

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS
MONOTERPENOS LIMONENO Y CITRONELOL CON MICROORGANISMOS**

GLORIA ASTRID PRIETO SUÁREZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSTGRADO EN QUÍMICA
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS
BUCARAMANGA
2011**

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS
MONOTERPENOS LIMONENO Y CITRONELOL CON MICROORGANISMOS**

GLORIA ASTRID PRIETO SUÁREZ, Qca. M.

**Trabajo de grado para optar al título de
DOCTOR EN QUÍMICA**

Directora

JANETH AIDÉ PEREA VILLAMIL

Química, Ph. D.

Codirectora

ELENA STASHENKO

Química, Ph. D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE POSTGRADO EN QUÍMICA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE

ALIMENTOS

BUCARAMANGA

2011

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres, Rafael y Marina a quienes debo todo en la vida.

A mis Hermanos, cuñado(a) s y sobrinos.

A mis tesoros Adolfo, Cristhian y Juliana

Gloria Astrid Prieto Suárez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por sus bendiciones día a día.

A COLCIENCIAS por la financiación de este proyecto.

A CENIVAM y al Laboratorio de Cromatografía-UIS, por el análisis de las muestras; sin éste soporte técnico no hubiese sido posible llevar a feliz término la investigación.

A la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia-Tunja, por la Comisión de Estudios otorgada.

A los Docentes de la UPTC, Oscar Julio Medina, Wilsón Rozo y Maria Luz Gonzalez, por su apoyo y credibilidad.

A la Dra. Janeth Aidé Perea Villamil, por su dirección, asesoría, y en sí, por ser una líder. Ejemplo a seguir.

A la Dra. Elena Stashenko, por su co-dirección y colaboración.

A Dra. Claudia Cristina Ortiz por su asesoría permanente en el trabajo experimental y en la productividad intelectual.

A los PhD. Rodrigo Torres, Martha Daza y Markus Doerr, por sus sugerencias y comentarios técnicos.

A la Dra. Patricia Escobar y la Ms. Sandra Leal, por los análisis de actividad antiparasitaria a los extractos de biotransformación.

Al CICTA, por la oportunidad que me brindaron de trabajar en su Centro de Investigación y facilitarme los recursos físicos para la realización de esta tesis.

Al Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear-UIS, por los espectros RMN mono y bidimensionales.

A mi esposo Adolfo y a mis hijos Cristhian y Julianita. Por su amor, paciencia y entendimiento. Por existir y ser mi motivo de inspiración para progresar profesionalmente.

A mis padres, hermanos, cuñado(a)s y sobrinos, quienes siempre han creído y confiado en mí. Por su amor incondicional; por sus palabras de apoyo y aliento para superar momentos difíciles y salir al frente con entusiasmo.

A mis amigos del CICTA, Luis, Yenny, Jennifer, Erick, Tatiana, Juancho, Hugo, Arley, Sandra, Daniel, Olga, quienes hicieron más llevadera la faena experimental con su alegría.

A mis compañeros de postgrado, Emilbus, Carlitos y Jhon, por compartir vivencias, éxitos y brindarme ánimo y valor.

A mis demás familiares y amigos por sus palabras de aliento y esperanza, porque siempre confiaron en mí.

Gloria Astrid Prieto Suárez

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
1. INTRODUCCIÓN	28
1.1 SUSTRATOS MONOTERPÉNICOS: LIMONENO Y CITRONELOL	30
1.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE MONOTERPENOS	33
1.2.1 Modo de acción de las oxigenasas	35
1.2.2 Oxifuncionalización de terpenos	37
1.2.3 Biocatalizadores potencialmente útiles en la oxifuncionalización de terpenos	39
1.2.4 Factores que inciden en el desarrollo de biotransformaciones competitivas de monoterpenos	42
1.3 DERIVADOS OXIGENADOS DE LOS MONOTERPENOS LIMONENO Y CITRONELOL	47
1.3.1 Derivados oxigenados del limoneno.	48
1.3.2 Derivados oxigenados del citronelol	49
1.4 CONTENIDO DE ESTA TESIS	57
2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN DEL CITRONELOL CON HONGOS. ESCALADO, PURIFICACIÓN Y BIOACTIVIDAD	59
2.1 INTRODUCCIÓN	59
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	70
2.2.1 Microorganismos, medios de cultivo y reactivos	70
2.2.2 Cinética de crecimiento microbiano de los hongos en medio de cultivo sólido	70
2.2.3 Evaluación de la actividad antifúngica del sustrato	71
2.2.4 Optimización del proceso de biotransformación de citronelol utilizando células completas de hongos a escala de laboratorio	72
2.2.5 Extracción, identificación y cuantificación de sustrato remanente y productos de biotransformación	75

2.2.6 Análisis estadístico	78
2.2.7 Escalamiento del proceso de biotransformación de citranelol por <i>P. digitatum</i> DSM 62840	78
2.2.7.1 A escala de 50 mL de medio	78
2.2.7.2 A escala de 500 mL de medio	79
2.2.8 Extracción y purificación del Cit-OH	80
2.2.9 Caracterización espectral del Cit-OH puro	80
2.2.10 Bioactividad del extracto de biotransformación del citranelol	81
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
2.3.1 Condiciones óptimas de crecimiento de los hongos en medio sólido	82
2.3.2 Actividad antifúngica de citranelol sobre el crecimiento de <i>P. digitatum</i> DSM 62840	84
2.3.3 Optimización del proceso de biotransformación	86
2.3.4 Escalado del proceso de biotransformación	95
2.3.4.1 A 50 mL de medio	95
2.3.4.2 A 500 mL de medio de cultivo	97
2.3.5 Purificación y caracterización de Cit-OH	105
2.3.6 Bioactividad: citotoxicidad, actividad antiparasitaria y antioxidante	108
3. BIOTRANSFORMACIÓN DEL (R)-(+)-LIMONENO POR BACTERIAS	110
3.1 INTRODUCCIÓN	110
3.1.1 Epóxidos de limoneno	111
3.1.2 Biotransformación del limoneno dirigida hacia la producción de sus derivados epóxidos	112
3.1.2 Obtención de epóxidos vía catálisis química	115
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	117
3.2.1 Microorganismo, medios de cultivo y reactivos	117
3.2.2 Crecimiento celular	118
3.2.3 Ensayos de biotransformación	118
3.2.4 Extracción, identificación y cuantificación de sustrato y productos de reacción	119

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	120
3.3.1 Crecimiento celular	120
3.3.2 Biotransformación	120
4. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN DEL LIMONENO POR <i>Aspergillus niger</i> DSM 821. ESCALAMIENTO Y BIOACTIVIDAD	124
4.1 INTRODUCCIÓN	124
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	131
4.2.1 Químicos y reactivos	131
4.2.2 Microorganismo y cultivo	131
4.2.3 Cinética de crecimiento microbiano de <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 en medio sólido	132
4.2.4 Evaluación de la actividad antifúngica del sustrato	132
4.2.5 Optimización del proceso de biotransformación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno utilizando <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 a escala de laboratorio	132
4.2.6 Extracción, identificación y cuantificación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno remanente y productos de biotransformación	136
4.2.7 Análisis estadístico	139
4.2.8 Escalamiento del proceso de biotransformación por <i>A. niger</i> DSM 821	139
4.2.8.1 A escala de 50 mL de medio	139
4.2.8.2 A escala de 500 mL de medio	140
4.2.9 Purificación del POH del extracto de biotransformación	141
4.2.10 Bioactividad del extracto de biotransformación del (<i>R</i>)-(+)-limoneno por <i>A. niger</i> DSM 821	142
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	143
4.3.1 Cinética de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 en medio de cultivo sólido	143
4.3.2 Evaluación de la actividad antifúngica del sustrato	144
4.3.3 Optimización del proceso de biotransformación	145

4.3.4 Escalado del proceso de biotransformación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno por <i>A. niger</i> DSM 821	156
4.3.4.1 A 50 mL de medio de cultivo	156
4.3.4.2 A 500 mL de medio de cultivo	158
4.3.5 Citotoxicidad, actividad antiparasitaria	167
4.3.6 Actividad antioxidante	169
5. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN DEL (<i>R</i>)-(+)-LIMONENO POR <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840. ESCALADO, PURIFICACIÓN Y BIOACTIVIDAD	172
5.1 INTRODUCCIÓN	172
5.1.1 Producción biocatalítica de α -terpineol	175
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	179
5.2.1 Microorganismo, medios de cultivo y reactivos	179
5.2.2 Cinética de crecimiento microbiano de <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840 en medio sólido	180
5.2.3 Evaluación de la actividad antifúngica del sustrato	180
5.2.4 Optimización del proceso de biotransformación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno utilizando <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840 a escala de laboratorio	181
5.2.5 Escalamiento del proceso de biotransformación	184
5.2.5.1 A 50 mL de medio	184
5.2.5.2 A 500 mL de medio	185
5.2.6 Extracción, identificación y cuantificación de sustrato y productos de reacción	187
5.2.7 Extracción y purificación del α -terpineol	190
5.2.8 Bioactividad del extracto de biotransformación del (<i>R</i>)-(+)-limoneno y del α -terpineol	191
5.2.8.1 Citotoxicidad en células de mamífero y la actividad anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> y anti- <i>Leishmania</i>	191
5.2.8.2 Actividad antioxidante	192
5.2.9 Análisis estadístico	192

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	192
5.3.1 Cinética de crecimiento microbiano de <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840 en medio sólido	193
5.3.2 Evaluación de la actividad antifúngica del sustrato	194
5.3.3 Optimización del proceso de biotransformación	195
5.3.4 Escalado del proceso de biotransformación	207
5.3.4.1 A 50 mL de medio de cultivo	207
5.3.4.2 A 500 mL de medio de cultivo	209
5.3.5 Purificación y caracterización de α -terpineol	216
5.3.6 Citotoxicidad, actividad antiparasitaria y antioxidante	221
6. CONCLUSIONES GENERALES	225
BIBLIOGRAFÍA	229
ANEXOS	266

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Isómeros estructurales de la molécula del limoneno	31
Figura 2 Estructura del citronelol	32
Figura 3 Estructura del grupo hemo y su ubicación en una oxigenasa P450. Estructura de cintas y lazos de la oxigenasa P450-Terp (CYP108) de una forma recombinante de <i>Pseudomonas</i> sp., expresada en <i>E. coli</i> que cataliza la oxidación de α -terpineol.	34
Figura 4 Reacciones generales de oxidación catalizadas por oxigenasas	35
Figura 5 Transferencia de electrones por el sistema citocromo P450	36
Figura 6 Esquema general del mecanismo de catálisis del citocromo P450 (Tomado de Ortiz de Montellano, 2005)	38
Figura 7 Residuos que conforman el sitio activo de la monooxigenasa P450 _{cam} a) Enzima nativa con alcanfor enlazado al sitio activo, b) enzima mutante Y96A con 4-hidroxidifenil metano enlazado al sitio activo, (---) indica el enlace de hidrógeno alcanfor-tirosina (Tomado de Swart et al., 2005).	40
Figura 8 Reacciones estereo-selectivas catalizadas por hongos (Tomada de Borges et al., 2009)	41
Figura 9 Representación de la estructura química optimizada en 3D del limoneno, carbonos activos para la oxidación y productos de oxidación (la estereoquímica no se define en las estructuras) (Tomada de Castellanos, 2007)	49
Figura 10 Biocatalizadores empleados en la biotransformación de limoneno. MO: Monooxigenasa, DH: Deshidrogenasa, EH: Epóxido hidrolasa. (S)-(-)- Limoneno 3-Monooxigenasa (EC 1.14.13.47), (S)-(-)-Limoneno 6-Monooxigenasa (EC 1.14.13.48), (S)-(-)-Limoneno 7-Monooxigenasa (EC 1.14.13.49), Limoneno 1,2 Epóxido hidrolasa (EC 3.3.2.8), Peril alcohol Dehidrogenasa (EC 1.1.1.144), (S)-(-)-limoneno sintasa (EC 4.2.3.16), (R)-(+)- Limoneno sintasa (EC 4.2.3.20).	52

Figura 11 Productos de oxidación/hidroxilación del citronelol	53
Figura 12 Metabolitos producidos por la biotransformación de citronelol utilizando diferentes biocatalizadores	63
Figura 13 Estructura química del hidroxicitronelol	64
Figura 14 Estructuras y propiedades de los isómeros d/l cis/trans óxidos de rosa	65
Figura 15 Ruta sintética para la obtención de óxido de rosa	66
Figura 16 Catálisis ácida del 3,7-dimetil-5-octen-1,7-diol.	66
Figura 17 Síntesis de óxidos de rosa catalizada por complejos de paladio	67
Figura 18 Síntesis del óxido de rosa catalizado por sales de mercurio	67
Figura 19 Síntesis de óxidos de rosa catalizada por KHSO ₄ /Tolueno	68
Figura 20 Formación de óxidos de rosa a partir de citronelol con ¹ O ₂	69
Figura 21 Cepas de <i>A. carbonarius</i> DSM 872, <i>P. digitatum</i> DSM 62840 y <i>A. niger</i> DSM 821 crecidas en medios de cultivo sólido YGA, PDA y MEA, respectivamente	83
Figura 22 Cinética de crecimiento microbiano de <i>A. carbonarius</i> DSM 872 en medios PDA, MEA y YGA sobre platos de agar a 27 °C	84
Figura 23 Bioconversión del citronelol por hongos	87
Figura 24 Cromatograma de biotransformación de citronelol por <i>A. niger</i> DSM 821 en el medio MYB de pH 2.5 a 27 °C	89
Figura 25 Metabolitos producidos de la biotransformación de citronelol por <i>A. niger</i> DSM 821 a pHs ácidos en el medio YMPG a 8 días de reacción	89
Figura 26 Efecto de la fase de crecimiento de <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840 sobre la biotransformación de citronelol. Condiciones de cultivo: medio MYB de pH 2.5 a 27 °C y 150 rpm, citronelol 12.8 mM	91
Figura 27 Efecto de la fase de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 sobre la biotransformación de citronelol. Condiciones de cultivo: medio MYB de pH 2.5 a 27 °C y 150 rpm	92

Figura 28 Cinética de crecimiento microbiano de <i>P. digitatum</i> DSM 62840 en 50mL de medio MYB de pH 2.5 a 27 °C y 150 rpm. (A) Con Suspensión de esporas y (B) Con micelio	96
Figura 29 Morfología de <i>P. digitatum</i> DSM 62840 adquirida en el medio MYB de pH 2.5 a 27 °C y 150 rpm	97
Figura 30 Cinética de crecimiento de <i>P. digitatum</i> DSM 62840 en 500 mL de medio MYB de pH 2.5, a 27 °C y 100 rpm agitado mecánicamente	98
Figura 31 Diagrama de efectos principales	100
Figura 32 Diagrama de estandarización de efectos	101
Figura 33 Superficie de Respuesta Estimada para Cit-OH, luego de 12 días de biotransformación como función de la velocidad de aireación y agitación	102
Figura 34 Cromatograma de biotransformación de citronelol por <i>P. digitatum</i> en biorreactor a 150 rpm y 0.05 vvm	103
Figura 35 Cromatografía de capa fina del extracto concentrado de biotransformación del citronelol por <i>P. digitatum</i> DSM 62840 sin purificar. 1, 2 y 3 patrón del citronelol; 4, extracto de biotransformación	105
Figura 36 Espectro de masas obtenido por GC-MS (EIMS, 70 eV) del Hidroxicitronelol	106
Figura 37 Espectro RMN- ¹ H del hidroxicitronelol	107
Figura 38 Estructura del fragmento del hidroxicitronelol	107
Figura 39 Producción del derivado hidroxilado del citronelol. Biotransformación con <i>P. digitaum</i> DSM 62840 (A); Catálisis ácida (B)	109
Figura 40 Estructura química de los epóxidos de limoneno: a) 1,2 b) 8,9	111
Figura 41 Reacciones de oxidación catalizadas por diferentes monooxigenasas de <i>Rhodococcus erythropolis</i> DC 14 y <i>Xanthobacter</i> sp.	114
Figura 42 Catalizador de Jacobsen. (a) Quiral; (b) Aquiral. (Tomado de Reyes et al., 2008)	116
Figura 43 Ciclo catalítico modificado propuesto para la epoxidación Jacobsen-Katsuki (Tomado de Reyes et al., 2008).	117

Figura 44 Seguimiento con el tiempo del proceso de biotransformación del limoneno por acción de bacterias usando una concentración de limoneno de 850 mg/L	121
Figura 45 Cromatograma del proceso de biotransformación del limoneno por la acción de <i>R. erythropolis</i> a 850 mg/L de limoneno, 72 h de reacción. (Linalol t_R , 11.578 min, óxidos trans limoneno t_R , 12.561 min y carvona t_R , 15.301min)	122
Figura 46 Biotransformación del (<i>R</i>)-(+)-limoneno por bacteria <i>R. erythropolis</i> DSM 43066, medio mineral de pH 7.0, a 28 °C, 100 rpm con agitación mecánica a, 48 h de reacción y concentración de sustrato 850 mg/L	123
Figura 47 Estructura del alcohol perílico	124
Figura 48 Biotransformación del limoneno por células de bacterias	129
Figura 49 Productos de biotransformación de limoneno, utilizando diferentes hongos	130
Figura 50 <i>Aspergillus niger</i> DSM 821. Cepa crecida en los medios de cultivo sólidos: MEA, PDA y YGA a 28 °C, 8 días de crecimiento	143
Figura 51 Cinéticas de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 en los medios sólidos PDA, MEA y YGA cultivado a 28°C	144
Figura 52 Producción de biomasa de <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 en diferentes medios de cultivo líquido: YMPG, MYB y YM de pH 5.0 a 28°C y 300 rpm	150
Figura 53 Efecto de la fase de crecimiento de <i>A. niger</i> DSM 821 sobre la biotransformación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno, medio MYB, 28 °C, 300 rpm, pH 5.0	152
Figura 54 Producción de alcohol perílico durante la biotransformación del (<i>R</i>)-(+)	153
Figura 55 Biotransformación del limoneno por suspensión de esporas de <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 bajo condiciones óptimas del proceso	155
Figura 56 Imagen de la morfología de <i>A. niger</i> DSM 821, micelio y suspensión de esporas	156

Figura 57 Cinética de crecimiento microbiano de <i>A. niger</i> DSM 821 en 50 mL de medio MYB de pH 5.0 a 28 °C y 300 rpm. (A) Suspensión de esporas y (B) Micelio	157
Figura 58 Producción de alcohol perílico por biotransformación del limoneno por <i>A. niger</i> DSM 821 en dos diferentes morfologías	158
Figura 59 Cinética de crecimiento de <i>A.niger</i> DSM 821 en 500 mL de medio MYB de pH 5.0, a 28 °C y 200 rpm en biorreactor New Brunswick Scientific BioFlo 110	159
Figura 60 Diagrama de estandarización de efectos (A) y Efectos principales (B)	162
Figura 61 Cromatograma obtenido de la biotransformación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno por <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 llevada a cabo en bioreactor en 500 mL de medio MYB de pH 5.0, a 28 °C, 200 rpm sin aireación	165
Figura 62 Espectro de masas del alcohol perílico obtenido por GC-MS (EIMS, 70 eV). Metabolito principal producido en la biotransformación del limoneno por <i>A. niger</i> DSM 821	166
Figura 63 Biosíntesis de α -terpineol	173
Figura 64 Isómeros estructurales del α -terpineol	174
Figura 65 Estructura de Terpeneoles	174
Figura 66 <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840. Cepa liofilizada y crecida en los medios de cultivo sólidos: (A) PDA, (B) MEA, (2 días) y (C) YGA	193
Figura 67 Cinética de crecimiento microbiano de <i>P. digitatum</i> DSM 62840 en medios PDA, MEA y YGA sobre platos de agar a 23 ° C. PDA (), YGA () y MEA ()	194
Figura 68 Cinética de crecimiento de <i>P. digitatum</i> en los medios líquidos MYB, YMPG y YG de pH 3.5 a 27 °C y 150 rpm.	196
Figura 69 Velocidad específica de crecimiento de <i>P. digitatum</i> DSM 62840 en medios de cultivo líquido de pH 3.5 a 27 °C y 150 rpm	197
Figura 70 Efecto del medio YMPG (), MYB () y YG () sobre la biotransformación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno por <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840. (A):	

Cinética de la producción de α -terpineol y (B): Cinética de crecimiento microbiano. Condiciones del medio de cultivo: pH 3.5 y temperatura de 27 °C	198
Figura 71 Productos de biotransformación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno por <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840 obtenidos a pH 4.5 y 6.0 en MYB, temperatura 27 °C y 150 rpm	201
Figura 72 Efecto de la adición de limoneno en diferentes fases de crecimiento de <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840 sobre la biotransformación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno. Condiciones de cultivo: medio MYB, 27° C, 150 rpm y pH 3.5.	203
Figura 73 Cromatograma obtenido de la biotransformación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno por <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840, en medio MYB, a 27 °C, 150 rpm, y pH 3.5. (A) Limoneno 15 mM (B) Limoneno 100 mM. Otras condiciones: Columna capilar DB-WAX (60m x 0.25mm x 0.25 μ m), Cromatografía acoplada a detector selectivo de masas (GC-MS)	204
Figura 74 Cinética de crecimiento microbiano de <i>P. digitatum</i> DSM 62840 en 50 mL de medio MYB de pH 3.5 a 27°C y 150 rpm. (A) Sin-precultivo y (B) Con-precultivo.	207
Figura 75 Morfología de <i>P. digitatum</i> DSM 62840. (A): medio inoculado con micelio, (B): medio inoculado con suspensión de esporas, SS; medio inoculado con SS a escala de laboratorio.	209
Figura 76 Cinética de crecimiento de <i>P. digitatum</i> DSM 62840 en 500 mL de medio MYB de pH 3.5, a 27 °C y 100 rpm en biorreactor New Brunswick Scientific BioFlo 110.	210
Figura 77 Diagrama de estandarización de efectos (A) y Superficie de respuesta estimada (B)	213
Figura 78 Fracciones resultantes de la cromatografía de columna sobre Sílica Gel-60 del extracto de biotransformación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno por <i>P. digitatum</i> DSM 62840 concentrado. Prueba cualitativa con el reactivo de Lucas. TLC de fracciones y patrones.	217

Figura 79 Espectro de masas de (<i>R</i>)-(+)- α -terpineol	218
Figura 80 Espectro RMN- ¹ H de (<i>R</i>)-(+)- α -Terpineol	219
Figura 81 Corrimientos químicos de la molécula de (<i>R</i>)-(+)- α -terpineol en RMN- ¹ H	219
Figura 82 Espectro RMN- ¹³ C de (<i>R</i>)-(+)- α -Terpineol	220

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Velocidad de crecimiento radial de los hongos en diferentes medios sólidos	83
Tabla 2 Efecto antifúngico del citronelol sobre el crecimiento de <i>P. digitatum</i> DSM 62840 a 23 °C	85
Tabla 3 Efecto antifúngico del citronelol en solución etanólica al 40% sobre el crecimiento de <i>P. digitatum</i> DSM 62840 a 23 °C	85
Tabla 4 Producción de biomasa por <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> y <i>P. digitatum</i> , en los medios YMPG y MYB, a las 48 horas, a 150 rpm, 27 °C y pH 2.5	87
Tabla 5 Efecto del medio de cultivo en la biotransformación del citronelol usando células completas de <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> y <i>P. digitatum</i> , a 150 rpm, 27 °C y pH 2.5	88
Tabla 6. Relación de metabolitos obtenidos en la biotransformación del citronelol por <i>A. niger</i> DSM 821 y <i>P. digitatum</i> DSM 62840 en medio MYB, a 27 °C, 150 rpm, a una concentración de citronelol 12.8 mM y 12 días de reacción	90
Tabla 7 Metabolitos producidos durante la biotransformación de citronelol por <i>P. digitatum</i> a diferentes concentraciones de sustrato en el medio MYB de pH 2.5, a 27 °C y 150 rpm	93
Tabla 8 Efecto inductor del citronelol sobre la biotransformación por <i>P. digitatum</i> DSM 62840 en medio MYB de pH 2.5, concentración de citronelol 12.8 mM, a 27 °C, 150 rpm y 12 días de reacción	94
Tabla 9 Productos de biotransformación del citronelol por <i>P. digitatum</i> DSM 62840 en 50 mL de medio MYB de pH 2.5 a 27 °C, 150 rpm, 12 días de reacción y concentración de citronelol 12.8 mM	97
Tabla 10 Variables y niveles evaluados en el diseño factorial multinivel 2 ²	98
Tabla 11 Matrix del diseño factorial multinivel 2 ² , y la concentración de Cit-OH obtenida por GC-MS, 12 días de reacción	99

Tabla 12 Efectos estimados y análisis de varianza para la concentración de Cit-OH (mg/L)	100
Tabla 13 Metabolitos producidos en la biotransformación de citrionelol por <i>P. digitatum</i> DSM 62840 en 500 mL de medio MYB de pH 2.5 ubicados en bioreactor a las diferentes condiciones de operación	104
Tabla 14 Velocidad de crecimiento radial (VCR) de <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 en diferentes medios de cultivo sólido	145
Tabla 15 Actividad antifúngica del (<i>R</i>)-(+)-limoneno sobre <i>A. niger</i> DSM 821, medio MEA cultivado a 28 °C	146
Tabla 16 Productos de biotransformación del (<i>R</i>)-(+)-limoneno por <i>A. niger</i> DSM 821	146
Tabla 17 Efecto del pH en la biotransformación del (<i>R</i>)-(+)-limoneno utilizando <i>Aspergillus niger</i> DSM 821	147
Tabla 18 Metabolitos producidos en la biotransformación del limoneno por <i>A. niger</i> DSM 821 por efecto de etanol como co-solvente	148
Tabla 19 Metabolitos producidos durante la biotransformación del limoneno por <i>A. niger</i> DSM 821 utilizando diferentes medios líquidos	151
Tabla 20 Relación de metabolitos obtenidos en la biotransformación del limoneno por <i>A. niger</i> DSM 821 a diferentes concentraciones de sustrato	154
Tabla 21 Metabolitos producidos durante la biotransformación del limoneno en 50 mL de medio MYB de pH 5.0 a 300 rpm, 28 °C y 6 días de reacción	158
Tabla 22 Variables y niveles evaluados en el diseño factorial multinivel 2 ²	160
Tabla 23 Matrix del diseño factorial multinivel 2 ² , y la concentración de POH obtenida por GC-MS, 6 días de reacción	160
Tabla 24 Efectos estimados y análisis de varianza para la concentración de POH (mg/L)	161
Tabla 25 Metabolitos producidos en la biotransformación de (<i>R</i>)-(+)-limoneno por <i>A. niger</i> DSM 821 en 500 mL de medio MYB de pH 5.0 ubicados en biorreactor y operado bajo condiciones óptimas: sin aireación y a 200 rpm	164

Tabla 26 Actividad del extracto de biotransformación de (R)-(+)-limoneno por <i>A. niger</i> DSM 821 y del alcohol perílico y de los medicamentos de referencia en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , promastigotes de <i>L. panamensis</i> y <i>L. chagasi</i> y en células Vero	167
Tabla 27 Actividad antifúngica de (R)-(+)-limoneno sobre <i>P. digitatum</i> DSM 62840 crecido en medio PDA a 23 °C	195
Tabla 28 Metabolitos producidos durante la biotransformación del (R)-(+)-limoneno por <i>P. digitatum</i> DSM 62840 a diferentes pH del medio MYB a 48 h de reacción	200
Tabla 29 Producción de metabolitos durante la biotransformación del (R)-(+)-limoneno usando <i>P. digitatum</i> DSM 62840, medio MYB, a 27 °C, 150 rpm y pH 3.5	204
Tabla 30 Bioconversión de (R)-(+)-limoneno por <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840 en presencia y ausencia de inductor	206
Tabla 31 Variables y niveles evaluados en el diseño factorial de tres niveles, 3 ²	210
Tabla 32 Matrix del diseño factorial de tres niveles 3 ² , y la concentración de α-terpineol (mg/L) obtenida por GC-MS luego de 48 horas de reacción	211
Tabla 33 Efectos estimados y análisis de varianza para la concentración de α-terpineol (mg/L)	212
Tabla 34 Metabolitos producidos en la biotransformación de (R)-(+)-limoneno por <i>P. digitatum</i> a diferentes velocidades de aireación y 200 rpm	214
Tabla 35 Efecto del cambio de volumen de medio MYB de pH 3.5 sobre la concentración de (R)-(+)-α-terpineol obtenida por biotransformación de (R)-(+)-limoneno por <i>P. digitatum</i> DSM 62840	214
Tabla 36 Actividad del extracto de biotransformación de (R)-(+)-limoneno por <i>P. digitatum</i> DSM 62840, del α-terpineol y de los medicamentos de referencia en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , promastigotes de <i>L. panamensis</i> y <i>L. chagasi</i> y en células Vero	222

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. PROCESO DE PATENTE	267
ANEXO 2. CUANTIFICACIÓN DEL CITRONELOL	269
ANEXO 3. RESULTADOS CINTROP	273
ANEXO 4. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL ENSAYO DE LOS ANTIOXIDANTES TOTALES SOBRE EL CATION-RADICAL ABTS ⁺	277
ANEXO 5. CUANTIFICACIÓN DEL LIMONENO	278
ANEXO 6. CUANTIFICACIÓN DEL ALCOHOL PERÍLICO	282
ANEXO 7. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL	286
ANEXO. 8.POSIBLES RUTAS DE FRAGMENTACIÓN DEL ALCOHOL PERÍLICO	287
ANEXO 9. CUANTIFICACIÓN DE α -terpineol	288
ANEXO 10. RUTAS DE FRAGMENTACIÓN DEL α -TERPINEOL	292
ANEXO 11. ESPECTRO BIDIMENSIONAL COSY DEL (R)-(+)- α -TERPINEOL	293
ANEXO 12. ESPECTRO BIDIMENSIONAL HSQC DE DEL (R)-(+)- α -TERPINEOL	294

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Aceites esenciales
AcOEt	Acetato de etilo
CNO	Compuestos naturales oxigenados
Cit-OH	Hidroxicitronelol
BIO-1	Biotransformación del (<i>R</i>)-(+)-limoneno por <i>P. digitatum</i> DSM 62840
BIO-2	Biotransformación del (<i>R</i>)-(+)-limoneno por <i>Aspergillus niger</i> DSM 821
BIO-3	Biotransformación del (<i>R</i>)-(+)-limoneno por bacterias
BIO-4	Biotransformación del citronelol por <i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840
DONT	Derivados oxigenados naturales de terpenos
DOL	Derivados oxigenados del limoneno
DOCit	Derivados oxigenados del citronelol
Lab-scale	Escala de laboratorio
PB	Procesos de biotransformación

POH	Alcohol perílico
PCHO	Peril aldehído
PCOOH	Ácido perílico
SS	Suspensión de esporas
MO	Monooxigenasas
MO-P450	Monooxigenasas de tipo citocromo P-450

RESUMEN

TÍTULO: OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS MONOTERPENOS LIMONENO Y CITRONELOL CON MICROORGANISMOS*

AUTOR: Prieto Suárez, Gloria Astrid**

PALABRAS CLAVE: Biotransformación, Citronelol, Limoneno, Bioconversión, Terpenos

DESCRIPCIÓN

Los terpenos son compuestos biosintetizados por las plantas como metabolitos secundarios. El limoneno y citronelol, son monoterpenos útiles para producir moléculas con similar estructura y de mayor valor, importantes para las industrias de alimentos, farmacéutica, perfumística y agroquímica. Algunos derivados oxigenados del limoneno (DOL) y del citronelol (DO-Cit) obtenidos por oxifuncionalización, resultan ser sustancias llamativas por su costo comercial y sus propiedades biológicas. Los procesos de biotransformación tienen bajo impacto ambiental, son reconocidos como metodología natural y se utilizan para obtener DOL y DO-Cit de connotación natural.

En éste trabajo se evaluó el efecto del biocatalizador, medio de bioconversión, pH, fase de crecimiento, concentración y efecto inductor de sustrato, sobre la biotransformación del limoneno y citronelol, para optimizar la producción de DOL y DO-Cit, a escala de laboratorio. Bajo las condiciones óptimas se escalaron los procesos a volúmenes 10 y 100 veces mayor. Los terpenoides mayoritarios se purificaron y caracterizaron espectralmente. A los extractos de biotransformación se les evaluó su actividad contra parásitos *T. cruzi*, *L. panamensis* y *L. chagasi*, su efecto citotóxico para las células de mamífero VERO y su actividad antioxidante.

Los resultados mostraron que cada transformación microbiana requiere de condiciones específicas para alcanzar la máxima bioconversión. La biotransformación del citronelol produjo selectivamente el hidroxicitronelol con *P. digitatum* DSM 62840 en una concentración de 1060 mg/L. Este biocatalizador biotransforma el (*R*)-(+)-limoneno con alta selectividad formando α -terpineol en una concentración de 1864 mg/L. *A. niger* DSM 821 da lugar a diferentes DOL donde el alcohol perílico es el producto principal (405 mg/L). La bacteria *R. erythropolis* DSM 43066 oxifuncionaliza el limoneno con baja selectividad y conversión y produce linalol, epóxido 1,2 limoneno y carvona. Los extractos de biotransformación del citronelol y limoneno por hongos, presentaron actividad antioxidante y no fueron tóxicos para las células VERO.

* Proyecto de Grado

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

ABSTRACT

TITLE: OPTIMIZATION OF BIOTRANSFORMATION PROCESS OF MONOTERPENES LIMONENE AND CITRONELLOL BY MICROORGANISM*

AUTHOR: Prieto Suárez, Gloria Astrid**

KEY WORDS: Biotransformation, Citronellol, Limonene, Bioconversion, Terpenes

DESCRIPTION

Terpenes are compounds biosynthesized by plants as secondary metabolites. The limonene and citronellol monoterpenes are useful for producing similar structure molecules higher value commercial important to the food, pharmaceutical and agrochemical perfumística industries. Some oxygenated derivatives of limonene (DOL) and citronellol (DO-Cit) obtained by oxifuncionalization, are substances interest for its cost and its biological properties. Biotransformation processes have low environmental impact, are recognized as natural methodology and it used for obtained DOL and DO-Cit of natural connotation.

In this work there was evaluated the effect of the biocatalyst, bioconversion medium, pH, growth phase, inducer and concentration of substrate on the biotransformation of limonene and citronellol, to optimize the production of DOL and DO-Cit at lab-scale. Under optimal conditions the processes were scaled to volumes 10 and 100 times greater. The major terpenoids were purified and characterized spectrally. A biotransformation extracts were evaluated for activity against parasites *T. Cruzy*, *L. panamensis* and *L. chagasi*, its cytotoxic effect to Vero mammalian cells and their antioxidant activity.

The results showed that each microbial transformation requires specific conditions for maximum bioconversion. Biotransformation of citronellol produced selectively hidroxicitronellol by *P. digitatum* DSM 62840 in a concentration of 1060 mg/L. This biocatalyst biotransformed the (*R*)-(+)-limonene with high selectivity to form α -terpineol at a concentration of 1864 mg/L. *A. niger* DSM 821 gives rise to different DOL where perillyl alcohol is the main product (405 mg/L). The bacterium *R. erythropolis* DSM 43066 oxifuncionalization limonene with low selectivity and conversion and produces linalool, limonene 1,2-epoxide and carvone. The extracts of limonene and citronellol biotransformation by fungi, showed antioxidant activity and were not toxic for VERO cells.

* Project Grade

** Universidad Industrial de Santander. Faculty of Science. School Chemistry Posgraduate. Directed by: Janeth Aidé Perea Villamil.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos veinte años, el interés por la producción biotecnológica de compuestos con la connotación de naturales ha aumentado notoriamente. Los procesos de biotransformación han sido utilizados con gran éxito en la obtención de nuevas moléculas y en la modificación estructural de sustratos orgánicos, con la finalidad de incrementar su valor comercial o científico. La biotransformación es una modificación química de sustratos exógenos naturales o sintéticos, mediante el empleo, como biocatalizadores, de células, organismos o enzimas puras o recombinadas, libres o inmovilizadas, para producir un (os) compuesto (s) con mayor actividad biológica y valor agregado (Hanson, 1998; Doble et al., 2004). En síntesis orgánica, la biotransformación es considerada una herramienta importante para producir químicos finos y precursores quirales que no han podido sintetizarse eficientemente por otros métodos (Pinheiro, 2007; Valadez, 2007; Held et al., 2000; Thomas et al., 2002; Rozzell, 1999). Además, la biotransformación es un instrumento eficaz para ejecutar gran número de reacciones regio-, quimio-diastereo-, y enantioselectivas (De Carvalho, 2011) difíciles de llevar a cabo por procedimientos sintéticos clásicos como la producción de moléculas complejas de interés farmacéutico y perfumístico (Rozzell, 1997; Held et al., 2000; Thomas et al., 2002; Schulze y Wubbolts, 1999; Pollard y Woodley, 2006).

La mayoría de los productos farmacéuticos son racémicos, y, por lo general, solo uno de los enantiómeros posee la actividad biológica deseada; el otro puede ser inactivo o, incluso, tener actividad nociva (Food and Drug Administration, 1992). En perfumería, la quiralidad es importante porque la percepción del sabor y del aroma depende de la configuración del estereo-isómero presente. Isómeros del mismo compuesto pueden tener diferentes propiedades organolépticas, por ejemplo, el mentol tiene ocho posibles isómeros y únicamente el poder odorante natural lo posee la configuración absoluta del (-)-(1R, 3R, 4S)-mentol (Serra et al., 2005).

Las condiciones suaves de pH y temperatura en las que se llevan a cabo las biotransformaciones y la alta actividad catalítica de los sistemas enzimáticos empleados, hacen más llamativos estos procesos que su contraparte: la catálisis química. En algunos casos, como la hidroxilación selectiva de átomos de carbono no activados, la biotransformación puede ser la única solución conocida para la producción de ciertos compuestos (De Carvalho, 2011). Por otra parte, el uso de células completas, en contraste con la síntesis química convencional, permite llevar a cabo la transformación en un solo paso (Van der Werf et al., 1997); no obstante, en estas reacciones influyen más variables por controlar, biocatalizador, medio de biotransformación, pH del medio, concentración de sustrato, tiempo, temperatura de reacción y velocidad de agitación (de Carvalho y da Fonseca, 2006; Tan y Day, 1998; Demyttenaere et al., 2004).

Además, los procesos de biotransformación cumplen con las exigencias medioambientales, no involucran intermediarios ni solventes tóxicos o carcinogénicos y generan más eficiente y naturalmente nuevos productos o productos conocidos. Por lo anterior, los productos obtenidos por esta vía pueden ser etiquetados como “sustancias naturales” (FDA; Rozenbaun et al., 2006; Serra et al., 2005). En países como Alemania, desde 1990, el 70% de la producción de compuestos aromatizantes y saborizantes naturales “bioflavors” son producidos vía biotecnológica (Demyttenaere y De Kimpe, 2001).

Dentro de las biotransformaciones, las biooxidaciones selectivas de moléculas orgánicas como alcanos, alquenos y terpenos, constituyen uno de los procesos tecnológicos industriales más importantes. Los productos obtenidos, llamados compuestos naturales oxigenados (CNO), tienen un gran valor agregado, por la preferencia de los consumidores que actualmente buscan productos naturales con actividad biológica. Algunos CNO exhiben excelentes propiedades como agentes aromatizantes, saborizantes, conservantes o como productos farmacéuticos. Estos compuestos pueden extraerse de material vegetal, sin embargo, en la mayoría de

los casos no están disponibles en cantidades industriales haciéndose necesario su síntesis a partir de precursores con mayor disponibilidad y menor valor comercial (Serra et al., 2005; Velazco et al., 2010).

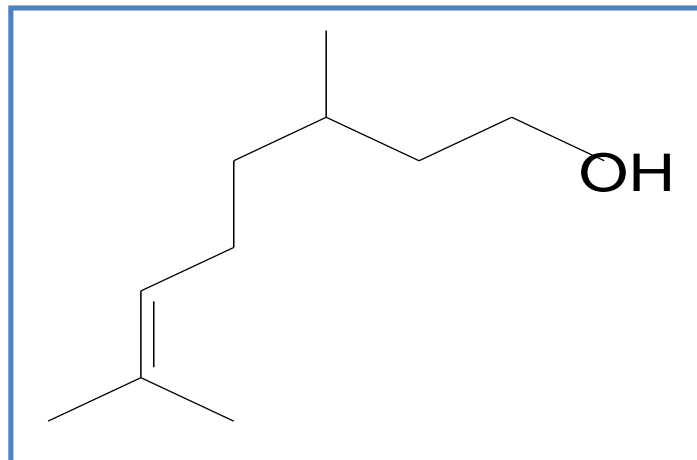
Actualmente, los terpenos son considerados materias primas importantes para obtener los CNO, por ser sustratos naturales susceptibles a transformaciones biocatalíticas. Los terpenos constituyen el grupo más grande de productos naturales con cerca de 40 000 estructuras conocidas, de las cuales, 400 corresponden a las estructuras más simples, los monoterpenos, formados por dos unidades isoprenicas (2-metil-1,3-butadieno) enlazadas en forma lineal, cíclica o mezcla de las dos (De Carvalho y Da Fonseca, 2006; Van der Werf et al., 1999). La abundancia en especies vegetales del monoterpeno limoneno, lo convierte en un candidato ideal para generar oxi-derivados.

Otros químicos finos objeto de estudio para biotransformar son los compuestos aromáticos tipo cumarinas, alcaloides oxigenados, esteroides hidroxilados y antibióticos β -lactámicos, entre otros (Giri, 2001, Thomas et al., 2002; Gavrilescu y Chisti, 2005; Vanek et al., 1999; Zhang et al., 2004; Borges da Silva et al., 2006; Tomotani y Vítolo, 2006). A futuro (año 2050) se estima que los procesos de biotransformación podrán abarcar hasta el 30% de la síntesis química (De Carvalho, 2011; Gavrilescu y Chisti, 2005) y solucionar algunos de los inconvenientes que presentan los catalizadores químicos, que, por lo general, son de naturaleza inorgánica y provienen de recursos no renovables.

1.1 SUSTRATOS MONOTERPÉNICOS: LIMONENO Y CITRONELOL

Uno de los monoterpenos monocíclicos más abundantes en la naturaleza es el limoneno (4-isopropenil 1-metil ciclohexeno), que es biosintetizado por más de 300 plantas diferentes, y existe en dos formas isoméricas (**Figura 1**): el (S)-(-)-limoneno, que se encuentra en la *Mentha spicata*, y el (R)-(+)-limoneno, que se

Figura 2 Estructura del citronelol



El citronelol se puede obtener a partir de diferentes sustratos y procesos: por biocatálisis del citral (mezcla de geraniol-nerol) con células libres e inmovilizadas de *Rhodotorula minuta* (Velankar et al., 2003), o por catálisis química mediante hidrogenación del citronelal en fase líquida (Arvela et al., 2003), usando sistemas monometálicos de Ir/SiO₂ e Ir/TiO₂ (Sanabria, 2007), Ir-Fe/SiO₂ (Rojas, 2007) o en presencia de estabilizantes poliméricos de metales nobles coloidales.

El consumo mundial del citronelol es del orden de 1000 toneladas por año (Lapczynski et al., 2008). Comercialmente, este alcohol monoterpenico es muy importante, por su aroma característico a rosa, y se utiliza en cosméticos, condimentos y fragancias en bajas concentraciones. En algunos pesticidas, el citronelol es el ingrediente activo y se metaboliza fácilmente en las plantas a sustancias inofensivas (Demyttenaere et al., 2004).

Tradicionalmente, los monoterpenos naturales se aíslan de los AE, que consisten en mezclas de compuestos volátiles obtenidos por procesos físicos como la extracción y la destilación a partir de material vegetal. Una ventaja de los procesos biotecnológicos para obtener flavors naturales es que están exentos de algunas restricciones que presentan las fuentes naturales como son la variabilidad en la

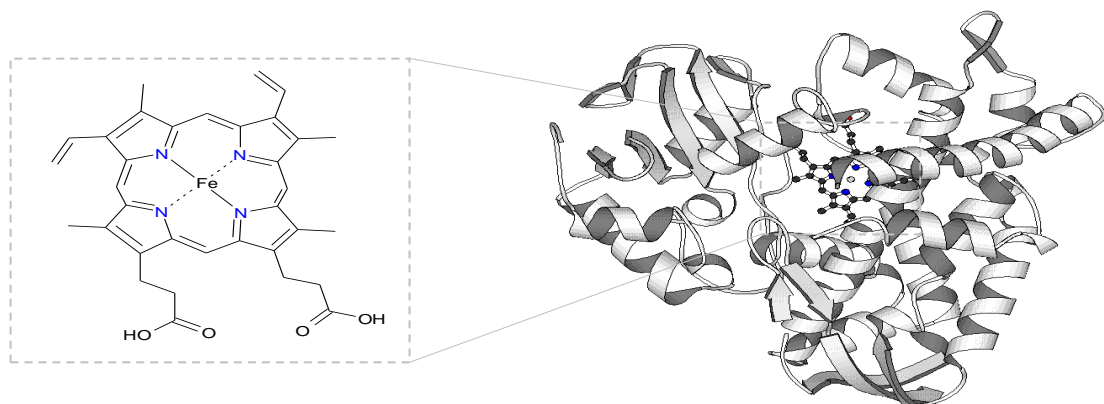
composición y el rendimiento en los AE de acuerdo con las fuentes geográficas, el clima y las enfermedades en las plantas (Velazco et al., 2010; Van der Werf et al., 1997). Algunos monoterpenos, como el (\pm)- α -pineno, (-)- β -pineno, (+)-limoneno, citral y (\pm)-citronelal, pueden aislarse a gran escala de AE y usarse como sustratos para la bioproducción de compuestos de mayor valor (Van der Werf et al., 1997).

1.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE MONOTERPENOS

La biotransformación de monoterpenos es de gran importancia comercial para las industrias alimenticia, farmacéutica y perfumística. En la industria de sabores y fragancias, por ejemplo, existe un marcado interés por identificar y describir aromatizantes que exhiban nuevas características organolépticas.

Específicamente, la oxifuncionalización de terpenos mediante procesos de biotransformación utiliza preferencialmente células completas “whole cell” de bacterias (41%), hongos (33%) y plantas (11%), y en menor grado, enzimas solubles o inmovilizadas (7%), células completas de cianobacterias (4%) y microalgas (4%) (De Carvalho y Da Fonseca, 2006). En la mayoría de los casos, los sistemas enzimáticos involucrados son oxigenasas enlazadas a la membrana celular pertenecientes a las hemoproteínas del complejo citocromo P450 (**Figura 3**) dependientes de sustratos y cofactores, NAD(P)H, NAD(P)⁺, FAD⁺, FADH₂ y ATP (Holland, 2000; Wust, 2001).

Figura 3 Estructura del grupo hemo y su ubicación en una oxigenasa P450. Estructura de cintas y lazos de la oxigenasa P450-Terp (CYP108) de una forma recombinante de *Pseudomonas* sp., expresada en *E. coli* que cataliza la oxidación de α -terpineol.



Lo anterior hace que los procesos de biotransformación de terpenos in vitro sean difíciles de realizar, por ello se prefiere el uso de células completas de microorganismos (De Carvalho y Da Fonseca, 2006; Duetz et al., 2003), no obstante, la aplicación de células completas puede disminuir la selectividad de la biotransformación de terpenos por la existencia de otras enzimas.

Para contrarrestar la alteración de la selectividad han sido utilizadas algunas estrategias como el cambio en la composición o del carácter hidrófobo o lipofílico del medio de biotransformación o la adición de compuestos que inhiben las enzimas no deseadas y la inmovilización de las células (Giri, 2001).

Los terpenos, generalmente, tienen alto grado de hidrofobicidad con valores entre 1 y 5, por lo que resultan tóxicos para las células, porque alteran la fluidez y permeabilidad de la membrana; por ello algunos procesos de biotransformación de terpenos han sido llevados a cabo en diferentes sistemas orgánicos (DMSO, etanol, metanol, acetona, dioctilftalato, dimetil ftalato, dietil ftalato y ésteres grasos como etil decanoato, entre otros) (De Carvalho, 2011; Giri, 2001; Berger, 1999;

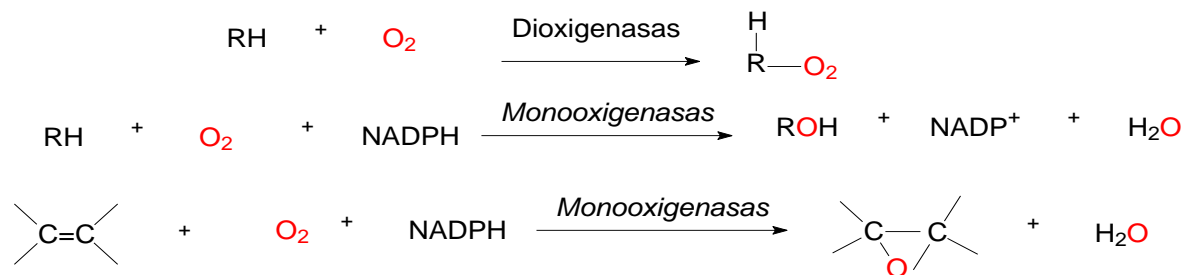
Ohlof et al., 1998). No obstante, la respuesta a un solvente dado, bajo iguales condiciones fisiológicas por diferentes tipos de células, varía considerablemente.

La inmovilización de células facilita la interacción enzima-sustrato, al mantener la unión membrana-complejo enzimático MO (monooxigenasa)-P450-Reductasa NADPH-P450. Dentro de los soportes empleados para la inmovilización se encuentran ciclodextrinas, alginato de calcio y el surfactante no iónico Tween (Masaphy et al., 1996; Scurig, 2001; Giri, 2001; Tan y Day, 1998).

A futuro se espera conseguir procesos de biotransformación más selectivos, eficientes y productivos aplicando las técnicas modernas de manipulación genética a la MO-P450 para elucidar y comprender sus funciones y propiedades (Carballeira et al., 2009; Julsing et al, 2008).

1.2.1 Modo de acción de las oxigenasas. Las oxigenasas comprenden varias familias de proteínas que catalizan la inserción de uno o dos átomos de oxígeno en diversos sustratos con enlaces C-H no activados (monooxigenasas MO y dioxigenasas, respectivamente) (**Figura 4**). El aire sirve como fuente de oxígeno molecular, y los equivalentes de reducción son obtenidos del NADH o NADPH gracias a proteínas de transferencia de electrones (Savithiry et al, 2004).

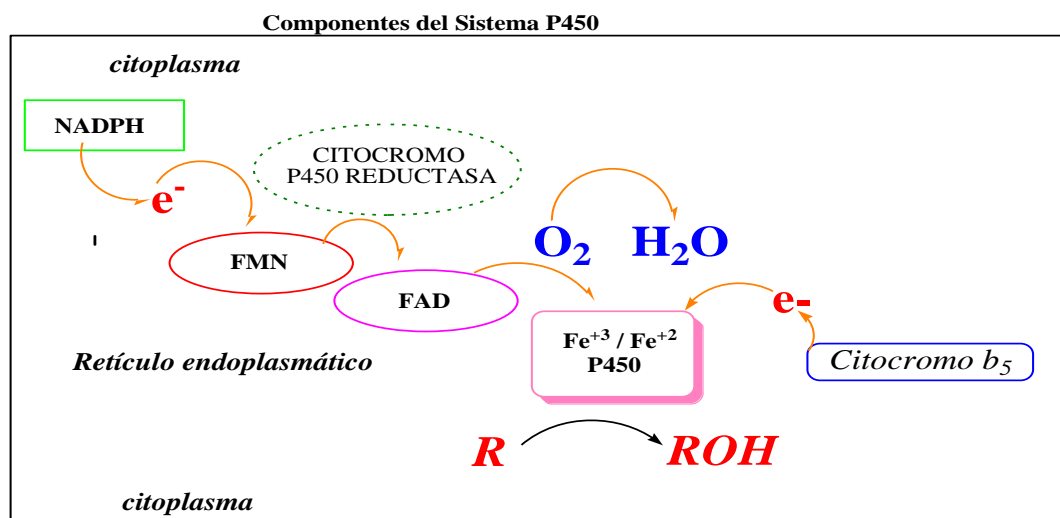
Figura 4 Reacciones generales de oxidación catalizadas por oxigenasas



El átomo de oxígeno remanente, en el caso de las MO naturales, por lo general es reducido a agua por los electrones derivados de los cofactores piridínicos NADH o NADPH, y transferidos uno a uno, vía FAD- y NAD-flavoproteínas (citocromo P450-reductasas) (**Figura 5**). La MO-citocromo P450 que actúa sobre el naftaleno, resulta ser la excepción, no requiere de equivalentes de reducción porque usa el peróxido de hidrógeno como donador de oxígeno (Held et al., 2000). En el caso de las dioxigenasas, la reducción subsecuente del peróxido formado al correspondiente alcohol o diol también requiere equivalentes de reducción derivados del NAD(P)H (Held et al., 2000).

Las oxigenasas tipo citocromo P450 y que participan en los procesos de oxidación de sustratos terpénicos, se encuentran unidas a la superficie citoplasmática del retículo endoplasmático mediante su extremo N-terminal y junto con las mitocondrias, lisosomas, citoplasma y microsomas son los órganos encargados de oxidar los sustratos hidrófobos para generar productos más solubles (Urlacher y Schmid, 2006; Werck-Reichhart, 2000).

Figura 5 Transferencia de electrones por el sistema citocromo P450

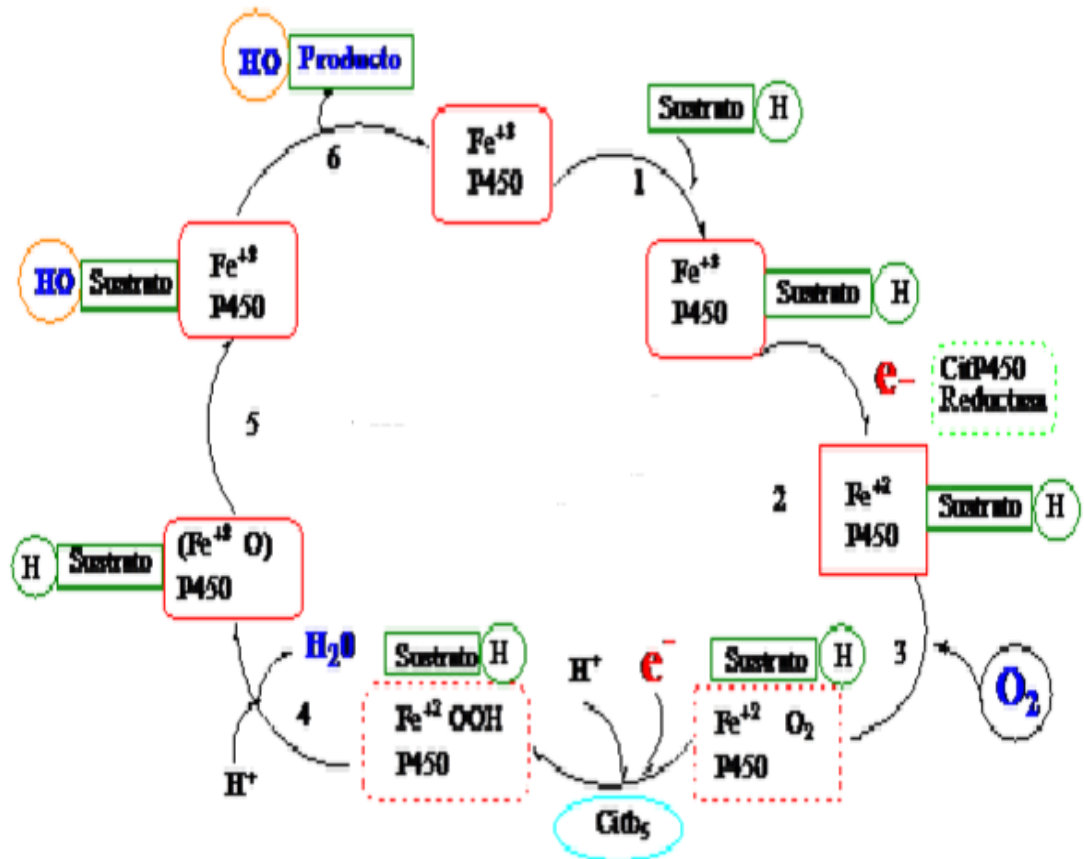


En general, se ha aceptado que el ciclo catalítico de estas oxigenasas (**Figura 6**), inicia con la unión al sustrato (1), seguido por la introducción del primer electrón del NAD(P)H a través de una cadena de transferencia de electrones (2); posteriormente se enlaza el oxígeno molecular (3), y el producto formado es capaz de aceptar el segundo electrón para producir un anión peroxi-férrico que al protonarse forma el complejo hidroperoxiférrico (4); el posterior rompimiento heterolítico da lugar a la especie ferrilo, conocida como Compuesto I (5), que ataca al sustrato y forma el producto hidroxilado (6), que al disociarse regenera la enzima y da lugar a un nuevo ciclo catalítico.

Corrientemente, el aceptor de oxígeno molecular es un compuesto hidrofóbico deficiente en oxígeno que al oxigenarse mediante reacciones de hidroxilación y de epoxidación forma diversos derivados más solubles y biológicamente activos como epóxidos, alcoholes y dioles, aldehídos, ácidos carboxílicos y ésteres (Hayaishi, 2004).

1.2.2 Oxifuncionalización de terpenos. La **hidroxilación**, conversión de un enlace C-H en un enlace C-OH, es una reacción enzimática fundamental en el metabolismo oxidativo de muchos compuestos orgánicos; durante años ha sido usada en la producción industrial de fragancias por hidroxilación alílica de terpenos (Farooq, 2002); de compuestos aromáticos, químicos finos e hidroxiesteroides importantes para la industria farmacológica (Aleu, 2001); de 14- β -hidroxi derivados de alcaloides morfínicos sintéticos útiles para obtener nuevos opiáceos (Giri, 2001); de ácidos grasos mirístico y palmítico hidroxilados en las posiciones ω -1, ω -2 y ω -3 (Yoshiro, 1975) y en procesos de biorremediación.

Figura 6 Esquema general del mecanismo de catálisis del citocromo P450 (Tomado de Ortiz de Montellano, 2005)



A pesar de su universalidad, la hidroxilación es una de las reacciones menos comprendidas y de difícil accesibilidad debido a que la mayoría de las hidroxilasas son complejos multi-proteínicos enlazados a la membrana celular (Holland, 2000; Wust, 2001).

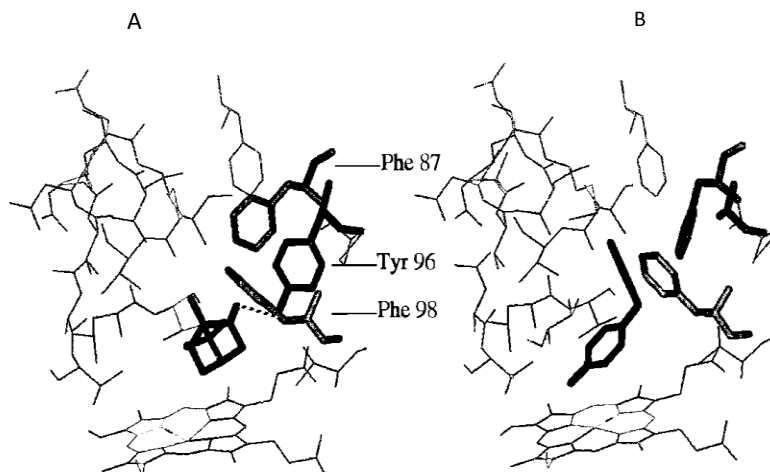
No obstante, se han realizado algunos estudios para comprender la especificidad sustrática y la selectividad de las reacciones de hidroxilación de terpenos cíclicos usando células completas de bacterias *P. putida*, *B. bassiana* y *R. rhodochrous*. Los resultados muestran que los tres biocatalizadores son regio-selectivos y que la especificidad sustrática es dependiente de cada especie. Además, la

selectividad de la hidroxilación se ve afectada por la composición en aminoácidos del sitio activo de la MO-P450 de *P. putida* (P450_{cam}) (**Figura 7**). La P450_{cam} nativa contiene tirosina (Tir 96) y establece un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo del alcanfor mientras que con la enzima mutada el puente de hidrógeno ocurre con sustratos sin grupo carbonilo (Swart et al., 2005).

En el caso de las **reacciones de oxidación**, la acción de las oxigenasas y las peroxidasas sobre los dobles enlaces C-C conduce a la formación de epóxidos e hidroperóxidos, respectivamente. A partir de los epóxidos se pueden obtener dioles vecinales, compuestos que actúan como bloques estructurales para la formación de sustancias complejas importantes en la industria farmacéutica y en síntesis orgánica. Sin embargo, la presencia de dobles enlaces isoprénicos en los terpenos hace a estos compuestos fácilmente oxidables con el oxígeno atmosférico ocurriendo una auto-oxidación. Por lo anterior, es necesario aclarar la procedencia de los derivados oxigenados formados (Van der Werf, 2000; Heipieper et al., 1994).

1.2.3 Biocatalizadores potencialmente útiles en la oxifuncionalización de terpenos. Para que un microorganismo sea viable como biocatalizador, idealmente debe cumplir un conjunto de condiciones: ser de fácil adquisición, inocuo, ambientalmente abundante, susceptible a modificación genética, resistente ante condiciones adversas y poseer alta selectividad hacia los sustratos de interés; algunas bacterias y hongos reúnen las características mencionadas, como se muestra a continuación.

Figura 7. Residuos que conforman el sitio activo de la monooxigenasa P450_{cam} a) Enzima nativa con alcanfor enlazado al sitio activo, b) enzima mutante Y96A con 4-hidroxidifenil metano enlazado al sitio activo, (---) indica el enlace de hidrógeno alcanfor-tirosina (Tomado de Swart et al., 2005).

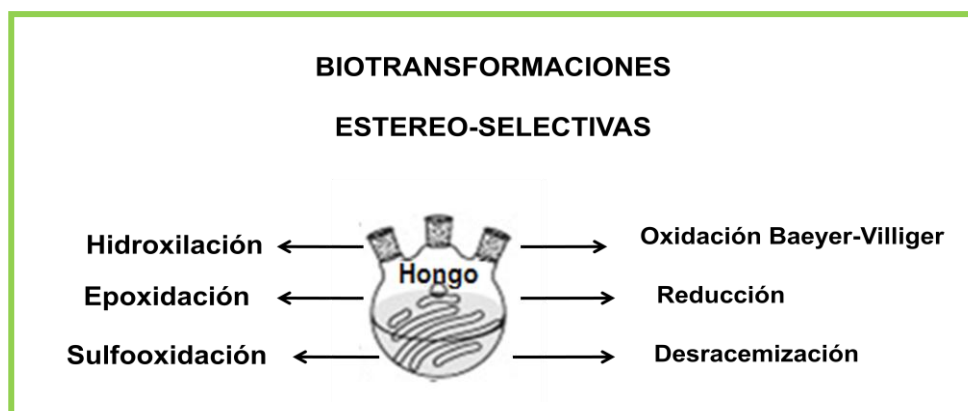


- **Bacterias.** Entre las bacterias, las especies de *Rhodococcus* y *Pseudomonas* parecen ser las más promisorias como biocatalizadores para los procesos de biotransformación de terpenos por la presencia de alrededor de 400 enzimas, mono y dioxigenasas y enzimas catabólicas (Van der Geize y Dijkhuizen, 2004; Larkin et al., 2005). Estos microorganismos tienen la capacidad de acumular altos niveles de metales pesados, tolerar sustratos y solventes miscibles y no miscibles en agua (etanol, butanol, dimetilformamida hasta 50%, n-dodecano y tolueno hasta 5% v/v), y pueden adherirse a gotas de aceite debido a la hidrofobicidad de su superficie celular generada por los ácidos micólicos presentes. Particularmente, la bacteria aeróbica *Rhodococcus erythropolis* DCL14, aprovecha como fuente de carbono y energía para su crecimiento, los terpenos: (4*R*)-(+ y (4*S*)-(-) limoneno, (4*R*) y (4*S*)-epóxido 1,2 limoneno, (4*R*) y (4*S*)-limoneno 1,2 diol, (4*R*) y (4*S*)-carveol, (4*R*), (4*S*)-carvona, (4*R*) y (4*S*)-dihidrocarveol, (4*R*)-dihidrocarvona, (-)-mentona, (-)-mentol, linalol y geraniol.

Otros géneros de bacterias útiles en la transformación de terpenos son *Mycobacterium* sp., *Bacillus* sp y la *Pseudomona* no patógena y relativamente segura *P. cepacia* o *P. putida* (De Bont, 1998; Walsh et al., 2001).

- **Hongos.** Los hongos pueden considerarse una fuente promisoría de nuevos biocatalizadores principalmente para reacciones quirales; además estos microorganismos tienen la capacidad de producir enzimas P450 activas en un amplio espectro de sustratos y realizan transformaciones quirales en terpenos, alcaloides, antibióticos, ácidos grasos y aminoácidos, generando productos biológicamente activos o con bases estructurales que sugieren bioactividad (Demyttenaere et al., 2004). Algunos procesos químico, regio y estereo-selectivos son mediados por hongos: hidroxilaciones, epoxidaciones, oxidaciones Baeyer-Villiger, sulfooxidaciones, desracemizaciones y reducciones de cetonas enantio y esteroselctivas; todas estas reacciones han sido publicadas durante el 2000-2007 (Bastos et al., 2009). En la **Figura 8** se ilustra lo relacionado.

Figura 8 Reacciones estereo-selectivas catalizadas por hongos (Tomada de Borges et al., 2009)



Los hongos con más aplicaciones reportadas en la transformación de terpenos hasta el momento pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Botrytis*; estos tienen habilidad para bioconvertir sustratos terpénicos como limoneno, α -

pineno, linalol, geraniol, nerol, citronelol, citral (mezcla geraniol-nerol) y el diterpeno kaurónico (Demyttenaere et al., 1996, 1998, 2000, 2001 y 2004; De Pooter, 1996; Torrenegra, 2002). Otros hongos con capacidad para biotransformar terpenos son *Candida*, *Cunninghamella*, *Beauveria*, *Pleurotus*, *Hormonema* y *Cladosporium* (De Carvalho y Da Fonseca, 2006).

En cuanto a los hongos filamentosos *Penicillium* y *Aspergillus*, presentan superioridad por su potencial de adaptación tan elevado; ambos son del orden de Eurotiales, familia Trichocomaceae, y tienen características y morfología similares. Entre los géneros útiles en la biotransformación de terpenos se encuentran *A. niger*, *A. cellulosa*, *A. fumigatus*, *A. carbonarius*, *P. digitatum*, *P. roqueforti*, *P. italicum*, *Penicillium sp* y *Penicillium spg 28* (Demyttenaere y De Pooter, 1996; Demyttenaere y Willemsen, 1998; Demyttenaere y De Kimpe, 2001; Demyttenaere et al., 2000, 2001, 2004; Castellanos et al., 2007). El género *Botrytis* específicamente *B. cinérea*, se ha utilizado en la biotransformación de diferentes monoterpenos y otros sustratos (Aleu y Collado, 2001; Farooq et al., 2002).

1.2.4 Factores que inciden en el desarrollo de biotransformaciones competitivas de monoterpenos. Held y col. (2000) y Van der Werf y col. (1997) plantean que para lograr biotransformaciones competitivas de monoterpenos catalizadas por oxigenasas, se deben tener en cuenta varios factores:

- Requerimiento de cofactores para la incorporación de oxígeno. Los procesos a escala industrial usan como biocatalizadores células completas que producen oxigenasas y oxidorreductasas, las cuales funcionan como biorreactores miniaturizados que convierten el sustrato a productos que difunden al exterior celular y reciclan los cofactores (Held et al., 2000). Sin embargo, el reciclaje de NAD(P)H in vivo sólo se lleva a cabo con células metabólicamente activas capaces de generar los equivalentes de reducción sin detener la reacción de oxigenación deseada. Lo anterior implica que las células deben mantenerse en

una etapa que permita una alta velocidad de regeneración de cofactores. Un requerimiento mínimo para el mantenimiento de este estado es que la membrana celular permanezca intacta durante el proceso biocatalítico; cuando la permeabilidad de la membrana aumenta, los metabolitos de bajo peso molecular y los cofactores se pierden, dando como resultado el deterioro o el rompimiento del metabolismo intracelular. Así, para el desarrollo de procesos biocatalíticos con células completas es importante considerar los efectos del medio, las condiciones del proceso, el efecto de sustratos y los productos sobre la fisiología celular, la actividad enzimática y la regeneración de cofactores.

La reacción de oxigenación in vitro es factible, pero relativamente costosa, porque requiere en primer lugar, de la regeneración de cofactores, involucrando para ello el acople de una segunda reacción enzimática; la glucosa deshidrogenasa y la formato deshidrogenasa son enzimas comúnmente utilizadas porque producen NAD(P)H a partir de NAD(P) y forman productos pequeños, ácido glucónico y dióxido de carbono, respectivamente. En segundo lugar, las oxigenasas son complejos multi-proteínicos ubicados en la membrana celular, de manera que la purificación y reconstitución de tales sistemas in vitro es una tarea desafiante.

- La velocidad de transferencia de oxígeno. La velocidad a la que el oxígeno puede transferirse a las células completas en tanques agitados influye en la velocidad de la reacción biocatalítica. La máxima velocidad de transferencia de oxígeno a escala industrial en reactores de tanque agitado (de 100 m³) es del orden de 100 mmolL⁻¹h⁻¹. La manera como el oxígeno es usado depende del sistema biocatalítico. Para biocatálisis in vitro es teóricamente posible canalizar todo el oxígeno en la reacción, y la productividad volumétrica podría aumentar a 1600 U/L (Held et al., 2000). Para reacciones biocatalíticas con células completas, in vivo, el oxígeno es necesario para el crecimiento y mantenimiento celular, así como para la reacción de oxigenación. En la práctica, más de la mitad del oxígeno alimentado en el reactor se usa para el metabolismo celular.

