

**BIOTRANSFORMACIÓN DEL LIMONENO POR MEDIO DE LA ENZIMA
CLOROPEROXIDASA DEL HONGO *Caldariomyces fumago***

GINNA PAOLA ARIAS MOYANO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

2008

**BIOTRANSFORMACIÓN DEL LIMONENO POR MEDIO DE LA ENZIMA
CLOROPEROXIDASA DEL HONGO *Caldariomyces fumago***

GINNA PAOLA ARIAS MOYANO

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

Director: Rodrigo Torres, Bioquímico, Ph. D.

Co-directora: Elena Stashenko, Química, Ph. D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

2008

AGRADECIMIENTOS

A Rodrigo Torres, por haber estado siempre disponible, aún cuando no lo estaba, brindándome su orientación y apoyo en la solución de cualquier dificultad.

A la Dra. Elena Stashenko, por sus valiosas enseñanzas, lecciones de vida, y por ser un ejemplo de perseverancia, dedicación y entusiasmo.

A mis padres y hermanos, por todo el apoyo recibido durante mi formación profesional.

A Carlos, por su ayuda, compañía y amor incondicional.

A Bonifacio y Cucho, por su fiel compañía durante el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres, Gustavo y Azucena, por el apoyo y las enseñanzas brindadas a lo largo de mi vida, y por ser mi ejemplo de lucha y amor.

A mis hermanos Cheche y Javier, por su compañía en cada uno de los momentos de mi vida.

A Carlos, por su apoyo, paciencia, compañía y amor en una de las etapas más importantes de mi vida.

A Bonifacio y Lucas, por estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles del proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. ESTADO DEL ARTE.	22
1.1. ENZIMAS.	22
1.2. CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN MEDIOS ORGÁNICOS.	26
1.2.1. Efecto de los solventes en la catálisis enzimática.	28
1.2.2. Efecto del agua en la catálisis enzimática.	30
1.3. PEROXIDASAS.	31
1.3.1. Cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i> .	32
1.4. TERPENOS.	37
1.4.1. Limoneno.	39
1.5. BIOTRANSFORMACIONES.	41
1.6. BIOTRANSFORMACIÓN DEL LIMONENO.	43
1.7. CROMATOGRAFÍA DE GASES.	45
1.8. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	47
1.9. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	48
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	50
2.1. ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA CLOROPEROXIDASA DEL HONGO <i>Caldariomyces fumago</i> .	50

2.2. REACCIONES DE BIOCONVERSIÓN DEL LIMONENO CON CLOROPEROXIDASA DEL HONGO <i>Caldariomyces fumago</i> .	51
2.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS.	51
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
3.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA CLOROPEROXIDASA DEL HONGO <i>Caldariomyces fumago</i> .	55
3.2. BIOTRANSFORMACIÓN DE R-(+)- Y S-(-)-LIMONENOS POR MEDIO DE LA ENZIMA CLOROPEROXIDASA.	58
3.2.1 Biotransformación de R-(+)-limoneno empleando acetonitrilo como solvente orgánico.	60
3.2.2. Biotransformación de R-(+)-limoneno, empleando metanol como solvente orgánico	71
3.2.3 Biotransformación del R-(+)-limoneno, empleando tetrahidrofurano como solvente orgánico.	82
3.2.4 Biotransformación del S-(-)-limoneno, empleando acetonitrilo como solvente orgánico.	96
3.2.5 Biotransformación del S-(-)-limoneno, empleando metanol como solvente orgánico.	105
3.2.6 Biotransformación del S-(-)-limoneno, empleando tetrahidrofurano como solvente orgánico.	114
3.3. EFECTO DE LOS SOLVENTES Y EL TIEMPO DE ADICIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA FORMACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE BIOTRANSFORMACIÓN	123
3.3.1. Productos de biotransformación del R-(+)-limoneno.	125
3.3.2. Productos de biotransformación del S-(-)-limoneno.	127
3.3.3. Variación en la concentración de monoterpenos cloro-oxigenados obtenidos, durante la biotransformación de R-(+)- y S-(-)-	130

limonenos.

4. CONCLUSIONES	133
5. RECOMENDACIONES	135
BIBLIOGRAFÍA	136
ANEXOS	146

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de las enzimas.	23
Tabla 2. Estados electrónicos del grupo prostético de la cloroperoxidasa [33].	34
Tabla 3. Reacciones catalizadas por cloroperoxidasa del hongo <i>Caldariomyces fumago</i> .	38
Tabla 4. Clasificación de terpenos, según unidades isoprénicas.	39
Tabla 5. Propiedades físicas y químicas del limoneno.	41
Tabla 6. Microorganismos usados en la biotransformación del limoneno, reportados en la literatura.	44
Tabla 7. Actividad catalítica de la enzima cloroperoxidasa.	58
Tabla 8. Composición química de los productos obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del R-(+)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo, usada como solvente orgánico.	66
Tabla 9. Cuantificación de los productos de biotransformación del R-(+)-limoneno, en acetonitrilo, usado como solvente.	72
Tabla 10. Composición química de los productos, obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del R-(+)-limoneno usando la mezcla agua:metanol como solvente orgánico.	79
Tabla 11. Cuantificación de los productos de biotransformación del R-(+)-limoneno con metanol, como solvente orgánico.	83
Tabla 12. Composición química de los productos, obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del R-(+)-limoneno en	91

la mezcla agua:tetrahidrofurano, usada como solvente orgánico.

Tabla 13. Cuantificación de los productos de biotransformación del R-(+)-limoneno, usando tetrahidrofurano como solvente. 95

Tabla 14. Composición química de los productos, obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del S-(-)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo usada como solvente orgánico. 102

Tabla 15. Cuantificación de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, usando acetonitrilo, como solvente. 106

Tabla 16. Composición química de los productos obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del S-(-)-limoneno, en la mezcla agua:metanol, usada como solvente orgánico. 111

Tabla 17. Cuantificación de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno con acetonitrilo, como solvente. 113

Tabla 18. Composición química de los productos obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del S-(-)-limoneno, en la mezcla agua:tetrahidrofurano usada como solvente orgánico. 120

Tabla 19. Cuantificación de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, usando con tetrahidrofurano como solvente. 124

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Enzimas: A. Estructura de proteínas; B. Fuerzas que estabilizan la estructura protéica [41].	27
Figura 2. Representación de los sistemas de reacción: A. Bifásico y B. Monofásico. (S = Sustrato; E = Enzima; P = Productos).	28
Figura 3. Efecto del agua en la actividad catalítica de la enzima en solventes orgánicos en concentraciones: A. Baja; B. Moderada; y C. Alta [39].	30
Figura 4. Estructuras químicas de los enantiómeros del limoneno.	40
Figura 5. Áreas de aplicación de procesos de biotransformación [26].	42
Figura 6. Enzima cloroperoxidasa del hongo <i>Caldariomyces fumago</i> .	50
Figura 7. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System</i> , acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies 5973 Network</i> , equipado con un puerto de inyección <i>split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent 7863</i> .	53
Figura 8. Actividad catalítica de la enzima cloroperoxidasa determinada para una dilución 1/1000.	57
Figura 9. Actividad catalítica de la enzima cloroperoxidasa determinada para una dilución 1/20.	57
Figura 10. Perfiles cromatográficos de los productos de la biotransformación de R-(+)-limoneno en la mezcla agua:acetonitrilo y el blanco de reacción, obtenidos por LLE con éter etílico, por	61

cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1 h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 8**. GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

Figura 11. Conversión de R-(+)-limoneno a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:acetonitrilo (ACN), usada como solvente. 66

Figura 12. Fórmulas estructurales de los productos de biotransformación de R-(+)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo, según su orden de elución en la columna cromatográfica DB5-MS (**Figura 10**). La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 8**. 68

Figura 13. Productos de biotransformación de R-(+)-limoneno, obtenidos en la mezcla agua:acetonitrilo. 69

Figura 14. Perfiles cromatográficos de los productos de la biotransformación de R-(+)-limoneno, en mezcla agua:metanol y el blanco de reacción, obtenidos por LLE con éter etílico, en cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 10**. GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV). 73

Figura 15. Conversión de R-(+)-limoneno a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:metanol, usada como solvente. 78

Figura 16. Fórmulas estructurales de los productos de la biotransformación de R-(+)-limoneno en la mezcla agua:metanol, según su orden de elución en los cromatogramas (**Figura 14**). Los nombres aparecen en la **Tabla 10**. 80

Figura 17. Productos de biotransformación del R-(+)-limoneno, 81

empleando la mezcla agua:metanol.

Figura 18. Perfiles cromatográficos de los productos de la biotransformación del R-(+)-limoneno en mezcla agua:tetrahidrofurano, y el blanco de reacción, obtenidos por LLE con éter etílico, en cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción sin Istd, **F.** Blanco de reacción con Istd. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 12.** GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV). 85

Figura 19. Conversión del R-(+)-limoneno a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:tetrahidrofurano, usada como solvente. 88

Figura 20. Fórmulas estructurales de los productos de biotransformación del R-(+)-limoneno en la mezcla agua:tetrahidrofurano, según su orden de elusión en la columna cromatográfica DB5-MS (**Figura 18**). La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 12.** 90

Figura 21. Productos de biotransformación del R-(+)-limoneno, empleando la mezcla de agua:tetrahidrofurano. 93

Figura 22. Perfiles cromatográficos de la biotransformación del S-(-)-limoneno, en mezcla agua:acetonitrilo y el blanco de reacción, obtenidos por LLE con éter etílico, a cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 14.** GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV). 96

Figura 23. Conversión del S-(-)-limoneno, a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:acetonitrilo, usada como solvente. 99

- Figura 24.** Fórmulas estructurales de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo, según su orden de elución en los cromatogramas (**Figura 22**). Los nombres aparecen en la **Tabla 14**. 101
- Figura 25.** Productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, empleando la mezcla agua:acetonitrilo, como solvente. 104
- Figura 26.** Perfiles cromatográficos de los productos de la biotransformación del S-(-)-limoneno, en mezcla agua:metanol y el blanco de reacción, obtenidos por LLE con éter etílico, a cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 16**. GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV). 107
- Figura 27.** Conversión del S-(-)-limoneno a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:metanol, usada como solvente. 110
- Figura 28.** Fórmulas estructurales de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno en la mezcla agua:metanol, según su orden de elución en los cromatogramas (**Figura 26**). Los nombres aparecen en la **Tabla 16**. 112
- Figura 29.** Productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, empleando la mezcla agua:metanol, como solvente. 113
- Figura 30.** Perfiles cromatográficos de los productos de la biotransformación del S-(-)-limoneno, en mezcla agua:tetrahidrofurano y del blanco de reacción, obtenidos por LLE con éter etílico, a cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción sin Istd, **F.** Blanco de reacción con Istd. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 18**. GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV). 115

Figura 31. Conversión del S-(-)-limoneno a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:tetrahidrofurano, usada como solvente.	118
Figura 32. Fórmulas estructurales de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno en la mezcla agua:tetrahidrofurano, según su orden de elución en los cromatogramas (Figura 30). Los nombres aparecen en la Tabla 18 .	119
Figura 33. Productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, empleando la mezcla agua:tetrahidrofurano como solvente.	122
Figura 34. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación del R-(+)-limoneno, a una hora (1 h) de la reacción.	126
Figura 35. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación del R-(+)-limoneno, a las 5 h de reacción.	127
Figura 36. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación del R-(+)-limoneno, a las 10 h de reacción.	128
Figura 37. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación del S-(-)-limoneno, a hora (1 h) de reacción.	129
Figura 38. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación de S-(-)-limoneno, a las 5 h de reacción.	130
Figura 39. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación del S-(-)-limoneno, a las 10 h de reacción.	131
Figura 40. Variación de la concentración de los productos durante la biotransformación de limonenos, realiza en la mezcla agua:acetonitrilo durante 1 h.	132

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Ejemplos de reacciones de oxidación catalizadas por peroxidadas [82].	32
Esquema 2. Mecanismo de reacción: A. Ciclo catalítico de la cloroperoxidasa; B. Mecanismo general de reacción catalizada por CPO [5, 69].	35
Esquema 3. Formación de un monoterpeno a partir de dos moléculas de isopreno.	37
Esquema 4. Algunas de las principales rutas de biotransformación del limoneno [59].	46
Esquema 5. Formación de diclorodimedona a partir de monoclorodimedona bajo las condiciones descritas por Morris y Hager [62].	56
Esquema 6. Mecanismo general de reacción de sustratos aceptores de halógenos con cloroperoxidasa [54].	70

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

CPO	Cloroperoxidasa.
CCPO	Cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i> .
ee	Exceso enantiomérico.
GC	<i>Gas-Chromatography</i> (Cromatografía de gases).
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Espectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
h	Hora (s)
i.e.	<i>Id ets.</i> (es decir, o sea)
MCD	Monoclorodimedona.
DCD	Diclorodimedona.
ACN	Acetonitrilo.
THF	Tetrahidrofurano.
CoA	Coenzima A.
D.I.	Diámetro interno, mm.
e.g.	Por ejemplo.
d_f	Espesor de la fase estacionaria, μm.
Istd	<i>Internal Standar</i> (Estándar interno).
EV	Electrón – Voltio.
m/z	Relación masa/carga.
°C	Grado(s) Celsius
mL	Mililitro(s).
mM	Milimolar.
μL	Microlitro(s).
μm	Micrometro(s).
min	Minuto(s).
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido).

RESUMEN:

TÍTULO: BIOTRANSFORMACIÓN DEL LIMONENO POR MEDIO DE LA ENZIMA CLOROPEROXIDASA DEL HONGO *Caldariomyces fumago**

Autora: Ginna Paola Arias Moyano**

Palabras clave: Cloroperoxidasa, Limoneno, Biotransformación, *Caldariomyces fumago*.

Las biotransformaciones de productos naturales constituyen un área de gran interés farmacéutico, dado que es posible potenciar su actividad biológica a través de reacciones regio- y enantioselectivas.

En la presente investigación se llevó a cabo la biotransformación enzimática de los monoterpenos enantioméricos, R-(+)- y S-(-)-limonenos, por medio de la enzima cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*. Las reacciones enzimáticas se realizaron en mezclas de acetonitrilo:agua, tetrahidrofurano:agua y metanol:agua, y en diferentes intervalos de adición del agente oxidante (peróxido de hidrógeno) en función del tiempo de reacción (1, 5, 10 y 24 h). Los productos obtenidos fueron extraídos con éter etílico, se secaron con sulfato de sodio y, finalmente, se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, con el fin de realizar una identificación de los productos obtenidos.

Los resultados logrados para los dos monoterpenos empleados muestran que el intervalo de adición del peróxido de hidrógeno y el tipo de solvente orgánico, afectan la actividad catalítica de la enzima, lo que se ve reflejado en los porcentajes de conversión de los enantiómeros y en los productos de biotransformación obtenidos. Cuando se emplearon metanol y tetrahidrofurano para la disolución del limoneno, se alcanzaron número de productos biotransformados y el porcentaje de bioconversión del limoneno más bajos, mientras que en los ensayos en los que se empleó acetonitrilo como solvente orgánico, se obtuvieron valores de conversión cercanos al 68%. Finalmente, se identificaron las moléculas *trans*-óxido de limoneno, *cis*-dihidrocarvona, *trans*-dihidrocarvona, *trans*-carveol y 2-cloro-4-(1-metiletetil)-ciclohex-5-en-1-ona, entre otros, como productos de biotransformación de los dos enantiómeros del limoneno empleados en esta investigación.

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de ciencias, Escuela de Química. Directores Rodrigo Torres y Elena E. Stashenko.

ABSTRACT:

TITLE: BIOTRANSFORMATION OF LIMONENE BY THE ENZYME CHLOROPEROXIDASE FROM THE *Caldariomyces fumago* MOLD*

Author: Ginna Paola Arias Moyano**

Keywords: Chloroperoxidase, Limonene, Biotransformation, *Caldariomyces fumago*.

Natural product biotransformation is an area of great pharmaceutical interest, since it is possible to enhance their biological activity by means of regio- and enantioselective reactions.

The enzymatic biotransformation of R-(+) - and S-(-)-limonene was carried out in the current investigation with a chloroperoxidase enzyme obtained from the fungus *Caldariomyces fumago*. The enzymatic reactions were conducted in mixtures of acetonitrile:water, tetrahydrofuran:water and methanol:water, and at different intervals of oxidizing agent (hydrogen peroxide) addition (for total reaction times of 1, 5, 10 and 24 h). The products obtained were extracted with ethyl ether, were dried with sodium sulfate and, finally, were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry, in order to identify the products obtained.

The results achieved for both monoterpenes showed that the interval of hydrogen peroxide addition and the type of organic solvent, affected the catalytic activity of the enzyme, which was reflected in enantiomer conversion and in the biotransformation products obtained. When methanol and tetrahydrofuran were used for limonene dissolution, the number of biotransformation products and the limonene bioconversion percentage were the lowest. When acetonitrile was used as organic solvent, up to 68% conversion was achieved. Finally, the following were identified among the biotransformation products of the two limonene enantiomers employed: *trans*-limonene oxide, *cis*-dihydrocarvone, *trans*-dihydrocarvone, *trans*-carveol and 2-chloro-4-(1-methylethenyl)-cyclohex-5-in-one-1.

* Undergraduate project

** Industrial University of Santander, Faculty of Science, School of Chemistry.

Directors: Rodrigo Torres and Elena E. Stashenko.

INTRODUCCIÓN

Las biotransformaciones de productos naturales constituyen un área de gran interés farmacéutico, dado que es posible potenciar su actividad biológica a través de reacciones biocatalíticas altamente regio y enantioselectivas. En especial, las biotransformaciones de terpenos son muy estudiadas, porque permiten la producción de compuestos enantioméricamente puros bajo condiciones de reacción suaves, que pueden ser utilizados en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética, entre otras.

Los monoterpenos representan un grupo abundante de sustancias quirales, que pueden ser transformadas en componentes bioactivos de gran valor agregado, tales como saborizantes, fragancias y fármacos [14]. Además, gracias a la gran biodisponibilidad, fácil obtención, y a la enantio- y estereoselectividad de este método, estos terpenoides son valiosos productos de partida para la obtención biotecnológica de diferentes compuestos.

Las reacciones de biotransformación pueden ser llevadas a cabo por microorganismos o través de reacciones enzimáticas, utilizando enzimas oxidativas como mono- o di-oxigenasas o peroxidasas. Las enzimas son moléculas altamente específicas tanto en la reacción que catalizan, como en la selección de las sustancias reaccionantes, denominadas sustratos. Además son de gran interés, ya que determinan la pauta de las transformaciones químicas, también son raras las reacciones colaterales, que conducen a la formación de productos secundarios, por lo que el uso de estos biocatalizadores en las diferentes industrias ha ido aumentando a lo largo de los últimos años.

La enzima cloroperoxidasa (CPO) del hongo *Caldariomyces fumago* es una peroxidasa de origen marino muy funcional, ya que no sólo cataliza las reacciones “clásicas” de las peroxidases, sino que también reacciones de transferencia de oxígeno y halogenaciones con una alta especificidad de sustrato [40, 45, 57]. *In vivo*, esta enzima interviene en la síntesis del caldariomicina, un compuesto halogenado con propiedades antimicrobiales. *In vitro*, la enzima cataliza un número importante de reacciones químicas, tales como las reacciones enantioselectivas de transferencia de oxígeno y las halogenaciones oxidativas [21].

La gran aplicabilidad tanto académica, como industrial, que tienen las biotransformaciones catalizadas por enzimas, hace necesario optimizar estos procesos de biotransformación, con el fin de aumentar el rendimiento y el exceso enantiomérico (*ee*) de los productos. Por esta razón, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la capacidad de biotransformación del limoneno por la enzima cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* en diferentes medios orgánicos e intervalos de adición del peróxido de hidrógeno durante diferentes tiempos.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. ENZIMAS

El uso de biocatalizadores en las transformaciones microbiológicas es un área de la biotecnología que continúa en expansión gracias a la eficiencia y especificidad del proceso. Los biocatalizadores son sustancias que alteran la energía de activación de una reacción química, haciendo que ésta sea más rápida o más lenta.

Una enzima es un catalizador biológico y, como todos los catalizadores, aumentan la rapidez de una reacción química sin sufrir un cambio químico permanente en sí mismas. Un catalizador influye en la rapidez de una reacción química pero no afecta el equilibrio de ésta.

Las enzimas, sin embargo, exhiben muchas propiedades que difieren de las mostradas por los catalizadores en general. Las tres propiedades más importantes son su alto poder catalítico, su especificidad y la capacidad de regular su actividad catalítica mediante diversos compuestos de origen natural [9].

Las propiedades de las enzimas se derivan de su estructura proteica, siendo la principal propiedad su capacidad catalítica. La capacidad catalítica de una enzima depende de su estructura nativa. Dicha configuración es el resultado de muchas fuerzas de interacción como puentes de hidrógeno, interacciones apolares y los enlaces iónicos.

La clasificación de las enzimas se lleva a cabo teniendo en cuenta su acción catalítica específica. Se distinguen así 6 grandes grupos o clases (Ver **Tabla 1**) [26].

Tabla 1. Clasificación de las enzimas.

CLASE	TIPO DE REACCIÓN	EJEMPLO
Ligasas	Síntesis	Ligasa X-Y
Isomerasas	Isomerización	Racemasas
Liasas	Reacciones de eliminación	Sustrato grupo liasa
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis	Esterasas
Transferasas	Transferencia de grupo	Transaldolasas
<i>Óxidoreductasas</i>	<i>Oxidación/reducción</i>	<i>Peroxidasas</i>

Las enzimas catalizan ciertas reacciones y logran algunas transformaciones químicas, difíciles de obtener mediante el empleo de tratamientos químicos convencionales. Cada una de ellas cataliza un sólo tipo de reacción, y actúa sobre un único sustrato gracias a que su capacidad catalítica viene de yuxtaponer los sustratos en orientaciones favorables dentro de los complejos enzima-sustrato (ES). Estos complejos enzima-sustrato se forman por la combinación de la enzima y el sustrato, mediante una reacción reversible, en la que se forma el complejo de transición ES y, consecuentemente el producto de reacción (P) (Ver **Ecuación 1**).

Cuando se forma este producto, se regenera de nuevo la enzima y queda disponible para combinarse con otra molécula de sustrato [9].



Ecuación 1.

Las moléculas de sustrato se unen al sitio activo de la enzima, donde tiene lugar la catálisis. El sitio activo comprende un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y un

sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de reacción [14].

Las siguientes son algunas generalidades del sitio o centro activo [77]:

1. El centro activo es una porción relativamente pequeña del volumen total de la enzima. Muchos de los residuos de aminoácidos no están en contacto con el sustrato.
2. Es una estructura tridimensional formada por grupos que proceden de distintas partes de una secuencia lineal de aminoácidos.
3. Los sustratos se unen a las enzimas por numerosas fuerzas débiles como enlaces electrostáticos, de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas.
4. Los centros activos son hoyos o hendiduras. En todas las enzimas de estructura conocida, las moléculas de sustrato quedan ligadas a una hendidura de la cual el agua ha quedado normalmente excluida, salvo que sea un componente de la reacción. El carácter no polar de la hendidura aumenta la afinidad por el sustrato. Además, la hendidura crea un microambiente en el cual ciertos residuos polares adquieren propiedades especiales para su función catalítica.
5. La especificidad del enlace depende de la disposición debidamente definida de los átomos del centro activo, por lo que una molécula de sustrato debe tener la forma adecuada para introducirse al centro.

La mayoría de las enzimas, a diferencia de los catalizadores químicos, son altamente específicas en cuanto a la naturaleza del sustrato (S) que utilizan y al tipo de reacción que catalizan. Algunas enzimas son más específicas que otras. Así, las peptidasas, fosfatasas y esterases utilizarán una amplia variedad de sustratos siempre que éstos contengan el enlace químico requerido, a saber: enlace peptídico, unión fosfato éster

y enlace carboxilato éster, respectivamente. A menudo, se encuentra baja la especificidad con las enzimas degradativas, pero rara vez con las enzimas biosintéticas. Otro grupo de enzimas, por ejemplo, la hexocinasa, son intermedias entre estos dos extremos que exhiben especificidad de grupo. Así, la hexocinasa cataliza la fosforilación de diversos azúcares siempre que sean de aldohexosas [9].

Una de las propiedades más sobresalientes de las enzimas como biocatalizadores es su alta especificidad por el sustrato. Existen tres tipos de especificidad [9]:

- a) **Especificidad absoluta:** Existen enzimas que sólo aceptan una molécula como sustrato, por ejemplo, la acetilcolinesterasa, que actúa sobre los ésteres de colina.

- b) **Especificidad de grupo:** Son enzimas que catalizan el mismo tipo de reacción con varios sustratos; pero que tienen en común un mismo grupo químico, el cuál es el directamente modificado en la reacción, por ejemplo, la esterasa, que actúa sobre los grupos éster.

- c) **Estereoespecificidad:** Está relacionada con el arreglo espacial de las moléculas de los sustratos (esteroisomería). Así, un gran número de enzimas son específicas para los isómeros ópticos L o D (especificidad óptica).

La estabilidad de una enzima depende de su estructura nativa, con la cual presenta una actividad catalítica. La estructura o conformación nativa de una proteína es la disposición espacial ordenada que adquieren todos sus átomos cuando se sintetiza en el medio biológico. Viene condicionada por el orden o secuencia en que se encuentran unidos sus residuos de aminoácidos por medio de enlaces peptídicos (estructura primaria). La conformación que adopta la proteína (estructura terciaria), es una suma

de unos ordenamientos espaciales específicos tipo helicoidal, de hojas plegadas y giros (estructura secundaria). Estas estructuras se establecen mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre los átomos de los enlaces peptídicos y otra serie de fuerzas, unas de naturaleza covalente como los enlaces de puentes disulfuro, y otras, por enlaces de naturaleza no covalente (Ver **Figura 1**) [14].

Cuando la enzima se desestabiliza por cambios en las condiciones físicas o químicas del medio que la rodea, pierde su estructura ordenada; se rompen muchas de las interacciones y se forman nuevos enlaces con las moléculas de solvente que envuelven la estructura proteica. Es decir, la enzima se desnaturaliza, pierde su forma nativa, se desordena y cambia su actividad [14].

1.2. CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN MEDIOS ORGÁNICOS

El uso de solventes orgánicos como medio de reacción ha aumentado enormemente la diversidad de la catálisis enzimática, especialmente, en diferentes aplicaciones de la síntesis orgánica. La relación entre la hidratación enzimática y la actividad catalítica es muy importante, debido a que el agua interviene en las interacciones no covalentes que ayudan a la conformación catalíticamente activa de la enzima [33].

Una de las razones para el uso de medios orgánicos en las reacciones enzimáticas, es la baja solubilidad que presentan los sustratos en agua. El uso de una pequeña cantidad de solvente orgánico en el medio de reacción es una buena alternativa para aumentar la solubilidad de los sustratos hidrofóbicos, y, de esta manera, hacer viable la reacción. Pueden usarse solventes orgánicos miscibles o inmiscibles con agua. En este caso, se obtiene un sistema bifásico en el cual la enzima y otras

sustancias hidrofílicas están presentes en la fase acuosa, mientras que los sustratos hidrofóbicos y los productos de reacción permanecen en la fase orgánica.

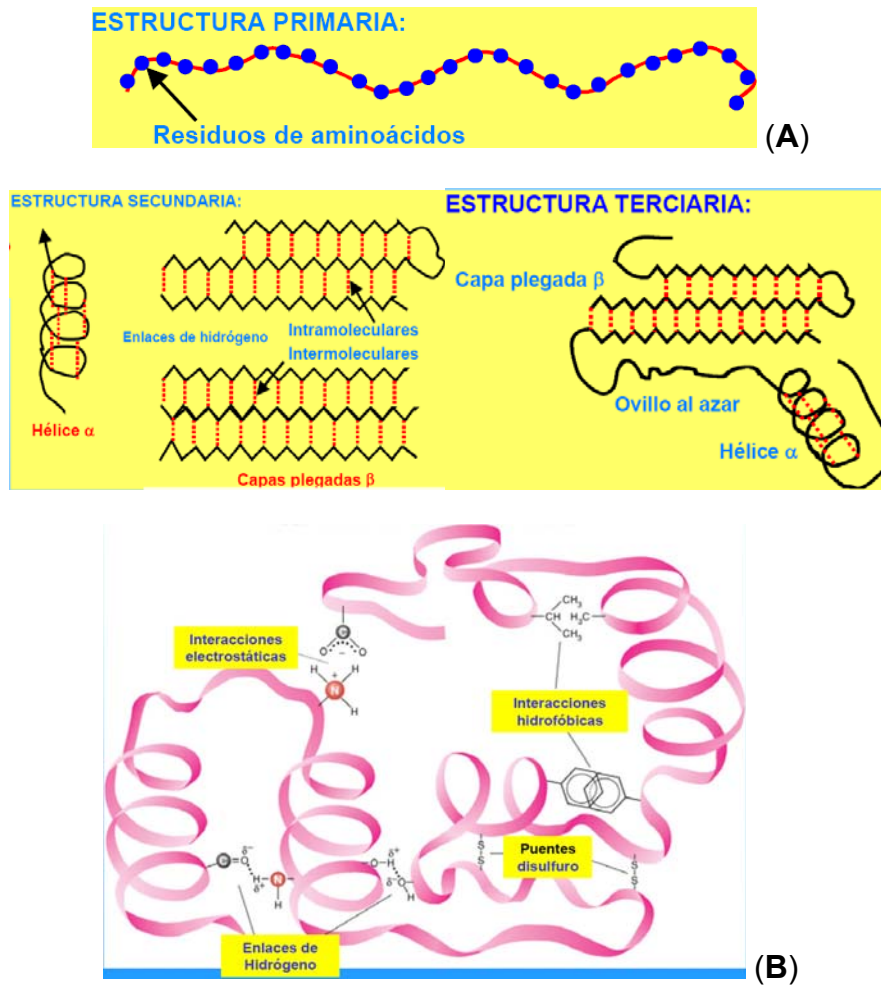


Figura 1. Enzimas: **A.** Estructura de las proteínas, **B.** Fuerzas que estabilizan la estructura protéica [43].

De acuerdo con la bioconversión ocurrida, los sustratos deben reaccionar con la enzima en la fase acuosa y después de la reacción los productos hidrofóbicos son transferidos hacia la fase orgánica. Estas reacciones no sólo se presentan en estos sistemas, también se pueden dar en sistemas monofásicos en los cuales el solvente orgánico y las moléculas de agua

se distribuyen en el sitio catalítico de la enzima [50]. En la **Figura 2**, se observan los sistemas esquemáticamente presentados de reacción, que se presentan con el uso de solventes durante la catálisis enzimática.

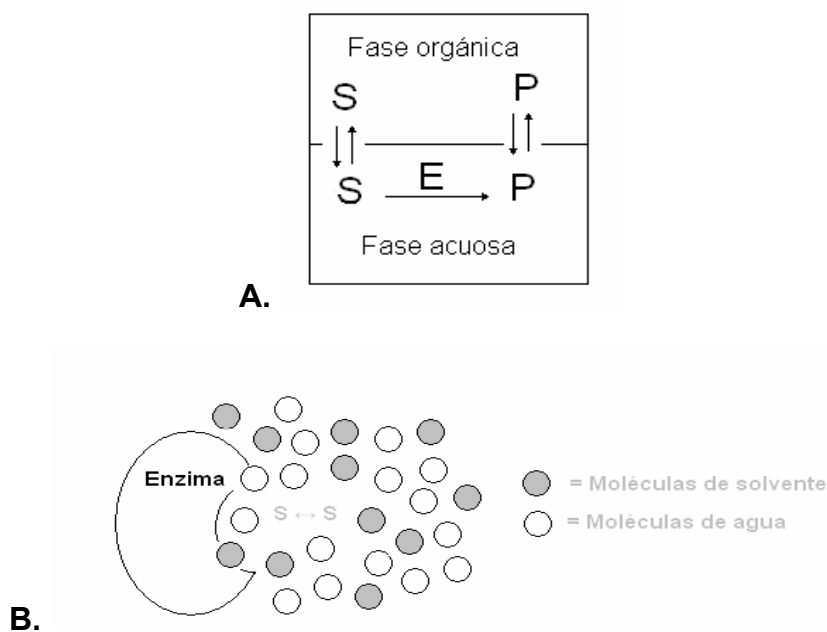


Figura 2. Representación de los sistemas de reacción: **A.** Bifásico y **B.** Monofásico. (S = Sustrato; E = Enzima; P = Productos)

Las reacciones enzimáticas en medios orgánicos han adquirido un rápido desarrollo en las áreas investigativa e industrial. Las enzimas en medios orgánicos exhiben cambios en sus propiedades, tales como el aumento de la termoestabilidad, la especificidad modificada y la capacidad de catalizar reacciones, que son cinéticamente imposibles en soluciones acuosas [53].

1.2.1. Efecto de los solventes en la catálisis enzimática. En la catálisis enzimática en medios orgánicos, la naturaleza del solvente influye sobre la actividad y estabilidad de la enzima. La polaridad del solvente juega un papel muy importante, porque un descenso en la constante dieléctrica del medio permitirá un aumento de las interacciones electrostáticas entre

residuos de aminoácidos cargados de la enzima, lo que conduce a una disminución de su flexibilidad. Esta flexibilidad es necesaria para los procesos catalíticos, ya que una flexibilidad reducida va acompañada de una disminución en la actividad catalítica [50].

La presencia de un solvente orgánico constituye un riesgo de activación de la enzima. Cuando se utilizan solventes miscibles con agua, concentraciones moderadas de éstos pueden usarse, sin provocar algún efecto negativo sobre la actividad de la enzima. Sin embargo, la adición de grandes cantidades, puede provocar su inactivación [48]. La presencia de los solventes a inactivar las enzimas no sólo depende de su hidrofobicidad, sino de otras características fisicoquímicas, tales como la capacidad de solvatar y la geometría molecular [48].

Los solventes orgánicos afectan la actividad catalítica de las enzimas, ya que son capaces de separar las moléculas de agua unidas a su superficie. Además, desestabilizan el sitio activo provocando una disminución de la polaridad local, y, por tanto, aumentando las repulsiones electrostáticas entre la enzima y el sustrato, disminuyendo la probabilidad que se unan. Este efecto del solvente de separar las moléculas de agua de la superficie se ha relacionado con la polaridad y el grado de hidrofobicidad del mismo [26]. Los solventes orgánicos interactúan directa o indirectamente con los sustratos y productos afectando la actividad enzimática. Estos solventes producen variaciones en las concentraciones de los sustratos y productos en la capa acuosa alrededor de la enzima, interfiriendo de esta manera la reacción [50].

Los solventes orgánicos pueden interactuar directa o indirectamente con los sustratos y productos, generando variaciones en las concentraciones de éstos en la capa acuosa alrededor de la enzima y afectando la actividad enzimática.

1.2.2. Efecto del agua en la catálisis enzimática. La cantidad de agua en el sistema catalizador/medio de reacción influye en la actividad catalítica de la enzima, como se observa en la **Figura 3**. El agua se distribuye entre las distintas fases presentes en el medio de reacción. Parte del agua se une a la enzima, otra parte se disuelve en el solvente y una tercera en el sustrato. El grado de hidratación de la enzima es un parámetro clave en su actividad [15].

El agua unida a la superficie de la molécula proteínica activa la enzima, aumentando la flexibilidad interna de la misma, sin embargo, algunas veces el agua puede actuar como sustrato en la reacción, provocando una menor posibilidad de contacto entre el sustrato de interés y la enzima [50].

Es necesario que exista una capa delgada de agua alrededor del biocatalizador con el fin de preservar la estructura tridimensional de la proteína en una forma activa catalíticamente. Cuando se agrega agua a un sistema enzima-solvente, ella se reparte entre el solvente y la enzima. La cantidad de agua adherida a la superficie de la enzima controla significativamente la actividad y, en un menor grado, el contenido de agua en el sistema total [88].

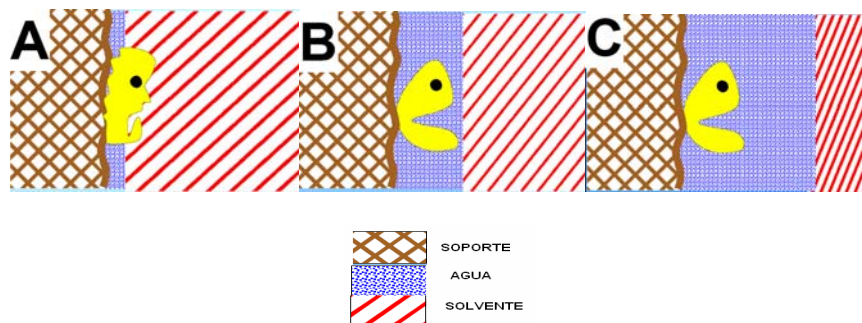


Figura 3. Efecto del agua en la actividad catalítica de la enzima en solventes orgánicos en concentraciones: **A.** Baja; **B.** Moderada; y **C.** Alta [39].

1.3. PEROXIDASAS

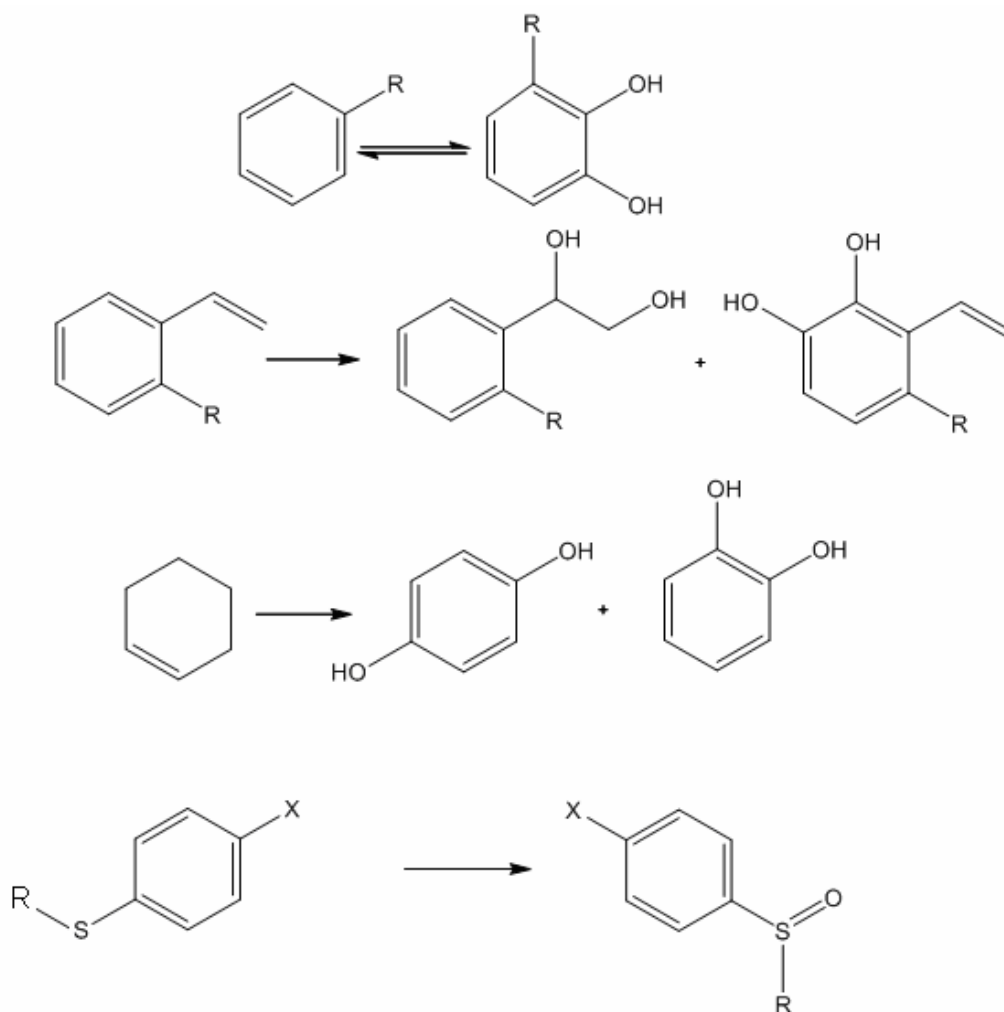
Las peroxidasas son glicoproteínas globulares con un peso molecular aproximado de 42000 Da, en las cuales la porción proteica corresponde aproximadamente a 34000 Da, el resto del peso molecular está constituido por el grupo prostético, dos iones de calcio y algunos ligandos superficiales enlazados [7].

Las peroxidasas son enzimas que se encuentran en plantas, animales o células microbianas. La mayoría de las peroxidasas son hemoproteínas, que contienen un grupo prostético hemo unido fuertemente a la cadena polipeptídica. El hemo es un complejo de protoporfirina IX e iones ferrosos (Fe^{2+}) [85].

Las peroxidasas reaccionan vía radical libre, usando peróxido de hidrógeno como agente oxidante en las reacciones. En este mecanismo el átomo de hierro se comienza a oxidar y se forman especies reactivas Fe(IV)-O y un intermediario radical del grupo hemo; el sustrato reducido después reacciona con el radical hemo y se forma el producto de la oxidación y regenerando el ion Fe(III) [12].

Estas enzimas pueden catalizar un amplio rango de oxidaciones, incluyendo la oxidación de heteroátomos en numerosos compuestos, epoxidación y reducción de hidroperóxidos, gracias a que tienen altos potenciales redox y son agentes oxidantes presentes [80]. Además, pueden catalizar halogenaciones de diferentes sustratos orgánicos, empleando iones Cl^- , Br^- y I^- [59].

En el **Esquema 1**, se presentan algunas de las reacciones más comunes catalizadas por las peroxidasas.



Esquema 1. Ejemplos de reacciones de oxidación catalizadas por peroxidasas [85].

La actividad catalítica de estas enzimas depende fuertemente de la concentración del peróxido de hidrógeno en solución, el cual puede llegar a ser un agente inactivante. Las peroxidasas son enzimas abundantes en la naturaleza, que pueden ser aisladas de diferentes fuentes, presentando diferentes actividades catalíticas y estabilidad según sea su origen.

Entre las peroxidasas de origen microbiano, las provenientes de hongos son los mejores biocatalizadores conocidos hasta la fecha, entre las que se encuentra la enzima cloroperoxidasa del hongo marino *Caldariomyces fumago*, empleada en esta investigación. Estas enzimas inicialmente

fueron aisladas de organismos marinos y son reconocidas por su capacidad de halogenar sustratos en presencia de haluros y peróxido de hidrógeno. En las reacciones de estas enzimas, el ion haluro se enlaza inicialmente al sitio activo, y, subsecuentemente, comienza a incorporarse al sustrato.

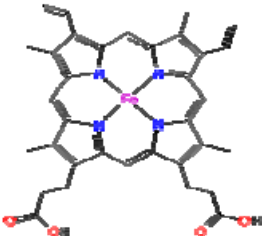
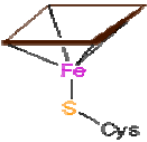
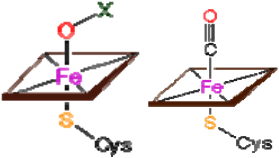
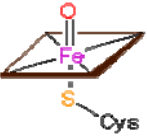
1.3.1. Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. En la búsqueda de nuevos compuestos con mayor potencial biológico y valor agregado, desde hace muchos años se han ido realizando diferentes investigaciones en el campo de las biotransformaciones, en las cuales se usan enzimas como catalizadores. Las enzimas han sido probadas como catalizadores multifuncionales para la síntesis de compuestos valiosos, por ejemplo, compuestos carbonílicos y aminoácidos, para la investigación y las diferentes industrias [52].

