



# **Biotransformaciones de monoterpenos por *Aspergillus* spp. aislados de fuentes naturales**

**Tesis presentada para cumplir con los requisitos finales para  
la obtención del título de Doctor en Química**

Autor: Q.F. Carlos García Carnelli

Directores: Prof. Dra. Pilar Menéndez y Prof. Dr. Horacio Heinzen

Montevideo, mayo de 2011

*Dedicado a Peti, Pauli y Fede, con todo mi amor.*

## AGRADECIMIENTOS

Mucha es la gente que me ha apoyado desde lo material, intelectual o afectivo a lo largo de este sinuoso sendero académico. A riesgo de cometer involuntarias omisiones, vayan estas líneas de agradecimiento a todos quienes han contribuido de alguna forma a ayudarme a llegar a esta instancia.

### *(i) A quienes financiaron el trabajo*

Este trabajo fue en parte realizado gracias al apoyo de los siguientes programas e instituciones:

- Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas – Area Química (PEDECIBA – Química).
- Comisión Sectorial de Investigación Científica – Universidad de la República (CSIC – UdelaR).
- Facultad de Química – Universidad de la República.

### *(ii) A quienes contribuyeron con su trabajo y conocimientos*

Mi agradecimiento a cuantas personas han hecho posible la realización del presente trabajo, con especial mención a:

Mis directores, Horacio y Pilar, por su paciencia, enseñanzas, consejos y el cariño brindado. A Horacio por iniciarme en la carrera académica, por haber confiado en mí, y darme la oportunidad de poder seguir haciendo esto que tanto me gusta. A Pilar por compartir parte de su trabajo hace tantos años, ser mí mentora en las biotransformaciones; por compartir algo más allá de lo académico, apoyarme siempre y darme el impulso permanente para terminar y seguir adelante a pesar de todo.

La Mag. Paula Rodríguez (Paulita), sin cuyo trabajo y dedicación este trabajo sencillamente no se hubiera llevado a cabo.

El Dr. Jorge Franco (Departamento de Biometría, Facultad de Agronomía), quien desinteresadamente volcó parte de su tiempo a discutir y explicarnos aspectos relativos al tratamiento estadístico, y además realizó los análisis correspondientes.

Los colaboradores directos de los últimos tiempos: Ignacio Miguez, Ignacio Maggiolo y Victoria Giorgi, quienes dedicaron horas honorarias de laboratorio con gran entusiasmo y sobrada capacidad.

Beatriz Vega por ayudarme con la síntesis del 3-endo-hidroxicineol.

Los compañeros de las viejas biotransformaciones que ya no están en Facultad: Lolo Días, Wilson Sierra, Ismael Olmos.

Los "especialistas" en GC y MS, Daniel Lorenzo, Gabriel González, Natalia Martínez y Eduardo Dellacassa, quienes colaboraron con gran parte de dichos análisis.

Horacio Pezaroglo por todos los experimentos de resonancia. A Verónica Martínez por buscar aquellos archivos perdidos.

Seba de Paula cuando estaba en el Laboratorio de Análisis Orgánico del Polo Tecnológico de Pando, por las medidas de poder rotatorio; y Alejandra Rodríguez por su buena disposición cuando tuve que usar ese instrumento y las instalaciones.

Andrés Pérez y Lucía Castillo por conseguirme aquellos papers "difíciles".

Todos los compañeros de la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales que me ayudaron durante estos dilatados años de formación académica. A los "viejos", que junto con Pilar y Horacio me bancan desde mis comienzos en la Cátedra: Verónica, Álvaro, Eduardo, Gabriel, Daniel (Osito). A los que se fueron sumando más acá en el tiempo, muchos hace casi tantos años como yo: Ana, Lu Pareja, Cristina, Nati Martínez, Alejandro (Gorostiaga), Silvina, Andrés, Marcos, Federico, Stephanie, Lu Geis, Nati Besil, Nacho, Ximena, María José, Mauri Guerra, Alejandra. También el recuerdo y agradecimiento a quienes ya no trabajan en la Cátedra pero supieron ayudarme de alguna u otra manera en su momento: Moyna, Silvia Soulé, Fernando, Sergio, Sonia, Carlitos Güntner, Ruben, Daniel (Fierita), Claudia Díaz, Claudia Barra, Carmelo, Patricia (Parda), Adriana, Tato, Claudio, Sandra, Silvia Etcheverry, Laura, Anisleidi, Joaquín, Nani, Sebastián, Nicolás. Cada uno a su manera y en su medida contribuyó con sus saberes y virtudes a la elaboración de este trabajo y a enriquecer mi formación académica y mi persona.

El Dr. Giuliano Delle Monache y el Prof. Bruno Botta por contribuir a mi formación en mis primeros pasos en la investigación, recibéndome en sus laboratorios y casas como a un amigo más, y por estar siempre dispuestos a ayudar.

La Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química y sus integrantes. Buena parte de este trabajo se desarrolló usando las instalaciones, materiales y equipos de esta Cátedra. Además de permitirme eso, siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y responder mis dudas con la mejor onda.

Las Cátedras de Orgánica y Química Farmacéutica y sus integrantes, por compartir reactivos, solventes, instrumentos, libros, etc., y por tener siempre una excelente disposición para dar una mano cuando la precisé. En especial a Gloria Serra por darme una gran mano en un momento académicamente complicado. Y a Gustavo Seoane y David González por contestar mis dudas cuando acudí a ellos.

Carmen Rossini, Andrés González y todos los integrantes del Laboratorio de Ecología Química. Por compartir sus equipos y darme una mano siempre que se los solicité.

Todos los compañeros con quienes comparto el Laboratorio de Biotransformaciones y Biocatálisis.

*(iii) A quienes durante estos años me brindaron su sustento en aquello que trasciende lo material y académico, pero sin lo cual jamás hubiera culminado esta etapa.*

A aquellos compañeros y amigos con quienes compartimos la tarea diaria en la Facultad, y me tiran su mejor onda y cariño. Aquellos que me soportan un mal día, y por los que da gusto volver al día siguiente. Los de ahora y también los que ya no comparten este espacio, pero siguen compartiendo su amistad. En definitiva, esa gente que siente el mismo placer que yo cuando nos vemos en otro lado diferente a la Facultad.

A los de la compañía y aliento incondicional desde las más tempranas horas universitarias, Ivana, Laurita, Adriana, Horacio, Gabriel, Osito, Paulita.

A Andrés y Carina, pues sin ellos no hubiera obtenido ni siquiera el título de grado.

A Malvín, refugio de una pasión y generador de alegrías.

A la Honorable Cofradía (Agustín, Chepo, Isma, Jano, Rodrigo, Tobi, Wilson), y las queridas contracófrades (Lucía, Claudia, María, Cecilia, Maral, Natalia). Por todo lo que compartimos y compartiremos.

A mi Barra, vieja y querida, sostén en las difíciles y compañeros de miles de alegrías (que fueron y que vendrán): Gonchi, Ricky, Gato, Carlitos, Fela, Germán, Pique, Nano, Fabián, Marcel, Loncho, Peta, Martín, Roberto, Pablito M, Cubano. A Adriana D y Eliana. A Alina, amiga y compañera de los primeros años de universidad.

A mis viejos, Ana y Mario, mis hermanas, Lala y Carolina y mi sobrina Micaela. A mi madrina Chola.

Por último, quiero agradecer a Peti, mi compañera de camino, y a Pauli y Fede, los soles que lo iluminan. A ellas dedico este trabajo.

# ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	i
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	iv
<b>ÍNDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS y TABLAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE ESPECTROS</b> .....	xiv
<b>ABREVIATURAS y ACRÓNIMOS</b> .....	xv
<b>RESUMEN</b> .....	xvii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Biotecnología y Biotransformaciones .....	1
1.1.1. Desarrollo sustentable y biotecnología .....	1
1.1.2. Biotransformaciones y biocatálisis .....	2
1.1.3. Antecedentes .....	3
1.1.4. Ventajas frente a la síntesis y al aislamiento desde una fuente natural.....	5
1.1.5. Generalidades de las enzimas usadas en biocatálisis .....	11
1.1.6. Estrategias de biotransformación: células enteras vs. enzimas aisladas .....	13
1.1.7. Clasificación de biotransformaciones .....	14
1.1.8. Metodología general para la biotransformación mediante microorganismos .....	16
1.2. Los hongos como agentes biotransformadores .....	22
1.2.1. Hongos y biotecnología .....	22
1.2.2. Biotransformaciones mediadas por hongos .....	24
1.2.3. <i>Aspergillus</i> sp .....	27
1.2.3.1. <i>Aspergillus niger</i> .....	28
1.2.3.2. <i>Aspergillus terreus</i> .....	29

1.3. Los monoterpenos como sustratos de biotransformación .....	31
1.3.1. Características generales de los terpenos .....	31
1.3.2. El $\alpha$ -limoneno .....	36
1.3.3. El 1,8-cineol .....	38
1.3.4. Transformaciones microbianas de monoterpenos .....	41
1.3.5. Biotransformación de limoneno .....	43
1.3.6. Biotransformación de cineol .....	54
1.4. Herbicidas de origen natural .....	62
1.4.1. Alelopatía. Aleloquímicos como modelos de herbicidas .....	62
1.4.2. Cineol y derivados .....	65
1.5. Objetivos .....	69
1.5.1. Objetivo general .....	69
1.5.2. Objetivos específicos .....	69
<b>2. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>72</b>
2.1. Selección y mantenimiento de los microorganismos .....	72
2.2. Solventes, reactivos, materiales e instrumentos .....	73
2.2.1. Solventes .....	73
2.2.2. Reactivos, estándares, enzimas y reveladores cromatográfico .....	73
2.2.3. Materiales .....	75
2.2.4. Instrumentos .....	75
2.3. Recuperación de limoneno y sus productos de biotransformación desde el medio de transformación .....	76

2.4. Biotransformación de limoneno .....	82
2.4.1. Condiciones generales .....	82
2.4.2. Influencia del medio de cultivo y la geometría del sistema de fermentación .....	84
2.4.3. Aproximación al mecanismo enzimático implicado .....	89
2.5. Biotransformación de cineol .....	91
2.5.1. Condiciones generales .....	91
2.5.2. Influencia de las condiciones de bioconversión .....	94
2.5.2.1. Geometría del sistema y tiempo de reacción .....	94
2.5.2.2. Medio de cultivo .....	97
2.5.3. Determinación del rendimiento de la biotransformación .....	98
2.5.4. Separación, aislamiento y caracterización de los productos .....	101
2.5.5. Síntesis de derivados oxigenados del 1,8-cineol .....	104
2.5.6. Esporas como agente biocatalizador .....	110
2.5.7. Aceite de <i>Eucalyptus</i> como sustrato .....	111
2.6. Biotransformación enzimática de los hidroxicineoles .....	112
2.6.1. Acetilación de los productos de biotransformación en YMPG .....	113
2.6.2. Esterificación del ( $\pm$ )-2- <i>exo</i> -hidroxicineol sintético .....	115
2.6.3. Hidrólisis del (-)-acetato de 2- <i>exo</i> -hidroxicineol .....	117
2.7. Actividad biológica de los productos de bioconversión del 1,8-cineol y sus derivados .....	118
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>122</b>
3.1. Recuperación del limoneno y sus productos de biotransformación desde el medio de cultivo .....	122
3.2. Biotransformación de limoneno .....	127

3.2.1. Influencia del medio de cultivo y la geometría del sistema .....	133
3.2.2. Aproximación al mecanismo enzimático .....	137
3.3. Biotransformación de 1,8-cineol .....	140
3.3.1. Influencia de los parámetros de la biotransformación .....	141
3.3.2. Determinación del rendimiento de la biotransformación .....	149
3.3.3. Aislamiento y caracterización de los productos de bioconversión .....	151
3.3.4. Esporas de <i>Aspergillus terreus</i> como agente biocatalizador .....	158
3.3.5. Aceite de <i>Eucalyptus</i> como sustrato de biotransformación .....	159
3.4. Obtención y caracterización de derivados por catálisis enzimática .....	161
3.5. Bioactividad de los productos de biotransformación del 1,8-cineol y derivados.....	168
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>178</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>181</b>
<b>ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>208</b>
<b>ANEXO II. ESPECTROS DE RMN .....</b>	<b>212</b>

## ESQUEMAS

- Esquema 1. Reducción enzimática regio y enantioespecífica de una decalindiona.
- Esquema 2. Hidrólisis enzimática de la bencilpenicilina natural.
- Esquema 3. Biohidroxilación estereoespecífica de esteroides con *Curvularia lunata*.
- Esquema 4. Ecuación general resumida para la reacción catalizada por enzimas citocromo P450.
- Esquema 5. Ruta del mevalonato en la biosíntesis de terpenos.
- Esquema 6. Ruta de la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato en la biosíntesis de terpenos.
- Esquema 7. Rutas biosintéticas en plantas para el limoneno y sus derivados
- Esquema 8. Principales productos de biotransformación del  $\alpha$ -limoneno.
- Esquema 9. Catabolismo del limoneno vía limoneno-1,2-epóxido.
- Esquema 10. Catabolismo del limoneno vía alcohol perílico.
- Esquema 11. Principales productos de la metabolización del 1,8-cineol por animales.
- Esquema 12. Principales productos de biotransformación del 1,8-cineol por microorganismos.
- Esquema 13. Ruta catabólica propuesta para el 1,8-cineol en bacterias.
- Esquema 14. Biotransformación de (-)-*cis*-carveol en bottroscipatol.
- Esquema 15. Obtención de un derivado del 1,8-cineol con actividad reguladora del crecimiento vegetal.
- Esquema 16. Secuencia de etapas llevadas a cabo para la dosificación de los productos de biotransformación del 1,8-cineol y la determinación del rendimiento de la misma.
- Esquema 17. Síntesis de 2-*exo*-hidroxicineol a partir de  $\alpha$ -terpineol.
- Esquema 18. Estrategia sintética para obtener el 2-oxocineol y el 2-*endo*-hidroxicineol.
- Esquema 19. Síntesis de 3-oxocineol y 3-*endo*-hidroxicineol a partir de 1,8-cineol.
- Esquema 20. Reacción de transesterificación de un hidroxicineol con un éster del alcohol vinílico.
- Esquema 21. Productos de biotransformación del  $\alpha$ -limoneno en las diferentes condiciones ensayadas.
- Esquema 22. Productos identificados en la biotransformación de 1,8-cineol.
- Esquema 23. Acetilación enzimática de los alcoholes productos de biotransformación del 1,8-cineol por *A. niger* en YMPG.
- Esquema 24. Obtención de forma independiente de los enantiómeros (+)- y (-) del 2-*exo*-hidroxicineol mediante procesos biocatalíticos.

## FIGURAS

- Figura 1. Dos metabolitos vegetales obtenidos por técnicas de cultivo celular.
- Figura 2. Diferentes efectos biológicos de algunos enantiómeros.
- Figura 3. *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus* en placas de PDA.
- Figura 4. Estereoisómeros configuracionales del limoneno.
- Figura 5. Estructura y nomenclatura del 1,8-cineol.
- Figura 6. Los diasterómeros *cis*-carveol y *trans*-carveol.
- Figura 7. Nomenclatura de los derivados C2 y C3 sustituidos del 1,8-cineol.
- Figura 8. Bialafos y glufozinato, dos bioherbicidas comerciales.
- Figura 9. 1,4-cineol, cinmethylin y 2-hidroxi-1,4-cineol.
- Figura 10. Fermentador New Brunswick Scientific, modelo BIOFLO III.
- Figura 11. Agitador orbital Sanyo IOXX400.XX2.C.
- Figura 12. Cromatograma de gases correspondiente a la biotransformación de  $\alpha$ -limoneno en el medio CM realizada en fermentador.
- Figura 13. Cromatograma de gases del producto de la biotransformación de  $\alpha$ -limoneno en el medio TSB realizada en fermentador.
- Figura 14. Cromatograma de gases de la biotransformación de  $\alpha$ -limoneno en el medio CM realizada en shaker.
- Figura 15. Ketoconazol, un inhibidor de la citocromo P450.
- Figura 16. Cromatograma de gases correspondiente a la biotransformación de  $\alpha$ -limoneno en TSB realizada en shaker.
- Figura 17. Cromatograma de gases correspondiente a la biotransformación de  $\alpha$ -limoneno realizada en shaker, en el medio TSB, con agregado de ketoconazol.
- Figura 18. Cromatograma de gases correspondiente a la biotransformación de 1,8-cineol en el medio YMPG realizada en fermentador.
- Figura 19. Estructura del alcanfor, utilizado como estándar interno para cuantificar el 1,8-cineol y sus derivados hidroxilados.
- Figura 20. Cromatogramas de los productos de biotransformación del 1,8-cineol en YMPG, utilizando dos fases estacionarias diferentes: Carbowax 20M y SE52.
- Figura 21. Cromatograma del aceite esencial de *Eucalyptus* utilizado como sustrato de biotransformación por *Aspergillus terreus*.

- Figura 22. Cromatograma de gases de la acetilación con acetato de vinilo y lipasa de *Candida rugosa*, de la mezcla de hidroxicineoles obtenido en la biotransformación del 1,8-cineol por *A. terreus* en YMPG.
- Figura 23. Cromatogramas quirales correspondientes a: 2-*exo*-hidroxicineol obtenido por biotransformación, 2-*exo*-hidroxicineol remanente de la reacción de bioacetilación y acetato de 2-*exo*-hidroxicineol obtenido por catálisis enzimática.
- Figura 24. Porcentajes de recuperación de limoneno desde el medio de cultivo.
- Figura 25. Porcentajes de recuperación de  $\alpha$ -terpineol desde el medio de cultivo.
- Figura 26. Porcentajes de recuperación de *trans*-carveol desde el medio de cultivo.
- Figura 27. Porcentajes de recuperación de *cis*-carveol desde el medio de cultivo.
- Figura 28. Porcentajes de recuperación de carvona desde el medio de cultivo.
- Figura 29. Perfil de los principales productos de biotransformación de cineol en ambas geometrías ensayadas.
- Figura 30. Evolución de la biotransformación de 1,8 cineol llevada a cabo en matraces dispuestos en agitador orbital.
- Figura 31. Evolución de la biotransformación de 1,8 cineol realizada en fermentador.
- Figura 32. Desarrollo de los pellets de *Aspergillus terreus* en Caldo Malta y TSB.
- Figura 33. Perfil de los principales productos de biotransformación del 1,8-cineol en cuatro medios de cultivo.
- Figura 34. Enantiómeros de los derivados hidroxilados en C2 y C3 del 1,8-cineol.
- Figura 35. 2- y 3-*exo*-hidroxicineol.
- Figura 36. Perfil de los productos de bioconversión utilizando como sustrato cineol puro y aceite de eucalipto.
- Figura 37. Seguimiento por GC de la reacción de acetilación de los hidroxicineoles con acetato de vinilo catalizada por CRL.
- Figura 38. Evolución de la esterificación catalizada con CRL de los productos de bioconversión del 1,8-cineol en YMPG.
- Figura 39. Evolución de la acetilación enzimática del 2-*exo*-hidroxicineol sintético.
- Figura 40. Acetato de 2-*exo*-hidroxicineol.
- Figura 41. Bioensayo con semillas de trigo al quinto día de puestas a germinar.
- Figura 42. Plántulas de lechuga dispuestas para las mediciones luego de germinadas durante 5 días.

- Figura 43. Gráfico de la diferencia en los porcentajes de las proporciones de germinación de semillas de lechuga entre las soluciones ensayadas y el blanco correspondiente.
- Figura 44. Gráfico de los efectos sobre el desarrollo del tallo de lechuga.
- Figura 45. Gráfico de los efectos sobre el desarrollo del tallo de trigo.
- Figura 46. Gráfico de los efectos sobre el desarrollo de la raíz de lechuga.
- Figura 47. Gráfico de los efectos sobre el desarrollo de la raíz de trigo.

## TABLAS

- Tabla 1. Clasificación de enzimas según el sistema de la Unión Internacional de Bioquímica.
- Tabla 2. Distribución de los trabajos presentados en los simposios *Biotrans* de 2003 y 2005, en base a la clase enzimática implicada en los mismos.
- Tabla 3. Precios comparativos del limoneno y algunos de sus derivados.
- Tabla 4. Ensayos para determinar la recuperación de limoneno desde el medio de cultivo.
- Tabla 5. Ensayos realizados para determinar la influencia de la geometría del sistema y del medio nutriente en la biotransformación de limoneno por *A. niger*.
- Tabla 6. Identificación de los principales productos de biotransformación de limoneno.
- Tabla 7. pH del medio YMPG a diferentes tiempos de iniciada la biotransformación de 1,8-cineol por *A. terreus*.
- Tabla 8. Resultado de la TLC de los productos de biotransformación del 1,8-cineol.
- Tabla 9. pH de los medios de cultivo a diferentes tiempos de iniciada la biotransformación de 1,8-cineol por *A. terreus*.
- Tabla 10. Índices de retención de Kovats del 1,8-cineol y sus derivados oxidados, determinados en una fase polar (Carbowax) y otra apolar (IK SE52).
- Tabla 11. Datos espectroscópicos del 3-*exo*-hidroxicineol.
- Tabla 12. Datos espectroscópicos del 2-*exo*-hidroxicineol.
- Tabla 13. Datos espectroscópicos del 2-oxocineol.
- Tabla 14. Datos espectroscópicos del 2-*endo*-hidroxicineol.

- Tabla 15. Datos espectroscópicos del 3-oxocineol.
- Tabla 16. Datos espectroscópicos del 3-endo-hidroxicineol.
- Tabla 17. Composición del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* utilizado como sustrato de biotransformación.
- Tabla 18. Composición de la mezcla producto de biotransformación del 1,8-cineol por *A. terreus* en YMPG, utilizada como sustrato de la biotransformación con acetato de vinilo catalizada con una lipasa de *Candida rugosa*.
- Tabla 19. Índices de retención de Kovats del acetato de 2-*exo*-hidroxicineol.
- Tabla 20. Datos espectroscópicos del acetato de 2-*exo*-hidroxicineol.
- Tabla 21. Composición de las mezclas de alcoholes productos de biotransformación del cineol en los medios YMPG y CM por *A. niger*, cuya fitotoxicidad fue evaluada mediante bioensayos específicos.
- Tabla 22. Índice de recuperación promedio para cada uno de los métodos de extracción de limoneno y productos de su biotransformación.
- Tabla 23. Porcentajes de limoneno y sus productos de bioconversión determinados por cromatografía gaseosa.
- Tabla 24. Distribución porcentual de los productos de biotransformación del limoneno en las diferentes condiciones ensayadas.
- Tabla 25. Desplazamientos de  $^1\text{H}$ -RMN del alcohol perílico.
- Tabla 26. Desplazamientos de  $^{13}\text{C}$ -RMN del alcohol perílico.
- Tabla 27. Porcentajes de bioconversión de 1,8-cineol en los distintos sistemas de fermentación a diferentes tiempos de seguimiento, en el medio YMPG.
- Tabla 28. Porcentajes de cineol remanente y de los productos de biotransformación a los distintos tiempos de bioconversión en los diferentes medios de cultivo.
- Tabla 29. Distribución enantiomérica de los productos de biotransformación de 1,8-cineol en los diferentes medios de cultivo.
- Tabla 30. Resultados cuantitativos de la reacción de biotransformación de cineol en CM.
- Tabla 31. Asignaciones de las señales de  $^{13}\text{C}$ -NMR obtenidas para el 2-*exo*-hidroxicineol.
- Tabla 32. Desplazamientos de  $^1\text{H}$  correspondientes al 2-*exo*-hidroxicineol.
- Tabla 33. Asignaciones de las señales de  $^{13}\text{C}$ -NMR obtenidas para el 3-*exo*-hidroxicineol.
- Tabla 34. Desplazamientos de  $^1\text{H}$  correspondientes al 3-*exo*-hidroxicineol.

- Tabla 35. Porcentajes de bionconversión del 1,8-cineol utilizando aceite de *Eucalyptus* como sustrato de la biotransformación.
- Tabla 36. Desplazamientos de <sup>13</sup>C-NMR para el acetato de 2-*exo*-hidroxicineol.
- Tabla 37. Desplazamientos de <sup>1</sup>H-NMR correspondientes al acetato de 2-*exo*-hidroxicineol.
- Tabla 38. Medias de las proporciones porcentuales de germinación para cada producto ensayado.
- Tabla 39. Medias de los desarrollos de tallos de lechuga y trigo con cada producto ensayado.
- Tabla 40. Medias de los desarrollos de raíces de lechuga y trigo con cada producto ensayado.

## INDICE DE ESPECTROS

- A1. Alcohol perílico  $^1\text{H-NMR}$
- A2. Alcohol perílico  $^{13}\text{C-NMR}$
- A3. Alcohol perílico HSQC
- A4. 2-*exo*-hidroxicineol  $^{13}\text{C-NMR}$
- A5. 2-*exo*-hidroxicineol  $^1\text{H-NMR}$
- A6. 3-*exo*-hidroxicineol  $^{13}\text{C-NMR}$
- A7. 3-*exo*-hidroxicineol  $^1\text{H-NMR}$
- A8. 2-*endo*-hidroxicineol  $^{13}\text{C-NMR}$
- A9. 2-*endo*-hidroxicineol  $^1\text{H-NMR}$
- A10. 3-*endo*-hidroxicineol  $^{13}\text{C-NMR}$
- A11. 3-*endo*-hidroxicineol  $^1\text{H-NMR}$
- A12. 2-oxocineol  $^{13}\text{C-NMR}$
- A13. 2-oxocineol  $^1\text{H-NMR}$
- A14. 3-oxocineol  $^{13}\text{C-NMR}$
- A15. 3-oxocineol  $^1\text{H-NMR}$
- A16. Acetato de 2-*exo*-hidroxicineol  $^{13}\text{C-NMR}$
- A17. Acetato de 2-*exo*-hidroxicineol  $^1\text{H-NMR}$

## ABREVIATURAS y ACRÓNIMOS

6–APA	Ácido 6-aminopenicilámico
AcOEt	Acetato de Etilo
AM	Agar malta
CFC	Compuestos clorofluorocarbonados
Cit P450	Citocromo P450
CM	Caldo malta
CPR	Citocromo P450 reductasa
CRL	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> ( <i>Candida rugosa lipase</i> )
CV	Coefficiente de variación (desviación estándar relativa porcentual)
d.i.	Diámetro interno
ee	Exceso enantiomérico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación ( <i>Food and Agriculture Organization</i> )
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	Detector de ionización de llama ( <i>Flame Ionization Detector</i> )
GC	Cromatografía gaseosa ( <i>Gas Chromatography</i> ) ó cromatógrafo de gases
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HLADH	Alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo ( <i>Horse Liver Alcohol Dehydrogenase</i> )
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance ( <i>High Performance Liquid Chromathography</i> )
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IBX	Ácido o-iodoxibenzoico
IPP	Isopentenilpirofosfato
MeOH	Metanol
MGAP	Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
MM	Medio mínimo mineral tamponeado (ver composición en Anexo I)
MM+Glu	Medio mínimo mineral tamponeado + 1% de glucosa (ver composición en Anexo I)
MS	Espectrometría de masas ( <i>Mass Spectrometry</i> ) ó espectrómetro de masas

NAD(P)H / NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamido adenín dinucleótido (fosfato), formas reducidas/oxidadas respectivamente
NMR	Resonancia magnética nuclear ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
OGM	Organismo genéticamente modificado
PCC	clorocromato de piridinio ( <i>Pyridinium Chlorochromate</i> )
PDA	Agar papa dextrosa ( <i>Potato Dextrose Agar</i> )
ppb	Partes por billón (uno en mil millones)
PPL	Lipasa de páncreas porcino ( <i>Pancreatic porcine lipase</i> )
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
SPME	Microextracción en fase sólida ( <i>Solid Phase Micro-Extraction</i> )
SAS	Sistema de Análisis Estadístico ( <i>Statistical Analysis System</i> )
TLC	Cromatografía en capa fina ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )
TSB	Caldo Triptona Soja ( <i>Tryptic Soy Broth</i> )
UdelaR	Universidad de la República
VLC	Cromatografía líquida a vacío ( <i>Vacuom Liquid Chromatography</i> )
VOC	Compuesto orgánico volátil ( <i>Volatile Organic Compound</i> )
YNB	Base nitrogenada para levaduras ( <i>Yeast Nitrogen Base</i> )
YNB+Glu	Medio YNB + 1% de glucosa (ver composición en Anexo I)

## RESUMEN

Las biotransformaciones son modificaciones químicas producidas sobre un sustrato, mediadas por organismos vivos o sus partes. Estas reacciones ocurren generalmente en condiciones suaves, a menudo son estereoselectivas, y muchas veces rinden productos de difícil obtención por síntesis clásica. Concomitante con esto generan menos residuos tóxicos y subproductos, comparadas con los procesos químicos tradicionales. Por ello son un área de desarrollo dentro de la química verde, y una interesante herramienta a aplicar en un contexto de desarrollo sustentable.

En este trabajo se buscó profundizar en aspectos químicos y metodológicos de las biotransformaciones de  $\alpha$ -limoneno y 1,8-cineol. Para ello se utilizaron hongos aislados de fuentes naturales: una cepa de *Aspergillus niger* para biotransformar el limoneno y una de *Aspergillus terreus* para el cineol. Ambos monoterpenos son subproductos de industrias nacionales. El  $\alpha$ -limoneno es el principal componente del aceite esencial de naranja y otros cítricos, sin contribuir en mayor medida a las propiedades organolépticas de la esencia. El 1,8-cineol es el componente mayoritario del aceite esencial de eucalipto, presente en las hojas de estos árboles, las que son un residuo de la creciente industria forestal. Mediante las bioconversiones se buscó obtener productos de mayor valor agregado *per se* o con potencial actividad biológica. En particular se estudió la potencialidad herbicida de los productos de biotransformación del cineol y derivados.

La bioconversión de  $\alpha$ -limoneno dio lugar a diferentes productos de oxidación, mayoritariamente alcoholes, con porcentajes de bioconversión relativamente bajos. Se estudió la recuperación de los productos, lográndose sistematizar el método de extracción del limoneno y sus productos de biotransformación desde el medio de cultivo. Del estudio de la influencia del medio de cultivo y la geometría del sistema de fermentación surgió que la biotransformación está notablemente condicionada por dichos parámetros. Mediante el uso de un inhibidor enzimático se logró una biotransformación regioespecífica del limoneno obteniéndose alcohol perílico, un potencial anticancerígeno, como único producto.

