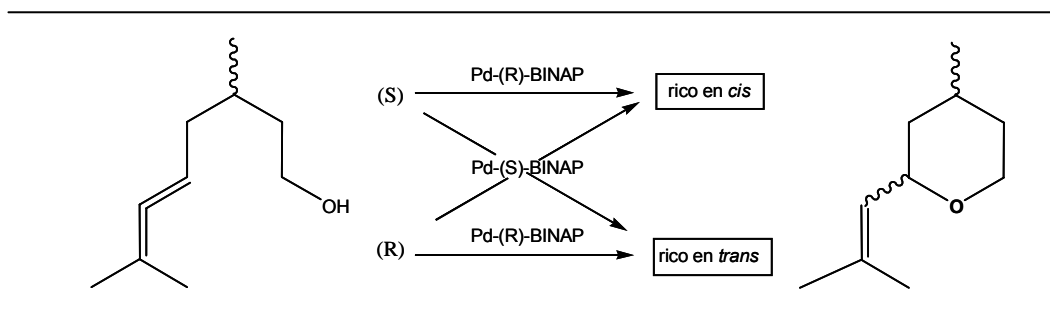
Esquema 2. Ruta sintética para la obtención de óxido de rosa.

Otro método de obtención del óxido de rosa, es por medio de una ciclación selectiva de un intermediario alenil (3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol), reacción catalizada por HgCl_2 . Sin embargo, este proceso se lleva a cabo por medio de múltiples etapas (**Esquema 3.**).



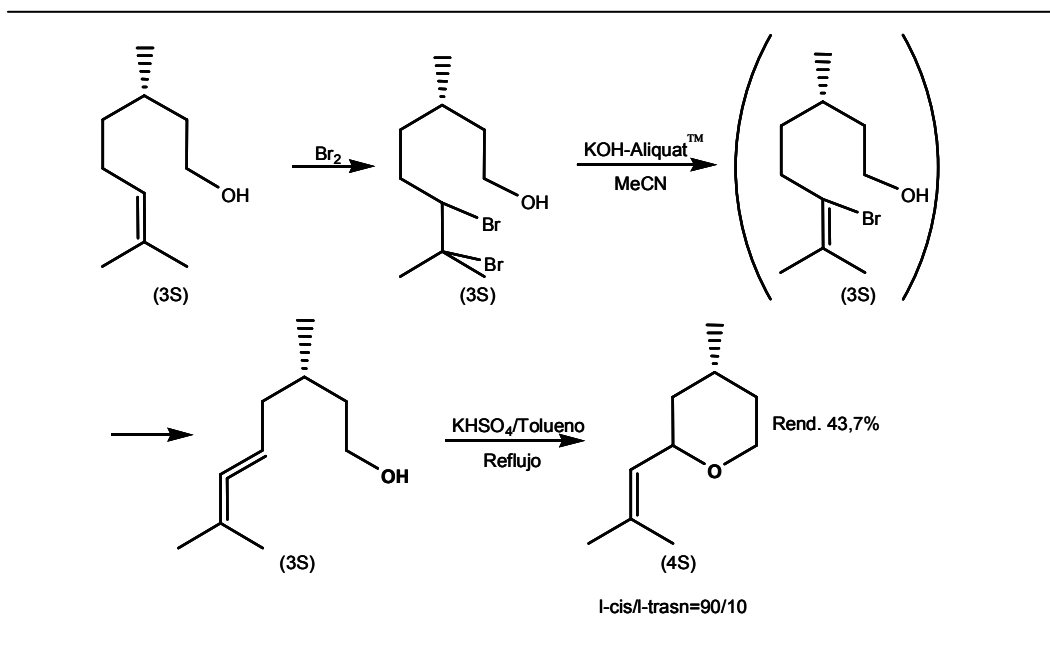
Esquema 3. Síntesis del óxido de rosa por múltiples etapas.

Recientemente Yamamoto y col., 2002, reportaron la síntesis “*one pot*” a partir de citronelol con condiciones de reacción (temperatura y cantidad relativa de KOH con respecto al citronelol bromado), que definen la estereoselectividad del alenil alcohol y posteriormente obtienen el óxido de rosa, utilizando complejos de paladio que definen la estereoselectividad de la reacción (**Esquema 4.**), o empleando KHSO_4 en tolueno a reflujo, como catalizador de la ciclación (**Esquema 5.**).



Esquema 4. Síntesis del óxido de rosa catalizada por complejos de Paladio.

La relación biogenética entre el óxido de rosa y el citronelol en especies *Pelargonium* se investigó en 1998 por Wüst y col., quienes experimentaron con citronelilglucósidos marcados, mostrando que las plantas son capaces de transformar los citronelilglucósidos en el correspondiente óxido de rosa, determinando que el mecanismo de formación apunta a la oxidación enzimática más que a la foto-oxigenación del citronelol con subsiguiente ciclación del diol resultante.



Esquema 5. Síntesis "one-pot" del óxido de rosa catalizada por KHSO_4

1.1.2 ÓXIDO DE NEROL

El óxido de nerol (**Figura 4.**) [3,6-dihidro-4-metil-2-(2-metil-1-propenil)-2-H-pirano], es un éter monoterpénico quiral, líquido incoloro con una poderosa y difusa nota floral. Naturalmente se encuentra en extractos de toronja, uva, limón, saúco y frutas amarillas. Se puede sintetizar a partir del nerol, con fotooxidación, seguida de reducción y posterior ciclación catalizada por ácido [Nerol oxide, 1992].

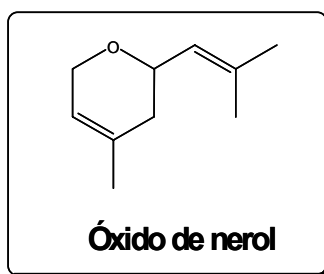


Figura 4. Óxido de nerol.

El óxido de nerol, se aisló por primera vez en 1965 del aceite de Rosa Búlgara por E. Kováts [Ohloff y col., 1980] y hoy en día es un valioso material base en perfumería. En 1974, Schreier y Drawert lo descubrieron en el vino de varias variedades de la uva dónde contribuye a su sabor único. Desde entonces, se ha encontrado en plantas como especies *Pelargonium*, las cuales se usan para la producción del aceite del geranio. Las propiedades olfativas de los enantiomeros se investigaron durante la síntesis enantioselectiva del óxido de nerol por Ohloff y col., en 1980. En 1999, se estudio la biogénesis de este compuesto en plantas de *Pelargonium*, usando precursores deuterados y analizando la enantioselectividad en diferentes aceites de geranio [Wüst y col., 1999].

1.1.3 LINALOL

El linalol (**Figura 5.**) es un alcohol monoterpénico alílico, con un agradable olor a lirio, usado enormemente en la industria de las fragancias. Se emplea en cosmetología, fragancias finas, shampoo, jabones, limpiadores y detergentes. Actualmente se utilizan aproximadamente 1000 toneladas al año, en todo el mundo [Leticia y col., 2003]. Se encuentra naturalmente en plantas y flores, como la lavanda, pero en su mayoría se obtiene a partir de α -pineno. Además, es un intermediario clave para la síntesis de varias vitaminas y productos químicos fragantes, tales como el geraniol, citronelol y citral [Da Silva y col., 2006].

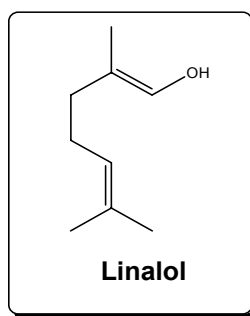


Figura 5. Linalol.

Demyttenaere y col., 2001, evaluaron la biotransformación de linalol con *Aspergillus niger* DSM 821, con el fin de determinar la composición del medio mas favorable para la transformación, tipo y co-solvente apropiado para la adición de sustrato, y posible adaptación del microorganismo al sustrato, tras el enriquecimiento del medio con linalol durante la inoculación, debido a que en 1998, fue reportada la transformación de linalol con *Aspergillus niger* ATCC 9142, obteniendo bajos rendimientos durante la bioconversión [Demyttenaere y col., 1998].

1.1.4 HIDROXICITRONELOL

El hidroxicitronelol (**Figura 6.**) [7-Hidroxi-3,7-dimetiloctan-1-ol], obtenido de manera sintética, se ha utilizado desde 1930. Sólo hasta 1983, Hirvi y col., lo encontraron presente en el aroma de los arándanos, especificándose el olor característico de estos frutos como el producido por el hidroxicitronelol. En este estudio se determinó su concentración de umbral en 5mg/Kg en agua. El hidroxicitronelol es utilizado para la fabricación de jabones, detergentes, cremas, lociones y perfumes. En la **Tabla 2.**, se presenta la concentración final de hidroxicitronelol en los productos mencionados

La preparación de hidroxicitronelol por una reacción de adición de agua al citronelol y catalizada por una resina de intercambio catiónico esta patentada⁴.

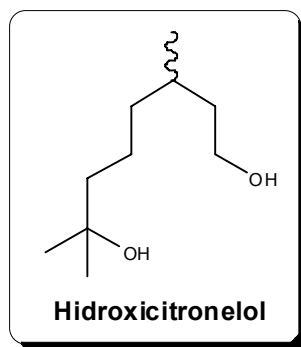


Figura 6. Hidroxicitronelol

⁴.Patente U.S. 4482765. Preparation of Hydroxycitronellol

Tabla 2. Concentración de hidroxicitronelol en producto final (%)⁵

Producto final	Jabones	Detergentes	Cremas y lociones	Perfumes
Usual	0,03	0,003	0,01	0,3
Máxima	0,15	0,015	0,05	1

Los compuestos mencionados (óxido de rosa, óxido de nerol, linalol e hidroxicitronelol) como productos de la biotransformación del citronelol se obtienen mediante reacciones de hidroxilación que realiza el microorganismo usando un complejo de enzimas conocido como oxigenasas.

1.2 HIDROXILACIÓN ENZIMÁTICA CON OXIGENASAS

La hidroxilación, conversión de un enlace carbono-hidrógeno a uno carbono-hidroxilo, es una actividad enzimática que ocurre en todas las formas de vida desde las bacterias hasta los humanos. La reacción es una parte importante del metabolismo oxidativo de muchos compuestos orgánicos, productos farmacéuticos beneficiosos y contaminantes medioambientales dañinos. Se ha usado durante muchos años en la producción industrial de químicos finos y para los procesos de bioremediación.

⁵ HYDROXYCITRONELLOL. FRAGRANCE raw materials monographs. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1974; Vol. 12 (7-8): P.923.

A pesar de su ubicuidad, la hidroxilación ha sido una reacción enzimática poco entendida. Esto se debe a que la mayor parte las enzimas hidroxilasas son complejos multiproteínicos limitados por una membrana, que dificulta su aislamiento y a menudo las vuelve inestables en forma aislada. Las hidroxilasas pertenecen al grupo de enzimas oxidativas conocidas como oxigenasas [Holland y col., 2000; Bell y col., 2001; Duetz y col., 2001; Cirino y col., 2002; Li y col., 2002].

Las oxigenasas se requieren en el metabolismo de varios nutrientes, para la biosíntesis, transformación y degradación de metabolitos esenciales y neurotransmisores. Adicionalmente se utilizan para la obtención de productos farmacéuticos, insecticidas, carcinógenos y en la síntesis de numerosos compuestos. Debido a sus capacidades catalíticas se destaca su significancia en medicina, agricultura, microbiología, tecnología de alimentos, salud pública y bioquímica en general [Bugg, 2001; Duetz y col., 2001; Hayaishi, 2004; Urlacher y col., 2006].