La cloroperoxidasa (CPO) obtenida a partir del hongo marino *Caldariomyces fumago*, es una haloperoxidasa que ha mostrado ser un biocatalizador muy usado por su alto rendimiento y la selectividad enantiomérica. Entre el grupo de las haloperoxidasas es la que presenta mayor actividad específica. Sin embargo, es altamente sensible a la temperatura y puede llegar a inhibirse por concentraciones altas del agente oxidante peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [20].

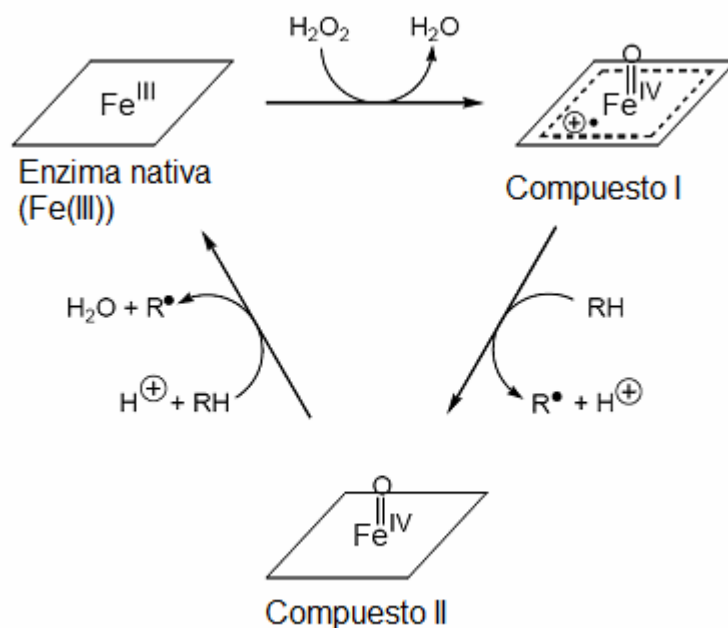
El uso de la CPO se extiende a campos tales como diagnóstico analítico, elaboración de productos farmacéuticos, control ambiental, remoción de aminas aromáticas carcinogénicas de los efluentes industriales, de fenoles a partir de residuos acuosos y de productos coloreados y de aromáticos volátiles a partir de bebidas acuosas [69]. Además, se ha demostrado que esta enzima es capaz de catalizar reacciones de oxidación de una gran variedad de compuestos fenólicos [69].

En la **Tabla 2**, se muestran los estados de oxidación que presenta esta enzima durante su ciclo catalítico.

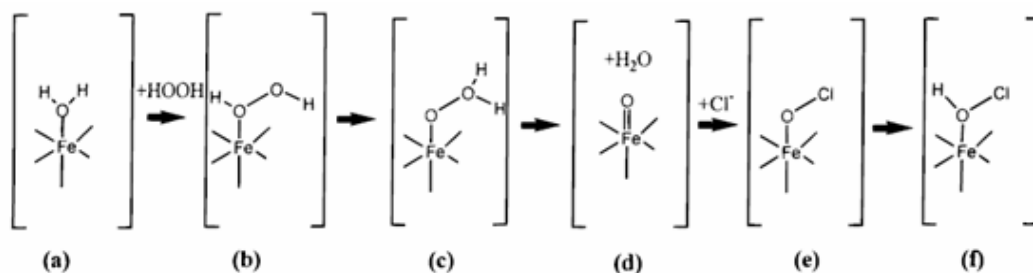
Tabla 2. Estados electrónicos del grupo prostético de la cloroperoxidasa [35].

Grupo Hemo	Coordinación del Fe hemo	Estados de oxidación/espin Fe	
		$\text{Fe}^{\text{II}} (S=2);$ $\text{Fe}^{\text{III}} (S=5/2)$	
	Pentacoordinado		$\text{Fe}^{\text{II}} (S=0);$ $\text{Fe}^{\text{III}} (S=1/2)$
	Hexacoordinado		$\text{Fe}^{\text{IV}} (S=1)$
	Hexacoordinado		

El ciclo catalítico de reacción de esta enzima es iniciado por el peróxido de hidrógeno, el cual se une al hierro pentacoordinado para producir el compuesto I, un catión-radical- π porfirínico, que contiene Fe^{IV} (Ver **Esquema 2**). Luego, es posible se den tres rutas diferentes: 1. En una el compuesto I sufrirá una reducción para formar el compuesto II, el cual contiene un centro oxiferril coordinado a un ligando porfirínico dianiónico; 2. En otra ruta, es reducido al estado férrico estable con la oxidación de un electrón del sustrato; y finalmente, 3. En la tercera ruta, la oxidación de un donador de electrones produce O_2 y retorna a la forma del compuesto I, para volver a su estado nativo más estable [58].



(A)



(B)

Esquema 2. Mecanismo de reacción: **A.** Ciclo catalítico de la cloroperoxidasa; **B.** Mecanismo general de reacción catalizada por CPO [5, 72].

El problema de las aplicaciones sintéticas de la cloroperoxidasa, es la disminución de su actividad catalítica en presencia de un exceso de sustrato y de agente oxidante. Empleando peróxido de hidrógeno, es posible que ocurra una inhibición enzimática en la que la velocidad de reacción inicialmente crece con el aumento de la concentración de este agente oxidante, y luego cae, después de alcanzar un máximo [4]. El mecanismo de inactivación de la enzima cloroperoxidasa ha sido investigado con el objetivo de mejorar la utilidad práctica de este

biocatalizador en la oxidación de hidrocarburos. Aunque el mecanismo de inactivación de la CPO por agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno no ha sido completamente elucidado, la inactivación de las típicas peroxidases, por ejemplo, la peroxidasa del rábano, en particular, sí se observa en la ausencia de sustratos reductores; es un proceso común en las reacciones de biotransformación. En tales sistemas, el peróxido de hidrógeno interactúa con la enzima mediante el mecanismo mostrado en el **Esquema 2** [68, 76].

En años recientes, se ha ido reconociendo a esta hemo peroxidasa por su gran estereoselectividad, que resulta ser muy útil en síntesis orgánica [49, 65]. Así, por ejemplo, se ha usado en epoxidación de olefinas con hidroperóxidos, debido a que los epóxidos quirales son intermediarios importantes en la síntesis asimétrica de compuestos biológicamente activos. De igual forma, se han estudiado las reacciones de transferencia de oxígeno al doble enlace carbono-carbono en un gran rango de monoolefinas arílicas, y los efectos en la posición del doble enlace a lo largo de la cadena, la estereoquímica *cis-/trans* en la enantioselectividad y reactividad de la enzima se han observado en diferentes reacciones [73]. En 1979, Corbett y colaboradores, demostraron la capacidad catalítica que tiene esta enzima, en reacciones de oxidación de arilaminas, empleando peróxido de hidrógeno como agente oxidante [22].

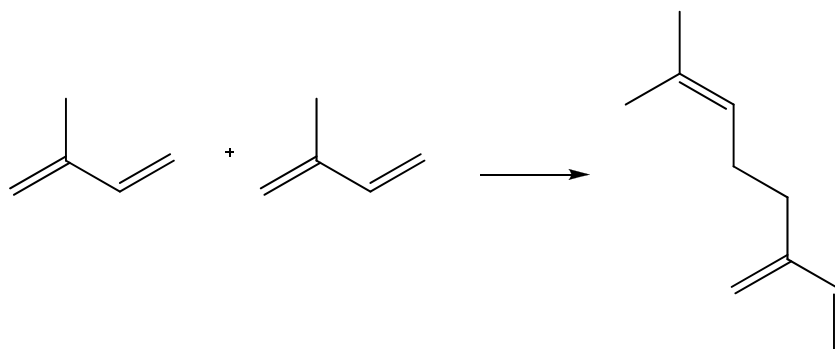
A medida que se conoce más acerca del alto potencial de esta enzima, se han estudiado los tipos de sustratos y las condiciones de reacción más favorables para estas bioconversiones. Varias investigaciones en las que se estudian diferentes tipos de reacciones, que pueden ser catalizadas por esta haloperoxidasa, son halogenación, oxidación asimétrica enantioselectiva, dehalogenación y epoxidación, entre otras [11, 16, 41, 45, 49, 57, 73, 74].

En la **Tabla 3**, se presentan algunas de las reacciones en las cuales emplearon la enzima cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* como catalizador.

1.4. TERPENOS

Los terpenos constituyen uno de los grandes grupos de compuestos secundarios presentes en una amplia proporción en el reino vegetal. Entre ellos, se encuentran los metabolitos secundarios, como los componentes de esencias, bálsamos y resinas, y un importante grupo de metabolitos considerados fisiológicamente como primarios. Estas sustancias naturales tradicionalmente conocidas como derivados del 2-metil-butadieno (isopreno), son los principales constituyentes de los aceites esenciales presentes en muchas familias de plantas, y se usan como aditivos en comidas, como fragancias en perfumería, en aromaterapia y en medicina tradicional y alternativa. La clasificación de los terpenos, basada en la consideración, que ellos son derivados del isopreno. El verdadero precursor de esta familia de sustancias es el ácido mevalónico (ácido 3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), el cual proviene de la acetil coenzima A [58].

Las unidades de isopreno se unen formando cadenas acíclicas y ciclos (mono-, di-, tri-, etc) de varios átomos de carbono (Ver **Esquema 3**).



Esquema 3. Formación de un monoterpene a partir de dos moléculas de isopreno [58].

Tabla 3. Reacciones catalizadas por cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*.

Investigadores	Referencia []	Año	País	Reacciones
Brown, F.S. Y Hager, L.P.	11	1967	EE.UU.	Halogenación
Corbett, M., <i>et al.</i>	22	1979	EE.UU.	Oxidaciones de arilaminas
Libby, R.D., <i>et al.</i>	57	1981	EE.UU.	Halogenaciones de sustratos orgánicos
Fu, H., Kondo, H., <i>et al.</i>	32	1992	EE.UU.	Oxidación de sulfuros
Casella, L.	16	1994	Italia	Oxidación de fenoles
Hager, L.P., Morris, D.R., <i>et al.</i>	39	1995	EE.UU.	Halogenación de MCD
Lakner, F., Hager, L.P., <i>et al.</i>	56	1996	EE.UU.	Epoxidación enantioselectiva de mevalonolactonas
Hager, L.P., Lakner, F.J., <i>et al.</i>	40	1998	EE.UU.	Epoxidación de alquenos
Aoun, S., Baboulene, M.	6	1998	Francia	Bromohidroxilación de alquenos
Manoj, K., <i>et al.</i>	61	1999	EE.UU.	Epoxidación de olefinas
Sanfilippo, C., <i>et al.</i>	74	2000	Italia	Oxidación del 1,3-ciclohexadieno
Kiljunen, E., <i>et al.</i>	49	2000	Finlandia	Oxidación de alcoholes a aldehídos
Vásquez, D., <i>et al.</i>	82	2001	México	Halogenación de hidrocarburos aromáticos
Sanfilippo, C., <i>et al.</i>	73	2002	Italia	Oxidación de dienos cíclicos
Bougioukou, D.J., <i>et al.</i>	10	2002	Grecia	Oxidación de ésteres
Osborne, R.L., <i>et al.</i>	67	2005	EE.UU.	Halogenación de sustratos alifáticos
La Rotta, C.E., <i>et al.</i>	54	2005	Alemania	Aminación y alquilación
Hofrichter, M., <i>et al.</i>	41	2006	Alemania	Oxidación de cetonas, cicloalcanos, alquinos y anisol
Kaup, B., <i>et al.</i>	45	2006	Alemania y Suiza	Oxidación y halo-hidroxilación

Los terpenos se clasifican según las unidades de isopreno presentes en su estructura (Ver **Tabla 4**).

Tabla 4. Clasificación de terpenos, según unidades isoprénicas.

Prefijo	Número de átomos de carbono	Número de unidades de isopreno, C ₅ H ₈
Mono-	10	2
Sesqui-	15	3
Di-	20	4
Tri-	30	6
Tetra-	40	8
Poli-	>40	>8

Los monoterpenos son moléculas que contienen 10 átomos de carbono en su estructura, y se clasifican en acíclicos, monocíclicos y bicíclicos [42].

El limoneno es un terpeno monocíclico que ha sido utilizado en diversos procesos industriales, químicos, farmacéuticos y alimenticios, como solvente industrial, materia prima para la fabricación de otros compuestos químicos, componente aromático, entre otros [63]. Debido al gran uso que tiene este compuesto, se ha incrementado el número de investigaciones relacionadas con su biotransformación en sustancias de mayor valor agregado y aplicaciones específicas [63].

1.4.1. Limoneno. El limoneno es un monoterpeno monocíclico muy abundante en la naturaleza y con un olor característico a los cítricos y algunas plantas aromáticas. Debido a la presencia de un carbono quiral en su estructura, existen dos enantiómeros con propiedades y usos específicos.

El S-(-)-limoneno se encuentra principalmente en la *Menta spicata* o hierbabuena, la cual es una hierba perenne, proveniente de Europa, empleada en gastronomía y perfumería, por su aroma intenso y fresco. El R-(+)-limoneno es el compuesto mayoritario del aceite esencial obtenido de los frutos cítricos (naranja, limón, mandarina, entre otros) [17, 63].

El limoneno se separa industrialmente por un proceso de destemperación del aceite esencial y se usa como disolvente biodegradable de resinas, pigmentos, tintas, entre otros, así como componente aromático y en la síntesis de nuevos compuestos.

En la **Figura 4**, se observan las estructuras químicas de los dos enantiómeros del limoneno.

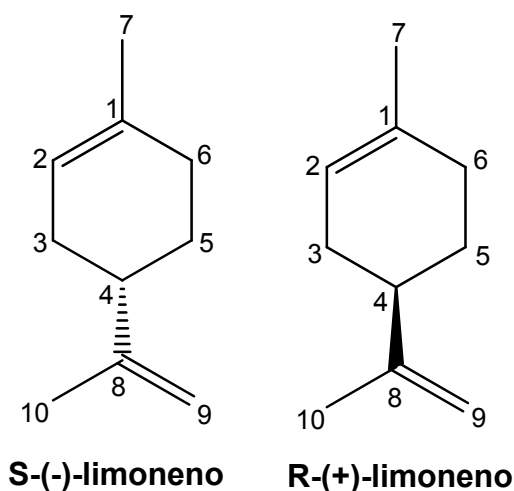


Figura 4. Estructuras químicas de los enantiómeros del limoneno.

El limoneno presenta enlaces dobles entre los carbonos C₁-C₂ y C₈-C₉, siendo más probable la oxidación en las posiciones alílicas (C₃ y C₆) y la epoxidación en los dobles enlaces por razones de estabilidad y reactividad química (Ver **Figura 4**), sin embargo, puede oxidarse en otros carbonos menos reactivos [30]. Debido a que la reactividad en los

metilos y los metilenos alílicos es muy similar, la selectividad se dificulta cuando se emplean catalizadores convencionales, por esta razón se prefiere el uso de biocatalizadores [30].

Algunas de las propiedades físicas y químicas del limoneno se presentan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Propiedades físicas y químicas del limoneno.

PROPIEDAD	DESCRIPTOR
Fórmula molecular	$C_{10}H_{16}$
Peso molecular	136,24 g/mol
Estado físico	Líquido
Color/olor	Incoloro/cítrico
Punto de ebullición	178°C
Densidad a 20°C	0,84 g/cm ³
Presión de vapor a 20°C	2,1 Pa
Solubilidad en agua a 20°C	Insoluble

1.5. BIOTRANSFORMACIONES

Las biotransformaciones son importantes en síntesis orgánica, especialmente, para la producción de moléculas quirales, caso en el que las reacciones químicas son bastante complejas de realizar [70, 75].

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 moléculas completas, ya sean microorganismos naturales o recombinantes [17, 29].

Este proceso desempeña un papel clave en el ámbito de los productos alimenticios, industria de drogas quirales, vitaminas, productos químicos especiales de valor agregado y de la alimentación animal (Ver **Figura 5**).

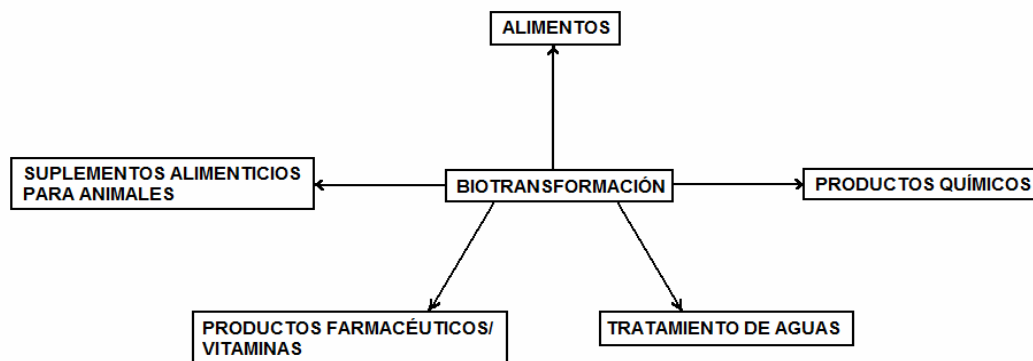


Figura 5. Áreas de aplicación de procesos de biotransformación [26].

Ampliar un proceso biotecnológico del laboratorio a una escala comercial es difícil y necesita de varios pasos. Sin embargo, más y más industrias se están moviendo hacia el desarrollo de procesos basados en biocatálisis debido a sus ventajas [26]. Es por esto, que cada día se incrementa más el interés, tanto académico como industrial hacia los biocatalizadores y las biotransformaciones, debido a su especificidad, estabilidad, sensibilidad y bajo costo [55].

Las biotransformaciones son conversiones catalizadas por enzimas, de diferentes sustratos. Las enzimas para biocatálisis se usan en un sin número de formas. Pueden ser tipo natural, recombinantes o

genéticamente modificadas para incrementar su especificidad o actividad [75].

Estas biotransformaciones se han realizado tradicionalmente en sistemas acuosos, debido a que estos medios son generalmente compatibles con las enzimas. Sin embargo, la solubilidad de los terpenos en agua es muy baja, por lo que es necesario emplear algunos solventes orgánicos en el medio de reacción. Cuando se emplean solventes no-acuosos en vez del medio acuoso natural, las enzimas exhiben nuevas propiedades, incluyendo su habilidad de catalizar reacciones imposibles de llevar a cabo en agua, y presentando el aumento de la termoestabilidad y la selectividad, entre otras. La principal desventaja del funcionamiento de la enzimas en solventes orgánicos es que se reduce su actividad catalítica comparada con la que presenta en el medio acuoso; una de las principales causas de esta inactivación no es el efecto mismo del solvente orgánico sino la desnaturalización de la enzima, por su previa deshidratación, usualmente por medio de liofilización [24, 79].

1.6. BIOTRANSFORMACIÓN DEL LIMONENO

Además de las aplicaciones que tiene el limoneno en diversos procesos industriales, químicos, farmacéuticos y alimenticios, sus propiedades organolépticas y costos, ha aumentado el número de investigaciones relacionadas con su biotransformación en sustancias de mayor valor agregado. Entre los productos de biotransformación obtenidos en las diferentes biotransformaciones realizadas, se encuentra el Alcohol Perfílico, la Isopiperitona y el Carveol.

En los últimos cinco años se dió un progreso significativo en el estudio de la biotransformación del limoneno, especialmente, empleando la

biocatálisis microbiana por cepas de bacterias, hongos, levaduras y enzimas. A diferencia de los procesos químicos tradicionales, que requieren temperaturas y presiones elevadas, las conversiones microbianas ocurren en condiciones moderadas, y, en algunos casos, los productos se obtienen de modo selectivo.

Algunos de los microorganismos usados en la biotransformación del limoneno se muestran en la **Tabla 6** [58, 63]:

Tabla 6. Microorganismos usados en la biotransformación del limoneno, reportados en la literatura.

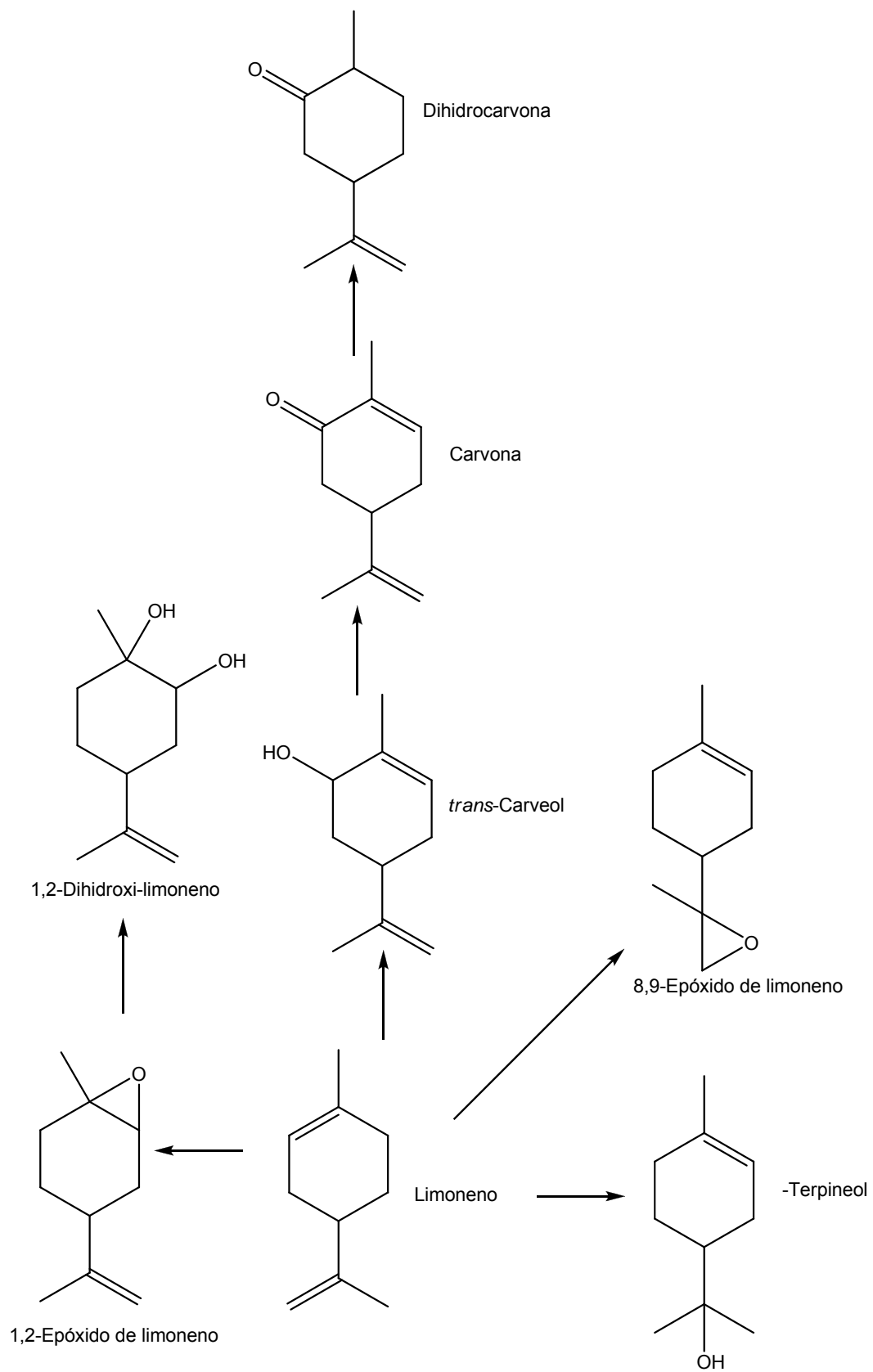
Investigadores	Microorganismos	Productos de biotransformación
Abraham, W.R., <i>et al.</i> [1]	<i>Diplodia gossypina</i> y <i>Corynospora cassiicola</i>	Productos de hidroxilación
Noma, Y., <i>et al.</i> [66]	<i>Aspergillus cellulosa</i>	(+)-Isopiperitona, (+)-alcohol perílico y (+)- <i>cis</i> -carveol
Chang, H.C., <i>et al.</i> [18]	<i>Bacillus stearothersophilus</i>	Alcohol perílico
Van Rensburg, E., <i>et al.</i> [78]	<i>Arxula adenivorans</i> y <i>Yarrowia lipolytica</i>	Ácido perílico

En los últimos años se han visto cambios significativos en el campo de la biotransformación del limoneno [62, 63], especialmente, con el uso de microorganismos como biocatalizadores. Un gran número de metabolitos aislados e identificados de diversos microorganismos y células, han demostrado su capacidad de transformar el limoneno en compuestos oxidados de mayor interés y aplicabilidad.

En el **Esquema 4**, se presentan algunas de las principales rutas de biotransformación del limoneno reportadas en la literatura.

1.7. CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases es una técnica de separación de mezclas, en la cual la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, donde sufre un fenómeno de partición entre dos fases, una móvil gaseosa (helio, argón, hidrógeno, nitrógeno), y otra estacionaria, constituida por un sólido o líquido soportado sobre las paredes de la columna [36]. La columna se coloca en un horno con temperatura regulable, según los requerimientos del análisis. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de los analitos y del grado de separación deseado. Los analitos separados por la columna, pasan a un detector en donde los componentes generan una señal, que se registra en forma de un cromatograma. La eficiencia de la separación cromatográfica está determinada por la fase estacionaria, dimensiones de la columna y temperatura de operación [31].



Esquema 4. Algunas de las principales rutas de biotransformación del limoneno [62].

Para la identificación tentativa de los componentes de una muestra determinada mediante GC se utiliza la comparación de sus tiempos de retención, con los de los patrones analizados bajo las mismas condiciones operacionales. Sin embargo, los tiempos de retención dependen de numerosas variables, tales como: el modo de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases, el diseño del equipo, etc. Por esta razón ha sido necesaria la introducción de parámetros que sean reproducibles como lo son los tiempos de retención relativos y los índices de retención. Estos se calculan a partir de los tiempos de retención, y por comparación con una serie de sustancias a las cuales se le asignan valores arbitrarios de índices de retención. Los más utilizados son los conocidos como índices de Kováts, introducidos en 1958 por E. Kováts, que han sido definidos respecto a los tiempos de retención de una serie de *n*-alcanos [31, 51].

Debido a su simplicidad, sensibilidad y efectividad para separar los componentes de mezclas, la cromatografía de gases es una de las herramientas más importantes en química. Es ampliamente usada para análisis cuantitativo y cualitativo de mezclas, para la purificación de compuestos y para la determinación de constantes termoquímicas, tales como calores de solución y vaporización, presión de vapor y coeficientes de actividad. La cromatografía de gases también se usa para monitorear los procesos industriales en forma automática: se analizan las corrientes de gas periódicamente y se realizan reacciones en forma manual o automática para contrarrestar variaciones no deseadas.

1.8. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es una técnica analítica que ha experimentado un gran desarrollo tecnológico en los últimos años. Permite estudiar compuestos de naturaleza diversa: orgánica, inorgánica o biológica y obtener información cualitativa o cuantitativa. Mediante el

análisis por espectrometría de masas es posible adquirir información de la masa molecular del compuesto analizado así como sobre la estructura del mismo. Para ello, es necesario ionizar las moléculas y obtener los iones en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en la fuente de iones y, actualmente, existen diferentes técnicas que permiten llevarlo a cabo, a través de impacto electrónico (EI), bombardeo con átomos rápidos (FAB), ionización química a presión atmosférica (APCI), o desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI). Los iones generados se aceleran hacia un analizador y se separan en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos, o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones, que llegan al detector, producen una señal eléctrica que se procesa, se amplifica y se envía a un ordenador. El registro obtenido se denomina “Espectro de masas” y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados [46].

1.9. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cromatografía de gases es una técnica de separación, que tiene la cualidad de conseguir la separación de analitos en mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que se dispone para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo, cuando se analizan muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar [46].

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz

de identificar los componentes de una mezcla sin su previa separación [46].

La combinación de cromatografía de gases con espectrometría de masas constituye una herramienta indispensable para determinar la composición química de una muestra. A partir de esta unión se obtienen los espectros de masas de los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica. Este método permite realizar en una sola operación un análisis cualitativo junto con una predicción de las proporciones en las que se encuentran los componentes en la muestra [44].

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA CLOROPEROXIDASA DEL HONGO *Caldariomyces fumago*

En este estudio se utilizó la enzima cloroperoxidasa (Ver **Figura 6**) obtenida de Sigma Aldrich (Bellefonte, Pensilvania, EE.UU.), y se determinó su actividad enzimática (U/mL) para, de esta forma, definir las unidades de enzima empleadas en cada uno de los ensayos de biotransformación.



Figura 6. Enzima cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*.

La actividad de la cloroperoxidasa se determinó por el método descrito por Morris y Hager [62]. Las reacciones se llevaron a cabo bajo condiciones estándar de reacción a 25 °C, en *buffer* fosfato (50 mM) de pH 2,70, cloruro de potasio 20 mM, monoclorodimedona (MCD) 0,1mM, peróxido de hidrógeno 2 mM, y cuantificando la formación de diclorodimedona (DMCD) a una longitud de onda de 278 nm en un espectrofotómetro ultravioleta UV-2401 PC (Shimadzu, UV-VIS *Recording Spectrophotometer*).

2.2. REACCIONES DE BIOCONVERSIÓN DEL LIMONENO CON CLOROPEROXIDASA DEL HONGO *Caldariomyces fumago*

Para las bioconversiones de los monoterpenos se emplearon iones de cloruro de potasio y condiciones de reacción de *buffer* fosfato de pH 3,50 (100 mM), con 15% de solvente orgánico, un volumen constante de 100 μ L de CPO (Dilución 1/20) y una concentración de 10 mM de los diferentes sustratos, R-(+)-limoneno y S-(-)-limoneno (Sigma Aldrich, Bellefonte, Pensilvania, EE.UU.). Los solventes orgánicos usados en los diferentes ensayos fueron acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano, debido a que en trabajos de investigación anteriores [35, 45, 47] se demostró que la enzima presentaba una “buena” actividad catalítica cuando en el medio de reacción estaban presentes estos solventes. Además, se añadió periódicamente una alícuota de 10 μ L de peróxido de hidrógeno (2mM), hasta completar un volumen de 110 μ L, y alcanzar 1, 5, 10 y 24 h de reacción; debido a que en ensayos preliminares se observó que añadiendo el volumen total del agente oxidante, la enzima se inactivaba y no era posible la bioconversión del limoneno. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

La conversión enzimática de los dos isómeros ópticos del limoneno se realizó en un intervalo de temperatura entre 8 y 10 °C. Posteriormente, las muestras fueron extraídas con éter etílico (1 mL) y secadas con sulfato de sodio durante 12 h.

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Una vez extraída la fase orgánica del medio de reacción de cada uno de los ensayos realizados, se prosiguió a preparar la muestra, para su análisis. Se le añadió a cada muestra 1 μ L de *n*-tetradecano, como

estándar interno (Istd), para la cuantificación de los compuestos obtenidos, y se llevó hasta un aforo de 1 mL.

El análisis de los metabolitos se llevó a cabo por cromatografía de gases en un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus* (HP, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973N* y un inyector *split/splitless* (Ver **Figura 7**). La inyección de la muestra se realizó en el modo *splitless*. La separación de los compuestos se llevo a cabo en una columna capilar apolar DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm, d_f, con fase estacionaria de 5%-fenilpoli(metilsiloxano). Se empleó helio como gas de arrastre en el análisis, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y una velocidad volumétrica de flujo de 1 mL×min⁻¹. El rango de temperatura del horno del cromatógrafo durante la corrida cromatográfica fue de 45 a 275 °C. Los iones fragmento de los compuestos se obtuvieron en el espectrómetro de masas, por impacto de electrones con energía de 70 eV.

Para la identificación tentativa de los compuestos biotransformados se emplearon los índices de Kováts, que se calculan con base en los tiempos de retención de patrones de hidrocarburos C₁₀-C₂₅, analizados bajo las mismas condiciones que las muestras obtenidas en los diferentes ensayos [2].

$$I_k = 100 \times n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde:

I_k: Índice de retención del compuesto de interés.

n y N : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes y después del compuesto de interés.

t_{Rx} : Tiempo de retención del compuesto de interés.

t_{RN} y t_{Rn} : Tiempos de retención de n -alcanos que eluyen antes y después del compuesto x .

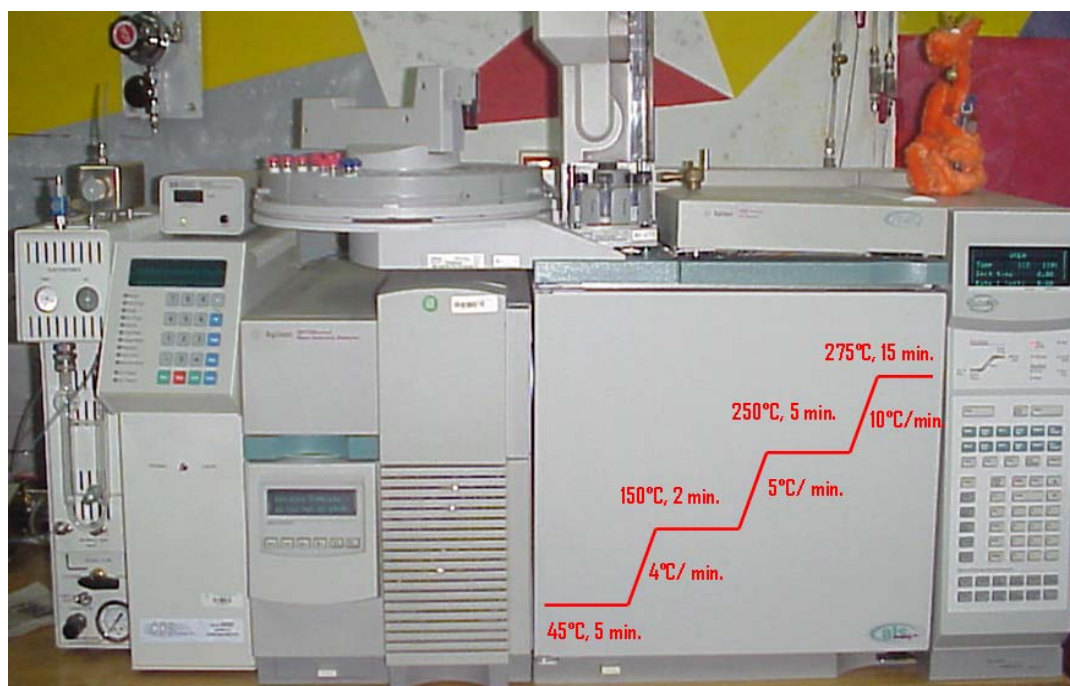


Figura 7. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863*.

Además, la identificación se realizó con base en comparación de los espectros de masas con los de las bases de datos (Adams, NIST y Wiley), a través del software *Data Analysis ChemStation* de *Agilent Technologies* (D 00.01.27, 2002). Algunos de los compuestos no pudieron ser identificados por comparación con los espectros de las bases de datos, por lo que fue necesario analizar los espectros de masas, de una

manera “manual”, estudiando las posibles rutas de fragmentación de los compuestos esperados.

La cuantificación de los productos de biotransformación obtenidos e identificados, se llevó a cabo empleando la técnica de estandarización interna, utilizando *n*-tetradecano como patrón interno ($t_R = 37,20$ min). La concentración, a la cual se llevó el patrón interno en el extracto fue de 755 ppm. Las áreas de los picos cromatográficos de cada uno de los productos se compararon con el área del estándar interno. Suponiendo, que los factores de respuesta del detector para el patrón interno y para los productos extraídos son similares, y que la adición del volumen del estándar interno a cada una de las muestras analizadas fuera el mismo; las concentraciones de cada uno de los productos se calcularon con base en la **Ecuación 3**:

$$C_x = \frac{C_{Istd} \times A_x}{A_{Istd}} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde:

C_x : Concentración del compuesto de interés, ppm.

C_{Istd} : Concentración del estándar interno, ppm.

A_x : Área del pico cromatográfico del compuesto de interés, cuentas.

A_{Istd} : Área del pico cromatográfico del estándar interno, cuentas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proyecto fue dividido en dos etapas. En la primera, se determinó la actividad catalítica de la enzima, para establecer la concentración de la enzima en U/mL necesaria para añadir en cada uno de los ensayos realizados. En la segunda parte, se realizaron diferentes ensayos de biotransformación de los enantiómeros R-(+)- y S-(-)-limonenos, variando para cada uno de ellos el solvente orgánico y el intervalo de tiempo en el que se adicionó el peróxido de hidrógeno. A continuación, se describen y se discuten los resultados obtenidos en cada una de las etapas.

3.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA CLOROPEROXIDASA DEL HONGO *Caldariomyces fumago*

La actividad catalítica de la enzima se determinó espectrofotométricamente, midiendo los cambios en la absorbancia de la solución que contiene el sustrato y la enzima.

Las U (unidades) de la cloroperoxidasa que catalizaron la formación de diclorodimedona (DCD) se calcularon aplicando la Ley de Beer de la siguiente manera:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

Donde: A = Absorción; ε = coeficiente de extinción molar; C = Concentración de MCD en mol/L.

Entonces:

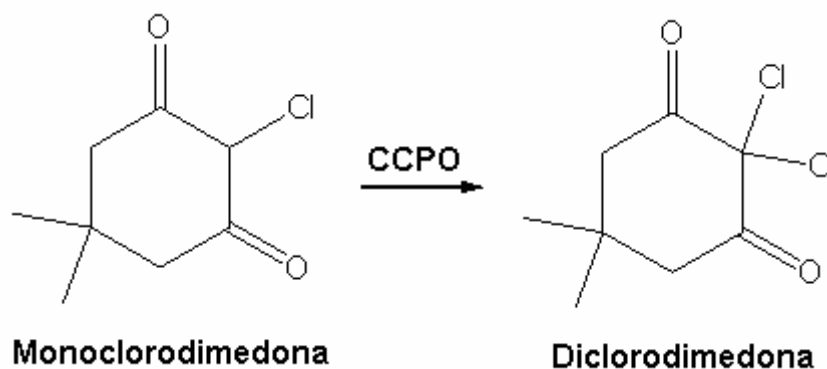
En este caso se cuantificó la desaparición del sustrato MCD ($v = -\frac{dS}{dt}$).

$$dA/dt = \varepsilon \cdot b \cdot dC/dt$$

$dC/dt = (dA/dt) \cdot 1/\varepsilon \cdot b$, siendo dA/dt la pendiente de la recta.

$dC/dt = m / \varepsilon \cdot b$, donde $dC/dt = \text{moles/L} \cdot \text{min} = U$ (Aquella cantidad de enzima capaz de transformar 1 μmol de sustrato por min).

Se calculó la actividad catalítica de la enzima cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*, siguiendo la metodología descrita por Morris y Hager [65]. Bajo las condiciones estándar de reacción, descritas en la metodología, CPO cataliza la formación de un μmol de diclorodimedona por min, a partir de monoclorodimedona, ambos compuestos aparecen en el **Esquema 5**.



Esquema 5. Formación de diclorodimedona a partir de monoclorodimedona bajo las condiciones descritas por Morris y Hager [65].

En las **Figuras 8 y 9**, presentadas a continuación, se observan el rango de linealidad y el efecto del volumen de la enzima, sobre la actividad catalítica de la cloroperoxidasa.

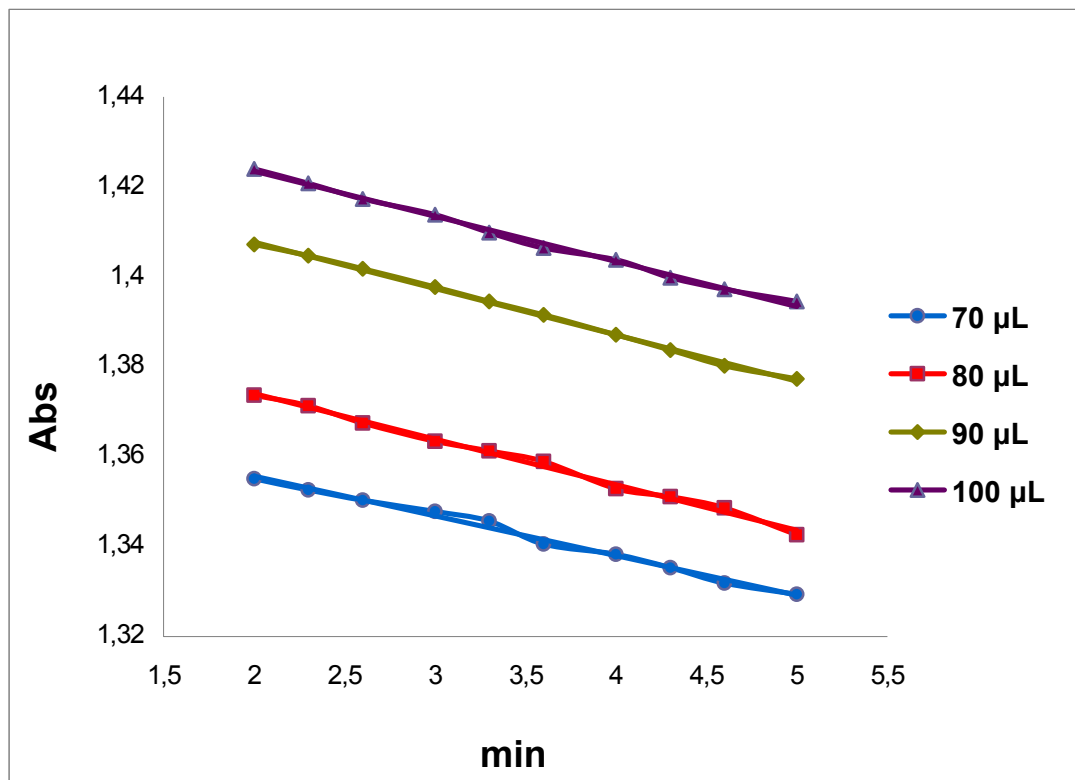


Figura 8. Actividad catalítica de la enzima cloroperoxidasa determinada para una dilución 1/100.

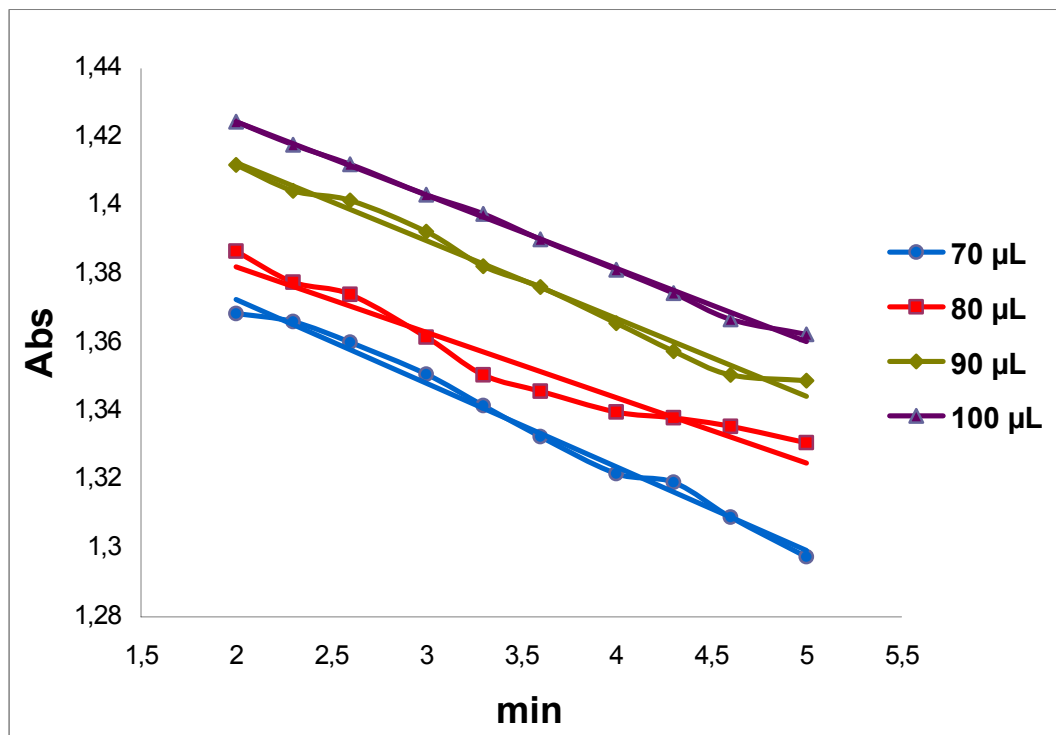


Figura 9. Actividad catalítica de la enzima cloroperoxidasa determinada para una dilución 1/20.

