

BIOTRANSFORMACIÓN DE LIMONENO, α -PINENO Y ACEITES ESENCIALES DE
NARANJA Y MANDARINA EMPLEANDO *Aspergillus niger*

FABIÁN ENRIQUE CASTELLANOS MOLINA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007

BIOTRANSFORMACIÓN DE LIMONENO, α -PINENO Y ACEITES ESENCIALES DE
NARANJA Y MANDARINA EMPLEANDO *Aspergillus niger*

FABIÁN ENRIQUE CASTELLANOS MOLINA

Trabajo de investigación presentado como requisito
parcial para optar al título de *Magíster* en Química

Directora

Janeth Aidé Perea V.

Química, MSc. Doctora en Química

Codirectora

Claudia Ortíz López.

Bacterióloga. Doctora en Biocatálisis

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007

Dedico este trabajo a Adela, Nelly, Aidé y Julián, mis guías en el camino.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Aidé Perea Villamil, por su excelente dirección y su amistad.

A la Dra. Claudia Ortiz por su dirección y su acompañamiento en mi trabajo.

A la Dra. Elena Stashenko, por la oportunidad de trabajar con CENIVAM, por su apoyo constante y su confianza en mi trabajo.

Al Centro Excelencia CENIVAM por el financiamiento de este trabajo y a sus integrantes, quienes me asistieron en las actividades realizadas.

Al laboratorio de Cromatografía, Catálisis y CINTROOP por la gran colaboración de sus directores e integrantes.

A mis compañeros y amigos del CICTA, con quienes compartí momentos realmente agradables, especialmente con Luis K.

A la Universidad Industrial de Santander, a la cual manifiesto gran cariño y respeto.

Para extinguir el sufrimiento, el óctuple sendero debemos seguir:

Correcto entendimiento (*samyag-di*)

Correcto pensamiento (*samyak-saṃkalpa*)

Correcta palabra (*samyag-vāc*)

Correcta acción (*samyak-karmānta*)

Correcta ocupación (*samyag-ājīva*)

Correcto esfuerzo (*samyag-vyāyāma*)

Correcta atención (*samyak-smṛti*)

Correcta concentración (*samyak-samādhi*)

Enseñanzas del Budismo

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	18
1.1 Biotransformación y biocatálisis aplicadas	22
1.1.1 Aspectos generales, situación actual y aplicaciones industriales	22
1.1.2 Biotransformaciones oxidativas y oxigenasas	29
1.1.3 Uso de células completas	33
1.2 Biooxidación de monoterpenos: limoneno y α-pineno	35
1.2.1 Procesos de transformación	36
▪ <i>Limoneno</i>	36
▪ <i>α-pineno</i>	41
1.2.2 Aplicaciones especiales de algunos derivados	44
▪ <i>Alcohol perílico</i>	44
▪ <i>Carvona</i>	45
▪ <i>α-terpineol</i>	46
1.3 Consideraciones finales	48
2. METODOLOGÍA	50
2.1 Materiales	50
2.1.1 Reactivos	50
2.1.2 Equipos	50
2.1.3 Medios de cultivo	50
2.1.4 Microorganismos	51
2.1.5 Otros materiales	52

2.2	Procedimientos	52
2.2.1	Biológicos	52
	▪ Limpieza, desinfección y esterilización	52
	▪ Activación , crecimiento y mantenimiento del hongo	53
	▪ Curva de crecimiento y evolución del pH	54
	▪ Biotransformación General	54
	▪ Ensayos iniciales: evaluación del medio de cultivo y de la edad del hongo	55
	▪ Evaluación de la volatilidad de sustratos	55
	▪ Ensayos en medios seleccionados a condiciones fijas: extracción L-L y evaluación de productos	56
	▪ Ensayos con aceites esenciales: extracción <i>SPME</i> y evaluación de productos	57
2.2.2	Analíticos e instrumentales	58
	▪ Condiciones	58
	▪ Preparación de patrones, calibración y validación del método	59
	▪ Extracción líquido-líquido (L-L) y concentración de productos	61
	▪ Microextracción en fase sólida (SPME)	61
	▪ Extracción de aceites esenciales cítricos	62
3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	64
3.1	Parte analítica e instrumental	64
3.1.1	Validación de métodos	64
	▪ Calibración y determinación de la precisión (repetibilidad)	64
	▪ Cálculo del LOD y LOQ	71
	▪ Eficiencia de extracción líquido-líquido (L-L)	72
3.1.2	Análisis de los aceites esenciales	72
3.1.3	Optimización de la extracción HS-SPME de monoterpenos	74
	▪ Efecto de la temperatura	75
	▪ Efecto del tiempo	76
3.2	Ensayos biológicos	77

3.2.1	Crecimiento del hongo y variación del pH	77
3.2.2	Evaluación del medio de cultivo y de la edad del hongo: identificación de productos de interés	78
▪	Medio YMPG	80
▪	Medio PDA	84
▪	Medio SS (suspensión de esporas)	88
3.2.3	Evaluación de la evaporación de sustratos y del tipo de sello	88
3.2.4	Ensayos en medios seleccionados a condiciones fijas: extracción L-L y evaluación de productos	89
3.2.5	Ensayos con aceites esenciales y determinación de productos por HS-SPME	93
4.	CONCLUSIONES	99
5.	RECOMENDACIONES	101
	BIBLIOGRAFIA	103

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Ensayos de biotransformación de limoneno y α -pineno variando el medio de cultivo y la edad del hongo <i>A. niger</i> DSM 821 (parámetros fijos: 6 días de reacción, extracción L-L)	55
Tabla 2. Ensayos para la evaluación de la volatilidad de sustratos (limoneno y α -pineno) empleando dos sistemas de cierre: tapón de algodón y sello PTFE/silicona (parámetros fijos: 6 días de contacto, extracción L-L)	56
Tabla 3. Ensayos de biotransformación de limoneno y α -pineno en medios seleccionados a condiciones fijas: <i>A. niger</i> DSM 821 (3 días de edad), 6 días de reacción, sello de PTFE/Silicona, extracción L-L	57
Tabla 4. Ensayos de biotransformación empleando aceites esenciales de mandarina y naranja como sustratos. <i>A. niger</i> DSM 821 (3 días de edad), medio YMPG, 6 días de reacción, sello de PTFE/Silicona, extracción HS-SPME	58
Tabla 5. Evaluación de la precisión para el análisis del limoneno, sistema LL-GC-FID	65
Tabla 6. Evaluación de la precisión para el análisis del α -pineno, sistema LL-GC-FID	65
Tabla 7. Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del limoneno, sistema LL-GC-FID	66
Tabla 8. Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del α -pineno, sistema LL-GC-FID	66
Tabla 9. Evaluación de la precisión para el análisis del alcohol perílico, sistema LL-GC-MS	67
Tabla 10. Evaluación de la precisión para el análisis del limoneno, sistema LL-GC-MS	67
Tabla 11. Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del limoneno, sistema LL-GC-MS	68
Tabla 12. Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del alcohol perílico, sistema LL-GC-MS	68

Tabla 13. Evaluación de la precisión para el análisis del limoneno, sistema SPME-GC-FID	69
Tabla 14. Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del limoneno, sistema SPME-GC-FID	69
Tabla 15. Resumen comparativo de los análisis de regresión para los diferentes sistemas emplead	70
Tabla 16. Valores de LOD y LOQ calculados para los diferentes analitos (en ppm) en cada sistema evaluado	72
Tabla 17. Composición relativa de los aceites esenciales de naranja y mandarina (en porcentaje)	73
Tabla 18. Compuestos obtenidos por la oxidación de limoneno y α -pineno de acuerdo al medio empleado (porcentaje máximo, %). Parámetros fijos: 6 días de reacción, extracción L-L	79
Tabla 19. Evaluación de la evaporación del limoneno y α -pineno de acuerdo al tipo de cierre empleado en los biorreactores a microescala (parámetros fijos: 6 días de contacto, extracción L-L)	89
Tabla 20. Compuestos obtenidos por la biotransformación de limoneno y α -pineno en medios seleccionados (% del producto). Condiciones fijas: <i>A. niger</i> DSM 821 (3 días de edad), 6 días de reacción, sello de PTFE/Silicona, extracción L-L	90
Tabla 21. Factores de respuesta calculados para la cuantificación de diferentes monoterpenos empleando HS-SPME	94
Tabla 22. Resultados obtenidos de los ensayos de biotransformación de aceites esenciales de naranja y mandarina. Condiciones fijas: <i>A. niger</i> DSM 821 (3 días de edad), medio YMPG, 6 días de reacción, sello de PTFE/Silicona, extracción HS-SPME.	94
Tabla 23. Concentraciones relativas de los compuestos oxigenados obtenidos en los ensayos de biotransformación de aceites esenciales de naranja y mandarina. Parámetros fijos: <i>A. niger</i> DSM 821 (3 días de edad), medio YMPG, 6 días de reacción, sello de PTFE/Silicona, extracción HS-SPME	95

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Obtención biocatalítica de acrilamida a partir de acrilonitrilo	25
Figura 2. <i>Vanilla planifolia</i> y estructura química de la vainillina	25
Figura 3. Esquema de la síntesis de vainillina a partir del catecol, glucosa y otros sustratos terpenoides	27
Figura 4. Estructura química de compuestos aromatizantes de interés obtenidos biocatalíticamente	27
Figura 5. Reacciones generales de oxidación catalizadas por oxigenasas	30
Figura 6. Estructura del grupo <i>hemo</i> y su ubicación en una oxigenasa P450: estructura de cintas y lazos de la oxigenasa P450-Terp (CYP108) de una forma recombinante de <i>Pseudomonas</i> sp. expresada en <i>E. coli</i> que cataliza la oxidación de α -terpineol (Hasemann et al., 1994)	30
Figura 7. Representación del mecanismo de oxidación catalizado por oxigenasas P450 (ciclo catalítico)	31
Figura 8. Representación de la estructura química optimizada en 3D del limoneno y algunos de sus productos oxidados más importantes, indicando los sitios de oxidación (no se ha definido la estereoquímica)	37
Figura 9. Representación de la estructura química optimizada en 3D del α -pineno y algunos de sus productos oxidados más importantes, indicando los sitios de oxidación (no se ha definido la estereoquímica)	41
Figura 10. Estructura química del alcohol perílico	44
Figura 11. Estructura química de la carvona	45
Figura 12. Estructura química del α -terpineol	46
Figura 13. Estructura química de los óxidos de limoneno: a) 1,2 y b) 8,9	47
Figura 14. Microorganismos obtenidos de DSMZ	52
Figura 15. Crecimiento del <i>A. niger</i> DSM 821 en medios a) MEA y b) PDA	53

Figura 16. Ensayos de biotransformación a microescala empleando medio líquido	54
Figura 17. Ensayos de biotransformación a microescala empleando medio sólido	55
Figura 18. Montaje realizado para la microextracción en fase sólida (SPME) de los analitos	62
Figura 19. Montaje realizado para la extracción de los aceites esenciales de naranja y mandarina empleando hidrodestilación asistida por microondas	63
Figura 20. Perfil cromatográfico (TIC) obtenido por GC-MS, del aceite esencial de cáscara de naranja. Columna HP-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Relación de <i>split</i> 1:30	73
Figura 21. Perfil cromatográfico (TIC) obtenido por GC-MS, del aceite esencial de cáscara de mandarina. Columna HP-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Relación de <i>split</i> 1:30	73
Figura 22. Efecto de la temperatura ($^{\circ}$ C) sobre la eficiencia de la extracción por HS-SPME (DVB/Carboxen/PDMS, 50/30 μ m) de la mezcla de monoterpenos, durante 20 min de exposición del recubrimiento	75
Figura 23. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de la extracción por HS-SPME (DVB/Carboxen/PDMS, 50/30 μ m) de la mezcla de monoterpenos, a 30 $^{\circ}$ C	76
Figura 24. Curva de crecimiento y de variación del pH para el <i>A. niger</i> DSM 821 en medio YMPG (5 mL)	77
Figura 25. Evaluación de los productos obtenidos en la biotransformación de acuerdo con el medio de cultivo y la edad del hongo <i>A. niger</i> DSM 821, para los sustratos A. α -pineno, B. Limoneno (6 días de reacción, extracción L-L)	80
Figura 26. Perfil cromatográfico (TIC) de los productos obtenidos en la bioconversión de limoneno empleando medio YMPG (6 días de reacción, extracción L-L). GC-MS: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Inyección 1 μ L (<i>split</i> 30:1)	81
Figura 27. Perfil cromatográfico (TIC) de los productos obtenidos en la bioconversión de α -pineno empleando medio YMPG (6 días de reacción, extracción L-L). GC-MS: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Inyección 1 μ L (<i>split</i> 30:1)	81
Figura 28. Espectro de masas obtenido por GC-MS (EIMS, 70 eV) del 2-feniletanol, compuesto obtenido en la biotransformación de los monoterpenos en medio YMPG	82
Figura 29. Esquema de las rutas químicas posibles para la degradación de L-	

fenilalanina hasta 2-feniletanol	83
Figura 30. Perfil cromatográfico (TIC) de los productos obtenidos en la bioconversión de limoneno empleando medio PDA (6 días de reacción, extracción L-L). GC-MS: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Inyección 1 μ L (<i>split</i> 30:1)	84
Figura 31. Perfil cromatográfico (TIC) de los productos obtenidos en la bioconversión de α -pineno empleando medio PDA (6 días de reacción, extracción L-L). GC-MS: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Inyección 1 μ L (<i>split</i> 30:1)	85
Figura 32. Estructura química del α -terpineol, borneol y fenchol	86
Figura 33. Estructura del catión α -terpinilo y sus posibles conversiones/transposiciones	86
Figura 34. Estructuras químicas de los dos posibles isómeros (<i>p</i> -mentanodiolos) obtenidos del limoneno y α -pineno	87
Figura 35. Espectro de masas obtenido por GC-MS (EIMS, 70 eV) del <i>p</i> -mentano-3,8-diol, compuesto predominante obtenido en la biotransformación de los monoterpenos en medio PDA	87
Figura 36. Perfil cromatográfico (TIC) de los productos obtenidos en la bioconversión de limoneno empleando medio PDB (6 días de reacción, extracción L-L). GC-MS: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Inyección 1 μ L (<i>split</i> 30:1)	92
Figura 37. Espectro de masas obtenido por GC-MS (EIMS, 70 eV) del alcohol perílico, compuesto predominante obtenido en la biotransformación de los monoterpenos en medio PDB	93
Figura 38. Perfil cromatográfico de los productos obtenidos en la bioconversión de aceite esencial de naranja empleando <i>A. niger</i> DSM 821 en medio YMPG (6 días de reacción, extracción HS-SPME). GC-FID: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). <i>split</i> 30:1	95
Figura 39. Perfil cromatográfico de los productos obtenidos en la bioconversión de aceite esencial de mandarina empleando <i>A. niger</i> DSM 821 en medio YMPG (6 días de reacción, extracción HS-SPME). GC-FID: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). <i>split</i> 30:1	95

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

3D	Tridimensional
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análisis de varianza)
Carboxen	<i>Carbon based adsorbent resin</i> (Resina adsorbente con base en carbono)
CO	<i>Company</i> (Compañía)
CVTST	<i>Canonical Variational Transition State Theory</i> (Teoría canónica-variacional del estado de transición)
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i> (Colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares)
DTF	<i>Density Functional Theory</i> (Teoría del funcional de densidad)
DVB	<i>Divinyl Benzene</i> (Divinilbenceno)
EE	Eficiencia de extracción
EI	<i>Electron impact</i> (Impacto de electrones)
EIMS	<i>Electron impact mass spectrometry</i> (Espectrometría de masas con impacto de electrones)
EtOH	Etanol
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
Fr	Factor de respuesta
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GC-FID	<i>Gas Chromatography – Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases acoplada al detector de ionización en llama)
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada al detector espectrométrico de masas)

GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i> (Reconocidos generalmente como seguros)
HCN	Acido cianhídrico
H-DTF	<i>Hybrid Density Functional Theory</i> (Teoría híbrida del funcional de densidad)
HS-SPME	<i>Headspace Solid Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza)
INC	<i>Incorporated</i> (Incorporada)
kW	<i>Kilowatt</i> (Kilovatio)
L-L	Líquido-Líquido
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección)
LOQ	<i>Limit of Quantitation</i> (Límite de cuantificación)
MCM-41	<i>Mobile Crystalline Material Number 41</i> (Material móvil cristalino número 41)
MEA	<i>Malt Extract Agar</i> (Extracto de malta y agar)
MYB	Extracto de malta-glucosa-peptona-extracto de levadura
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form</i> (Dinucleótido de nicotinamida adenina en forma reducida)
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form</i> (Fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina en forma reducida)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i> (Espectroscopía de resonancia magnética nuclear)
P450	Enzimas oxigenasas de la familia Citocromo P450
pA	<i>picoAmpere</i> (picoAmperio)
PA	<i>Polyacrylate</i> (Poliacrilato)
PAHs	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i> (Hidrocarburos aromáticos policíclicos)
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (Agar de papa y dextrosa)
PDB	<i>Potato Dextrose Broth</i> (Caldo de papa y dextrosa)
ppm	Partes por millón

psi	<i>Pound per square inch</i> (Libras por pulgada cuadrada)
PTFE	<i>Polytetrafluoroethylene</i> (Politetrafluoroetileno o Teflón)
R	Coefficiente de correlación de Pearson
RMSE	<i>Root Mean Squared Error</i> (Raíz del error promedio cuadrado)
RSD%	<i>Relative Standard Deviation as percent</i> (Desviación estándar relativa, como porcentaje)
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
SS	<i>Spore Suspension</i> (Suspensión de esporas)
TIC	<i>Total ion chromatogram</i> (Cromatograma iónico total)
Tr	Tiempo de retención
US FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i> (Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América)
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos de América)
USD	<i>United States dollar</i> (Dólar de los Estados Unidos)
YMPG	<i>Yeast Extract-Malt Extract-Peptide-Glucose</i> (Extracto de levadura-Extracto de malta-Peptona-Glucosa)

RESUMEN

TÍTULO:

BIOTRANSFORMACIÓN DE LIMONENO, α -PINENO Y ACEITES ESENCIALES DE NARANJA Y MANDARINA EMPLEANDO *Aspergillus niger**

Autor: Fabián E. Castellanos**

Palabras clave: limoneno, α -pineno, aceite esencial de naranja, biotransformación, biocatalizador

El limoneno y α -pineno son los monoterpenos más abundantes en la naturaleza, presentes en aceites esenciales extraídos de la cáscara de frutos cítricos, incluyendo los aceites esenciales de naranja y mandarina. Estos monoterpenos son susceptibles de oxidación para generar compuestos de mayor valor agregado. Puesto que en nuestra región existe una producción relativamente alta de dichos frutos, es posible obtener cantidades abundantes de aceites cítricos a un bajo costo para usar en procesos biocatalíticos, obteniendo derivados oxigenados de alto valor por sus aplicaciones cosméticas/farmacéuticas y por su clasificación como productos naturales.

En el presente trabajo se realizó un estudio preliminar de la biotransformación de limoneno, α -pineno y aceites esenciales de naranja y mandarina con alto contenido de limoneno (>70 %). Las reacciones se hicieron a escala laboratorio en frascos de 20 mL con sello PTFE/Silicona, empleando como biocatalizador el hongo filamentoso *Aspergillus niger* DSM 821, obtenido de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, DSMZ. Se estudiaron diferentes parámetros del sistema: medio de cultivo, concentración de sustratos y disponibilidad de oxígeno.

Los productos formados fueron identificados y cuantificados por cromatografía de gases con detectores FID y MSD. Para la extracción se estudiaron dos técnicas disponibles que fueron comparadas posteriormente: extracción líquido-líquido y microextracción en fase sólida - SPME. Se logró la biooxidación de los monoterpenos (limoneno y α -pineno) en la mayoría de los experimentos para obtener como productos principales α -terpineol, *p*-mentano-1,8-diol (terpino) y alcohol perfílico, en cantidades relativas máximas de 55,1 %, 46,5 % y 14,7 %, respectivamente. Según estos resultados es posible considerar a futuro un proceso de biotransformación a nivel industrial y realizar su optimización logrando así aprovechar subproductos agroindustriales de fácil adquisición.

* Trabajo de Investigación y Tesis de Maestría en Química

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

ABSTRACT

TITLE:

BIOTRANSFORMATION OF LIMONENE, α -PINENE, ORANGE AND MANDARIN ESSENTIAL OILS USING *Aspergillus niger**

Author: Fabián E. Castellanos**

Keywords: limonene, α -pinene, orange essential oil, biotransformation, biocatalyst

Limonene and α -pinene are the most abundant monoterpenes in nature, present in essential oils extracted from peel of citrus fruits, including orange and mandarin. These monoterpenes are susceptible of oxidation to generate oxygenated compounds of greater added value. Since in our region exists the production of citrus fruits, it is possible to obtain high amounts of these oils at low cost for use on biocatalytic processes to obtain derivatives with interesting cosmetic and pharmaceutical applications, additionally considered like natural products.

In the present work, a study for the biotransformation of limonene, α -pinene, orange and mandarin essential oils with high limonene content (> 70 %) was carried out. The reactions were made at laboratory scale in 20 mL vials with PTFE/Silicone seals and using as biocatalyst filamentous fungi *Aspergillus niger* DSM 821, obtained from German Collection - DSMZ. Different reaction and culture conditions like substrates concentration, oxygen availability and types of growth media were studied.

The formed products were resolute and its characterization was made by gas chromatography coupled to FID and MSD type detectors. For the extraction, two methods were used and later compared: solvent liquid-liquid extraction and headspace solid phase microextraction (HS-SPME). The main conversion products obtained were α -terpineol, *p*-menthane-1,8-diol and perillyl alcohol with the highest relative percents of 55,1 %, 46,5 % y 14,7 %, respectively. According to results, we consider possible developing industrial bioprocesses to take advantage of agroindustrial available by-products.

* Research Work and MSc. Thesis

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

INTRODUCCIÓN

Los procesos biocatalíticos se han fortalecido mundialmente en las últimas décadas debido a grandes tendencias de la síntesis química actual como el *desarrollo sostenible*, *la química verde* y *los procesos ambientalmente benignos*. Las diversas industrias que buscan seguir e implementar estas pautas se encuentran dedicadas a la elaboración continua de productos farmacéuticos, alimenticios y agroindustriales en su gran mayoría (Bommarius y Riebel, 2004; Pinheiro y Marsaioli, 2007)

Entre la diversidad natural de componentes promisorios susceptibles de biotransformación se destacan los compuestos poliaromáticos, esteroides, alcaloides, cumarinas y terpenoides. Desde el punto de vista industrial es deseable emplear sustancias de alta biodisponibilidad, económicas y de fácil obtención, por esta razón los monoterpenos son sustratos valiosos para la producción biotecnológica de compuestos aromatizantes y productos farmacéuticos (Giri et al., 2001)

En este trabajo se realizó la exploración de un proceso de biotransformación en microescala que permitiera la oxidación del limoneno y α -pineno, predominantes en las cáscaras de frutos cítricos. La idea de esta transformación química nació como una alternativa viable para la explotación y el aprovechamiento de subproductos que son fuentes abundantes de monoterpenos. Como biocatalizador se empleó una cepa certificada de *Aspergillus niger*, debido a su abundancia, facilidad de obtención y desempeño comprobado en diferentes tipos de biotransformaciones.

Adicionalmente, el futuro de estos procesos es alentador si se tiene en cuenta que los cítricos conforman el 34,5 % de la producción total de frutas en Colombia. En el 2004 se alcanzó una producción total de cítricos de 989 539 Ton, con un crecimiento promedio anual del 6,7 %. Algunos departamentos como Santander, Norte de Santander, Boyacá, Cundinamarca, Tolima y Huila contribuyen con el 47 % de la producción nacional total de

cítricos en el país (450 351 Ton), siendo los principales productores de naranja los departamentos de Tolima, Antioquia, Cesar, Santander y Cauca, con el 97,9 % de la producción de esta especie. Con respecto a la producción de mandarina el principal departamento productor es Santander, con un 85,5 % del total nacional según la producción acumulada 2000-2004 (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

Este trabajo de investigación fue financiado por **COLCIENCIAS** a través del **Centro de Excelencia CENIVAM** (contrato N° 432-2004) y se desarrolló en el **Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA)**.

Los resultados parciales obtenidos en este trabajo fueron presentados en modalidad Oral en el **IX Congreso Colombiano de Fitoquímica** realizado en Pereira, Colombia entre el 8-11 de Mayo de 2007 y publicados en la Edición Especial de la revista *Scientia et Technica*, Año XIII, N° 33, Mayo de 2007 (ISSN 0122-1701)

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Biotransformación y biocatálisis aplicadas

1.1.1 Aspectos generales, situación actual y aplicaciones industriales

Los procesos de biotransformación se definen como aquellos en los cuales se emplean sistemas biológicos para llevar a cabo transformaciones químicas de cualquier tipo. Estos sistemas se denominan *biocatalizadores* y se caracterizan por ser enzimas o células completas, ya sean de microorganismos naturales o recombinantes (Hanson, 1998; Doble et al., 2004). Aunque comúnmente se aplican enzimas libres, es preferible el uso de células completas ya que son de fácil obtención y bajo costo. Además, las membranas celulares protegen las enzimas de fuerzas de cizalla, de la toxicidad de solventes y permiten el abastecimiento de cofactores necesarios para la consecución de las reacciones intracelulares (Duetz et al., 2001; Ishige et al., 2005)

En diversas publicaciones se han hecho revisiones acerca de las ventajas, mitos y realidades del uso de biocatalizadores como tecnologías alternativas emergentes, en comparación con los catalizadores sintéticos convencionales (Rozzell, 1999; Held et al., 2000; Thomas et al., 2002), según las cuales, es de aceptación general que los biocatalizadores, en la mayoría de casos, funcionan adecuadamente bajo condiciones suaves de reacción, poseen alta actividad catalítica y permiten superior regio y estereoselectividad. En algunos casos es posible observar menor selectividad cuando se trabaja con microorganismos completos debido a que las células contienen diferentes grupos de enzimas capaces de transformar al sustrato. De cualquier forma, y por fortuna, la selectividad puede ser alterada variando el medio, adicionando solventes orgánicos o inhibidores de enzimas no deseadas, entre otros.

Actualmente existe una tendencia creciente hacia el uso de biocatalizadores aplicados en la obtención de moléculas complejas de interés industrial, especialmente en el sector farmacéutico, donde son requisitos fundamentales las propiedades de selectividad y

especificidad en un proceso de síntesis (Schulze y Wubbolts, 1999; Pollard y Woodley, 2006).

La estereoselectividad es un tema trascendente, por ejemplo en los fármacos, cuya actividad depende del enantiómero presente. Estos productos únicamente se consideran “*enantiómeros puros*” cuando uno de ellos está en exceso del 98%. Aunque la mayoría de productos farmacéuticos son racémicos, usualmente solo uno de los enantiómeros presenta la actividad biológica deseada; el otro puede ser inactivo o incluso tener actividad nociva. La *US FDA* estableció su política frente al tema desde el año 1992, definiendo que, en una droga quiral, deben ser estudiados los efectos biológicos de ambos enantiómeros (*US Food and Drug Administration*, 1992).

La quiralidad también es importante en perfumería ya que la percepción del sabor y olor (*flavor*) dependen de la conformación absoluta del estereoisómero presente. Diferentes isómeros del mismo compuesto pueden tener diferentes características organolépticas. Algunas revisiones publicadas por Frater et al. (1998), Brenna et al. (2003), McConathy y Owens (2003) y Leffingwell (2003) realizan el análisis químico/biológico de la quiralidad en las moléculas y su relación con la actividad en fármacos y perfumes. En otros trabajos se destacan aspectos sobre la importancia en la selección de la técnica usada para identificar diferentes estereoisómeros; al respecto, Maier et al. (2001), Schurig (2001) y Zhang et al. (2005), discuten sobre las técnicas de separación de enantiómeros, especialmente de la cromatografía quiral.