- Concentraciones bajas de sustratos y productos. Algunos microorganismos, usualmente, crecen a bajas concentraciones de sustratos y pueden sobrevivir en condiciones desfavorables; sin embargo, no toleran altas concentraciones de sustratos no-naturales; de hecho, algunos compuestos tienen propiedades bactericidas y fungicidas inactivando las células a concentraciones entre 0.2 a 0.5 g/L. Para obtener altos rendimientos en el proceso, las concentraciones de sustratos o productos no deben ser tóxicas. En el caso de la biocatálisis de compuestos hidrofóbicos, la adición de un solvente orgánico inmiscible en agua a la mezcla de reacción alivia los efectos tóxicos. El solvente actúa como un reservorio que separa el sustrato y el producto de la fase acuosa, y mantiene la concentración efectiva de estos compuestos en niveles adecuados para el biocatalizador. Los productos se concentran en la fase orgánica y pueden separarse fácilmente de la suspensión biocatalizadora. Como resultado, las concentraciones de productos de compuestos bactericidas como 1-octanol o epóxido de-(S)-estireno pueden incrementarse por lo menos en un orden de magnitud de ~20 g/L (Held et al., 2000).

- Inestabilidad química. Los monoterpenos son compuestos inestables; llevan a cabo reacciones espontáneas de autooxidación química, isomerización cis-trans, racemización, hidratación, ciclización y polimerización, que dan lugar a una mezcla de productos, reducción del rendimiento y a la necesidad de usar blancos para diferenciar entre las reacciones químicas y las biológicas. Diversos factores afectan la estabilidad química de estos compuestos:
 - La concentración de iones metálicos especialmente el hierro y el cobre, y la exposición a la luz UV estimulan la autooxidación.

 - Las propiedades intrínsecas de la molécula; por ejemplo, el α -pineno sufre reacciones de catálisis ácida 16 veces más rápido que el limoneno.

- El pH del medio: valores de pH mayores que 8 y menores que 6 incrementan las velocidades de las reacciones químicas.
- La presión parcial de oxígeno y la temperatura. La mayoría de los problemas de inestabilidad de estos sustratos pueden minimizarse haciendo crecer las células a temperatura moderada (30 °C), usando un pH neutro y un medio mineral que contenga bajas concentraciones de sales (Van der Werf et al., 1997).
- Solubilidad. Los hidrocarburos monoterpénicos son escasamente solubles en agua y dependiendo de la afinidad del sistema biológico hacia el sustrato (K_M), la velocidad de la reacción podría verse limitada por la biodisponibilidad de este. Una alta densidad celular disminuye la solubilidad y afecta la velocidad de biotransformación; idealmente, esto no ocurre cuando la densidad celular es baja.
- Volatilidad. La propiedad que hacen llamativos a los monoterpenos es su volatilidad, no obstante, también causa serios problemas durante su biotransformación a gran escala. La mayoría de reacciones de biotransformación comercialmente interesantes dependen de la concentración de oxígeno. Al suministrar aireación y agitación vigorosa al sistema puede ocasionar pérdidas de sustrato y producto. Afortunadamente, los terpenoides producidos son generalmente menos volátiles que los hidrocarburos terpénicos, por lo que se esperan pérdidas de producto menores comparadas con las del sustrato (Van der Werf et al., 1997).
- Toxicidad para las células completas de microorganismos. Se ha observado que la adición de terpenos a los cultivos celulares inhibe el crecimiento e incluso puede ocasionar lisis celular; aunque la mayoría de monoterpenos son lipofílicos, los efectos inhibitorios dependen de la concentración; en general, concentraciones

mayores al 0.05 % v/v inhiben totalmente el crecimiento (Van der Werf et al., 1997).

La toxicidad de los monoterpenos y de los solventes orgánicos altera la integridad y permeabilidad de la membrana celular. La hidrofobicidad de los solventes orgánicos, expresada como la partición del solvente entre octanol y agua (valor de $\log P_{o/w}$), es un buen indicador de su toxicidad. Sustancias con un valor de $\log P$ en el rango 1- 5 son generalmente tóxicas para las células completas. Los monoterpenos tienen valores de $\log P$ en el rango de 2.5 a 4.5. Los terpenoides son incluso más tóxicos que los hidrocarburos terpénicos de partida, así que durante la biotransformación se acentúan los problemas de toxicidad. La exposición a la luz UV, en el caso específico del monoterpeno citral la toxicidad, aumenta (Van der Werf et al., 1997). Para reducir los efectos tóxicos de los sustratos terpénicos, estos se han agregado al cultivo después de que se ha obtenido el máximo crecimiento celular, o mediante la adición secuencial de cantidades no tóxicas del terpeno, o suministrando el sustrato en fase gaseosa o disuelto en un solvente no tóxico para las células (Van der Werf et al., 1997).

- Mineralización del sustrato. Algunos microorganismos son capaces de mineralizar el sustrato impidiendo la acumulación de productos; esto puede resolverse agregando inhibidores de enzimas no deseadas en el medio de crecimiento, variando las condiciones de crecimiento o por mutación de la cepa. Sin embargo, como se ha encontrado que varias cepas tienen múltiples trayectorias para metabolizar los terpenos, estos métodos, en general, no han tenido mucho éxito (Van der Werf et al., 1997).

- Múltiples trayectorias metabólicas. Las biotransformaciones microbianas de terpenos generalmente conducen a mezclas de metabolitos, y la acumulación de un único producto de reacción es escasa. Por ejemplo, en la transformación de (+)-limoneno con una cepa de *Pseudomonas* sp, se obtuvieron 12 productos

debido a que este microorganismo tiene tres trayectorias diferentes para transformar el compuesto (Van der Werf et al., 1997). La purificación del producto de interés a partir de la mezcla compleja de compuestos se dificulta; sin embargo, una excepción resulta ser la transformación de (+)-limoneno por células de *Corynespora cassiicola*, que formó como único compuesto al (1S, 2S, 4R)-p-menten-8-eno-1,2-diol. (Van der Werf et al., 1997).

- Bajas concentraciones y rendimientos de productos. Algunos monoterpenoides producidos durante estudios de biotransformación se han obtenido en cantidades traza, algunas veces incluso después de extensivas investigaciones de optimización. Los rendimientos de algunas biotransformaciones han sido muy bajos, incluso menores al 5%. Sin embargo, se ha reportado la producción de 900 g de (1S, 2S, 4R)-p-menten-8-eno-1,2-diol a partir de 1300 g de (*R*)-(+)-limoneno en un fermentador de 70 L en 4 días. También se ha reportado la producción de (+)- α -terpineol a partir de (*R*)-(+)-limoneno por células de *Penicillium digitatum* en concentraciones superiores a los 1.4 g/L (Peschek et al., 2008).

- Actividad enzimática no detectable en los extractos celulares. La determinación de los mecanismos de biotransformación de monoterpenos y el uso de enzimas aisladas para transformarlos, se han limitado sustancialmente por el hecho de que después de romper las células las actividades enzimáticas se pierden parcial o totalmente (Van der Werf et al., 1997).

1.3 DERIVADOS OXIGENADOS DE LOS MONOTERPENOS LIMONENO Y CITRONELOL

Los DO monoterpenicos o terpenoides, se encuentran en las plantas en bajas concentraciones; su obtención a partir de fuentes vegetales requiere de grandes cantidades de materia prima a procesar, la cuál a su vez esta condicionada por la

variación estacional y de composición. Estas limitaciones conllevan a buscar otras alternativas de producción a partir de fuentes naturales renovables (Schader, 2007; Schewe et al, 2011).

En los últimos años se ha impulsado el uso de células completas de hongos y bacterias como biocatalizadores para la producción de derivados oxigenados del limoneno (DOL) y del citronelol (DOCit) (De Carvalho y Da Fonseca, 2006), debido a que las fuertes condiciones de reacción, las altas temperaturas y las presiones diferentes a la atmosférica, así como el uso de solventes clorados, poco amigables con el ambiente, han puesto en desventaja la catálisis química frente a los procesos biocatalíticos (Rafelt y Clark, 2000).

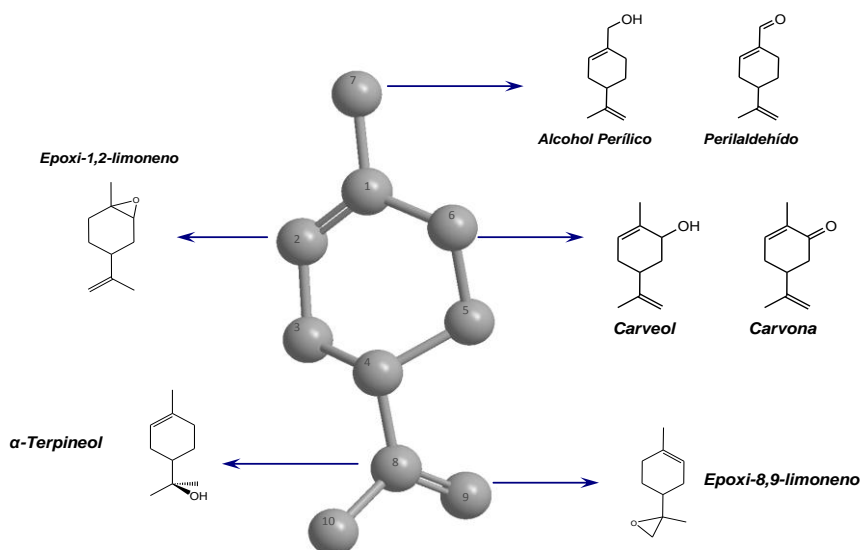
1.3.1 Derivados oxigenados del limoneno. La presencia en la molécula del limoneno de dos dobles enlaces, dos carbonos alílicos y dos carbonos metílicos, además de su base cíclica, le confieren una alta reactividad originando 11 tipos de sustancias oxigenadas (DOL), productos resultantes de la oxifuncionalización del limoneno por reacciones de oxidación/hidroxilación (**Figura 9**). Los dobles enlaces ubicados entre los carbonos C₁-C₂ y C₈-C₉, pueden oxidarse formando los respectivos epóxidos. En los grupos metilenos alílicos posicionados en C₃ y C₆, por razones de estabilidad y reactividad química, resulta más probable la hidroxilación formando isopiperitenol (C₃) y los isómeros cis/trans carveol (C₆). La posterior oxidación de estos alcoholes secundarios da lugar a isopiperitenona y carvona, respectivamente. Los grupos alílicos ubicados sobre los carbonos C₇ y C₁₀ pueden de igual manera hidroxilarse produciendo alcohol perílico (POH) (C₇) y mentol (C₁₀). La oxidación inicial de POH forma perilaldehído (PCHO) y posteriormente ácido perílico (PCOOH) (Duetz et al., 2003).

Los DOL más importantes por su actividad biológica y fitosanitaria y por su aplicación en la industria de fragancias y perfumes, son α -terpineol, alcohol perílico, carveol, carvona y mentol, cuyos precios aproximados son hasta 100

veces superiores al precio del limoneno (Duetz et al., 2003; Da Silva et al., 2003). La carvona supera de 15 a 30 veces el costo del limoneno (US \$ 30-60 /kg); el alcohol perílico, más de 100 veces (US \$-300/kg); mientras que la mezcla pura 1:1 de cis/trans 1,2 epóxidos, tiene un valor de US \$-213/5g. Por lo anterior, la síntesis de derivados oxigenados a partir del (*R*)-(+)-limoneno a escala industrial se considera importante para generar productos de mayor valor agregado (Duetz et al., 2003).

En la **Figura 9**, se resumen los diferentes productos de biotransformación del limoneno y las oxigenasas específicas que transforman este compuesto.

Figura 9 Representación de la estructura química optimizada en 3D del limoneno, carbonos activos para la oxidación y productos de oxidación (la estereoquímica no se define en las estructuras) (Tomada de Castellanos, 2007)



1.3.2 Derivados oxigenados del citronelol. Dentro de los derivados oxigenados del citronelol (DOCit) más importantes se encuentran los isómeros cis/trans óxidos de rosa (Demyttenaere et al., 2004; Adams et al., 2003; Marostica y Pastore, 2007); el 3,7-dimeti- 1,7-octanodiol comúnmente conocido como hidroxicitronelol

(Lozano et al., 2007), el 10-hidroxicitronelol (Hamada et al., 1997) y α -terpineol (Demittenaere et al., 2004). Otros derivados son el linalol, citronelal y ácido citronélico. En la **Figura 10**, se ilustran algunos de los compuestos importantes obtenidos por biooxidación del citronelol.

Los compuestos resultantes de la oxidación del citronelol tienen aplicaciones importantes en la industria de alimentos, cosmética, perfumística y de aseo por exhibir aromas únicos (Lapczynski et al., 2008; Wust et al., 1999; Wust, 1998; Miyazawa et al.; Hirvi et al., 1983; Rose Oxide Levo, 1975). El ácido citronélico se utiliza como material base para preparar diferentes feromonas y derivados o moléculas complejas con actividad biológica (Quitino, 2009).

Considerando los estudios realizados hasta el momento, se encuentra que cuando se pretende desarrollar la producción de compuestos oxigenados de terpenos, se requiere para cada sistema sustrato-microorganismo evaluar las variables que afectan el proceso y el efecto del escalado. Por lo anterior y teniendo en cuenta que el Centro Nacional de Investigaciones para la Agro-industrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), tiene entre sus objetivos buscar alternativas para dar mayor valor agregado a los aceites esenciales y sus componentes principales, este proyecto tuvo como objetivo general: “Evaluar y optimizar el proceso de biotransformación de limoneno y citronelol empleando diferentes biocatalizadores, para obtener los productos oxigenados de alto valor agregado con potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica, de alimentos y en perfumería fina” y como objetivos específicos:

- Establecer las condiciones óptimas de crecimiento celular de los biocatalizadores: *Aspergillus niger* DSM 821, *Aspergillus carbonarius* DSM 872, *Penicillium digitatum* DSM 62840 y *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066.

- Establecer las condiciones óptimas del proceso de biotransformación del limoneno y del citronelol para obtener compuestos oxigenados, evaluando el efecto del pH, medio de biconversión, concentración de sustrato y tiempo de reacción.

Figura 10 Biocatalizadores empleados en la biotransformación de limoneno. MO: Monooxigenasa, DH: Deshidrogenasa, EH: Epóxido hidrolasa. (S)-(-)-Limoneno 3-Monooxigenasa (EC 1.14.13.47), (S)-(-)-Limoneno 6-Monooxigenasa (EC 1.14.13.48), (S)-(-)-Limoneno 7-Monooxigenasa (EC 1.14.13.49), Limoneno 1,2 Epoxido hidrolasa (EC 3.3.2.8), Peril alcohol Dehidrogenasa (EC 1.1.1.144), (S)-(-)-limoneno sintasa (EC 4.2.3.16), (R)-(+)-Limoneno sintasa (EC 4.2.3.20).

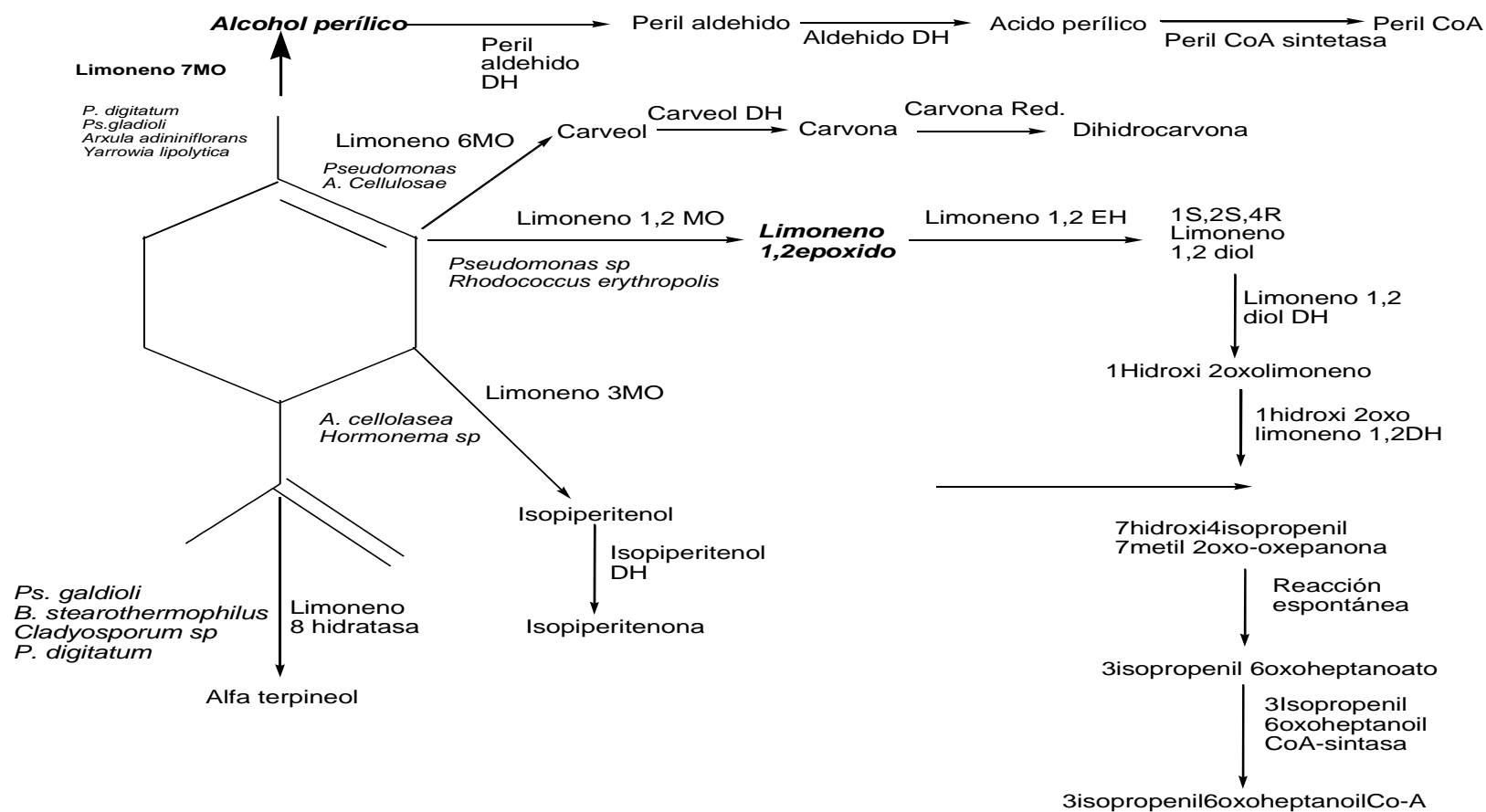
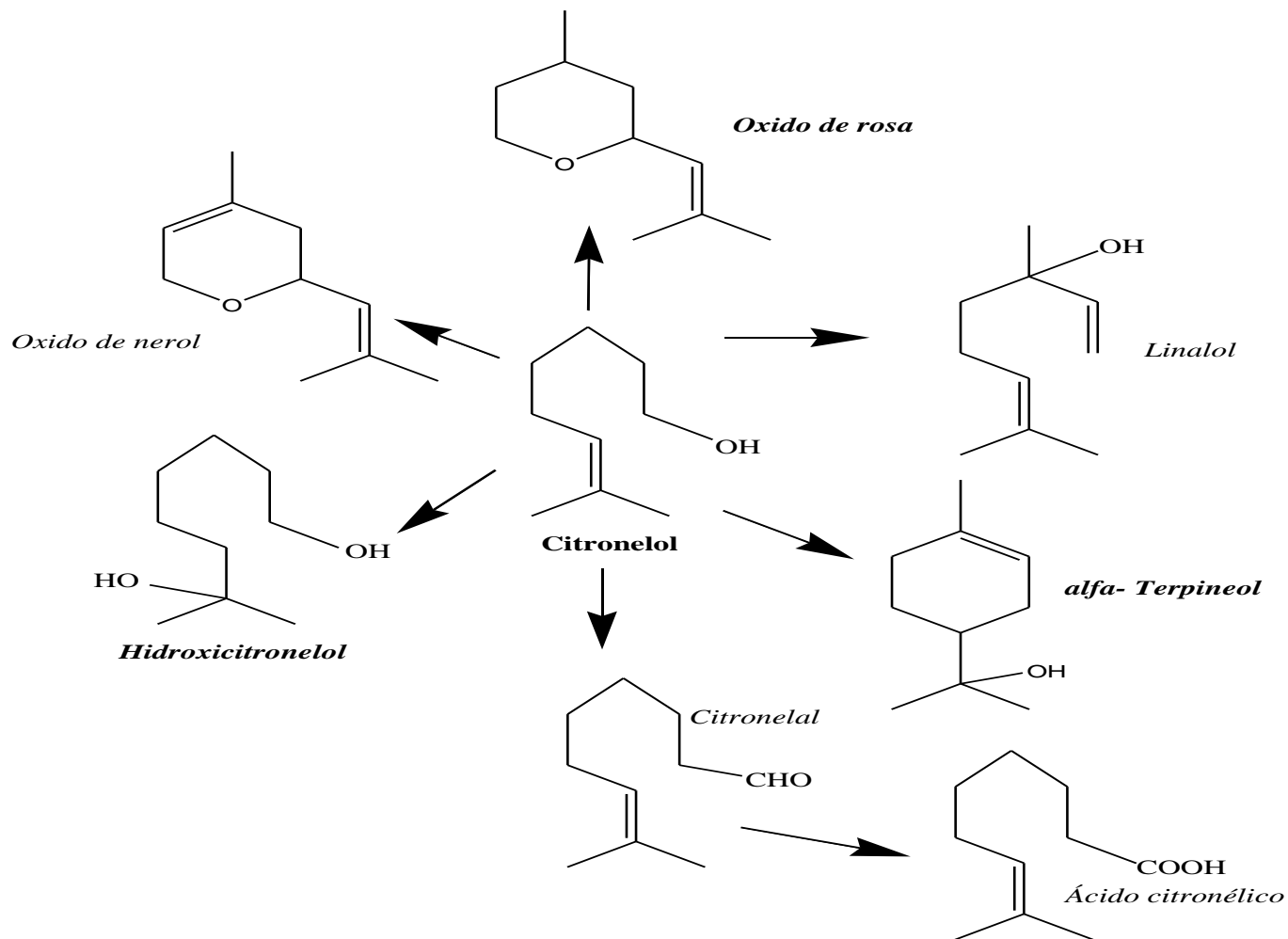


Figura 11 Productos de oxidación/hidroxilación del citronelol



- Escalar progresivamente el proceso de biotransformación del limoneno y el citronelol, hasta una capacidad máxima de 1 L, en las condiciones seleccionadas previamente y evaluar métodos de purificación de los compuestos oxigenados de interés.
- Evaluar la bioactividad antichagásica y antileishmania y antioxidante de los productos obtenidos.

De esta forma, en este trabajo se evaluó la biotransformación del limoneno con los hongos, *Aspergillus niger* DSM 821 y *Penicillium digitatum* DSM 62840 y las bacterias *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066 y *Xantobacter Xp* y la biotransformación del citronelol con *Aspergillus carbonarius* DSM 872, *Aspergillus niger* DSM 821 y *Penicillium digitatum* DSM 62840.

El desarrollo del proyecto permitió producir el DOL α -terpineol con alta selectividad y concentración (1864 mg/L) a partir de la optimización de la biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *P. digitatum* DSM 62840 (BIO 1). Mientras que la optimización del proceso de biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno con *Aspergillus niger* DSM 821 dio lugar principalmente al DOL alcohol perílico (405 mg/L) (BIO 2). También se estudió la biotransformación del limoneno usando las bacterias *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066 y *Xantobacter Xp.*; la primera presentó capacidad para oxidar e hidroxilar el limoneno, dando lugar al linalol, epóxido 1,2 limoneno y carvona (BIO 3). La biotransformación del citronelol por *Penicillium digitatum* DSM 62840 permitió obtener el DOCit con alta selectividad y concentración (1060 mg/L) (BIO 4). Los extractos de las tres biotransformaciones (BIO 1, BIO 2 y BIO 4) presentaron actividad antioxidante y no fueron tóxicos para las células de mamífero (células VERO), característica importante para su posible uso en humanos.

Una vez optimizadas las condiciones a escala de laboratorio se escalaron los procesos (BIO 1, BIO 2 y BIO 4). En los tres procesos de biotransformación disminuyó la concentración de los DOL y DOCit mayoritarios obteniéndose finalmente, 1275 mg/L, 252 mg/L y 720 mg/L de α -terpineol, alcohol perílico y 3,7-dimetil-1,7-octanodiol (hidroxicitronelol), respectivamente. La aireación en todos los casos favoreció la producción de otros derivados oxigenados, por lo que la selectividad de la biotransformación disminuyó.

La investigación realizada permitió evaluar de manera integrada las variables que afectan la biotransformación de monoterpenos utilizando células completas de hongos y bacterias, así como el efecto del escalado. De esta manera, se generan productos que presentan mayor valor agregado que las materias primas a partir de las cuales fueron obtenidos.

El proyecto fue financiado por COLCIENCIAS a través del contrato CENIVAM RC 4322004, se desarrolló en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UIS (CICTA) y dio lugar a las publicaciones y participaciones en eventos que se relacionan a continuación:

- a. Prieto GA, Perea JA, Stashenko E. (2007). Biotransformación del limoneno para la obtención de terpenoides por la acción de bacterias: *Rhodococcus erythropolis* y *Xanthobacter* sp. Scientia Et Technica, abril, año/vol. XIII, número 033, 291-292.
- b. Prieto GA, Perea JÁ, Ortíz CC. MICROBIAL BIOTRANSFORMATION OF (R)-(+)-LIMONENE BY *Penicillium digitatum* DSM 62840 FOR PRODUCTION OF (R)-(+)- α -TERPINEOL. Vitae. 2011; 18 (2): 163-172.
- c. Prieto GA, Perea JA, Stashenko E. Utilización del micelio de *Aspergillus niger* DSM 821 en la biotransformación de limoneno. III Congreso Internacional

de Microbiología "La Biotecnología como eje de innovación científica y tecnológica". Pamplona-Colombia. Modalidad: Ponencia. (2008).

d. Prieto GA, Perea JA, Rojas JP. Biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *Penicillium digitatum*. VIII Curso Latinoamericano de Biotecnología y XV Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica, Universidad Pontificia Católica de Valparaíso-Chile. Valparaíso, 2008.

e. Prieto GA, Perea JA, Stashenko E. Obtención de α - Terpineol por bioconversión de (*R*)-(+)-limoneno con *Penicillium digitatum* DSM 62840. 9° Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos-ACTA, Bogotá, 2008.

f. Prieto GA, Ortiz CC, Perea JA. Producción natural del monoterpeneoide α -terpineol. 10° Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos-ACTA, en simultánea con el XVI Seminario Latinoamericano de Ciencia y Tecnología de Alimentos- ALACCTA y 2° Simposio Latinoamericano de Inocuidad de Alimentos-IAFP. Bogotá, 2010.

Enviados para publicación y participación en eventos:

g. Prieto GA, Perea JA, Ortíz CC. PRODUCTION BIOCATALYTIC OF PERILLYL ALCOHOL USING WHOLE CELLS OF *Aspergillus niger* DSM 821. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial.

h. Prieto GA, Perea JA, Ortíz CC. OPTIMIZATION OF THE BIOTRANSFORMATION PROCESS OF (*R*)-(+)-LIMONENE BY *Penicillium digitaum* DSM 62840 CARRIED OUT IN BIORREACTOR. XI Congreso Nacional de Fitoquímica. Medellín-Colombia.

Patente

Janeth Aidé Perea, Claudia Cristina Ortiz, Elena Stashenko, Gloria Astrid Prieto.
Producción de hidroxicitronelol por biotransformación con hongos.

Entidad Titular: Universidad Industrial de Santander. Centro de Investigaciones para la Agro-industrialización de Especies Aromáticas Vegetales Tropicales y Medicinales, CENIVAM, Universidad Industrial de Santander

Estado de patente: En proceso (**Anexo 1**).

1.4 CONTENIDO DE ESTA TESIS

Para cumplir los objetivos planteados, el trabajo fue dividido en etapas, cada una de las cuales se presenta en capítulos separados, así:

En el capítulo segundo se describe la “Optimización del proceso de biotransformación de citronelol por hongos. Escalado, purificación y bioactividad”. Inicialmente se hace el análisis del estado del arte sobre la biotransformación del alcohol monoterpénico citronelol; posteriormente se presenta la metodología utilizada para optimizar el proceso a escala de laboratorio, a volúmenes 10 y 100 veces mayor de medio; los métodos para cuantificar, purificar y caracterizar el DOCit mayoritario; los métodos para determinar la actividad biológica, y, finalmente, los resultados obtenidos.

El capítulo tercero se relaciona con la “Biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno usando células bacterianas”, se presenta el estado del arte, la metodología utilizada en ensayos preliminares y los resultados alcanzados.

En el capítulo cuarto titulado “Optimización del proceso de biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *Aspergillus niger* DSM 821. Escalamiento y bioactividad”, se hace, al igual que en los capítulos anteriores, una revisión del tema, se muestra la metodología utilizada y los resultados alcanzados.

En el capítulo quinto, se describe la “Optimización del proceso de biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *Penicillium digitatum* DSM 62840. Escalado, purificación y bioactividad” se presenta una introducción, una descripción de las materias primas y los métodos de análisis utilizados para optimizar el proceso de biotransformación a escala de laboratorio y a escala 10 y 100 veces mayor en volumen, además de los métodos para cuantificar, purificar y caracterizar el DOL mayoritario, y los métodos para determinar la actividad biológica. También se presentan los resultados obtenidos.

En el capítulo sexto se presentan las conclusiones del proyecto.

Finalmente se incluye la bibliografía consultada, que permite soportar el proyecto.

2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN DEL CITRONELOL CON HONGOS. ESCALADO, PURIFICACIÓN Y BIOACTIVIDAD

2.1 INTRODUCCIÓN

Los aromas y fragancias son ampliamente utilizados en el mundo moderno y son considerados esenciales en la calidad final de alimentos y bebidas; las principales fuentes son los aceites esenciales y sus compuestos monoterpénicos (Rozenbaum et al., 2006); sin embargo, la baja concentración de estos compuestos en la fuente natural, además de las restricciones químicas-ambientales-económicas (clima, enfermedad, complejidad química del extracto vegetal), afectan el rendimiento de la extracción. Dentro de las rutas comúnmente empleadas para obtener aromas se encuentra la síntesis química a partir de sustratos abundantes en la naturaleza, como los hidrocarburos terpénicos. La oxidación microbiana de monoterpenos resulta ser otra vía ventajosa, llamativa y de mayor interés debido a la creciente preferencia de los consumidores por productos naturales, en vez de sintéticos, y a la simplicidad de los procesos, que generalmente se llevan a cabo en una sola etapa, a diferencia de la síntesis química.

Una de las materias primas, de gran interés industrial para la síntesis de otros compuestos aromatizantes, químicos finos de mayor valor (Maróstica y Pastore, 2006; Boersma, et al., 2005; Kamisnska et al., 1989) y otras notas florales (Schrader y Berger, 2001) es el citronelol, compuesto fragante y aromatizante-saborizante. Diferentes derivados naturales del citronelol han sido obtenidos por biotransformación aprovechando la capacidad de las enzimas o células completas de microorganismos para transformar de manera enantioselectiva un sustrato (Serra et al., 1994). La biotransformación del citronelol da lugar a un amplio número de metabolitos (Demyttenaere et al, 2004; Griffin et al, 1999; Onken y Berger, 1999; Cameotra et al, 1998; Brunerie, 1987; Kaminska et al., 1989), y en

algunos casos, a compuestos naturales enantio-específicos importantes (Serra et al., 2005; Demyttenaere et al., 2004) como los isómeros l-cis/trans óxidos de rosa (Yamamoto, 2002).

BIOTRANSFORMACIÓN DEL CITRONELOL

Los primeros estudios de degradación microbiana de alcoholes terpénicos acíclicos y aldehídos data de los años sesenta del siglo pasado. La bacteria *Pseudomona citronellolis* presentó capacidad para transformar los sustratos citronelal y geraniol. El citronelal se redujo dando lugar al citronelol mientras que el geraniol se oxidó produciendo ácido geránico.

Brunerie y colaboradores (1987) fueron los primeros en investigar la biotransformación del citronelol utilizando hongos; ellos emplearon una cepa de *Botrytis cinérea* crecida en uvas en descomposición y obtuvieron 2,6-dimetil-1,8-octadienol y su derivado ω -hidroxilado (E)-2,6-dimetil-2-octeno-1,8-diol; también evaluaron el efecto del medio de bioconversión usando mezclas de diferentes proporciones (1-5:700) de jugo de uva y medio mineral sintético; en este caso predominó la oxidación a ácido citrónico.

Años más tarde, Onken y Berger (1999) llevaron a cabo la biotransformación de citronelol por el basidiomiceto *Cystoderma carcharia*, en un biorreactor de membrana de capacidad 2L con aireación. El producto principal de biotransformación fue 3,7-dimetil-3,6,7-octanotriol y la productividad del proceso fue $0.15 \text{ gL}^{-1}\text{día}^{-1}$. Modificaciones al proceso como aumento de la superficie por intercambio de gas, permitieron alcanzar alta saturación de oxígeno, alto crecimiento y alta velocidad de transformación. Así, se obtuvieron intermediarios: 3,7-dimetil-6,7-epoxy-1-octanol, dioles alílicos, 2,6-dimetil-2-octeno-1,8-diol, 3,7-dimetil-5-octeno-1,7-diol y 3,7-dimetil-7-octeno-1,6-diol, y los isómeros cis/trans-óxidos de rosa, en menor cantidad. Estos autores, además, sugieren la

participación de una monooxigenasa citocromo P-450 en la oxi-funcionalización inicial del citronelol mientras que los pasos subsiguientes fueron catalizados por una hidrolasa y transferasa, respectivamente (Onken y Berger, 1999).

En 2004, Demyttenaere y colaboradores propusieron el uso de la técnica de micro extracción en fase sólida (SPME) para el screening de cepas con capacidad para biotransformar el citronelol en el medio YMPG. Los productos de biotransformación fueron los óxidos de rosa formados por combinación de la biocatálisis y catálisis ácida/temperatura (Demyttenaere et al., 2004).

Maróstica y Pastore (2007) utilizaron el agua residual de yuca (cassava, CM) suplementada con sales minerales (CC+MM) como medio para llevar a cabo los experimentos de biotransformación de citronenol y como biocatalizador, una cepa de *Penicillium* sp., y obtuvieron óxidos de rosa (73.4 mg/L del isómero cis y 31.5 mg/L del isómero trans) y 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol y 6-metil-5-hepten-2-ol.

Recientemente Piantini y colaboradores (2011), sintetizaron los óxidos de rosa por oxifuncionalización del citronelol mediante un proceso combinado de biocatálisis/catálisis química. Como biocatalizador utilizaron la cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago* en presencia de H_2O_2 y KBr a un pH de 3.6. La CPO biotransforma el (\pm) citronelol a (\pm)-citronelol-bromohidrinás; posteriormente por tratamiento con t-butolato se obtienen los dioles, cis/trans 6-bromo-3,7-dimetiloctano-1,7-diol y la acción de ácido sulfúrico da lugar a los isómeros cis/trans óxidos de rosa con un rendimiento del 60% (Piantini et al, 2011).

Kaminska y colaboradores (1989) usaron, en cambio, las enzimas peroxidasa/hidrogenoperoxidasa de rábano picante en la presencia de ácido ascórbico como donador de protones para biotransformar el citronelol. El producto en este caso fue el epóxido de citronelol; su posterior solvólisis con MeOH/ H_2O condujo a los dioles y trioles: 6-metoxi 3,7 dimetil 1,7-octanodiol, 7-metoxi-3,7-

dimetil-1,6-octanodiol, 3,7-dimetil-1,6,7-octanotriol, 3,7-dimetil-1,7-octanodiol, 6-metoxi-3,7-dimetil-1-octanol, 7-metoxi-3,7-dimetil-1-octanol y 3,7 dimetil 1,7 octanodiol. Los productos resultan del efecto sumatorio de auto-oxidación y bioconversión del citronelol, siendo esta última entre 1.5 a 2.5 veces más rápida (Kaminska et al., 1989).

En el **Figura 12** se resumen los productos obtenidos de la biotransformación de citronelol usando diferentes biocatalizadores.

En este trabajo se planteó la biotransformación citronelol para obtener compuestos oxigenados de mayor valor útiles en la industria de alimentos, cosmética y perfumística por sus propiedades fragantes, como son el hidroxicitronelol (Cit-OH) y los isómeros cis/trans óxidos de rosa.

El 3,7-dimetil-1,7-octanodiol, comúnmente conocido como hidroxicitronelol (**Figura 13**), es un ingrediente fragante de aroma a arándano (*Vaccinium corymbosum*) (Hirvi et al, 1983) de significancia comercial, útil para la industria cosmética (elaboración de cremas), perfumística (elaboración de perfumes y lociones) y de aseo (elaboración de champús, jabones y detergentes) (Lapczynski et al, 2008).

La concentración umbral del hidroxictornelol es de 5 mg/kg en agua.

Figura 12 Metabolitos producidos por la biotransformación de citronelol utilizando diferentes biocatalizadores

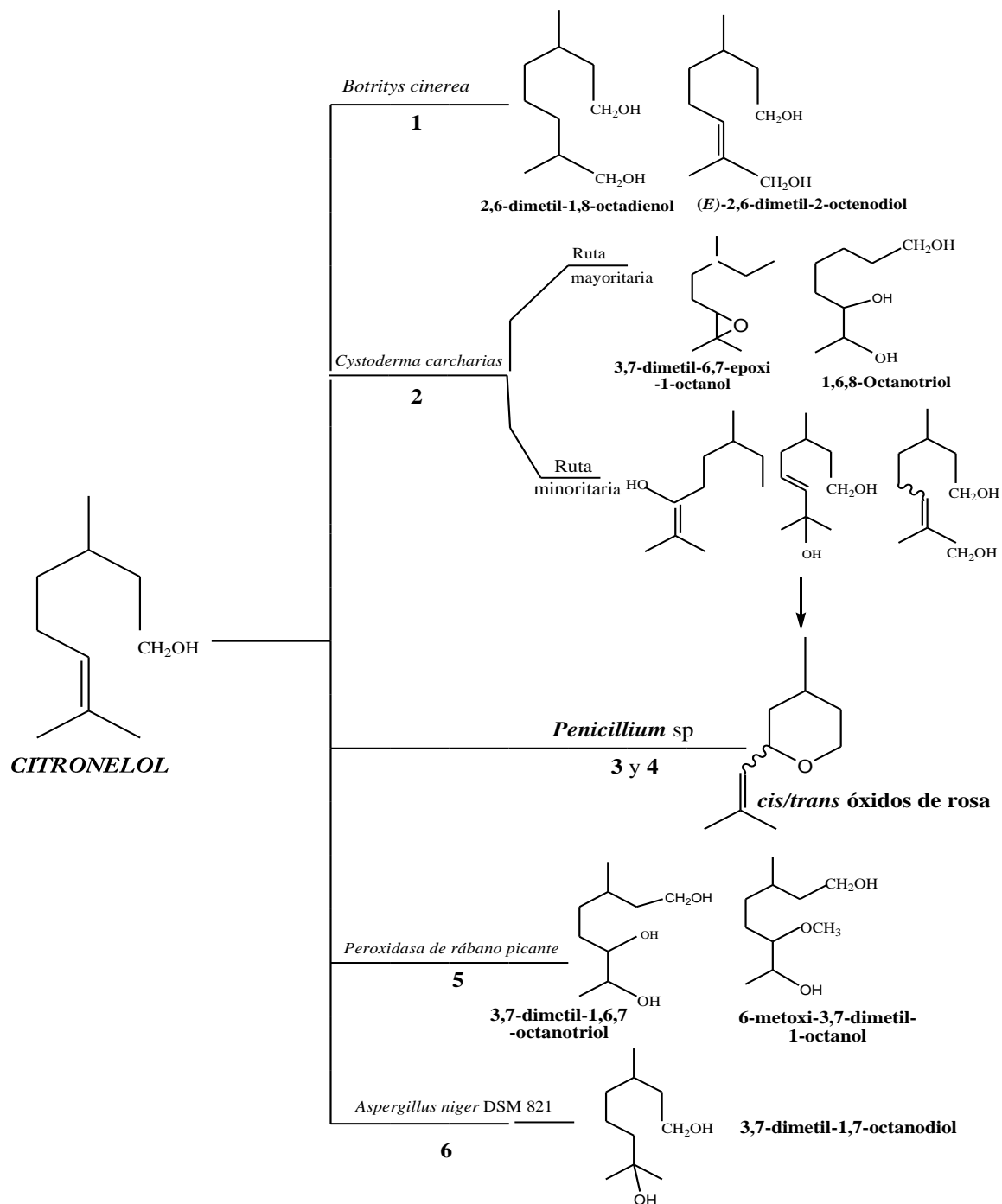
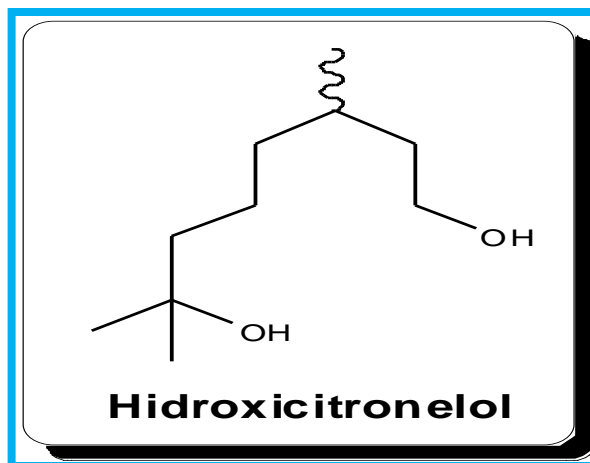


Figura 13 Estructura química del hidroxicitronelol



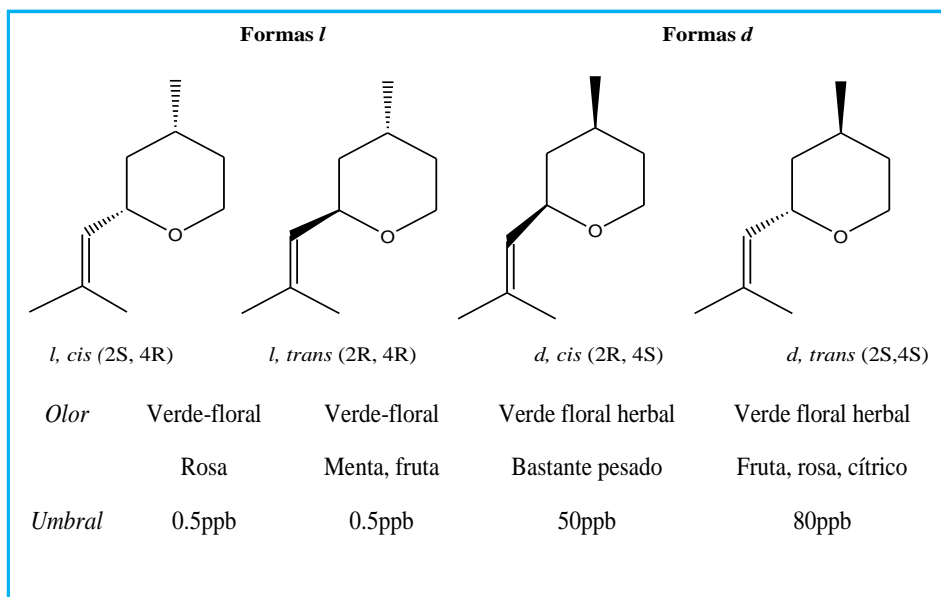
El Cit-OH comercial se obtiene por métodos químicos mediante una reacción de adición de agua al citronelol catalizada con resinas de intercambio catiónico (Patentes US 4482765, WKU 04056573 y US 3996303). El único proceso biocatalítico reportado a la fecha para producir Cit-OH es el publicado por Lozano et al., (2007), quienes utilizaron *Aspergillus niger* DSM 821, medio sólido PDA, a 30 °C y 15 días de reacción, alcanzándose un rendimiento del 62%.

Los óxidos de rosa (2-(2-metil-1-propenil)-4metil-tetrahidropirano) (**Figura 14**), son éteres cíclicos monoterpénicos; existen en cuatro formas isoméricas: 2 isómeros *l-cis* (2*S*, 4*R*) y 2 isómeros *l-trans* (2*R*, 4*R*), diferenciados por sus características odoríferas. El isómero más abundante en la naturaleza es el *l-cis*, que tiene un aroma impactante a fruta mientras que el isómero *d-cis* tiene aroma herbal (Yamamoto, 2002).

El peculiar olor a rosa del óxido de rosa, lo convierte en la materia prima básica para crear las diferentes notas a rosa en los diversos productos (Rose Oxide Levo, 1975; Miyazawa et al., 1995; Wust et al., 1999). En los alimentos, el óxido de rosa se ha empleado como aromatizante-saborizante de bebidas, dulces y productos de panadería; también se usa en la fabricación de detergentes (0.0005-0.005%),

jabones (0.005-0.05%), cremas y lociones (0.003-0.02%) y en perfumería (0.04-0.2%) (Wust, 1998).

Figura 14 Estructuras y propiedades de los isómeros *d/l cis/trans* óxidos de rosa

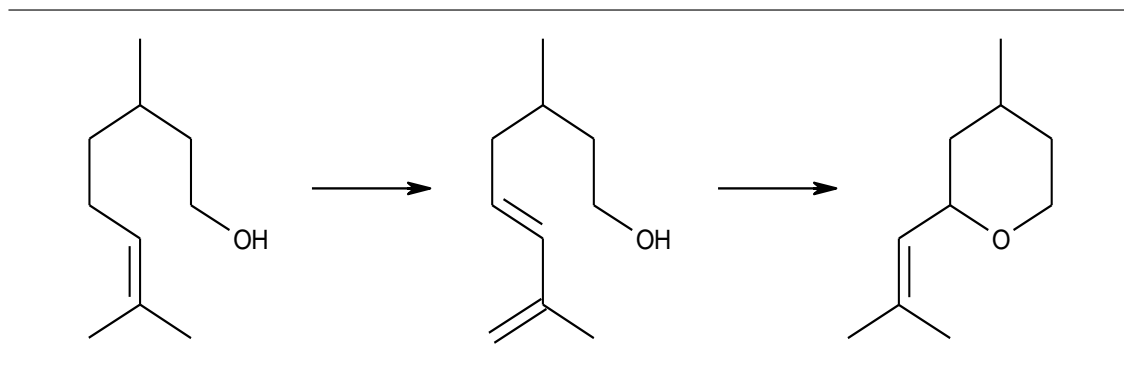


Los óxidos de rosa están presentes en plantas como *Rosa bulgaria*, *Rosa damascena*, geranio (Babu et al., 2002), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) (Taneja et al, 2005) y la planta Benth (*Dracocephalum heterophyllum*) del desierto frío. El AE de *Rosa bulgaria* contiene aproximadamente un 0.39% de *cis*-óxido de rosa y 0.18% del isómero *trans* (Kovats, 1987). El AE de *D. heterophyllum* contiene 1.6% *cis*-óxido de rosa, 0.5% *trans*-óxido de rosa y 7.4% de citronelol (Kumar et al., 2003). El principio odorífero del AE de pétalos de *Rosa damascena* extraído con solvente e identificado por cromatografía a contracorriente, se atribuye a la presencia de los diastereoisómeros 4*R* del óxido de rosa y de la cetona, β-damascenona (Ohloff y Demole, 1994).

Wüst et al. (1998) demostró que la formación del óxido de rosa se lleva a cabo por oxidación enzimática; para ello usó la enzima citronelil glucosidasa aislada de especies de *Pelargonium* y el sustrato citronelol. El marcaje isotópico de los

citronelil-glucósidos producidos por la acción E-S permitió establecer el mecanismo de reacción (**Figura 15**).

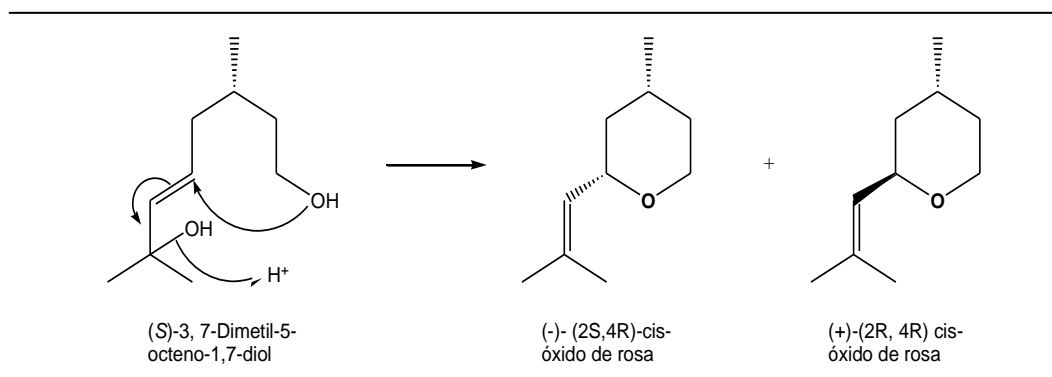
Figura 15 Ruta sintética para la obtención de óxido de rosa



Los óxidos de rosa también han sido sintetizados por diferentes autores usando catalizadores químicos y a partir de diferentes sustratos. El *l-cis*-óxido de rosa se sintetiza a partir del *S*-citronelol (Boersma et al., 2005), mientras el (+)-*cis*-óxido de rosa a partir de *R*(+)-metil ciclohexanona (Gravel y Bordeleau, 1998).

La mezcla de los isómeros *cis/trans* óxidos de rosa ha sido obtenida usando diferentes sustratos y reacciones. Knapp, en 1998, utilizó la ciclación del 3,7-dimetil-5-octen-1,7-diol, bajo condiciones ácidas (**Figura 16**).

Figura 16 Catálisis ácida del 3,7-dimetil-5-octen-1,7-diol.



Usando el citronelol como sustrato, Yamamoto et al., (2002) desarrollaron un proceso sintético “one pot”, que consistió en la bromación del citronelol para dar lugar al intermedio “alenil-alcohol (3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol)”, cuya selectividad hacia los isómeros cis/trans óxidos de rosa, depende del catalizador: complejos de paladio (**Figura 17**), HgCl_2 (**Figura 18**) y medio ácido (KHSO_4 /tolueno) (**Figura 19**), respectivamente.

Figura 17 Síntesis de óxidos de rosa catalizada por complejos de paladio

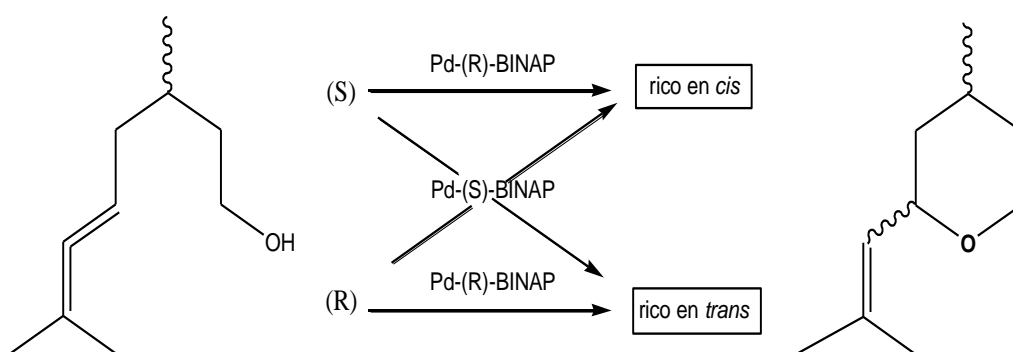


Figura 18 Síntesis del óxido de rosa catalizado por sales de mercurio

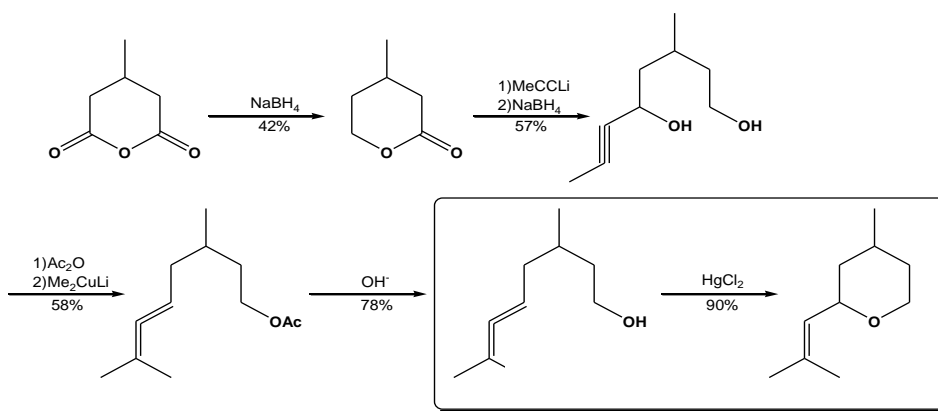
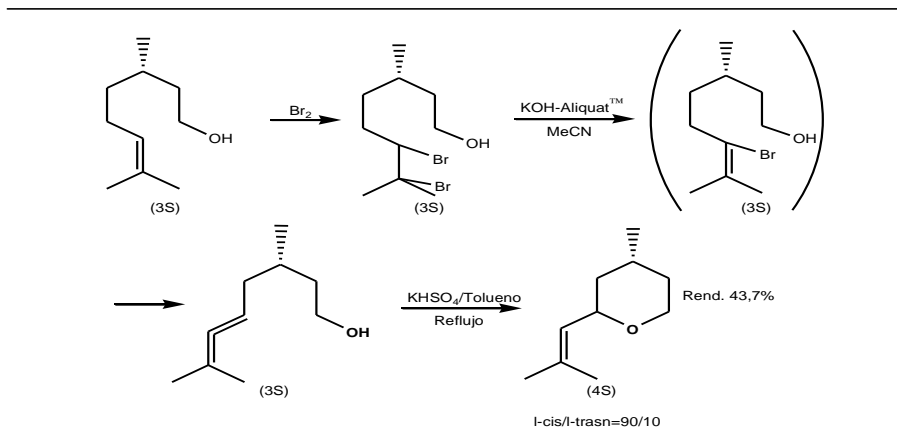


Figura 19 Síntesis de óxidos de rosa catalizada por $\text{KHSO}_4/\text{Tolueno}$

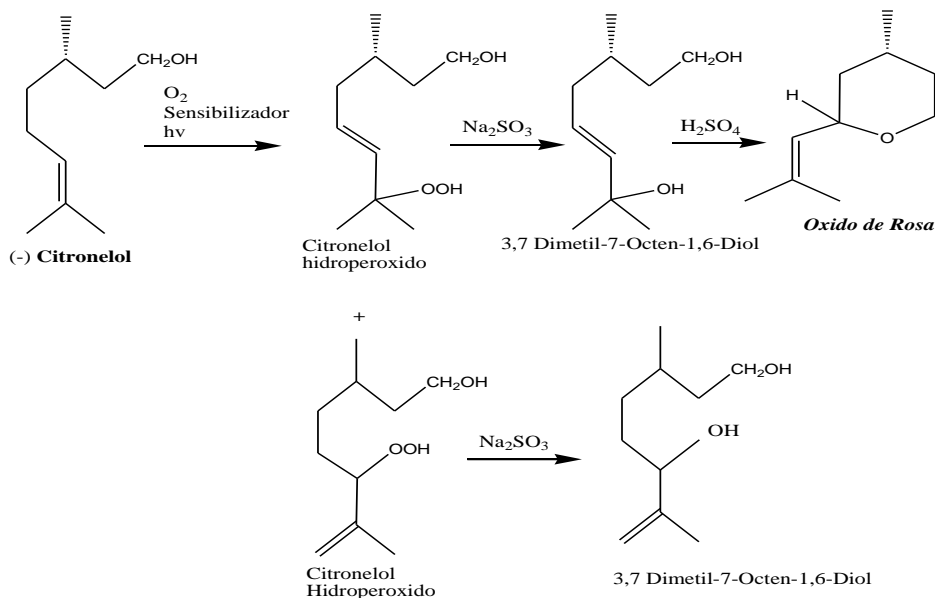


Dincalp et al. (2001), en un período de fotólisis de 2 horas con luz solar concentrada (900-100 sun) y citronelol disuelto en acetonitrilo, obtuvieron como productos: 76.0% del isómero cis óxido de rosa, 6.2% del isómero trans, 5.9% de dioles y 3.2% de (-)-citronelol, con el fotosensibilizador ABIPER (dehidroabietil perilen diimida). Mientras que con el fotosensibilizador BUNAP (n-butil naftaleno), los porcentajes fueron del 53.9, 23.1, 19.6 y 0.7%, respectivamente, en un tiempo de fotólisis de 1 h. Estos autores también usaron la mezcla ABIPER/ miristato de hierro Fe^{+3} , obteniendo 53.4% cis, 5.8% trans, 4.8% dioles y 35.7% de (-)-citronelol y con la mezcla ABIPER/ Cu^{+2} fue de 11.2% (-)-cis, 4.9% (-)-trans, 2.0% de dioles y 81.1% de (-)-citronelol.

Recientemente, Meyer et al. (2007), usando como sustrato el (S)-(-)- β -(-)-citronelol, obtuvieron los óxidos de rosa por oxidación fotoquímica con oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) generado por el foto-sensibilizador sintético, complejo de rutenio $[\text{Ru}(\text{t}^{\text{b}}\text{py})_3\text{Cl}_2]$, dicloruro tris-(4,4'-tert-butil-2,2'-bipiridil)-Rutenio (II) y un diodo de 468 nm tipo L-7113PBC-Azul, como fuente de radiación. Adicionalmente, ensayaron el efecto de las diimidias aromáticas (ABIPER) y (BUNAP) para generar el anión radical superóxido sin oxígeno singulete ($\text{O}_2^{\cdot-}$) para oxidar soluciones aireadas de citronelol-acetona y producir eficientemente los óxidos de rosa mediante un mecanismo como el que se indica en el **Figura 20**. Estos

investigadores centraron su interés en evaluar dos tipos de reactores: reactor batch y microrreactor, y la eficiencia en términos de rendimiento espacio/tiempo y eficiencia fotónica. Pero en cuanto a las concentraciones de los óxidos de rosa producidos no se da información (Meyer et al., 2007).

Figura 20 Formación de óxidos de rosa a partir de citronelol con 1O_2



Comercialmente, la obtención de los cis/trans óxidos de rosa a partir del precursor citronelol resulta interesante, por tener un precio 250 veces mayor (US \$-169/ 250mL/ US \$-168/1mL).

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en la optimización de la biotransformación del citronelol usando células completas de tres hongos: dos de género *Aspergillus*, *Aspergillus niger* DSM 821 y *Aspergillus carbonarius* DSM 872 y uno de género *Penicillium*, *Penicillium digitatum* DSM 62840. También se indican los resultados del escalado del proceso a volúmenes 10 y 100 veces mayor, de la purificación del producto mayoritario y de los estudios de bioactividad del extracto de biotransformación.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Microorganismos, medios de cultivo y reactivos

Microorganismos: Las cepas de los hongos empleadas fueron *Aspergillus niger* DSM 821, *Aspergillus carbonarius* DSM 872 y *Penicillium digitatum* DSM 62840, adquiridas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares DSMZ (Braunschweig, Alemania).

Medios de cultivo: Los medios de cultivo PDA (papa dextrosa agar, pH 5.6 ± 0.2) y MEA (agar extracto de malta, pH 5.4 ± 0.2), y las materias primas requeridas para preparar el medio complejo YGA (extracto de levadura 3.0 g/L, extracto de malta 20 g/L, glucosa 20 g/L, peptona bacteriológica 1.0 g/L y agar 20 g/L, pH 6.0), YMPG (extracto de levadura 5.0 g/L, extracto de malta 10 g/L, glucosa 10 g/L y peptona bacteriológica 5.0 g/L) y MYB (extracto de levadura 3.0 g/L, extracto de malta 20 g/L, glucosa 10 g/L, peptona bacteriológica 10 g/L), fueron compradas a OXOID (Hampshire, Inglaterra).

Reactivos: El sustrato citronelol (98%) fue obtenido de Merck (Darmstadt, Alemania); los isómeros cis/trans óxidos de rosa (99%), de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); el n-tetradecano, Tween 80, etanol absoluto ($\geq 99.9\%$), acetato de etilo ($\geq 99.8\%$) y otros solventes fueron grado analítico y se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania); el nitrógeno gaseoso se obtuvo de Aga-Fano (Bucaramanga, Colombia).

2.2.2 Cinética de crecimiento microbiano de los hongos en medio de cultivo sólido. El crecimiento de *Aspergillus niger* DSM 821, *Aspergillus carbonarius* DSM y *Penicillium digitatum* DSM 62840, fue seguido durante 10 días en los medios PDA, MEA y YGA de pH 5.4-6.0, a 28 °C para las cepas de *Aspergillus* y a 23 °C para *Penicillium*. La cinética de crecimiento de los microorganismos se

determinó por medición del diámetro de la colonia con el tiempo y la velocidad de crecimiento radial (VCR, mm/h) usando el método descrito por Trinci y Pirt (Trinci, 1969; Pirt, 1975). Para cada hongo, se seleccionó el medio con base en la mayor VCR y se usó para el mantenimiento periódico de la cepa. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.2.3 Evaluación de la actividad antifúngica del sustrato. La actividad antifúngica del citronelol sobre *P. digitatum* DSM 62840 se evaluó con la finalidad de determinar la concentración de sustrato que inhibe parcial y totalmente el crecimiento del microorganismo (máximo un 25%). La concentración de citronelol se varió en el rango entre 0 y 250 mM, adicionando sustrato al medio PDA antes de la gelificación. Luego, el medio se inoculó con 10 μ L de SS de concentración $1.0 \cdot 10^7$ esporas/mL. Como blanco se usó el hongo crecido sin citronelol. El crecimiento microbiano del testigo y del blanco se determinó mediante el registro del cambio en el diámetro de la colonia a los 8 días (Pandey et al., 1982). Los experimentos se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó usando la **Ecuación 1**, donde D_c es el diámetro promedio de la colonia fúngica del testigo y D_e es el diámetro promedio del blanco. Los resultados se usaron para construir las curvas de inhibición. La concentración de citronelol que inhibe el crecimiento de *P. digitatum* en un máximo del 25% se definió como concentración mínima inhibitoria (CMI) y la que inhibe el 100%, como concentración letal (CL).

$$\text{Inhibición, \%} = \left[\left(\frac{D_c - D_e}{D_c} \right) * 100 \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

Dependiendo de los resultados del efecto antifúngico del citronelol puro, se evaluará el efecto de este sustrato adicionado en solución etanólica al 40%.

2.2.4 Optimización del proceso de biotransformación de citronelol utilizando células completas de hongos a escala de laboratorio

- **Preparación de la suspensión de esporas.** Las esporas de *A. niger* DSM 821, *A. carbonarius* DSM 872 y *P. digitatum* DSM 62840 obtenidas en el respectivo medio de cultivo sólido previamente seleccionado fueron re-suspendidas en 10 mL de solución salina 0.85% NaCl y 0.1% Tween 80. El recuento del número (N) de células por mL, se hizo utilizando una cámara de Neubauer. La concentración inicial de esporas en el medio de biotransformación fue de 1×10^7 esporas/mL.

i. **Cinética de crecimiento de los hongos en medio líquido.** *A. niger* DSM 821, *A. carbonarius* DSM 872 y *Penicillium digitatum* DSM 62840 se cultivaron en viales de 22 mL con tapa rosca provistos con septa de teflón, que contenían 5 mL de medio líquido estéril YMPG y MYB a 27 °C con agitación de 150 rpm usando un agitador orbital (Heidolph Vibramax 100, Schwabach, Germany). El medio se inoculó con 50 μ L de suspensión de esporas (SS) de concentración 1×10^7 esporas/mL. La concentración de biomasa se determinó por el método de peso seco de las células, tomando muestras cada 24 h durante 15 días (Demyttenaere et al., 2004).

j. **Proceso general de biotransformación a escala de laboratorio.** Los bioensayos se realizaron en viales de 22 mL con tapa rosca provistos con septas de teflón, los cuales contenían 5 mL de medio de cultivo líquido estéril, el cual se inoculó con 50 μ L de SS 10^7 esporas/mL y se pre-incubó a 27 °C durante 72 h con una agitación de 150 rpm usando un agitador orbital (Heidolph Vibramax 100). Los biocatalizadores empleados fueron SS de *A. niger* DSM 821, *A. carbonarius* DSM 872 y *P. digitatum* DSM 62840. Luego de la pre-incubación se adicionó citronelol en solución etanólica al 40% en concentración 12.8 mM (Lozano, 2007). Al mismo tiempo, se prepararon dos controles, blanco de biomasa (esporas suspendidas en

el medio de reacción sin sustrato) y blanco de sustrato (medio de reacción y sustrato sin suspensión de esporas). La biotransformación microbiana fue monitoreada durante el experimento. Los productos de reacción y el sustrato remanente fueron extraídos y analizados por GC-SM.

Las variables de estudio fueron: biocatalizador, medio de biotransformación, pH, fase crecimiento del microorganismo, concentración de sustrato y efecto inductor del sustrato. El criterio de selección del mejor valor para cada variable fue la bioconversión, expresada como la concentración (mg/L) de Cit-OH producida y la selectividad de la reacción. También se determinó la conversión de sustrato, utilizando la **Ecuación 2**, y el rendimiento de biotransformación expresado como mg Cit-OH/mg citronelol*100.

$$\text{Conversión \%} = \left[\frac{(C_i - C_f)}{C_i} \right] * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde C_i = Concentración inicial de citronelol, C_f : Concentración final de citronelol.

A continuación se describe el procedimiento para evaluar cada variable.

a. Efecto del tipo de medio de cultivo sobre la biotransformación microbiana.

La capacidad de biotransformación del citronelol por los hongos *A. niger* DSM 821, *A. carbonarius* DSM 872 y *P. digitatum* DSM 62840, se evaluó usando los medios líquidos YMPG y MYB disueltos en buffer citrato-fosfato 0.1 M de pH 2.5, a 27 °C, 150 rpm y una concentración final de citronelol en el medio de 12.8 mM, usando una solución alcohólica de citronelol al 40% (Lozano, 2007). La cinética de biotransformación microbiana fue monitoreada cada 4 días durante 12 días de reacción. Una vez evaluado el efecto del medio de cultivo, se seleccionaron los dos mejores biocatalizadores con capacidad para oxifuncionalizar el citronelol

b. Efecto del pH sobre la biotransformación del citrónelol. Con los dos biocatalizadores seleccionados en la etapa anterior, se evaluó el efecto del pH en la biotransformación del citrónelol. El medio de cultivo MYB se disolvió en buffer de citrato 0.1 M de pH 2.5 y 3.5, que fueron los valores de pH evaluados. Los experimentos de biotransformación se llevaron a cabo usando la metodología previamente descrita en el procedimiento general. La transformación microbiana se monitoreó cada 4 días de reacción durante 12 días, luego de la adición de citrónelol. El pH del medio con mayor selectividad y valor de bioconversión se seleccionó para evaluar otros parámetros de biotransformación.

c. Efecto de la fase de crecimiento. A partir de las curvas de crecimiento de *A. niger* DSM 821 y *P. digitatum* DSM 62840 se pudo establecer el tiempo respectivo para cada fase de crecimiento: 1, 3, 5, 7 y 9 días que correspondieron respectivamente a las fases latencia, exponencial temprana, media y final, y estacionaria. Luego de crecidos los hongos en cada fase en el medio de cultivo, a cada una se adicionó el citrónelol en solución etanólica al 40% en una concentración final 12.8 mM para dar inicio a la biotransformación. En cada caso se monitoreo la cinética de transformación microbiana a los 0, 4, 8 y 12 días de reacción.

Luego de evaluado el efecto del pH y la fase de crecimiento se seleccionó el biocatalizador con mayor bioconversión y selectividad.

d. Efecto inductor de citrónelol. El posible efecto inductor del citrónelol se determinó mediante experimentos de biotransformación por *P. digitatum* DSM 821 en el medio MYB de pH 2.5 inoculado con 50 μL de SS 10^7 esporas/mL, previamente obtenida por crecimiento del hongo en PDA en presencia de inductor (1.28 mM de citrónelol) y en ausencia de inductor (blanco). Las biotransformaciones se realizaron a 27 °C, 150 rpm, concentración de citrónelol

12.8 mM usando una solución etanólica al 40%. Se monitoreó la reacción a los 0, 4 y 8 días.

e. Efecto de la concentración de sustrato. Se utilizaron diferentes concentraciones de citronelol (0-100 mM) adicionado en solución etanólica al 40%, para evaluar la biotransformación por *P. digitatum* DSM 62840 en el medio MYB de pH 2.5, durante 12 días, a 27 °C y 150 rpm. La concentración de sustrato óptima se seleccionó de acuerdo con la mayor selectividad y bioconversión del sustrato monoterpénico.

2.2.5 Extracción, identificación y cuantificación de sustrato remanente y productos de biotransformación

Extracción líquido-líquido y concentración de productos: Los productos y el sustrato remanente obtenidos de los experimentos de biotransformación fueron extraídos con acetato de etilo, AcOEt, (2 * 2.5 mL), seguido de centrifugación a 4000 rpm durante 5 min. La fase orgánica se recolectó y secó con Na₂SO₄ anhidro; luego se concentró con corriente de N₂. Posteriormente se adicionaron 3 µL de n-tetradecano (estándar interno), se aforó a 1 mL y se tomaron 2 µL para el análisis cromatográfico.

Eficiencia de extracción (EE): Se prepararon tres soluciones de citronelol: 5 mL de medio MYB de pH 2.5 y 12 µL de citronelol (12.8 mM); se agitaron a 150 rpm durante 30 min; posteriormente se realizó la extracción con AcOEt (2 * 2.5 mL) y la concentración de las muestras como se describió anteriormente. A su vez, se preparó un blanco (solución en acetato de etilo de citronelol 12.8 mM con el istd). La comparación del valor promedio de concentración de las muestras extraídas con su respectivo blanco permitió determinar la EE del proceso utilizando la **Ecuación 3**.

$$EE \% = \left[\frac{\text{(masa analito recuperado)}}{\text{masa de analito adicionado}} \right] * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Identificación: El citronelol y los DOCit producidos, se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, GC-MS, usando un cromatógrafo Agilent modelo 6890N (Palo Alto, CA, USA) acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5975C con un sistema detector de ionización por impacto de electrones (70 eV) y un analizador de masas cuadrúpolo, operado en modo full scan de 40-400 Dalton (m/z). La relación Split fue 1:13 y se usó un inyector automático Series HP 7683. Se utilizó una columna capilar DB-WAX (60 m de largo x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor). La temperatura fue programada a 45 °C mantenida durante 10 min, luego se elevó hasta 220 °C a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min, y esta temperatura se mantuvo durante 30 min. La identificación de los compuestos se realizó comparando los espectros de masas de las muestras con los espectros de los compuestos presentes en las bases de datos espectrales ADAMS, NSB 75K, 138K NIST 05 y WILEY disponibles en el sistema de datos G1701BA HP Enhanced Chemstation.