Las U/mL de la enzima obtenidas para 2 diluciones, 1/100 y 1/20, y diferentes volúmenes de cada una, se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Actividad catalítica de la enzima cloroperoxidasa.

VOLUMEN DE ENZIMA, μ L	ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA, U/mL	
	1/100	1/20
70	3,2	1,8
80	3,2	1,2
90	2,9	1,3
100	2,6	1,1
PROMEDIO	$3,0 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,3$

3.2. BIOTRANSFORMACIÓN DE R-(+)- Y S-(-)-LIMONENOS POR MEDIO DE LA ENZIMA CLOROPEROXIDASA

El bajo costo y la fácil consecución del limoneno ha estimulado su uso como sustrato para la producción de compuestos con mayor valor agregado, útiles como aditivos, aromas y sabores en la industria. En la búsqueda de una mayor eficiencia y productos químicamente más puros, las transformaciones se han efectuado, usando microorganismos y enzimas (biotransformaciones).

La biotransformación de R-(+)- y S-(-)-limonenos por medio de la enzima cloroperoxidasa, se realizó utilizando una concentración fija de enzima y peróxido de hidrógeno, variando el tiempo de adición del agente oxidante (peróxido de hidrógeno) y midiendo el efecto de los solventes orgánicos

(acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano) sobre la actividad catalítica de la enzima. Inicialmente, se probó el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad catalítica de la enzima, adicionando 110 μL de la solución 2 mM en una sola porción; lo que provocó una inactivación de la misma por exceso de este agente oxidante. Es por esto, que la adición del peróxido de hidrógeno se realizó en varias porciones a lo largo de los tiempos usados. La selección de estos solventes se realizó con base en los resultados de estudios en los cuales se evaluó el efecto de los solventes sobre la actividad biocatalítica de la cloroperoxidasa, empleando diferentes sustratos [33, 37, 79].

Los terpenos son compuestos muy usados comercialmente, con bioactividades que comúnmente dependen de las características de sus grupos funcionales y su configuración estereoquímica. La oxidación selectiva de hidrocarburos y/o alcoholes es una reacción muy importante en la industria química, lo cual es todavía un reto para la química orgánica debido a lo costoso y complejo que resulta [17]. Es por eso que la biocatálisis ofrece una alternativa sintética promisoriosa, gracias a la gran diversidad de enzimas que son capaces de realizar este tipo de reacciones.

Para clasificar un solvente orgánico, puede usarse un gran número de constantes físicas, tales como puntos de fusión y ebullición, presión de vapor, índice de refracción, densidad, polaridad, viscosidad, constante dieléctrica, hidrofobicidad, entre otros. La polaridad de los solventes es un término comúnmente utilizado para expresar la capacidad que tiene un solvente de solvatar cargas disueltas o especies dipolares. Otro parámetro importante, empleado en la caracterización de los solventes, es el logaritmo de partición, el cual resulta útil para expresar la hidrofobicidad de los mismos.

El carácter hidrofóbico de los compuestos orgánicos juega un papel importante en la habilidad de éstos para interactuar en sistemas bioquímicos [37]. Es por esto, que en los ensayos realizados con los

solventes y bajo las mismas condiciones se obtuvieron productos de biotransformación diferentes.

A causa del alto costo, de la cloroperoxidasa, el desarrollo del proyecto se vio obligado a un número limitado de ensayos; por lo que no fue posible realizar un diseño de experimentos que permitiera optimizar completamente el proceso de biotransformación de los monoterpenos enantioméricos, R-(+)- y S-(-)-limonenos.

En estudios realizados por Kaup, B. y colaboradores [45], se empleó la enzima cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* como biocatalizador para la bioconversión de monoterpenos, entre los cuales se encuentra el limoneno; no se reportan los productos obtenidos en los ensayos de bioconversión de este monoterpeno, puesto que éstos no fueron detectadas bajo el método cromatográfico usado. Kaup, B. y colaboradores, realizaron el análisis cromatográfico con parámetros operacionales diferentes a los empleados en este trabajo; los autores [45] usaron la inyección en modo *split* 50:1.

Teniendo en cuenta estos resultados, y los obtenidos en ensayos preliminares, también analizados por la técnica GC-MS, con inyección en modo *split* 30:1, se concluyó que para detectar los productos de biotransformación, era necesario realizar una inyección de la muestra en modo *splitless*, porque así se puede alcanzar sensibilidades mucho más altas, necesarias para la detección e identificación de productos.

3.2.1 Biotransformación de R-(+)-limoneno, empleando acetonitrilo como solvente orgánico. La biotransformación de R-(+)-limoneno se realizó empleando la mezcla de agua:acetonitrilo en el medio de reacción, debido a la poca solubilidad de este monoterpeno en agua. Además, se realizaron varios ensayos, en los que se varió el intervalo de adición del peróxido de hidrógeno a diferentes tiempos trabajados para cada

experimento, con el fin de determinar el tiempo en el cual se obtiene el mayor porcentaje de conversión.

En la **Figura 10**, se ilustran los perfiles cromatográficos obtenidos bajo las condiciones operacionales descritas en la **Sección 2.3**. En los perfiles cromatográficos de los ensayos realizados se aprecia la formación de nuevos productos, en comparación con el perfil obtenido de un blanco de reacción, realizado bajo las mismas condiciones experimentales, pero sin adicionar la enzima; ello como consecuencia de la catálisis enzimática de la cloroperoxidasa (**Sección 2.2**).

A.

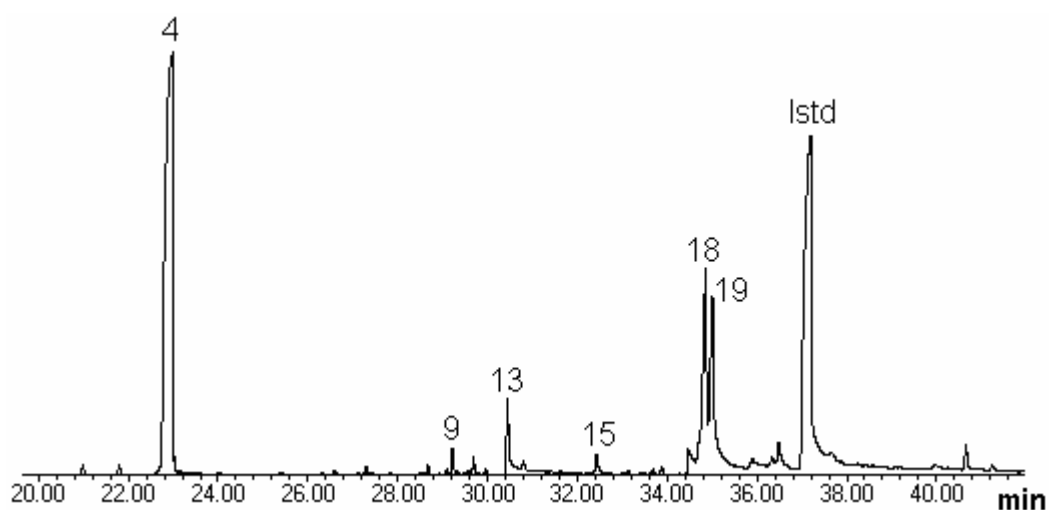
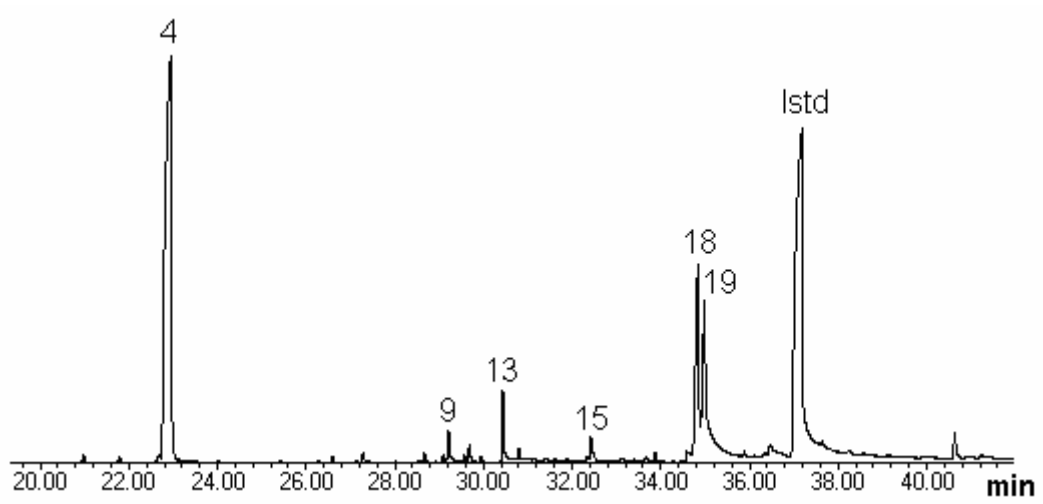


Figura 10. Perfiles cromatográficos de los productos de la biotransformación de R-(+)-limoneno en la mezcla agua:acetonitrilo y el blanco de reacción, obtenidos por LLE con éter etílico, por cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 8**. GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

Figura 10, continuación.

B.



C.

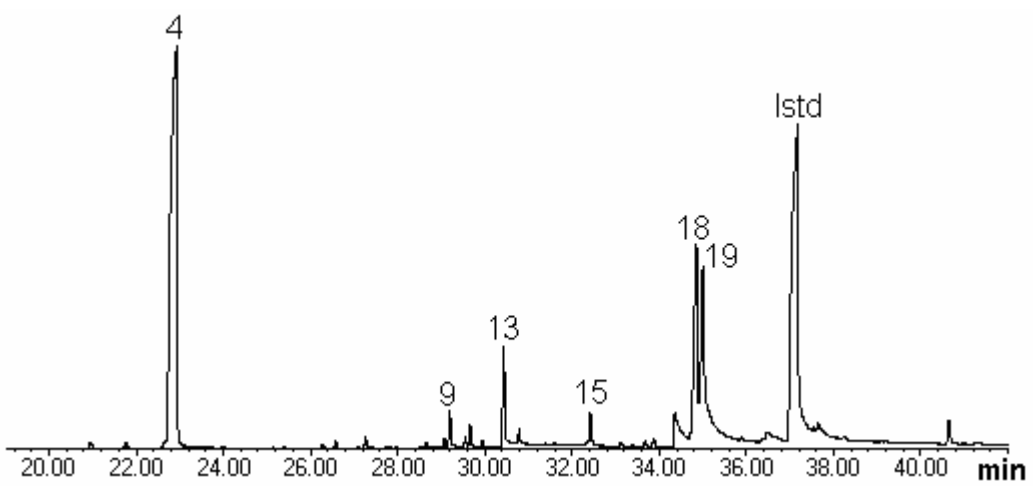
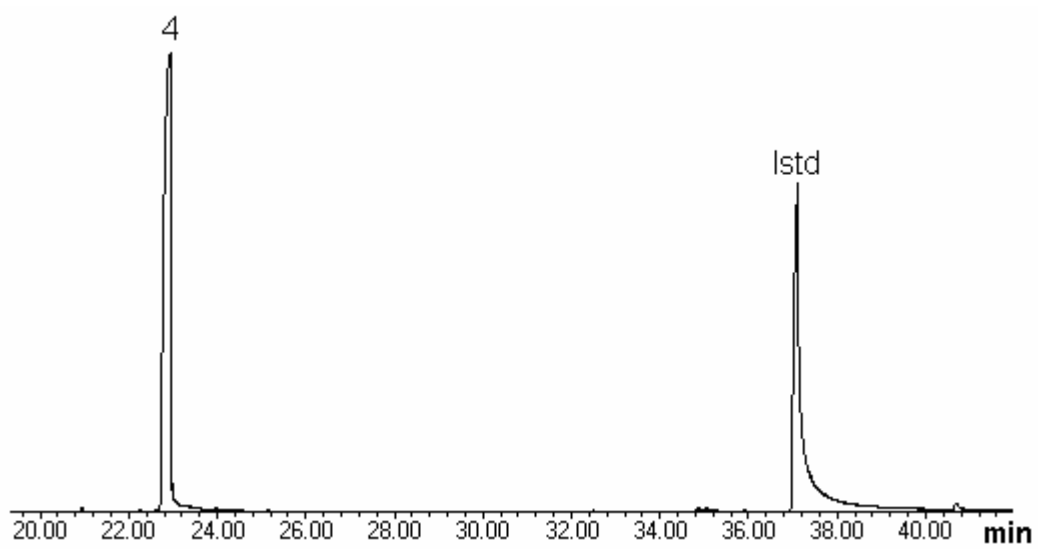
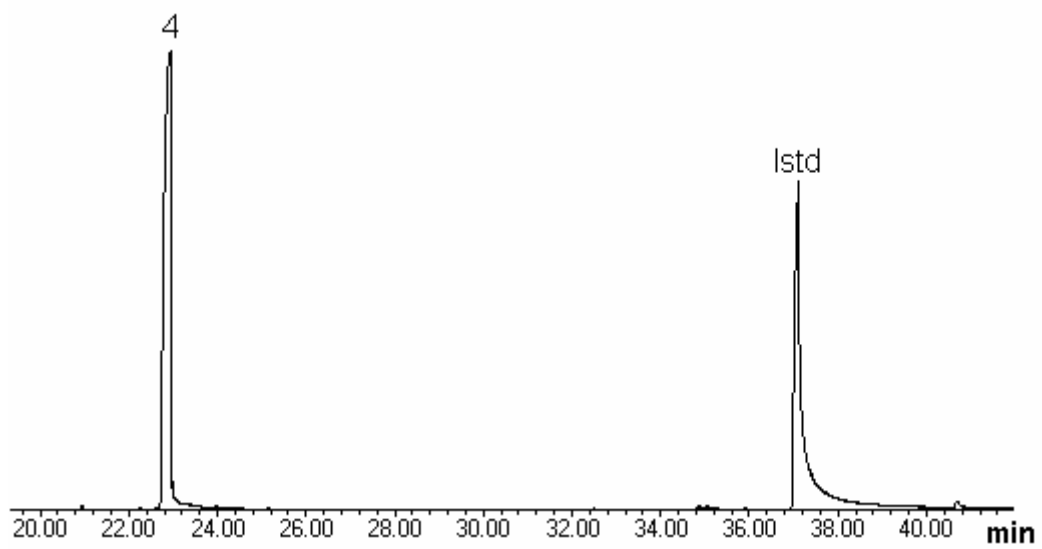


Figura 10, continuación.

D.



E.



Los porcentajes de conversión del R-(+)-limoneno en la mezcla agua:acetonitrilo, en función del intervalo de adición del peróxido de hidrógeno en los 4 tiempos de reacción usados, disminuyeron a medida que aumentaba el intervalo de adición de este agente oxidante. En la **Figura 11**, se observa cómo a la hora de reacción, y bajo las condiciones ya mencionadas en la metodología, se obtuvo el mayor porcentaje de conversión (68,2%), mientras que a las 5 y 10 h de reacción, se obtuvieron porcentajes de bioconversión considerables (51,1 y 41,5%, respectivamente); lo que no sucedió a las 24 h de reacción, el porcentaje de conversión fue de 0%.

A las 24 h de reacción no se formaron productos de biotransformación, por que la adición del H₂O₂ se realizó a intervalos de tiempo largos, por lo que posiblemente la enzima pudo ser activada. Hay que tener en cuenta que en estos ensayos el intervalo de tiempo en el que se adicionó peróxido era de 2 h y 24 min, en cambio en los ensayos de 1 y 5 h, se adicionaba cada 6 min y 30 min, respectivamente, lo que pudo causar que en los ensayos de 24 h, la cloroperoxidasa no se pudiera activar para la catálisis o se genera un fenómeno de inactivación por el tiempo prolongado de reacción.

El patrón de R-(+)-limoneno empleado contiene algunos monoterpenos como β-pineno, β-mirceno y *p*-cimeno en muy bajas concentraciones, los cuales al inyectarse en modo *splitless* pudieron ser registrados entre los productos de bioconversión y en el blanco de reacción. Estos compuestos no fueron considerados como productos de biotransformación del limoneno, pero sí se reportan en la **Tabla 8**.

Los productos de biotransformación obtenidos pertenecen a la familia de los monoterpenos oxigenados y en el caso de los mayoritarios, monoterpenos cloro-oxigenados, los cuales comúnmente presentan

actividad biológica contra diferentes bacterias y hongos. En la **Figura 12**, se presentan las fórmulas estructurales de los productos identificados de biotransformación del R-(+)-limoneno en la mezcla agua:acetonitrilo.

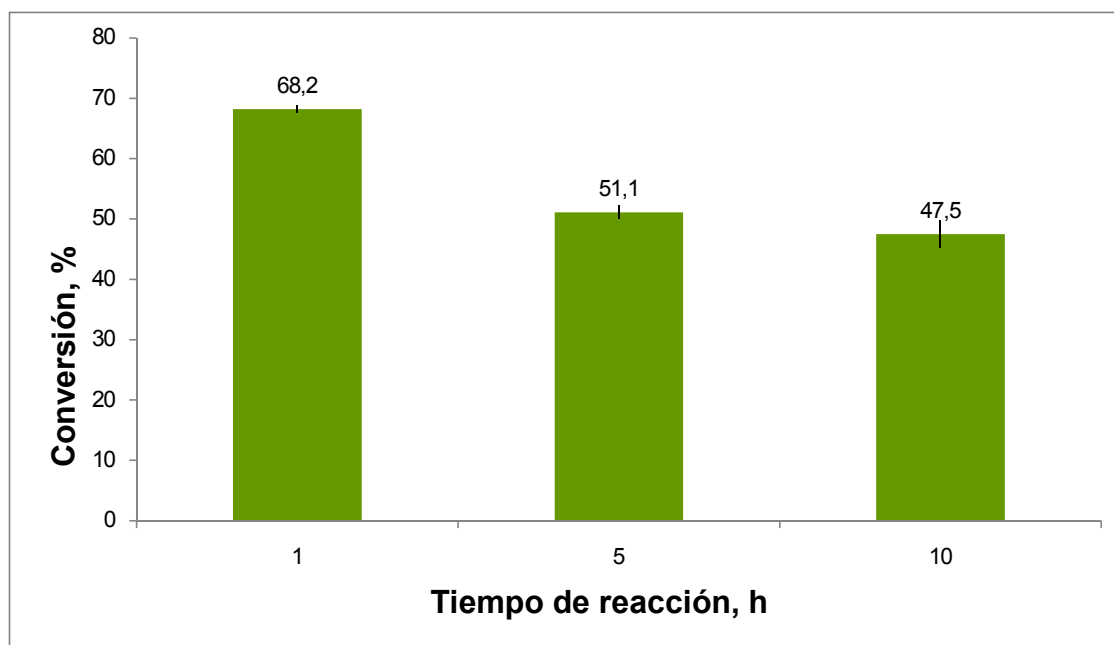


Figura 11. Conversión de R-(+)-limoneno a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:acetonitrilo (ACN), usada como solvente.

El extracto obtenido por LLE presentó, en su mayoría, productos de biotransformación oxigenados, entre los cuales se encuentran 1-(1,4-dimetil-3-ciclohexen-1-il)-etanona, *cis*-dihidrocarvona y *trans*-carveol, y algunos compuestos cloro-oxigenados, como 2-cloro-4-(1-metileténil)-ciclohex-5-en-1-ona (Ver **Anexo 1**).

Tabla 8. Composición química de los productos obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del R-(+)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo, usada como solvente orgánico.

Pico N° **	Ik ^{a)}	Compuesto	Cantidad relativa, %				
			Tiempo, h				
			1	5	10	24	Blanco
1	990	β - Pineno	0,47 ± 0,01	0,4 ± 0,1	0,33 ± 0,04	0,28 ± 0,03	0,080 ± 0,01
2	1009	β-Mirceno	0,27 ± 0,06	0,27 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,093 ± 0,01	0,037 ± 0,01
3	1030	p - Cimeno	0,40 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,43 ± 0,04	0,066 ± 0,01	0,021 ± 0,01
4	1037	Limoneno	30,7 ± 0,4	47,8 ± 0,9	51,3 ± 2,1	94,8 ± 0,3	98,9 ± 0,2
5	1038	β - Felandreno	0,15 ± 0,05	0,69 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2
6	1143	trans - Óxido de Limoneno	0,56 ± 0,02	0,38 ± 0,05	0,42 ± 0,01	N.D.	N.D.
7	1178	N.I. (<i>m/z</i> 151 [M ⁺], 143 (28), 123 (24), 107 (32), 93 (50), 79 (39), 69 (45), 43 (48)).	0,51 ± 0,03	0,50 ± 0,01	0,30 ± 0,01	N.D.	N.D.

Tabla 8, continuación.

8	1189	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	0,35 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,37 ± 0,06	N.D.	N.D.
9	1192	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona (Isómero)	1,25 ± 0,03	1,5 ± 0,2	1,62 ± 0,05	N.D.	N.D.
10	1202	2-(4-Metilenciclohexil)-2-propen-1-ol	0,13 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,44 ± 0,02	N.D.	N.D.
11	1205	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	0,90 ± 0,02	1,0 ± 0,2	0,78 ± 0,06	N.D.	N.D.
12	1212	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0,36 ± 0,01	0,29 ± 0,03	0,47 ± 0,04	N.D.	N.D.
13	1226	<i>trans</i> -Carveol	5,04 ± 0,06	3,5 ± 0,4	3,7 ± 0,2	N.D.	N.D.
14	1236	Óxido de carvona	0,46 ± 0,01	0,49 ± 0,05	0,48 ± 0,01	N.D.	N.D.
15	1280	Alcohol perílico	2,37 ± 0,1	1,5 ± 0,4	1,40 ± 0,07	N.D.	N.D.
16	1300	C ₁₀ H ₁₆ O*, P.M. 152	0,16 ± 0,03	0,21 ± 0,01	0,27 ± 0,01	N.D.	N.D.
17	1336	C ₁₀ H ₁₀ O ₄ *, P.M. 194	4,0 ± 0,3	3,27 ± 0,02	0,95 ± 0,01	N.D.	N.D.
18	1343	2-Cloro-4-(1,1-dimetiletil)-ciclohexanona*	25 ± 1,6	17 ± 1,5	14 ± 0,1	N.D.	N.D.
19	1347	2-Cloro-4-(1,1-dimetiletil)-ciclohexanona* (Isómero)	26 ± 0,8	21 ± 2,0	18 ± 1,4	N.D.	N.D.
20	1507	Hidroxitolueno butilado	1,5 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,83 ± 0,09	0,096 ± 0,01	0,067 ± 0,01

** Número de pico en la **Figura 10**; ^{a)} Identificado tentativamente; N.D. No detectado; N.I. No identificado; ^{b)} Índices de Kováts determinados experimentalmente en la columna DB5-MS; ^{b)} Promedio de dos extracciones independientes.

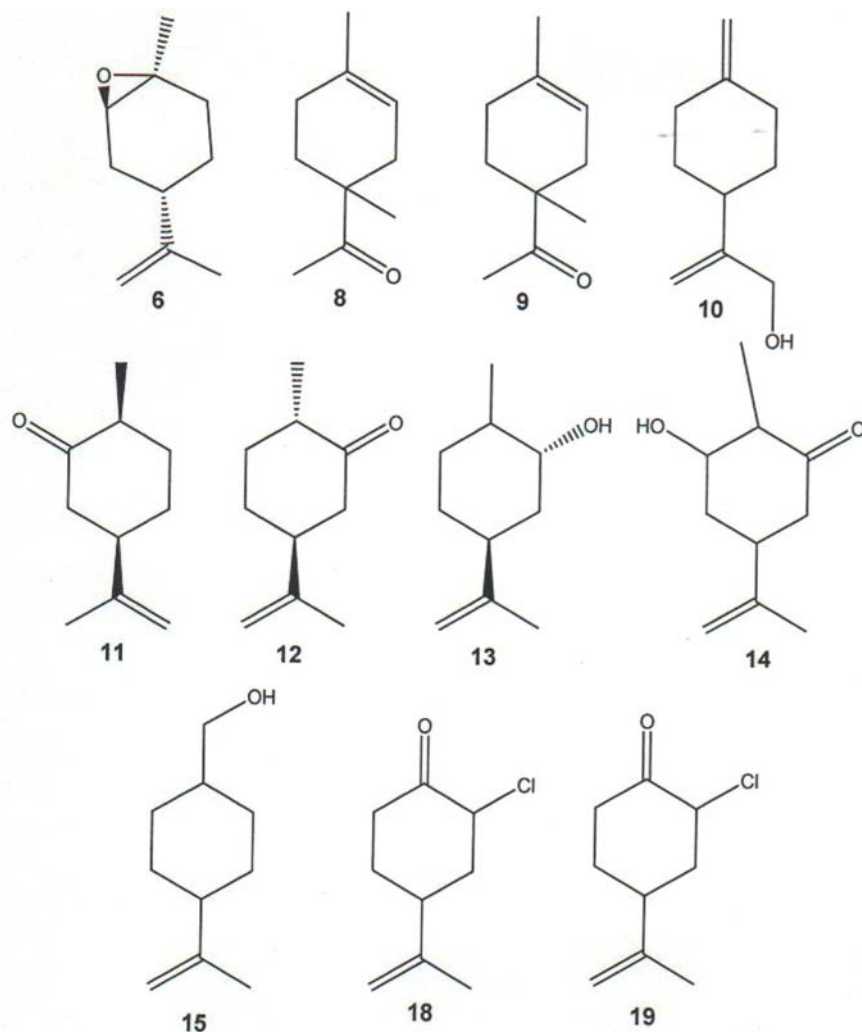


Figura 12. Fórmulas estructurales de los productos de biotransformación de R-(+)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo, según su orden de elución en la columna cromatográfica DB5-MS (**Figura 10**). La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 8**.

En la **Figura 13**, se aprecia más claramente la cantidad relativa de los productos obtenidos cuando se empleó la mezcla agua:acetonitrilo, en el medio de reacción. Los siguientes son los productos de biotransformación mayoritarios en el extracto aislado por LLE con éter etílico: 2-cloro-4-(1-metiletenil)-ciclohex-5-en-1-ona [25,3% (1 h), 17,3% (5 h) y 14,1% (10 h)] y 2-cloro-4-(1-metiletenil)-ciclohex-5-en-1-ona [25,6% (1 h), 20,9% (5 h) y 18,0% (10 h)], seguidos de *trans*-carveol [5,04% (1 h), 3,5% (5 h) y 3,7%

(10 h)], 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona [1,25% (1 h), 1,5% (5 h) y 1,62% (10 h)], C₁₀H₁₀O₄ [4,0% (1 h), 3,27% (5 h) y 0,95% (10 h)], el último no pudo ser identificado, alcohol perílico [2,37% (1 h), 1,5% (5 h) y 1,40% (10 h)] y *cis*-dihidrocarvona [0,90% (1 h), 1,0% (5 h) y 0,78% (10 h)].

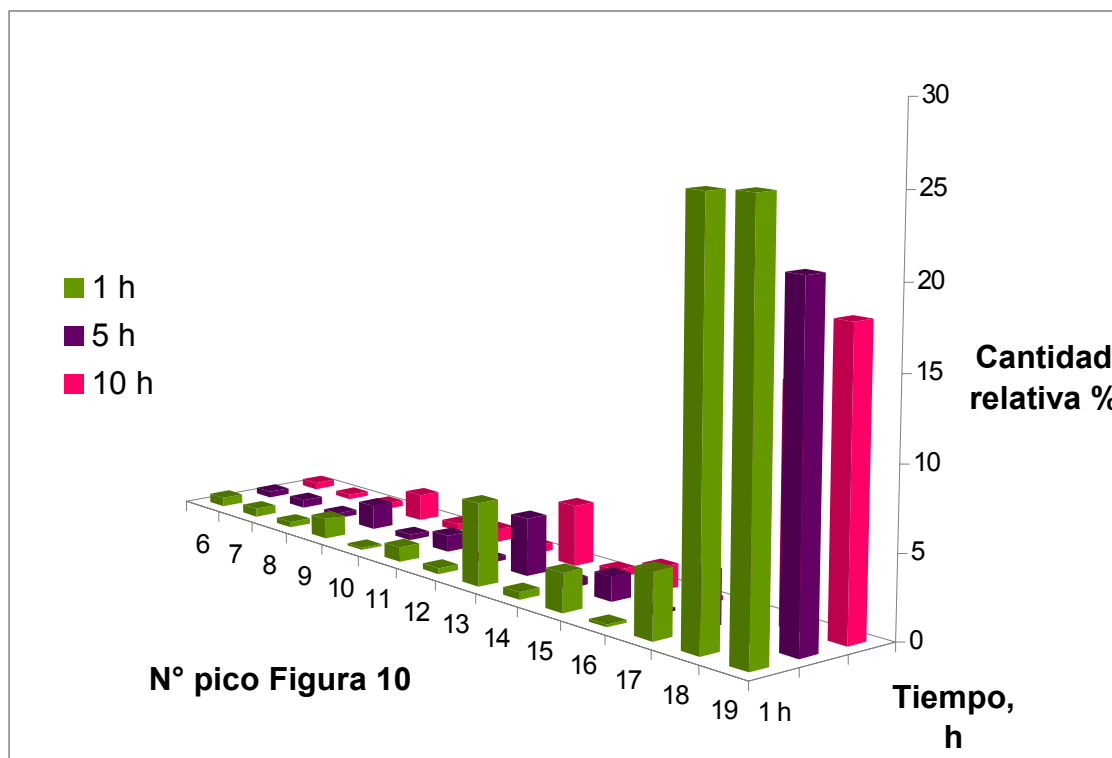


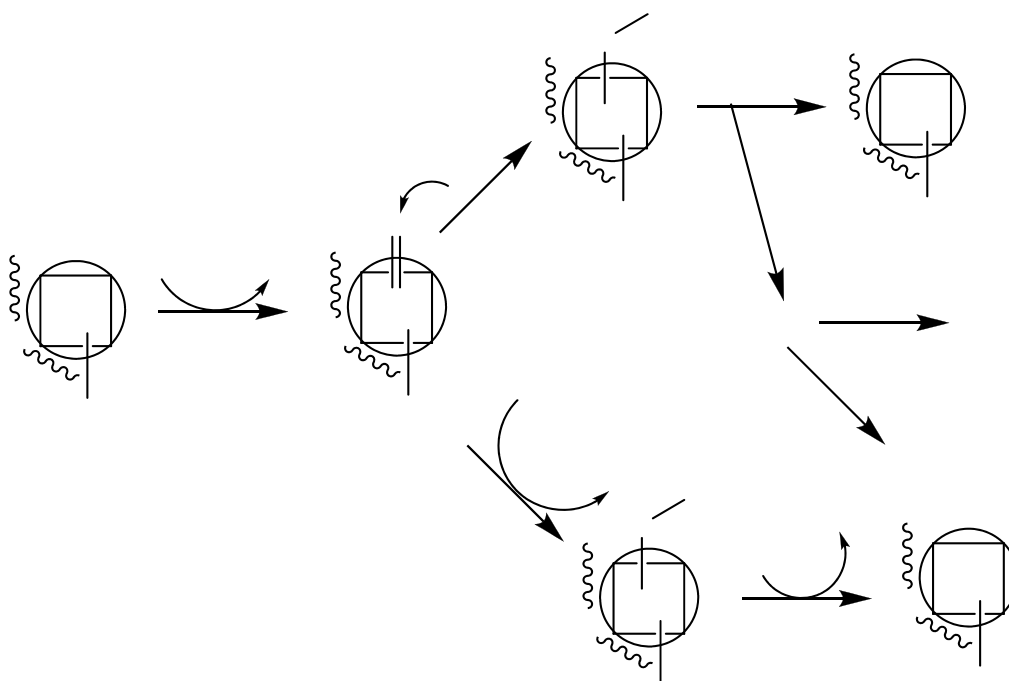
Figura 13. Productos de biotransformación de R-(+)-limoneno, obtenidos en la mezcla agua:acetonitrilo.

Esta variabilidad de la cantidad relativa (%) de los productos de biotransformación, y la presencia o no de algunos otros compuestos, pudo estar influenciada por las condiciones de reacción empleadas, como concentración del peróxido de hidrógeno, U/mL de enzima adicionadas, entre otras.

Los compuestos mayoritarios cloro-oxigenados, registrados en la **Figura 12** (Picos N° 18 y 19), hasta la fecha no aparecen reportados en la literatura como productos de la biotransformación del limoneno por medio de microorganismos. La obtención de estos productos con el uso de la cloroperoxidasa como biocatalizador, se debe a la capacidad que tiene la

enzima de catalizar reacciones de halogenación con una alta selectividad de sustrato [11, 37, 54].

Un mecanismo para explicar la oxidación de sustratos orgánicos en presencia de haluros, fue propuesto por Libby, R. D. y colaboradores [54] (Ver **Esquema 6**). Se observa, que una vez activada la enzima por el peróxido de hidrógeno, se produce una halogenación inicial del sustrato formándose un intermediario inestable (XAH), que luego se descompone rápidamente para generar un producto de oxidación (Pasos 3a y 4a, ó 5a). Se podría suponer, que este mecanismo enzimático, sea el que se lleve a cabo para la formación de los compuestos mayoritarios reportados en la **Tabla 8** (Picos N° 18 y 19), teniendo en cuenta que el monoterpeno halogenado que se forma durante el proceso debería ser lo suficientemente estable (Paso 3a), como para que se de la oxidación del mismo sin que se lleve a cabo la deshalogenación (Paso 4a).



Esquema 6. Mecanismo general de la reacción de sustratos aceptores de halógenos con cloroperoxidasa [54].

Corbett, M. D. y colaboradores [22], han sugerido que la oxidación de sustratos orgánicos en presencia de haluros por la cloroperoxidasa, se produce a través de un ataque nucleofílico del sustrato sobre el oxígeno del compuesto EOX con el cual se produce un intermedio que posteriormente será oxidado (Ver **Esquema 6.**).

✘ **Cuantificación de los productos de biotransformación del R-(+)-limoneno obtenidos, en acetonitrilo, como solvente orgánico.**

La cuantificación de los productos de biotransformación obtenidos con acetonitrilo como solvente orgánico, se realizó empleando la técnica de estandarización interna descrita en la metodología (**Sección 2.3**) (Ver **Tabla 9**).

3.2.2 Biotransformación de R-(+)-limoneno empleando metanol como solvente orgánico. Con el uso de la mezcla agua:metanol en el medio de reacción, se dio la bioconversión de R-(+)-limoneno, formándose compuestos, con áreas cromatográficas muy bajas, lo que indica la producción de productos más hidrofílicos con reducida extracción de la fase orgánica o, que en presencia de este solvente la cloroperoxidasa no se activa lo suficiente para catalizar la biotransformación bajo las condiciones experimentales usadas.

En la **Figura 14**, se ilustran los perfiles cromatográficos obtenidos bajo las condiciones operacionales descritas en la **Sección 2.3**, en los cuales se muestran los picos cromatográficos de los productos obtenidos.

Tabla 9. Cuantificación de los productos de biotransformación del R-(+)-limoneno, en acetonitrilo, usado como solvente.

Pico N° **	Compuesto	Concentración, ppm*		
		Tiempo, h		
		1	5	10
6	<i>trans</i> - Óxido de limoneno	6,0 ± 0,2	4,7 ± 0,2	7,0 ± 0,3
7	N.I. (<i>m/z</i> 151 [M ⁺], 143 (28), 123 (24), 107 (32), 93 (50), 79 (39), 69 (45), 43 (48).	6,3 ± 0,4	6 ± 1,1	5 ± 1,6
8	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	4,3 ± 0,1	4,0 ± 0,5	6,3 ± 0,8
9	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona (Isómero)	15,3 ± 0,4	18,5 ± 0,9	27 ± 2,5
10	2-(4-Metilenciclohexil)-2-propen-1-ol	4,23 ± 0,09	5,5 ± 0,6	2,2 ± 0,6
11	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	11 ± 0,3	13 ± 0,7	13,0 ± 0,9
12	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	4,50 ± 0,02	3,6 ± 0,2	7,9 ± 0,1
13	<i>trans</i> -Carveol	62,2 ± 0,09	43 ± 1,4	62 ± 1,9
14	Óxido de carvona	5,64 ± 0,09	6 ± 1,6	8 ± 1,1
15	Alcohol perfílico	29 ± 1,0	19 ± 2,4	23 ± 2,7
16	C ₁₀ H ₁₆ O*, P.M. 152	2,0 ± 0,4	2,6 ± 0,3	4,58 ± 0,05
17	C ₁₀ H ₁₀ O ₄ *, P.M. 194	40,2 ± 0,2	12 ± 1,9	68 ± 0,9
18	2-Cloro-4-(1-metiletenil)-ciclohex-5-en-1-ona*	313 ± 8,7	214 ± 2,6	235 ± 7,6
19	2-Cloro-4-(1-dimetiletetil)-ciclohex-5-en-1-ona* (Isómero)	314 ± 9,2	264 ± 0,3	302 ± 2,3

** Número de pico **Figura 10**; *Identificado tentativamente; N.I. No identificado; * Promedio de dos extracciones independientes.

El efecto de los solventes sobre la actividad catalítica de la cloroperoxidasa en reacciones de oxidación y en algunos casos halogenación de sustratos insolubles en agua, condujo a la formación de productos de biotransformación en cantidades relativas diferentes. En el caso de la bioconversión de R-(+)-limoneno empleando metanol, no se obtuvieron compuestos clorados, lo que si sucedió con el uso de acetonitrilo como solvente orgánico.

A.

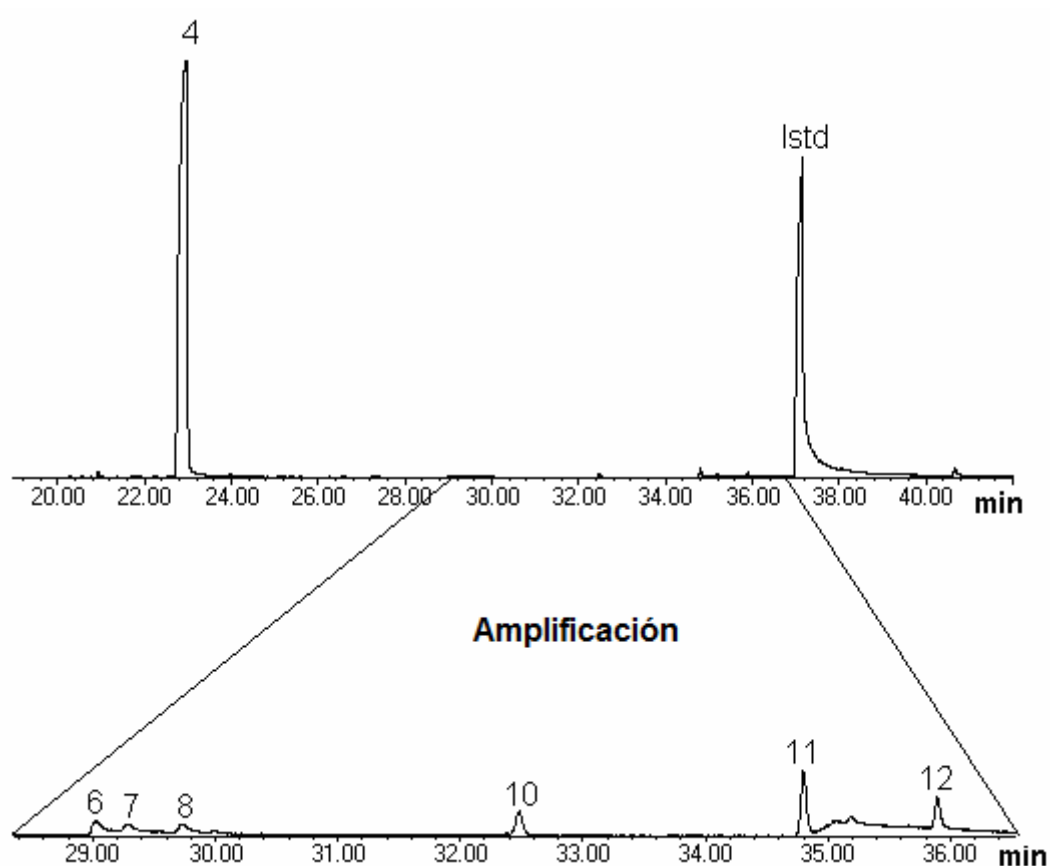


Figura 14. Perfiles cromatográficos de los productos de la biotransformación de R-(+)-limoneno, en mezcla agua:metanol y el blanco de reacción, aislados por LLE con éter etílico, en cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 10**. GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

Figura 14, continuación.

B.

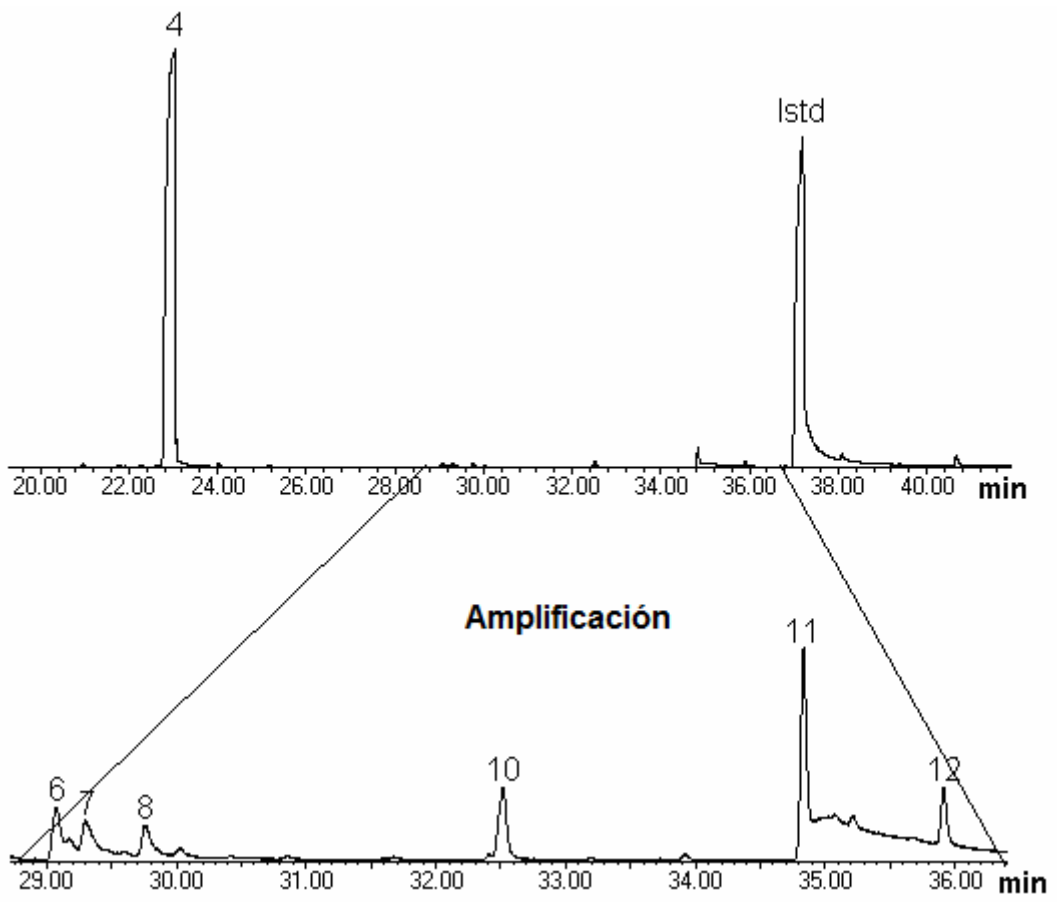


Figura 14, continuación.