La biotransformación de 1,8-cineol arrojó cuatro alcoholes secundarios como principales productos, en todas las condiciones ensayadas. La geometría del sistema de fermentación no afectó significativamente el resultado de la biotransformación, pero el medio de cultivo resultó condicionante de la regio y estereoselectividad de la reacción. El principal producto fue el 2-*exo*-hidroxicineol, obtenido prácticamente como racemato en el medio YMPG y con un exceso enantiomérico del 96 % de su forma dextrógira en el medio CM. Sin embargo el rendimiento global de la bioconversión fue muy bajo (3,3 % en el día 7 de reacción).

Los alcoholes obtenidos fueron sometidos a esterificaciones enzimáticas buscando derivados con potencial fitotoxicidad. Se ensayaron dos lipasas y cuatro donadores de acilo. La esterificación con acetato de vinilo catalizada por una lipasa de *Candida rugosa* dio como único producto el (-)- acetato de 2-*exo*-hidroxicineol. La hidrólisis de este acetato dio lugar al (-)-2-*exo*-hidroxicineol con un exceso enantiomérico del 99 %.

Aplicando un bioensayo específico y mediante un tratamiento estadístico apropiado, se logró evaluar y comparar la potencial actividad herbicida del 1,8-cineol, sus productos de biotransformación fúngica y los derivados obtenidos por catálisis enzimática. La evaluación de la bioactividad se realizó midiendo tres efectos biológicos en dos especies vegetales: una monocotiledónea (*Triticum aestivum* L.) y una dicotiledónea (*Lactuca sativa* L). El (-)-2-*exo*-hidroxicineol presentó actividades inhibitorias en los tres parámetros evaluados, y selectivamente sobre la especie dicotiledónea. Por lo tanto dicho compuesto resulta un promisorio modelo para la obtención de un herbicida selectivo de origen natural.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Biotecnología y Biotransformaciones

### 1.1.1 Desarrollo sustentable y biotecnología

El desarrollo sustentable es desde hace algunos años uno de los desafíos más importantes que enfrenta la humanidad. Este concepto apunta a lograr procesos y productos económicamente viables en un contexto social y ecológico sustentable; es decir, satisfacer las necesidades del presente sin comprometer las capacidades para que las futuras generaciones satisfagan sus propias necesidades. En tal sentido, la aplicación de la biotecnología en varios sectores industriales ha traído beneficios tanto económicos como ambientales. Los avances biotecnológicos alcanzados en los últimos tiempos han influido en varios campos como ser el cuidado de la salud, la industria alimentaria, la agricultura y silvicultura, el cuidado del medio ambiente y la industria química en general. (Gavrilescu & Chisti, 2005).

Al hablar de biotecnología nos enfrentamos a un término sobre el que existen varias definiciones e interpretaciones. Comprende una amplia gama de actividades, y es quizás en esta amplitud donde radican algunos de los problemas de interpretación. En algunas ocasiones el término biotecnología se refiere a cualquier uso práctico de los organismos vivos; en otras se utiliza de modo más específico para referirse a las actividades que surgen por la modificación genética de dichos organismos (Muñoz, 1993; Arundel et al., 2007).

La Federación Europea de Biotecnología define a la biotecnología como “la integración de las ciencias naturales e ingeniería para llevar a cabo la aplicación de organismos, células, partes de las mismas y análogos moleculares en productos y servicios” (Federación Europea de Biotecnología, 1999). De esta definición bastante amplia se desprende el carácter multidisciplinario de la biotecnología, dado que su estudio abarca varios campos del conocimiento (Serafini et al., 2001; Bu'Lock, 1991).

No obstante ello, se suele clasificar a la biotecnología en dos categorías: la "biotecnología moderna" o "nueva biotecnología", la cual implica la utilización de la tecnología del ADN recombinante y técnicas de fusión celular para proporcionar a los organismos genéticamente modificados (OGM) las características deseadas; y la "biotecnología tradicional", que implica el uso de las técnicas convencionales que han sido empleadas durante muchos siglos, por ejemplo para la obtención de alimentos (Federación Europea de Biotecnología, 1994).

Gracias a la ingeniería genética se han alcanzado grandes logros como la producción de varias proteínas recombinantes humanas, como por ejemplo insulina humana, somatotropina y eritropoyetina a partir de OGM (Crueger & Crueger, 1990; Gavrilescu & Chisti, 2005), o la obtención de cultivos más resistentes a variaciones climáticas o ataque de fitopatógenos (Quecini & Carneiro Vieira, 2001). Por otro lado se hallan en el centro de un debate mundial los distintos aspectos legales y éticos que implica la manipulación de material genético. Más allá de ello, es a través de procesos biotecnológicos tradicionales como se continúan obteniendo la mayor cantidad de productos provenientes de la industria biotecnológica, siendo los principales: alcohol industrial, ácido cítrico, alimentos, saborizantes, antibióticos y vitaminas (Crueger & Crueger, 1990; Gavrilescu & Chisti, 2005).

### *1.1.2 Biotransformaciones y biocatálisis*

Muchas veces se suelen utilizar indistintamente términos como biotecnología, biotransformaciones y biocatálisis, pero el concepto de biotransformación (o bioconversión) resulta más restrictivo y se refiere generalmente a las modificaciones químicas producidas sobre un compuesto orgánico (sustrato) mediadas por organismos vivos (habitualmente microorganismos o cultivos celulares) o sus partes (Crueger & Crueger, 1990). Si bien pueden establecerse distinciones entre una conversión fermentativa típica y una biotransformación para la obtención de un producto de interés, ambos procesos son ejemplos del uso controlado de la catálisis biológica. Esto es, en términos generales, la explotación del poder catalítico de las enzimas promotoras del metabolismo celular de los organismos vivos sobre sustratos tanto endógenos como exógenos (Roberts et al., 1995). El éxito de esta metodología se sustenta en las propiedades de estos catalizadores naturales de actuar en condiciones suaves de reacción, en ser las reacciones en las que participan altamente regio y

estereoselectivas, y en proveer productos de difícil obtención por métodos tradicionales como la síntesis clásica o el aislamiento de metabolitos de su fuente natural (Moyna & Menéndez, 2001; de Carvalho, 2011). Concomitante con esto, los procesos biocatalíticos generan menos residuos tóxicos, emisiones y subproductos comparados con los procesos químicos tradicionales (Gavrilescu & Chisti, 2005).

Es así que la biocatálisis tiene un importante rol en la industria química moderna. Son varios los productos químicos que se obtienen por fermentaciones o implican alguna biotransformación durante su fabricación. Etanol, ácido cítrico, algunos aminoácidos, vitaminas y muchos antibióticos, son ejemplos de la aplicación industrial de las fermentaciones (Demain, 2000). En la industria farmacéutica son varias las aplicaciones de las bioconversiones, integrándose constantemente nuevos procesos biocatalíticos que reemplazan rutas sintéticas tradicionales (Tao & Xu, 2009). Un clásico y trascendente ejemplo es el de las hormonas esteroideas semisintéticas, donde la oxidación regioespecífica del sustrato mediada por microorganismos constituye un paso esencial en la síntesis de corticosteroides. Ácidos nucleicos, péptidos y otros polímeros se han logrado en forma sintética mediante la catálisis enzimática. (Crueger y Crueger, 1990; Roberts et al., 1995). Una mención particular merece la aplicación de catalizadores biológicos en la síntesis de agroquímicos, la cual ha crecido rápidamente en los últimos años (Aleu et al., 2006). No menos importante resulta la aplicación de las bioconversiones en procesos de remoción de contaminantes del ambiente (biorremediación) (Gavrilescu & Chisti, 2005).

### *1.1.3 Antecedentes*

Las biotransformaciones vienen siendo usadas para provecho humano desde tiempos inmemoriales, especialmente en lo relativo a la producción de alimentos. Cerveza, vino, pan, vinagre y derivados lácteos, son productos milenarios que implican durante su fabricación alguna transformación química mediada por microorganismos (Serafini et al., 2001). La microbiología industrial, principal fundamento de la biotecnología, nació así de desarrollos empíricos en la producción de alimentos y bebidas, principalmente la fabricación de cerveza y vino (Crueger & Crueger, 1990). A mediados del siglo XIX Pasteur descubre que el proceso de fermentación dependía de la acción de microorganismos. A partir de ahí, durante la segunda mitad de ese siglo, y a través de la industria cervecera en Inglaterra, es donde se producen los mayores

avances en microbiología y se desarrollan los conceptos y descubrimientos básicos en torno a la fermentación y catálisis. De esta manera, la aplicación de los avances logrados en esos campos a la conversión del azúcar en alcohol tornó a los procesos de fermentación más confiables y redituables, con el consecuente crecimiento de la industria cervecera. La aplicación de la tecnología de la fermentación más allá de esa industria en particular evolucionó de forma paulatina y natural (Roberts et al., 1995). En 1897, E. Buchner descubrió que la fermentación alcohólica puede producirse en ausencia de células vivas, demostrando que la misma se debe a la acción de las enzimas y no a la simple acción fisiológica de las células de la levadura (Melo & Cuamatzi, 2007).

Desde los albores del siglo XX y hasta la segunda guerra mundial, comienza la producción de diversos metabolitos microbianos. De este modo, se plantea la producción de ácido cítrico por fermentación, y se integra la biocatálisis a la química sintética dando lugar a productos de semisíntesis, como la de la vitamina C a partir de sorbitol llevada a cabo por Reichstein y Grössner en 1934 (Crueger & Crueger, 1990; Roberts et al., 1995).

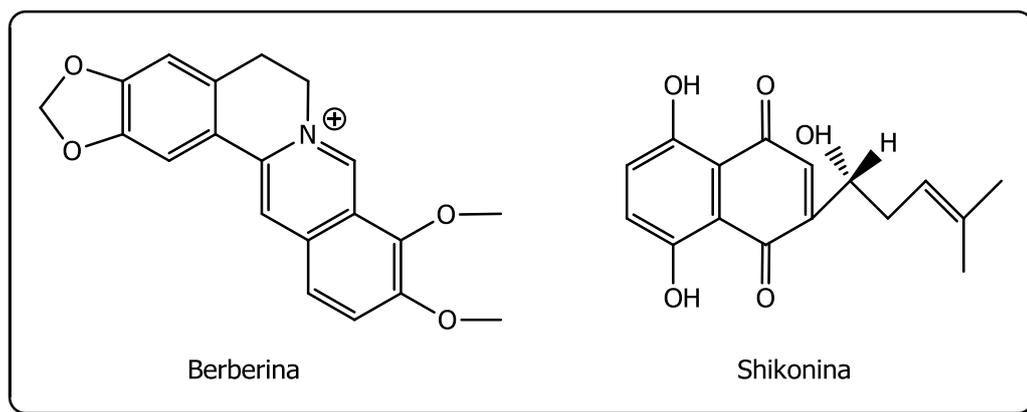
Luego de la segunda guerra mundial ocurre quizás el mayor avance en la bioproducción a raíz de la utilización de fermentaciones industriales a gran escala, especialmente en la fabricación de antibióticos, siendo la producción de penicilina por medio de un hongo filamentoso el hecho que marcó el comienzo de esta nueva etapa. Es por esos años que se introduce en la jerga científica el término biotecnología. Hasta la década del '60 los nuevos productos biotecnológicos fueron principalmente antibióticos, para pasar luego a la obtención a escala industrial de otros fármacos de gran importancia económica. Se logran entonces diversos avances en las tecnologías aplicadas: las técnicas de inmovilización de enzimas y células, el uso de fermentación continua para la producción de proteínas de bacterias y levaduras, etc..

Se llega así a finales del siglo pasado donde la biotecnología adquiere una nueva dimensión con la introducción de la ingeniería genética; y donde se manifiesta un explosivo interés por esta disciplina, el cual se mantiene en el comienzo del nuevo milenio y conlleva a un trabajo altamente multidisciplinario (Crueger y Crueger, 1990; Roberts et al., 1995; Serafini et al., 2001).

#### 1.1.4 Ventajas frente a la síntesis y al aislamiento desde una fuente natural

Las reacciones de biotransformación como método de obtención de nuevos productos, poseen diversas ventajas tanto frente al aislamiento de compuestos desde su fuente natural como frente a la química de síntesis tradicional (Menéndez, 1995).

La mayoría de los productos naturales usados como drogas derivan de plantas, y el aislamiento de estas sustancias resulta a menudo dificultoso y consume mucho tiempo. Por otra parte, varios son los factores que afectan el desarrollo de las plantas así como su contenido en metabolitos secundarios de interés: el clima (temperatura, fotoperíodo, lluvias, etc.), el tipo de suelo, la situación geográfica, la acción de insectos u otros patógenos. Además, los métodos y épocas de recolección y almacenamiento del material vegetal pueden también alterar el contenido de tales metabolitos (Evans, 1989; Samuelsson, 1992). Una alternativa biotecnológica que ha solucionado en parte algunos de estos inconvenientes es el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales. Esta técnica es de particular interés en la producción industrial de sustancias naturales derivadas de plantas, dado que se independiza la producción de las condiciones medioambientales, se evita el peligro de extinguir la planta de interés y puede realizarse en cualquier lugar y estación. Visto que existen varios obstáculos a superar previo a la producción industrial de compuestos útiles por esta técnica (bajos rendimientos, velocidades de crecimiento bajas, etc.), son pocas las sustancias que se obtienen y comercializan de las muchas que están bajo estudio. Entre ellas se pueden citar el pigmento shikonina, derivado de plantas de la especie *Lithospermum erythrorhizum*, el cual se utiliza en ciertas enfermedades de la piel, y el alcaloide berberina, proveniente de plantas de la especie *Coptis japonica*, usado en el tratamiento de ciertos trastornos gastrointestinales (Figura 1). Además de la obtención de las sustancias endógenas propias de cada especie, los cultivos celulares de plantas también pueden resultar apropiados para la realización de biotransformaciones al agregar el sustrato en estudio al medio de cultivo. De esta manera se han investigado extensamente la producción de diferentes drogas como glicósidos cardiotónicos, antitumorales, alcaloides, etc. (Misawa, 1994; Moyna y Menéndez, 2001; Samuelsson, 1992).



*Figura 1. Dos metabolitos vegetales obtenidos por técnicas de cultivo celular.*

La síntesis “de novo” tropieza a menudo con una serie de inconvenientes, siempre y cuando sea posible diseñar una ruta sintética para el producto deseado. Entre ellos, las múltiples etapas, la utilización de reactivos costosos y los bajos rendimientos son obstáculos frecuentes a los que se enfrenta un químico orgánico al realizar una síntesis. Pero son tres las dificultades principales de la síntesis tradicional que pueden encontrar solución en las reacciones de biocatálisis. Una es que el desarrollo de productos químicos implica generalmente la utilización de reactivos, solventes y procesos muy a menudo no amigables con el medio ambiente. Un segundo inconveniente es que la síntesis clásica de productos quirales deriva en la obtención de mezclas racémicas, por lo que a los problemas mencionados se debe adicionar la necesidad de una posterior separación de estos estereoisómeros, previo a su utilización en la industria. En tercer término cabe mencionar que las condiciones de reacción a menudo empleadas son lo suficientemente drásticas como para no permitir trabajar con ciertos reactivos o productos lábiles a los pH o temperaturas requeridas.

Evaluaciones ambientales y consideraciones económicas han llevado a que la industria química se preocupe cada vez más por adoptar nuevas tecnologías que sintonicen con una actividad protectora del medio ambiente. Es en este contexto que unos años atrás fue introducido el concepto de “química verde” o “química sustentable”, la cual se define como: “la utilización de un conjunto de principios que reduzcan o eliminen el uso o la generación de sustancias peligrosas en el diseño, fabricación y aplicación de productos químicos” (Anastas & Warner, 1998). Dentro de la química verde una de sus áreas de desarrollo es el “empleo de procesos naturales”, lo que implica el uso de biosíntesis, biocatálisis y transformaciones químicas basadas en

biotecnología para la selectividad y eficiencia (Tundo et al., 2000). De esta manera se localiza a las biotransformaciones en la interfase entre los procesos de fermentación y la química basada en el petróleo, catalogándose las como procesos que amplían el alcance de las herramientas para la bioconversión de compuestos orgánicos en productos funcionalizados (Held et al., 2000). Tanto en la industria farmacéutica como agroquímica es cada vez mayor el desarrollo de procesos "verdes", debido a la aplicación de bioconversiones en los mismos (Aleu et al., 2006; Tao & Xu, 2009).

La quiralidad es la propiedad de una molécula de tener una imagen especular no superponible, y su ocurrencia en la naturaleza es tan notable como lo son las diferentes propiedades de los distintos enantiómeros. Los productos naturales al generarse por una determinada ruta biosintética generalmente presentan una sola de las formas enantioméricas, y por lo general los enantiómeros poseen actividades biológicas diferentes (Evans, 1989). A menudo la quiralidad determina las acciones y comportamientos de las moléculas de manera insospechada; el simple hecho de que dos enantiómeros posean distinta configuración de un único centro estereogénico implica en muchos casos que dichas moléculas tengan efectos biológicos disímiles, como se ejemplifica en la Figura 2 (Faber, 2000; Koskinen, 1993; Sekhon, 2009). Como todos los grandes eventos bioquímicos en un organismo están gobernados por enzimas, y estas son en su mayoría altamente selectivas con respecto a la quiralidad de un sustrato, es obvio que los enantiómeros de un determinado compuesto bioactivo como un fármaco o un agroquímico, puedan causar efectos biológicos diferentes (Crossley, 1992). La necesidad de sintones homoquirales y la disponibilidad de tales compuestos para síntesis es cada vez más importante, dado que el requerimiento de productos finales ópticamente puros es cada vez más un prerequisite de las formulaciones farmacéuticas y agroquímicas (Patel, 2008; Sekhon, 2009).

La obtención de compuestos homoquirales puede realizarse por diferentes métodos: aislamiento desde su fuente natural (ya visto), síntesis asimétrica, resolución de mezclas racémicas, y procesos de biotransformación (Koskinen, 1993). A su vez, la resolución de mezclas racémicas, esto es, la separación de una mezcla conteniendo cantidades iguales de un par de enantiómeros, se basa en relaciones diastereoméricas y puede realizarse de varias formas. Una de estas alternativas, como en la obtención directa de compuestos ópticamente puros por bioconversiones, implica el uso de enzimas, explotando así su propiedad de catalizadores asimétricos, altamente eficientes

y selectivos. La aplicación de las biotransformaciones en la síntesis de compuestos con actividad farmacológica y agroquímica se ha expandido rápidamente en los últimos años, lo que constituye un claro ejemplo de la utilidad de esta herramienta (Aleu et al. 2006; Patel, 2008). Como las enzimas derivan de L-aminoácidos naturales ópticamente puros, son compuestos homoquirales y poseen diferente afinidad frente a dos enantiómeros de un determinado sustrato, lo que se traduce en su enantioselectividad. La razón es que el complejo entre la enzima y uno de los enantiómeros guarda una relación diastereomérica con el complejo de la enzima con el otro enantiómero, y por lo tanto dichos complejos poseen diferentes propiedades fisicoquímicas. Esta enantioselectividad también puede observarse en el comportamiento de muchas enzimas frente a estructuras proquirales, esto es, la capacidad de distinguir entre átomos y grupos enantiotópicos, o realizar adiciones estereoespecíficas sobre caras estereotópicas (Carey & Sundberg, 1990). La capacidad de discriminar entre las distintas características estructurales (regioselectividad) y estereoquímicas (estereoselectividad) de los sustratos determina la utilidad sintética de las enzimas. Por ejemplo, la deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH) es una enzima ampliamente estudiada que cataliza interconversiones estereoespecíficas  $C=O \rightleftharpoons C-OH$  de un amplio rango de sustratos (Jones, 1986). La reducción de decalindionas en sus respectivas hidroxidecalonas catalizada por esta enzima (Esquema 1) es un claro ejemplo de la enantio y regioespecificidad de esta clase de reacciones (Dodds & Jones, 1988). La molécula de sustrato presenta elementos de simetría y por lo tanto es aquiral, pero contiene dos grupos carbonilo enantiotópicos que la hacen una molécula proquiral. La reacción enzimática es enantioespecífica ya que el ataque por hidruro ocurre sobre la cara *re* del grupo carbonilo, obteniéndose de esta forma únicamente el enantiómero (-) 3S. También es una reacción regioespecífica desde el momento que solo uno de los dos carbonilos sufre la reducción.

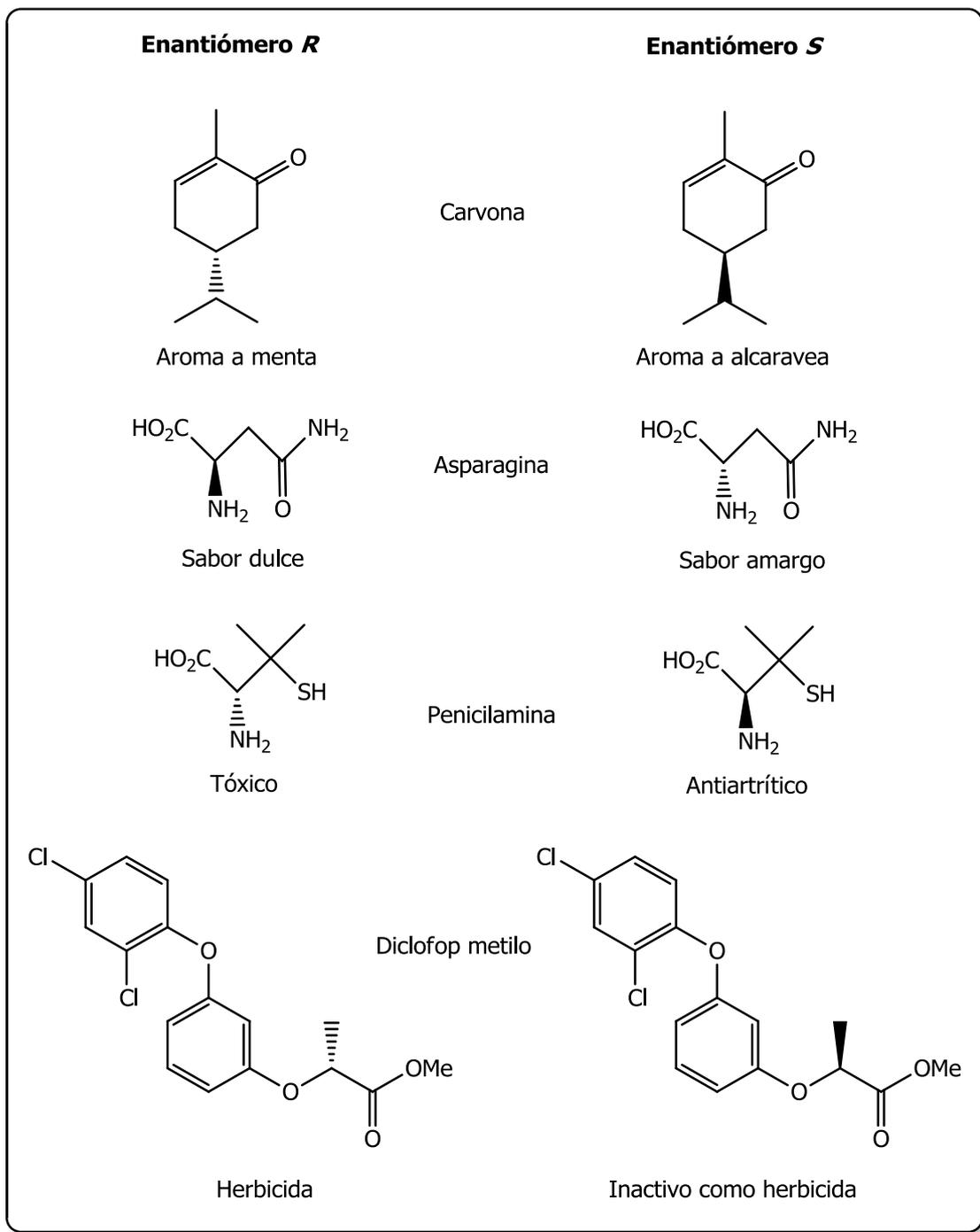
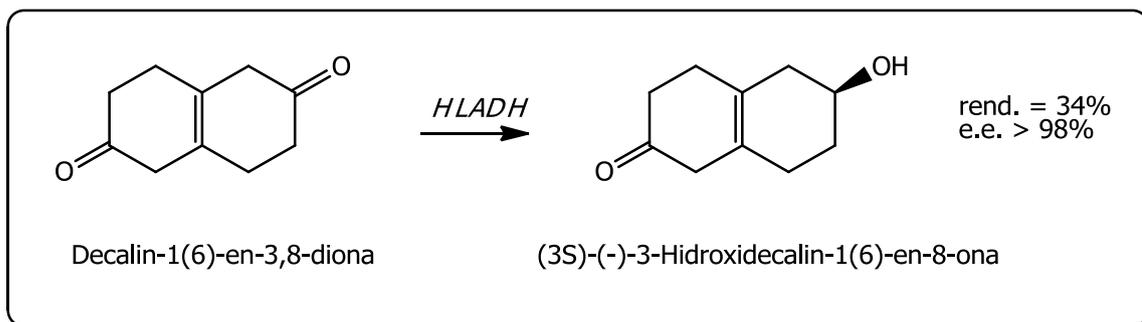
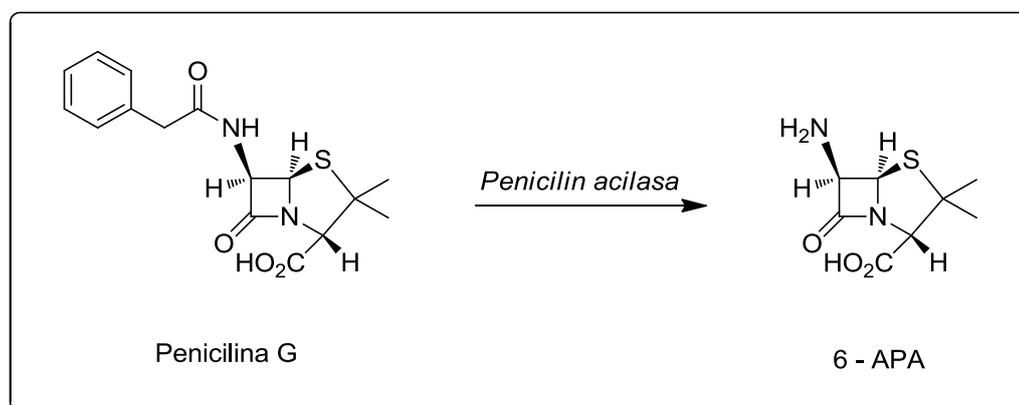


Figura 2. Efectos biológicos diferentes de algunos enantiómeros.



*Esquema 1. Reducción enzimática enantio y regioespecífica de una decalindiona.*

Además de la ventaja de la formación de compuestos homoquirales, el uso de enzimas como catalizadores asimétricos se realiza en condiciones de reacción suaves, por lo general a temperaturas cercana a la ambiente y a pH que rondan la neutralidad. Esto permite realizar reacciones sobre compuestos que se descompondrían en condiciones convencionales. El punto es relevante, por ejemplo, en la conversión de penicilinas naturales (como la Penicilina G) en el ácido 6-aminopenicilámico (6-APA), precursor de la semisíntesis de muchas penicilinas de amplio espectro (Esquema 2). El núcleo  $\beta$ -lactámico es muy inestable a pH mayores de 9 y menores a 2, lo que impide una simple hidrólisis ácida o básica para obtener el núcleo 6-APA. Mediante la utilización de una cepa de *E. coli* productora de una penicilin acilasa (penicilin amidohidrolasa, EC 3.5.1.11) que hidroliza específicamente la amida exocíclica en condiciones suaves (pH en el entorno de 8), dicha reacción es posible de llevarse a cabo (Roberts et al., 1995; Duggleby et al., 1995).



*Esquema 2. Hidrólisis enzimática de la bencilpenicilina natural para obtener el precursor 6-APA de penicilinas semisintéticas.*

Todas estas ventajas hacen que los procesos enzimáticos sean considerados como una herramienta esencial en un contexto de desarrollo sustentable, y por tanto están en permanente investigación y desarrollo (Gavrilescu & Chisti, 2005).

#### 1.1.5 Generalidades de las enzimas usadas en biocatálisis

Cualquiera que fuera la estrategia o metodología para llevar a cabo una biotransformación, son en definitiva las enzimas, solas o formando parte de toda la maquinaria celular, las que hacen posible realizar la bioconversión. En comparación con otros catalizadores, las enzimas son excepcionales en tres aspectos: (Melo & Cuamatzi, 2007):

1. Son extremadamente versátiles y catalizan un amplio rango de reacciones en condiciones suaves (temperaturas por debajo de 100 °C, presión atmosférica y valores de pH cercanos a 7).
2. Pueden ser catalizadores altamente eficientes, llegando a aumentar la velocidad de reacción hasta  $10^{12}$  veces respecto de la reacción no catalizada.
3. Son generalmente muy selectivas en términos del tipo de reacción catalizada y con respecto a la estructura y estereoquímica del sustrato y del producto (elevada regio y estereoselectividad).

Muchas enzimas son en realidad proteínas puras, sin embargo, otras están formadas por una proteína, llamada *apoenzima*, y un componente no proteico, el *cofactor*, necesario para la actividad catalítica. La enzima completa, constituida por la apoenzima y el cofactor, recibe el nombre de *holoenzima*. Si el cofactor está unido firmemente a la apoenzima, constituye un *grupo prostético*. Dado que la reacción catalizada es la propiedad específica que distingue una enzima de otra, es lógico que esto se utilice como base para la nomenclatura y clasificación de enzimas. De esta manera un comité de la Unión Internacional de Bioquímica establece un sistema de asignación de un código de cuatro números a cada enzima individual; de acuerdo a esta clasificación se establecen seis grupos principales de enzimas (Tabla 1) (Melo & Cuamatzi, 2007). De estos las oxidoreductasas, las hidrolasas y las liasas son las más utilizadas en la actualidad por los químicos orgánicos (Tabla 2), siendo las hidrolasas la clase enzimática de mayor disponibilidad comercial (Faber, 2000; Leresche & Meyer, 2006). Son también hidrolasas, como proteasas, amilasas, lipasas y celulasas, las de mayor aplicación a nivel industrial. Un 75% del mercado de las enzimas está

relacionado con esta clase enzimática y su aplicación en las industrias de alimentos, detergentes y procesamiento de almidón. Tanto las hidrolasas como las demás clases enzimáticas también tienen una aplicación creciente en otras industrias como la farmacéutica, química fina, textil, agroquímica, etc. (Gavrilescu & Chisti, 2005).