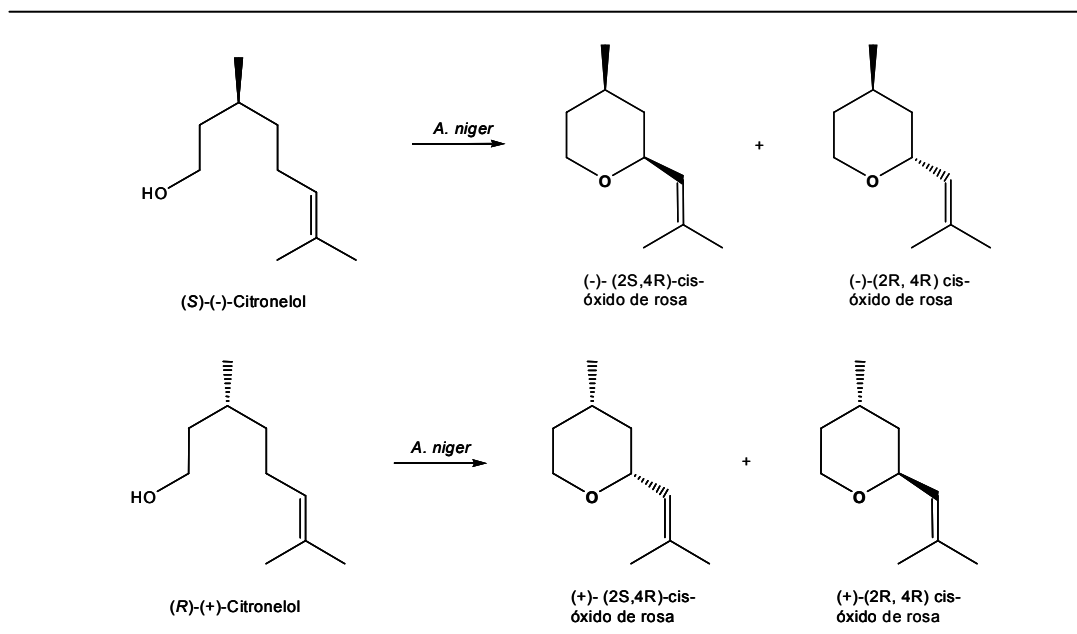
Las oxigenasas son ampliamente utilizadas en las biotransformaciones, debido a tres razones principales: 1) Sus contrapartes químicas o no existen, o no poseen la regioselectividad y estéreoselectividad requeridas; 2) Se usa oxígeno como oxidante económico y no tóxico para el ambiente en comparación con otros oxidantes químicos; 3) Pueden ser usadas para preparar bloques constructores quirales e intermediarios farmacéuticos o para modificar productos naturales con actividades biológicas significativas [Flitsch y col., 1999; Li y col., 2002].

Debido a estas razones, el número de procesos para la fabricación de químicos finos que involucran biocatálisis o ingeniería metabólica con oxigenasas ha aumentando considerablemente.

En un intento por comparar los resultados del estudio de la utilización de enzimas aisladas [Duetz y col., 2001] y sistemas celulares enteros, se analizó la hidroxilación de una serie de sustratos cíclicos con hidroxilasas aisladas de *Pseudomonas putida*, *Beauveria bassiana*, y *Rhodococcus rhodochrous*. Los resultados mostraron una tendencia general en la regioselectividad de la hidroxilación, pero también diferencias significativas de la especificidad de sustrato, que sugieren que una generalización de las actividades de la enzima hidroxilasa a través de la especie no es posible [Flitsch y col., 1999; Holland y col., 1999; Holland y col., 2000].

Demyttenaere y col., (1996, 1998a, 1998b, 2000, 2001a, 2001b, 2001c y 2004), ha realizado estudios sobre la biotransformación de progesterona, diterpenoides, isosteviol, y diferentes terpenos, utilizando el hongo *Aspergillus niger*. Estos autores describen la hidroxilación regio-específica de alcoholes monoterpénicos acíclicos y sus acetatos. Así, lograron conversiones del 32% a *cis*-óxido de rosa, y del 11% a *trans*-óxido de rosa (**Esquema 6.**), además de obtener óxido de nerol, 6-metil-5-hepten-2-ona, valenceno, aristoloqueno, y linalol, mientras que con *Penicillium sp.*, los productos de la reacción fueron el *cis*- y *trans*-óxido de rosa, además del óxido de nerol, 6-metil-5-hepten-2-ona, aristoloqueno y β -Elemeno.

Puesto que el (-)- *cis*-óxido de rosa es el más apetecido de los cuatro estereoisómeros del óxido de rosa, debido a su bajo umbral (alta capacidad odorífera a bajas concentraciones, 0.5ppb) [Yamamoto y col., 2002], se puede deducir que esta biotransformación resulta bastante promisorio desde el punto de vista comercial, ya que este isómero brinda un agradable aroma a geranio verde-floral [Demyttenaere y col., 2004].



Esquema 6. Biotransformación de citronelol con *Aspergillus niger*.

Es importante indicar que en ninguno de los trabajos de biotransformación mencionados se ha obtenido hidroxicitronelol como producto de la reacción.

1.3 *Aspergillus niger*

El *Aspergillus niger* es ampliamente utilizado en aplicaciones biotecnológicas, en la degradación de químicos tóxicos como el hexadecano y el tratamiento de las aguas residuales. Además se utiliza en la biosorción de metales pesados peligrosos, tales como cadmio, plomo, cromo y cobre. Las especies del género *Aspergillus* se pueden aislar de una gran variedad de sustratos. Normalmente pueden tolerar ambientes bastante secos. La actividad acuosa (a_w) y la temperatura son factores críticos que afectan el crecimiento y metabolismo de estos hongos, mostrando que pequeños cambios en la tensión de agua pueden

producir un estímulo significativo en la producción de metabolitos secundarios [Tequida y col., 2002; Bapat y col., 2003; Parra y col., 2004].

Microscópicamente (**Figura 7.**) el *Aspergillus niger* presenta cabezas conidiales biseriadas y radiales; estipes de paredes gruesas, lisos, hialinos, amarillentos o de color marrón pálido, en especial cerca de la vesícula. Vesícula casi esférica; métulas ocupando toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos de color marrón, normalmente muy rugosos con crestas irregulares y protuberancias [Abarca, 2000].

Sus esporas se utilizan como inóculo, en procesos de biotransformación en medio sólido en viales inclinados, cajas de Petri y Erlenmeyers, con medios químicamente definidos PDA (Papa Dextrosa Agar) o MEA (Malta Extracto Agar) [Bapat y col., 2003].

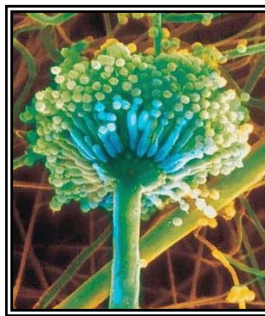


Figura 7. *Aspergillus niger*. Conidióforo.

En la **Figura 8.**, se muestran las características macroscópicas de las colonias de *Aspergillus niger* en MEA y PDA.



Figura 8. Características macroscópicas, Colonias de *Aspergillus niger* en: a. PDA y b. MEA.

Dentro de las cepas de *Aspergillus niger* mas utilizadas en los procesos de biotransformación de diferentes terpenos incluido el citrionelol se encuentra la cepa de *Aspergillus niger* DSM 821.

2. METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

En este estudio se utilizó una cepa liofilizada del microorganismo *Aspergillus niger* (DSM 821) (**Figura 9.**) obtenida de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany), debido a que es una cepa certificada a nivel internacional.

Los medios de cultivo fueron medio MEA (Extracto de Malta Agar) y medio PDA (Papa Dextrosa Agar) obtenidos de Oxoid. Como sustrato se empleó una mezcla racémica (S)-(-) y (R)-(+)-citronelol, reactivo para síntesis (Merck).



Figura 9. Cepa liofilizada de *Aspergillus niger*.

Se utilizaron reactivos grado analítico como diclorometano (DCM), etanol (EtOH), cloruro de sodio (NaCl) y sulfato de sodio anhidro (NaSO₄); mientras que el patrón de citronelol empleado durante los análisis cromatográficos fue grado CG y suministrado por Fluka.

2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental de este proyecto se realizó por etapas, comenzando con las rutinas necesarias para la reactivación, cultivo y mantenimiento del microorganismo, seguido del proceso de biotransformación de citronelol utilizando *Aspergillus niger*. En esta etapa se hizo necesario establecer parámetros para facilitar el crecimiento del hongo, y la transformación del sustrato. Los productos de la biotransformación fueron extraídos y analizados por cromatografía de gases con detector de masas (CG-EM).

2.2.1 Procesos de rutina para el trabajo con microorganismos

En esta etapa se ajustaron y realizaron los procesos de rutina, utilizando buenas prácticas de laboratorio para el trabajo con microorganismos, tal como se describe a continuación:

a. Reactivación del microorganismo

La reactivación del microorganismo liofilizado, se realizó siguiendo el procedimiento especificado en la ficha técnica. Para ello el contenido de la ampolla se rehidrató durante 30 minutos con 1.0 mL del medio de cultivo PDA. Posteriormente, el contenido hidratado se agitó y transfirió a un tubo de ensayo con el medio de cultivo y se mantuvo a temperatura ambiente, durante 8 días. A partir de este cultivo del hongo, se inoculó el medio sólido de MEA y de PDA en cajas de petri durante 8 días a 28 °C.

b. Replicación de la cepa de *Aspergillus niger*

A partir de los cultivos en PDA, se hicieron repiques en cajas de petri que contenían MEA o PDA como medio sólido de cultivo. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 8 días. Este proceso se repitió con el fin de tener cepas frescas al momento de realizar experimentos.

c. Preparación de la suspensión de esporas

Sobre la superficie de la caja de petri de 8 días de crecimiento, se agregaron 15 mL de una solución salina estéril de 8,5 g/L de NaCl y Tween 80 al 0,1%V/V en agua y con ayuda de una varilla de vidrio estéril, se removieron las esporas de la caja. Posteriormente, el sobrenadante se extrajo y se depositó en un tubo de 50 mL con perlas de vidrio, donde la solución de esporas se agitó para proceder al recuento.

El recuento de esporas se realizó en un microscopio utilizando una cámara de Neubauer (**Figura 10.**), haciendo las diluciones respectivas (**Ecuación 1.**). Posteriormente la concentración de esporas en solución se ajustó aproximadamente hasta 10^8 esporas mL^{-1} .

Ecuación 1. Medición de la concentración de esporas en suspensión

Concentración en la suspensión (Esporas/mL): $[10000 \cdot X]$

4

X: Σ (esporas) entre las cuatro áreas *L* de la **Figura 10.**

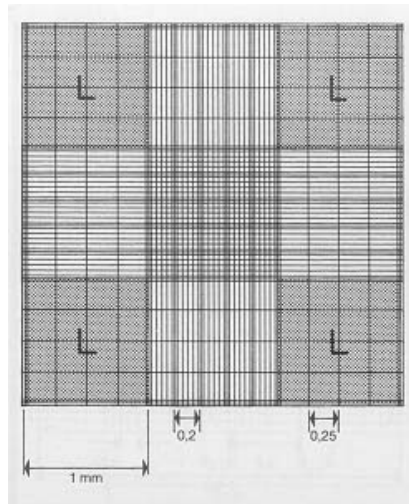


Figura 10. Cámara de Neubauer.

d. Cultivo de *Aspergillus niger*

Preparado el medio de cultivo MEA o PDA, se adicionaron 5 mL de medio a cada sistema de crecimiento (tubos, erlenmeyer, viales), y posteriormente se esterilizó.

Para la inoculación, en todos los casos, se adicionaron 50 μL de la suspensión de esporas de 10^8 esporas mL^{-1} , sobre el medio, inmediatamente, cada sistema se cubrió con parafilm y se incubó en la estufa a $28\text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 días [Demyttenaere y col., 1996, 1998a, 1998b, 2000, 2001a, 2001b, 2001c y 2004].

2.2.2 Evaluación de las variables relacionadas con el crecimiento del *Aspergillus niger*

Para evaluar el efecto de las variables que afectan el crecimiento del microorganismo, se realizó un diseño experimental al azar. En todos los casos la variable respuesta fue cualitativa y se basó en la observación del crecimiento del hongo y la formación de esporas.

Inicialmente se seleccionó el medio de cultivo, para lo cual se utilizaron los medios MEA y PDA a las condiciones descritas por Demyttenaere y col., 2004: $30\text{ }^\circ\text{C}$ durante las 24 horas iniciales y posteriormente a temperatura ambiente el tiempo restante del experimento.

Una vez seleccionado el medio, se procedió a evaluar el efecto de la temperatura, del pH y de la disponibilidad de oxígeno. Para evaluar la temperatura se observó el crecimiento del hongo a temperatura controlada de 28 °C y a temperatura ambiente no controlada. Posteriormente se procedió a evaluar el efecto del pH con medios MEA y PDA a pH inicial 5.5 y 6.0, respectivamente y con cada medio ácido a pH 3,5 [López y col., 2006].

Para evaluar el efecto de la disponibilidad de oxígeno se observó el crecimiento del hongo en sistemas con diferentes condiciones de oxigenación. Para ello el hongo se cultivó en viales de 20 mL, tubos de ensayo y Erlenmeyer cubiertos con parafilm, o en viales con tapa y septum, y tubos de ensayo con tapa rosca, cerrados herméticamente. En todos los casos la cantidad de medio de cultivo utilizado fue de 5 mL y el tamaño del inóculo de 10^8 esporas mL⁻¹.

2.2.3 Biotransformación de citrionelol utilizando *Aspergillus niger*

En el proceso de biotransformación se evaluó inicialmente el efecto del oxígeno disponible, utilizando un sistema sellado y un sistema no sellado. Posteriormente se midió la autooxidación del citrionelol y finalmente la biotransformación a diferentes volúmenes de sustrato, para determinar la influencia de la superficie de contacto entre el medio y el citrionelol.