C.

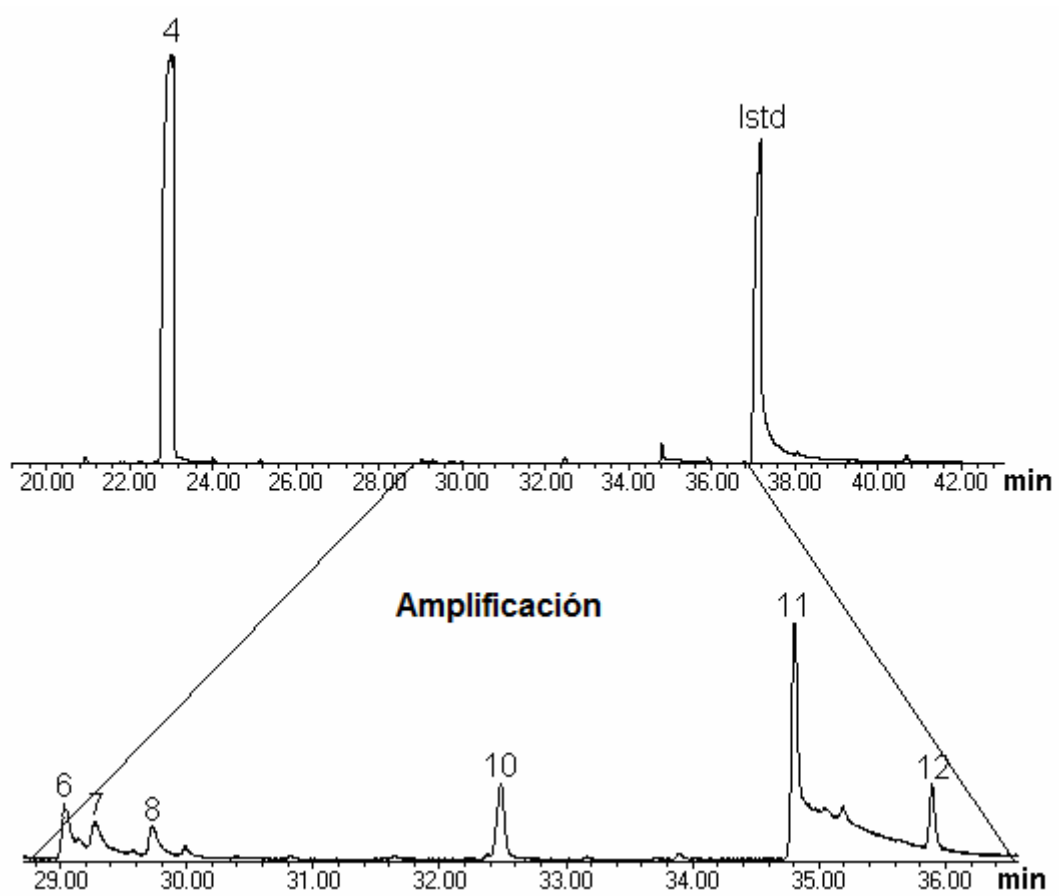


Figura 14, continuación.

D.

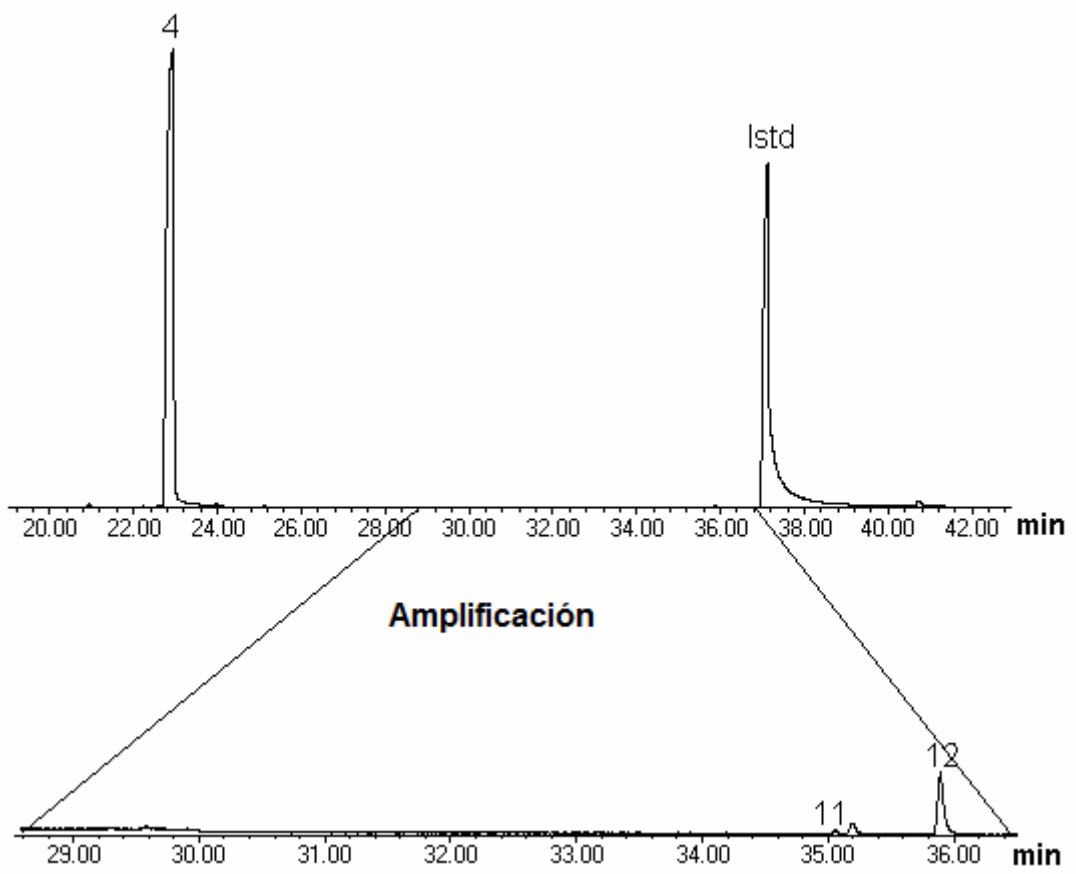
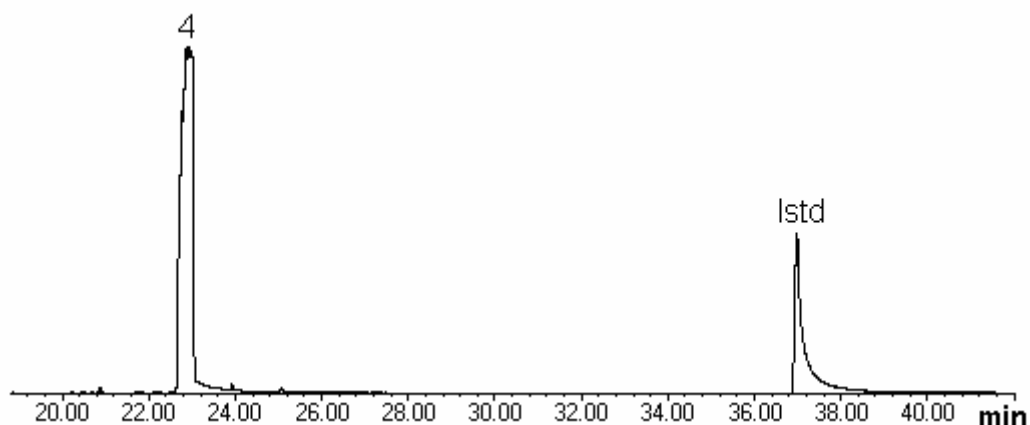


Figura 14, continuación.

E.



En la **Figura 15**, se presentan los porcentajes de conversión de R-(+)-limoneno en presencia de metanol. En estos ensayos, no se logró la conversión de más del 50% del sustrato, como sí sucedió con el uso de acetonitrilo.

Los porcentajes de conversión del R-(+)-limoneno en mezcla agua:metanol, realizada en diferentes tiempos, fueron muy cercanos, a excepción del obtenido a las 24 h. En la **Figura 15**, se observa cómo a la hora de reacción, y bajo las condiciones ya mencionadas en la metodología, se obtuvo el mayor porcentaje de conversión (31,35%). Sin embargo, a las 5 y 10 h de reacción, se obtuvieron porcentajes de bioconversión muy cercanos (25,35 y 28,95%, respectivamente), lo que no sucedió a las 24 h de reacción, cuando se produjo la menor conversión de R-(+)-limoneno (3,95%), ya que sólo se formaron dos productos de biotransformación en cantidades relativas (%) muy bajas.

En la **Tabla 10**, se muestran las cantidades relativas (%) de los compuestos diferentes al R-(+)-limoneno presentes en el patrón certificado y de los productos de biotransformación extraídos por LLE con éter etílico. Debido a que el patrón certificado empleado no es 100% puro y al modo de inyección utilizado, se detectaron e identificaron algunos hidrocarburos monoterpénicos como β -mirceno y *p*-cimeno, los cuales no son considerados como productos de biotransformación.

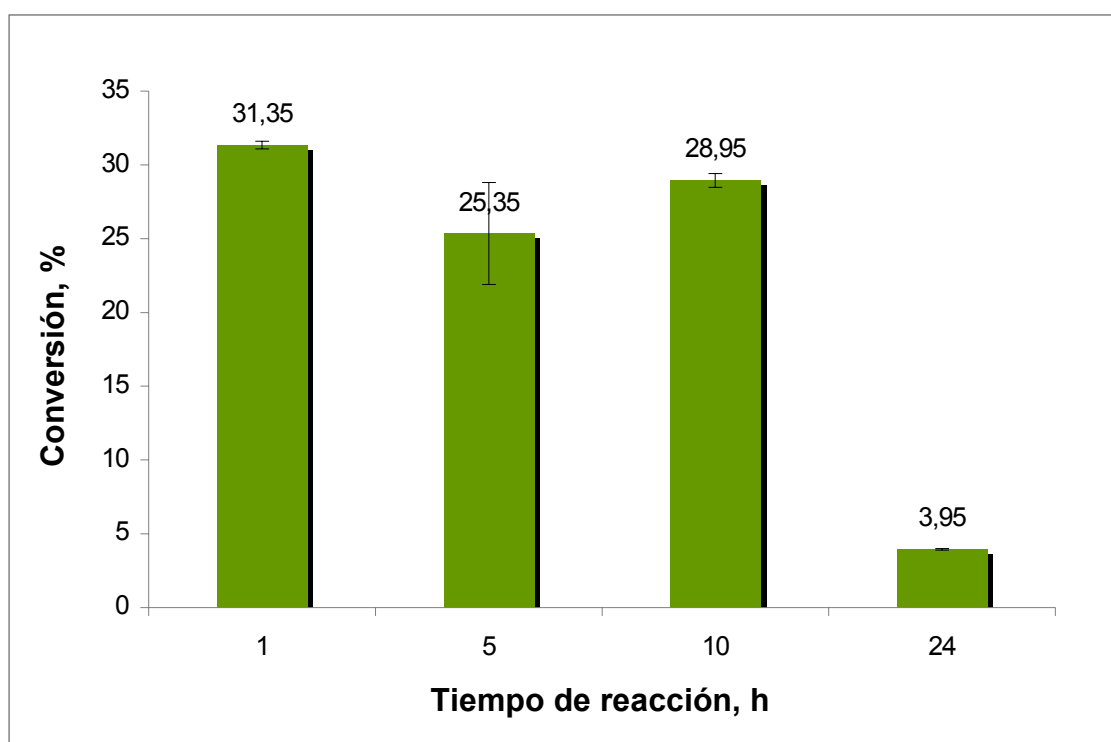


Figura 15. Conversión de R-(+)-limoneno a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:metanol, usada como solvente.

El extracto, obtenido por LLE con éter etílico, presentó en su mayoría productos de biotransformación oxigenados, entre los cuales se encuentran 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona, *cis*- dihidrocarvona, alcohol perílico y 4-hidroxi- $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-ciclohexanometanol. A diferencia de lo obtenido con la mezcla de solventes agua:acetonitrilo, no se obtuvieron compuestos clorados-oxigenados (Ver **Tabla 10**).

Tabla 10. Composición química de los productos, obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del R-(+)-limoneno, usando la mezcla agua:metanol como solvente orgánico.

Pico N° **	Ik ^{a)} DB-5	Compuesto	Cantidad relativa, % ^{b)}				
			Tiempo, h				
			1	5	10	24	Blanco
1	936	β-Mirceno	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,2	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01
2	954	p-Cimeno	1,06 ± 0,06	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,5	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01
3	982	Limoneno	67,7 ± 0,2	74 ± 3,4	70,1 ± 0,4	95,10 ± 0,06	99,05 ± 0,06
4	1010	β - Felandreno	10,4 ± 0,1	7 ± 1,2	11 ± 1,7	0,14 ± 0,04	0,26 ± 0,04
5	1023	γ - Terpineno	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,5	0,12 ± 0,01	0,08 ± 0,01
6	1039	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	1,34 ± 0,04	1,2 ± 0,6	0,9 ± 0,1	N.D.	N.D.
7	1043	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona (Isómero)	1,6 ± 0,2	3,7 ± 0,4	0,76 ± 0,09	N.D.	N.D.
8	1054	cis - Dihidrocarvona	4,5 ± 0,3	0,78 ± 0,09	0,80 ± 0,01	N.D.	N.D.
9	1076	trans - Dihidrocarvona	0,25 ± 0,04	0,2 ± 0,1	0,43 ± 0,06	N.D.	N.D.
10	1146	Alcohol perílico	1,37 ± 0,01	2,02 ± 0,09	2,2 ± 0,3	N.D.	N.D.
11	1181	N.I. (<i>m/z</i> 85 [M ⁺], 135 (4), 108 (22), 72 (30), 55(8).	5,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,9 ± 0,1	<i>tr</i>	N.D.
12	1190	4-Hidroxi-α,α,4-trimetil-ciclohexanometanol	1,72 ± 0,06	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,0 ± 0,1	N.D.
13	1194	Hidroxitolueno butilado (Antioxidante)	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,3	4,7 ± 0,4	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,01

** Número de pico **Figura 14**; *Identificado tentativamente; N.D. No detectado; N.I. No identificado; ^{a)} Índices de Kováts determinados experimentalmente en la columna DB5-MS; ^{b)} Promedio de dos extracciones independientes; *tr*. Trazas (< 0,05%).

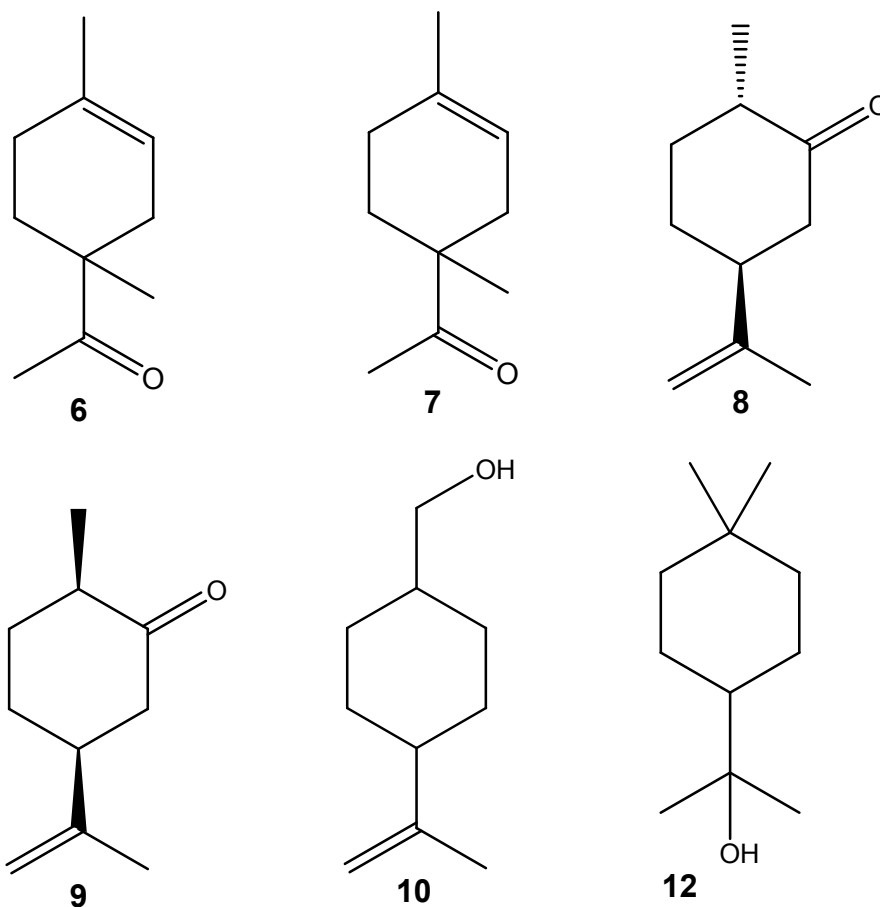


Figura 16. Fórmulas estructurales de los productos de la biotransformación de R-(+)-limoneno en la mezcla agua:metanol, según su orden de elución en los cromatogramas (**Figura 14**). Los nombres aparecen en la **Tabla 10**.

Algunos de los monoterpenos oxigenados identificados en estos ensayos, también se detectaron en las pruebas de bioconversión de este enantiómero con acetonitrilo. En la **Figura 17** se observa, que la relación entre la cantidad relativa (%) de estos monoterpenos oxigenados y el tiempo de adición del peróxido de hidrógeno es mejor.

Los siguientes son productos de biotransformación mayoritarios en el extracto obtenido por LLE con éter etílico: 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-

il)-etanona [1,6% (1 h), 3,7% (5 h) y 0,76% (10 h)], *cis*-dihidrocarvona [4,5% (1 h), 0,78% (5 h) y 0,80% (10 h)] y alcohol perílico [1,37% (1 h), 2,02% (5 h) y 2,2% (10 h)] (Ver **Figura 16**).

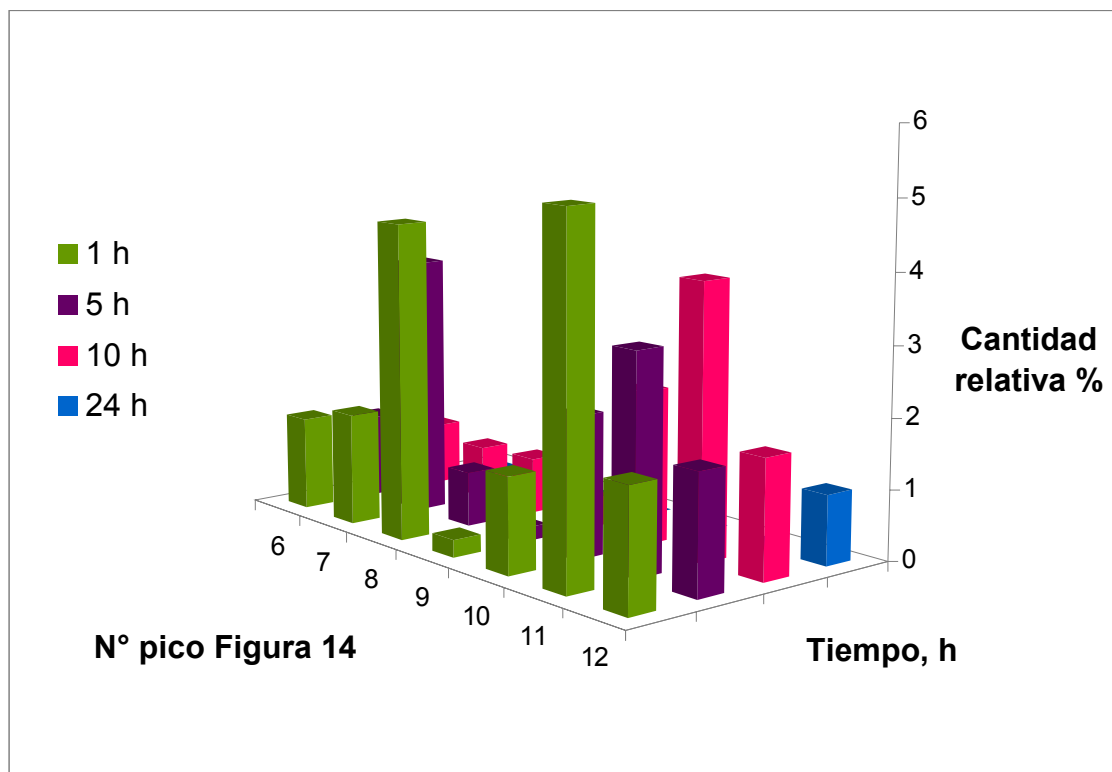


Figura 17. Productos de biotransformación del R-(+)-limoneno, empleando la mezcla agua:metanol.

A pesar de que a las 24 h ocurrió la bioconversión del R-(+)-limoneno, el porcentaje no es considerable en comparación con los obtenidos en los demás tiempos de reacción, por lo que no es recomendable usar 24 h de reacción para realizar la conversión de este monoterpeno, bajo las condiciones experimentales usadas (**Sección 2.2**).

Entre los productos de biotransformación obtenidos, se destaca el alcohol perílico (Ver **Anexo 1**), el cual es un derivado con alto valor farmacéutico y comercial [36]. Es el monoterpenol que ha presentado el mayor potencial anticancerígeno, y se encuentra en diferentes concentraciones en los aceites esenciales de plantas como *Lavandula angustifolia*,

Lavandula hybrida, *Menta piperita*, *Menta spicata*, *Carum carvi*, entre otras [35, 36]. Este compuesto oxigenado con baja toxicidad, propiedades terapéuticas y quimioterapéuticas contra una amplia variedad de cánceres, actualmente está siendo estudiado como agente terapéutico en el tratamiento de tumores de próstata [19], dendrogliomas malignos [23], tumores de pulmón [83] y cáncer de mama [84].

✘ **Cuantificación de los productos de biotransformación de R-(+)-limoneno obtenidos, en metanol, como solvente orgánico.**

La cuantificación de los productos de biotransformación obtenidos en metanol, como solvente orgánico, se realizó empleando la técnica de estandarización interna descrita en la metodología (**Sección 2.3**) (Véase la **Tabla 11**). Los productos obtenidos a las 24 h de reacción no se cuantificaron, ya que estos resultados no fueron relevantes.

3.2.3 Biotransformación del R-(+)-limoneno, empleando tetrahidrofurano como solvente orgánico. La biotransformación del R-(+)-limoneno también se realizó en un medio de reacción agua:tetrahidrofurano, para determinar si con este solvente la CPO presentaba una mayor actividad catalítica y permite aumentar la bioconversión del R-(+)-limoneno. Además, al igual que con los demás solventes empleados, se trabajaron diferentes tiempos de reacción.

Tabla 11. Cuantificación de los productos de biotransformación del R-(+)-limoneno con metanol, como solvente orgánico.

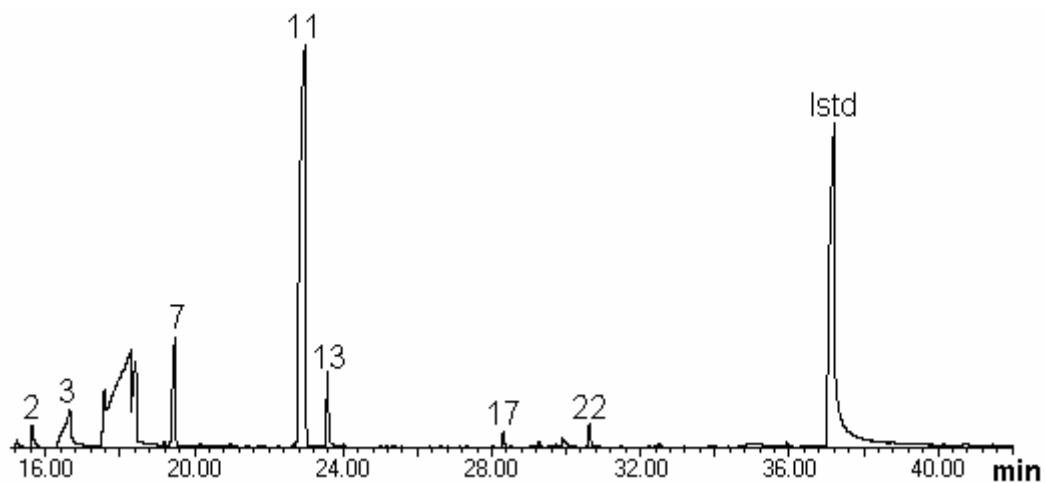
Pico N° **	Compuesto	Concentración, ppm*		
		Tiempo, h		
		1	5	10
6	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	4,1 ± 0,4	3,9 ± 0,3	2,8 ± 0,1
7	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona (Isómero)	4,7 ± 0,1	12,8 ± 0,2	2,4 ± 0,3
8	<i>cis</i> - Dihidrocarvona	13,4 ± 0,9	2,7 ± 0,3	2,49 ± 0,02
9	<i>trans</i> - Dihidrocarvona	0,75 ± 0,02	0,85 ± 0,04	1,35 ± 0,02
10	Alcohol perílico	4,1 ± 0,3	7 ± 1,0	6,80 ± 0,02
11	N.I. (<i>m/z</i> 85 [M^+], 135 (4), 108 (22), 72 (30), 55(8).	15,0 ± 0,1	10,9 ± 0,7	12 ± 1,1
12	4-Hidroxi- $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-ciclohexanometanol	5,1 ± 0,1	6,17 ± 0,03	5,3 ± 0,1

** N° pico **Figura 18**; * Promedio de dos extracciones independientes.

Los perfiles cromatográficos obtenidos bajo las condiciones operacionales descritas en la **Sección 2.3**, en los cuales se aprecia la formación de nuevos productos, se muestran en la **Figura 18**.

Bajo las condiciones establecidas para estos ensayos, se efectuó la conversión del R-(+)-limoneno, se obtuvieron algunos monoterpenos oxigenados en cantidades relativas (%) apreciables. Infortunadamente, en los perfiles cromatográficos de los diferentes ensayos y del blanco de reacción, se detectaron compuestos indeseables, no considerados como productos de biotransformación. Posiblemente, estos compuestos provengan de impurezas del estándar interno (*n*-tetradecano); o por contaminación cruzada por el material de vidrio o por el mismo solvente. Estos compuestos no se detectaron en cromatograma del blanco de reacción sin Istd (Ver **Figura 18**).

A.



B.

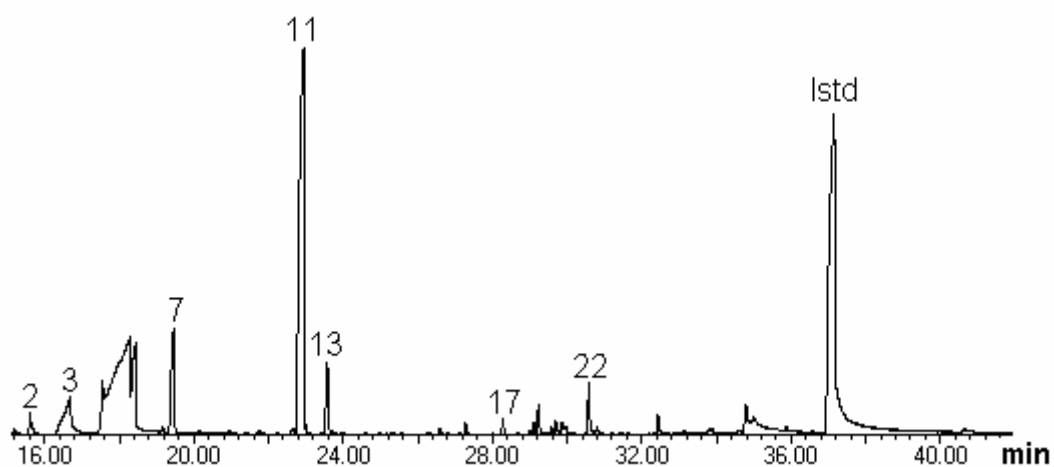
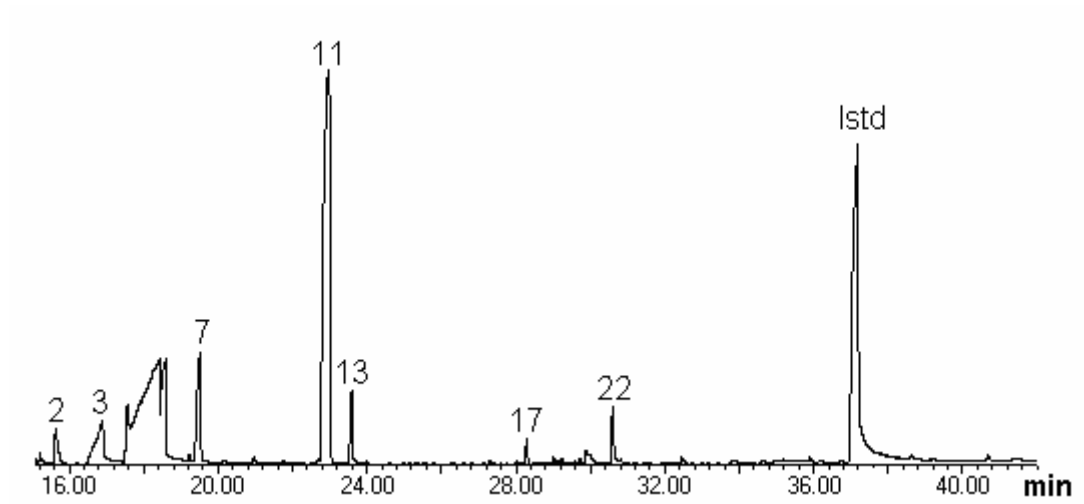


Figura 18. Perfiles cromatográficos de los productos de la biotransformación del R-(+)-limoneno en mezcla agua:tetrahidrofurano, y el blanco de reacción, obtenidos por LLE con éter etílico, en cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1 h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción sin Istd, **F.** Blanco de reacción con Istd. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 12**. GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

Figura 18, continuación.

C.



D.

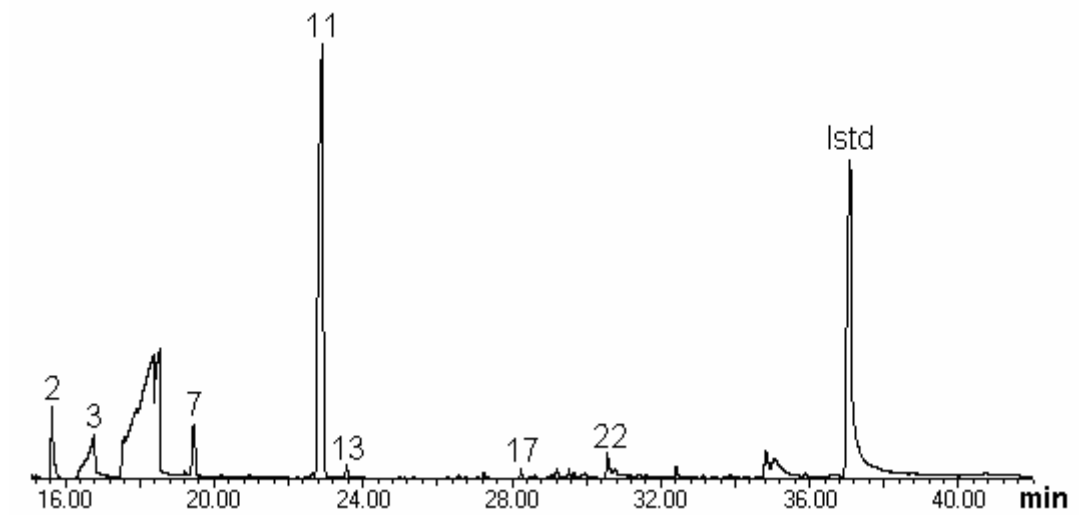
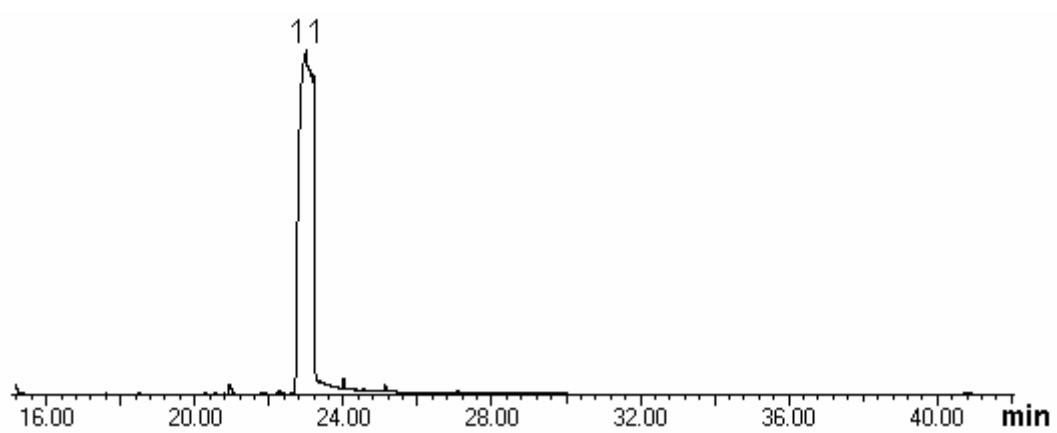
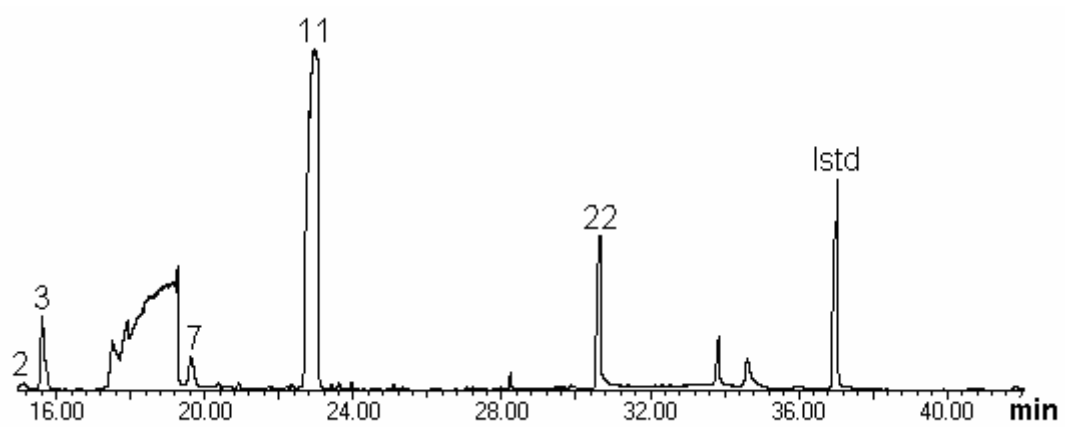


Figura 18, continuación.

E.



F.



Los porcentajes de conversión del R-(+)-limoneno en mezcla agua:tetrahidrofurano, disminuyeron con el tiempo (Ver **Figura 19**). A una hora de reacción se logró el mayor porcentaje de conversión (32,33%), seguido de los alcanzados a las 5, 10 y 24 horas (28,93, 28,13 y 25,03%, respectivamente). A pesar de que se obtuvieron porcentajes de conversión relativamente altos, los resultados logrados bajo estas condiciones no fueron muy buenos, debido a que muchos de los compuestos detectados e identificados que no forman parte de la reacción de bioconversión del R-(+)-limoneno por la cloroperoxidasa. No hay una diferencia significativa en los porcentajes de conversión, lo que indica que empleando la mezcla agua:tetrahidrofurano, no vale la pena realizar los ensayos en tiempos de reacción tan largos como 24 h.

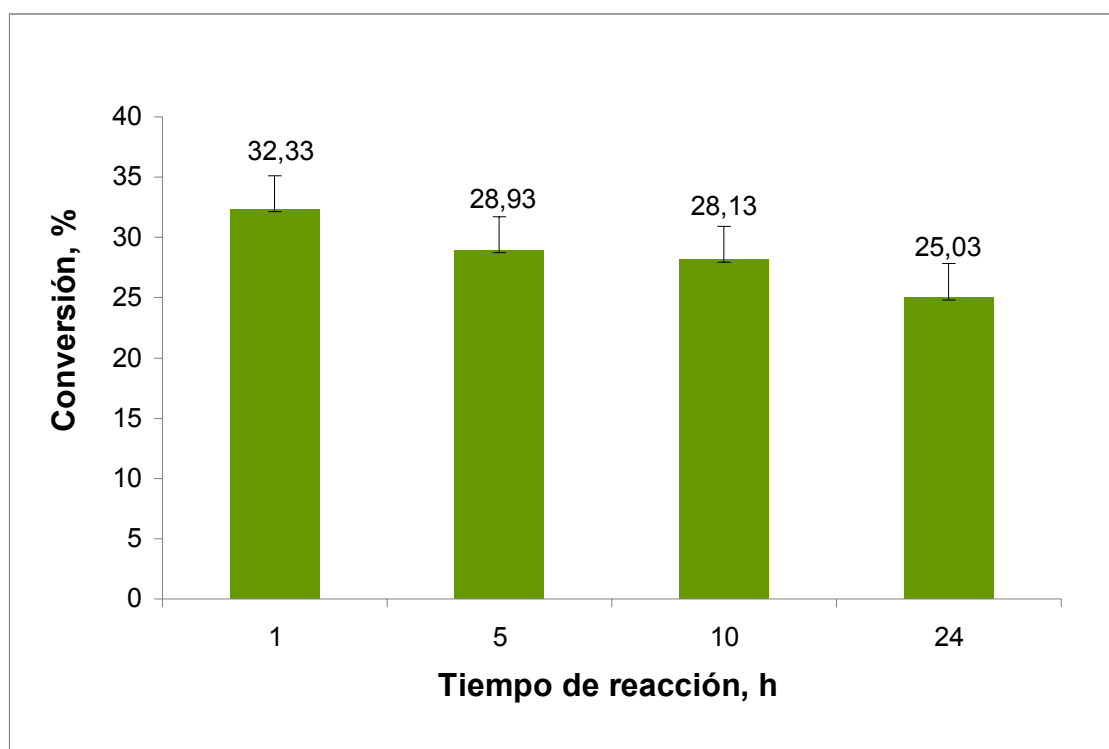


Figura 19. Conversión del R-(+)-limoneno a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:tetrahidrofurano, usada como solvente.

En la **Tabla 12**, se presentan las cantidades relativas (%) de los compuestos diferentes al R-(+)-limoneno, presentes en el patrón

certificado empleado, y de los productos de biotransformación extraídos por LLE con éter etílico, de cada uno de los ensayos efectuados. Al igual que en los ensayos realizados con los demás solventes y en los blancos de reacción, se detectaron e identificaron algunos compuestos como β -mirceno, *p*-cimeno, β -felandreno, presentes en el patrón certificado, con áreas de picos cromatográficos considerables, a causa de la inyección *splitless*.

El extracto obtenido por LLE con éter etílico, presentó en su mayoría productos de biotransformación oxigenados, entre los cuales se encuentran *cis*-óxido de limoneno, 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona y *cis*-dihidrocarvona. A diferencia de lo obtenido en los otros ensayos, se formaron menos productos y aparecieron algunos secundarios, que no provienen de la catálisis enzimática. Al igual que con la mezcla agua:metanol, no se obtuvieron compuestos cloro-oxigenados (Ver **Tabla 12**).

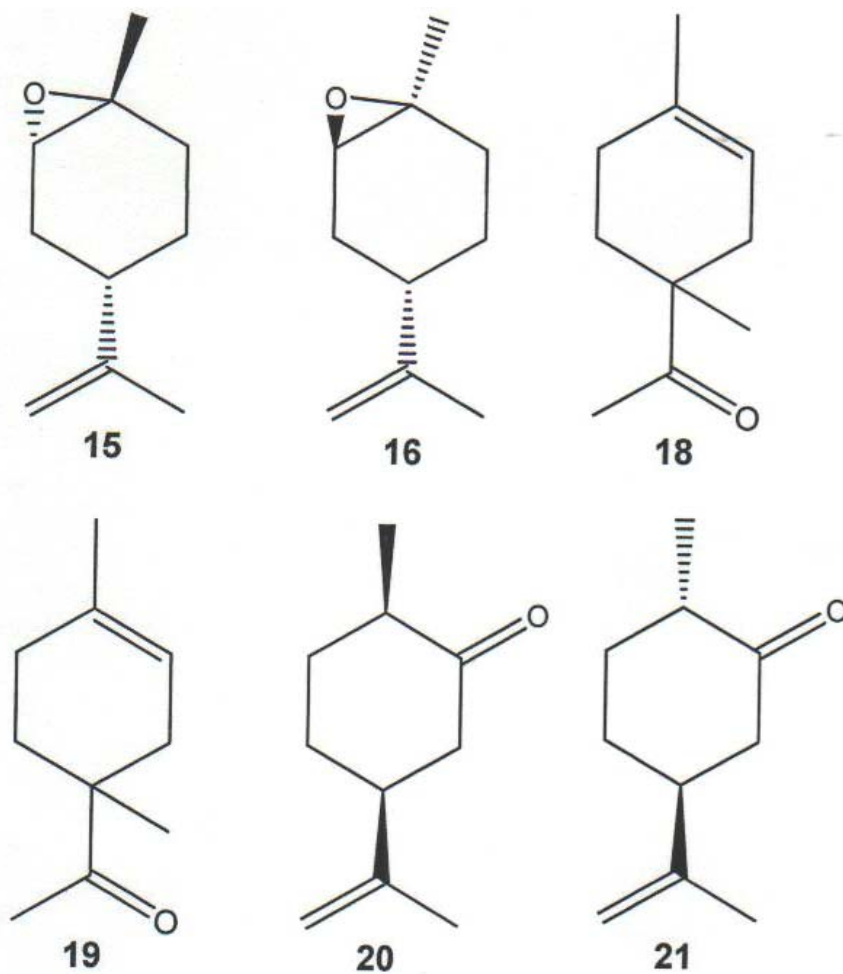


Figura 20. Fórmulas estructurales de los productos de biotransformación del R-(+)-limoneno en la mezcla agua:tetrahidrofurano, según su orden de elusión en la columna cromatográfica DB5-MS (**Figura 18**). La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Composición química de los productos, obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del R-(+)-limoneno en la mezcla agua:tetrahidrofurano, usada como solvente orgánico.