<b>Categoría</b>	<b>Tipos de reacciones que catalizan</b>
1. <i>Oxidoreductasas</i>	Oxidación-reducción (transferencia de electrones). Ejs.: Hidroxilaciones, interconversión de cetonas con alcoholes.
2. <i>Transferasas</i>	Transferencia de grupos acilo, fosforilo, amino, azúcar, etc., de una molécula a otra.
3. <i>Hidrolasas</i>	Hidrólisis de ésteres, péptidos, glicéridos, anhídridos, etc.: transferencia de grupos funcionales al agua.
4. <i>Liasas</i>	Adición a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por eliminación (C=C, C=N, C=O, etc.).
5. <i>Isomerasas</i>	Reacciones de isomerización (migración de enlaces C=C, racemizaciones <i>cis</i> – <i>trans</i> , etc.).
6. <i>Ligasas</i>	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la ruptura de ATP.

*Tabla 1. Clasificación de las enzimas según la Unión Internacional de Bioquímica.*

<b>Clase enzimática</b>	<b>2003</b>	<b>2005</b>
1. <i>Oxidoreductasas</i>	28 %	24 %
2. <i>Transferasas</i>	3 %	6 %
3. <i>Hidrolasas</i>	58 %	55 %
4. <i>Liasas</i>	10 %	12 %
5. <i>Isomerasas</i>	1 %	2 %
6. <i>Ligasas</i>	0 %	1 %

*Tabla 2. Distribución de los trabajos presentados en los simposios Biotrans llevados a cabo en Olomouc (2003) y Delft (2005), en base a la clase enzimática implicada en los mismos (Leresche & Meyer, 2006).*

### *1.1.6 Estrategias de biotransformación: células enteras vs. enzimas aisladas.*

Existen básicamente dos estrategias para llevar a cabo biotransformaciones: utilizar enzimas aisladas puras o parcialmente purificadas, o usar células enteras (Roberts et al., 1995).

El uso de enzimas aisladas como catalizadores por lo general requiere aparatos simples, permitiendo que la reacción pueda ser realizada en pequeñas cantidades de agua o solvente, por lo que la temperatura y pH de la solución son de fácil control. En este caso además existe una alta especificidad para la reacción seleccionada, por lo que raramente se observan reacciones secundarias y subproductos. Esta metodología también permite un work-up simple, y los cosolventes orgánicos son generalmente bien tolerados. Con ciertas enzimas aisladas (como por ejemplo lipasas) es posible realizar reacciones en medios no acuosos, lo que ha brindado nuevas posibilidades en para la obtención de productos de diversa utilidad (Reetz, 2002). La principal desventaja de los preparados de enzimas intracelulares aisladas es lo costoso de la operación en tiempo y dinero parte del cual, en ciertos casos, es debido a la necesidad de adicionar cofactores enzimáticos, por lo que se hace imprescindible su recuperación.

Como contrapartida los sistemas de biotransformación mediante células enteras tienen como principal ventaja el ser baratos y que todas las entidades necesarias para la biocatálisis (enzimas, cofactores, etc.) se hallan dentro de la célula. Entre las principales desventajas cabe mencionar que el work-up es engorroso, luego que la reacción se completa es necesario eliminar las células por filtración o centrifugación. El material de vidrio requerido es voluminoso, en este tipo de operaciones generalmente se utilizan grandes cantidades de agua, por lo tanto los productos finales solubles en agua son difíciles de extraer de la solución. Por otro lado hay que tener cuidado de no perder los productos lipofílicos que se pueden adherir a los restos celulares. También cabe mencionar que al utilizar la célula entera, pueden ocurrir reacciones secundarias tanto con el sustrato como con el producto de la reacción deseada. Por último, el agregado de cosolventes no siempre es tolerado ya que puede afectar las enzimas ligadas a membranas.

Al trabajar con células enteras (particularmente microorganismos), a menudo se denomina fermentación o proceso fermentativo a cualquier transformación mediada por

un microorganismo, independientemente del tipo de metabolismo realizado en el proceso. Del mismo modo se llama fermentador (o biorreactor) al dispositivo donde se lleva a cabo la bioconversión. Este punto de vista más bien industrial no debe confundirse con el concepto bioquímico estricto de fermentación, el cual hace referencia a un proceso metabólico donde se produce ATP en ausencia de un aceptor externo de electrones, y en el cual la regeneración de cofactores ocurre por reducción de un compuesto orgánico generalmente producido durante el mismo proceso (Silveira & Berbert, 2002).

La decisión final sobre la forma en que el biocatalizador debería usarse (enzima o célula), depende de varios factores como ser: el tipo de reacción, la escala en la que la biotransformación ha de ser realizada, y si hay necesidad de cofactores. Muchas veces se opta por el uso de células enteras como metodología de biotransformación por problemas que pueden surgir con el uso de ciertas enzimas, especialmente las intracelulares. Entre los mismos se puede citar el hecho de que muchas de las enzimas potencialmente útiles son inestables fuera del ambiente celular (pérdida de la conformación de la forma activa). Además pueden ser sensibles al ataque hidrolítico de otras enzimas (particularmente proteasas) que son liberadas durante los procesos de fraccionamiento celular. Por otra parte, tal como se mencionó, el hecho de que muchas enzimas sean cofactor dependiente y el elevado costo del aislamiento determina que la metodología con célula entera sea de elección. Cuando no se encuentran estos inconvenientes es posible trabajar con las enzimas aisladas. Esto ocurre con la mayoría de las enzimas extracelulares, las que son casi en exclusividad hidrolasas (por ejemplo lipasas) (Roberts, 1995). Estas no requieren cofactores y son muy estables, llevando a cabo incluso reacciones en medios no acuosos.

#### *1.1.7 Clasificación de biotransformaciones*

Desde el punto de vista del origen del sustrato se pueden observar dos tipos de biotransformaciones: xenobióticas y biosintéticas. Las biotransformaciones xenobióticas son aquellas en las cuales un producto es transformado por células que no lo producen, y en las que predominan los mecanismos de oxidación mediante sistemas de oxigenasas. Por otro lado, en las biotransformaciones biosintéticas un producto natural es reconocido biológicamente como integrante de un proceso biosintético y por lo tanto es incluido en él y biotransformado. (Menéndez, 1995)

En base al tipo de reacción química que implican, las biotransformaciones se pueden agrupar en las siguientes categorías: oxidaciones, reducciones, hidrólisis, condensaciones, isomerizaciones, formación de nuevos enlaces (particularmente C-C), introducción de hetero-funciones. Las reacciones de oxidación son particularmente útiles en la producción industrial (Crueger & Crueger, 1990). Las óxidorreducciones se llevan a cabo generalmente con microorganismos a célula entera, y dichas reacciones implican habitualmente el uso de cofactores enzimáticos. Este tipo de bioconversiones son menos sencillas de realizar que, por ejemplo, las reacciones de hidrólisis, no obstante lo cual existen algunos procesos de relevancia comercial como la antes mencionada modificación de progesterona, la preparación de intermediarios de la vitamina E, la obtención del antihelmíntico oxamniquina, etc. (Roberts et al., 1995).

Las enzimas empleadas en las reacciones redox se clasifican en tres categorías: deshidrogenasas, oxidasas y oxigenasas (Faber, 2000). Las primeras son ampliamente utilizadas en la reducción de aldehídos, cetonas y alquenos, ya que dependiendo del patrón de sustitución del sustrato dichas reacciones pueden brindar una potencial conversión de un sustrato proquiral en un producto quiral; pero la reacción inversa (por ejemplo la conversión de un alcohol en el respectivo aldehído), usualmente deriva en la pérdida de un centro quiral, por lo que su uso es de poca aplicación. Las oxidasas catalizan reacciones que implican una activación directa del oxígeno molecular, las que aplicadas en sistemas biocatalíticos, proporcionan un efectivo método de oxifuncionalización (particularmente asimétrica) y rutas para la formación controlada y predecible de productos oxi- e hidroxilados, así como polímeros (Burton, 2003). Las oxigenasas catalizan la incorporación de uno (monooxigenasas) o dos (dioxigenasas) átomos del oxígeno molecular sobre el sustrato, siendo las biotransformaciones que las implican muy importantes por tres razones principales (Li et al., 2002): 1. las reacciones muchas veces son imposibles de lograr por métodos químicos clásicos, o, sí lo son, no tienen la regio o estereoselectividad requerida; 2. utilizan O<sub>2</sub>, un oxidante barato y natural en contraste con los oxidantes químicos tóxicos, 3. pueden usarse tanto para preparar sintones quirales como para modificar productos naturales con actividades biológicas. Consecuentemente el uso de oxigenasas se ha convertido en un importante método para alcanzar metas sintéticas, lo cual es particularmente significativo en el campo de los esteroides y terpenos, dada la relevancia industrial de los productos obtenidos (de Raadt & Griengl, 2002).

Como se verá más adelante, en el presente trabajo predominan las biotransformaciones oxidativas llevadas a cabo por células enteras de hongos filamentosos, sobre xenobióticos de estructura terpénica. No obstante, también se explota el poder catalítico de determinadas lipasas comerciales para llevar a cabo reacciones de esterificación en un medio no acuoso. Como se mencionó, las hidrolasas son las enzimas de mayor distribución comercial. Debido a ello y a que las reacciones que catalizan son sencillas, son las enzimas más explotadas para biotransformaciones (Roberts, 1995). En particular varias lipasas han demostrado gran actividad biocatalítica al poder llevar a cabo reacciones inversas a la hidrólisis de ésteres. Estas reacciones de esterificación o transesterificación ocurren en solventes orgánicos conteniendo sólo una cantidad de agua suficiente para mantener la estructura tridimensional de la enzima. El éxito de varias bioesterificaciones realizadas de esta forma radica en la elevada estereoselectividad de las reacciones.

#### *1.1.8 Metodología general para la biotransformación mediante microorganismos.*

Al pretender realizar una bioconversión de un sustrato mediante microorganismos pueden establecerse una secuencia de etapas que casi invariablemente se cumplirán (Menéndez et al., 2005):

- Selección y mantenimiento del microorganismo
- Método de utilización del agente biotransformador
- Adición del sustrato
- Ajuste de los parámetros de cultivo
- Recuperación y purificación de los productos
- Seguimiento y análisis de la bioconversión

#### *Selección y mantenimiento del microorganismo*

El microorganismo biotransformador es el principal factor determinante del éxito o fracaso de un proceso de biotransformación (Elander, 2001). La búsqueda de agentes biotransformantes se realiza generalmente mediante la aplicación de dos estrategias: búsqueda en una colección de cultivos o aislamiento de hábitats naturales (Vezina, 1991). En la naturaleza es donde se encuentra la mayor diversidad genética, por lo que

la mayoría de las veces la búsqueda de nuevos productos implica hacer aislamientos de suelo o de material vegetal en descomposición, donde puedan existir los organismos que posean las propiedades que están siendo buscadas. Cuando lo que se busca es un organismo capaz de utilizar un sustrato particular, el primer paso es aislar de sitios adecuados organismos capaces de usar el sustrato seleccionado (Carlile & Watkinson, 1994). Un procedimiento habitual es utilizar la técnica de enriquecimiento selectivo, en la cual la muestra natural se inocula en un medio líquido con el compuesto a biotransformar como única fuente de carbono y energía (Roberts et al., 1995). Luego de realizar varios subcultivos sucesivos se aíslan el o los microorganismos capaces de crecer y metabolizar el sustrato agregado.

Una vez obtenido un cultivo puro del microorganismo de interés, se debe conservar la cepa en estado viable evitando cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos, que puedan dar lugar a una pérdida total o parcial del potencial metabólico por el cual fue seleccionado. A grandes rasgos los métodos de conservación se pueden clasificar en tres clases (Smith & Onions, 1994): métodos de crecimiento continuo, secado, y de minimización del metabolismo.

#### *Métodos de utilización del agente biotransformador*

En general pueden ser consideradas cuatro formas principales de utilizar un catalizador microbiano (Roberts et al., 1995):

- cultivos en crecimiento
- células en reposo (resting cells)
- cultivo de esporas
- cultivos inmovilizados

Sin embargo no todas las técnicas son aplicables a todos los tipos de microorganismo. Por ejemplo el uso de cultivos de esporas está restringido a aquellos microorganismos que las producen en gran número.

La biotransformación llevada a cabo por cultivos en crecimiento es el procedimiento más simple, y quizás por ello el más difundido. Básicamente consiste en hacer crecer al microorganismo en un medio líquido adecuado, bajo ciertos parámetros establecidos controlados (temperatura, agitación, etc.). En determinado momento se agrega el sustrato a transformar y se continúa incubando hasta desaparición del mismo

y/o cese de la bioconversión. La forma más sencilla de realizar la fermentación es en matraces Erlenmeyer, dispuestos por lo general en un agitador orbital con control de temperatura. Una alternativa es el uso de fermentadores a escala de laboratorio (1 o 2 litros).

Las células en reposo se obtienen a partir de un medio nutriente en el momento en que la actividad enzimática es máxima. Dicha biomasa se obtiene por centrifugación o filtración del medio de crecimiento líquido y las células así obtenidas se resuspenden en agua destilada, buffer o medio mínimo (sin los nutrientes necesarios para el crecimiento). Algunas veces se pueden utilizar mezclas de solventes no acuosos para realizar la biotransformación (Fontanille et al., 2002). Por lo general cuando se utiliza esta técnica se reducen los tiempos de reacción y el work-up es menos engorroso que para una biotransformación realizada en un medio rico.

Varios grupos de microorganismos (fundamentalmente hongos filamentosos y algunas bacterias) poseen la capacidad de formar esporas. Estas, si bien muchas veces suelen considerarse metabólicamente inertes, pueden realizar una amplia variedad de biotransformaciones (Wolken et al., 2003). Las esporas presentan varias ventajas como biocatalizadores frente a las células vegetativas, como ser resistencia a la temperatura, desecación, radiación y compuestos tóxicos. Al igual que con las células en reposo, las biotransformaciones se llevan a cabo suspendiendo las esporas en un medio no nutriente (agua o buffer), la formación de espuma es mínima y la extracción de los productos es eficiente (Vezina, 1991). Una vez utilizadas las esporas se pueden lavar y volver a usarse o almacenarse en freezer por varios meses (Roberts et al., 1995).

Algunos agentes biotransformadores pueden ser inmovilizados sobre un soporte sólido adecuado en vez de estar suspendidos en un medio líquido. La técnica se basa en hacer crecer al microorganismo hasta un óptimo potencial de la actividad deseada (previamente determinado), separar y lavar el material celular, para luego inmovilizarlo sobre un material adecuado como agar, poliacrilamida, etc. (Roberts et al., 1995; Vezina, 1991). La ventaja de este método es que a menudo una preparación de células inmovilizadas puede usarse varias veces, y el work-up de la bioconversión resulta más sencillo que para el método de cultivos en crecimiento. Entre los principales inconvenientes se puede mencionar que, comparado con un volumen equivalente de células en crecimiento la actividad catalítica es menor, y en algunos casos la

estereoquímica de la biotransformación puede estar afectada por la naturaleza de la inmovilización (Roberts et al., 1995).

### *Agregado del sustrato*

La forma más sencilla de agregar el compuesto a biotransformar es añadirlo directamente al medio de reacción, en el momento en que existe una concentración adecuada de células activas del microorganismo. No obstante, pueden existir algunas dificultades derivadas de la naturaleza del sustrato, como ser: toxicidad del mismo hacia al microorganismo, baja solubilidad y/o inestabilidad en agua, y evaporación en el caso de compuestos volátiles (de Carvalho et al., 2000, Pescheck et al., 2009).

Realizando ensayos de crecimiento del microorganismo elegido con distintas concentraciones del compuesto a transformar, se obtiene la máxima concentración del sustrato que no resulta tóxica a la célula biocatalizadora (Menéndez et al., 2005). La baja solubilidad en agua puede superarse agregando el sustrato disuelto en el mínimo volumen posible de un solvente orgánico miscible con agua (de baja toxicidad para el microorganismo de trabajo); o agregando un tensoactivo que favorezca la dispersión del sustrato en el medio acuoso (Roberts et al., 1995). La elevada presión de vapor del sustrato es una característica que dificulta su utilización, desde el momento que existirán pérdidas por volatilización. Al respecto se han desarrollado algunas técnicas alternativas a la hora de poner en contacto el sustrato con el agente biotransformador, como el agregado del mismo en fase gaseosa haciéndolo burbujear en el medio (Pescheck et al., 2009), o empleando un reservorio del compuesto volátil el cual satura lentamente el medio de cultivo (Menéndez et al., 2000).

### *Ajuste de los parámetros de cultivo*

En general los productos de una biotransformación se darán en forma óptima bajo condiciones bastante específicas. Habitualmente éstas no serán las mismas que para obtener mayor biomasa. De hecho, la habilidad para explotar las respuestas celulares a las distintas condiciones externas es un recurso fundamental de la biotecnología (Bu'Lock, 1991). Parámetros nutricionales y ambientales condicionarán el número de células viables, la cantidad de moléculas de la enzima de interés por célula, y la actividad de dicha enzima, y por lo tanto pueden afectar la calidad y cantidad de

bioconversión (Roberts et al., 1995). Dichos parámetros influyen en el crecimiento de los microorganismos, pudiendo darse cambios morfológicos concomitantes con variaciones metabólicas. De esta manera es factible que bajo distintas condiciones, un mismo microorganismo provoque diferentes cambios en la estructura de un sustrato, ya sea en la cantidad o el tipo de productos obtenidos. Por ello, luego de elegido el microorganismo biotransformador se deberían identificar las variables que están implicadas en el proceso de biotransformación para lograr su optimización (Menéndez et al., 2005). En general estas variables son: medio de cultivo, temperatura, pH, agitación y geometría del sistema (que condicionan la disponibilidad de O<sub>2</sub>), concentración de sustrato y tiempo de reacción.

### *Recuperación y purificación de los productos*

Cualquier proceso de producción solamente se lleva a cabo con utilidad cuando los productos de interés son recuperados en una forma provechosa (Bu'Lock, 1991). Generalmente un primer paso implica la separación de la biomasa (células o micelio) del medio de cultivo donde estarían disueltos los productos. Esto puede realizarse por centrifugación o filtración. Luego es usual obtener los productos de biotransformación desde el medio líquido mediante extracción con solventes orgánicos. De las condiciones de la misma dependerán los rendimientos y la recuperación de los productos. No obstante, la extracción se puede realizar también sobre todo el cultivo (o sea, biomasa más medio de cultivo). Cuando se realiza la extracción total se puede obtener el dato de todo el sustrato que fue biotransformado y de cuanto permanece intacto. Cuando se realiza la extracción del medio de cultivo y las células por separado se puede llegar a obtener información sobre si el sustrato o sus productos son retenidos en la biomasa, como por ejemplo por el micelio de un hongo filamentoso (Onken & Berger, 1999a). Otros métodos de extracción más específicos pueden utilizarse dependiendo de las características de los compuestos a recuperar. Por ejemplo la extracción mediante destilación por arrastre con vapor de agua puede resultar una herramienta adecuada para la extracción de compuestos volátiles (Menéndez et al., 2005).

Los productos de biotransformación obtenidos se separan y purifican por cromatografía, u otros métodos adecuados de acuerdo a sus características (Vezina, 1991).

### *Seguimiento y análisis de la bioconversión*

Las técnicas e instrumentos utilizados en el seguimiento y análisis de una biotransformación son los de uso común en el seguimiento de cualquier reacción en química orgánica (Menéndez et al., 2005). De esta manera, quizás la cromatografía en capa fina (TLC) sea la técnica más empleada a la hora de seguir un proceso de biotransformación. No obstante, también técnicas instrumentales como la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) o la cromatografía gaseosa (GC) son de uso relativamente frecuente para el seguimiento y análisis de la bioconversión. Otras técnicas más específicas son utilizadas en ocasiones particulares, como es el caso de la microextracción en fase sólida (SPME) para el análisis de productos de biotransformación volátiles (Demyttenaere et al., 2004).

Como se mencionó, una de las ventajas de ocurrencia frecuente de las reacciones de biotransformación es la elevada estereoselectividad con la que transcurren (Secc. 1.1.4). En estos casos resulta imprescindible para el análisis de dichas bioconversiones la medida del poder rotatorio de los productos aislados, así como la separación y cuantificación de los enantiómeros implicados. Esto último puede llevarse a cabo mediante técnicas cromatográficas empleando fases estacionarias quirales. Por ejemplo, en cromatografía gaseosa la utilización de columnas quirales acopladas a columnas no quirales (tándem GC-GC), permiten determinar la distribución enantiomérica de la mezcla a analizar (Mondello et al., 1998), y los consecuentes excesos enantioméricos.

Una vez aislados y purificados los productos, sus estructuras se elucidan por métodos espectroscópicos clásicos como ser resonancia magnética nuclear (NMR), espectroscopia infrarroja (IR), espectroscopia ultravioleta (UV), y espectrometría de masas (MS).

## 1.2 Los hongos como agentes biotransformadores

### 1.2.1 Hongos y biotecnología

Las biotransformaciones de productos naturales se pueden realizar utilizando prácticamente cualquier tipo de ser vivo, animales o plantas superiores, órganos, tejidos, células aisladas o microorganismos. Pero es la biocatálisis microbológica la más extendida al realizar bioconversiones con células enteras, permitiendo así el acceso a una variada serie de actividades enzimáticas que representan reacciones de gran especificidad. Una célula microbiana constituye el organismo entero, y debe ser capaz de llevar a cabo todas las actividades que le caracterizan, le permiten evolucionar y continuarán permitiéndole sobrevivir. Debido a su alta relación superficie/volumen los microorganismos son capaces de crecer rápido y tener altas velocidades de metabolismo, lo que se traduce en velocidades de biotransformación mayores. Además, bacterias, levaduras y hongos, son versátiles y por lo general pueden metabolizar una amplia variedad de sustratos. Otra importante ventaja a tener en cuenta es que los microorganismos pueden ser aislados, propagados y estudiados fácilmente y con equipamiento simple. Dentro de estos, debido a su uso tradicional, levaduras y hongos filamentosos son frecuentemente usados en biotransformaciones. (Vezina, 1991; Roberts, 1995; Demain, 2000; Moyna & Menéndez, 2001)

Los hongos constituyen un reino propio (*Fungi*) entre los seres vivos, el que se estima alberga alrededor de un millón quinientas mil especies, de las cuales son conocidas apenas cerca de un 5%. Los hongos verdaderos (levaduras, mohos y setas) se caracterizan por ser seres eucariotas, que poseen una pared celular rígida -cuyo principal componente es la quitina-, que carecen de clorofila -y por lo tanto ser quimioorganótrofos y heterótrofos, con nutrición absorptiva-, y que presentan en la mayoría de los casos *hifas* (especialmente en los hongos filamentosos) que en su conjunto forman un *micelio* característico. En general constituyen un grupo muy coherente desde el punto de vista filogenético, mostrando sí diversidad en cuanto a los tipos morfológicos y ciclos sexuales que presentan, características en las que se basa generalmente su clasificación. (Deacon, 2006; Madigan et al., 1999)

El ser organismos eucariotas relativamente simples, con procesos biosintéticos usuales, y muchos de ellos fáciles de cultivar, ha hecho de los hongos un material de

investigación muy atractivo a la hora de estudiar procesos biológicos fundamentales como la generación de energía, el control metabólico y los mecanismos de herencia. Además son de gran importancia práctica, ya sea por sus efectos detrimentales en la salud (de hombres, animales y plantas), en la degradación de alimentos y otros bienes, como por sus roles beneficiosos, que van desde su utilización como alimentos en sí mismos (por ej. el hongo *Agaricus bisporus*), hasta la explotación de su versatilidad metabólica para la obtención de productos y procesos de interés biotecnológico. (Carlile & Watkinson, 1994). Dentro de estos cabe mencionar:

- *Alimentos y bebidas.* Existen decenas de alimentos consumidos en todo el mundo que son producidos con el auxilio de hongos filamentosos y levaduras (Carlile & Watkinson, 1994; Azevedo, 2001). Como se mencionó (Sección 1.1.3), la elaboración de bebidas alcohólicas y pan es una actividad milenaria, y la misma implica la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- *Metabolitos primarios.* La producción de etanol por fermentación empleando *S. cerevisiae* es una de las actividades de mayor relevancia de la microbiología industrial. No menos importante es la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, utilizando como sustrato la sacarosa presente en la melaza de la caña de azúcar. (Carlile & Watkinson, 1994; Azevedo, 2001)
- *Enzimas y proteínas recombinantes.* Muchas enzimas extracelulares y algunas enzimas intracelulares de amplio uso en diferentes campos, son producidas por hongos. Amilasas, celulasas, lactasas, pectinasas, renina, glucooxidasas, lipasas, catalasas, son producidas por diferentes hongos, siendo los del género *Aspergillus* los más importantes en cuanto la producción de enzimas comerciales (Carlile & Watkinson, 1994; Azevedo, 2001). La expresión de genes de mamíferos en *S. cerevisiae* y otras levaduras ha permitido la obtención de varias proteínas recombinantes (Adrio & Demain, 2003).
- *Metabolitos secundarios.* Existen un gran número de estos metabolitos que son producidos por hongos y tienen a su vez significancia económica. Los antibióticos son el producto de uso farmacéutico más importante producido por la industria de la fermentación (Carlile & Watkinson, 1994; Azevedo, 2001). Más del 20 % de los antibióticos conocidos es producido por hongos filamentosos (Adrio & Demain, 2003). Además del clásico ejemplo de la penicilina, producida industrialmente por el hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum*, cefalosporina, griseofulvina, ácido fusídico y pleuromutilina, son antibióticos producidos por diversas especies de

hongos. Varios aminoácidos y vitaminas como la riboflavina son también obtenidos mediante tecnologías fermentativas utilizando hongos (Carlile & Watkinson, 1994). Fármacos, como los alcaloides del ergot, obtenidos a partir de cepas de *Claviceps purpurea*, son también de importancia comercial (Azevedo, 2001). La lovastatina es un metabolito secundario producido por varios hongos filamentosos, inhibidor de la síntesis de colesterol y cuya producción comercial se realiza a partir de *Aspergillus terreus* (Vilches Ferrón et al., 2005). Algunos agentes inmunosupresores también son obtenidos de hongos, como la ciclosporina A producida por el mohó *Tolypocladium nivenum* (Adrio & Demain, 2003).

- *Biorremediación*. El proceso de retirar los poluentes del medio ambiente puede ser realizado utilizando microorganismos para su degradación, entre los cuales los hongos cumplen un destacado papel (Tortella et al., 2005).

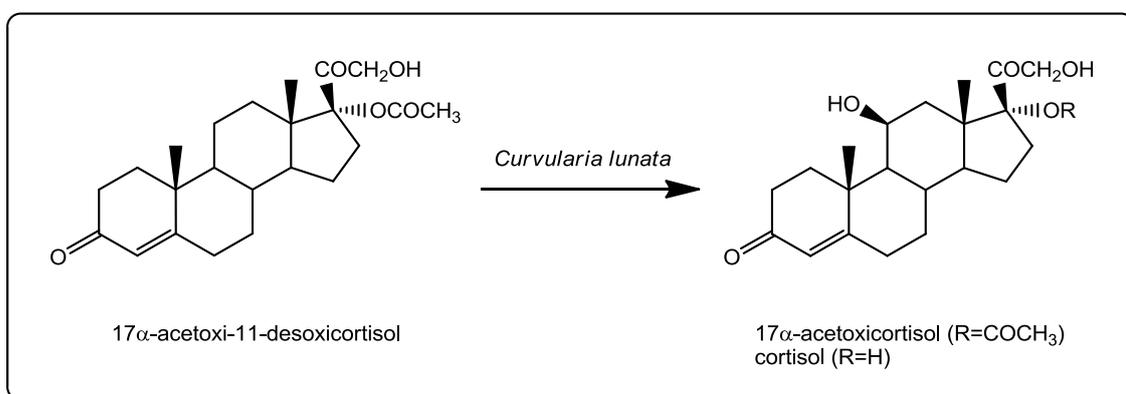
Muchas de las aplicaciones mencionadas se han tornado viables comercialmente luego de la aplicación de un programa de mejoramiento genético del hongo implicado (Crueger & Crueger, 1990). Para ello es necesario que exista variabilidad, la que puede obtenerse naturalmente por mutaciones espontáneas y la reproducción sexuada, o mediante métodos artificiales como mutaciones inducidas y las técnicas de mejoramiento genético modernas de fusión de protoplastos y la tecnología del ADN recombinante. (Adrio & Demain, 2003; Azevedo, 2001).

### 1.2.2 *Biotransformaciones mediadas por hongos*

Más allá de la explotación de los hongos para obtener productos como enzimas o metabolitos por ellos producidos, el uso de estos organismos para provocar modificaciones en moléculas orgánicas ya sean sintéticas o naturales, es un método de creciente aplicación que lleva a la producción de fármacos, agroquímicos, aditivos alimentarios, etc. (Azevedo, 2001). Muchas veces se considera a la bioconversión mediada por hongos relativamente superior a la efectuada con bacterias para lograr determinadas transformaciones químicas, debido a que la mayor velocidad del metabolismo bacteriano a menudo lleva a la degradación de los compuestos deseados (Farooq et al., 2004). Varios son los tipos de reacciones mediadas por hongos que han sido reportadas, como ser: hidroxilaciones, reducciones de cetonas, sulfoxidaciones, epoxidaciones, oxidaciones de Baeyer-Villiger y desracemizaciones (Borges et al., 2009). En la mayoría de los casos se busca la introducción de centros quirales de forma

estereoselectiva, explotando la actividad oxidorreductasa del microorganismo entero sin la necesidad del agregado de cofactores.

Como se mencionó, las reacciones de oxidación son particularmente útiles en la producción industrial (Sección 1.1.7). Además, las reacciones de oxigenación enzimática son particularmente interesantes desde el momento que mediante ellas se pueden funcionalizar sustratos orgánicos no activados, de una manera difícil de emular por la química orgánica clásica (Faber, 2000). En este sentido, los hongos filamentosos han despertado particular interés por su capacidad de catalizar regio y estereoselectivamente hidroxilaciones de un amplio rango de sustratos orgánicos como esteroides, alcaloides, flavonoides, compuestos aromáticos y terpenos (Lehman & Stewart, 2001). Las hidroxilaciones microbianas implican el reemplazo directo del átomo de hidrógeno sobre un carbono determinado, donde el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo deriva de oxígeno molecular (Vezina, 1991). Un ejemplo trascendente en este campo es la bioconversión mediante el microorganismo *Curvularia lunata* de determinados esteroides, con el cual se logra la introducción del grupo 11-hidroxilo en posición  $\beta$  directamente, y es la base del proceso comercial de conversión de  $17\alpha$ -acetoxi-11-desoxicortisol en hidrocortisona (Esquema 3) (Roberts et al., 1995). La reconocida capacidad de muchos hongos de hidroxilar esteroides ha sido largamente explotada, y explicada como un mecanismo de defensa bioquímico del microorganismo contra metabolitos secundarios que son producidos por la planta huésped, y que poseen una estructura esteroideal (Vitas et al., 1999).