- Para evaluar el efecto del oxígeno disponible, se adicionaron a los viales que contienen medio MEA o PDA, 20 µL de solución etanólica de citrionelol al

40%. Los medios fueron analizados en sistema sellado y en sistema no sellado, en cuanto a la variación de citronelol por transformación química o evaporación en el tiempo a los 0, 2 y 8 días, para lo cual se extrajo con DCM así: a cada vial se le adicionó una porción de 3 mL de solvente orgánico, se agitó hasta romper el medio en el vortex, posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 8 minutos (centrifuga Hettich modelo Rotofix 32). La capa del solvente orgánico, se transfirió a viales oscuros con tapa y septum. Se realizó una segunda extracción con solvente realizando el mismo procedimiento. Los productos de la extracción se secaron con sulfato de sodio anhidro y luego se concentraron hasta 1 mL con nitrógeno gaseoso para su posterior análisis por CG-EM.

- Para evaluar la autooxidación de citronelol se siguió el método descrito por Demyttenaere, 2004; con el fin de conocer la estabilidad del citronelol y la posible catálisis química que se puede dar en el medio. Para ello, las reacciones se llevaron a cabo en viales de 20 mL, usando medio MEA y medio PDA a una temperatura de 28 °C y al pH inicial. A los tres días se adicionó el citronelol en EtOH y se selló cada sistema con tapa y septum. A partir de este momento se monitoreó la concentración de citronelol, extrayendo con DCM después de 0, 2, 6, y 15 días de reacción. Los productos generados se analizaron, identificaron y cuantificaron por CG-EM.

- Para evaluar la biotransformación del citronelol, se aplicó un diseño experimental al azar para determinar el efecto de: a) el volumen de solución de sustrato en el medio y b) el tiempo de reacción. Inicialmente se procedió a crecer durante tres días el microorganismo en viales de 20 mL que contenían medio MEA o PDA a 28 °C al pH inicial del medio 5.5 y 6.0, respectivamente, en un sistema no sellado. Al cabo de este tiempo se adicionó la solución etanólica de sustrato, se cubrió con tapa y septum y se sellaron los viales. A partir de este momento se

monitoreó la conversión, extrayendo con DCM después de 0, 2, 4, 6 y 8 días de reacción. Los productos generados se identificaron y cuantificaron por CG-EM.

Durante el proceso de biotransformación, se experimentó con concentraciones totales de sustrato al 98% en el medio de 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16 y 0.4% (V/V).

El porcentaje de cada componente en la muestra se definió como:

$$\% \text{Área}_{X_i}: \frac{X_i * 100}{X_t}$$

X_i : Área de cada componente en la muestra.

X_t : Área total de la muestra.

La relación del área de cada componente, respecto al área del citronelol adicionado y la evaporación de compuestos, se definió como:

$$\% X_{t_{\text{Corr}}}: \frac{X_t * 100}{X_c}$$

X_c : Área del citronelol adicionado inicialmente en el sistema.

2.2.4 Métodos de análisis

El análisis de los metabolitos se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases modelo *HP-5890 A Series II*, equipado con un puerto de inyección *split /splitless* (relación de split 30:1), la inyección se efectuó de manera automática, usando un inyector *HP 7683 Series II*; como medio de separación se empleó una columna *HP-5* con fase estacionaria de 5% fenil polidimetilsiloxano [60m x 0,25mm (d.i.) x 0,25µm (f.e.)], usando una rampa de calentamiento de 5°C/min, iniciando desde 50°C hasta 250°C., temperatura que se mantuvo durante 10 min.

Para la identificación de los compuestos, el cromatógrafo se acopló a un detector selectivo de masas *Hewlett Packard* modelo *HP 5972* con sistema de ionización por impacto de electrones (70ev), temperatura de la cámara de ionización de 180°C y un analizador másico cuadrupolar operado en el modo de barrido completo por radiofrecuencia *fullscan* desde 40 hasta 400 Dalton (m/z). Los componentes se identificaron mediante la comparación de sus espectros de masas con los de las bibliotecas (NBS 75k y WILEY 138K) y los registrados en el sistema de *datos HP Enhanced Chemstation G1701BA* (versión B.01.00).

La cuantificación de los componentes se realizó, con método de normalización simple de áreas. [Poole, C.F. y Poole, S.K., 1991].

2.2.5 Tratamiento estadístico de datos

En el tratamiento estadístico de datos se calcularon el promedio (\bar{x}), la desviación estándar (σ) y los coeficientes de variación (CV), a partir de las mediciones realizadas por duplicado.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON EL CRECIMIENTO DEL *Aspergillus niger*.

La evaluación del efecto de las variables sobre el crecimiento del microorganismo se basó en la observación del crecimiento radial del micelio del hongo y la formación de esporas.

3.1.1 Selección del medio de cultivo.

Inicialmente se evaluó el efecto del medio de cultivo (**Tabla 3.**), observándose que el *Aspergillus niger* DSM 821 comienza la producción de esporas en medio MEA, después de dos días de cultivo, y su producción cesa en el rango de 8 a 10 días después de cultivado. El micelio del hongo toma un color café, que con el tiempo, aumenta su área superficial (**Figura 11.**).

En medio PDA, como muestra la **Figura 12.**, la producción de esporas comienza al segundo día de cultivo, y cesa después de 8 días. Inicialmente el micelio tiene un aspecto amarillento, que va tomando una coloración verdosa, sobre el cual se observa la formación de esporas.

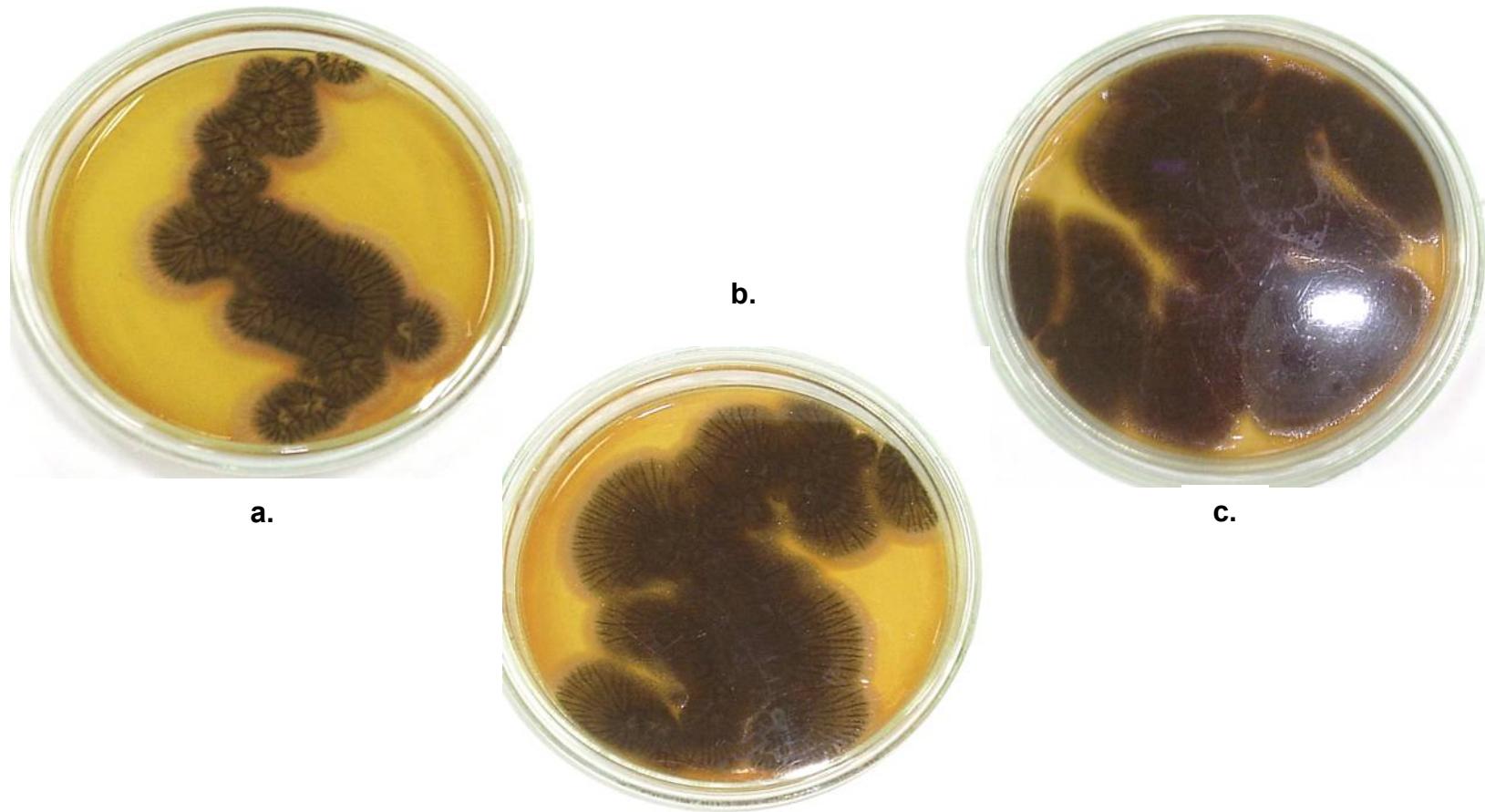


Figura 11. Crecimiento del *Aspergillus niger* DSM 821 en MEA; a. A los 2 días, b. A los 4 días y c. A los 8 días.

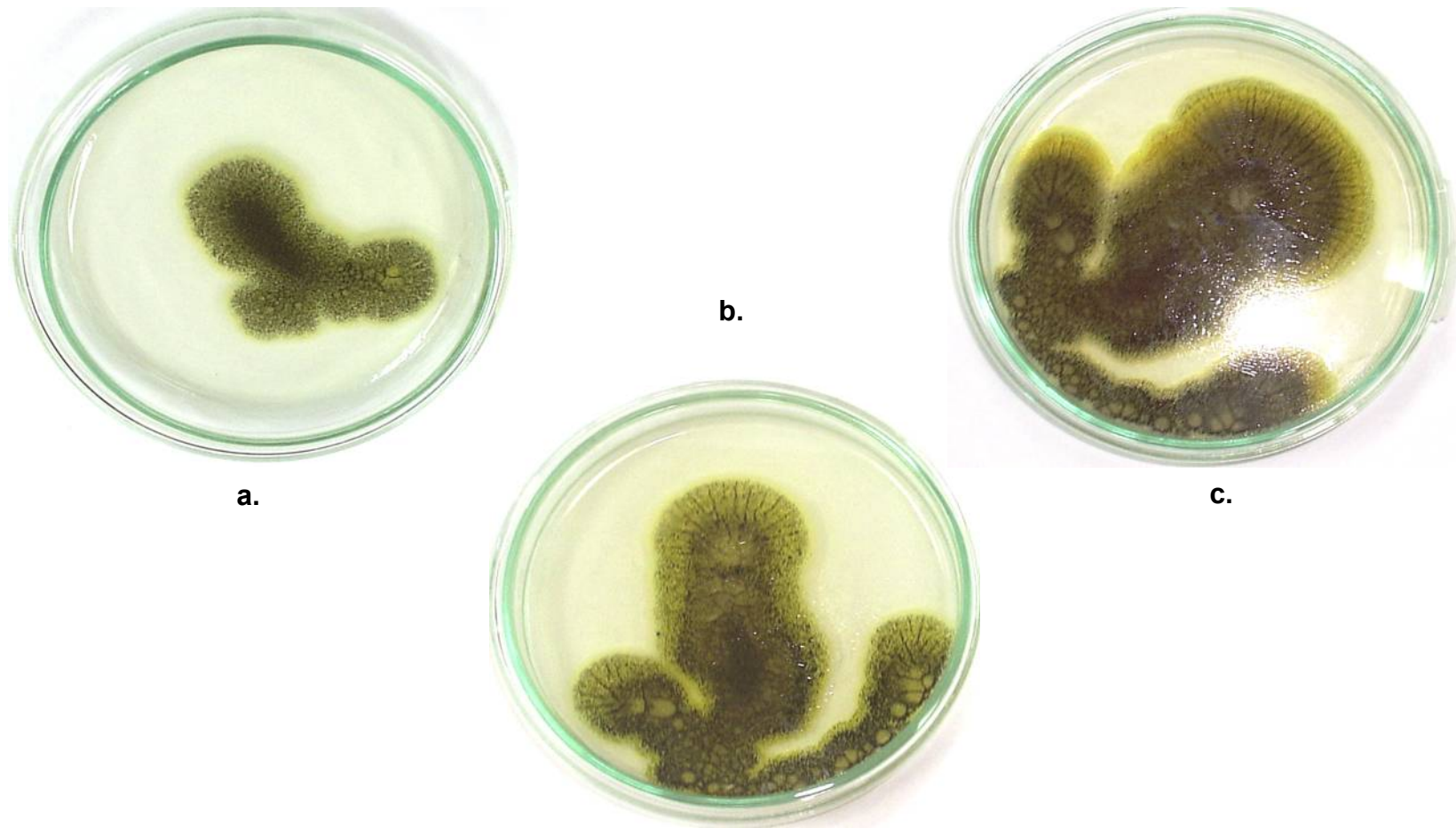


Figura 12. Crecimiento del *Aspergillus niger* DSM 821 en PDA; a. A los 2 días, b. A los 4 días y c. A los 8 días.