Pico N° **	I _k ^{a)}	Compuesto	Cantidad relativa, % ^{b)}				
			Tiempo, h				
			1	5	10	24	Blanco
1	861	2-Etoxitetrahidrofurano	0,27 ± 0,01	0,12 ± 0,05	0,27 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01
2	871	1,3-Dicloropropano	2,0 ± 0,1	1,00 ± 0,06	1,7 ± 0,2	2,8 ± 0,3	0,39 ± 0,01
3	896	N.I. (<i>m/z</i> 57 [M ⁺], 74 (92), 47 (32), 39 (7), 31 (73).	4,8 ± 0,1	5,1 ± 0,7	4,8 ± 0,02	4,7 ± 0,02	0,44 ± 0,01
4	914	Dihidro 2[3H]-Furanona	2,7 ± 0,1	2,5 ± 0,7	2,7 ± 0,06	9 ± 1,8	0,64 ± 0,03
5	932	Ácido 4-hidroxi-butanoico	29,3 ± 0,1	28,5 ± 0,6	27,7 ± 0,8	22 ± 1,7	26,42 ± 0,01
6	935	Dihidro 2[3H]-Furanona	5,85 ± 0,01	5,5 ± 0,2	5,8 ± 0,6	9,8 ± 0,2	0,40 ± 0,01
7	957	Contaminación (Artefacto)	5,99 ± 0,01	6,3 ± 0,6	6,0 ± 0,1	2,2 ± 0,3	0,18 ± 0,01
8	990	β-Mirceno	0,18 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,02 ± 0,01
9	1008	2-Metil-5-(1-metiletenil)-ciclohexadieno	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,01
10	1030	<i>p</i> -Cimeno	0,20 ± 0,01	0,29 ± 0,08	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,02 ± 0,01
11	1037	Limoneno	38,2 ± 0,2	42 ± 2,8	42,4 ± 0,5	45,5 ± 0,6	70,53 ± 0,05
12	1038	β-Felandreno	0,14 ± 0,01	0,19 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,05 ± 0,01
13	1052	N.I. (<i>m/z</i> 87 [M ⁺], 155 (5), 127 (19), 59 (23), 41(33).	2,13 ± 0,01	2,7 ± 0,4	2,2 ± 0,09	0,34 ± 0,01	0,06 ± 0,01
14	1062	γ - Terpineno	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,76 ± 0,01

Tabla 12, continuación.

15	1143	<i>cis</i> - Óxido de limoneno	0,03 ± 0,01	0,6 ± 0,1	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	N.D.
16	1146	<i>trans</i> - Óxido de limoneno	0,13 ± 0,01	0,35 ± 0,09	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,05	N.D.
17	1168	N.I. (<i>m/z</i> 71 [M ⁺], 130 (1), 87 (1), 43 (25)).	0,9 ± 0,5	0,43 ± 0,09	0,66 ± 0,01	0,26 ± 0,09	0,15 ± 0,04
18	1190	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	0,07 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,41 ± 0,03	0,07 ± 0,01	N.D.
19	1193	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona (Isómero)	0,30 ± 0,06	0,9 ± 0,2	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,01	N.D.
20	1210	<i>cis</i> - Dihidrocarvona	0,15 ± 0,01	0,4 ± 0,2	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,05	N.D.
21	1212	<i>trans</i> - Dihidrocarvona	1,71 ± 0,01	0,3 ± 0,1	1,59 ± 0,02	0,18 ± 0,01	N.D.
22	1229	N.I. (<i>m/z</i> 71 [M ⁺], 87 (51), 59 (6), 43 (26)).	4,2 ± 0,7	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,1 ± 0,4	3,7 ± 0,2
23	1236	N.I. (<i>m/z</i> 93 [M ⁺], 135 (8), 121 (26), 87 (30), 71 (60), 41 (34)).	0,24 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,09 ± 0,08	0,07 ± 0,02	0,17 ± 0,07
24	1508	Hidroxitolueno butilado (Antioxidante)	0,3 ± 0,1	0,27 ± 0,02	0,3 ± 0,1	0,28 ± 0,05	0,02 ± 0,1

** Número de pico en la **Figura 18**; N.D. No detectado; N.I. No identificado; ^{a)} Índices de Kováts determinados experimentalmente en la columna DB5-MS; ^{b)} Promedio de dos extracciones independiente.

En la **Figura 21** se muestra más claramente la relación entre la cantidad relativa (%) de cada producto a diferentes tiempos de reacción. Los productos mayoritarios de biotransformación en el extracto obtenido por LLE con éter etílico, son: *trans*-óxido de limoneno [0,13% (1 h), 0,6% (5 h), 0,04% (10 h) y 0,16%(24 h)], 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona [0,30% (1 h), 0,9% (5 h), 0,31% (10 h) y 0,32% (24 h)], *trans*-dihidrocarvona [1,71% (1 h), 0,3% (5 h), 1,59% (10 h) y 0,18% (24 h)] y *cis*-dihidrocarvona [0,15% (1 h), 0,4% (5 h), 0,16% (10 h) y 0,22% (24 h)].

Al igual que con la mezcla de agua:metanol, no se detectaron monoterpenos cloro-oxigenados.

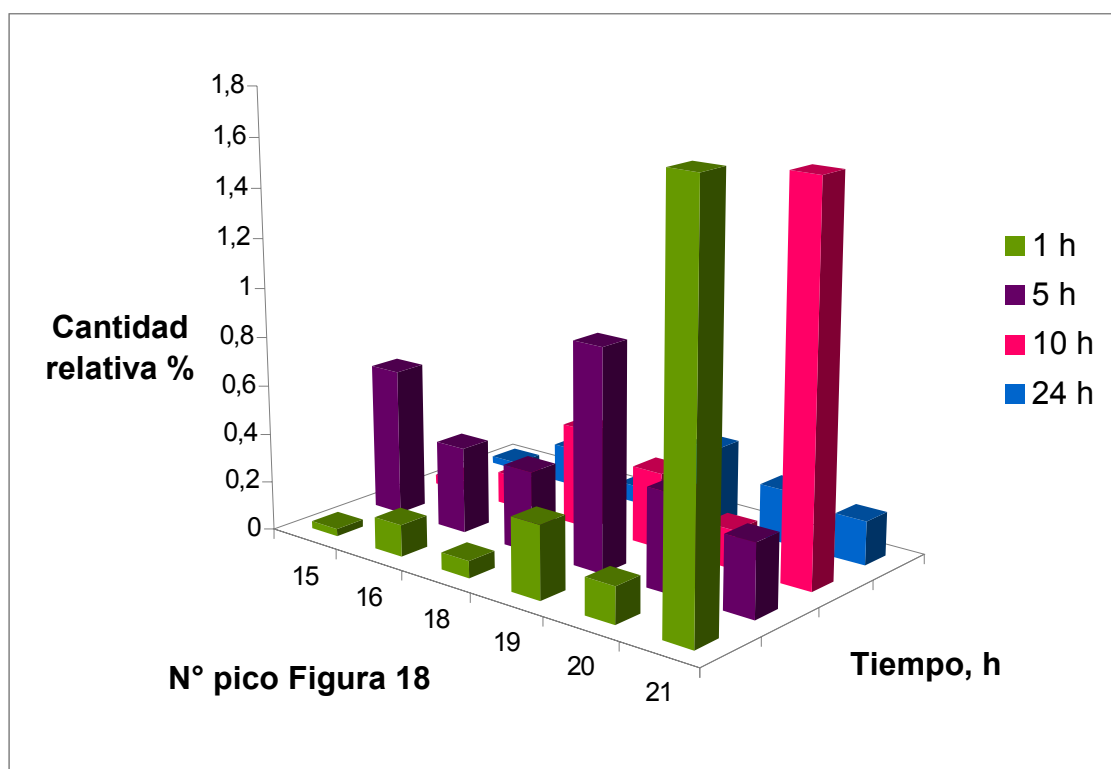


Figura 21. Productos de biotransformación del R-(+)-limoneno, empleando la mezcla de agua:tetrahidrofurano.

Los óxidos de limoneno [**Figura 20** (Picos N° 15 y 16)], se encuentran en trazas, en algunas especies vegetales como *Micromeria silicica*, *Michelia alba*, y en algunos alimentos como mandarina y jengibre. Debido a la

reactividad del grupo epóxido, son intermediarios de alto valor en la producción de compuestos ópticamente activos y en la resolución cinética de mezclas racémicas [16]. En estudios realizados por van der Werf [78] y colaboradores, se han logrado producir epóxidos a partir de los enantiómeros del limoneno empleando *Xanthobacter sp* [78]. Aunque su obtención también se logra comúnmente con catalizadores químicos heterogéneos [13].

Demyttenaere y colaboradores [25], realizaron la bioconversión del R-(+)-limoneno empleando especies *Penicillium*, se obtuvieron *cis*-óxido de limoneno y *trans*-óxido de limoneno como productos de biotransformación. Con el uso del hongo *Corynespora cassicola* y *Penicillium digitatum* en un medio de cultivo líquido obtuvieron *cis*-óxido de limoneno (0,14 y 0,29%, de rendimiento, respectivamente) [25].

✘ **Cuantificación de los productos de biotransformación del R-(+) limoneno obtenidos, en tetrahydrofurano, como solvente orgánico.**

La cuantificación de los productos de biotransformación, obtenidos con tetrahydrofurano como solvente orgánico, se realizó empleando la técnica de estandarización interna descrita en la metodología (**Sección 2.3**) (Véase **Tabla 13**).

Sólo se realizó la cuantificación de los productos de biotransformación, de la catálisis enzimática de la cloroperoxidasa, no se tuvieron en cuenta los compuestos secundarios indeseables, obtenidos posiblemente de reacciones del estándar interno con algunos compuestos presentes en el medio de reacción, o por contaminación cruzada al añadir el patrón interno, por los solventes o por el material de vidrio.

Tabla 13. Cuantificación de los productos de biotransformación del R-(+)-limoneno, usando tetrahidrofurano como solvente.

Pico N° **	Compuesto	Concentración [ppm]*			
		Tiempo,h			
		1	5	10	24
15	<i>cis</i> - Óxido de limoneno	0,68 ± 0,01	12,6 ± 0,1	0,92 ± 0,03	0,8 ± 0,2
16	<i>trans</i> - Óxido de limoneno	3,27 ± 0,04	7,1 ± 0,6	3,25 ± 0,01	3,72 ± 0,08
18	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	2,01 ± 0,06	6,52 ± 0,01	10,4 ± 0,6	1,69 ± 0,09
19	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona (Isómero)	8 ± 1,5	19 ± 1,4	7,74 ± 0,05	7,8 ± 0,2
20	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	3,7 ± 0,1	8,4 ± 0,3	4,2 ± 0,2	5,19 ± 0,04
21	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	43,6 ± 0,9	6,8 ± 0,3	40,2 ± 0,9	4,43 ± 0,02

** Número de pico en la **Figura 18**; * Promedio de dos extracciones independientes.

3.2.4 Biotransformación del S(-)-limoneno, empleando acetonitrilo como solvente orgánico. Al igual que para el enantiómero R(+)-, se realizó la biotransformación de S(-)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo. La cloroperoxidasa catalizó la oxidación de S(-)-limoneno, lográndose resultados similares a los obtenidos en la bioconversión del enantiómero R(+)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo.

En la **Figura 22**, se ilustran los perfiles cromatográficos obtenidos bajo las condiciones operacionales descritas en la **Sección 2.3**, en los cuales se puede observar la aparición de nuevos productos en comparación con el blanco de reacción (**Sección 2.2**).

A.

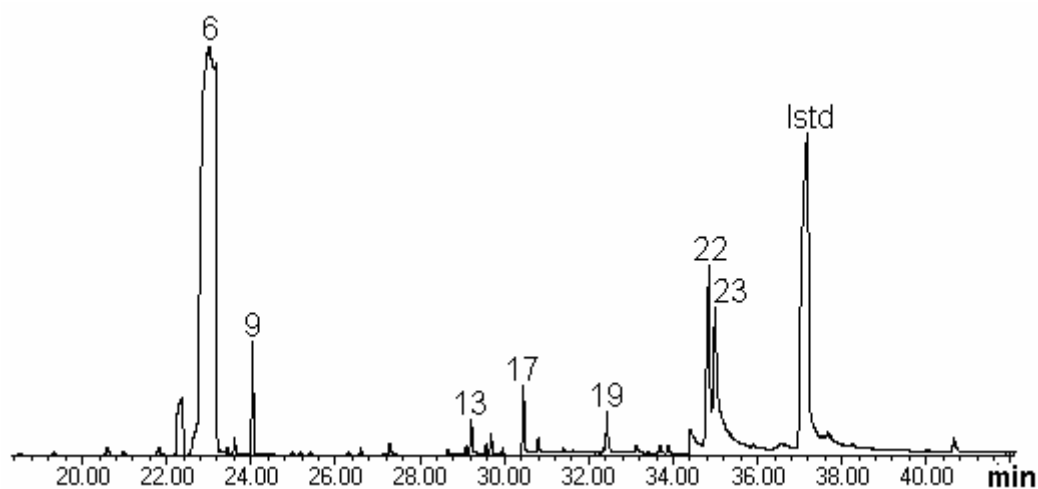
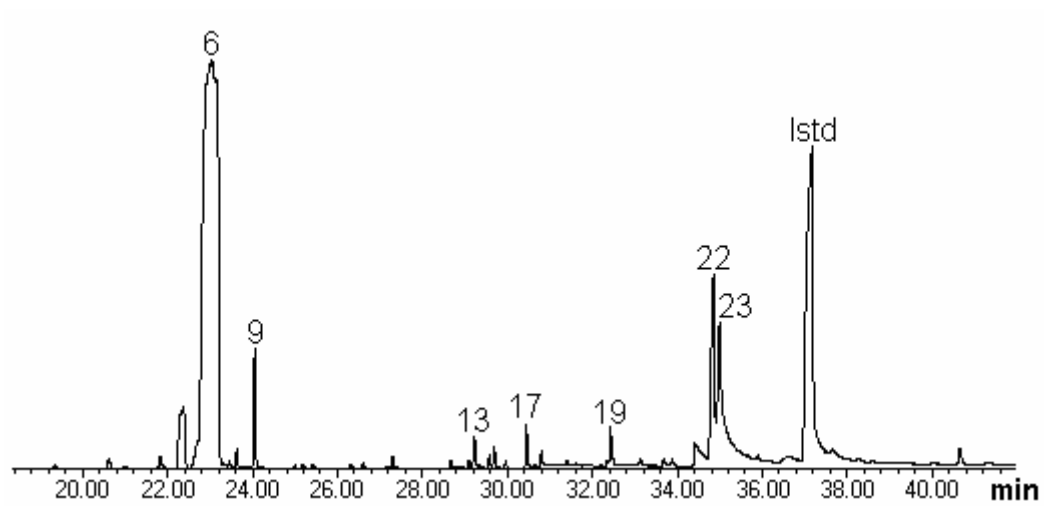


Figura 22. Perfiles cromatográficos de la biotransformación del S(-)-limoneno, en mezcla agua:acetonitrilo y el blanco de reacción, obtenidos por LLE con éter etílico, a cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1 h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 14**. GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

Figura 22, continuación.

B.



C.

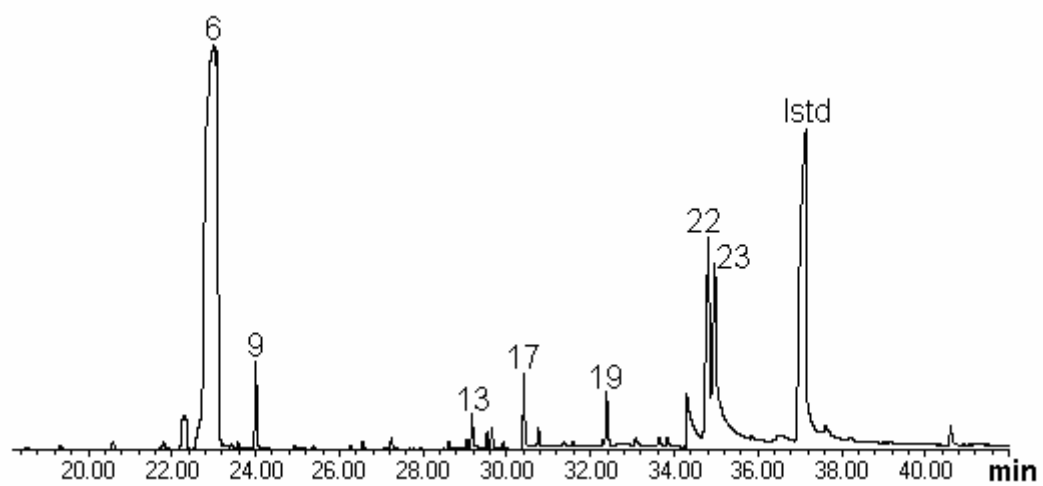
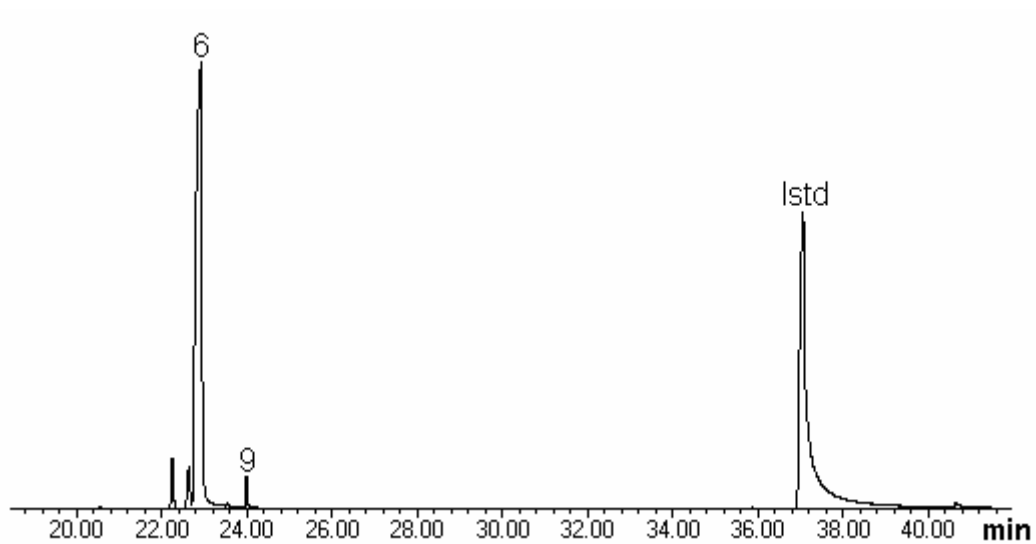
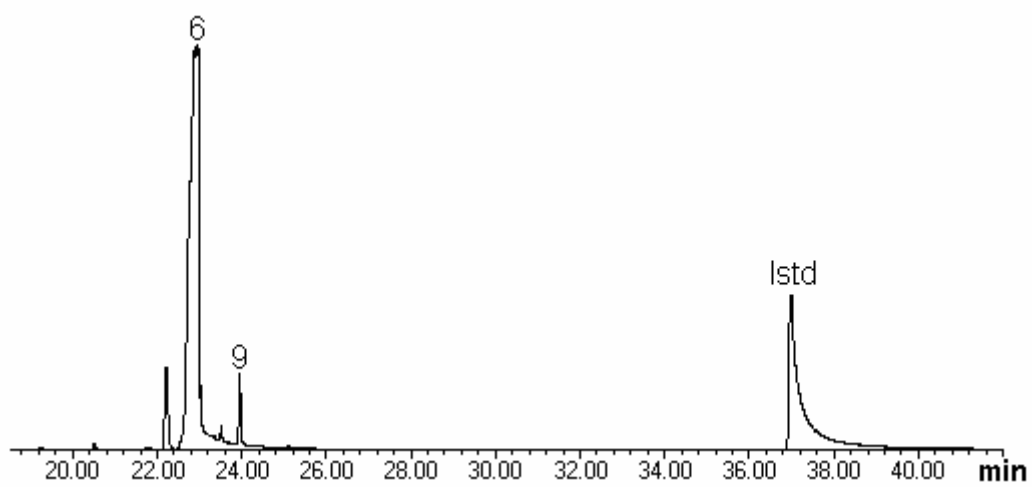


Figura 22, continuación.

D.



E.



La bioconversión del S-(-)-limoneno en la mezcla agua:acetonitrilo realizada en varios tiempos de reacción, presentó unos porcentajes de conversión muy similares (alrededor del 40%), lo que indica que bajo las condiciones utilizadas experimentalmente, el tiempo no es una variable significativa del proceso.

En la **Figura 23**, se presentan los porcentajes de conversión del S-(-)-limoneno a diferentes tiempos de reacción. Se observa como a las 10 h de reacción se alcanza el porcentaje de conversión más alto (42,4%), seguido del obtenido a las 5 h, cuando se logró un porcentaje muy cercano (40,5%), y finalmente, a una hora de reacción se observó la menor conversión del monoterpeno (39,5%).

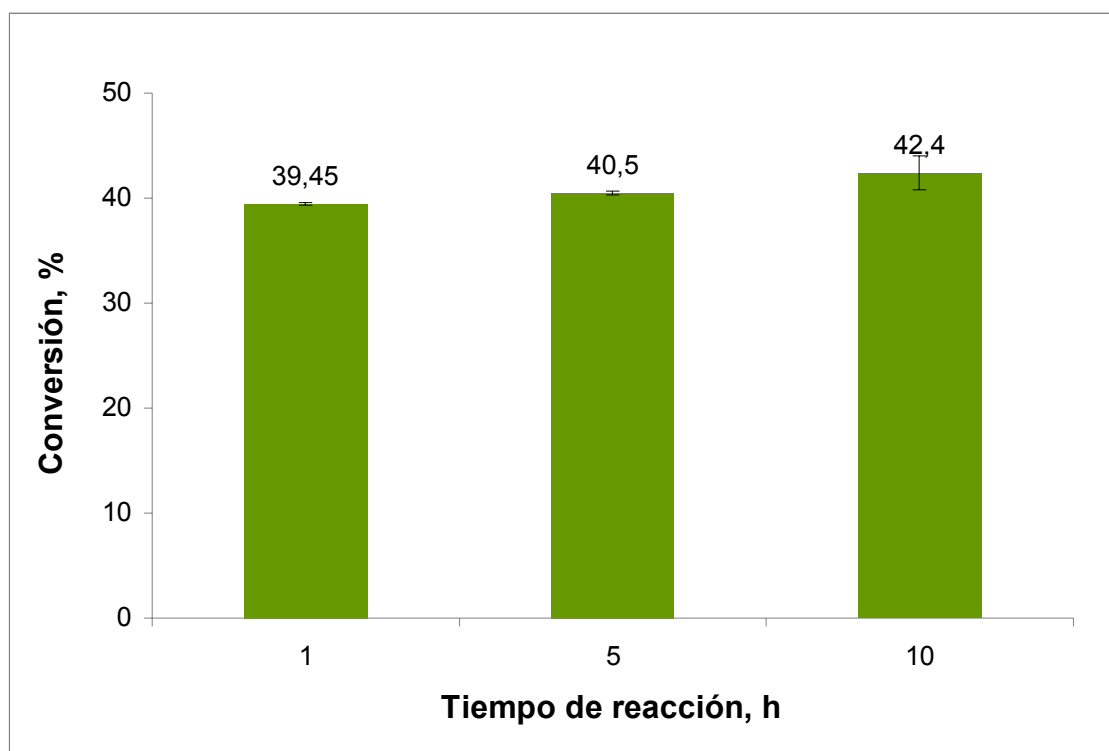


Figura 23. Conversión del S-(-)-limoneno, a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:acetonitrilo, usada como solvente.

Al igual que en los ensayos de biotransformación del R-(+)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo, a las 24 h de reacción no se formó ningún producto, posiblemente, porque la concentración y el volumen de peróxido de hidrógeno utilizado no fue el adecuado para estas condiciones o mala activación de la enzima.

El patrón certificado del S-(-)-limoneno (Sigma-Aldrich, 96%) empleado contiene algunos compuestos como canfeno, α -pineno y β -pineno, que fueron detectadas en los perfiles cromatográficos de los ensayos realizados y en el del blanco de reacción, aunque en muy bajas concentraciones. Estos compuestos no son considerados como productos de biotransformación, pero sí se reportan en la **Tabla 14**.

En estos ensayos se identificaron los mismos productos de oxidación y halogenación, identificados en los ensayos de biotransformación del R-(+)-limoneno con acetonitrilo, pero en cantidades relativas (%) diferentes. En la **Figura 24**, se presentan las fórmulas estructurales de los productos de biotransformación identificados de la bioconversión del S-(-)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo.

En el extracto obtenido por LLE, en su mayoría aparecen, productos de biotransformación oxigenados, entre los cuales se encuentran 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona, *cis*-dihidrocarvona y *trans*-carveol, y algunos compuestos cloro-oxigenados, e.g. 2-cloro-4-(1-metileténil)-ciclohex-5-en-1-ona.

En estudios realizados por Vázquez-Duhalt, R. y colaboradores [82], los autores lograron realizar la cloración de hidrocarburos aromáticos, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales se encuentran dispersos en el medio ambiente, y con considerados carcinogénicos [79]. Cabe resaltar, que bajo las condiciones de reacción usadas en estos ensayos (15% acetonitrilo, pH 3,0, 20 mM KCl y 1 mM H₂O₂), las cuales son muy similares a las usadas en esta investigación,

únicamente ocurrió la halogenación de los hidrocarburos, y no reacciones de oxidación, como si sucedió durante la bioconversión realizada en este trabajo [Ver **Tabla 14** (Picos N° 22 y 23)].

Debido a su bajo precio, entre 0,6-0,14 US \$/kg (2000), el limoneno es un compuesto atractivo para la industria química y de sabores, por ser estructuralmente similar a la carvona, carveol y alcohol perílico [61]. Duetz, W. A. y colaboradores [28], realizaron la biotransformación de limoneno empleando células de *Rhodococcus opacus* PWD4, obteniendo *trans*-carveol y trazas de carvona, bajo diferentes medios de reacción. El *trans*-carveol es un producto común en la oxidación de limoneno con diferentes microorganismos o enzimas [28].

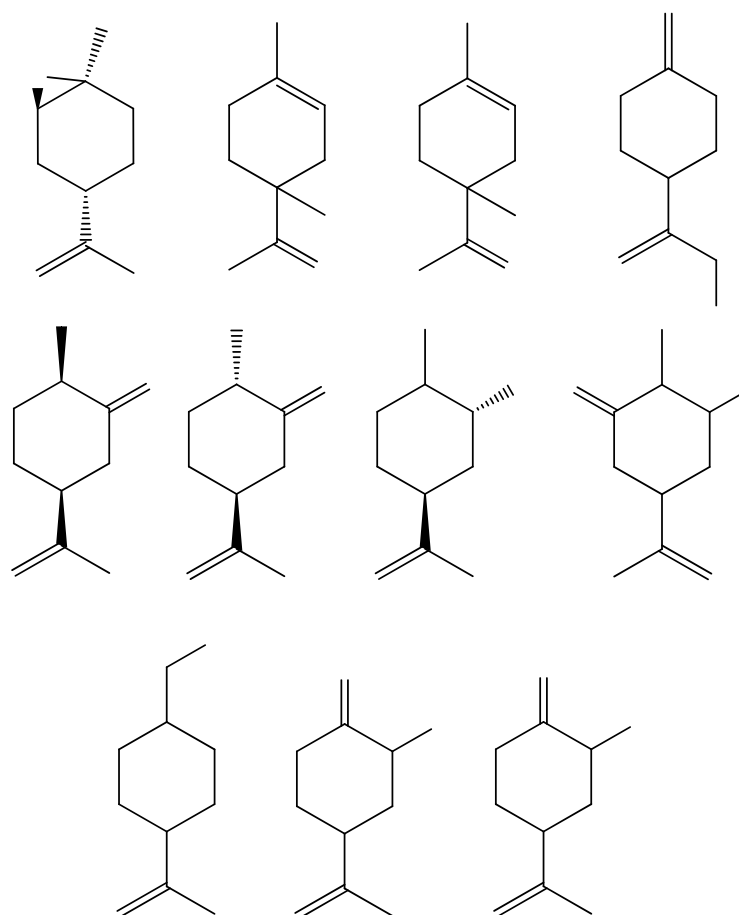


Figura 24. Fórmulas estructurales de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo, según su orden de elución en los cromatogramas (**Figura 22**). Los nombres aparecen en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Composición química de los productos, obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del S-(-)-limoneno, en la mezcla agua:acetonitrilo usada como solvente orgánico.

Pico N° **	Ik ^{a)}	Compuesto	Cantidad relativa, % ^{b)}				
			Tiempo, h				
			1	5	10	24	Blanco
1	936	α - Pineno	0,12 \pm 0,01	0,17 \pm 0,03	0,11 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01
2	954	Canfeno	0,21 \pm 0,05	0,27 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01
3	982	β - Pineno	0,35 \pm 0,01	0,43 \pm 0,032	0,28 \pm 0,07	0,08 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01
4	1010	β -Mirceno	0,42 \pm 0,03	0,59 \pm 0,06	0,21 \pm 0,03	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
5	1023	Δ -2-Careno	4,0 \pm 0,6	5,09 \pm 0,04	2,05 \pm 0,04	1,10 \pm 0,06	1,01 \pm 0,04
6	1039	Limoneno	58,05 \pm 0,03	57,0 \pm 0,1	55 \pm 1,5	95,8 \pm 0,6	97,5 \pm 0,1
7	1043	β -Felandreno	0,66 \pm 0,01	1,0 \pm 0,4	0,6 \pm 0,2	0,54 \pm 0,08	0,62 \pm 0,07
8	1054	1-Metilen-4-(1-metilethenil)-ciclohexano	0,33 \pm 0,04	0,37 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01
9	1076	γ -Terpineno	2,38 \pm 0,06	2,93 \pm 0,03	0,19 \pm 0,02	0,7 \pm 0,2	0,4 \pm 0,1

Tabla 14, continuación.

10	1146	<i>trans</i> - Óxido de limoneno	0,27 ± 0,02	0,30 ± 0,06	0,33 ± 0,06	N.D.	N.D.
11	1181	N.I. (<i>m/z</i> 151 [M ⁺], 143 (28), 123 (24), 107 (32), 93 (50), 79 (40), 69 (45), 43 (48)).	0,19 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,18 ± 0,01	N.D.	N.D.
12	1190	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	0,21 ± 0,06	0,24 ± 0,02	0,21 ± 0,01	N.D.	N.D.
13	1194	1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona (Isómero)	0,92 ± 0,07	0,9 ± 0,2	3,0 ± 0,4	N.D.	N.D.
14	1203	2-(4-Metilenciclohexil)-2-propen-1-ol	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,45 ± 0,01	N.D.	N.D.
15	1206	<i>cis</i> - Dihidrocarvona	0,46 ± 0,02	0,68 ± 0,02	1,49 ± 0,01	N.D.	N.D.
16	1215	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0,20 ± 0,03	2,1 ± 0,9	0,26 ± 0,01	N.D.	N.D.
17	1228	<i>trans</i> -Carveol	0,8 ± 0,3	2,7 ± 0,1	3,6 ± 0,2	N.D.	N.D.
18	1243	Óxido de carvona	0,37 ± 0,03	0,40 ± 0,01	3,5 ± 0,2	N.D.	N.D.
19	1286	Alcohol perílico	1,1 ± 0,2	1,12 ± 0,09	2,3 ± 0,1	N.D.	N.D.
20	1303	C ₁₀ H ₁₆ O*, P.M. 152	0,24 ± 0,04	0,27 ± 0,05	0,27 ± 0,04	N.D.	N.D.
21	1332	C ₁₀ H ₁₀ O ₄ *, P.M. 194	2,2 ± 0,2	2,5 ± 0,5	3,78 ± 0,06	N.D.	N.D.
22	1344	2-Cloro-4-(1-metiletenil)-ciclohex-5-en-1-ona*	8,9 ± 0,4	9 ± 1,1	9 ± 1,1	N.D.	N.D.
23	1348	2-Cloro-4-(1-metiletenil)-ciclohex-5-en-1-ona* (Isómero)	12,9 ± 0,3	13,9 ± 0,8	10 ± 3,0	N.D.	N.D.
24	1507	Hidroxitolueno butilado (Antioxidante)	0,47 ± 0,04	0,7 ± 0,06	0,52 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,01

** Número de pico en la **Figura 22**; *Identificado tentativamente; N.D. No detectado; N.I. No identificado; ^{a)} Índices de Kováts determinados experimentalmente en la columna DB5-MS; ^{b)} Promedio de dos extracciones independiente.

En la **Figura 25**, se presentan los productos de biotransformación, obtenidos en función de sus cantidades relativas (%), a diferentes tiempos de reacción. Los siguientes fueron los productos mayoritarios en el extracto obtenido por LLE con éter etílico: 2-cloro-4-(1-metileténil)-ciclohex-5-en-1-ona [8,9% (1 h), 9,4% (5 h) y 8,8% (10 h)] y 2-cloro-4-(1-metileténil)-ciclohex-5-en-1-ona [12,9% (1 h), 13,9% (5 h) y 10,5% (10 h)], seguidos de *trans*-carveol [0,8% (1 h), 2,7% (5 h) y 3,6% (10 h)], 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona [0,92% (1 h), 0,9% (5 h) y 3,0% (10 h)], C₁₀H₁₀O₄ [2,2% (1 h), 2,5% (5 h) y 3,78% (10 h)] el cual no se logró identificar, alcohol perílico [1,1% (1 h), 1,12% (5 h) y 2,3% (10 h)] y *cis*-dihidrocarvona [0,46% (1 h), 0,68% (5 h) y 1,49% (10 h)].

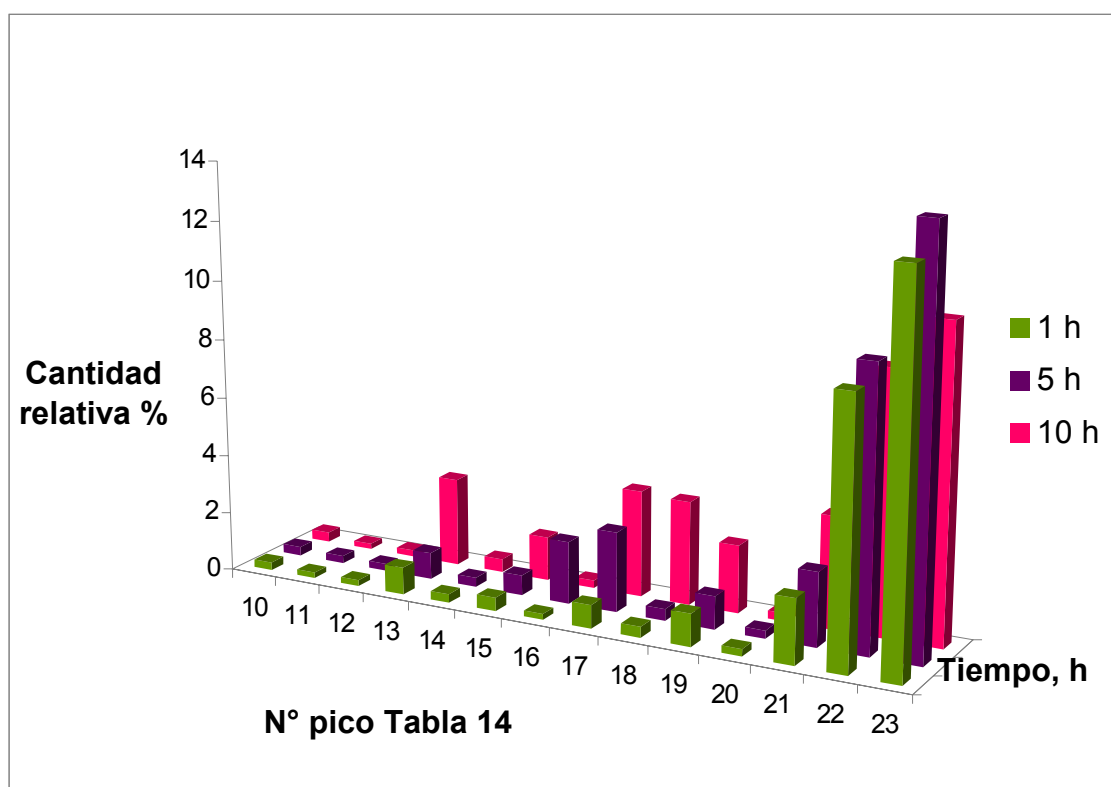


Figura 25. Productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, empleando la mezcla agua:acetonitrilo, como solvente.

La cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*, tiene la habilidad de realizar varios tipos de reacciones estereoselectivas de inserción de oxígeno, entre las que se encuentran la epoxidación e hidroxilación [32].

La variación en las cantidades relativas (%), de los productos de la biotransformación de los dos limonenos enantioméricos, puede ser una consecuencia de la alta enantioselectividad de la cloroperoxidasa, para catalizar halogenación y oxidación.

✘ **Cuantificación de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, empleando acetonitrilo como solvente orgánico.**

La cuantificación de los productos de biotransformación obtenidos con acetonitrilo como solvente orgánico, se realizó empleando la técnica de estandarización interna, descrita en la metodología (**Sección 2.3**) (Véase **Tabla 15**).

3.2.5 Biotransformación del S-(-)-limoneno, empleando metanol como solvente orgánico. Con el uso de la mezcla agua:metanol en el medio de reacción, se presentaron diferencias claras en la biotransformación de R-(+)-limoneno y S-(-)-limoneno, obteniéndose un menor número de productos en la bioconversión del S-(-)-limoneno (Ver **Figura 26**).

Teniendo en cuenta que la extracción (LLE) de los productos de biotransformación fue realizada bajo las mismas condiciones, se puede concluir, que la diferencia en la bioconversión de los monoterpenos enantioméricos con el uso de metanol, se debe a la enantioselectividad de la cloroperoxidasa, puesto que tanto los solventes orgánicos, como la estereoquímica del sustrato tienen un efecto sobre la actividad catalítica de las enzimas.

Tabla 15. Cuantificación de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, usando acetonitrilo, como solvente.

Pico N° **	Compuesto	Concentración, ppm ^{a)}		
		Tiempo, h		
		1	5	10
10	<i>trans</i> - Óxido de limoneno	7,6 ± 0,1	7,05 ± 0,02	9,63 ± 0,06
11	N.I. (<i>m/z</i> 151 [M ⁺], 143 (28), 123 (24), 107 (32), 93 (50), 79 (39), 69 (45), 43 (48)).	5,2 ± 0,2	6,06 ± 0,06	5,3 ± 0,1
12	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	5,90 ± 0,02	5,8 ± 0,4	6,28 ± 0,01
13	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona (Isómero)	25,4 ± 0,1	20,2 ± 0,9	87,70 ± 0,4
14	2-(4-Metilenciclohexil)-2-propen-1-ol	8,04 ± 0,09	7,8 ± 0,2	13,09 ± 0,01
15	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	12,7 ± 0,3	16,23 ± 0,02	43,5 ± 0,1
16	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	5,93 ± 0,01	6,22 ± 0,04	5,69 ± 0,01
17	<i>trans</i> -Carveol	21,7 ± 0,5	65 ± 2,8	104 ± 1,2
18	Óxido de carvona	10,20 ± 0,08	9,3 ± 0,3	100,6 ± 0,9
19	Alcohol perfílico	31,5 ± 0,8	26,9 ± 0,2	68,1 ± 0,9
20	C ₁₀ H ₁₆ O*, P.M. 152	6,5 ± 0,1	6,5 ± 0,1	7,73 ± 0,04
21	C ₁₀ H ₁₀ O ₄ *, P.M. 194	59,3 ± 0,9	60 ± 1,0	110 ± 1,6
22	2-Cloro-4-(1-metiletetil)-ciclohex-5-en-1-ona*	247 ± 1,8	227 ± 0,4	258 ± 1,1
23	2-Cloro-4-(1-metiletetil)-ciclohex-5-en-1-ona* (Isómero)	357 ± 1,3	333 ± 1,4	309 ± 1,9

** Número de pico en la **Figura 22**; *Identificado tentativamente; N.I. No identificado; ^{a)} Promedio de dos extracciones independientes.

En la **Figura 26**, se ilustran los perfiles cromatográficos obtenidos bajo las condiciones operacionales descritas en la **Sección 2.3**. Debido a que las áreas de picos cromatográficos de los productos de biotransformación son muy pequeñas, no se observó una diferencia clara entre los perfiles cromatográficos de los ensayos realizados y el blanco de reacción, por lo que fue necesario ampliar un pequeño rango del perfil para observar mejor las señales los productos formados.

A.

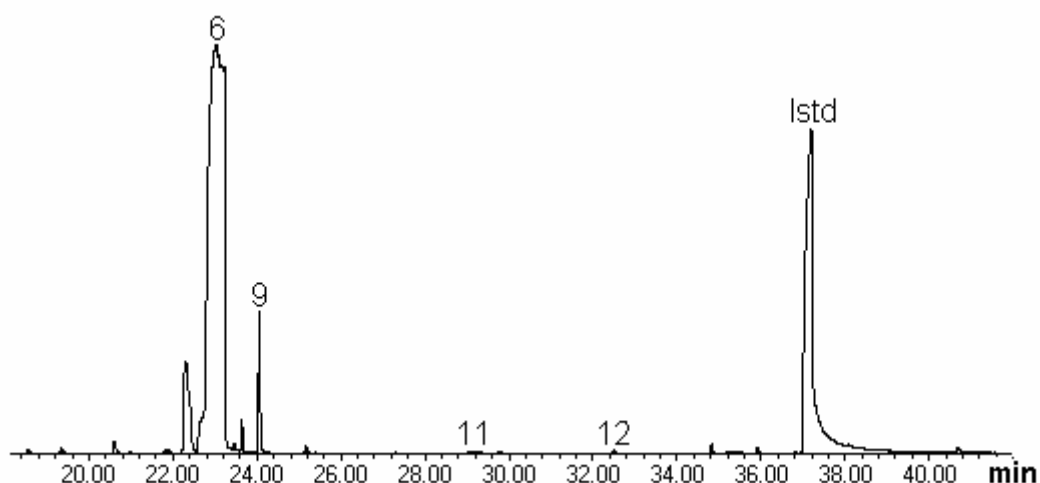
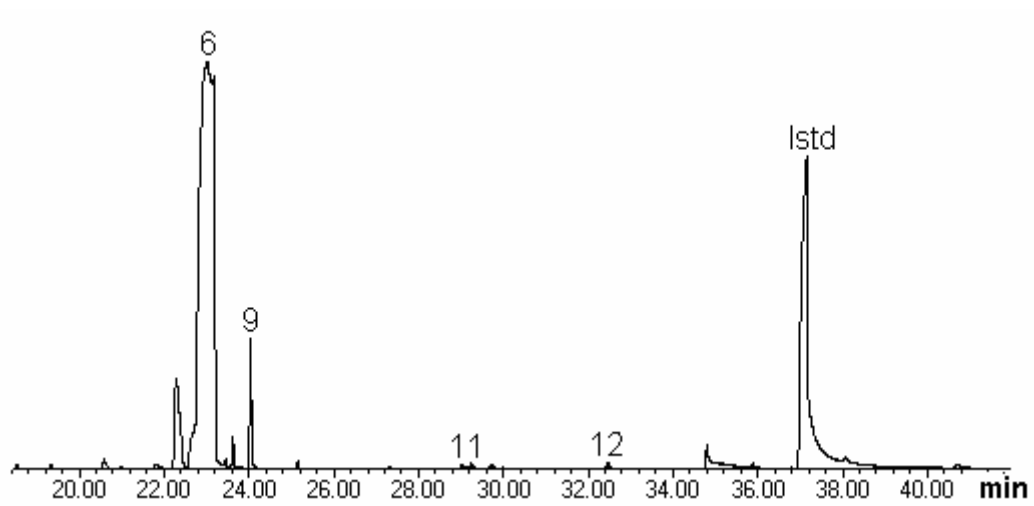


Figura 26. Perfiles cromatográficos de los productos de la biotransformación del S-(-)-limoneno, en mezcla agua:metanol y el blanco de reacción, obtenidos por LLE con éter etílico, a cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 16**. GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

Figura 26, continuación.

B.



C.