Esquema 3. Biohidroxilación estereoespecífica de esteroides con *Curvularia lunata*.

La funcionalización de un carbono que normalmente no sería reactivo es muy valiosa en una variedad de productos naturales y drogas sintéticas. Un inconveniente no menor a la hora de realizar ciertas biotransformaciones, tales como las hidroxilaciones de enlaces C-H remotos a un grupo funcional, es la falta de predicción acerca del curso regio y estereoquímico de la reacción, por lo que su investigación sigue siendo un campo de particular atención (Holland, 1999; Li & Chang, 2004).

Evidencias bioquímicas indican que las hidroxilaciones, así como muchas biotransformaciones llevadas a cabo con numerosas especies de hongos, son catalizadas por monooxigenasas pertenecientes a la superfamilia de enzimas citocromo P450 (Cit P450 ó CYP) (Lehman & Stewart, 2001). Este es un término genérico aplicado a una amplia variedad de hemoproteínas encontradas prácticamente en todos los organismos donde, si bien las enzimas individuales difieren significativamente, una corta secuencia de 26 aminoácidos en la proximidad del grupo hemo es idéntica en todas las Cit P450 monooxigenasas (Faber, 2000). La nomenclatura de las Cit P450 se basa en la identidad de la secuencia de aminoácidos; por convención a las letras CYP sigue un número que indica la clasificación de la enzima en una familia (más del 40% de identidad), luego una letra de la subfamilia (más del 55% identidad) y finalmente un número para cada proteína individual (Cresnar & Petric, 2011). Aunque catalizan un amplio rango de bioconversiones (Bernhardt, 2006), la reacción general para todas ellas puede resumirse como se muestra en el Esquema 4. Usualmente, estas enzimas actúan como oxidantes terminales en un sistema multicomponente de transferencia de electrones en cadena llamados sistemas P450 (Degtyarenko, <http://www.icgeb.org/~p450srv/>). Según la naturaleza de este sistema donante tradicionalmente se clasificó a los sistemas P450 en dos clases principales: clase I y clase II (Ortiz de Montellano & De Voss, 2002). En el sistema clase I el conjunto donante está compuesto por dos proteínas y abarcan la mayoría de las Cit P450 localizadas en mitocondrias y organismos procariotas. En el clase II, una sola proteína (citocromo P450 reductasa, CPR) transfiere los electrones a la Cit P450 terminal. Estos sistemas se encuentran localizados en el retículo endoplasmático. La mayoría de las Cit P450 fúngicas identificadas pertenecen a este último tipo de sistema (van den Brink et al., 1998). Actualmente, y según el sistema de proteínas que participan en la transferencia de electrones, los sistemas Cit P450 se clasifican en 10 clases, 3 de las cuales (clase II, clase VIII y clase IX) han sido identificadas en hongos (Cresnar & Petric, 2011).



*Esquema 4. Ecuación general resumida para la reacción catalizada por enzimas citocromo P450 (R = molécula de sustrato).*

En cuanto a la metodología para llevar a cabo las biotransformaciones con hongos filamentosos, en la mayoría de los casos se reportan resultados de experimentos realizados en fermentadores o matraces con medios líquidos y cultivos del hongo en crecimiento (Lehman & Stewart, 2001). No obstante, otras alternativas como el estudio de la bioconversión por parte de hongos esporulados crecidos en un medio sólido (Demyttenaere et al., 2000), cultivos de las células inmovilizadas (Larroche & Gros, 1997), células en reposo (Aguirre-Pranzoni et al., 2011) ó la utilización de una suspensión de esporas en vez del micelio (Wolken & van der Werf, 2001), también han sido reportadas.

### *1.2.3 Aspergillus sp.*

Los *Aspergillus* son hongos filamentosos que se solían clasificar dentro de la subdivisión *Deuteromycota* del Reino Fungi, más comúnmente conocido como grupo de los "hongos imperfectos", debido a que su reproducción sexual era desconocida o ausente (Deacon, 2006). La clasificación actual basada en estudios filogenéticos no reconoce a la subdivisión *Deuteromycota* como un taxón formal en la sistemática de hongos, y sus integrantes se ubican dentro de la división *Ascomycota* (Taylor et al., 2006). Además, en la actualidad, la mayoría de las especies de *Aspergillus*, excepto *A. fumigatus*, tienen reproducción sexual y asexual conocidas (Ward et al., 2006).

En cuanto a su hábitat son hongos cosmopolitas, ampliamente distribuidos en la naturaleza, habitualmente aislados del suelo y desechos vegetales, así como del aire de algunos ambientes cerrados ([http://www.doctorfungus.org/thefungi/aspergillus\\_spp.php](http://www.doctorfungus.org/thefungi/aspergillus_spp.php)). El género *Aspergillus* contiene más de 180 especies reconocidas.; algunas se destacan por su patogenicidad en humanos (por ej. *Aspergillus fumigatus*) y muchas son interesantes por sus aplicaciones industriales. Entre ellas *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* están

incluidas en la lista GRAS ("Generally Recognized as Safe") de la FDA de los Estados Unidos (Ward et al., 2006).

Dentro de las aplicaciones industriales de este género de hongos, cabe citar: producción de ácido cítrico, producción de enzimas extracelulares, biotransformaciones, producción de metabolitos secundarios y algunas aplicaciones medioambientales (Ward et al., 2006).

#### 1.2.3.1 *Aspergillus niger*

Desde el punto de vista macroscópico, las colonias de *Aspergillus niger* se presentan típicamente negras, lo que es debido a la pigmentación característica de las paredes de sus esporas (Deacon, 2006) (Figura 3). Es una de las cuatro especies más investigadas desde el punto de vista genético y molecular (junto con *A. nidulans*, *A. oryzae* y *A. fumigatus*), siendo su genoma totalmente secuenciado (Ward et al., 2006).

La aplicación industrial más significativa de esta especie es la obtención de ácido cítrico, la que se estima en unas 1,5 millones de toneladas anuales (Berovic & Legisa, 2007). No menos importante resulta su utilización para la producción de enzimas comerciales como amilasas, glucosaoxidasas, etc. (Carlile & Watkinson, 1994; Ward et al., 2006). También es el principal hongo (junto con *Saccharomyces cerevisiae*) usado para estudios de mecanismos enzimáticos presentes en mamíferos, como los sistemas citocromo P450, dada la similitud de los sistemas fúngicos con los encontrados en eucariotas superiores (van den Brink et al., 1998). Se lo ha estudiado además como agente biorremediador, ya sea en la remoción del medio ambiente de metales tóxicos (Sayer et al., 1999; Durson et al., 2003), como en la degradación de compuestos orgánicos tóxicos (Varga et al., 2000), en la remoción de colorantes de soluciones acuosas (Fu & Viraraghavan, 2003), o en la biodegradación de compuestos policíclicos aromáticos (Giraud et al., 2001) y pesticidas (Kanaly et al., 2005).

Es el hongo filamentoso más utilizado como biocatalizador industrial (Grogan & Holland, 2000). La versatilidad de este hongo como agente biotransformador se desprende de los innumerables reportes al respecto, y de los diferentes sustratos sobre los que ha mostrado actividad, los que incluyen principalmente: flavonoides (Miyazawa et al., 2006), esteroides (Bisogno et al., 2007) y terpenos (monoterpenos: ver siguiente

párrafo; sesquiterpenos acíclicos: Hrdlicka et al., 2004; sesquiterpenos cíclicos: Furusawa et al., 2006; diterpenos: Pertino et al., 2007; triterpenos: Huang et al., 2009). También existen reportes de la utilización de *A. niger* en la bioconversión de cumarinas (Aguirre-Pranzoni et al., 2011), lignanos (Miyazawa et al., 1993) y compuestos policíclicos aromáticos (Islam et al., 2008). En cuanto a los tipos de reacciones biocatalíticas llevadas a cabo por este hongo, estas son variadas y van desde la reducción de cetonas en sus correspondientes alcoholes (Kurbanoglu et al., 2007), hasta reacciones de Baeyer-Villiger (Keppler et al., 2005). Incluso se llegó a aplicar el *A. niger* en estudios de transferencia de masa en biorreactores (Klein et al., 2002). Sin embargo, las reacciones de hidroxilación sobre terpenos y esteroides son las más reportadas (Chen & Reese, 2002).

Existen numerosos reportes respecto a la biotransformación de monoterpenos por *A. niger*, siendo los sustratos ensayados tanto hidrocarburos acíclicos (Yamazaki et al., 1988), monocíclicos (Divyashree et al., 2006) y bicíclicos (Toniazzo et al., 2005), así como alcoholes (Esmaili et al., 2009), ésteres de alcoholes (Madyastha & Murthy, 1988), éteres (Nishimura et al., 1982) y cetonas (Miyazawa et al., 1995a). En particular sobre los hidrocarburos monoterpénicos, objeto central de este trabajo, las reacciones que predominan en las biotransformaciones llevadas a cabo con *Aspergillus niger* son dihidroxilaciones sobre doble enlace C=C (Yamazaki et al., 1988) e hidroxilaciones alílicas sobre metilenos (Vidya & Agrawal, 2003) y metilos (Madyastha & Murthy, 1988). De particular interés resultan las hidroxilaciones sobre hidrocarburos monoterpénicos, ya que varios de ellos son de bajo costo en contraste con el de sus derivados oxigenados (Divyashree et al., 2006).

#### 1.2.3.2 *Aspergillus terreus*

Este hongo se presenta macroscópicamente como colonias de color beige a marrón cuando crece en el medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa) ([http://www.doctorfungus.org/thefungi/aspergillus\\_spp.php](http://www.doctorfungus.org/thefungi/aspergillus_spp.php)) (Figura 3). En cuanto a sus aplicaciones industriales, son mucho menores a las del *A. niger*. Por un lado no es una especie catalogada como GRAS. De hecho, el *A. terreus*, que se relaciona con *A. fumigatus*, ha surgido como un importante patógeno humano oportunista que causa aspergilosis invasiva, con tasas de mortalidad más altas que cualquier otro *Aspergillus* patógeno, y que es resistente a la anfotericina B, un antibiótico esencial para el

tratamiento de infecciones fúngicas (Ward et al., 2006). No obstante, resulta de gran importancia económica debido a que es el principal hongo productor de lovastatina, una potente droga anticolesterolémica (Vilches et al., 2005). También se han encontrado cepas de *A. terreus* productoras del péptido inmunosupresor ciclosporina A. Si bien las aplicaciones medioambientales de hongos del género *Aspergillus* son raras (Ward et al., 2006), al igual que con *A. niger* existen reportes de aplicaciones de una cepa de *A. terreus* en la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Capotorti et al., 2004).

En cuanto a la utilización de este hongo como agente biotransformador, los reportes encontrados en la literatura son muy escasos en comparación con lo reportado para el *A. niger*. Se destaca la actividad alcohol deshidrogenasa, obteniéndose alcoholes a partir de las respectivas cetonas, como por ejemplo  $\beta$ -cetoésteres (Ravia et al, 2009), cetonas cíclicas (Keppler et al., 2005) y esteroides (Faramarzi et al, 2004). En todos los casos se resalta la elevada estereoselectividad con que transcurren las reacciones. Otra actividad reportada para este hongo es la de Baeyer-Villiger monooxigenasa, al convertir cetonas cíclicas en las correspondientes lactonas (Faramarzi et al, 2004; Keppler et al., 2005). También se han descrito estudios de biotransformación de compuestos organoselénicos utilizando cultivos en crecimiento de este hongo (Da Costa et al., 2007). Sin embargo, no se hallado mayor referencia a reacciones de hidroxilación mediadas por *A. terreus*.

En particular, relativo a la biotransformación de monoterpenos, en una reciente revisión de las biotransformaciones fúngicas de estos compuestos realizada por A. Farooq y colaboradores (Farooq et al., 2004), no se menciona ninguna llevada a cabo por *Aspergillus terreus*. Una búsqueda en los años posteriores arroja solamente el artículo surgido del presente trabajo, el cual fue recientemente publicado (García et al., 2009).

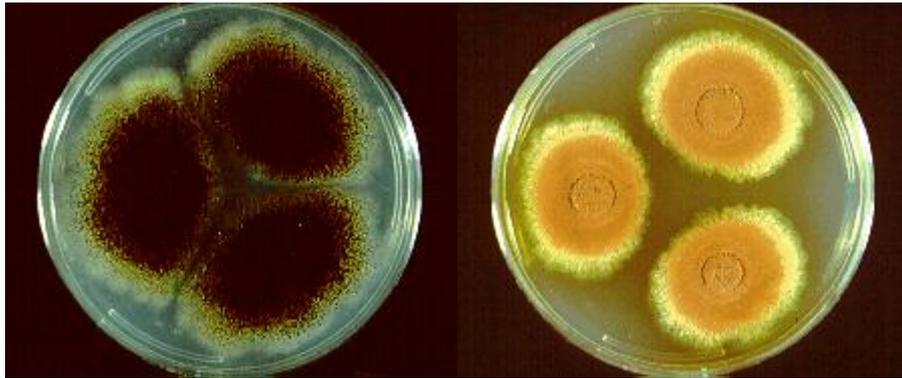


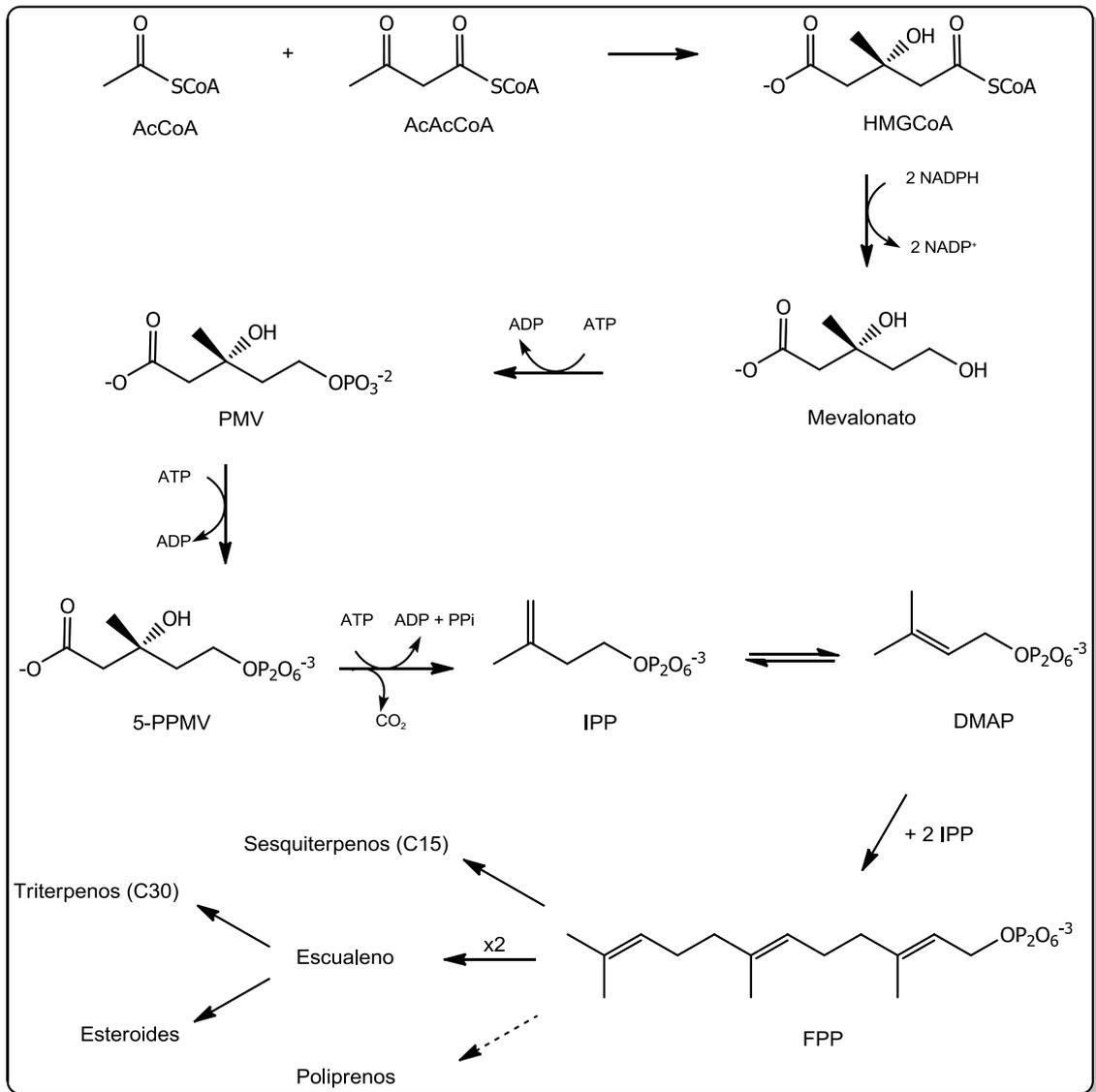
Figura 3. *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus* cultivados en placas de PDA (tomadas de [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/)).

### 1.3 Los monoterpenos como sustratos de biotransformación

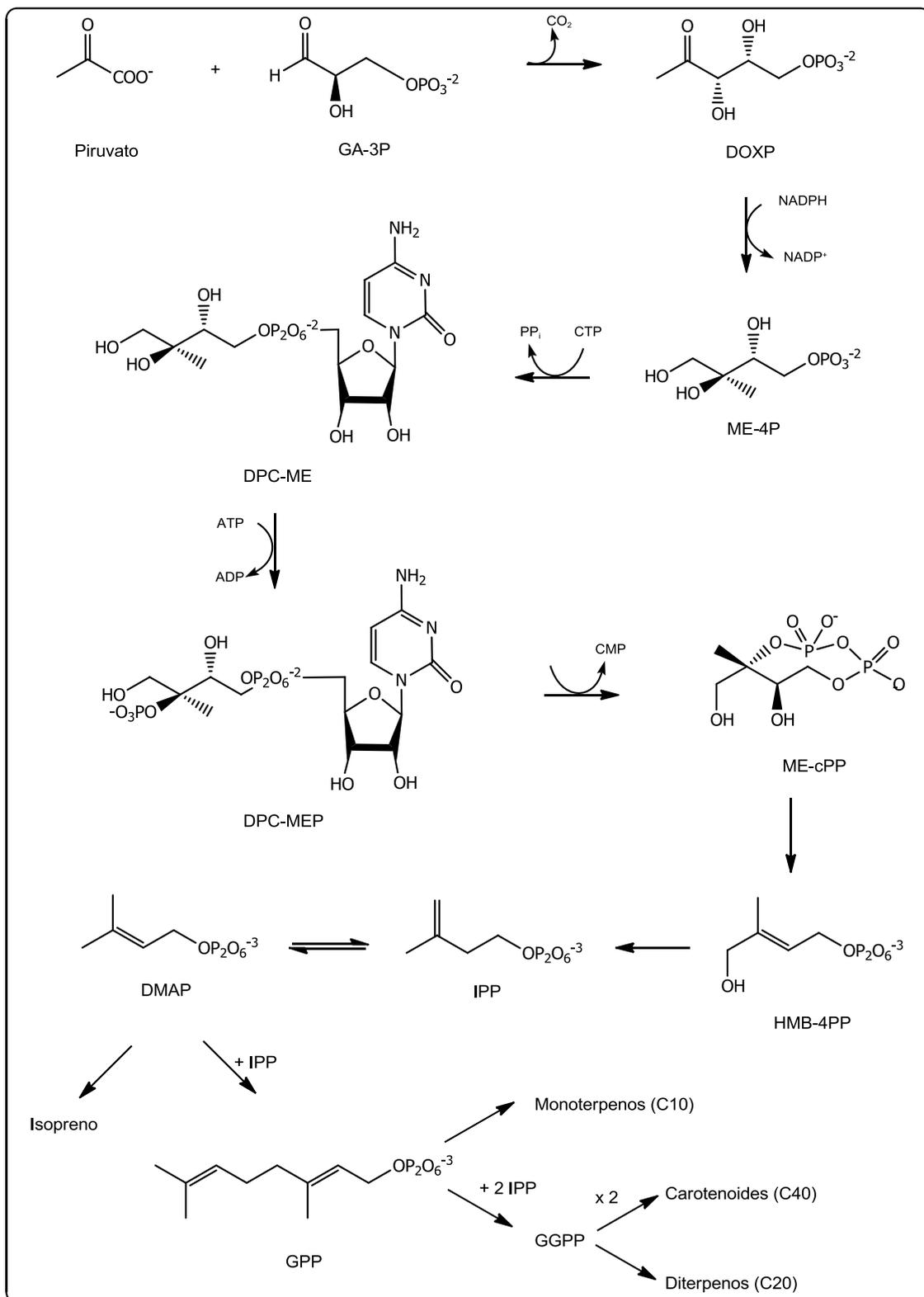
#### 1.3.1 Características generales de los terpenos

Desde el punto de vista de su estructura química se puede considerar a estos compuestos como derivados de la yuxtaposición de unidades isoprenilo de 5 átomos de carbono, por lo que se los clasifica dentro del grupo de compuestos isoprenoides, siendo los monoterpenos los constituyentes más simples de la serie con 10 átomos de carbono (Bruneton, 1995).

Respecto a su origen biosintético, hasta hace pocos años atrás se consideraba a todos los isoprenoides derivados de la ruta única del ácido mevalónico (Esquema 5). Pero estudios recientes indican la existencia de una vía alternativa en la formación del intermediario isopentenilpirofosfato (IPP), llamada ruta de la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (Esquema 6). *Archaea*, hongos y animales utilizan exclusivamente la vía del mevalonato para biosintetizar sus isoprenoides, mientras que la mayoría de las eubacterias y algunas algas usan la vía de la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato. Las plantas superiores y ciertas algas utilizan invariablemente la ruta del mevalonato en el compartimiento citosólico y la ruta no-mevalónica en plástidos. Esta última daría origen al isopreno (C5), a los monoterpenos (C10) y diterpenos (C20), además de carotenoides (C40) y otros isoprenoides superiores, mientras que la clásica ruta del acetato/mevalonato conduciría a los sesquiterpenos (C15), triterpenos (C30), esteroides y otros politerpenos. (Lichtenthaler & Schwender, 1998; Rohdich et al., 2001; Mijts & Schmidt-Dannert, 2003).



Esquema 5. Biosíntesis de isoprenoides en el citoplasma de la célula vegetal: vía del mevalonato. (AcCoA = Acetil Coenzima A, AcAcCoA = Acetoacetil Coenzima A, HMG = Hidroximetilglutaril Coenzima A, PMV = Fosfomevalonato, 5-PPMV = 5-pirofosfomevalonato, IPP = Isopentenilpirofosfato, DMAP = Dimetilalilpirofosfato, FPP = Farnesilpirofosfato).



Esquema 6. Biosíntesis de isoprenoides en plástidos de la célula vegetal: vía de la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato. (GA-3P = Gliceraldehído-3-fosfato, DOXP = 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato, ME-4P = 2-metil-D-eritritol-4-fosfato, DPC-ME = 4-difosfocitidil-2-metil-D-eritritol, DPC-MEP = 4-difosfocitidil-2-metil-D-eritritol-2-fosfato, ME-cPP = 2-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato, HMB-4PP = hidroximetilbutenil-4-difosfato, IPP = isopentenilpirofosfato, DMAP = dimetilalil pirofosfato, GPP = geranil pirofosfato, GGPP = geranilgeranil pirofosfato, CTP = citidina trifosfato, CMP = citidina monofosfato).

Los organismos vivos sintetizan una gran diversidad de isoprenoides (Evans, 1989), pero los monoterpenos son formados casi en exclusividad por las plantas, estimándose su emisión desde las mismas en aproximadamente  $4,8 \times 10^8$  toneladas por año (Hylemon & Harder, 1999). Los terpenoides en su conjunto constituyen el grupo más grande de productos naturales, con más de 22000 estructuras determinadas al día de hoy, de las cuales más de 400 resultan monoterpenos (Demyttenaere & De Kimpe, 2001). En la naturaleza los monoterpenos son mayormente producidos por plantas aromáticas, siendo los principales componentes de muchos aceites esenciales, ya sea como hidrocarburos o compuestos oxigenados, de estructuras abiertas o cíclicas (Krasnobajew, 1984). Por lo general son los principales responsables de las características aromáticas de dichas plantas (Demyttenaere & De Pooter, 1998). Con excepción de las derivadas de heterósidos (como las de almendras amargas y mostaza), las esencias son generalmente mezclas de hidrocarburos y compuestos oxigenados derivados de ellos, y en la mayoría de los casos el origen de estos componentes es terpenoide (Evans, 1989). Los aceites esenciales pueden presentarse en distintos tipos de órganos vegetales, como por ejemplo: flores (lavanda, manzanilla), hojas (eucalipto, menta, lavanda), corteza (canela), madera (sándalo), raíz (jengibre, cúrcuma), semilla (anís, comino) y en el pericarpio del fruto (limón, naranja). Su acumulación está asociada a estructuras histológicas secretoras altamente especializadas, como tricomas glandulares, canales resiníferos, células oleíferas, y cavidades secretoras (Bruneton, 1995). La característica distintiva de estos aceites es que son arrastrables con corriente de vapor de agua, y en esto se basa su extracción con excepción de las esencias de cítricos (Evans, 1989).

Estos metabolitos secundarios parecen cumplir un rol fundamental desde el punto de vista químico – ecológico, actuando como intermediarios químicos entre la planta que los produce y otras especies (Harborne, 2001). Dicha intermediación resulta en beneficio del vegetal que los sintetiza, a pesar del costo metabólico que implica su biosíntesis (Gershenzon, 1994). De esta manera proveen a la planta de una defensa química contra diversos enemigos naturales como insectos, hongos, herbívoros, etc. Los mecanismos para llevar a cabo esta defensa son variados. Algunos terpenos han demostrado actuar directamente contra insectos y hongos patógenos (Isman, 2000). El hecho de formar parte de una compleja mezcla como los aceites esenciales, ha llevado a algunos investigadores a plantear la existencia de una acción sinérgica, esto es, la actividad de la mezcla (el aceite esencial) es mayor que la suma de las actividades

individuales de cada terpeno constituyente (Wittstock & Gershenzon, 2002). Otra estrategia defensiva implica no repeler directamente al depredador, como en el caso de ciertas plantas que frente a un ataque de insectos o ácaros herbívoros, emiten estos compuestos volátiles que atraen artrópodos carnívoros capaces de hacer presa de los primeros (Degenhardt et al., 2003). Un importante rol asignado a varios de estos compuestos volátiles en plantas con flor, es el de atraer insectos polinizadores hacia el vegetal (Harborne, 2001). Muchos monoterpenos también cumplen un interesante papel en la interrelación química planta – planta, siendo reconocidos desde hace años como agentes aleloquímicos (Mandawa, 1985). Además de estos importantes roles químico-ecológicos, los monoterpenos son los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) biogénicos más abundantes luego del isopreno (Guenther et al., 1995). La emisión de VOC's desde la vegetación influye en varias propiedades atmosféricas, influyendo por ejemplo en las concentraciones de ozono y metano en la tropósfera (Adams et al., 2001).

Evidentemente el uso principal que el ser humano ha dado a los monoterpenos es como componentes de sabores y aromas, industria que está en continuo crecimiento (Miyazawa et al., 1995b). Desde el punto de vista farmacológico, si bien muchos son usados en medicinas caseras (fundamentalmente como infusiones de las hierbas aromáticas que los contienen), la aplicación medicinal formal de estos compuestos es un campo de reciente investigación (Chan, 2001). No obstante, algunos monoterpenos como alcanfor, cineol y el mentol son ingredientes comunes de muchos productos analgésicos de aplicación tópica (Billany et al., 1995; Valdez et al., 1999). Varios monoterpenos, como  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, citral, citronelal y limoneno, son usados en grandes cantidades en la industria química para la producción de otros terpenos más valiosos (Krasnobajew, 1984). Un importante campo de estudio es el de la utilización de estos compuestos naturales en el control de insectos (Regnault-Roger & Hamraoui, 1995). Algunos monoterpenos hidrocarbonados son utilizados como materia prima en la fabricación de adhesivos, o como solventes orgánicos sustitutos de los derivados del petróleo y CFC's (<http://jan.mannlib.cornell.edu./reports/erssor/specialty/ius-bb/ius5f.asc>). Un campo de reciente aplicación y no menos importante es el uso de estos compuestos como modelos en la búsqueda de nuevos herbicidas naturales (Macías et al., 1999). La utilización de muchos de estos compuestos como sustratos en conversiones microbiológicas es un área de particular importancia, como se verá en la Sección 1.3.3.

### 1.3.2 El *d*-limoneno

El limoneno (4-isopropenil-1-metilciclohexeno, ó *p*-menta-1,8-dieno) es el terpeno más ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo sintetizado por más de 300 plantas (van der Werf et al., 1999). Es un monoterpeno hidrocarbonado monocíclico que posee un carbono quiral (C4), por lo que es posible plantear dos formas enantioméricas: 4-(*R*)-(+)-limoneno y 4-(*S*)-(-)-limoneno (Figura 3). Ambas existen en la naturaleza: el (-) limoneno se encuentra como componente minoritario de una variedad de árboles y hierbas como *Mentha* spp., mientras que el (+)-limoneno es el principal componente de los aceites de cítricos como naranja y limón, así como de la esencia de alcaravea (Duetz et al., 2003). Este último es el más abundante de los dos isómeros (van der Werf et al., 1999). El limoneno es un líquido oleoso con punto de ebullición 175 °C, densidad relativa 0.843, presión de vapor aproximadamente 213 Pa, y solubilidad en agua a 25 °C de apenas 0,15 mmol/L (Evans, 1989; Fichan et al., 1999). Estas propiedades fisicoquímicas hacen del limoneno un compuesto factible de ser extraído de un medio acuoso, tanto con solventes orgánicos como por destilación por arrastre con vapor de agua.