En la **Tabla 3.**, se describe el crecimiento radial del *Aspergillus niger* en MEA, deduciendo que después de dos días, el crecimiento es aproximadamente igual al crecimiento del hongo en PDA después de 4 días, relación que se mantiene incluso después de 8 días, cuando el hongo detiene su crecimiento, tanto radial como en producción de esporas.

Tabla 3. Comparación del efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento radial del *Aspergillus niger* en MEA y PDA.

	2 días	4 días	6 días	8 días	15 días
MEA	xx	xxx	xxxx	xxxxx	xxxxx
PDA	x	xx	xxx	xxxx	xxxx

x: Insuficiente **xx:** Regular **xxx:** Aceptable
xxxx: Bueno **xxxxx:** Excelente

Es de notar que en MEA las esporas forman una especie de terciopelo sobre el micelio del hongo, mientras que en PDA, el crecimiento de las esporas es más definido, presentándose un conidióforo más largo que en PDA (**Figura 13.**).

Con base en los resultados mostrados para el crecimiento del *Aspergillus niger*, se concluye que el hongo crece más abundante en MEA que en PDA.

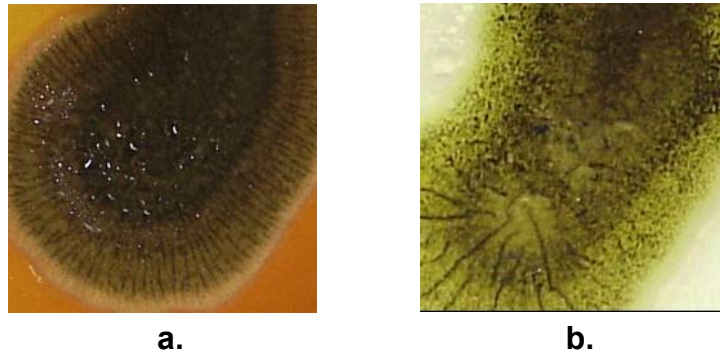


Figura 13. Crecimiento superficial de *Aspergillus niger* en: a. MEA y b. PDA.

3.1.2 Evaluación del efecto de la incubación a temperatura controlada (28°C) y temperatura ambiente no controlada sobre el crecimiento del *Aspergillus niger*

Al mantener el hongo en MEA a temperatura controlada de 28°C, se observó un crecimiento radial uniforme del micelio del microorganismo, y la formación de esporas consecuente con la edad del hongo como puede verse en la **Figura 14: a (2 días de crecimiento), b (4 días)** y **c (8 días)**, mientras que al conservarlo en MEA a temperatura ambiente no controlada (**Figura 14. d., e., f.**), el crecimiento radial fue irregular. Por lo tanto, es más adecuado mantener el hongo a temperatura controlada de 28°C.

El hongo cultivado en PDA y mantenido a temperatura controlada de 28°C, revela características similares al crecimiento en MEA, pues se observa como el micelio crece radialmente de acuerdo a su edad (**Figura 15. a., b., c.**). La exposición a temperatura ambiente no controlada afecta la morfología del cultivo,

especialmente después de 4 días, en este ultimo caso, se nota una mayor producción de esporas (Figura 15. d., e., f.).

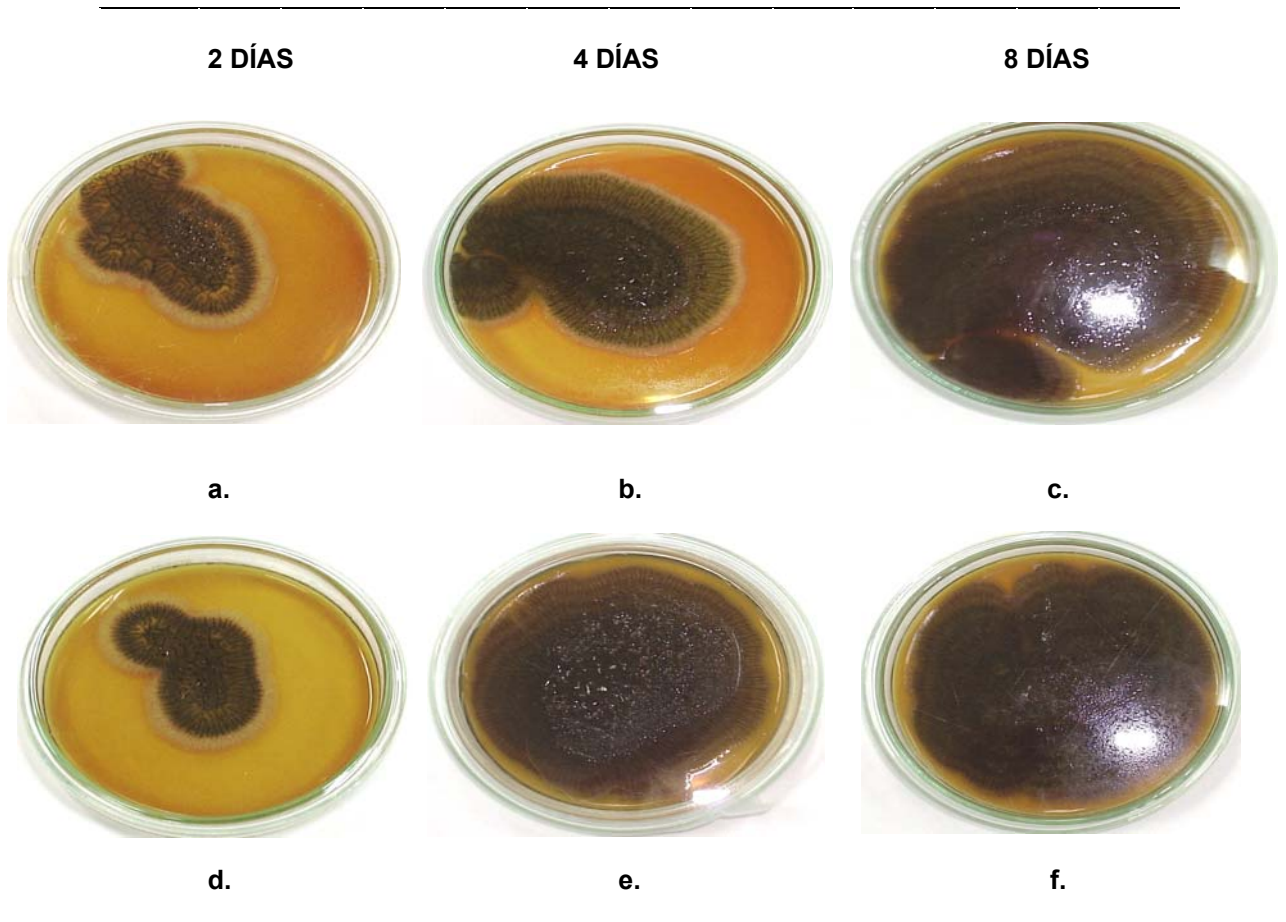


Figura 14. Crecimiento del *A. niger* en MEA a temperatura controlada (28°C): a., b. y c.; y a temperatura ambiente no controlada: d., e. y f.

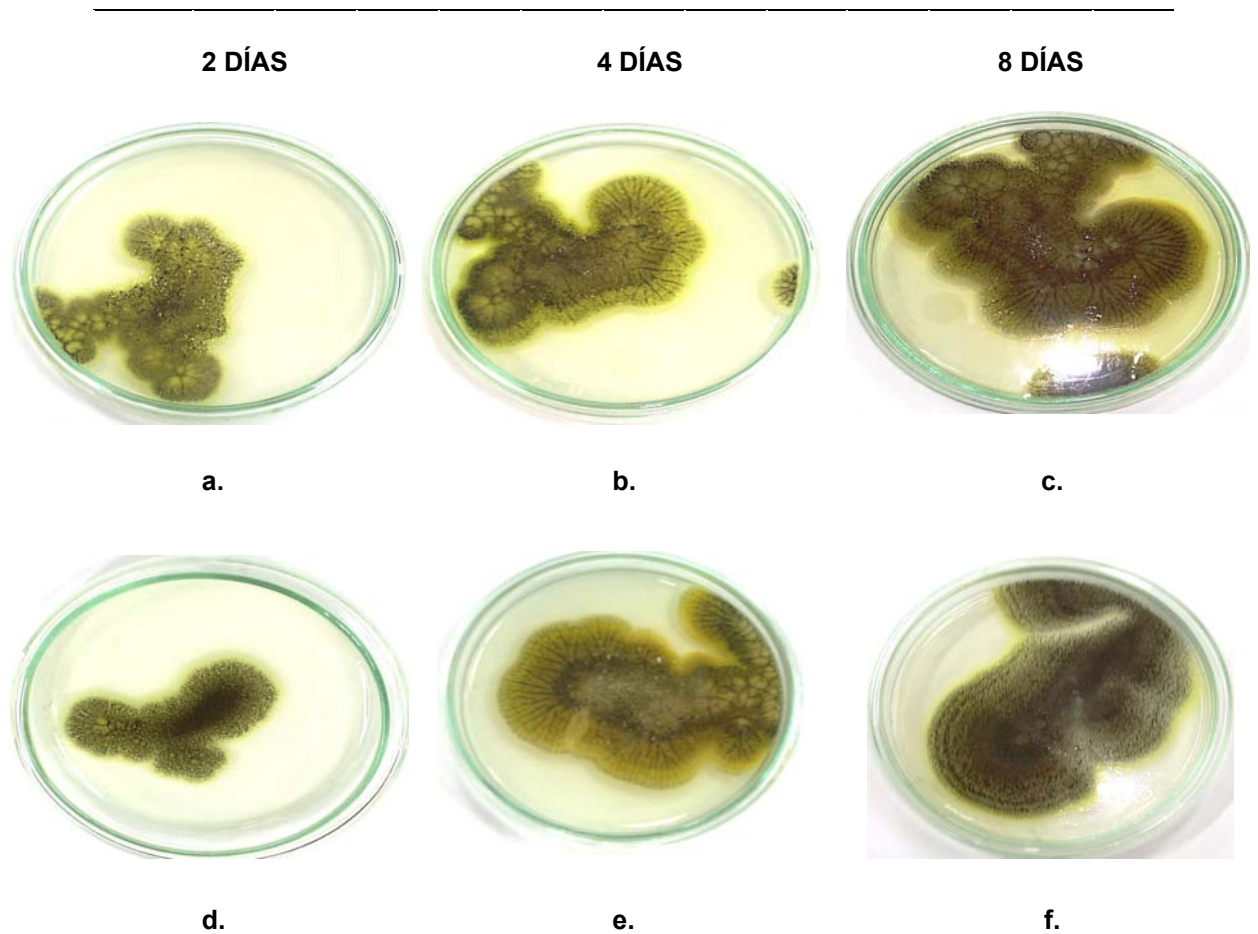


Figura 15. Crecimiento del *A. niger* en PDA a temperatura controlada (28°C): a., b. y c.; y a temperatura ambiente no controlada: d., e. y f.

3.1.3 Evaluación del efecto del pH sobre el crecimiento del *Aspergillus niger*

Durante la evaluación del crecimiento del hongo a pH 3.5, tanto en MEA como en PDA, no se observó crecimiento del micelio, ni producción de esporas de *Aspergillus niger*, incluso después de 15 días de cultivo (**Figura 16. a., b.**). A pH 5.5 para MEA y 6.0 para PDA, se observa crecimiento en los dos medios. Por lo

anterior, se selecciona como pH para el crecimiento del microorganismo, este ultimo valor.