Cuantificación: La cuantificación de citronelol remanente se realizó por el método de estándar externo por CG-EM. La cuantificación de los DOCit, Cit-OH, isómeros *cis/trans* óxidos de rosa y demás productos generados en cada ensayo de biotransformación microbiana, se realizó por el método de estándar interno, usando n-tetradecano como patrón (2280 mg/L). Se prepararon cuatro soluciones en acetato de etilo de diferentes concentraciones de citronelol (2000, 3000, 5000 y 8000 mg/L) cada una por triplicado. A 5 mL de cada solución se adicionaron 15 µL de n-tetradecano. Las soluciones preparadas se utilizaron para realizar la respectiva curva de calibración del citronelol. Las soluciones corrieron en el cromatógrafo bajo las condiciones de análisis descritas.

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

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

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

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

$$\text{LOD} = (3 * \text{RMSE})/m$$
$$\text{LOQ} = (10 * \text{RMSE})/m$$

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

$$C_m = \frac{A_m}{f_r} \quad f_r = \frac{A_p}{C_p}$$

Donde C_m : concentración de la muestra; A_m : área del pico de la muestra; f_r : factor de respuesta; A_p : área del pico del patrón; C_p : concentración del patrón. La concentración del citronelol presente en las muestras obtenidas de los

experimentos de biotransformación, fueron corregidas utilizando el respectivo %EE.

2.2.6 Análisis estadístico. Los ensayos de actividad antifúngica se realizaron por triplicado. Los experimentos de biotransformación se realizaron dos veces y cada prueba se llevó a cabo por duplicado. En total se obtuvieron cuatro replicas. La concentración de sustrato remanente y los productos de biotransformación se expresaron como el promedio±desviación estándar. Para los cálculos se utilizó el programa Microsoft Office Excell 2007.

2.2.7 Escalamiento del proceso de biotransformación de citronelol por *P. digitatum* DSM 62840

2.2.7.1 A escala de 50 mL de medio. Inicialmente se evaluó el efecto del biocatalizador sobre el proceso de biotransformación del citronelol por *P. digitatum* DSM 62840, llevando a cabo la biotransformación con suspensión de esporas (sin-precultivo) y con micelio (con-precultivo) del hongo, manteniendo las condiciones óptimas establecidas en micro-escala. Previamente fue necesario establecer las curvas de crecimiento para los dos sistemas en 50 mL de medio estéril MYB de pH 2.5 ubicados en frascos tapa rosca de 250 mL para determinar el tiempo de incubación correspondiente a la fase exponencial temprana, fase óptima para la biotransformación.

Sin-precultivo: 50 mL de medio estéril MYB de pH 2.5 contenidos en frascos tapa rosca de 250 mL fueron inoculados con 500 μ L de SS de concentración $1 \cdot 10^7$ esporas/mL. Luego se incubó durante 48 h, a 27 °C y 150 rpm y posteriormente se dio inicio a la biotransformación por la adición de citronelol (12.8 mM) en solución etanólica al 40%. Las demás condiciones de reacción se mantuvieron durante 12 días. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Con pre-cultivo: 45 mL de medio estéril MYB de pH 2.5 se inocularon con el micelio de *P. digitatum* obtenido por cultivo en 5 mL del mismo medio durante 72 h, a 27 °C y 150 rpm. La mezcla medio-bioctalizador de 50 mL, se incubó durante 72 h. Posteriormente se adicionó el sustrato en concentración 12.8 mM en solución etanólica al 40% y se mantuvo la agitación orbital a 150 rpm, a 27 °C durante 12 días de reacción. Los experimentos se realizaron por duplicado.

La extracción con AcOEt del sustrato remanente y de los productos de biotransformación del citronelol por SS y micelio de *P. digitatum* DSM 62840, se realizó dos veces usando 15 mL de solvente (2*15 mL) y seguido de centrifugación a 4000 rpm por 5 min. Del volumen total de fase orgánica recolectada (extracto de biotransformación), se tomaron 5 mL y se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se concentraron con corriente de N₂, se adicionaron 3 µL de n-tetradecano (estándar interno), y se aforó a 1 mL. Se tomaron 2 µL para el análisis cromatográfico.

2.2.7.2 A escala de 500 mL de medio. Para establecer el tiempo correspondiente a la fase exponencial temprana de *P. digitatum* DSM 62840 se hizo la curva de crecimiento en 500 mL de medio MYB de pH 2.5 a 100 rpm y 27 °C en el biorreactor New Brunswick Scientific BioFlo 110. Periódicamente se tomaron muestras para determinar el consumo de fuente de carbono.

Los experimentos de biotransformación del citronelol por *P. digitatum* DSM 62840 en bioreactor se realizaron de acuerdo con el diseño experimental factorial multinivel 2². Se evaluó el efecto de la velocidad de agitación y de aireación sobre la biotransformación; cada variable se evaluó en dos niveles (alto y bajo), y la variable respuesta fue la concentración (mg/L) de Cit-OH producido. La extracción de sustrato remanente y de productos de biotransformación del citronelol se llevó a cabo siguiendo la metodología indicada anteriormente para 50 mL de medio.

Bajo las condiciones óptimas de las variables independientes, se realizó nuevamente la reacción de biotransformación para establecer la aproximación teórico-experimental.

El extracto en acetato de etilo obtenido de la biotransformación del citronelol bajo condiciones óptimas de velocidad de aireación y agitación, se recolectó, concentró y utilizó para purificar el Cit-OH.

2.2.8 Extracción y purificación del Cit-OH. El extracto en AcOEt de la biotransformación del citronelol por *P. digitatum* se concentró por micro-destilación fraccionada (7 veces). 10 μ L del extracto concentrado se aplicaron a platos de Sílica Gel (Merck) y se desarrollaron con diclorometano-acetona 9:1 (Abraham et al., 1986); los platos se secaron y rociaron con solución de vainillina-ácido sulfúrico-etanol (0.5 g: 0.5: 9 mL) y calentaron a 100 °C durante 1 min para la coloración de los metabolitos (Gilbert y Martín, 2006). La identificación de los compuestos eluidos se realizó por comparación con el R_f de patrones de citronelol e isómeros cis/trans óxidos de rosa; la mancha correspondiente al Cit-OH fue raspada y disuelta en AcOEt y aplicada a una columna ODS-C18 equilibrada con la fase móvil, mezcla 9:1 de acetona: diclorometano; el flujo de elución fue de 0.5 mL/min. Se recolectaron fracciones de 1.5 mL, que se analizaron nuevamente por TLC; las fracciones correspondientes a Cit-OH se reunieron; el solvente se evaporó hasta sequedad en estufa a 40 °C, para obtener el Cit-OH puro.

2.2.9 Caracterización espectral del Cit-OH puro. La fracción obtenida de Cit-OH luego de evaporar el solvente se analizó por espectroscopia de masas y RMN-¹H. Para la toma del espectro RMN el Cit-OH se disolvió en CCl₃D y se analizó en el espectrofotómetro Bruker BioSpm, operado a 400 MHz, equipo del Laboratorio de Resonancia Magnética de la UIS. El tratamiento de los datos se realizó con el programa Mestre-Nova 6.0.2-5475 Win. Los desplazamientos químicos se registraron en ppm, utilizando como referencia la señal del solvente.

2.2.10 Bioactividad del extracto de biotransformación del citronelol. Para determinar la posible aplicación del extracto en AcOEt de biotransformación del citronelol obtenido bajo condiciones óptimas de operación del biorreactor (compuesto 3), se evaluó la citotoxicidad en células de mamífero y la actividad anti-*Trypanosoma cruzi*, anti-*Leishmania* y antioxidante. Los tres primeros se analizaron en el Laboratorio de Quimioterapia del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP-UIS).

a. Preparación de los compuestos. Se pesaron 2-3 mg del compuesto 3 y se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Las soluciones stock se almacenaron a -20 °C. El Nifurtimox, la Amfotericina B (AmB) y la Miltefosina fueron utilizados como medicamentos de referencia.

b. Prueba de actividad antiparasitaria. Los epimastigotes de *T. cruzi* y los promastigotes de *L. chagasi* y *L. panamensis* fueron expuestos a diferentes concentraciones (0, 1-100 µg/mL) del compuesto 3 durante 72 h a 28 °C. Células control permanecieron sin el compuesto. En el caso de epimastigotes de *T. cruzi*, la inhibición del crecimiento se determinó por conteo directo y para epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *Leishmania* spp., por el método de reducción de la sal de tetrazolio MTT. Los resultados fueron expresados como concentración inhibitoria del 50 y 90% de los parásitos (CI₅₀ y CI₉₀) (Gómez et al., 2010; Escobar et al., 2010; Palma et al., 2009).

c. Prueba de citotoxicidad. Las células VERO (derivadas de riñón de mono verde africano) fueron expuestas a diferentes diluciones del compuesto 3 (300-0.3 µg/mL). Se realizó incubación por 72 h a 37 °C, 5% de CO₂. Se utilizó un control de muerte celular como referencia. El ensayo se realizó una sola vez. Tanto las diluciones del compuesto 3 como las del medicamento de referencia se evaluaron por triplicado. Los resultados se expresaron como concentración citotóxica para el 50 y 90% de las células (CC₅₀ y CC₉₀).

d. Actividad antioxidante. La actividad antioxidante del extracto de biotransformación del citrionelol se analizó usando el método espectrofotométrico de barrido (scavenging) del catión radical ABTS^{•+} (Cadena y Herrera, 2008; Re et al., 1999). Los resultados se expresaron como mili-equivalentes a Trolox/kg de muestra a partir de la curva de calibración de Trolox realizada con concentraciones entre 0.1-2.5 mM. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la optimización del proceso a micro-escala de la biotransformación de citrionelol utilizando células completas de los hongos *A. niger* DSM 821, *A. carbonarius* DSM 872 y *P. digitatum* 62840. De igual manera se muestran los resultados del escalado del proceso usando volúmenes de medio de 50 y 500 mL; del proceso de purificación del derivado hidroxilado mayoritario del citrionelol, Cit-OH, y su caracterización espectral, y finalmente la evaluación de citotoxicidad, actividad antiparasitaria y antioxidante del extracto de biotransformación, para determinar su posible aplicación.

2.3.1 Condiciones óptimas de crecimiento de los hongos en medio sólido.

Inicialmente, se evaluó el crecimiento de los hongos *A. carbonarius* DSM 872, *P. digitatum* DSM 62840 y *A. niger* DSM 821 en los medios de cultivo sólido PDA, MEA y YGA (**Figura 21**). En la **Tabla 1** se muestran los valores de la VCR obtenidos por los tres biocatalizadores en los diferentes medios sólidos de crecimiento. La cinética de crecimiento en medio sólido solo se ilustra para *A. carbonarius* DSM 872 (**Figura 22**).

Tabla 1 Velocidad de crecimiento radial de los hongos en diferentes medios sólidos

Hongo	Velocidad de crecimiento radial (mm/h) en medios de cultivo sólido		
	PDA	MEA	YGA
<i>Aspergillus carbonarius</i> DSM 872	0.22 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.47 ± 0.02
<i>Aspergillus niger</i> DSM 821	0.41 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.23 ± 0.04
<i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840	0.35 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.31 ± 0.02

Los mejores medios de crecimiento sólido para los biocatalizadores *Aspergillus carbonarius* DSM 872, *Aspergillus niger* DSM 821 y *Penicillium digitatum* DSM 62840 fueron YGA, MEA y PDA, respectivamente. Por ello, se seleccionaron estos medios para el mantenimiento periódico de cada cepa y para obtener la suspensión de esporas en cada caso para los experimentos de biotransformación del citronelol.

Figura 21 Cepas de *A. carbonarius* DSM 872, *P. digitatum* DSM 62840 y *A. niger* DSM 821 crecidas en medios de cultivo sólido YGA, PDA y MEA, respectivamente.

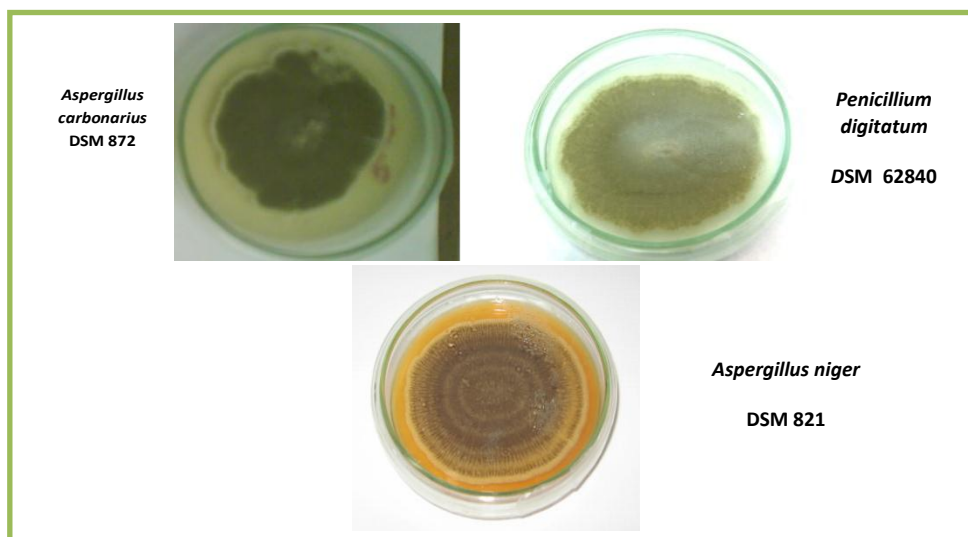
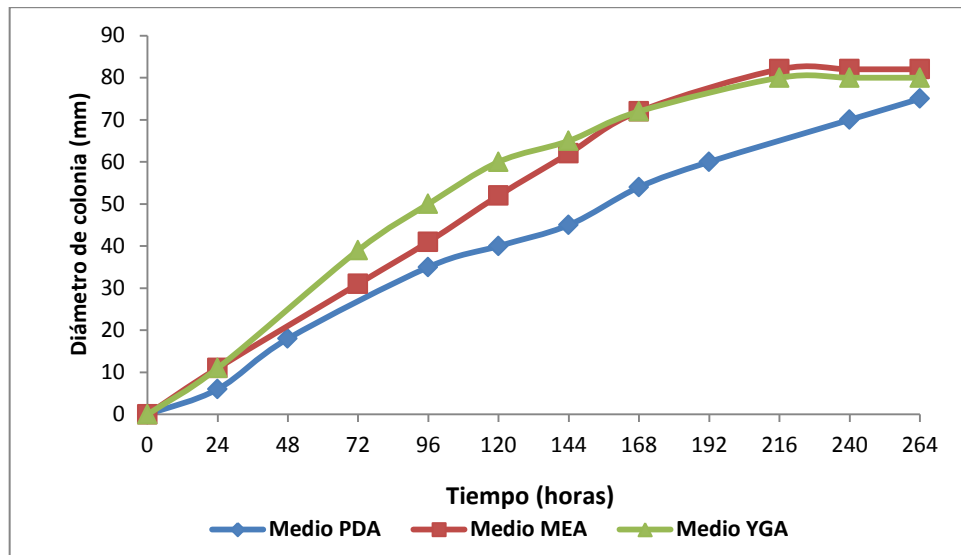


Figura 22 Cinética de crecimiento microbiano de *A. carbonarius* DSM 872 en medios PDA, MEA y YGA sobre platos de agar a 27 °C



2.3.2 Actividad antifúngica de citronelol sobre el crecimiento de *P. digitatum* DSM 62840. Teniendo en cuenta la menor VCR exhibida por *Penicillium digitatum* DSM 62840 en comparación con los otros biocatalizadores, se seleccionó este microorganismo para evaluar el efecto antifúngico del citronelol (**Tabla 2**). Los resultados muestran que a una concentración de citronelol de 2.06 mM se inhibe el crecimiento del hongo en un 25%, esta concentración se fijó como la mínima inhibitoria (CMI). Por otro lado, a esta concentración se presentó un cambio brusco en la VCR. Concentraciones superiores a 12.80 mM resultaron ser letales (CL) para el crecimiento del hongo; este efecto puede atribuirse a la toxicidad del citronelol, debido a que este compuesto tiene un $\log P_{OW}$ de 3.56 (Lapczynski et al., 2008). Varios autores (Bicas et al., 2008; Onken y Berger, 1999; Tan y Day, 1998; Ohloff 1994) han establecido que los terpenos con coeficientes de partición n-octanol/agua ($\log P_{OW}$) entre 1 y 5 causan pérdida de permeabilidad específica e integridad a la membrana celular.

Tabla 2 Efecto antifúngico del citronelol sobre el crecimiento de *P. digitatum* DSM 62840 a 23 °C

Concentración de citronelol mM)	Inhibición (%)	VCR (mm/h)
0.00	0.00	0.35 ± 0.01
0.64	7.69	0.28 ± 0.03
1.28	13.85	0.17 ± 0.03
1.92	23.08	0.15 ± 0.02
2.56	32.31	0.10 ± 0.02
3.20	40.00	0.08 ± 0.02
5.12	43.08	0.06 ± 0.02
6.40	50.77	0.06 ± 0.02
7.68	56.92	0.04 ± 0.02
9.60	84.62	0.01 ± 0.02
12.80	100.00	0.0 ± 0.00

Cabe notar que la evaluación de la actividad antifúngica del citronelol para *P. digitatum* se realizó adicionando citronelol puro y se obtuvo una CMI de 2.06 mM, concentración relativamente baja. Por lo tanto, se evaluó el efecto antifúngico del citronelol adicionado en solución etanólica al 40% (Lozano, 2007), utilizando concentraciones entre 0-50 mM. Los resultados presentados en la **Tabla 3** indican que la presencia de etanol en el medio hace que las células de *P. digitatum* DSM 62840 toleren concentraciones mayores de sustrato por lo que la CMI se alcanzó con una concentración 12.8 mM de citronelol y concentraciones ≥ 150 mM son letales. Por lo anterior, se seleccionó la concentración de 12.8 mM de citronelol adicionado en solución etanólica al 40% para llevar a cabo los experimentos de biotransformación.

Tabla 3 Efecto antifúngico del citronelol en solución etanólica al 40% sobre el crecimiento de *P. digitatum* DSM 62840 a 23 °C

Concentración de citronelol (mM)	Inhibición (%)	VCR (mm/h)
0.00	0.0	0.35 ± 0.01
1.28	5.2	0.30 ± 0.02
1.92	8.4	0.27 ± 0.02
2.56	14.3	0.22 ± 0.01
5.12	17.9	0.18 ± 0.01

Concentración de citronelol (mM)	Inhibición (%)	VCR (mm/h)
12.8	24.8	0.12 ± 0.01
25.0	37.5	0.09 ± 0.01
50.0	53.6	0.07 ± 0.01
75.0	70.7	0.05± 0.02
100.0	88.4	0.02± 0.01
150.0	100.0	0.00± 0.00

Algunos mecanismos propuestos para explicar la tolerancia a etanol u otro solvente por microorganismos en especial por bacterias se basan principalmente en la reacciones de adaptación que involucran alteraciones en la composición de la membrana particularmente en la composición de ácidos grasos, fosfolípidos y en el contenido proteínico y cambios en la isomería de ácidos grasos, paso de cis a trans (Heipieper et al., 1994).

2.3.3 Optimización del proceso de biotransformación. Las variables analizadas para optimizar el proceso de biotransformación del citronelol por células completas de hongos fueron: biocatalizador, pH del medio, medio de cultivo líquido, fase de crecimiento del hongo, concentración de sustrato e inducción por sustrato y efecto antifúngico del citronelol.

a. Efecto del medio líquido en la biotransformación. La biotransformación del citronelol se llevó a cabo en los medios líquidos YMPG y MYB de pH 2.5, usando cepas de *A. niger* DSM 821, *A. carbonarius* DSM 872 y *P. digitatum* DSM 62840. Se observó que todos los hongos utilizados mostraron capacidad para hidroxilar el C-7 del citronelol y producir el Cit-OH (**Figura 23**) lo que significa que en todos actúa inicialmente una monooxigenasa de citocromo P450, responsable de oxidación del enlace olefínico, y posteriormente una hidrogenasa, que reduce el epóxido, dando lugar al hidroxiderivado. A diferencia, la hidroxilación de carbonos terminales (C-10) en alcoholes monoterpénicos alquílicos, ha sido reportada por Madhava et al., (1988) y se lleva a cabo por acción de MO tipo Citcromo P-450.

Ademas, como se muestra en la **Tabla 4**, el medio líquido y el biocatalizador influyen en la bioconversión. En todos los casos, sin embargo, los mayores valores de producción de biomasa (**Tabla 5**), actividad específica de bioconversión se alcanzaron en medio MYB, y con *P. digitatum*, seguido de *A. niger*. Con *A. carbonarius* y en medio YMPG estos parámetros presentaron los menores valores.

Figura 23 Bioconversión del citranelol por hongos

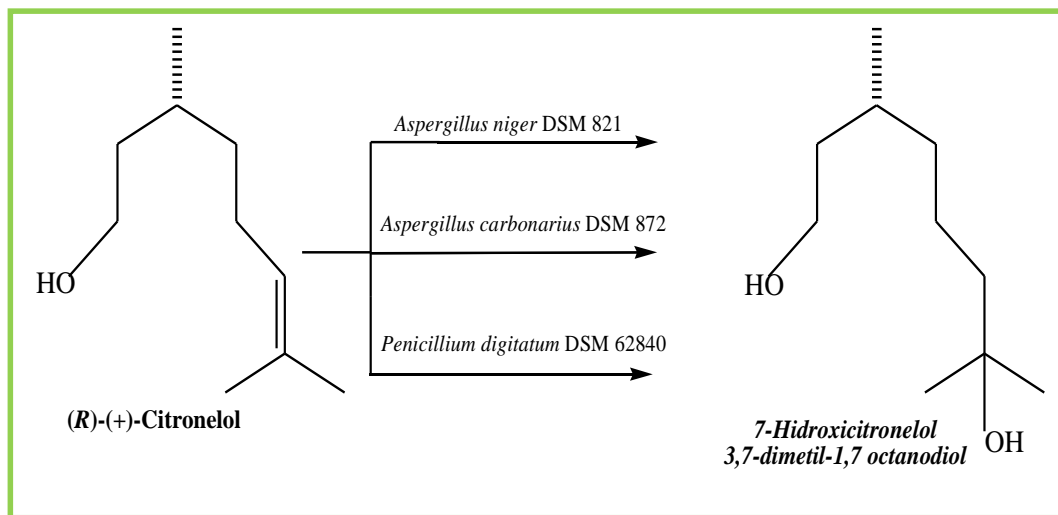


Tabla 4 Producción de biomasa por *A. niger*, *A. carbonarius* y *P. digitatum*, en los medios YMPG y MYB, a las 48 horas, a 150 rpm, 27 °C y pH 2.5

Concentración de biomasa (g/L)	<i>Aspergillus niger</i> DSM 821		<i>Aspergillus carbonarius</i> DSM 872		<i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840	
	Medio YMPG	Medio MYB	Medio YMPG	Medio MYB	Medio YMPG	Medio MYB
		3.48±0.18	3.67±0.20	2.28±0.19	3.44±0.09	2.69±0.17
mgCit-OH/g célula seca*	219,1±110	227.9±132	151.1±129	212.1±74	372.4±194	289.1±127

*Actividad específica de bioconversión. Determinada utilizando la concentración de Cit-OH a los 12 días de reacción

Por lo anterior, se seleccionaron el medio MYB y los hongos *A. niger* DSM 821 y *P. digitatum* DSM 62840, para continuar evaluando el efecto de otras variables en la biotransformación del citranelol.

Es importante aclarar que estos experimentos se llevaron a cabo a pH 2.5 y que dieron lugar también a una reacción de auto-oxidación del citranelol. De este modo, la producción de Cit-OH a este pH resulta del efecto combinado de las dos catálisis: enzimática (90%) y química (10%). Resultados similares de autooxidación fueron reportados por Adams et al., (2003) y Demyttenaere et al., (2004), usando un pH en el medio de 3.5.

A los 12 días de reacción, en todos los casos se producen trazas del isómero cis-óxido de rosa en concentraciones de 11.1, 19.2 y 26.1 mg/L, usando como biocatalizadores *A. carbonarius*, *A. niger* y *P. digitatum*, respectivamente.

Tabla 5 Efecto del medio de cultivo en la biotransformación del citranelol usando células completas de *A. niger*, *A. carbonarius* y *P. digitatum*, a 150 rpm, 27 °C y pH 2.5

Concentración de Cit-OH (mg/L)						
Tiempo (días)	<i>Aspergillus niger</i> DSM 821		<i>Aspergillus carbonarius</i> DSM 872		<i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840	
	Medio YMPG	Medio MYB	Medio YMPG	Medio MYB	Medio YMPG	Medio MYB
0	0	0	0	0	0	0
4	179.2±13.6	252.6±18.7	90.6±7.4	208.5±15.6	308.1±28.8	277.8±19.9
8	310.1±9.6	294.3±22.2	313.1±23.3	311.5±17.9	454.4±20.2	671.9±19.7
12	761.2±20.1	855.4±32.8	343.5±22.9	736.4±21.8	993.2±28.8	1060.5±43.2

b. Efecto del pH sobre la biotransformación del citranelol. El efecto del pH en la biotransformación del citranelol fue evaluado usando células completas de *A. niger* DSM 821 y *P. digitatum* DSM 62840, en el medio MYB a pHs ácidos de 2.5 y 3.5. A un valor de pH más ácido la transformación microbiana con *A. niger* y *P. digitatum* es altamente selectiva formandose el hidroxicitranelol (Cit-OH) como producto principal y trazas del isómero cis-óxido de rosa (**Figura 24**) mientras que

a pH 3.5 la selectividad disminuye dando lugar a Cit-OH, los dos isómeros cis/trans óxidos de rosa y 2,6-dimetil-2,6-octadieno usando *P. digitatum*. Con *A. niger* adicionalmente se produce geraniol (**Figura 25**).

En la **Tabla 6** se reporta la cantidad de los diferentes metabolitos producidos.

Figura 24 Cromatograma de biotransformación de citronelol por *A. niger* DSM 821 en el medio MYB de pH 2.5 a 27 °C

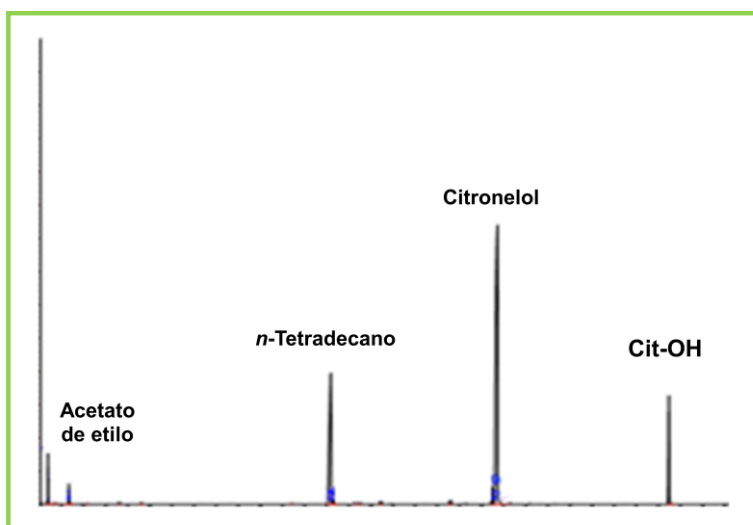
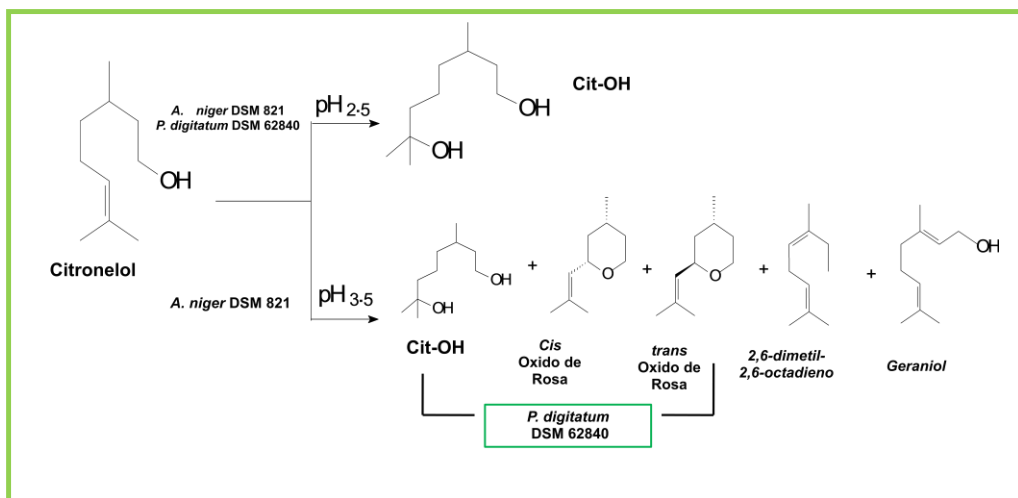


Figura 25 Metabolitos producidos de la biotransformación de citronelol por *A. niger* DSM 821 a pHs ácidos en el medio YMPG a 8 días de reacción



El efecto del pH sobre la biotransformación del citronelol ha sido evaluado por otros autores. Lozano et al., (2007), reportan la producción de Cit-OH por biotransformación de citronelol usando *A. niger* DSM 821 en medio sólido PDA de pH inicial 5.6 ± 0.2 . A los 15 días de reacción el pH descendió a 1.5 y el porcentaje relativo de Cit-OH fue del 62% (total de compuestos eluidos). En este trabajo, también se formaron a nivel de trazas los isómeros *cis/trans* óxidos de rosa (Lozano et al., 2007).

Respecto a estos compuestos, Demyttenaere et al., (2004) reportan la producción de *cis/trans*-óxidos de rosa usando cepas de *P. digitatum*, en medio YMPG de pH 4.5. Con el basidiomiceto *C. carcharias* estos isómeros se produjeron en un medio complejo mineral de pH 5.0-5.2 (Onken y Berger, 1999).

Tabla 6. Relación de metabolitos obtenidos en la biotransformación del citronelol por *A. niger* DSM 821 y *P. digitatum* DSM 62840 en medio MYB, a 27 °C, 150 rpm, a una concentración de citronelol 12.8 mM y 12 días de reacción

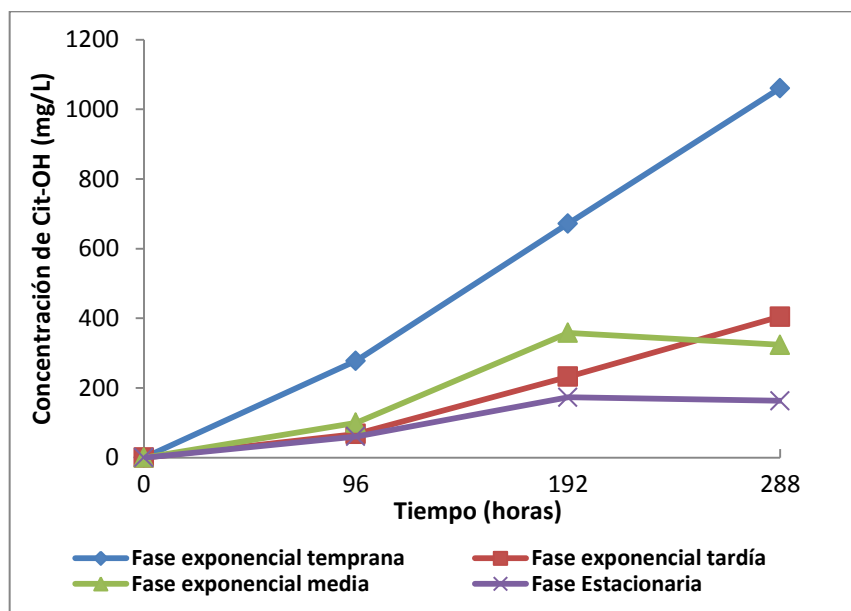
Productos	Concentración (mg/L), pH 2.5	
	<i>Aspergillus niger</i> DSM 821	<i>Penicillium digitatum</i> DSM 62840
Citronelol remanente	1144.6±55.2	939.5±39.9
Cit-OH	855.4±32.8	1060.5±43.2
<i>cis</i> óxido de rosa	19.2±1.8	26.1±1.4
	Concentración (mg/L), pH 3.5	
Citronelol remanente	1454.9±86.0	1223.8±66.2
Cit-OH	423.1±33.3	715.2±41.4
<i>cis</i> óxido de rosa	34.5±12.2	39.9±8.8
<i>trans</i> óxido de rosa	27.8±9.7	ND
2,6-dimetil-2,6-octadieno	23.2±5.9	21.1±6.6
Geraniol	36.5±4.6	ND

ND: No detectado.

En este estudio, para continuar evaluando el efecto de otras variables en la biotransformación de citronelol, se seleccionó el pH 2.5.

c. **Efecto de la fase de crecimiento de los hongos sobre la biotransformación del citronelol.** El citronelol fue adicionado al medio de cultivo con el microorganismo en diferentes fases de crecimiento. En todos los casos, las células de *P. digitatum* producen Cit-OH (**Figura 2.6**), pero la máxima concentración (1060.5 ± 43.2 mg/L), se obtiene cuando el citronelol se adiciona al medio que contiene el microorganismo en la fase exponencial temprana (48 h). Con el *P. digitatum* en las fases exponencial media, exponencial tardía y estacionaria, la producción de Cit-OH decrece en un 62, 69 y 85%, respectivamente.

Figura 26 Efecto de la fase de crecimiento de *Penicillium digitatum* DSM 62840 sobre la biotransformación de citronelol. Condiciones de cultivo: medio MYB de pH 2.5 a 27 °C y 150 rpm, citronelol 12.8 mM

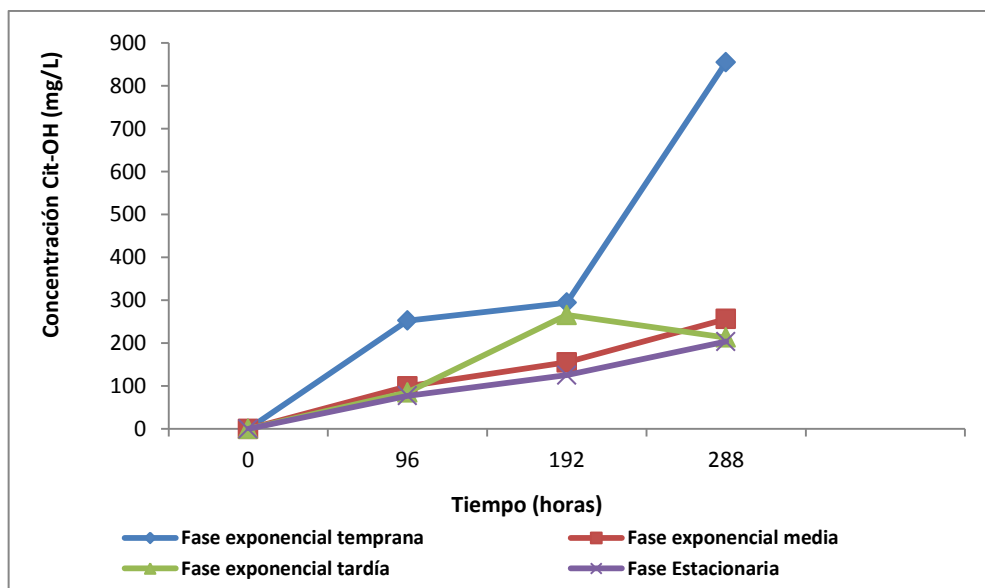


El *A. niger* DSM 821 tiene comportamiento similar al *P. digitatum*, en todos los casos; las células producen Cit-OH y su concentración aumenta con el tiempo, alcanzando un máximo (855.4 ± 32.8 mg/L), a los 12 días de reacción cuando el citronelol se ha adicionado al medio en la fase exponencial temprana del hongo

(48 h) (**Figura 27**). En las otras fases de crecimiento, la producción de Cit-OH decrece entre el 70 y 76%.

En este caso, aun cuando la máxima concentración de Cit-OH se alcanza cuando el hongo está en fase exponencial temprana, se seleccionó el *P. digitatum* DSM 62840 para continuar los estudios, en razón a que con él se alcanza la máxima bioconversión del producto de interés.

Figura 27 Efecto de la fase de crecimiento de *Aspergillus niger* DSM 821 sobre la biotransformación de citronelol. Condiciones de cultivo: medio MYB de pH 2.5 a 27 °C y 150 rpm



d. Efecto de la concentración de sustrato. Las diferentes concentraciones del sustrato afectaron la selectividad y conversión del citronelol por *P. digitatum*. Concentraciones entre 12.8 y 50 mM fueron favorables para la producción de Cit-OH y del cis óxido de rosa, mientras que concentraciones superiores afectan negativamente la producción de estos dos DOCit y la selectividad de la reacción, formando otros compuestos, como se muestra en la **Tabla 7**. En este caso, aun cuando la mayor bioconversión se alcanzó con una concentración de citronelol de

50 mM, se seleccionó la concentración de 12.8 mM, teniendo en cuenta que el incremento en la producción de Cit-OH entre estas dos concentraciones fue solo de 5.6% y el citronelol en cualquier caso, puede tener un efecto tóxico debido a su coeficiente de partición Log P_{OW} de 3.56 (Lapczynski et al., 2008).

Tabla 7 Metabolitos producidos durante la biotransformación de citronelol por *P. digitatum* a diferentes concentraciones de sustrato en el medio MYB de pH 2.5, a 27 °C y 150 rpm

Concentración citronelol (mM)	Concentración de productos (mg/L)				
	Cit-OH	Cis óxido de rosa	Cis Geraniol	Trans Geraniol	3,7-dimetil-1,7-Octadieno
0	0	0	0	0	0
12.8	1060.3±43.2	26.1±1.4	ND	ND	ND
20	1070.3±43.2	63.0±4.6	20.5±1.7	ND	72.5±8.8
32	1098.7±40.1	96.8±6.2	68.9±7.5	34.6±2.8	169.9±12.3
50	1112.3±38.4	140.8±13.1	118.2±4.59	92.6±3.1	140.65±16.7
75	929.5±33.2	123.5±10.9	75.7±3.8	51.8±2.3	71.2±10.7
100	889.4±29.7	112.1±10.2	46.8±6.2	49.5±2.2	60.5±5.9

ND: No detectado.

Adicionalmente, es de destacar que la biotransformación del citronelol se dirigió también hacia la producción del isómero *cis*-óxido de rosa, y su máxima concentración, de 140.8±13.1 mg/L, se obtiene utilizando una concentración de citronenol 50 mM. A diferencia de otras investigaciones solo se obtuvo el isómero *cis*-óxido de rosa, y el valor alcanzado, supera los valores reportados por otros autores (Maróstica et al., 2007; Demyttenaere et al., 2004; Adams et al., 2003). Por lo anterior, las células de *P. digitatum* DSM 62840 biosintetizan una MO-P450 estereo-selectiva que da lugar al isómero *cis*-óxido de rosa.

Otros DOCit formados a concentraciones mayores a 12.8 mM son los isómeros *cis/trans* geraniol y el 3,7-dimetil-1,7-octadieno.

e. Efecto inductor del citronelol sobre la capacidad de biotransformación. La adición previa de citronelol como inductor de las células del hongo *P. digitatum* no incrementaron la producción de Cit-OH comparado con el control a los 12 días de reacción (**Tabla 8**). Los resultados anteriores sugieren que las enzimas del complejo citocromo P450 de *P. digitatum* DSM 62840, responsables de la oxifuncionalización del citronelol, no son inducibles.

Tabla 8 Efecto inductor del citronelol sobre la biotransformación por *P. digitatum* DSM 62840 en medio MYB de pH 2.5, concentración de citronelol 12.8 mM, a 27 °C, 150 rpm y 12 días de reacción

Productos de biotransformación	Concentración de productos (mg/L)	
	Sin inductor	Con inductor
Citronelol remanente	2039.1±65.5	2084.3±77.9
Cit-OH	1060.3±43.2	987.0±36.3
<i>Cis</i> óxido de rosa	26.1±1.4	54.1±9.7

Maróstica y Pastore (2007) evaluaron el efecto inductor del citronelol sobre una cepa de *Penicillium* sp. En este caso los autores encontraron que las células al estar en contacto durante 8 días con el citronelol, aprovechan inicialmente el sustrato monoterpénico como fuente de carbono y posteriormente metabolizan el terpeno, lo que se manifiesta en cambios morfológicos (color), desarrollados por la biosíntesis de pigmentos extracelulares tipo melaninas. La formación de estos compuestos disminuyen la producción de los isómeros *cis/trans* óxidos de rosa en un 90%, por lo que los autores concluyen que las monooxigenasas de *P. digitatum*, no son inducibles.

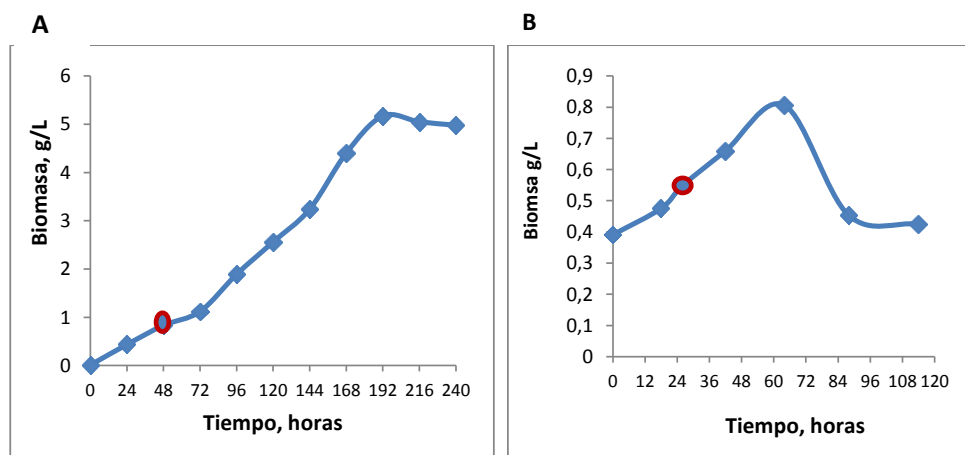
Además del estudio mencionado, no hay otros que hayan evaluado el efecto inductor.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos a escala de laboratorio, se estableció que las células completas de los biocatalizadores *A. niger* DSM 821, *A. carbonarius* DSM 872 y *P. digitatum* DSM 62840 son fisiológicamente activas y tienen capacidad para oxifuncionalizar el citranelol con alta selectividad formando el derivado hidroxilado Cit-OH. La bioconversión del citranelol es afectada por variables como biocatalizador, edad del hongo, pH, composición del medio líquido y concentración de sustrato. La mayor biotransformación (1112.3 ± 38.4 mg Cit-OH/L) se da con *P. digitatum* DSM 62840 crecido hasta fase exponencial temprana (48 h), en el medio MYB de pH 2.5, con una concentración de citranelol 50 mM, un tiempo de reacción de 12 días a 27 °C y 150 rpm. Sin embargo, por el efecto de la toxicidad del citranelol, se escoge una concentración de sustrato de 12.8 mM, alcanzando con esta una concentración de 1060.3 ± 43.2 mg Cit-OH/L, una conversión del 53% (mg producto/mg sustrato inicial), una actividad específica de bioconversión de 288.9 ± 13.0 mg Cit-OH/g célula seca y una productividad del $3.68 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$. No obstante, la transformación del citranelol resulta de un efecto combinado de auto-oxidación (10%) y biotransformación (90%), debido al bajo valor de pH (2.5).

2.3.4 Escalado del proceso de biotransformación. En las condiciones seleccionadas anteriormente, se procedió a escalar a 50 mL; en este caso se evaluó el efecto de la forma metabólica del hongo: solución de esporas y micelio. Posteriormente se escaló a 500 mL.

2.3.4.1 A 50 mL de medio. Previamente fue necesario establecer el tiempo requerido para alcanzar la fase exponencial temprana (fase óptima) de crecimiento de *P. digitatum* DSM 62840, en un volumen de medio MYB de pH 2.5 de 50 mL, para los dos sistemas: micelio (con-precultivo) o suspensión de esporas (sin-precultivo) (**Figura 28**). Para el sistema sin-precultivo el tiempo fue de 48 h, mientras que con-precultivo fue de 36 h; la biomasa producida en cada caso fue 0.97 ± 0.09 g/L y 0.58 ± 0.08 g/L, respectivamente.

Figura 28 Cinética de crecimiento microbiano de *P. digitatum* DSM 62840 en 50mL de medio MYB de pH 2.5 a 27 °C y 150 rpm. (A) Con Suspensión de esporas y (B) Con micelio.

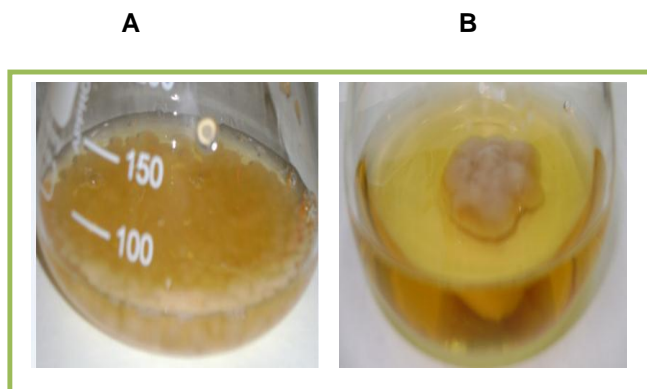


La morfología de *P. digitatum* fue diferente, como se muestra en la **Figura 29**. Inoculando el medio con SS se forma un pellet (**Figura 29 A**) mientras que inoculándolo con micelio aumenta de tamaño y continúa en forma de agregado (**Figura 29 B**); esta situación afecta la biotransformación de citronelol, como se ve en la **Tabla 9**; con SS se obtiene 2.15 veces más Cit-OH y la selectividad es mejor.

Comparando los resultados alcanzados en 5 mL con los obtenidos en 50 mL, la concentración de Cit-OH disminuyó el 16% al utilizar SS, y el 61%, con micelio. A escala de 5 mL no se alcanza a formar definitivamente el pellet y macroscópicamente se observa uno solo, así el área de contacto hongo-sustrato es mayor. En un volumen de 50 mL inoculado con SS, se forman varios pellet que podrían tener un comportamiento individual y diferente; en el caso del medio inoculado con micelio, este aumenta de tamaño en forma de un agregado compacto impidiendo una interacción E-S favorable para la oxi-funcionalización del citronelol teniendo en cuenta que las monooxigenasas CYP-450 son enzimas

ligadas a la membrana celular. Por ello, para escalar a 500 mL, se seleccionó el sistema de inoculación con SS.

Figura 29 Morfología de *P. digitatum* DSM 62840 adquirida en el medio MYB de pH 2.5 a 27 °C y 150 rpm



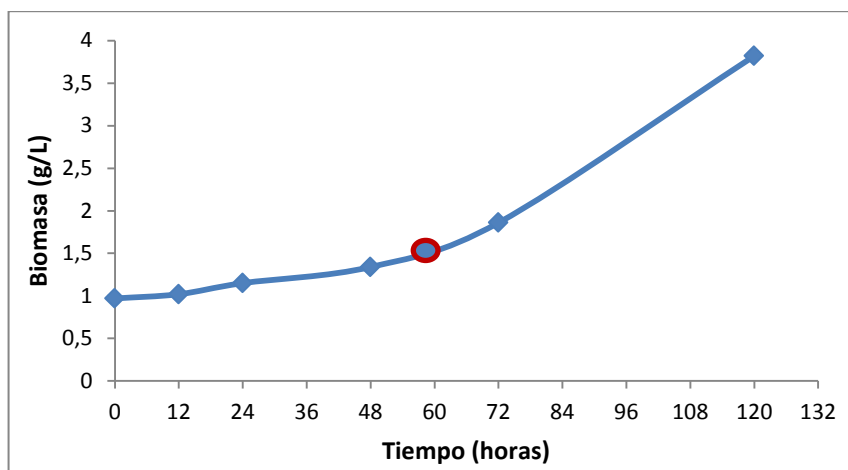
2.3.4.2 A 500 mL de medio de cultivo. Previamente se estableció el tiempo en el que *P. digitatum* DSM 62840 alcanza la fase exponencial óptima de crecimiento en 500 mL de medio MYB de pH 2.5 ubicados en un erlenmeyer de 1 L agitado mecánicamente a 27 °C y 100 rpm con una producción de biomasa de 1.48 ± 0.12 g/L (**Figura 30**). Este tiempo fue de 60 h.

Tabla 9 Productos de biotransformación del citrionelol por *P. digitatum* DSM 62840 en 50 mL de medio MYB de pH 2.5 a 27 °C, 150 rpm, 12 días de reacción y concentración de citrionelol 12.8 mM

Productos	Con suspensión de esporas	Con micelio
Citrionelol remanente	1030.1±48.8	1456.5±45.5
Cit-OH	890±37.7	413.9±28.3
<i>cis</i> óxido de rosa	56.1±9.9	14.5±3.3
<i>trans</i> óxido de rosa	23.8±4.1	4.3±0.8
<i>cis</i> -2,6-dimetil-2,6-Octadieno	ND ^a	65.4±4.8
3,7-dimetil-6-octen-1-ol	ND ^a	45.4±3.2
Conversión (%)	48.5±3.3	27.2±2.2
Rendimiento (%) ^b	44.5±1.5	20.7±0.9

^a ND: No detectado; ^b (mg Cit-OH/mg Citrionelol*100)

Figura 30 Cinética de crecimiento de *P. digitatum* DSM 62840 en 500 mL de medio MYB de pH 2.5, a 27 °C y 100 rpm agitado mecánicamente



Selección de las condiciones de operación del bioreactor para producir Cit-OH

En el proceso de biotransformación del citronelol por *P. digitatum* en biorreactor se evaluó el efecto de la velocidad de agitación y de aireación mediante la aplicación del diseño experimental factorial multinivel 2². En la **Tabla 10** se presentan los valores de los niveles evaluados. Los valores de la variable respuesta (concentración de Cit-OH, mg/L) se presentan en la **Tabla 11**.

Tabla 10 Variables y niveles evaluados en el diseño factorial multinivel 2²

Variables	Niveles	
	-1	+1
Velocidad de agitación (rpm)	100	150
Velocidad de aireación (vvm ^a)	0.00	0.05

^avvm: velocidad de aireación por volumen de medio

Tabla 11 Matrix del diseño factorial multinivel 2², y la concentración de Cit-OH obtenida por GC-MS, 12 días de reacción

Puntos del diseño	Niveles de las variables independientes		Variable respuesta
	Agitación (rpm)	Aireación (vvm)	Concentración de Cit-OH (mg/L)
1	-1	-1	255.2
2	1	-1	720.0
3	-1	1	173.2
4	1	1	185.3

Los mínimos y máximos de concentración de Cit-OH fueron de 173.2 y 720 mg/L, equivalentes a una conversión del 8.7 y 36%, respectivamente; el valor más alto de concentración de Cit-OH se obtuvo en el nivel más alto de velocidad de agitación (150 rpm) y sin aireación.

Los datos fueron analizados aplicando análisis estadístico de efectos principales, análisis de varianza (ANOVA) y metodología de superficie de respuesta, empleando el programa de análisis estadístico STATGRAPHICS CENTURION XV. El análisis de efectos principales, que permite evaluar por separado el efecto de cada una de las variables analizadas, muestra que la producción de Cit-OH es directamente proporcional a la agitación e inversamente proporcional a la aireación (**Figura 31**). En tanto que el análisis de varianza ANOVA, que permite ver el efecto de cada una de las variables y la interrelación entre ellas, muestra que la velocidad de aireación (B) y su interacción con la velocidad de agitación (AB), tienen un efecto negativo, mientras que la velocidad de agitación (A) tiene un efecto positivo (**Tabla 12**).

Figura 31 Diagrama de efectos principales

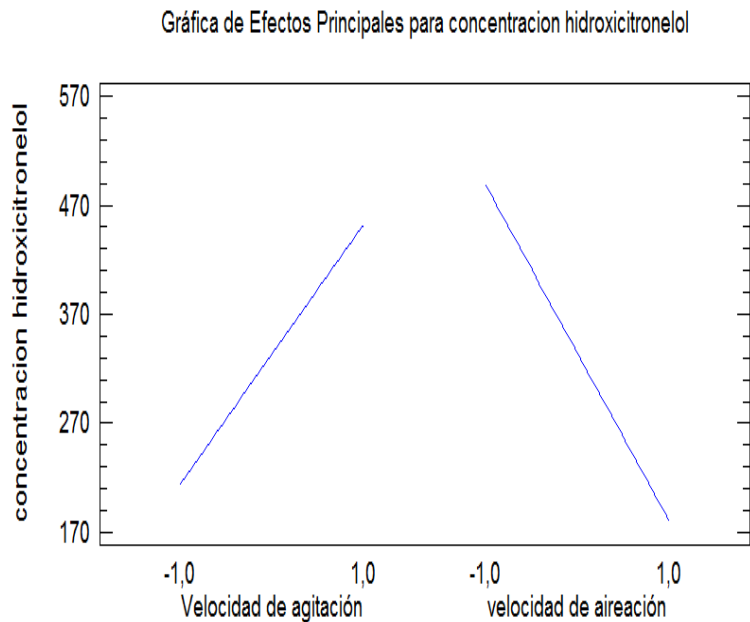
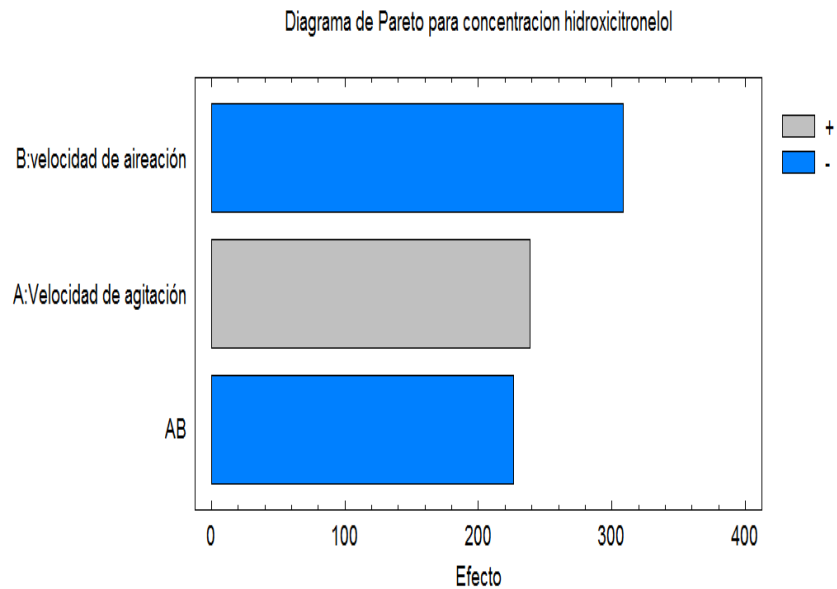


Tabla 12 Efectos estimados y análisis de varianza para la concentración de Cit-OH (mg/L)

Efecto	Coefficiente de regresión	Ss	Df
Promedio	333,425		
A: agitación	119,225	56858,4	1
B: velocidad aireación	-154,175	95079,7	1
Ab	-113,175	51234,3	1
Error total		0,0	0
Total (corr.)		203172	3
Coeficiente de determinación, r^2		100,00	

Abreviaturas: SS= Suma de cuadrados; Df=grados de libertad

Figura 32 Diagrama de estandarización de efectos



El coeficiente de determinación (R^2) para la variable respuesta fue 1.0, que indica que no se observan variaciones en los puntos del diseño y que se puede aplicar el modelo desarrollado.

La ecuación de regresión ajustada a los datos despliega la siguiente ecuación de modelo ajustado:

$$CCit-OH = 333,425 + 119,225*VAg - 154,175*VAi - 113,175*VAg*VAi$$

Donde CCit-OH corresponde a la concentración de Cit-OH (mg/L), VAg a la velocidad de agitación, y VAi, a la velocidad de aireación.

A partir de esta ecuación se obtiene la gráfica de superficie de respuesta (**Figura 33**) que permite establecer que la máxima concentración de citronelol se obtiene en un sistema en el cual se aplica una velocidad de agitación de 150 rpm y sin aireación. Bajo estas condiciones, el modelo predice una formación de

hidroxicitronelol del orden de 684 mg Cit-OH/L. Al realizar el experimento en estas condiciones, para corroborar el modelo, se encontró que la bioconversión a esta escala (720 mg/L de Cit-OH) disminuye en un 32%, comparada con la alcanzada a escala de laboratorio, mientras que la selectividad no se ve afectada, se mantiene la formación de los mismos compuestos (**Figura 34**). La disminución obtenida es aceptable, teniendo en cuenta que se trata de un sistema biológico y que a un mayor volumen es posible que el comportamiento individual del microorganismo sea diferente; además, es posible que se manifiesten los efectos de inhibición por producto (Duetz et al., 2001).

Figura 33 Superficie de Respuesta Estimada para Cit-OH, luego de 12 días de biotransformación como función de la velocidad de aireación y agitación

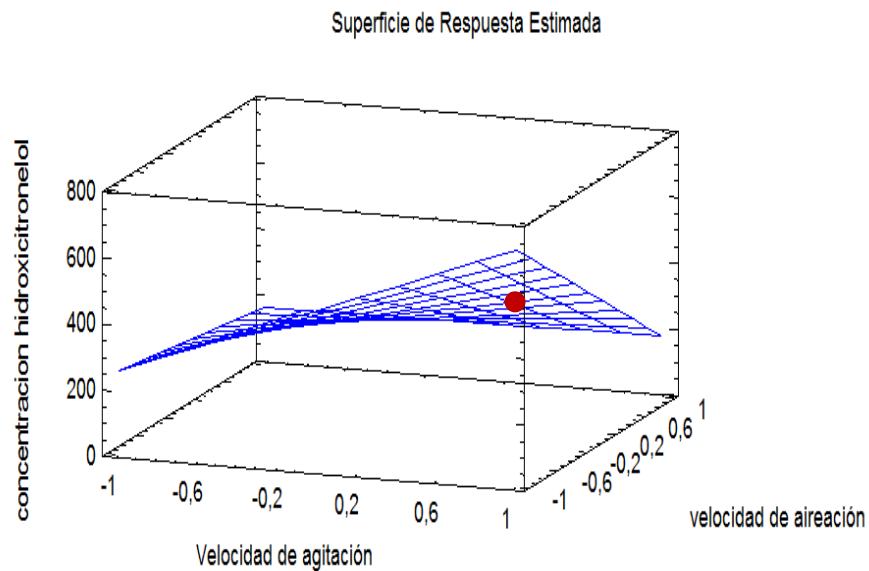
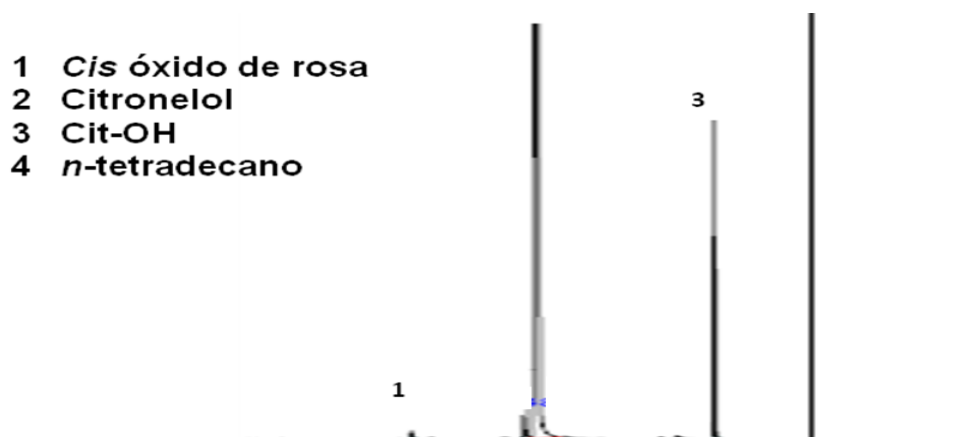


Figura 34 Cromatograma de biotransformación de citronelol por *P. digitatum* en biorreactor a 150 rpm y 0.05 vvm



Un aspecto importante de destacar en el escalado a 500 mL es que la aireación afecta notoriamente la selectividad, como se refleja en los datos mostrados en la **Tabla 13**, debido probablemente a que el efecto combinado agitación/aireación en el medio permite rearrreglos intramoleculares de las moléculas de citronelol y del DOCit, Cit-OH. Además se lleva a cabo fragmentación y ciclación de las moléculas de sustrato, dando lugar a nuevos productos. También se presenta pérdida de especificidad de las enzimas MO-P450.

Finalmente se puede decir que el escalado progresivo del proceso de biotransformación del citronelol por *P. digitatum* DSM 62840 utilizando primero un volumen de medio 10 veces mayor, bajo las condiciones óptimas obtenidas en el proceso a lab-scale, resultó ser dependiente de la morfología del hongo y afectó la bioconversión. El producto mayoritario continuó siendo el Cit-OH y la máxima concentración de 890 mg/L se consiguió realizando el proceso con suspensión de esporas de *P. digitatum*. Comparado con el bioensayo a 5 mL de medio, la concentración de Cit-OH disminuyó en un 16%.

A un volumen de medio 100 veces mayor, el proceso se llevó a cabo en biorreactor, utilizando agitación mecánica. Pese a optimizar la velocidad de

aireación y de agitación, la bioconversión de Cit-OH disminuyó en un 32%. En estas condiciones, se alcanzó una conversión de sustrato del 38.5%, una actividad específica de bioconversión respecto al Cit-OH de 476 mg/g célula seca y una productividad del proceso de biotransformación de citronelol de 2.50 mg Cit-OH L⁻¹h⁻¹.

Cabe destacar que a la fecha no hay estudios semejantes.

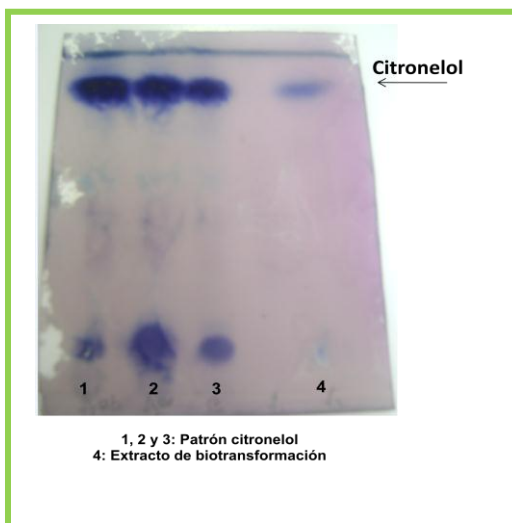
Tabla 13 Metabolitos producidos en la biotransformación de citronelol por *P. digitatum* DSM 62840 en 500 mL de medio MYB de pH 2.5 ubicados en bioreactor a las diferentes condiciones de operación

Productos	Concentración promedio (mg/L)			
	(100 rpm, 0.00vvm)	(150 rpm, 0.00 vvm)	(100 rpm, 0.05 vvm)	(150 rpm, 0.00 vvm)
Citronelol remanente	1616.0	1231.0	1653.5	1501.7
Cit-OH	255.2	720	173.2	185.3
Cis óxido de rosa	56.7	31.9	20.7	14.1
Trans óxido de rosa	20.4	17.0	7.3	4.9
cis-2,6-dimetil-2,6-octadieno	51.7	ND	ND	ND
2,3 dimetil pentano	ND ^a	ND	6.26	4.8
3-metil-hexano	ND	ND	3.7	18.8
2,7-dimetil-1-octanol	ND	ND	12.5	8.31
Geraniol	ND	ND	122.8	ND
2-metil-hexano	ND	ND	ND	16.2
Heptano	ND	ND	ND	4.4
Metil-ciclohexano	ND	ND	ND	9.4
Limoneno	ND	ND	ND	145.1
Total biotransformación	384.0	769	346.5	498.3
Conversión (%)	19.2	38.5	17.3	24.9
Rendimiento (%)^b	8.17	23.04	5.54	5.93

^a ND: No detectado; ^b Rendimiento: (mg Cit-OH/mg Citronelol)*100

2.3.5 Purificación y caracterización de Cit-OH. Para purificar el citronelol se recogieron los extractos del proceso utilizando 500 mL de medio. El extracto fue concentrado en un factor de 10 por microdestilación fraccionada. El extracto concentrado se utilizó para purificar el Cit-OH usando tres cromatografías consecutivas; la primera fue cromatografía líquida en columna sobre Sílica Gel 60 usando como fase móvil la mezcla binaria diclorometano-acetona (9:1) (Abraham et al., 1986); la segunda fue la cromatografía de capa fina (TLC) utilizada para el análisis de las fracciones recolectadas en la primera cromatografía. Teniendo el perfil cromatográfico del extracto sin purificar y del patrón citronelol como comparación, se seleccionaron las fracciones que correspondieron al Cit-OH (**Figura 35**).

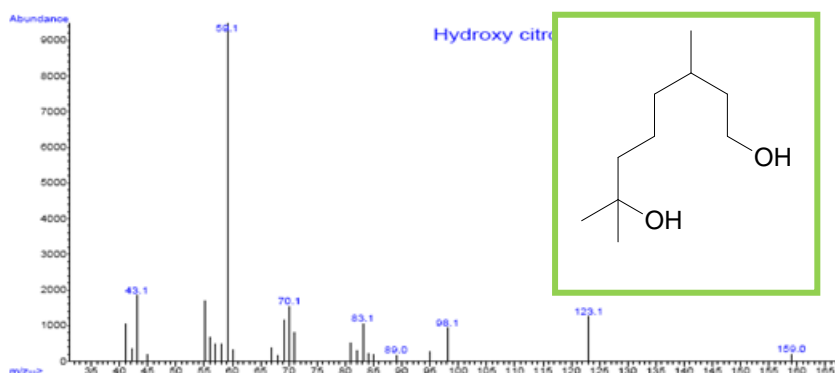
Figura 35 Cromatografía de capa fina del extracto concentrado de biotransformación del citronelol por *P. digitatum* DSM 62840 sin purificar. 1, 2 y 3 patrón del citronelol; 4, extracto de biotransformación



La mancha correspondiente al Cit-OH sobre la placa de TLC fue raspada y disuelta en AcOEt y aplicada a una columna ODS-C18 equilibrada con la fase móvil, mezcla 9:1 de acetona: diclorometano. El flujo de elución fue de 0.5 mL/min. Se recolectaron fracciones de 1.5 mL y se analizaron nuevamente por TLC. Las

fracciones correspondientes a Cit-OH se reunieron; a esta muestra se le determinó su espectro de masas (**Figura 36**).

Figura 36 Espectro de masas obtenido por GC-MS (EIMS, 70 eV) del Hidroxicitronelol

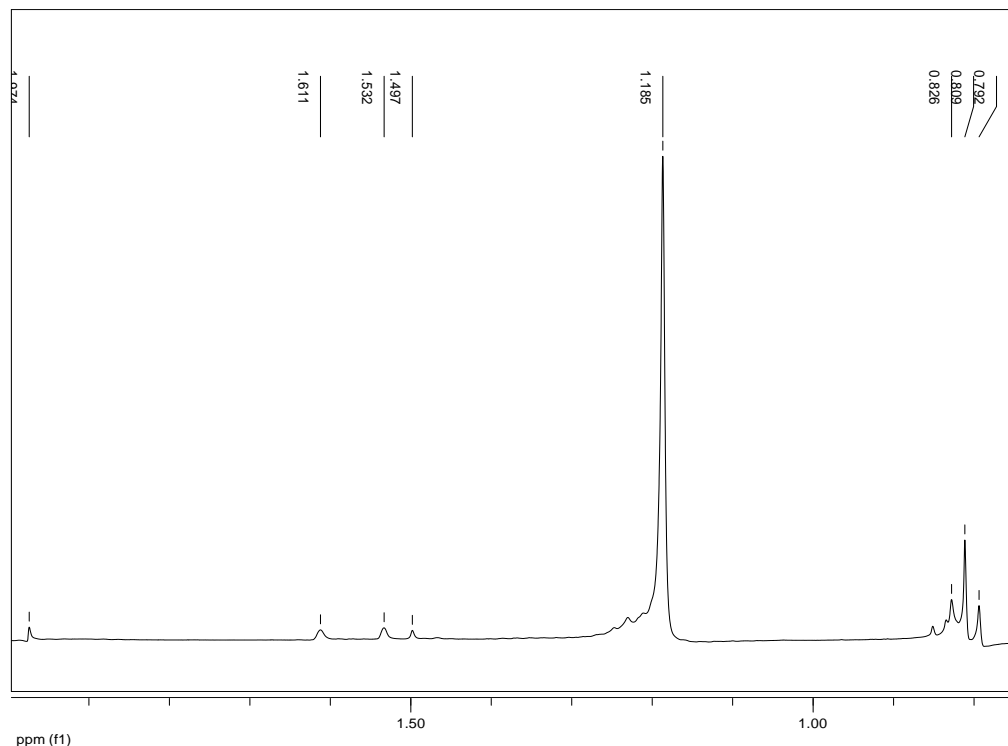


El espectro de masas del hidroxicitronelol se caracteriza por la presencia de los fragmentos diagnóstico m/z: 59.1 $[M-(CH_2)_6CH_2OH]^+$, 43.1 $[M-O-CH_2-(CH_2)_5CH_2OH]^+$, 159.0 $[M-CH_3]^+$ y 123.1 $[M-CH_3-(H_2O)_2]^+$.

El solvente presente en la fracción recolectada luego de la cromatografía de columna sobre Sílica-Gel 60, se evaporó hasta sequedad en estufa a 40 °C, para obtener el Cit-OH puro y determinar su espectro RMN- 1H (**Figura 37**).

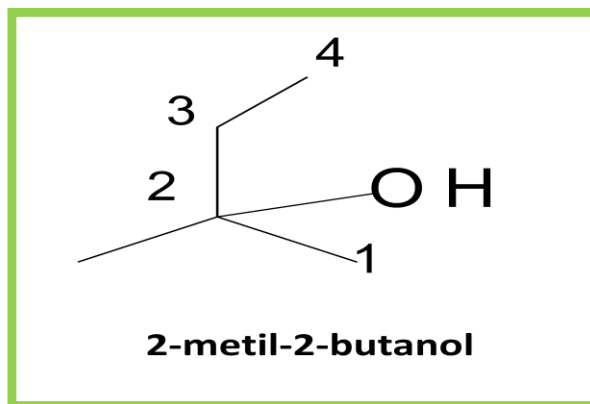
En el espectro RMN- 1H del hidroxicitronelol se observa solo un fragmento de la molécula, que, sin embargo, evidencia la existencia del hidroxi-derivado del citronelol. La señal más característica del fragmento se muestra en el singulete intenso de los protones metílicos de C-1 y C-2 en 1.185 ppm. Los protones metilénicos enlazados a C-3 resuenan como multiplete en 1.497-1.611 ppm. En 1.974 ppm aparece la señal del protón del grupo hidróxilo unido a C-2.