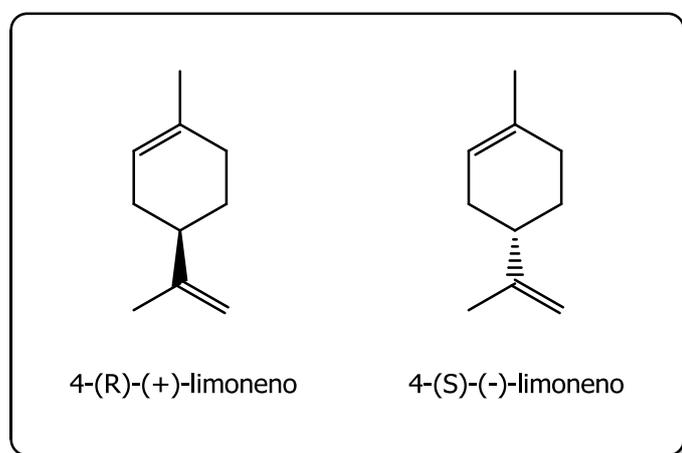


Figura 4. Estereoisómeros configuracionales del limoneno.

La concentración de *d*-limoneno en los aceites obtenidos de frutos cítricos se encuentra entre 32 y 98% (Svoboda & Greenaway, 2003). En las esencias uruguayas representa aproximadamente el 95% de la esencia de mandarina (Calvarano et al., 1989), 70% de la esencia de limón (Dellacassa et al., 1991b) y 40% de la esencia de

bergamota (Verzera et al., 1997). Sin embargo dicho compuesto, junto a otros monoterpenos hidrocarbonados, no interviene en el aroma ni en el sabor de estas esencias, siendo los principales responsables compuestos oxigenados presentes en cantidades minoritarias (Ahmed et al., 1978). Pero estos hidrocarburos aumentan la inestabilidad química de la esencia frente a la temperatura, la luz y el oxígeno atmosférico, con su consiguiente deterioro (Spraul et al., 1991). Por esta razón métodos como la encapsulación (Anandaraman & Reineccius, 1986) ó la desterpenación de la esencia (Cardozo-Filho et al., 1997) son utilizados en la industria. La desterpenación es un proceso industrial generalizado que consiste en la separación del limoneno junto a otros monoterpenos hidrocarbonados, del resto de los componentes oxigenados de la esencia, principales responsables del aroma y sabor de la misma. A nivel mundial la producción de cítricos viene en constante ascenso, y mayor aun es el crecimiento de la cantidad de fruta procesada para la obtención de jugos concentrados y productos derivados (principalmente esencias) (Nonino, 1996). Se estima que la producción mundial de limoneno derivado de esta industria oscila las 50.000 toneladas anuales (de Oliveira & Strapasson, 2000). La citricultura en Uruguay también se muestra como un sector en franca expansión (Dellacassa et al., 1991a). De esta manera es posible acceder al  $\alpha$ -limoneno como un subproducto abundante y de bajo costo derivado de la industria cítrica.

A nivel industrial los usos de este monoterpeno son relativamente escasos. No obstante, está reconocido como GRAS por la FDA para su uso como saborizante, y de ahí su uso en algunos alimentos (Sun, 2007). También se lo utiliza como materia prima en la fabricación de resinas adhesivas, y como solvente en limpiadores no acuosos, champús para mascotas y agentes desengrasantes (Braddock & Cadwallader, 1995). Su empleo como solvente se ha visto incrementado dada su baja toxicidad, olor agradable y biodegradabilidad (Thomas & Bessièrre, 1989). Pero su principal uso es como materia prima para la producción de alcoholes y cetonas terpénicas de aroma y/o sabor característicos (Tan & Day, 1998), debido a que es uno de los más baratos y abundantes materiales de partida quirales usado para síntesis orgánica (Thomas & Bessièrre, 1989; van der Werf et al., 2000). También existen estudios sobre sus efectos insecticidas (Hink & Fee, 1986; Tripathi et al., 2003), habiéndose patentado formulaciones que lo contienen como principio activo en pulguicidas y garrapaticidas para pequeños animales (Dotolo, 1983).

A nivel de laboratorio, varios son los grupos de investigadores que mediante síntesis orgánica han utilizado el limoneno ya sea para la obtención de sintones quirales, o para la obtención de compuestos interesantes en sí mismos (Menéndez, 1995; Thomas & Bessière, 1989). Estudios relativamente recientes han mostrado que el  $\alpha$ -limoneno posee significativas propiedades quimiopreventivas y quimioterapéuticas, previniendo la formación de tumores inducidos químicamente y exhibiendo efectos antitumorales en roedores (Whysner & Williams, 1996; Edris, 2007). Ciertos derivados hidroxilados, como carveol, alcohol perílico y ácido perílico, han mostrado poseer aun mayor potencial antitumoral (Boon et al., 2000; Crowell et al., 1992; Crowell et al., 1991). Por otro lado, se reporta al limoneno como un cancerígeno epigenético, pero específico para ratas macho, sin riesgo para humanos (Williams, 2001; Whysner & Williams, 1996). Recientemente también se ha reportado la actividad antiparasitaria, particularmente contra *Leishmania*, de este monoterpeno (Arruda et al., 2009), y la actividad antimicrobiana de cada uno de sus enantiómeros (van Vuuren & Viljoen, 2007). Desde hace casi cinco décadas la conversión biocatalítica del  $\alpha$ -limoneno ha sido considerada por diversos grupos de investigación (Duetz et al., 2003), siendo hoy en día un popular sustrato de bioconversión dado su abundancia y bajo costo (Adams et al., 2003), como se verá en la Sección 1.3.5.

### 1.3.3 El 1,8-cineol

El 1,8-cineol (1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]octano) es un éter bicíclico monoterpénico, conocido también como eucaliptol o simplemente cineol (Figura 5). Es un monoterpeno muy abundante, de aroma característico y constituyente de los aceites esenciales de varias especies vegetales, destacándose como principal componente del aceite esencial de varias especies del género *Eucalyptus* (Harborne & Baxter, 1993; Villecco et al., 2005). Se encuentra también en los aceites de cajeput y niaouli, en las hojas de laurel, en el aceite de cardamomo, en la raíz de jengibre, en la espiga de lavanda, en el romero, y en otras tantas especies (Villecco et al., 2005). A temperatura ambiente es un líquido incoloro, que posee un punto de ebullición de 176 °C, una densidad relativa de 0,922 g/mL y un punto de fusión de 1,5 °C (The Merck Index, 2006). Posee una presión de vapor de 1160 Pa a 294 K (Aparicio et al., 2007), y es insoluble en agua al igual que el limoneno, aunque la solubilidad de este último es un par de órdenes menor (Miller & Hawthorne, 2000).

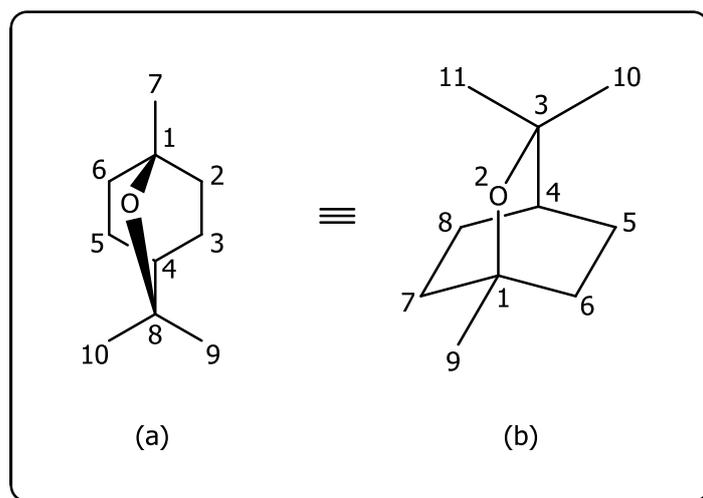


Figura 5. Dos formas de nombrar al mismo compuesto: (a) 1,8 cineol (b) 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]octano (nomenclatura IUPAC).

Aunque es un compuesto ampliamente disponible, el cineol permanece en cierto aspecto poco explotado (Aparicio et al., 2007). Se puede tener una idea del impacto del cineol en la naturaleza considerando que, únicamente en Australia, se biosintetizan y liberan al ambiente más de 500.000 toneladas por año (Villeco et al., 2005). Como se mencionó, la principal fuente de esta molécula es el aceite esencial presente en las hojas de *Eucalyptus*. Estos aceites se clasifican en el mercado en tres grupos de acuerdo a su composición y uso final: medicinal, industrial y perfumería. De estos el más importante por el volumen de producción y comercialización es el medicinal, caracterizado por su alto contenido en 1,8-cineol con un mínimo de 80 % (Coppen & Hone, 1992). Este compuesto se halla en una concentración aproximada del 70 % en la esencia del *E. globulus*, lo que hace a este aceite el más utilizado para la producción comercial de esta molécula (Clark & Cameron, 2000). La separación de este compuesto del resto de la esencia puede realizarse fácilmente por congelamiento. La concentración de 1,8-cineol en los aceites de las distintas especies varía de acuerdo a las mismas (Mantero et al., 2007). Incluso existen variaciones dentro de la misma especie en el rendimiento de aceite por kilogramo de hoja y en la composición porcentual de cineol de dicho aceite según: el método de obtención del aceite, año de cosecha, localización geográfica, tipo de hojas, estación de cosecha y subespecie (Mantero et al., 2007; Sefidkon et al., 2008). Un reciente trabajo llevado a cabo en conjunto por grupos de las Facultades de Agronomía y Química de la UdelaR, muestra que las principales especies

de *Eucalyptus* cultivadas en el país resultan promisorias para la producción de aceites esenciales y obtención de cineol, con un porcentaje de rendimiento en aceite igual o mayor al 1,00 % y un porcentaje de 1,8-cineol superior al 75 %, llegando a obtenerse 87 % del monoterpeno en la esencia de *Eucalyptus globulus biscotata* (Mantero et al., 2007).

Hasta el año 1988, la silvicultura de plantaciones en Uruguay se limitaba a unas 31 mil hectáreas plantadas. En la actualidad, la superficie de bosques, naturales e implantados, se estima en 1.720.000 hectáreas (9,8 % de la superficie total del país) (MGAP, 2010). La industria forestal al amparo del marco promocional de 1987 se orientó principalmente hacia *Eucalyptus* (74 % del área forestada corresponde a este género), siendo la especie más utilizada el *Eucalyptus globulus*, la cual pasó de 90 hectáreas en 1975 a 368.388 hectáreas en el 2007 (MGAP, 2005; 2010). Esta industria se dedica a la producción para la obtención de madera y de pulpa celulósica para la industria del papel, sin realizar un aprovechamiento global de los residuos, en especial de hojas, ramas y ramillas que quedan abandonadas en el suelo. Además, dada la actividad biológica de estos aceites, su extracción antes de volver las hojas al suelo constituye una práctica ecológicamente recomendable (Mantero et al., 2007). De esta manera el 1,8-cineol se presenta como una materia prima barata y de fácil obtención a partir del aceite esencial de hojas de eucalipto, subproducto de la creciente industria forestal.

En cuanto a sus usos y aplicaciones, a diferencia del limoneno, el aroma agradable y característico hace del 1,8-cineol un compuesto ampliamente usado tanto en las industrias cosmética, alimentaria y farmacéutica (Villico et al., 2005). Popularmente las hojas y los aceites de *Eucalyptus* se han utilizado especialmente para problemas respiratorios, pero también se ha usado en tratamiento de estados febriles, problemas de piel, dolores articulares, etc. (Sefidkon et al., 2008). La industria farmacéutica moderna consume el 90 % del 1,8-cineol producido en el mundo (Aparicio et al., 2007). Existen varias preparaciones que lo contienen, no solo como aromatizante, sino además como agente antiinflamatorio y antirreumático en formulaciones de uso tópico (Billany et al., 1995). Se utiliza también habitualmente en las enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias como agente mucolítico (Worth et al., 2009) y en aerosoles de aplicación nasal (Clark & Cameron, 2000)

A nivel de grupos de investigación existen numerosos reportes que hacen referencia a distintas aplicaciones del 1,8-cineol. Una de las más destacadas es el ser un mejorador de la penetrabilidad transdérmica, permitiendo así mejorar la absorción de determinadas drogas a través de la piel (dos Anjos et al., 2007). Estudios clínicos recientes mostraron al cineol como capaz de provocar cambios morfológicos en células de leucemia, induciendo la apoptosis (Edris, 2007). En otro orden, también se lo ha usado como monómero en la fabricación de polímeros orgánicos (Easton et al., 2009). Pero sin dudas es la amplia gama de actividades biológicas lo que hace de este compuesto un permanente foco de atención de varios investigadores. Es así que existen reportes respecto a su potente actividad aleloquímica (ver Sección 1.4) tóxica e inhibitoria para la vegetación herbácea (Duke & Oliva, 2004), así como actividad contra insectos (Lee et al., 2004; Abeywickrama et al., 2006), bacterias (van Vuuren & Viljoen, 2007), hongos (Vilela et al., 2009) y nematodos (Sangwan et al., 1990).

Como sustrato de bioconversión el 1,8-cineol ha sido mucho menos utilizado que el hidrocarburo limoneno. No obstante, la funcionalización del cineol ha sido abordada tanto por métodos químicos (Villego et al., 2005) como biológicos (Sección 1.3.6) buscando derivados con utilidad en la industria de aromas y sabores ó con potencial actividad biológica. Su transformación en compuestos de mayor valor agregado está siendo reconocida como de gran potencial económico para las industrias alimentaria, perfumera y farmacéutica (García et al., 2009).

#### *1.3.4 Transformaciones microbianas de monoterpenos*

Los terpenos son dentro de los productos naturales uno de los grupos que más interés ha despertado como sustratos de biotransformación (Moyna & Menéndez, 2001). Esto es debido principalmente a la potencial aplicación de los productos de la bioconversión en la industria perfumera y de saborizantes (Krasnobajew, 1984; Rozenbaum et al., 2006); además de la obtención de sintones quirales para síntesis (Abraham et al., 1986), y de productos homoquirales con actividad farmacológica interesante *per se* (Crowell et al., 1992). Sumado a ello, la disponibilidad de varios de estos compuestos en grandes cantidades desde su fuente natural o por métodos sintéticos, presenta a su biotransformación como una herramienta útil en dichos campos (Abraham et al., 1986). Además, existe una creciente investigación enfocada hacia la producción microbiológica de sabores y aromas naturales (Esmaeili et al.,

2009), debida a tres causas principales. Por un lado, está la demanda de los consumidores por productos naturales y seguros desde el punto de vista de la salud, en vez de las fragancias y saborizantes sintéticos que representan más del 80 % de la producción mundial de estos aditivos (Toniazzo et al., 2005). Por otra parte, y tal como se mencionó (Sección 1.1.4), la síntesis clásica deriva muchas veces en mezclas racémicas y los enantiómeros pueden tener propiedades organolépticas distintas. En tercer lugar cabe mencionar que, si bien las plantas son una importante fuente natural de aceites esenciales y sabores, los componentes activos están presentes a menudo en cantidades menores o solo se encuentran en especies exóticas, haciendo dificultoso su aislamiento y encareciendo el producto final (Demyttenaere & De Kimpe, 2001; Janssens et al., 1992).

Se han publicado estudios describiendo la biotransformación de terpenos utilizando todo tipo de biocatalizadores: enzimas aisladas, extractos de células y células enteras de bacterias, cianobacterias, levaduras, algas, hongos y plantas. Una reciente revisión realizada por C. de Carvalho y M. da Fonseca muestra que el 75 % de los trabajos publicados sobre producción y/o biotransformación de terpenos, son realizados utilizando como biocatalizador bacterias, levaduras u hongos enteros, y sólo un 7 % usando enzimas aisladas (de Carvalho & da Fonseca, 2006). En ese mismo trabajo se destaca que la mayoría de las reacciones se llevan a cabo en medio acuoso, a pesar de la baja solubilidad de la mayoría de los terpenos en agua. En cuanto al tipo de reactor, casi la mitad de los trabajos publicados indican que la biotransformación se realizó en matraces con agitación, repartiéndose el otro 50 % en diversos tipos de viales, aparatos de microescala y diferentes tipos de fermentadores.

Entre los principales obstáculos en la biotransformación de terpenos cabe mencionar: la inestabilidad, volatilidad y baja solubilidad en agua de sustratos y/o productos, y la inhibición enzimática por los mismos (de Carvalho et al., 2000; Farooq et al., 2002). Estos, sumados a que el metabolismo microbiano usualmente resulta en varios productos de biotransformación de un único terpeno, hacen que la aplicación a escala industrial de este tipo de biotransformaciones aun sea dificultosa (de Carvalho & da Fonseca, 2006).

Los monoterpenos son los compuestos más aplicados como sustratos dentro de las transformaciones microbianas de terpenoides (Krasnobajew, 1984). El creciente

interés sobre las bioconversiones de monoterpenos se refleja en la cantidad y diversidad de agentes biotransformadores que han sido investigados, por ejemplo: bacterias anaerobias (Hylemon & Harder, 1999), bacterias aerobias (Thompson et al., 2010), hongos filamentosos (Farooq et al., 2004), esporas de hongos (Demyttenaere & De Pooter, 1998), levaduras (King & Dickinson, 2003), cultivo celulares de plantas (Lindmark-Henriksson et al., 2004), e incluso algas (Ghasemi et al., 2009); sumado a descripciones de transformaciones de monoterpenos por microsomas hepáticos humanos (Duisken et al., 2005), y el estudio de su metabolismo en ratas (Chen et al., 2003) entre otros animales. Una gran parte de la literatura trata la bioconversión de monoterpenoides por hongos a célula entera en cultivos sumergidos (Demyttenaere & De Pooter, 1996). Sin embargo, hasta hace algunos años la biotransformación fúngica de monoterpenos era estudiada en menor grado en comparación con la de otros sustratos naturales, debido a la dificultad en el manejo de estos compuestos por su volatilidad y potencial toxicidad para el hongo. Esto ha ido cambiando en los últimos años, y son varios los grupos de investigación que vienen reportando diversas transformaciones de todo tipo de monoterpenos, según se desprende de la revisión realizada por A. Farooq y colaboradores (Farooq et al., 2004). Como se mencionó en la Sección 1.2.2, los hongos resultan muy útiles para llevar a cabo hidroxilaciones sobre hidrocarburos monoterpénicos (Divyashree et al., 2006), y siendo muchas veces estos compuestos mucho más baratos que sus correspondientes derivados oxidados, no resulta extraño el aumento del interés en este campo de las biotransformaciones.

### *1.3.5 Biotransformación de limoneno*

Como se mencionó (Sección 1.3.2) el  $\alpha$ -limoneno es un subproducto abundante y de bajo costo derivado de la industria cítrica. Sumado a ello, el mayor valor agregado de muchos de sus diversos derivados oxigenados (Tabla 3), la utilización de varios de estos en la industria perfumera y del sabor, y su potencial aplicación en la industria farmacéutica, ha despertado el interés de varios investigadores en la utilización de este compuesto como sustrato de biotransformación (Duetz et al., 2003). A modo de ejemplo, se puede citar el  $\alpha$ -terpineol y el alcohol perílico (Tabla 3). El primero es considerado el alcohol monoterpénico más importante según su uso. El consumo anual de  $\alpha$ -terpineol se ha estimado en más de 13.000 kg, lo que lo sitúa entre los compuestos más utilizados de acuerdo a su aroma característico (Toniazco et al., 2005). En tanto el alcohol perílico resulta de particular importancia, ya que tiene demostrados

efectos preventivos y terapéuticos en una amplia variedad de modelos preclínicos de tumores y se encuentra actualmente en fase I y fase II de ensayos clínicos (Xanthakis et al., 2009). En las plantas que los contienen, estos compuestos como otros derivados oxigenados, se biosintetizan a partir del limoneno mediante la acción de citocromos P450 monooxigenasas (Esquema 7). Por otra parte, lograr estos compuestos oxigenados por métodos sintéticos puede ser dificultoso, dado que no es trivial realizar selectivamente en el laboratorio oxidaciones de dobles enlaces o de carbonos alílicos cuando existe más de un sitio reactivo en la molécula (Menéndez, 1995). Tal es el caso del limoneno, donde existen grupos con similares propiedades electrónicas como metilenos alílicos (C3 y C6) y metilos alílicos (C7 y C10), por lo que las oxidaciones por métodos clásicos, así como mediante catalizadores químicos, generalmente dan lugar a una mezcla de productos (Duetz et al., 2003; Kala Raj et al., 2003; Sanseverino et al., 2000). Razones como estas han llevado a que la conversión biocatalítica del limoneno haya sido considerada desde hace varias décadas, siendo un grupo de investigadores indios los pioneros en este tema (Dhavalikar & Battacharyya, 1966; Dhavalikar et al., 1966). No obstante, hechos como las dificultades que pueden presentarse con la biotransformación de sustratos lipofílicos (Roberts et al., 1995), así como la falta de predictibilidad del sitio de oxidación (Holland, 1999), sumado al limitado suceso de estas estrategias para con el limoneno (Duetz et al., 2003), hacen que la biotransformación de este monoterpeno continúe siendo campo de exploración.

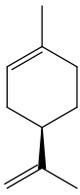
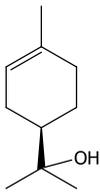
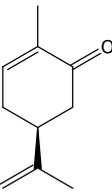
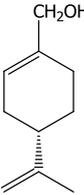
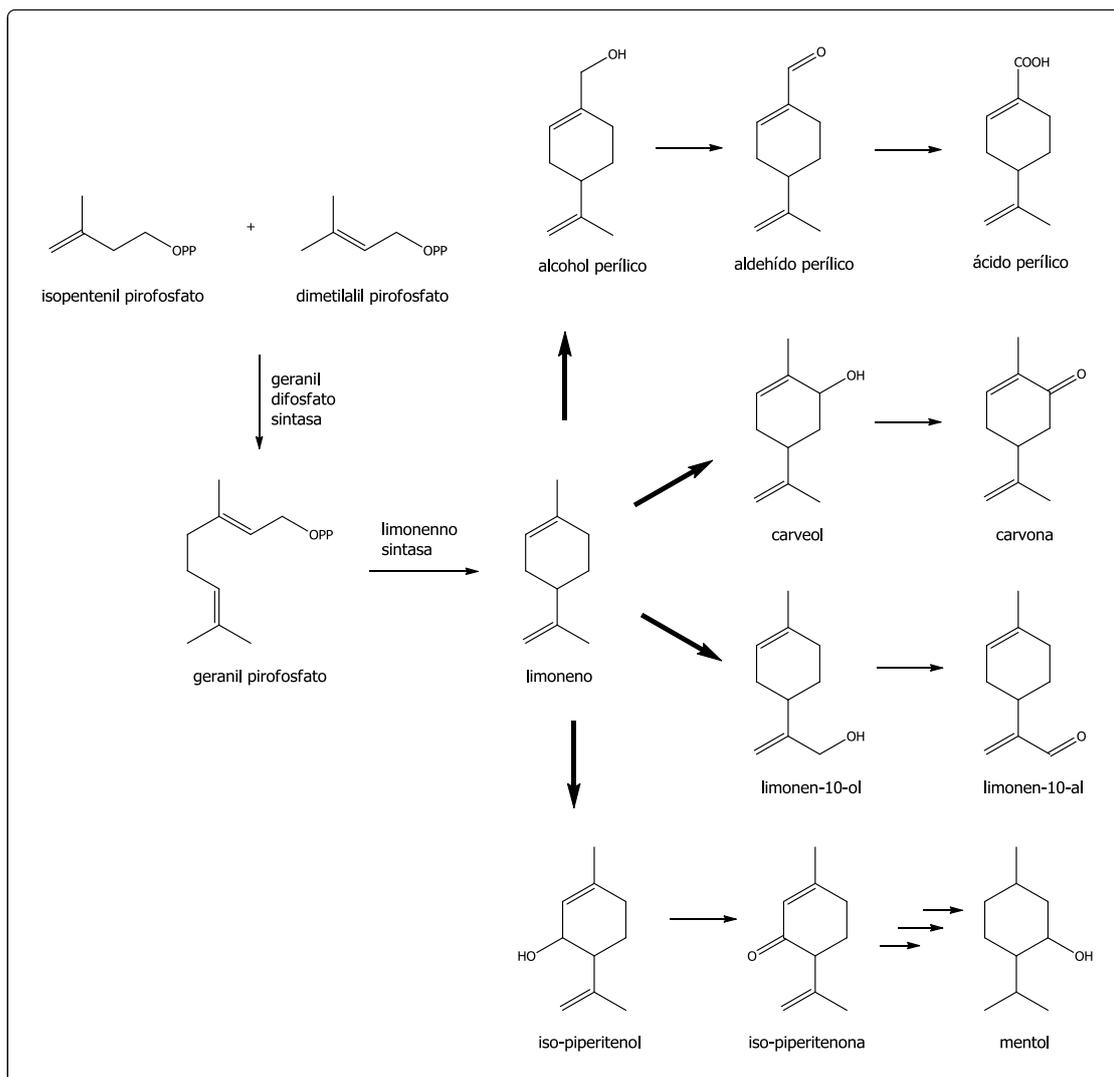
<p><i>R</i>(+)-limoneno</p>  <p>0,01      0,10 técnico    pur. 97%</p>	<p><i>S</i>(-)-<math>\alpha</math>-terpineol</p>  <p>0,50</p>	<p><i>S</i>(+)-carvona</p>  <p>2,00</p>	<p>Alcohol-<i>S</i>(-)-perílico</p>  <p>2,30</p>	<p>Alcohol-<i>R</i>(+)-perílico</p>  <p>50,00</p>
---	--	--	---	--

Tabla 3. Precio en dólares por gramo del limoneno y algunos de sus productos de oxidación (Sigma-Aldrich, 2007).



*Esquema 7. Rutas biosintéticas en plantas para el limoneno y sus derivados. Las flechas gruesas muestran el primer paso catalizado por una Cit P450; las restantes son una selección de pasos hacia productos derivados, donde generalmente están implicadas alcohol deshidrogenasas (Duetz et al., 2003).*

Existen reportados numerosos microorganismos capaces de biotransformar el limoneno, así como distintos productos de biooxidación (Duetz et al., 2003; Menéndez et al., 2005; Maróstica & Pastore, 2007). Las biotransformaciones de limoneno generalmente implican un primer paso de hidroxilación de un carbono saturado o de epoxidación de un doble enlace, y se ha postulado que dichas reacciones están catalizadas por citocromos P450. No obstante lo ya mencionado sobre la especificidad enzimática, en el caso de las bioconversiones del limoneno es poco frecuente encontrar oxidaciones que transcurran con elevada regio y estereoselectividad cuando se utilizan cepas silvestres como agentes biocatalizadores, y por lo general se obtienen una mezcla

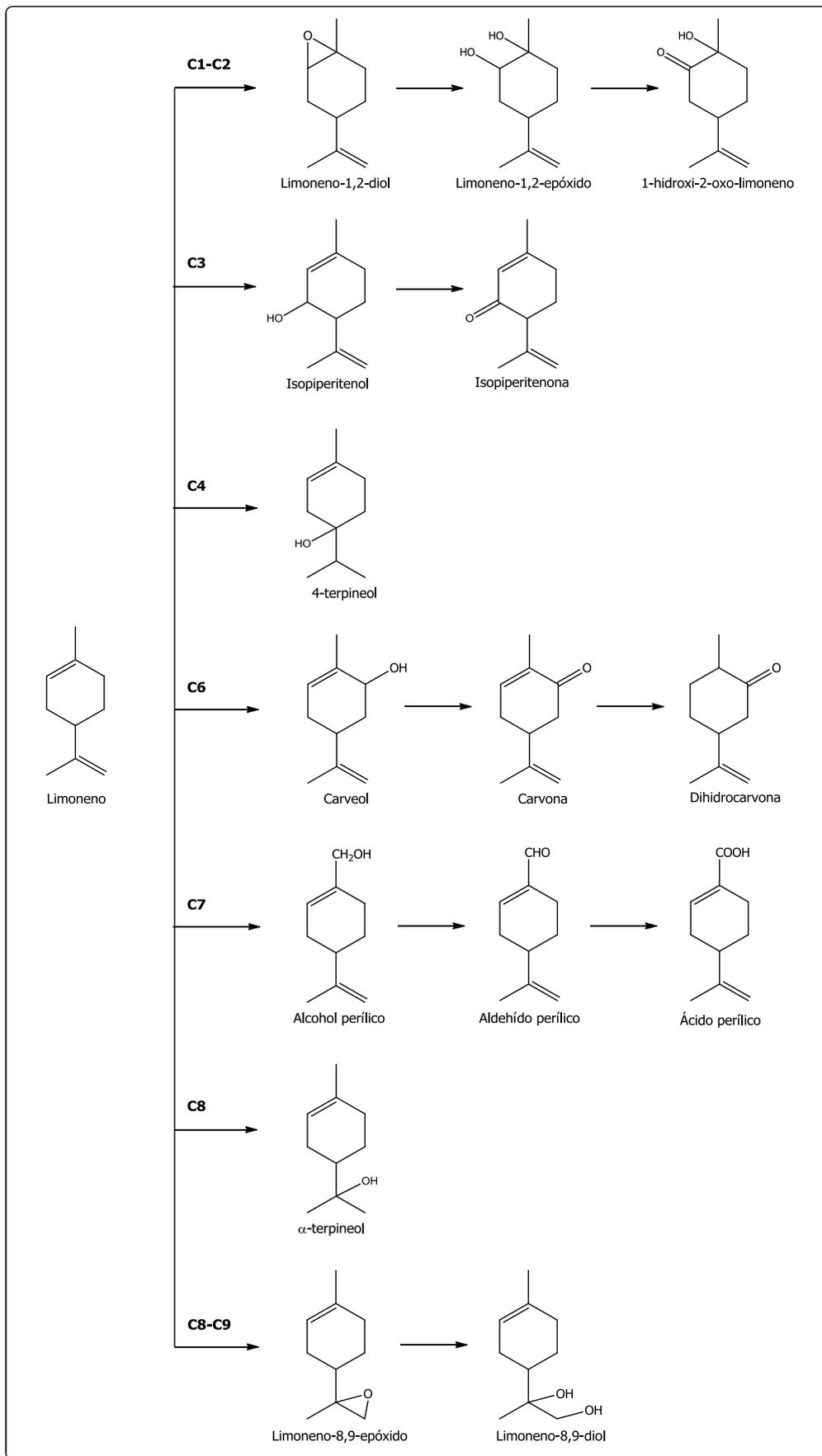
de varios productos y no un único compuesto (Menéndez et al., 2005). En el Esquema 8 se presentan los principales productos de biotransformación reportados hasta el momento, según el carbono donde ocurre la oxidación.