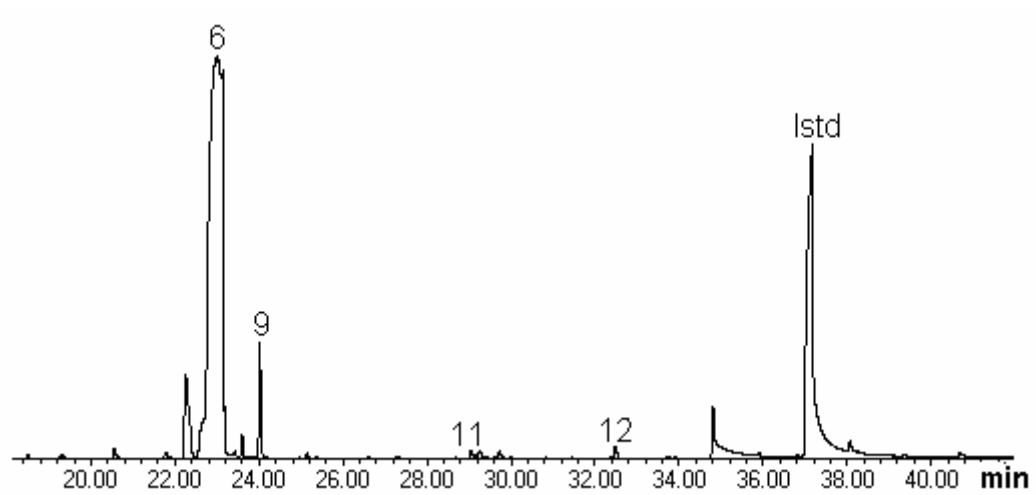
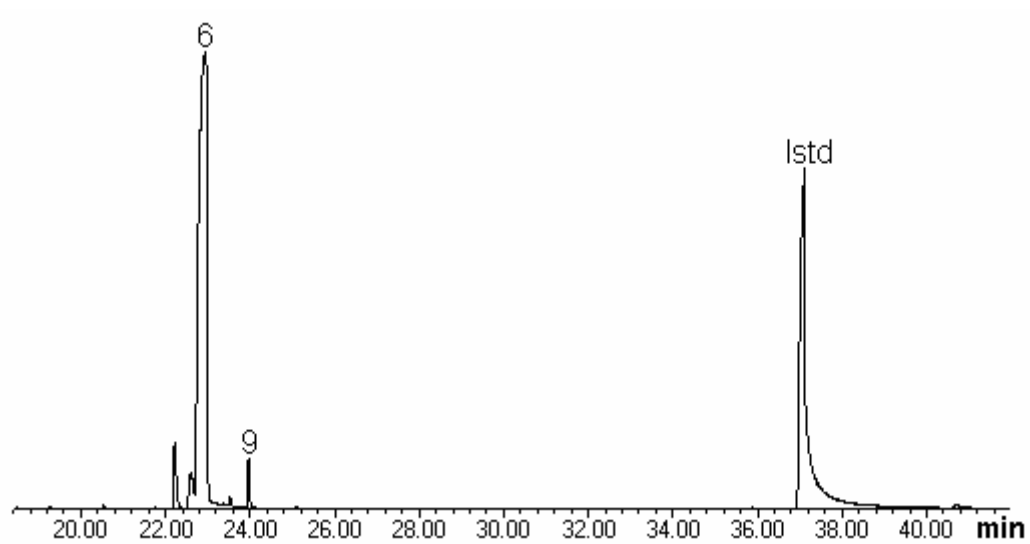
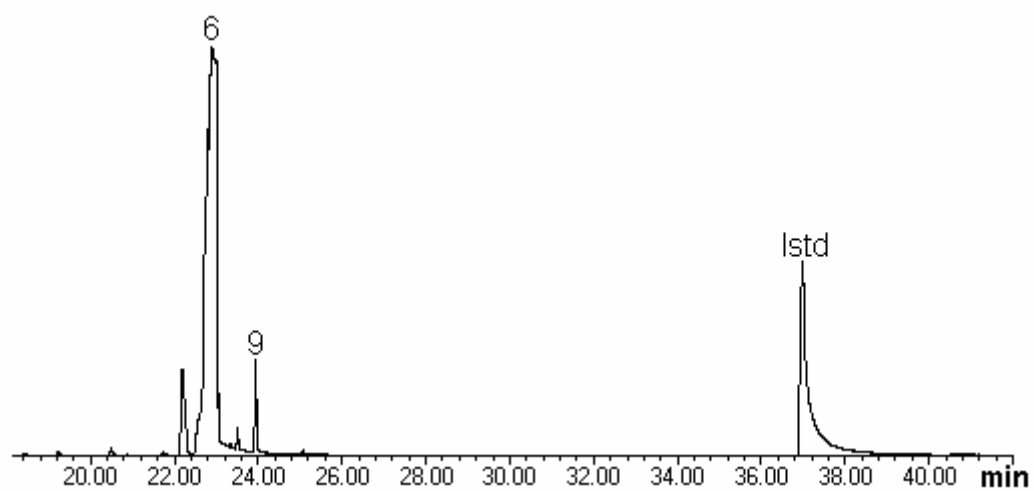


Figura 26, continuación.

D.



E.



Los porcentajes de conversión del S-(-)-limoneno, obtenidos fueron muy similares entre ellos. En la **Figura 27**, se observa que la diferencia de los porcentajes a distintos tiempos de reacción es mínima. A las 5 h de reacción se obtuvo la mayor conversión del S-(-)-limoneno (34,7%), pero la conversión a 1 y 10 h varió en menos del 3% (32,8 y 31,8%, respectivamente). Al igual que en los ensayos de biotransformación del R-(+)-limoneno, bajo las condiciones experimentales, no ocurrió la conversión del S-(-)-limoneno a las 24 h de reacción.

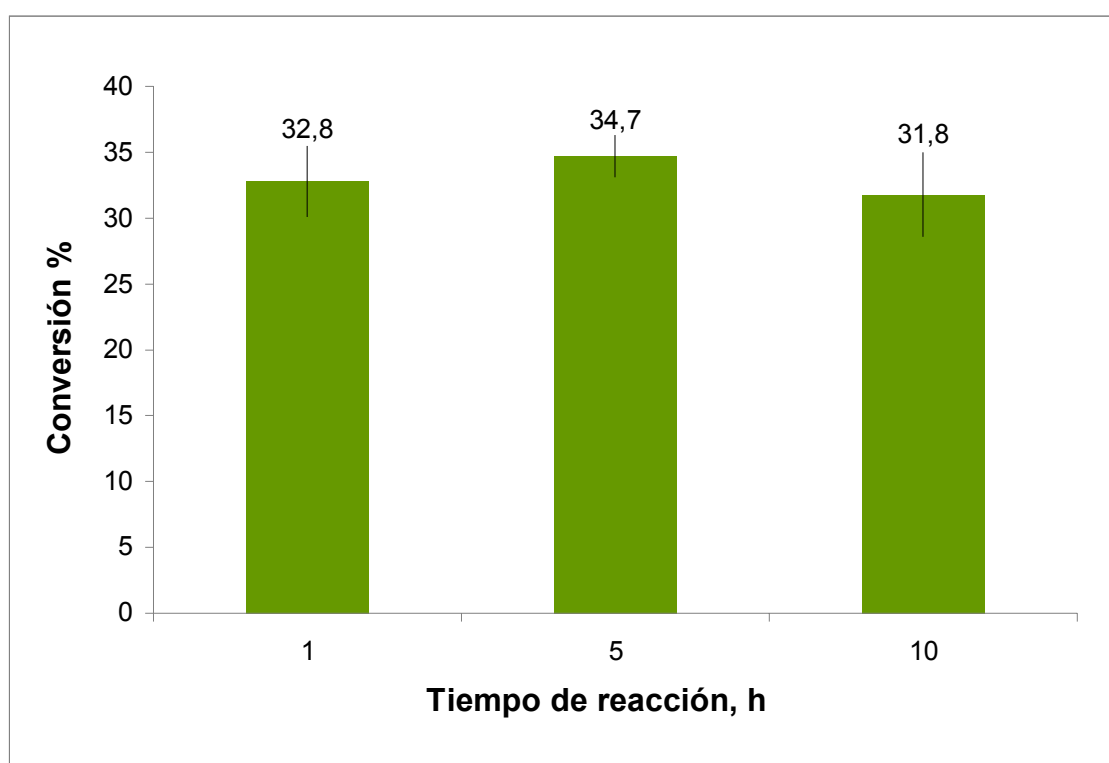


Figura 27. Conversión del S-(-)-limoneno a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:metanol, usada como solvente.

En la **Tabla 16**, se muestran las cantidades relativas (%) de los compuestos presentes en el patrón certificado del S-(-)-limoneno y dos productos de formación identificados (Ver **Figura 28**), los cuales también fueron detectados durante la bioconversión del R-(+)-limoneno, pero en cantidades relativas (%) mayores.

Tabla 16. Composición química de los productos obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del S-(-)-limoneno, en la mezcla agua:metanol, usada como solvente orgánico.

Pico N ^{o**}	Ik ^{a)}	Compuesto	Cantidad relativa [%] ^{b)}				
			Tiempo, h				
			1	5	10	24	Blanco
1	935	α -Pineno	0,47 \pm 0,04	0,46 \pm 0,06	0,5 \pm 0,1	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,03
2	950	Canfeno	0,69 \pm 0,06	0,59 \pm 0,02	0,7 \pm 0,1	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,05
3	980	β -Pineno	1,3 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1	1,1 \pm 0,06	0,2 \pm 0,01	0,1 \pm 0,1
4	1009	α -Felandreno	1,0 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,07	0,07 \pm 0,03	0,09 \pm 0,08
5	1020	α -Terpineno	18 \pm 2,5	17,8 \pm 0,7	15,5 \pm 1,0	1,6 \pm 0,2	1,9 \pm 0,7
6	1035	Limoneno	64 \pm 1,3	62,0 \pm 0,2	65 \pm 1,8	94,9 \pm 0,9	97 \pm 1,4
7	1039	β - Felandreno	2,7 \pm 0,3	3,1 \pm 0,3	3,0 \pm 0,6	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,3
8	1038	1(7), 8- <i>p</i> -menthadiene	1,6 \pm 0,3	2,2 \pm 0,7	1,3 \pm 0,08	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,06
9	1050	γ -Terpineno	9 \pm 2,5	8,4 \pm 0,2	7,9 \pm 0,1	0,13 \pm 0,02	0,11 \pm 0,05
10	1080	Terpinoleno	0,4 \pm 0,02	0,51 \pm 0,05	0,42 \pm 0,03	0,6 \pm 0,1	0,57 \pm 0,07
11	1200	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	0,35 \pm 0,02	0,72 \pm 0,05	1,0 \pm 0,1	N.D.	N.D.
12	1283	Alcohol perílico	0,6 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1	1,45 \pm 0,05	N.D.	N.D.
13	1507	Hidroxitolueno butilado	0,74 \pm 0,01	0,72 \pm 0,04	1,0 \pm 0,1	0,09 \pm 0,01	0,1 \pm 0,1

** Número de pico en la **Figura 26**; *Identificado tentativamente; N.D. No detectado; ^{a)} Índices de Kováts determinados experimentalmente en la columna DB5-MS; ^{b)} Promedio de dos extracciones independiente

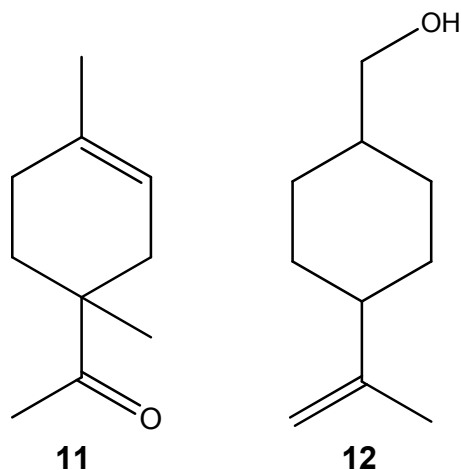


Figura 28. Fórmulas estructurales de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno en la mezcla agua:metanol, según su orden de elución en el cromatograma (**Figura 26**). Los nombres aparecen en la **Tabla 16**.

En la **Figura 29**, se presentan los productos de biotransformación obtenidos en función de sus cantidades relativas (%), a diferentes tiempos de reacción, siendo éstos: 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona [0,35% (1 h), 0,72% (5 h) y 1,0% (10 h)] y alcohol perílico [0,6% (1 h), 1,2% (5 h) y 1,45% (10 h)].

✘ **Cuantificación de los productos de la biotransformación del S-(-)-limoneno obtenidos, en metanol, como solvente orgánico.**

La cuantificación de los productos de biotransformación obtenidos con metanol como solvente orgánico, se realizó empleando la técnica de estandarización interna descrita en la metodología (**Sección 2.3**) (Ver **Tabla 17**).

Tabla 17. Cuantificación de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno con acetonitrilo, como solvente.

Pico N° **	Compuesto	Concentración, ppm ^a		
		Tiempo, h		
		1	5	10
11	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	3,54 ± 0,02	6,6 ± 0,1	8,2 ± 0,2
12	Alcohol perfílico	6,4 ± 0,2	10,6 ± 0,1	12,17 ± 0,05

** Número de pico en la **Figura 26**; ^{a)} Promedio de dos extracciones independientes.

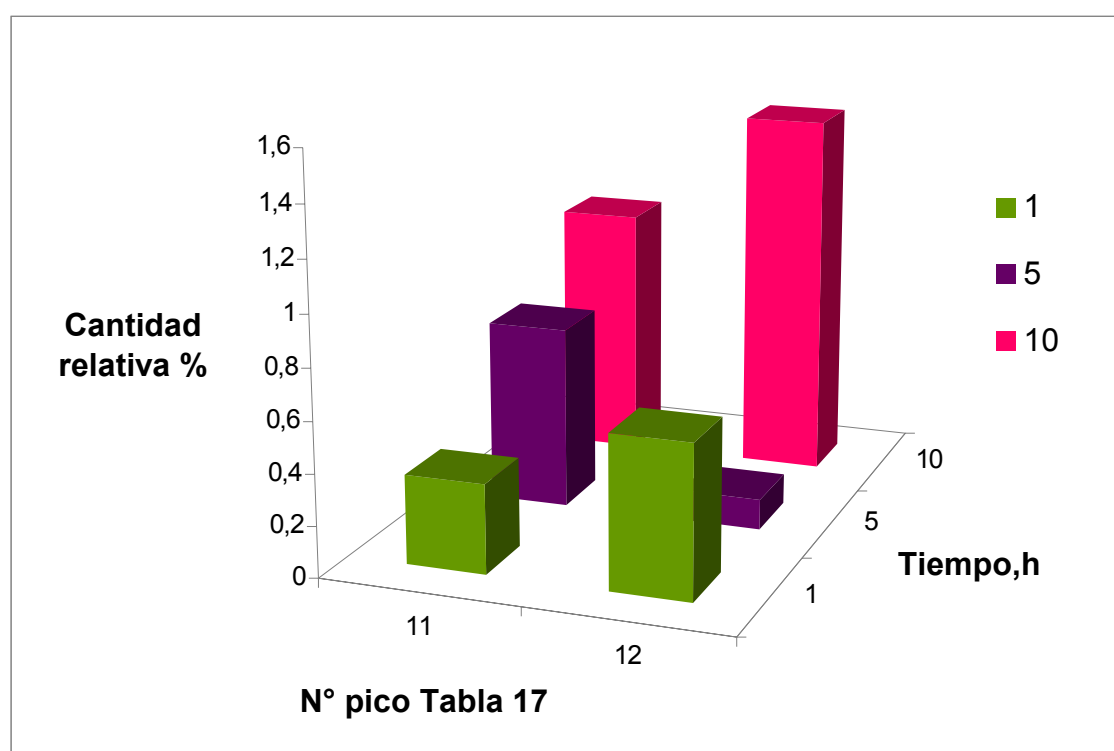


Figura 29. Productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, empleando la mezcla agua:metanol, como solvente.

En estudios realizados por Wenjian, L. y colaboradores [83], en los que se realizó la bioconversión del limoneno empleando varias algas marinas, se identificaron algunos monoterpenos oxigenados y otros metabolitos como sesqui-, di- y tri-terpenos, como productos de biotransformación. Además, se detectaron algunos terpenos generados por biodegradación o

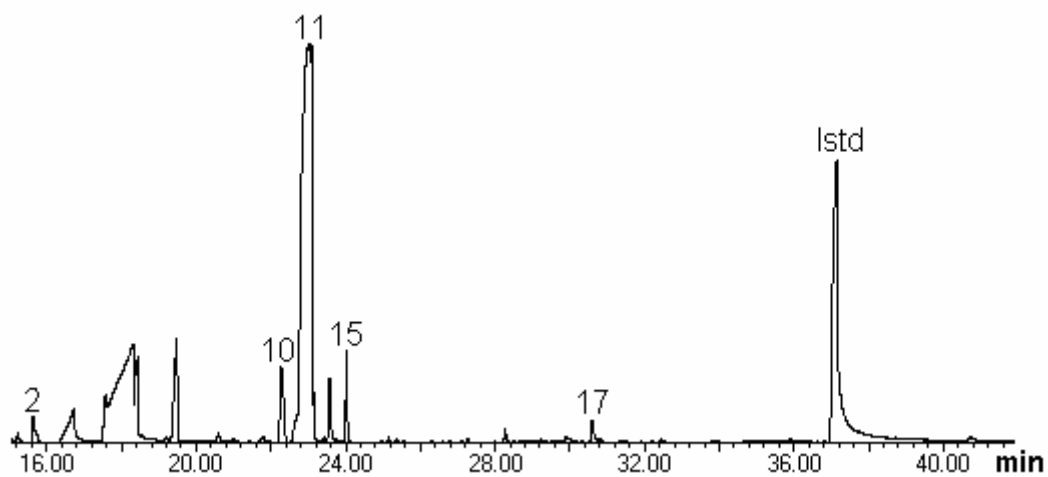
rearrreglo. Estos productos de biotransformación sólo fueron identificados, pero no se reportan sus cantidades relativas (%), ni concentraciones de cada uno de ellos.

3.2.6 Biotransformación del S-(-)-limoneno, empleando tetrahidrofurano como solvente orgánico. La biotransformación del S-(-)-limoneno también se realizó en un medio de reacción agua:tetrahidrofurano, a diferentes tiempos de reacción.

En los perfiles cromatográficos (Ver **Figura 30**) obtenidos bajo las condiciones operacionales descritas en la **Sección 2.3**, se aprecia la formación de nuevos productos en los ensayos realizados.

También se efectuó la conversión del S-(-)-limoneno, empleando la mezcla agua:metanol, con lo que se logró la formación de los mismos monoterpenos oxigenados en cantidades relativas (%) similares, a los obtenidos durante la bioconversión del R-(+)-limoneno, realizada bajo las mismas condiciones experimentales. En estos ensayos, además de la formación de los mismos productos de biotransformación, también se identificaron los mismos compuestos no considerados productos de la catálisis enzimática, ya que también se observaron en el perfil cromatográfico del blanco de reacción con Istd, pero no en el perfil de blanco de reacción sin Istd (Ver **Figura 30**).

A.



B.

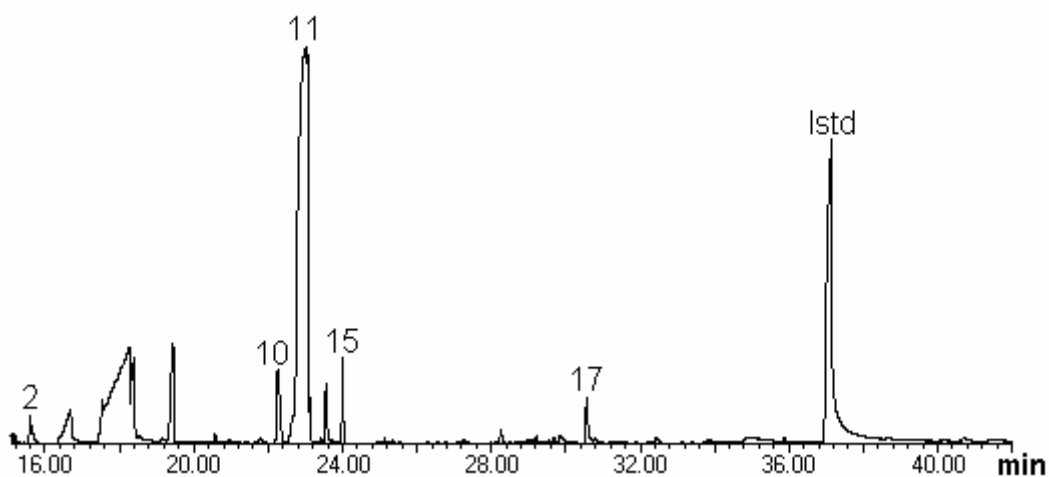
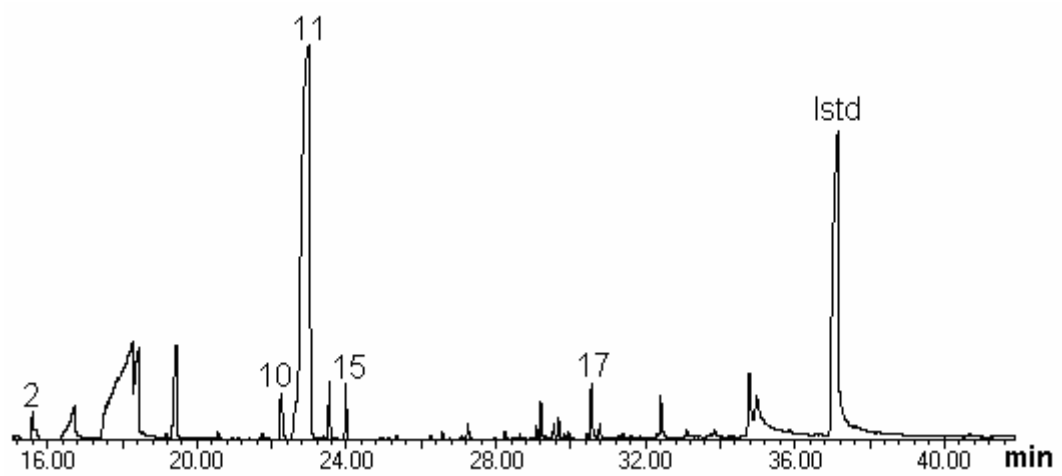


Figura 30. Perfiles cromatográficos de los productos de la biotransformación del S-(-)-limoneno, en mezcla agua:tetrahidrofurano y del blanco de reacción, obtenidos por LLE con éter etílico, a cada uno de los tiempos de reacción: **A.** 1 h; **B.** 5 h; **C.** 10 h; **D.** 24 h; **E.** Blanco de reacción sin Istd, **F.** Blanco de reacción con Istd. La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 18**. GC-MS, columna capilar DB-5MS (60 m), inyección *splitless*, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

Figura 30, continuación.

C.



D.

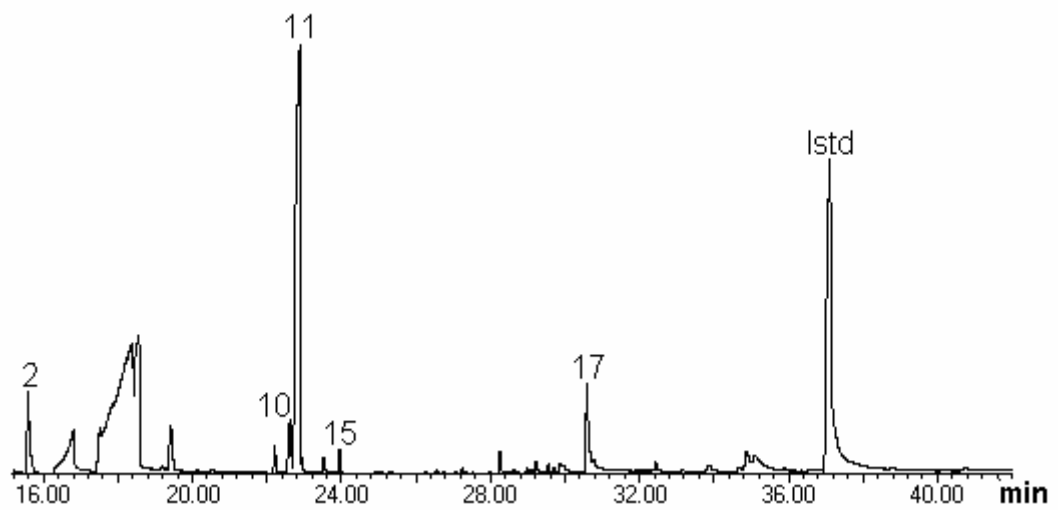
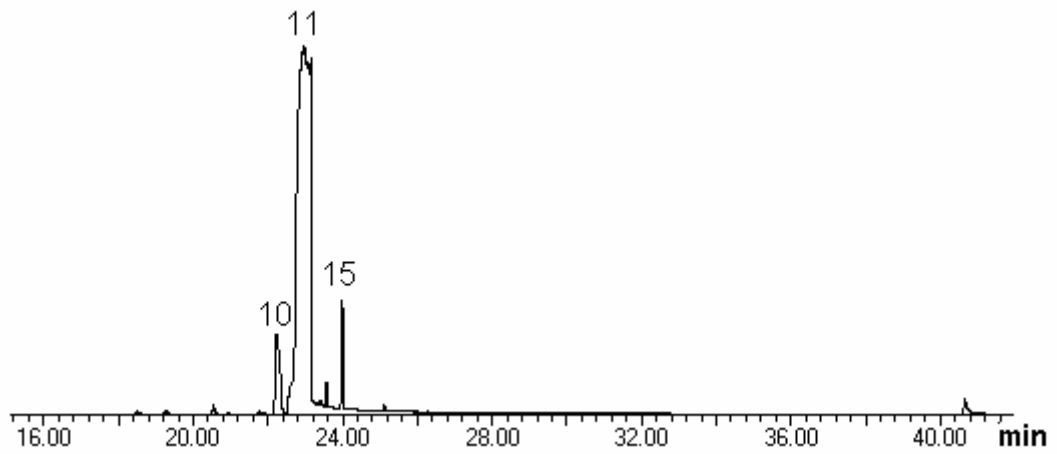
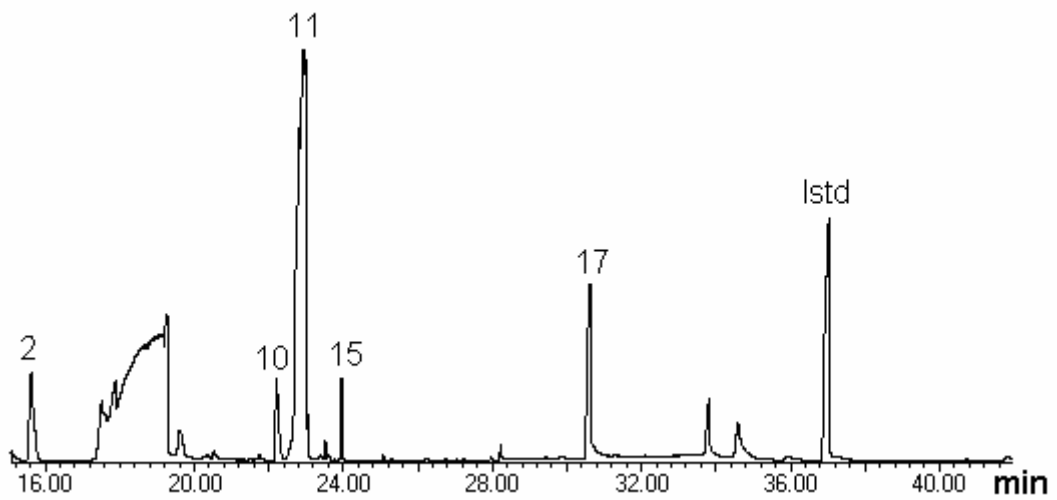


Figura 30, continuación.

E.



F.



Los porcentajes de conversión del S-(-)-limoneno en mezcla agua:tetrahidrofurano, aumentaron con el tiempo, manejado en función de la adición del H₂O₂, exceptuando las 24 h, cuando se observó una leve disminución (Ver **Figura 31**). En esta figura, se observa como a las 10 h de reacción se obtuvo el porcentaje de conversión más alto (44,5%), seguido de los porcentajes registrados a las 24 h (41,8%), 5 h (39,1%) y 1 h (37,3%).

A pesar de que se lograron porcentajes de conversión relativamente altos, los resultados obtenidos bajo estas condiciones no fueron los esperados porque además de los productos de biotransformación, se detectaron e identificaron compuestos secundarios, no derivados de la catálisis enzimática.

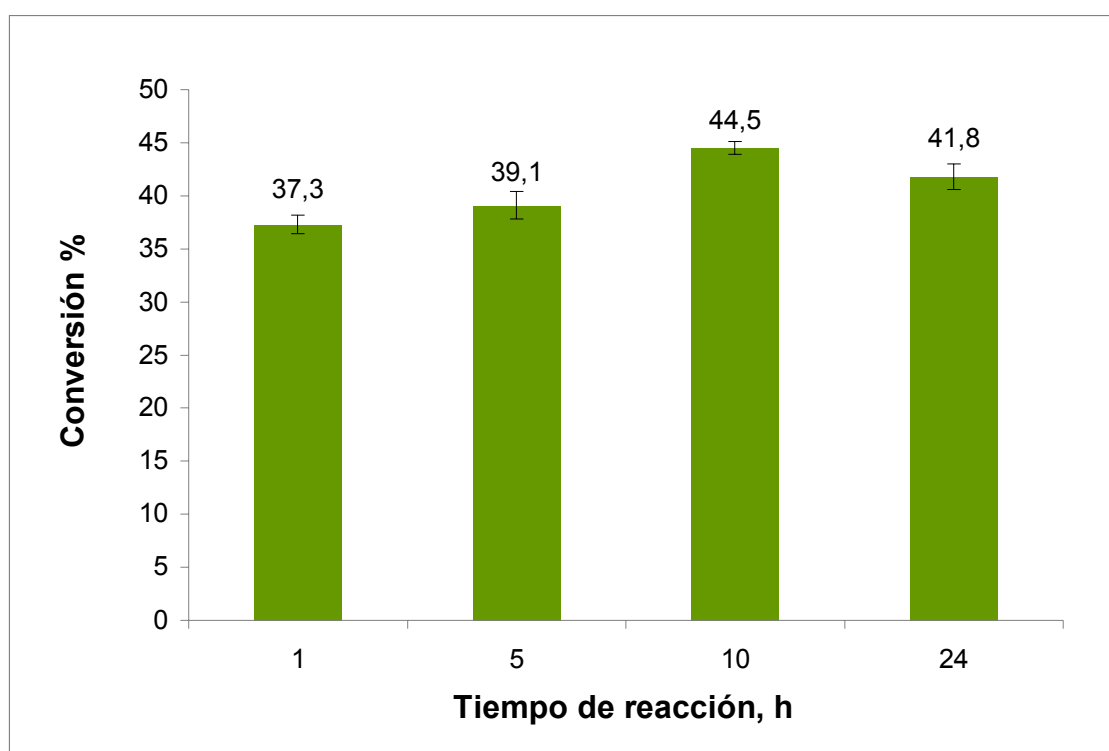


Figura 31. Conversión del S-(-)-limoneno a diferentes intervalos de adición del peróxido de hidrógeno, en la mezcla agua:tetrahidrofurano, usada como solvente.

En la **Tabla 18**, se muestran las cantidades relativas (%) de los compuestos presentes en el patrón certificado del S-(-)-limoneno y de los

productos de biotransformación en la fase orgánica, extraídos con éter etílico.

El extracto obtenido por LLE con éter etílico, presentó en su mayoría productos de biotransformación oxigenados, entre los cuales se encontraban *cis*-óxido de limoneno, 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona y *cis*-dihidrocarvona. A diferencia de lo obtenido durante la biotransformación del S-(-)-limoneno con los otros solventes, se obtuvieron menos productos de biotransformación y se registraron compuestos no derivados de la catálisis enzimática (Ver **Tabla 18**).

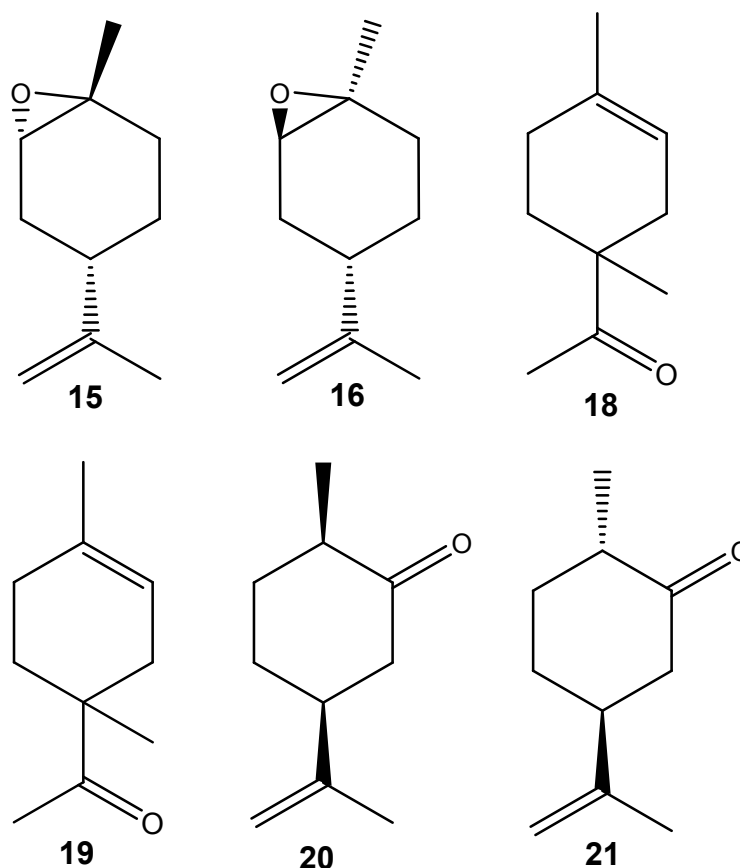


Figura 32. Fórmulas estructurales de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno en la mezcla agua:tetrahidrofurano, según su orden de elución en los cromatogramas (**Figura 30**). Los nombres aparecen en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Composición química de los productos obtenidos por LLE con éter etílico, de la biotransformación del S-(-)-limoneno, en la mezcla agua:tetrahidrofurano usada como solvente orgánico.

Pico N° **	Ik ^{a)}	Compuesto	Cantidad relativa, % ^{b)}				
			Tiempo, h				
			1	5	10	24	Blanco
1	862	2-Etoxitetrahidrofurano	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,02 ± 0,01
2	871	1,3-Dicloropropano	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,05 ± 0,02	2,4 ± 0,6	0,50 ± 0,02
3	899	N.I. (<i>m/z</i> 57 [M ⁺], 74 (92), 47 (32), 39 (7), 31 (73).	3,2 ± 0,08	3,1 ± 0,06	2,92 ± 0,09	4,5 ± 0,08	0,49 ± 0,02
4	916	Dihidro 2(3H)-furanona	0,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,63 ± 0,02
5	931	Ácido 4-hidroxi-butanoico	18,7 ± 0,6	21 ± 1,5	22 ± 1,8	24 ± 3,2	3,1 ± 0,2
6	936	Dihidro 2(3H)-furanona	0,69 ± 0,04	0,79 ± 0,1	4,9 ± 0,1	9 ± 1,8	0,47 ± 0,01
7	952	Contaminación (Artefacto)	4,59 ± 0,09	4,5 ± 0,1	4,1 ± 0,3	1,9 ± 0,2	0,15 ± 0,01
8	975	β-Mirceno	0,3 ± 0,1	0,24 ± 0,01	0,17 ± 0,04	0,08 ± 0,03	0,02 ± 0,01
9	1002	2-Metil-5-(1-metiletetil)-ciclohexadieno	0,15 ± 0,05	0,21 ± 0,04	0,28 ± 0,05	0,08 ± 0,04	0,03 ± 0,01
10	1021	<i>p</i> -Cimeno	3,7 ± 0,1	2,9 ± 0,4	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,6	0,7 ± 0,1
11	1037	Limoneno	56,1 ± 0,9	54 ± 1,3	48,9 ± 0,6	52 ± 1,2	93,4 ± 0,2

Tabla 18. Continuación.

12	1040	β -Felandreno	$0,15 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,01$
13	1048	N.I. (m/z 87 [M^{+}], 155 (5), 127 (19), 59 (23), 41(33).	$1,9 \pm 0,1$	$1,71 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,1$	$0,03 \pm 0,01$
14	1060	γ -Terpineno	$1,9 \pm 0,2$	$1,58 \pm 0,02$	$1,13 \pm 0,01$	$0,5 \pm 0,2$	$0,16 \pm 0,01$
15	1119	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	$0,09 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,1$	N.D.
16	1142	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	$0,24 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,09$	$0,50 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,02$	N.D.
17	1162	N.I. (m/z 71 [M^{+}], 130 (1), 87 (1), 43 (25).	$0,11 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,2$	$0,02 \pm 0,01$
18	1184	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	$0,14 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,04$	N.D.
19	1192	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona (Isómero)	$0,52 \pm 0,05$	$1,7 \pm 0,3$	$1,05 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,1$	N.D.
20	1202	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	$0,35 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,06$	$1,9 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$	N.D.
21	1209	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	$3,9 \pm 0,5$	$0,42 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,2$	N.D.
22	1225	N.I. (m/z 71 [M^{+}], 87 (51), 59 (6), 43 (26).	$0,76 \pm 0,07$	$1,48 \pm 0,02$	$1,4 \pm 0,9$	$0,36 \pm 0,1$	$0,94 \pm 0,03$
23	1234	N.I. (m/z 93 [M^{+}], 135 (8), 121 (26), 87 (30), 71 (60), 41 (34).	$0,02 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,06$	$0,08 \pm 0,01$
24	1508	Hidroxitolueno butilado (Antioxidante)	$0,25 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,08$	$0,07 \pm 0,01$

*Identificado tentativamente; N.D. No detectado; N.I. No identificado; ^{a)} Índices de Kováts determinados experimentalmente en la columna DB5-MS; ^{b)} Promedio de dos extracciones independiente.

En la **Figura 33**, se encuentran graficados los productos de biotransformación, cuando se empleó la mezcla agua:tetrahidrofurano como solvente. Los siguientes son los productos de biotransformación mayoritarios en el extracto, obtenido por LLE con éter etílico: *trans*-óxido de limoneno [(0,24% (1 h), 0,35% (5 h), 0,50% (10 h) y 0,14%(24 h)], 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona [0,52% (1 h), 1,7% (5 h), 1,05% (10 h) y 0,3% (24 h)], *cis*-dihidrocarvona [0,35% (1 h), 0,40% (5 h), 5,0% (10 h) y 0,,2% (24 h)] y *trans*-dihidrocarvona [3,9% (1 h), 0,42% (5 h), 0,29% (10 h) y 0,5% (24 h)].

En la biotransformación del S(-)-limoneno, empleando la mezcla agua:tetrahidrofurano como solvente, se obtuvieron los mismos productos que en la bioconversión del R-(+)-limoneno, bajo las mismas condiciones (Ver **Tabla 12**).

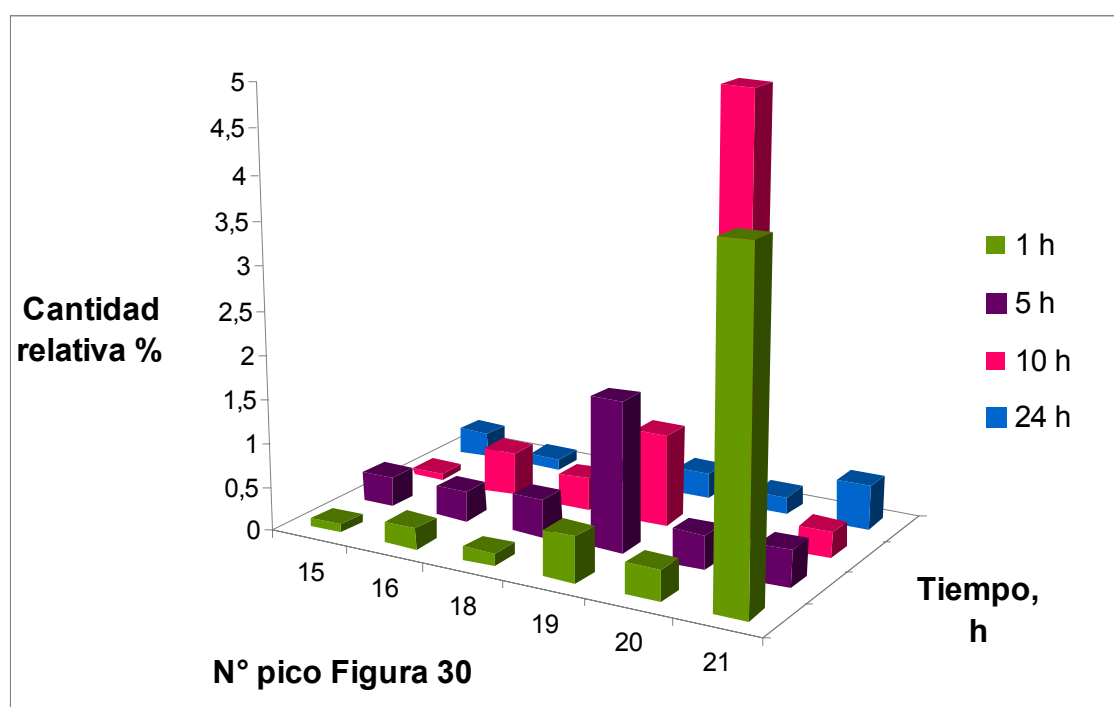


Figura 33. Productos de biotransformación del S(-)-limoneno, empleando la mezcla agua:tetrahidrofurano como solvente.

Demyttenaere y colaboradores [25], realizaron la bioconversión del S-(-)-limoneno por *Corynerpora eassiiicola* y *Penicillium digitatum*, obteniendo *trans*-dihidrocarvona, como producto de biotransformación (con rendimientos de 0,35 y 0,50%, respectivamente). En este trabajo se obtuvieron los dos enantiómeros de dihidrocarvona en cantidades relativas apreciables. Con el uso de tetrahidrofurano en la bioconversión del S-(-)-limoneno, estos monoterpenos oxigenados fueron los productos de biotransformación mayoritarios.

✘ **Cuantificación de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno obtenidos, en tetrahidrofurano, como solvente orgánico.**

La cuantificación de los productos de biotransformación obtenidos con tetrahidrofurano como solvente orgánico, se realizó empleando la técnica de estandarización interna descrita en la metodología (**Sección 2.3**) (Ver **Tabla 19**).

3.3. EFECTO DE LOS SOLVENTES Y EL INTERVALO DE ADICIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA FORMACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE BIOTRANSFORMACIÓN

En la **Sección 3.2**, se presentaron los productos generados de la biotransformación de los dos enantiómeros del limoneno, empleando diferentes solventes y tiempos de reacción. En todos los ensayos realizados se obtuvieron productos comunes, pero en cantidades diferentes. Es por esto, que para evaluar el efecto de los solventes orgánicos y el tiempo de adición del peróxido de hidrógeno, se realizó una comparación entre las cantidades obtenidas de algunos compuestos comunes, generados en todos los ensayos.

Tabla 19. Cuantificación de los productos de biotransformación del S-(-)-limoneno, usando tetrahidrofurano como solvente.