La gran mayoría de compuestos aromatizantes se preparan por síntesis química convencional, sin embargo, en las últimas décadas se ha incrementado considerablemente su obtención a través de nuevos procesos biotecnológicos. Esto se debe en parte a que las legislaciones de USA y Europa han definido como “*sustancias naturales*” únicamente a aquellas que pueden prepararse por procesos físicos, enzimáticos o microbianos a partir de precursores aislados de la naturaleza. Esta clasificación ha creado una competencia en el mercado ya que los compuestos etiquetados como “naturales” presentan alta demanda, mientras que otros compuestos producidos por métodos químicos, a pesar de ser

denominados como “idénticos al natural”, son menos apreciados por los consumidores (Serra et al., 2005). Mundialmente numerosos procesos comerciales emplean enzimas o microorganismos como catalizadores, los cuales demuestran la importancia de las reacciones de biotransformación aplicadas a la industria. Al respecto Thomas et al. (2002) hacen una interesante discusión acerca de las aplicaciones de la biocatálisis a escala industrial.

Aunque las biotransformaciones industriales se usan principalmente en la elaboración de químicos *finos*, existe un aumento de casos en la producción de *commodities*. El proceso de biotransformación a gran escala más exitoso es la fabricación de acrilamida a partir de acrilonitrilo, usando una enzima nitrilo-hidratasa (Fig. 1). La acrilamida se forma con productividad de 100 L/h, logrando concentraciones finales de producto superiores a 400 g/L. Mientras que el proceso enzimático opera a 10 °C, con rendimiento del 100 % y no genera subproductos, su contraparte, el proceso químico convencional, está basado en un catalizador de Cobre que opera a 100 °C, produciendo HCN y ácido acrílico como subproductos (Liese y Filho, 1999; Straathof et al., 2002).

Este sistema se comercializa en Japón por *MITSUBISHI RAYON CO.* (anteriormente *NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO.*) cuya escala reportada es aproximadamente de 20 000 ton producto/año. Esta compañía ha patentado varios procesos para la producción continua de acrilamida (o metacrilamida) a partir de acrilonitrilo (o metacrilonitrilo) empleando microorganismos solubles con actividad nitrilasa (Watanabe, 1982; Yamaguchi et al., 1984; Watanabe et al., 1989) y microorganismos inmovilizados en polímeros catiónicos en forma de gel (Watanabe et al., 1983).

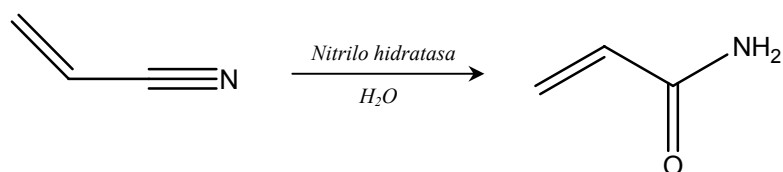
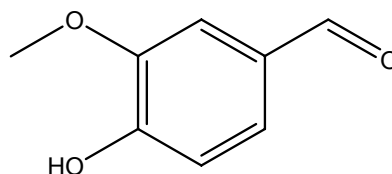


Figura 1. Obtención biocatalítica de acrilamida a partir de acrilonitrilo

Con respecto a los procesos *finos*, la síntesis de vainillina es de gran interés industrial. La fuente natural de vainillina (Fig. 2), la *Vanilla planifolia*, solo sufre en 20 000 kg/año la demanda mundial de vainillina, estimada en $1,2 \times 10^7$ kg/año, por esta razón es necesaria su producción sintética. Este compuesto se encuentra en las vainas de orquídeas tropicales de *V. planifolia* en concentración del 2 % en peso, sin embargo, menos del 1 % del mercado global es cubierto por el compuesto extraído de la planta (Liese y Filho, 1999). El valor de la vainillina extraída (natural) se calcula entre USD 1200-4000/kg mientras que la vainillina sintética preparada a partir del guayacol tiene un precio menor a los USD 15/ kg (Serra et al., 2005). Esta gran diferencia de precio, es generada por la preferencia de los consumidores hacia los productos naturales.



Vainillina
(4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído)

Figura 2. *Vanilla planifolia* y estructura química de la vainillina

La síntesis química de la vainillina se logra por metilación del catecol para obtener guayacol, que por reacciones subsiguientes se transforma en vainillina (Fig. 3). Una nueva alternativa en desarrollo hacia la vainillina natural se basa en biocatálisis partiendo de glucosa, que es convertida en ácido vainílico por una cepa recombinante de *E. coli*. Posteriormente el ácido se reduce a vainillina por una deshidrogenasa de *Neurospora crassa* (Fig. 3). Gracias al diseño de esta ruta biocatalítica se logran dos poderosas ventajas, el producto se considera como vainilla natural y el proceso de manufactura es ambientalmente benigno: no involucra intermediarios o solventes tóxicos ni carcinogénicos y no está basado en derivados del petróleo (Liese y Filho, 1999). También existen otros procesos biotecnológicos en desarrollo para la producción de vainillina a partir de sustratos naturales como lignina y de terpenoides como anisol, eugenol e isoeugenol (Walton et al., 2000, 2003; Serra et al., 2005).

Además de la vainillina, otros compuestos usados como ingredientes aromatizantes despiertan interés, como es el caso del mentol, la cetona de frambuesa y el 2-feniletanol (Fig. 4). Estos compuestos están presentes en tan baja cantidad en las plantas, que su extracción no es viable y el principal modo de obtención es a partir de precursores naturales abundantes. El caso más importante es el mentol, usado como aditivo en alimentos, cosméticos, fármacos, cremas dentales y gomas de mascar. Las propiedades organolépticas de este monoterpeneo están relacionadas a su configuración absoluta y de sus ocho posibles isómeros únicamente es adecuado como agente odorante el natural, (-)-(1R, 3R, 4S)-mentol. En 1998 la producción mundial estimada de (-)-mentol fue de 11800 ton (Serra et al., 2005), la gran mayoría obtenido por congelamiento del aceite de *Mentha arvensis*. Únicamente las compañías *HAARMANN & REIMER GmbH* (Alemania) y *TAKASAGO INTERNATIONAL CO* (Japón) han desarrollado procesos químicos y biocatalíticos que son fuentes comerciales del mentol.

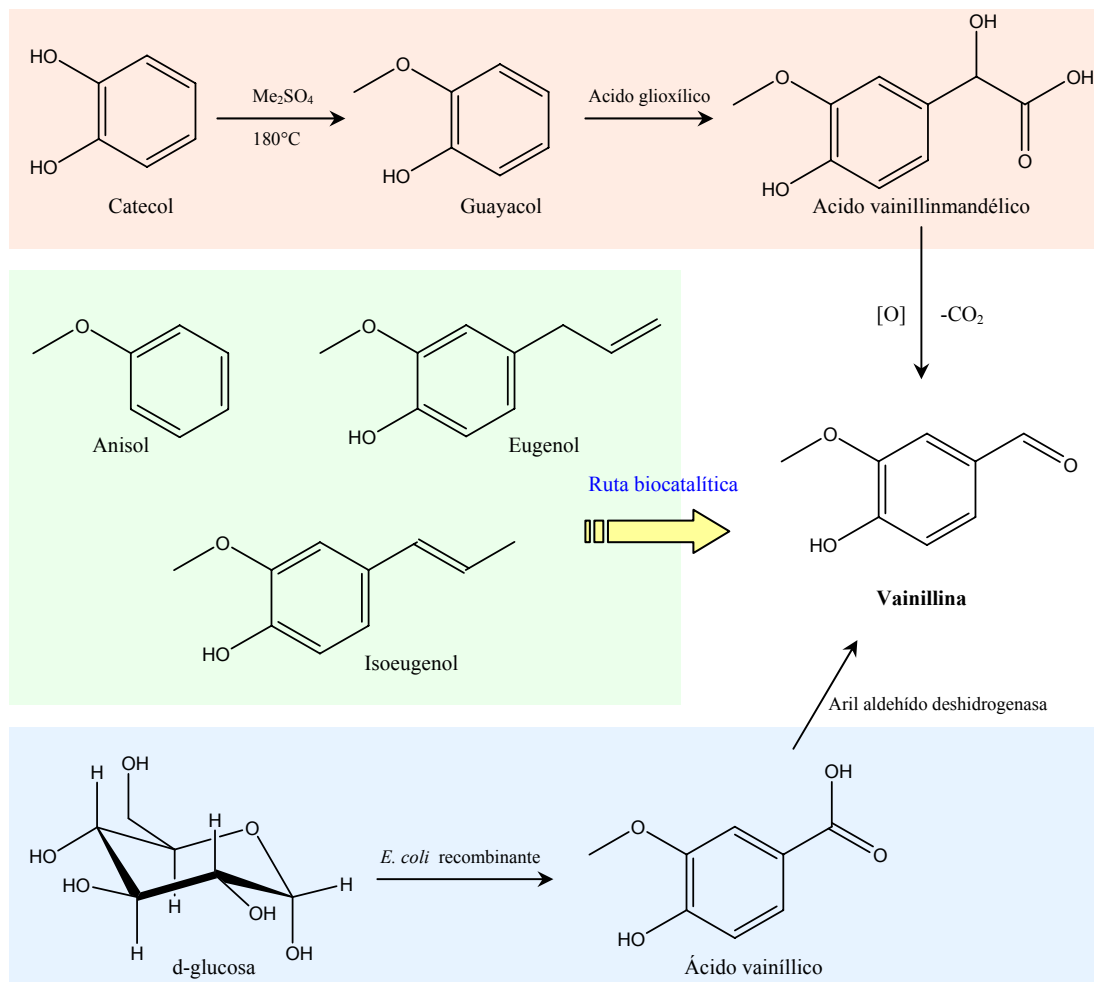


Figura 3. Esquema de la síntesis de vainillina a partir del catecol, glucosa y otros sustratos terpenoides

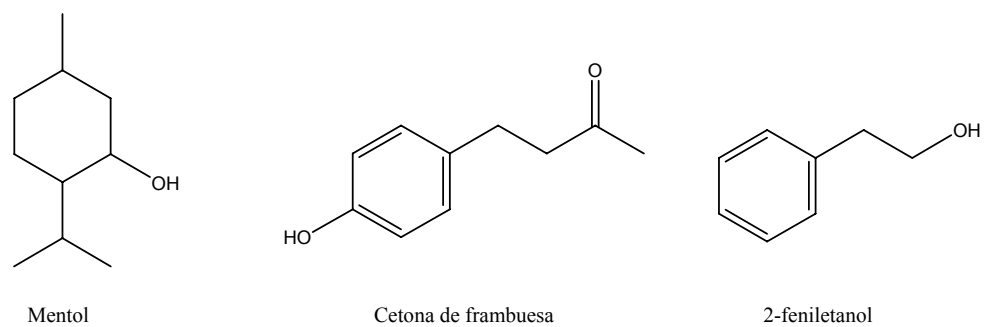


Figura 4. Estructura química de compuestos aromatizantes de interés obtenidos biocatalíticamente

HAARMANN & REIMER posee patentes para la separación de isómeros del mentol, neomentol e isomentol ópticamente puros por esterificación ácida no biocatalítica (Fleischer, 1976) y para la producción de mentol y sus derivados empleando lipasas en separaciones enzimáticas enantioselectivas (Gatfield et al., 2002). También posee una patente para la preparación de α -terpineol por hidratación acuosa de α -pineno con catalizadores ácidos (sulfúrico y fosfórico) en presencia de agentes emulsificantes (Moelleken, 1992).

Por su parte, *TAKASAGO INTERNATIONAL CO.* posee patentes para la obtención de (-)-mentol de alta pureza por esterificación/hidrólisis enzimática y selectiva (Nakayama et al., 1978), por hidrogenación de piperitenona empleando complejos de metales de transición (Noboru y Takaji, 2004), y por aislamiento bioquímico empleando hidrólisis asimétrica de ésteres de mentol con hidrolasas de microorganismos de diferentes géneros, como *Penicillium*, *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Pullularia*, *Fusarium* y *Absidia* (Moroe et al., 1970; Takasago, 1972)

La producción de 2-feniletanol también se encuentra patentada por la compañía *HUABAO INTERNATIONAL HOLDINGS* (Tu et al., 2003) a través de un proceso microbiano que usa el tabaco como precursor, con el cual bajo ciertas condiciones, se lleva a cabo la degradación de lignina, pectina y polifenoles para la producción del 2-feniletanol que posteriormente es purificado por adsorción en una resina de intercambio iónico.

También se destacan otros casos extraordinarios que aprovechan enzimas isomerasas e hidrolasas en procesos industriales. Por ejemplo, la producción de jarabe de maíz de alta fructosa a partir de glucosa empleando la enzima glucosa-isomerasa, en un proceso que genera hasta 6 millones de toneladas de producto por año (Zhang et al, 2004; Borges da Silva et al, 2006; Tomotani y Vitolo, 2007) o la producción de leche deslactosada, por hidrólisis de lactosa a glucosa y galactosa empleando una β -galactosidasa, con producciones superiores a los 250 000 L/día. La mayoría de estos procesos son bastante eficientes y han sido optimizados, por lo tanto no son propensos a innovación tecnológica inmediata, sin embargo, muchos procesos en desarrollo necesitan ser mejorados para

hacerlos técnicamente viables y económicamente competitivos. Estos y otros ejemplos de bioconversiones a gran escala son descritos por Gavrilescu y Chisti, 2005, quienes plantean los procesos biotecnológicos como alternativas sostenibles para la industria química.

1.1.2 Biotransformaciones oxidativas y oxigenasas

Desde su descubrimiento y durante mucho tiempo después, las oxigenasas se consideraron enzimas inusuales, cuya presencia se limitaba únicamente a organismos vivientes primitivos como bacterias del suelo u hongos (Hayaishi et al., 1955; Itada, 1965; Nakasawa, et al., 1967). Posteriormente, se fueron encontrando en todos los reinos de la naturaleza, y actualmente se reconoce su papel fundamental en el metabolismo de nutrientes, hormonas, neurotransmisores y la biosíntesis de compuestos indispensables para la vida.

Las enzimas oxigenasas comprenden varias familias de proteínas que catalizan la inserción de uno o dos átomos de oxígeno en diversos sustratos (Fig. 5). El aire sirve como fuente de oxígeno molecular y los equivalentes de reducción son obtenidos del NADH o NADPH gracias a proteínas de transferencia de electrones. Las oxigenasas catalizan reacciones con alta regio- y estereo- selectividad y se destacan particularmente las reacciones de hidroxilación y epoxidación (Hayaishi, 2004). Las monooxigenasas más estudiadas hasta ahora pertenecen al grupo Citocromo P450 (Fig. 6), una versátil superfamilia de enzimas que contienen grupo *hemo* y catalizan reacciones oxidativas en sustratos que van desde pequeños alcanos hasta moléculas complejas como los esteroides y ácidos grasos. Las P450 han sido sometidas a numerosos estudios de ingeniería genética con el fin de comprender sus funciones y propiedades para convertirlas en catalizadores más eficientes (Cirino et al., 2002). Las P450 catalizan preferiblemente la monooxigenación de compuestos hidrófobos y tienen la extraordinaria capacidad de introducir oxígeno en enlaces C-H no activados (Urlacher y Schmid, 2006).

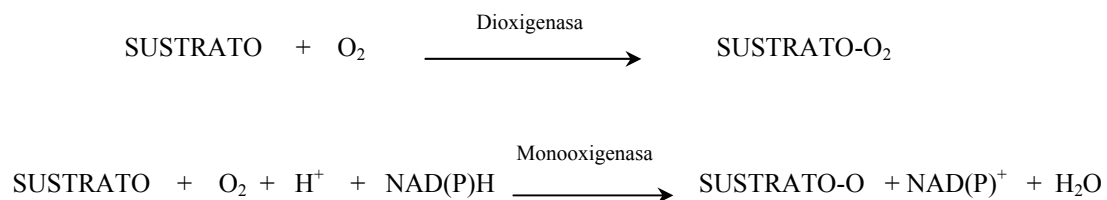


Figura 5. Reacciones generales de oxidación catalizadas por oxigenasas

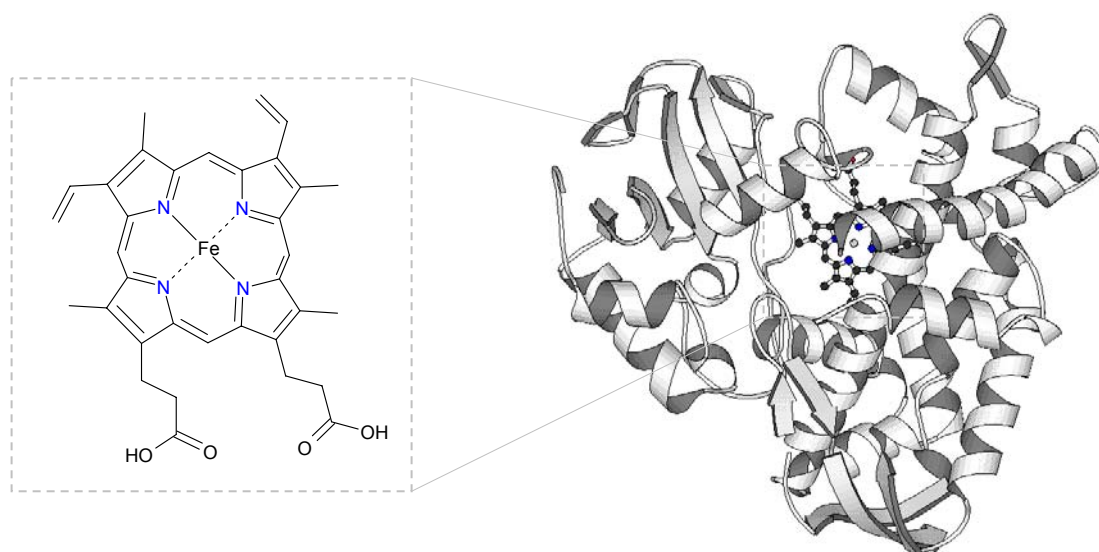


Figura 6. Estructura del grupo *hemo* y su ubicación en una oxigenasa P450: estructura de cintas y lazos de la oxigenasa P450-Terp (CYP108) de una forma recombinante de *Pseudomonas* sp. expresada en *E. coli* que cataliza la oxidación de α -terpineol (Hasemann et al., 1994)

Se ha comprobado que los sistemas P450 están involucrados en más de 20 diferentes clases de reacciones químicas, de las cuales, algunas son muy inusuales. La estructura y función química de las enzimas P450 todavía es motivo de controversia y de constante investigación. En general es aceptado que el ciclo catalítico de estas oxigenasas (Fig. 7) se inicia con su enlace al sustrato (A), seguido por la introducción del primer electrón del NAD(P)H a través de una cadena de transferencia de electrones (B). En el siguiente paso (C), se enlaza el oxígeno, el cual es capaz de aceptar el segundo electrón para producir un anión peroxi-férrico (D). En los siguientes pasos el anión se protona para formar un

complejo hidroperoxiférrico (**E**), el cual decae por un rompimiento heterolítico con la formación de la especie *ferrilo*, conocida como *Compuesto I* (**F**). Esta especie ataca al sustrato formando el producto hidroxilado (**G**), que se disocia para regenerar la enzima y dar lugar a un nuevo ciclo. Los aspectos mecanísticos, estructurales y biotecnológicos de las P450 son revisados extensamente por Denisov et al. (2005), Ortiz de Montellano (2005), Sligar et al. (2005) y Bernhardt (2006).

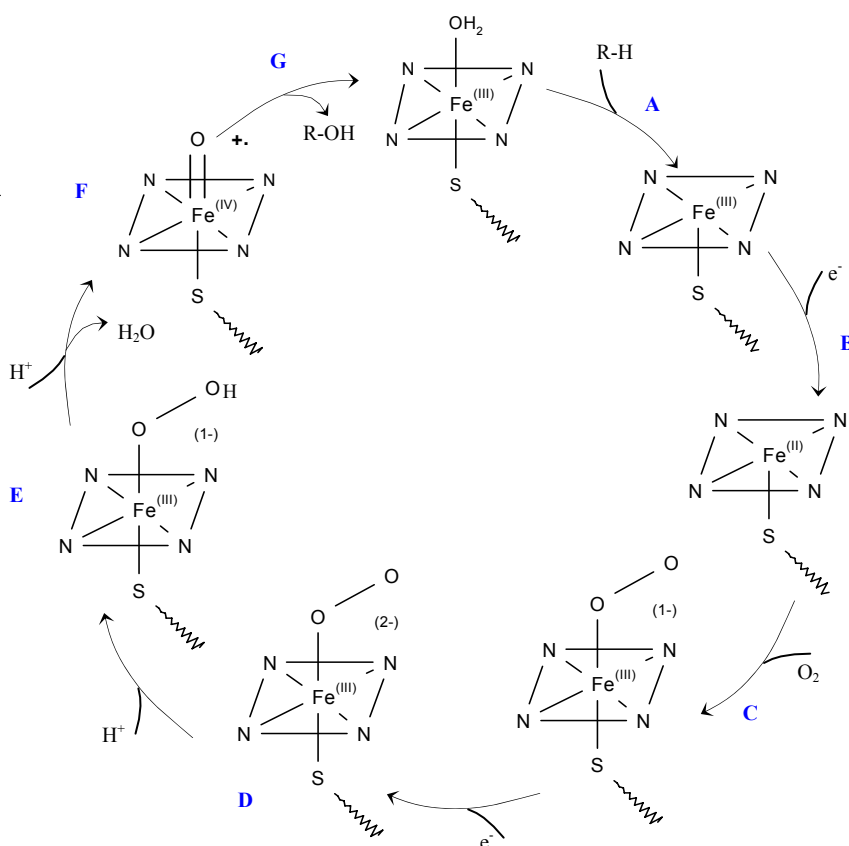


Figura 7. Representación del mecanismo de oxidación catalizado por oxigenasas P450 (ciclo catalítico)

Durante mucho tiempo se creyó que las oxigenasas requerían cofactores para la catálisis, sin embargo, en trabajos recientes se han identificado algunas que no necesitan iones metálicos ni cofactores para su activación (Fetzner, 2007). La gran mayoría de oxigenasas presentes en microorganismos, que son de interés en biotransformación, son enzimas P450 a excepción de algunas oxigenasas no hemo, conocidas como alcanooxigenasas e

hidroxilasas. Las enzimas P450 frecuentemente se presentan como sistemas complejos con estructura cuaternaria formados por 2 componentes: una hidroxilasa y una reductasa. Además, siempre están enlazadas a la membrana celular lo cual genera dificultad en su manipulación y producción a gran escala (Ayala y Torres, 2004).

Por otra parte, los sistemas de alcano-hidroxilasas no hemo, presentan tres componentes: una hidroxilasa, una rubredoxina y una rubredoxin-reductasa, donde la hidroxilasa está enlazada a la membrana mientras que los otros dos componentes son proteínas citoplasmáticas. En particular el sistema de metano-oxigenasas es sumamente interesante ya que permite la oxidación directa de sustratos difíciles, poco reactivos y muy abundantes, derivados de la industria del petróleo, como los alcanos de cadena corta desde C₁ hasta C₅ (Lange y Que .Jr, 1998; Van Beilen y Funhoff, 2005). Las oxigenasas también permiten las síntesis de compuestos que no son accesibles por otras rutas químicas, por ejemplo, la hidroxilación regioespecífica de esteroides, lo cual hace que sus aplicaciones a escala industrial presenten enorme potencial (Holland y Weber, 2000; Ayala y Torres, 2004).

En la actualidad es tan importante el estudio de las oxigenasas P450 en la activación de diversos compuestos, que existen estudios puramente teóricos para desentrañar los mecanismos y reactividad del oxígeno, como ejemplos se tienen trabajos de aplicación de la Teoría del Funcional de Densidad Híbrida (*H-DFT*) para el análisis de diferentes mecanismos del rompimiento de la molécula de oxígeno (Blomberg et al., 2000; Hata et al., 2005), modelado molecular empleando estructuras 3D para estudio de mecanismos de la activación del enlace O-O (Hlavica, 2004; Kirton et al., 2002) y estudios computacionales teóricos de la hidroxilación de alcanos y la epoxidación de alquenos (Shaik et al., 2002). Los estudios de la oxidación de monoterpenos y otros hidrocarburos afines, también abarcan la química teórica computacional en trabajos como el modelado de la formación de aerosoles en la atmósfera por oxidación de α -pineno, β -pineno y limoneno (Chen y Griffin, 2005), el modelado teórico de la hidroxilación por oxigenasas empleando aproximaciones *DFT* (Chen y Chan, 2006), determinación de geometrías óptimas de los radicales que se forman por la adición de OH al α -pineno y β -pineno usando la teoría del estado de

transición canónico variacional, *CVTST* (Fan et al., 2005), estudios teóricos de la adición de OH al limoneno y al β -pineno en fase gaseosa empleando calculos *Ab initio* (Ramirez-Ramirez y Nebot-Gil, 2005; Ramirez-Ramirez et al., 2004) y estudios de la activación del enlace C-H en alcanos usando *DFT* (Yoshizawa, 2002).

Debido este conjunto de razones, el número de procesos para la fabricación de químicos finos que involucran biocatálisis se está incrementando considerablemente. De hecho, se estima que la biocatálisis y la biotransformación podrían abarcar hasta el 30% de la síntesis de químicos para el año 2050 (Van Beilen et al., 2003)

1.1.3 Uso de células completas

Las enzimas monooxigenasas microbianas involucradas en el metabolismo de compuestos endógenos y xenobióticos poseen potenciales aplicaciones en áreas como la síntesis orgánica, la biorremediación y la producción de fármacos. Las fuentes microbianas de estas enzimas corresponden a especies bacterianas, levaduras y hongos en su gran mayoría. La búsqueda continua de nuevas fuentes de enzimas es una labor que aun se mantiene en pie con la esperanza de encontrar propiedades catalíticas únicas e inusuales (Pinheiro y Marsaioli, 2007; Vatsyayan et al., 2007).

Para que un microorganismo sea viable como biocatalizador, idealmente debería cumplir un conjunto de condiciones: ser de fácil adquisición, inocuo, ambientalmente abundante, susceptible a modificación genética, resistente ante condiciones adversas y, además, que posea alta selectividad hacia los sustratos de interés. Difícilmente una clase de microorganismos llenaría todos los requisitos descritos, sin embargo, algunas bacterias y hongos reúnen características que los hacen excelentes biocatalizadores.

Entre las bacterias, algunas especies de *Rhodococcus* y *Pseudomonas* parecen ser las más promisorias, sin embargo, también se ha reportado la aplicación eficiente *Mycobacterium* sp. y *Bacillus* sp., con las cuales se han logrado transformaciones oxidativas. Los hongos

y levaduras con más aplicaciones reportadas pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Botrytis*, aunque también se han probado con éxito diferentes especies de *Candida*, *Cunninghamella*, *Beauveria*, *Pleurotus*, *Hormonema* y *Cladosporium* (Onken y Berger, 1999; De Carvalho y Da Fonseca, 2006).

En muchos casos se prefieren los hongos debido a su producción de enzimas P450 con un amplio espectro de sustratos, aunque pueden presentar actividades celulares menores con respecto a las bacterias. Gracias a los avances biotecnológicos y al aumento creciente del conocimiento acerca de la expresión heteróloga de enzimas P450, actualmente se realiza manipulación genética de diferentes microorganismos para adaptarlos a nuevos procesos biocatalíticos con eficiencia mejorada. La manipulación con técnicas de ADN recombinante es un área interesante de estudio gracias a la cual se puede mejorar un microorganismo (o sus enzimas) y cambiar su selectividad o capacidad metabólica, que se traduce en mayor productividad. Este es un tema de trascendencia mundial y es tratado por autores como Bell et al. (2001), Li et al. (2002) y Robertson y Steer (2004).

Entre las bacterias, el Rhodococci se destaca por su amplia versatilidad genética y metabólica así como por la habilidad para ocupar diferentes nichos ecológicos, siendo uno de los candidatos preferidos para la biotransformación y biorremediación (Duetz et al., 2001). El Rhodococci ha sido detectado en muchos ambientes inhóspitos, incluidos sedimentos de desechos altamente radiactivos donde otras bacterias difícilmente sobrevivirían. Entre las especies interesantes se encuentran el *Rhodococcus opacus* y *Rhodococcus erythropolis*, bacterias Gram-positivas (orden *Actinomycetales*, familia *Nocardiaceae*) capaces de diferenciación morfológica en respuesta al ambiente y, aunque algunas especies son patógenas, la mayoría suelen ser habitantes inocuos del suelo (Van der Geize y Dijkhuizen, 2004; Larkin et al., 2005).