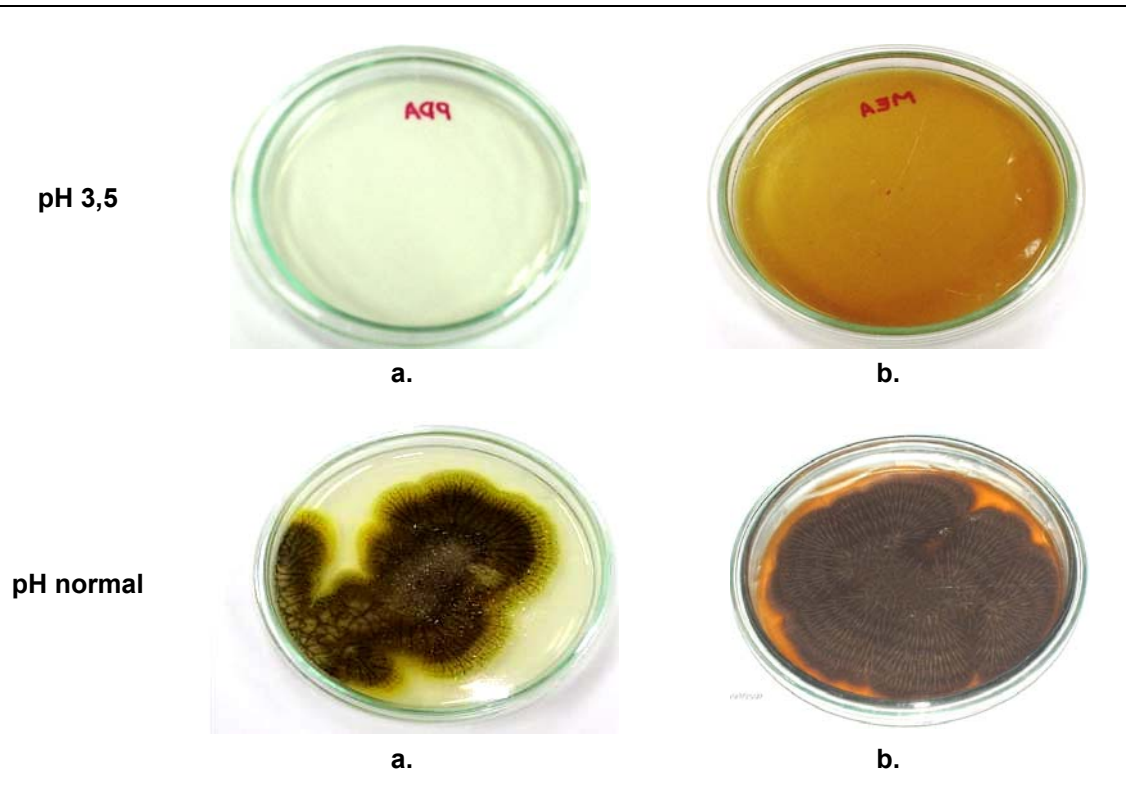


Figura 16. Efecto del pH del medio sobre el crecimiento del hongo:
a. MEA y b. PDA

3.1.4 Evaluación del efecto de la disponibilidad de oxígeno en el sistema sobre el crecimiento del *Aspergillus niger*

Al evaluar el efecto del oxígeno disponible en recipientes diferentes utilizando sistema sellado y no sellado (**Figura 17.**), se observa que el oxígeno es

fundamental en el crecimiento del hongo. En los sistemas abiertos (sistemas no sellados), se aprecia un micelio que cubre radialmente la superficie del medio, de un color amarillo brillante, sobre el cual se distingue claramente, la formación de esporas. Es de notar, que los experimentos realizados en erlenmeyer evidencian un hongo mucho más vistoso, característica referida a la mayor disponibilidad de oxígeno disponible en este sistema comparado con los viales y los tubos de ensayo.

En aquellos casos donde la aireación del sistema esta muy limitado (sistema sellado), la producción de esporas es nula, solo se observa la formación de un micelio blancuzco muy pálido, en algunas partes del medio (**Figura 17.**), que con el tiempo lo recubre casi por completo, mostrando que la disponibilidad de aire en estos sistemas no es suficiente para el completo desarrollo del hongo.

Con base en los resultados anteriores, se establece que el crecimiento radial uniforme del micelio del microorganismo y la formación de esporas consecuente con la edad del hongo, se obtiene bajo siguientes condiciones: Temperatura controlada de incubación de 28 °C, pH inicial de cada medio, mayor disponibilidad de aire, a mayor espacio de cabeza del sistema, mejor crecimiento radial y mejor producción de esporas.

**Sistema
sellado
4 días**



a.



b.



a.



b.

**Sistema
no
sellado
6 días**



a.



b.



a.



b.



a.



b.

Figura 17. Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre el crecimiento del hongo en viales de 20mL y tubos: MEA (a) y PDA (b)

3.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE CITRONELOL UTILIZANDO *Aspergillus niger*

3.2.1. Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la evaporación del citranelol

Previó a la realización de los procesos de biotransformación, se evaluó el efecto de utilizar un sistema sellado o un sistema no sellado sobre la concentración de citranelol. Como lo muestran las **Figuras 18.** y **19.**, al mantener el sistema no sellado el citranelol se evapora, más rápidamente que en el sistema sellado.

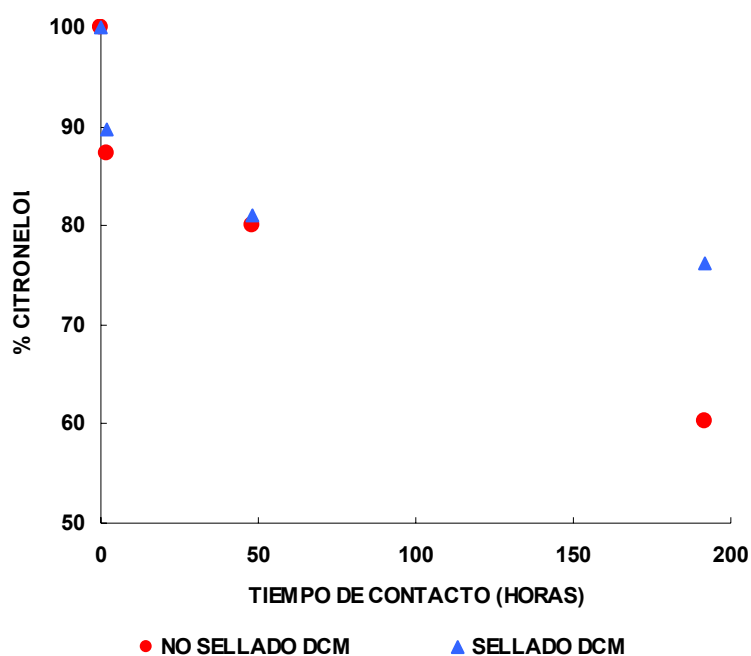


Figura 18. Evolución del citranelol en sistema con diferente disponibilidad de oxígeno en MEA.

En medio MEA el citronelol recuperado, después de dos días en ambos sistemas, es similar: 80% en un sistema no sellado, y en 81% el sistema sellado. Después de 8 días la pérdida aumenta, hasta obtener 60% y 76% respectivamente. En PDA, el comportamiento del citronelol es diferente (**Figura 19.**). En el sistema no sellado después de dos días la pérdida alcanza valores de 27%, mientras que en el sistema sellado la pérdida calculada es de 12%. Después de 8 días la pérdida de citronelol es de 28% y 14%, respectivamente.

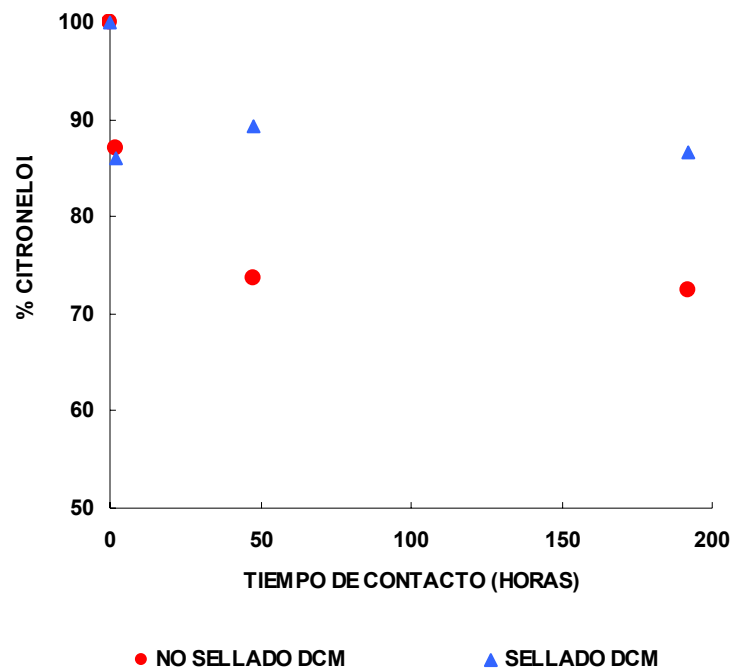


Figura 19. Evaluación de la evolución del citronelol en sistema con diferente disponibilidad de oxígeno en PDA.

Estos datos, muestran que en los sistemas no sellados la pérdida de citronelol es mayor, en diferencia al comportamiento seguido por un sistema sellado donde se observa pérdida secuencial del sustrato, lo que sugiere indudablemente, la

necesidad de cerrar el sistema al momento de adicionar el sustrato para la biotransformación.

Podría pensarse que las causas de este comportamiento son en primera instancia la pérdida de citronelol por evaporación. Sin embargo, como esta pérdida no es igual en los dos medios utilizados, pareciera que el medio influye en la recuperación de sustrato, incluso, después de dos horas de contacto, recuperando solo el 88% en PDA y mucho menos en MEA, lo que sugiere que el citronelol tiene mayor afinidad por el medio MEA, quedando atrapado en este medio.

Demyttenaere y col., 2004., encontraron que al extraer el citronelol del medio YMPG (Extracto de levadura 0.5%, extracto de malta 1%, peptona bacteriológica 0.5%, glucosa 1%, pH 6.1), en un sistema sellado, las pérdidas del citronelol adicionado son del 60%. Los autores también consideraron la evaporación como una causa de este comportamiento.

3.2.2 Autooxidación de citronelol

Como se mencionó en el apartado **2.2.3**, para evaluar la autooxidación del citronelol, éste se adicionó al medio de cultivo y se trató en las mismas condiciones en que se hizo la biotransformación, salvo que el medio de cultivo no fue inoculado con esporas.

Para el caso del PDA, se observó una mínima formación de 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol y de hidroxicitronelol, después de 2 horas de reacción. Con el tiempo la concentración de estos compuestos disminuye y al cabo de 15 días de reacción

(**Tabla 4.**) se obtiene un porcentaje máximo de 0.05% de óxido de rosa. En medio MEA, en cambio, no se detecto la presencia de compuestos diferentes al citronelol durante todo el experimento.

Es de notar, que la concentración de citronelol disminuye desde el tiempo cero, ya que al extraerlo con el DCM solamente se recupera el 86.97%, hasta alcanzar un valor de 71% al cabo de 15 días.

Tabla 4. Autooxidación de citronelol en PDA.⁶

SUSTRATO Y METABOLITOS	2 HORAS	2 DÍAS	6 DÍAS	15 DÍAS
Citronelol	86,97	75,33	73,56	71,54
Óxido de rosa	0	0	0	0,05
3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	0,34	0,27	0,25	0,17
Hidroxicitronelol	0,13	0,13	0,07	0,01

Por lo anterior se concluye que el nivel de autooxidación del citronelol en los medios y en las condiciones utilizadas es muy bajo pese a su tendencia hacia la fotooxidación (Monnerie y col, 2001)

En estudios anteriores realizados por Demyttenaere y col., 2004, al evaluar la autooxidación, obtuvieron *cis* y *trans* óxido de rosa, en proporciones de 0.6% y 0.3% respectivamente. Además se observa la producción de óxido de nerol en una

⁶ Los CV's encontrados para los datos expresados se encuentran entre 0-9%

proporción de 0.1%, durante la extracción por SDSE, en medio MEA. Los autores atribuyen la formación de estos compuestos a la conversión química del citronelol.

3.2.3 Biotransformación de Citronelol

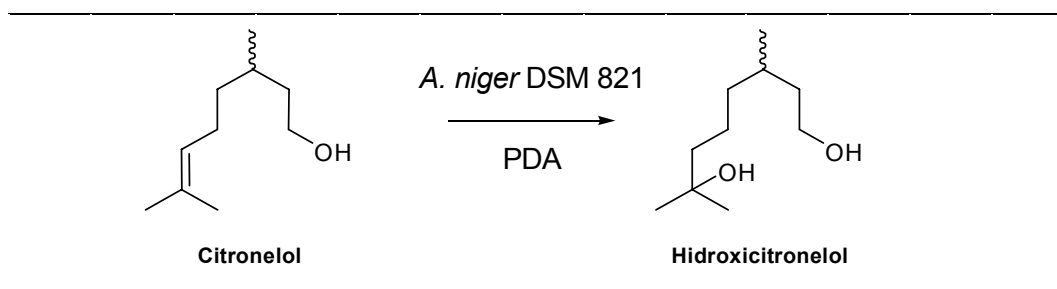
La biotransformación de citronelol con *Aspergillus niger*, se realizó utilizando los mismos medios en los cuales se creció el microorganismo, midiéndose el efecto del volumen y/o concentración del sustrato en el medio de la bioconversión y el tiempo de reacción. En todos los casos el citronelol se aplicó disuelto en etanol, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Demyttenaere y col., (1996, 1998a, 1998b, 2000, 2001a, 2001b, 2001c y 2004).