Figura 37 Espectro RMN-¹H del hidroxicitronelol



La fragmentación del DOCit posiblemente se presentó en el proceso de concentración por destilación fraccionada, o en la etapa de evaporación del solvente. Al comparar con el espectro simulado del 2-metil-2-butanol (**Figura 38**), la separación del multiplete de los protones del C-3 es un índice de que el compuesto no es 100% puro.

Figura 38 Estructura del fragmento del hidroxicitronelol



2.3.6 Bioactividad: citotoxicidad, actividad antiparasitaria y antioxidante.

Para estas pruebas no fue posible tener la cantidad necesaria de los compuestos puros, por lo que se evaluó la citotoxicidad y la actividad antiparasitaria del extracto de biotransformación de citronelol en células Vero y en las formas libres de *T. cruzi* y de *L. panamensis* y *L. chagasi*. El extracto identificado como compuesto 3 (**Anexo 3**) no mostró toxicidad para *T. cruzi*, *L. panamensis* y *L. chagasi*, porque presentó tanto IC_{50} como $IC_{90} > 100 \mu M$, indicando ser inactivo. Tampoco mostró toxicidad en células de mamífero, porque el CC_{50} y el CC_{90} , fueron mayores a los compuestos de referencia Nifurtimox, AmB y Mitelfosina.

El hecho de que el extracto de biotransformación del citronelol, no presente toxicidad para las células de mamífero resulta ser importante, porque podría ser utilizado en humanos, siempre y cuando se realicen ensayos adicionales de genotoxicidad y mutagenicidad, para su posible aplicación en la industria de aromatizantes y cosméticos.

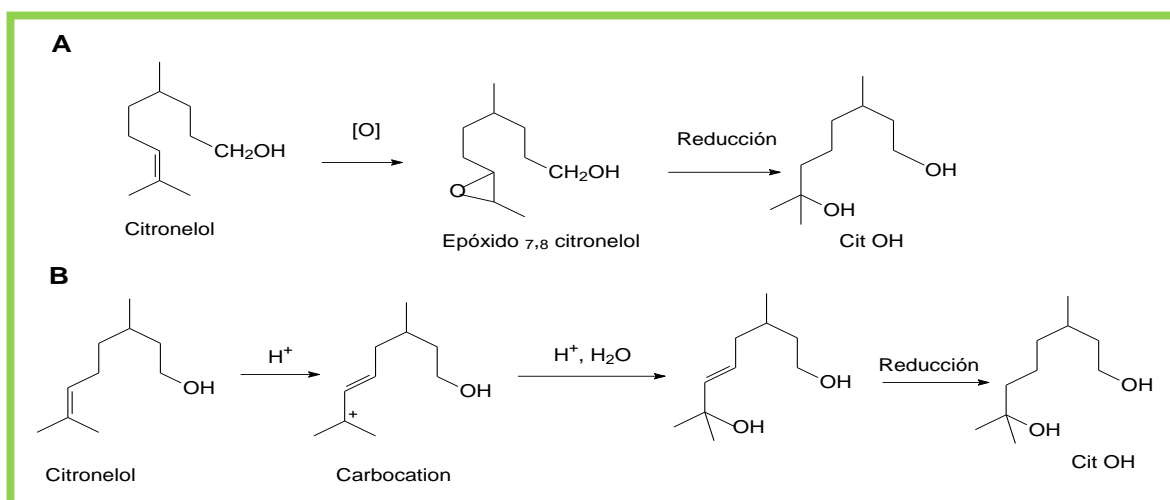
En cuanto a la actividad antioxidante se encontró que el extracto de biotransformación de citronelol en AcOEt, evaluado por el método de barrido (scavenging) del catión radical $ABTS^{*+}$, mostró un porcentaje de inhibición del $ABTS^{*+}$ de 11.3% correspondientes a 0.145 miliequivalentes a Trolox/mM (TEAC), determinado por la curva de calibración (**Anexo 3**). El patrón de citronelol presentó un porcentaje de inhibición del catión-radical de 5.7%. Lo anterior permite suponer que los productos de biotransformación principalmente Cit-OH, aportan a la actividad antioxidante del extracto.

Finalmente, se puede concluir que el proceso de biotransformación del citronelol utilizando células completas de *P. digitatum* DSM 62840 es altamente dependiente de las variables: pH, medio de bioconversión, biocatalizador y concentración de sustrato; que encontrar los valores óptimos de cada variable permitió obtener selectivamente Cit-OH y el isómero cis-óxido de rosa; que hasta la fecha no se

registra en los estudios reportados en la literatura, la producción del hidroxicitronel por procesos de biotransformación y que los reportados han hecho énfasis en la producción de óxido de rosa. Además, que el Cit-OH resulta ser un compuesto de importancia comercial para la industria de alimentos, cosmética, perfumística y de aseo por sus propiedades fragantes y su aroma a arándano (*Vaccinium corymbosum*).

La producción del Cit-OH resulta de un efecto combinado biotransformación/catálisis ácida (**Figura 39**). En el caso de la biotransformación del citronelol, inicialmente ocurre la oxidación del doble para formar un epóxido intermediario. La enzima responsable de este paso es una MO-P450. La posterior ruptura reductiva del epóxido da lugar al Cit-OH. Este mecanismo ha sido propuesto por diferentes autores (Badeel et al, 2011; Tan y Day et al 1998; Abraham et al, 1985). La catálisis ácida debida al bajo pH (2.5), involucra una reacción de adición de agua al enlace olefínico del citronelol, formando un carbocatión intermediario que al hidratarse forma el 2,6-dimetil-3-octadien-2,8-diol. La posterior reducción del doble enlace conduce al Cit-OH.

Figura 39 Producción del derivado hidroxilado del citronelol. Biotransformación con *P. digitatum* DSM 62840 (A); Catálisis ácida (B)



3. BIOTRANSFORMACIÓN DEL (R)-(+)-LIMONENO POR BACTERIAS

3.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos veinte años, los procesos de biotransformación constituyen una herramienta importante para sintetizar moléculas de alto valor agregado con aplicabilidad en la industria química, farmacéutica, agroquímica, perfumística y de alimentos, imposibles de obtener por métodos tradicionales.

A partir del monoterpeno limoneno obtenido de AEs extraídos de cáscaras de frutos cítricos, se obtienen flavors, químicos finos y derivados oxigenados de monoterpenos (DONT) vía biotransformación (Bicas et ál, 2010; Lerin et al., 2010; De Carvalho y Da Fonseca, 2006; Duetz et al., 2003). EL limoneno por ser un sustrato de bajo costo (USD 1-2/kg) resulta ser una molécula potencialmente interesante para el desarrollo de productos existentes y nuevos.

Los DONT adquieren especial relevancia por las propiedades funcionales que presentan; por ejemplo, los **epóxidos de limoneno** son sustratos apetecibles en síntesis fina para la obtención de compuestos químicos quirales (Chiral Blocks Building), importantes en la fabricación de drogas seguras y sustancias complejas (Cagnoli et al., 2005; De Vries et al., 2003; Van der Werf et al., 2001 ; Villa, 2002; Archelas y Furstoss, 2001); además, tienen precios, aproximados, de hasta 100 veces superiores al precio del limoneno (Duetz et al., 2003; Da Silva et al., 2003); así, la mezcla pura 1:1 de cis/trans 1,2 epóxidos tiene un valor de US \$-213/5g. Cabe destacar que estos precios corresponden a compuestos producidos por síntesis química, mientras que los de los obtenidos por procesos de biotransformación, por ser una metodología limpia y natural, serían mayores.

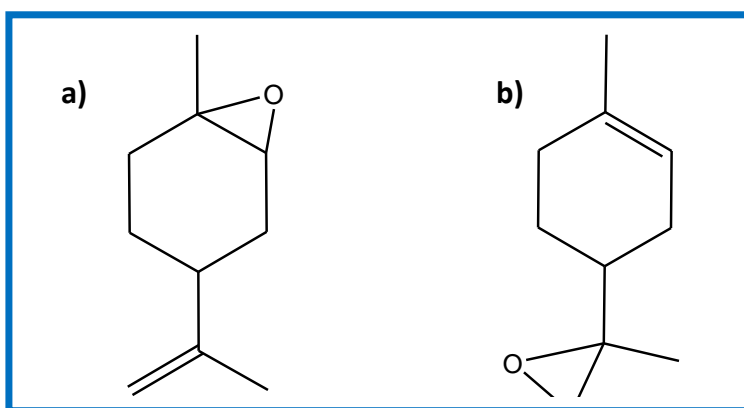
Los epóxidos se obtienen por reacciones de oxidación de **dobles enlaces**. Si el proceso se lleva a cabo enzimáticamente, los biocatalizadores que actúan son las

oxigenasas y las peroxidasas, que dan lugar a la formación de epóxidos e hidroperóxidos, respectivamente.

3.1.1 Epóxidos de limoneno. El epóxido 1,2 limoneno hace parte de la fracción volátil de algunas especies vegetales como *Micromeria silicica* (Duru et al., 2004) y *Michelia alba* (Shang et al., 2002). El epóxido 8,9 limoneno sólo se encuentra en la fracción volátil de *Citrus reticulata* y *Zingiber officinale* (Van der Werf et al., 2000) y puede ser transformado al aldehído p-ment-1-en-9-al, por la acción de una epóxido-isomerasa. Este compuesto se utiliza como saborizante y aromatizante y es reconocido como seguro (FEMA GRAS 3178) (Hartmans, 1989).

En la **Figura 40**, se ilustran las estructuras de los dos epóxidos de limoneno; la reactividad intrínseca del anillo oxirano presente los convierte, además, en intermediarios de alto valor para la producción de compuestos ópticamente activos, para la resolución cinética de mezclas racémicas y como materiales constructores quirales (Chiral building blocks), es decir son importantes en síntesis orgánica y en la industria farmacéutica (Archelas y Furstoss, 2001).

Figura 40 Estructura química de los epóxidos de limoneno: a) 1,2 b) 8,9



Los mono y diepóxidos de limoneno son importantes intermediarios para la elaboración de fragancias, perfumes y aditivos alimentarios (Villa, 2002). A partir

de los epóxidos se pueden obtener dioles vecinales por reacción principalmente con nucleófilos como haluros, carbono, nitrógeno, azufre y oxígeno, o por hidrólisis. Los dioles vecinales son compuestos que actúan como bloques estructurales para formar sustancias complejas importantes en la industria farmacéutica y en síntesis química (de Vries y Janssen, 2003).

La biorresolución de diferentes epóxidos quirales se ha llevado a cabo utilizando diferentes epóxido hidrolasas (EHs) aisladas de hongos, bacterias, levaduras y microsomas humanos: EH terpénicas, EH glicidil acetil derivadas, EH epoxialilalifáticas y EH epoxiaromáticas (Steiner, 2002).

3.1.2 Biotransformación del limoneno dirigida hacia la producción de sus derivados epóxidos. Según la mayoría de publicaciones, la biotransformación de monoterpenos se ha hecho con células completas; en su orden, bacterias (41%), hongos (35%), plantas (11%), cianobacterias (4%) y microalgas (4%). Únicamente en el 7% de los estudios se han empleado enzimas aisladas (De Carvalho y Da Fonseca, 2006). Los epóxidos del limoneno han sido principalmente obtenidos por procesos de biotransformación utilizando bacterias como biocatalizadores; entre ellas, las especies de *Rhodococcus* y *Xanthobacter* (Van der Werf, 2000) y algunas bacterias marinas de los géneros *Vibrio* y *Listonella* (Houjin et al., 2006).

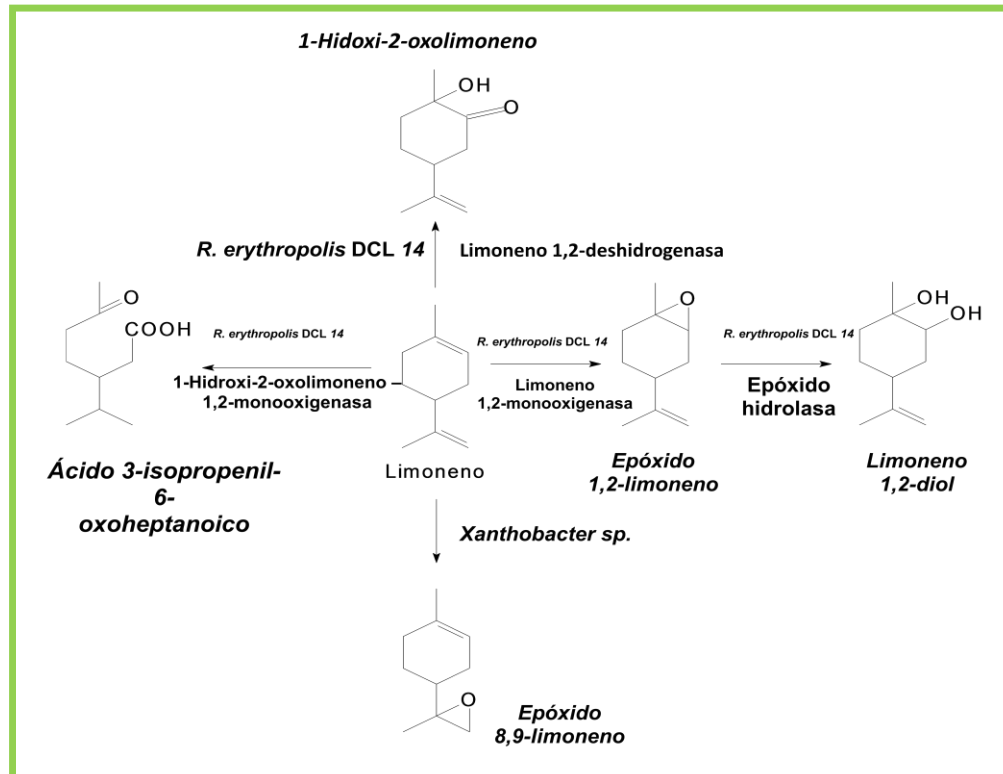
El género *Rhodococcus* es un grupo de bacterias Gram-positivas que tienen la habilidad para ocupar diferentes nichos ecológicos aun en condiciones inhóspitas (Flitsch et al., 1999). Este género, junto con las *Pseudomonas*, tiene gran capacidad para degradar diversos compuestos orgánicos, debido a la presencia de alrededor de 400 enzimas catabólicas dentro de las cuales se ubican diferentes tipos de monooxigenasas (incluidas MO-P450) y dioxigenasas (Van der Geize y Dijkhuizen, 2004 y Larkin et al., 2005). Además, las *Rhodococcus* tienen habilidad para utilizar diferentes sustratos, por su fisiología, su alta tolerancia a sustratos y solventes (Flitsch et al., 1999) y la capacidad de acumular altos niveles de metales

pesados, tolerar sustratos y solventes miscibles y no miscibles en agua (etanol, butanol, dimetilformamida hasta 50%, n-dodecano y tolueno hasta 5% v/v); además, pueden adherirse a gotas de aceite debido a la hidrofobicidad de su superficie celular generada por los ácidos micólicos presentes. Por tal razón, estas especies son usadas ampliamente en bioprocesos industriales encaminados a obtener fármacos, productos químicos y energía, y en biorremediación (Larkin, 2005).

Van der Werf et al., (1999) biotransformaron el limoneno con *R. erythropolis* DCL14 y lograron producir el epóxido 1,2 limoneno (0,1g/L). Esta bacteria aeróbica tiene la capacidad de aprovechar como fuente de carbono y energía para su crecimiento, los terpenos: (4*R*)-(+ y (4*S*)-(-) limoneno, (4*R*) y (4*S*) epóxido 1,2 limoneno, (4*R*) y (4*S*) limoneno 1,2 diol, (4*R*) y (4*S*)-carveol, (4*R*) y (4*S*)- carvona, (4*R*) y (4*S*)-dihidrocarveol, (4*R*)-dihidrocarvona, (-)-mentona, (-)-mentol, linalol y geraniol (Van der Werf et al., 1999).

De otra parte, *Rhodococcus erythropolis* DCL14 ha utilizado el limoneno como su única fuente de carbono y energía, para generar como productos principales el 1-hidroxi-2-oxolimoneno y el ácido 3-isopropenil-6-oxoheptanoico (Van der Werf, 1999); esta misma cepa expresa una limoneno 1,2-monooxigenasa, dando lugar al epóxido 1,2-limoneno, y una epóxido hidrolasa que cataliza la hidrólisis del epóxido a limoneno-1,2-diol (Barbirato et al., 1998; Van der Werf et al., 1998) **(Figura 41)**.

Figura 41 Reacciones de oxidación catalizadas por diferentes monooxigenasas de *Rhodococcus erythropolis* DC 14 y *Xanthobacter* sp.



Van der Werf y colaboradores, emplearon la bacteria *Xanthobacter* sp C20 para biotransformar el limoneno; esta cepa dio lugar al epóxido 8,9 de limoneno. La máxima velocidad de bioconversión se observó a una concentración inicial de sustrato 12 mM y la cantidad del epóxido 8,9-limoneno fue de 0.8 g/L. La bioconversión es fuertemente limitada por inhibición por producto (Van der Werf et al., 2000).

Las bacterias marinas *Vibrio cholerae*, *Listonella damsela* y *Vibrio alginolyticus*, biotransformaron el limoneno a una mezcla de epóxidos, alcoholes, cetonas, aldehídos y ésteres. Los ensayos se hicieron a 28 °C durante 6 días en agitador rotatorio (Houjin et al., 2006).

Existen dos patentes que reportan la producción de epóxidos de limoneno por transformación microbológica; en ambos casos utilizaron levaduras (US 435701 y US 6943001).

Es de destacar que la mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha para la obtención de epóxidos de limoneno han sido llevados a cabo con catalizadores químicos heterogéneos (Alarcón et al., 2007; Saikia et al., 2006; Cagnoli et al., 2005; González et al., 2004; Villa et al., 2002). Algunos procesos reconocidos como procesos “limpios”, basados en química verde, son la oxidación de limoneno con H_2O_2 , empleando un catalizador de titanio Ti-MCM-41 (tipo tamiz molecular mesoporoso). Este catalizador presenta actividad catalítica hacia los epóxidos de limoneno (1,2 y 8,9) y su producción se lleva a cabo con una conversión del 52% y una selectividad del 60% hacia los epóxidos en un tiempo de 7 h de reacción (Cagnoli et al., 2005). La oxidación en fase líquida del limoneno, empleando catalizadores heterogéneos de vanadio/titanio (V_2O_5/TiO_2) preparados por procedimientos sol-gel, permitió producir polímeros de limoneno, óxido de limoneno, carveol y carvona (Oliveira et al., 2006).

Por lo anterior, se seleccionaron las cepas de las bacterias de *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066 y *Xanthobacter* sp. DSM 6696 para biotransformar el limoneno con miras a la producción de los epóxidos 1,2 y 8,9-limoneno.

3.1.2 Obtención de epóxidos vía catálisis química. Los epóxidos ópticamente activos derivados del limoneno son moléculas de alto interés, por ser materia prima clave en la síntesis de fragancias, productos farmacéuticos y saborizantes artificiales; su síntesis se lleva a cabo utilizando el método tradicional consistente en la transferencia directa de oxígeno, u oxidación del limoneno. La existencia de dos enlaces olefínicos (1,2 y 8,9) en la molécula del limoneno, ambos susceptibles a oxidación, pueden dar lugar a dos tipos de diastereoisómeros (Saikia et al., 2006).

Por lo anterior, en los últimos años se han dedicado esfuerzos para transformar catalíticamente y selectivamente el limoneno. Hasta la fecha, uno de los mejores métodos para la epoxidación enantioselectiva de olefinas no funcionalizadas es la epoxidación de Jacobsen-Katsuki, en la cual se emplean catalizadores basados en complejos de salen de manganeso (III) ópticamente activos y los agentes oxidantes, hipoclorito de sodio o yodosilbenceno (Reyes et al., 2008). La isomerización del sustrato es uno de los temas que más se ha discutido debido a que a partir de *cis*-olefinas se obtienen mezcla de *cis*- y *trans*-epóxidos (Reyes et al., 2008; Adam et al., 2002; Ito y Katsuki, 1999; Dalton et al., 1998). No obstante, el mecanismo de la reacción de epoxidación de olefinas todavía se encuentra bajo intenso debate (Reyes et al., 2008; Dalton et al., 1998; Palucki et al., 1998).

Reyes et al. (2008) evaluaron el efecto del tipo de agente oxidante, la quiralidad y la estabilidad del catalizador de Jacobsen (**Figura 42**) en la epoxidación diastereoselectiva del *R*-(+)-limoneno. Estos autores propusieron un mecanismo de reacción modificado a Jacobsen-Katsuki para la epoxidación asimétrica de *R*-(+)-limoneno con complejos de salen de Mn (III) (**Figura 43**), el cual involucra la participación de una especie oxidante activa al agente oxidante diferente a las especies Mn^V (oxo) (**Figura 44**).

Figura 42 Catalizador de Jacobsen. (a) Quiral; (b) Aquiral. (Tomado de Reyes et al., 2008)

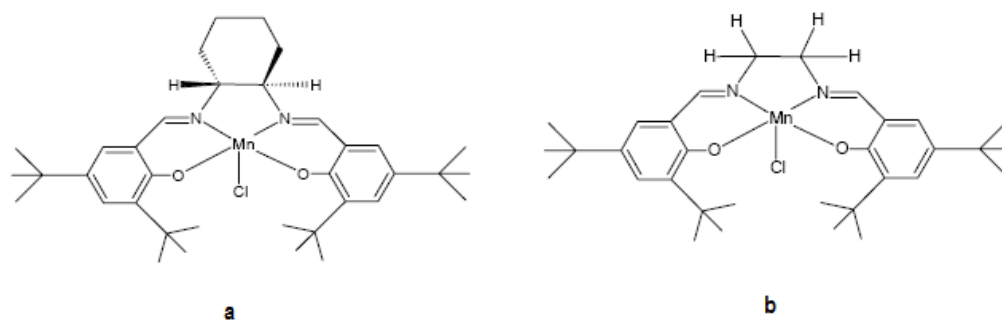
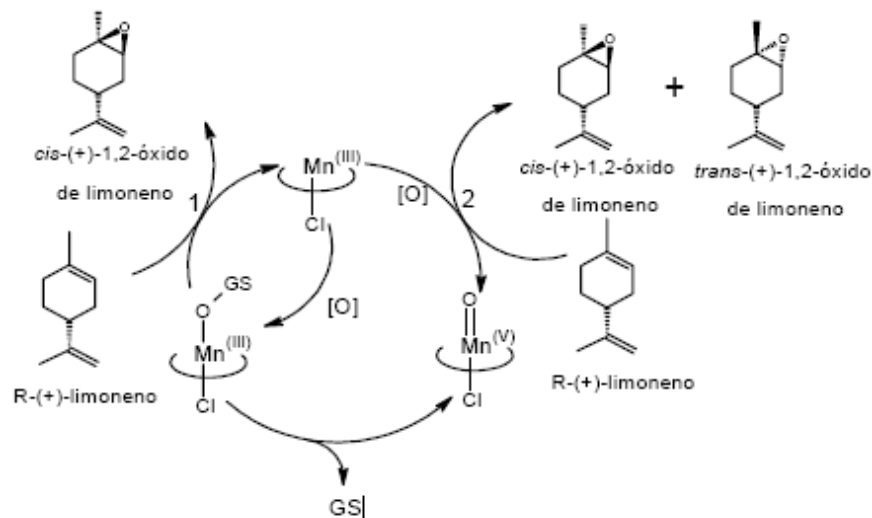


Figura 43 Ciclo catalítico modificado propuesto para la epoxidación Jacobsen-Katsuki (Tomado de Reyes et al., 2008).



Usando un sistema catalítico heterogéneo compuesto por tres fases: PW-Amberlita/ peróxido de hidrógeno acuoso/ acetonitrilo, se llevó a cabo la epoxidación de limoneno. Barrera et al. (2007) propusieron para el proceso una expresión cinética ajustada a los datos experimentales, considerando la desactivación del catalizador de orden uno con miras a poder simular y diseñar el reactor bajo condiciones cercanas a las reales.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Microorganismo, medios de cultivo y reactivos

Microorganismo: Las cepas certificadas de las bacterias *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066 y *Xanthobacter* sp. DSM 6696 fueron adquiridas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares DSMZ (Braunschweig, Alemania).

Medios de cultivo: Las materias primas requeridas para preparar el medio complejo YGA (extracto de levadura 5.0 g/L, glucosa 2.0 g/L y agar 15 g/L) fueron adquiridas de OXOID (Hampshire, Inglaterra).

Reactivos. El sustrato (*R*)-(+)-limoneno (98%), Tween 80, acetato de etilo ($\geq 99.8\%$) y otros solventes fueron grado analítico y adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). El nitrógeno gaseoso se obtuvo de Aga-Fano (Bucaramanga, Colombia).

3.2.2 Crecimiento celular. Las bacterias *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066 y *Xanthobacter* sp. DSM 6696 crecieron a 30 °C sobre caja petri en el medio de cultivo YAG (agar levadura-glucosa); *Xanthobacter*, además, creció expuesta a gases de ciclohexano. Una vez crecidas las células bacterianas, se adicionaron 10 mL de medio salino (0.85% NaCl y 0.1% de Tween 80); luego se centrifugó y se retiró la solución sobrenadante para obtener el pellet, que se lavó con solución buffer fosfato 50 mM. El pellet se disolvió en 7 mL de buffer y se almacenó a 4 °C; esta solución de células fue utilizada para los ensayos de biotransformación.

3.2.3 Ensayos de biotransformación. La biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno se llevó a cabo en el medio mineral (MM) reportado por Hartmans et al., (1989): 2.2 g K_2HPO_4 , 1.7 g KH_2PO_4 , 1.0 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.08 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.005 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.003 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.013 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.001 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.005 g $ZnCl_2 \cdot 7H_2O$, 0.005 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.001 g $CuSO_4$, 0.005 g $NiSO_4 \cdot 6H_2O$, 0.43 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 0.001 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.005 g EDTA, disueltos en 500 mL de agua destilada.

Los bioensayos se llevaron a cabo en viales head space de 15 mL provistos con agitadores magnéticos estériles. A los viales se adicionaron 5 mL de medio MM estéril y se inocularon con 300 μ L de solución de células y 10 μ L de una solución de limoneno al 10%. Posteriormente se sellaron los viales con agrafes provistos

con septa de silicona para evitar la evaporación del limoneno. Los viales se agitaron a 100 rpm y a 30 °C. La cinética del proceso de biotransformación (PB) se obtuvo por monitoreo del proceso con el tiempo cada 24 h, durante 180 h.

En este estudio se evaluó la conversión del limoneno, determinada como se expresa en la **Ecuación 4**

$$\text{Conversión \%} = \left[\frac{(C_i - C_f)}{C_i} \right] * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde C_i = Concentración inicial de sustrato, C_f : Concentración final de sustrato.

Para la cinética del proceso de biotransformación se hizo seguimiento al consumo de sustrato con el tiempo.

Finalmente se evaluó el efecto de la concentración de sustrato sobre la biotransformación por *R. erythropolis* y *Xanthobacter* sp., analizando las concentraciones de 170, 340, 510 y 850 mg/L. Todos los experimentos se realizaron por duplicado

3.2.4 Extracción, identificación y cuantificación de sustrato y productos de reacción

Extracción: Finalizada la reacción se realizó la extracción del sustrato remanente y de los productos de biotransformación usando diclorometano (2*3 mL) como solvente extractor. Se recolectó la fase orgánica y se secó con Na_2SO_4 anhidro, se concentró por corriente de nitrógeno hasta obtener el volumen final de 1.0 mL y se adicionaron 3 μL de n-tetradecano como estándar interno (istd). Se tomaron 2 μL para el análisis cromatográfico.

Identificación: El limoneno y los derivados oxigenados producidos se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), usando un cromatógrafo Agilent modelo 6890N (Palo Alto, CA, USA) acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5975C con un sistema detector de ionización por impacto de electrones (70 eV) y un analizador de masas cuadrúpolo, operado en modo full scan de 40-400 Dalton (m/z). La relación Split fue 1:13 y se usó un inyector automático Series HP 7683. Se utilizó una columna capilar DB-WAX (60 m de largo x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor). La temperatura del inyector se programó a 45 °C mantenida durante 10 minutos, a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min hasta 220 °C, y luego se mantuvo por 30 min. La identificación de los compuestos se realizó comparando los espectros de masas de las muestras con los espectros de los compuestos presentes en las bases de datos espectrales ADAMS, NSB 75K, 138K NIST 05 y WILEY disponibles en el sistema de datos G1701BA HP Enhanced Chemstation.

Cuantificación: La cuantificación del limoneno remanente se realizó por el método del estándar externo (**Anexo 5**).

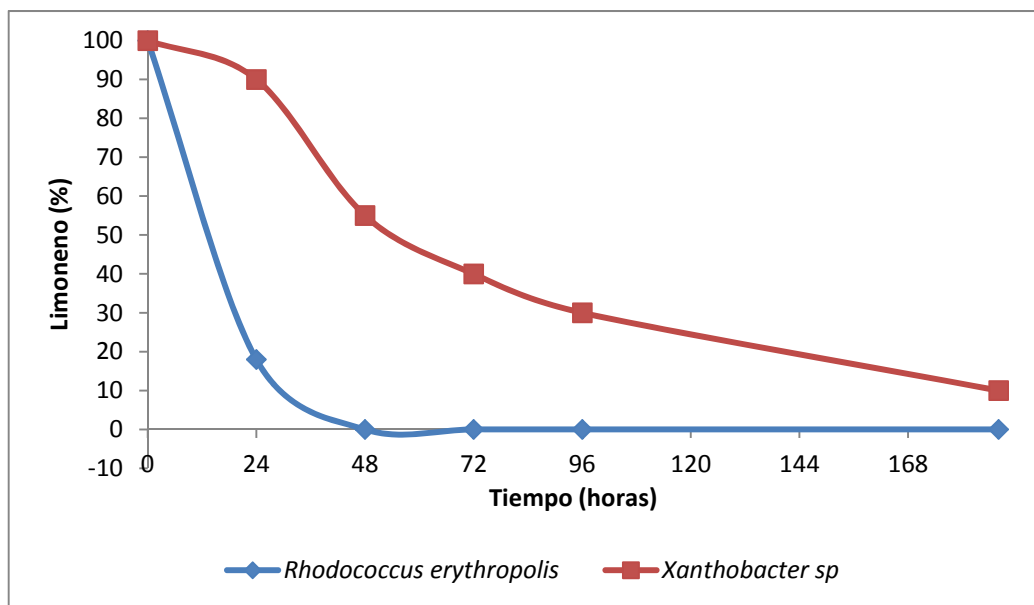
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Crecimiento celular. Las colonias de *R. erythropolis* fueron de color rosado y ligeramente viscosas sobre YAG, mientras las de *Xanthobacter* sp., fueron de color amarillo y aún más viscosas. A 30 °C, las bacterias crecieron a los 4 y 8 días, respectivamente.

3.3.2 Biotransformación. En la **Figura 44** se muestra la evolución de la concentración de limoneno con el tiempo; se observa que el consumo de este sustrato ocurre más rápidamente cuando se utiliza *R. erythropolis*; a las 48 h de reacción, ya no hay limoneno en el medio, mientras que en el caso de *Xantobacter* sp., a este tiempo hay una concentración de limoneno aproximadamente del 58%.

Además, *R. erythropolis*, consume el limoneno como fuente de carbono y energía y para la transformación microbiana de éste sustrato. A diferencia, *Xanthobacter* sp., sólo utiliza el limoneno para su desarrollo. La literatura reporta que la cepa *Xanthobacter* sp C20 o 124X, tiene capacidad para transformar el limoneno oxidándolo al epóxido 8,9-limoneno (Van der Werf, 2000); a su vez, hidroxila y oxida sustratos hidrofóbicos, como los compuestos aromáticos, estireno, tolueno y ácido hidroxifenilacético (Hartmans et al., 1989).

Figura 44 Seguimiento con el tiempo del proceso de biotransformación del limoneno por acción de bacterias usando una concentración de limoneno de 850 mg/L



La biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *R. erythropolis*, se llevó a cabo en el medio mineral (MM) de pH 7.0 utilizando diferentes concentraciones de sustrato, 170 - 850 mg/L. Cuando la concentración fue de 170 mg/L, el principal producto obtenido fue el linalol, en una cantidad relativa del 30.4% a las 48 h, mientras que a las 72 h fue de 58.7%. Al incrementar la concentración de sustrato 5 veces (850 mg/L) se pierde selectividad y se forman otros DOL: un alcohol, el linalol (0.15%),

un epóxido, óxido trans 1,2-limoneno (0.10%) y una cetona, carvona (0.071%). En la **Figura 45**, se ilustra el cromatograma respectivo.

Los tres productos generados se obtienen por reacciones de hidroxilación-oxidación y ruptura cíclica de la molécula del limoneno, probablemente a través de reacciones catalizadas por las enzimas sintetizadas por *R. erythropolis* DSM 43066 (**Figura 46**). Sin embargo, el grado de conversión alcanzado fue sólo del 0.32%, contribuyendo el epóxido de limoneno en 0.10%.

Figura 45 Cromatograma del proceso de biotransformación del limoneno por la acción de *R. erythropolis* a 850 mg/L de limoneno, 72 h de reacción. (Linalol t_R , 11.578 min, óxidos trans limoneno t_R , 12.561 min y carvona t_R , 15.301min)

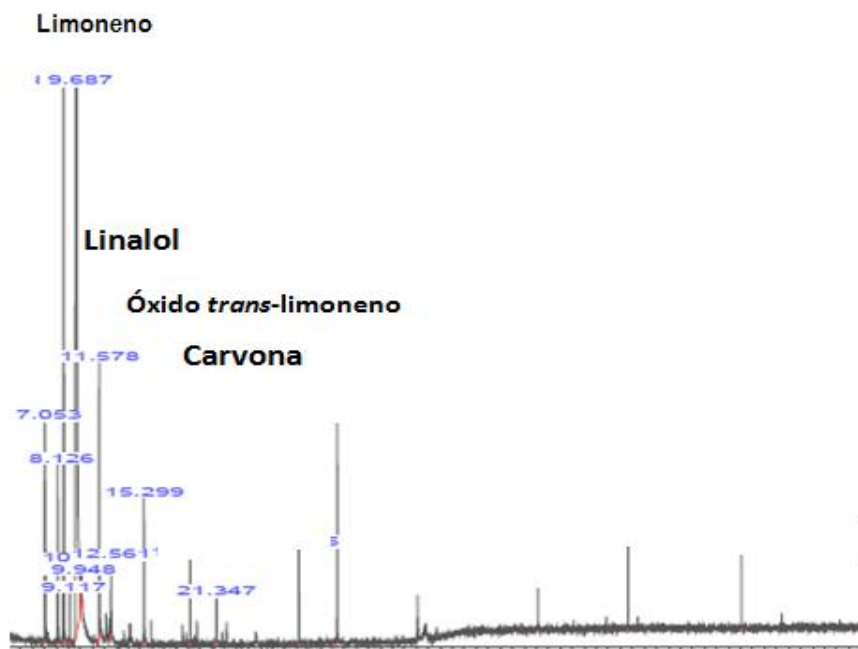
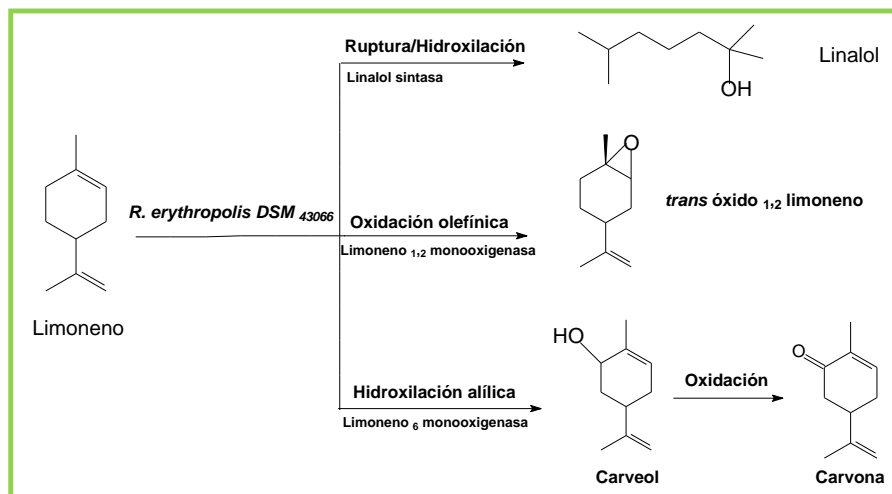


Figura 46 Biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por bacteria *R. erythropolis* DSM 43066, medio mineral de pH 7.0, a 28 °C, 100 rpm con agitación mecánica a, 48 h de reacción y concentración de sustrato 850 mg/L



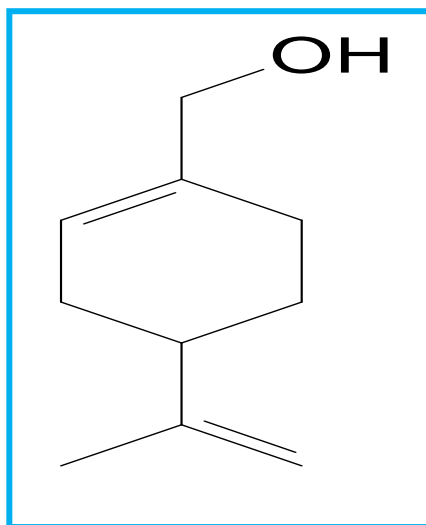
Con base en los resultados mostrados, y debido a los bajos valores de conversión alcanzados, se tomó la decisión de no continuar con el estudio usando bacterias, y se procedió a evaluar los hongos para biotransformar el (*R*)-(+)-limoneno.

4. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN DEL LIMONENO POR *Aspergillus niger* DSM 821. ESCALAMIENTO Y BIOACTIVIDAD

4.1 INTRODUCCIÓN

Como resultado de la oxifuncionalización microbiana del limoneno, se obtiene el alcohol perílico (POH), monoterpreno cíclico (**Figura 47**) presente en forma natural en el AE de plantas como lavanda (*Lavandula hybrida*), hierbabuena (*Mentha spicata*), menta (*Mentha piperita*), apio (*Perilla frutescens*), alcaravea (*Prunas sp* y *Carum carvi*), cerezas (*Eugenia uniflora*) y mora (*Morus nigra*) (Belanger, 1998; Gupta y Myrdal, 2004).

Figura 47 Estructura del alcohol perílico



El POH obtenido por oxidación del limoneno se considera el derivado de mayor valor comercial (US \$-300/kg), un valor 100 veces mayor al limoneno; sin embargo, la extracción del POH a partir de las fuentes naturales mencionadas anteriormente, no es rentable económicamente por la baja concentración (menor al 0.1% p/p) en que se encuentra (Nakayama et al., 1978; Wang et al., 1997). Por

ello, hoy la producción del POH y sus derivados peril aldehído (PCHO) y ácido perílico (PCOOH), a escala industrial, se realiza mediante síntesis química a partir de β -pineno y limoneno. No obstante, utilizando β -pineno el rendimiento es más bajo y el proceso es menos amigable ambientalmente (Cagnoli et al., 2005; Duetz et al., 2003). En el caso del limoneno, las propiedades similares de los carbonos metílicos y metilénicos alílicos en la molécula, dificultan la incorporación específica de grupos hidroxilos o carbonilos dando lugar generalmente a mezclas de terpenoides.

Los inconvenientes señalados con la catálisis química en la oxifuncionalización de monoterpenos hacen que la vía biocatalítica se presente como una alternativa, por ser un proceso ambientalmente amigable, realizarse en condiciones suaves de reacción y dar lugar a reacciones químio, regio y estéreo selectivas (De Carvalho, 2011).

En general, los aceites esenciales ricos en monoterpenos se reconocen por su función como conservantes y antioxidantes naturales y por su actividad anticancerígena (Fisher y Phillips, 2008; Sandri et al., 2007; Schelz et al., 2006; Crowell, 1999). El limoneno y algunos de sus derivados oxigenados como el alcohol perílico (POH), el carveol, el mentol y la cetona carvona, poseen actividad biológica in vivo para interrumpir o inhibir la progresión metastásica de células de melanoma, y para destruir tumores malignos existentes debido a la capacidad de inhibición de la prenilación proteínica (farnesil transferasa) y de la apoptosis (Peffley et al., 2007; Chung et al., 2006; Xu et al., 2004).

Ante el marcado incremento mundial de pacientes con riesgo de cáncer, en los últimos años se ha incrementado notablemente la demanda de compuestos anticancerígenos (Skouridou et al., 2004); el POH y el ácido perílico (PCOOH), derivados oxigenados en el C-7 del limoneno, son compuestos interesantes por su poder medicinal, demostrado en diferentes pruebas preclínicas in vitro e in vivo; el

POH se reconoce como agente no tóxico con propiedades terapéuticas y quimiopreventivas potenciales para el tratamiento de cánceres de páncreas y mama (Peffley et al., 2007; Yuri et al., 2004; Pohanish et al., 2002; Bailey et al., 2002), de pulmón (De Carvalho, 2005; Yuri et al., 2004), hígado, colon, piel y próstata (Pohanish et al., 2002; Gerhäuser et al., 2003) y de ovario (Chung et al., 2006; Bailey et al., 2002). El POH ha sido sometido a pruebas preclínicas de Fase II, sin embargo, los estudios de su aplicación en humanos todavía están restringidos por la estabilidad y el escaso conocimiento de su mecanismo de acción (Peffley et al., 2007). Con el primer producto de oxidación del POH, el peril aldehído (PCHO), se realizó un screening con células tumorales y se evaluó su citotoxicidad, con el objeto de utilizarlo también como medicamento.

Además, el POH, el PCHO y el PCOOH han sido objeto de estudio en la búsqueda de nuevos fármacos naturales quimioterapéuticos para el tratamiento de leishmaniasis. Niño et al., evaluaron la actividad de los tres DOL como agentes anti-Leishmania utilizando promastigotes de *L. amazonensis* y lesiones derivadas de amastigotes; el POH presentó un IC_{50} s de 0.8 ± 0.08 y 5.2 ± 0.18 mM, respectivamente; mientras que el PCHO fue de IC_{50} s de 68 ± 4 y 152 ± 40 μ M (Niño et al., 2005). Adicionalmente, estos autores realizaron estudios in vivo de toxicidad con ratones tratados tópicamente o intracelularmente con POH y PCHO por 15 días; al no encontrar efectos colaterales sistémicos o locales realizaron ensayos con células tumorales BABL de ratones adicionando POH durante 3 semanas; los resultados mostraron que POH tiene respuesta terapéutica significativa con retardo en la aparición de lesiones (Niño et al., 2005).

Producción biocatalítica de POH

Los procesos de biotransformación del limoneno utilizando células completas de diferentes microorganismos: hongos, bacterias, levaduras y plantas, han permitido

la producción del POH y el PCOOH gracias a la hidroxilación regioselectiva del grupo metil (C-7) del anillo del limoneno.

Bacterias

Chatterjee y Bhattacharyya (2001) encontraron que la *Pseudomona putida* MTCC 1072 biotransforma el limoneno en POH (36%) y p-menta-1-eno-6,8-diol (44%), productos que fueron caracterizados por FTIR y RMN. Un screening realizado a 1800 bacterias permitió seleccionar a *Mycobacterium* HXN-1500, por su capacidad específica para hidroxilar el C-7 del limoneno. Posteriormente, la alcanohidroxilasa de *Mycobacterium* fue clonada y co-expresada en *Pseudomonas putida*. La enzima resultante presentó una actividad específica de 3U/g de células secas y transformó el limoneno en fase orgánica [bis-(2-etilhexil)-ftalato] a las 75 h en POH a escala de gramos (6.8 g/L) empleando un biorreactor de 2L y una densidad celular de 15 g/L. Adicionalmente se produjo 0.14 g/L de PCOOH (Van Beilin et al., 2005).

La biotransformación del limoneno empleando la bacteria *Pseudomona putida* DSM 12264 produjo PCOOH mediante la aplicación de un sistema integrado consistente en la recirculación continua del caldo no filtrado y recuperación in situ del producto (ISPR) por acople al biorreactor de una columna de lecho empacada con una resina de intercambio iónico (Amberlita IRA 410 Cl). La producción de 31 g de PCOOH/L hace que este sea uno de los procesos de biotransformación de terpenos más exitosos a la fecha (Mirata et al., 2009).

Las bacterias marinas *Vibrio cholerae*, *Listonella damsela* y *Vibrio alginolyticus* biotransforman el limoneno, obteniendo una mezcla de productos: alcoholes dentro de los que se encuentra el POH, epóxidos, cetonas, aldehídos y ésteres. Los bioensayos se hicieron a 28 °C durante 6 días en agitador rotatorio (Houjin et al., 2006).

Para incrementar las propiedades lipofílicas del POH e investigar su actividad biológica, este compuesto se esterificó con ácido decanoico empleando lipasas de varas fuentes: *Pseudomona cepacia* (PcL) y *Candida cylindracea* (CcL) (Skouridou et al, 2004).

Hasta el momento se han publicado diferentes patentes referentes a la aplicación de bacterias como biocatalizadores para producir POH a partir de limoneno (Duetz et al., 2003; Chastain et al., 1999; Jourdat et al., 2002). Existen también patentes registradas para la preparación de ácidos y ésteres perílicos por pirólisis de 1,2 diésteres de limoneno y para la preparación de alcohol perílico y acetato de perillilo por catálisis química ácida a partir de óxido de β -pineno (Chastain et al., 1999). En el **Figura 48** se ilustra el proceso de biotransformación del limoneno con bacterias.

Hongos

Menéndez y colaboradores (2002) realizaron la biooxidación del limoneno empleando una cepa de *A. niger* BFQU 68, y produjeron POH (28,5%) y ácidos grasos de cadena corta (propanoico, isobutirico e isopentanoico). Para interrumpir la producción de ácidos grasos sin afectar la del POH, se adicionó ketoconazol al medio como inhibidor de oxidasas citocromo P450, logrando con ello alcanzar la máxima selectividad (100%). Otras especies de *Aspergillus*, como *A. cellulosa*, presentan capacidad para transformar los dos isómeros del limoneno. A partir del (*R*)-(+)-limoneno se obtienen isopiperitenona, limoneno-1,2-diol, carveol y POH, mientras que el *S*-(-)- limoneno produce POH, trans limoneno-1,2-diol y neodihidrocarveol, como productos principales (Noma et al., 1992).

Usando una suspensión de esporas (SS) de *A. niger* DSM 821 de concentración $4 \cdot 10^4$ esporas/mL en el medio YMPG de pH 6.5, y una concentración 4.9 mM de limoneno, a 28 °C y 300 rpm y 6 días de reacción, se obtuvo como producto principal POH (14.7%, 76.3 mg/L) (Castellanos, 2007).

Con el micelio de *Fusarium verticilloides* se biotransformó el limoneno a derivados hidroxilados, dentro de los que se encuentra el POH, que fue purificado por cromatografía de columna usando sílica gel 60 e identificado por $^1\text{H-RMN}$. El medio líquido utilizado para la transformación microbiana fue un medio complejo de pH 7.0 constituido por licor de maíz, extracto de levadura y glucosa. La reacción se llevó a cabo a 30 °C y 100 rpm, adicionándose secuencialmente el limoneno 12 mM cada 24 horas durante un tiempo total de 60 horas. El trabajo hizo énfasis en la identificación del POH, sin reporte alguno del rendimiento (de Oliveira y Strapasson, 2000).

Los hongos psicrotrofos *Mortierella minutissima*, *Chrysosporium pannorum*, *M. alpina*, *Penicillium chrysogenum*, *P. cyclopium* y *P. islandicum* también fueron evaluados en la biotransformación del limoneno para producir POH (121 mg/L) en medio YMPG (Tritek y Fiedurek, 2005).

Figura 48 Biotransformación del limoneno por células de bacterias

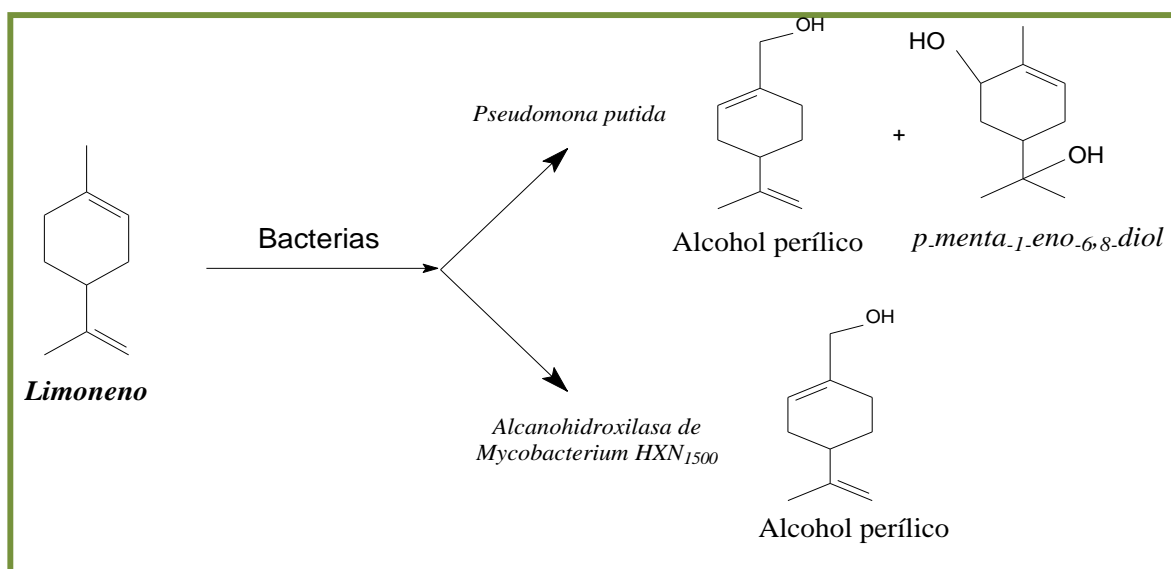
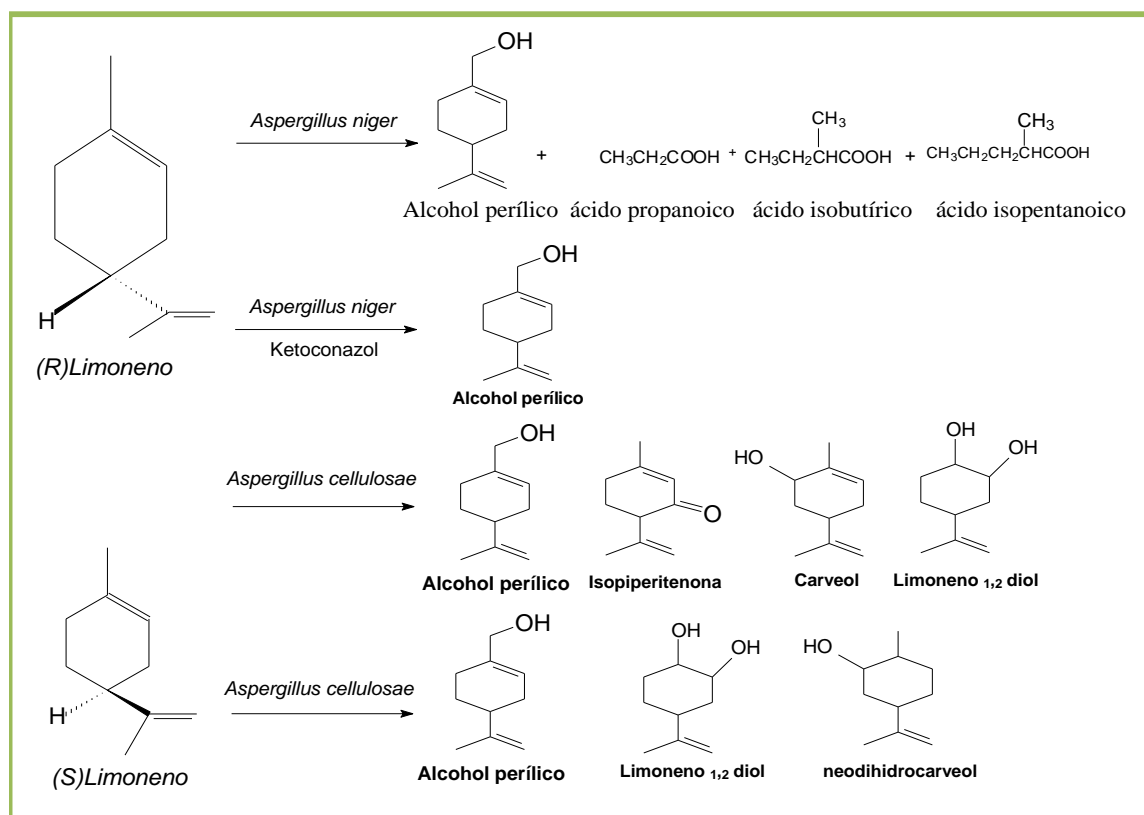


Figura 49 Productos de biotransformación de limoneno, utilizando diferentes hongos



Levaduras

Martins et al. (2007) evaluaron las levaduras *Candida parapsilosis* y *Yarrowia lipolytica* en la biotransformación de D-limoneno en medio YMPG. Las variables independientes fueron el pH evaluado entre 6.8 y 7.2 y la temperatura entre 28 y 30°C, a una concentración de sustrato fija (0.2% v/v). Se midió la biomasa antes y después de la adición de limoneno y los productos formados. Las levaduras presentaron capacidad para transformar el limoneno y producir PCOOH como producto principal (Martins et al., 2007).

Células vegetales

La biotransformación del limoneno con células de *Picea abies* alcanzó una conversión del 4% de *R*-(+)-limoneno distribuida en los derivados oxigenados, POH, epóxido 1,2 limoneno, carveol y 1,8-cineol (Lindmark-Henriksson et al., 2004).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de *Aspergillus niger* DSM 821 para biotransformar el (*R*)-(+)-limoneno y producir principalmente POH. Se midió el efecto de diferentes variables con el fin de optimizar el proceso a escala de laboratorio (5 mL) y luego escalar a volúmenes 10 y 100 veces mayor. Además, se trató de aislar el POH del medio de bioconversión y de los demás productos presentes. Posteriormente se evaluó la posible bioactividad del extracto de biotransformación.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Químicos y reactivos. El (-)-alcohol perílico fue proporcionado por Sigma-Adrich (Steinheim, Suiza). Los demás reactivos y solventes fueron de grado analítico.

4.2.2 Microorganismo y cultivo. La cepa de *Aspergillus niger* DSM 821 se obtuvo de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares DSMZ (Braunschweig, Alemania). Los medios de cultivo sólido PDA (papa dextrosa agar, pH 5.6 ± 0.2) y MEA (agar extracto de malta, pH 5.4 ± 0.2), y las materias primas requeridas para preparar el medio complejo de YGA (extracto de levadura 3.0 g/L, extracto de malta 20 g/L, glucosa 20 g/L, peptona bacteriológica 1.0 g/L y agar 20 g/L, pH 6.0), YMPG (extracto de levadura 5.0 g/L, extracto de malta 10 g/L, glucosa 10 g/L y peptona bacteriológica 5.0 g/L), MYB (extracto de levadura 3.0 g/L, extracto de malta 20 g/L, glucosa 10 g/L, peptona bacteriológica 10 g/L) y YG

(extracto de levadura 3.0 g/L, extracto de malta 20 g/L, glucosa 20 g/L, peptona bacteriológica 1.0 g/L) fueron comprados a OXOID (Hampshire, Inglaterra).

4.2.3 Cinética de crecimiento microbiano de *Aspergillus niger* DSM 821 en medio sólido. *Aspergillus niger* DSM 821 fue cultivada en los medios PDA, MEA y YGA a 28 °C durante 10 días; su cinética de crecimiento fue establecida por seguimiento del diámetro de la colonia con el tiempo, y se determinó la velocidad de crecimiento radial (VCR, mm/h) de acuerdo con el método de Trinci y Pirt (Trinci, 1969; Pirt, 1975). El medio de crecimiento se seleccionó con base en la mayor VCR, y posteriormente fue empleado para el mantenimiento periódico de la cepa. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.2.4 Evaluación de la actividad antifúngica del sustrato. La actividad antifúngica del sustrato se evaluó adicionando diferentes concentraciones de (*R*)-(+)-limoneno (0 -75.0 mM) al medio MEA antes de su gelificación; posteriormente, los medios fueron inoculados con 20 µL de SS ($1.0 \cdot 10^7$ esporas/mL). Durante 8 días de crecimiento del hongo se determinó la variación del diámetro de las colonias. Los porcentajes de inhibición se calcularon utilizando la **Ecuación 2** (Numeral 2.2.2). La concentración de limoneno que inhibe máximo un 25% el crecimiento de *A. niger* se definió como la mínima inhibitoria (CMI) y la que inhibe el 100%, como concentración letal (CL).

4.2.5 Optimización del proceso de biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno utilizando *Aspergillus niger* DSM 821 a escala de laboratorio

- **Preparación de la suspensión de esporas (SS).** Las esporas obtenidas en el medio previamente seleccionado, y crecidas durante siete días, fueron resuspendidas en 10 mL de una solución salina NaCl al 0.85% y Tween 80 al 0.1%; posteriormente se realizó el recuento en cámara de Neubauer. La

concentración de esporas con la que se inoculó el medio de biotransformación fue de $1 \cdot 10^7$ esporas/mL.

- **Cinética de crecimiento de *A. niger* en medio líquido.** La cinética de crecimiento de *Aspergillus niger* se realizó por seguimiento de la biomasa producida en los medios líquidos YMPG, MYB y YM de pH 5.0 ajustado con buffer citrato-fosfato 0.1 M, cada 24 h durante 15 días. La concentración de biomasa se determinó gravimétricamente, previo lavado, filtrado del micelio en papel Whatman N.º1 y secado a 105 °C durante 24 h. La velocidad específica de crecimiento (μ) del hongo en cada medio de cultivo, se determinó estableciendo la pendiente de la recta de la gráfica semi logarítmica concentración de biomasa versus tiempo (Eng et al., 2003). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

- **Proceso general de biotransformación a escala de laboratorio.** Los bioensayos fueron llevados a cabo en viales de 22 mL provistos con tapones de teflón, que contenían 5 mL de medio líquido estéril inoculados con 50 μ L de SS de concentración $1.0 \cdot 10^7$ esporas/mL. Los medios fueron preincubados a 28 °C durante 72 h con una agitación de 300 rpm, empleando un agitador orbital (Heidolph Vibramax 100). Finalizado el tiempo de pre-incubación, la reacción de biotransformación se inició adicionando (*R*)-(+)-limoneno en la concentración preestablecida para cada experimento. La transformación microbiana fue monitoreada en el tiempo. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se utilizaron blancos, blanco de biomasa (suspensión de esporas en el medio de reacción sin sustrato) y blanco de sustrato (medio de reacción y sustrato sin suspensión de esporas) para determinar la posible catálisis ácida. En cada caso se utilizaron muestras destructivas. Los productos obtenidos y el sustrato remanente fueron extraídos y analizados por CG-EM.

- **Variables de estudio.** Las variables de estudio del proceso de biotransformación del limoneno por *A. niger* fueron: efecto inductor del sustrato,

efecto del pH, del etanol como cosolvente, del medio de biotransformación, de la fase de crecimiento del hongo y de la concentración de sustrato. La selección del mejor valor de cada variable se realizó con base en la concentración de POH formado (mg/L) (bioconversión) y la selectividad de la reacción. También se determinó la conversión de sustrato utilizando la **Ecuación 5**

$$\text{Conversión \%} = \left[\frac{C_i - C_f}{C_i} \right] * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde C_i = Concentración inicial de sustrato, C_f : Concentración final de sustrato.

A continuación se detalla el procedimiento para evaluar cada variable.

a. Efecto inductor de (R)-(+)-limoneno. Teniendo en cuenta los resultados de Castellanos (2007) se utilizó el medio YMPG para evaluar el posible efecto inductor del (R)-(+)-limoneno en la biotransformación; solo que en este caso el pH del medio (6.5) se ajustó con buffer citrato-fosfato 0.1 M. El medio se inoculó con 50 μ L de SS de concentración $1.0 \cdot 10^7$ esporas/mL obtenidas creciendo el hongo en 20 mL de medio MEA a 28 °C en presencia de inductor (0.74 mM de (R)-(+)-limoneno) (Tan y Day, 1998). La incubación del hongo en el medio se realizó durante 72 h a 28 °C y 300 rpm y posteriormente se dio inicio a la reacción de biotransformación adicionando 50 μ L de una solución etanólica de limoneno al 20% equivalente a una concentración en el medio de (R)-(+)-limoneno 12 mM. La biotransformación microbiana se monitoreó periódicamente durante 6 días. Como control se utilizó SS crecidas sin inductor.

b. Efecto del pH del medio. El buffer citrato-fosfato 0.1 M fue utilizado para ajustar el pH del medio líquido YMPG en valores de 3.5, 5.0 y 6.5; posteriormente fueron realizadas las reacciones de biotransformación de acuerdo con la

metodología anteriormente descrita. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

c. Efecto de etanol en el medio de bioconversión. Para evaluar el efecto del etanol como cosolvente en la biotransformación del limoneno, se prepararon soluciones del sustrato disueltas en etanol absoluto de diferente concentración 0, 10, 20 y 40%. En cada caso, a 5 mL de medio YMPG de pH 5.0 se adicionó un volumen de solución etanólica de limoneno de modo que la concentración de limoneno en el medio fuera constante: 12 mM. Los experimentos de biotransformación se realizaron por duplicado como se describió anteriormente.

d. Efecto del medio de biotransformación. Los experimentos de biotransformación fueron llevados a cabo en los medios líquidos, YMPG, MYB y YM de pH 5.0 ajustado con buffer citrato-fosfato 0.1 M, bajo las condiciones especificadas previamente y utilizando una concentración final en el medio de (*R*)-(+)-limoneno 12 mM a partir de una solución etanólica de limoneno al 20%. La cinética de biotransformación microbiana se monitoreó periódicamente durante 6 días de reacción. El medio líquido en el que se obtuvo la mayor bioconversión fue seleccionado para evaluar las demás variables.

e. Efecto de la fase de crecimiento del hongo. Para apreciar el efecto de la fase de crecimiento de *A. niger* DSM sobre la biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno se realizaron los experimentos creciendo el hongo de forma independiente en el medio MYB de pH 5.0 ajustado con buffer citrato-fosfato 0.1 M. El microorganismo fue cultivado durante 6 horas, 1, 3, 5 y 7 días, que corresponden a las fases de latencia, exponencial temprana, exponencial media, exponencial tardía y estacionaria, respectivamente. Una vez crecido *A. niger* en cada fase, se adicionó el (*R*)-(+)-limoneno al medio, a una concentración final de 12 mM. La cinética de transformación microbiana fue monitoreada en cada caso a los 0, 3, 6 y 9 días de reacción. La fase de crecimiento con la que se obtuvo la

máxima concentración de alcohol perílico fue seleccionada para evaluar los demás parámetros. Los ensayos fueron realizados por duplicado y se evaluó la posible catálisis ácida.

f. Efecto de la concentración de sustrato. El efecto de la concentración de (*R*)-(+)-limoneno sobre la biotransformación por *A. niger* DSM 821 fue examinado utilizando diferentes concentraciones de limoneno en el medio MYB de pH 5.0 (0, 12, 25, 50, 75 y 100 mM) en un tiempo de reacción de 6 días. Se consideró como concentración óptima aquella en la que se obtuvo mayor selectividad y mayor bioconversión.

4.2.6 Extracción, identificación y cuantificación de (*R*)-(+)-limoneno remanente y productos de biotransformación

Extracción líquido-líquido y concentración de productos: Los productos y el sustrato remanente, obtenidos de los experimentos de biotransformación fueron extraídos dos veces con AcOEt (2 * 2.5 mL) seguido de centrifugación a 4000 rpm durante 5 min. La fase orgánica se recolectó y secó con Na₂SO₄ anhidro, luego se concentró con corriente de N₂. Posteriormente se adicionaron 3 µL de n-tetradecano (estándar interno), se aforó a 1 mL y se tomaron 2 µL para el análisis cromatográfico.

Para evaluar la **eficiencia de la extracción** se prepararon tres soluciones de (*R*)-(+)-limoneno que contenían 5 mL de medio MYB de pH 6.5 y 12.5 µL de limoneno (14.7 mM); se agitaron a 150 rpm durante 30 min, y posteriormente se realizó la extracción líquido-líquido y la concentración de las muestras, como se describió anteriormente. De igual manera, se procedió con el derivado oxigenado POH, solo que la cantidad adicionada al medio equivalió a una concentración 10 mM (1520 mg/L). A su vez, se prepararon blancos, soluciones en AcOEt que contenían cantidades exactas de las concentraciones de análisis del limoneno y POH y del

istd. La comparación de los valores de concentración promedio de los respectivos blancos y de las muestras extraídas permitió determinar la EE del proceso, utilizando la **Ecuación 6**

$$EE \% = \left[\frac{\text{masa analito recuperado}}{\text{masa de analito adicionado}} \right] * 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Identificación: El limoneno remanente, los derivados oxigenados formados y demás productos de biotransformación fueron identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) utilizando un cromatógrafo Agilent modelo 6890N (Palo Alto, CA, USA) acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5975C con un sistema detector de ionización por impacto de electrones (70 eV) y un analizador de masas cuadrúpolo, operado en modo full scan de 40-400 Dalton (m/z). La relación Split fue 1:13 y se uso un inyector automático Series HP 7683. Se utilizó una columna capilar DB-WAX (60 m de largo x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor). La temperatura del inyector se programó a 45 °C, se mantuvo por 10 min, y luego se elevó a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min hasta 220 °C, y a esta temperatura se mantuvo por 30 min. La identificación de los compuestos se realizó comparando los espectros de masas de las muestras con los espectros de los compuestos presentes en las bases de datos espectrales ADAMS, NSB 75K, 138K NIST 05 y WILEY disponibles en el sistema de datos G1701BA HP Enhanced Chemstation.

Cuantificación: La cuantificación de limoneno remanente y de POH producido en los ensayos de biotransformación microbiana se realizó por el método de estándar externo por CG-EM. Para la cuantificación del POH se prepararon cuatro soluciones en acetato de etilo de diferentes concentraciones (400, 800, 1200 y 2000 mg/L), cada una por triplicado. A 5 mL de cada solución se adicionaron 15 µL de n-tetradecano como patrón (2280 mg/L). Las soluciones preparadas se utilizaron para realizar la respectiva curva de calibración del alcohol terpénico establecida por análisis de regresión lineal y determinada por el programa

estadístico Statgraphics Centurion XV. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

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

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

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

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

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

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

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

$$C_m = \frac{A_m}{f_r} \quad f_r = \frac{A_p}{C_p}$$

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

Para la cuantificación de otros productos de biotransformación se tuvo en cuenta el factor de respuesta del patrón interno n-tetradecano y la relación de área del compuesto a cuantificar; todos los experimentos de biotransformación se realizaron por duplicado, así la concentración de sustrato remanente y los productos de biotransformación se expresaron como el promedio.

4.2.7 Análisis estadístico. Los ensayos de actividad antifúngica se realizaron por triplicado. Los experimentos de biotransformación se realizaron dos veces y cada prueba se llevó a cabo por duplicado. En total se obtuvieron cuatro replicas. La concentración de sustrato remanente y los productos de biotransformación se expresaron como el promedio \pm desviación estándar. Para los cálculos se utilizó el programa Microsoft Office Excell 2007.

4.2.8 Escalamiento del proceso de biotransformación por *A. niger* DSM 821

4.2.8.1 A escala de 50 mL de medio. La biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821 en un volumen de medio de 50 mL se llevó a cabo utilizando las condiciones óptimas de cada variable encontradas en los bioensayos en microescala (5 mL). Inicialmente se evaluó el efecto de la morfología del biocatalizador, suspensión de esporas, SS (sin-precultivo) y micelio (con-precultivo), sobre la biotransformación. Para cada sistema fue necesario establecer previamente la curva de crecimiento del hongo en 50 mL de medio estéril MYB de pH 5.0 ajustado con buffer citrato-fosfato 0.1 M, con el fin de determinar el tiempo en el que el hongo se encuentra en la fase exponencial media, fase óptima de crecimiento.

Sin-precultivo: Se tomaron 50 mL de medio provistos en frascos tapa rosca de 250 mL y se inocularon con 50 μ L de SS de concentración de esporas $1 \cdot 10^7$ esporas/mL. El periodo de incubación a 28 °C y 300 rpm fue de 96 h. Posteriormente se dio inicio a la biotransformación adicionando el (*R*)-(+)-limoneno en solución etanólica al 20%. La concentración de sustrato fue 50 mM. El tiempo de reacción fue de 6 días. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Con pre-cultivo: 45 mL de medio MYB de pH 5.0 estéril se inocularon con micelio de *A. niger* obtenido por cultivo en 5 mL del mismo medio durante 72 h, a 28 °C y 300 rpm. La mezcla medio-biocatalizador de 50 mL, se incubó durante 84 h a 28 °C y 300 rpm. Posteriormente se adicionó el sustrato en concentración 50 mM y se mantuvieron las condiciones de reacción durante 6 días. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Para ambos sistemas (Sin pre y Con pre-cultivo) se realizó la extracción con acetato de etilo (2 * 15 mL) de los productos y de sustrato remanente. Del extracto se tomó una alícuota de 5 mL, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se concentró con corriente de N₂, se adicionó 3 μ L de n-tetradecano y se aforó a 1 mL. Se tomaron 2 μ L para el análisis cromatográfico.

4.2.8.2 A escala de 500 mL de medio. Para establecer el tiempo correspondiente a la fase exponencial media de *A. niger* se hizo la curva de crecimiento en 500 mL de medio MYB de pH 5.0 a 200 rpm y 28 °C en el biorreactor New Brunswick Scientific BioFlo 110. Se evaluó el efecto de la velocidad de agitación y de aireación sobre la biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821, aplicando el diseño experimental factorial multinivel 2². Cada variable se evaluó en tres niveles (alto-medio-bajo), y la variable respuesta, fue la concentración (mg/L) de DOL formado. En todos los casos, el tiempo de reacción fue de 6 días.