El género *Pseudomonas* (orden *Pseudomonadales*, familia *Pseudomonadaceae*), pertenece al grupo de bacterias Gram-negativas de importancia por su resistencia ante adversas condiciones ambientales creciendo en lugares casi imposibles para otras bacterias. Aunque

se considera patógeno, algunas especies son relativamente seguras para su empleo en biotransformaciones, como *Pseudomonas cepacia* o *Pseudomonas putida* (De Bont, 1998; Walsh et al., 2001).

En cuanto a los hongos, *Penicillium* y *Aspergillus* presentan superioridad, ya que ningún otro género tiene un potencial de adaptación tan elevado. *Aspergillus* es un género de hongos filamentosos encontrado en la naturaleza, aislado comúnmente del suelo, plantas y aire en ambientes cerrados. Pertenece al orden de *Eurotiales*, familia *Trichocomaceae* y se conocen cerca de 185 especies de las cuales 20 se han reportado como agentes causantes de infecciones oportunistas en el hombre.

El *Penicillium* es un hongo filamentoso cercanamente emparentado con el *Aspergillus*, siendo muy similares en sus características y morfología. Entre las especies de éstos hongos empleadas para biotransformaciones de terpenos se encuentran *A. niger*, *A. cellulosa*, *A. fumigatus*, *P. digitatum* y *P. italicum* (Demyttenaere y De Pooter, 1996; Demyttenaere y Willemsen, 1998; Demyttenaere y De Kimpe, 2001; Demyttenaere et al., 2000, 2001, 2004). Otro género de gran interés es *Botrytis*, un hongo filamentoso que se aísla de plantas moribundas y predomina en zonas tropicales, por ejemplo, la especie *Botrytis cinerea* aunque se considera un agente fitopatógeno, es inocua en los humanos y se ha reportado en interesantes casos de biotransformación de diferentes monoterpenos y otros sustratos (Aleu y Collado, 2001; Farooq et al., 2002)

1.2 Biooxidación de monoterpenos: limoneno y α -pineno

Las oxidaciones catalíticas selectivas de moléculas orgánicas se encuentran dentro de los procesos tecnológicos más importantes en la industria química. Principalmente la oxidación selectiva de alcanos y alquenos son objetivos clave en la actualidad y aunque son procesos termodinámicamente favorecidos, son difíciles de lograr de una manera controlada (Costas et al., 2000). Dentro de los compuestos naturales susceptibles a transformaciones biocatalíticas se encuentran los monoterpenos, principalmente el limoneno y el α -pineno,

que por ser los más abundantes en las especies vegetales, se convierten en candidatos ideales para la generación de oxi-derivados.

1.2.1 Procesos de transformación

- *Limoneno*

Los dos enantiómeros del limoneno son los monoterpenos monocíclicos más abundantes en la naturaleza. El (S)-(-)-limoneno se encuentra principalmente en la *Mentha spicata*, mientras que el (R)-(+)-limoneno es el componente principal (hasta un 95%) del aceite esencial obtenido del exocarpo de frutos cítricos (naranja, limón, mandarina, pomelo) y del aceite esencial de alcaravea (*Carum carvi*). El limoneno es separado por un proceso de desterpenación, así que se emplea con frecuencia como sustrato enantiopuro para la síntesis química de aromatizantes (Ager, 1999; Duetz et al., 2003).

El limoneno presenta enlaces dobles entre los carbonos C₁-C₂ y C₈-C₉, siendo más probable la oxidación (hidroxilación) en las posiciones alílicas (C₃, C₆) y la epoxidación en los dobles enlaces por razones de estabilidad y reactividad química, sin embargo, puede oxidarse en otros carbonos menos reactivos. Debido a que la reactividad en los metilos y metilenos alílicos es muy similar, la selectividad se dificulta cuando se emplean catalizadores convencionales, por esta razón se prefiere el uso de biocatalizadores. En la Figura 8 se indican los posibles sitios de oxidación y algunos de los compuestos oxidados más importantes (Duetz et al., 2003).

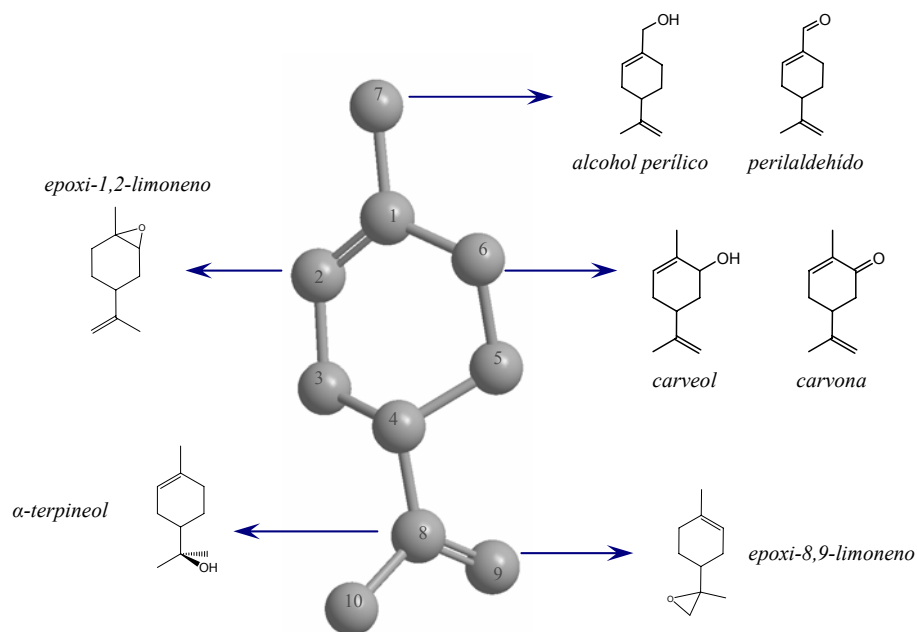


Figura 8. Representación de la estructura química optimizada en 3D del limoneno y algunos de sus productos oxidados más importantes, indicando los sitios de oxidación (no se ha definido la estereoquímica)

Desde el punto de vista comercial es interesante destacar que la industria de jugos cítricos aporta una gran cantidad de cáscaras como residuos, útiles para la obtención del limoneno. El bajo costo del limoneno enantiopuro extraído (USD 1-2 /kg) de estos residuos, ha generado interés en la industria química, debido a que una serie de compuestos medicinales y aromatizantes poseen el mismo esqueleto carbonado del limoneno, lo cual sugiere un gran potencial de síntesis (Duetz et al., 2003). Los derivados más notables del limoneno por sus aplicaciones son compuestos oxigenados como α -terpineol, alcohol perílico, carveol, carvona y mentol cuyos precios aproximados son hasta 100 veces mayores que el del limoneno (Duetz et al., 2003).

El limoneno se ha logrado transformar en diversas ocasiones empleando preferiblemente hongos. Se destaca el trabajo realizado por Demyttenaere et al. (2001) donde se ensayaron más de 60 cepas fungales y se evaluó la técnica *SPME* por su rapidez y eficiencia en la extracción e identificación de compuestos oxigenados. Una de las cepas que presentó buen desempeño fue el *Penicillium digitatum*, para la obtención de α -terpineol como principal

componente y como metabolitos minoritarios *cis/trans p-ment-2-en-1-ol*, neodihidrocarveol y óxido de limoneno. Con *Corynespora cassicola* se obtuvo como producto principal limoneno-1,2-diol, pero la mejor conversión de limoneno para la obtención de α -terpineol fue lograda con *Penicillium digitatum* luego de 8 horas y con un rendimiento del 100%.

Los sondeos rápidos en los productos de biotransformación son comúnmente realizados para seleccionar microorganismos, por ejemplo, Chatterjee y Bhattacharyya (2001) estudiaron tres cepas fungales y 15 cepas bacterianas, concluyendo que la *Pseudomonas putida* MTCC 1072 presenta alta eficiencia en la oxidación de limoneno. En dicha conversión los productos fueron aislados y caracterizados mediante FTIR y NMR, identificándolos como alcohol perílico y *p-ment-1-eno-6,8-diol*, obtenidos con rendimientos de 36 % y 44 % respectivamente.

Además de *Pseudomonas*, algunas especies poco convencionales se han probado en la biotransformación., por ejemplo Houjin et al. (2006) investigaron la biotransformación de limoneno por las bacterias marinas *Vibrio cholerae*, *Listonella damsela* y *Vibrio alginolyticus*. Los ensayos se hicieron a 28°C durante 6 días en agitador rotatorio, obteniendo una mezcla de diversos productos como epóxidos, alcoholes, cetonas, aldehídos y ésteres derivados del limoneno.

La gran mayoría de trabajos se han enfocado al uso de hongos, quizás por las razones mencionadas con anterioridad. Entre los casos más destacados se encuentra el de Menendez et al. (2002) quienes lograron la biooxidación de limoneno por una cepa de *Aspergillus niger* con producción de alcohol perílico (28,5 %) y ácidos grasos de cadena corta. Este es uno de los casos donde se han reportado productos no monoterpénicos como los ácidos grasos y donde se ha empleado el ketoconazol como inhibidor de oxidasas P450, que permite mejorar la selectividad ya que interrumpe la producción de ácidos grasos sin afectar la producción del alcohol perílico (100 %).

Diferentes especies de *Aspergillus* presentan gran actividad en la oxidación, tal es el caso del *Aspergillus cellulosa*, en la transformación de R-(+)-limoneno a isopiperitenona, limoneno-1,2-diol, carveol y alcohol perílico, mientras que el S-(-)- limoneno es transformado a alcohol perílico, *trans*-limoneno-1,2-diol y neodihidrocarveol como productos principales (Noma et al., 1992). En este caso se aprecia claramente la estereoespecificidad de las enzimas transformadoras.

Por su parte, Tan y Day (1998) han reportado el uso del micelio de *Penicillium digitatum* para la obtención de R-(+)- α -terpineol (0,83 mg/mL). Curiosamente la bioconversión únicamente ocurre en fases temprana y media de crecimiento del hongo sin importar la edad del inóculo empleado. También se concluye la posibilidad de emplear concentraciones hasta del 1 % de limoneno sin inhibir la conversión. La temperatura óptima reportada es 28 °C con un pH de 4,5; logrando la más alta concentración del producto luego de 48 h de reacción.

Para las bioconversiones no solo se han empleado monoterpenos aislados sino también desechos vegetales ricos en monoterpenos, tal es el caso de la biotransformación de aceite esencial de naranja con un 94 % de limoneno, usando residuos agroindustriales de yuca (*Cassava*) como medio de cultivo. Una de las cepas probadas, *Fusarium oxysporum* 152B, permitió la producción de α -terpineol (450 mg/L) después de 3 días de reacción (Marostica y Pastore, 2007).

Además de bacterias y hongos, las células vegetales parecen promisorias para este tipo de bioprocesos, de las cuales *Picea abies* (en suspensión) ha permitido la conversión de R-(+)-limoneno hasta limoneno-1,2-epóxido, carveol, alcohol perílico y 1,8-cineol (Lindmark-Henriksson et al., 2004). También se han usado células de *Solanum aviculare* y *Dioscorea deltoidea*, para la obtención de carveol y carvona con producción máxima de 34 % de carvona (Vanek et al, 1999)

Dentro de las oxidaciones de monoterpenos se destacan algunos procesos catalíticos “limpios” y ambientalmente benignos que no involucran biocatalizadores pero que vale la pena mencionar ya que están basados en química verde. Por ejemplo Cagnoli et al. (2005) describen la epoxidación “limpia” de limoneno con H_2O_2 como agente oxidante, empleando un catalizador de Ti-MCM-41 (tipo tamiz molecular mesoporoso). Este catalizador presenta actividad catalítica hacia los epóxidos de limoneno, logrando conversiones del 52 % en 7 h con selectividad del 60 % hacia los óxidos (1,2 y 8,9) de limoneno. En otro proceso limpio descrito por Oliveira et al, 2006, se emplean catalizadores heterogéneos de vanadio/titanio (V_2O_5/TiO_2) preparados por procedimientos sol-gel, para la oxidación en fase líquida del limoneno obteniendo como productos de oxidación polímeros de limoneno, óxido de limoneno, carveol y carvona .

Diferentes grupos tienen en funcionamiento procesos comerciales de transformación del limoneno; por ejemplo, la *BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH* (Alemania) ha patentado (Stumpf et al., 1984) la producción de α -terpineol por conversión microbiológica del limoneno. También posee patentes la *KAO CO.* para la obtención de α -terpineol pero esta vez por catálisis química no biocatalítica en reacciones de una etapa con alta eficiencia y diferentes catalizadores ácidos como el sulfúrico, fosfórico, p-toluensulfónico y clorhídrico (Yamamoto et al., 1997), o catalizadores heterogéneos como triflato de escandio, itrio , neodimio o disprosio (Tanaka et al., 1997)

Para la obtención de carvona la compañía *PFIZER INC.* ha patentado un proceso microbiológico a partir de alfa o beta pineno usando como biocatalizador una cepa de *Pseudomonas* (Rhodes y Winskill, 1985). También existen patentados métodos químicos no biocatalíticos que parten de limoneno y emplean cloruro de nitrosilo y sales de paladio como catalizadores (Mulder et al., 1999; Chelariu, 2000).

Para la producción de alcohol perílico y perilaldehído a partir de limoneno la *UNIVERSIDAD DE MICHIGAN (USA)* ha patentado un proceso bacteriano con una cepa de *Bacillus stearothermophilus* (Chang-Hae y Oriel, 1997). En otros procesos para

preparar alcohol perílico y acetato de perílico a partir de limoneno, se emplean cepas microbianas cuya identidad se mantiene en secreto (Jourdat et al., 2002; Duetz et al., 2003). Existe también una patente registrada para la preparación de alcohol perílico y acetato de perílico por catálisis química ácida a partir de oxido de β -pineno (Chastain et al., 1999)

▪ *α -pineno*

Después del limoneno, el α -pineno es el monoterpeneo más abundante y el principal componente del aceite de trementina, obtenido de las resinas de plantas coníferas, que pueden contener hasta un 50% de pinenos (Wang et al., 1997). El isómero más abundante es el R-(+)- α -pineno, extraído de fuentes naturales con pureza óptica máxima de 91%, mientras que el S-(-)- α -pineno se extrae con pureza del 81%. Los pinenos son de gran valor como precursores de fragancias y la mayoría de sus derivados (el 84 %) se producen por síntesis química (Ager, 1999; Yoo et al., 2001). Sus productos de oxidación más frecuentes (Fig. 9) son verbenol, verbenona y aldehído camfolénico, ya sea para su uso directo o como intermediarios de otros químicos finos, por ejemplo, citral, mentol, taxol y vitaminas A y E (Maksimchuk et al., 2005).

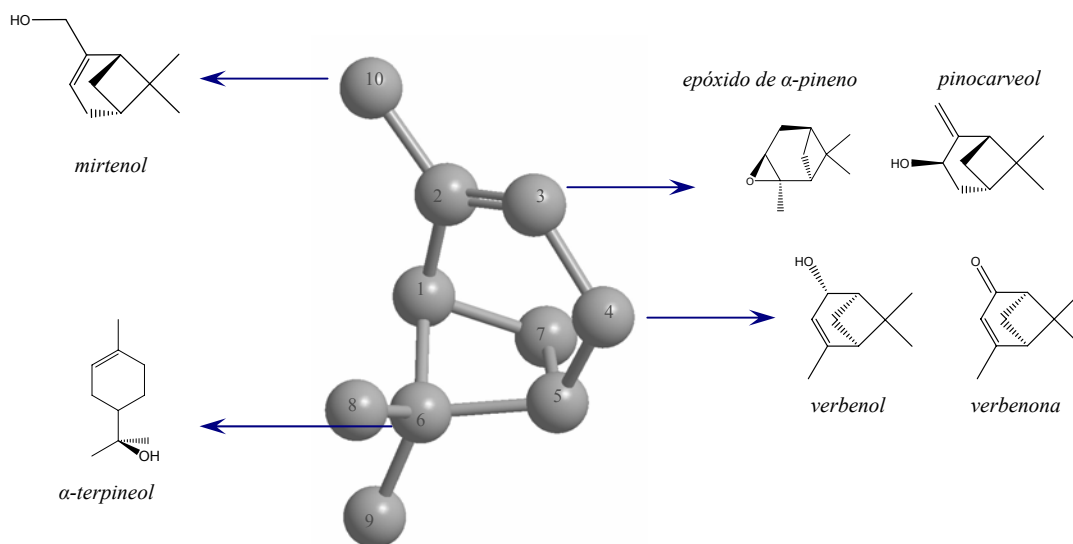


Figura 9. Representación de la estructura química optimizada en 3D del α -pineno y algunos de sus productos oxidados más importantes, indicando los sitios de oxidación (no se ha definido la estereoquímica)

El verbenol se usa directamente como aditivo o para producir variedad de compuestos fragantes y vitaminas. Uno de los métodos promisorios en la actualidad es su obtención por oxidación de α -pineno empleando oxígeno molecular, aunque son escasos los trabajos dedicados a la oxidación de α -pineno y a la identificación detallada de sus productos. Este tipo de oxidaciones comúnmente se llevan a cabo a través de mecanismos que involucran formación de radicales libres y α -pineno-hidroperóxidos como intermediarios (Ancel et al., 2004).

La verbenona es otro compuesto aromatizante de alto valor. Es el principal constituyente de fresas, frambuesas, hierbabuena y eneldo, y en estado puro posee notas fuertes de alcanfor y menta. La verbenona es de gran demanda en la industria de alimentos, con un costo promedio de USD 3000/ kg y es obtenida por extracción de aceites de pino y eucalipto. Agrawal y Joseph (2000) han logrado la conversión de α -pineno a verbenona empleando células en reposo de una cepa nativa de *A. niger*. La máxima formación de verbenona fue de 3,28 mg /100 mL, equivalente a un rendimiento molar del sustrato de 16,5 %. Las condiciones óptimas obtenidas fueron: pH 7,0; concentración del sustrato de 20 mg/ 100 mL y un tiempo de incubación de 6 horas. Se ha logrado también la conversión de α -pineno empleando *Botrytis cinerea* para obtener verbenona y tres nuevos metabolitos no descritos con anterioridad: 3 β -hidroxi-(-)- β -pineno, 9-hidroxi- α -pineno y 3 β -hidroxi-(-)- α -pinen-6-ona (Farooq et al., 2002).

Para la obtención de verbenona se han empleado otros métodos limpios aunque no biocatalíticos, por ejemplo, McMorn et al. (2000) obtuvieron verbenona con un 60 % de selectividad empleando un catalizador tipo gel de sílice/titanio y como agente oxidante el *terbutil hidroperóxido*. En este estudio también se han evidenciado mecanismos de formación a través de radicales libres e intermediarios de tipo hidroperóxido. Dentro de las patentes registradas para la producción de verbenol y verbenona a partir de α -pineno, se encuentra el empleo de tamiz molecular mesoporoso tipo MCM-41 como catalizador, en un medio alcalino y con ayuda de surfactantes catiónicos de amonio (Wang, 2006).

También se destacan algunos procesos catalíticos que emplean metaloporfirinas (catalizadores biomiméticos de estructura afín al grupo hemo de las P450) y agentes oxidantes limpios que generan mínima o ninguna contaminación. Por ejemplo, Guo et al. (2005) han usado metaloporfirinas simples para la oxidación de α -pineno con oxígeno molecular en ausencia de co-catalizadores y solventes. Sus resultados indican que en dicho proceso, la temperatura de reacción, el núcleo metálico y los sustituyentes periféricos de las metaloporfirinas tienen influencia marcada en la selectividad de la reacción. El desarrollo de métodos catalíticos selectivos empleando procesos verdes de oxidación es un reto en la actualidad y una tendencia en la química fina. La mayoría de tales procesos emplean H_2O_2 como agente oxidante y diferentes catalizadores sólidos de silicatos mesoestructurados con inclusión de metales como Ti (IV), Zr (IV) y Fe (III) (Maksimchuk et al., 2005)

Las biotransformaciones de α -pineno se han llevado a cabo satisfactoriamente empleando hongos, bacterias y células vegetales. Dentro de los hongos se ha reportado el *A. niger* en diferentes formas y estados de crecimiento, libre o inmovilizado en polímeros y adicionando el sustrato en fase líquida o gaseosa, para obtener productos como verbenona y α -terpineol (Rozenbaum et al., 2006). En algunos casos el *A. niger* ha sido modificado usando ingeniería genética con resultados mejorados, tal es el caso de una cepa superproductora de verbenol generada por fusión de dos cepas de *A. niger*, alcanzando un rendimiento máximo de conversión de 48,6 % en solo 6 h (Vidya y Agrawal, 2003). No solo *A. niger* ha sido un eficiente oxidante de α -pineno, algunas especies menos conocidas como *Hormonema sp.* han catalizado la formación de verbenona y *trans*-verbenol en concentraciones aproximadas de 0,4 g/L después de 96 horas de reacción (Van Dyk et al., 1998)

Dentro del grupo de las bacterias se destaca la *Pseudomonas sp.* PIN aislada del suelo y adaptada al sustrato en cultivos enriquecidos con α - y β - pineno. Con ella se ha logrado la bioconversión con 33,5 % de rendimiento, para obtención de limoneno, *p*-cimeno y α -terpinoleno (Yoo y Day, 2001, 2002). Algunas bacterias termófilas aeróbicas como *Bacillus pallidus* también presentan alta capacidad transformadora para la obtención de metabolitos

como β -pineno, limoneno, pinocarveol, pinocarvona, carveol y carvona (Savithiry et al., 1998)

Vanek et al. (2005) han reportado biotransformaciones eficientes de ambos enantiómeros de α -pineno empleando células vegetales de *Picea abies* inmovilizadas en alginato. Los productos principales fueron *cis/trans* verbenol y verbenona. La transformación empleando células vegetales libres ha demostrado ser más rápida que el empleo de células inmovilizadas.

1.2.2 Aplicaciones especiales de algunos derivados

▪ *Alcohol perílico*

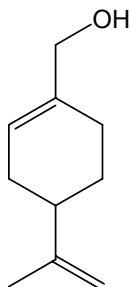


Figura 10. Estructura química del alcohol perílico

El alcohol perílico (Fig. 10) es el derivado oxigenado con mayor valor farmacéutico y comercial. Es el monoterpeneo con la más potente actividad anticancer y se encuentra en baja concentración en aceites esenciales de *Lavandula hybrida*, *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Prunus* sp., *Carum carvi* y *Perilla frutescens* (Belanger, 1998; Gupta y Myrdal, 2004). Es un agente con baja toxicidad, propiedades terapéuticas y actividad quimiopreventiva y/o quimioterapéutica contra una amplia variedad de cánceres. Recientemente se ha estudiado su efecto como agente terapéutico en el tratamiento de tumores de próstata (Peffley et al., 2007; Chung et al., 2006), carcinogénesis inducida por PAH's (Chan et al., 2006), dendrogliomas malignos (da Fonseca et al., 2006), tumores de pulmón (Xu et al., 2004) y cáncer de mama (Yuri et al., 2004). También se ha sometido a pruebas preclínicas de estudio fase II para el tratamiento

de cáncer de ovario (Bailey et al., 2002), fase II para el tratamiento oral del cáncer de próstata (Liu et al., 2003) y fase I en el tratamiento de tumores sólidos avanzados (Azzoli et al., 2003).

▪ *Carvona*

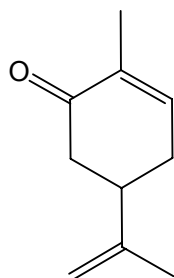


Figura 11. Estructura química de la carvona

La carvona (Fig. 11) es uno de los componentes principales en plantas como Alcaravea (*Carum carvi*), Eneldo (*Anethum graveolens*) e Hierbabuena (*Mentha spicata*). Se han descrito diferentes aplicaciones de la carvona, situándola como un compuesto atractivo para producción. Algunas de sus aplicaciones, detalladas por De Carvalho y Da Fonseca (2006) son:

- *Inhibición del brote en papas.* La (4S)-(+)-carvona se considera un buen inhibidor del brote (*sprout*) en tubérculos como la papa. Cuando se compara con químicos tradicionales antibrote como isopropilfenilcarbamato y 3-isopropilclorofenilcarbamato, la carvona muestra igual o mejor comportamiento durante el almacenamiento a largo plazo, manifestando también actividad antifúngica contra *Fusarium sulphureum*, *Phoma exigua* y *Helminthosporium solana*. De hecho, la carvona es superior si se compara a otros químicos considerando su baja toxicidad e inocuidad con la capa de ozono. La carvona se comercializa por la compañía LUXAN V.B (Elst, Países Bajos) como un agente antibrote bajo el nombre de *Talent*.

- *Agente antimicrobiano.* Se ha comprobado que ambos isómeros ópticos de la carvona son efectivos contra un amplio espectro de hongos y bacterias patógenos en humanos. Se destaca el hecho de que algunos aceites esenciales de *Anethum graveolens* con alto

contenido de carvona, aun guardados por más de 35 años, muestran excelente actividad microbiana contra hongos como *Aspergillus niger* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*.

- *Repelente*. La carvona se ha empleado también como un insecticida natural para la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* y se ha probado con éxito contra el *Aedes aegypti*, uno de los principales vectores de enfermedades como la fiebre amarilla, dengue y dengue hemorrágico.

▪ *α-terpineol*

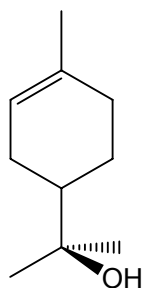


Figura 12. Estructura química del α -terpineol

El α -terpineol (Fig. 12) es el alcohol terpénico monocíclico comercialmente más importante, con un consumo anual superior a los 13000 kg/año, que lo ubica entre los 30 compuestos saborizantes con mayor demanda mundial. Ambos enantiómeros tienen olor diferente, el R-(+)- α -terpineol tiene un aroma floral a lilas mientras que el S-(-)-terpineol tiene un aroma a madera de coníferas. Es usado como perfume, repelente de insectos, antifúngico, desinfectante, agente para flotación de metales (Tan y Day, 1998; Marostica y Pastore, 2007) y para fabricación de copolímeros funcionales (Yadav y Srivastava, 2002, 2004).

El proceso comercial para su producción se hace por hidratación (en medio ácido) de aceite de trementina para obtener el *cis*-hidrato de terpinol, que luego es deshidratado a α -terpineol. De esta forma está disponible a un bajo costo y un proceso microbiano debe asegurar altos rendimientos para ser competitivo con el proceso convencional. Una ventaja

a favor del proceso biocatalítico, es la posibilidad de generar α -terpineol con alto exceso enantiomérico (Adams et al., 2003; Román-Aguirre et al., 2005)

▪ *Epóxidos de limoneno*

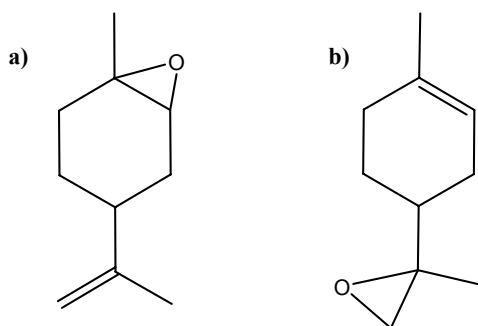


Figura 13. Estructura química de los óxidos de limoneno: a) 1,2 b) 8,9

A partir del limoneno se pueden obtener dos epóxidos (Fig. 13), el epóxi-1,2-limoneno y el epóxi-8,9-limoneno, los cuales se han encontrado naturalmente, en trazas, en algunas especies vegetales como *Micromeria silicica* (Duru et al., 2004) y *Michelia alba* (Shang et al., 2002), aunque también se han detectado en alimentos como mandarina y jengibre (Van der Werf et al., 2000). El epóxido-8,9-limoneno por ser terminal puede ser transformado en el aldehído, *p*-menten-9-al, el cuál se usa en la industria de aromas y es reconocido como un aditivo alimentario seguro, *GRAS*.

Debido a la reactividad del anillo epóxido, son intermediarios de alto valor en la producción de compuestos ópticamente activos y en la resolución cinética de mezclas racémicas. Los productos de hidrólisis de los epóxidos, los dioles vecinales, también son compuestos con uso creciente (de Vries y Janssen, 2003). En estudios realizados por Van der Werf et al. (2000) se han logrado producir los epóxidos (0,1 g/L) a partir de los dos enantiómeros del limoneno empleando *Xanthobacter* sp. Aunque su obtención se logra comúnmente con catalizadores químicos heterogéneos (Cagnoli et al., 2005; Saikia et al., 2006), su producción reportada por métodos biológicos es casi nula.