La biooxidación del limoneno mediada por microorganismos puede darse en prácticamente todos los carbonos, siendo el metileno no activado C5 el único sitio donde no se han reportado derivatizaciones.

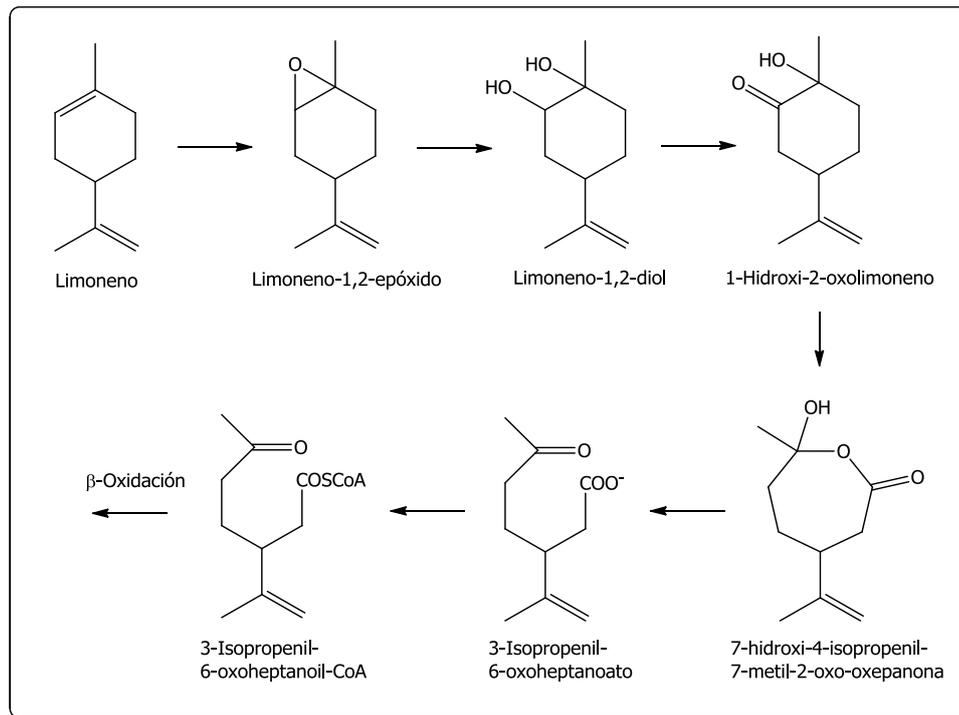
### *Carbonos 1 y 2*

Cuando los carbonos oxidados son los del doble enlace 1,2 los productos obtenidos son el limoneno-1,2-epóxido, el 1,2-diol (*cis* y *trans*) y el 1-hidroxi-2-oxo-limoneno como se muestra en el Esquema 8 (Dhavalikar et al., 1966; Mukherjee et al., 1973; Bowen, 1975; Abraham et al., 1986; Draczynska-Lusiak & Siewinski, 1989; Noma et al., 1992; van Rensburg et al., 1997; van der Werf et al., 1999; Demyttenaere et al., 2001; Pinheiro & Marsaioli, 2007; Ghasemi et al., 2009). Si bien generalmente se obtienen mezclas de productos, y en bajos rendimientos, existen reportes donde los porcentajes de bioconversión son interesantes. Noma y colaboradores trabajando con *Aspergillus cellulosa* han reportado la obtención del diol como compuesto mayoritario en un 21% (Noma et al., 1992). Por otro lado, con el microorganismo *Corynespora cassicola* se ha logrado obtener casi un 50% del limoneno-1,2-diol más otros tres productos minoritarios (Demyttenaere et al., 2001). En general se asume que la posible secuencia oxidativa es la que se muestra en el Esquema 8, la cual comienza con una epoxidación por una monooxigenasa, seguida de la hidrólisis del epóxido.

Muchos microorganismos son capaces de utilizar el limoneno como única fuente de carbono y energía, y en estos casos se ha postulado que el proceso catabólico puede tener dos vías de inicio: con la oxidación del metilo en la posición 7 (ver más adelante, Esquema 10), ó vía limoneno-1,2-epóxido. Esta última implicaría la hidrólisis del epóxido al diol por una epóxido hidrolasa, el cual se oxida a una hidroxicetona que resulta sustrato de una Baeyer-Villiger oxigenasa; la posterior hidrólisis de la lactona conduce al ácido susceptible de catabolizarse mediante  $\beta$ -oxidación (Esquema 9). Esta vía ha sido propuesta por van der Werf y colaboradores en la biotransformación del limoneno por la bacteria *Rhodococcus erythropolis* DCL14 (van der Werf et al., 1999).



Esquema 8. Principales productos de biotransformación microbiana del d-limoneno



Esquema 9. Catabolismo del limoneno vía limoneno-1,2-epóxido.

### Carbono 3

Cuando la oxidación se produce en el carbono 3 los metabolitos obtenidos son el isopiperitenol y la cetona correspondiente, la isopiperitenona (Esquema 8, C-3) (Kieslich et al., 1986; Noma et al., 1992, van Rensburg et al., 1997; van Dyk et al., 1998). No hay muchos reportes de oxidación en esta posición, y ninguno de ellos con bacterias como biocatalizador. Se destaca la obtención de isopiperitenona en un 19% por una cepa de *Aspergillus cellulosa*, pero junto con otros varios productos (Noma et al., 1992), y de *trans*-isopiperitenol con un rendimiento de 31 % por una cepa de *Hormonema* sp. (van Dyk et al., 1998), aunque en este último caso los autores indican que dicho resultado no pudo ser repetido.

### Carbono 4

Son muy escasos los reportes de hidroxilación sobre este carbono terciario (Bowen, 1975). Menéndez y colaboradores obtuvieron 4-terpineol al incubar limoneno con una cepa de *Streptococcus faecalis* en presencia de peróxido de hidrógeno, junto

con *cis*- y *trans*-carveol y carvona (Menéndez et al., 2000). Estos últimos se obtienen cuando la biotransformación se lleva a cabo sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no así el 4-terpineol.

### Carbono 6

La oxidación alílica sobre este carbono conduce a los alcoholes secundarios *cis*- y/o *trans*-carveol (Figura 6). La posterior acción de una deshidrogenasa sobre cualquiera de estos diasterómeros da lugar a la carvona, y la adición de H<sub>2</sub> sobre el doble enlace 1,2 lleva a la dihidrocarvona, productos todos que han sido reportados en la bioconversión del limoneno por distintos microorganismos (Dhavalikar & Bhattacharyya, 1966; Bowen, 1975; Kieslich et al., 1986; Noma et al., 1992; Onken & Berger, 1999a; Menéndez et al., 2000; Duetz et al., 2001; de Carvalho & da Fonseca, 2003; Hamada et al., 2003; Kaspera et al., 2005; Ghasemi et al., 2009; Lerin et al., 2010). De estos trabajos se destaca lo reportado por Duetz y colaboradores donde con una cepa de *Rhodococcus opacus* obtuvieron exclusivamente (+)-*trans*-carveol con un rendimiento final superior al 94 % (Duetz et al., 2001)

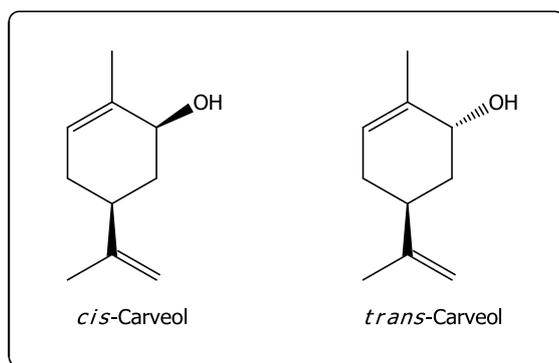


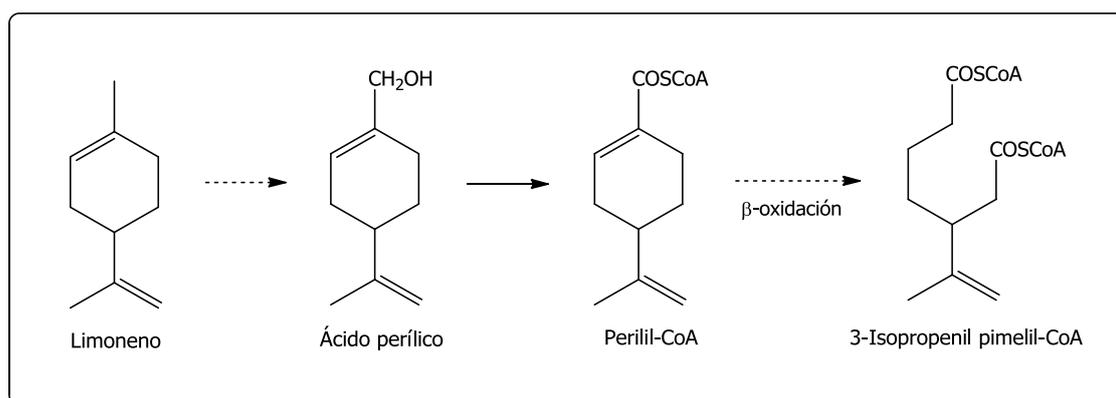
Figura 6. Los diasterómeros *cis*-carveol y *trans*-carveol.

### Carbono 7

Cuando la oxidación ocurre en C-7 existen distintos metabolitos posibles. La hidroxilación sobre este metilo alílico da lugar al alcohol perílico, quién luego puede sufrir posterior oxidación al aldehído y el ácido correspondientes (Esquema 8, C-7). Esta vía ha sido reportada para una gran diversidad de microorganismos, como bacterias (principalmente cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus*) (Dhavalikar & Bhattacharyya, 1966;

Cadwallader et al., 1989; Chang & Oriel, 1994; Speelmans et al., 1998; Mars et al., 2001; Chatterjee & Bhattacharyya, 2001; van Beilen et al., 2005; Mirata et al., 2009; Lerin et al., 2010), hongos filamentosos (Bowen, 1975; Noma et al., 1992; de Oliveira & Strapasson, 2000; Menéndez et al., 2002; Trytek & Fiedurek, 2005; Kaspera et al., 2005; Maróstica & Pastore, 2007, Trytek et al., 2009) y levaduras (van Rensburg et al., 1997).

Como se mencionó, una de las rutas metabólicas de varios microorganismos capaces de utilizar el limoneno como fuente de carbono y energía, comienza con la hidroxilación sobre este carbono, una progresiva oxidación a ácido perílico, seguida de la catabolización por una vía análoga a la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Esquema 10). Esta vía fue postulada por primera vez para una *Pseudomonas putida* PL por Dhavalikar y colaboradores (Dhavalikar & Battacharyya, 1966; Dhavalikar et al., 1966).



Esquema 10. Catabolismo del limoneno vía alcohol perílico

### Carbono 8

Cuando la oxidación se produce en el carbono 8 se obtiene el  $\alpha$ -terpineol (Esquema 8, C-8). Si bien en su momento se postuló la acción de una hidratasa sobre el doble enlace 8,9, actualmente se acepta la formación del 8,9-époxydo y posterior ruptura reductiva del mismo para dar lugar al  $\alpha$ -terpineol (Duetz et al., 2003). Kraidman informa por primera vez esta conversión en altos porcentajes con una especie de *Cladosporium* creciendo en un medio mineral y utilizando limoneno como única fuente de carbono y energía (Kraidman et al., 1969). Este es un producto comúnmente

encontrado en las transformaciones del limoneno (Cadwalader et al., 1989; Chang & Oriol, 1994; Tan & Day, 1998a, 1998b; Tan et al., 1998; Adams et al., 2003; Kaspera et al., 2005; Bicas et al., 2008a, 2008b; Pescheck et al., 2009; Lerin et al., 2010; Bicas et al., 2010; Badee et al., 2011). Se ha informado la obtención de más de un 67% de  $\alpha$ -terpineol en la bioconversión de limoneno con una cepa de *Penicillium digitatum* (Demyttenaere et al., 2001). Con ese mismo hongo, recientemente Pescheck y colaboradores han logrado obtener una concentración de  $\alpha$ -terpineol superior a 1 g/L mediante un biorreactor con un sistema cerrado de gases y alimentación continua del sustrato (Pescheck et al., 2009).

### *Carbonos 8 y 9*

La oxidación del doble enlace exocíclico da lugar al limoneno-8,9-epóxido o el limoneno-8,9-diol. Ambos son productos recientemente reportados en la biotransformación del limoneno por microorganismos. El epóxido ha sido informado como único producto de bioconversión por van der Werf y colaboradores, quienes utilizaron una cepa de *Xanthobacter* sp. C20 aislada de una muestra de sedimentos y cuyo crecimiento se dio con ciclohexano como única fuente de carbono (van der Werf et al., 2000). El diol (uroterpenol) es un producto característico de metabolización del limoneno en mamíferos. El único reporte de este compuesto como producto de biotransformación por microorganismos fue realizado recientemente por Pinheiro y Marsaioli, al bioconvertir el monoterpeno mediante una cepa del hongo *Trichosporum cutaneum* (Pinheiro & Marsaioli, 2007).

Otros compuestos que también han sido reportados en la biotransformación de *d*-limoneno mediante microorganismos son: *cis* y *trans*-2-*p*-menten-1-ol; *neo*-dihidrocarveol; 2-*exo*-hidroxicineol y 1,3,5-*p*-mentatrieno (Demyttenaere et al., 2001); limoneno-6,8-diol (Chatterjee & Bhattacharyya, 2001); 2,8-*p*-mentadien-1-ol (Rama Devi & Bhattacharyya, 1978); *cis*- y *trans*-*p*-menta-2,8-dien-1-ol (Bowen, 1975); 1-*p*-menten-6,9-diol, ácidos 2-hidroxi-8-*p*-menten-7-oico y 6,9-dihidroxi-1-*p*-menten-7-oico (Dhavalikar & Bhattacharyya, 1966); 4,9-dihidroxi-1-*p*-menten-7-oico (Dhavalikar et al., 1966)

En particular, respecto a la biotransformación de limoneno mediante hongos filamentosos, los primeros reportes se realizaron por un grupo norteamericano a fines

de los 60, utilizando cepas de *Cladosporium* sp. y obteniendo como productos mayoritarios  $\alpha$ -terpineol y *trans*-limoneno-1,2-diol (Kraidman et al., 1969; Mukherjee et al., 1973). Aunque no está comprobado en todos los casos, las bioconversiones fúngicas de  $\alpha$ -limoneno parecen iniciarse por acción de citocromo P450 monooxigenasas. Braddock y Cadwallader sostienen que en general los hongos catalizan las oxidaciones sobre los dobles enlaces 1,2 u 8,9 (Braddock & Cadwallader, 1995). Sin embargo, un estudio detallado de la bibliografía indica que prácticamente todos los derivados mencionados (Esquema 8) pueden ser obtenidos mediante bioconversiones fúngicas. Por lo general los ensayos son llevados a cabo con cultivos en medios líquidos ricos, con células viables en crecimiento. Según Rama Devi y Bhattacharyya los hongos no son capaces de crecer con un monoterpeno como única fuente de carbono, pero la biomasa derivada de un crecimiento de una fuente rica puede oxidar y catabolizar a dichos sustratos (Rama Devi & Bhattacharyya, 1978). En 2001 el grupo de Demyttenaere reporta por primera vez la biotransformación de limoneno mediante cultivos de *Penicillium digitatum* en medio sólido de superficie esporulada, a los cuales se les asperja una solución del terpeno (Demyttenaere et al., 2001). En el mismo trabajo realizan el ensayo de bioconversión con una suspensión de esporas en suero fisiológico, siendo los rendimientos obtenidos en ambos casos muy bajos. En dicha ocasión los autores también presentan a la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) para el seguimiento de la bioconversión. Más adelante el mismo grupo reporta el estudio de la influencia de diferentes parámetros, como agregado secuencial de sustrato, agregado de cosolventes y diferentes medios nutrientes, en la bioconversión llevada a cabo en medios líquidos ricos (Adams et al., 2003). Recientemente, un grupo de investigadores brasileños estudiaron la influencia de varios parámetros de la bioconversión (medio de cultivo, temperatura, agitación, concentración de sustrato, tamaño del inóculo) buscando optimizar la producción de  $\alpha$ -terpineol a partir de limoneno mediante una cepa del hongo *Fusarium oxysporum* (Bicas et al., 2008b). Si bien la mayoría de las biorreacciones con hongos filamentosos reportadas son realizadas en matraces con agitación, existen trabajos donde se utilizan distintos tipos de fermentadores o biorreactores. El más reciente es el publicado por Pescheck y colaboradores, donde obtienen muy buenos rendimientos de  $\alpha$ -terpineol al bioconvertir el limoneno en un fermentador cerrado con un medio nutriente rico, y al cual se le suministra en forma continua el sustrato tanto en forma líquida como gaseosa (Pescheck et al., 2009).

El presente trabajo abarca en una de sus partes aspectos relativos a la biotransformación del  $\alpha$ -limoneno por parte de una cepa de *Aspergillus niger* oportunamente aislada de cáscara de naranja. El mismo se enmarca en la continuación de lo iniciado por la Dra. Pilar Menéndez (Menéndez, 1995). En dicho trabajo se estudió la bioconversión del limoneno por diferentes bacterias y hongos, ensayando diversas condiciones de cultivo. En particular, para una cepa de *Aspergillus* sp., se obtuvieron 4-terpineol, carvona, isopiperitenona y piperitenona, pero con muy bajos porcentajes de bioconversión. Los antecedentes hallados en la literatura acerca de la biotransformación de limoneno con cepas de esta especie fúngica, son relativamente escasos. En prácticamente todos se destacan los bajísimos o nulos porcentajes de biotransformación. En 1978 Rama Devi y Bhattacharyya informan la obtención de carveol, carvona,  $\alpha$ -terpineol y 2,8-*p*-mentadien-1-ol, con la cepa *Aspergillus niger* NCIM 612, sin dar cuenta de los rendimientos ni condiciones empleadas (Rama Devi & Bhattacharyya, 1978). Los reportes más recientes indican que con este hongo la biotransformación de limoneno no ocurre (ó se da en pequeñísimos porcentajes). Dichos trabajos se llevaron a cabo usando distintas concentraciones de sustrato y diferentes métodos de utilización del biocatalizador (células en crecimiento, en reposo e inmovilizadas). La biotransformación de limoneno mediante cultivos de superficie esporulada y cultivos de crecimiento en medio líquido rico con *A. niger* DSM821, no arrojó ningún producto de reacción (Demyttenaere et al., 2001). Tampoco se obtuvieron productos de bioconversión realizando la fermentación en diversos medios ricos, tanto con una cepa de *A. niger* MTCC 961 (Chatterjee & Bhattacharyya, 2001), como con la cepa ATCC 9642 del mismo hongo (Toniazzo et al., 2005). Divyashree y colaboradores, solo observaron bioconversión de (-)-limoneno, y prácticamente nada con el (+)-limoneno, utilizando células en reposo en buffer fosfato y una cepa aislada de una muestra de suelo (Divyashree et al., 2006). Tampoco hubo biotransformación con la cepa de *A. niger* IOC-3913, aplicada en diferentes formas (Rozenbaum et al., 2006). Recientemente Lerin y colaboradores obtuvieron porcentajes de bioconversión prácticamente despreciables con dos cepas de colección: 0,13% y 0,68% de  $\alpha$ -terpineol respectivamente (Lerin et al., 2010). El mismo grupo de investigadores no encontró una cepa capaz de biotransformar limoneno en un screening de 400 microorganismos, entre los que se encontraban tres cepas de *A. niger* (Rottava et al., 2010).

### 1.3.6 Biotransformación de cineol

De la Sección 1.3.3 se desprende que el 1,8-cineol resulta un interesante sustrato de biotransformación dados su abundancia, costo, asequibilidad y potencial mayor valor de sus derivados oxi-funcionalizados. Muchos de estos derivados pueden resultar de utilidad en la industria de aromas y sabores, además de ser bioactivos con aplicaciones en farmacología ó en el agro. En particular es de esperar que los derivados oxigenados del cineol puedan presentar un efecto antibacteriano mayor que el del compuesto madre (Villecco et al., 2005). También resulta interesante explorar la potencial actividad fitotóxica de dichos derivados, a sabiendas del comportamiento aleloquímico del cineol y la bioactividad de compuestos relacionados (ver Sección 1.4.2). Por otra parte, si bien el 1,8-cineol no posee actividad óptica por ser una molécula simétrica respecto a un plano, es un compuesto proquiral. Cualquiera de los cuatro metilenos son centros proquirales, y la sustitución de cualquiera de los hidrógenos -por ejemplo por un oxidrilo- da lugar a un carbono quiral y por lo tanto una molécula con actividad óptica. De esta manera la obtención de sintones quirales ó derivados homoquirales con actividad biológica distintiva (Sección 1.1.4), es una razón más para buscar la funcionalización del 1,8-cineol. Esta derivatización implica entonces la sustitución de enlaces C-H no activados, lo cual constituye uno de los problemas más difíciles de resolver mediante procedimientos sintéticos clásicos (Villecco et al., 2005). Sin embargo, la funcionalización regioespecífica, y aun estereoespecífica, de enlaces C-H no activados es relativamente frecuente en los sistemas biológicos donde las reacciones son controladas enzimáticamente (Faber, 2000). De ahí que la biotransformación de 1,8-cineol resulte un campo de exploración más que interesante.

El 1,8-cineol es un compuesto poco estudiado como sustrato de bioconversión si lo comparamos con otros monoterpenos, particularmente con el limoneno. Los reportes de biotransformación de este monoterpeno mediante microorganismos, son los menos frente a los estudios realizados utilizando como biocatalizadores células animales y vegetales. El uso del 1,8-cineol o el aceite de *Eucalyptus* en preparaciones farmacéuticas, así como la presencia de hojas de *Eucalyptus* en la dieta de algunos animales, ha llevado al profuso estudio de la metabolización de este compuesto por parte de células animales.

### Biotransformación de 1,8-cineol mediante células vegetales

En lo que respecta a la biotransformación del 1,8-cineol a través de cultivos vegetales existen dos antecedentes. El primero de ellos implicó el uso de células de *Eucalyptus perriniana*, dándose la hidroxilación en las posiciones 2- y 3-*exo* (\*), seguida de glicosidación para dar cinco glucopiranosidos como productos finales (Orihara & Furuya, 1994). Los autores de este trabajo postularon que el 1,8-cineol es tóxico para el cultivo de estas células vegetales por lo que su biotransformación viene dada de la detoxificación del mismo, probablemente a través de un sistema de citocromo P450. En el otro trabajo se estudió la biotransformación utilizando un cultivo celular de *Catharanthus roseus* con el cual se obtuvo estereoselectivamente la hidroxilación en las posiciones *exo*: 2-*exo*-hidroxi-1,8-cineol y 3-*exo*-hidroxi-1,8-cineol (Hamada et al., 2004).

#### (\* Nota sobre la nomenclatura de los derivados hidroxilados del 1,8-cineol:

Manteniendo el criterio manejado por la mayoría de los autores, en este trabajo se nombrarán mediante el uso de los descriptores *exo* y *endo*, según lo indicado en la Figura 7. Tal asignación surge de la orientación del grupo sustituyente respecto al puente formado por los otros dos metilenos no sustituidos (el de numeración más alta según sistema IUPAC). Si el grupo está orientado hacia dicho puente, se denomina *exo*; si está orientado de manera opuesta al puente de mayor numeración se nombra *endo*. Cabe acotar que la literatura no es consistente al respecto hallándose diversas nomenclaturas, muchas veces contradictorias.

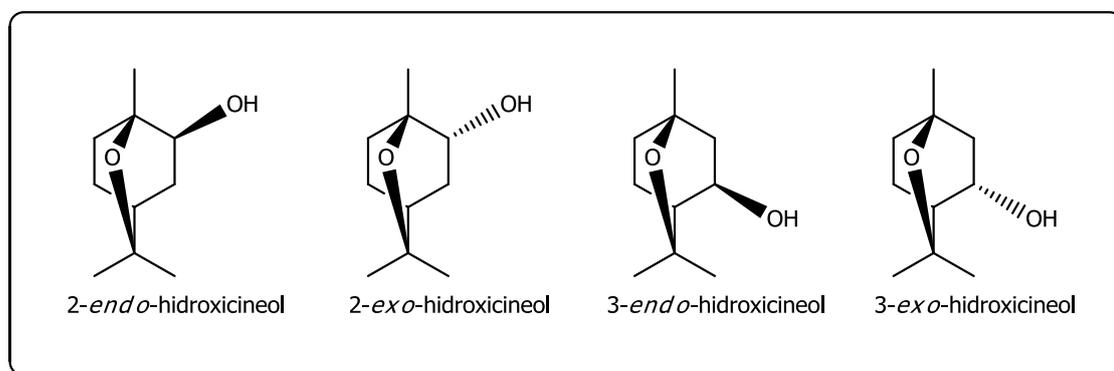
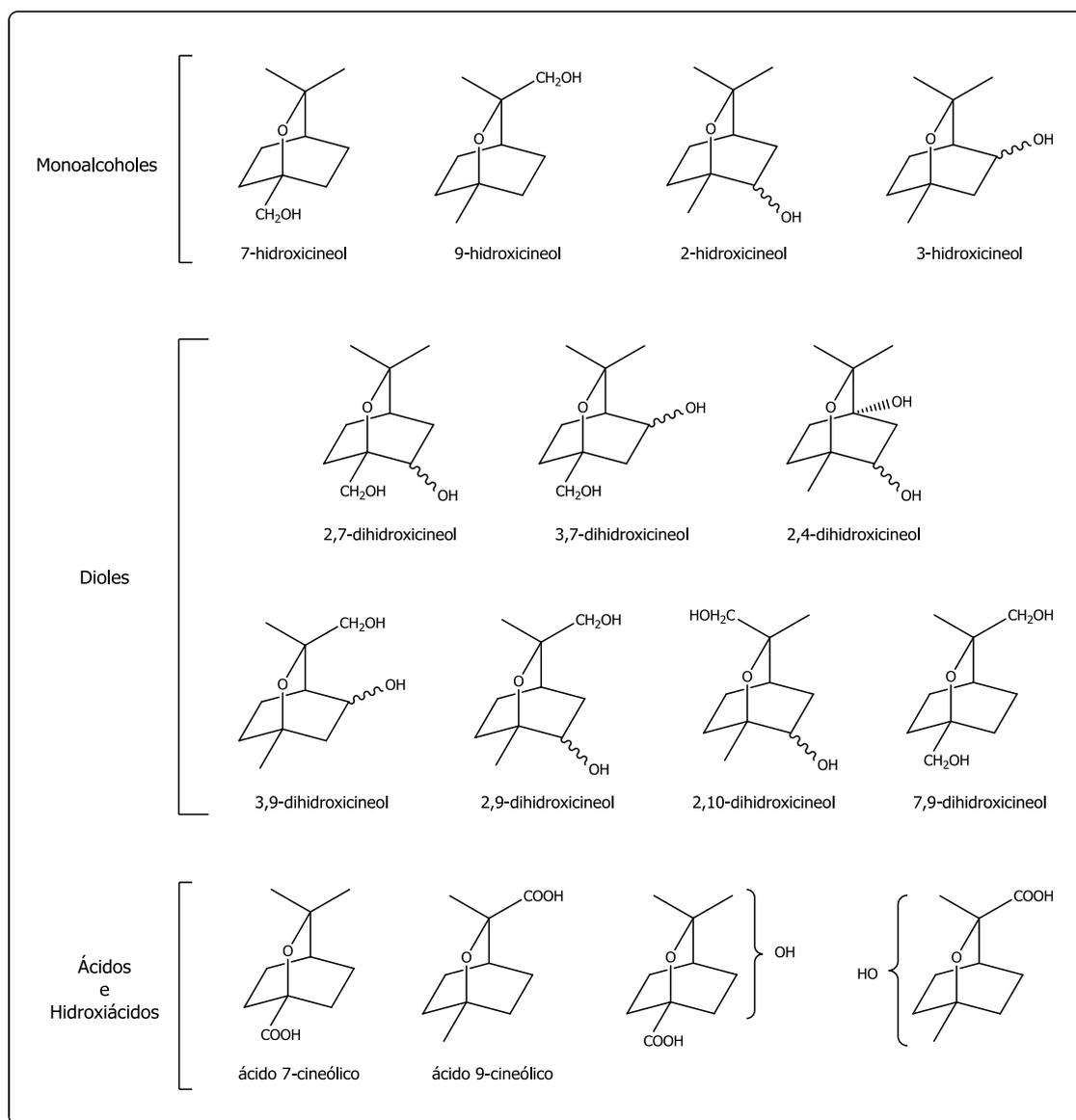


Figura 7. Nomenclatura de los derivados C2 y C3 sustituidos del 1,8-cineol.

## Biotransformación de 1,8-cineol mediante células animales

Existe un importante número de trabajos publicados sobre la metabolización del 1,8-cineol por la zarigüeya cola de cepillo (*Trichosurus volpecula*) y el koala (*Phascolarctos cinereus*), dos animales que cuya dieta habitual contiene hojas de eucaliptos, así como también por conejos y ratas. Los reportes abarcan generalmente el estudio de los metabolitos presentes en la orina de estos animales. Los productos de biotransformación son los ya mencionados alcoholes secundarios 2- y 3- (*endo* y *exo*) hidroxicineoles, además de los alcoholes primarios 7-hidroxi y 9-hidroxi, los respectivos ácidos en esas posiciones, distintos dioles e hidroxiaácidos (Esquema 11). En el metabolismo animal el comienzo de la oxidación del terpeno se da preferentemente por los metilos, luego metilenos y por último el metino (Carman et al., 1994).



Esquema 11. Principales productos de la metabolización del 1,8-cineol por animales.