En la **Tabla 5**, se observa como dependiendo del medio utilizado, se da o no la biotransformación. En medio MEA, no se observa la formación de productos en todo el rango de tiempo evaluado pese al buen crecimiento del hongo en este medio. Se observa sin embargo, la disminución de la concentración de citronelol, lo cual puede deberse a la pérdida de este compuesto por evaporación.

Cuando se utiliza PDA si hay biotransformación y se obtiene como producto principal el Hidroxicitronelol, en una proporción de 52.21% después de ocho días de reacción. El hidroxicitronelol es el producto de la hidroxilación en el C-7 del citronelol (**Esquema 7**). El óxido de rosa uno de los compuestos esperados, se obtiene en una proporción muy baja (0.12%) al cabo de dos días, disminuyendo al término de 8 días de reacción.

Tabla 5. Concentración de citronelol remanente (%) y productos de bioconversión (%) obtenidos durante la extracción con DCM.⁷

SUSTRATO Y METABOLITOS	0 DÍAS		2 DÍAS		8 DÍAS		15 DÍAS	
	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA
Citronelol remanente	79,23	80,16	52,23	70,83	0,16	4,48	nd	0,30
Óxido de rosa	0	0	0	0,12	0	0,08	0	0,08
Hidroxicitronelol	0	0,32	0	14,42	0	52,21	0	64,53
Linalol	0	0	0	0,06	0	0	0	0
alfa-terpineol	0	0	0	0,11	0	0	0	0
2,6-dimetil-7 octen-2,6-diol	0	0	0	0,06	0	0,07	0	0,06
3,7-dimetil-1,7-octadienol	0	0	0	0	0	0,11	0	0,12



Esquema 7. Bioconversión de citronelol a hidroxicitronelol utilizando *Aspergillus niger* DSM 821 en medio PDA.

Al sumar la cantidad de compuestos formados y la cantidad de citronelol recuperado en medio PDA, no se obtiene un cien por ciento, por lo cual, se supone que al igual que en el medio MEA hay pérdida de citronelol por evaporación o porque se adhiere al medio de cultivo.

⁷ Los CV's encontrados para los datos expresados variaron entre 0-11.5%

En las **figuras 20 y 21**, se presenta un cromatograma representativo de las muestras producto de la biotransformación en los dos medios evaluados.

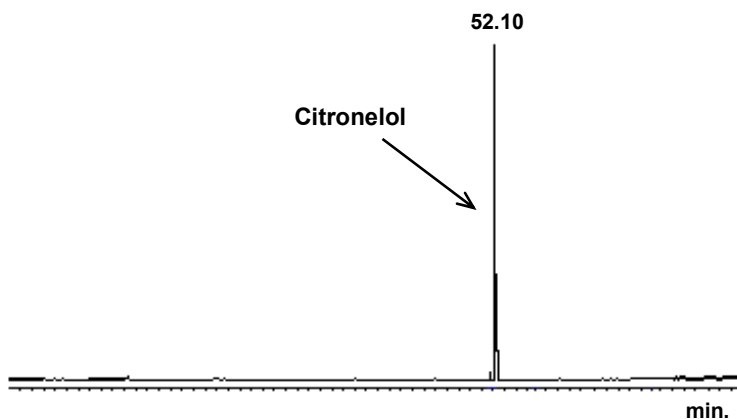


Figura 20. Perfil cromatográfico del extracto obtenido con DCM de un cultivo en MEA de *Aspergillus niger* tratado con citronelol a los 6 días de reacción



Figura 21. Perfil cromatográfico del extracto obtenido con DCM de un cultivo en PDA de *Aspergillus niger* tratado con citronelol a los 6 días de reacción

Al comparar los resultados obtenidos en esta investigación con los reportados por Demyttenaere y col., 2004., quienes utilizaron la misma cepa y el medio MEA, se encuentra que ellos obtuvieron en mayor proporción: *cis*-óxido de rosa (32.08%); *trans*-óxido de rosa (10.82%); 6-metil-5-hepten-2-ona (6.20%); óxido de nerol (5,12%); valenceno, aristoloqueno y linalol. El hidroxicitronelol no fue reportado por estos investigadores.

No se encuentran reportes en los cuales se utilice como medio de cultivo el PDA, para la biotransformación del citronelol.

3.2.4 Estudio del efecto del volumen de citronelol adicionado en el medio de biotransformación.

Teniendo en cuenta que el proceso de biotransformación se llevó a cabo en medio sólido, paralelamente, se estudió el efecto del volumen de sustrato en la biotransformación. Para ello se realizaron experimentos en los cuales se le adicionaron al medio 20 μ L de citronelol al 40% (V_1) y 200 μ L de citronelol al 4% (V_2), de forma que en los dos casos la concentración final de citronelol adicionado fue la misma, 0.16%. Los productos de la reacción fueron extraídos después de 0, 2, 4, 6, 8 y 15 días.

En medio MEA en ninguno de los casos y como se mostró en el apartado anterior, hubo biotransformación.

En el medio PDA, dio como resultado la formación de los compuestos que se muestran en la **Tabla 6**. Es de notar que la cantidad de citronelol extraído el día cero es diferente 80,16 y 68,35% respectivamente, probablemente debido a que al tener mayor volumen la superficie de contacto entre el sustrato y el sistema (hongo -medio) aumenta, y la retención del citronelol es mayor. Abraham y col., 1997 [Maróstica y Pastore, 2006], señalan que los compuestos lipofílicos, tales como los terpenoides (citronelol), se disuelven preferiblemente en los sistemas de membrana lipofílica de las células fúngicas, aumentando entonces la posibilidad de que el citronelol quede atrapado en el sistema.

Teniendo en cuenta esta situación, para poder comparar el efecto del volumen de sustrato, se tomo una variable que permitiera hacer una comparación con lo que se extrae a tiempo cero, escogiéndose el porcentaje de conversión⁸ del citronelol y el porcentaje de formación de hidroxicitronelol.

Los resultados obtenidos se reflejan en la **Figura 22.**, hasta el día 8 la conversión del citronelol y la formación del hidroxicitronelol con **V₂** es mayor que con **V₁** debido probablemente a que el aumento del área de contacto entre el sustrato y las esporas del medio, favorecen la biotransformación. A partir de este tiempo, se tiende a alcanzar un equilibrio lo cual puede deberse a diferentes razones: en primera instancia a la disminución de la cantidad de citronelol disponible en el medio de reacción, así como a la disminución de la cantidad de oxígeno presente en el sistema, que no permite la supervivencia del hongo, así como la hidroxilación del sustrato.

⁸ % Conversión = $((C_i - C_t) / C_i) * 100$ donde:

C_i: Citronelol en la biotransformación, extraído a tiempo cero

C_t: Citronelol en la biotransformación extraído en el tiempo t.

Tabla 6. Cantidad de citronelol remanente (%) y productos de bioconversión (%) durante la evaluación del efecto de la concentración y el volumen de sustrato en la biotransformación de citronelol en PDA.⁹

SUSTRATO Y METABOLITOS	0 días		2 días		4 días		6 días		8 días		15 días	
	V ₁	V ₂	V ₁	V ₂	V ₁	V ₂	V ₁	V ₂	V ₁	V ₂	V ₁	V ₂
Citronelol remanente	80,16	68,35	70,83	35,03	39,37	25,15	24,34	26,7	4,48	5,59	0,30	0,03
Oxido de rosa	0	0	0,12	0,05	0,05	0,06	0,07	0,08	0,08	0,05	0,08	0,06
Hidroxicitronelol	0,32	0	14,42	19,32	26,84	40,41	36,13	52,74	52,21	55,66	64,53	59,17
Linalol	0	0	0,06	0	0,04	0	0	0	0	0	0	0
Alfa-terpineol	0	0	0,11	0,13	0,06	0,16	0,09	0,15	0	0,06	0	0
2,6-dimetil-7-octen-2,6-diol	0	0	0,06	0	0	0	0,06	0	0,07	0	0,06	0
3,7-dimetil-1,7-octadienol	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0	0,12	0
3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	0	0	0	0,07	0	0,05	0	0	0	0	0	0

V₁: Experimentos realizados con 20µL de citronelol al 40% en EtOH concentración de sustrato total 0.16%.

V₂: Experimentos realizados con 200µL de citronelol al 4% en EtOH concentración de sustrato total 0.16%.

⁹ Los CV's encontrados para los datos expresados se encuentran entre 0-11.5%

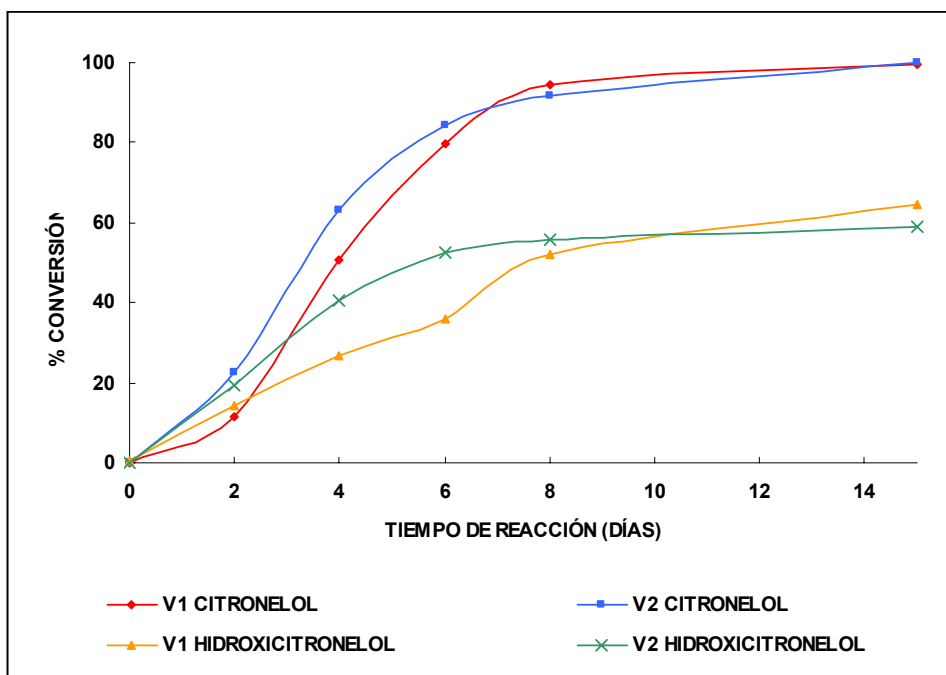


Figura 22. Efecto del volumen de solución de sustrato sobre la conversión de citronelol.

De otra parte y teniendo en cuenta que la producción de hidroxicitronelol es aproximadamente del 52.21% después de 8 días de reacción y que la formación de óxido de rosa fue mínima (0.05%), siendo este último uno de los productos esperados, se procedió a evaluar la variación del pH en el medio de cultivo durante el proceso de biotransformación.

En la **figura 23.**, se presenta la evolución de este parámetro con el tiempo. Se observan dos etapas. En la primera, el pH disminuye, para el MEA de 5.5 a 4,5 y para el PDA de 6.0 a 2.5 en los tres días en los cuales se hace la adaptación de las esporas. Posteriormente una vez se adiciona el sustrato, el pH disminuye al cabo de 15 días hasta el rango de 1.5 a 2. Esta situación podría influir en la biotransformación del citronelol, por lo cual se requiere en estudios posteriores profundizar sobre el efecto de esta variable.

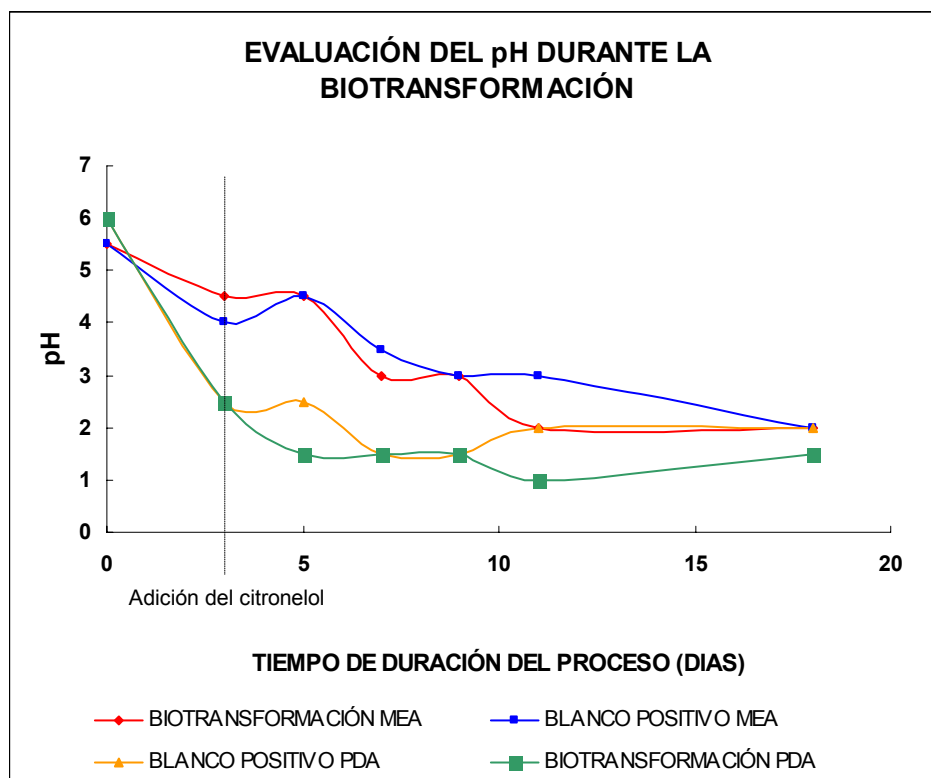


Figura 23. Evaluación del pH durante la biotransformación

Este mismo fenómeno fue detectado por Demyttenaere y col., (1996, 1998a, 1998b, 2000, 2001a, 2001b, 2001c y 2004); al evaluar la biotransformación de diferentes alcoholes terpénicos. Para el caso del citronelol en particular, observaron que al utilizar *Aspergillus niger*, el pH final del medio varió entre 2 y 3. Un experimento adicional con *P. digitatum*, reveló que la composición del medio de cultivo influye significativamente en el pH final del medio, sin embargo, no influye en el rendimiento de los productos de conversión, por lo que los autores atribuyen la obtención de metabolitos, a la unión entre la conversión química a pH ácido y el proceso de biotransformación en sí.