1.3 Consideraciones finales

Además de los compuestos mencionados, la gama de productos derivados del limoneno y α -pineno es amplia ya que pueden ocurrir sobreoxidaciones o dihidroxilaciones que conllevan a la formación de aldehídos, ácidos, cetonas y dioles, los cuales también poseen diferentes aplicaciones en las áreas alimenticia y farmacológica.

En la Universidad Industrial de Santander se han realizado trabajos anteriores de oxidación de limoneno empleando como catalizadores complejos de cobalto con bases de Schiff (Cárdenas y Paez, 1998), complejos de Fe y Mn encapsulados (Vargas et al., 1998) y zeolitas tipo Y (Blanco et al., 1998). Sin embargo, las transformaciones biocatalíticas de monoterpenos solo se han iniciado recientemente a través del Centro de Excelencia CENIVAM, que además del presente trabajo, tiene en desarrollo otros similares como la biooxidación de citronelol y la esterificación de citronelol con ácidos grasos empleando hongos filamentosos.

En la Universidad de Antioquia (Grupo de Catálisis Ambiental) también existe investigación activa en la oxidación de terpenos empleando procesos limpios aunque no biocatalíticos, haciendo uso de catalizadores como molibdatos de níquel (Gallego et al., 2007), y metaloflaltocianinas soportadas en materiales mesoestructurados tipo MCM-41 (Ariza et al., 2007), trabajos orientados a la obtención de epóxidos de limoneno.

El grupo de investigación en Fitoquímica (GIFUJ) de la Pontificia Universidad Javeriana ha dedicado ya varios años a la investigación activa en biotransformaciones de compuestos terpenoides obtenidos de diferentes especies vegetales nativas empleando hongos filamentosos como catalizadores.

Mundialmente, el interés que ha retomado el uso y aplicación de terpenos en procesos de biotransformación es tan fuerte en la actualidad que la publicación *Nature Chemical Biology* (parte del *Nature Publishing Group*) en su edición de Julio del 2007 presenta un

enfoque especial en productos naturales, particularmente en terpenos. Según esta publicación, *“Las investigaciones en productos naturales han ganado recientemente más importancia debido al incremento de la comprensión de su significado biológico y al incremento del reconocimiento del origen y función de su diversidad estructural.”*...*“Los productos naturales son tema central de investigación en la interfase entre química y biología. Aunque todos los productos naturales inspiran investigación intelectual, una de las más intrigantes clases de moléculas son los terpenos.”*...” La colección de artículos en esta edición especial demuestra que las investigaciones de productos naturales, en particular de terpenos, son muy prósperas. “ (Traducción al español del Editorial de *Nature Chemical Biology*, 2007)

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos

Los patrones y reactivos para síntesis empleados fueron R-(+)-limoneno (≥ 94 %), (1R)-(+)- α -pineno (≥ 97 %) y α -terpineol (≥ 98 %) obtenidos de Merck (Hohenbrunn, Alemania); (-)-alcohol perílico (≥ 98 %) y (R)-(-)-carvona (≥ 98 %) obtenidos de Sigma-Adrich (Steinheim, Suiza). Los solventes etanol ($>99,9$ %) y diclorometano (≥ 98 %) fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania) y los gases de alta pureza empleados en cromatografía de AGA-Fano (Bucaramanga, Colombia).

2.1.2 Equipos

Para la ejecución de procedimientos se emplearon los siguientes equipos: placa de calentamiento MR Hei-TEc marca Heidolph (Schwabach, Alemania), incubador ultravioleta SI-950 marca UVP (Cambridge, Reino Unido), agitador orbital Vibramax 100 marca Heidolph (Schwabach, Alemania), balanza analítica AB204-S marca Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Suiza), centrífuga Rotofix 32 marca Hettich (Kirchlengern, Alemania), microcentrífuga 1-14 marca Sigma (Osterode, Alemania), autoclave de vapor No.25X marca All American (Hempstead, New York) y medidor de pH HI 223 marca Hanna Instruments (Cluj-Napoca, Rumania).

2.1.3 Medios de cultivo

Los medios de cultivo y nutrientes empleados fueron dextrosa (glucosa), extracto de levadura, extracto de malta, cloruro de sodio, peptona especial, extracto de malta-agar (MEA), papa-dextrosa-agar (PDA) obtenidos de Oxoid (Hampshire, Inglaterra) y Tween[®]

80 obtenido de Merck (Hohenbrunn, Alemania). Los medios se prepararon de la siguiente manera según las recomendaciones de Oxoid y *DSMZ* (porcentajes en p/v):

PDA (*Potato Dextrose Agar* - 0,4 % extracto de papa, 2,0 % glucosa, 1,5 % agar): 39 g de medio en polvo PDA (Oxoid) se diluyeron con agua destilada hasta completar 1 L.

MEA (*Malt Extract Agar* - 3,0 % extracto de malta, 0,5 % peptona micológica, 1,5 % agar): 50 g de medio en polvo MEA (Oxoid) se diluyeron con agua destilada hasta completar 1 L.

YMPG (*Yeast Malt Peptone Glucose*): Se preparó un litro de solución acuosa que contenía 0,5 % extracto de levadura, 0,5 % extracto de malta, 0,5 % peptona bacteriológica y 1,0 % glucosa.

PDB (*Potato Dextrose Broth*): Se tomaron 200 g de papas peladas, cortadas en pequeños trozos, y se adicionaron a 1 L de agua destilada. Se llevó a ebullición durante una hora, se dejó enfriar y se filtró. Con el líquido de filtrado se preparó el medio al 2 % de glucosa.

SS (*Spore Suspension*): Se preparó una solución acuosa estéril que contenía NaCl (0,85 %) y Tween 80 (0,1 %), de la cual se tomaron 10 mL y se adicionaron en la superficie del *A. niger* esporulado, luego se transfirieron las esporas a la solución frotando con espátula y se ajustó la concentración final a 10^7 esporas/mL empleando la técnica de recuento en cámara de Neubauer.

2.1.4 Microorganismos

Se empleó una cepa certificada de *Aspergillus niger* (DSM 821) obtenida de *DSMZ GmbH-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (Braunschweig, Alemania). La cepa en forma liofilizada (Fig. 14) fue reactivada de acuerdo al protocolo recomendado por *DSMZ* en medio líquido de papa (PDB) y fue guardada a 5 °C para su uso posterior.



Figura 14. Microorganismos obtenidos de DSMZ

2.1.5 Otros materiales

Los bioensayos se realizaron en viales transparentes de 20 mL tipo *headspace* con tapa de encapsulado de aluminio y sello de PTFE/Silicona de 20 mm, marca Agilent (Santa Clara, USA). Para el almacenamiento de las muestras se emplearon viales ámbar de 15 mL con tapa de rosca y sello de PTFE/Silicona, viales transparentes de 22 mL con tapa encapsulado y sello de PTFE/Silicona marca Supelco (Bellefonte, USA) y microtubos de 1,5 mL marca Brand (Wertheim, Alemania). Para la microextracción se empleó un *Holder* manual y un juego de fibras de 50/30 μm , DVB/CarboxenTM/PDMS (*StableFlex*TM) marca Supelco (Bellefonte, USA)

2.2 Procedimientos

2.2.1 Biológicos

- Limpieza, desinfección y esterilización

Todos los medios, excepto la suspensión de esporas, fueron esterilizados a 121 °C (15 psi) durante 15 minutos antes de realizar los ensayos. El material de vidrio y plástico fue limpiado por inmersión en una solución de Extrán al 5% durante 1 hora, enjuagado completamente con agua destilada y secado a 60 °C durante 3 horas. El material de vidrio

se sometió a esterilización seca en horno a 160 °C durante 3 horas y se guardó en un lugar limpio hasta su uso. Las asas y agujas de inoculación se esterilizaron antes y después de cada aplicación por exposición directa a la llama hasta el rojo vivo. Las superficies de metal, cemento, loza o granito fueron desinfectadas por aplicación de etanol comercial al 95% y/o solución de hipoclorito de sodio a 5000 ppm. Los medios para desecho y el material contaminado fueron sometidos a esterilización por vapor a 121 °C (15 psi) durante 40 minutos y sumergidos en solución de hipoclorito de sodio a 5000 ppm durante una hora.

▪ Activación , crecimiento y mantenimiento del hongo

Para el crecimiento del *A. niger* DSM 821 se probaron los medios PDA y MEA, de los cuales se tomaron 25 mL en cajas de Petri, que fueron inoculados con la cepa (Fig. 15). Para su reactivación, se abrió la cabeza de la ampolla externa, calentando la punta directamente en la llama y quebrándola. Cuidadosamente se separó la punta de vidrio, removiendo el material aislante y retirando el vial interior. Se flameó en llama la cabeza del vial y luego se adicionó 1 mL del medio de cultivo PDB. Se dejó rehidratar por 30 minutos y luego se agitó el contenido, transfiriendo la mezcla a un tubo de ensayo con 10 mL de PDB. De este medio final se tomaron 100 µL para preparar los cultivos definitivos en PDA y MEA. Una vez inoculado el hongo fue incubado a 30 °C por 24 horas, luego a temperatura ambiente por 3 días y finalmente almacenado a 5 °C. El hongo fue mantenido por subcultivos periódicos en MEA y PDA realizados cada 15 días.

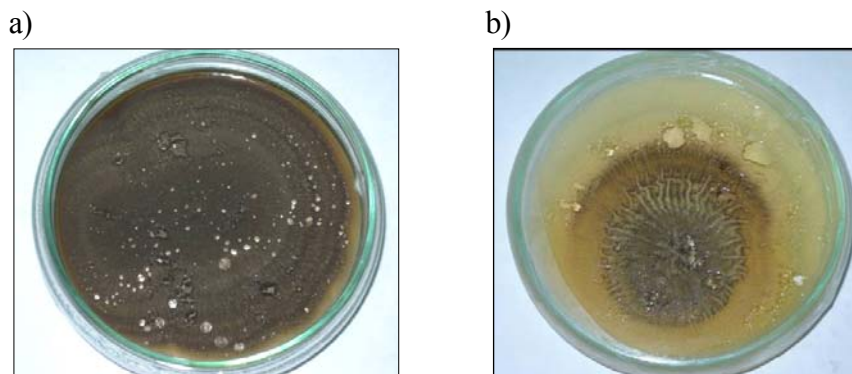


Figura 15. Crecimiento del *A. niger* DSM 821 en medios a) MEA y b) PDA

- Curva de crecimiento y evolución del pH

Para realizar la curva de crecimiento y la medición del pH, se tomaron muestras homogéneas del medio con el hongo (5 mL) cada 24 horas durante 8 días. Cada muestra fue filtrada y lavada con 10 mL de agua destilada a 60 °C, se determinó el pH del filtrado y el residuo húmedo (biomasa) fue secado a 105 °C por 24 h e introducido en el desecador durante 1 hora antes de realizar la medición del peso seco. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

- Biotransformación General

Los bioensayos a microescala se realizaron en 5 mL del medio de cultivo seleccionado y empleando viales tipo *headspace* de 20 mL que fueron inoculados con 20 μ L de la suspensión de esporas, SS (excepto cuando SS funcionaba como medio), y tapados con algodón/gasa. Los medios líquidos (Fig. 16) fueron sometidos a agitación orbital (300 rpm) a temperatura ambiente. Los medios sólidos (Fig. 17) en forma de *slant* se mantuvieron a temperatura ambiente en posición horizontal. En diferentes estados de crecimiento del hongo (1-8 días) a cada vial se adicionaron 10 μ l de solución del sustrato [R-(+)-limoneno, R-(+)- α -pineno, aceite esencial de naranja o aceite esencial de mandarina] al 40% en EtOH y se dejó reaccionar durante el tiempo requerido. Una vez finalizadas las reacciones se efectuó la extracción de productos (líquido-líquido o SPME) y el análisis por GC-FID/MS.

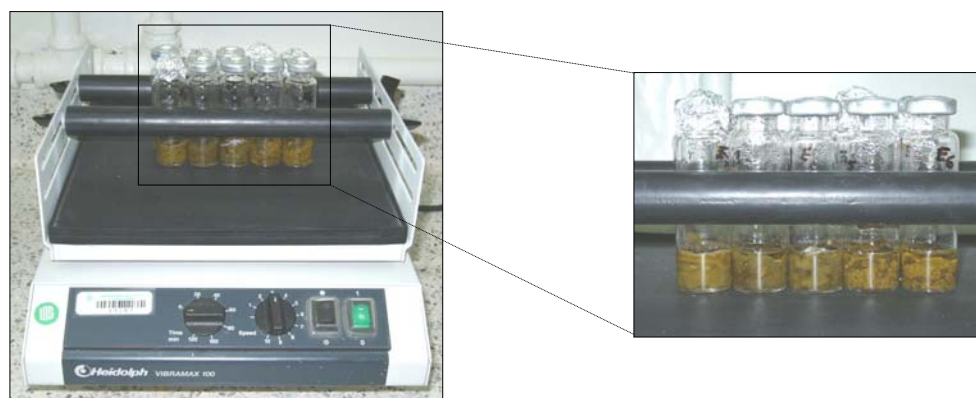


Figura 16. Ensayos de biotransformación a microescala empleando medio líquido



Figura 17. Ensayos de biotransformación a microescala empleando medio sólido

- Ensayos iniciales: evaluación del medio de cultivo y de la edad del hongo

Se probaron dos medios líquidos (YMPG y SS) y un medio sólido (PDA) en la oxidación del limoneno y α -pineno, empleando el procedimiento de biotransformación general. El sustrato fue adicionado en diferentes estados de crecimiento (edad) del hongo. Una vez transcurrido el tiempo de reacción que fue mantenido constante en todos los casos (8 días), se procedió a la extracción (L-L) y análisis de productos oxigenados empleando GC-FID. En la Tabla 1 se describen las condiciones experimentales.

SUSTRATO	MEDIO			Edad del hongo (días)
	YMPG	PDA	SS	
α -pineno	YP1	PP1	SP1	1
	YP2	PP2	SP2	2
	YP3	PP3	SP3	4
	YP4	PP4	SP4	8
limoneno	YL1	PL1	SL1	1
	YL2	PL2	SL2	2
	YL3	PL3	SL3	4
	YL4	PL4	SL4	8

Tabla 1. Ensayos de biotransformación de limoneno y α -pineno variando el medio de cultivo y la edad del hongo *A. niger* DSM 821 (parámetros fijos: 6 días de reacción, extracción L-L)

- Evaluación de la volatilidad de sustratos

Se evaluó la volatilización de los sustratos en los medios de reacción YMPG y PDA usando viales con dos formas diferentes de cierre: tapones permeables de algodón y tapas herméticas de encapsulado de aluminio con sello de PTFE/Silicona. En estas determinaciones se empleó

el procedimiento general de biotransformación pero **sin** inoculación del hongo (incluyendo ensayos blancos, B). Una vez transcurridos 6 días luego de la aplicación del sustrato, se realizó la extracción (L-L) y el análisis cuantitativo por GC-FID. Las condiciones experimentales se resumen en la Tabla 2.

<i>Experimento</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Medio</i>	<i>Tipo de cierre</i>
E1	α -pineno	YMPG	Tapón de algodón
E2	limoneno	YMPG	Tapón de algodón
E3	α -pineno	PDA	Tapón de algodón
E4	limoneno	PDA	Tapón de algodón
E5	α -pineno	YMPG	Sello PTFE/silicona
E6	limoneno	YMPG	Sello PTFE/silicona
E7	α -pineno	PDA	Sello PTFE/silicona
E8	limoneno	PDA	Sello PTFE/silicona
B1	---	PDA	Sello PTFE/silicona
B2	---	YMPG	Sello PTFE/silicona

--- No se adicionó sustrato

Tabla 2. Ensayos para la evaluación de la volatilidad de sustratos (limoneno y α -pineno) empleando dos sistemas de cierre: tapón de algodón y sello PTFE/silicona (parámetros fijos: 6 días de contacto, extracción L-L)

- Ensayos en medios seleccionados a condiciones fijas: extracción L-L y evaluación de productos

Para estos experimentos fueron seleccionados 2 medios diferentes, YMPG y PDA, con base en los ensayos iniciales de prueba. Adicionalmente se probó el medio PDB, similar al PDA pero en estado líquido. El *A. niger* DSM 821 fue usado como biocatalizador y se efectuó el procedimiento general de biotransformación. El sustrato fue adicionado al tercer día de edad del hongo e inmediatamente los frascos fueron cerrados herméticamente (sello PTFE/Silicona). Una vez transcurridos 6 días luego de aplicar el sustrato, se realizó la extracción (L-L) y el análisis de los productos empleando GC-FID/MS. Las condiciones experimentales se resumen en la Tabla 3, donde se han incluido diferentes blancos denominados TB. El tiempo de adición del sustrato, el tipo de sello y el tiempo de reacción fueron seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos en las fases anteriores de prueba y se explican en el capítulo de análisis de resultados.

<i>Experimento</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Medio</i>
T1	α -pineno	YMPG
T2	limoneno	YMPG
T3	α -pineno	PDA
T4	limoneno	PDA
T5	α -pineno	PDB
T6	limoneno	PDB
TB1	---	YMPG
TB2	---	PDA
TB3	---	PDB

--- No se adicionó sustrato

Tabla 3. Ensayos de biotransformación de limoneno y α -pineno en medios seleccionados a condiciones fijas: *A. niger* DSM 821 (3 días de edad), 6 días de reacción, sello de PTFE/Silicona, extracción L-L

- Ensayos con aceites esenciales: extracción *SPME* y evaluación de productos

Los experimentos con aceites esenciales se realizaron en medio YMPG, con el fin de lograr la producción de alcohol perílico. El *A. niger* DSM 821 fue usado como biocatalizador y se efectuó el procedimiento general de biotransformación empleando como sustratos los aceites esenciales de naranja y mandarina. El sustrato fue adicionado al tercer día de edad del hongo e inmediatamente los frascos fueron cerrados herméticamente (sello PTFE/Silicona). Una vez transcurridos 6 días luego de aplicar el sustrato, se realizó la extracción (SPME) y el análisis de los productos empleando GC-FID, bajo las condiciones optimizadas descritas. Las condiciones experimentales se muestran en la Tabla 4, donde se han incluido diferentes blancos denominados AB. El tiempo de adición del sustrato, el tipo de sello y el tiempo de reacción fueron seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos en las fases anteriores de prueba y se explican en el capítulo de análisis de resultados.

<i>Experimento</i>	<i>Catalizador</i>	<i>Aceite esencial(sustrato)</i>
AE1	Si	Mandarina
AE2	Si	Naranja
AB1	Si	-- (Etanol como solvente)
AB2	---	Mandarina
AB3	---	Naranja
AB4	---	---

--- No se adicionó sustrato, reactivo o catalizador

Tabla 4. Ensayos de biotransformación empleando aceites esenciales de mandarina y naranja como sustratos. *A. niger* DSM 821 (3 días de edad), medio YMPG, 6 días de reacción, sello de PTFE/Silicona, extracción HS-SPME

2.2.2 Analíticos e instrumentales

▪ Condiciones

Los análisis GC-FID se realizaron en un cromatógrafo de gases HP 6890 *Series* (Paloalto, CA, USA) usando una columna con fase estacionaria de polietilenglicol, HP-INNOWAX (30 m x 0,32 mm diámetro interno x 0,25 µm grosor de película). Las condiciones cromatográficas del horno fueron las siguientes: temperatura mantenida a 80 °C durante 2 min luego de la inyección e incrementada a una velocidad de 15 °C/min hasta 230 °C y mantenida durante 5 min a 230 °C. La relación de *split* fue 1:30, el inyector fue mantenido a 250 °C y el detector a 250 °C. La identificación de componentes se realizó comparando los tiempos de retención obtenidos de los patrones disponibles analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas.

Los análisis GC-MS fueron realizados en un cromatógrafo de gases modelo *Agilent* 6890N (Paloalto, CA, USA). Para la separación de los analitos se empleó una columna capilar de sílice fundida DB-WAX (60 m x 0,25 mm diámetro interno x 0,25 µm grosor de película). La programación de temperatura fue desde 45 °C mantenidos por 10 min, con velocidad de calentamiento de 3 °C /min hasta 220 °C y mantenida por 30 min a 220 °C. Se empleó

un detector selectivo de masas modelo *Agilent 5975C* (Paloalto, CA, USA) con sistema de ionización por impacto de electrones (70 eV) y analizador de masas cuadrupolar operado en modo de barrido completo desde 40 hasta 400 Dalton (m/z). La relación de *split* fue de 1:13 y se usó un inyector automático modelo *HP 7683 Series*. La identificación de componentes se realizó empleando el sistema de datos *HP Enhanced Chemstation G1701BA* y comparando los espectros de masas de los productos con aquellos contenidos en las bases de datos espectrales NBS 75K, NIST 05 y WILEY 138.

- Preparación de patrones, calibración y validación del método

Para los análisis GC-FID/MS (extracción L-L) se prepararon soluciones *stock* de R-(+)-limoneno, R-(+)- α -pineno y alcohol perílico en diclorometano, con concentración de 84000 ppm cada una. A partir de cada *stock* se prepararon cuatro soluciones patrón de diferentes concentraciones para el R-(+)- α -pineno (172, 430, 860 y 1720 ppm), para el R-(+)-limoneno (168, 420, 840 y 1680 ppm) y para el alcohol perílico (840, 1680, 4200 y 8400 ppm), las cuales se emplearon para realizar cada curva de calibración, inyectando 1 μ L bajo las condiciones descritas de análisis. Para el análisis por SPME-GC-FID se empleó el medio YMPG como matriz y se utilizaron cuatro soluciones patrón de concentraciones 0,84 ; 1,68; 4,21 y 8,41 ppm de limoneno en el medio de cultivo. La extracción se realizó bajo las condiciones descritas para SPME. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se calcularon con base en los parámetros de la regresión lineal empleando la metodología *RMSE*, recomendada por la US EPA (Corley, 2003) y expresados en unidades de concentración definidos como:

$$\text{LOD} = (3 \cdot \text{RMSE}) / m$$

$$\text{LOQ} = (10 \cdot \text{RMSE}) / m$$

Para el análisis de regresión lineal se usó el programa estadístico *Statgraphics Centurión XV* y las curvas de calibración se definieron según la ecuación, $X = m \cdot C + b$, donde, X: área del pico, m: pendiente calculada, C: concentración del patrón en ppm, b: constante calculada. El *RSME* fue calculado según la definición:

$$\text{RMSE} = \left[\frac{\sum_{j=1}^n E_j^2}{n - 2} \right]^{1/2}$$

Donde n: número de patrones, E: error de cada medición

Para cada análisis fueron obtenidos tres datos de áreas y tiempos de retención con los cuales se analizó la precisión (repetibilidad) de la respuesta con base en la desviación estándar relativa expresada como porcentaje (RSD%). La cuantificación se hizo empleando las curvas de calibración obtenidas y usando los factores de respuesta de cada componente de acuerdo con las siguientes relaciones:

$$C_m = \left(\frac{A_m}{f_r} \right) \quad f_r = \left(\frac{A_p}{C_p} \right)$$

Donde C_m : concentración de la muestra; A_m : área del pico de la muestra; f_r : factor de respuesta; A_p : área del pico del patrón; C_p : concentración del patrón.

- Extracción líquido-líquido (L-L) y concentración de productos

A cada vial de ensayo se adicionaron 2 porciones de 3 mL de diclorometano cada una, agitando vigorosamente durante 15 min hasta rompimiento de las células y del medio, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y se extrajo completamente la capa orgánica. Este procedimiento se repitió y se combinaron ambas porciones orgánicas. El extracto obtenido fue secado empleando sulfato de sodio anhidro y luego concentrado con una corriente de nitrógeno gaseoso hasta obtener 1 mL del extracto. De este extracto se tomó 1 μ L para el análisis por GC-FID y/o GC-MS. Se determinó la eficiencia de extracción empleando blancos que contenían 5 mL del medio y cantidades exactas de los sustratos limoneno (1,68 mg) y α -pineno (1,2 mg). La eficiencia de extracción (*EE*) fue definida como:

$$EE \% = (\text{masa analito recuperado} / \text{masa analito adicionado}) * 100$$

- Microextracción en fase sólida (SPME)

Para realizar la extracción se empleó una fibra de 50/30 μ m con recubrimiento de DVB/CarboxenTM/PDMS (*StableFlex*TM), marca Supelco. Para el cálculo del LOD y LOQ se emplearon los parámetros de extracción de monoterpenos recomendados por Demyttenaere et al. (2001): tiempo de absorción, 30 min; temperatura de extracción, 40 °C; temperatura de desorción, 250 °C; y tiempo de desorción, 2 min. Los dispositivos y el montaje empleado se muestran en la Figura 18. Para seleccionar las mejores condiciones de muestreo (extracción) se llenaron viales con 5 mL de medio YMPG y a cada uno se adicionaron 100 μ L de una solución de los monoterpenos al 10% en EtOH (La solución contenía limoneno, α -terpineol, α -pineno, carvona y alcohol perílico). Se realizaron los muestreos empleando diferentes tiempos de extracción (10, 20 y 40 min) y diferentes temperaturas (40, 50 y 60°C) que fueron comparadas con base en las áreas de los componentes extraídos. Para el análisis de los ensayos empleando como sustratos los aceites esenciales (naranja y mandarina), se usaron las condiciones óptimas encontradas. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

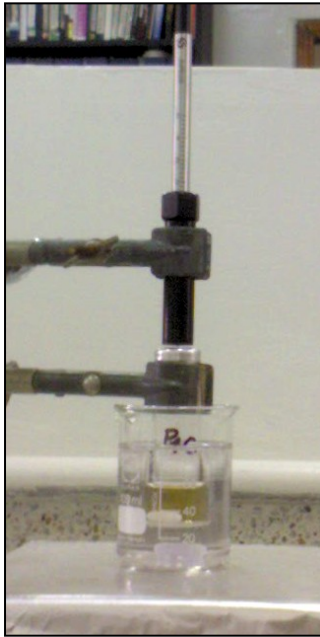


Figura 18. Montaje realizado para la microextracción en fase sólida (SPME) de los analitos

- Extracción de aceites esenciales cítricos

Para la extracción se empleó la técnica de hidrodestilación asistida por microondas. Se tomó aproximadamente 1 kg de cada fruto (naranja, mandarina y limón). Se pelaron los frutos hasta recolectar 400 g de cáscara, se depositaron en un balón de 1 L y se adicionó una cantidad de agua destilada de aproximadamente 1/3 del volumen de la muestra. Se introdujo el balón en el horno microondas modificado y se acopló al montaje de extracción tipo *Clevenger* (Fig. 19). Se procedió al calentamiento por radiación de microondas con potencia del horno de 7 kW, en 3 etapas de 10 minutos cada una y con pausas de 2 min. Una vez finalizada la extracción, se separó la capa acuosa por decantación, se recolectó el aceite esencial en un vial y se secó con sulfato de sodio anhidro. Del aceite se tomó la cantidad necesaria para los ensayos de biotransformación o para su análisis por GC-MS.



Figura 19. Montaje realizado para la extracción de los aceites esenciales de naranja y mandarina empleando hidrodestilación asistida por microondas.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Parte analítica e instrumental

En esta sección se analizan las variables estudiadas para realizar una adecuada determinación cualitativa y cuantitativa de los componentes monoterpénicos obtenidos en los ensayos de biotransformación, empleando las técnicas de GC-FID y GC-MS. La validación de la técnica analítica incluidos los procedimientos de extracción, es fundamental para obtener resultados confiables y reproducibles.

3.1.1 Validación de métodos

- Calibración y determinación de la precisión (repetibilidad)

De acuerdo con la metodología, se obtuvieron datos para generar las curvas de calibración del limoneno, α -pineno y alcohol perílico usando patrones de diferentes concentraciones. La validación se hizo para 3 sistemas analíticos: LL-GC-FID (extracción líquido-líquido, análisis por GC-FID), LL-GC-MS (extracción líquido-líquido, análisis por GC-MS) y SPME-GC-FID (microextracción en fase sólida, análisis por GC-FID). La regresión lineal se realizó con los datos obtenidos de área y concentración, calculando una ecuación de la forma:

$$X = m * C + b$$

Donde, X: área del pico, m: pendiente, C: concentración, b: constante

- Sistema LL-GC-FID

Los tiempos de retención (Tr), las áreas obtenidas y el cálculo de la RSD% para las determinaciones se muestran en las Tablas 5 y 6. Con base en estos valores se realizó el análisis de regresión. Para este sistema se emplearon limoneno y α -pineno. Los resultados del análisis y las ecuaciones que definen la curva de calibración se muestran en las Tablas 7 y 8.