Finalizado cada bioensayo se filtró el micelio de *A. niger* DSM 821, se adicionaron 50 mL de la mezcla de reacción y se realizó la respectiva extracción con AcOEt (2*15 mL), siguiendo la metodología indicada anteriormente en 50 mL de medio.

Con base en las condiciones óptimas de velocidad de agitación y de aireación, arrojadas por el análisis de resultados del diseño experimental aplicando metodología de superficie de respuesta y análisis de optimización multivariable, se determinó la aproximación teórico-experimental llevando a cabo nuevamente el experimento de biotransformación del limoneno (2 veces).

Posteriormente se realizó la extracción de productos y sustrato remanente del medio de bioconversión utilizando alícuotas de 50 mL. Se recolectó la fase orgánica, y el extracto concentrado de biotransformación se utilizó para los ensayos de bioactividad.

4.2.9 Purificación del POH del extracto de biotransformación. El extracto en AcOEt de las biotransformaciones del (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821, obtenido bajo las condiciones óptimas de velocidad de aireación y agitación en el biorreactor, se concentró por micro-destilación fraccionada (10 veces). Del concentrado obtenido se tomaron 5 mL y se aplicaron a una columna de Sílica Gel 60 (14.5 x 1.8 cm) equilibrada con una mezcla diclorometano-acetona 9:1 (Abraham et al., 1986). Los productos fueron eluidos a una velocidad de 1.0 mL/min, recolectándose fracciones de 4 mL. Las fracciones obtenidas se analizaron por TLC usando platos de Sílica Gel (Merck) y diclorometano-acetona 9:1 como eluyente (Abraham et al., 1986). Los platos se secaron y aspersaron con solución de vainillina-ácido sulfúrico-etanol (0.5 g: 0.5 mL: 9 mL) (Gilbert y Martín, 2006) y calentaron a 100 °C por 1 min para colorear los metabolitos. La identificación de los compuestos eluidos se realizó por comparación con el R_f de patrones de limoneno y de POH.

4.2.10 Bioactividad del extracto de biotransformación del (R)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821. Para determinar la posible aplicación del extracto de biotransformación del (R)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821 concentrado obtenido bajo condiciones óptimas de operación en biorreactor (muestra 2) y solución patrón de POH en AcOEt (muestra 5), se evaluó la citotoxicidad en células de mamífero y la actividad anti-*Trypanosoma cruzi*, y anti-*Leishmania* en el Laboratorio de Quimioterapia del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP-UIS). Además se determinó la capacidad antioxidante del extracto.

- **Citotoxicidad en células de mamífero y la actividad anti-*Trypanosoma cruzi*, anti-*Leishmania*.** Los compuestos fueron pesados entre 2-3 mg y disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). Las soluciones stock se almacenaron a -20 °C. El Nifurtimox, la Amfotericina B (AmB) y la miltefosina fueron utilizados como medicamentos de referencia.

a. Prueba de actividad antiparasitaria. Los epimastigotes de *T. cruzi*, promastigotes de *L. chagasi* y *L. panamensis* fueron expuestos a diferentes concentraciones (0.1-100 µg/mL) de los compuestos 1 y 4 durante 72 h a 28 °C. Células control permanecieron sin el compuesto. La inhibición del crecimiento, en el caso de epimastigotes de *T. cruzi*, se determinó por conteo directo, y para promastigotes de *Leishmania* spp., por el método de reducción de la sal de tetrazolio MTT. Los resultados fueron expresados como concentración inhibitoria del 50 y 90% de los parásitos (CI₅₀ y CI₉₀) (Gómez et ál, 2010; Escobar et al., 2010; Palma et al., 2009).

b. Prueba de citotoxicidad. Las células VERO (derivadas de riñón de mono verde africano) fueron expuestas a diferentes diluciones de los compuestos (300-0.3 µg/mL). Se realizó incubación por 72 h a 37 °C y 5% de CO₂. Se utilizó un control de muerte celular como referencia. El ensayo se realizó una sola vez.

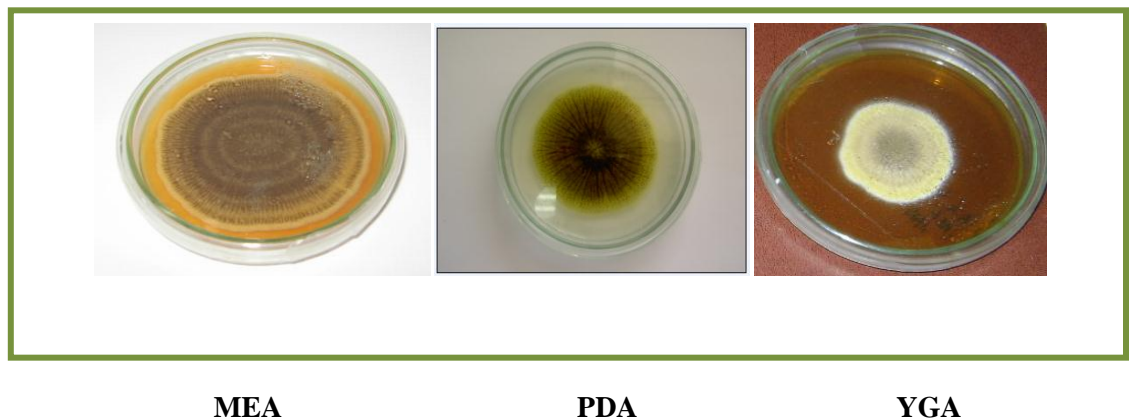
Tanto las diluciones de los compuestos 1 y 4 y el medicamento de referencia se evaluaron por triplicado. Los resultados se expresaron como concentración citotóxica para el 50 y 90% de las células (CC₅₀ y CC₉₀).

c. Actividad antioxidante. La actividad antioxidante del extracto de biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno y del patrón de POH, se analizó usando el método espectrofotométrico de barrido (scavenging) del catión radical ABTS^{•+} (Cadena y Herrera, 2008; Re et al., 1999). Los resultados se expresaron como mili-equivalentes a Trolox/kg de muestra a partir de la curva de calibración de Trolox realizada con concentraciones entre 0.10-2.0 mM. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

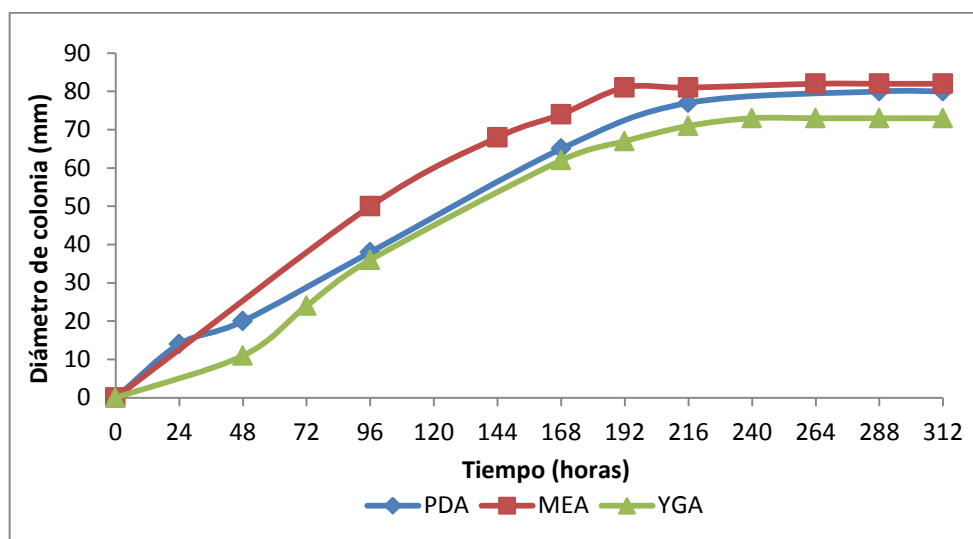
4.3.1 Cinética de crecimiento de *Aspergillus niger* DSM 821 en medio de cultivo sólido. El crecimiento de *A. niger* DSM 821 fue evaluado en los medios PDA, MEA y YGA (**Figura 50**).

Figura 50 *Aspergillus niger* DSM 821. Cepa crecida en los medios de cultivo sólidos: MEA, PDA y YGA a 28 °C, 8 días de crecimiento



Para evaluar el crecimiento de *A. niger* DSM 821 en los medios PDA, MEA y YGA se hizo seguimiento del diámetro de la colonia en el tiempo. De las curvas de crecimiento del hongo se observa que la composición del medio influye en el crecimiento de *A. niger*. El mayor crecimiento del hongo se obtuvo en el medio MEA, seguido del medio PDA y YGA (**Figura 51**). El medio MEA se diferencia por su mayor contenido en fuente de carbono y nitrógeno y un pH (0.2 y 0.6 unidades) ligeramente más ácido comparado con los medios PDA y YGA.

Figura 51 Cinéticas de crecimiento de *Aspergillus niger* DSM 821 en los medios sólidos PDA, MEA y YGA cultivado a 28°C



La mayor VCR del hongo se obtuvo en el medio MEA y fue 1.1 y 2.0 veces mayor a los medios PDA y YGA, respectivamente (**Tabla 14**). Por lo anterior, se seleccionó el medio MEA para la conservación de *A. niger*.

4.3.2 Evaluación de la actividad antifúngica del sustrato. Para determinar el efecto del (*R*)-(+)-limoneno sobre el crecimiento de *A. niger* DSM 821 se varió la concentración de sustrato en el medio de cultivo MEA, entre 0 y 50 mM. Se observó que la presencia de limoneno afecta negativamente el crecimiento del hongo, disminuyendo la VCR (**Tabla 15**). La concentración de limoneno que

inhibió el crecimiento de *A. niger* en un 25% (CMI) fue de 12 mM, mientras que concentraciones superiores a 50 mM, fueron letales (CL) por inhibir totalmente el crecimiento del hongo. El efecto observado puede ser consecuencia de la toxicidad del (*R*)-(+)-limoneno, al tener un coeficiente de partición n-octanol-agua ($\log P_{ow}$) de 4.8 (Tan y Day, 1998; Onken y Berger, 1999; Martíns et al., 2007). Terpenos con $\log P_{ow}$ entre 1 y 5 ocasionan pérdida de permeabilidad específica e integridad de la membrana celular (Bicas et al., 2008; Onken y Berger, 1999; Kraidman et al., 1969).

Tabla 14 Velocidad de crecimiento radial (VCR) de *Aspergillus niger* DSM 821 en diferentes medios de cultivo sólido

Medio de cultivo sólido	VCR (mm/hora)
PDA	0.41 ± 0.03
MEA	0.46 ± 0.03
YGA	0.23 ± 0.04

4.3.3 Optimización del proceso de biotransformación. En el **Anexo 6** se encuentra el porcentaje de recuperación del alcohol perílico, y los parámetros evaluados para la validación del método de cuantificación.

Las variables analizadas en la optimización del proceso de biotransformación del limoneno por células completas de *Aspergillus niger* DSM 821 fueron: inducción por sustrato, efecto de co-solvente, medio de cultivo líquido, pH del medio, fase de crecimiento del hongo y concentración de sustrato. A continuación se detallan los resultados de cada una.

Tabla 15 Actividad antifúngica del (*R*)-(+)-limoneno sobre *A. niger* DSM 821, medio MEA cultivado a 28 °C

Concentración de limoneno (mM)	Diámetro (mm)	Inhibición (%)	VCR (mm/h)
0	78		0.46 ± 0.02
3.7	76	2.56	0.43 ± 0.04
7.3	75	3.85	0.38 ± 0.02
11.0	72	7.69	0.34 ± 0.04
14.7	55	29.49	0.14 ± 0.01
22.0	52	33.33	0.13 ± 0.02
30.0	46	41.03	0.12 ± 0.01
50.0	0	100.00	0.00

a. **Efecto inductor del (*R*)-(+)-limoneno.** Siguiendo la metodología de Tan y Day (1998) para evaluar el efecto inductor del sustrato en la biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821, se suplementó el medio MEA con el sustrato en una concentración de 0.74 mM (Tan y Day, 1998). Con las esporas inducidas, se llevaron a cabo los experimentos de biotransformación en el medio YMPG, a una concentración de sustrato de 12 mM, a 28 °C y 300 rpm. Los resultados mostraron que la biotransformación es diferente cuando el hongo es pre-expuesto al limoneno. En presencia de inductor, se llevan a cabo reacciones de oxidación e hidroxilación dando lugar a los derivados carvona, *cis/trans* carveol y 1,2-limoneno diol (**Tabla 16**). Sin inducción previa, solo hay reacciones de hidroxilación, y el producto principal es el POH. Otros derivados son *cis/trans* carveol, linalol y fenil etanol. En estas condiciones la concentración de POH es 129 mg/L. Lo anterior significa que la producción de POH mediante biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* no es inducible.

Tabla 16 Productos de biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821

Sin inductor		Con inductor (0.74 mM limoneno)	
Producto	Concentración promedio (mg/L)	Producto	Concentración promedio (mg/L)
Limoneno	1243.3±8.5	Limoneno	1501.9±8.9

Sin inductor		Con inductor (0.74 mM limoneno)	
Producto	Concentración promedio (mg/L)	Producto	Concentración promedio (mg/L)
remanente		remanente	
Linalol	80.6±2.2	Carvona	60.9±2.8
<i>Trans</i> -carveol	71.1±1.9		
<i>Cis</i> -carveol	54.3±1.5	1,2 limoneno diol	22.7±1.7
Fenil etanol	55.7±2.0	<i>Trans</i> -carveol	21.1±2.0
Alcohol perílico	129.1±2.9	<i>Cis</i> -carveol	28.2±2.4
Conversión (%)	23.9±0.6	Conversión (%)	8.1±0.5

b. Efecto del pH del medio de biotransformación. Se evaluó la capacidad de biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821 a valores de pH de 3.5, 5.0 y 6.5, en medio YMPG. El pH del medio afectó la selectividad de la biotransformación y dio lugar a derivados hidroxilados. A pH 3.5 se obtuvo principalmente fenil etanol, y su concentración (450 mg/L) fue 15 y 100 veces mayor a la del linalol y 1,2-limoneno-diol, respectivamente (**Tabla 17**). A pH de 5.0, el producto mayoritario es POH, obtenido en una concentración de 129 mg/L. Otros productos fueron los alcoholes linalol, 1,2 limoneno-diol y fenil etanol. A pH 6.5, aunque la reacción fue más selectiva, formando fenil etanol y 1,2 limoneno-diol, la bioconversión fue menor. El efecto del pH sobre la biotransformación del limoneno por *A. niger* no ha sido evaluado por otros autores.

Tabla 17 Efecto del pH en la biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno utilizando *Aspergillus niger* DSM 821

Concentración de productos (mg/L)									
pH 3.5			pH 5.0			pH 6.5			
Linalol	1,2-limoneno-diol	Fenil Etanol	Alcohol perílico	Linalol	1,2-limoneno-diol	Fenil etanol	1,2-limoneno-diol	Fenil etanol	
4.5±0.3	30.8±2.3	450.7±18.2	129.1±2.9	18.4±2.6	35.1±3.1	66.9±3.7	30.7±1.9	85.2±3.0	
Conversión (%)		29.7±1.3	Conversión (%)			15.3±0.8	Conversión (%)		7.1±0.3

c. Efecto de etanol en el medio de bioconversión. La presencia de etanol en el medio de biotransformación, influye notablemente en la capacidad de las células de *A. niger* DSM 821 para transformar el (*R*)-(+)-limoneno. Tanto en presencia como en ausencia de etanol el hongo puede oxifuncionalizar el limoneno. Sin embargo, la presencia de etanol favorece la biotransformación del limoneno y produce los derivados hidroxilados: POH, isómeros *cis/trans* carveol y linalol. La máxima producción de POH (129.1 mg/L) se consigue cuando se utiliza una solución etanólica de limoneno al 20% seguida de la solución al 40% (ver **Tabla 18**). Es decir, que concentraciones de etanol entre 48 y 128 mM son favorables para la bioconversión del limoneno hacia POH. Concentraciones elevadas de etanol (289.4 mM) disminuyen 16 veces la capacidad de las células fúngicas para biotransformar el limoneno; de igual manera ocurre en ausencia de etanol (0 mM), porque la concentración de POH es 11 veces más baja. En conclusión, la presencia de etanol en el medio es requerida para que las células de *A. niger* DSM 821 tengan máxima capacidad de transformar el limoneno y producir POH. A su vez, el hongo puede sintetizar oxigenasas activas y producir ácidos grasos. La presencia de etanol en el medio favorece la esterificación, dando lugar a los ésteres etílicos: etil laureato, etil oleato, etil linoleato y etil estearato.

Tabla 18 Metabolitos producidos en la biotransformación del limoneno por *A. niger* DSM 821 por efecto de etanol como co-solvente

Productos	Concentración de etanol (mM)			
	0	289.4 (10%) ^a	128.7 (20%) ^a	48.3 (40%) ^a
	Concentración (mg/L)			
Limoneno remanente	1623.4±1.3	1595.6±6.0	1319.9±22.0	1514.5±10.0
Linalol	ND	5.7±0.7	18.4±2.6	6.8±1.0
Alcohol perílico	11.5±1.3	7.8±1.0	129.1±2.9	86,7±2.2
Etil laureato	ND	5.5±0.9	8.4±1.2	3.8±1.1
Etil oleato	ND	8.1±1.1	13.2±1.5	3.9±0.9
Etil linoleato	ND	6.9±1.0	11.0±1.5	5.0±1.9
Etil estearato	ND	5.3±1.3	8.4±1.6	3.8±0.7

Productos	Concentración de etanol (mM)			
	0	289.4 (10%) ^a	128.7 (20%) ^a	48.3 (40%) ^a
	Concentración (mg/L)			
Trans carveol	ND	ND	13.9±2.0	5.8±1.2
Cis carveol	ND	ND	10.5±1.9	4.5±1.1
Fenil etanol	ND	ND	66.9±3.7	ND
Limoneno 1,2-diol	ND	ND	35.1±3.1	ND
Conversión (%)	0.7±0.1	2.4±0.4	19.3±1.3	7.4±0.6

ND: No detectado. ^a: Concentración de la solución etanólica de limoneno empleada

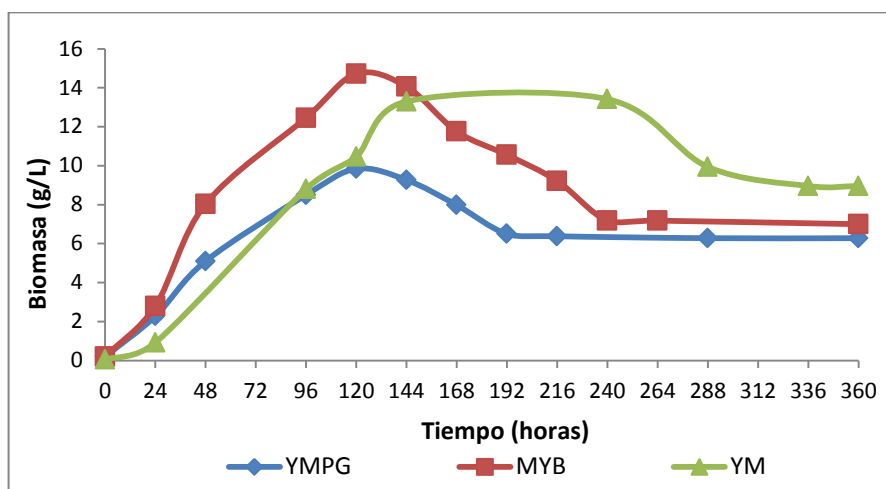
La obtención de etil-ésteres de ácidos grasos superiores por procesos de biotransformación de terpenos no ha sido reportada hasta la fecha. Se han producido ácidos grasos de bajo peso molecular (ácido propanoico, isobutírico e isopentanoico) mediante la adición de limoneno puro en el medio de biotransformación (Menéndez et al, 2002); bajo estas condiciones se obtuvo un 28.5% de POH (porcentaje relativo al pico máximo, limoneno remanente); es posible que ante la presencia de etanol en el medio TSB (caldo de triptona-soya) empleado por estos autores, los ácidos grasos se esterifiquen y den lugar a los respectivos etil-ésteres.

Castellanos (2007), utilizando una solución etanólica del limoneno al 40% como sustrato en la biotransformación por *A. niger* DSM 821 en el medio YMPG, encontró una concentración de POH de 72.6 mg/L (Castellanos, 2007). En este trabajo la concentración de POH en el medio YMPG de pH 5.0 fue 1.2 veces mayor.

d. Efecto del medio de cultivo líquido en el crecimiento de *A. niger* y en la biotransformación del limoneno. La cinética de crecimiento de *A. niger* DSM 821 en los medios líquidos YMPG, MYB y YG a pH 5.0 (**Figura 52**) mostró que la composición del medio de cultivo influye en el crecimiento del hongo. El mayor

crecimiento se obtuvo en el medio MYB caracterizado por su igual contenido en fuente de carbono y nitrógeno seguido del crecimiento en los medios YG y YMPG, respectivamente. Sin embargo, las velocidades específicas de crecimiento (μ) en los tres medios fueron relativamente similares: 0.03 h^{-1} para MYB y YG y 0.02 h^{-1} para YMPG.

Figura 52 Producción de biomasa de *Aspergillus niger* DSM 821 en diferentes medios de cultivo líquido: YMPG, MYB y YM de pH 5.0 a 28°C y 300 rpm



La biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* se llevó a cabo utilizando los tres medios líquidos. Los resultados muestran que en los medios MYB, YMPG y YG de pH 5.0, el POH es el producto mayoritario (**Tabla 19**); no obstante, en el medio MYB se produjo una concentración de $246.4 \pm 5.6 \text{ mg/L}$, concentración 1.7 y 3.4 veces superior a los medios YMPG y YG, respectivamente. La mayor conversión de limoneno en el medio MYB se debe, posiblemente, a que en este se obtuvo mayor biomasa, y a su mayor contenido en nitrógeno, representado por el contenido en peptona. Por otro lado, los resultados indican que los medios de bioconversión no fueron selectivos porque en todos los casos se formaron los mismos compuestos, pero en diferente concentración.

Castellanos biotransformó el limoneno con *A. niger* DSM 821 utilizando los medios YMPG y PDB (caldo papa-dextrosa) a una concentración de limoneno de 4.93 mM alcanzó una bioconversión de POH de 72.6 mg/L (14.7%) a los 6 días. Con *A. niger* BFQU 68 en el medio TSB, una concentración de limoneno de 37 mM, obtuvo un 28.5% de POH, en relación con el limoneno remanente (pico máximo) (Menéndez et al., 2002).

Tabla 19 Metabolitos producidos durante la biotransformación del limoneno por *A. niger* DSM 821 utilizando diferentes medios líquidos

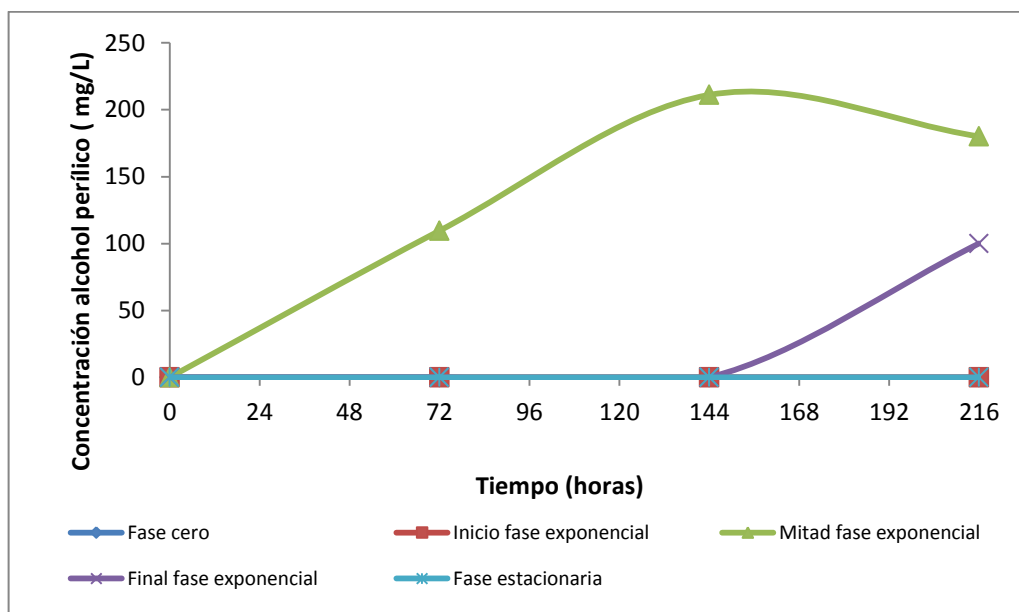
Productos de biotransformación	Medios de biotransformación					
	YMPG		MYB		YG	
	Conversión %	Concentración (mg/L)	Conversión %	Concentración (mg/L)	Conversión %	Concentración (mg/L)
Limoneno remanente	80.7±1.0	1319.9±16.8	62.5±1.8	770.6±32.5	85.5±0.8	1397.9±13.3
Linalol	1.1±0.2	8	1.0±0.1	16.6±2.1	4.6±0.2	3
Trans-carveol	0.9±0.1	18.4±2.6	4.4±0.2	71.8±3.4	ND	74.5±3.4
Cis-carveol	0.6±0.1	13.9±2.0	5.8±0.2	94.5±3.9	1.2±0.1	ND ^b
Alcohol perílico	7.9±0.2	10.5±1.9	15.1±0.3	246.4±5.6	4.5±0.2	20.4±1.9
Fenil etanol	4.1±0.2	129.1±2.9	3.3±0.1	54.3±2.1	2.8±0.1	73.0±2.8
1,2 limoneno-diol	2.2±0.2	66.9±3.7	4.3±0.2	71.1±2.7	0.7±0.1	45.6±2.3
Etil ésteres	2.5±0.1	35.1±3.1	18.5±0.8	309.5±12.7	0.8±0.1	10.9±1.1
Total	19.3±1.0	41.0±5.8	37.5±1.8	864.2±32.5	14.5±0.8	12.5±1.8
		314.9±16.8				236.9±13.3

^a PNI: Producto no identificado, ^b: No detectado

e. Efecto de la fase de crecimiento de *A. niger*. El efecto de la fase de crecimiento de *A. niger* sobre la biotransformación del limoneno se evaluó adicionando el sustrato al medio de cultivo que contenían el microorganismo en diferentes fases de crecimiento. La biotransformación se monitoreó periódicamente durante 9 días. Las células de *A. niger* mostraron capacidad para biotransformar el limoneno cuando se encontraban en la fase exponencial media (72 h), alcanzando una concentración máxima de POH de 246.4±5.6 mg/L a los 6 días de reacción (**Figura 53**). En la fase exponencial tardía (120 h), la biotransformación del limoneno se lleva a cabo luego de 6 días de adicionado el sustrato y se dirige hacia la formación de trans-carveol, alcanzando una

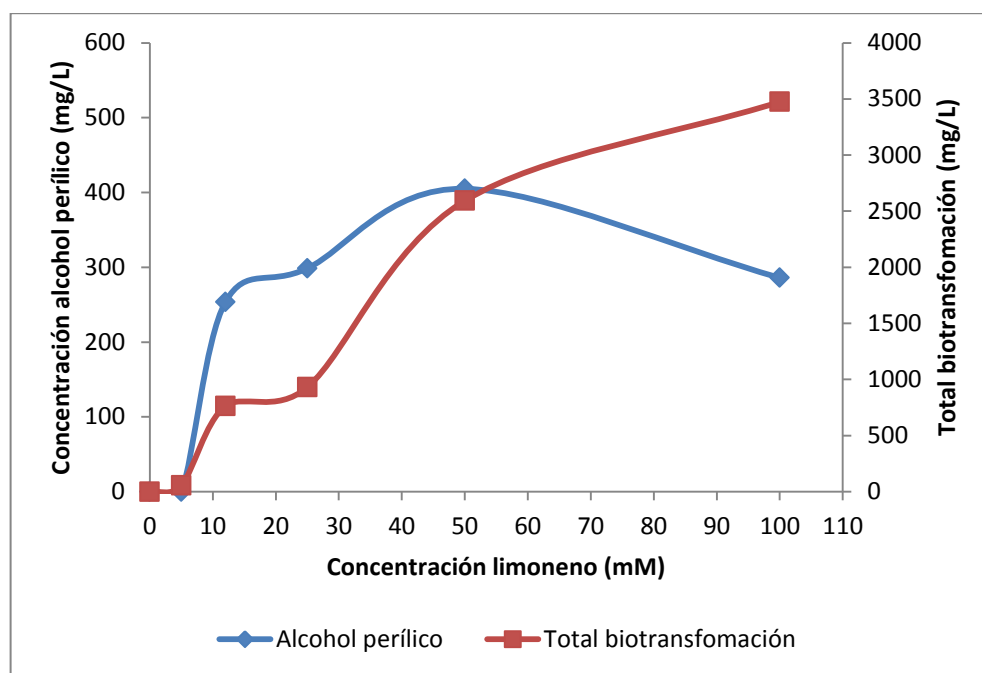
concentración de 100 mg/L a los 9 días. En las demás fases, latencia, exponencial temprana y estacionaria, no hay biotransformación del limoneno por *A. niger*.

Figura 53 Efecto de la fase de crecimiento de *A. niger* DSM 821 sobre la biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno, medio MYB, 28 °C, 300 rpm, pH 5.0



f. Efecto de la concentración de sustrato. La concentración de sustrato afectó la selectividad de la reacción y el nivel de transformación del sustrato. La selectividad disminuyó al incrementar la concentración de limoneno en el medio (**Figura 54**). Sin embargo, una concentración de (*R*)-(+)-limoneno de 50 mM favoreció notoriamente la producción de POH, alcanzando una concentración de 405 mg/L. Otros productos fueron cis/trans-carveol, carvona, limoneno-1,2-diol, fenil etanol y etil ésteres palmítico, oleico y linoleico (**Tabla 20**).

Figura 54 Producción de alcohol perílico durante la biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821



Comparando con lo obtenido anteriormente al evaluar los efectos del pH, medio de biotransformación y fase de crecimiento de *A. niger*, la concentración de POH es 1.7 veces mayor.

Concentraciones mayores a 50 mM dan lugar a los DOL peril aldehído, cis/trans carveol, carvona, α -terpineol, óxido de limoneno 1,2, valenceno, β -mirceno y fenil etanol y los etil ésteres de los ácidos grasos palmítico, oleico y linoleico. La presencia de los etil-ésteres de ácidos grasos en el extracto natural obtenido por la biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821, posiblemente ampliaría su espectro de aplicación, teniendo en cuenta que en la búsqueda de aumentar la hidrofobicidad, las propiedades lipofílicas y la bioactividad, modifican al POH para obtener ésteres grasos perílicos (Skouridou et al., 2004).

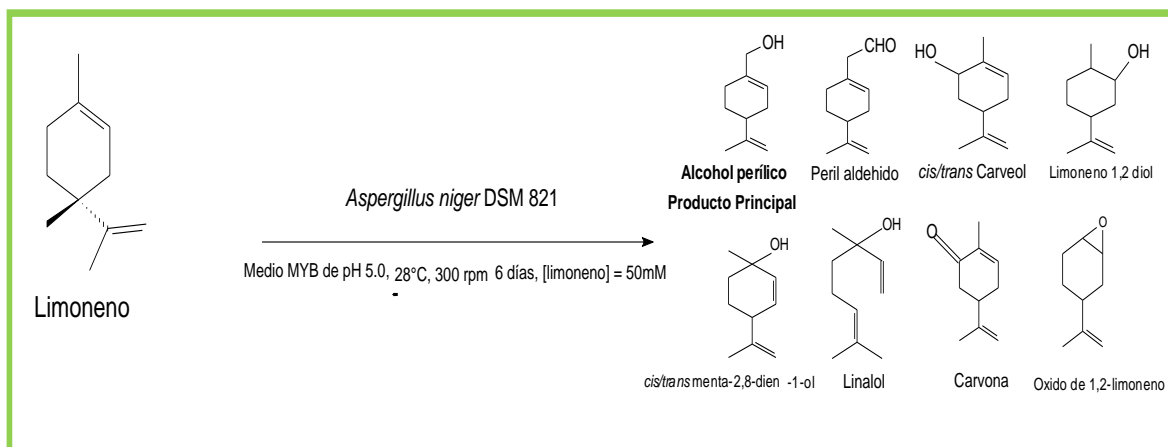
Tabla 20 Relación de metabolitos obtenidos en la biotransformación del limoneno por *A. niger* DSM 821 a diferentes concentraciones de sustrato

Productos	Concentración limoneno (mM)				
	5	12	25	50	100
Limoneno remanente	623.7±3.1	770.6±32.5	2474.9±38.7	4861.0±55.8	10050.0±104.8
trans carveol	ND	71.8±3.4	58.9±2.8	143.7±6.4	343.1±10.1
cis carveol	ND	94.5±3.9	49.0±1.9	115.6±5.7	254.2±11.1
Carvona	ND	ND	43.9±1.7	106.2±4.3	296.3±13.8
Alcohol perílico	ND	246.4±4.6	298.7±13.2	404.9±6.6	285.9±13.9
Limoneno-1,2-diol	ND	54.3±2.1	56.1±2.0	117.5±3.3	415.1±16.3
Fenil etanol	ND	71.1±2.7	71.7±2.4	83.2±3.6	120.1±2.5
Ésteres de ácidos grasos	57.5±3.1	309.5±12.7	352.8±14.7	798.1±16.9	862.4±17.5
Linalol	ND	16.6±2.1	ND	79.9±2.9	212.9±4.0
trans menta-2,8-dien-1-ol	ND	ND	ND	31.9±1.9	86.6±2.0
cis menta-2,8-dien-1-ol	ND	ND	ND	24.8±0.9	96.3±2.9
α-terpineol	ND	ND	ND	19.5±1.6	49.3±1.3
Valenceno	ND	ND	ND	25.7±1.7	68.6±2.2
β-mirceno	ND	ND	ND	ND	363.2±3.1
Peril aldehído	ND	ND	ND	ND	45.3±1.9
Oxido de 1,2-limoneno	ND	ND	ND	ND	74.7±2.2
Total Biotransformación (mg/L)	57.5±3.1	864.2±32.5	931.1±38.7	1951.0±55.8	3574.0±104.8
Conversión (%)	8.4±0.5	37.5±1.8	27.3±1.1	36.3±0.6	26.2±0.8

Una estrategia empleada por Menéndez y colaboradores (2002) para incrementar la producción de POH (100% del sustrato transformado) consistió en adicionar ketoconazol al medio TSB para inhibir la acción de oxigenasas y suprimir la producción de ácidos grasos de cadena corta (propanoico, isobutírico e isopentanoico) durante la biotransformación del limoneno por *A. niger* BFQU 68 (Menéndez et al., 2002). Es posible que utilizando esta estrategia en el bioproceso, incremente de igual manera, la concentración de POH.

Finalmente, luego de evaluar las distintas variables que afectan la biotransformación de limoneno por *A. niger* DSM 821, se puede decir que este hongo tiene la capacidad de hidroxilar el limoneno en diferentes carbonos, principalmente en el C-7, dando lugar a POH (**Figura 55**). La concentración máxima de POH, 405 mg/L, se obtiene cuando las condiciones del proceso son las siguientes: medio de biotransformación MYB a pH 5.0 inoculado con esporas crecidas hasta fase exponencial temprana (72 h), sin inductor, concentración de limoneno de 50 mM, adicionada en solución etanólica al 20% (etanol 128 mM), tiempo de reacción de 6 días, 28 °C y 300 rpm. La conversión máxima del limoneno fue del 36.3% distribuida entre los diferentes productos de oxidación (26.2%) con un aporte de POH de aproximadamente 6%. Además, al aprovechar los nutrientes del medio complejo, *A. niger* probablemente sintetiza oxigenasas activas que producen ácidos grasos superiores que en presencia de etanol se esterifican a etil-ésteres y contribuyen al total de bioconversión en un 11.7%.

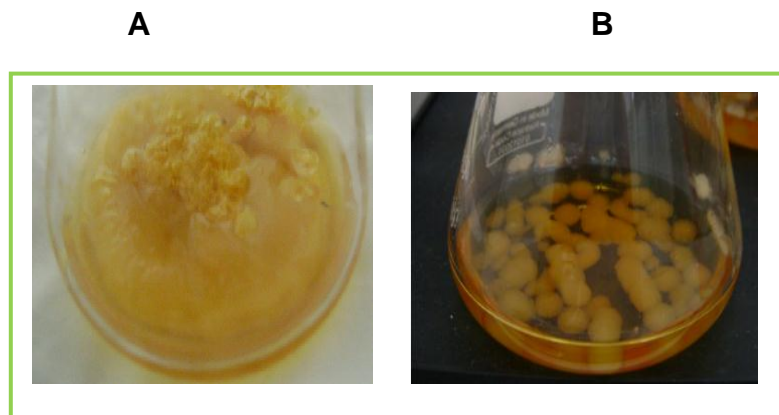
Figura 55 Biotransformación del limoneno por suspensión de esporas de *Aspergillus niger* DSM 821 bajo condiciones óptimas del proceso



4.3.4 Escalado del proceso de biotransformación de (R)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821

4.3.4.1 A 50 mL de medio de cultivo. La biotransformación del (R)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821 en 50 mL de medio MYB de pH 5.0, se llevó a cabo utilizando el biocatalizador en dos morfologías: micelio (con pre-cultivo) (**Figura 56 A**) y suspensión de esporas (sin pre-cultivo) (**Figura 56 B**).

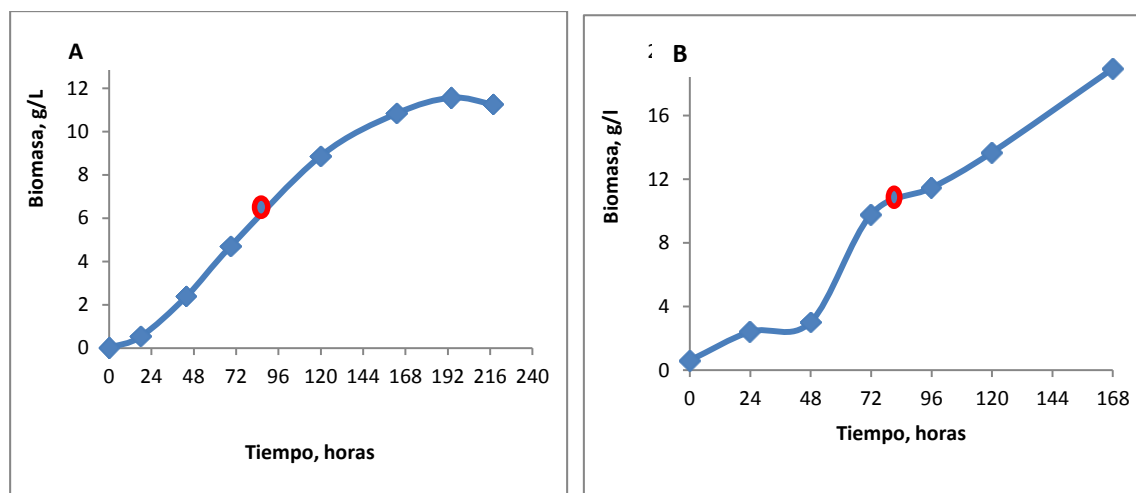
Figura 56 Imagen de la morfología de *A. niger* DSM 821, micelio y suspensión de esporas



A partir de la curva de crecimiento de *A. niger* en 50 mL de medio MYB de pH 5.0 para ambos sistemas (**Figura 57**) se determinó el tiempo correspondiente para que el hongo alcance la fase óptima (fase exponencial media); esto se requería establecer para iniciar los experimentos de biotransformación a escala de 50 mL.

Para el sistema sin-precultivo el tiempo fue de 96 h, y para el sistema con-precultivo de 84 h, obteniendo una biomasa de 11.46 y 6.15 g/L, respectivamente.

Figura 57 Cinética de crecimiento microbiano de *A. niger* DSM 821 en 50 mL de medio MYB de pH 5.0 a 28 °C y 300 rpm. (A) Suspensión de esporas y (B) Micelio

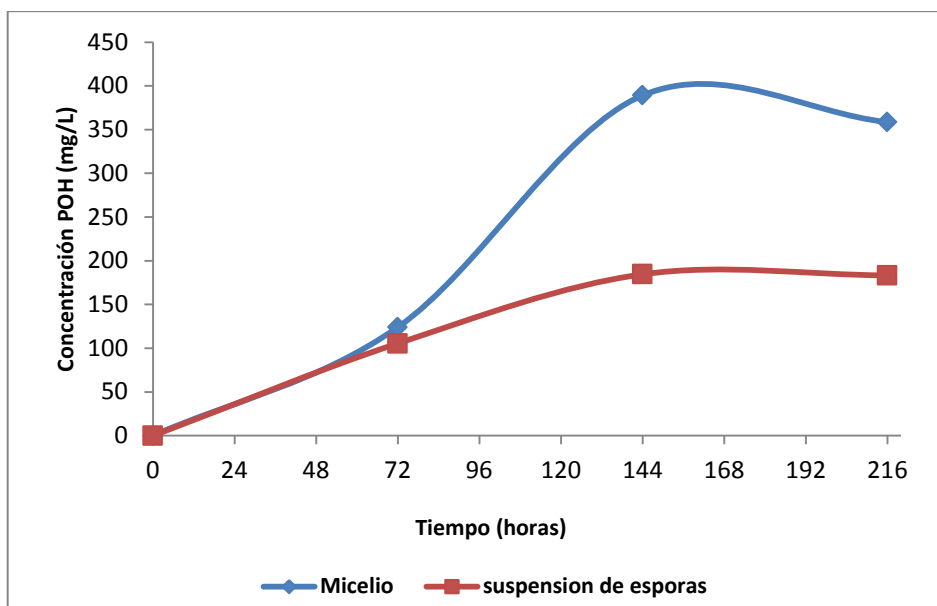


Manteniendo las demás condiciones de reacción, la biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno se llevó a cabo utilizando micelio y suspensión de esporas (SS) de *A. niger* DSM 821. Los resultados mostraron que dependiendo de la morfología del hongo, la producción de POH es diferente (**Figura 58**); la mayor concentración se obtuvo con micelio (389,1 mg/L), y con SS se obtuvieron 184.6 mg/L; es decir, con micelio fue 2.1 veces mayor la bioconversión dirigida hacia POH.

Al comparar esta concentración de POH con las conseguidas en microescala (5 mL), se observa que disminuye; con micelio el descenso fue del 3.9%, y con SS, del 45.6%. Teniendo en cuenta la acción completa de oxigenasas de *A. niger* que da lugar a diferentes productos (**Tabla 21**), el total de biotransformación disminuyó el 42.7% con micelio, y el 77.6% con SS.

Por lo anterior, se decidió utilizar el micelio de *A. niger* DSM 821 para continuar con el escalado.

Figura 58 Producción de alcohol perílico por biotransformación del limoneno por *A. niger* DSM 821 en dos diferentes morfologías



4.3.4.2 A 500 mL de medio de cultivo. Antes de llevar a cabo la biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *A.niger* DSM 821 en 500 mL de medio MYB de pH 5.0 depositados en el biorreactor New Brunswick Scientific BioFlo 110 fue necesario establecer el tiempo en el que el hongo alcanza la fase óptima de crecimiento bajo las nuevas condiciones: medio agitado mecánicamente a 200 rpm y 28 °C; en la **Figura 59** se observa que a las 48 h el hongo se ubica en esta fase; además, en este tiempo el hongo ha consumido aproximadamente el 90% de la glucosa inicial. En el **Anexo 7** se reporta la curva de calibración de glucosa.

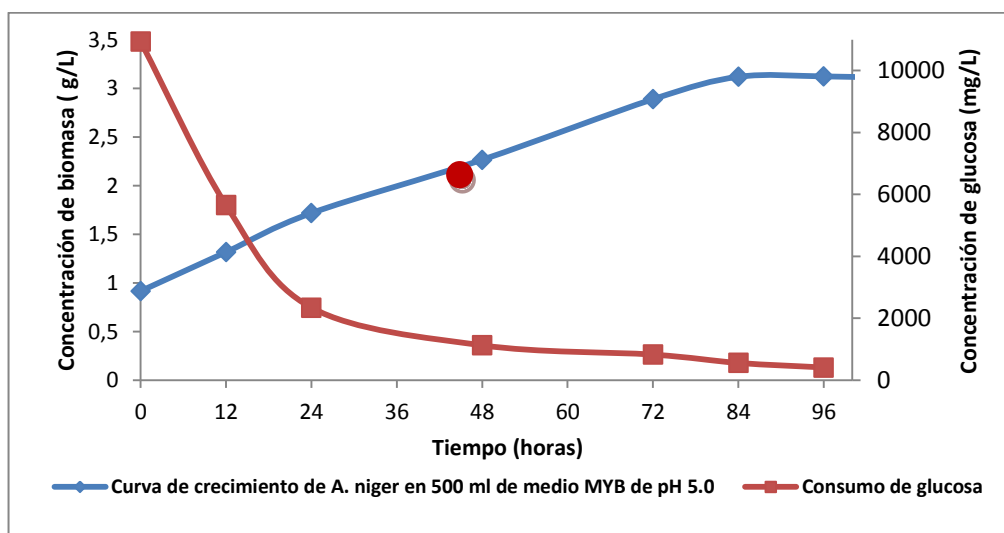
Tabla 21 Metabolitos producidos durante la biotransformación del limoneno en 50 mL de medio MYB de pH 5.0 a 300 rpm, 28 °C y 6 días de reacción

Concentración promedio (mg/L)		
Productos	Con micelio	Con suspensión de esporas
Limoneno remanente	5973.5	6315
Linalol	149.6	ND
Trans carveol	109.1	119.2

Concentración promedio (mg/L)		
Productos	Con micelio	Con suspensión de esporas
Cis carveol	94.2	89.7
Alcohol perílico	389.1	184.6
Limoneno 1,2 diol	14.9	103.5
Carvona	81.6	ND
trans menta-2,8-dien-1-ol	28.2	ND
cis menta-2,8-dien-1-ol	31.5	ND
α -terpineol	29.3	ND
Fenil etanol	50.6	ND
Total DOL (mg/L)	978.1	497.0
Conversión por biooxidación (%)	14.4	7.29
Etil hexadecanoato	58.5	30.3
Etil linoleato	24.3	28.2
Etil tetradecanoato	47.3	24.5
Total etil ésteres de ácidos grasos (mg/L)	130.1	83.0
Conversión por esterificación (%)	1.91	1.22
Conversión total (%)	16.3	8.51

ND: No detectado

Figura 59 Cinética de crecimiento de *A.niger* DSM 821 en 500 mL de medio MYB de pH 5.0, a 28 °C y 200 rpm en biorreactor New Brunswick Scientific BioFlo 110



Selección de las condiciones de operación del biorreactor para la producción de POH

En el proceso de biotransformación del limoneno por *A. niger* llevado a cabo en biorreactor se evaluó el efecto de la velocidad de agitación y de aireación mediante la aplicación del diseño experimental factorial multinivel 2². En la **Tabla 22** se presentan los valores de los niveles evaluados.

Tabla 22 Variables y niveles evaluados en el diseño factorial multinivel 2²

Variables	Niveles	
	-1	+1
Velocidad de agitación (rpm)	200	250
Velocidad de aireación (vvm ^a)	0.00	0.05

^avvm: velocidad de aireación por volumen de medio

Los valores de la variable respuesta, concentración de POH (mg/L) se presentan en la **Tabla 23** Los mínimos y máximos de concentración de POH fueron de 259.5 y 100.8 mg/L, respectivamente. La concentración de POH más baja se obtuvo con los valores más altos de velocidad de aireación y de agitación, y al contrario, la mayor producción de POH se presentó en los niveles más bajos; la aireación al sistema favoreció la producción de etil-ésteres de ácidos grasos.

Tabla 23 Matrix del diseño factorial multinivel 2², y la concentración de POH obtenida por GC-MS, 6 días de reacción

Puntos del diseño	Niveles de las variables independientes		Variable respuesta
	Agitación (rpm)	Aireación (vvm)	Concentración de POH (mg/L)
1	-1	-1	259.5
2	1	-1	200.4
3	-1	1	154.6
4	1	1	100.8

Los datos del diseño experimental fueron analizados aplicando la metodología de superficie de respuesta, y se realizó el análisis estadístico de estandarización de efectos y análisis de varianza (ANOVA) de las variables independientes, empleando el sistema de análisis estadístico Statgraphics Centurion XV. Los resultados se muestran en la **Tabla 24**.

Tabla 24 Efectos estimados y análisis de varianza para la concentración de POH (mg/L)

Efecto	Coefficiente de regresión	SS	Df
Promedio	178,825		1
A:Agitación	-56,45	3186,6	1
B: Velocidad aireación	-102,25	10 455,1	1
AB	2,65	7,0225	1
Error total		0,0	0
Total (corr.)		13 648,7	3
coeficiente de determinación (R ²)		100,00	

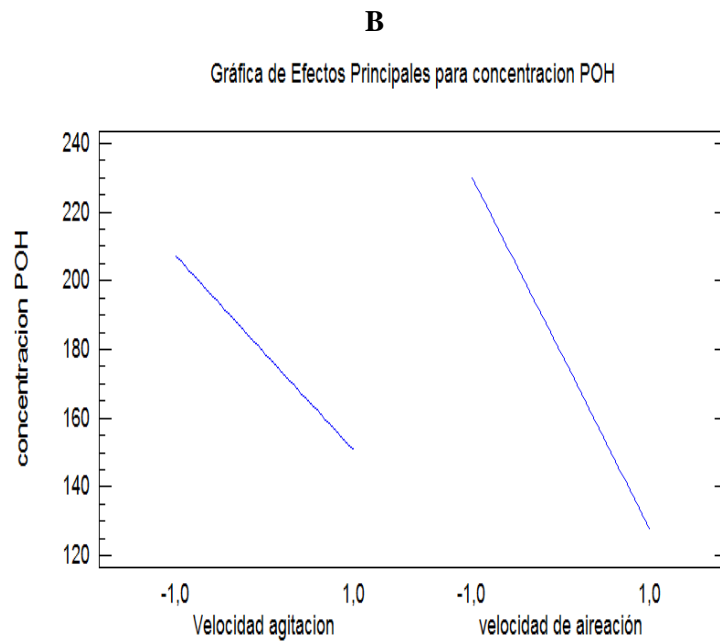
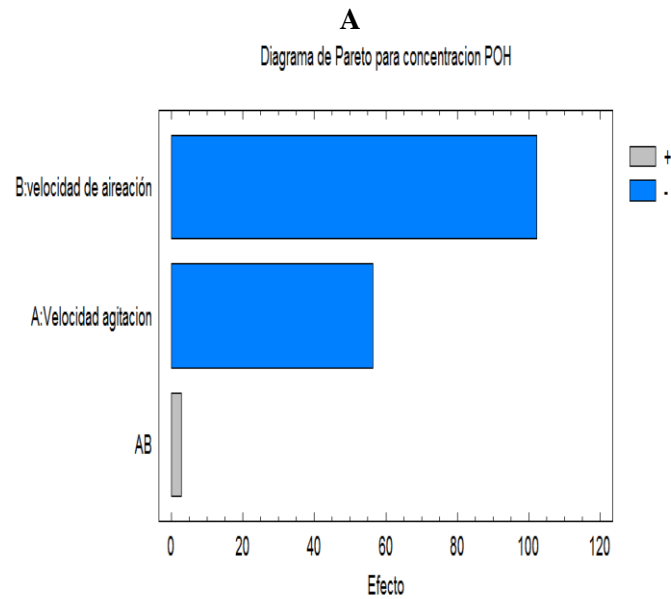
Abreviaturas: SS= Suma de cuadrados; Df=grados de libertad

Los resultados muestran un coeficiente de determinación (R²) para la respuesta de 1.0, que indica que no se observan variaciones en los puntos del diseño y que se puede aplicar el modelo desarrollado. También indican los resultados que, en la producción de POH, las velocidades de agitación y de aireación tienen un efecto negativo, mientras que su interacción (AB) tiene un efecto positivo. Estos resultados se corroboran con el diagrama de estandarización de los efectos (**Figura 60A**).

En la **Figura 60 B** se observan los efectos principales para la concentración de POH, sugiriendo que la máxima concentración de POH se obtiene cuando la biotransformación en biorreactor de (R)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821 se lleva a cabo en el nivel más bajo de aireación, es decir, sin aireación (0.00 vvm), y

en el nivel más bajo de velocidad de agitación (200 rpm). Bajo las anteriores condiciones se establece la concentración óptima de POH de 259.5 mg/L. Adicionalmente se obtienen otros productos (**Tabla 25**).

Figura 60 Diagrama de estandarización de efectos (A) y Efectos principales (B)



En la **Figura 61** se ilustra un cromatograma de los diferentes productos que resultan de la acción de oxigenasas sintetizadas por *A. niger* DSM 821.

Bajo las condiciones óptimas se llevó a cabo el proceso de biotransformación del limoneno y se obtuvo una concentración de POH de 252.3 mg/L, que indica una alta aproximación teórico-experimental: 97.2%.

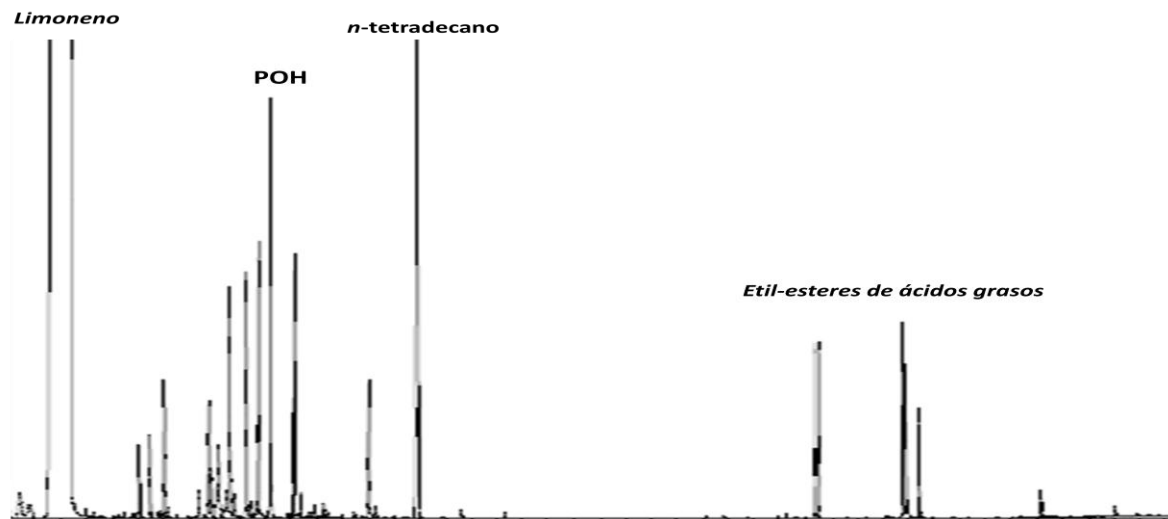
Con base en los anteriores resultados se puede inferir que el escalado progresivo del proceso de biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821, incrementando 10 y 100 veces el volumen de medio y manteniendo fijas las condiciones óptimas establecidas en microescala (5 mL), la morfología del hongo afectó la biotransformación del limoneno hacia la producción de POH; la máxima concentración de POH, de 389.1 mg/L, se consiguió con el micelio de *A. niger*; comparado con el bioensayo a microescala, la concentración de POH disminuye poco (4%); cabe destacar que a la fecha no hay estudios semejantes al respecto.

A volumen de medio 100 veces mayor, el proceso se llevó a cabo en biorreactor, que implica un cambio en el tipo de agitación (mecánica); pese a optimizar la velocidad de aireación y de agitación en el proceso, en todos los niveles evaluados el rendimiento de POH disminuyó bruscamente; bajo las condiciones óptimas del proceso, sin aireación y a 200 rpm, el rendimiento disminuyó un 35.9%, pues la concentración de POH fue de 259.5 ± 2.77 mg/L; sin embargo, a estas condiciones, la biooxidación total del limoneno no se vio tan afectada y tuvo un ligero incremento (~2%). El grado de acercamiento teórico-experimental fue alto: 97,23%.

Tabla 25 Metabolitos producidos en la biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821 en 500 mL de medio MYB de pH 5.0 ubicados en biorreactor y operado bajo condiciones óptimas: sin aireación y a 200 rpm

Productos de biotransformación	Concentración promedio (mg/L)
Limoneno remanente	5118.2
Fenil etanol	47.0
trans-p-Menta-2,8-dienol	46.2
cis-p-Menta-2,8-dienol	96.7
4-(1-Metiletetil)-2-ciclohexeno	17.1
1,8-mentadien-4-ol	67.3
trans-Carveol	161.5
cis-Carveol	82.1
Carvona	93.3
Alcohol perílico	259.5
1,2-Limoneno diol	97.1
Total DOL	967.8
Conversión DOL (%)	14.2
Etil octanoato	44.9
Etil octadecanoato	86.8
Etil linoleato	108.8
Etil Oleato	85.3
Total etil-ésteres de ácidos grasos	325.6
Conversión etil-ésteres de ácidos grasos (%)	4.8
Total biotransformación	19.0%

Figura 61 Cromatograma obtenido de la biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *Aspergillus niger* DSM 821 llevada a cabo en bioreactor en 500 mL de medio MYB de pH 5.0, a 28 °C, 200 rpm sin aireación



En resumen, el proceso de biotransformación del limoneno por *A. niger* DSM 821, llevado a cabo en biorreactor y cargado con 500 mL de medio, dio lugar a una concentración de POH de 259.5 ± 2.77 mg/L, a una bioconversión del 20%, a una actividad específica de bioconversión respecto al POH de 115.3 mg POH/g de célula seca de *A. niger*, y respecto al total de biotransformación del limoneno de 604 mg POH/g de célula seca de *A. niger*, la productividad del proceso de biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno fue de 1.80 mgPOH $L^{-1}h^{-1}$.

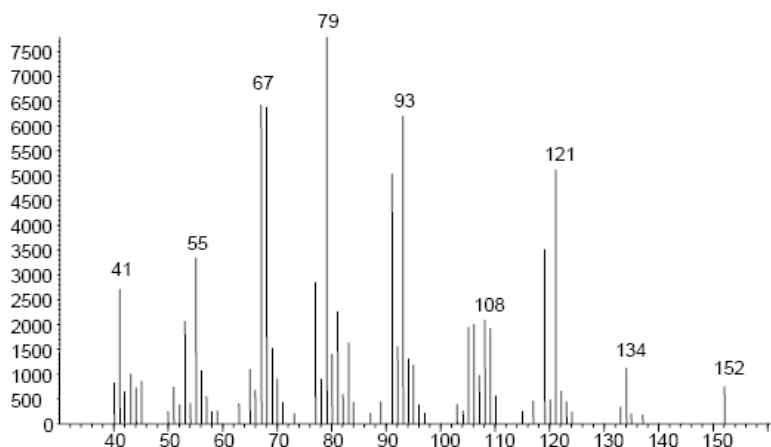
A la fecha, el único proceso reportado referido a la biotransformación en biorreactor (2 L) del (*R*)-(+)-limoneno, y dirigida hacia la producción de POH, es el realizado por Van Beilin y colegas (2005), quienes usaron como biocatalizador la bacteria *Mycobacterium* HXN-1500, y encontraron a las 75 h una concentración de POH de 6.8 g/L y de PCOOH de 0.14 g/L (Van Beilin et al., 2005). Este bioproceso es 16.8 veces más eficiente.

Por lo anterior, se puede concluir que es más rentable la producción de POH vía biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno, usando bacterias, que con el hongo *A. niger* DSM 821.

Adicionalmente se intentó purificar el POH a partir del extracto concentrado de biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821, utilizando inicialmente extracción en fase sólida (SPE) sobre ODS-C18 y luego cromatografía de columna sobre Sílica Gel 60. Las fracciones fueron identificadas por el respectivo R_f del POH patrón desarrollado sobre TLC. En realidad, la complejidad del extracto en su composición variada, sumada a la baja concentración, dificultó el logro de resultados positivos. Por lo anterior, se procedió a valorar la bioactividad del extracto concentrado.

En la **Figura 62** se ilustra el espectro de masas obtenido del POH; el cual se caracteriza, por la presencia de los fragmentos diagnóstico m/z : 152 $[M]^+$, 134 $[M-H_2O]^+$ y 121 $[M-CH_2OH]^+$. En el **Anexo 8** se señalan las posibles rutas de fragmentación de la molécula de POH.

Figura 62 Espectro de masas del alcohol perílico obtenido por GC-MS (EIMS, 70 eV). Metabolito principal producido en la biotransformación del limoneno por *A. niger* DSM 821



4.3.5 Citotoxicidad, actividad antiparasitaria. La citotoxicidad y la actividad antiparasitaria del extracto de biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821 (compuestos 2) y del POH (compuesto 5) fueron determinadas en células Vero y en formas libres de *T. cruzi*, *L. panamensis* y *L. chagasi* (Tabla 26. Los compuestos 2 y 5 no mostraron ser tóxicos para *T. cruzi* y de *L. panamensis* y *L. chagasi* porque presentaron tanto IC₅₀ como IC₉₀ >100µM indicando ser inactivos. Tampoco mostraron ser tóxicos en células de mamífero porque el CC₅₀ y el CC₉₀ fueron mayores a los compuestos de referencia Nifurtimox, AmB y Mitelfosina.

Tabla 26 Actividad del extracto de biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821 y del alcohol perílico y de los medicamentos de referencia en epimastigotes de *T. cruzi*, promastigotes de *L. panamensis* y *L. chagasi* y en células Vero

Compuesto	µg/mL							
	T. cruzi		Leishmania				Células Vero	
	CI ₅₀	CI ₉₀	<i>L. panamensis</i>		<i>L. chagasi</i>		CC ₅₀	CC ₉₀
2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
5	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
Nifurtimox	3,06± 0,13	18,13± 2,15	-	-	-	-	62,82± 1,84	250,47± 11,05
AmB	-	-	-	-	0,03±0, 00001	0,04±0, 0004	-	-
Miltefosina	-	-	5,94± 0,02	25,07± 0,26	-	-	-	-

CI: Concentración inhibitoria; CC: Concentración citotóxica; AmB: Anfotericina B; compuesto 2: extracto de biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821; Compuesto 5: solución de alcohol perílico.

Por otra parte, los dos compuestos se comportan sin presentar diferencias; así es posible utilizar el extracto de biotransformación, sin requerir de la separación y purificación del POH. El hecho de que el extracto de biotransformación y la solución de POH no sean tóxicos para las células de mamífero resulta ser una

característica muy importante para su posible aplicación en humanos. Lo anterior sugiere la realización de otros ensayos como genotoxicidad y mutagenicidad. De igual manera se podría evaluar su actividad biológica contra hongos e insectos y como aromatizante y cosmético, con miras a ampliar el espectro de aplicación del extracto de biotransformación en las áreas de agroquímica, alimentos y cosmética.

En la búsqueda de nuevos fármacos naturales quimioterapéuticos para el tratamiento de la leishmaniasis, diferentes monoterpenos han sido objeto de estudio. Un grupo de investigadores del Departamento de Parasitología del Instituto de Ciencias Biomédicas de USP, probaron la actividad de varios terpenos; uno de ellos fue el limoneno teniendo en cuenta que la actividad antitumoral, antibiótica, anticancerígena y antileishmania ha sido bien establecida (Arruda et al., 2009; Niño et al., 2005). Usando promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis*, el limoneno presentó un IC₅₀ de 258±4.9 y 147.3±4.6 µM, respectivamente (Niño et al., 2005). Arruda y colaboradores utilizaron estos estadios en *L. amazonensis* y evaluaron la actividad del limoneno in vitro e in vivo encontrando, una diferencia de IC₅₀ de 252±49.0 y 147±46 µM, respectivamente. Estos investigadores evaluaron, además, la actividad antiprotozoaria del limoneno contra otras especies de *Leishmania*, y encontraron la muerte de promastigotes de *L. major*, *L. braziliensis* y *L. chagasi*; sin embargo el limoneno es más activo contra *L. amazonensis* que contra *L. major* (Arruda et al., 2009).

Por los estudios anteriores se esperaba que el extracto de biotransformación del limoneno por *A. niger* DSM 821 tuviera actividad antiprotozoaria, al contener limoneno remanente.

Teniendo en cuenta que el metabolismo del limoneno en animales se lleva a cabo en el hígado y que da lugar al POH y al peril aldehído (PCHO), Niño y colaboradores utilizaron estos DOL para evaluar su actividad en promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis*, obteniendo respectivamente un IC_{50s} de

0.8±0.08 y 5.2±0.18 mM para el POH, mientras que para el PCHO se obtuvo un IC₅₀s de 68±4 y 152±40 μM, respectivamente. Estos resultados indican que el POH y PCHO exhiben menor actividad in vitro contra *Leishmania* que el limoneno (Niño et al., 2005).

Con base en lo anterior se puede justificar la no actividad antiprotozoaria del extracto de biotransformación del limoneno por *A. niger* DSM 821. La presencia de los diferentes DOL, POH, isómeros cis/trans-carveol, carvona, 1,2-limoneno-diol, óxido de 1,2-limoneno y feniletanol, y de los etil-ésteres de ácidos grasos superiores, inhiben la respuesta anti-leishmania esperada.

Adicionalmente, Niño y colaboradores realizaron estudios in vivo de toxicidad con ratones tratados tópicamente o intracelularmente con POH y PCHO por 15 días, sin encontrar efectos colaterales sistémicos o locales, por lo que hicieron ensayos con células tumorales BABL de ratones y las trataron con POH por 3 semanas. Los resultados mostraron que el POH tiene respuesta terapéutica significativa, retardando la aparición de lesiones. La actividad antitumoral del POH ha sido justificada por la inhibición de la prenilación proteínica y de la apoptosis (Niño et al., 2005).

4.3.6 Actividad antioxidante. La actividad antioxidante del extracto de biotransformación en AcOEt evaluada por el método de barrido (scavenging) del catión radical ABTS^{•+} mostró un alto porcentaje de inhibición del ABTS^{•+}, de 71.581±1.820, correspondiente a 2.051 miliequivalentes a Trolox/mM (TEAC). La curva de calibración de Trolox se muestra en el Anexo 3. Las soluciones de limoneno y POH arrojaron un %In de ABTS^{•+} de 4.57 y 6.41, respectivamente, que sumados aportarían un 10.982%. Lo anterior indica que los demás derivados oxigenados del limoneno (trans/cis-carveol, carvona, trans/cis-p-menta-2,8-dienol, 1,2-limoneno-diol y fenil etanol) y los etil-ésteres de ácidos grasos, presentes en el extracto de biotransformación, ejercen un efecto sinérgico antioxidante que

corresponde al 60.6%, %In restante del extracto de biotransformación. El alto poder antioxidante encontrado para el extracto de biotransformación de limoneno por *A. niger* favorece su aplicación en las áreas de alimentos y farmacéutica.

Maróstica y colaboradores determinaron el potencial antioxidante al extracto en AcOEt de biotransformación del aceite esencial de naranja por *F. oxysporum* 152B obtenido por extracción del medio MM+CC “mezcla líquida de sales y del agro-residuo del procesamiento de yuca (cassava)”. El extracto constituido por limoneno (166 mg/L), α -terpineol (6.6 mg/L), alcohol perílico (2.6 mg/L) y carvona (0.2 mg/L) presentó una capacidad total antioxidante determinada por ensayo de barrido del radical libre DPPH, de EC₅₀ de 2.09%v/v (Maróstica et al., 2009).

De frutos como la fresa se ha obtenido un extracto utilizando mezcla de CO₂: Etanol (90:10, v/v). El extracto exhibió una alta actividad antioxidante (181.4±23.7 μ mol TEAC/g) y fue efectivo para inhibir el crecimiento de células cancerosas en colon humano (ED₅₀ 96h = 0.20±0.02 mg/mL). El POH hace parte de los componentes del extracto y es uno de los principales responsables de las propiedades antiproliferativas (Serra et al., 2010).

Cabe destacar que actualmente diferentes investigadores han centrado su interés en los aceites esenciales como antioxidantes o atrapadores (scavengers) de radicales libres; para ello evalúan la actividad por los métodos de DPPH, y la comparan con estándares antioxidantes (Trolox). El interés por encontrar nuevas fuentes de antioxidantes con mayor potencial se debe a que los radicales libres, responsables de la oxidación de biomoléculas, últimamente se han relacionado con alteraciones moleculares generadoras de envejecimiento, arteriosclerosis, cáncer, enfermedad de Alzheimer, diabetes y asma (Chen y Viljoen, 2010; Edris 2007).

Finalmente, es de destacar el alto valor antioxidante presentado por el extracto de biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821, lo que sugiere realizar estudios posteriores, que complementen estos resultados.

5. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN DEL (R)-(+)-LIMONENO POR *Penicillium digitatum* DSM 62840. ESCALADO, PURIFICACIÓN Y BIOACTIVIDAD

5.1 INTRODUCCIÓN

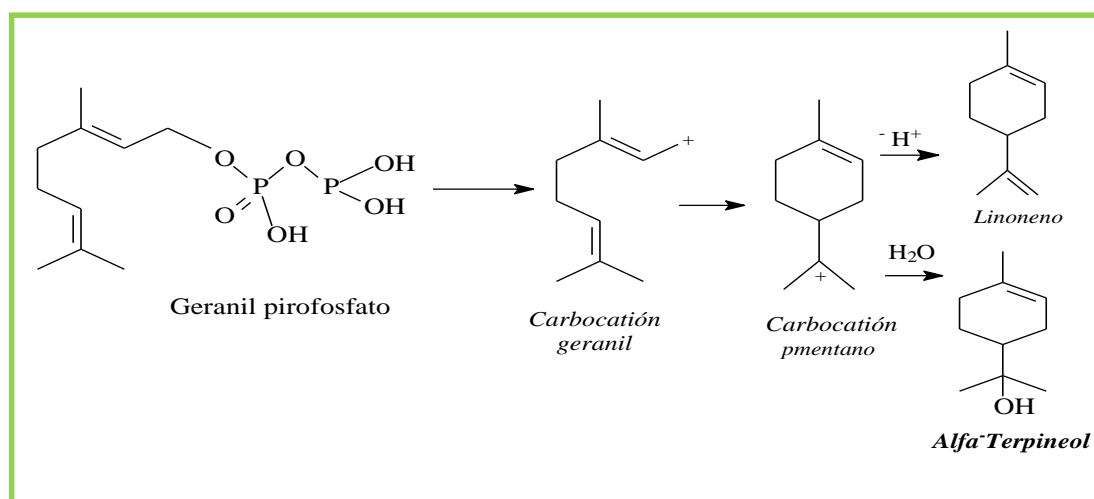
En los últimos diez años se ha incrementado la tendencia a producir compuestos de aroma a partir de monoterpenos por conversión biotecnológica, debido a las bondades de estos procesos (Chen y Viljoen, 2010). La producción biotecnológica de bioaromas y fragancias, cuyos componentes principales son los derivados oxigenados naturales de terpenos (DONT), se hace más interesante cuando se utilizan sustratos económicos y abundantes o fuentes renovables. En este sentido, el monoterpeno limoneno obtenido de AEs extraídos de cáscaras de frutos cítricos se convierte en el precursor más valorado y útil para la síntesis de flavors, químicos finos y DONT vía biotransformación (Bicas et al., 2010; Lerin et al., 2010; De Carvalho y Da Fonseca, 2006; Duetz et al., 2003).