Pico N° **	Compuesto	Concentración, ppm ^{a)}			
		Tiempo, h			
		1	5	10	24
15	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	2,51 ± 0,01	8,5 ± 0,1	2,51 ± 0,03	8,1 ± 0,2
16	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	6,59 ± 0,04	9,1 ± 0,9	13,5 ± 0,1	3,82 ± 0,08
18	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona	3,78 ± 0,06	11,03 ± 0,01	9,8 ± 0,6	3,04 ± 0,09
19	1-(1,4-Dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona (Isómero)	14,1 ± 0,5	42 ± 1,4	28,18 ± 0,05	8,5 ± 0,2
20	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	9,6 ± 0,1	10,4 ± 0,3	13,5 ± 0,2	5,98 ± 0,04
21	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	68 ± 1,1	11,0 ± 0,3	9,04 ± 0,02	14,6 ± 0,2

** Número de pico en la **Figura 30**; ^{a)} Promedio de dos extracciones independientes.

3.3.1. Productos de biotransformación del R-(+)-limoneno. Como se observó en la **Sección 3.2**, con el uso de los diferentes solventes orgánicos en las reacciones de bioconversión, se obtuvieron compuestos oxigenados comunes en concentraciones diferentes, a diferentes tiempos de reacción. Los siguientes son los productos de biotransformación que se obtuvieron en los ensayos de bioconversión del R-(+)-limoneno: *cis*-dihidrocarvona, *trans*-dihidrocarvona y 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona.

Las condiciones de reacción, bajo las cuales se realiza la biotransformación de un sustrato, juegan un papel muy importante, porque dependiendo de ellas, los productos y sus concentraciones aumentarán o disminuirán. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir, que no necesariamente las mejores condiciones experimentales son en las que se obtenga el mayor porcentaje de conversión del sustrato: todo depende del producto que se desee obtener en mayor concentración, ya que la mayor concentración los productos formados no se obtuvo en el tiempo en el que se dio la conversión del limoneno más alta.

En la **Figura 34**, se observa la variación de algunos compuestos oxigenados con el uso de los tres solventes orgánicos, empleados a una hora (1 h) de reacción. Se observa cómo a 1 h de reacción y empleando tetrahidrofurano como solvente, se obtuvo la mayor concentración de *trans*-dihidrocarvona (43,6 ppm). Para el caso de 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona, la mayor concentración 15,3 ppm, se obtuvo con acetonitrilo. Finalmente, para *cis*-dihidrocarvona se obtuvieron concentraciones muy cercanas con acetonitrilo y metanol (1,1 y 13,4 ppm, respectivamente).

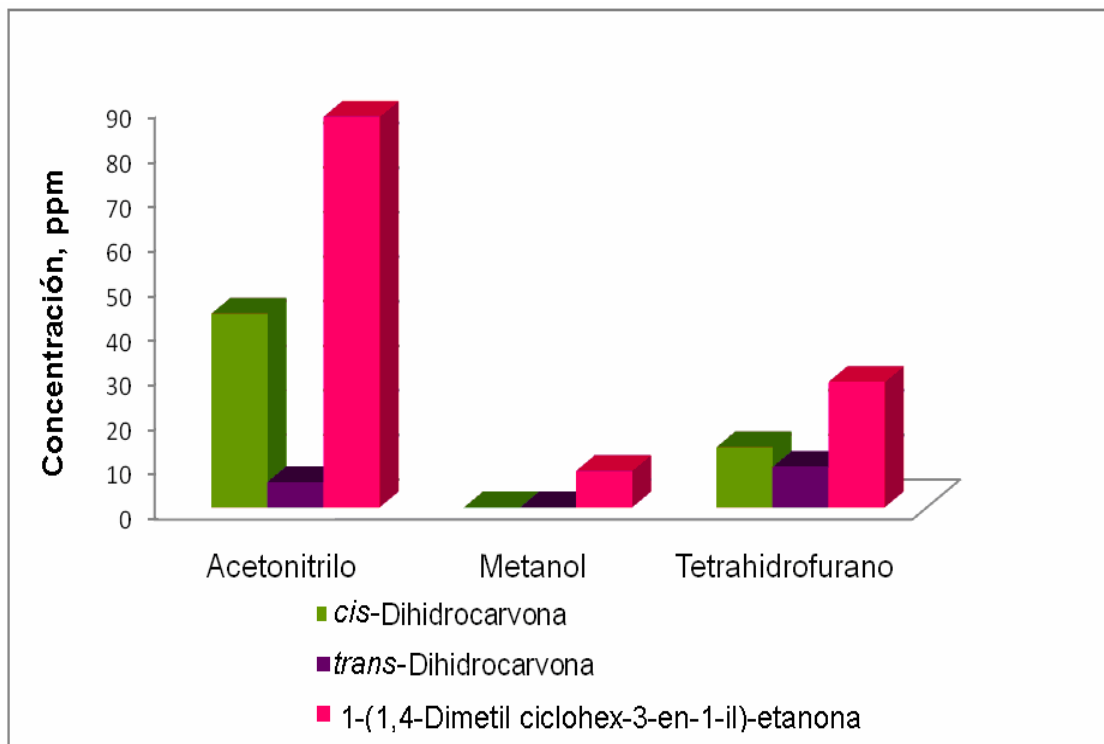


Figura 34. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación del R-(+)-limoneno, a una hora (1 h) de la reacción.

La concentración de estos monoterpenos oxigenados aumentó a las 5 h de reacción, obteniéndose 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona en concentraciones cercanas, a las observadas cuando se usaron acetonitrilo y tetrahidrofurano como solventes (18,5 y 18,8 ppm, respectivamente). La mayor concentración de *cis*-dihidrocarvona se logró con el uso de acetonitrilo (12,5 ppm), pero *trans*-dihidrocarvona se formó en mayor concentración, cuando se empleó tetrahidrofurano como solvente (6,8 ppm) (Ver **Figura 35**).

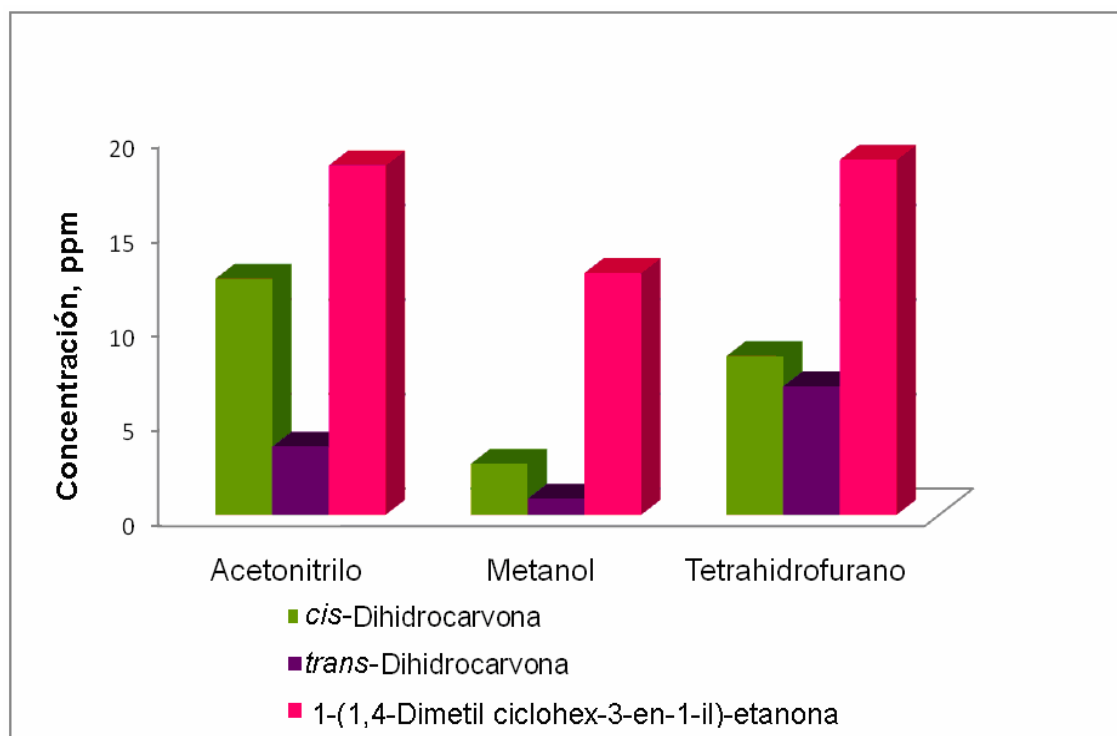


Figura 35. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación del R-(+)-limoneno, a las 5 h de reacción.

Finalmente, como se observa en la **Figura 36**, a las 10 h de reacción, nuevamente, con tetrahidrofurano, se obtuvo la mayor concentración de *trans*-dihidrocarvona (40,2 ppm), como sucedió a 1 h de reacción. Lo mismo ocurrió con 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona, cuya concentración en acetonitrilo fue muy cercana (27,1 ppm) a la obtenida a 1 h de reacción. Para el caso de *cis*-dihidrocarvona, el tiempo no fue una variable significativa, ya que las concentraciones de este compuesto en los diferentes tiempos de reacción fueron muy cercanas (Ver **Figuras 34-36**).

3.3.2. Productos de biotransformación del S(-)-limoneno. En los ensayos de bioconversión del S(-)-limoneno con los diferentes solventes, se formaron los mismos monoterpénos oxigenados, que en la bioconversión del R-(+)-limoneno.

A pesar de que con el uso de tetrahidrofurano y un tiempo de 24 h ocurrió la bioconversión del S(-)-limoneno, estos compuestos no se tuvieron en cuenta para la comparación con metanol y acetonitrilo, debido a que no se produjo biotransformación del S(-)-limoneno con los dos solventes mencionados.

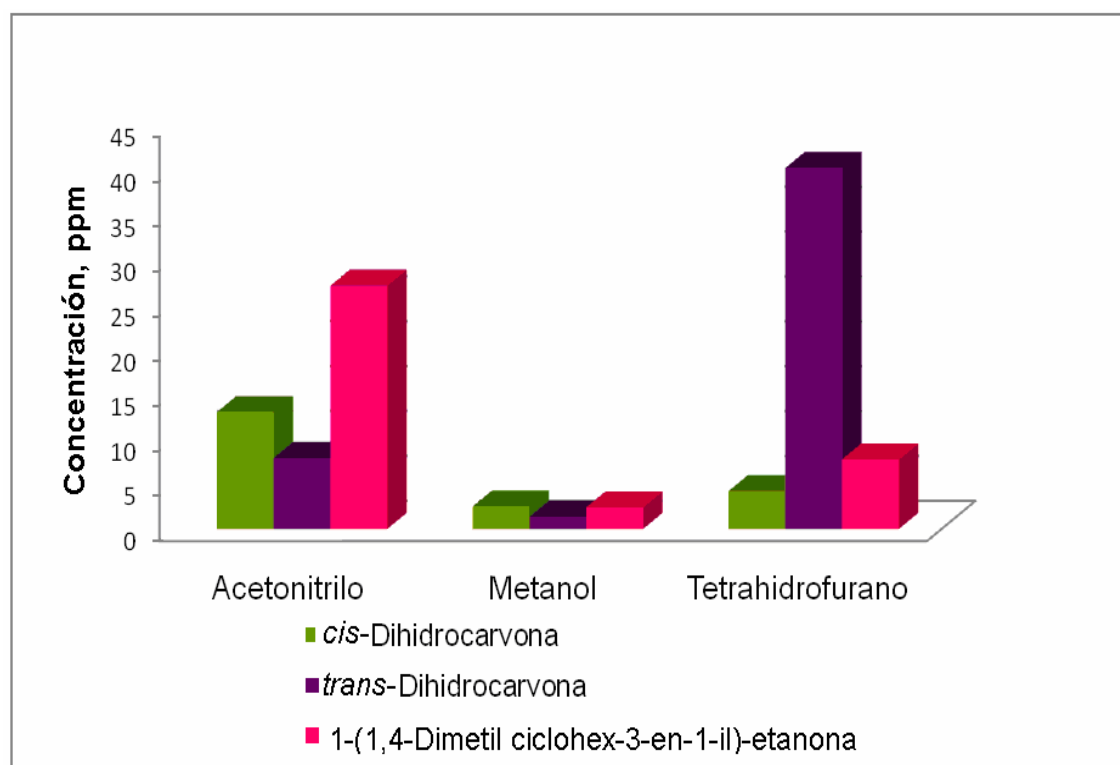


Figura 36. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación del R-(+)-limoneno, a las 10 h de reacción.

A una hora (1 h) de reacción y empleando tetrahidrofurano como solvente, se generó la mayor concentración de *trans*-dihidrocarvona (67,5 ppm). La diferencia en la concentración de productos a diferentes tiempos de reacción, es significativa, ya que con tetrahidrofurano se logra una concentración mayor de los mismos. Para 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona, el solvente con el que se obtuvo la mayor concentración fue acetonitrilo, al igual que para *cis*-dihidrocarvona (Ver **Figura 37**).

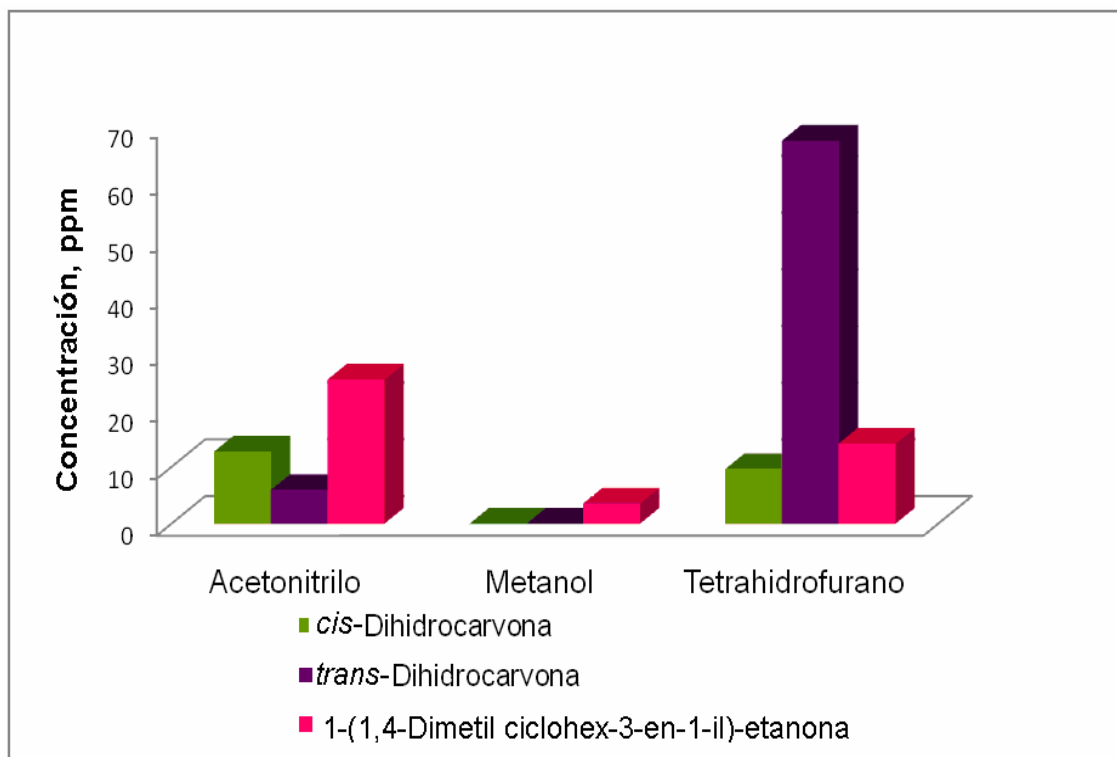


Figura 37. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación del S-(-)-limoneno, a hora (1 h) de reacción.

A las 5 h de reacción, la concentración de estos monoterpenos oxigenados varió significativamente, como se observa en la **Figura 38**. A este tiempo, con el uso de tetrahidrofurano, 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona se formó en mayor concentración (42,3 ppm). Con el uso de acetonitrilo se obtuvieron las mayores concentraciones de *cis*-dihidrocarvona y *trans*-dihidrocarvona (16,23 y 6,22 ppm, respectivamente).

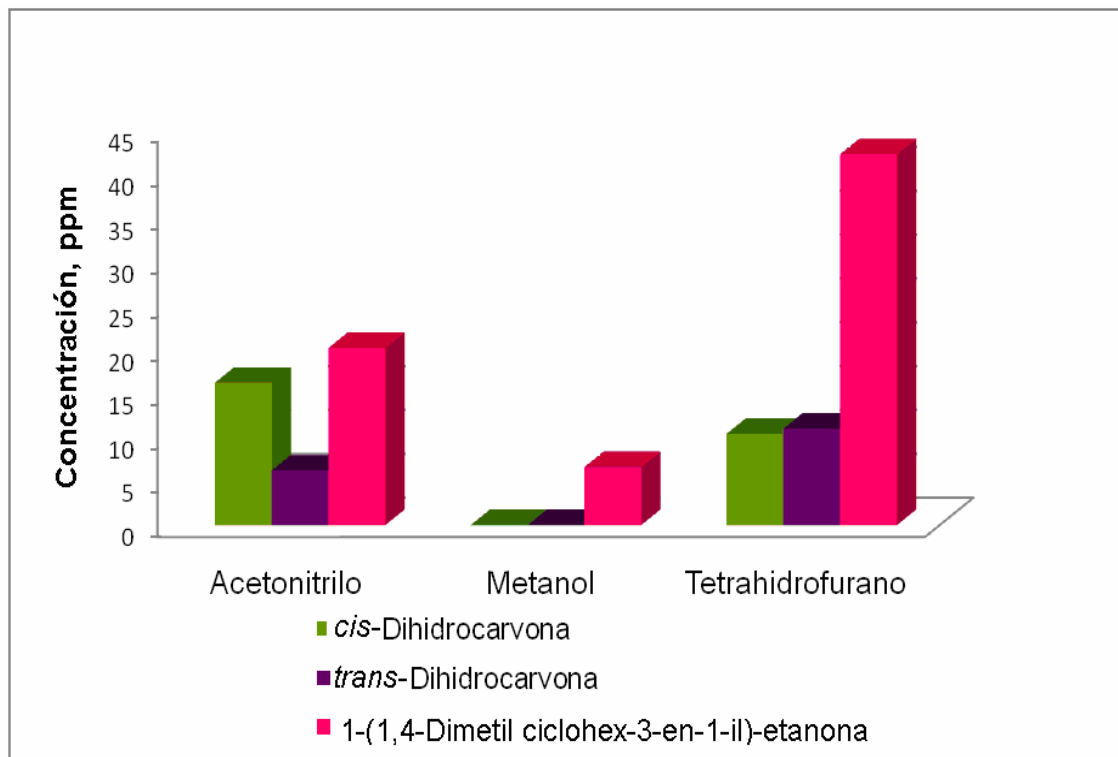


Figura 38. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación de S-(-)-limoneno, a las 5 h de reacción.

Finalmente después de las 10 h de reacción, con acetonitrilo como solvente, 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona y *cis*-dihidrocarvona presentaron las mayores concentraciones (87,7 y 43,5 ppm, respectivamente), en comparación con las obtenidas con otros solventes. Pero la formación de *trans*-dihidrocarvona se vio favorecida con el uso de tetrahidrofurano (9,94 pm) (Ver **Figura 39**).

3.3.3. Variación en la concentración de monoterpenos cloro-oxigenados obtenidos, durante la biotransformación de R-(+)- y S-(-)-limonenos. Únicamente con el uso de acetonitrilo en los ensayos de biotransformación de los limonenos enantioméricos, se obtuvieron productos cloro-oxigenados, como consecuencia de la capacidad que

tiene la cloroperoxidasa de catalizar las reacciones de halogenación, con una alta especificidad de sustrato.

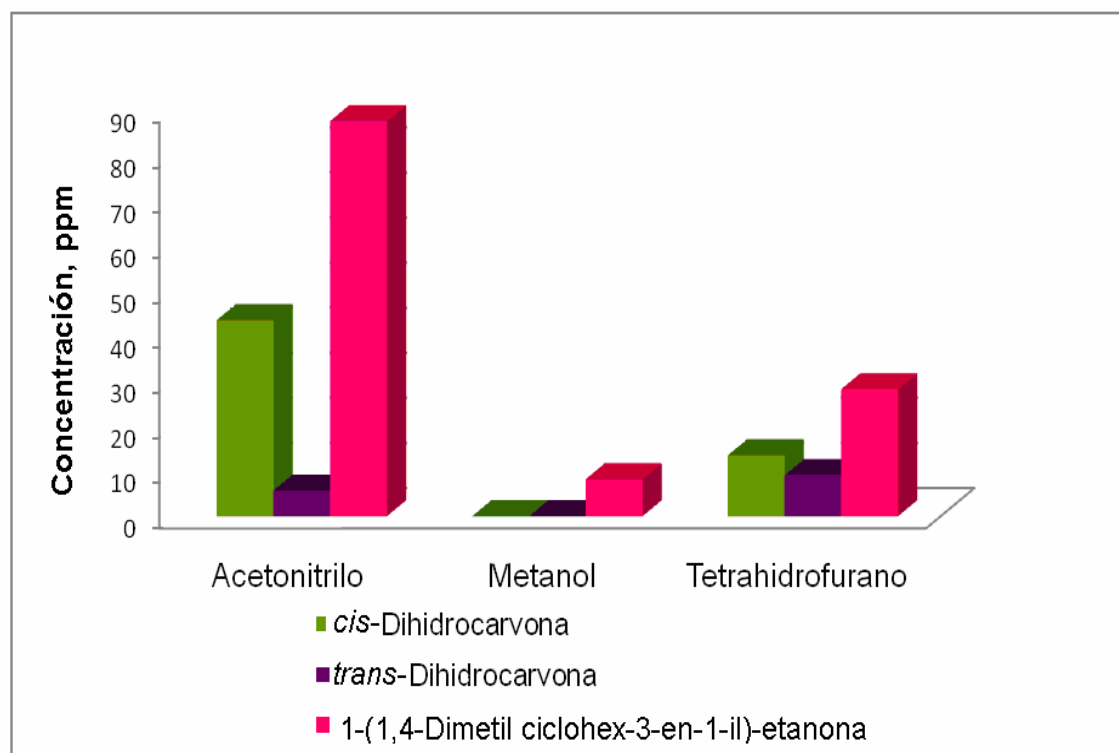


Figura 39. Efecto del solvente sobre la formación de los productos de la biotransformación del S-(-)-limoneno, a las 10 h de reacción.

El tiempo al cual se obtuvo la mayor concentración de productos clorados, fue cuando se adicionó el peróxido de hidrógeno a una concentración fija durante una hora, alcanzando sus concentraciones de hasta 350 ppm. Cuantitativamente, se observó una variación de la concentración de los compuestos isómeros de 2-cloro-4-(1-metiletenil)-ciclohex-5-en-1-ona, lo que se aprecia en la **Figura 40**.

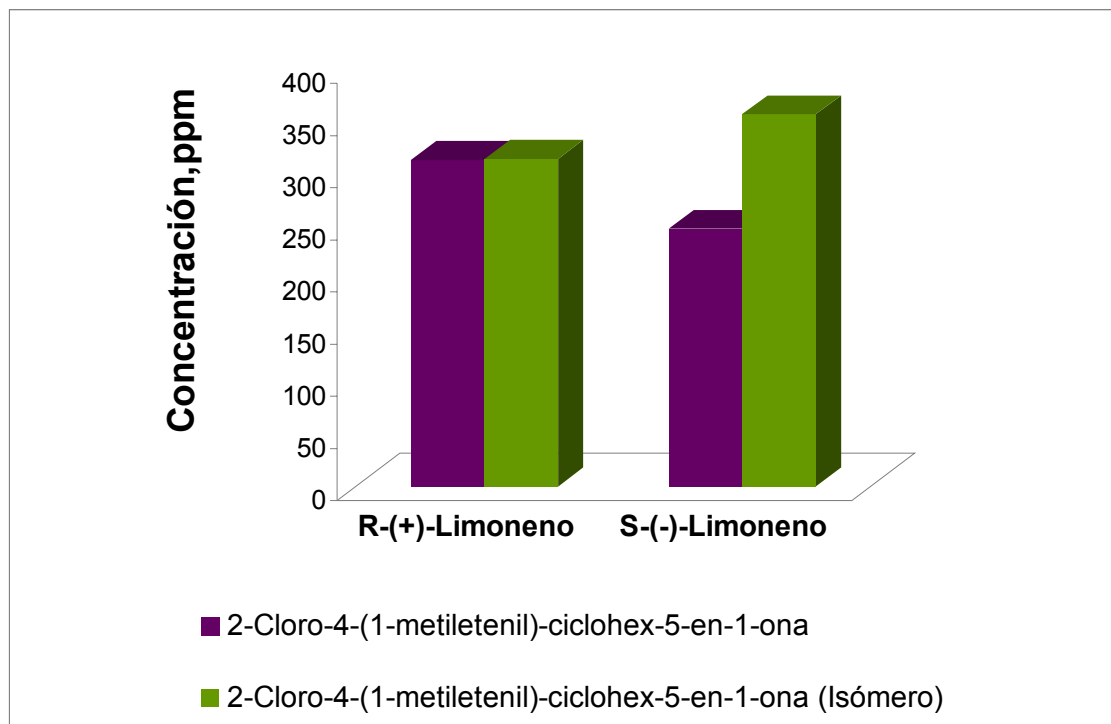


Figura 40. Variación de la concentración de los productos durante la biotransformación de limonenos, realizada en la mezcla agua:acetonitrilo durante 1 h.

En la **Figura 40**, se observa cómo en el proceso de biotransformación de R-(+)-limoneno, los isómeros de 2-cloro-4-(1-metileténil)-ciclohex-5-en-1-ona se formaron en concentraciones similares, pero más bajas que durante la bioconversión del S-(-)-limoneno: uno de los isómeros se formó en mayor proporción.

CONCLUSIONES

- ✘ Se lograron la oxidación y la halogenación de R-(+)- y S-(-)-limonenos en un proceso a escala de laboratorio, con la enzima cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*, bajo condiciones suaves de reacción. Los productos de oxidación obtenidos poseen importantes aplicaciones en las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica.

- ✘ Se estableció, que los solventes orgánicos afectan significativamente la actividad catalítica de la cloroperoxidasa y el tipo y distribución de los productos de oxidación y halogenación de ambos enantiómeros del limoneno.

- ✘ Se logró establecer, que sólo en acetonitrilo, como medio de reacción, se formaron compuestos halogenados isoméricos en cantidades relativas apreciables, así, para R-(+)-limoneno, 14,1-25,6%, para S-(-)-limoneno, el rango fue de 8,8-12,9%. Durante la bioconversión del R-(+)-limoneno, a una hora (1 h) de reacción se obtuvieron dos productos de biotransformación halogenados en mayor cantidad relativa (25,3 y 25,6%), tal como sigue:

Compuesto halogenado	Cantidad relativa, %					
	R-(+)-Limoneno			S-(-)-Limoneno		
	Tiempo, h					
	1	5	10	1	5	10
2-Cloro-4-(1-metiletenil)- ciclohex-5-en-1-ona	25,3	17,3	14,1	8,9	9,4	8,8
2-Cloro-4-(1-metiletenil)- ciclohex-5-en-1-ona (Isómero)	25,6	20,9	18,0	12,9	13,9	10,5

- ✘ Se estableció, que el metanol fue el solvente, que no favoreció la catálisis enzimática de R-(+)- y S-(-)-limonenos; con él se obtuvieron porcentajes de conversión de alrededor de un 30%, y se formaron productos en cantidades relativas bajas (< 5,1%).
- ✘ Se estableció, que con el uso de tetrahidrofurano, se obtuvieron varios compuestos oxigenados en cantidades relativas no mayores del 5%, y se generaron compuestos secundarios en cantidades relativas apreciables, que, posiblemente no son productos de la catálisis enzimática.
- ✘ Se estableció, que cuando se emplearon metanol y acetonitrilo como solventes, durante la biotransformación a un tiempo de adición del peróxido de hidrógeno de 24 h, no se detectaron productos de biotransformación, posiblemente, debido a que la concentración de peróxido de hidrógeno no fue adecuada durante un tiempo de reacción tan largo, por lo que la enzima no se activó lo suficiente para catalizar la bioconversión de los limonenos.

RECOMENDACIONES

- ✘ En este trabajo se analizó la influencia de algunas variables (Tiempo de adición del peróxido de hidrógeno y tipo de solvente), en el proceso de biotransformación del limoneno. Sin embargo, existen variables que no fueron monitoreadas y que pueden influir de manera significativa en el proceso, por ejemplo, el pH, la concentración de peróxido de hidrógeno, entre otras. Para el desarrollo de un sistema optimizado y escalado sería necesario incluir estas variables y analizar su influencia sobre el proceso.

- ✘ Se recomienda realizar la cuantificación de los productos de biotransformación mayoritarios empleando el método de estandarización externa con patrones certificados.

- ✘ Debido a que los procesos de biotransformación se consideran muy promisorios actualmente, es necesario seguir estudiando la biodiversidad natural. Por ejemplo, identificar, extraer y emplear enzimas recolectadas de plantas, animales o células microbianas, de diferentes zonas de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] ABRAHAM, W.R., STUMPF, B., KIESLICH, K. Biotransformation of tetramethyl-limonene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1986**. 24(1): 31-34.
- [2] ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol stream, Illinois: **2007**. Allured Publishing Corporation. p. 804.
- [3] AGRAWAL, R., DEEPIKA, N.U.A. and JOSEPH, R. Strain improvement of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. by induced mutation for biotransformation of α -pinene to verbenol. *Biotechnol. Bioeng.*, **1999**. 63: 249-252.
- [4] ALLAN, E., HAGER, L.P. Optimization of peroxidase immobilization and of the desing of packed –bed enzyme reactions for flow injection analysis. *J. Am. Chem.*, **1993**. 115: 4415-4416.
- [5] ANDERSSON, L.A., DAWSON, L.A. EXAFS spectroscopy of heme-containing oxygenases and peroxidases. *Struct. Bond.*, **1991**. 74: 1-40.
- [6] AOUN, S., BABOULENE, M. Regioselective bromohydroxylation of alkenes catalyzed by chloroperoxidase: Advantages of the immobilization of enzyme on talc. *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **1998**. 4: 101-109.
- [7] BARBOSA, L, O. Elaboración de agregados entrecruzados de peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*). Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia: **2006**, pp. 22-29.
- [8] BELL, S.G., CHEN, X., SOWDEN, R. J., XU, F., WILLIAMS, N., WONG, L. and RAO, Z. Molecular recognition in (+)- α -pinene oxidation by cytochrome P450cam. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**. 125: 705-714.
- [9] BERNHARD, S.A. The structure and function of enzymes. New York: **1968**. W. A. Benjamin, Inc., p. 13.

- [10] BOUGIOUKOU, D.J., SMONOU, I. Chloroperoxidase-catalysed oxidation of conjugated dienoic esters. *Tetrahedron Lett.*, **2002**. 43: 339-342.
- [11] BROWN, F.S., HAGER, L.P. Chloroperoxidase. IV. Evidence for an Ionic Electrophilic Substitution Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**. 89: 719-720.
- [12] BURTON, S.G. Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends Biotechnol.*, **2003**. 21(12): 543-549.
- [13] CAGNOLI, M. V., CASUSCELLI, S. G., ALVAREZ, A. M., BENGGOA, J. F. and GALLEGOS, N. G. "Clean" limonene epoxidation using Ti-MCM-41 catalyst. *Appl. Catal.*, **2005**. 287: 227-235.
- [14] CAMPBELL, M.K., FARREL, S.O. Bioquímica; 4ª Edición. México: **2004**. Internacional Thomson Editores, S.A., pp. 134-151.
- [15] CARVALHO, C., FONSECA, M. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.*, **2006**. 24: 134-142.
- [16] CASELLA, L. The chloroperoxidase-catalysed oxidation of phenols. Mechanism, selectivity, and characterization of enzyme-substrate complexes. *Biochem.*, **1994**. 33(21): 6377-6386.
- [17] CASTELLANOS, F. E. Biotransformación del limoneno, α -pineno y aceites esenciales de naranja y mandarina empleando *Aspergillus niger*. Tesis de Maestría en Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia: **2007**, pp. 36-38.
- [18] CHANG, H.C., ORIEL, P. Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Food Sci.*, **1994**. 59(3): 660-662.
- [19] CHUNG, B. H., LEE, H-Y., LEE, J. S. and YOUNG, C. Y. F. Perillyl alcohol inhibits the expression and function of the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Cancer Lett.*, **2006**. 236: 222-228.

- [20] COLONA, S., GAGGERO, N., RICHELMI, C. and PASTA, P. Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *Trends Biotech.*, **1999**. 17: 163-168.
- [21] CONESA, A., WEELINK, G., CEES, A. M. J. J., HONDEL, V. and PUNT, P. J. C-terminal propeptide of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase: an intramolecular chaperone?. *FEBS Lett.*, **2001**. 503: 117-120.
- [22] CORBETT, M., CHIPKO, B. Peroxide oxidation of indole to oxindole by chloroperoxidase catalysis. *J. Biochem.*, **1979**. 183: 269-276.
- [23] DA FONSECA, C. O., MASINI, M., FUTURO, D., CAETANO, R., GATTASS, C. R. and QUIRICO-SANTOS, T. Anaplastic oligodendroglioma responding favorably to intranasal delivery of perillyl alcohol: A case report and literature review. *Surg. Neurol.*, **2006**. 66:611-615.
- [24] DAI, L., and KLIBANOV, A. Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media. *Appl. Biol. Sci. Chem.*, **1996**. 96: 9475-9478.
- [25] DEMYTTENAERE, J. C. R., VAN BELLEGHEM, K. and DE KIMPE, N. Biotransformation of R-(+)- and S-(-)-limonene by fungi and the use of solid-phase microextraction for screening. *Phytochemistry*, **2001**. 57: 199-208.
- [26] DOBLE, M., KRUTHIVENTI, A, K. y GAIKAR, V.G. Biotransformations and Bioprocesses. New York: Ed. Marcel Dekker Inc. **2004**.
- [27] DRACZYNSKA-LUSIAK, B., SIEWINSKI, A. Enantioselectivity of the metabolism of some monoterpenic components of coniferous tree resin by *Armillariella mellea* (honey fungus). *J. Basic Microbiol.*, **1989**. 29:269-275.
- [28] DUETZ, W. A., FJALLMAN, H. M., REN, S., JOURDAT, C. and WITHOLT, B. Biotransformation of D-limonene to (+) *trans*- carveol by

toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**. 67(6): 2829-2832.

[29] DUETZ, W .A., VAN BEILEN, G. B. and WITHOLT, B. Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2001**. 12: 419-425.

[30] DUETZ, W.A., WITHOLT, B. and JOURDAT, C. Process for the preparation of perillyl alcohol. **2003**. EP1364039

[31] DURÁN, D. C. Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz. Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia: **2005**, pp. 30, 52.

[32] FU, H., KONDO, H., ICHIKAWA, Y., LOOK, G. C. and WONG, C. Chloroperoxidase-catalysed asymmetric synthesis: Enantioselective reactions of chiral hydroperoxides with sulfides and bromohydration of glycals. *J. Org. Chem.*, **1992**. 51:7265-7270.

[33] GORMAN, L.A.S., DORDICK, D.S. Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**. 39(4):392-397.

[34] GREY, C. E., HEDSTROM, M. and ADLERCREUTZ, P. A mass spectrometric investigation of native and oxidatively inactivated chloroperoxidase. *Chem. Bio. Chem.*, **2007**. 8: 1055-1062.

[35] GRIFFIN, B.W. Chloroperoxidase: a review. In: Everse, J., Everse, K.E., Grishman, M.B., (Eds). Peroxidases in Chemistry and Biology. CRC Press, Boca Raton, Vol II, **1999**. pp.85-137.

[36] GROB, L. Modern practice of gas chromatography. New York: 1985. Ed. John Wiley & Sons. pp. 267-288.

- [37] GUTIÉRREZ, E. Estudio del efecto de los solventes orgánicos sobre la actividad biocatalítica de la cloroperoxidasa. Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia: **2001**, pp.4-91.
- [38] GUPTA, A. and MYRDAL, P. B. Development of a perillyl alcohol topical cream formulation. *Int. J. Pharm.*, **2004**. 269:373-383.
- [39] HAGER, LP., MORRIS, DR., BROWN, F. C., and EBERWEIN, H. Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions. *J. Biol. Chem.*, **1966**. 241 (8):1769-1777.
- [40] HAGER, L.P., LAKNER, F.J., and BASAVAPATHRUNI, A. Chiral synthons via chloroperoxidase catalysis. *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **1998**. 5:95-101.
- [41] HOFRICHTER, M., ULLRICH, R. Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**. 71: 276-288.
- [42] IKAN, R. Natural Products, A Laboratory Guide. California: **1991**. Academic Press, Inc., pp. 169-174.
- [43] IBORRA P., Jose Luis. Biocatalizadores y Solvente Neotéricos. Murcia, 2004. Discurso, Academia de Ciencias de la Región de Murcia, Sesión inagural del día 5 de marzo de **2004**, pp.1-33.
- [44] JENNINGS, W., MITTFEHLDT, E., and STREMPLE, P. Analytical gas chromatography. San Diego: Academic Press, **1987**, pp. 1-287.
- [45] KAUP, B., PIANTINI, U., WÜST, M. and SCHRADER, J. Monoterpenes as novel substrates for oxidation and halo-hydroxylation with chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**. 73(5):1087-1096.
- [46] KELLNER, R., MERMET, J. M., OTTO, M. (Ed). Analytical Chemistry. Berlín: Willey-VCH, Verlag GmbH & Co. **2004**, pp.407-409, 554, 823-825, 867.

- [47] KHMELNITSKY, Y., LEVASHOV, A., KLYACHKO, N. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enz. Microb. Technol.*, **1988**. 10:710-724.
- [48] KHMELNITSKY, Y., MOZHAEV, V., BELOVA, A. Denaturation capacity: a new qualitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. *Eur. J. Biochem.*, **1991**. 198(1):31-41.
- [49] KILJUNEN, E., KANERVA, L. Chloroperoxidase-Catalysed oxidation of alcohols to aldehydes. *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2000**. 9:163-172.
- [50] KOSKINEN, A.M.P., KLIBANOV, A.M. Enzymatic reactions in organic media. Londres: 1996. Blackie Academic & Professional., pp. 9-37.
- [51] KOVÁTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan Chromatogr.*, **1965**, pp. 229-247.
- [52] KRAGL, U., KRUSE, W. Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example. *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**. 52:309-319.
- [53] KUHL, P., HALLING, P.J. Chymotrypsin suspended in organic solvents with salt hydrates is a good catalyst for peptide synthesis from mainly undissolved reactants. *Tetrahedron Lett.*, **1990**. 31(36):5213-5216.
- [54] LA ROTTA, C.E., LÜTZ, S., LIESE, A. and BON, E. P. S. Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking. *Enzyme Microb. Technol.*, **2005**. 37:582-588.
- [55] LAIRD, T. Biocatalysis and Biotransformations. *Org. Process Res. Dev.*, **2005**. 9: 521. [Editorial]
- [56] LAKNER, F.J. and HAGER, L.P. Chloroperoxidase as enantioselective epoxidation catalyst: An efficient synthesis of (R)-(-)-mevalonolactones. *J. Org. Chem.*, **1996**. 61:3923-3925.

- [57] LIBBY, R., THOMAS, J.A., KAISER, L. W. and HAGER, L. P. Chloroperoxidase halogenation reactions. Chemical versus enzymic halogenating intermediates. *J. Biol. Chem.*, **1882**. 257 (9):5030-5037.
- [58] LINDMARK-HENRIKSSON, M. Biotransformations of Turpentine Constituents: Oxygenation and Esterification. Estocolmo, **2003**. Tesis de Doctorado, Departamento de Química del Instituto Real de Tecnología (KTH). pp. 3-39.
- [59] LOUGHLIN, W., HAWKES, D. B. Effect of organic solvents on a chloroperoxidase biotransformation. *Bioresour. Technol.*, **2000**. 71:167-172.
- [60] MANOJ, K., YI, X., RAI, G. P. and HAGER, L. P. A kinetic epoxidation assay for chloroperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**. 266:301-303.
- [61] MANOJ, K., LAKNER, F. and HAGER, L. P. Epoxidation of indene by chloroperoxidase. *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2000**. 9: 107-111.
- [62] MARÓSTICA, M.R. and PASTORE, G. M. Biotransformação de Limoneno: Uma Revisão Das Principais Rotas Metabólicas. *Quím. Nova*, **2007**. 30(2):382-387.
- [63] MARTINS, R., KAWAI, S. and CHACÓN, D. Estudio de la biotransformación del d-limoneno por fermentación en fase líquida. Buscado en: www.google.com.co (Fecha de consulta: marzo 10 de 2007).
- [64] MAZZARO, D. Orange oil D-limonene market unsettled due to Brazilian delays. *Chem. Marketing Rep.*, **2000**. 258(4): 18.
- [65] MORRIS, D., HAGER, L. Chloroperoxidase: Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **1965**. 241(8):1763-1768.
- [66] NOMA, Y., YAMASAKI, S., ASAKAWA, Y. Biotransformation of limonene and related-compounds by *Aspergillus cellulosa*. *Phytochemistry*, **1992**. 31:2725-2727.
- [67] OSBORNE, R., RANER, G. M., HAGER, L. P. and DAWSON, J. H. C. *fumago* chloroperoxidase is also a dehaloperoxidase: oxidative

dehalogenation of halophenols. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**. 128(4):1036-1037.

[68] PARK, J. and CLARK, D. S. Deactivation Mechanisms of Chloroperoxidase during Biotransformations. *Biotechnol. Bioeng.*, **2006**. 93(6):1190-1195.

[69] PICKARD, M.A., TENSUK, A. Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. *Soc. Ind. Microbiol.*, **1990**. 15:235-241.

[70] PINHEIRO, L. y MARSAIOLI, A. J. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2007**. 44:78-86.

[71] PREMA, B.R., BHATTACHARYYA, P.K. Microbiological transformation of terpenes. II. Transformations of α -pinene. *Appl. Microbiol.*, **1962**. 10:524-528.

[72] RANTWIJK, F. and SHELDON, R. A. Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic. *Chemical Biotechnol.*, **2000**. 11:554-564.

[73] SANFILIPPO, C., NICOLOSI, G. Catalytic behaviour of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in the oxidation of cyclic conjugated dienes. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**. 13:1889-1892.

[74] SANFILIPPO, C., PATTI, A., NICOLOSI, G. Asymmetric oxidation of 1,3-cyclohexadiene catalysed by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**. 11:3269-3272.

[75] SHAW, N.M., ROBINS, K.T. and KIENER, A. Lonza: 20 years of biotransformations. *Adv. Synth. Catal.*, **2003**. 345(4):425-435.

[76] SHEVELKOVA, A. N. and RYABOV, A. D. Irreversible inactivation of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase by hydrogen peroxide. A kinetic study in chloride and bromide systems. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **1996**. 39(4):665-670.

[77] STRYER, L. Bioquímica; 3ª Edición; Tomo I. Barcelona, España: **1988**. Editorial Reverté, S.A. pp. 183-203.