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (ppm)	Tr (min)	Área (pA*min)	RSD%	
				Tr	Área
P1	168	4,697	156,17	0,01	2,09
		4,697	160,51		
		4,698	156,58		
P2	420	4,700	456,45	0,01	2,21
		4,700	459,81		
		4,701	475,71		
P3	840	4,707	990,53	0,00	2,81
		4,707	1023,51		
		4,707	1052,69		
P4	1680	4,717	2207,28	0,02	1,82
		4,715	2127,67		
		4,716	2175,09		

Tabla 5. Evaluación de la precisión para el análisis del limoneno, sistema LL-GC-FID

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (ppm)	Tr (min)	Área (pA*min)	RSD%	
				Tr	Área
P1	172	3,282	96,990	0,00	1,52
		3,282	101,13		
		3,282	99,230		
P2	430	3,284	430,94	0,02	2,22
		3,284	432,72		
		3,285	448,949		
P3	860	3,287	968,79	0,02	3,04
		3,287	999,98		
		3,286	1024,66		
P4	1720	3,291	2075,81	0,02	1,85
		3,290	2001,76		
		3,290	2042,31		

Parámetro	Valor Estimado	Error estándar	T estadística	Valor P
Intercepto (b)	-85,6035	13,578	-6,30458	0,0001
Pendiente (m)	1,33733	0,0140559	95,1437	0,0000
Coefficiente de correlación (R)	0,999448			
R cuadrado	0,998897			
Valor P para la pérdida de ajuste	0,2227			
Error estándar del estimado (RMSE)	27,9465			
Suma de cuadrados del residual	7810,09			
Ecuación del modelo ajustado	$X = -85,635 + 1,33733 * C$			

X: área del componente; C: concentración en ppm

Tabla 7. Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del limoneno, sistema LL-GC-FID

Parámetro	Valor Estimado	Error estándar	T estadística	Valor P
Intercepto (b)	-102,037	12,9601	-7,8732	0,0000
Pendiente (m)	1,25155	0,0131042	95,507	0,0000
Coefficiente de correlación (R)	0,999452			
R cuadrado	0,998905			
Valor P para la pérdida de ajuste	0,1618			
Error estándar del estimado (RMSE)	26,6748			
Suma de cuadrados del residual	7115,44			
Ecuación del modelo ajustado	$X = -102,037 + 1,25155 * C$			

X: área del componente; C: concentración en ppm

Tabla 8. Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del α -pineno, sistema LL-GC-FID

- Sistema LL-GC-MS

Las áreas obtenidas, los valores calculados de RSD% y los resultados del análisis para cada

determinación se muestran en las Tablas 9, 10, 11 y 12. Para este sistema se emplearon limoneno y alcohol perílico. No se analizaron los Tr ya que los valores de RSD% en el sistema anterior fueron cercanos a cero. Además algunos autores consideran que este parámetro (Tr) evalúa la calidad del inyector en lugar de la idoneidad del procedimiento (Epshtein, 2004).

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (ppm)	Área (cuentas*min)	RSD%
P1	959	371872520	4,57
		339403408	
		355410434	
P2	1918	511993676	7,08
		571033809	
		501772442	
P3	4795	856041309	2,83
		820467466	
		866189360	
P4	9590	1282161823	3,87
		1187088843	
		1244814259	

Tabla 9. Evaluación de la precisión para el análisis del alcohol perílico, sistema LL-GC-MS

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (ppm)	Área (cuentas*min)	RSD%
P1	840	147941489	3,31
		139756951	
		148238796	
P2	1680	232464829	7,00
		262046817	
		232828578	
P3	4200	464317293	8,39
		432256103	
		510569732	
P4	8400	804354643	6,14
		721850216	
		804487736	

Tabla 10. Evaluación de la precisión para el análisis del limoneno, sistema LL-GC-MS

Parámetro	Valor Estimado	Error estándar	T estadística	Valor P
Intercepto (b)	1,069E08	1,36E07	7,831	0,000
Pendiente (m)	79171,3	1579,84	50,113	0,000
Coefficiente de correlación (R)	0,99742			
R cuadrado	0,99485			
Valor P para la pérdida de ajuste	0,2565			
Error estándar del estimado (RMSE)	3,569E07			
Suma de cuadrados del residual	1,6566E16			
Ecuación del modelo ajustado	$X = 1,069E08 + 79171,3 * C$			

X: área del componente; C: concentración en ppm

Tabla 11. Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del limoneno, sistema LL-GC-MS

Parámetro	Valor Estimado	Error estándar	T estadística	Valor P
Intercepto (b)	4,0862E08	2,3543E07	17,3566	0,0000
Pendiente (m)	84168,7	2134,75	39,4278	0,0000
Coefficiente de correlación (R)	0,99679			
R cuadrado	0,99360			
Valor P para la pérdida de ajuste	0,0744			
Error estándar del estimado (RMSE)	4,8457E07			
Suma de cuadrados del residual	2,3480E16			
Ecuación del modelo ajustado	$X = 4,0862E08 + 84168,7 * C$			

X: área del componente; C: concentración en ppm

Tabla 12. Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del alcohol perílico, sistema LL-GC-MS

- Sistema SPME-GC-FID

Las áreas obtenidas, el cálculo de la RSD% y el análisis de regresión para cada patrón se muestran en las Tablas 13 y 14. Para este sistema solo se empleó limoneno.

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (ppm)	Área (pA*min)	RSD%
P1	0,84	1488,6779	4,63
		1439,1723	
		1576,4605	
P2	1,68	2661,7641	6,50
		2357,6970	
		2623,7592	
P3	4,21	3929,8725	2,03
		3954,9846	
		4081,1103	
P4	8,41	6137,3828	6,51
		5798,6977	
		6601,1626	

Tabla 13. Evaluación de la precisión para el análisis del limoneno, sistema SPME-GC-FID

Parámetro	Valor Estimado	Error estándar	T estadística	Valor P
Intercepto (b)	1675,45	159,31	10,516	0,000
Pendiente (m)	537,815	28,887	18,617	0,000
Coefficiente de correlación (R)	0,990053			
R cuadrado	0,980204			
Valor P para la pérdida de ajuste	0,6800			
Error estándar del estimado (RMSE)	240,504			
Suma de cuadrados del residual	404895			
Ecuación del modelo ajustado	$X = 1675,45 + 537,815 * C$			

X: área del componente; C: concentración en ppm

Tabla 14. Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del limoneno, sistema SPME-GC-FID

- Resumen del análisis

En la Tabla 15 se comparan los resultados del análisis para cada sistema y luego se discuten los aspectos importantes.

Parámetro	Valor Estimado				
	limoneno (LL-GC-MS)	limoneno (LL-GC-FID)	limoneno (SPME-GC-FID)	α -pineno (LL-GC-FID)	alcohol perfílico (LL-GC-MS)
Pendiente (m)	79171,3	1,33733	537,815	1,25155	84168,7
Coefficiente de correlación (R)	0,99742	0,999448	0,990053	0,999452	0,99679
Error estándar del estimado (RMSE)	3,569E07	27,9465	240,504	26,6748	4,8457E07
Ecuación del modelo ajustado	$X = 1,069E08 + 79171,3 * C$	$X = -85,635 + 1,33733 * C$	$X = 1675,45 + 537,815 * C$	$X = -102,037 + 1,25155 * C$	$X = 4,0862E08 + 84168,7 * C$

X: área del componente; C: concentración en ppm

Tabla 15. Resumen comparativo de los análisis de regresión para los diferentes sistemas empleados

El valor p fue menor que 0,05 en todos los casos, lo que indica la relación estadísticamente significativa entre el área y la concentración a un nivel del 95% de confianza para todos los analitos. El coeficiente de correlación cuadrado (R^2) confirma que los modelos ajustados explican en más del 98% la variabilidad en el área. El coeficiente de correlación (R) en todos los casos es superior a 0,990 lo cual evidencia una fuerte relación lineal entre las variables. Puesto que el valor p para la falta de ajuste es mayor o igual a 0,05, los modelos lineales son adecuados para los datos observados en un intervalo de confianza del 95%.

En el sistema LL-GC-FID los valores RSD para las mediciones de Tr fueron menores del 0,02 %, lo que indica la alta precisión en la inyección de la muestra. Empleando GC-FID los RSD para las mediciones de área fueron inferiores del 3,1 % tanto para el limoneno como para el α -pineno. Con el sistema LL-GC-MS se obtuvieron valores de RSD menores al 8,4 %, mientras que con SPME-GC-FID se obtuvieron valores de RSD máximos del 6,51 %. En todos los casos los valores de RSD no superan el 10 %, y por tanto se considera una precisión adecuada y aceptable para las determinaciones. Con el sistema LL-GC-FID se obtuvo la mejor repetibilidad. En este trabajo se han tomado como referencia los parámetros indicados por Jiménez et al. (2002) y Bliesner (2006), quienes establecen que el nivel de aceptación máximo permitido de RSD es entre 10-15 % para un ensayo de identificación de Categoría II según los métodos USP.

- Cálculo del LOD y LOQ

El LOD y el LOQ fueron calculados con base en el valor *RMSE* obtenido de la regresión lineal (Corley, 2003). El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 16 cuyos valores se expresan en unidades de concentración (ppm). Los menores valores del LOD y LOQ se obtuvieron con el sistema SPME-GC-FID (LOD 1,34 ; LOQ 4,47), mientras que con LL-GC-FID los valores para ambos analitos son hasta 46 veces superiores y con el sistema LL-GC-MS hasta 1000 veces mayores. Para diferentes analitos empleando la misma técnica los valores difieren muy poco, lo cual se explica debido a que los componentes son químicamente similares, por tanto los factores de respuesta son cercanos. Por ejemplo, para el limoneno el *fr* es 1235,3 mientras que para el α -pineno el *fr* es 1251,0.

Es notable como el sistema SPME-GC-FID permite disminuir el LOD y LOQ hasta niveles de concentraciones muy bajas (1-5 ppm), lo cual es deseable en determinaciones de trazas. Debido a que las condiciones cromatográficas no fueron idénticas en todos los casos, estos valores no demuestran rigurosamente cual método es más sensible, pero si permiten obtener límites que no se basan únicamente en el ruido instrumental sino que tienen en cuenta la señal del analito y la técnica empleada. El LOD y LOQ más adecuados para el análisis de los sustratos y productos en los bioensayos son aquellos obtenidos con la técnicas LL-GC-FID y SPME-GC-MS ya que las concentraciones de trabajo son de 3360 ppm para el limoneno y 3440 ppm para el α -pineno en las extracciones L-L, y de 672 ppm para el limoneno en las microextracciones con fibra (SPME) directamente del medio de cultivo (5 mL).

<i>Sistema LL-GC-FID</i>				
ANALITO	RMSE	m	LOD	LOQ
limoneno	27,9465	1,33733	62,69	208,97
α -pineno	26,6748	1,25155	63,94	213,13
<i>Sistema LL-GC-MS</i>				
ANALITO	RMSE	m	LOD	LOQ
limoneno	3,569E07	79171,3	1352,38	4507,95
alcohol perílico	4,8457E07	84168,7	1727,14	5757,13
<i>Sistema SPME-GC-MS</i>				
ANALITO	RMSE	m	LOD	LOQ
limoneno	240,504	537,815	1,34	4,47

Tabla 16. Valores de LOD y LOQ calculados para los diferentes analitos (en ppm) en cada sistema evaluado

▪ Eficiencia de extracción líquido-líquido (L-L)

La recuperación fue del 69,0 % (0,47 RSD%) para el limoneno y del 88,8 % (3,74 RSD%) para el α -pineno. El α -pineno fue extraído considerablemente mejor que el limoneno bajo las condiciones empleadas, posiblemente debido a que tiene una menor solubilidad en agua (18,3 μ M) en comparación con el limoneno (41,0 μ M), lo cual favorece su difusión en la fase orgánica (Li et al., 1998). Sin embargo, los porcentajes de recuperación y la precisión se consideran aceptables para ambos analitos.

3.1.2 Análisis de los aceites esenciales

Los aceites esenciales de la cáscara de naranja, limón y mandarina una vez extraídos fueron analizados por GC-MS de acuerdo al procedimiento descrito (Numeral 2.2.2). La composición relativa para cada aceite se indica en la Tabla 17, donde solo se han identificado y considerado los componentes mayoritarios de nuestro interés. Los perfiles cromatográficos (TIC) junto con la identidad de cada pico se muestran en las Figuras 20 y 21.

Componente	Naranja (%)	Mandarina (%)	Limón (%)
<i>α-Pineno</i>	1,5	0,9	3,6
β-Pineno	---	0,4	13,8
Sabineno	1,1	0,2	3,3
β-Mirceno	5,0	2,6	2,1
<i>Limoneno</i>	90,4	72,9	42,3
γ-Terpineno	---	4,6	12,9
Linalol	9,7	8,2	0,4

-- -Concentración menor al 1%. Solo se han indicado los componentes mayoritarios de interés.

Tabla 17. Composición relativa de los aceites esenciales de naranja y mandarina (en porcentaje)

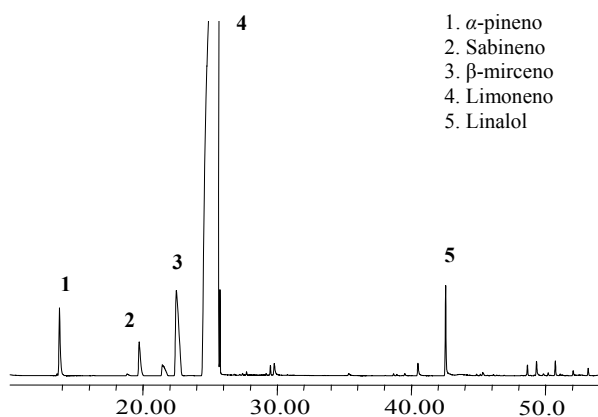


Figura 20. Perfil cromatográfico (TIC) obtenido por GC-MS, del aceite esencial de cáscara de naranja. Columna HP-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Relación de *split* 1:30

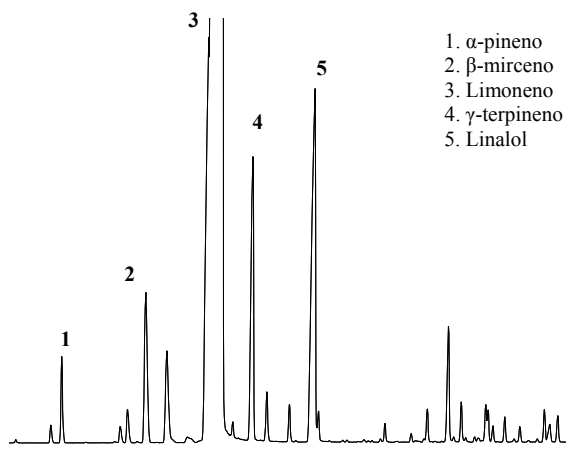


Figura 21. Perfil cromatográfico (TIC) obtenido por GC-MS, del aceite esencial de cáscara de mandarina. Columna HP-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Relación de *split* 1:30

El limoneno es el compuesto predominante en todos los frutos: su contenido es superior al 90% en la naranja, al 70% en la mandarina y al 40% en el limón. Otros componentes mayoritarios de interés son el α -pineno, β -pineno y γ -terpineno, los cuales también son susceptibles de oxidación. Diferentes autores han analizado con detalle los aceites esenciales de frutos cítricos como naranja (Ferhat et al., 2006), mandarina (Lota et al., 2001) y limón (Benvenuti et al., 2001), y han reportado composiciones similares a las encontradas en este trabajo, con respecto a los componentes predominantes. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que dicha composición es variable y depende fuertemente del método de extracción empleado, de la especie y madurez del fruto. De acuerdo con el análisis, estos aceites se consideran excelentes sustratos para realizar la biooxidación, especialmente los de naranja y mandarina por su alto contenido de limoneno.

3.1.3 Optimización de la extracción HS-SPME de monoterpenos

Para las determinaciones HS-SPME se empleó una fibra con recubrimiento de DVB/Carboxen/PDMS (50/30 μm) que es recomendada para el análisis de compuestos oxigenados y aromatizantes volátiles y semivolátiles. Su recubrimiento polar es de tipo poroso/polimérico, entrecruzado y con alta estabilidad (Camara et al., 2007). Esta clase de fibra ha demostrado el mejor desempeño para la extracción de componentes en vinos bajo condiciones optimizadas (Setkova et al., 2007) y para la extracción de compuestos como β -pineno, cariofileno y γ -cadineno en el análisis GC-FID del aceite esencial de Yacón (*Smallanthus sonchifolius*) (Adam et al., 2005). Esta fibra también ha mostrado eficiencia en el análisis del aceite esencial de especies de *Evodia*, debido a su alta capacidad de extracción para monoterpenos y su fuerte afinidad por el limoneno (Pellati et al., 2005). Aplicada en procesos de biotransformación Demyttenaere et al. (2001) han empleado esta fibra con la cual fue posible lograr el mejor desempeño en la extracción de metabolitos del limoneno.

Antes de realizar la extracción, fue necesario desarrollar un procedimiento para la selección de las variables (tiempo y temperatura) que permiten obtener la mayor eficiencia. Las otras variables como la fibra empleada, el tiempo y temperatura de desorción se fijaron de acuerdo con el trabajo de Demyttenaere et al. (2001) y fueron descritas en la metodología.

- Efecto de la temperatura

Se evaluó el efecto de la temperatura en la eficiencia de la extracción HS-SPME. Las temperaturas de análisis fueron 40, 50 y 60 °C, empleando la fibra DVB-CAR-PDMS. En estas determinaciones se mantuvo fijo el tiempo en 20 min. La dependencia de las áreas de los picos GC-FID con respecto a la temperatura para los 5 monoterpenos estudiados se muestra en la Figura 22. Se observó que la extracción de α -pineno y limoneno disminuyó paulatinamente al aumentar la temperatura, mientras que la extracción de α -terpineol, carvona y alcohol perílico fue mejor al incrementar la temperatura, hasta un máximo de 60 °C. Debido al interés en los compuestos oxigenados, para estudios subsecuentes se seleccionó una temperatura de extracción de 60 °C.

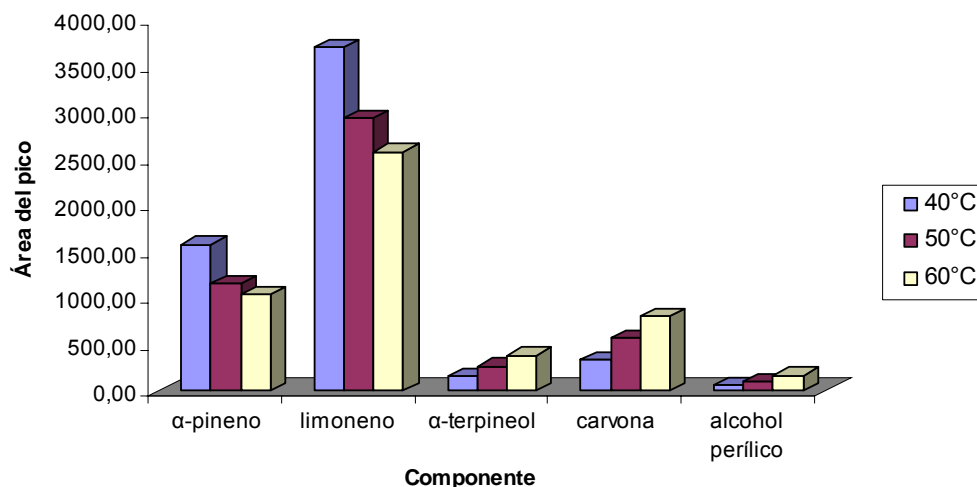


Figura 22. Efecto de la temperatura (° C) sobre la eficiencia de la extracción por HS-SPME (DVB/Carboxen/PDMS, 50/30 μ m) de la mezcla de monoterpenos , durante 20 min de exposición del recubrimiento

▪ Efecto del tiempo

Se evaluó el efecto del tiempo en la eficiencia de la extracción HS-SPME. Los tiempos de análisis fueron de 10, 20 y 40 min, empleando la fibra DVB-CAR-PDMS. En estas determinaciones se mantuvo fija la temperatura de extracción en 30 °C. La dependencia de las áreas de los picos GC-FID con respecto al tiempo para los 5 monoterpenos se muestra en la Figura 23. Se observó que la extracción de todos los compuestos fue mejor a medida se incrementó el tiempo de extracción, especialmente para el α -pineno y limoneno, presentando la mayor afinidad el limoneno. Para el α -terpineol, carvona y alcohol perílico, el efecto del tiempo no es muy marcado y la extracción, aunque levemente mayor, es muy similar para todos los tiempos de extracción. Debido a que en este tipo de determinaciones son deseables tiempos cortos de análisis y a la alta eficiencia, se seleccionó un tiempo de extracción de 20 min.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado con valores de RSD entre 0,8 y 11,2 %. En todos los casos de variación de temperatura y tiempo, la extracción de limoneno y α -pineno es mucho más eficiente en comparación con los monoterpenos oxigenados, por lo tanto se deduce que esta fibra presenta gran afinidad por los monoterpenos volátiles no oxigenados.

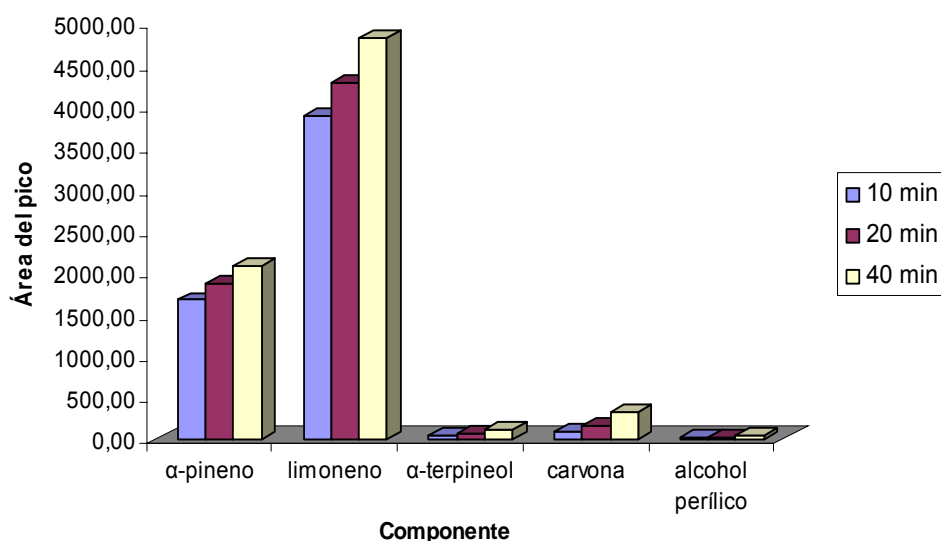


Figura 23. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de la extracción por HS-SPME (DVB/Carboxen/PDMS, 50/30 μ m) de la mezcla de monoterpenos, a 30°C

3.2 Ensayos biológicos

3.2.1 Crecimiento del hongo y variación del pH

Aspergillus niger DSM 821 presentó mayor biomasa y mejor esporulación en MEA, razón por la cual este medio fue seleccionado para el crecimiento y conservación. El hongo presenta máximo crecimiento hasta el segundo día (inicio de la idiofase), por lo tanto, este momento sería propicio para la adición del sustrato. Con respecto al pH, se aprecia una fuerte disminución en la fase de crecimiento exponencial, que posteriormente aumenta hasta el octavo día donde alcanza su valor original (Fig. 24). El pH es una variable que afecta el desarrollo de los procesos de fermentación y biotransformación tanto en cultivos sólidos como sumergidos. Las especies de *Aspergillus* pueden producir ácidos orgánicos, ya sea por oxidación de azúcares o debido al ciclo del ácido tricarbóxico (Chang et al., 2004). Normalmente el pH disminuye debido a la secreción de ácidos orgánicos como el acético, propanoico, glucónico y láctico, sin embargo la fuente de nitrógeno también afecta la tendencia del pH, sobre todo en medios complejos (Moresi y Parente, 2004).

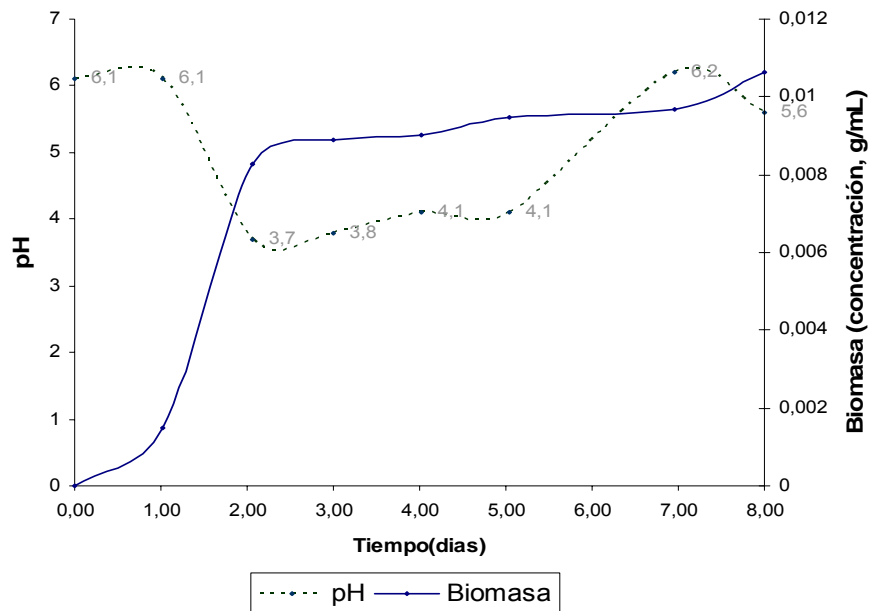


Figura 24. Curva de crecimiento y de variación del pH para el *A. niger* DSM 821 en medio YMPG (5 mL)

Adams et al. (2003) y Demyttenaere et al. (2001) han reportado la disminución del pH en la biotransformación de limoneno con *Penicillium digitatum* y mencionan la posibilidad de oxidación catalizada por ácidos. Por esta razón, dichos autores realizaron ensayos blancos ajustando el medio a pH de 3,5 con ácido acético. Luego de varios días de reacción no se detectaron productos oxidados, concluyendo así la ausencia de catálisis ácida y la alta estabilidad del limoneno bajo estas condiciones.

Los metabolitos secundarios se asocian comúnmente con los procesos de esporulación de microorganismos. En los hongos, los metabolitos secundarios usualmente se producen en la idiofase, etapa inmediatamente posterior a la fase de crecimiento activo llamada trofofase. Los metabolitos secundarios no tienen relación directa con la síntesis de material celular y con el crecimiento normal de los microorganismos, por esta razón, en la gran mayoría de biotransformaciones se adiciona el sustrato en esta fase de crecimiento (Demain, 1986; Nigam y Singh, 2004).

En la oxidación de limoneno a α -terpineol por *P. digitatum*, Tan et al. (1998) concluyeron que la bioconversión únicamente ocurre durante etapas temprana o media del crecimiento logarítmico, sin importar la edad del inoculo empleado. Este patrón sin embargo, es diferente al reportado por Cadwallader et al. (1989) para la conversión de limoneno con *Pseudomonas gladioli*, donde la bioconversión es favorable en etapas tardías de la fase exponencial y en inicios de la fase estacionaria (idiofase). Tan et al. (1998) también observaron una fuerte correlación entre el crecimiento del hongo y la producción de α -terpineol; el medio que presenta un mayor crecimiento en biomasa es aquel que permite obtener el mayor porcentaje de conversión. Con base en estos argumentos y en la curva de crecimiento obtenida en este trabajo, se determinó que la adición de los sustratos debe hacerse en el tercer día de edad del hongo.