De los trece DONT (*cis/trans* carveol, carvona, alcohol perílico (POH), peril aldehído (PCHO), ácido perílico (PCOOH), α -terpineol, epóxidos 1,2 y 8-9 limoneno, isopiperitenol e isopiperitenona, mentol y mentona) posibles de obtener por oxifuncionalización del limoneno vía catálisis química o biocatálisis, el alcohol monoterpénico α -terpineol (3-ciclohexeno-1-metanol) constituye uno de los compuestos más interesantes para investigar, dado su mayor valor (100 veces; USD 78/0.5 lb), comparado con el sustrato, limoneno.

El α -terpineol está presente en aceites esenciales de *Cymbopogon schoenanthus* (Khadri et al., 2008), *Ephedra sinica* (Wang, 2006), *Citrus limón* y *Zanthoxylum rhesta* (Rout, 2007) y de algunas especies de rosas (*Pelargonium*) (Rajeswara, 2002). La biosíntesis de este alcohol monoterpénico, al igual que la del limoneno, procede del geraniol difosfato (GPP) e involucra la química de carbocación. En

primer lugar se forma el carbocatión geranil (G^+), por heterólisis del enlace C-O de GPP; posteriormente ocurre la ciclación por interacción intramolecular entre G^+ y el enlace olefínico externo, dando lugar al carbocatión p-mentano (4-isopropil-1-metilciclohexano). La desprotonación del carbocatión produce limoneno mientras el atrapamiento del carbocatión por una molécula de agua, origina el α -terpineol (**Figura 63**) (Sell, 2003).

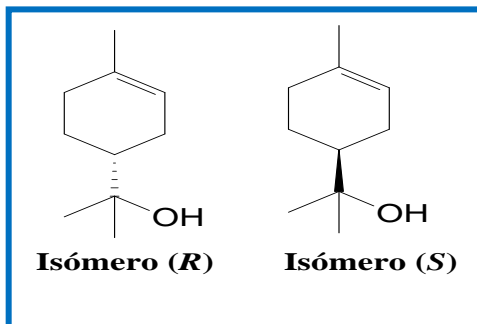
Figura 63 Biosíntesis de α -terpineol



Existen dos isómeros del α -terpineol (**Figura 64**), que se diferencian por sus cualidades sensoriales; el isómero (*S*)-(-) tiene un aroma característico a conífera, mientras que el aroma típico floral a lila del (*R*)-(+)- α -terpineol lo convierte en una de las fragancias más comúnmente empleadas por la industria de perfumes, aromas, cosmética y de aseo (Fisher y Phillips, 2008; Bathia y Letizia, 2008; Marostica y Pastore, 2007). Además, el α -terpineol es un aditivo seguro (GRAS 3045), y útil para la industria alimenticia por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Maróstica et al., 2009; Fisher y Phillips, 2008; Schelz et al., 2006; Crowell, 1999). El α -terpineol también se usa en la industria farmacéutica como antifúngico y desinfectante (Fisher y Phillips, 2008; Jun y Jeong, 2006). Su consumo anual es de 13 000 t/año, por lo que se ubica dentro de los 30

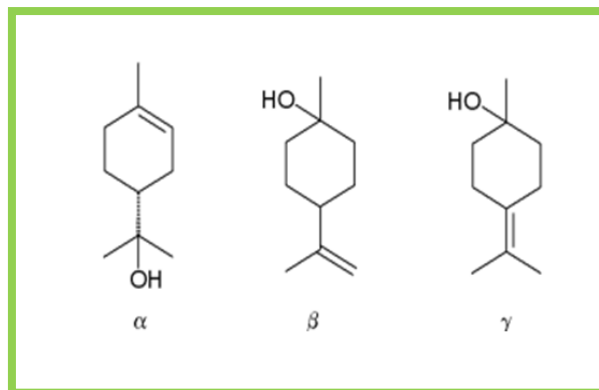
saborizantes de mayor demanda mundial (Fisher y Phillips, 2008; Bathia y Letizia, 2008).

Figura 64 Isómeros estructurales del α -terpineol



El α -terpineol por lo general se obtiene químicamente a partir de α -pineno utilizando catalizadores ácidos (ácidos orgánicos o minerales diluídos o acuosos, resinas de intercambio catiónico, zeolitas, líquidos iónicos ácidos, etc.) (Chibiryaev et al, 2010; Ávila et al, 2010), o a partir del aceite crudo de terpentina por hidratación de terpino, seguido de una deshidratación parcial (Badee et al, 2011). Comúnmente se obtiene una mezcla de isómeros, α , β y γ -terpineol (**Figura 65**), donde el α -isomero es el producto principal. La ventaja de los procesos enzimáticos es la enantioespecificidad y se puede aprovechar para producir sólo al α -terpineol.

Figura 65 Estructura de Terpinoles



5.1.1 Producción biocatalítica de α -terpineol. El limoneno ha sido biotransformado en α -terpineol con alta selectividad usando hongos y bacterias como biocatalizadores. Entre los hongos se tienen: *Fusarium oxysporum* 152B (Marostica y Pastore, 2007; Bicas et al., 2008; Bicas et al., 2010), *Cladosporium* (Kraidman et al., 1969; Kraidman et al., 1986), *Aspergillus niger* (ATCC 16404, ATCC 9642 y ATCC 1004) (Rotava et al., 2010), y *Penicillium*: *Penicillium* sp. (Badee et al., 2011; Tan y Day, 1998a; Tan y Day, 1998b; Pescheck et al., 2009; Abraham et al., 1985); y entre las bacterias: *Pseudomona gladioli* (Cadwallader y Braddock, 1992; Braddock y Cadwallader, 1995), *Escherichia coli* (Savithiry et al., 1997) y *Sphingobium* sp (Bicas et al., 2010). En todos los casos, las monooxigenasas dependientes de citocromo P450 realizan la degradación del limoneno (Lerin et al., 2010).

- **Biotransformación de limoneno por células completas de bacterias.** Cadwallader y Braddock aislaron de *Pseudomona gladioli* una deshidratasa de α -terpineol (α TD) y la purificaron en un factor de 13 veces (Cadwallader y Braddock, 1992). Estudios posteriores con la α TD pura en la biotransformación de limoneno mostraron que esta enzima hidrata los isómeros (4R)-(+ y (4S)-(-)-limoneno dando lugar a los α -terpineoles (4R)-(+ y (4S)-(-) respectivos. La velocidad de hidratación fue diez veces mayor para el (4R)-(+)-limoneno (Braddock y Cadwallader, 1995). Usando células completas de *P. gladioli*, Braddock y Cadwallader, llevaron a cabo la biotransformación de limoneno en un medio salino de pH 6.5 con 1% de limoneno como fuente de carbono a 25 °C produciéndose α -terpineol y ácido perílico. El ácido se degradó posteriormente (Braddock y Cadwallader, 1995).

En 1997, Savithiry y colaboradores reportaron la producción de α -terpineol (29 mg/L), alcohol perílico (72 mg/L) y carveol (0.9 mg/L) a partir de limoneno utilizando la enzima termoestable limoneno hidratasa aislada de *Bacillus stearothermophilus* y expresada en *Escherichia coli* (EC423). La bioconversión

con células completas de *E. coli* recombinante, crecidas hasta fase estacionaria (48 horas) en buffer fosfato 50 mM de pH 7.0 saturado con limoneno, produjo una cantidad significativa de α -terpineol de 239 mg/L y de carvona de 35 mg/L, a las 72 horas a 50 °C. La saturación del medio con el terpeno previno la deshidratación del alcohol y la reversibilidad de la reacción. La formación de carvona fue atribuida a la acción de una metil-oxidasa (Savithiry et al., 1997).

En el último año, se logró la más alta conversión del limoneno en α -terpineol (25 g/L) utilizando células restituidas de *Sphingobium* sp., que producen una hidratasa en un medio bifásico agua-aceite vegetal, hexadecano como cosolvente, en un tiempo de reacción de 30 horas, a 30 °C y 500 rpm (Bicas et al., 2010).

- **Biotransformación de limoneno por células completas de hongos.** El limoneno ha sido transformado biocatalíticamente empleando preferencialmente hongos. El estudio más reciente lo llevo a cabo Badee y col., quienes utilizaron *Penicillium digitatum* NRRL 1202 como biocatalizador y aceite esencial de piel de naranja como sustrato.

Las células restituidas a partir del liofilizado de *F. oxysporum* 152B produce en condiciones anaerobias una enzima intracelular enantioselectiva y enantioespecífica que biotransforma el (R)-(+)-limoneno en (R)-(+)- α -terpineol produciendo una concentración máxima de 4 g/L (Bicas et al., 2010). Una concentración menor (2.44 g/L) se obtuvo al utilizar biomasa del hongo fresco en relación 0.25 (m/m) inóculo/medio (agua destilada), concentración de limoneno 0.5% (v/p) a las 72 h de reacción a 27 °C y 230 rpm (Bicas et al., 2008). Anteriormente, Marostica y Pastore emplearon como sustrato el aceite esencial extraído de la cáscara de naranja, con un 94% de limoneno y *F. oxysporum* 152B como biocatalizador, obteniendo una concentración de α -terpineol de 450 mg/L en el medio de biotransformación, mezcla MM (sales minerales) y MC (residuo líquido

agroindustrial de yuca, Cassava) a los 3 días de reacción (Marostica y Pastore, 2007).

Rotava et al. (2010) realizaron un screening con 400 microorganismos utilizando (R)-(+)-limoneno y (-)- β -pineno como sustratos; ninguno mostró capacidad para biotransformar el limoneno, mientras que cuatro cepas sí presentaron habilidad para modificar el (-)- β -pineno. La cepa de *Penicillium camembertii* ATCC 4845 produjo 24.38 ± 2.78 mg/L de α -terpineol y trazas de trans-pinocarveol. *Aspergillus niger*. ATCC 16404 produce la mayor concentración de α -terpineol (2856.54 ± 50.23 mg/L) y trazas de fenchol; mientras que las cepas ATCC 9642 y ATCC 1004 fueron altamente selectivas, produciendo α -terpineol 688.13 ± 42.27 mg/L y 172.07 ± 32.94 , respectivamente; por lo anterior, estos autores seleccionaron la cepa de *A. niger* ATCC 16404 y modificaron las condiciones de reacción, logrando conseguir una concentración de α -terpineol (14058.86 ± 49.76 mg/L) en el medio caldo papa-dextrosa, a una concentración de sustrato (61.7 mM; 1mL/100mL) y etanol al 1% v/v como co-solvente, a las 72 h de reacción, a 35 °C y 120 rpm. La adición al medio de los agentes oxidantes, H₂O₂ y ter-butil hidroperóxido, disminuye drásticamente el rendimiento (Rotava et al., 2010).

Un screening realizado a más de 60 cepas fúngicas y el uso de la microextracción en fase sólida, SPME, para extraer y monitorear los compuestos oxigenados generados, permitió seleccionar una cepa de *Penicillium* sp., por su capacidad para transformar el limoneno en medios de biotransformación sólido (MEA) y líquido (YMPG y MYB). La máxima conversión de limoneno en α -terpineol (93%) se logró con el medio MYB de pH 3.5, que contenía 0.4% de etanol como cosolvente, en un tiempo de reacción de 8 horas. Otros productos fueron *cis/trans* p-menta-2-en-1-ol, neodihidrocarveol y epóxido de limoneno (Adams et al., 2003).

La cepa *P. digitatum* NTCC 1202, empleada por Tan y Day (1998), transforma el limoneno en (R)-(+)- α -terpineol en una proporción de 830 mg/L a las 24 horas en

el medio MYB de pH 4.5, con una concentración de limoneno del 1%. La bioconversión se llevó a cabo únicamente cuando el hongo alcanzó la fase de crecimiento temprana, independiente de la edad del inóculo (Tan y Day, 1998). Recientemente, utilizando este biocatalizador se llevó a cabo la biotransformación del D-limoneno a partir del AE extraído de la piel de naranja (98% de compuestos monoterpénicos donde el 96.1% es limoneno, y 1.09% de aldehídos) (Badee et al, 2011). La biotransformación se realizó en los medios MYB de pH 6.1 y MEB de pH 5.4, siendo la selectividad del α -terpineol mayor (67.7%) en MYB comparado con MEB (47.1%), a 25–27 °C, 120 rpm durante 31 h. El sustrato se adicionó en solución etanólica (limoneno al 20%). La bioconversión incrementó con el tiempo, alcanzando un 79% y 95.5% en el medio MYB a las 3 y 7 h posteriores a la segunda adición, respectivamente (Badee et al, 2011).

El α -terpineol se identificó por sus propiedades fisicoquímicas, gravedad específica, índice de refracción, solubilidad en etanol y número ácido, obteniéndose respectivamente, 0.932, 1.484, 1-10 mL y 0.02 mg KOH/g aceite (Badee et al, 2011).

La biotransformación del limoneno adicionado en forma gaseosa por *P. digitatum* DSM 62840 se llevó a cabo en un biorreactor con circuito cerrado de gas, y permitió alcanzar una concentración de 1009 mg/L de (*R*)-(+)- α -terpineol, equivalente a conversión molar del 63%, y una productividad promedio de $8.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, utilizando como condiciones del proceso: medio MYB con una cantidad de extracto de levadura del 0.5%, pH controlado a 4.0 por adición de soluciones de NaOH o H_3PO_4 1M, a 27 °C y 120 g, flujo de aireación de 0.05 vvm. El limoneno fue adicionado secuencialmente en concentración 1.9 mM cada 24 horas (5 veces). La primera adición se hizo luego que la concentración de glucosa en el medio disminuyó 30 veces (1g/L) (Pescheck et al., 2009).

La patente US 2628258, de la empresa Biotechnolog Forschung GMBH de Alemania, reporta la producción de α -terpineol vía biocatalítica. No hay información sobre el microorganismo utilizado (Stumpf et al., 1984).

Las investigaciones anteriormente relacionadas muestran que la producción de α -terpineol es altamente dependiente de las variables del proceso de biotransformación. Por ello, en esta etapa del proyecto se planteó como objetivo evaluar y establecer a escala de laboratorio (lab-scale) las condiciones óptimas del proceso de biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno utilizando células completas del hongo *P. digitatum* DSM 62840 (composición del medio, pH del medio, fase de crecimiento del microorganismo, efecto inductor y concentración de sustrato para alcanzar la máxima concentración del DOL natural hidroxilado, (*R*)-(+)- α -terpineol). Posteriormente, manteniendo dichas condiciones, se escaló el proceso, se purificó el producto principal y se evaluó la bioactividad.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Microorganismo, medios de cultivo y reactivos

Microorganismo: La cepa certificada del hongo *Penicillium digitatum* DSM 62840 fue adquirida de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares DSMZ (Braunschweig, Alemania).

Medios de cultivo: Los medios de cultivo PDA (papa dextrosa agar, pH 5.6 ± 0.2), MEA (agar extracto de malta, pH 5.4 ± 0.2) y las materias primas requeridas para preparar el medio complejo de YGA (extracto de levadura 3.0 g/L, extracto de malta 20 g/L, glucosa 20 g/L, peptona bacteriológica 1.0 g/L y agar 20 g/L, pH 6.0), YMPG (extracto de levadura 5.0 g/L, extracto de malta 10 g/L, glucosa 10 g/L y peptona bacteriológica 5.0 g/L), MYB (extracto de levadura 3.0 g/L, extracto de malta 20 g/L, glucosa 10 g/L, peptona bacteriológica 10 g/L) y YG (extracto de

levadura 3.0 g/L, extracto de malta 20 g/L, glucosa 20 g/L, peptona bacteriológica 1.0 g/L) fueron comprados a OXOID (Hampshire, Inglaterra).

Reactivos. El sustrato (*R*)-(+)-limoneno (98%), el α -terpineol (90%), el *n*-tetradecano, Tween 80, etanol absoluto ($\geq 99.9\%$), acetato de etilo ($\geq 99.8\%$) y otros solventes fueron grado analítico y se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El nitrógeno gaseoso se obtuvo de Aga-Fano (Bucaramanga, Colombia).

5.2.2 Cinética de crecimiento microbiano de *Penicillium digitatum* DSM 62840 en medio sólido. *Penicillium digitatum* DSM 62840 se creció en medio PDA, MEA y YGA, a 23 °C durante 10 días. En todos los casos se midió periódicamente el diámetro de la colonia para determinar la cinética de crecimiento del microorganismo. La velocidad de crecimiento radial (VCR, mm/h) se estableció siguiendo el método descrito por Trinci (1969) y Pirt (1975). El mejor medio de crecimiento para el cultivo microbiano se seleccionó de acuerdo con el valor de VCR y se usó para el mantenimiento periódico de la cepa. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.2.3 Evaluación de la actividad antifúngica del sustrato. Diferentes concentraciones (0-280 mM) de (*R*)-(+)-limoneno se adicionaron al medio PDA antes de gelificarse. En todos los casos, la dispersión de (*R*)-(+)-limoneno se llevó a cabo por agitación. Posteriormente, el medio se inoculó con 20 μ L de suspensión de esporas (SS), (1×10^7 esporas/mL). El crecimiento microbiano a 23 °C se monitoreó, midiendo el cambio en el diámetro de la colonia luego de 8 días (Trinci, 1969; Pirt, 1975). El porcentaje de inhibición se calculó usando la **Ecuación 7**, donde D_c es el diámetro promedio de la colonia fúngica del blanco (limoneno 0 mM) y D_e es el diámetro promedio de la colonia ensayo (Pandey et al., 1982). Los resultados se utilizaron para producir las curvas de inhibición. La concentración de limoneno que inhibe el crecimiento de *P. digitatum* en un máximo

del 25% se definió como concentración mínima inhibitoria (CMI), y la que inhibió el 100% del crecimiento, como concentración letal (CL).

$$\text{Inhibición, \%} = \left[\left(\frac{D_c - D_e}{D_c} \right) * 100 \right] \quad \text{Ecuación 7}$$

5.2.4 Optimización del proceso de biotransformación de (R)-(+)-limoneno utilizando *Penicillium digitatum* DSM 62840 a escala de laboratorio

- **Preparación de la suspensión de esporas.** Las esporas obtenidas en el medio sólido previamente seleccionado se resuspendieron en 10 mL de solución salina 0.85% NaCl y 0.1% Tween 80, y el recuento del número (N) de células por mL se hizo en una cámara de Neubauer. La concentración inicial de esporas en el medio de biotransformación fue de $1 \cdot 10^7$ esporas/mL.
- **Cinética de crecimiento de *Penicillium digitatum* DSM 62840 en medio líquido.** *Penicillium digitatum* DSM 62840 se cultivó en viales de 22 mL con tapa rosca, provistos con septa de teflón, los cuales contenían 5 mL de medio líquido estéril YMPG, MYB y YM, a 27 °C y con agitación de 150 rpm, usando un agitador orbital (Heidolph Vibramax 100, Schwabach, Germany). El medio se inoculó con 50 µL de SS y la concentración de biomasa, se determinó por el método de peso seco de las células, tomando muestras cada 24 h durante 15 días (Demyttenaere et al., 2004).
- **Proceso general de biotransformación a escala de laboratorio.** Los bioensayos se llevaron a cabo en viales de 22 mL, con tapa rosca, y provistos con septa de teflón, los cuáles contenían 5 mL de medio líquido estéril. El medio de cultivo se inoculó con 50 µL de SS $1 \cdot 10^7$ esporas/mL y se preincubó a 27 °C durante 72 h, con una agitación de 150 rpm, usando un agitador orbital (Heidolph Vibramax 100). Luego de la preincubación se adicionó R)-(+)-limoneno puro en

concentraciones y condiciones específicas requeridas para cada experimento (ver resultados). Al mismo tiempo, se prepararon dos controles: blanco de biomasa (esporas suspendidas en el medio de reacción sin sustrato) y blanco de sustrato (medio de reacción y sustrato sin suspensión de esporas). Los productos de reacción y el sustrato remanente fueron extraídos y analizados por GC-SM.

Las variables de estudio fueron: medio de biotransformación, pH, fase de crecimiento del microorganismo, concentración de sustrato y efecto inductor del sustrato. El criterio de selección del mejor valor para cada variable fue la bioconversión, expresada como la concentración (mg/L) de α -terpineol producida, y la selectividad de la reacción. También se determinó la conversión de sustrato utilizando la **Ecuación 8**.

$$\text{Conversión \%} = \left[\frac{C_i - C_f}{C_i} \right] * 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde C_i = Concentración inicial de sustrato, C_f : Concentración final de sustrato.

A continuación se describe el procedimiento para evaluar cada variable.

- **Efecto del tipo de medio de cultivo sobre la biotransformación microbiana.** Los experimentos de biotransformación se llevaron a cabo en el medio líquido usando, YMPG, YM y MYB disueltos en buffer citrato-fosfato 0.1 M de pH 3.5, bajo las condiciones especificadas anteriormente. El (R)-(+)-limoneno se adicionó a una concentración final de 14.7 mM (CMI). La cinética de transformación microbiana se monitoreó a las 0, 24, 48 y 96 h luego de la adición del sustrato. El medio de cultivo en el cual se alcanzó el más alto valor de bioconversión se seleccionó para evaluar otros parámetros de biotransformación.

- **Efecto del pH sobre la biotransformación del limoneno.** El efecto del pH sobre la biotransformación del limoneno se estudió disolviendo el medio de cultivo MYB en buffers citrato-fosfato 0.1 M a pH 3.0, 3.5, 4.5 y 6.0. Los bioensayos se llevaron a cabo con la metodología previamente descrita en el procedimiento general. La transformación microbiana se monitoreó a las 0 y 48 h después de la adición de sustrato. El medio de cultivo con mayor selectividad y valor de bioconversión se seleccionó para evaluar parámetros adicionales en la biotransformación.

- **Efecto de la fase de crecimiento de *P. digitatum* sobre la biotransformación del limoneno.** Los bioensayos se llevaron a cabo en viales de 22 mL con taparrosca y provistos con septa de teflón, los cuales contenían 5 mL de medio MYB de pH 3.5. El medio de cultivo se inoculó con 50 μ L de SS $1 \cdot 10^7$ esporas/mL y se pre-incubó a 27 °C durante 24, 72, 120, 168 y 216 h, correspondientes a las fases latencia, exponencial temprana, media y tardía, y estacionaria, respectivamente, y con una agitación de 150 rpm, usando un agitador orbital. Una vez que *P. digitatum* alcanzó la respectiva fase, el (R)-(+)-limoneno se adicionó al medio de cultivo MYB de pH 3.5 a una concentración final de 14.7 mM. La cinética de transformación microbiana para cada biotransformación se monitoreó a las 0, 24, 48 y 96 h de reacción. La fase de crecimiento de mayor valor de bioconversión se seleccionó para evaluar otros parámetros.

- **Efecto de la concentración de sustrato sobre la capacidad de biotransformación.** Los bioensayos se llevaron a cabo en viales de 22 mL con taparrosca y provistos con septa de teflón, los cuales contenían 5 mL de medio MYB de pH 3.5. El medio de cultivo se inoculó con 50 μ L de SS $1 \cdot 10^7$ esporas/mL y se preincubó a 27 °C durante 72 h (fase exponencial temprana) con agitación de 150 rpm. (R)-(+)-limoneno se adicionó en una concentración final de 5-100 mM. La transformación microbiana se monitoreó a las 0 y 48 h después de la adición de

sustrato. La concentración de sustrato óptima se seleccionó con base en la mayor selectividad y bioconversión.

- **Efecto inductor de (R)-(+)-limoneno sobre la capacidad de biotransformación.** Para determinar el posible efecto inductor del sustrato, los experimentos de biotransformación, se llevaron a cabo inoculando el medio MYB de pH 3.5 con 50 μ L de suspensión de esporas obtenida previamente creciendo el hongo en medio PDA en presencia de inductor ((R)-(+)-limoneno 1.47mM) y en ausencia de inductor (blanco). Las biotransformaciones se realizaron durante 72 h a 27 °C y 150 rpm, con 14.7 mM (R)-(+)-limoneno en el medio de cultivo, y se monitoreó a las 0, 8, 24 y 48 h.

5.2.5 Escalamiento del proceso de biotransformación. Los procesos de escalado se realizaron a 50 mL y a 500 mL de medio de reacción. En todos los casos se estableció previamente la cinética de crecimiento de *Penicillium digitatum* DSM 62840 en medio líquido, para determinar el tiempo en el cual el hongo alcanza la fase exponencial temprana.

5.2.5.1 A 50 mL de medio. Bajo las condiciones óptimas seleccionadas en los experimentos llevados a cabo a escala de laboratorio (5 mL) se evaluó el proceso en un volumen 10 veces mayor, llevando a cabo la biotransformación con suspensión de esporas (sin-precultivo) y con micelio del hongo (con-precultivo).

Sin-precultivo: Se tomaron 50 mL de medio estéril MYB de pH 3.5 ajustado con buffer citrato-fosfato 0.1 M en frascos taparrosca de 250 mL. El medio se inoculó con 500 μ L de SS de concentración $1 \cdot 10^7$ esporas/mL y se incubó durante 96 h, a 27 °C y 150 rpm. El tiempo de incubación de 96 h, correspondió a la fase exponencial media establecida previamente por la curva de crecimiento del hongo a esta escala. Al finalizar el periodo de incubación, se adicionó el (R)-(+)-limoneno en concentración 14.7 mM y se mantuvieron las condiciones durante 48 h.

Finalizada la biotransformación se realizó la extracción con acetato de etilo (2* 15 mL), de sustrato remanente y de los productos de biotransformación para determinar la bioconversión del proceso. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Con pre-cultivo: Inicialmente, 5mL de medio estéril MYB de pH 3.5 depositados en viales taparrosca de 22 mL provistos con septa de teflón se inocularon con 50 µL de SS de concentración $1 \cdot 10^7$ esporas/mL de *P. digitatum* y se incubaron durante 72 h a 27 °C y 150 rpm, usando un agitador orbital. Toda la mezcla de micelio y medio, contenida en el vial se adicionó a 45 mL de medio MYB de pH 3.5 estéril contenido en frascos taparrosca de 250 mL a 27 °C, 150 rpm usando un agitador orbital durante 84 h (tiempo correspondiente a la fase exponencial temprana determinada por la curva de crecimiento). Posteriormente se dio inicio a la biotransformación con la adición de (R)-(+)-limoneno 14.7 mM, manteniendo una agitación de 150 rpm y una temperatura de 27 °C durante 48 h. Transcurrido el tiempo se realizó la extracción con acetato de etilo (2* 15 mL) de sustrato remanente y productos de biotransformación para determinar la bioconversión del proceso. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Los productos y el sustrato remanente obtenidos en todos los casos fueron analizados por GC-SM como se describió anteriormente. De acuerdo con el valor de bioconversión y selectividad, se seleccionó el sistema (sin o con pre-cultivo) para evaluar el proceso de biotransformación a escala 10 veces mayor (500 mL).

5.2.5.2 A 500 mL de medio. Basados en los resultados de biotransformación del (R)-(+)-limoneno en 50 mL de medio, se utilizó micelio de *P. digitatum* para llevar a cabo los experimentos de biotransformación en el biorreactor de tanque agitado New Brunswick Scientific BioFlo 110 de capacidad 1.3 L.

Para establecer el tiempo correspondiente a la fase exponencial temprana se hizo necesario establecer la curva de crecimiento del microorganismo en 500 mL de medio MYB de pH 3.5; para ello se inocularon 450 mL de medio MYB de pH 3.5 estéril con 50 mL de mezcla (medio y micelio crecido durante 84 h) a 27 °C y 150 rpm, y se incubó durante 24 h a 100 rpm y 27 °C. Finalizado el tiempo se determinó la biomasa producida. Este experimento se repitió variando el tiempo de incubación, 48, 72 y 96 h. La velocidad de agitación para el crecimiento del hongo se fijó en 100 rpm, que equivalen a 150 rpm de agitación orbital.

Una vez determinado el tiempo de incubación de *P. digitatum* DSM 62840 para alcanzar la fase exponencial temprana, se realizaron los experimentos de biotransformación a escala de 500 mL de medio. En estos experimentos se evaluó el efecto de la velocidad de agitación y de aireación sobre la biotransformación manteniendo la concentración de limoneno (14.7 mM), la temperatura (27 °C) y tiempo de reacción (48 h). Al finalizar el tiempo se realizó la respectiva extracción en AcOEt (2*15 mL), del sustrato remanente y de productos, y se analizó por GC-MS.

Para estudiar el efecto de la velocidad de agitación y de la aireación, se aplicó un diseño experimental, central compuesto factorial 2^k ; con cada variable a tres niveles (alto-medio-bajo). La variable respuesta fue la concentración de α -terpineol (mg/L) producido. El análisis de los datos se realizó por metodología de superficie de respuesta (MSR) usando el programa estadístico Statgraphics Centurion XV. De acuerdo con las condiciones óptimas de velocidad de agitación y de aireación, arrojadas por MSR, se realizaron nuevamente experimentos de biotransformación para establecer la aproximación teórico-experimental.

El extracto en AcOEt de las biotransformaciones del (R)-(+)-limoneno, obtenido bajo las condiciones óptimas de velocidad de aireación y agitación, se recolectó y utilizó para purificar el α -terpineol.

5.2.6 Extracción, identificación y cuantificación de sustrato y productos de reacción

Extracción líquido-líquido y concentración de productos.

Los productos y el sustrato remanente obtenidos de los experimentos de biotransformación fueron extraídos con AcOEt (2 * 2.5 mL), seguido de centrifugación a 4000 rpm durante 5 min. La fase orgánica se recolectó y secó con Na₂SO₄ anhidro, luego se concentró con corriente de N₂. Posteriormente se adicionaron 3 µL de n-tetradecano (istd, estándar interno), se aforó a 1 mL y se tomaron 2 µL para el análisis cromatográfico.

Para evaluar la eficiencia de la extracción se prepararon tres soluciones iguales de (R)-(+)-limoneno: 5 mL de medio MYB de pH 6.5 y 12.5 µL de limoneno (14.7 mM), y se agitaron a 150 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó la extracción líquido-líquido y la concentración de las muestras, como se describió anteriormente. De igual manera, se procedió con el derivado oxigenado (R)-(+)-α-terpineol, solo que la cantidad adicionada al medio equivalió a una concentración 10.24 mM (1600 mg/L). A su vez, se prepararon blancos: soluciones en AcOEt que contenían cantidades exactas de las concentraciones de análisis del limoneno y α-terpineol y del istd. La comparación de los valores de concentración promedio de los respectivos blancos y de las muestras extraídas permitió determinar la EE del proceso utilizando la **Ecuación 9**.

$$EE \% = \left[\frac{\text{masa analito recuperado}}{\text{masa de analito adicionado}} \right] * 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

Identificación

El limoneno y los derivados oxigenados producidos se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), usando un

cromatógrafo Agilent modelo 6890N (Palo Alto, CA, USA) acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5975C con un sistema detector de ionización por impacto de electrones (70 eV) y un analizador de masas cuadrúpolo, operado en modo full scan de 40-400 Dalton (m/z). La relación Split fue 1:13 y se usó un inyector automático Series HP 7683. Se utilizó una columna capilar DB-WAX (60 m de largo x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor). La temperatura del inyector se programó a 45 °C, que se mantuvieron por 10 minutos, y luego se elevó con una velocidad de calentamiento de 3 °C/min hasta 220 °C, a esta temperatura se mantuvo por 30 min. La identificación de los compuestos se realizó comparando los espectros de masas de las muestras con los espectros de los compuestos presentes en las bases de datos espectrales ADAMS, NSB 75K, 138K NIST 05 y WILEY disponibles en el sistema de datos G1701BA HP Enhanced Chemstation.

Cuantificación

La cuantificación de α -terpineol y limoneno remanente, producidos en cada uno de los ensayos de biotransformación microbiana, se realizó por el método de estándar externo por GC-SM. Se prepararon cuatro soluciones en AcOEt de diferentes concentraciones de (R)-(+)-limoneno (1000, 2000, 5000 y 10000 mg/L) y de (R)-(+)- α -terpineol (800, 1600, 2400 y 3200 mg/L), cada una por triplicado. A 5 mL de cada solución se adicionaron 15 µL de n-tetradecano como patrón (2280 mg/L). Las soluciones preparadas se utilizaron para realizar las respectivas curvas de calibración de los terpenos. Las soluciones eluyeron en el cromatógrafo bajo las condiciones de análisis descritas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para el análisis de regresión lineal se usó el programa estadístico Statgraphics Centurion XV y las curvas de calibración se definieron según la ecuación $X = m \cdot C$

+ b, donde X: área de pico, m: pendiente calculada, c: concentración del patrón en mg/l, b: constante calculada. El RMSE fue calculado según la definición:

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

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

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

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

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

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

$$C_m = \frac{A_m}{f_r} \quad f_r = \frac{A_p}{C_p}$$

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

La concentración del limoneno y del α -terpineol presente en las muestras obtenidas de los experimentos de biotransformación fue corregida, utilizando el respectivo %EE.

En los **Anexos 5** y **9** se muestran los resultados obtenidos de la eficiencia de extracción, y la validación del método de cuantificación para el limoneno y el α -terpineol, respectivamente.

5.2.7 Extracción y purificación del α -terpineol. El extracto en AcOEt recolectado de las biotransformaciones del (R)-(+)-limoneno por *P. digitatum* obtenido bajo las condiciones óptimas se concentró por micro-destilación fraccionada (9 veces). Del concentrado obtenido se tomaron 5 mL y se aplicaron a una columna de Sílica Gel 60 (14.5 x 1.8 cm) equilibrada con una mezcla diclorometano-acetona 9:1 (Abraham et al., 1986). Los productos fueron eluidos a una velocidad de 1.2 mL/min, recolectándose fracciones de 5 mL. Las fracciones obtenidas se analizaron por TLC usando platos de Sílica Gel (Merck) y diclorometano-acetona 9:1 como eluente (Abraham et al., 1986). Los platos se secaron y aspersaron con solución de vainillina-ácido sulfúrico-etanol (0.5 g: 0.5 mL: 9 mL) (Gilbert y Martín, 2006) y calentaron a 100 °C por 1 minuto, para colorear los metabolitos. La identificación de los compuestos eluidos se realizó por comparación con el R_f de patrones de limoneno, α -terpineol y AcOEt. Las fracciones que contenían el α -terpineol fueron colectadas, y el solvente se evaporó hasta sequedad para obtener el α -terpineol puro.

Para determinar la pureza y caracterizar el producto obtenido, se tomaron los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y masas.

- **Resonancia magnética nuclear (RMN).** La muestra de α -terpineol se disolvió en CCl_3D y se analizó en el espectrofotómetro Bruker BioSpm, operado a 400 MHz. Se tomaron los espectros monodimensionales ^1H y ^{13}C y bidimensionales COSY y HSQC. El tratamiento de los datos se realizó con el programa Mestre-Nova 6.0.2-5475 Win. Los desplazamientos químicos se registraron en ppm, utilizando como referencia la señal del solvente.

- **Espectroscopia de gases-masas.** La muestra de α -terpineol se analizó por GC-SM, utilizando un espectrofotómetro Agilent Technologies 5975C con un sistema detector de ionización por impacto de electrones (70 eV) y un analizador de masas cuadrúpulo operado en modo full scan de 40-400 Dalton (m/z).

5.2.8 Bioactividad del extracto de biotransformación del (R)-(+)-limoneno y del α -terpineol. Para determinar la posible aplicación del extracto de biotransformación del (R)-(+)-limoneno (compuesto 1) y α -terpineol (compuesto 4), se evaluó la citotoxicidad en células de mamífero y la actividad anti-*Trypanosoma cruzi*, anti-Leishmania en el Laboratorio de Quimioterapia del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP-UIS) y la actividad antioxidante en el CICTA.

5.2.8.1 Citotoxicidad en células de mamífero y la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* y anti-Leishmania. Los compuestos fueron pesados, 2-3 mg, y disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). Las soluciones stock se almacenaron a -20 °C. El Nifurtimox, la Amfotericina B (AmB) y la Miltefosina fueron utilizados como medicamentos de referencia.

a. Prueba de actividad antiparasitaria. Los epimastigotes de *T. cruzi*, y los promastigotes de *L. chagasi* y *L. panamensis* fueron expuestos a diferentes concentraciones (0.1-100 μ g/mL) durante 72 h a 28 °C. Células control permanecieron sin el compuesto. En el caso de epimastigotes de *T. cruzi*, la inhibición del crecimiento se determinó por conteo directo y para promastigotes de *Leishmania* spp., por el método de reducción de la sal de tetrazolio MTT. Los resultados fueron expresados como concentración inhibitoria del 50 y 90% de los parásitos (CI_{50} y CI_{90}) (Gómez et al., 2010; Escobar et al., 2010; Palma et al., 2009).

b. Prueba de citotoxicidad. Las células VERO (derivadas de riñón de mono verde africano) fueron expuestas a diferentes diluciones de los compuestos (300-0.3 µg/mL). Se realizó incubación por 72 h a 37 °C, en concentración de CO₂ del 5%. Se utilizó un control de muerte celular como referencia. Tanto las diluciones de los compuestos como el medicamento de referencia se evaluaron por triplicado. Los resultados se expresaron como concentración citotóxica para el 50 y el 90% de las células (CC₅₀ y CC₉₀).

5.2.8.2 Actividad antioxidante. La actividad antioxidante del extracto de biotransformación del (R)-(+)-limoneno y del α-terpineol puro, se analizó usando el método espectrofotométrico de barrido (scavenging) del catión radical ABTS^{•+} (Cadena y Herrera, 2008; Re et al., 1999). Los resultados se expresaron como miliequivalentes a Trolox/g de muestra a partir de la curva de calibración de Trolox realizada con concentraciones entre 0.1-2.0 mM. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.2.9 Análisis estadístico. Los ensayos de actividad antifúngica se realizaron por triplicado. Los experimentos de biotransformación a escala de laboratorio se realizaron dos veces y cada prueba se llevó a cabo por duplicado, para un total de cuatro muestras por experimento. La concentración de sustrato remanente y los productos de biotransformación se expresaron como el promedio ± desviación estándar. Los experimentos realizados a escala de 50 y 500 mL se efectuaron por duplicado y la concentración de sustrato y producto se expresó como el promedio.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la optimización del proceso de biotransformación de (R)-(+)-limoneno utilizando células completas de *Penicillium digitatum* DSM 62840 a escala de laboratorio (5 mL), así como los resultados del escalado del proceso a 50 mL y 500 mL de medio, del proceso de

purificación del derivado hidroxilado del limoneno, α -terpineol, su caracterización espectral, y finalmente, la evaluación de citotoxicidad y de actividades antiparasitaria y antioxidante, para determinar su posible aplicación.

5.3.1 Cinética de crecimiento microbiano de *Penicillium digitatum* DSM 62840 en medio sólido. Inicialmente se evaluó el crecimiento del microorganismo en diferentes medios de cultivo PDA, MEA y YGA (**Figura 66**) y se encontró que *P. digitatum* DSM 62840 creció de manera similar en los medios PDA y YGA, y en menor proporción en el medio MEA, como se muestra en la **Figura 67**.

Figura 66 *Penicillium digitatum* DSM 62840. Cepa liofilizada y crecida en los medios de cultivo sólidos: (A) PDA, (B) MEA, (2 días) y (C) YGA

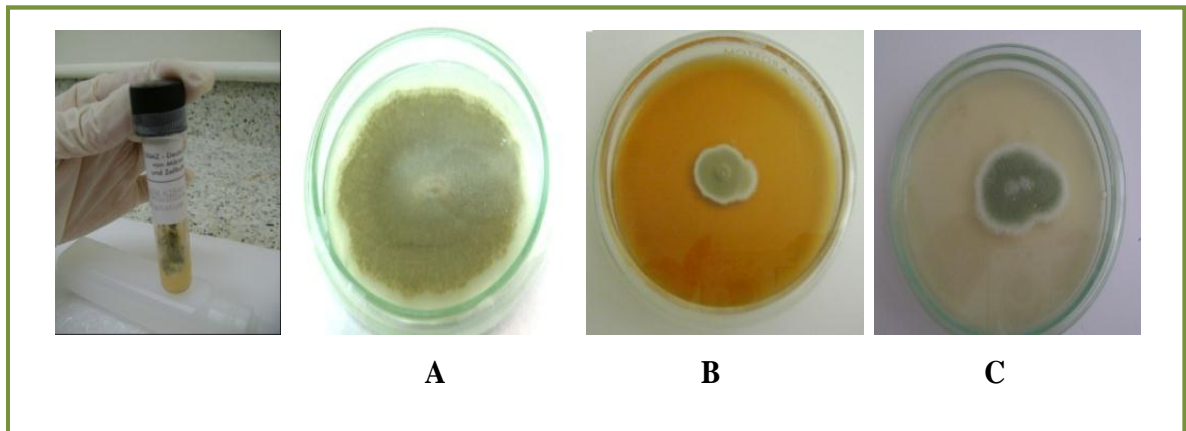
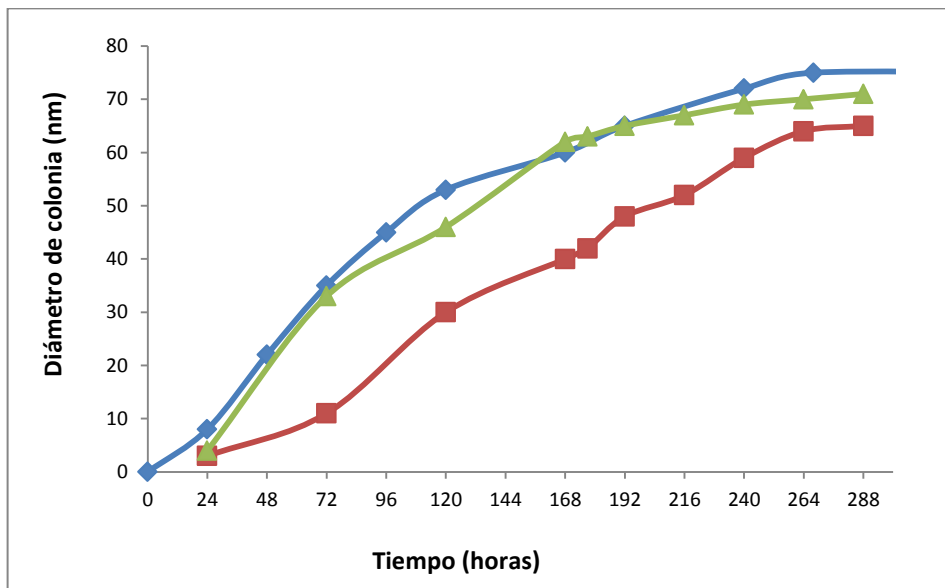


Figura 67 Cinética de crecimiento microbiano de *P. digitatum* DSM 62840 en medios PDA, MEA y YGA sobre platos de agar a 23 ° C. PDA (◆), YGA (▲) y MEA (■)



Sin embargo, la más alta VCR (0.35 ± 0.01 mm/h) se obtuvo en el medio PDA, por lo cual este se seleccionó para el mantenimiento periódico de *P. digitatum* DSM 62840 y para obtener la suspensión de esporas usada en posteriores experimentos.

5.3.2 Evaluación de la actividad antifúngica del sustrato. Para determinar la actividad antifúngica del (R)-(+)-limoneno sobre el crecimiento de *P. digitatum*, se varió la concentración de sustrato en un rango de 0-280 mM en el medio PDA y se encontró que la adición de (R)-(+)-limoneno afecta negativamente el crecimiento de *P. digitatum*, como se muestra en la **Tabla 27**.

Tabla 27 Actividad antifúngica de (R)-(+)-limoneno sobre *P. digitatum* DSM 62840 crecido en medio PDA a 23 °C

Concentración de limoneno (mM)	Inhibición (%)	VCR (mm/h)
0	0	0.47 ± 0.01
0.73	4.0	0.41 ± 0.02
1.46	6.7	0.41 ± 0.02
3.65	13.3	0.41 ± 0.02
7.35	17.3	0.40 ± 0.05
14.70	22.7	0.31 ± 0.02
25.00	28.2	0.30 ± 0.07
36.75	30.7	0.27 ± 0.04
73.40	34.7	0.23 ± 0.05
88.08	40.0	0.17 ± 0.02
110.10	46.7	0.13 ± 0.03
132.12	58.7	0.12 ± 0.02
183.50	80.0	0.09 ± 0.03
220.20	85.3	0.08 ± 0.01
256.90	89.3	0.05 ± 0.04

Con base en estos resultados se estableció una concentración de 14.7 mM como la mínima inhibitoria (CMI), mientras concentraciones superiores a 257 mM se consideraron letales (CL). Por lo anterior, para los procesos de biotransformación se seleccionó una concentración de (R)-(+)-limoneno de 14.7 mM.

El efecto de toxicidad observado puede atribuirse a la toxicidad del (R)-(+)-limoneno. Varios autores (Bicas et al., 2008; Onken y Berger, 1999; Tan y Day, 1998; Ohloff 1994) han establecido que terpenos con coeficientes de partición n-octanol/agua ($\log P_{O/W}$) entre 1 y 5 causan pérdida de permeabilidad específica e integridad a la membrana celular. El limoneno tiene un $\log P_{O/W}$ de 4.8 (Onken y Berger, 1999; Tan y Day, 1998).

5.3.3 Optimización del proceso de biotransformación. Las variables analizadas para optimizar el proceso de biotransformación del limoneno por las células de *P. digitatum* DSM 62840 fueron: medio de cultivo líquido, pH del medio, fase de

crecimiento del hongo, concentración de sustrato y efecto inductor del sustrato. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

a. Efecto del tipo de medio de cultivo. Los medios de cultivo líquidos YMPG, MYB y YG, usados en este estudio, contienen componentes nutricionales similares, pero con diferentes concentraciones, lo cual incide en su crecimiento. En la **Figura 68** se muestran las curvas de crecimiento de *P. digitatum* DSM 62840 a 27 °C y 150 rpm en los medios mencionados con pH 3.5. Se observa que *P. digitatum* crece mejor en medio MYB seguido de YMPG y YG y alcanza velocidades específicas de crecimiento (μ) de $0.005h^{-1}$ en los medios MYB y YMPG y de $0.010 h^{-1}$ en el medio YG (**Figura 69**).

Figura 68 Cinética de crecimiento de *P. digitatum* en los medios líquidos MYB, YMPG y YG de pH 3.5 a 27 °C y 150 rpm.

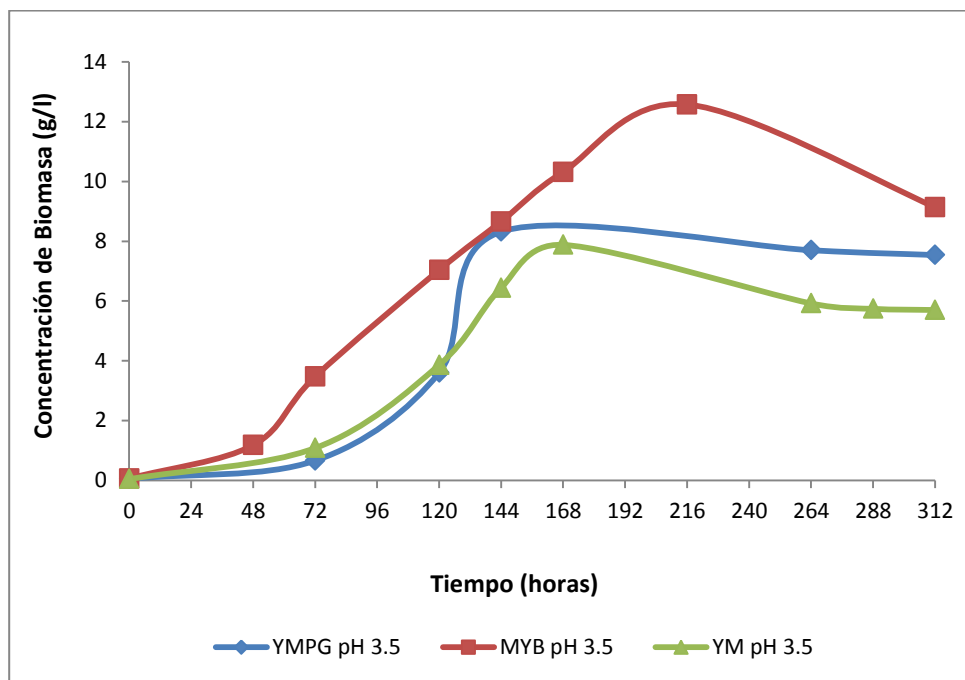
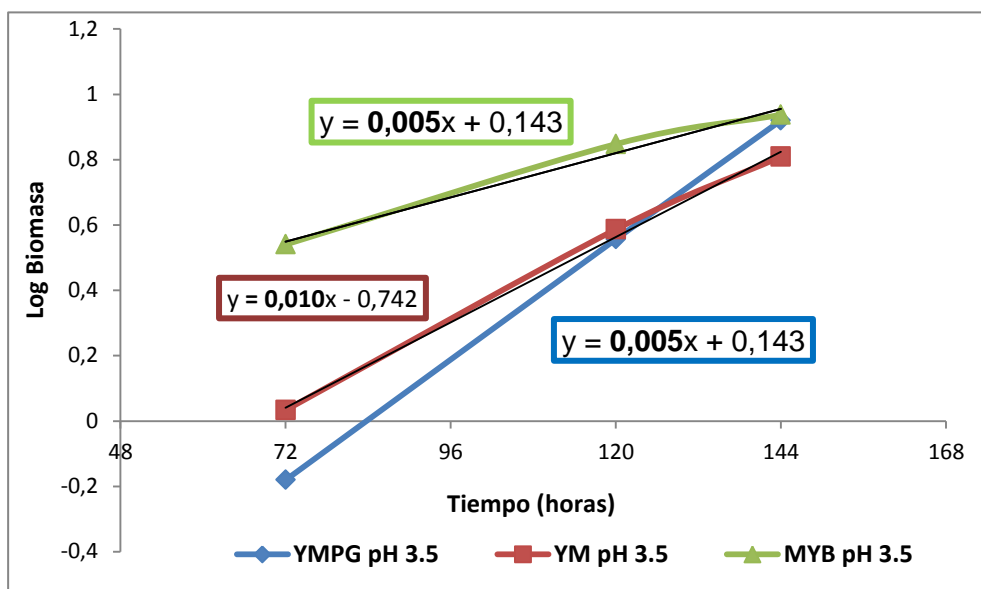
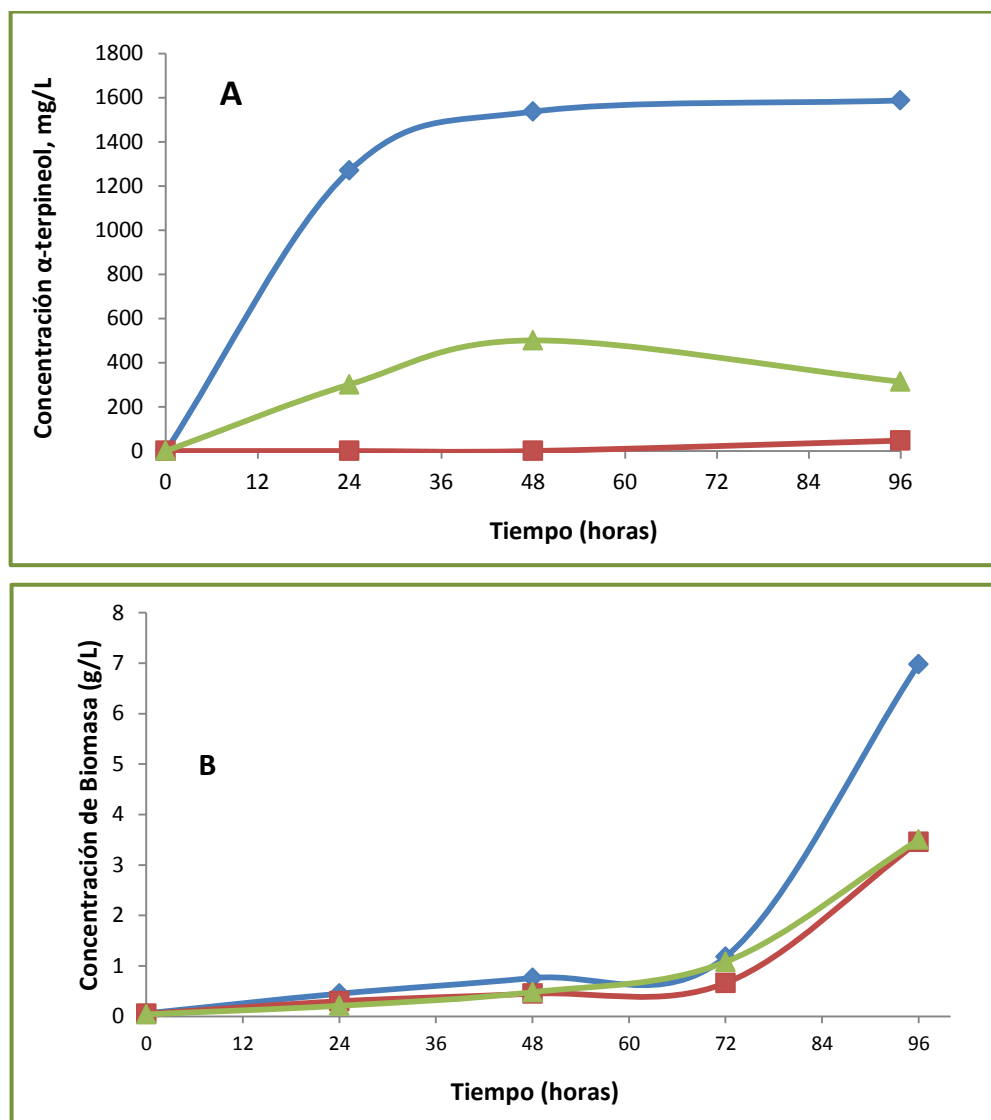


Figura 69 Velocidad específica de crecimiento de *P. digitatum* DSM 62840 en medios de cultivo líquido de pH 3.5 a 27 °C y 150 rpm



En los medios MYB y YG, el limoneno fue biotransformado sólo en (R)-(+)- α -terpineol; no obstante a las 48 h de reacción, la concentración del producto fue aproximadamente tres veces mayor (1585 ± 19.59 mg/L) en medio MYB (**Figura 70 A**) y mayor concentración de biomasa (**Figura 70 B**).

Figura 70 Efecto del medio YMPG (■), MYB (◆) y YG (▲) sobre la biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *Penicillium digitatum* DSM 62840. (A): Cinética de la producción de α -terpineol y (B): Cinética de crecimiento microbiano. Condiciones del medio de cultivo: pH 3.5 y temperatura de 27 °C



En medio YMPG, los productos de biotransformación del limoneno fueron detectados luego de 96 h, formándose sólo trans-carveol.

Los resultados mencionados muestran que el medio de cultivo puede afectar tanto la selectividad como la concentración de producto formado. Adicionalmente, la menor biotransformación en el medio YG posiblemente se debió a los mecanismos de repressión catabólica por la alta concentración de glucosa que reduce el uso de limoneno como fuente de carbono y energía. Similares efectos han sido reportados por otros autores (Badee et al, 2011; Bicas et al, 2009).

Tan et al., (1998), usando limoneno como sustrato y *Penicillium digitatum* NRRL 1202 como cepa fúngica, encontraron luego de 48 h de reacción en medio MYB un contenido de 220 mg α -terpineol/g de células secas, mientras que en este trabajo el contenido específico fue 4 veces más alto (880.6 ± 2.64 mg α -terpineol/g de células secas).

De acuerdo con estos resultados, el medio MYB se seleccionó para estudios posteriores.

a. Efecto del Ph. La capacidad de *P. digitatum* DSM 62840 para biotransformar a diferentes pHs se evaluó sobre el medio MYB, encontrándose que las células de *P. digitatum* muestran selectividad hacia la producción de (R)-(+)- α -terpineol a pH 3.0 y 3.5, mientras que a pH 4.5, la selectividad disminuye, debido a la formación de otros productos oxigenados.

Aun cuando en todos los casos el α -terpineol fue el producto formado en mayor proporción (**Tabla 28**), la más alta producción de (R)-(+)- α -terpineol (1537 ± 34.95 mg/L) se logra a pH 3.5. A valores de pH mayores ocurren re-arreglos intramoleculares que promueven la formación de otros productos por reacciones de hidroxilación en diferentes carbonos del limoneno, reacciones de isomerización, de oxidación y ruptura del ciclo, tal como se muestra en la **Figura 71**.

Tabla 28 Metabolitos producidos durante la biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *P. digitatum* DSM 62840 a diferentes pH del medio MYB a 48 h de reacción

Concentración de metabolitos de biotransformación (mg/L)	pH de biotransformación			
	3.0	3.5	4.5	6.0
Limoneno remanente	1061±67.1	439.1±28.2	530.6±21.9	1641±39.5
α-Terpineol	982±40.5	1537±34.9	1352±23.2	288.1±20.7
Linalol	ND	ND	27.8±1.3	28.6±2.0
trans-p-menta-2,8-dien-1-ol	ND	ND	23.6±1.5	23.9±1.5
cis-p-menta-2,8-dien-1-ol	ND	ND	19.5±0.9	42.9±2.1
trans carveol	ND	66.9±3.4	20.1±1.2	30.1±1.9
cis carveol	ND	ND	42.1±1.8	32.2±1.6
Carvona	ND	ND	27.3±1.0	23.0±1.2
Concentración total de productos	982±40.5	1604±37.3	1512.4±31.0	402±19.7

ND: No detectado

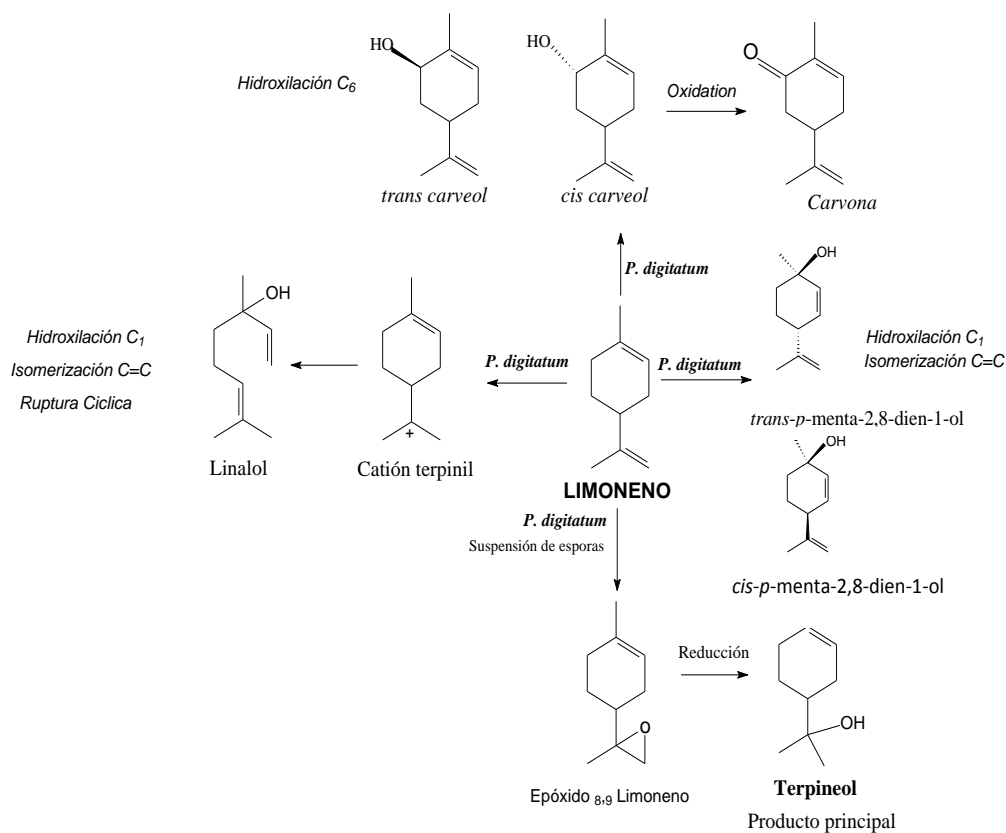
Tan y Day (1998) evaluaron el efecto del pH en el rango de 2.5 a 8.0 sobre la biotransformación del limoneno por *P. digitatum* NRRL 1202 y encontraron un perfil de actividad relativa de bioconversión versus pH con 4 valores máximos a pHs 4.5, 5.5, 6.5 y 8.0, los cuales se deben, según estos autores, a la presencia de isoenzimas y multi-componentes proteínicos presentes en el complejo enzimático citocromo P-450. Esta misma situación fue observada por Osborne et al., (1990), con la 11-α-hidroxilasa de progesterona presente en *R. nigricans*, la cual tiene 4 proteínas: P-450, NADPH-citocromo P-450, citocromo b₅ y citocromo b₅-reductasa.

En este trabajo se seleccionó el pH 3.5 para continuar los estudios.

Note que a pH 4.5 y 6.0 se forman los derivados oxigenados linalol y los isómeros *cis/trans*-p-menta-2,8-dien-1-ol. Estos compuestos no han sido producidos por

biotransformación del limoneno. Es posible que bajo condiciones suavemente ácidas den lugar a nuevas rutas metabólicas del limoneno por las células de *P. digitatum* DSM 62840. El linalol se forma a través del catión intermediario α -terpinil como ocurre naturalmente en las plantas (**Figura 72**). La bioconversión de (R)-(+)-limoneno por *P. digitatum* a α -terpineol, implica un intermediario (epóxido-8,9- limoneno) formado via epoxidación por ataque al doble enlace 8,9 seguido de una ruptura reductiva (**Figura 72**). Las reacciones de epoxidación por lo general son catalizados por MO-citocromo P450 (Badee et al, 2011; Tan y Day, 1998; Abraham et al., 1985).

Figura 71 Productos de biotransformación de (R)-(+)-limoneno por *Penicillium digitatum* DSM 62840 obtenidos a pH 4.5 y 6.0 en MYB, temperatura 27 °C y 150 rpm

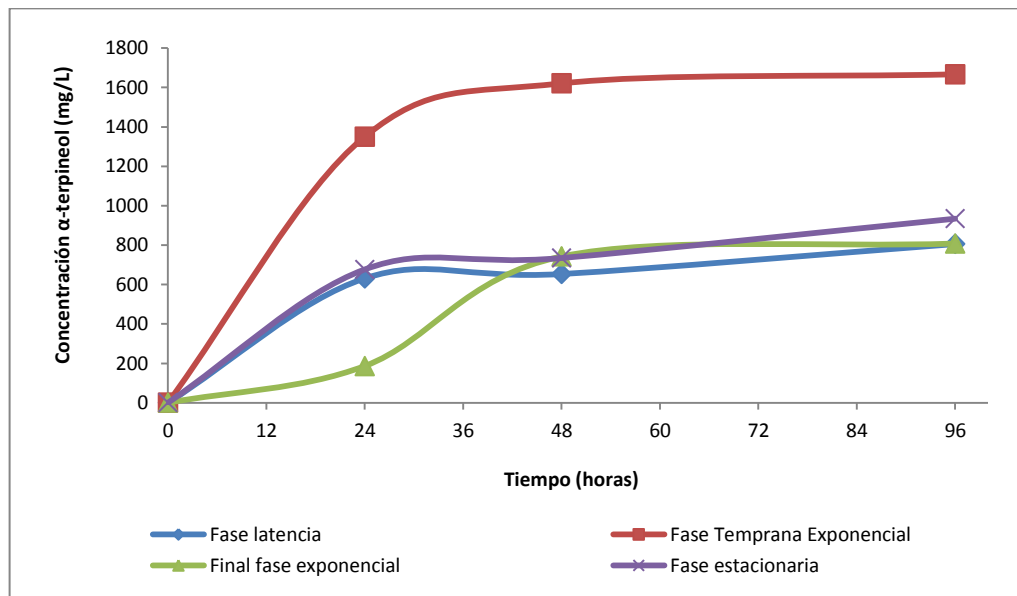


a. Efecto de la fase de crecimiento de *P. digitatum* DSM 62840. En este experimento, el limoneno se adicionó al medio de cultivo que contenía el microorganismo en diferentes fases de crecimiento y se monitoreó la biotransformación cada 24 h durante 96 h; se encontró que, en todos los casos, la biotransformación de (R)-(+)-limoneno ocurre rápidamente en las primeras 24 h, después de 48 h de reacción, la velocidad de biotransformación es constante. La **Figura 72** resume estos resultados.

Además, independientemente de la fase de crecimiento, las células de *P. digitatum* producen (R)-(+)- α -terpineol; sin embargo, la mayor concentración (1667 ± 49.7 mg/L) se obtuvo cuando el limoneno se adicionó en la fase exponencial temprana (72 h). Cuando se adicionó en las otras fases de crecimiento, la producción de (R)-(+)- α -terpineol decreció entre el 50% y el 60%.

El efecto de la fase de crecimiento sobre la biotransformación del limoneno ha sido evaluada por Tan et al., (1998), usando *P. digitatum* NRRL 1202 en medio MYB a pH 4.5; estos autores encontraron que la biotransformación del limoneno solo se lleva a cabo en las fases exponencial temprana (24 h) y media (72 h), alcanzando un rendimiento específico de 5.4 y 2.2 mg α -terpineol/ g célula seca/día, respectivamente.

Figura 72 Efecto de la adición de limoneno en diferentes fases de crecimiento de *Penicillium digitatum* DSM 62840 sobre la biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno. Condiciones de cultivo: medio MYB, 27° C, 150 rpm y pH 3.5.



Con base en los resultados mostrados se escogió la fase de crecimiento en fase exponencial temprana, para continuar con los análisis.

b. Efecto de la concentración de sustrato. Los experimentos llevados a cabo utilizando diferentes concentraciones de limoneno mostraron que estas afectan tanto la selectividad como la bioconversión del limoneno por *P. digitatum*. En este estudio, concentraciones entre 10 y 15 mM favorecen la producción de α -terpineol, mientras que concentraciones mayores (> 30 mM) disminuyen la selectividad formando diferentes derivados oxigenados, como *cis/trans* carveol, carvona, 1,2 - limoneno diol, *cis* p-menta 2,8-dien-1-ol, fenil etanol (picos 5, 6, 7, 8, 9 y 12, respectivamente), β -pineno, sabineno y mirceno (picos 1, 2 y 3), y dos picos no-identificados (picos 11 y 14), tal como se muestra en la **Figura 73**. En el caso de la bioconversión el valor más alto (1537 ± 34.95 mg/L) se alcanza a una concentración 15 mM de limoneno (**Tabla 29**).

Figura 73 Cromatograma obtenido de la biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *Penicillium digitatum* DSM 62840, en medio MYB, a 27 °C, 150 rpm, y pH 3.5. **(A)** Limoneno 15 mM **(B)** Limoneno 100 mM. Otras condiciones: Columna capilar DB-WAX (60m x 0.25mm x 0.25 μm), Cromatografía acoplada a detector selectivo de masas (GC-MS)

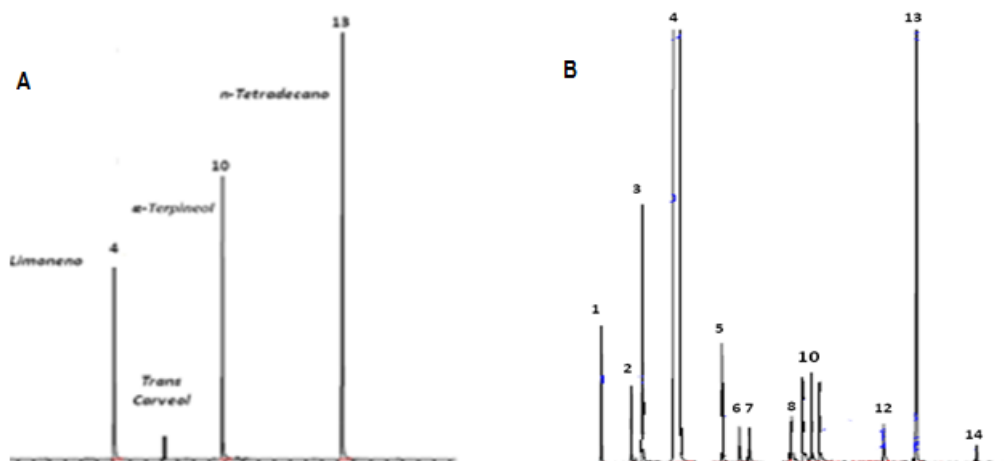


Tabla 29 Producción de metabolitos durante la biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno usando *P. digitatum* DSM 62840, medio MYB, a 27 °C, 150 rpm y pH 3.5

Sustrato y productos (mg/L)	Concentración de limoneno (mM)					
	10	15	30	50	75	100
Limoneno remanente	964.7±40.7	317±25.5	2319±44.6	4866±56.9	7432±50.8	10566±57.9
α-Terpineol	357±15.3	1537±34.9	1039±37.4	634±26.3	697±23.7	496±18.8
Trans carveol	ND	67±3.4	85.4±3.9	154.1±7.3	369.0±9.4	370.7±11.6
Cis carveol	ND	ND	53.5±2.7	76.8±4.5	155.6±5.1	207.1±7.4
Carvona	ND	ND	63.7±5.8	95.3±3.1	181.6±8.3	215.7±8.3
1,6-Octadien-3-ol	ND	ND	67.9±5.3	103.9±5.6	211.7±8.0	260.9±5.9

Sustrato y productos (mg/L)	Concentración de limoneno (mM)					
	10	15	30	50	75	100
Fenil etanol	ND	ND	42.2±0.1	64.0±2.9	135.0±3.7	174.9±7.7
Limoneno 1,2-diol	ND	ND	54.9±4.47	77.9±3.3	159.4±3.4	188.5±6.1
cis-menta-2,8-dien-1-ol	ND	ND	38.9±2.1	42.1±1.9	92.2±4.1	123.9±8.6
trans-menta-2,8-dien-1-ol	ND	ND	77.7±2.9	89.9±3.6	173.3±5.9	208.2±8.3
Total otros productos	0	67±3.4	484±16.3	704±19.9	1477±24.7	1745±32.2
Total biotransformación	357±15.3	1604±37.3	1523±29.9	1338±22.3	2174±20.7	2241±31.2
Bioconversión (%)						
	26.20±1.1	75.21±1.7	25.42±0.9	9.31±0.4	6.82±0.2	3.64±0.1

Otros autores, como Peschek et al. (2009), encontraron con este mismo hongo concentraciones óptimas de sustrato menores (9.5 mM), mientras que para otros hongos se han obtenido mejores resultados con concentraciones de limoneno del orden de 62 mM (Tan y Day, 1998a). Usando bacterias para biotransformar el limoneno, por ejemplo *P. gladioli*, la concentración máxima de sustrato fue de 11.4 mM (Braddock y Cadwallader, 1995).