El primer reporte se remonta a 1979 donde Flynn y Southwell detectaron el 9-hidroxicineol y el ácido correspondiente en la orina de zarigüeya (Flynn & Southwell, 1979). En trabajos posteriores con este animal llevados a cabo por el equipo del Dr. Carman, también fueron identificados como metabolitos los alcoholes en las posiciones 7 y 9 (ambos enantiómeros), los correspondientes ácidos en esas posiciones y los dioles 2,4; 2,7; 2,9; 2,10 y 7,9 (Carman & Klika, 1992; Bull et al., 1993; Carman et al., 1994; Carman & Rayner, 1994; Carman & Garner, 1996). Por su parte, Boyle y colaboradores encontraron tres hidroxicineoles, los dos ácidos cineólicos, tres dioles y once ácidos hidroxicineólicos, en la orina de los animales alimentados con una dieta conteniendo 0.5% de cineol (Boyle et al., 2000). Recientemente el mismo grupo de investigación halló resultados similares al realizar estudios farmacocinéticos del 1,8-cineol en el mencionado marsupial (Mc Lean et al., 2007). Los cuatro alcoholes secundarios 2- y 3- (*endo* y *exo*) hidroxicineoles fueron encontrados en la orina de conejos a los que se les incorporó 1,8-cineol en la dieta (Miyazawa et al., 1989). En un trabajo posterior se realizó un estudio del metabolismo de 1,8-cineol utilizando preparados microsomales de zarigüeya y koala, en comparación con rata y humanos (Pass et al., 2001). Se determinó que la capacidad de detoxificación del 1,8-cineol es mayor en los animales que incluyen este terpeno en su dieta que en los animales que no lo hacen. En este estudio se detectaron como productos de metabolización: 2-, 3-, 7- y 9-hidroxicineoles; los dioles 2,9; 3,9; 2,7 y 3,7 y los ácidos en 7 y 9.

El metabolismo del 1,8-cineol fue estudiado también en insectos, comparándose los metabolitos obtenidos con distintas especies y en los estados de larva y adulto de cada una (Southwell et al., 2003). Los principales productos obtenidos fueron los monoalcoholes hidroxilados en las posiciones 2, 3 y 9, y el 2,9-dihidroxicineol. Según los autores es el primer reporte de un diol del cineol como metabolito de insectos.

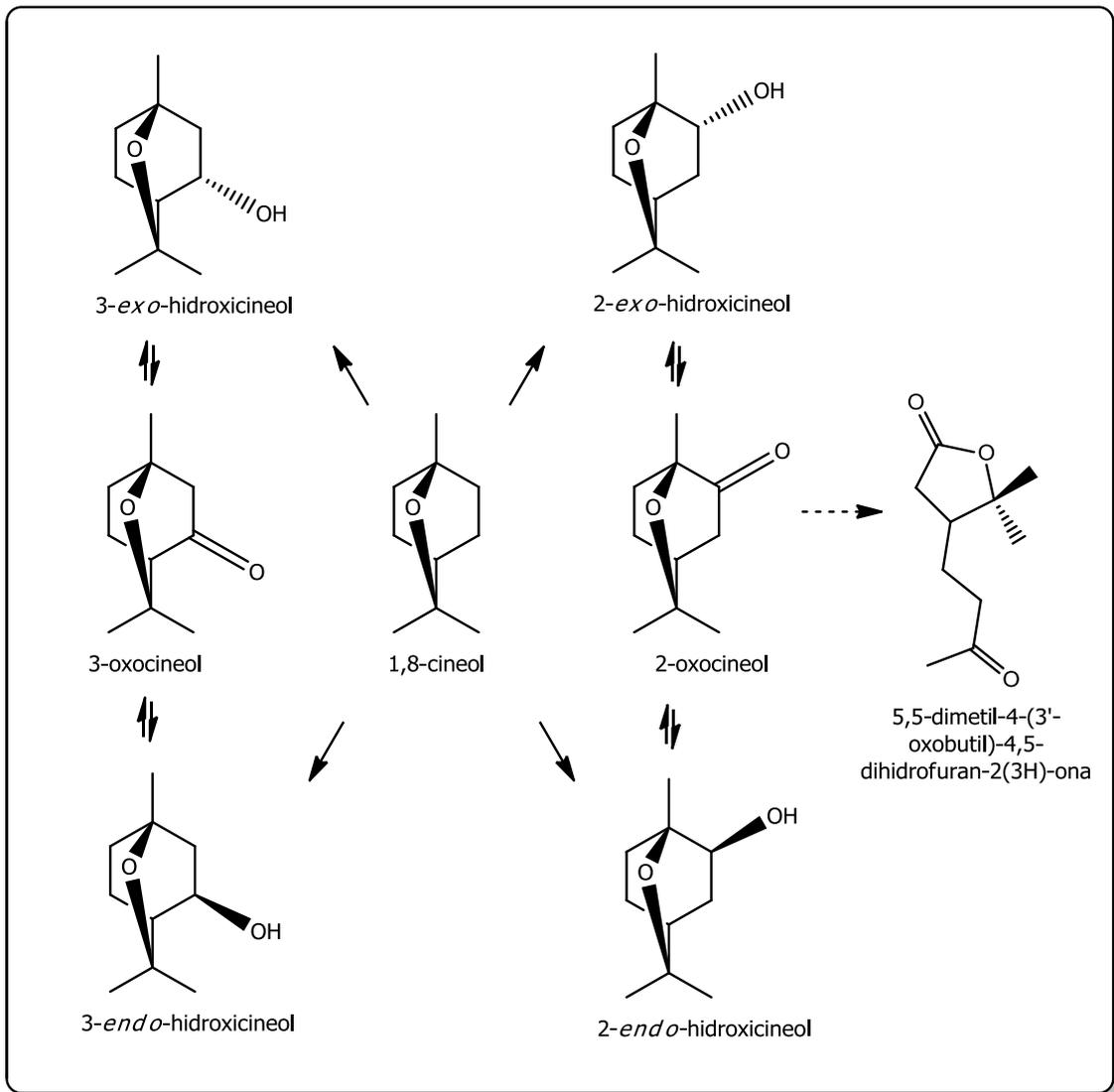
En cuanto a la biotransformación con células humanas, el 2-*exo*-hidroxicineol fue el único producto identificado en la incubación del 1,8-cineol con microsomas de hígado humano, en varias concentraciones y niveles de Cit P450 (Miyazawa & Shindo, 2001). Trabajando con ese mismo tipo de células, recientemente Duisken y colaboradores encontraron como producto de la biotransformación el 3-*exo*-hidroxicineol además del ya reportado 2-*exo*-hidroxicineol (Duisken et al., 2005). Estos resultados *in vitro* fueron confirmados *in vivo* al hallarse dichos metabolitos en orina de humanos a quienes se les administró el monoterpeno oralmente.

### *Biotransformación de 1,8-cineol mediante microorganismos*

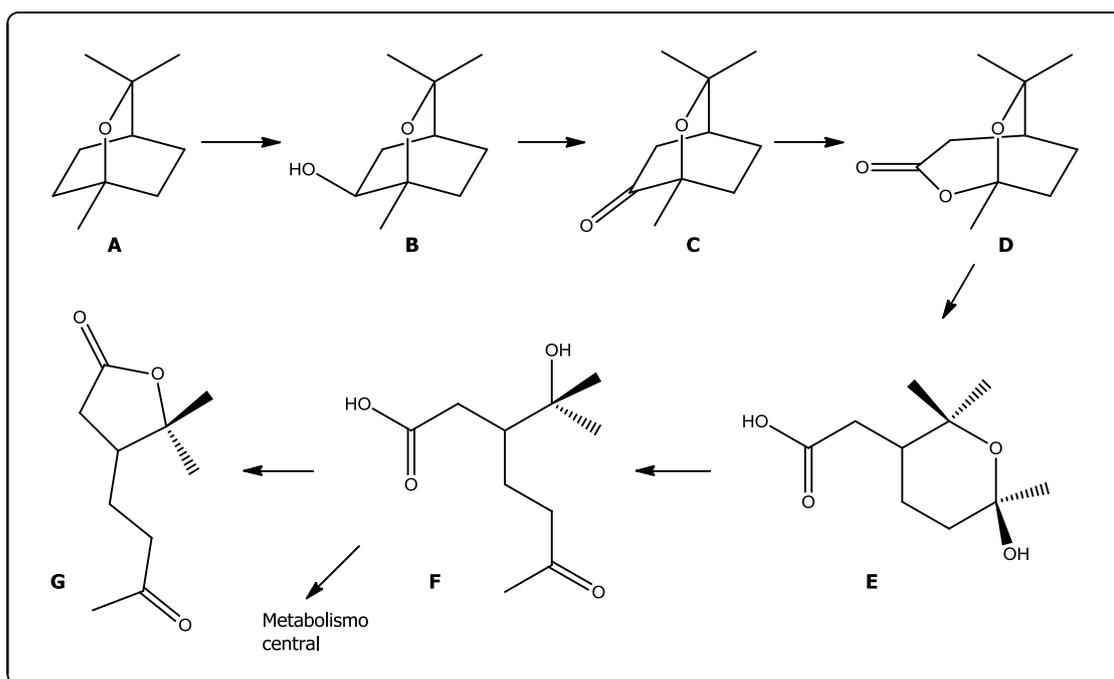
Los productos obtenidos por la bioconversión con microorganismos implican generalmente funcionalizaciones en los carbonos 2 y 3 del 1,8-cineol (Esquema 12). Los trabajos que utilizan bacterias como agente biocatalizador predominan sobre los que utilizan hongos. Los primeros reportes sobre la utilización del cineol por microorganismos datan de 1979 cuando Mac Rae y colaboradores aislaron de la superficie de una hoja de *Eucalyptus* una cepa de la bacteria *Pseudomonas flava* capaz de utilizar cineol como única fuente de carbono, detectándose los metabolitos 2-oxocineol, 2-*endo*- y 2-*exo*-hidroxicineol, y la lactona (*R*)-5,5-dimetil-4-(3'-oxobutil)-4,5-dihidrofuran-2(3H)-ona (compuesto G, Esquema 13) (Mac Rae et al., 1979). Los autores realizaron estudios con los diferentes intermediarios detectados y propusieron una ruta de metabolización para el 1,8-cineol donde el primer producto es el 2-*exo*-hidroxicineol, que se oxida a 2-oxo, el cual puede reducirse de nuevo a 2-*exo* o 2-*endo*-hidroxicineol, no existiendo evidencia de que se forme el 2-*endo* directamente a partir de cineol. Sin embargo, más adelante otro grupo aisló una cepa de *Rhodococcus* a partir de suelo forestado con *Eucalyptus* capaz de crecer en 1,8-cineol como única fuente de carbono y energía, y que dio 2-*endo*-hidroxicineol y 2-oxocineol como productos de biotransformación (Williams et al., 1989). Dicha cepa produce además la misma lactona que aislaron Mac Rae y colaboradores al crecer con 2-oxocineol como única fuente de carbono. De esta forma los autores proponen una ruta metabólica para el 1,8-cineol, donde el alcohol es el primer producto, el cual se oxida a 2-oxocineol, el que deviene en una lactona por acción de una Baeyer-Villiger-monooxigenasa; este compuesto se hidroliza espontáneamente y luego se cicla para dar otra lactona idéntica a la antes mencionada (Esquema 13). La biotransformación del 1,8-cineol utilizando una cepa de *Bacillus cereus* (UI-1477) dio lugar al 2(*R*)-*exo*-hidroxi-1,8-cineol como único compuesto de reacción, con un rendimiento del 79%, y asignándose la responsabilidad biocatalítica a una citocromo P450 (Liu & Rosazza, 1990). De Voss y colaboradores han aislado, purificado y caracterizado el primer citocromo P450<sub>cin</sub> (CYP176A1), involucrado en la hidroxilación de 1,8-cineol, a partir de una cepa salvaje de *Citrobacter braakii* capaz de utilizar el monoterpeno como única fuente de carbono y energía (Hawkes et al., 2002). En dicho trabajo clonaron el gen cinA (que codifica para el citocromo P450<sub>cin</sub>), expresándolo luego en una cepa *E. coli*. Este microorganismo recombinante biotransforma 1,8-cineol obteniéndose como único producto 2-hidroxicineol del cual no se reporta la estereoquímica. En base a este resultado los autores plantean que el

citocromo P450<sub>cin</sub> es el responsable de la monooxigenación inicial del 1,8-cineol en la ruta de degradación de este terpeno por la cepa de *Citrobacter braakii*. Recientemente los mismos autores clonaron, expresaron y caracterizaron una hidroxicineol deshidrogenasa del mismo microorganismo (Slessor et al., 2010). Ahí dieron cuenta que el 2-hidroxicineol formado a partir de la CYP176A1 fue un único enantiómero del 2-*endo*-hidroxicineol, y que la deshidrogenasa fue enantioespecífica ya que ensayados los 4 isómeros del 2-hidroxicineol, solamente el obtenido en la oxidación con la CYP176A1 dio el 2-oxocineol. Rasmussen y colaboradores aislaron 44 microorganismos, hongos y bacterias, capaces de transformar 1,8-cineol (Rasmussen et al., 2005). Los autores sólo discuten el resultado obtenido con dos cepas, una bacteriana y una fúngica. La bacteria corresponde a un cepa de *Novosphingobium subterranea* que convierte el 1,8-cineol en los mismos metabolitos reportados por primera vez por Mac Rae y colaboradores arriba mencionados, además del ácido 3-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-oxo-heptanoico, precursor de la lactona (Esquema 13). El trabajo más reciente sobre la biotransformación bacteriana del cineol es el realizado por el grupo de Facultad de Química de la UdelaR, donde mediante una cepa de *Rhodococcus* sp. aislada de suelo, se obtuvieron 2-*endo*- y 2-*exo*-hidroxicineol y 2-oxohidroxicineol, todos ópticamente puros (Rodríguez et al., 2006).

Los trabajos referidos a la biotransformación del cineol mediante hongos son muy escasos. El primero es el realizado por Noma y colaboradores, quienes lograron la bioconversión del 1,8-cineol utilizando una cepa de *Aspergillus niger* aislada de suelo, llevando a cabo la reacción en un medio nutriente rico, agregando el sustrato en una concentración de 0,15 % (v/v) y dejándola transcurrir por 7 días (Nishimura et al., 1982). Los productos obtenidos fueron los alcoholes 2-*exo*-hidroxicineol, 3-*endo*- y 3-*exo*-hidroxicineol, y las cetonas 2-oxocineol y 3-oxocineol (Esquema 12). Como se mencionó anteriormente, el equipo de Rasmussen también aisló una cepa fúngica identificada como *Penicillium purpurogenum*, capaz de crecer en 1,8-cineol como única fuente de carbono y energía, y con el que se logró convertir este compuesto en 3-hidroxicineol (no se menciona si uno o ambos diasterómeros) y 3-oxocineol (Rasmussen et al., 2005). Ambos trabajos sobre biotransformación fúngica del 1,8-cineol se realizaron utilizando los respectivos biocatalizadores como cultivos sumergidos en medios líquidos.



Esquema 12. Principales productos de biotransformación del 1,8-cineol por microorganismos reportados en la literatura, indicando los probables caminos metabólicos hacia los mismos (adaptado de Rasmussen et al., 2005).



*Esquema 13. Ruta catabólica propuesta para el 1,8-cineol utilizado como única fuente de carbono y energía por parte de bacterias. (A) 1,8-cineol; (B) 2-hidroxicineol; (C) 2-oxocineol; (D) 1,6,6-trimetil-2,7-dioxabicyclo[3.2.2]nonan-3-ona; (E) 2,6,6-trimetil-5-acetiltetrahidropiran-2-ol; (F) ácido 3-(1-hidroxi-1-metiletil)-6-oxoheptanoico; (G) 5,5-dimetil-4-(3'-oxobutil)-4,5-dihidrofuran-2(3H)-ona.*

Una rápida revisión sobre los trabajos aquí citados acerca de la biotransformación del 1,8-cineol, permite notar que en el metabolismo microbiano se obtienen oxidaciones sobre los metilenos, no así sobre los metilos cuya hidroxilación es frecuente en el metabolismo animal. En todas las biotransformaciones microbianas del 1,8-cineol se observa que las cepas bacterianas producen únicamente series de compuestos 2-oxigenados mientras que cuando se emplean cepas fúngicas la oxidación ocurre tanto en las posiciones 2 como 3 (Rodríguez, 2006; Rasmussen et al., 2005). Esto sugiere que utilizando hongos para la bioconversión de este monoterpeno es posible acceder a un espectro mayor de derivados.

## 1.4 Herbicidas de origen natural

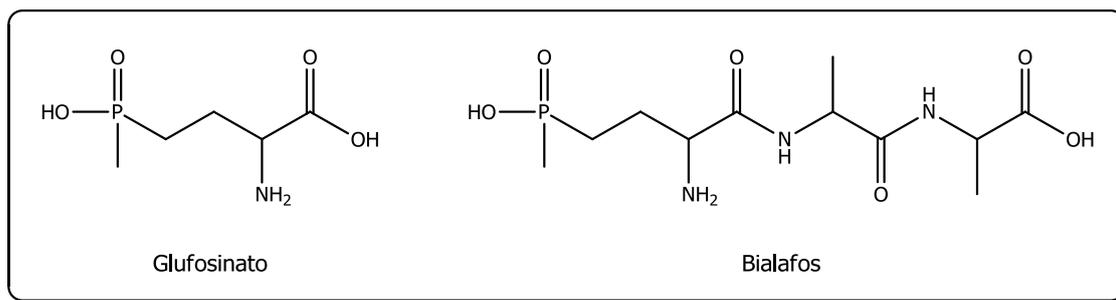
### 1.4.1 Alelopatía. Aleloquímicos como modelos de herbicidas.

De las 250.000 especies vegetales existentes, aproximadamente 8.000 (3%) son consideradas malezas y 250 son problemáticas para el agro, representando el 0,1% de la flora mundial (Leguizamón, [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_pasturas/pasturas\\_combate\\_de\\_plagas\\_y\\_malezas/90-malezas\\_y\\_agroecosistema.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_combate_de_plagas_y_malezas/90-malezas_y_agroecosistema.pdf)). El problema del control de malezas ha sido enfocado tradicionalmente desde el punto de vista de su exclusión de los cultivos, apuntándose la investigación y el desarrollo hacia la obtención de nuevos herbicidas. Durante la segunda mitad del siglo pasado la investigación se centró en el desarrollo de herbicidas sintéticos (Macías, 1995). El rápido aumento de la población y la limitada disponibilidad de tierras fueron dos de los factores más importantes para estimular el crecimiento del mercado para los productos agroquímicos. Entre el 60 y 70% de los pesticidas usados en la agricultura de los países desarrollados son herbicidas (Macías et al., 1999). Al día de hoy se disponen de más de 260 principios activos herbicidas (The Pesticide Manual, 2006). Un reciente reporte indica que el mercado mundial de agroquímicos (fertilizantes y pesticidas) movilizó en 2009 una cifra superior a los 119 mil millones de dólares, correspondiendo 51 mil millones a pesticidas, de los cuales los herbicidas significan alrededor de un 60% (<http://www.bccresearch.com/report/CHM054A.html>). Estos productos sin duda han contribuido en forma significativa al logro de los altos niveles de producción de las últimas décadas.

Sin embargo, esta mejora en la producción tiene un importante contracara derivada del uso indiscriminado de los agroquímicos, lo que ha despertado una enorme preocupación. Muchos de estos compuestos son muy peligrosos debido a su persistencia en el ambiente, su toxicidad sobre organismos no blancos, y la potencial actividad carcinógena y mutagénica (Macías, 1995). Los organismos de protección del medio ambiente de la mayoría de países han identificado a la agricultura como la principal fuente no puntual de contaminación de aguas superficiales. Dicha contaminación, junto con la de aguas subterráneas, la aparición de especies resistentes, y el hallazgo de residuos de plaguicidas en ciertos alimentos, son algunos de los inconvenientes derivados del uso de agroquímicos en el marco de la llamada agricultura

convencional (Waller, 2004). Por ello, la agricultura moderna se enfrenta al desafío de reducir el daño ambiental y los peligros para la salud derivados del uso de pesticidas convencionales, minimizando la erosión del suelo y manteniendo un alto nivel de producción (Einhellig, 1995a). Esto ha llevado en los últimos años al planteamiento de nuevas alternativas tecnológicas que intentan la obtención de niveles de producción similares o aún algo inferiores a los actuales, sostenibles en el largo plazo, y con una sustancial reducción en el uso de agroquímicos, combustibles y labranzas (Leguizamón, [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_pasturas/pasturas\\_combate\\_de\\_plagas\\_y\\_malezas/90-malezas\\_y\\_agroecosistema.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_combate_de_plagas_y_malezas/90-malezas_y_agroecosistema.pdf)).

En ese contexto, existe un considerable interés en la búsqueda de agroquímicos biodegradables, más eficientes y específicos (Macías et al., 1999, Vyvyan, 2002). Una de las estrategias en esa búsqueda apunta a los pesticidas de origen natural, debido a que usualmente son más seguros desde el punto de vista ambiental, y podrían no alterar los delicados eco- y biociclos (Macías, 1995). Los miles de metabolitos secundarios producidos por plantas y microorganismos, proveen una gran diversidad de estructuras químicas que se presentan como diferentes oportunidades en la búsqueda de nuevos pesticidas y reguladores del crecimiento (Einhellig, 1995a). Sin embargo, el uso de productos naturales como herbicidas o estructuras líderes en programas de desarrollo de herbicidas es una alternativa que no ha sido tan explotada como lo ha sido para insecticidas y fungicidas (Duke et al., 2000). De hecho, hasta el momento sólo dos compuestos de origen natural, derivados del metabolismo bacteriano, se han comercializado con éxito como herbicidas: bialafos (un tripéptido) y glufosinato (ó fosfotricina, un fosfonato análogo a aminoácido) (Figura 8) (Hoagland, 1999). Dado su origen, estos dos compuestos pueden catalogarse como *biopesticidas* o más concretamente como *bioherbicidas*. Cabe aquí precisar que si bien el término bioherbicida es usado a veces para hacer referencia a cualquier compuesto fitotóxico de origen natural, su correcto significado resulta menos abarcativo. Un biopesticida es un agente biológico microscópico ó un producto derivado de microorganismos, usado en el control de plagas como malezas, insectos o roedores (Gavrilescu & Chisti, 2005).



*Figura 8. Bialafos y glufosinato, dos bioherbicidas comerciales.*

La *alelopatía* es definida por la Sociedad Internacional de Alelopatía como “la ciencia que estudia cualquier proceso que involucra, principalmente, los metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos que influyen en el crecimiento y el desarrollo de los sistemas agrícolas y biológicos, incluidos los efectos positivos y negativos” (Macías et al., 1999). El término fue introducido por el fisiólogo vegetal Hans Molisch en 1937 para referirse al efecto (positivo o negativo) de una planta sobre otra, al describir el fenómeno de la interacción a través de productos químicos. El significado ha dado lugar a variaciones y confusiones, y muchas veces la alelopatía es simplemente reconocida como el efecto perjudicial que una planta tiene sobre otra debido a los productos químicos que libera al medio ambiente (Mallik, 2008). Sin embargo la alelopatía hoy se reconoce como un fenómeno ecológico complejo, y de ahí lo abarcativo de su significado actual (Weidenhamer, 2008). Más allá de la definición, el concepto de la interacción entre plantas se conoce desde hace miles de años, hallándose reportes del fenómeno ya en la antigua Grecia (Willis, 2007).

Los compuestos químicos responsables de la acción alelopática se conocen como *aleloquímicos*. Los aleloquímicos de plantas tienen implicaciones ecológicas como comunicadores biológicos en la naturaleza (Macías et al., 2008). Estos compuestos pueden liberarse al medioambiente por varios mecanismos: volatilización desde las hojas, exudación de las raíces, y lixiviado por las lluvias de las hojas o de los desechos de plantas en el suelo (Vyvyan, 2002). A los efectos del control de malezas, resultan de particular interés aquellos aleloquímicos liberados por una planta que puedan actuar en detrimento de la germinación o desarrollo de otra especie. Los aleloquímicos que son fitotóxicos han sido identificados en muchos géneros de plantas y pertenecen a distintas clases de familias químicas (Leather & Einhellig, 1988). De los cientos de aleloquímicos identificados solo se conoce el modo de acción de unos pocos (Einhellig, 1995b). En la

alelopatía planta-planta, los efectos inhibidores más comunes son visibles en las funciones de las plantas tales como la respiración, la fotosíntesis, el balance hídrico y la función estomática, el flujo de xilema, la permeabilidad de la membrana, el desarrollo y la división celular, y alteraciones en la actividad y síntesis de proteínas y enzimas (Haig, 2008).

Mediante el desarrollo de nuevas técnicas que involucren a la alelopatía se puede encontrar alternativas al control de malezas mediante: el uso de plantas alelopáticas en cultivos de cobertura, en la rotación de cultivos, la transferencia genética de los rasgos de alelopáticos en cultivares comerciales, ó el uso de aleloquímicos (o derivados) como herbicidas (Macías, 1995). De esta manera la alelopatía se presenta como un promisorio componente en el desarrollo de manejos integrados de malezas. Desde hace años está bien establecido que la alelopatía resulta una valiosa herramienta en la búsqueda de nuevos herbicidas naturales (Macías, 1995; Macías et al., 1999). Así, la investigación acerca del uso de aleloquímicos naturales o modificados como herbicidas, ha tenido una reciente expansión y surge como una tecnología alternativa para el control de malezas (Vyvyan, 2002). Aquellos productos naturales con potencial alelopático son una atractiva fuente de compuestos líderes en la búsqueda de nuevos herbicidas, no sólo por la diversidad y novedad de las estructuras químicas producidas por los organismos vivos, sino también por la potencial especificidad de la bioactividad y la muy poca probabilidad de bioacumulación perjudicial en suelo y agua. (Macías, 1995; Waller, 2004; Macías et al., 2008).

El posible uso como herbicida de un aleloquímico natural o derivado, debe ser evaluado en base a su estabilidad en el suelo, su biodegradabilidad, el sitio de acción, la accesibilidad y el nivel de actividad (Macías, 1995). Más allá de eso, un primer paso crucial en el camino hacia un herbicida de origen natural es la aplicación de bioensayos adecuados a nivel de laboratorio (Vyvyan, 2002; Hoagland & Williams, 2004; Macías et al., 2008).

#### *1.4.2 Cineol y derivados*

A los efectos de establecer una primera aproximación del potencial de los aleloquímicos de plantas superiores, en 1995 Francisco Macías realizó una revisión de los compuestos alelopáticos con potencial uso como herbicidas naturales, basado en sus

niveles de actividad y especificidad (Macías, 1995). Siguiendo una clasificación previa que agrupa a los aleloquímicos en 13 clases de compuestos, el autor encontró que 7 clases eran las más activas y concluyó que los aleloquímicos naturales más potentes son terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpénicas y triterpenos) y ácidos grasos, con un grado de actividad de 0,25 a  $10^5$  ppb.

Los monoterpenos son uno de los grupos de productos naturales más promisorios respecto a su uso como modelos de nuevos herbicidas naturales (Macías et al., 1999), siendo dentro de los compuestos terpenoides los más implicados en procesos alelopáticos (Duke et al., 2000; Duke & Oliva, 2004; Einhellig, 1995b; Macías et al., 1999; Nishida et al., 2005; Vyvyan, 2002). Durante más de 75 años se ha sabido que los monoterpenos de aceites esenciales de plantas tienen fuertes efectos inhibitorios sobre el crecimiento y la germinación de semillas, y que estos efectos pueden ocurrir a través de la volatilización de estos compuestos (Haig, 2008). Dentro de ellos, el 1,8-cineol fue uno de los primeros compuestos en ser reportado como un potente aleloquímico (Muller & Muller, 1964). Este monoterpeno fitotóxico está probablemente localizado en su totalidad en tricomas glandulares de especies de *Salvia*, y junto con otros terpenoides inhiben el crecimiento y desarrollo de las plantas del entorno; alcanzando las mismas aparentemente por volatilización y/o lixiviación de los desechos del suelo (Duke et al., 1999). El modo de acción parece darse afectando la división celular dando por resultado células de mayor diámetro, más cortas y con núcleos irregulares (Einhellig, 1995b), inhibiendo fuertemente todas las etapas de la mitosis (Romagni et al., 2000a). En un reciente estudio de los efectos de varios monoterpenos sobre plántulas de *Brassica campestris*, Nishida y colaboradores encontraron que el 1,8-cineol inhibe el crecimiento de raíz, no así del hipocótilo, afectando la actividad mitótica a nivel del meristema apical de la misma (Nishida et al., 2005). El 1,4-cineol (1-metil-4-(1-metiletil)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptano) (Figura 9), otro éter monoterpénico isómero del 1,8-cineol, también es conocido por sus propiedades fitotóxicas (Duke & Oliva, 2004; Vyvyan, 2002). A partir de un trabajo publicado por Romagni y colaboradores en el año 2000, se consideró que la acción herbicida era debida a la inhibición de la enzima asparagina sintetasa por parte del monoterpeno (Romagni et al., 2000b). Cinco años más tarde, los autores se retractaron, manifestando que si bien el trabajo original demostró que la asparagina sintetasa era el sitio de acción para el 1,4-cineol y derivados, esto no pudo repetirse en ensayos posteriores (Romagni et al., 2005). La volatilidad de estos monoterpenos se presenta como un problema para su aplicación

directa como herbicidas. Así, a partir del 1,4-cineol se desarrolló el compuesto conocido como *cinmethylin* (éter bencílico del 2-hidroxi-1,4-cineol) (Figura 9), para el control ciertas de malezas monocotiledóneas (Grayson et al., 1987). Respecto a su modo de acción caben aquí las mismas consideraciones que para el 1,4-cineol. No obstante, más allá del sitio blanco, la actividad parece deberse al alcohol (2-hidroxi-1,4-cineol) (Figura 9), siendo el cinmethylin un proherbicida que requeriría una bioactivación metabólica mediante la ruptura del éter bencílico (Romagni et al., 2000b). En otras palabras, es un producto de biotransformación del compuesto original el que tiene la actividad buscada.