3.2.2 Evaluación del medio de cultivo y de la edad del hongo: identificación de productos de interés

Empleando los medios YMPG, PDA y SS, se evaluó la adición del sustrato a diferentes edades del hongo (1, 2, 4 y 8 días), manteniendo constante el tiempo de contacto (reacción de 8 días). En la Figura 25 se muestran las diferencias de los productos obtenidos con respecto a la edad del hongo y en la Tabla 18 se identifican los productos principales con respecto al medio y los porcentajes máximos obtenidos para cada sustrato. En general, la producción de metabolitos es mayor a medida que la biomasa se incrementa, llegando a un máximo al cuarto día de edad, luego del cual permanece constante. La producción de todos los compuestos oxigenados se inicia a partir del segundo día y progresivamente aumenta hasta el octavo día. Se observa que al emplear α -pineno y limoneno como sustratos los metabolitos son similares en ambos casos. El porcentaje total de productos es mayor cuando se emplea PDA, sin embargo la selectividad es mejor en el medio YMPG. Todos los productos identificados poseen importantes aplicaciones y son de gran interés en las biotransformaciones por ser compuestos sencillos pero con notable actividad biológica. A continuación se discuten los aspectos más interesantes de cada transformación de acuerdo con el medio empleado y se resaltan las aplicaciones de los productos.

Medio	Productos formados con respecto a cada sustrato (% máximo)	
	<i>α-pineno</i>	<i>limoneno</i>
YMPG	2-feniletanol (11,6)	2-feniletanol (17,7)
PDA	Fenchol (8,2) Borneol (6,0) α -terpineol (18,3) <i>p</i> -mentano-3,8-diol (46,5)	α -terpineol (11,7) <i>p</i> -mentano-3,8-diol (21,9)
SS	Ninguno detectado	Ninguno detectado

Tabla 18. Compuestos obtenidos por la oxidación de limoneno y α -pineno de acuerdo al medio empleado (porcentaje máximo, %). Parámetros fijos: 6 días de reacción, extracción L-L

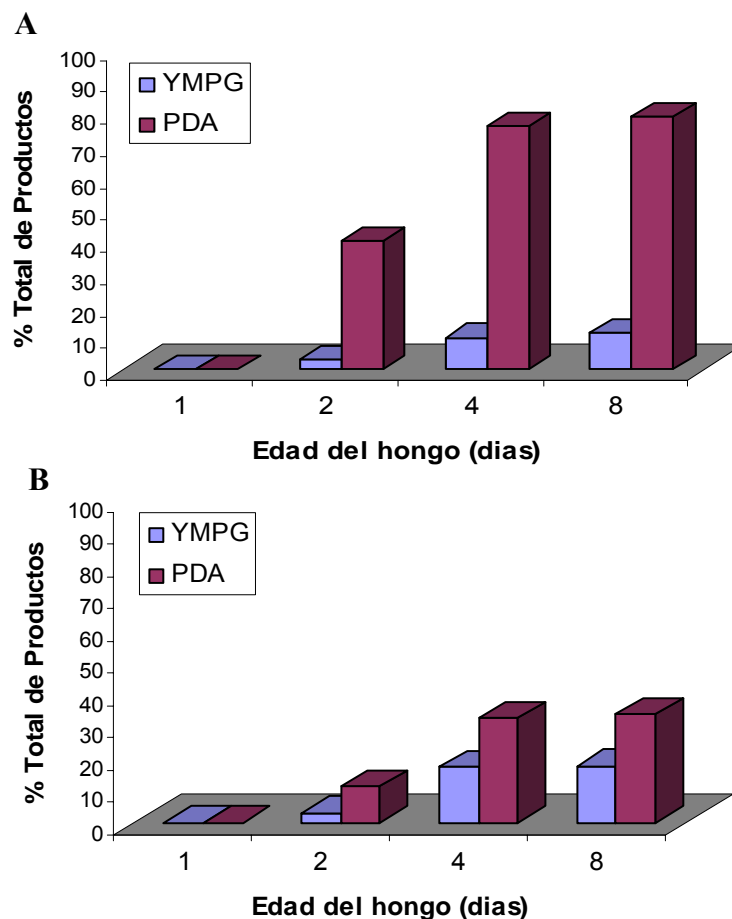


Figura 25. Evaluación de los productos obtenidos en la biotransformación de acuerdo con el medio de cultivo y la edad del hongo *A. niger* DSM 821, para los sustratos A. α -pineno, B. Limoneno (6 días de reacción, extracción L-L)

- Medio YMPG

En la transformación de ambos sustratos (limoneno y α -pineno) solo se detectó el 2-feniletanol como producto (Fig. 26 y 27). El espectro de masas del 2-feniletanol (Fig. 28) se caracteriza por los iones diagnóstico m/z (int. rel.): 122 $[M]^+$ (31), 91 $[M-CH_2OH]^+$ (100) y 65 $[M-C_2H_4OH]^+$ (14). Este es un preciado compuesto empleado en perfumería ya que posee olor agradable con notas fuertes de rosa y jazmín. Hace parte de los componentes mayoritarios del aceite esencial de rosa (*Rosa damascena*), clasificado como uno de los aceites más costosos del mundo, razón por la cual, es sintetizado preferiblemente por rutas petroquímicas a partir de tolueno, benceno y estireno (Etschmann et al., 2002; Longo y Sanromán, 2006).

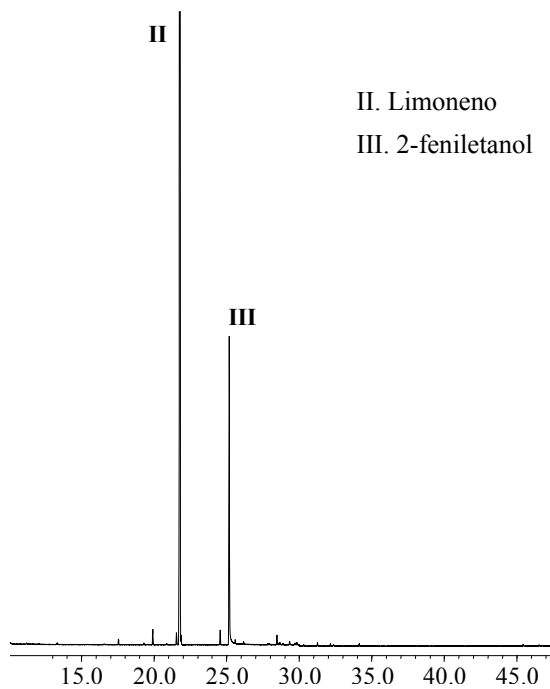


Figura 26. Perfil cromatográfico (TIC) de los productos obtenidos en la bioconversión de limoneno empleando medio YMPG (6 días de reacción, extracción L-L). GC-MS: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Inyección 1 μ L (*split* 30:1)

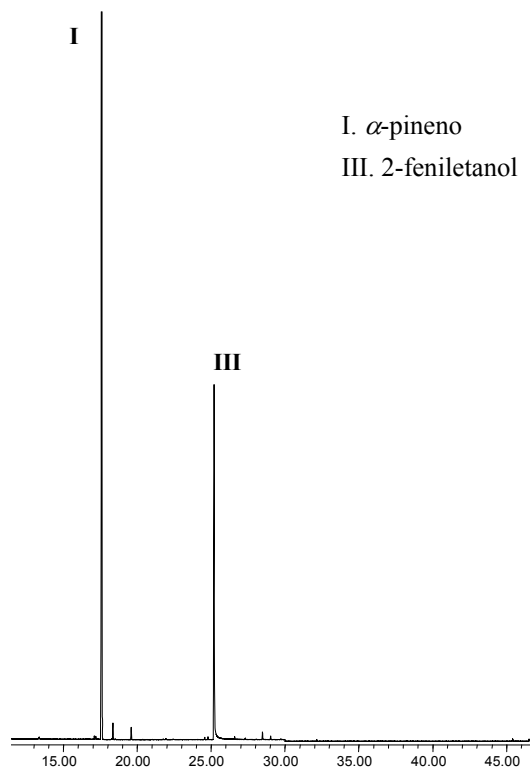


Figura 27. Perfil cromatográfico (TIC) de los productos obtenidos en la bioconversión de α -pineno empleando medio YMPG (6 días de reacción, extracción L-L). GC-MS: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Inyección 1 μ L (*split* 30:1)

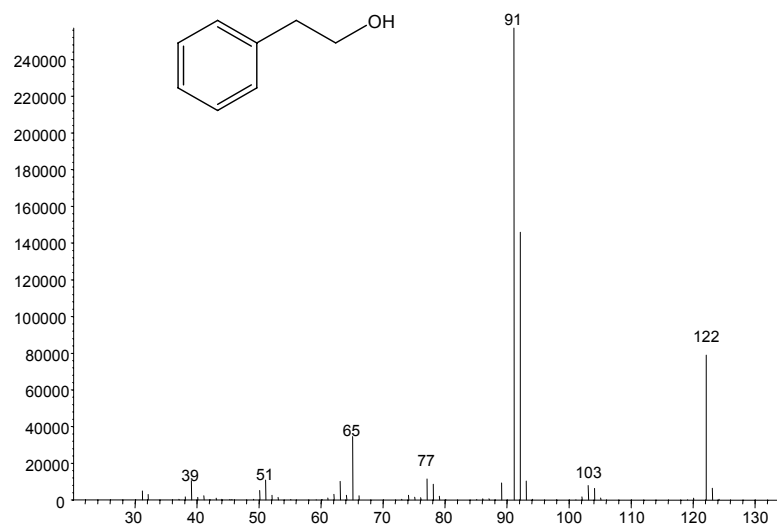


Figura 28. Espectro de masas obtenido por GC-MS (EIMS, 70 eV) del 2-feniletanol, compuesto obtenido en la biotransformación de los monoterpenos en medio YMPG

El 2-feniletanol no se ha considerado (hasta ahora) como un posible derivado del limoneno o α -pineno, por lo tanto es probable que se origine por la transformación/degradación de algún componente en el medio de cultivo. Sin embargo, Adams et al. (2003) en la biotransformación de (S)-(-)-limoneno con *Penicillium digitatum*, reportan al 2-feniletanol como el metabolito mayoritario recuperado de la bioconversión (1,5 %), por encima del α -terpineol (0,35 %) y del carveol (1,1 %), aunque no presentan ninguna explicación, comentario o discusión acerca de su origen.

En diferentes casos de biotransformaciones (no relacionadas con limoneno ni α -pineno), las cepas de levaduras *Hansenula anomala*, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* han demostrado gran potencial para la producción industrial de 2-feniletanol a partir de la bioconversión de L-fenilalanina (Longo y Sanromán, 2006; Etschmann et al., 2002). La levadura más promisorio hasta ahora es *Kluyveromyces marxianus* (Garavaglia et al., 2007), aunque también son eficientes las cepas de *A. niger* (Lomascolo et al., 2001) y *Pichia fermentans* (Huang et al., 2000, 2001) con las cuales se han obtenido resultados satisfactorios. La producción de 2-feniletanol se encuentra patentada por la compañía

HUABAO INTERNATIONAL HOLDINGS (Tu et al., 2003) tal y como se describió en el marco teórico.

En el presente estudio es posible que ocurra su producción a partir de L-fenilalanina, aminoácido presente en la peptona del medio YMPG. En los hongos hay dos posibles rutas para la degradación de L-fenilalanina hasta 2-feniletanol: 1) por descarboxilación hasta feniletilamina, seguida por desaminación oxidativa hasta fenilacetaldehído y posterior reducción al alcohol (Fig. 29, A) y 2) la ruta de Ehrlich, por transaminación a fenilpiruvato, posterior descarboxilación a fenilacetaldehído y reducción final a 2-feniletanol (Fig.29, B) (Etschmann et al., 2002).

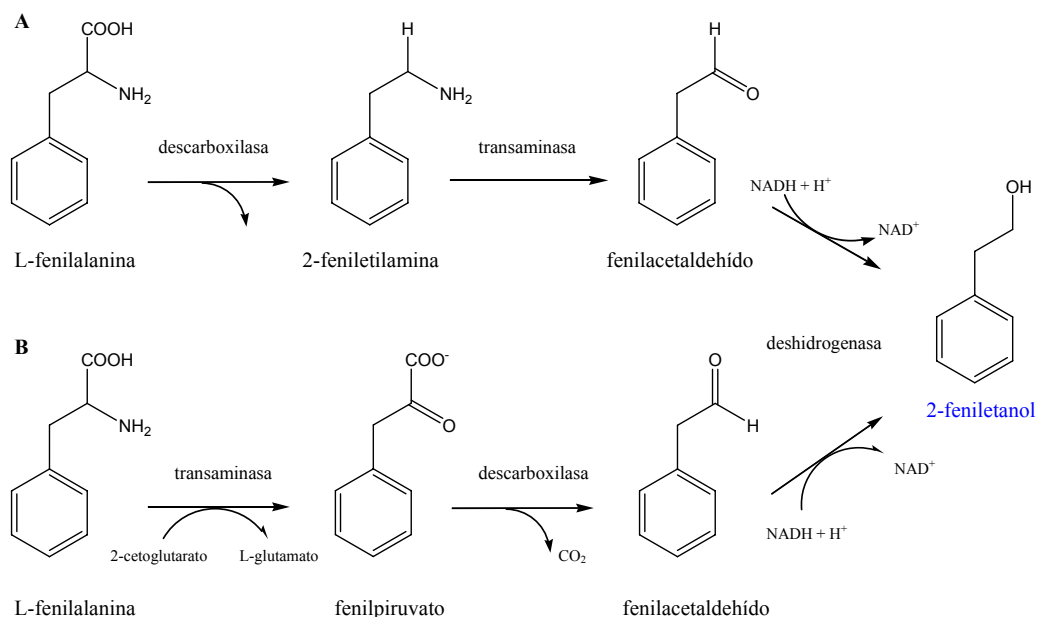


Figura 29. Esquema de las rutas químicas posibles para la degradación de L-fenilalanina hasta 2-feniletanol

Sin embargo, la producción de 2-feniletanol no ocurre en todos los ensayos con este medio (YMPG), por tanto es posible que sea dependiente de otros factores como la presencia de reactivos (inducción), la concentración de oxígeno y el estado de crecimiento del hongo. El 2-feniletanol solo se obtuvo en aquellas reacciones donde se emplean YMPG, y ya que no aparece en los blancos, la inducción enzimática podría estar relacionada con los

monoterpenos. Los medios YMPG y MYB (extracto de malta-glucosa-peptona-extracto de levadura) con contenidos de peptona bacteriológica entre 0,5 y 1%, se han empleado frecuentemente en las biotransformaciones. Por ejemplo, el YMPG se considera el medio preferido en la biotransformación de citronelol por *A. niger* y *Penicillium* sp. (Demyttenaere et al., 2001, 2004), de limoneno por *P. digitatum* (Adams et al., 2003) y de geraniol, nerol y citral por *A. niger* y *P. digitatum* (Demyttenaere et al., 2000).

- Medio PDA

Con este medio se logró la producción de metabolitos como: α -terpineol, borneol, fenchol y *p*-mentano-3,8-diol, los cuales se consideran derivados oxigenados del limoneno o del α -pineno (Fig. 30 y 31). La producción de tales compuestos se inicia a partir del segundo día y progresivamente aumenta hasta el cuarto día, luego del cual permanece casi constante. El borneol y fenchol solo se producen por oxidación del α -pineno (no del limoneno), mientras que el *p*-mentano-3,8-diol y el α -terpineol están presentes en la oxidación de ambos sustratos (limoneno y α -pineno).

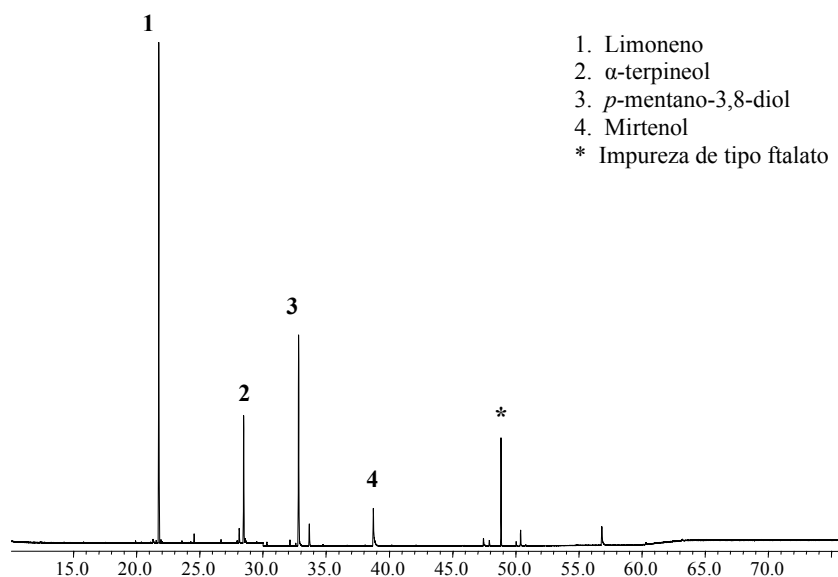


Figura 30. Perfil cromatográfico (TIC) de los productos obtenidos en la bioconversión de limoneno empleando medio PDA (6 días de reacción, extracción L-L). GC-MS: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Inyección 1 μ L (*split* 30:1)

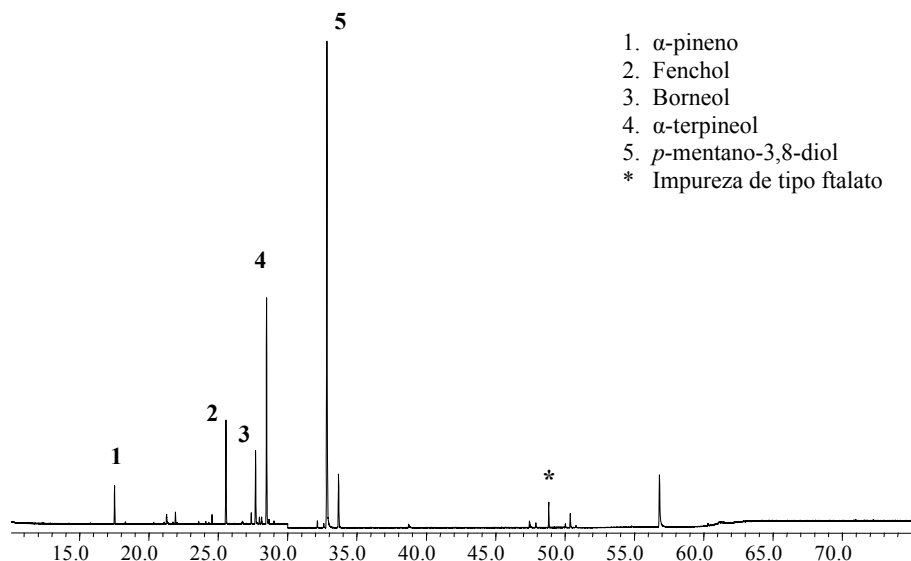


Figura 31. Perfil cromatográfico (TIC) de los productos obtenidos en la bioconversión de α -pineno empleando medio PDA (6 días de reacción, extracción L-L). GC-MS: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Inyección 1 μ L (*split* 30:1)

El α -terpineol se formó únicamente en las bioconversiones en medio sólido PDA, más no en YMPG ni en la solución de esporas (SS). Este compuesto se ha reportado en otros trabajos como producto de la oxidación del limoneno empleando diferentes géneros de hongos como *Aspergillus* (Demyttenaere et al., 2001), *Penicillium* (Adams et al., 2003) y *Fusarium* (Marostica y Pastore, 2007). También se ha obtenido a partir de α -pineno empleado bacterias del genero *Pseudomonas* (Yoo et al., 2001). El α -terpineol es el alcohol terpénico más importante en el mercado y sus aplicaciones ya se han descrito en el marco teórico.

El fenchol y borneol (Fig. 32) únicamente se obtuvieron por oxidación del α -pineno (no del limoneno). Estos alcoholes terpénicos bicíclicos son apreciados en perfumería debido a sus características fragantes. Su presencia se explica por la formación del catión (o radical) α -terpinilo (Fig 33, A), el cual por adición intramolecular al doble enlace forma el catión pinilo (Fig. 33, B) y a su vez una transposición tipo Wagner-Meerwein genera el catión fenchilo o bornilo (Fig. 33, C y D) (El Tamer, 2001; Yoo y Day., 2002). La formación de fenchol y el borneol se han reportado en muy pocas ocasiones (en trazas), por ejemplo en la bioconversión de α -y β - pineno por *Pseudomonas* sp. (Yoo et al., 2001; Yoo y Day., 2002)

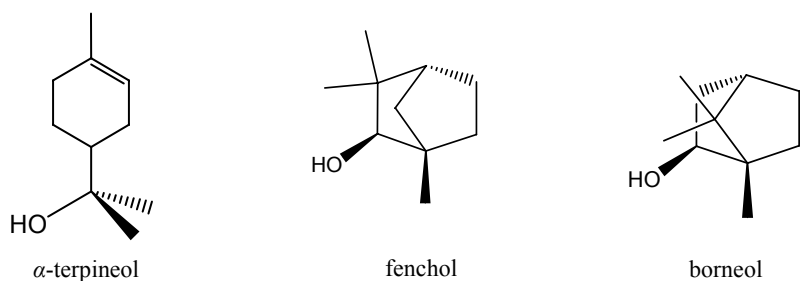


Figura 32. Estructura química del α -terpineol, borneol y fenchol

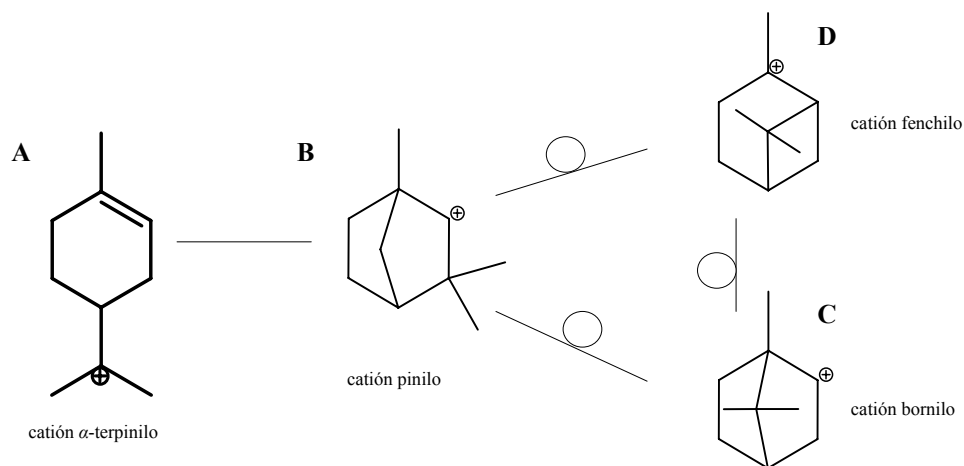


Figura 33. Estructura del catión α -terpinilo y sus posibles conversiones/transposiciones

El *p*-mentano-3,8-diol se obtuvo a partir de ambos sustratos, limoneno y α -pineno, y es el compuesto mayoritario al emplear PDA (46,5 %). Este tipo de compuestos dihidroxilados se forman por sobreoxidación del sustrato y aunque no es frecuente su formación algunos revisten importancia. El *p*-mentano-3,8-diol es el componente principal del aceite natural conocido en china con el nombre de *Quwenling*, obtenido de la especie *Eucalyptus maculata* y con actividad repelente similar al *Deet* (N,N-dietil-m-toluamida) contra especies como *Anopheles gambiae* y *Anopheles funestus*, que son los principales vectores de la malaria en África (Nentwig, 2003). Gracias a la presencia de este compuesto, las hojas de *Eucalyptus* sp. sirven para evitar los mosquitos en espacios exteriores e interiores y son usadas tradicionalmente en países como Guinea-Bissau (Palsson y Jaenson, 1999). Este

compuesto repelente puede ser aplicado de forma segura en la piel humana y ropas, inclusive en niños (US EPA, 2000).

El espectro de masas del *p*-mentano-3,8-diol (Fig. 35) se caracteriza por la ausencia del ión molecular y por la presencia de los fragmentos diagnóstico m/z : 154 $[M-H_2O]^+$, 139 $[M-H_2O-Me]^+$, 81 $[M-OH-hidroxiisopropil-Me]^+$ (100). El espectro de masas del *p*-mentano-1,8-diol, es casi idéntico al espectro del *p*-mentano-3,8-diol, razón por la cual no fue posible definir con exactitud cual de los dos isómeros fue producido. Sin embargo, los dos componentes (Fig. 34) posibles pueden considerarse estructuralmente como derivados hidroxilados del α -terpineol.

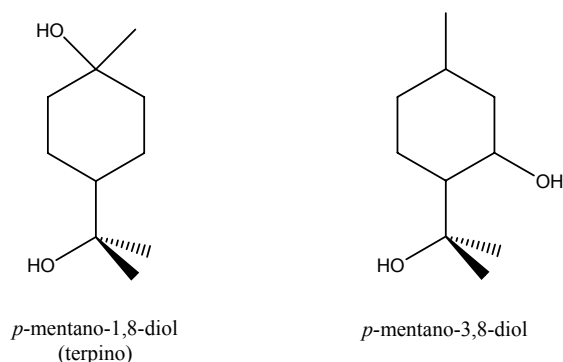


Figura 34. Estructuras químicas de los dos posibles isómeros (*p*-mentanodiolos) obtenidos del limoneno y α -pineno

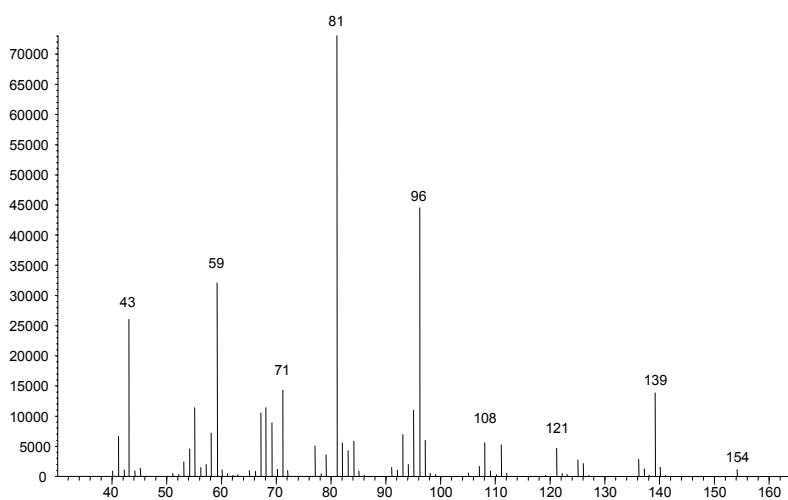


Figura 35. Espectro de masas obtenido por GC-MS (EIMS, 70 eV) del *p*-mentano-3,8-diol, compuesto predominante obtenido en la biotransformación de los monoterpenos en medio PDA

Por su parte, el otro isómero probable, el *p*-mentano-1,8-diol (conocido como terpino), presenta propiedades farmacológicas como expectorante y ha sido empleado en jarabes para la tos junto con codeína y dextrometorfano (Kurlansik et al., 1967; World Health Organization, 2001). La preparación de suspensiones de hidrato de terpino para ser usadas como expectorantes fueron patentadas hace varias décadas por UPJOHN (Jensen, 1962), aunque actualmente se ha descontinuado su uso. Sin embargo, existen patentes recientes (Radbil et al., 2000) para la preparación de hidrato de terpino a partir de α -pineno o trementina empleando ácido clorhídrico como catalizador. El terpino se ha logrado producir (biocatalíticamente) en trazas únicamente a partir de α -terpineol empleando las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* y *Kluyveromyces lactis* (King y Dickinson, 2000). Dentro de la revisión de la literatura hecha, no se encontró ningún reporte anterior de la bioproducción directa de *p*-mentano-1,8-diol o *p*-mentano-3,8-diol a partir del limoneno o α -pineno.