Finalmente, la obtención de hidroxicitronelol como resultado de la biotransformación del citronelol es significativamente importante, debido a su utilidad en la industria cosmética, donde se ha utilizado desde 1930, el compuesto obtenido sintéticamente. Es importante notar que en las investigaciones realizadas por Brunerie y col., 1987; Demyttenaere y col., 2004; Maróstica y Pastore, 2006; y Onken y Berger, 1999; sobre la biotransformación de citronelol, en ningún caso se reporta el Hidroxicitronelol, como producto del bioproceso (**Tabla 7.**).

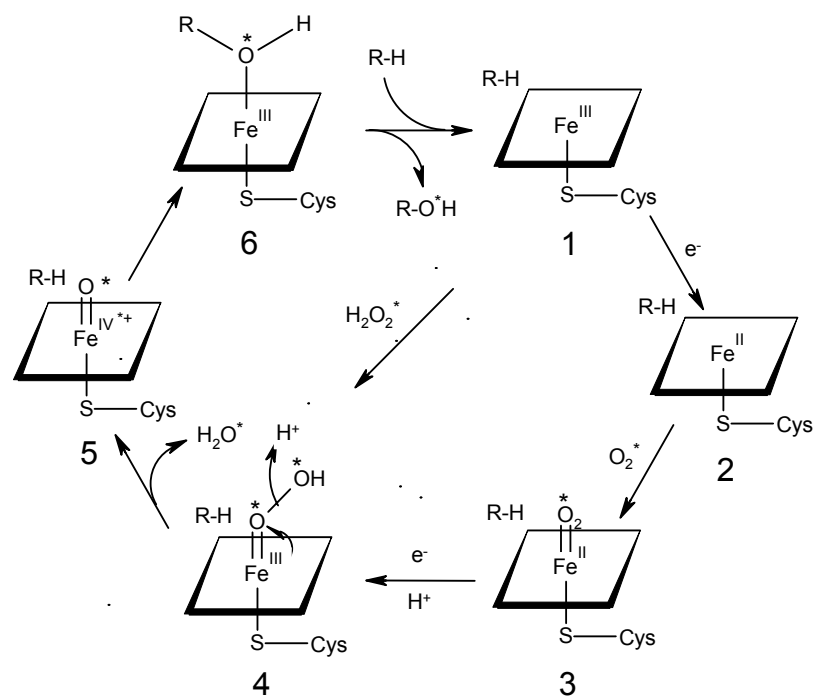
La formación de hidroxicitronelol se da por la hidroxilación del C-7 del citronelol. Como mecanismo posible para su obtención, se propone el relacionado a continuación teniendo en cuenta el ciclo catalítico del grupo de enzimas Citocromo P450 (**Esquema 8.**) presentes en el *Aspergillus niger*, las cuales generalmente son las encargadas de llevar a cabo las reacciones de hidroxilación [Ortiz, 2005]:

De esta manera, la posible ruta de formación del hidroxicitronelol a partir del citronelol es un reordenamiento alílico seguido de una reducción o hidrogenación (**Esquema 9.**).

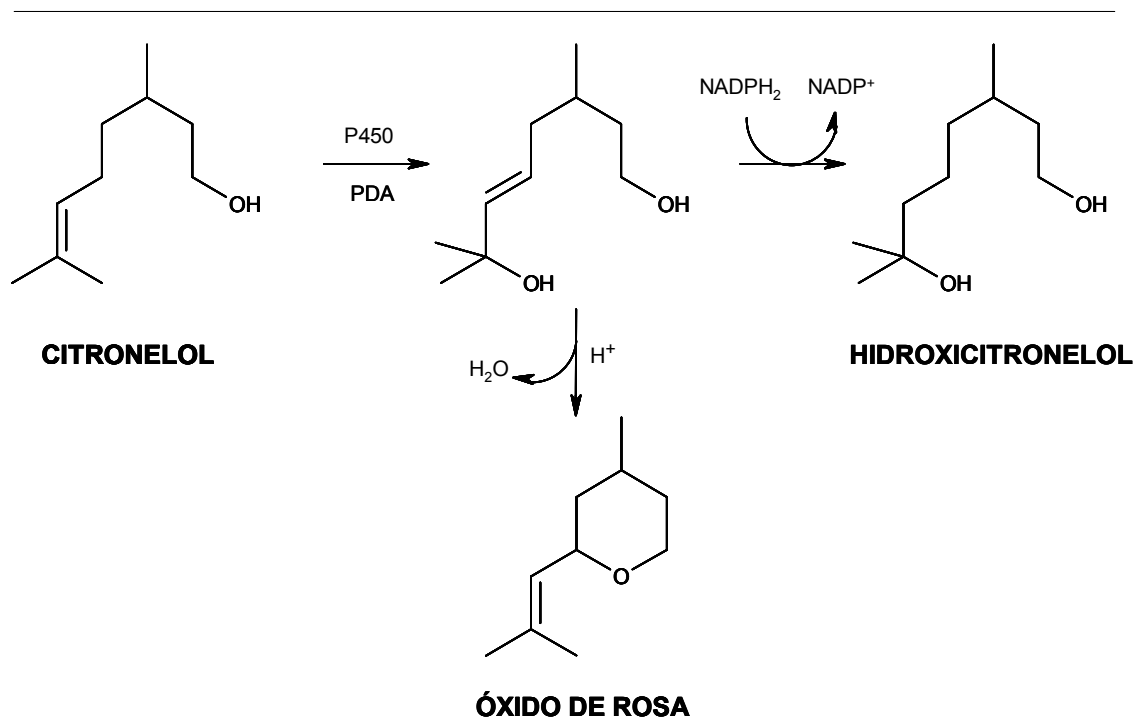
Tabla 7. Biotransformación de citronelol por diferentes microorganismos.

AUTORES	MICROORGANISMO	MEDIO	PRODUCTOS
En este trabajo	<i>A. niger</i> DSM 821	MEA PDA	No hay reacción Hidroxicitronelol; Óxido de rosa; alfa-Terpineol Linalol y 2,6-dimetil-7-octen-2,6-diol
MARÓSTICA, M.R. and PASTORE, G.M 2006	<i>Penicillium sp.</i>	medio almidón líquido de yuca	Cis/Trans-óxido de rosa; 1-octeno; 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol; 6-metil-5-hepten-2-ol
DEMYTTENAERE, J.C.R., VANOVERSCHDELDE J. and DE KIMPE N. 2004	<i>A. niger</i> DSM 821 <i>Penicillium sp.</i>	MEA pH: 5,4	Cis-óxido de rosa; Trans-óxido de rosa; 6-metil-5-hepten-2-ona; Óxido de nerol; Valenceno Aristolokueno, Linalol β-Elemeno
ONKEN, J. and BERGER, R.G. 1999	<i>Cystoderma carcharias</i>	medio estándar*	3,7-dimetil-1,6,7-octanetriol; 2,6-dimetil-2-octen-1,8-diol; 3,7-dimetil-5-octen-1,7-diol; 3,7-dimetil-7-octen-1,6-diol; Óxido de rosa 3,7-dimetil-6,7-epoxi-1-octanol
BRUNERIE, P., <i>et al.</i> 1987	<i>Botrytis cinerea</i>	jugo de uva medio sintético de uva	2 2,6-dimetil-1,8-octanodiol; 2-metil-γ-butirolactona; (E)-2,6-dimetil-2-octen-1,8-diol; 2-metil-2-hepten-6-ona; 2,6-dimetil-2,8-octanodiol; 2-metil-2-hepten-6-ol; p-mentan-3,8-diol; isopulegol; ácido citronelico; (Z)-2,6-dimetil-2-octen-1,8-diol; 2-metil-2-hepten-6-ona-1-ol

*30 g D-glucosa monohidrato, 4.5 g L-asparagina monohidrato, 3 g extracto de levadura, 1.5 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄ H₂O y 1 mL de solución de elementos traza (80 mg/L FeCl₃ 6H₂O, 90 mg/L ZnSO₄ 7H₂O, 30 mg/L MnSO₄ H₂O, 5 mg/L CuSO₄ 5H₂O y 0.4 g/l EDTA).



Esquema 8. Ciclo catalítico general concertado para la activación y transferencia de oxígeno por la Citocromo P450.



Esquema 9. Ruta de formación de hidroxicitronelol y óxido de rosa a partir del citronelol.

Sin embargo, para que la formación de hidroxicitronelol prevalezca en la biotransformación, es necesario especificar que el potencial reductor del NADPH_2 asociada a las reductasas derivadas del citocromo P450, debe ser mucho mayor que el potencial ácido del medio.

CONCLUSIONES

- * Se establece que el crecimiento radial uniforme del micelio del microorganismo y la formación de esporas consecuente con la edad del hongo, se obtiene al pH inicial del medio 5,5 para MEA y 6,0 para PDA, bajo las siguientes condiciones: Temperatura controlada de incubación de 28°C, y alta disponibilidad de aire en el sistema.
- * Al evaluar la autooxidación del citronelol en MEA no se observaron productos de catálisis química en todo el proceso. Mientras que en PDA, la autooxidación del citronelol a hidroxicitronelol, óxido de rosa y 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol se hizo evidente en muy bajas proporciones, incluso después de dos horas de contacto.
- * La biotransformación de citronelol utilizando *Aspergillus niger* DSM 821, empleando como medio de cultivo MEA, no se lleva a cabo, en las condiciones evaluadas.
- * La biotransformación de citronelol utilizando *Aspergillus niger* DSM 821, empleando como medio de cultivo PDA, permite la obtención de hidroxicitronelol, con mínima contribución de productos adicionales, obteniéndose porcentajes de formación hasta del 52% después de 8 días, en las siguientes condiciones: Temperatura controlada de 28°C, baja disponibilidad de aire en el sistema.
- * La biotransformación después de 8 días, tiende a alcanzar un equilibrio lo cual puede deberse: en primera instancia a la disminución de la cantidad de citronelol disponible en el medio de reacción, así como a la disminución de la cantidad de oxígeno presente en el sistema, que no permite la supervivencia del hongo.

RECOMENDACIONES

- Evaluar la autooxidación del citronelol a pH ácido (2), con el fin de asegurar la nula o posible catálisis ácida durante el proceso.
- Realizar el proceso de biotransformación utilizando un medio de cultivo tamponado.
- Para la optimización de la biotransformación de citronelol con *Aspergillus niger* en PDA, se recomienda evaluar la micro-extracción en fase sólida y posteriormente comparar los resultados.
- Evaluar y utilizar un método efectivo para la separación de los productos de la biotransformación.
- Continuar el estudio de la biotransformación de citronelol con *Aspergillus niger*, tendiente a la obtención de óxido de rosa como producto principal de la biotransformación, para lo cual se puede experimentar la biotransformación en otros medios, incluido el líquido.

BIBLIOGRAFIA

1. ABARCA, M.L. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2000; Vol. 17: P.S79-S84.
2. ADAMS, A., DEMYTTENAERE, J.C.R. and DE KIMPE, N. Biotransformation of (*R*)-(+)- y (*S*)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum*– investigation of culture conditions. *Food Chemistry*, 2003; Vol. 80: P.525-534.
3. ARVELA, P.M., y col. Liquid-phase hydrogenation of citral for production of citronellol: catalyst selection. *Applied Catalysis A: General*, 2003; Vol. 241: P.271-288.
4. BAPAT, P.M., KUNDU S. and WANGIKAR, P.P. An Optimized Method for *Aspergillus niger* Spore Production on Natural Carrier Substrates. *Biotechnol. Prog.*, 2003; Vol. 19: P.1683-1688.
5. BELANGER, J.T. Perillyl Alcohol: Applications in Oncology. *Alternative Medicine Review*, 1998; Vol. 3 (6): P.448-457.
6. BELL, S.G., SOWDEN, R.J. and WONG, L.-L. Engineering the haem monooxygenase cytochrome P450_{cam} for monoterpene oxidation. *Chem. Commun.*, 2001; P.635-636.