Lo anterior permite inferir que la concentración de sustrato afecta principalmente la selectividad y la bioconversión del (*R*)-(+)-limoneno.

c. Efecto inductor de (*R*)-(+)-limoneno. La adición previa de limoneno como inductor de las células del hongo incrementó la producción de α -terpineol en 14.6% a las 48 h de reacción, tal como se muestra en la **Tabla 30**. Estos resultados sugieren que la enzima responsable de la oxifuncionalización del limoneno es inducible. El efecto inductor ha sido reportado en cepas de hongos

como *P. digitatum* NRRL 1202 (Tan y Day, 1998), *Cladosporium* (Kraidman et al., 1969) y *P. gladioli* (Braddock y Cadwallader, 1995; Savithiry et al., 1997).

En otros estudios de biotransformación de sustratos hidrofóbicos realizados utilizando otros hongos y levaduras, como *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 (Holland et al., 1975), *Lodderomyces elongisporus* (Honeck et al., 1982), *Candida maltosa* y *Saccharomyces cerevisiae* (Zimmer et al., 1995), también se encontró que la hidroxilación es realizada por monooxigenasas tipo citocromo P450, que a su vez son inducibles por sustrato.

Tabla 30 Bioconversión de (*R*)-(+)-limoneno por *Penicillium digitatum* DSM 62840 en presencia y ausencia de inductor

Tiempo (horas)	Concentración (mg α -terpineol/L)		Conversión (%)		Productividad, mg α -terpineol L ⁻¹ h ⁻¹	
	Sin Inductor	Con Inductor ^a	Sin Inductor	Con Inductor ^a	Sin Inductor	Con Inductor
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	492±10.9	763±15.9	21.72±0.53	33.72±0.78	61.49±1.3	95.43±1.99
24	1154±18.8	1308±22.2	50.96±0.92	57.75±1.09	48.07±0.78	54.48±0.93
48	1585±19.6	1835±54.4	70.00±1.32	81.05±4.91	3.01±0.41	38.23±1.13

^a: Concentración de (*R*)-(+)- Limoneno en el medio (1.47 mM)

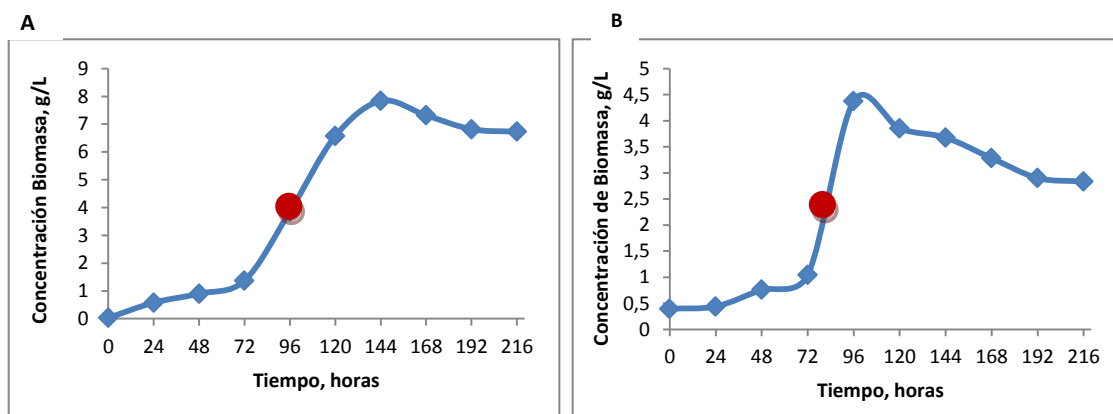
En resumen, de los resultados obtenidos a escala de laboratorio se puede establecer que las células de *Penicillium digitatum* DSM 62840 fueron altamente selectivas para producir (*R*)-(+)- α -terpineol por biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno puro, lográndose una conversión máxima promedio de 81.05±4.91, una actividad específica de bioconversión de 880 mg α -terpineol/g de célula seca y una

productividad promedio de 38.2 mg α -terpineol $L^{-1}h^{-1}$, bajo las siguientes condiciones de proceso: Medio de biotransformación MYB a pH 3.5, inoculado con esporas crecidas en presencia de inductor hasta fase exponencial temprana (72 h); concentración de sustrato: 14.7 mM, tiempo de reacción: 48 h, y a 27 °C y 150 rpm.

5.3.4 Escalado del proceso de biotransformación. Bajo las condiciones seleccionadas se procedió a escalar el proceso a 50 mL, para evaluar la reproducibilidad del proceso al aumentar la escala y adecuar variables para escalar a 500 mL de medio de reacción.

5.3.4.1 A 50 mL de medio de cultivo. Previamente fue necesario establecer la cinética de crecimiento del microorganismo a esta escala para determinar el tiempo necesario para alcanzar la fase exponencial temprana (fase óptima) de crecimiento de *P. digitatum* DSM 62841 en el medio MYB de pH 3.5, para los dos sistemas: suspensión de esporas (sin-precultivo) y micélio (con-precultivo). En la **Figura 74** se presentan las curvas de crecimiento obtenidas.

Figura 74 Cinética de crecimiento microbiano de *P. digitatum* DSM 62840 en 50 mL de medio MYB de pH 3.5 a 27°C y 150 rpm. (A) Sin-precultivo y (B) Con-precultivo.

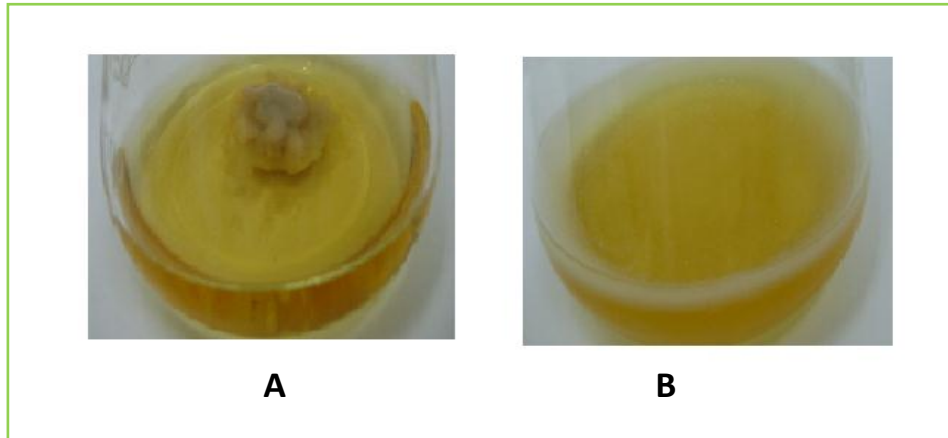


Para el sistema sin-precultivo el tiempo fue de 96 h, mientras que con-precultivo fue de 84 h. La biomasa producida en cada caso fue de $3,84 \pm 0,27$ y $2,58 \pm 0,18$ g/L, respectivamente. Manteniendo las demás condiciones de reacción se llevó a cabo la biotransformación de (R)-(+)-limoneno utilizando los dos sistemas. Los resultados mostraron que dependiendo de la morfología de *P. digitatum* (**Figura 75**), la biotransformación del limoneno sigue diferentes rutas. Utilizando el micelio del hongo la reacción es más selectiva, produciendo los terpenoides α -terpineol (1603.6 ± 34.8 mg/L) y trans-carveol (60.7 ± 9.6 mg/L), mientras que con suspensión de esporas la concentración de α -terpineol es 3 veces menor (516.9 ± 23.9 mg/L) y se producen fenil etanol (45.1 ± 2.8 mg/L) y etil oleato (2.8 ± 0.7 mg/L).

La conversión fue mayor (81.4%) cuando la biotransformación del limoneno, se llevó a cabo utilizando micelio de *P. digitatum*, mientras que con la solución de esporas la bioconversión disminuye apreciablemente alcanzándose un valor de 28.2%. Lo anterior puede deberse a varias situaciones; es posible que las esporas bajo las nuevas condiciones de reacción sufran estrés que afecte su estado fisiológico y disminuya la resistencia a tóxicos, que en este caso sería el limoneno remanente y los productos formados, α -terpineol, y causen inhibición enzimática a las oxigenasas responsables de la oxifuncionalización del monoterpeno (Dantigny et al., 2009; Wolken et al., 2003; Wolken et al., 2002).

Por lo anterior, para continuar con el escalado del proceso se utilizó micelio (con pre-cultivo).

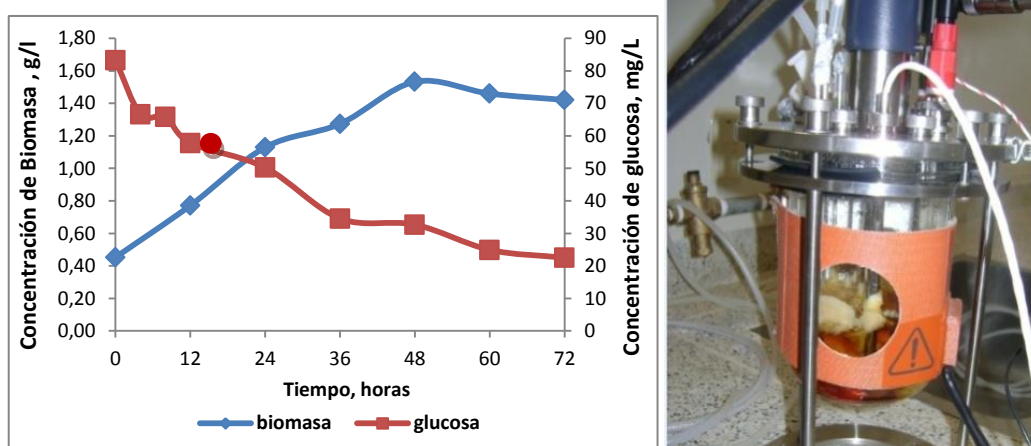
Figura 75 Morfología de *P. digitatum* DSM 62840. (A): medio inoculado con micelio, (B): medio inoculado con suspensión de esporas, SS; medio inoculado con SS a escala de laboratorio.



5.3.4.2 A 500 mL de medio de cultivo. Los bioensayos en volumen de 500 mL de medio MYB de pH 3.5 se llevaron a cabo utilizando micelio, que fue obtenido de la siguiente manera: 5 mL de medio MYB de pH 3.5 se inocularon con 50 μ L de SS de concentración $1 \cdot 10^7$ esporas/mL y se incubó por 72 h a 27 °C y 150 rpm. El micelio obtenido y el volumen de medio se utilizaron para inocular 45 mL de medio fresco e incubar durante 84 h a las mismas condiciones de agitación y temperatura. El conjunto micelio y medio de cultivo obtenido se empleó para inocular 450 mL de medio MYB de pH 3.5 fresco, ubicados en el biorreactor New Brunswick Scientific BioFlo 110, esterilizado previamente.

Aquí también fue necesario determinar el tiempo en el que *P. digitatum* alcanza la fase exponencial temprana de crecimiento; para ello se determinó la curva de crecimiento respectiva inoculando el medio de cultivo como se describió anteriormente. La **Figura 76** muestra que a las 24 h se alcanza la fase exponencial media, habiendo consumido el hongo el 40% de la glucosa inicial (**Anexo 7**).

Figura 76. Cinética de crecimiento de *P. digitatum* DSM 62840 en 500 mL de medio MYB de pH 3.5, a 27 °C y 100 rpm en biorreactor New Brunswick Scientific BioFlo 110.



Los experimentos de biotransformación de (R)-(+)-limoneno por *P. digitatum* DSM 62840 a escala de 500 mL de medio MYB de pH 3.5 se realizaron a 27 °C, utilizando agitación mecánica. Para establecer las condiciones óptimas de velocidad de agitación y velocidad de aireación y su efecto en la biotransformación, se aplicó el diseño experimental central factorial de tres niveles 3^2 . Como variable respuesta se aplicó la producción de α -terpineol expresada como concentración de α -terpineol (mg/L). En la **Tabla 31** se presentan los valores de los niveles evaluados para cada variable, y en la **Tabla 32**, los resultados obtenidos al aplicar el diseño experimental.

Tabla 31 Variables y niveles evaluados en el diseño factorial de tres niveles, 3^2

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
Velocidad de agitación (rpm)	100	150	200
Velocidad de aireación (vvm ^a)	0.00	0.05	0.10

^avvm: velocidad de aireación por volumen de medio

Tabla 32 Matrix del diseño factorial de tres niveles 3^2 , y la concentración de α -terpineol (mg/L) obtenida por GC-MS luego de 48 horas de reacción

Puntos del diseño	Niveles de las variables independientes		Variable respuesta
	Agitación (rpm)	Aireación (vvm)	Concentración α -terpineol (mg/L)
1	-1	-1	980,8
2	0	-1	1272,8
3	1	-1	1172,1
4	-1	0	19,0
5	0	0	309,0
6	1	0	442,0
7	-1	1	253,3
8	0	1	255,8
9	1	1	581,1

El análisis estadístico de estandarización de efectos y análisis de varianza (ANOVA) de las variables independientes permitió obtener los resultados que se muestran en la **Tabla 33**; de ellos se establece que en la producción de α -terpineol el factor velocidad de aireación y el cuadrado de su interacción (BB) influyen significativamente, teniendo la velocidad de aireación un efecto significativo al nivel del 99.0% ($P < 0.01$). Estos resultados se corroboran con el diagrama de estandarización de los efectos o diagrama de pareto (**Figura 77 A**), y con la gráfica de superficie de respuesta estimada, en la cual se observa que al incrementar la velocidad de aireación disminuye la producción del compuesto de interés (**Figura 77 B**).

Tabla 33 Efectos estimados y análisis de varianza para la concentración de α -terpineol (mg/L)

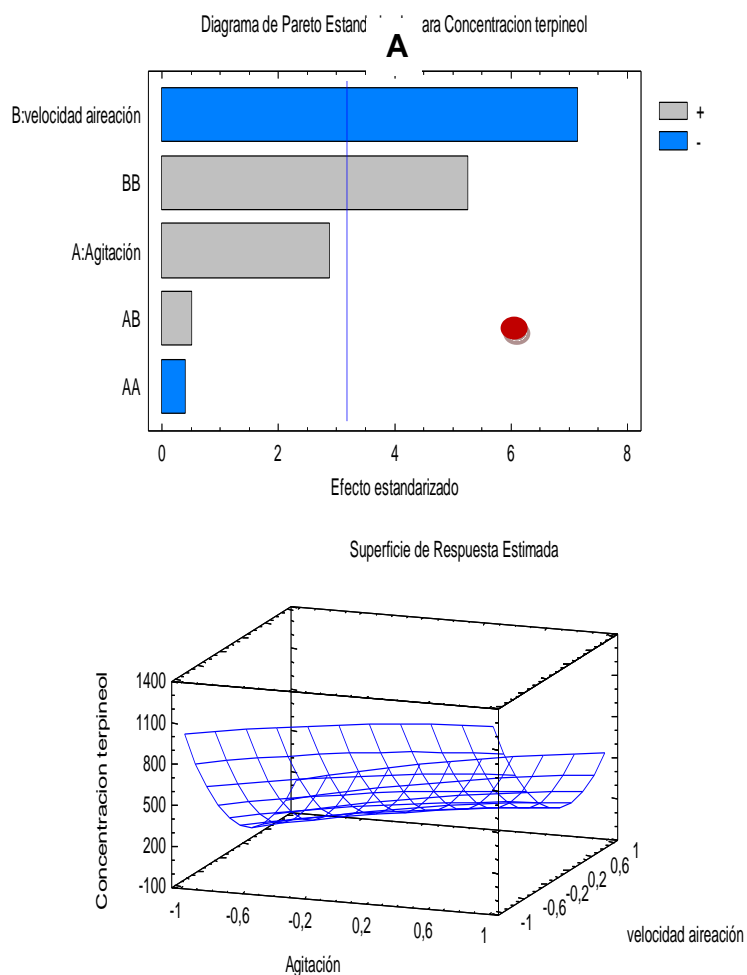
Efecto	Coefficiente de regresión	Error estándar	SS	Df	MS	F	P
Promedio	281,878	99,2771					
A:Agitación	314,033	108,753	147925	1	147925	8,34	0,0631
B:velocidad aireación	-778,5	108,753	909093	1	909093	51,24	0,0056
AA	-75,6333	188,365	2860,2	1	2860,2	0,16	0,7149
AB	68,25	133,194	4658,06	1	4658,06	0,26	0,6437
BB	991,967	188,365	491999	1	491999	27,73	0,0133
Error total			53222,1	3	17740,7		
Total (corr.)			1,60976 E ⁶	8			
coeficiente de determinación, R ²			96,6938%				

Abreviaturas: SS= Suma de cuadrados; Df=grados de libertad; MS= cuadrado medio; F= prueba de significación; P= probabilidad de error.

Lo anterior sugiere que la biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *P. digitatum* DSM 62840 en biorreactor se debe llevar a cabo en ausencia de aireación para que la concentración de α -terpineol sea máxima (1272,8 mg/L) (**Figura 77B**).

Al aplicar el análisis de optimización multivariable se estableció que para tener la máxima conversión equivalente a una producción de (*R*)-(+)- α -terpineol de 1252,19 mg/L se requiere operar el biorreactor a una velocidad de agitación de 200 rpm, sin aireación (0 vvm) y manteniendo las demás condiciones del proceso. En estas condiciones se evaluó la reproducibilidad del proceso, realizándolo por duplicado, y se obtuvo una concentración de α -terpineol de 1271.5 \pm 16.9 mg/L, que equivalen a una actividad de bioconversión específica de 954,7 mg α -terpineol/g célula seca y una productividad de 25,7 mg.L⁻¹h⁻¹.

Figura 77 Diagrama de estandarización de efectos (A) y Superficie de respuesta estimada (B)



Contrario a lo esperado, el oxígeno –que es un sustrato clave y necesario en bioprocesos aerobios–, y debe suministrarse continuamente debido a la baja solubilidad en medios acuosos (García y Gómez, 2009); en esta investigación, afectó negativamente la selectividad de las reacciones de hidroxilación del C-8 del (R)-(+)-limoneno, generando otros productos como puede verse en la **Tabla 34**.

Por último, una comparación de los resultados obtenidos durante el escalado del proceso de biotransformación de (R)-(+)-limoneno por *P. digitatum* DSM 62840 (**Tabla 35**) muestra que la producción de (R)-(+)- α -terpineol disminuye con los

cambios progresivos de volumen de escalado, al igual que la conversión y la productividad específica. En el caso del escalado a 500 mL, el cambio de volumen (100 veces) y del tipo de agitación (de orbital a mecánica) afectaron la capacidad de *P. digitatum* DSM 62840 para biotransformar el (*R*)-(+)-limoneno a (*R*)-(+)- α -terpineol.

Tabla 34 Metabolitos producidos en la biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *P. digitatum* a diferentes velocidades de aireación y 200 rpm

Productos	Velocidades de aireación (vvm)		
	0.05	0.10	0.00
	Concentración (mg/L)		
Limoneno remanente	990,1	1082,1	797,3
Fenil etanol	32,1	5,8	ND
cis-p-Menta-2,8-dienol	22,5	6,3	ND
1,8-mentadien-4-ol	17,5	0,5	ND
alfa terpineol	442,0	581,1	1172,1
Alcohol perílico	5,7	5,9	ND
trans Carveol	63,4	20,5	14,8
cis Carveol	60,9	9,0	18,8
Carvona	2,3	19,4	ND
Peril aldehido	ND	17,4	ND

ND: No detectado

Tabla 35 Efecto del cambio de volumen de medio MYB de pH 3.5 sobre la concentración de (*R*)-(+)- α -terpineol obtenida por biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *P. digitatum* DSM 62840

Concentración α -terpineol (mg/L)	Volumen de medio (mL)		
	5	50	500
	1835 \pm 54.4	1603.6 \pm 34.8	1271.5 \pm 16,9
Conversión de limoneno (%)	81.05 \pm 4.91	70.79 \pm 1.70	56.15 \pm 0.74
Productividad (mgL ⁻¹ h ⁻¹)	38.2	33.4	25.7
Cambio respecto a concentración de α -terpineol productida en 5 mL (%)		10.26	24.90

No se encontraron en la bibliografía estudios similares que evalúen el efecto progresivo del escalado en los procesos de biotransformación de terpenos, por lo que es difícil establecer si los valores observados en este estudio son representativos. A nivel industrial, cambios en los procesos de escalado hasta de un 25% se consideran aceptables.

Con respecto a la selectividad, es de destacar que se mantienen las condiciones finales de los tres procesos (a nivel de laboratorio, 50 mL y 500 mL), es decir, en todos los casos se forma α -terpineol y trans-carveol, lo que sugiere que en el proceso *P. digitatum* DSM 62840 se producen oxigenasas: una monooxigenasa que oxida el enlace olefínico del C-8 del limoneno, y posteriormente, una enzima reductiva que actúa sobre el epóxido, da lugar al (*R*)-(+)- α -terpineol, y la otra enzima, 6-limoneno-monooxigenasa, que hidroxila estereo-específicamente el carbono alílico C-6 del limoneno, formando el isómero trans-carveol (De Carvalho y Da Fonseca, 2002).

Comparado con otras investigaciones, es importante destacar que autores como Pescheck y colaboradores (2009) han evaluado la biotransformación de limoneno utilizando también la cepa de *P. digitatum* DSM 62840, pero en lugar de utilizar un biorreactor de tanque agitado, como en este estudio, utilizaron un biorreactor con circuito cerrado de gas, debido a que el limoneno se adicionó en fase gaseosa. Las condiciones del proceso fueron: 2.7 L de medio MYB de pH 4.0, 27 °C, 100 rpm y 0.05 vvm de velocidad de aireación, con adición secuencial de limoneno (cinco dosis de 1.9 mM cada 24 horas). En estas condiciones, los autores alcanzaron una conversión molar del 63%, equivalente a una concentración de (*R*)-(+)- α -terpineol de 1009 mg/L y una productividad promedio de 8.5 mgL⁻¹h⁻¹.

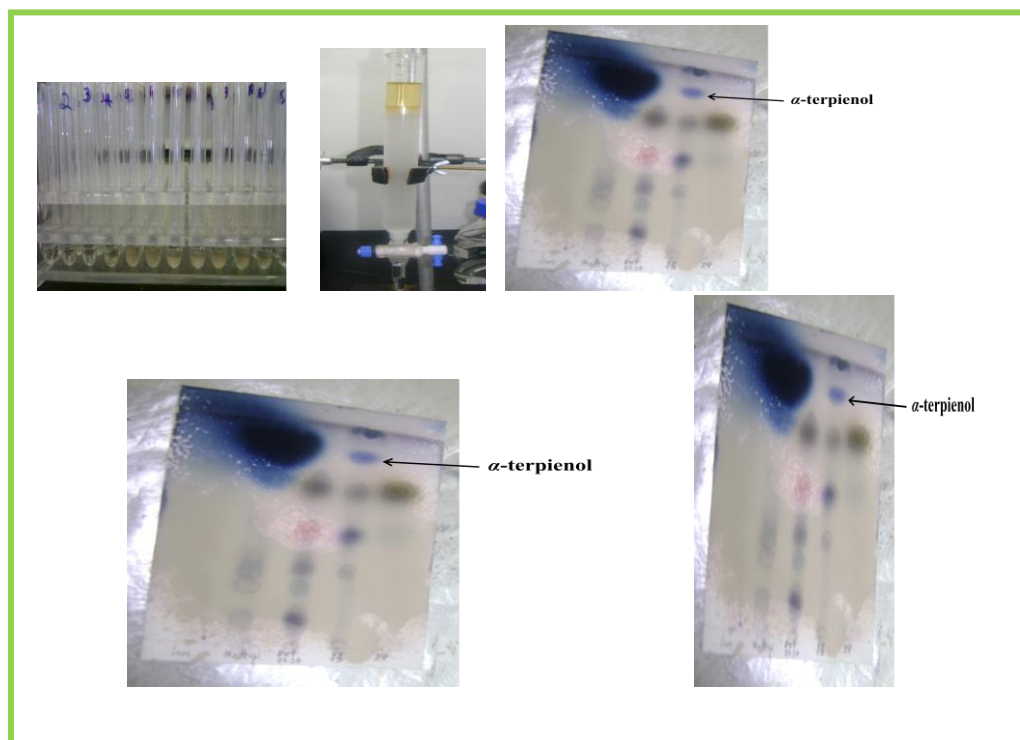
Comparando con los resultados obtenidos en biorreactor, utilizando 500 mL de medio, la concentración de α -terpineol y la productividad obtenida en nuestro caso fue aproximadamente del 20% y 3 veces mayor, respectivamente.

Pescheck et al., no reportan la producción de derivados oxigenados diferentes al α -terpineol, aunque es posible que bajo las condiciones del proceso estos se hubiesen formado; el interés de los autores se centró en el producto mayoritario. En este trabajo se encontró que la aireación del bioproceso afectó negativamente la bioconversión y la selectividad de la biotransformación del limoneno.

Otros autores, como Tan y Day (1998), ensayaron diferentes concentraciones de oxígeno disuelto, 0.77, 1.60 y 3.03 mg/L, y encontraron que el oxígeno acelera la reacción de bioconversión del limoneno por *P. digitatum* NRRL 1202; pero los excesos decrecen la bioconversión. La más alta bioconversión se obtuvo a 1.60 mg/L de oxígeno disuelto, en un tiempo de 24 h. En el caso de 0.77 mg/L, la bioconversión continuó hasta el quinto día. Los requerimientos de oxígeno resultaron ser muy similares a los de la levadura *Candida maltosa*. En esta investigación, la aireación reducida en el medio (60 rpm) versus cultivos aireados (240 rpm) redujo los niveles de citocromo P-450 y NADPH-citocromo P-450.

5.3.5 Purificación y caracterización de α -terpineol. El (*R*)-(+)- α -terpineol fue purificado del extracto de biotransformación usando cromatografía de columna sobre Sílica Gel 60 (Merck), y como fase móvil, la mezcla 9:1 diclorometano-acetona (Abraham, 1997); en cada fracción se recogieron 5 mL. Se realizó una prueba cualitativa a cada fracción, teniendo en cuenta que α -terpineol es un alcohol terciario, y como tal da prueba positiva con el reactivo de Lucas (ZnCl_2/HCl concentrado) (**Figura 78**). Las fracciones que dieron prueba positiva se reunieron y se analizaron por cromatografía de capa fina (fracciones A y B). Las fracciones fueron identificadas por patrones corridos de limoneno y α -terpineol por TLC y eluidos con una mezcla 1:1 de diclorometano-acetona. La fracción B correspondió al DOL; esta se evaporó en estufa a 40°C hasta sequedad para obtener el compuesto ausente de solvente y puro.

Figura 78 Fracciones resultantes de la cromatografía de columna sobre Sílica Gel-60 del extracto de biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por *P. digitatum* DSM 62840 concentrado. Prueba cualitativa con el reactivo de Lucas. TLC de fracciones y patrones.



Posteriormente al compuesto puro se tomaron los espectros de masas, RMN-¹³C y RMN-¹H) y bidimensionales, COSY y HSQC.

Espectro de masas

El espectro de masas del α-terpineol se muestra en la **Figura 79**. Este espectro se caracteriza, por la presencia de los fragmentos diagnóstico m/z : 136 $[M-H_2O]^+$, 121 $[M-H_2O-CH_3]^+$, 93 $[M-H_2O-C_3H_5-2H]^+$ y 59 $[C_3H_7O]^+$. El ión m/z 59 corresponde al pico de base (100%) generado por una ruptura α del enlace exocíclico. En el **Anexo 10** se ilustran las rutas de fragmentación del α-terpineol.

Espectro RMN-¹H y RMN-¹³C

El espectro de RMN-¹H del (R)-(+)- α -terpineol se muestra en la **Figura 81**. En él se observan como señales más características los singuletes (s) de los protones metílicos presentes en C-10 y C-9 en 3.04 y 3.05 ppm, respectivamente. A campos bajos y como consecuencia del efecto anisotrópico del doble enlace, en 3,52 ppm se observan los protones del grupo metilo enlazados a C-1. En 3,54 ppm aparece la señal del protón del grupo hidróxilo. El protón metilénico de la posición C-4 del anillo resuena como multiplete (m) en 3,4 – 3,41 ppm. En la **Figura 80** se ilustra la asignación de los respectivos corrimientos químicos.

Figura 79 Espectro de masas de (R)-(+)- α -terpineol

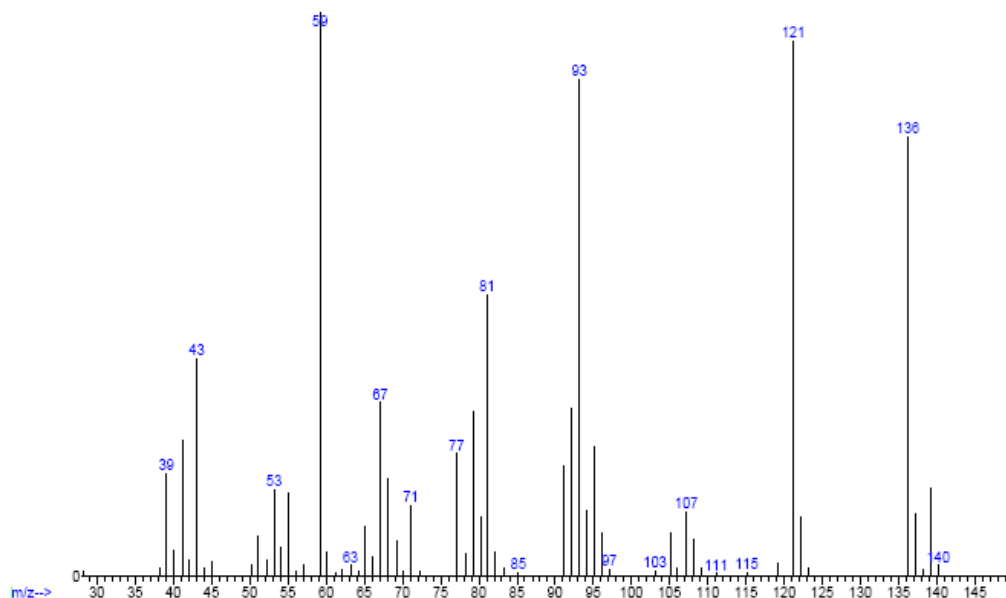


Figura 80 Espectro RMN-¹H de (*R*)-(+)- α -Terpineol

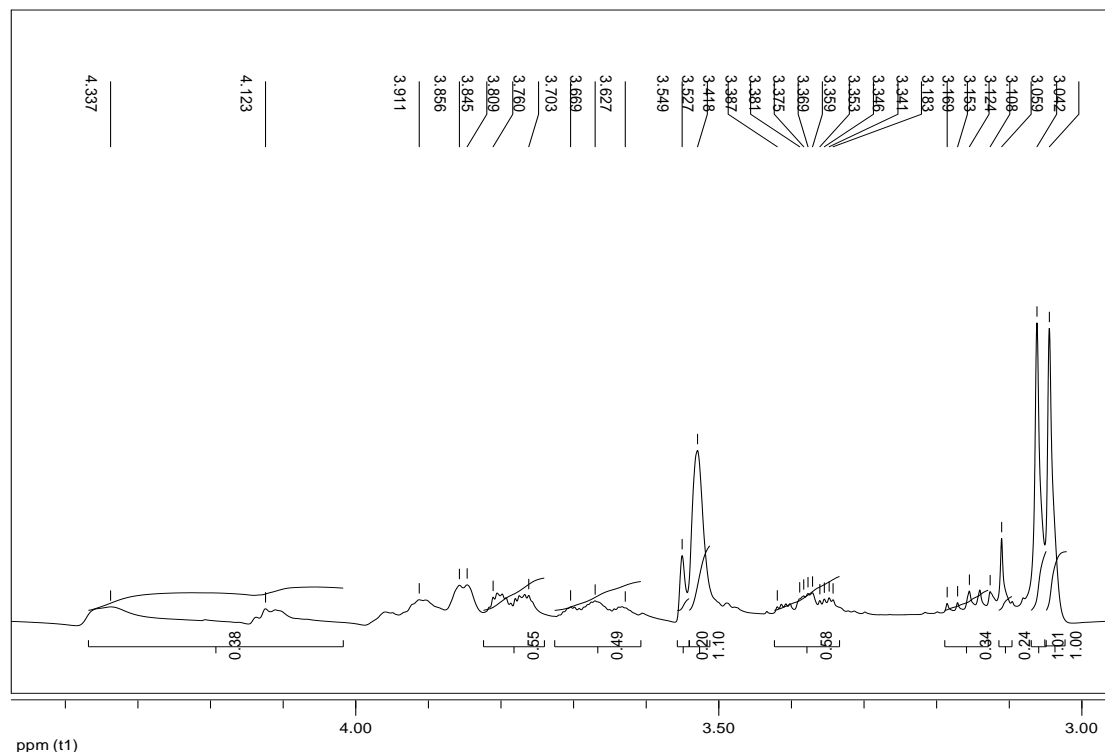
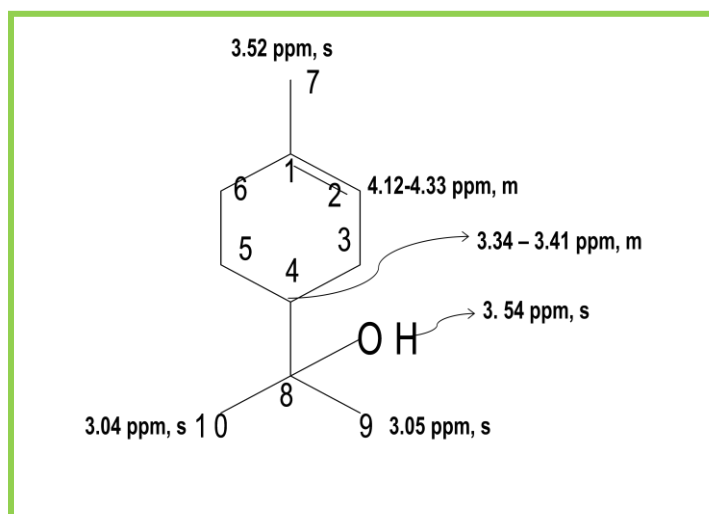
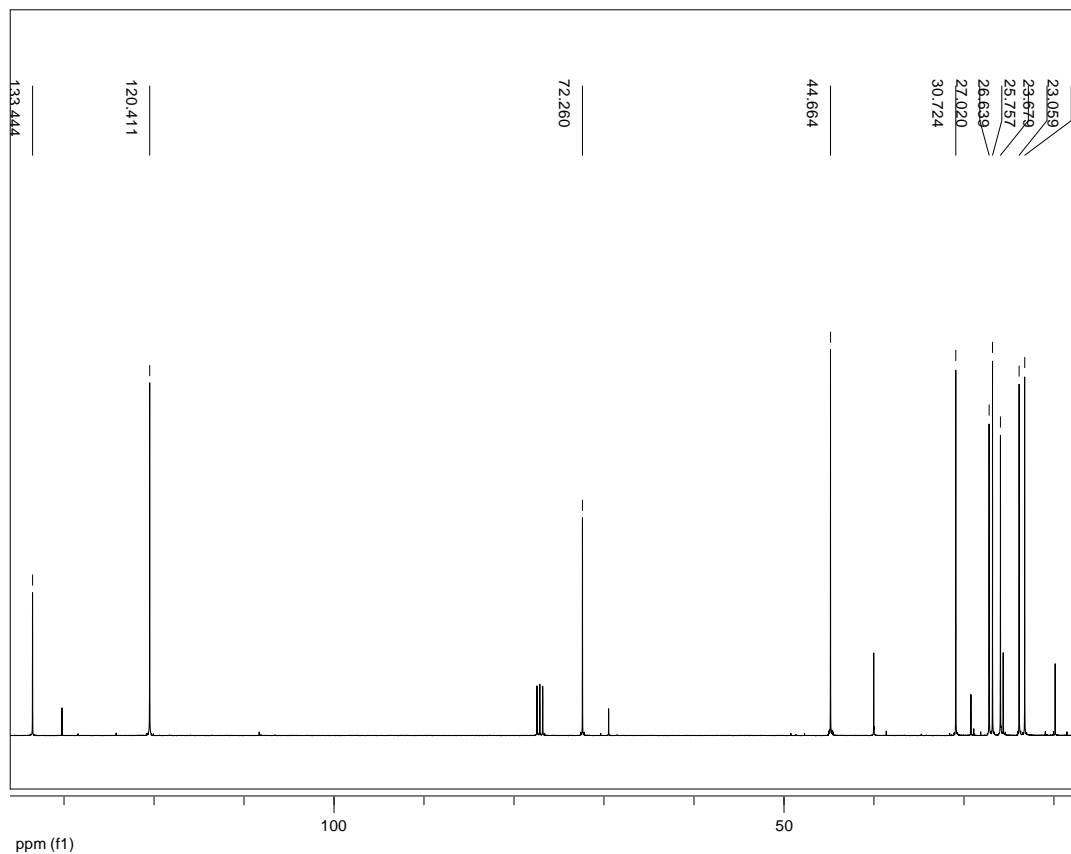


Figura 81 Corrimientos químicos de la molécula de (*R*)-(+)- α -terpineol en RMN-¹H



El espectro de RMN-¹³C del (*R*)-(+)- α -terpineol se muestra en la **Figura 80**.

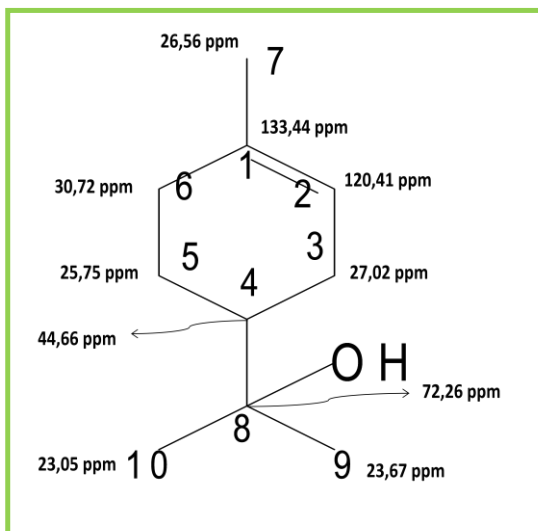
Figura 82 Espectro RMN-¹³C de (*R*)-(+)- α -Terpineol



En el espectro de RMN-¹³C se observan claramente los corrimientos de los carbonos 1 y 2 del doble enlace, en 133,44 y 120,41 ppm, respectivamente. El carbono metílico unido al C-7 aparece en 26,63 ppm. La señal del carbono cuaternario que enlaza el grupo hidroxilo aparece en 72,26 ppm, mientras que los otros dos carbonos metílicos exocíclicos (C-9, C-10) resuenan en 23,05 y 23,67 ppm, respectivamente. Las señales de los carbonos restantes C-3, C-4 y C-5 se observan entre 25,75 – 44,66 ppm.

En la **Figura 83** se ilustra la asignación de los respectivos corrimientos químicos.

Figura 83 Corrimientos químicos del (R)-(+)- α -terpineol en RMN- ^{13}C



Los espectros de masas y de RMN protónico y de ^{13}C permitieron identificar la molécula como (R)-(+)- α -terpineol con un alto grado de pureza (>98%).

En los **Anexos 11** y **12**, se encuentran los espectros de RMN bidimensionales del (R)-(+)- α -terpineol, COSY y HSQC, respectivamente.

5.3.6 Citotoxicidad, actividad antiparasitaria y antioxidante. La citotoxicidad y la actividad antiparasitaria de los diferentes extractos fue analizada en el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) Laboratorio de Quimioterapia (**Anexo 3**), utilizando células Vero y formas libres de *T. cruzi* y de *L. panamensis* y *L. chagasi*. Los resultados del extracto de biotransformación de (R)-(+)-limoneno por *P. digitatum* DSM 62840 (compuesto 1) y del limoneno (compuesto 4) ilustrados en la **Tabla 36** indican que estos compuestos no son tóxicos, por ser inactivos para *T. cruzi*, *L. panamensis* y *L. chagasi* y presentar tanto IC_{50} como IC_{90} >100 μM . Tampoco mostraron ser tóxicos en células de mamífero porque los CC_{50} y CC_{90} fueron mayores a los compuestos de referencia Nifurtimox, AmB y Mitelfosina. Por otra parte, el sustrato y el producto de biotransformación se comportan de igual manera, sin presentar diferencias; el

hecho de que el extracto y la solución patrón de α -terpineol no presenten toxicidad para las células de mamífero resulta ser una característica muy importante para su aplicación en humanos; no obstante, está condicionada a los resultados de los ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad.

Arruda y colaboradores (2009) evaluaron la actividad del limoneno in vitro e in vivo contra especies de Leishmania, encontrando la muerte de promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* con una CI_{50} de 252.0 ± 49.0 y 147 ± 46.0 μ M. También este monoterpeneo fue activo contra promastigotes de *L. major*, *L. braziliensis* y *L. chagasi* (Arruda et al., 2009). Lo anterior sugería una posible actividad antiprotozoaria del extracto de biotransformación, constituido principalmente por el DOL α -terpineol y su precursor, limoneno.

Tabla 36 Actividad del extracto de biotransformación de (R)-(+)-limoneno por *P. digitatum* DSM 62840, del α -terpineol y de los medicamentos de referencia en epimastigotes de *T. cruzi*, promastigotes de *L. panamensis* y *L. chagasi* y en células Vero

Compu esto	μ g/MI							
	T. cruzi		Leishmania				Células Vero	
	CI_{50}	CI_{90}	<i>L. panamensis</i>		<i>L. chagasi</i>		CC_{50}	CC_{90}
1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
4	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
Nifurti mox	3,06 \pm 0,13	18,13 \pm 2,15	-	-	-	-	62,82 \pm 1,84	250,47 \pm 11,05
AmB	-	-	-	-	0,03 \pm 0, 00001	0,04 \pm 0, 0004	-	-
Miltefo sina	-	-	5,94 \pm 0,02	25,07 \pm 0,26	-	-	-	-

CI: Concentración inhibitoria; CC: Concentración citotóxica; AmB: Anfotericina B; compuesto 1: extracto de biotransformación de (R)-(+)-limoneno por *P. digitatum* DSM 62840; Compuesto 4: solución de limoneno

En cuanto a la actividad antioxidante del extracto de biotransformación en AcOEt evaluada por el método de barrido (scavenging) del catión radical ABTS^{•+}, mostró un porcentaje de inhibición del ABTS^{•+} de 10.43, correspondientes a 0.115 miliequivalentes de Trolox (TEAC). La curva de calibración de Trolox se muestra en el **Anexo 4**. Las soluciones de limoneno y α -terpineol arrojaron un %In de ABTS^{•+} de 4.6 y 6.4, respectivamente, que sumados corresponden al %In del extracto de biotransformación; es decir, que la mezcla sustrato-producto tiene un efecto sinérgico antioxidante favorable para la aplicación directa del extracto de biotransformación.

El potencial antioxidante del extracto de la biotransformación en AcOEt del aceite esencial de naranja por *F. oxysporum* 152B, llevada a cabo en medio MM+CC “mezcla líquida de sales y del agro-residuo del procesamiento de yuca (cassava)”, y constituido por limoneno (166 mg/L), α -terpineol (6.6 mg/L), alcohol perílico (2.6 mg/L) y carvona (0.2 mg/L), fue evaluado por Maróstica et al., y encontraron una capacidad total antioxidante de EC₅₀ de 2.09%v/v, determinada por ensayo de barrido del radical libre DPPH (Maróstica et al., 2009).

Últimamente se evaluó el potencial antioxidante (PA) a los monoterpenoides carvona, alcohol perílico y α -terpineol usando los métodos DPPH y ORAC. Los resultados muestran una muy baja actividad antioxidante por DPPH mientras que por ORAC, el α -terpineol presentó una concentración de 2.72 μ equiv.Trolox/ μ mol. Adicionalmente, se evaluó el efecto antiproliferativo contra nueve líneas cancerosas, encontrando que el α -terpineol tiene efecto citostático en el rango de 181–588 μ M, en adenocarcinoma de pulmón y leucemia crónica (Bicas et al, 2011).

Los resultados de actividad antioxidante y de citotoxicidad celular, sugieren la posible aplicación directa del extracto de biotransformación de limoneno por *P.*

digitatum DSM 62840. Lo anterior, permite eliminar la etapa de purificación del α -terpineol, favoreciendo económicamente el proceso total.

Con miras a ampliar el espectro de uso del extracto de biotransformación, en las industrias agroquímicas, de alimentos y cosmética, se sugiere evaluar la actividad biológica contra hongos e insectos y su actividad aromatizante y cosmética.

Finalmente, el trabajo desarrollado en esta etapa del proyecto permite concluir que las condiciones bajo las cuales se realiza el proceso de biotransformación afectan tanto la selectividad como la bioconversión; sin embargo, una vez definidas las condiciones de la reacción y escalado el proceso, se ve más afectada la bioconversión, mientras que la selectividad se mantiene.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Las cepas de los hongos *A. niger* DSM 821, *A. carbonarius* DSM 872 y *P. digitatum* DSM 62840 presentaron capacidad para biotransformar el citronelol. En todos los casos la oxifuncionalización fue selectiva formando el derivado hidroxilado 3,7-dimetil-1,7-octanodiol comúnmente conocido como hidroxicitronelol (Cit-OH), compuesto importante para la industria de alimentos y de perfumería fina.

La bioconversión del citronelol es afectada por variables como biocatalizador, pH, composición del medio líquido, edad del hongo, concentración de sustrato y tiempo de reacción. La mayor bioconversión (1060.3 ± 43.2 mg Cit-OH/L) se logra con *P. digitatum* DSM 62840 crecido hasta fase exponencial temprana (48 h), en medio MYB de pH 2.5 con una concentración de citronelol 12.8 mM adicionada en solución etanólica al 40%, un tiempo de reacción de 12 días a 27 °C y 150 rpm. La conversión alcanzada fue del 53% (mg producto/mg sustrato inicial). La actividad de bioconversión fue de 288 mgCit-OH/g célula seca y la productividad del $3.68 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$. No obstante, la transformación del citronelol resulta de un efecto combinado auto-oxidación (10%)-biotransformación (90%), debido al bajo valor de pH (2.5).

La producción de citronelol en medios de cultivo líquido no ha sido reportada. Este trabajo es precursor en la producción natural de Cit-OH.

El escalado del proceso de biotransformación del citronelol afectó la bioconversión, pero no la selectividad. De esta forma, con el proceso operado bajo condiciones óptimas de velocidad de agitación y de aireación (150 rpm y 0.00 vvm respectivamente), se obtuvo una concentración máxima de Cit-OH de 720 mg/L, equivalente a una conversión del 36%, una actividad específica de 480 mg Cit-OH/g célula seca y una productividad de $2.50 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$.

La oxifuncionalización del limoneno para producir (*R*)-(+)- α -terpineol utilizando *Penicillium digitatum* DSM 62840 resultó ser dependiente de las condiciones del proceso: medio de biotransformación, pH, fase de crecimiento del hongo, concentración de sustrato, tiempo de reacción y efecto inductor, siempre y cuando se mantengan fijas otras variables: concentración de suspensión de esporas, temperatura, velocidad de agitación y volumen de medio. Bajo las siguientes condiciones de proceso: medio de biotransformación MYB a pH 3.5, inoculado con suspensión de esporas inducidas por sustrato y crecidas durante 72 h a 27 °C y 150 rpm, una concentración de limoneno 15 mM y 48 h de reacción, se alcanzó una concentración de (*R*)-(+)- α -terpineol de 1835 \pm 54.4 mg/L, una conversión del 81.05 \pm 4.91%, una actividad específica de 880.6 mg α -terpineol/g células secas y una productividad de 38.23 mg α -terpineol L⁻¹h⁻¹.

El escalado del proceso de biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno afectó la bioconversión, mas no la selectividad. Además, la concentración de α -terpineol producida fue dependiente de la morfología de *P. digitatum* DSM 62840, obteniéndose el doble de concentración (1600 mg/L) cuando se utiliza micelio comparado con suspensión de esporas. A escala 100 veces mayor de volumen de medio (500 mL), con una velocidad de agitación de 200 rpm y 0.00 vvm de velocidad de aireación, se alcanzó una concentración máxima de α -terpineol de 1271,5 mg/L, equivalente a una conversión del (*R*)-(+)-limoneno del 60,3%, una productividad de 25,7 mgL⁻¹h⁻¹ y una actividad específica de bioconversión de 954,7 mg α -terpineol/g célula seca.

La biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno por *Aspergillus niger* DSM 821 para producir alcohol perílico se logró con células completas del hongo crecidas hasta fase exponencial media (72 h), en el medio de bioconversión MYB de pH 5.0 ajustado con buffer citrato-fosfato 0.1 M, concentración de sustrato 50 mM adicionado en solución etanólica al 20%, a 300 rpm, 28 °C y un tiempo de reacción de 6 días. Bajo estas condiciones se alcanzó la más alta concentración de POH

(405 mg/L), equivalente a una actividad específica de bioconversión de 50.63 mg POH/g célula seca y una productividad de 2.81 mg POH L⁻¹h⁻¹. La conversión de sustrato fue del 25%, distribuida en la producción de DOL, principalmente de POH y PCHO. La concentración de POH alcanzada en este estudio resulta ser la mayor bioconversión alcanzada usando cepas fúngicas.

Las células completas de *A. niger* DSM 821 tienen la capacidad de hidroxilar y oxidar la molécula de limoneno en diferentes carbonos, dando lugar a los terpenoides POH, PCHO, *cis/trans* carveol, 1,2 limoneno-diol, linalol, óxidos de limoneno y fenil etanol, mostrando, por tanto, baja selectividad.

Al escalar el proceso, la biotransformación del (*R*)-(+)-limoneno se afecta por la morfología de *A. niger* DSM 821, obteniéndose 2.1 veces más de concentración de POH cuando se utiliza micelio, comparado con suspensión de esporas, y se produce una concentración de POH de 389.1 mg/L, una actividad específica de bioconversión de 33.98 mg POH/g célula seca, una conversión a DOL del 13.5% y una productividad de 2.70 mg POH L⁻¹h⁻¹.

A escala de 500 mL, a 200 rpm y sin aireación, se obtuvo una concentración máxima de POH de 259.5±3.45 mg/L y una actividad específica de bioconversión de 115.3 mg POH/g de célula seca. El proceso total de biotransformación dirigido a DOL tuvo una conversión del 20%, una productividad de 1.80 mg L⁻¹h⁻¹ y una actividad específica de bioconversión de 604mg/g de célula seca.

En la biotransformación de (*R*)-(+)-limoneno por bacterias se encontró que *R. erythropolis* DSM 43066 tiene capacidad para transformar el sustrato en un tiempo de 72 h en el medio mineral (MM) de pH 7.0, a una concentración de 850 mg/L, y producir los DOL linalol, epóxido trans 1,2-limoneno y carvona con un bajo grado de conversión (0.32%). La bacteria *Xanthobacter* sp. DSM 6696 no biotransformó

el limoneno, y después de 24 h utiliza el monoterpeno como fuente de carbono y energía.

Los extractos de biotransformación de citronelol y limoneno por hongos no presentaron actividad antichagas ni antileishmania. Ninguno resultó ser tóxico para las células de mamífero (VERO) y arrojaron valores de CC_{50} y CC_{90} mayores a los medicamentos de referencia (>300): Nifurtimox, Amfotericina B y Miltefosina.

Los extractos de biotransformación de citronelol y limoneno por hongos inhiben la capacidad antioxidante del $ABTS^{•+}$. La mayor capacidad antioxidante se obtuvo con el extracto de biotransformación de (R)-(+)-limoneno por *A. niger* DSM 821, que contiene POH como DOL mayoritario, con un porcentaje de inhibición del 71.6 ± 1.8 y una concentración de 2.051 mEquivalentes a Trolox/mM. Los extractos BIO-1 y BIO-3 correspondientes a la biotransformación del citronelol y limoneno por *P. digitatum* DSM 62840 presentaron una inhibición del catión-radical $ABTS^{•+}$ del 11.31% y 10.5%, equivalentes a 0.145 y 0.115 mEquivalentes a Trolox/mM, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, A.; DEMYTTENAERE, J.C.R.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of the culture conditions. *Food Chem.* **2003**; 80: 525-534.

ABRAHAM, WR; HOFFMANN, HMR; KIESLICH, K; RENG, G; STUMPF, B. Microbial transformation of some monoterpenoids and sesquiterpenoids. In R. Porter & S. Clark (Eds), *Enzymes in Organic Synthesis*. Ciba Foundation Symposium III, London. **1985**; 146-160.

ABRAHAM, B; ONKEN, JG; BERGER, RG. Strategies toward an efficient biotechnology of aromas. In: *Proceedings of the 5th Wartburg Aroma Symposium*, Eisenach, Eigenverlag Universität Potsdam. **1997**; 357-373.

AOAC (1995) *Official Method of Analysis - The Association of Official Analytical*

ALEU, J.U; GONZÁLEZ, I. Biotransformation by *Botrytis* species. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2001**; 13: 77-93.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **2000**; 30, 1269–1281.

ARCHELAS, A; FURSTOSS, R. Synthetic applications of epoxide hydrolases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**; **5**: 112-119.

ARRUDA, DC; MIGUEL, DC; YOKOYAMA-YASUNAKA, JKU; KATZIN, AM, ULIANA, SRB. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* **2009**; XX: 1-7.

ARVELA, PM; et al. Liquid-phase hydrogenation of citral for production of citronellol: catalyst selection. *Appl. Catal. A: Gen.* **2003**; 241: 271-288.

AVILA, MC; CORNELLI, NA; RODRÍGUEZ, E; JÍMENEZ, A. Study of solid acid catalysis for the hydration of α -pinene. *J. Mol. Cat. A: Chem.* 2010; 322: 106-112.

AZIAH, N; KAMARUDDIN, AH; TAU, KY. A continuous esterification of malonic acid with citronellol using packed bed reactor: Investigation of parameter. *Food & Bioproducts Processing.* **2009**.

AZZOLI, CG; MILLER, VA; NG, KK; KRUG, LM; SPRIGGS, DR. A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**; 51: 493-498.

BABU, KGD; SINGH, B; JOSHI, VP; SINGH, V. Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) distilled under different pressures and temperatures. *Flav. Frag. J.* **2002**; 7: 136-140.

BADEE, AZM; HELMY, SA; MORSY, FS. Utilisation of orange peel in the production of α -terpineol by *Penicillium digitatum* NRRL 1202. *Food Chem.* **2011**; 126: 849-854.

BAERG, RJ; BARRETT, M; POLGE, ND. Insecticide and Insecticide metabolite interactions with cytochrome P450 mediated activities in maize. *Pesticide Biochemistry & Physiology.* **1996**; 0030: 10-20.

BAILEY, H.H., DONNA, M.D., et al. A phase II trial of daily perillyl alcohol in patients with advanced ovarian cancer: Eastern cooperative oncology group study E2E96. *Gin. Onc.* **2002**; 85: 464-468.

BALANA, FR; REGUERA, R; CUBRIA, JC; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharmacol.* **1998**; 30: 435–443

BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK A, IDAOMAR M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicology.* **2008**; 46: 446-475.

BAPAT, PM; KUNDU, S; WANGIKAR, PP. An Optimized Method for *Aspergillus niger* Spore Production on Natural Carrier Substrates. *Biotechnol. Prog.* **2003**; 19: 1683-1688.

BATHIA, SP; LETIZIA, CS; API, AM. Fragrance material review on alpha-terpineol. *Food Chem. Toxicology.* **2008**; 46:S280–S285

BASTOS, K; DE SOUZA, W; DURÁN, R; TALLARICO, M; SUELI, P; GONZÁLEZ, I. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2009**; 20: 385–397

BELANGER, J.T. Perillyl Alcohol: Applications in Oncology. *Alternative Medicine Review.* **1998**; 3 (6): 448-457.

BELL, SG; SOWDEN, RJ; WONG, LL. Engineering the haem monooxygenase cytochrome P450cam for monoterpene oxidation. *Chem. Commun.* **2001**; 635-636.

BERGER, RG; AKKAN, Z; DRAWERT, F. Catabolism of geraniol by cell suspension cultures of *Citrus limon*. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1999**; 3:1055, 234-239.

BERGER RG; KRINGS, U; ZORN, H. Biotechnological flavour generation, In A. J. Taylor. *Food Flavour Technology*. Weimar: C.H.I.P.S Press. Berger, R. G. (Ed.). (1995). *Aroma biotechnology*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. **2002**; 60-104p.

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

BHADRA, R. Antileishmanial agents. *Drugs Future.* 1993; 18: 451–463.

BIANCHI, G; NUZZI, M; AVITABILE, A. Development of a headspace-solid phase micro extraction method to monitor changes in volatile profile of rose (*Rosa hybrida*, cv David Austin) petals during processing. *J. Chrom. A.* **2007**; 1150: 190-197.

BICAS, JL; NERI-NUMA, IA; RUIZ, ALTJ; DE CARVALHO, EJ; PASTORE, GM. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food Chem. Tox.* **2011**; 49 (7): 1610-1615.

BICAS, JL; FONTANILLE, P; PASTORE, GM; LARROCHE, C. A bioprocess for the production of high concentrations of (R)-(+)- α -terpineol from (R)-(+)-limonene. *Process Biochem.* **2010**; 45: 481-486.

BICAS, JL; PEREIRA, C; NERI-NUMA, IA; PASTORE, GM. Integrated process for co-production of alkaline lipase of (R)-(+)- α -terpineol by *Fusarium oxysporum*. *Food Chem.* **2010**; 120: 452-456.

BICAS, JL; CAVALCANTE, FF; WAGNER, R; TEIXEIRA, H. Optimization of (R)-(+)- α -terpineol production by the biotransformation of (R)-(+)-limonene. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**; 35: 1061-1070.

BIZUKOJC, M; STANISLAW, L. A kinetic to predict biomass content for *Aspergillus niger* germinating spores in the submerged culture. *Process Biochem.* **2006**; 41: 1063-1071

BLIESNER, DM. Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide. John Wiley & Sons, New Jersey. **2006**.

BOCK, G; BENDA, I; SCHREIER, P. Microbial transformation of geraniol and nerol by *Botrytis cinerea*. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **1988**; 27: 351-357.

BOGADO, AL; DE SOUZA, RF; SCHUCHARDT, U; BATISTA, A. On the kinetics of epoxidation of olefins by Cis and trans- [RuCl₂ (dppb)(2,2'-bipy)] complexes. J. Mol. Catal. A: Chem. **2003**. 203, 129-135.

BOERSMA, YL; SCHELTINGA, PC; DRÖGE, MJ; BOS, R; QUAX, WJ. A validated gas chromatographic method for the evaluation of enzymatic enantioselectivity in kinetic resolution applications. J. Separations Sci. **2005**; 28, 501-505.

BOMMARIUS, AS; RIEBEL, BR. Biocatalysis. Fundamentals and applications. Wiley-VCH, Weinheim. **2004**.

BORGES, EA; ULSON, AA; DE SOUZA, SG. Analysis of the high fructose syrup production using reactive SMB technology. Chem. Engin. J. **2006**; 118: 167-181.

BRADDOCK, RJ; CADWALLADER, KR. Bioconversion of Citrus d-Limonene. A.C.S. Symp. Ser. **1995**; 596: 142-148

BRAGA, FG; BOUZADA, MLM; FABRI, RL; MATOS, MO; MOREIRA, FO; SCIO, E; COIMBRA, ES. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. J. Ethnopharmacology. **2007**; 111: 396–402

BRENNA, E; FUGANTI, C; SERRA, S. Enantioselective perception of chiral odorants. Tetrahedron: Asymmetry. **2003**; 14: 1-42.

BRUNERIE, P; BENDA, I; BOCK, G; SCHREIER, P. Bioconversion of citronellol by *Botrytis cinerea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1987**; 27: 6-10.

BUGG, TDH. Oxygenases: mechanisms and structural motifs for O₂ activation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**; 5: 550-555.

CADWALLADER, KR; BRADDOCK, RJ; PARISH, ME; HIGGINS, DP. Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*. *J. Food Sci.* **1989**; 54 (5): 1241-1245.

CADWALLADER, KR; BRADDOCK, RJ. Enzymatic hydration of (4R)-(+)-limonene to (4R)(+)- α -terpineol. *Developments Food Sci.* **1992**; 29: 571-584.

CADWALLADER, KR; BRADDOCK, RJ; PARISH, ME; HIGGINS, DP. Bioconversion of (+)-limonene. *Pseudomonas gladioli*. *J. Food Sci.* **1992**; 29: 571-584.

CAGNOLI, MV; CASUSCELLI, SG; ALVAREZ, A; BENGEOA, J; GALLEGOS, N; CRIVELLO, N. Ti-MCM-41 silylation : Development of a simple methodology for its estimation silylation effect on the activity and selectivity in the limonene oxidation with H₂O₂. *Catalysis Today.* **2005**; 107: 397-403.

CAMEOTRA, SS; MAKKAR, RS. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998; 50: 520-529.

CARRILLO, ML; RÁMIREZ, MR; MARTÍNEZ, JC. Effect of solutes on growth parameters of food spoilage moulds. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2006**; 5 (2): 142-146.

CARVALHO, PB; FERREIRA, EI. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease—review. *Fitoterapia.* **2001**; 72: 599–618.

CARVALHO, PB; ARRIBAS, MAG; FERREIRA, EI. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy?. Rev. Bras. Ci. Farm 36 (Suppl. 1). **2000**; 69–96.

CASTELLANOS, FE; PEREA, JA; ORTIZ, C. Obtención de alcohol perílico por biotransformación del limoneno. Scientia Et Technica. **2007**; abril, año/vol.XIII, número 033: 137-140.

CASTELLANOS, FE. Biotransformación de limoneno, α -pineno y aceites esenciales de naranja y mandarina empleando *Aspergillus niger*. **2007**. Universidad Industrial de Santander, Tesis de Maestría en Química.

CASUSCELLI, S; HERRERO, E., et al. Application of complex heteropolytundstates in limonene epoxidation by H_2O_2 in biphasic medium. Catalysis Today. **2005**; 107: 230-234.

CHAN, KK. Quantitation of monoterpenoid compounds with potential medicinal use in biological fluids. J. Chrom. A. **2001**; 936: 47-57.

CHAN, NLS; WANG, H; WANG, Y; LEUNG, HY. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced CYP1B1 activity is suppressed by perillyl alcohol in MCF-7 cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. **2006**; 213: 98-104.

CHANG-HAE, C; ORIEL, P. **1997**. Process and bacterial cultures for the preparation of perillyl compounds. US5652137.

CHANG, H; ORIEL, PJ. Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. J. Food Sci. **1994**; 59: 660-686.

CHANG, PK; BHATNAGAR, D; CLEVELAND, TE. **2004**. ASPERGILLUS/Introduction. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P. (Eds.), Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, USA, pp. 62-66.

CHASTAIN, D; MODY, N; MAJETICH, G. **1999**. Method of preparing perillyl alcohol and perillyl acetate. US5994598.

CHATTERJEE, T; BHATTACHARYYA, DK. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **2001**; 55: 541-546.

CHEN W; VILJOEN, AM. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. South African Journal Botanic. **2010**; 76: 643-651.

CHIBIRYAEV, AM; YERMAKOVA, A; KOZHEVNIKOV, IV. Chemical and phase equilibria calculation of α -pinene hydration in CO₂-expanded liquid. J. Superc. Fluids. **2010**; 51: 295-305.

CHUNG, BH; LEE, HY; SEOK, J; YOUNG, CYF. Perillyl alcohol inhibits the expression and function of the androgen receptor in human prostate cancer cells. Cancer Lett. **2006**; 236: 222-228.

CIRINO, PC; ARNOLD, FH. Protein engineering of oxygenases for biocatalysis. Curr. Opin. Biotechnol. **2002**; 6: 130-135.

COLLINS, C; LYNE, P; GRANCE, J. Microbiological Methods. Great Britain: Butterwoth-Heinemann. **1995**. 472p.

COLJA, L; SJEF, B; KEES, B; CEES, V. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol & Bioengineering. 1986; XXX: 81-87.

CORLEY J. **2003**. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. In: Lee PW., Aizawa H., Barefoot AC. (Eds.), Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals, vol 1. Jhon Wiley & Sons, England.

CORTÉS, R; SANABRIA, F. Efecto SMSI en diferentes soportes: hidrogenación de citronelal en sistemas Ir/SiO₂ e Ir/TiO₂. 2008.

CROWELL, P. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. J Nutr. **1999**; 129: 775S-778S.

DAMASCENO, S; CEREDA, MP; PASTORE, GM. Desenvolvimento de Geotrichum fragrans em manipueira. Energia na Agricultura. **1999**; 14: 7-14.

DANIELS, L; HANSON, R; PHYLLIPS, JA. Chemical analysis. In: Gerhardt, P.; Murray, RGE.; Wood, W.A.; Krieg, N.R (Ed.) Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington DC. **1994**. 127: 518-519.

DANTIGNY, P; NANGUY, SPM. Significance of the physiological state of fungal spores. Int. J. f Food Microbiol. **2009**;

DA SILVA, JG; et al.. Rhodium Catalyzed hydroformylation of Linalool. Appl. Catal. A: Gen. **2006**; 309: 169-176.

DE BONT, JA. Solvent tolerant bacteria in biocatalysis. Tr. Biotechnol, **1998**; 16: 493-499

DEMAIN, AL. Regulation of secondary metabolism in fungi. Pure Appl. Chem. **1986**; 58: 219-226

DE VRIES, EJ; Janssen, DB. Biocatalytic conversion of epoxides. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**; 14: 414-420.

DE CARVALHO, CCR. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. *Biotechnol. Adv.* **2011**; 29: 75-83.

DE CARVALHO, CCR; DA FONSECA, MMR. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.* **2006**; 24: 134-142.

DE CARVALHO, CCR; DA FONSECA, MMR. Carvone; Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chem.* **2005**. Art. In press.

DE CARVALHO, CCR; DA FONSECA, MMR. Towards the bio-production of trans-carveol and carvone from limonene: induction after cell growth on limonene and toluene. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2003**; 14: 3925-3931.

DE CARVALHO, CCR; DA FONSECA, MMR. Influence reactor configuration on the production of carvone from carveol by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* DCL14. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2002**; 19: 377-387.

DE CARVALHO, PB; FERREIRA, EI. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia.* **2001**. 72: 599 - 618.

DEMYTTENAERE, JCR; VANOVERSCHELDE, J; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)- citronellol by *Aspergillus* sp. And *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextraction for screening. *J.Chrom. A.* **2004**; 1027: 137-146.

DEMYTTENAERE, JCR; BELLEGHEM, KV; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry*. **2001**; 57: 199-208.

DEMYTTENAERE, JCR; DE KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi. Study of the pathways involved. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2001**; 11: 265-270.

DEMYTTENAERE, JCR; ADAMS, A; VANOVERSCHELDE, J; DE KIMPE, N. Biotransformation of (S)-(+)-linalool by *Aspergillus niger*. An investigation of the culture conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2001**; 49: 5895-5901.

DEMYTTENAERE, JCR; DE KIMPE, N; HERRERA, MC. Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surfaces cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. *Phytochemistry*. **2000**; 55: 363-373.

DEMYTTENAERE, JCR; DE POOTER, HL. Biotransformation of citral and nerol by spores of *Penicillium digitatum*. *Flav. Frag. J.* **1998**; 13: 173-176.

DEMYTTENAERE, JCR; DE POOTER, H.L. Biotransformation of geraniol and nerol by spores of *Penicillium italicum*. *Phytochemistry*. **1996**; 41: 1079-1082.

DEMYTTENAERE, JCR; WILLEMEN, HM. Biotransformation of linalool to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry*. **1998**; 47: 1029-1036.

DENISOV, IG; SLIGAR, SG; MAKRIS, TM. Thirty years of microbial P450 monooxygenase research: Peroxo-heme intermediates—The central bus station in heme oxygenase catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2005**. 338: 346-354.

DE OLIVEIRA, BH; STRAPASSON, RA. Biotransformation of the monoterpene, limonene, by *Fusarium verticilloides*. *Braz. Arch. Biol. Biotechnol.* **2000**; 43.

DHERE, SG; DHAVALIKAR, RS. Microbial transformation of terpenoids:limonene. *Sci.Cult.* **1970**. 7: 292

DIVYASHREE, MS; GEORGE, J; AGRAWAL, R. Biotransformation of terpenic substrates by resting cells of *Aspergillus niger* and *Pseudomonas putida* isolates. *J. Food Sci. Tech.* **2006**; 43(1): 73-76.

DOBLE, M; KRUTHIVENTI, AK; GAIKAR, VG. Biotransformations and Bioprocesses. **2004**; CRC Press, New York, USA, 406.

DROBY S, EICK A, MACARISIN D, et al.. Role of citrus in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Postharvest Biology and Technology.* **2008**; 49: 386-396.

DUBEY, VS; BHALLA, R; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J. Biosciences.* **2003**; 28: 637–646.

DUETZ, WA; BOUWMEESTER, H; VAN BEILEN JB, WITHOLT B. Using proteins in their natural environment: potencial and limitations of microbial whole cell hydroxylations in applied biocatálisis. *Curr. Opin. Botechnol.* **2003**. 12:419-425.