- Medio SS (suspensión de esporas)

En ninguno de los ensayos realizados las soluciones de esporas permitieron la biotransformación del limoneno o α -pineno, aun cuando las esporas de *A. niger* y *Penicillium sp.* se han empleado con éxito en otros trabajos de biotransformación de linalool (Demyttenaere y Willemen, 1998), de geraniol, nerol y citral (Demyttenaere et al., 2000) y de limoneno (Demyttenaere et al., 2001)

3.2.3 Evaluación de la evaporación de sustratos y del tipo de sello

Se realizaron ensayos con dos diferentes tipos de cierre para los reactores: tapones de algodón y sellos de teflón/silicona (para HS-SPME). Los tapones de algodón, permeables al oxígeno, permiten un abastecimiento constante de oxígeno, sin embargo, con su empleo se observa la rápida evaporación de los sustratos volátiles (limoneno y α -pineno) hasta niveles no detectables en el medio. Cuando se emplea un sello hermético es posible la recuperación de los sustratos, sin embargo, ocurren pérdidas hasta del 50 %, debido a la volatilización de los sustratos en las etapas de extracción y concentración. La recuperación

es ligeramente mejor cuando se utiliza medio sólido (PDA) que medio líquido (YMPG) (Ver Tabla 19). De acuerdo con esto, es preferible el uso de sellos herméticos que eviten la evaporación de sustratos, aun cuando la cantidad de oxígeno sea restringida. La ausencia de componentes oxigenados en los blancos indica que los medios y los sustratos no se degradan por otras vías catalíticas no biológicas.

<i>Experimento</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Medio</i>	<i>Tipo de cubierta</i> ³	<i>Concentración de la muestra (Cm)</i> ¹ <i>μL/mL</i>	<i>Concentración máxima esperada(Cmax)</i> <i>μL/mL</i>	<i>Recuperación (%)</i> ²
E1	α-pineno	YMPG	TC	0	4	0
E2	limoneno	YMPG	TC	0	4	0
E3	α-pineno	PDA	TC	0	4	0
E4	limoneno	PDA	TC	0	4	0
E5	α-pineno	YMPG	SH	1,37	4	34,3
E5	limoneno	YMPG	SH	1,63	4	40,8
E7	α-pineno	PDA	SH	1,85	4	46,3
E8	limoneno	PDA	SH	1,99	4	49,9
B1	---	PDA	SH	0	4	0
B2	---	YMPG	SH	0	4	0

1. Una concentración de cero indica que no fue detectable; 2..La recuperación como porcentaje está dada por $R = (Cm/Cmax)*100$; 3. TC: tapón de celulosa; SH: sello hermético PTFE/silicona

Tabla 19. Evaluación de la evaporación del limoneno y α-pineno de acuerdo al tipo de cierre empleado en los biorreactores a microescala (parámetros fijos: 6 días de contacto, extracción L-L)

3.2.4 Ensayos en medios seleccionados a condiciones fijas: extracción L-L y evaluación de productos

Una vez identificados algunos productos formados a partir del limoneno y α-pineno, se evaluaron nuevamente los medios YMPG, PDA y adicionalmente PDB, bajo condiciones fijas: adición de sustrato al tercer día de crecimiento y uso de sellos herméticos (teflón/silicona) en los biorreactores. Estos parámetros se definieron con base en los resultados anteriormente encontrados. En todos los casos se evidencian diferencias significativas en la oxidación relacionadas con el medio empleado. En la Tabla 20 se indican los metabolitos obtenidos para cada sustrato bajo condiciones fijas. Según estos resultados el tipo de medio y el estado (líquido o sólido) afectan significativamente la selectividad de la reacción y los productos obtenidos.

MEDIO	YMPG		PDA		PDB	
SUSTRATO	<i>α-pineno</i>	limoneno	<i>α-pineno</i>	limoneno	<i>α-pineno</i>	limoneno
Componente						
α -pineno	100	6,2	34,6	6,6	44,9	3,9
limoneno	--	73,5	--	46,3	--	74,3
fenchol	--	--	3,2	--	--	--
<i>α-terpineol</i>	--	--	28,0	19,7	55,1	--
borneol	--	--	2,5	--	--	--
desconocido 1	--	--	--	--	--	3,7
<i>alcohol perílico</i>	--	14,7	--	4,9	--	14,6
<i>p-mentano-1,8-diol (3,8)</i>	--	--	20,0	12,2	--	--
desconocido 2	--	5,6	--	--	--	3,5
mirtenol	--	--	11,7	10,2	--	--

--No detectable

Tabla 20. Compuestos obtenidos por la biotransformación de limoneno y α -pineno en medios seleccionados (% del producto). Condiciones fijas: *A. niger* DSM 821 (3 días de edad), 6 días de reacción, sello de PTFE/Silicona, extracción L-L

Con YMPG, en la transformación de α -pineno no se detectó ningún componente de oxidación. Sin embargo, este medio permite la oxidación del limoneno hasta alcohol perílico (14,7%), es decir que favorece la producción con selectividad hacia el alcohol (Fig. 35). En este caso tampoco se detectó el 2-feniletanol, formado en los ensayos iniciales de prueba.

Con PDA, en la transformación de α -pineno se logró la producción de *p*-mentano-1,8-diol (20,5 %) y α -terpineol (28,0 %) como productos principales; fenchol (3,2 %) y borneol (2,5 %) como productos menores. El α -terpineol se obtiene tanto en la oxidación del limoneno como del α -pineno y se encuentra en porcentaje máximo cuando se emplea α -pineno. Cuando se emplea el limoneno como sustrato se genera α -terpineol (19,7 %), *p*-mentano-1,8-diol (12,2%), y alcohol perílico (4,9%), por tanto la selectividad hacia la producción de alcohol perílico en PDA es menor en comparación con YMPG, pero se favorece la producción de α -terpineol. El α -terpineol y *p*-mentano-1,8-diol son componentes importantes que se obtuvieron en los ensayos de prueba y que ya se han discutido. En este ensayo se formaron los mismos metabolitos que se obtuvieron en pruebas preliminares pero diferentes rendimientos, excepto el 2-feniletanol (que no se formó) y el *p*-mentano-3,8-diol, que se formó en menor cantidad relativa. Sin embargo, fue posible la obtención del alcohol perílico, no producido en los ensayos iniciales (Ver Tabla 18).

Con PDB, por oxidación del α -pineno se obtiene α -terpineol (55,1%) como único producto. Sin embargo, el limoneno se oxida a alcohol perílico (14,6 %) como producto mayoritario, pero sin producción de α -terpineol. A pesar de ser medios líquidos, YMPG y PDB, su composición es muy diferente y esto genera un cambio determinante en la producción de metabolitos favoreciendo la selectividad hacia el alcohol perílico y el α -terpineol. El medio PDB es un medio de constitución muy similar al PDA, cuya única diferencia es el estado de gel/sólido, que según se observa, también tiene un fuerte efecto en la selectividad y concentración de productos obtenidos. El limoneno y α -pineno aunque similares químicamente, son oxidados de diferente manera por el hongo.

En estos ensayos fue posible la producción de alcohol perílico (Fig. 36) con alta selectividad tanto en medio YMPG como PDB, ambos líquidos pero de diferente composición. El espectro de

masas del alcohol perílico (Fig. 37) se caracteriza por la presencia de los fragmentos diagnóstico m/z : 152 $[M]^+$, 134 $[M-H_2O]^+$ y 121 $[M-CH_2OH]^+$. El alcohol perílico es el monoterpeno con mayor valor farmacéutico debido a sus aplicaciones como agente anticancer, las cuales fueron nombradas en el marco teórico. Este compuesto se ha logrado obtener por biotransformación del aceite de naranja con *Penicillium* sp. y *Fusarium oxysporum* (Marostica y Pastore, 2007) y a partir del limoneno empleando *Pseudomonas putida* con un rendimiento del 36 % (Chatterjee y Bhattacharyya, 2001), empleando *Aspergillus niger* con rendimiento del 100 % (Menendez et al., 2002), con *Aspergillus cellulosa* (Noma et al., 1992) y también usando células vegetales de *Picea abies* (Lindmark-Henriksson et al., 2004). Hay algunas patentes que describen su producción con *Bacillus stearothermophilus* (Chang-Hae y Oriol, 1997) y otras cepas microbianas no reportadas (Jourdat et al., 2002; Duetz et al., 2003).

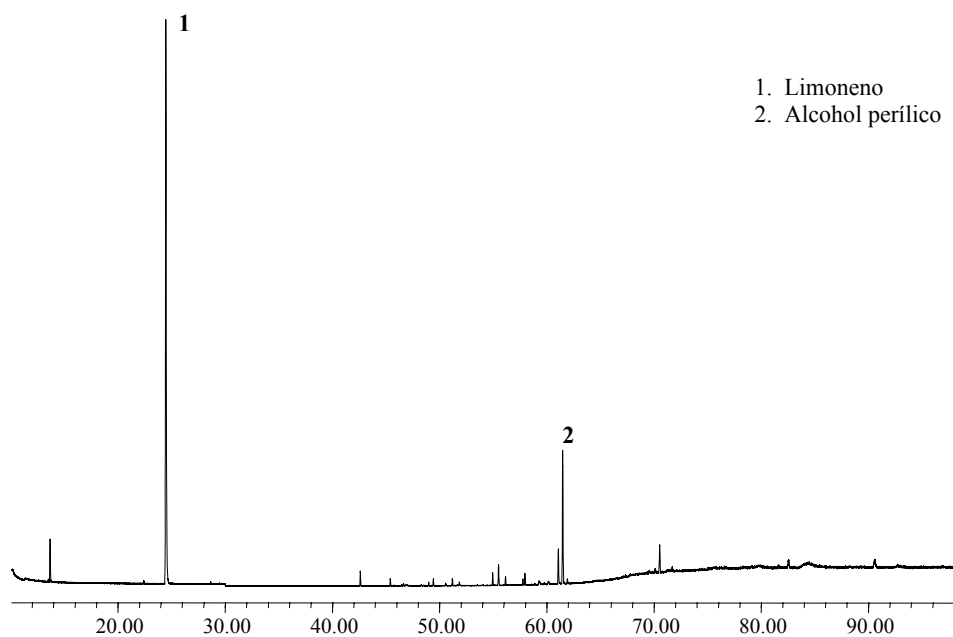


Figura 36. Perfil cromatográfico (TIC) de los productos obtenidos en la bioconversión de limoneno empleando medio PDB (6 días de reacción, extracción L-L). GC-MS: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Inyección 1 μ L (*split* 30:1)

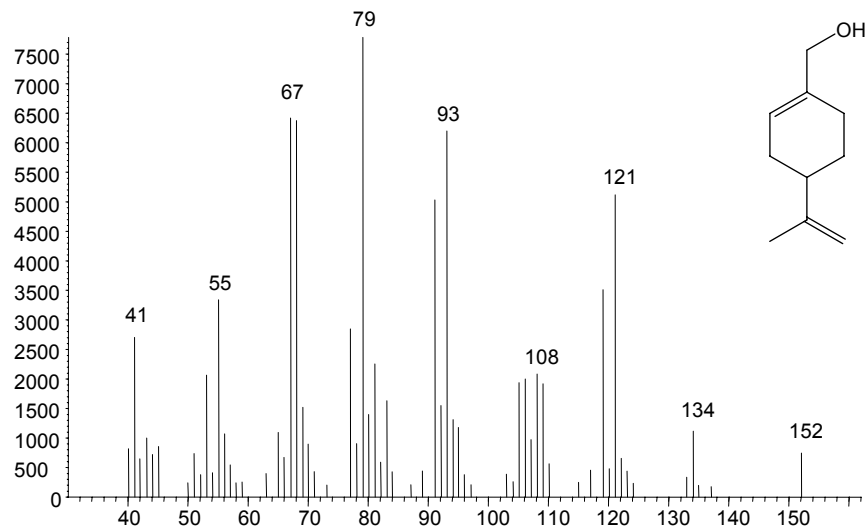


Figura 37. Espectro de masas obtenido por GC-MS (EIMS, 70 eV) del alcohol perílico, compuesto predominante obtenido en la biotransformación de los monoterpenos en medio PDB

3.2.5 Ensayos con aceites esenciales y determinación de productos por HS-SPME

Se realizaron ensayos de biotransformación empleando como sustratos aceites esenciales de naranja y mandarina, según lo descrito en la metodología. Para el análisis se aplicó el método HS-SPME optimizado para la fibra DVB-Carboxen-PDMS: tiempo de extracción 20 min, temperatura de extracción 60 °C, temperatura de desorción 250° C y tiempo de desorción 2 min. Estos ensayos se hicieron en medio YMPG debido a su efecto de selectividad hacia el alcohol perílico. Las determinaciones cuantitativas de productos se hicieron solo para el alcohol perílico y el α -terpineol, debido a su gran importancia. La cuantificación se realizó empleando el factor de respuesta para cada componente cuyos valores calculados se muestran en la Tabla 21. Los productos obtenidos y su concentración se indican en las Tabla 22 y 23.

<i>Componente</i>	<i>Área (pA)</i>	<i>Concentración(ppm)</i>	<i>Factor de respuesta (área/concentración)</i>
α -pineno	398,11829	1,72	231,46
limoneno	1190,6358	1,68	708,71
α -terpineol	223,16603	1,88	118,71
carvona	423,60092	1,918	220,86
alcohol perílico	117,43691	1,918	61,23

Tabla 21. Factores de respuesta calculados para la cuantificación de diferentes monoterpenos empleando HS-SPME

Empleando HS-SPME-GC-FID se observa que los factores de respuesta para cada analito difieren considerablemente. En general el limoneno presenta el valor más alto (708,71), lo que confirma la afinidad de la fibra por este compuesto. El α -pineno presenta el segundo valor más elevado (231,46) y similar a la carvona (220,86). El alcohol perílico presenta un valor (61,23) aproximadamente 11,5 veces menor que el limoneno. Los factores de respuesta disminuyen a medida que el peso molecular aumenta, lo cual es consistente con detectores tipo FID. Debido a estas diferencias es necesario realizar determinaciones cuantitativas con base en compuestos de referencia y sus factores de respuesta y no con base en áreas relativas, a menos de que se hagan las correcciones necesarias. El uso de las áreas relativas en estos casos puede ocasionar una cuantificación errónea.

<i>Experimento</i>	<i>Catalizador</i>	<i>Aceite esencial (sustrato)</i>	<i>Componente(s) identificado(s) (ppm)</i>		
			<i>Limoneno</i>	<i>α-terpineol</i>	<i>Alcohol perílico</i>
AE1	Si	Mandarina	7,98	0,37	0,33
AE2	Si	Naranja	4,81	0,74	0,38
AB1	Si	Etanol	nd	nd	nd
AB2	---	Mandarina	34,36	0,19	nd
AB3	---	Naranja	24,32	0,44	nd
AB4	---	---	nd	nd	nd

--- No se adicionó sustrato, reactivo o catalizador; nd: no detectable.

Tabla 22. Resultados obtenidos de los ensayos de biotransformación de aceites esenciales de naranja y mandarina. Condiciones fijas: *A. niger* DSM 821 (3 días de edad), medio YMPG, 6 días de reacción, sello de PTFE/Silicona, extracción HS-SPME

Experimento	Componente(s) identificado(s)	
	α -terpineol (Cr %)	Alcohol perílico (Cr %)
AE1	4,70	4,10
AE2	15,43	7,94
AB1	---	---
AB2	0,56	---
AB3	1,83	---
AB4	---	---

--- No aplica; Cr %: concentración relativa al limoneno, expresada en porcentaje

Tabla 23. Concentraciones relativas de los compuestos oxigenados obtenidos en los ensayos de biotransformación de aceites esenciales de naranja y mandarina. Parámetros fijos: *A. niger* DSM 821 (3 días de edad), medio YMPG, 6 días de reacción, sello de PTFE/Silicona, extracción HS-SPME

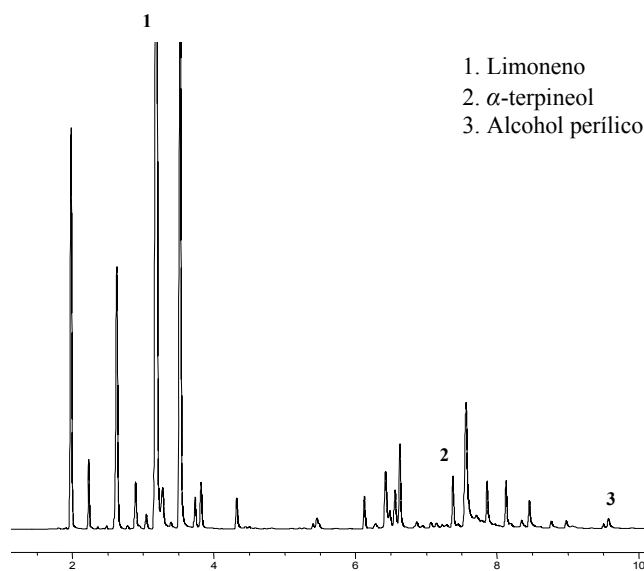


Figura 38. Perfil cromatográfico de los productos obtenidos en la bioconversión de aceite esencial de naranja empleando *A. niger* DSM 821 en medio YMPG (6 días de reacción, extracción HS-SPME). GC-FID: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). *split* 30:1

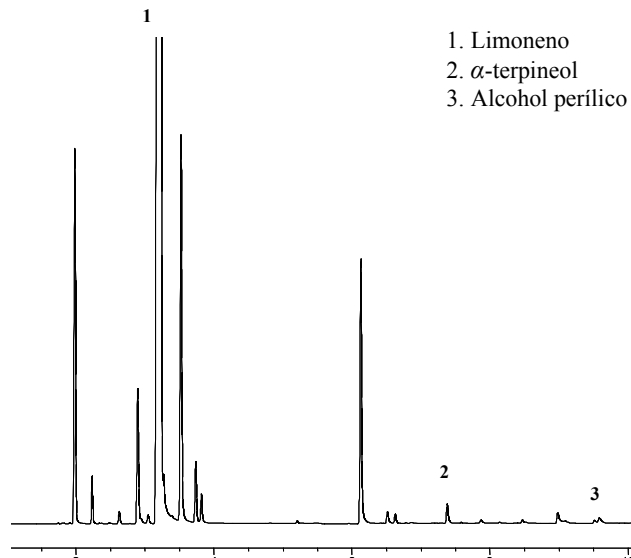


Figura 39. Perfil cromatográfico de los productos obtenidos en la bioconversión de aceite esencial de mandarina empleando *A. niger* DSM 821 en medio YMPG (6 días de reacción, extracción HS-SPME). GC-FID: columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). *split* 30:1

Los resultados de los ensayos de biotransformación del aceite esencial de naranja (AE1, Fig. 38) y mandarina (AE2, Fig. 39) fueron comparados con ensayos blancos sin presencia del biocatalizador (AB2 y AB3). Adicionalmente, se hicieron ensayos con etanol y blanco del medio (AB4) para descartar cualquier interferencia o falso positivo debido a productos generados por biodegradación de los solventes o del medio. Se observa que la concentración de limoneno disminuye cuando se realiza la bioconversión con ambos aceites esenciales. El α -terpineol, presente originalmente en los aceites esenciales, aumenta su concentración debido a la transformación, es decir que ocurre la bioproducción de α -terpineol. El alcohol perílico, ausente en los aceites esenciales, es generado en la bioconversión hasta alcanzar concentraciones similares para ambos aceites (0,33 y 0,38 ppm para mandarina y naranja respectivamente). En ninguno de los ensayos blancos es posible detectar α -pineno ni alcohol perílico, por lo tanto la formación de los oxi-derivados se origina exclusivamente a partir del limoneno presente en los aceites esenciales.

Para efectos comparativos se ha calculado la concentración relativa de los productos formados (Tabla 23) con respecto al limoneno remanente. En los aceites originales la concentración relativa del alcohol perílico es cero debido a su ausencia, sin embargo, en los bioensayos la concentración relativa de α -terpineol y alcohol perílico es máxima cuando se emplea el aceite de naranja, probablemente por su mayor contenido de limoneno. Fue posible lograr la biotransformación de ambos aceites esenciales para la obtención de α -terpineol y alcohol perílico empleando el medio YMPG, con resultados que concuerdan con los obtenidos en los ensayos realizados con limoneno puro, con respecto a los productos, pero a porcentajes menores. Aunque las concentraciones absolutas son bajas en el caso de los aceites esenciales, las concentraciones relativas al limoneno son altas y similares a aquellas obtenidas para el limoneno puro empleando medio YMPG.

Dentro de la revisión bibliográfica realizada, solo se encontró un trabajo reciente sobre la biotransformación del aceite esencial de naranja empleando *Penicillium* sp. y *Fusarium oxysporum* (Marostica y Pastore, 2007). Existe otro trabajo interesante sobre transformación limpia del aceite de naranja, pero no biocatalítica, donde se logra la

producción de derivados oxigenados del limoneno empleando paladio soportado en hidrotalcitas bajo condiciones libres de solvente (Arizaga et al., 2007). Bajo estas condiciones fue posible la obtención de 1,2- y 8,9- epoxilimoneno, carveol y carvona. No se encontraron trabajos reportados sobre oxidación de aceites esenciales de mandarina o limón para la obtención de derivados del limoneno ni por transformación biocatalítica, ni por transformación química limpia.

En el trabajo de Marostica y Pastore, 2007, el aceite de naranja (94,29 % de limoneno) fue transformado a *R*-(+)- α -terpineol con un rendimiento cercano a los 450 mg/L (ppm) después de 3 días de reacción. También destacan la fuerte influencia del medio de cultivo en la bioconversión, sin embargo, no pudieron establecer una regla general. Además del α -terpineol, destacan la producción de alcohol perílico en bajas concentraciones, (1,4 ppm, después de 48 h con *Penicillium* sp. y 10 ppm, después de 96 h con *Fusarium oxysporum*). Es así como sus resultados son muy similares a los del presente trabajo en cuanto a los productos, pero diferentes con respecto a las cantidades obtenidas. Finalmente también concuerdan en resaltar los problemas generados en la extracción y cuantificación de los productos obtenidos debido a la alta volatilidad de los sustratos empleados, lo cual se puede remediar empleando por ejemplo la técnica HS-SPME.

Con respecto a la extracción, en el presente trabajo es notoria la baja afinidad de la fibra DVB-Carboxen-PDMS hacia los metabolitos oxigenados de interés, obtenidos a partir del limoneno. Por esta razón es recomendable incluir como parámetro de optimización el tipo de fibra y probar otros recubrimientos de diferente polaridad, por ejemplo de PDMS, poliacrilato (PA), Carboxen/PDMS o Carbowax/DVB, y seleccionar aquella que muestre mejor desempeño.

En resumen, el presente trabajo de investigación estuvo encaminado a la exploración de la biotransformación en pequeña escala de los monoterpenos más abundantes en la naturaleza y de los aceites esenciales de naranja y mandarina que son fuente de limoneno. Debido a que el interés estaba enfocado en los productos, no se estudió ningún tipo de mecanismo ni

se realizaron determinaciones de tipo cinético. La oxidación de los sustratos fue la reacción predominante gracias a la cual se obtuvieron con éxito alcoholes monoterpénicos de gran valor. Fue posible emplear por primera vez en nuestro grupo de investigación y en la Universidad Industrial de Santander, un aceite esencial cítrico en un proceso biooxidativo empleando células completas, haciendo de este trabajo la base para la búsqueda, desarrollo y optimización de muchos otros procesos que involucran biocatalizadores y sustratos naturales.

4. CONCLUSIONES

- Fue posible lograr la oxidación de limoneno, α -pineno y aceites esenciales de naranja y mandarina (con alto contenido de limoneno) en un proceso económico y limpio a microescala empleando el hongo *Aspergillus niger* DSM 821 como biocatalizador bajo condiciones normales de temperatura y presión. Todos los productos de oxidación obtenidos poseen importantes aplicaciones en la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica. Adicionalmente, se consideran productos naturales ya que fueron obtenidos a partir de sustratos naturales a través de un proceso biocatalítico.
- El tipo y composición del medio de cultivo afectan significativamente el crecimiento del hongo y los productos de oxidación formados a partir del limoneno y α -pineno (con respecto a la selectividad y concentración). Empleando medio sólido PDA fue posible la oxidación del limoneno para obtener α -terpineol, *p*-mentano-1,8-diol y alcohol perílico como los productos mayoritarios. El α -pineno como sustrato conduce a la formación α -terpineol y *p*-mentano-1,8-diol como productos principales, con borneol y fenchol como productos minoritarios.
- Empleando el medio líquido YMPG fue posible la oxidación del limoneno para obtener alcohol perílico como producto principal; el α -pineno como sustrato no conduce a la formación de los compuestos oxigenados.
- Empleando medio líquido PDB fue posible la oxidación del limoneno para obtener alcohol perílico como producto principal; el α -pineno como sustrato conduce a la formación α -terpineol pero no de alcohol perílico.

- La solución de esporas (SS), no presentó poder de biotransformación ya que ninguno de los monoterpenos fue oxidado. Adicionalmente, al emplear medio YMPG en algunos de los ensayos se produjo 2-feniletanol, un compuesto aromatizante de alto valor que se forma por la oxidación de los componentes del medio de cultivo.

- Con respecto a los sustratos, a partir del limoneno, en los medios líquidos YMPG y PDB se favorece la formación de alcohol perílico, mientras que el medio sólido PDA favorece la producción de α -terpineol y *p*-mentano-1,8-diol. A partir del α - pineno, el medio PDA promueve la formación de α -terpineol y *p*-mentano-1,8-diol; el PDB solo a α - terpineol, y con el YMPG no se logra la oxidación.

- Fue posible emplear la técnica HS-SPME para la determinación de los metabolitos del limoneno y α -pineno en las biorreacciones. El uso de esta técnica demuestra ventajas superiores en comparación con la extracción por solvente: disminución del tiempo de análisis, mayor sensibilidad, ahorro en reactivos, aumento de la seguridad, mínima exposición a solventes y al hongo disminuyendo por tanto cualquier riesgo de contaminación de la muestra o del ambiente de trabajo.

- Debido a la alta volatilidad de los sustratos, todas la biorreacciones a microescala deben llevarse a cabo en frascos herméticamente sellados evitando el uso de tapones de celulosa o cualquier cubierta permeable a gases.

- Todas las técnicas analíticas empleadas fueron validadas obteniendo valores permitidos o adecuados con respecto a los límites de detección y la precisión, sin embargo, la técnica HS-SPME-GC-FID presentó una eficiencia superior y por tanto se recomienda su aplicación en este tipo de procesos.

5. RECOMENDACIONES

- En este trabajo se analizaron algunas de las variables más influyentes en los procesos de biotransformación y cada parámetro fue explorado de la forma tradicional, uno a la vez. Sin embargo, existen variables que no fueron monitoreadas y que pueden influir de manera acentuada en el proceso, por ejemplo, el pH, concentración de oxígeno y la intensidad lumínica. Para el desarrollo de un sistema optimizado y escalado sería necesario incluir estas variables y analizarlas empleando diseños experimentales que permitan un análisis más profundo.
- Debido a que los procesos de biocatálisis y biotransformación se consideran muy promisorios en la actualidad, es necesario aumentar el estudio de sistemas que aprovechen recursos naturales abundantes y que hagan uso de nuestra biodiversidad natural. Por ejemplo, identificar, aislar y emplear cepas nativas (Colombianas) recolectadas de árboles frutales, especialmente de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Botrytis*. También es interesante el uso de cultivos de células vegetales o microbianas que han demostrado alta capacidad transformadora, o la realización de manipulaciones genéticas para mejorar la eficiencia de aquellas con actividad catalítica comprobada.
- Además de los monoterpenos monocíclicos más comunes, es posible emplear otros sustratos complejos de interés, por ejemplo, sesquiterpenos, aminoácidos o ácidos orgánicos que permiten la formación de compuestos importantes en la industria como el mentol, 2-feniletanol y varias decalactonas.
- Existen diversos trabajos donde no solamente se aplican las enzimas microbianas o fúngicas, sino también diferentes metaloporfirinas o metalofthalocianinas diseñadas que imitan el comportamiento catalítico de las enzimas P450 en los procesos de biotransformación. Desde el punto de vista mecanístico es deseable estudiar este tipo de

catalizadores biomiméticos usando directamente aceites esenciales como sustratos, especialmente aquellos en los cuales predomina un componente en particular.

BIBLIOGRAFÍA

Adam, M., Juklova, M., Bajer, T., Eisner, A., Ventura, K., 2005. Comparison of three different solid-phase microextraction fibres for analysis of essential oils in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. *J. Chromatogr. A* 1084, 2-6.

Adams, A., Demyttenaere, J.C.R., De Kimpe, N., 2003. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of the culture conditions. *Food Chem.* 80, 525-534.

Ager, D.J. 1999. *Handbook of Chiral Chemicals*. Marcel Dekker, New York.