7. BOCK, G., BENDA, I. and SCHREIER, P. Microbial transformation of geraniol and nerol by *Botrytis cinerea*. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, 1988; Vol. 27: P.351-357.
8. BOUWMEESTER, H., GERSHENZON, J. and KONINGS, M.C.J.M. Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway. *Plant physiology*, 1998; Vol. 117: P.901-912.
9. BRUNERIE, P., y col. Bioconversion of citronellol by *Botrytis cinerea*. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, 1987; Vol. 27 (1): P.6-10.
10. BUGG, T.D.H. Oxygenases: mechanisms and structural motifs for O₂ activation. *Current opinion in biotechnology*, 2001; Vol. 5: P.550-555.
11. CIRINO, P.C. and ARNOLD, F.H. Protein engineering of oxygenases for biocatalysis. *Current opinion in biotechnology*, 2002; Vol. 6: P.130-135.
12. DA SILVA, J.G., y col. Rhodium Catalyzed hydroformylation of Linalool. *Applied Catalysis A: General*, 2006; Vol. 309: P.169-176.
13. DE CARVALHO, C.C.C.R. and DA FONSECA, M.M.R. Biotransformation of terpenes. *Biotechnology advances*, 2006; Vol. 24: P.134-142.
14. DE CARVALHO, C.C.C.R. and DA FONSECA, M.M.R. Maintenance of cell viability in the biotransformation of (-)-carveol with whole cells of *Rhodococcus erythropolis*. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*, 2002; Vol. 19-20: P.389-398.

15. DEMYTTENAERE, J.C.R., BELLENGHEM, K.V. and DE KIMPE, N. Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-Limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry*, 2001a; Vol. 57 (2): P.199-208.
16. DEMYTTENAERE, J.C.R. and DE KIMPE, N. Biotransformation of Terpenes by Fungi Study of the Pathways Involved. *Journal. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001b; Vol. 11: P.265–270.
17. DEMYTTENAERE, J.C.R. and DE POOTER, H.L. Biotransformation of citral and nerol by spores of *Penicillium digitatum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 1998a; Vol. 13: P.173-176.
18. DEMYTTENAERE, J.C.R. and DE POOTER, H.L. Biotransformation of geraniol and nerol by spores of *Penicillium italicum*. *Phytochemistry*, 1996; Vol. 41 (4): P.1079-1082.
19. DEMYTTENAERE, J.C.R., y col. Biotransformation of (*S*)-(-)-Linalool by *Aspergillus niger*. An Investigation of the Culture Condition. *Journal. Agric. Food Chem.*, 2001c; Vol. 49: P.5895-5901.
20. DEMYTTENAERE, J.C.R., HERRERA, M.C. and DE KIMPE, N. Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* *Phytochemistry*, 2000; Vol. 55: P.363-373.
21. DEMYTTENAERE, J.C.R., VANOVERSCHELDE, J. and DE KIMPE, N. Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-citronellol by *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.*, and the use of solid-phase microextraction for screening. *Journal of Chromatography A*, 2004; Vol. 1027(1-2): P.137-146.

22. DEMYTTENAERE, J.C.R. and WILLEMEN, H.M. Biotransformation of Linalool to Furanoid and Pyranoid Linalool oxides by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry*, 1998b; Vol. 47 (6): P.1029-1036.
23. DUETZ, W.A., VAN BEILEN, J.B. and WITHOLT, B. Using Proteins In Their Natural Environment: Potential And Limitations Of Microbial Whole Cell Hydroxylations In Applied Biocatalysts. *Current opinion in biotechnology*, 2001; Vol. 12: P.419-42.
24. DUBEY, V.S., BHALLA, R. and LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences*, 2003; Vol. 28: P.637–646.
25. FAROOQ, A., y col. The microbial oxidation of (-)- β -Pinene by *Botrytis cinerea*. *Z. Naturforsch.*, 2002; Vol. 57c: P.686-690.
26. FLITSCH, S.L., y col. Biohydroxylation Reactions Catalyzed by Enzymes and Whole-Cell Systems. *Bioorganic Chemistry*, 1999; Vol. 27: P.81–90.
27. GARNER, W, BARGE, M., and USSARY. J. Good Laboratory Practice, Standards. Washington, DC. ACS Professional Reference Book. 1992. 571.
28. GRAYSON, D.H. Monoterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 2000; Vol. 17: P.385-419.
29. HAYAISHI, O. Oxygenases. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, 2004; Vol. 3: P.178-182.
30. HIRVI, T. and HONKANEN, E. The Aroma of Blueberries. *Journal of the science of Food and Agriculture*, 1983; Vol. 34: P.992-998.

31. HOLLAND, H.L., y col. A new paradigm for biohydroxylation by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *Tetrahedron*, 1999; Vol. 55 (24): P.7441-7460.
32. HOLLAND, H.L. and WEBER, H.K. Enzymatic hydroxylation reactions. *Current opinion in biotechnology*, 2000; Vol. 11: P.547-553.
33. HYDROXYCITRONELLOL. FRAGRANCE raw materials monographs. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1974; Vol. 12 (7-8): P.923.
34. INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación referencias bibliográficas para libros, folletos e informes. Bogotá: ICONTEC, 1996. P. 5. (NTC 1160)
35. KAMINSKA, J., y col. Biotransformation of citronellol by means of horseradish peroxidase. *Enzyme and microbial technology*, 1989; Vol. 11: P.436-438.
36. KNAPP, H., y col. (S)-3,7-dimethyl-1,5-octene-1,7-diol and Related Oxygenated Monoterpenoides From Petals of *Rosa damascena* Mill. *Journal Agric. Food Chem.*, 1998; Vol. 46: P.1966-1970.
37. KOVATS, E. Composition of Essential Oils. Part 7. Bulgarian Oil of Rose (*Rosa Damascena* Mill.). *Journal of Chromatography*, 1987; Vol. 406: P.185-222.
38. LETIZIA, C.S., y col. Fragrance material review on Linalool. *Food and Chemical toxicology*, 2003; Vol. 41: P.943-964.
39. LI, Z., y col. Oxidative Biotransformations Using Oxygenases. *Current opinion in chemical biology*, 2002; Vol. 6: P.136-144.

40. LÓPEZ, R.C.A, y col. Producción de Ácido Cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de Suero de Leche. *Dyna*, 2006; Vol. 73 (150): P.39-57.
41. MADYASTHA, M.M. and KRISHNA, M.N.S.R. Regiospecific Hydroxylation of Acyclic Monoterpene Alcohols By *Aspergillus niger*. *Tetrahedron Letters*, 1988; Vol. 29 (5): P.579-580.
42. MARÓSTICA, M.R. and PASTORE, G.M. Biotransformation of citronellol in rose-oxide using cassava wastewater as a medium. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2006; Vol. 26 (3): P.690-696.
43. MELO, L.L.M.M., PASTORE, G.M. and MACEDO, G.A. Optimized Synthesis of Citronellyl Flavour Esters Using Free And Immonilized Lipase From *Rhizopus sp.* *Process Biochemistry*, 2005; Vol. 40: P.3181-3185.
44. MIYAZAWA, M., YOKOTE, K. and KAMEOKA, H. Biotransformation of The Monoterpenoid, Rose Oxide, By *Aspergillus niger*. *Phytochemistry*, 1995; Vol. 39 (1): P.85-89.
45. MONNERIE, N., ORTNER, J., Economic evaluation of the industrial photosynthesis of rose oxide via lamp or solar operated photooxidation of citronellol. *Journal of Solar Energy Engineering*. 2001; Vol. 123 P.171-174.
46. MUÑOZ, A., y STASHENKO, E. Determinación de los coeficientes de partición de monoterpenos y sesquiterpenos y sus análogos oxigenados usando microextracción en fase sólida y cromatografía de gases. *Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química*, 2005; Tesis de postgrado.

47. NEROL OXIDE. Fragrance raw materials monographs. *Food and chemical Toxicology*, 1992; Vol. 30 (1): P.97
48. OHLOFF, G. and DEMOLE, E. Importance of the Odoriferous Principle of Bulgarian Rose Oil in Flavour and Fragrance Chemistry. *Journal of Chromatography*, 1987; Vol. 406: P.181-183.
49. OHLOFF, G.; y col. Synthesis of (*R*)- and (*S*)-4-Methyl-6-2'-methylprop-1'-enyl-5,6-dihydro-2H-pyran (Nerol oxide) and natural occurrence of its racemate. *Helv. Chim. Acta*, 1980; Vol. 63: P.1582-1588.
50. ONKEN, J. and BERGER, R.G. Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated-membrane bioreactor. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999; Vol. 51: P.158-163.
51. ORTIZ de Montellano, P.R. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, 3e, Ortiz de Montellano Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, 2005. Cap. 1 y 6
52. PARRA, R., y col. Water activity, solute and temperature modify growth and spore production of wild type and genetically engineered *Aspergillus niger* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004; Vol. 35: P.232–237.
53. Patente U.S. 4482765. Preparation of Hydroxycitronellol.
54. POOLE, C.F. and POOLE, S.K. Chromatography today. *Elsevier Science Publishing Company INC.*, New York, 1991: P. 88-95.
55. ROSE OXIDE Levo. Fragrance raw materials monographs. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1976; Vol. 14 (1): P. 855.

56. SCHELZ, Z., MOLNAR, J. and HOHMANN, J. Antimicrobial and Antiplasmid Activities of Essential Oils. *Fitoterapia*, 2006; xx: P.1-7.
57. STASHENKO, E.E., COMBARÍAS, Y. y PUERTAS, M.A. Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis. *Universidad Industrial de Santander*, Bucaramanga. Ediciones UIS. 1998: P.1.
58. TEQUIDA, M.M., y col. Efecto de extractos alcoholicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2002; Vol. 19: P.84-88.
59. URLACHER, V.B. and SCHMID, R.D. Recent advances in oxigenase-catalyzed biotransformations. *Current opinion in chemical biology*, 2006; Vol. 10: P.1-6.
60. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Biopesticides Registration Action Document : Citronellol (Pc Code 167004), 2006.
61. VANEK, T., VALTEROVÁ, I. and VAISAR, T. Biotransformation of (S)-(-) - and (R)-(-)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* plant cells. *Phytochemistry*, 1999; Vol. 50: P.1347-1351.
62. VAN BEILEN, J.B., y col. Practical issues in the application of oxygenases. *Trends in biotechnology*, 2003; Vol. 21 (4): P.170-177.
63. VELANKAR, H.R. and HEBLE, M.R. Biotransformation of (L)-citronellal to (L)-citronellol by free and immobilized *Rhodotorula minuta*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2003; Vol. 6 (2): P.90-103.

64. VIDARI, G., y col. Rose Oxide and Iridodial from *Aromia moschata* L. *Tetrahedron Letters*, 1975; Vol. 41: P.4065-4068.
65. WANG, Y. and LINKO, Y.Y. Lipase Catalized Enantiomeric Synthesis of Citronellyl Butyrate. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995; Vol. 80 (5): P.473-477.
66. WÜST, M., BECK, T. and MOSANDL, A. Biogenesis of Geranium Oil Compounds: On the Origin of Oxygen in *cis-/trans*-Rose. *J. Agric. Food Chem.*, 1998; Vol. 46: P.3225-3229.
67. WÜST, M., BECK, T. and MOSANDL, A. Mechanistic Conversion of Citronellyl Diphosphate and citronellyl β -D-glucoside into Rose Oxide by *Pelargonium graveolens* *J. Agric. Food Chem.*, 1999; Vol. 47: P.1668-1672.
68. WÜST, M., y col. Structure Elucidation, Enantioselective Analysis, and Biogenesis of Nerol Oxide in Pelargonium Species. *J. Agric. Food Chem.*, 1999; Vol. 47: P.3145-3150.
69. WÜST, M., REXROTH, T. and MOSANDL, A. Mechanistic Aspects of the Biogenesis of Rose Oxide in Pelargonium graveolens L'Heritier. *Chirality*, 1998; Vol. 10: P.229-237.
70. YADAV, G. and LATHI, P.S. Synthesis of Citronellol Laurate In Organic Media Catalyzed By Immobilized Lipases: Kinetic Studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004; Vol. 27: P.113-119.
71. YAMAMOTO, T., y col. Synthesis and odor of optically active rose oxide. *Tetrahedron Letters*, 2002; Vol. 43: P.9077-9080.