DUETZ WA, BOUWMEESTER H, VAN BEILEN JB, WITHOLT B. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeast, and plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**; 61: 269-277

DUETZ, WA; WITHOLT, B; JOURDAT, C. **2003**. Process for the preparation of perillyl alcohol. EP1364039.

EDRIS, AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Res.* **2007**; 21: 308–323.

ENG, F; GUTIÉRREZ, M; FAVELA, E. A survey of temperature and pH effect on colonial growth of *Botryodiplodia theobromae* RC1. *Rev Iberoam Micol.* **2003**; 20 : 172-175.

ESCOBAR, P; LEAL, SM; HERRERA, LV; MARTÍNEZ, JR; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; **2010**; 105(2): 184-190.

FAROOQ, A; et al.. Biotransformation of (-)- α -Pinene by *Botrytis cinerea*. *Z Naturforsch.* **2002**; 57: 686-690.

FISCHER, K; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Tr. Food Sci. Tech.* **2008**; 19: 156-164.

FLEISCHER, J; BAUER, K; HOPP, R. **1976**. Separating optically pure isomers of menthol, neomenthol and isomenthol. US3943181.

FLITSCH, S.L.; et al.. Biohydroxylation reactions catalyzed by enzymes and whole cell systems. *Bioorg. Chem.* **1999**; 27: 81-90.

FRÁTER, G; BAJGROWICZ, JA; KRAFT, P. Fragrance chemistry. *Tetrahedron*, **1998**; 54, 7633-7703.

GALLEGO, FE; VASQUEZ, GE; PALACIO, LA; CUBILLOS, JA. **2007**. Síntesis y utilización de molibdato de níquel en la oxidación de limoneno y α -pineno. Tesis de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

GARCIA A; LINAN, E; MARTINEZ, A; RIVAS, F; MESA-VALLE, C. CASTILLA-CALVENTE, JJ; OSUNA, A. In vitro action of ent-manoyl oxydes against Leishmania donovani. J. Nat. Prod. **1997**; 60: 13–16.

GARCÍA F; GOMÉZ E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial process: An overview. Biotechnol. Adv. **2009**; 27: 153-176.

GATFIELD, IL; HILMER, J-M; BORNSCHEUER, U; SCHMIDT, R. **2002**. Method for preparing D- or L- menthol. EP1223223.

GATFIELD, IL; SCHILMO, JM; BONSHEYEL, U. **2002**. Method for preparing L-menthol. CN1364910

GALLEZOT, P. Catalytic routes from renewables to fine chemicals. Catalysis Today. **2007**, 121: 76-91.

GAVRILESCU, M; CHISTI, Y. Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. Biotechnol. Adv. **2005**; 23: 471-499.

GERHÄUSER, C; ELKE HEISS, KK; NEUMANN, I. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. **2003**. 523: 163-172.

GIBSON, AM; HOCKING, AD. Advances in the predicitive modeling of fungal growth: the effect of water activity on Aspergillus flavus and related species. Int. J. Food Microbiol. **1997**; 23: 419-413

GILBER, JC; MARTIN, SF. Experimental Organic Chemistry: a miniscale and microscale approach. California: Belmont. 4a ed. **2006**. ISBN 0-632-04819-0

GIRI, A; VIKAS CC; GIRIB, AS; OWEN, P; WARDC, M. Lakshmi Narasua et al.. Biotransformation using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnol. Adv.* **2001**; 19: 175-199.

GÓMEZ, S; CASTRILLÓN, JA; PALMA, A; LEAL, SM; ESCOBAR, P; BAHASAS, A. Synthesis, structural elucidation and in vitro antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites of novel tetrahydro-1-benzazepine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**; 18: 4721-4739.

GRAYSON, D.H. Monoterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2000**; 17: 385-419.

GRAVEL, D; BORDELEAU, J. Photochemical Rearrangement of 2-Phenylthio-1,3-cyclohexanediols to Deoxysugars. Application to a Stereospecific Synthesis of (+)-cis-Rose Oxide. *Tetrahedron Lett.* **1998**; 39: 8035-8038.

GRIFFIN, S; WYLLIE, SG; MARKHAM, J. Determination of octanol–water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A.* **1999**; 864: 221-228.

GUENTER M. The flavour and fragrance industry-past, present, and future. In Berge RC (ed) *Flavours and fragrances chemistry, bioprocessing and sustainability.* **2007**. Springer, Berlin, 1-14.

GUPTA, A; MYRDAL, PB. Development of perillyl alcohol topical cream formulation. *Int. J. Pharm.* **2004**; 269: 373-383.

HALLAHAN, DL; WEST, JM; WALLSGROVE, RM. Purification and characterization of an Acyclic Monoterpene Primary Alcohol: NADP+ Oxidoreductase from Catmint (*Nepeta racemosa*). *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**; 1 (318): 105-111.

HAMADA, H; et al.. Biotransformation of geraniol, nerol and (+)-and (-)-carvone by suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*. **1997**; 44(4): 615-621.

HAMADA, H; et al.. Stereoselective Biotransformation of limonene and limonene oxide by Cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942. *J. Biosci. Bioengin.* **2003**; 96 (6): 581-584.

HANSON, JR. An introduction to Biotransformation in Organic Chemistry, **1998**, Oxford University, Press, New York, USA, 100

HARTMANS, S; VAN DER WERF, M; WOLKERING, F; BONT, JA. Metabolism of styrene oxid and 2-phenylethanol in the styrene-degrading *Xanthobacter* strain 124X. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**; 55: 2850-2855.

HATA, E; IKEDA, S. P-873 ND3 operation for lung cancer. *Lung Cancer*. **2005**; 49: S349

HEIPIEPER, HJ; WEBER, FJ; SIKKEMA, J; KEWELOH, H; DE BONT, JAM. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *TIBTECH*. 1994; 12: 409-415.

HLAVICA, P; SCHULZE, J; LEWIS, DFV. Functional interaction of cytochrome P450 with its redox partners: a critical assessment and update of the topology of predicted contact regions. *J. Inorg. Biochem.* **2003**; 96: 279-297

HAYAISHI, O. Oxygenases. In: Lennarz, W.J., Lane, M.D. (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Academic Press, Amsterdam. **2004**; 3: 178-182.

HELD, M; SCHMID, A; VAN BEILEN, JB; WITHOLT, B. Biocatalysis. Biological Systems for the production of chemicals. Pure Appl. Chem. **2000**; 72 (7):1337-1343.

HEIPIEPER, HJ; WEBER, FJ; HERIBERT, K; DE BONT, JAM. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. Tr. Biotechnol. **1994**; 409-415.

HIRVI, T; HONKANEN, E. The Aroma of Blueberries. J. Sci. Food Agric. **1983**; 34: 992-998.

HODEK, P; KRIZKOVA, J; BURDOVA, K; SULC, M; KIZEK, R; HUDECEK, J; STIBOROVA, M. Chemopreventive compounds- View from the other side. Chemico-Biological Interactions. **2009**; 180: 1-9.

HOLLAND, HL; WEBER, HK. Enzymatic hydroxylation reactions. Curr. Opin. Biotechnol. **2000**; 11: 547-553.

HOLLAND, HL; AUET, BJ. The mechanism of the microbial hydroxylation of steroids. Part 2. Hydroxylation of a Δ^4 -3-ketosteroid analog by *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145. Can. J. Chem. 1985, 53: 2041-2044.

HOLLAND, HL; RIEMLAND, E. Microbial hydroxylation of steroids. 10. Rearrangement during epoxidation and hydroxylation, and the stepwise nature of these enzymatic reactions. Can. J. Chem. 1985; 63: 1121-1126.

HOUJIN, L; LAN, W. Biotransformation of Limonene by Marine Bacteria. Chin. J. Anal. Chem. **2006**; 34: 946-950.

Hydroxycitronellol. Fragrance raw materials monographs. Food Cosmetics Toxicol. **1974**; 12 (7): 923.

ISHIGE, T; HONDA, K; SHIMIZU, S. Whole organism biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**; 9: 174-180

JARAMILLO, MC; ARANGO, GJ; GONZÁLEZ, MC; ROBLEDO, SM; VELEZ, ID. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia.* **2000**; 71: 183–186

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

JIROVETZ, L; et al.. Solid phase microextraction/gas chromatographic and olfactory analysis of the scent and fixative properties of the essential oil of *Rosa damascena* from China. *Flavour Fragr J.* **2005**; 20:7–12.

JOICHI, A., et al.. Volatile components of tea-scented modern roses and ancient Chinese roses. *Flav. Frag. J.* **2005**; 20: 152–157.

JOURDAT, C; DUETZ, WA; WITHOLT, B. **2002**. Process for the preparation of perillyl alcohol. AU2002232294.

JUN, M; JEONG, WS. Health promoting properties of natural flavours substances. *Food Sci Biotechnol.* **2006**; 15: 329-335

KAMINSKA, J; MARKOWICZ, L; STOŁOWSKA, J; GÓRA, J. Biotransformation of citronellol by means of horseradish peroxidase. *Enz. Microbiol. Tech.* **1989**; 11: 436-438.

KIESLICH, K; ABRAHAM, WR; STUMP, B; THEDE, B; WASHAUSEN, P. Transformations of terpenoids. In Progress in Essential Oil Research, ed E.J. Brunke. Walter de Gruyter and Co., Berlin **1986**. 367-394.

KINAY, P; MANSOUR, MF; MLIKOTA, F. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California.

KING, A; DICKINSON, JR. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. **2000**; 16: 499-506.

KIRTON, SB; BAXTER, CA; SUTCLIFFE, MJ. Comparative modelling of cytochromes P450. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**; 54: 385-406

KNAPP, H., et al.. (S)-3,7-dimethyl-1,5-octene-1,7-diol and Related Oxygenated Monoterpenoides From Petals of *Rosa damascena* Mill. *J. Agric. Food Chem.* **1998**; 46: 14966-1970.

KRAIDMAN, G; MUKHERJEE, BB; HILL, ID. Conversion of D-limonene into an optically active isomer of α -terpienol by a *Cladosporium* species. *Bacteriol. Proceedings*. **1969**. 63.

KOVATS, E. Composition of Essential Oils. Part 7. Bulgarian Oil of Rose (*Rosa Damascena* Mill.). *J. Chrom. A.* **1987**; 406: 185-222.

KUIATE, JR; BESSIÈRE, JM; ZOLLO, PHA. Composition of the essential oils from three *Laggera* Spp from Cameroon. *Flav. Frag. J.* **2002**; 17: 105-108.

KUMAR, KV; UMAR, M; SINGH, AP; BRIJ, L; RAJ, NH; VIRENDRA, S. **2003**. Patent number: WO03080777, Publication date: 2003-10-02, Application number: WO2002IB01205 20020325.

LAI, L; CHOUS, S; CHAO, W. Studies of the antioxidative activities of hsian-tsao (*Mesona procumbens* hemsl) leaf gum. *J. Agric. Food Chem.* **2001**; 49: 963-968.

LAPCZYNSKI, A; BATHIA, SP; LETIZIIA, CS; API, AM. Fragrance material review on dl-citronellol. *Food Chem. Toxicol.* **2008**; 46: S103-109.

LAPCZYNSKI, A; BATHIA, SP; LETIZIIA, CS; API, AM. Fragrance material review on hydroxycitronellol. *Food Chem. Toxicol.* **2008**; 46: S179-181.

LARKIN, J.M.; KULAKOV, L.A.; ALLEN, C.C.R. Biodegradation and *Rhodococcus*-masters of catabolic versatility. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**; 16:282-290.

LEAL, SM; PALMA, A; CUBEROS, E; GALEANO, N; ESCOBAR, P. Actividad antiparasitaria de nuevas dihidrodibenzo[c,f]tiazolo[3,2-a]azepin-3(2H)-onas contra *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi*. *Salud UIS.* **2009**; 41(3): 268-274.

LEONEL, M; CEREDA, MP. Citric acid production by *Aspergillus niger* from "Manipueira", a manioc liquid residue. *Scientia Agricola.* **1995**; 52: 299-304.

LETIZIA, C.S ; et al.. Fragrance material review on Linalool. *Food Chem. Toxicol.* **2003**; 41: 943-964.

LI, Z; et al. Oxidative Biotransformations Using Oxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**; 6: 136-144.

LIESE, A; FILHO, M.V. Production of fine chemicals using biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**; 10: 595-603.

LIU, G; OETTEL, K; BAILEY, H; VAN UMMERSEN, L; TUTSCH, K. Phase II trial of perillyl alcohol (NSC 641066) administered daily in patients with metastatic androgen independent prostate cancer. *Inv. New Drugs*. **2003**; 21: 367-372.

LIMBERGER, R.P. Chemical composition of essential oil from Myrciinae (Myrtaceae) and terpenoids biotransformation. *Caderno de Farmácia*. **2001**; 118: 34-35.

LINDMARK, M; ISAKSSON, E. Transformation of terpene using a *Picea abies* suspension culture. *J. Biotechnol.* **2004**; 107: 173-184.

LOZANO, SJ. Evaluación de la biotransformación de citronelol utilizando como biocatalizador *aspergillus niger*. Universidad Industrial de Santander. **2007**. Trabajo de Grado en Química.

LOYOLA, V. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad Química de México*. **2004**; 48: 67-94.

MADHAVA, K; KRISHNA, NSR. Transformations of acetates of citronellol, geraniol, and linalool by *Aspergillus niger*: regiospecific hydroxylation of citronellol by a cell-free system. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **1988**; 28: 324-329.

MAIER, NM; FRANCO, P; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J. Chrom. A*. **2001**; 906: 3-33.

MAKI, P; HOLMBON, B; SALMI, T; MURZIN, D. Recent Progress in Synthesis of Fine and Specialty Chemicals from Wood and Other Biomass by Heterogeneous Catalytic Processes. *Catalysis Rev.* **2007** ; 49 : 197-340.

MANN, J; DAVIDSON, JR; HOBBS, JB. Natural Products, Addison Wesley Longman Ltd., Harlow, UK, **1994**. pp308-309. ISBN 0582060095

MARTINS, R; KAWAI, S; CHACÓN, D. Estudio de la biotransformación del D-limoneno por fermentación en fase líquida. **2007**.

MASAPHY, DL; VENKATESWARLU, LK; STEVEN, K. Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo(a) pyrene hydroxylation in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Lett. **1996**; 135: 51-55.

MARÓSTICA, MR; ROCHA, TAA; FRANCHI, GC; NOWILL, A; PASTORE, GM; HYSLOP, S. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. Food Chem. **2009**; 116: 8-12.

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

MARÓSTICA, MR; PASTORE, GM. Biotransformation of citronellol in rose-oxide using cassava wastewater as medium. Cienc. Tecnol. Aliment. **2006**; 26 (3): 690-696.

MATURA, M. Oxidized citrus oil (R-) limonene): a frequent skin sensitizer in Europe. J. Am. Acad. Dermatol. **2002**; 47(5): 709-714.

MCCONATHY, J; OWENS, MJ. Stereochemistry in Drug Action. J. Clin. Psychiatry. **2003**, 5: 70-73.

MELO, LLMM; PASTORE, GM; MACEDO, GA. Optimized Synthesis of Citronellyl Flavour Esters Using Free And Immobilized Lipase From *Rhizopus* sp. *Process Biochem.* **2005**; 40: 3181-3185

MENÉNDEZ, P; GARCÍA, C; RODRÍGUEZ, P. Enzymatic system involved in D-limonene biooxidation. *Braz. Arch. Biol. Tech.* **2002**; 45 (2): 111-114.

MELETIADIS, J; MEIS, JFG; MOUTON, JW; VERWEIJ, M. Analysis of growth characteristics fungi in different nutrition media. *J. Clin. Microbiol.* **2001**; 2: 478-484.

MEYER, S; TIETZE, D; RAU, S; SCHAFER, B; KREISEL, G. Photosensitized oxidation of citronellol in microreactors. *J. Photochem. A: Chem.* **2007**; 186: 248-253.

MIRATA, MA; HEERD, D; SCHRADER, J. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264. *Process Biochem.* **2009**; 44: 764-761.

MIYAZAWA, M; SHINDO, M; SHIMADA, T. Metabolism of (+)- and (-)-limonenes to respective carveols and perillyl alcohols by CYP2C9 and CYP2C19 in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **2002**; 30(5): 602-607

MIYAZAWA, M; YOKOTE, K; KAMEOKA, H. Biotransformation of the monoterpenoid, rose oxide, by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry.* **1994**; 39 (1): 85-89.

MONNERIE, N; ORTNER, J. Economic evaluation of the industrial photosynthesis of rose oxide via lamp or solar operated photooxidation of citronellol. *J. Solar Energy Engin.* **2001**; 123: 171-174

MONTEIRO, J.L., AND VELOSO, C.O. Catalytic conversion of terpenes into fine chemicals. *Topics in Catal.* **2004**; 27 (1): 169-180.

MÜLLER, PM; LAMPARSKY, D. *Perfumes: Art, Science & Technology*. Amsterdam, New York: Elsevier; **1991**.

MUÑOZ, A; STASHENKO, E. Determinación de los coeficientes de partición de monoterpenos y sesquiterpenos y sus análogos oxigenados usando microextracción en fase sólida y cromatografía de gases. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, **2005**; Tesis de postgrado.

NAGAKI, M. Biotransformation of prenyl alcohols by cultured cells of *Cucurbita maxima*. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2007**; 47: 33-36.

NAKAYAMA, M; YAMAGUCHI, Y; MACHIDA, H; IWASAKI, S; KOMATSU, A; SHINODA, A. Preparation of L-menthol racemete. **1978**. JP53044691.

National Toxicology Program: NTP toxicology and carcinogenesis studies of d-limonene (CAS No. 5989-27-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *Nat. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* **1990**; 518: 1-165.

All natural. *Nature Chem. Biol.* Nature Chemical Biology Editorial. **2007**; 3: 351

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Biochemistry.* 1945; 153, 375–380.

NIÑO, JRA; ARRUDA, DC; ULIANA, RB. In vivo testing of perillyl alcohol and perillyl aldehyde in the treatment of cutaneous leishmaniasis. XXII Meeting of the SBPZ -Quimioterapia-Chemotherapy. POSTER QT15. **2005**.

NITSCHKE, M; PASTORE, G.M. Cassava Flour Wastewater as a Substrate for Biosurfactant Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2003**; 106: 295-302.

NOMA, Y; YAWASAKI, S; ASAKAWA, Y. Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*. **1992**; 8(31): 2725-2727.

ODA, S; INADA, Y; KATO, A; MATSUDOMI, N; OHTA, H. Production of (S)-citronellic acid and (R)-citronellol with an interface bioreactor. *J. Ferm. Bioeng.* **1995**; 80(6): 559-564

ODA, S; SUGAI, T; OHTA, H. Optical resolution of racemic citronellol via a double coupling system in an interface bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**; 87(4): 473-480.

OHLOFF, G. Scent and fragantes. The fascination of Odors and their Chemical Perspectives. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; **1994**.

ONKEN, J; BERGER, RG. Effets of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *J. Biotechnol.* **1999**; 69: 163-168.

ONKEN, J; BERGER, R.G. Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated-membrane bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**; 51: 158-163.

OLIVEIRA, P., ROJAS, M.L., RAMOS, A.M., AND FONSECA, I.M. Limonene oxidation over V_2O_5/TiO_2 catalyts. *Catalysis Today.* **2006**; 118: 307-314.

OREJARENA, S.M. Biotransformación de terpenos halogenados por medio de los hongos marinos *Penicillium brevicompactum* y *Geotriehum* sp. Universidad Industrial de Santander. **2007**. Trabajo de Grado.

ORTIZ, PR. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, 3e, Ortiz de Montellano Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, **2005**. Cap. 1 y 6

PALMA, A; YEPES AF; LEAL, SM; CORONADO, CA; ESCOBAR, P. Synthesis and in vitro activity of new tetrahydronaphtho[1,2-b]azepine derivatives against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**; 19: 2360–2363.

PANDEY, DK; TRIPATHI, NN; TRIPATHI, RD. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *H. suaveolens*. *Zeit. Pflanzenern. Pflanzensch.* **1982**; 89: 344-349

PATZ, JA; GRACZYK, TK; GELLER, N; VITTOR, AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int. J. Parasitol.* **2000**; 30: 1395–1405

Patente U.S. 4482765. Preparation of Hydroxycitronellol.

PEFFLEY, DM; SHARMA, C; HENTOSH, P; BUECHLER, RD. Perillyl alcohol and genistein differentially regulate PKB/Akt and 4E-BP1 phosphorylation as well as eIF4E/eIF4G interactions in human tumor cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**; 465: 266-273.

PEÑA, R; SANABRIA, LF; BORDA GC; ROJAS, HA. Hidrogenación de citronelal en sistemas Ir/SiO₂ e Ir/TiO₂. Estudio del efecto SMSI. *Ciencia En Desarrollo.* **2006**; 2(2): 7-16.

PESCHECK, M; MIRATA, MA; BRAUER, B. Improved monoterpene biotransformation with *Penicillium* sp. by use of a closed gas loop bioreactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**; 36: 827-836.

PIANTINI, U; SCHRADER J; WAWRZUN, A; WÜST. A biocatalytic route towards rose oxide using chloroperoxidase. *Food Chem.* **2011**; 129: 1025–1029.

PINHEIRO, L; MARSAIOLI, AJ. Microbial monooxygenase applied to fragrance compounds. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2007**; 44: 78-86.

PIRT, SJ. Principles of microbes and cell cultivation. London Blackwell Scientific Publications Ltda, Oxford. 1975.

POHANISH, RP. Dipentene. In, Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens, Fourth Ed., Vol. 1. Norwich, NY: Noyes Publications, William Publishing, **2002**, 970-972.

POLLARD, DJ; WOODLEY, JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Tr. Biotechnol.* **2006**; **2**:25

PRASHANT, MB; KUNDU, S; WANGIKAR, PP. An optimized method for *Aspergillus niger* spore production on natural carrier substrates. *Biotechnol. Prog.* **2003**; 19: 1683-1688.

RAFELT, JS; CLARK, JH. Recent advances in the partial oxidation of organic molecules using heterogeneous catalysis. *Catalysis Today.* **2000**; 57:33-44.

RAJESWARA, BR; RAO, PN; KAUL, KV; SYAMASUNDAR, SR. Water soluble fractions of rose-scented geranium (*Pelargonium sntspecies*) essential oil. *Bioresource Technology.* **2002**; 84: 243-246

RAVASIO, N; ZACCHERIA, F; GUIDOTTI, M; PSARO, R. Mono and bifunctional heterogeneous catalytic transformation of terpenes and terpenoids. *Topics in Catal.*, **2004**, 27: 1-4.

ROBERTSON, DE; STEER, BA. Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**; 8: 141-149

ROJAS, HR; FONSECA, L; ORTIZ, CM; RÁMIREZ, IN. Efecto del método de preparación de catalizadores de Ir soportado en SiO₂ dopados con TiO₂, reducidos a alta temperatura (HT), para la hidrogenación de citral. *Ciencia En Desarrollo.* **2006**; 2(2): 81-91.

RE, R; PELLEGRINI, N; PROTEGENTE, A; PANNATA, A; YANG, M; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying and improved radical cation decoloration assay. *In: Free Rad. Bio Med.* **1999**; 26: 1231-1237.

ROBERTSON, DE; STEER, BA. Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**; 8: 141-149.

ROCHA, LG; ALMEIDA, JRGS; MACE[^]DO, RO; BARBOSA-FILHO, JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine.* **2005**; 12: 514–535

ROSE OXIDE LEVO. *Fragrance raw materials monographs. Food Cosm. Toxicol.* **1976**; 14 (1): 855.

ROZZELL, JD. Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**; 7: 2253-2261.

ROZENBAUM, HF; PATITUCCI, ML; ANTUNES, AC; PEREIRA, N. Production of aromas and fragrances through microbial oxidations of monoterpenes. *Braz. J. Chem. Engin.* **2006**; 23(3): 273-279.

SAEZ, J; GRANADOS, H; TORRES, B; VELEZ, ID; MUNOZ, D. Leishmanicidal activity of *Annona aff. spraguei* seeds. *Fitoterapia.* **1998**; 69: 478–479.

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

SANDRI, IG; ZACARIA, JF; FRACARO, APL; DELAMARE, S; ECHEVERRI G. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chem.* **2007**; 103: 821-828.

SAVITHIRY, N. Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR425. *Biodegradation.* **1998**; 9: 337-341.

SAVITHIRY, N; CHEONG, TK; ORIEL, P. Production of alpha-terpineol from *Escherichia coli* cells expressing thermostable limonene hydratase. *ABAB* 63-65 (1): 213-220.

SAVITHIRY N, CHEONG TK, ORIEL P. Production of α -terpineol from *Escherichia coli* cells expressing thermostable limonene hydratase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1997**; 63 (5): 213-220.

SCHAFFER, S; SCHARADER, J; SELL, D. Oxygen uptake rate measurements the activity of terpene transforming fungi. *Process Biochem.* **2004**; 39: 2221-2228.

SCHELZ, Z; MOLNAR, J; HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia.* **2006**; 77(4): 279-285.

SCHEWE, H; MIRATA, MA; HOLTMANN, D; SCHRADER, J. Biooxidation of monoterpenes with bacterial monooxygenases. *Process Biochem.* 2011.

SCHRADER, J; ETSCHMANN, MMW. Applied biocatalysis for the biosynthesis of natural flavor compounds-current industrial processes and future prospects. *Biotechnol. Lett.* **2004**; 26: 461-472.

SCHRADER, J; BERGER, RG. Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (2nd Ed), *Biotechnology*. Weinheim: Wiley-VHC. **2001**. 373-422p.

SCHULZE, B; WUBBOLTS, MG. Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**; 10: 609-615.

SCOTT, EB. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Med. Mycology.* **2006**; 44: 17-21.

SCURIG, V; MAYER, S. Separation of enantiomers by open capillary electrochromatography on polysiloxane-bonded permethyl- β -cyclodextrin. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2001**; 48: 117-141

SELL, C. A fragrant introduction to terpenoid chemistry. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. **2003**; 410 p.

SERRA, S; FUGANTI, C; BRENNNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Tr. Biotechnol.* **2005**; 23(4): 193-198.

SERRA, AT; SEABRA, IJ; BRAGA, MEM; BRONZE, MR; DE SOUSA, HC; DUARTE, CMM. Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. *J. Supercritical Fluids.* **2010**; 55: 184-191.

SHAIK, S; DE VISSER, SP; OGLIARO, F; SCHWARZ, H. Two-state reactivity mechanisms of hydroxylation and epoxidation by cytochrome P-450 revealed by theory. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**; 6: 556-567.

SKOURIDOU, V; CHYSINA, ED; STAMATIS, H. Kinetic and modeling studies on the lipase catalysed enantioselective esterification of (\pm) perillyl. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2004**; 29: 9-12.

SLIGAR, SG; MAKRIS, T; DENISOV, I. Thirty years of microbial P450 monooxygenase research: Peroxo-heme intermediates—The central bus station in heme oxygenase catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2005**; 338: 346-354

STASHENKO, EE; COMBARÍSA, Y; PUERTAS, MA. Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. Ediciones UIS. **1998**, 1.

STEINER, D. A facile and efficient method for the kinetic separation of commercially available cis and trans limonene epoxide. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2002**; 13: 2359-2363.

SOMOGY, M.A. A new reagent for determination of sugar. *J. Biological Chem.* **1944**; 160: 61–68.

STRAATH, OF; AJJ; PANKE, S; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**; 13: 548-556.

STUMPF, B; ABRAHAM, WR; KIESLICH, K. **1984**. Process for the preparation of (+)- α -terpineol by microbiological conversion of limonene. DE3243090.

SWART, M; GROENHOF, AR. Substrate binding in the active site of cytochrome P450 cam. Chem. Physics Lett. **2005**; 403: 35-40

TAHIR, AE; IBRAHIM, AM; SATTI, GMH; THEANDER, TG; KHARAZMI, A; KHSLID, AS. The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. Phytother. Res. **1998**; 12: 576–579.

TAN, Q; DAY DF; CADWALLAER, KR. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). Process Biochem. **1998**; 33: 29-37.

TAN, Q; DAY, DF. Bioconversion of limonene to α -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **1998**; 49:96-101.

TAN, Q; DAY, DF. Organic co-solvent effects on the bioconversion of (R)-(+)-limonene to (R)-(+)- α -terpineol. Process Biochem. **1998**; 33: 755-761.

TANAKA, S; YAMAMOTO, J; ETSUNO, J. **1997**. Production of alpha-terpineol. JP9278693.

TANEJA, SC; SETHI, VK; ANDOTRA, SS; KOUL, S; QAZI, G.N. Rose oxides: a facile Chemo and Chemo-enzymatic Approach. Synthetic Comm. **2005**; 35: 2297-2303.

TANGESTANINEJAD, S; HABIBI, MH; MIRKHANI, V. Readily prepared polymer-supported molybdenum carbonyls as novel reusable and highly active epoxidation catalysts. Inorg. Chem. Comm. **2006**; 9: 575-578.

THOMAS, SM; DI COSIMO, R; NAGARAJAN, V. Biocatalysis: Applications and potentials for the chemical industry. Tr. Biotechnol. **2002**; 20 (6): 238-242.

TOMATANI, EJ; VITOLO, M. Production and high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. *J. Food Engin.* **2007**; 80: 662-667.

TONIAZZO, G. Biotransformation of (-)- β -pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**; 121: 837-844.

TORRENEGRA, RD; BAQUERO, JD. Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de *Penicillium* spg 28, aislada de páramo de Guasca, departamento de Cundinamarca. Santa Fé de Bogotá.

TRINCI, APJ. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and the other fungi. *J Gen Microbiol.* **1969**; 57, 11-24.

TRYTEK, M; FIEDUREK, J. A novel psychrotrophic fungus, *Mortierella minutissima*, for D-limonene biotransformation. *Biotechnol. Lett.* **2005**; 27: 149-153

URLACHER, VB; SCHMID, RD. Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformations. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**; 10: 1-6.

VALADEZ, R; CASTELO F, FERREIRA JR; GUY A. A membrane bioreactor for biotransformations of hydrophobic molecules using organic solvent nanofiltration (OSN) membranes. *J. Memb. Sci.* **2008**; 317: 50-64.

VAN BEILEN, JB; HOLTACKERS, R; LÜSCHER, D. Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium* sp. Cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*. *Appl. Envirom. Microbiol.* **2005**; 1737-1744.

VAN BEILEN, JB; DUETZ, WA; SCHMID, A. Practical issues in the application of oxygenases. *Tr. Biotechnol.* **2003**; 4(21): 170-177.

VAN BEILEN, JB; HOLTACKERS, R; LÜSCHER, D. Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel Mycobacterium sp. Cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in Pseudomonas putida. Appl. Environ. Microbiol. **2005**; 1737-1744.

VAN DER GEIZE, R; DIJKHUIZEN, L. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. Curr. Opin. Microbiol. **2004**; 7: 255-261.

VAN DER WERF, M; BONT, JAM; LEAK, D.J. Opportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes. Adv. Biochem. Engin. **1997**; 55: 147-177.

VAN DER WERF, M; OVERKAMP, K.M.; DE BONT, J.A.M. Limonene-1,2-epoxide hydrolase from Rhodococcus erythropolis DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases. J. Bacteriol. **1998**; 180(19): 5052-5057.

VAN DER WERF, M; SWARTS, H.J.; DE BONT, J.A.M. Rhodococcus erythropolis DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. Appl. Env. Microbiol. **1999**; 2092-2102.

VAN DER WERF, M; KEIJZER P, SDHAFT P. Xanthobacter sp. C20 contains novel bioconversion pathway for limonene. J. Biotechnol. **2000**; 84: 133-143.

VAN DYK, MS; VAN RENSBURG, E; MOLELEKI, N. Hydroxylation of (+)-limonene, (+)- α -pinene and (-)- β -pinene by a Hormonema sp., Biotechnol. Lett. **1998**; 20: 431-436.

VANEK, T; VALTEROVÁ, I; VAISART, T. Biotransformation of S(-) and R(+) limonene using Solanum aviculare and Dioscorea deltoidea plant cells. Phytochemistry. **1999**; 50: 1347-1351

VELASCO, R; GIL, JH; GARCÍA CM; DURANGO, DL. Production of 2-phenylethanol in the biotransformation of cinnamyl alcohol by the plant pathogenic fungus *colletotrichum acutatum*. *Vitae*, **2010**; 17(3): 272-280.

VELASCO, R; ARISTIZABAL, DA; GARCÍA, CM; GIL, JH; DURANGO, DL. Biotransformation of trans-Cinnamaldehyde by the filamentous fungus *Aspergillus* sp. *Vitae*. **2010**; 17 (3): 1-16.

VILLA, AL; FARLÁN, A; MONTES, C. Kinetics of limonene epoxidation by hydrogen peroxide on PW-Amberlite. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2002**; 185, 269-277.

WANG, X; LIU, Y-S; NAIR, UB; ARMSTRONG, DW; ELLIS, B. Enantiomeric composition of monoterpenes in conifer resins. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1997**; 8: 3977-3984.

WALSH, UF; MORRISSEY, JP; O'GARA, F. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopatogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**; 12: 289-295.

WENIGER, B; ROBLEDO, S; ARANGO, GJ; DEHARO, E; ARAGON, R; MUNOZ, V; CALLAPA, et al.. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J. Ethnopharmacol.* **2001**; 78: 193–200.

WERCK, R; HEHN, DA; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Tr. Plant Sci.* **2000**; 5: 116-123.

WOUT, AM; TRAMPER, J; VAN DER WERF, MJ. Toxicity of terpenes to spore and mycelium of *Penicillium digitatum*. *Biotechnol. Bioengin.* **2002**; 80 (6): 685-690.

WOUT, AM; TRAMPER, J; VAN DER WERF, MJ. What can spores do for us?. Tr. Biotechnol. **2003**; 21 (8): 338-344.

WUST, M; THOMAS, B; MOSANDL, A. Biogenesis of geranium oil compounds: On the origin of oxygen in cis/trans -rose oxide. J. Agric. Food. Chem. **1998**; 46: 3225-3229.

WÜST, M; BECK, T; MOSANDL, A. Mechanistic Conversion of Citronellyl Diphosphate and citronellyl β -D-glucoside into Rose Oxide by *Pelargonium graveolens*. J. Agric. Food Chem. **1999**; 47: 1668-1672.

WÜST, M; DAWN, B; LITTLE, MS; CROTEAU, R. Hydroxylation of Limonene Enantiomers and Analogs by Recombinant (-)-Limonene 3- and 6-Hydroxylases from Mint (*Mentha*) Species: Evidence for Catalysis within Sterically Constrained Active Sites. Arch. Biochem. Biophysics. **2001**; 387: 125-136.

WÜST, M; REXROTH, T; MOSANDL, A. Mechanistic Aspects of the Biogenesis of Rose Oxide in *Pelargonium graveolens* L'Heritier. Chirality. **1998**; 10: 229-237.

XU, M; FLOYD, HS. Perillyl alcohol-mediated inhibition of luna cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotheapeutic effects. Toxicol. Appl. Pharmacology. **2004**; 195: 232-246.

YADAV, G; LATHI, PS. Synthesis Of Citronellol Laurate In Organic Media Catalyzed By Immobilized Lipases: Kinetic Studies. J. Mol. Catal. B: Enz. **2004**; 27: 113-119.

YADAV, S; SRIVASTAVA, AK. Synthesis of Functional and Alternating Copolymer of α -Terpineol with Butylmethacrylate. Polym. -Plast. Technol. Eng. **2004**; 43: 1229-1243.

YAMAMOTO, T; Matsuda, H; Utsumi, Y. Synthesis and odor of optically active rose oxide. *Tetrahedron Lett.* **2002**; 43: 9077-9080

YURI, T; DANBARA, N; TSUJITA-KYUTOKU, M; KIYOSUKA, Y; SENSAKI, H. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**; 84: 251-260.

ZHANG, Y; HIDAJAT, K; RAY, AK. Optimal designs operation of SMB bioreactor: production of high fructose syrup by isomerization of glucose. *Biochem. Engin. J.* **2004**; 21: 111-121.

ZIMMER, T; KAMINSKI, K; SCHELLER, U; VOGEL, F; SCHUNCK, WH. In vivo reconstitution of highly active *Candida* maltose cytochrome P450 monooxygenase system in inducible membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA & Cell Biology.* **1995**; 14: 619-628.

ANEXOS

ANEXO 1. PROCESO DE PATENTE

El título de la invención es “Obtención de Hidroxicitronelol Por Biotransformación Con Hongos” presentado ante la entidad TM TAMAYO & ASOCIADOS, es la firma de abogados que adelanta el trámite de Protección de Derechos con el Ministerio de Comercio de Industria y Turismo, Superintendencia de Industria y Comercio. A continuación se muestra la constancia del proceso.

- CONSTANCIA -

Tm Tamayo con Nit. 830.091.650-8 hace constar que el **Universidad Industrial de Santander** con Nit. 890201213-4 domiciliado en Bucaramanga - Colombia ha comenzado su proceso de preparación de la Solicitud de Patente de Invención denominada "**Obtención De Hidroxicitronelol Por Biotransformación Con Hongos**" con esta entidad, para ser radicado y solicitar la protección de sus derechos en Colombia ante la República de Colombia, Ministerio de Comercio Industria y Turismo, Superintendencia de Industria y Comercio.

Cualquier información adicional dirigirse a e-mail: consultas@tmtamayo.net Teléfono (PBX): 3419841, Carrera 13A No. 28-38, Bufete 230, Parque Central Bavaria, Bogotá D.C; Colombia S.A. www.tmtamayo.com

Para constancia se expide en Bogotá, 17 de enero de 2011



Carlos Enrique Tamayo S.
Director



Carlos Maya Rodríguez
Abogado



COLOMBIA:

Carrera 13-A No. 28-38 Bufete 230
Tel (571) 341 9841 / Fax (571) 243 5423
Parque Central Bavaria
Bogotá D.C. / Colombia / Sur América

USA:

COL 12010 TM Tamayo
10000 NW 25 Th St Unit 1 L
33172-2204
MIAMI / FL, U.S.A.

E-mail: consultas@tmtamayo.net
ip@tmtamayo.com

Web: www.tmtamayo.com

ANEXO 2. CUANTIFICACIÓN DEL CITRONELOL

Para que la cuantificación del citronelol remanente obtenido en los ensayos de biotransformación sea confiable y reproducible fue necesario determinar los parámetros de mérito para la validación de la técnica analítica CG-EM incluyendo los procedimientos de extracción, ELL-CG-EM.

Eficiencia de extracción líquido-líquido (EE): La extracción del citronelol del medio MYB usando como solvente acetato de etilo (AcOEt), presentó una eficiencia del $82.48 \pm 4.66\%$, porcentaje relativamente alto teniendo en cuenta la solubilidad en agua de este terpenoide (0.03% p/v) (Lapczynski et al, 2008). El AcOEt es un buen solvente extractor de componentes de polaridad media a baja, de medios acuosos, empleado comúnmente en los procesos de biotransformación de terpenos. Sin embargo, aunque se reporta en los experimentos de biotransformación de citronelol el uso de solventes como diclorometano (Oda et al., 1995), la mezcla pentano-diclorometano 2:1 (Brunerie et al., 1987), dietil éter (Madhava y Krishna, 1988; Demyttenaere et al., 2000), en ningún caso se informa el porcentaje de recuperación del citronelol.

A continuación se muestran los resultados y análisis de la determinación de precisión (repetibilidad) y calibración del citronelol.

- Determinación de la precisión (repetibilidad) y calibración del citronelol Los tiempos de retención (t_R), las áreas obtenidas y el cálculo de la RSD% para las determinaciones del sustrato citronelol, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Evaluación de la precisión para el análisis del citroneol

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (mg/L)	t _R (min)	Área (Cuentas/min)	RSD%	
				t _R	Área
P1	2000	28.968	666743336	0.059	1.491
		28.998	672340160		
		28.998	686283529		
P2	3000	29.035	989357984	0.105	0.187
		29.041	992379876		
		29.091	992741189		
P3	5000	29.145	1298663559	0.043	0.282
		29.169	1300951067		
		29.163	1292985345		
P4	8000	29.492	1770545787	0.069	1.037
		29.515	1794596253		
		29.533	1807072537		

Los valores RSD para las mediciones de t_R del citroneol fueron menores al 0,10% indicando una alta precisión en la inyección de la muestra. Para las mediciones de área del citroneol, los RSD fueron inferiores al 1.5%, así la precisión es adecuada y aceptable según lo indicado por Jiménez et al., (2002) y Bliesner (2006), cuyo nivel de aceptación máximo permitido de RSD se encuentra entre 10 y 15% para un ensayo de Categoría II según los métodos USP.

Usando los datos obtenidos de área y concentración de los diferentes patrones de citroneol, se construyó la respectiva curva de calibración. La ecuación de la recta obtenida por regresión lineal y los resultados del análisis, se indican en la Tabla 2. El valor p fue menor que 0,05, lo que indica la relación estadísticamente significativa entre el área y la concentración a un nivel del 95% de confianza para

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

Tabla 2 Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del citronelol

Parámetro	Valor Estimado	Error Estándar	T estadística	Valor P
Intercepto (b)	3,87014E8	3,60743E7	10,7282	0,0000
Pendiente (m)	178157	7143,77	24,9388	0,0000
Coeficiente de correlación (R)		0,992056		
R cuadrado, por ciento		98,4176		
Valor P para la pérdida de ajuste		P=0,0010		
Error estándar del estimado (RMSE)		5,67019E7		
Suma de cuadrados del residual		3,21511E16		
Ecuación del modelo ajustado	$Y = 3,87014E8 + 178157 * X$			

Y: área del componente; X: Concentración en mg/L.


- **Cálculo del LOD y LOQ**

El LOD y LQD fueron determinados con base en el valor de RMSE obtenido de la regresión lineal (Corley, 2003). La Tabla 3 resume los resultados expresando los valores en unidades de concentración (mg/L).

Tabla 3 Valores de LOD y LQD calculados para el citronelol (en mg/L)

ANALITO	RMSE	M	LOD	LQD
Citronelol	5,67019E7	178157	954.81	3182.69

ANEXO 3. RESULTADOS CINTROP

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER		
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN EFERMEDADES TROPICALES (CINTROP)		
LABORATORIO DE QUIMIOTERAPIA		
Formato VS 3	Actividad antiparasitaria y citotóxica de compuestos	
PAGINA 1 de 2		

1. INFORMACIÓN GENERAL

Fecha:	10 de diciembre de 2010	Código:	VS 2.5
Solicitante	Entidad:	CICTA	
	Dependencia:	Universidad Industrial de Santander	
	Responsable:	Dra. Janeth Aidé Perea	
Servicio solicitado	Citotoxicidad utilizando la prueba de reducción de MTT y actividad anti-T. cruzi utilizando el conteo directo y actividad anti- Leishmania utilizando la prueba de reducción de MTT y MTT/PMS.		

2. DESCRIPCIÓN DE PRUEBAS DE LABORATORIO.

2.1 PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Los compuestos fueron pesados entre 2-3 mg y disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO). Las soluciones stock se almacenaron a -20°C. El nifurtimox, la

amfotericina B (AmB) y la miltefosina fueron utilizados como medicamentos de referencia

2.2 PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA

Los epimastigotes de *T. cruzi*, promastigotes de *L. chagasi* y *L. panamensis* fueron expuestos a diferentes concentraciones (0,1-100 µg/ml) de los compuestos durante 72 horas a 28°C. Células control permanecieron si el compuesto. La inhibición del crecimiento fue determinada en el caso de epimastigotes de *T. cruzi* por conteo directo y en promastigotes de *Leishmania* por reducción de la sal de tetrazolio MTT. Los resultados fueron expresados como concentración que inhibitoria del 50 y 90% de los parásitos (CI_{50} y CI_{90}).

2.3 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Las células VERO (derivadas de riñón de mono verde africano) fueron expuestas a diluciones seriadas 1:3 de los compuestos (0,3-300-µg/mL) por 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. Células control permanecieron si el compuesto. El ensayo fue realizado una sola vez y cada dilución fue evaluada por triplicado. Los resultados fueron expresados como concentración citotóxica para el 50 y 90% de las células (CC_{50} y CC_{90}).

3. RESULTADOS

Como se observa en la tabla, los compuesto evaluados no mostraron actividad para las formas libres de *T. cruzi* y de *L. panamensis* y *L. chagasi*. Tampoco mostraron ser tóxicos en células de mamífero.

Tabla 4 Actividad de los compuestos y de los medicamentos de referencia en epimastigotes de *T. cruzi*, promastigotes de *L. panamensis* y *L. chagasi* y en células Vero

Compuesto	µg/mL							
	Leishmania						Células Vero	
	T. cruzi		<i>L. panamensis</i>		<i>L. chagasi</i>			
CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CC ₅₀	CC ₉₀	
1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
3	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
4	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
5	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
Nerol	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
Geraniol	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
Linalool	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>300	>300
Nifurtimox	3,06 ±0,13	18,13 ±2,15	-	-	-	-	62,82 ±1,84	250,47 ±11,05
AmB	-	-	-	-	0,03 ±0,00001	0,04 ±0,0004	-	-
Miltefosine	-	-	5,94 ±0,02	25,07 ±0,26	-	-	-	-

CI: Concentración inhibitoria; CC: Concentración citotóxica; AmB: Anfotericina B

4. OBSERVACIONES

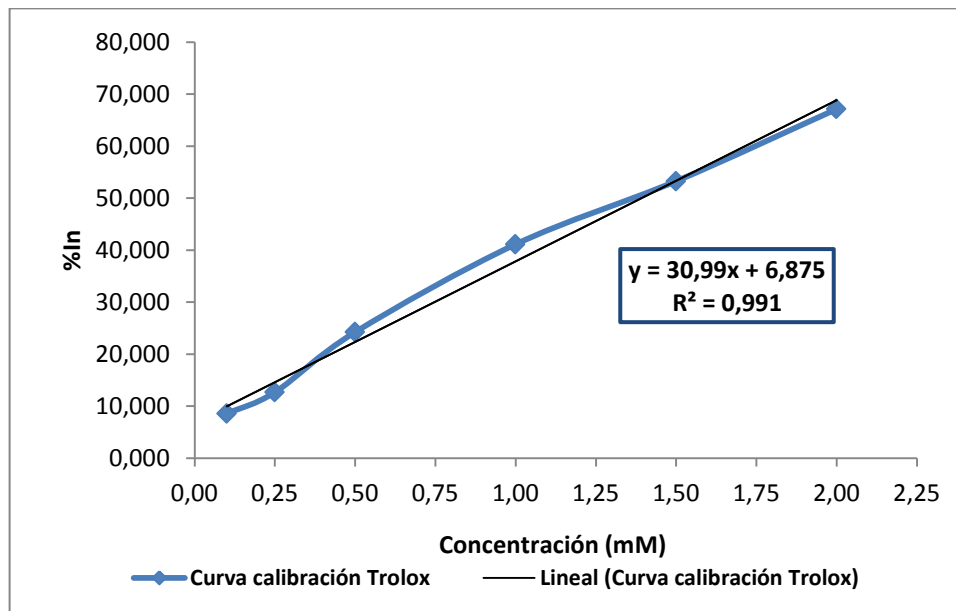
Los compuestos no fueron tóxicos para las células de mamífero. Esta característica es muy importante ya que podría ser utilizado con otros fines en humanos. Ensayos adicionales de geneotoxicidad y mutagenicidad son sugeridos.

Igualmente se podría evaluar su actividad biológica contra hongos, insecticidas antioxidantes, aromatizantes y cosmética.

PATRICIA ESCOBAR

Laboratorio de Quimioterapia en Enfermedades Tropicales
Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP)
Universidad Industrial de Santander

ANEXO 4. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL ENSAYO DE LOS ANTIOXIDANTES TOTALES SOBRE EL CATION-RADICAL ABTS⁺



ANEXO 5. CUANTIFICACIÓN DEL LIMONENO

Para obtener resultados confiables y reproducibles en la cuantificación de los componentes monoterpénicos obtenidos en los ensayos de biotransformación se determinaron los parámetros de mérito para la validación de la técnica analítica CG-EM incluyendo los procedimientos de extracción (ELL-CG-EM). La recuperación del limoneno del medio de cultivo fue del $83.92 \pm 2.83\%$. El porcentaje de recuperación y de precisión se consideran aceptables. La solubilidad del limoneno en agua es baja, $41,0 \pm 0.7\mu\text{M}$, 23.5°C , por lo que se dificulta su difusión en la fase orgánica no permitiendo la eficiencia extractiva en un 100% (Li & Perdue, 1998).

Castellanos (2007) reportó un 69% de recuperación del limoneno del medio de cultivo líquido YMPG y usando diclorometano (DCM) como solvente extractor. Por lo anterior, se puede decir que el acetato de etilo (AcOEt) empleado en este estudio resultó ser mejor solvente extractor.

En la mayoría de estudios recientes de biotransformación de terpenos se reporta frecuentemente la extracción de sustrato y productos con AcOEt, sin embargo, no existen datos para comparar la capacidad extractante del AcOEt, u otros solventes comúnmente empleados, DCM o éter etílico.

A continuación se muestran los resultados y análisis de la determinación de precisión (repetibilidad) y calibración del limoneno.

Determinación de la precisión (repetibilidad) del (R)-(+)-limoneno y calibración

Los tiempos de retención (t_R), las áreas obtenidas y el cálculo del RSD% para la determinación de limoneno se muestra en la Tabla 1.

Tabla 5 Evaluación de la precisión para el análisis del (R)-(+)-limoneno

PATRÓN	CONCENTRACIÓN, mg/L	t _R (min)	Área (Cuentas/min)	RSD%	
				t _R	Área
P1	1000	21,094	42643580	0,01	0,84
		21,097	42567898		
		21,096	41989765		
		21,115	123985025		
P2	2000	21,113	124006547	0,01	0,02
		21,113	123964531		
		21,121	471690038		
P3	5000	21,121	471620009	0,01	0,06
		21,126	472116564		
		21,136	987557739		
P4	10000	21,138	991023456	0,01	0,18
		21,139	988867432		

Los valores RSD para las mediciones de t_R fueron menores del 0,02% para el limoneno indicando una alta precisión en la inyección de la muestra. Para las mediciones de área, los RSD fueron inferiores al 1.0%, de modo que la precisión es adecuada y aceptable para las determinaciones según lo indican Jiménez et al., (2002) y Bliesner (2006), quienes establecen que el nivel de aceptación máximo permitido de RSD se encuentra entre 10 y 15% para un ensayo de Categoría II según los métodos USP.

Usando los datos obtenidos de área y concentración de los diferentes patrones, se construyó la curva de calibración del limoneno. La ecuación de la recta obtenida por regresión lineal y los resultados del análisis, se indican en la Tabla 2.

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

Tabla 6 Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del limoneno

Parámetro	Valor Estimado	Error Estándar	T estadística	Valor P
Intercepto (b)	-7,23554E7	5,73632E6	-12,6135	0,0000
Pendiente (m)	106487	1006,22	105,829	0,0000
Coeficiente de correlación (R)	0,999554			
R cuadrado	0,999108			
Valor P para la pérdida de ajuste	0,2250			
Error estándar del estimado (RMSE)	1,21997E07			
Suma de cuadrados del residual	1,48834E15			
Ecuación del modelo ajustado	Y = -7,23554E07 + 106487*X			

X: área del componente; C: Concentración en mg/L.

- **Cálculo del LOD y LOQ**

El LOD y LQD fueron determinados con base en el valor de RMSE obtenido de la regresión lineal (Corley, 2003). La Tabla 3 resume los resultados expresando los valores en unidades de concentración (mg/L).

Tabla 7 Valores de LOD y LQD calculados para el limoneno (en mg/L)

ANALITO	RMSE	m	LOD	LQD
Limoneno	1,21997E07	106487	343,69	1145,65

ANEXO 6. CUANTIFICACIÓN DEL ALCOHOL PERÍLICO

La validación de la técnica analítica GC-SM incluidos los procedimientos de extracción (ELL-GC-MS), fue necesaria para la cuantificación confiable y reproducible del POH producido durante los diferentes ensayos de biotransformación del limoneno, por lo que se determinaron los parámetros de mérito.

- **Precisión (repetibilidad)**

En la Tabla 1, se indican los tiempos de retención (t_R) y las áreas obtenidas para las diferentes concentraciones de POH y el cálculo de la RSD% para cada parámetro.

Tabla 8 Evaluación de la precisión para el análisis del alcohol perílico

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (mg/L)	t_R (min)	Área (Cuentas/min)	RSD%	
				t_R	Área
P1	400	30,554	469439902	0.03	2.79
		30,553	495630974		
		30,569	488235127		
P2	800	30,594	542563304	0.01	2.74
		30,594	513579489		
		30,599	528849832		
P3	1200	30,605	615043019	0.02	1.33
		30,609	616847552		
		30,618	630186410		
		30,627	761995300		

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (mg/L)	t _R	Área	RSD%	
		(min)	(Cuentas/min)	t _R	Área
P4	2000	30,631	781519260	0.03	1.92
		30,644	791285153		

Los valores RSD para las mediciones de t_R no fueron mayores a 0,03% para el POH, lo que indica una alta precisión en la inyección de la muestra. Para las mediciones de área, los RSD no superaron el 3.0% por lo que estuvieron por debajo del nivel de aceptación máximo permitido de RSD (10 y 15%) para un ensayo de Categoría II según los métodos USP, por lo que se considera una precisión adecuada y aceptable para las determinaciones según lo indica Jiménez et al., (2002) y Bliesner (2006).

- **Calibración**

Usando los datos obtenidos de área y concentración de los diferentes patrones, se construyó la respectiva curva de calibración del POH. La ecuación de la recta obtenida por regresión lineal y los resultados del análisis, se indican en la Tabla 2. Usando el valor de RMSE obtenido de la regresión lineal se determinaron los valores de LOD y LQD (Corley, 2003).

Tabla 9 Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del alcohol perílico

Parámetro	Valor Estimado	Error Estándar	T estadística	Valor P
Intercepto (b)	3,94792E8	1,05306E7	37,4901	0,0000
Pendiente (m)	189218	8431,2	22,4426	0,0000

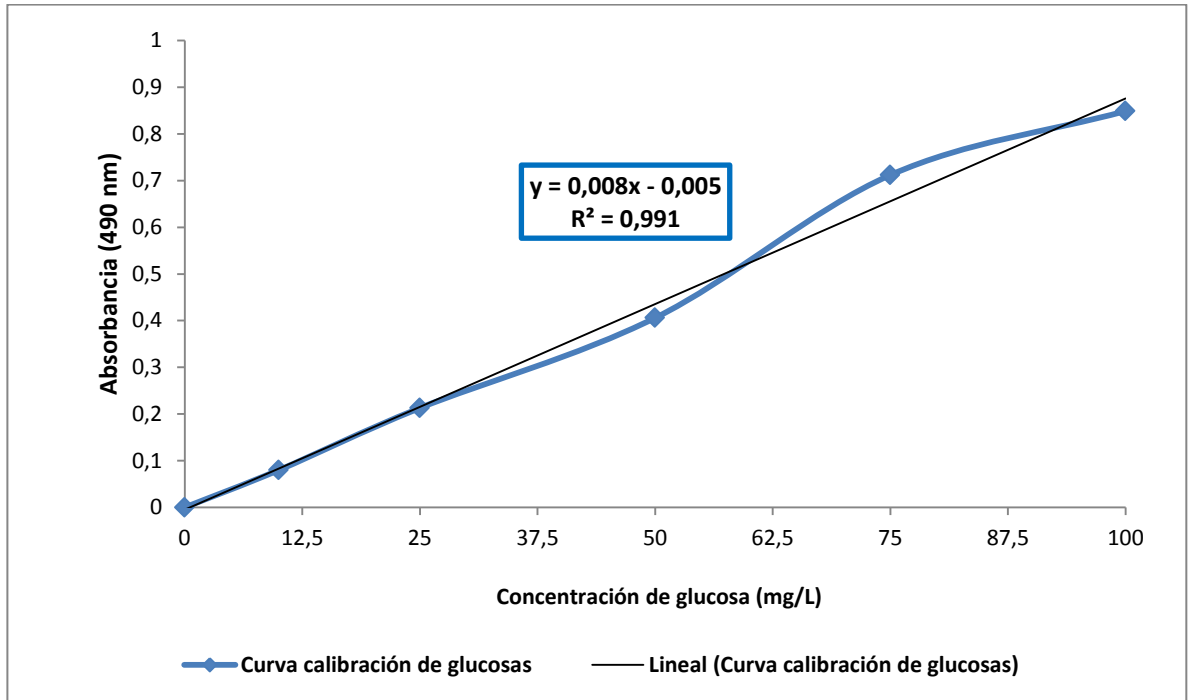
Parámetro	Valor Estimado	Error Estándar	T estadística	Valor P
Coeficiente de correlación (R)			0,990218	
R cuadrado			98,0532	
Valor P para la pérdida de ajuste			0,0225	
Error estándar del estimado (RMSE)			1,72788E7	
Suma de cuadrados del residual			2,98558E15	
Ecuación del modelo ajustado	Y = 3,94792E8 + 189218*X			
LOD			273,951	
LQD			913,169	

X: área del componente; C: Concentración en mg/L.

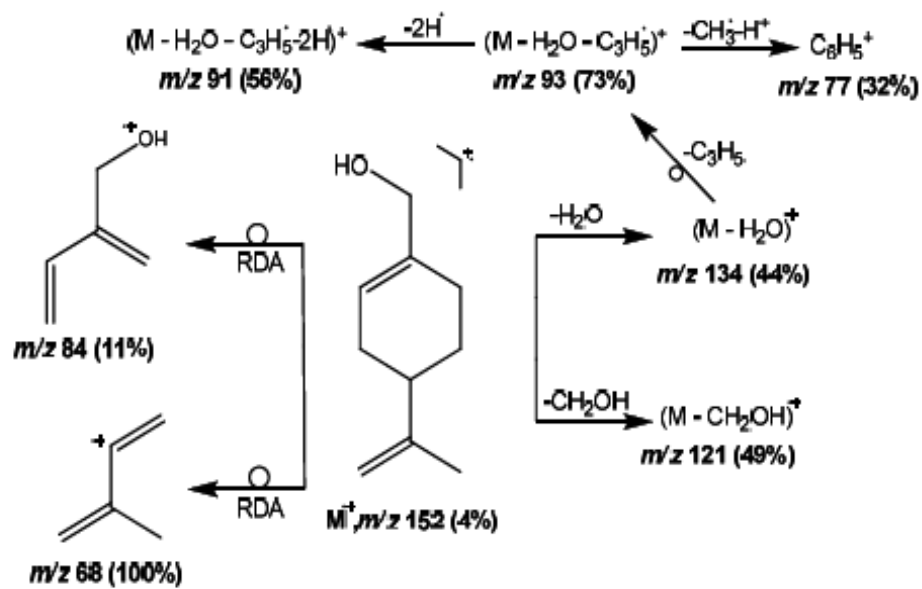
El valor p fue menor a 0,05 indicando la relación estadísticamente significativa entre el área y la concentración a un nivel del 95% de confianza. El coeficiente de correlación cuadrado (R^2) mayor al 98% confirma que el modelo ajustado explica la variabilidad en área. El coeficiente de correlación (R) superior a 0,990 evidencia una fuerte relación lineal entre las variables. Puesto que el valor p para la falta de ajuste es menor a 0,05, el modelo lineal es adecuado para los datos observados en un intervalo de confianza del 95%.

Eficiencia de Extracción, EE: La recuperación del POH del medio de bioconversión fue del $88.92 \pm 3.03\%$, considerada alta y aceptable teniendo en cuenta la solubilidad en agua de este terpeno (471mg/L, 25°C).

ANEXO 7. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUCOSA EN EL MEDIO DE BIOTRANSFORMACIÓN MÉTODO DUBOIS O FENOL-ÁCIDO SULFÚRICO



**ANEXO. 8. POSIBLES RUTAS DE FRAGMENTACIÓN DEL ALCOHOL
PERÍLICO**



ANEXO 9. CUANTIFICACIÓN DE α -terpineol

Para la cuantificación confiable y reproducible del monoterpenoide α -terpineol obtenido en los ensayos de biotransformación, se determinaron los parámetros de mérito para la validación de la técnica analítica CG-EM incluyendo los procedimientos de extracción (ELL-CG-EM). La recuperación del α -terpineol del medio de cultivo MYB fue del $90.46 \pm 1.94\%$, 1.07 veces mayor que el limoneno ($83.92 \pm 2.83\%$), es decir que el α -terpineol fue mejor extraído bajo iguales condiciones; posiblemente la mayor solubilidad del DOL ($4600 \pm 207\mu\text{M}$, 23.5°C) en comparación con el limoneno ($41,0 \pm 0.7\mu\text{M}$, 23.5°C), favorece su difusión en la fase orgánica (Li & Perdue, 1998). Los porcentajes de recuperación y de precisión se consideraron aceptables. En la mayoría de estudios recientes de biotransformación de terpenos se reporta frecuentemente la extracción de sustrato y productos con AcOEt, sin embargo, no existen datos para comparar la capacidad extractante del AcOEt, u otros solventes comúnmente empleados, DCM o éter etílico.

En la tabla 1, se muestran los resultados y análisis de la determinación de precisión (repetibilidad) y calibración del α -terpineol.

Tabla 10 Evaluación de la precisión para el análisis del (*R*)-(+)- α -Terpineol

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (mg/L)	t_R (min)	Área (Cuentas/min)	RSD%	
				t_R	Área
P1	800	27,820	34471449	0,01	0,07
		27,823	34451233		
		27,825	34500876		
		27,836	68943300		
P2	1600	27,834	68967776	0,01	0,03

PATRÓN	CONCENTRACIÓN (mg/L)	t _R (min)	Área (Cuentas/min)	RSD%	
				t _R	Área
P3	2400	27,835	68981023	0,01	0,06
		27,845	103939572		
		27,845	104070876		
		27,847	104001187		
P4	3200	27,854	146257236	0,01	0,20
		27,850	146687659		
		27,855	146798876		

Los valores RSD para las mediciones de t_R fueron menores del 0,02% para el α-terpineol, lo que indica una alta precisión en la inyección de la muestra. Para las mediciones de área, los RSD fueron inferiores al 1.0%, de modo que la precisión es adecuada y aceptable para las determinaciones según lo indican Jiménez et al., (2002) y Bliesner (2006), quienes establecen que el nivel de aceptación máximo permitido de RSD se encuentra entre 10 y 15% para un ensayo de Categoría II según los métodos USP. La repetibilidad resultó igual para los dos terpenos.

Usando los datos obtenidos de área y concentración de los diferentes patrones, se construyó la respectiva curva de calibración del α-terpineol. La ecuación de la recta obtenida por regresión lineal y los resultados del análisis, se indican en la Tablas 2.

Tabla 11 Resumen de la regresión y ANOVA para el análisis del α-Terpineol

Parámetro	Valor Estimado	Error Estándar	T estadística	Valor P
Intercepto (b)	-4,33409E6	1,68163E6	-2,57732	0,0275

Parámetro	Valor Estimado	Error Estándar	T estadística	Valor P
Pendiente (m)	46420,0	767,556	60,4777	0,0000
Coeficiente de correlación (R)		0,998636		
R cuadrado		0,997273		
Valor P para la pérdida de ajuste		0,679571		
Error estándar del estimado (RMSE)		2,37818E06		
Suma de cuadrados del residual		5,65576E13		
Ecuación del modelo ajustado	Y = -4,33409E6 + 46420*X			

X: área del componente; C: Concentración en mg/L.

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

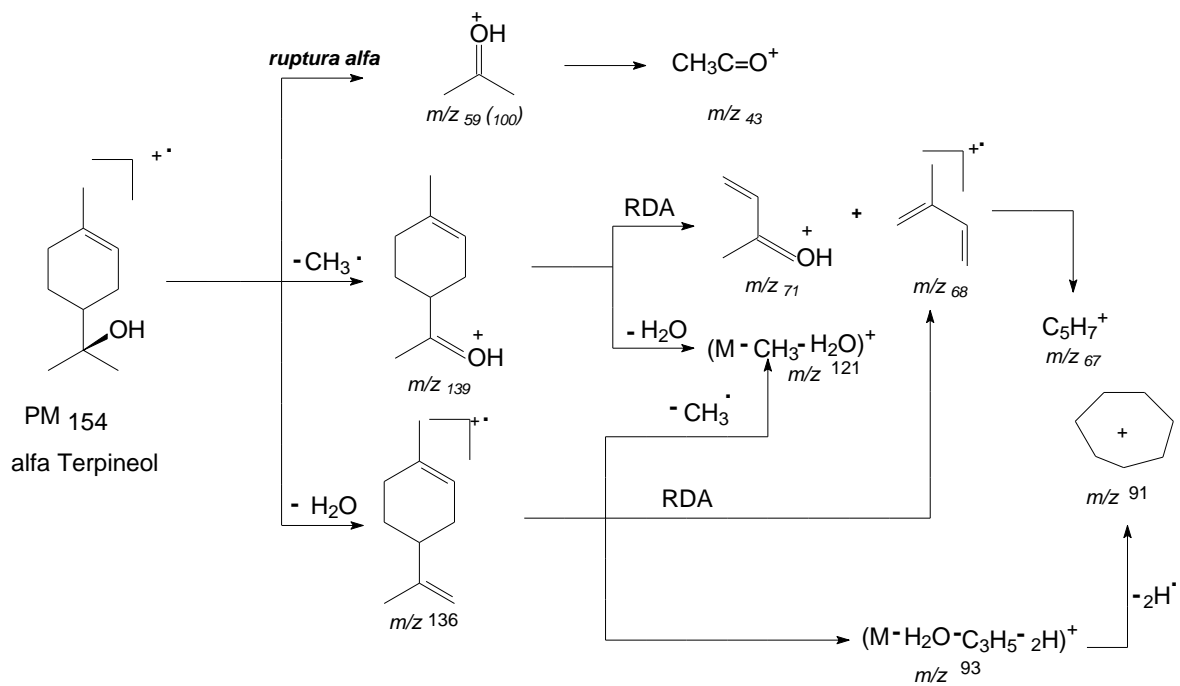
- **Cálculo del LOD y LOQ**

El LOD y LQD fueron determinados con base en el valor de RMSE obtenido de la regresión lineal (Corley, 2003). La Tabla 3 resume los resultados expresando los valores en unidades de concentración (mg/L).

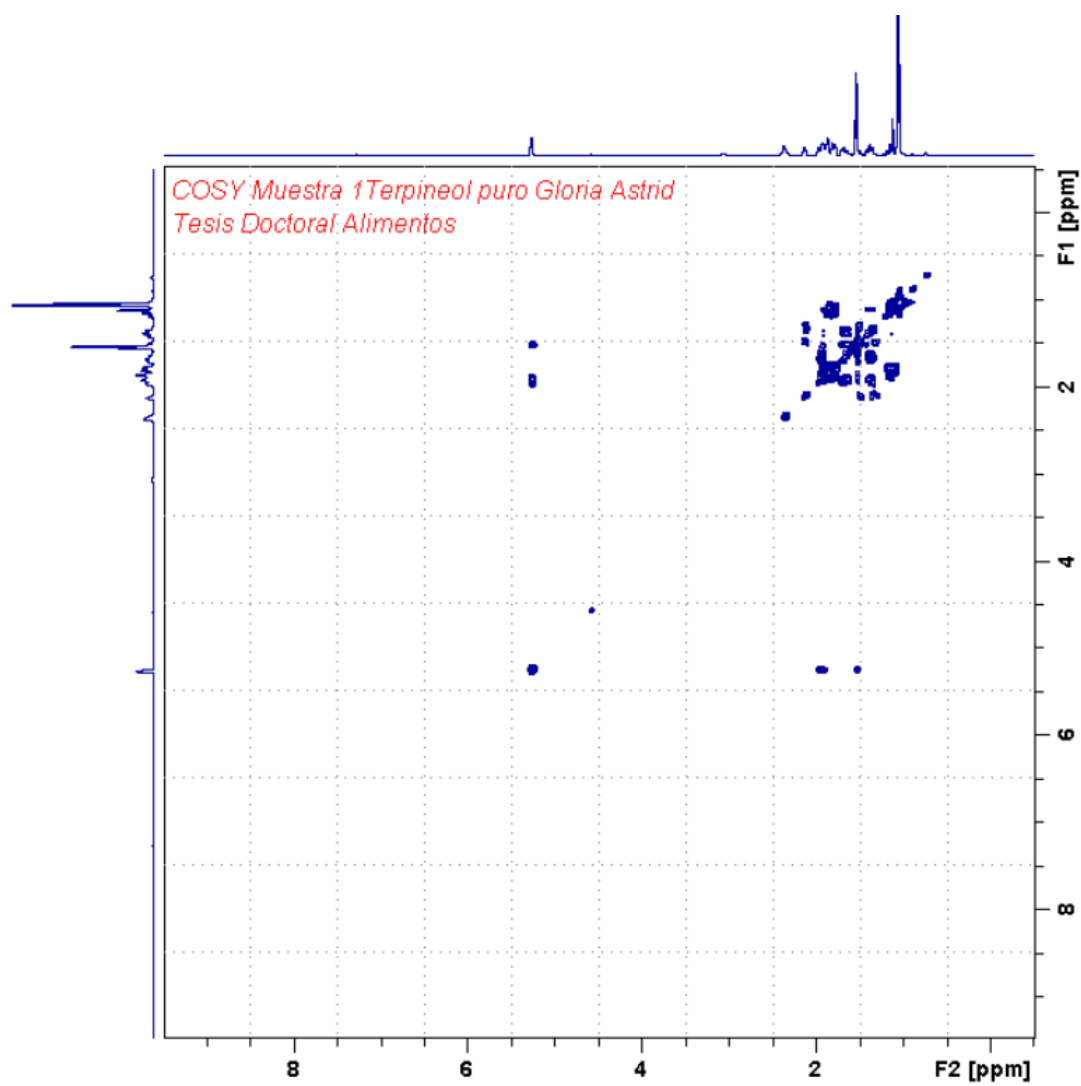
Tabla 12 Valores de LOD y LQD calculados para los analitos (en mg/L)

ANALITO	RMSE	M	LOD	LQD
α -Terpineol	2,37818E06	46420,0	153,69	512,32

ANEXO 10. RUTAS DE FRAGMENTACIÓN DEL α -TERPINEOL



ANEXO 11. ESPECTRO BIDIMENSIONAL COSY DEL (R)-(+)- α -TERPINEOL



ANEXO 12. ESPECTRO BIDIMENSIONAL HSQC DE DEL (R)-(+)- α -TERPINEOL