Agrawal, R., Joseph, R., 2000. Bioconversion of alpha pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 335-337.

Aleu, J., Collado, I.G., 2001. Biotransformations by *Botrytis* species. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 13, 77-93.

Ancel, J.E., Maksimchuk, N.V., Simakova, I.L., Semikolenov, V.A., 2004. Kinetic peculiarities of α -pinene oxidation by molecular oxygen. *Appl. Catal., A* 272, 109-114.

Ariza, A.M., Vargas, M.T., Villa, A.L. 2007. Oxifuncionalización catalítica de limoneno con una ftalocianina de manganeso soportada en MCM-41 funcionalizada. Tesis de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Arizaga, B., de Leon, A., Burgueno, N., López, A., Paz, D., Martinez, N., 2007. A clean process for the production of oxygenated limonene derivatives starting from orange oil. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 532-538.

Ayala, M., Torres, E., 2004. Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective. *Appl. Catal., A* 272, 1-13.

Azzoli, C.G., Miller, V.A., Ng, K.K., Krug, L.M., Spriggs, D.R., 2003. A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 51, 493-498.

Bailey, H.H., Levy, D., Harris, L.S., Schink, J.C., 2002. A Phase II Trial of Daily Perillyl Alcohol in Patients with Advanced Ovarian Cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E2E96. *Gynecol. Oncol.* 85, 464-468.

Belanger, J.T., 1998. Perillyl alcohol: Applications in Oncology. *Altern. Med. Rev.* 3, 448-456.

Bell, S.G., Sowden, R.J., Wong, L-L., 2001. Engineering the haem monooxygenase cytochrome P450_{cam} for monoterpene oxidation. *Chem. Commun.* 635-636.

Benvenuti, F., Gironi, F., Lamberti, L., 2001. Supercritical deterpenation of lemon essential oil, experimental data and simulation of the semicontinuous extraction process. *J. Supercrit. Fluids* 20, 29-44.

Bernhardt, R., 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124, 128-145.

Blanco, C., Stashenko, E.E., Martinez, J.R. 1998. Oxidación catalítica del limoneno por complejos bases de Schiff tipo Salen de Fe y Mn encapsulados en Zeolita-Y. Tesis de Maestría en Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Bliesner, D.M. 2006. Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide. Jhon Wiley & Sons, New Jersey.

Blomberg, M.R.A., Siegbahn, P.E.M., Babcock, G.T., 2000. O-O bond splitting in cytochrome oxidase. J. Inorg. Biochem. 80, 261-269.

Bommarius, A.S., Riebel, B. R. 2004. Biocatalysis. Fundamentals and applications. Wiley-VCH, Weinheim.

Borges da Silva, E.A., Ulson de Souza, A.A., U. De Souza, S.G., 2006. Analysis of the high-fructose syrup production using reactive SMB technology. Chem. Eng. J. 118, 167-181.

Brenna, E., Fuganti, C., Serra, S., 2003. Enantioselective perception of chiral odorants. Tetrahedron: Assymetry 14, 1-42.

Cadwallader, K.R., Braddock, R.J., Parish, M.E., Higgins, D.P., 1989. Bioconversion of (+)-Limonene by *Pseudomonas gladioli*. J. Food Sci. 54, 1241-1245.

Cagnoli, M.V., Casuscelli, S.G., Alvarez, A.M., Bengoa, J.F., Gallegos, N.G., 2005. "Clean" limonene epoxidation using Ti-MCM-41 catalyst. Appl. Catal., A 287, 227-235.

Camara, J.S., Marques, J.C., Perestrelo, R.M., Rodrigues, F., Oliveira, L., 2007. Comparative study of the whisky aroma profile based on headspace solid phase microextraction using different fibre coatings. J. Chromatogr., A 1150, 198-207.

Cardozo, N., Paez M., E. 1998. Evaluación de la actividad catalítica de complejos de cobalto con bases de Schiff en la oxidación de limoneno. Tesis de Maestría en Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Chan, N.L.S., Wang, H., Wang, Y., Leung, H.Y., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced CYP1B1 activity is suppressed by perillyl alcohol in MCF-7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213, 98-104.

Chang-Hae, C., Oriel, P. 1997. Process and bacterial cultures for the preparation of perillyl compounds. US5652137.

Chang, P-K., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. 2004. ASPERGILLUS/Introduction. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, USA, pp. 62-66.

Chastain, D., Mody, N., Majetich, G. 1999. Method of preparing perillyl alcohol and perillyl acetate. US5994598.

Chatterjee, T., Bhattacharyya, D.K., 2001. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 541-546.

Chelariu, G. 2000. Process for preparing l-carvone. RO115628.

Chen, J., Griffin, R.J., 2005. Modeling secondary organic aerosol formation from oxidation of α -pinene, β -pinene, and *d*-limonene. *Atmos. Environ.* 39, 7731-7744.

Chen, P.P.-Y., Chan, S.I., 2006. Theoretical modeling of the hydroxylation of methane as mediated by the particulate methane monooxygenase. *J. Inorg. Biochem.* 100, 801-809.

Chung, B.H., Lee, H-Y. Lee, J.S., Young, C.Y.F., 2006. Perillyl alcohol inhibits the expression and function of the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 236, 222-228.

Cirino, P.C., Arnold, F.H., 2002. Protein engineering of oxygenases for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 130-135.

Corley, J. 2003. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. In: Lee, P.W., Aizawa, H., Barefoot, A.C.(Eds.), *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*, vol. 1. John Wiley & Sons, England.

Costas, M., Chen, K., Que Jr., L., 2000. Biomimetic nonheme iron catalysts for alkane hydroxylation. *Cord. Chem. Rev.* 200-202, 517-544.

Da Fonseca, C.O., Masini, M., Futuro, D., Caetano, R., Rocha Gattass, C., 2006. Anaplastic oligodendroglioma responding favorably to intranasal delivery of perillyl alcohol: a case report and literature review. *Surg. Neurol.* 66, 611-615.

De Bont, J.A.M., 1998. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. *Trends Biotechnol.* 16, 496-499.

De Carvalho, C.C.C.R, da Fonseca, M.M.R., 2006. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chem.* 95, 413-422.

De Carvalho, C.C.C.R., Da Fonseca, M.M.R., 2006. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.* 24, 134-142.

De vries, E.J., Janssen, D.B., 2003. Biocatalytic conversion of epoxides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 414-420.

Demain, A.L., 1986. Regulation of secondary metabolism in fungi. *Pure Appl. Chem.* 58, 219-226.

Demyttenaere, J., De Kimpe, N., 2001. Biotransformation of terpenes by fungi. Study of the pathways involved. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11, 265-570.

Demyttenaere, J.C.R., De Pooter, H.L., 1996. Biotransformation of geraniol and nerol by spores of *Penicillium italicum*. *Phytochemistry* 41, 1079-1082.

Demyttenaere, J.C.R., Van Belleghem, K., De Kimpe, N., 2001. Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry* 57, 199-208.

Demyttenaere, J.C.R., Herrera, M., De Kimpe, N., 2000. Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. *Phytochemistry* 55, 363-373.

Demyttenaere, J.C.R., Vanoverschelde, J., De Kimpe, N., 2004. Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextraction for screening. *J. Chromatogr., A* 1027, 137-146.

Demyttenaere, J.C.R., Willems, H.M., 1998. Biotransformation of linalool to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry* 47, 1029-1036.

Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I., 2005. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.* 105, 2253-2277.

Doble, M., Kruthiventi, A.K., Gaikar, V.G. 2004. Biotransformations and Bioprocesses. CRC Press, USA.

Duetz, W.A., Bouwmeester, H., van Beilen, J.B., 2003. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 269-277.

Duetz, W.A., Fjallman, A.H.M., Ren, S., Jourdat, C., Witholt, B., 2001. Biotransformation of D- limonene to (+) *trans*-Carveol by Toluene-Grown *Rhodococcus opacus* PWD4 Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2829-2832.

Duetz, W.A., van Beilen, J.B., Witholt, B., 2001. Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 419-425.

Duetz, W.A., Witholt, B., Jourdat, C. 2003. Process for the preparation of perillyl alcohol. EP1364039.

Duru, M.E., Ozturk, M., Ugur, A., Ceylan, O., 2004. The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 94, 43-48.

El Tamer, M.K. 2002. Molecular regulation of plant monoterpene biosynthesis in relation to fragrance. Proefschrift Wageningen Universiteit, Wageningen.

Epshtein, N.A., 2004. Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. *Pharm. Chem. J.* 38, 212-228.

Etschmann, M.M.W., Bluemke, W., Sell, D., 2002. Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 1-8.

Fan, J., Zhao, J., Zhang, R., 2005. Theoretical study of OH addition to α -pinene and β -pinene. *Chem. Phys. Lett.* 411, 1-7.

Farooq, A., Choudhary, M.I., Tahara, S., Rahman, A., 2002. The Microbial Oxidation of (-)- β -Pinene by *Botrytis cinerea*. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* 57, 686-690.

- Farooq, A., Tahara, S., Choudhary, M.I., Rahman, A., 2002. Biotransformation of (-)- α -Pinene by *Botrytis cinerea*. Z. Naturforsch., C: J. Biosci. 57, 303-306.
- Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Smadja, J., Chemat, F., 2006. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. J. Chromatogr., A 1112, 121-126.
- Fetzner, S., 2007. Cofactor-independent oxygenases go it alone. Nature Chemical Biology 3, 374-675.
- Fleischer, J., Bauer, K., Hopp, R. 1976. Separating optically pure isomers of menthol, neomenthol and isomenthol. US3943181.
- Food and Drug Administration. 1992. FDA'S Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs. FDA, Maryland, USA.
- Frater, G., Bajgrowicz, J.A., Kraft, P., 1998. Fragrance Chemistry. Tetrahedron 54, 7633-7703.
- Gallego, F.E., Vasquez, G.E., Palacio, L.A., Cubillos, J.A. 2007. Síntesis y utilización de molibdato de níquel en la oxidación de limoneno y α -pineno. Tesis de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Garavaglia, J., Flores, S.H., Pizzolato, T.M., Peralba, M., 2007. Bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol by *Kluyveromyces marxianus* in grape must cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. On line
- Gatfield, I.L., Hilmer, J-M., Bornscheuer, U., Schmidt, R. 2002. Method for preparing D- or L- menthol. EP1223223.

Gatfield, I.L., Schilmo, J.M., Bonsheyel, U. 2002. Method for preparing L-menthol. CN1364910.

Gavrilescu, M., Chisti, Y., 2005. Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.* 23, 471-499.

Giri, A., Dhingra, V., Giri, C.C., Singh, A., 2001. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzymes systems: current trends and future prospects. *Biotechnol. Adv.* 19, 175-199.

Guo, C-C., Yang, W-J., Mao, Y-L., 2005. Selectively aerobic oxidation of C=C and allylic C-H bonds in α -pinene over simple metalloporphyrins. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 226, 279-284.

Gupta, A., Myrdal, P.B., 2004. Development of a perillyl alcohol topical cream formulation. *Int. J. Pharm.* 269, 373-383.

Hanson, J.R. 1998. *An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry*. Oxford University Press, USA.

Hasemann, C.A., Ravichandran, K.G., Peterson, J.A., 1994. Crystal Structure and Refinement of Cytochrome P450_{terp} at 2.3 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 236, 1169-1185.

Hata, M., Hirano, Y., Hoshino, T., Nishida, R., 2005. Theoretical study on monooxygenation mechanism by cytochrome P450: an ultimate species in the substrate oxidation process. *J. Mol. Struct.* 722, 133-137.

Hayaishi, O. 2004. Oxygenases. In: Lennarz, W.J., Lane, M.D. (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Academic Press, Amsterdam.

Hayaishi, O., Katagiri, M., Rothberg, S., 1955. Mechanism of the pyrocatechase reaction. J. Am. Chem. Soc. 77, 5450-5451.

Held, M., Schmid, A., van Beilen, J.B., Witholt, B. 2000. Biocatalysis. Biological systems for the production of chemicals. Pure Appl. Chem. 72, 1337-1343.

Hlavica, P., 2004. Models and mechanisms of O-O bond activation by cytochrome P450. Eur. J. Biochem. 271, 4335-4360.

Holland, H.L., Weber, H.K., 2000. Enzymatic hydroxylation reactions. Curr. Opin. Biotechnol. 11, 547-553.

Houjin, L., Wenjian, L., Chuanghua, C., Yipin, Z., 2006. Biotransformation of Limonene by Marine Bacteria. Chin. J. Anal. Chem. 34, 946-950.

Huang, C., Lee, S.L., Chou, C.C., 2000. Production and Molar Yield of 2-Phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as Affected by Some Medium Components. J. Biosci. Bioeng. 90, 142-147.

Huang, C., Lee, S-L., Chou, C.C., 2001. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. Food Res. Int. 34, 277-282.

Ishige, T., Honda, K., Shimizu, S., 2005. Whole organism biocatalysis. Curr. Opin. Chem. Biol. 9, 174-180.

Itada, N., 1965. ¹⁸O Investigation of pyrocatechase reaction: mode of attack of molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 149-153.

Jensen, E. 1962. Terpin hydrate suspensions. US3069317.

Jimenez, C., Ventura, R., Segura, J., 2002. Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 767, 341-351.

Jourdat, C., Duetz, W.A., Witholt, B. 2002. Process for the preparation of perillyl alcohol. AU2002232294.

King, A., Dickinson, J.R., 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16, 499-506.

Kirton, S.B., Baxter, C.A., Sutcliffe, M.J., 2002. Comparative modelling of cytochromes P450. *Adv. Drug Delivery Rev.* 54, 385-406.

Kurlansik, L., Damon, C., Klein, H., Salim, E., 1967. Determination of Terpin Hydrate in Elixirs by Gas Chromatography. *J. Pharm. Sci.* 56, 1160-1161.

Lange, S.J., Que Jr, L., 1998. Oxygen activating nonheme iron enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 159-172.

Larkin, M.J., Kulakov, L.A., Allen, C.C.R., 2005. Biodegradation and *Rhodococcus* - masters of catabolic versatility. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 282-290.

Leffingwell, J.C., 2003. Chirality and Bioactivity I: Pharmacology. *Leffingwell Reports* 3, 1-27.

Li, J., Perdue, E.M., Pavlostathis, S.G., Araujo, R., 1998. Physicochemical properties of selected monoterpenes. *Environment International* 24, 353-358.

Li, Z., van Beilen, J.B., Duetz, W.A, Schmid, A., de Raadth, A., 2002. Oxidative biotransformations using oxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 136-144.

Liese, A., Filho, M.V., 1999. Production of fine chemicals using biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 595-603.

Lindmark-Henriksson, M., Isaksson, D., Vanek, T., Valterova, I., 2004. Transformation of terpenes using a *Picea abies* suspension culture. *J. Biotechnol.* 107, 173-184.

Liu, G., Oettel, K., Bailey, H., Van Ummersen, L., Tutsch, K., 2003. Phase II trial of perillyl alcohol (NSC 641066) administered daily in patients with metastatic androgen independent prostate cancer. *Inv. New Drugs* 21, 367-372.

Lomascolo, A., Lesage-Meessen, L., Haon, M., Navarro, D., 2001. Evaluation of the potential of *Aspergillus niger* species for the bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 99-102.

Longo, M.A., Sanromán, M.A., 2006. Production of Food Aroma Compounds: Microbial and Enzymatic Methodologies. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 335-353.

Lota, M., Serra, D., Tomi, F., Casanova, J., 2001. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 77-104.

Maier, N.M., Franco, P., Lindner, W., 2001. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J. Chromatogr., A* 906, 3-33.

Maksimchuk, N.V., Melgunov, M.S., Mrowiec-Bialon, J., 2005. H₂O₂-based allylic oxidation of α -pinene over different single site catalysts. *J. Catal.* 235, 175-183.

Marostica, M.R., Pastore, G.M., 2007. Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. *Food Chem.* 101, 345–350.

McConathy, J., Owens, M.J., 2003. Stereochemistry in Drug Action. *J. Clin. Psychiatry* 5. 70-73.

McMorn, P., Roberts, G., Hutchings, G.J., 2000. Oxidation of α -pinene to verbenone using silica-titania co-gel catalyst. *Catal. Lett.* 67, 203-206.

Menendez, P., Garcia, C., Rodríguez, P. Moyna, P., Heinzen, H., 2002. Enzymatic Systems Involved in D- limonene Biooxidation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 45, 111-114.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas. 2005. La cadena de cítricos en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica, 1991-2005. Agrocadenas, Bogotá.

Moelleken, R. 1992. Terpineol production for use as fragrances or their intermediates - involves pinene hydration using aq. sulphuric and phosphoric acids mixt. in presence of emulsifier. DE4111901.

Moresi, M., Parente, E. 2004. FERMENTATION (INDUSTRIAL)/ Production of Organic Acids. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, USA, pp. 705-717.

Moroe, T., Hattori, S., Komatsu, A., Yamaguchi, Y. 1970. A method for the Biochemical Isolation of l-Menthol. GB1187320.

Mulder, P., Van Haveren, J., Nijhuis, H. 1999. Process for the preparation of carvone. WO9912880.

- Nakasawa, A., Kojima, Y., Taniuchi, H., 1967. Purification and properties of pyrocatechase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta* 147, 189-199.
- Nakayama, M., Yamaguchi, Y., Machida, H., Iwasaki, S., Komatsu, A., Shinoda, A. 1978. Preparation of L-menthol from menthol racemate. JP53044691.
- Nature Chemical Biology Editorial ,2007. All natural. *Nature Chem. Biol.* 3, 351
- Nentwig, G., 2003. Use of repellents as prophylactic agents. *Parasitol. Res.* 90, S40-S48.
- Nigam, P., Singh, D. 2004. METABOLIC PATHWAYS/ Production of Secondary Metabolites-Fungi. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, USA, pp. 1319-1328.
- Noboru, S., Takaji, M. 2004. A method for producing 1-menthol. IN191940.
- Noma, Y., Yamasaki, S., Asakawa, Y., 1992. Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*. *Phytochemistry* 31, 2725-2727.
- Oliveira, P., Rojas-Cervantes, M.L., Ramos, A.M., Fonseca, I.M., 2006. Limonene oxidation over V₂O₅/TiO₂ catalysts. *Catal. Today* 118, 307-314.
- Onken, J., Berger, R.G., 1999. Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *J. Biotechnol.* 69, 168-168.
- Ortiz de Montellano, P.R. 2005. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. 3 ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Palsson, K., Jaenson, T.G.T., 1999. Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa. *Acta Tropica* 72, 39-52.

Peffley, D.M., Sharma, C., Hentosh, P., Buechler, R.D., 2007. Perillyl alcohol and genistein differentially regulate PKB/Akt and 4E-BP1 phosphorylation as well as eIF4E/eIF4G interactions in human tumor cells. Arch. Biochem. Biophys. In press.

Pellati, F., Benvenuti, S., Yoshizaki, F., Bertelli, D., Rossi, M.C., 2005. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of the volatile compounds of *Evodia* species fruits. J. Chromatogr., A 1087, 265-273.

Pinheiro, J., Marsaioli, A.J., 2007. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. J. Mol. Catal. B: Enzym. 44, 78-86.

Pollard, D.J., Woodley, J.M., 2006. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. Trends Biotechnol. 25, 66-73.

Radbil, A. B., Zolin, B.A., Radbil, B. A., Kulikov, M. V., Kartashov, V. R. 2000. Method of preparing terpin hydrate. RU2154049

Ramirez-Ramirez, V.M., Nebot-Gil, I., 2005. Theoretical study of the OH addition to the endocyclic and exocyclic double bonds of the *d*-limonene. Chem. Phys. Lett. 409, 23-28.

Ramirez-Ramirez, V.M., Peiró-Garcia, J., Nebot-Gil, I., 2004. Theoretical study of the OH addition to the β -pinene. Chem. Phys. Lett. 391, 152-156.

Rhodes, P., Winskill, N. 1985. Microbiological process for the preparation of 1-carvone. US4495284.

Robertson, D.E., Steer, B.A., 2004. Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. Curr. Opin. Chem. Biol. 8, 141-149.

Román-Aguirre, M., De la Torre-Sáenz, L., Flores, W.A., Robau-Sánchez, A., 2005. Synthesis of terpineol from α -pinene by homogeneous acid catalysis. *Catal. Today* 107-108: 310-314

Rozenbaum, H.F., Patitucci, M.L., Antunes, O.A.C., 2006. Production of aromas and fragrances through microbial oxidation of monoterpenes. *Braz. J. Chem. Eng.* 23, 273-279.

Rozzell, J.D., 1999. Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities. *Bioorg. Med. Chem.* 7, 2253-2261.

Saikia, L., Srinivas, D., Ratnasamy, P., 2006. Chemo-, regio-, and stereo-selective aerial oxidation of limonene to the *endo*-1,2-epoxide over Mn(Salen)-sulfonated SBA-15. *Appl. Catal., A* 309, 144-154.

Santos, J.C., Paez M., E., Stashenko, E.E. 1998. Oxidación catalítica del limoneno por complejos bases de Schiff tipo Salen de Fe y Mn encapsulados en Zeolita-Y. Tesis de Maestría en Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Savithiry, N., Gage, D., Fu, W., Oriel, P., 1998. Degradation of Pinene by *Bacillus pallidus* BR425. *Biodegradation* 9, 337-341.

Schulze, B., Wubbolts, M.G., 1999. Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 609-615.

Schurig, V., 2001. Separation of enantiomers by gas chromatography. *J. Chromatogr., A* 906, 275-299.

Serra, S., Fuganti, C., Brenna, E., 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnol.* 23, 193-198.

Setkova, L., Risticovic, S., Pawliszyn, J., 2007. Rapid headspace solid-phase microextraction-gas-chromatographic-time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction I. Method development and optimization. *J. Chromatogr., A* 1147, 213-223.

Shaik, S., de Visser, S.P., Ogliaro, F., Schwarz, H., 2002. Two-state reactivity mechanisms of hydroxylation and epoxidation by cytochrome P-450 revealed by theory. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 556-567.

Shang, C., Hu, Y., Deng, C., Hu, K., 2002. Rapid determination of volatile constituents of *Michelia alba* flowers by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction. *J. Chromatogr., A* 942, 283-288.

Sligar, S.G., Makris, T.M., Denisov, I.G., 2005. Thirty years of microbial P450 monooxygenase research: Peroxo-heme intermediates-The central bus station in heme oxygenase catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 346-354.

Straathof, A.J.J., Panke, S., Schmid., 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 548-556.

Stumpf, B., Abraham, W.R., Kieslich, K. 1984. Process for the preparation of (+)- α -terpineol by microbiological conversion of limonene. DE3243090.

Takasago Perfumery Co. 1972. Biochemical isolation of l-menthol. GB1275180.

Tan, Q., Day, D.F., 1998. Bioconversion of limonene to α -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 96-101.

Tan, Q., Day, D.F., 1998. Organic co-solvent effects on the bioconversion of (R)-(+)-limonene to (R)-(+)- α -terpineol. *Process Biochem.* 33, 755-761.

- Tan, Q., Day, D.F., Cadwallader, K.R., 1998. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Process Biochem.* 33, 29-37.
- Tanaka, S., Yamamoto, J., Etsuno, J. 1997. Production of alpha-terpineol. JP9278693.
- Thomas, S.M., Di Cosimo, R., Nagarajan, V., 2002. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends in Biotechnol.* 20, 238-242.
- Tomotani, E.J, Vitolo, M., 2007. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. *J. Food Eng.* 80, 662-667.
- Tu, M., Lu, G., Zhang, Y. 2003. Microbe fermenting process of producing perfume phenylethanol. CN1403581.
- U.S. EPA, 2000. p-Menthane-3,8-diol (011550) Biopesticide Registration Eligibility Document. EPA, Washington.
- Urlacher, V.B., Schmid, R.D., 2006. Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformations. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 1-6.
- Van Beilen, J.B., Duetz, W.A., Schmid, A., Witholt, B., 2003. Practical issues in the application of oxygenases. *Trends in Biotechnol.* 21, 170-177.
- Van Beilen, J.B., Funhoff, E.G., 2005. Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 308-314.
- Van der Geize, R., Dijkhuizen, L., 2004. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 255-261.

- Van der Werf, M.J., Keijzer, P.M., van der Shaft, P.H., 2000. *Xanthobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene. J. Biotechnol. 84, 133-143.
- Van Dyk, M.S., Van Rensburg, E., Moleleki, N., 1998. Hydroxylation of (+)limonene, (-) α -pinene and (-) β -pinene by a *Hormonema* sp. Biotechnol. Lett. 20, 431-436.
- Vanek, T., Halik, J., Vankova, R., Valterova, I., 2005. Formation of *trans*-Verbenol and Verbenone from α -pinene Catalysed by Immobilised *Picea abies* Cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69, 321-325.
- Vanek, T., Valterová, I., Vaisart, T., 1999. Biotransformation of (*S*)-(-) and (*R*)-(+)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* plant cells. Phytochemistry 50, 1347-1351.
- Vatsyayan, P., Kumar, A.K., Goswami, P., Goswami, P., 2007. Broad substrate Cytochrome P450 monooxygenase activity in the cells of *Aspergillus terreus* MTCC 6324. Bioresour. Technol. In Press.
- Vidya, C.M., Agrawal, R., 2003. Production of verbenol, a high valued food flavourant from a fusant strain of *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol Biotechnol. 62, 421-422
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P., O'Gara, F., 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. Curr. Opin. Biotechnol. 12, 289-295.
- Walton, N.J., Mayer, M.J., Narbad, A., 2003. Molecules of interest. Vanillin. Phytochemistry 63, 505-515.
- Walton, N.J., Narbad, A., Faulds, C.B., Williamson, G., 2000. Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. Curr. Opin. Biotechnol. 11, 490-496.

Wang, J.Y. 2006. Method for synthesizing verbenol and verbenone with alpha-pinene. CN1821195.

Wang, X., Liu, Y-S., Nair, U.B., Armstrong, D.W., Ellis, B., 1997. Enantiomeric composition of monoterpenes in conifer resins. *Tetrahedron: Asymmetry* 8, 3977-3984.

Watanabe, I. 1982. Process for the production of acrylamide using microorganism. US4343900.

Watanabe, I., Ogawa, Y., Seki, S. 1989. Method for producing acrylamide using a microorganism. US4851342.

Watanabe, I., Sakashita, K., Ogawa, Y. 1983. Production of acrylamide using immobilized cells. US4421855.

World Health Organization. 2001. Cough and Cold Remedies for the Treatment of Acute Respiratory Infections in Young Children. WHO, Suiza.

Xu, M., Floyd, H.S., Greth, S.M., Chang, W-C.L., Lohman, K., 2004. Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 232-246.

Yadav, S., Srivastava, A.K., 2002. Kinetics and Mechanism of Copolymerization of α -terpineol with Methylmethacrylate in Presence of Azobisisobutyronitrile as an Initiator. *J. Polym. Res.* 9, 265-270.

Yadav, S., Srivastava, A.K., 2004. Synthesis of Functional and Alternating Copolymer of α -Terpineol with Butylmethacrylate. *Polym. –Plast. Technol. Eng.* 43, 1229-1243.

Yamaguchi, Y., Watanabe, I., Satoh, Y. 1984. Process for the continuous production of acrylamide or methacrylamide using microorganisms. US4440858.

Yamamoto, J., Tanaka, S., Etsuno, J. 1997. Production of alpha-terpineol. JP9278692.

Yoo, S.K., Day, D.F., 2002. Bacterial metabolism of α - and β - pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN. Process Biochem. 37, 739-745.

Yoo, S.K., Day, D.F., Cadwallader, K.R., 2001. Bioconversion of α - and β - pinene by *Pseudomonas* sp. strain PIN. Process Biochem. 36, 925-932.

Yoshizawa, K., 2002. Density functional theory study on the C-H bond activation of alkane by cytochrome P450. Int. Congress Series 1233, 191-195.

Yuri, T., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Kiyozuka, Y., Senzaki, H., 2004. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. Breast Cancer Res. Treat. 84, 251-260.

Zhang, Y., Hidajat, K., Ray, A.K., 2004. Optimal design and operation of SMB bioreactor: production of high fructose syrup by isomerization of glucose. Biochem. Eng. J. 21, 111-121.

Zhang, Y., Wu, D.R., Wang-Iverson, D.B., Tymiak, A.A., 2005. Enantioselective chromatography in drug discovery. Drug Discovery Today 10, 571-577.