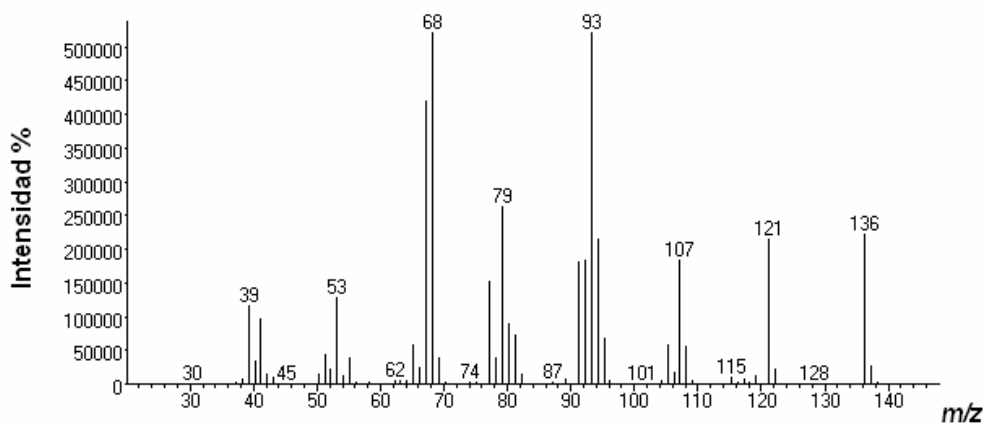
- [78] VAN RENSBURG, E., MOLELEKI, N., VAN DER WALT, J. P., BOTES, P. J. and VAN DYK, M.S. Biotransformation of (+)-Limonene and (-)-Piperitone by Yeast and Yeast-Like Fungi. *Biotechnol. Lett.*, **1997**. 19(8):779-782.
- [79] VAN KEULEN, F., CORREJA, C. N. and FONSECA, M. M. R. Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Catal B: Enz.*, **1998**. 5:295-299.
- [80] VAN DE VELDE, F., RANTWIJK, F. V. and SHELDON, R. Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. *Trends Biotechnol*, **2001**. 19:73-80.
- [81] VAN DER WERF, M. J., KEIJZER, P. M. and VAN DER SHAFT, P. H. *Xantobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene. *J. Biotechnol.*, **2000**. 84: 133-143.
- [82] VÁZQUEZ-DUHALT, R., AYALA, M. and MÁRQUEZ-ROCHA, F. J. Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago*. *Phytochemistry.*, **2001**. 58:929-933.
- [83] WENJIAN, L., HOUJIN, L., CHUANGHUA, C., ZHOU, Y. and LIN, Y. Biotransformation of limonene by marine bacteria. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2006**. 34(7): 946-950.
- [84] www.ehu.es/biomoleculas/. Enzimas. Fecha de consulta: Abril 13 de 2007.
- [85] www.laguna.fmedic.unam.mx. Peroxidasas. Fecha de consulta: 16 de Abril de 2007.
- [86] XU, M., FLOYD, H. S., GRETH, S. M., CHANG, W-C. L. and LOHMAN, K. Perillyl alcohol mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potencial mechanisms for its chemotherapeutic effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2004**. **195**: 232-246.
- [87] YURI, T., DANBARA, N., TSUJITA-KYOTOKU, M., KIYOZUKA, Y., and SENZAKI, H. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth *In vitro* and *In vivo*. *Breast Cancer Res.*, **2004**. 84: 251-260.

[88] ZAKS, A., KLIBANOV, A.M. The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.*, **1988**. 263:8017-8021.

ANEXOS

ANEXO 1. Rutas de fragmentación del limoneno y de algunos productos de su biotransformación.

Figura 1-1. Espectro de masas del limoneno (EI, 70 eV).



Esquema 1. Rutas de fragmentación del limoneno (EI, 70 eV) [29].

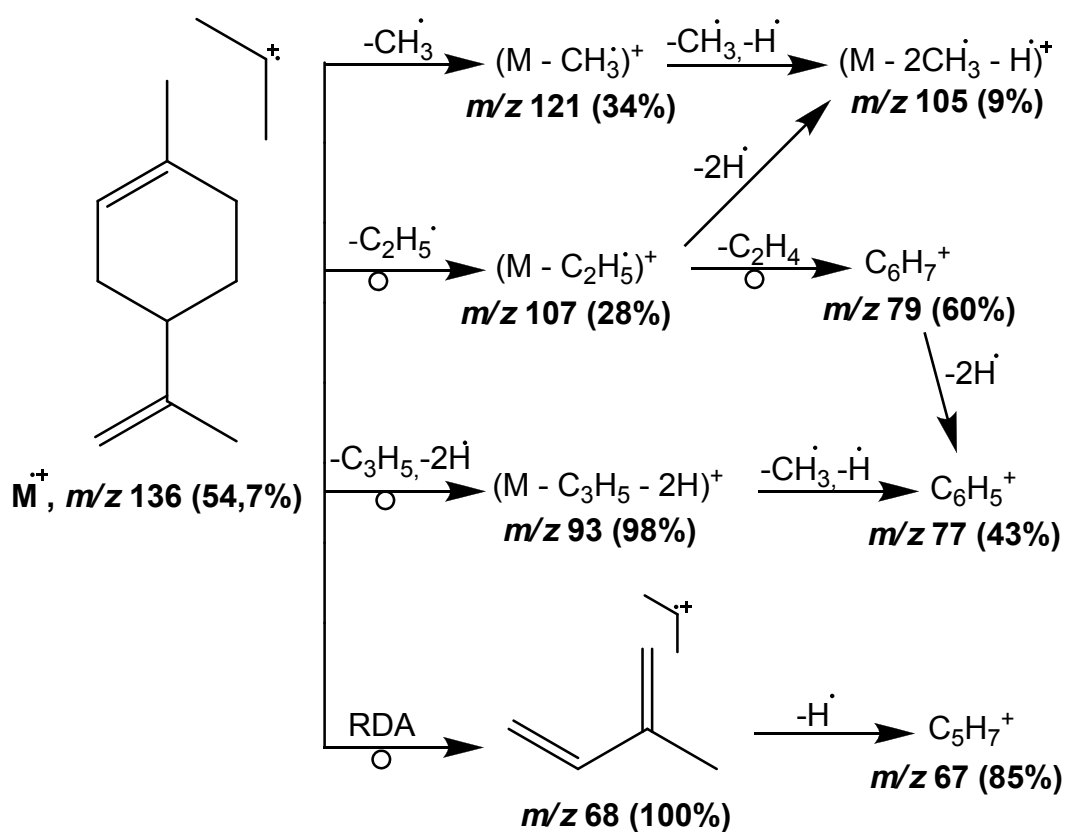
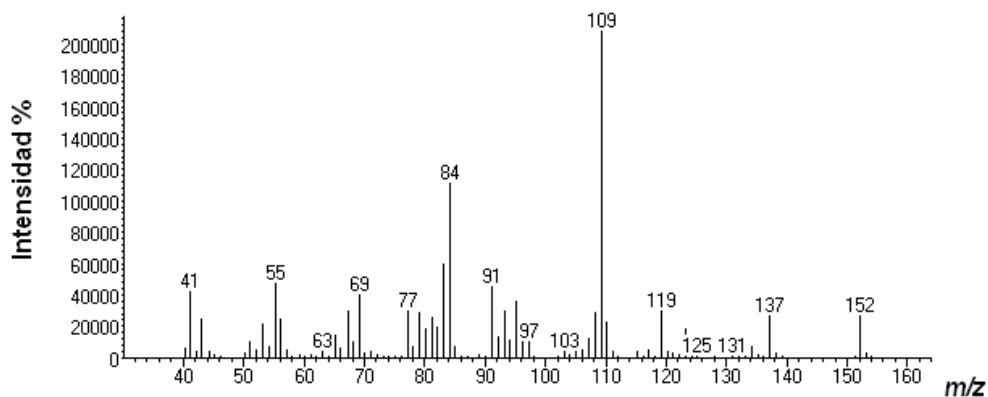


Figura 1-2. Espectro de masas del carveol (EI, 70 eV).



Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del carveol (EI, 70 eV).

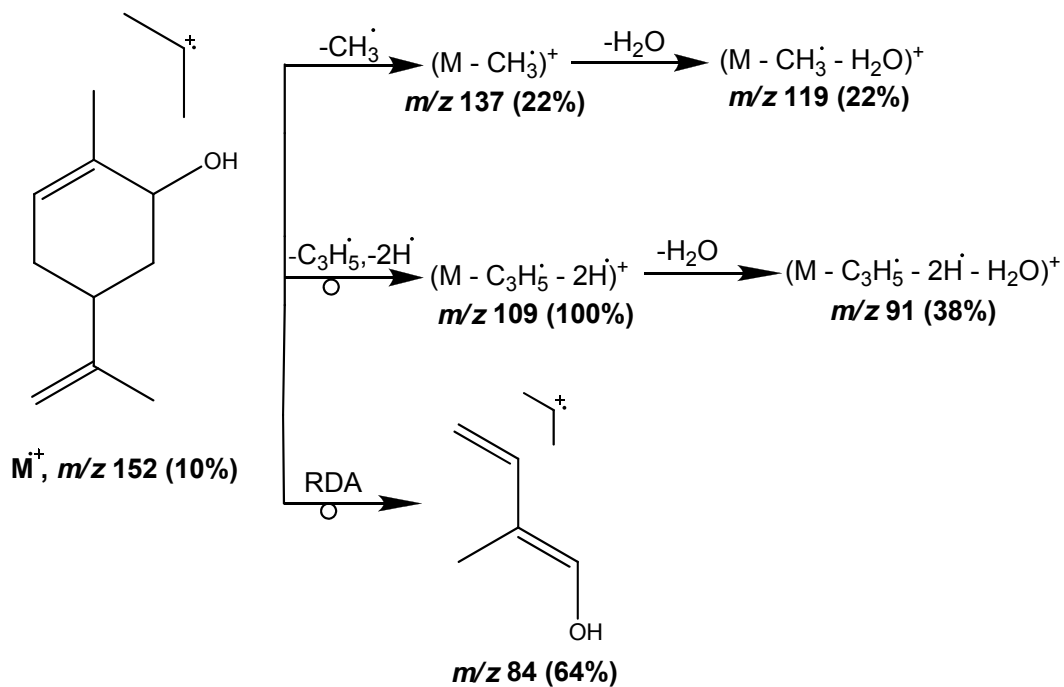
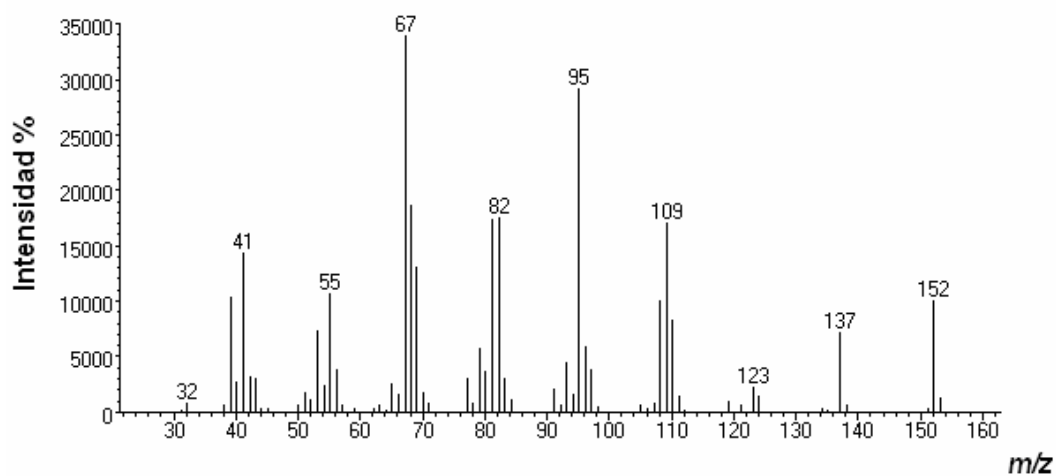


Figura 1-3. Espectro de masas de dihidrocarvona (EI, 70 eV).



Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación de dihidrocarvona (EI, 70 eV).

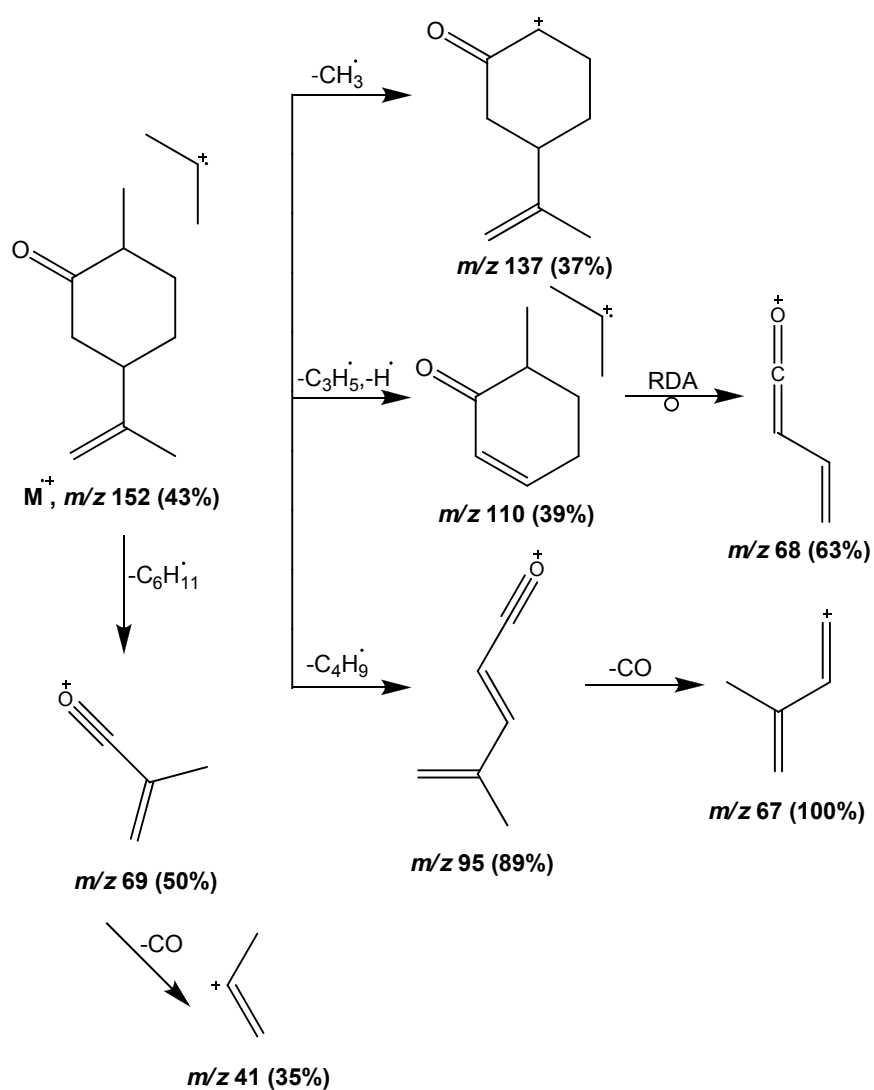
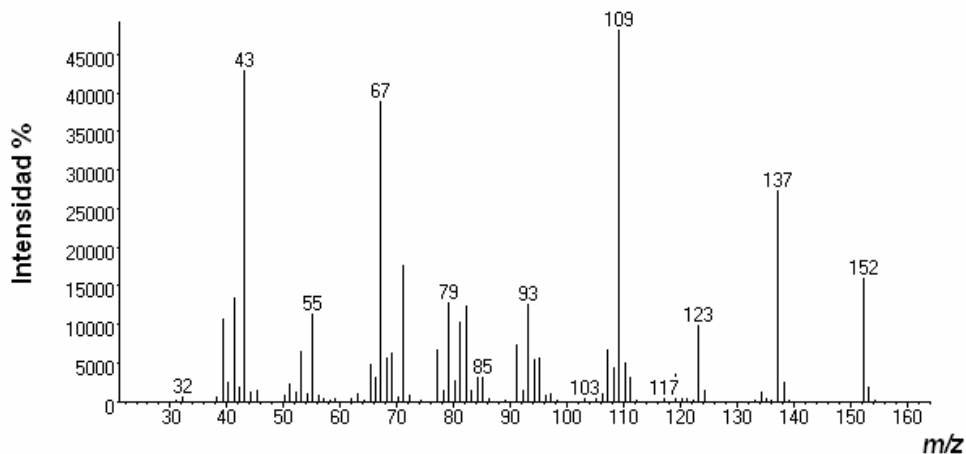


Figura 1-4. Espectro de masas de 1-(1,4-dimetil-3-ciclohexen-1-il)-etanona (EI, 70 eV).



Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación de 1-(1,4-dimetil ciclohex-3-en-1-il)-etanona (EI, 70 eV).

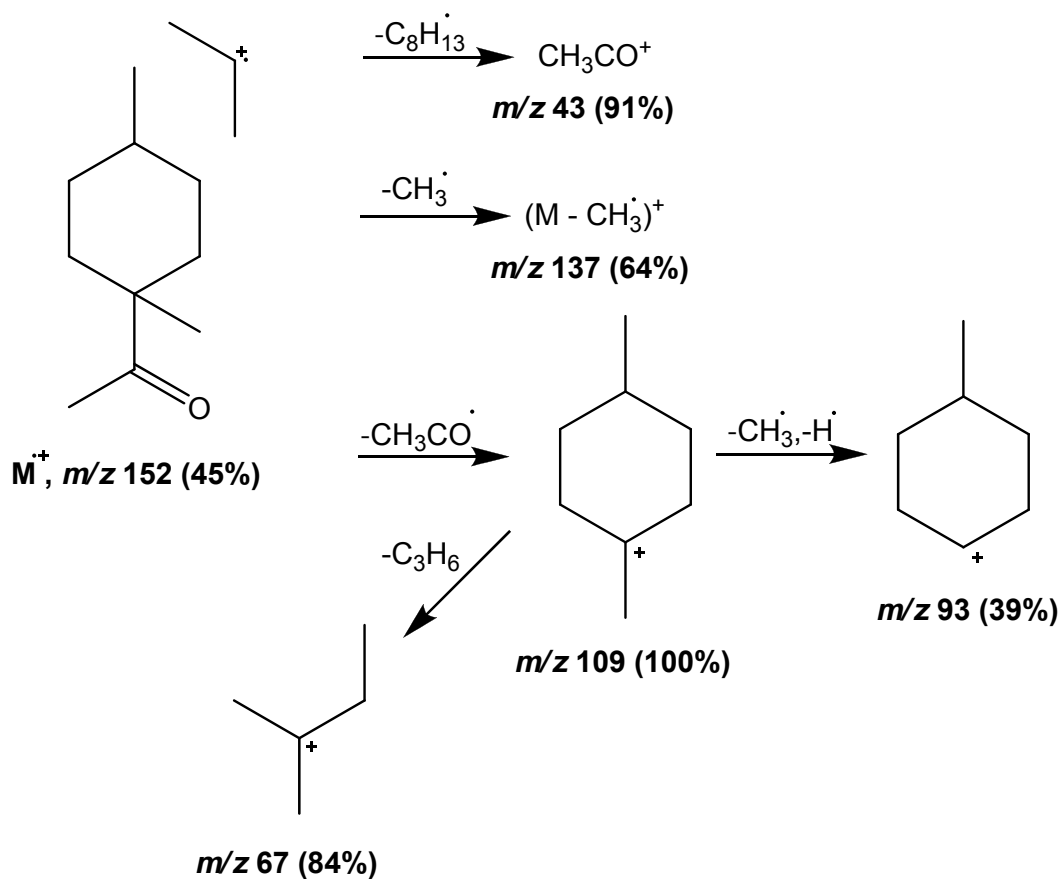
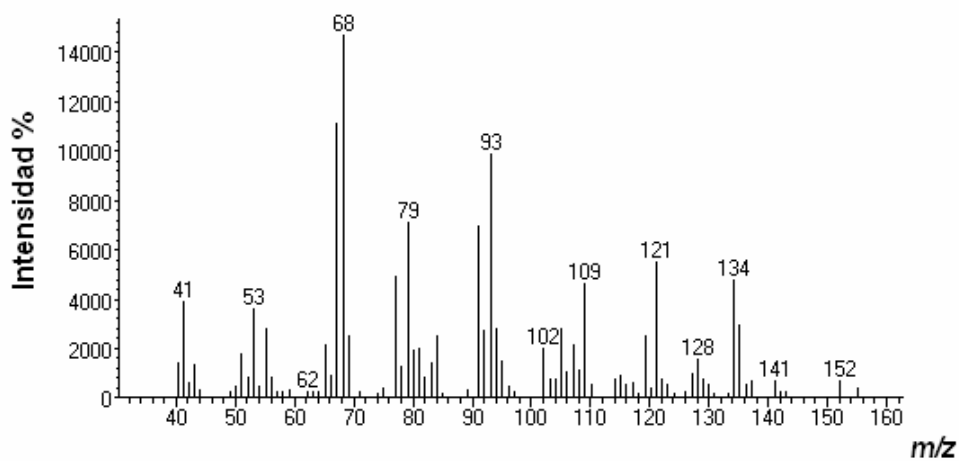


Figura 1-5. Espectro de masas del alcohol perílico (EI, 70 eV).



Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del alcohol perílico (EI, 70 eV).

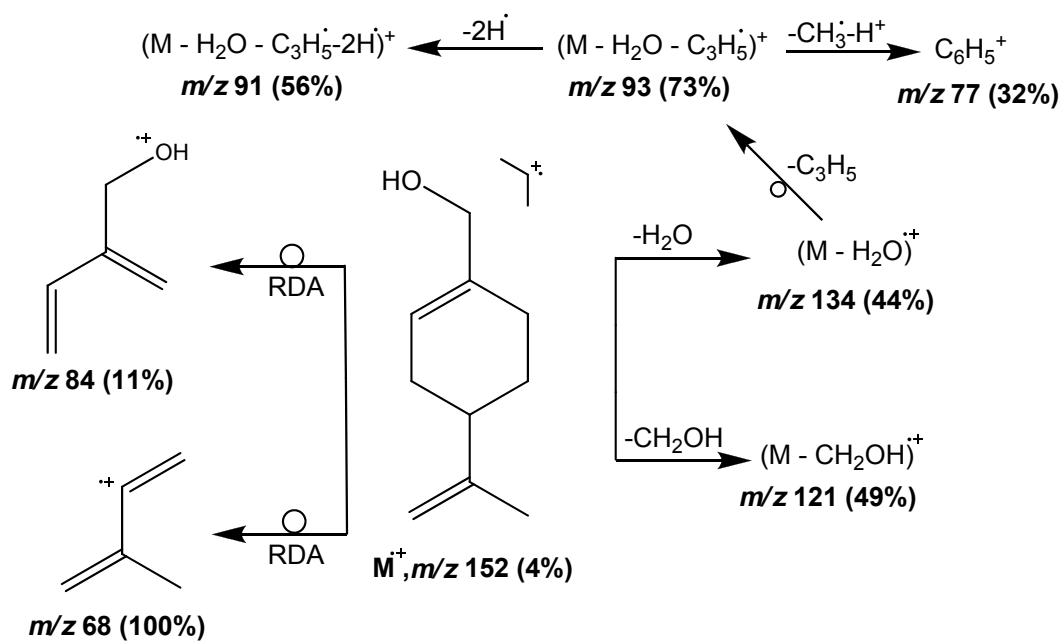
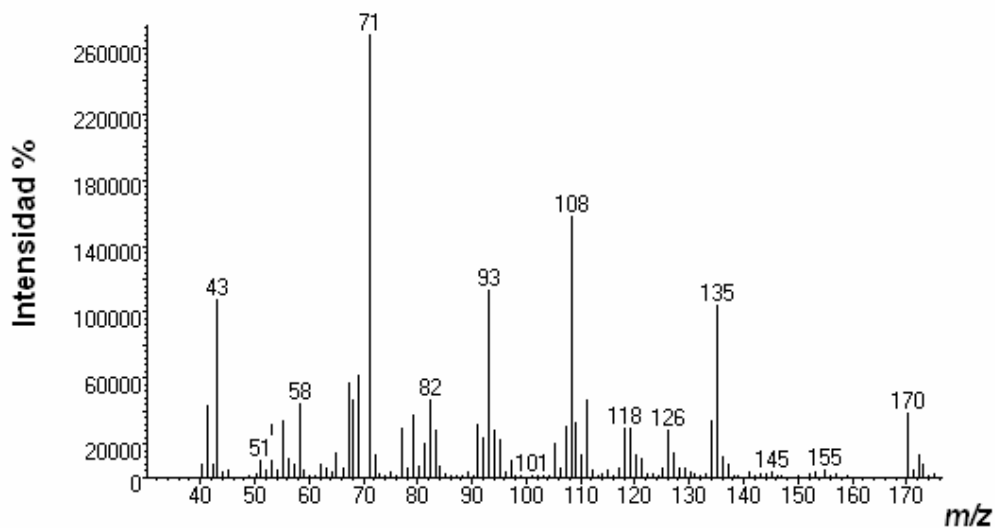
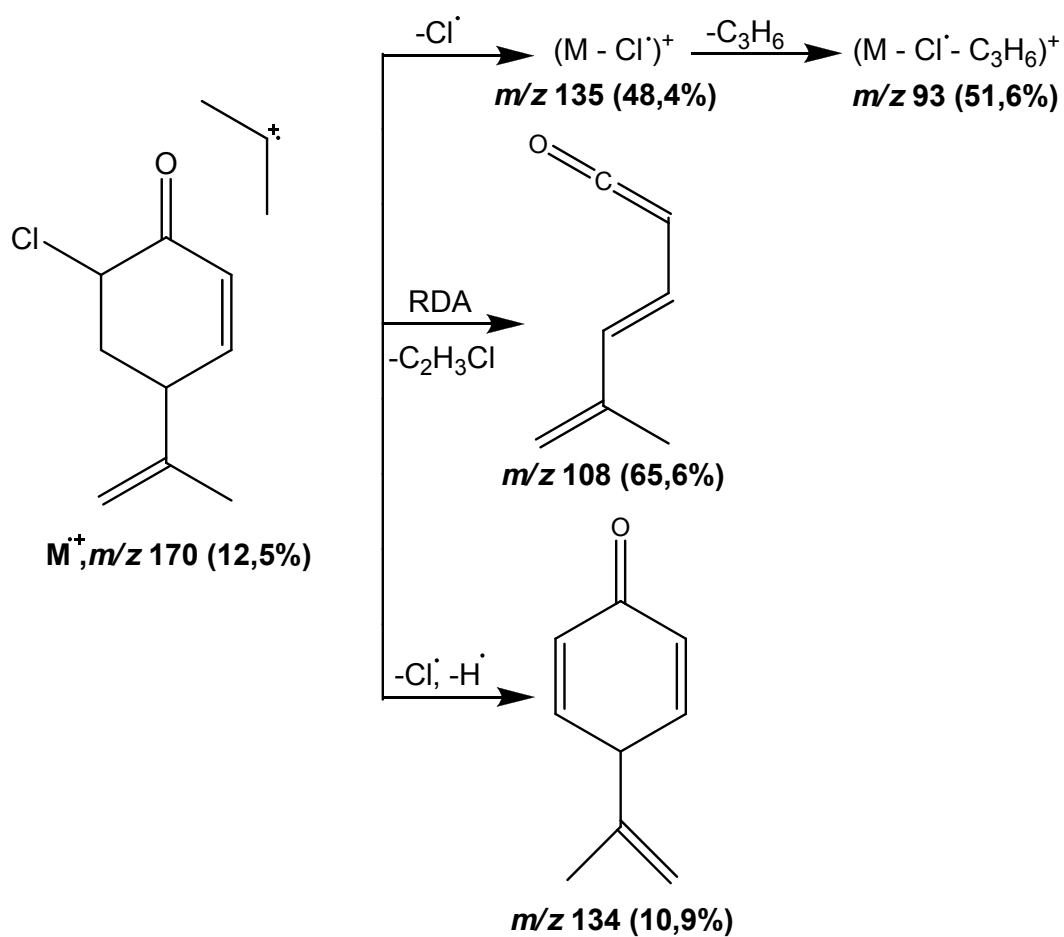


Figura 1-6. Espectro de masas de 2-cloro-4-(1-metiletenil)-ciclohex-5-en-1-ona (EI, 70 eV).



Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación de 2-cloro-4-(1-metiletenil)-ciclohex-5-en-1-ona (EI, 70 eV).



ANEXO 2. Fotocopia del trabajo publicado en las memorias del IX Congreso Colombiano de Fitoquímica, Pereira del 8 al 11 de mayo de 2007.

BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOS R(+)-LIMONENO, α -PINENO Y β -TERPINENO POR MEDIO DE CLOROPEROXIDASA de *Caldariomyces fumago*

RESUMEN

En este trabajo, se llevó a cabo la biotransformación enzimática de los monoterpenos R(+)-limoneno, α -pineno y β -terpineno, por medio de la enzima cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en mezclas de acetonitrilo:agua, y los productos obtenidos fueron extraídos con éter etílico, secados con sulfato de sodio y finalmente analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Finalmente, se identificaron carvona y (E)-carveol como productos de la biotransformación del R(+)-limoneno.

PALABRAS CLAVE: Cloroperoxidasa, *Caldariomyces fumago*, terpenos, biotransformación enzimática

ABSTRACT

*The enzymatic biotransformation of the monoterpenes R(+)-limonene, α -pinene and β -terpinene was performed using chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. The enzymatic reactions were carried out in acetonitrile:water mixtures and the obtained products were extracted with diethyl ether, dried with sodium sulphate and finally analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Carvone and (E)-carveol were identified as biotransformation products of R(+)-limonene.*

KEYWORDS: Chloroperoxidase, *Caldariomyces fumago*, terpenes, enzymatic biotransformation

GINNA PAOLA ARIAS

Estudiante de Química
Universidad Industrial de Santander

ELENA STASHENKO

Química, Ph.D
Profesora Titular
Escuela de Química
Universidad Industrial de Santander
CENIVAM
elena@tucan.uis.edu.co

RODRIGO TORRES

Bioquímico, Ph.D
Profesor Asistente
Escuela de Química
Universidad Industrial de Santander
rtorres@uis.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

Las biotransformaciones de productos naturales constituyen un área de gran interés farmacéutico, dado que es posible potenciar su actividad biológica a través de reacciones biocatalíticas altamente regio y enantioselectivas. En especial, las biotransformaciones de terpenos son muy estudiadas porque permiten la producción de compuestos enantioméricamente puros bajo condiciones suaves de reacción, que pueden ser utilizados en la industria farmacéutica. Los monoterpenos, en particular, representan un grupo abundante de sustancias quirales que pueden ser transformadas en componentes bioactivos de gran valor tales como saborizantes, fragancias y fármacos. [1]

Estas reacciones de biotransformación pueden ser llevadas a cabo por microorganismos o través de reacciones enzimáticas utilizando enzimas oxidativas como mono o di-oxigenasas o peroxidadas. Las peroxidadas son enzimas muy interesantes que pueden ser útiles a la hora de llevar a cabo reacciones de biotransformación, ya que son muy abundantes en la naturaleza y altamente enantio y regioselectivas.

La enzima cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago*, la cual se utilizó en este estudio, es una enzima muy versátil, ya que no solo cataliza las reacciones clásicas de las peroxidadas, sino que también reacciones

Fecha de Recepción: 15 Febrero de 2007

Fecha de Aceptación: 12 Marzo de 2007

de transferencia de oxígeno y halogenaciones con una alta especificidad de sustrato [2-4]. Además, se caracteriza por ser una glicoenzima muy estable a 40 °C y a pH entre 3.0 y 5.5 [5].

En años recientes, se ha ido reconociendo a esta hemo peroxidasa por su gran estereoselectividad que resulta ser muy útil en síntesis orgánica [6, 7]. Así por ejemplo, se ha usado la CPO en epoxidación de olefinas con hidroperóxidos, debido a que los epóxidos quirales son intermediarios importantes en la síntesis asimétrica de compuestos biológicamente activos. De igual forma se han estudiado las reacciones de transferencia de oxígeno al doble enlace carbono-carbono en un gran rango de mono-olefinas arílicas, y los efectos en la posición del doble enlace a lo largo de la cadena y la estereoquímica *cis/trans* en la enantioselectividad y reactividad de la enzima se han observado en diferentes reacciones. [8]

Estas biotransformaciones se han realizado tradicionalmente en sistemas acuosos, debido a que estos medios son generalmente compatibles con las enzimas. Sin embargo, la solubilidad de los terpenos en agua es muy baja, por lo que es necesario emplear algunos solventes orgánicos en el medio de reacción. Cuando se emplean solventes no-acuosos en vez del medio acuoso natural, las enzimas exhiben nuevas propiedades, incluyendo la habilidad de catalizar reacciones

imposibles en agua, aumento de la termoestabilidad y selectividad, entre otras. La principal desventaja del funcionamiento de la enzimas en solventes orgánicos es que se reduce su actividad catalítica comparada con la que presenta en medio acuoso; una de las principales causas de esta inactivación no es el efecto mismo del solvente orgánico sino la desnaturalización de la enzima por su previa deshidratación, usualmente por medio de liofilización [9]. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la capacidad de biotransformación de los monoterpenos R(+)-limoneno, α -pineno y γ -terpineno (Ver Figura 1) por la enzima cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* en medios orgánicos.

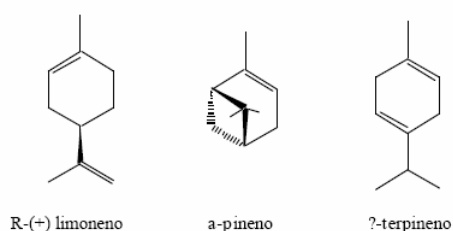


Figura 1. Estructura de los sustratos sometidos a biotransformación con CPO de *Caldariomyces fumago*

2. CONTENIDO

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1 Reactivos

Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* fue gentilmente donada por el Dr. Rafael Vázquez-Duhalt (UAM-México). R-(+)-limoneno (97%, Aldrich), α -pineno (98%, Aldrich) y γ -terpineno (98% Aldrich), monoclorodimedona (MCD), acetonitrilo, buffer fosfato 3,50, cloruro de potasio, peróxido de hidrógeno, éter etílico, sulfato de sodio y *n*-tetradecano (ISTD), fueron de grado analítico.

2.1.2 Reacciones de bioconversión de terpenos con CPO de *Caldariomyces fumago*

La actividad de la cloroperoxidasa fue determinada por el método descrito por Morris y Hager (1996). Las reacciones se llevaron a cabo bajo condiciones estándar de reacción a 25°C, en buffer fosfato (50 mM) de pH 2,70, cloruro de potasio 20 mM, monoclorodimedona 0,1 mM, peróxido de hidrógeno 2 mM, cuantificando la formación de diclorodimedona (DMCD) a una longitud de onda de 278 nm en un espectrofotómetro ultravioleta UV-2401 PC (Shimadzu, UV-VIS Recording Spectrophotometer). La enzima utilizada presentó una actividad de 4000 U/mL para la cloración de la monoclorodimedona (MCD).

Para las conversiones de los terpenos se emplearon iones cloruro de KCl, con una actividad enzimática de CPO de 40 U/mL y condiciones de reacción de buffer fosfato pH 3.50 (100 mM), con el 40% de acetonitrilo y una concentración de 10 mM de los diferentes sustratos (patrones de terpenos certificados). El peróxido de hidrógeno fue añadido a una concentración total de 2 mM en un tiempo total de reacción de 60 min, en porciones de 10 μ L cada 6 min. La conversión enzimática se llevó a cabo por triplicado a temperaturas entre 8-12°C.

Posteriormente, las muestras fueron extraídas con éter etílico, secadas con sulfato de sodio durante 12 horas, y analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus* (HP, Palo Alto, California, USA), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975*. En una columna capilar de sílice fundida polar, DB-WAX (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol), de 60 m x 0.25 mm D.I. 0.25 μ m, d_f .

2.2. Resultados y Discusión.

2.2.1 Biotransformación de R(+)-limoneno

El R-(+)-limoneno es un terpeno monocíclico que ha sido utilizado en diversos procesos industriales químicos, farmacéuticos y alimenticios, como solvente industrial, materia prima para la fabricación de otros compuestos químicos, componente aromático, entre otros. Debido al gran uso que tiene este compuesto, se ha incrementado el número de investigaciones relacionadas con su biotransformación en sustancias de mayor valor agregado y aplicaciones específicas [10].

La biotransformación de R-(+)-limoneno con CPO permitió la formación de productos derivados oxigenados y compuestos clorados, destacándose el (E)-carveol y la carvona, un monoterpene oxidado de gran valor agregado (ver Tabla 1 y Figuras 1 y 2).

Producto	Iones espectro de masas (m/z)
Derivado oxigenado	170 [M ⁺], 134 (30), 121 (41), 93 (63), 79 (39), 68 (100), 53 (16), 41 (14).
Carvona	150 [M ⁺], 108 (46), 93(41), 82 (100), 67 (11), 54 (30), 41 (17).
(E)-Carveol	152 [M ⁺], 137 (12), 119 (24), 109 (100), 91 (31), 84 (51), 77 (15), 69 (19), 55 (23), 41 (19).
Derivado clorado y oxigenado	188 [M ⁺ , 2Cl], 170 (8), 135 (17), 108 (57), 93 (32), 82 (13), 71 (100), 58 (15), 43 (37).
Derivado clorado y oxigenado	188 [M ⁺ , 2Cl], 170 (13), 135 (35), 108 (53), 93 (37), 82 (15), 71 (100), 58 (16), 43 (38).

Tabla 1. Datos de espectros de masas de productos de biotransformación de R(+)-Limoneno

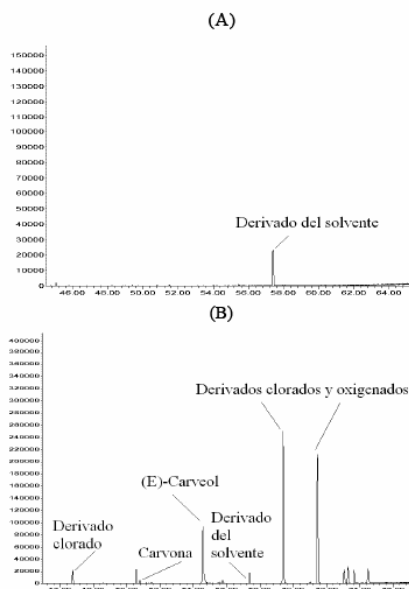


Figura 1. Cromatogramas de: (A) Blanco del sustrato R(+)-limoneno, y (B) Productos de biotransformación de R(+)-Limoneno.

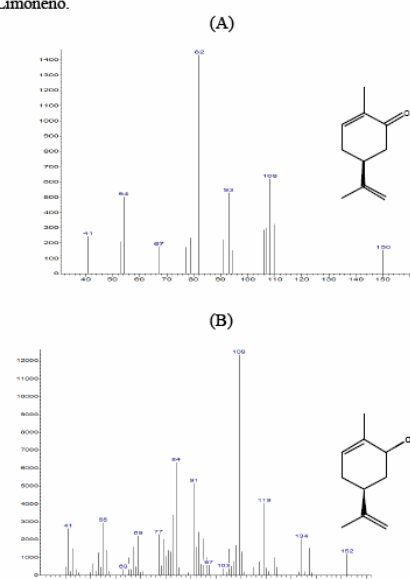


Figura 2. Espectros de masas de: (A) Carvona y (B) (E)-Carveol.

2.2.2 Biotransformación de β -Terpineno:

Los resultados obtenidos muestran que durante el tiempo de reacción se obtuvieron diversos productos oxigenados, que posiblemente pueden ser productos de biotransformación con mejores propiedades aromatizantes que el sustrato de partida (ver Figura 3).

En este cromatograma se observan dos señales bastantes intensas en comparación con las señales de los otros productos de biotransformación, que representan a un derivado oxigenado del sustrato empleado y al derivado del solvente que aparece en cada uno de los cromatogramas obtenidos, por lo que no es considerado como producto de la biotransformación.

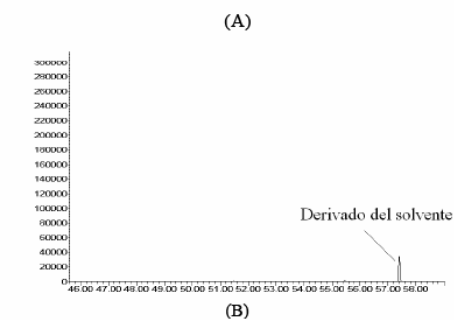


Figura 3. Cromatogramas de: (A) Blanco del sustrato β -Terpineno, y (B) productos de biotransformación de β -Terpineno.

2.4. Biotransformación de α -pineno:

La biotransformación de α -pineno al igual que la de los otros sustratos empleados fue exitosa, ya que se obtuvieron algunos derivados oxigenados (ver Figura 4). Los productos obtenidos indican una posible oxigenación arílica de este sustrato por la enzima CPO de *Caldariomyces fumago*.

Los resultados obtenidos en esta biotransformación concuerdan con los resultados de otras investigaciones, en las que emplean *Armillariella mellea* el cual es un

hongo dulce en vez de enzimas. [11] La ventaja que presenta el uso de esta enzima como catalizador en las diferentes reacciones es el corto tiempo de reacción y la enantio y estereoespecificidad que presenta con cada uno de los sustratos empleados.

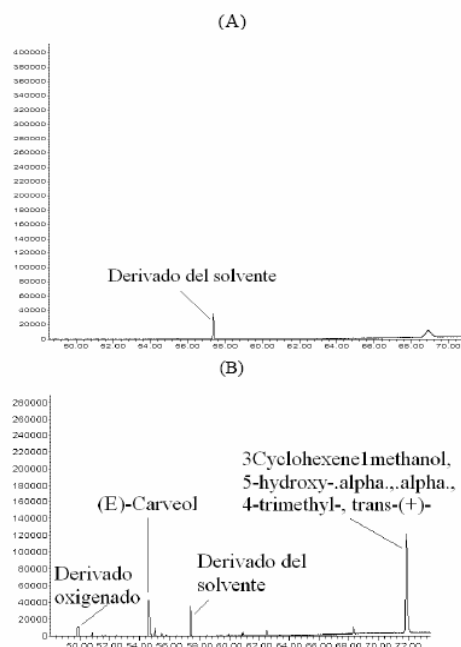


Figura 4. Cromatograma de: (A) Blanco del sustrato α -Pinoeno, y (B) productos de biotransformación de α -Pinoeno.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El porcentaje relativo de los productos de biotransformación obtenidos no es muy alto (carvona 0,041%, (E)-carveol 1,099%) en las condiciones utilizadas en estas reacciones enzimáticas, por lo que es necesario optimizar la reacción de biotransformación para obtener una mayor conversión de los terpenos. Los productos obtenidos son en su mayoría compuestos oxigenados, destacándose la formación de carvona y (E)-carveol a partir de R-(+) limoneno. Estos resultados demuestran que es posible que se lleven a cabo reacciones de oxidación de terpenos y productos de mayor valor agregado y actividad biológica.

4. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a COLCIENCIAS-CENIVAM contrato RC 432-2004, por la financiación de esta investigación.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] CARVALHO, C., FONSECA, M. Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances*, 2006. **24**: 134-142.
- [2] KAUP, B., PIANTINI, U., et al. Monoterpenes as novel substrates for oxidation and halo-hydroxylation with chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006. **73** (5): 1087-1096.
- [3] HAGER, LP., MORRIS, DR., et al. Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen ions. *Journal of Biological Chemistry*, 1966. **241** (8): 1769-1777.
- [4] LIBBY, R., THOMAS, JA., et al. Chloroperoxidase halogenation reactions. Chemical versus enzymic halogenating intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, 1882. **257** (9): 5030-5037.
- [5] LA ROTTA, C., LÜTZ, S., et al. Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation amidation and cross-linking. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005. **37**: 582-588.
- [6] KILJUNEN, E., KANERVA, L. Chloroperoxidase-Catalysed oxidation of alcohols to aldehydes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000. **2**: 163-172.
- [7] MORRIS, D., HAGER, L. Chloroperoxidase: Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 1965. **241**(8): 1763-1768.
- [8] SANFILIPPO, C., NICOLOSI, G. Catalytic behaviour of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in the oxidation of cyclic conjugated dienes. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002. **13**: 1889-1892.
- [9] DAI, L., and KLIBANOV, A. Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media. *Applied Biological Sciences, Chemistry*, 1996. **96**: 9475-9478.
- [10] MARTINS, R., KAWAI, S., et al. Estudio de la biotransformación del d-Limoneno por fermentación en fase líquida.
- [11] DRACZYNSKA, B., CAGARA, Cz., et al. Biotransformation of pinenes. XVII. Transformation of α - and β -pinenes by means of *Armillariella mellea* (honey fungus), a parasite of woodlands. *J. Basic Microbiol*, 1985. **25** (8): 457-492.