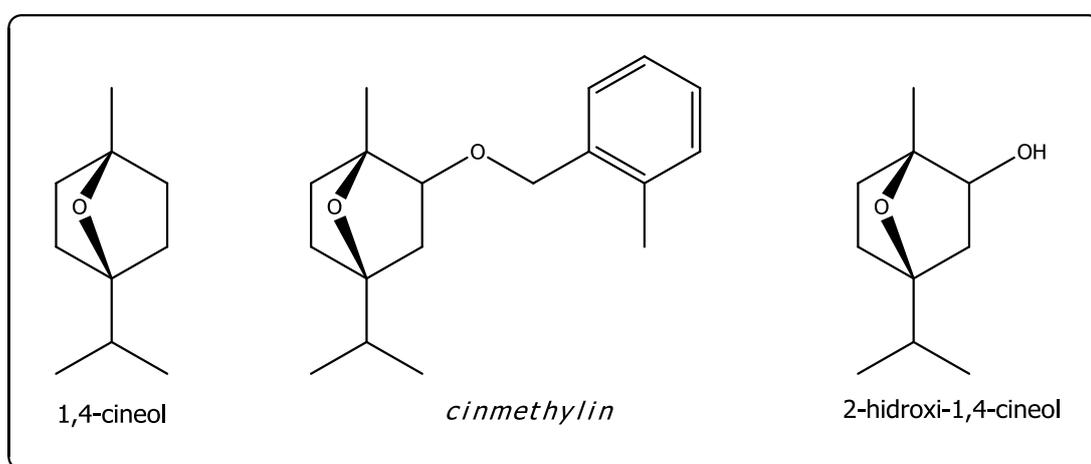
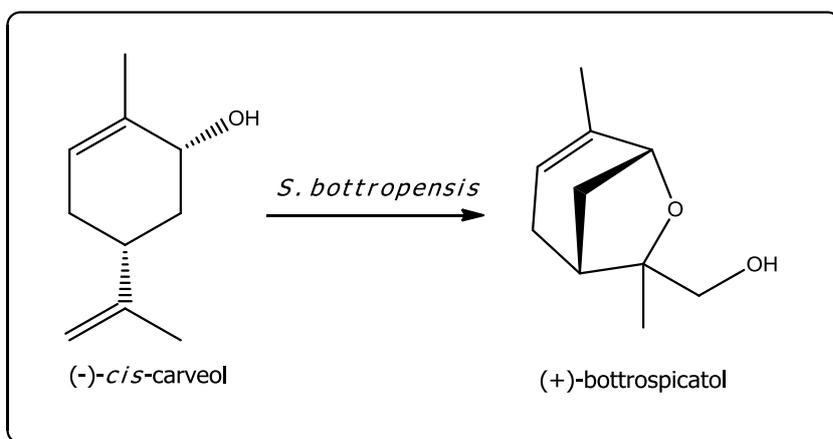


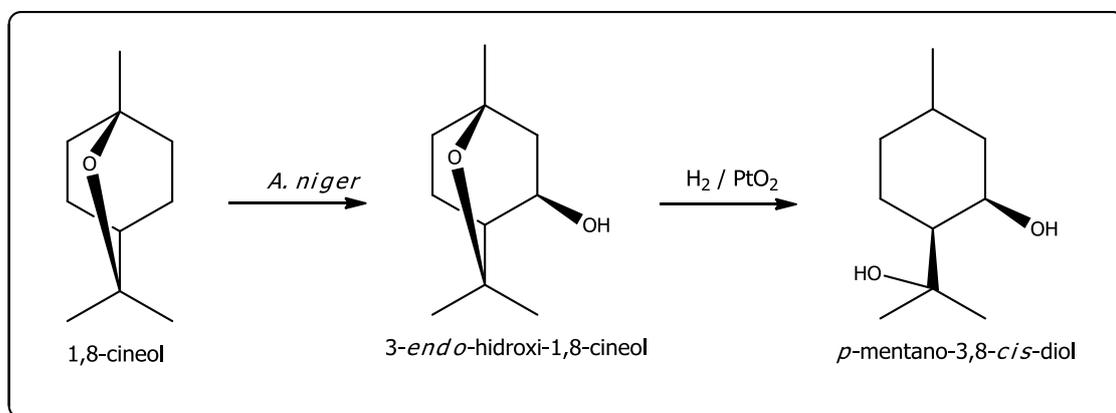
Figura 9. El monoterpene fitotóxico 1,4-cineol, el herbicida comercial derivado Cinmethylin, y el alcohol producto de la metabolización Cinmethylin, el cual sería responsable de la actividad herbicida.

Desde una perspectiva alelopática, las biotransformaciones de compuestos terpenoides y el estudio de las actividades de sus productos tiene un interés considerable, pero ha recibido un modesto nivel de investigación (Haig, 2008). Nishimura y colaboradores encontraron que (-)-*cis*-carveol se transforma en (+)-*bottropicatol* (Esquema 14) mediante una cepa de *Streptomyces bottropensis* aislada de suelo, y que el metabolito fue activo frente a la germinación de semillas de lechuga (Nishimura et al., 1983). Un año antes, el mismo grupo había planteado la utilización del 1,8-cineol en términos de biomasa renovable, sosteniendo que sería de gran interés para producir sustancias más valiosas, como por ejemplo reguladores del crecimiento vegetal a partir de la transformación microbiana de este compuesto (Nishimura et al., 1982). En tal sentido lograron obtener el *p*-mentano-3,8-*cis*-diol, reportado como aleloquímico derivado de *Eucalyptus citriodora*, a partir de la hidrogenólisis del 3-*endo*-

hidroxicineol, producto de la biotransformación del 1,8-cineol por *Aspergillus niger* (Esquema 15). Pero los rendimientos tanto de la bioconversión como de la ruptura catalítica del éter fueron muy bajos.



Esquema 14. Biotransformación de (-)-cis-carveol en bottrosopicatol, un fuerte inhibidor de la germinación de semillas de lechuga.



Esquema 15. Obtención de un derivado del 1,8-cineol con actividad reguladora del crecimiento vegetal, por hidrogenólisis de un producto de biotransformación fúngica.

Como se mencionó en secciones anteriores, la capacidad de los catalizadores biológicos de introducir un oxígeno en carbonos no reactivos como los del 1,8-cineol, en un único paso y con determinado grado de estereoselectividad, brinda la posibilidad de obtener compuestos útiles per se o como bloques en la construcción de estructuras más complicadas. Según Rasmussen y colaboradores, esa nueva serie de derivados del 1,8-cineol pueden ser estudiados en cuanto a distintas bioactividades, entre ellas la

actividad herbicida. (Rasmussen et al., 2005). De esta forma, el uso racional de una herramienta ambientalmente amigable como las biotransformaciones, aplicada a compuestos con potencial aleloquímico como el 1,8-cineol, resulta en una más que interesante alternativa en la búsqueda de compuestos de origen natural con potencial herbicida.

## **1.5 Objetivos**

### *1.5.1 Objetivo general*

Profundizar en aspectos químicos y metodológicos de las biotransformaciones de  $\alpha$ -limoneno y 1,8-cineol, llevadas a cabo por cepas fúngicas aisladas de fuentes naturales; buscando productos de mayor valor agregado per se o con potencial actividad biológica.

### *1.5.2 Objetivos específicos*

De lo expuesto en las secciones anteriores (1.3.2 a 1.3.6), se desprende que tanto el  $\alpha$ -limoneno como el 1,8-cineol resultan sustratos de biotransformación muy interesantes, ya sea por factores económicos (bajo costo, subproductos industriales, abundantes en Uruguay), químicos (compuestos factibles de rendir derivados homoquirales de difícil obtención por síntesis clásica) ó medioambientales (obtención de potenciales compuestos bioactivos de origen natural obtenidos por técnicas ambientalmente amigables). Como agentes biotransformadores se plantea usar una cepa de *Aspergillus niger* para el limoneno y una cepa de *Aspergillus terreus* para el cineol. Ambos microorganismos fueron oportunamente aislados de cáscara de naranja y hojas de Eucalipto respectivamente. El hecho de que los hongos fueran obtenidos a partir de un material rico en el sustrato de biotransformación, sumado a la reconocida versatilidad de este género fúngico (Sección 1.2.3), hace suponer que los mismos no sólo tolerarán los respectivos compuestos, sino que también pueden ser capaces de biotransformarlos.

Respecto a la biotransformación de  $\alpha$ -limoneno con *A. niger*, se trata de estudiar la capacidad biocatalizadora de este hongo, utilizando la técnica de cultivo en

crecimiento, en el marco del trabajo iniciado por la Dra. Pilar Menéndez (Menéndez, 1995). En tal sentido se plantea abarcar algunos aspectos metodológicos (Sección 1.1.8) no contemplados previamente, como la recuperación de los productos de bioconversión y el estudio de la influencia del medio de cultivo y la geometría del sistema de fermentación.

Como se mencionó (Sección 1.1.6), una de las desventajas de utilizar células enteras en los ensayos de biotransformación es lo engorroso del work-up. Un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de realizar una bioconversión, es la posterior recuperación de los productos y el sustrato remanente desde el medio de biotransformación. Dadas las características del sustrato utilizado y de los productos esperados, existen por lo menos dos métodos para su extracción. Por un lado, la extracción directa con solventes orgánicos, que es la de mayor aplicación en la bibliografía consultada. La otra alternativa, dada la volatilidad de los compuestos, es la destilación por arrastre con vapor de agua.

Por otro lado, es bien conocida la influencia de parámetros nutricionales y ambientales en el crecimiento de los microorganismos, afectando así el número de células viables por unidad de volumen de medio (Roberts et al., 1995). Variaciones en dichos parámetros se pueden ver traducidas en cambios morfológicos del hongo, concomitantes con variaciones en su metabolismo (Znidarsic & Pavko, 2001; Calvo et al., 2002). Es factible pues que, bajo distintas condiciones, un mismo microorganismo provoque diferentes cambios en la estructura de un sustrato determinado, ya sea en la cantidad o el tipo de productos obtenidos, sobre todo si la molécula en cuestión tiene varios sitios susceptibles de ataques químicos (Krasnobajew, 1984).

Los escasos reportes sobre la bioconversión del 1,8-cineol por hongos filamentosos (Nishimura, 1982; Rasmussen, 2005) hacen necesario el planteamiento de estudios más profundos en las metodologías, condiciones y rendimientos de las reacciones de biotransformación. Ensayos exploratorios previos, así como los antecedentes encontrados en la bibliografía consultada, apuntan a derivados oxigenados (principalmente alcoholes secundarios) como los principales productos obtenidos. Dichos productos de la transformación fúngica del cineol pueden tener mayor valor agregado por diferentes motivos, como ser el poseer aromas característicos (Bitteur et al., 1990; Kubota et al., 1998; Miyazawa & Hashimoto, 2002; Someya et al.,

2001) ó la potencial actividad antimicrobiana (Miyazawa & Hashimoto, 2002; Vilecco et al., 2008). En este trabajo en particular, y de acuerdo a los antecedentes mencionados en la Sección 1.4, se propone incursionar en la búsqueda de una potencial actividad herbicida. El planteamiento de esta hipótesis se sostiene en dos hechos. Por un lado, las reconocidas propiedades aleloquímicas del 1,8-cineol (Sección 1.4.2), que lo hace un potencial compuesto líder en la búsqueda de nuevos herbicidas. El otro hecho es la existencia de un herbicida comercial estructuralmente relacionado con los cineoles, como sin duda lo es el *cinmethylin* (Sección 1.4.2). Más aún, los productos de biotransformación pueden ser modificados racionalmente para aumentar su actividad. En tal sentido, se propone obtener ésteres de estos alcoholes con ácidos grasos mediante catálisis enzimática. Basado en la reportada actividad alelopática de dichos ácidos (Alsaadawi et al., 1983; Ohkawa & Nishikawz, 1987; Macías, 1995), se apunta a obtener una prodroga herbicida, cuya hidrólisis en el medio liberaría el hidroxicineol y el ácido graso. De esta manera, la combinación de las biotransformaciones y la alelopatía permiten conceptualizar un proceso para la obtención de un potencial herbicida, dentro del marco de la química sustentable. Por último, resulta imprescindible la aplicación de un bioensayo adecuado para evaluar la actividad fitotóxica de los productos a ensayar (Hoagland & Williams, 2004), con un tratamiento estadístico apropiado que permita valorar la significancia de los resultados obtenidos.

De esta manera, en el marco del objetivo general planteado, se busca cumplir con los siguientes cinco objetivos específicos:

1. Sistematizar el método de extracción del limoneno y sus productos de biotransformación desde el medio de cultivo.
2. Estudiar la influencia de las condiciones de cultivo en los resultados de la biotransformación de (+)-limoneno por una cepa de *Aspergillus niger*, en la búsqueda de productos de mayor valor agregado.
3. Ensayar diversos procesos de bioconversión de 1,8-cineol por parte de una cepa de *Aspergillus terreus*, en la búsqueda de productos con potencial actividad herbicida.
4. Derivatizar los productos obtenidos mediante biotransformaciones enzimáticas buscando mejorar la bioactividad.
5. Evaluar la actividad herbicida de los productos de biotransformación y sus derivados.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

---

### 2.1 Selección y mantenimiento de los microorganismos

En el presente trabajo se utilizaron dos cepas fúngicas: *Aspergillus niger* BFQU 68 para la biotransformación de limoneno y *Aspergillus terreus* BFQU 121 para la biotransformación del cineol. Ambas cepas fueron oportunamente aisladas, identificadas e indexadas por el grupo de de trabajo del área Biotransformaciones, de la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales de la Facultad de Química, Udelar. Los medios de cultivo mencionados en este capítulo y posteriores son descriptos en el Anexo I.

*A. niger* BFQU 68 fue aislado a partir de cáscara de naranja con crecimiento fúngico. Para ello se transfirió mediante un ansa estéril un inóculo desde la zona contaminada del fruto a una placa de Petri conteniendo Agar Malta (AM). Se sembró en forma de estrías, y se cultivó a 28°C por 7 días. Se realizaron repiques sucesivos de colonias aisladas a placas del mismo tipo hasta obtener un único microorganismo en una misma placa.

La cepa *A. terreus* BFQU 121 se aisló de hojas de *Eucalyptus globulus* utilizando la técnica del enriquecimiento selectivo (Roberts et al., 1995). Fragmentos del material vegetal se colocaron en un matraz conteniendo el medio mínimo BG-11 (Holt & Krieg, 1994) al que se le agregó 0,5% de 1,8-cineol como única fuente de carbono. Luego de 7 días de cultivo a 37°C y 150 rpm en agitador orbital (Sanyo IOXX400.XX2.C) se realizó una dilución 1:10 hacia un medio fresco de la misma composición, el que se cultivó en las mismas condiciones. Esta operación se repitió tres veces. Un inóculo de la última dilución fue estriado sobre una placa de BG-11 Agar, a la que se adicionó 1,8-cineol al 0.5% colocado en la parte interior de la tapa. De esta forma se recuperó un cultivo puro de *A. terreus*. Esta cepa fue repicada en placas de Petri de Agar Papa Dextrosa (PDA) (Oxoid® ó Difco®).

La identificación de ambos microorganismos se realizó siguiendo la metodología y las claves indicadas por Pitt y Hocking (Pitt & Hocking, 1999).

Ambos hongos se conservaron mediante el método de crecimiento continuo, en tubos de ensayo conteniendo el medio sólido inclinado PDA ó en placas de Petri con el mismo medio. En el caso de los tubos, el microorganismo esporulado se cubrió con una capa vaselina estéril. Los tubos tapados con algodón y sellados con Parafilm<sup>®</sup>, y las placas selladas con Parafilm<sup>®</sup>, se almacenaron en refrigerador (aproximadamente 4°C) hasta el uso ó transferencia del microorganismo desde el medio agotado a un nuevo medio PDA fresco. Estos repiques se realizaron aproximadamente cada 10 meses.

Excepto indicación en contrario, en los diferentes ensayos de biotransformación ambos hongos se agregaron al medio de cultivo bajo forma de suspensión de esporas. Para ello, se repicó el hongo a usar en varios tubos de ensayo conteniendo PDA los que se incubaron a 28°C durante 5 a 7 días, hasta observar esporulación. A cada uno de los tubos se agregó 5 mL de suero fisiológico estéril (solución de cloruro de sodio en agua destilada, 9 mg/mL). Bajo condiciones estériles, con un ansa se raspó el micelio formado de manera de liberar las esporas y dejarlas en suspensión. La suspensión fue filtrada a través de lana de vidrio, de manera de retener el micelio, hacia un frasco conteniendo dos bolitas de vidrio. Mediante agitación manual de las bolitas se evitó el agregado de las esporas en el filtrado. El recuento de esporas de la suspensión filtrada se realizó mediante cámara de Neubauer. En las condiciones descritas se obtuvo una suspensión de esporas del orden de 10<sup>7</sup> esporas/mL.

## **2.2 Solventes, reactivos, materiales e instrumentos**

### *2.2.1 Solventes*

Todos los solventes utilizados fueron de grado reactivo, purificados mediante destilación sobre vidrio, salvo indicación en contrario. La pureza de los mismos se constató por cromatografía gaseosa (GC), siendo como mínimo 99,0 %.

### *2.2.2 Reactivos, estándares, enzimas y reveladores cromatográficos*

*d*-limoneno grado técnico fue adquirido en Saporiti S.A. (Montevideo), siendo destilado a presión reducida sobre sodio previo a su uso. Su pureza se determinó mediante cromatografía gaseosa, siendo como mínimo 99,9%.

1,8-cineol fue suministrado por el Centro de Tecnología Agroindustrial (Cochabamba, Bolivia). Previo a su uso se verificó una pureza superior a 99,5% mediante cromatografía gaseosa.

$\alpha$ -terpineol 95%,  $\alpha$ -terpineol 90%, carveol 97% (mezcla de isómeros), carvona 96%, undecano 99%, tetradecano 99%, ácido p-toluensulfónico, ácido o-iodoxibenzoico y ácido 3-cloroperoxibenzoico, fueron adquiridos de Aldrich®.

Alcanfor adquirido de Enol S.A. (Montevideo)

Mezcla para la determinación de los índices de retención de Kovats: se utilizó una mezcla equimolecular de los alcanos C-9 a C-26 de marcas Fluka® y Sigma-Aldrich®.

Ácidos propanoico, isobutírico e isopentanoico utilizados para determinación de los tiempos de retención en GC, fueron de la marca Aldrich®.

El ketoconazol utilizado fue de laboratorio Roemmers.

Los ésteres de vinilo utilizados en los ensayos con lipasas fueron: acetato de vinilo (Sigma), butirato de vinilo (Fluka), laureato de vinilo (Fluka) y estearato de vinilo (Aldrich).

### Enzimas

Lipasa tipo VII de *Candida rugosa* (CRL) 900 U/mg, y lipasa tipo II cruda de páncreas porcino (PPL) 32 U/mg, ambas de la marca Sigma®.

### Reveladores cromatográficos:

$CuSO_4/H_3PO_4$ : solución de sulfato de cobre al 10% en ácido fosfórico al 8%.

*Anisaldehído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>* (Wagner & Bladt, 1996): solución de 0,5 mL de anisaldehído mezclados con 10 mL de ácido acético glacial, a la que se agregan 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

### 2.2.3 Materiales

Las cromatografías en capa fina se desarrollaron en placas de TLC de sílica gel Macherey-Nagel (Polygram® SIL G/UV<sub>254</sub>, 0,25 mm).

Las cromatografías en columna abierta se llevaron a cabo usando sílica gel para columna (poro 60 Å, partícula 0,063-0,2 mm) Macherey-Nagel ó sílica gel 60 *flash* (poro 60 Å y partícula 0,04-0,2 mm) Macherey-Nagel, según el caso.

Las semillas utilizadas en los bioensayos para evaluar fitotoxicidad fueron de trigo (*Triticum aestivum* L.), adquiridas en Agropecuaria Agraciada (Montevideo); y de lechuga manteca (*Lactuca sativa* L) obtenidas de la semillería Surco (Montevideo).

### 2.2.4 Instrumentos

Para la cromatografía gaseosa se utilizaron cromatógrafos Shimadzu modelos GC- 6AM, GC-14B y GC-2014, equipados en todos los casos con detectores FID y columnas capilares o semicapilares de fase estacionaria Carbowax 20M ó SE52 (ó equivalentes), según el experimento. El gas portador fue nitrógeno cuando se usaron los modelos 6AM y 14B, e hidrógeno cuando se usó el GC-2014. El resto de las condiciones (programa de temperatura, temperaturas de inyector y detector, relación de split, flujo del gas portador) se detallan en la sección correspondiente para cada experimento. Los datos fueron analizados con el software EZ-Chrome (Shimadzu) cuando los cromatogramas fueron obtenidos en los modelos GC-6AM y GC-14B, y con el software GC-Solutions (Shimadzu) cuando se utilizó el modelo GC-2014.

La Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas se llevó a cabo en un cromatógrafo Shimadzu QP 5050 equipado con bibliotecas de referencia (Adams, 2007; McLafferty & Stauffer, 1991) y en las mismas condiciones que las utilizadas en la cromatografía gaseosa, pero utilizando helio como gas portador. Los espectros fueron analizados con el software Class-5000 ó GC-MS-Solutions.

La pureza óptica se determinó en un sistema tandem GC-GC (Mondello et al., 1998). El primer GC fue un Shimadzu GC 17A equipado con una columna SE52 (30 m x 0,32 mm d.i.) y el segundo también un Shimadzu GC 17A con una columna quiral capilar (25 m x

0,25 mm d.i. x 0,25  $\mu$ m de espesor de film) de fase 2,3-di-*O*-etil-6-*O*-*terc*-butildimetilsilil- $\beta$ -ciclodextrina en soporte PS 086 (13 % feniletil polisiloxano).

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron realizados en solución de CDCl<sub>3</sub> en un espectrómetro BRUKER DPX-400 Avance (400 MHz para <sup>1</sup>H, 100 MHz para <sup>13</sup>C).

El poder rotatorio específico se determinó en un polarímetro Krüss P8000 (Krüss Optronic) equipado con el software V3.0, utilizando celdas de 5 cm de largo.

### **2.3 Recuperación de limoneno y sus productos de biotransformación desde el medio de transformación**

Se determinó el porcentaje de recuperación desde el medio de cultivo del limoneno y cuatro productos típicos de su biotransformación:  $\alpha$ -terpineol, *cis*-carveol, *trans*-carveol y carvona. Se ensayaron dos metodologías: extracción líquido-líquido con diclorometano, acetato de etilo (AcOEt) y hexano, y destilación por arrastre con vapor de agua (y posterior extracción con diclorometano). La cuantificación se realizó mediante cromatografía gaseosa, utilizando como estándares internos tetradecano para cuantificar limoneno (Tan & Day, 1998a) y alcanfor (Croteau et al., 2000) para cuantificar los derivados oxidados.

#### *Ensayos para determinar la recuperación de d-limoneno*

Para determinar la recuperación de limoneno se autoclavaron 6 matraces Erlenmeyer de 1L conteniendo 200 mL del medio Caldo Triptona Soja (TSB) cada uno (Tabla 4). En 4 de ellos (ensayos 2 a 5) se inocularon 2 mL de una suspensión de esporas de *Aspergillus niger* de  $1 \times 10^7$  esporas/mL, preparada según se describió en la Sección 2.1, de manera que la concentración final fue  $1 \times 10^5$  esporas/mL. Los 6 matraces se colocaron en agitador orbital (Sanyo IOXX400.XX2.C) a 100 rpm y 28°C. A las 72 horas se agregó 1,0 mL de limoneno a cada uno los 6 matraces (0,5%). Uno de los dos matraces que no fueron inoculados (ensayo 1) se extrajo inmediatamente con diclorometano (3 x 150 mL). Las fases orgánicas se juntaron, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró mediante papel y se concentró en rotavapor cuidando que la temperatura no superara los 40°C, hasta un volumen aproximado de 4 mL. Los 5

restantes Erlenmeyers se incubaron durante 2 horas más en las mismas condiciones. Los matraces conteniendo pellets del hongo se filtraron a través de papel de filtro, lavándose la biomasa con agua destilada. Uno de estos filtrados (ensayo 5) y el medio que quedó sin microorganismo agregado (ensayo 6), fueron extraídos con diclorometano de la misma forma que se hizo en el ensayo 1. Otros dos medios filtrados que contenían hongo crecido fueron extraídos con hexano (ensayo 3) y acetato de etilo (ensayo 4) respectivamente, procediendo de la misma forma que con las extracciones hechas con diclorometano. El medio filtrado restante fue extraído mediante arrastre con vapor de agua (ensayo 2). Para ello el filtrado fue introducido en un balón (3L) de dos bocas, conectado mediante una de ellas a una fuente de vapor exógena. La otra boca se conectó a un condensador a cuya salida se encontraba un nuevo balón de dos bocas, una por la cual se recogió el condensado, y otra conectada a un tercer recipiente a modo de trampa, conteniendo una solución de hidróxido de sodio al 40%. De esta manera, la corriente de gas que emana del balón donde se recoge el condensado, se hace barbotear en la solución de soda, buscando evitar la dispersión de cualquier espora al ambiente. Todo el sistema está cerrado excepto por el venteo ubicado al final del mismo en la trampa de soda. Se recogen aproximadamente 2 litros de condensado, los que se fraccionan en 4 partes, extrayéndose cada una de ellas con diclorometano (3 x 200 mL). Las fases orgánicas se juntan, y se procede de la misma forma que con los extractos de los otros ensayos.

Previo a la extracción se controló el pH del medio de cultivo. En los medios donde creció hongo (ensayos 2 a 5) el pH se situó entre 8,0 y 9,0, por lo que se ajustó el mismo a 7,0 con HCl 5%. En los restantes (ensayos 1 y 6) el pH medido dio 6,5 y no se modificó.

Durante las extracciones líquido-líquido de medios inoculados, se observó formación de una emulsión moderada al usar diclorometano (ensayo 5) y grande al usar hexano (ensayo 3), no observándose ese fenómeno al extraer con AcOEt (ensayo 4). Por ello, durante la extracción llevada a cabo en los ensayos 3 y 5 se agregó una solución saturada de NaCl para favorecer la ruptura de las emulsiones.

<b>Ensayo</b>	<b>Inóculo (esp/mL)<sup>(a)</sup></b>	<b>Tiempo (h)<sup>(b)</sup></b>	<b>Extracción<sup>(c)</sup></b>
<b>1</b>	0	0	I/I: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
<b>2</b>	1x10 <sup>5</sup>	2	AV
<b>3</b>	1x10 <sup>5</sup>	2	I/I: Hexano
<b>4</b>	1x10 <sup>5</sup>	2	I/I: AcOEt
<b>5</b>	1x10 <sup>5</sup>	2	I/I: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
<b>6</b>	0	2	I/I: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>

*Tabla 4. Ensayos para la determinación del mejor método de extracción de limoneno desde el medio de cultivo. (a) concentración final de esporas en el medio de cultivo; (b) tiempo de contacto del limoneno con el medio previo a su extracción; (c) I/I: extracción líquido-líquido en bola de decantación, AV: extracción por arrastre con corriente de vapor de agua con posterior extracción I/I con diclorometano.*

#### *Curva de calibración para cuantificar limoneno*

Se preparó una solución estándar de tetradecano en MeOH de 5000 ppm y una solución de limoneno 10% (p/v) de limoneno en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A partir de ambas soluciones se realizaron mezclas de las mismas de manera de obtener nuevas soluciones con las siguientes relaciones de masa limoneno/tetradecano: 11, 22, 33, 44, 55, 66, 77 y 88. Cada una de las soluciones fue inyectada por triplicado en un GC Shimadzu 6AM equipado con una columna Carbowax 20M (ver Sección 2.2). El programa de temperatura utilizado fue: 60 °C (10 min), 60 °C hasta 220 °C a 3 °C/min.; temperatura del inyector y del detector 240 °C; inyección: split (relación 1:50); flujo de gas portador (N<sub>2</sub>) 1,4 mL/min. Con los valores de área bajo la curva obtenidos para cada uno de los picos se determinó la relación de áreas limoneno/tetradecano para cada inyección, promediándose las correspondientes a cada relación de masas. De esta manera se construyó la curva cuya ecuación resultó ser:

$$y = 0,9011 x - 3,1714 \quad \text{con un coeficiente de regresión } R^2 = 0,9982$$

Donde  $y$  es la relación masa limoneno/masa tetradecano, y  $x$  es la relación área limoneno/área tetradecano.

### *Cuantificación del limoneno extraído en cada ensayo*

Cada uno de los 6 extractos concentrados, se transfirieron cuantitativamente a matraces aforados de 50,0 mL, llevándose a volumen con el solvente usado para la extracción hecha en cada caso. Para cada extracto se tomó una alícuota de 1,0 mL de esta dilución, a la que se agregó 50  $\mu$ L de la solución 5000 ppm del estándar interno. Cada una de estas soluciones se inyectó por triplicado en el cromatógrafo de gases, en las condiciones antes mencionadas. Con los valores de área bajo la curva obtenidos se determinó la relación de áreas limoneno/tetradecano para cada inyección. Las áreas correspondientes a cada ensayo se promediaron, siendo el coeficiente de variación (CV) de las mismas menor o igual a 2,0% (CV = Desviación estándar relativa x 100). La relación de áreas (limoneno/tetradecano) promedio obtenida en cada ensayo se interpoló en la curva mencionada, obteniendo una relación de masas, de la cual se dedujo la masa de limoneno recuperado en cada caso.

### *Ensayos para determinar la recuperación de $\alpha$ -terpineol, cis-carveol, trans-carveol y carvona*

Previo a su uso la pureza de cada monoterpeno oxigenado fue determinada por GC, utilizando un GC Shimadzu 6AM equipado con una columna Carbowax 20M (ver Sección 2.2). El programa de temperatura utilizado fue: 60 °C hasta 220 °C a 5 °C/min.; temperatura del inyector y del detector 240 °C, inyección: split (relación 1:50); flujo de gas portador ( $N_2$ ) 1,4 mL/min. De esta manera se determinó que el  $\alpha$ -terpineol fue 99,7%, la carvona 100,0%, la mezcla de isómeros del carveol 56,8% trans y 43,2% cis y el alcanfor usado como estándar interno 98,7%.

Para determinar los porcentajes de recuperación de los derivados oxidados del limoneno, se realizaron los mismos 6 ensayos que se mencionaron en la determinación del limoneno recuperado. En lugar de adicionar 1,0 mL de limoneno a las 72 horas de incubación, se agregaron 100,0  $\mu$ L de  $\alpha$ -terpineol, 100,0  $\mu$ L de carvona y 100,0  $\mu$ L de la mezcla de carveoles.

Similar a lo ocurrido para con el limoneno, en los medios donde creció hongo el pH se situó en 8,0 y se ajustó a 7,0 con HCl 5%. En los restantes el pH fue 6,5 y no se modificó.

Se observaron emulsiones durante las extracciones con hexano y diclorometano, por lo que se usó NaCl para facilitar la ruptura de las mismas

*Curva de calibración para cuantificar  $\alpha$ -terpineol, cis-carveol, trans-carveol y carvona*

Para realizar la curva de calibración para el  $\alpha$ -terpineol, se preparó una solución estándar de alcanfor 9,99 mg/mL en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y una solución de  $\alpha$ -terpineol 100,04 mg/mL en el mismo solvente. Con estas soluciones se realizaron mezclas de manera de obtener las relaciones de masa  $\alpha$ -terpineol /alcanfor: 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 y 1,2. Cada una de las mezclas fue inyectada por triplicado en un GC Shimadzu 6AM equipado con una columna Carbowax 20M (ver Sección 2.2). El programa de temperatura utilizado fue: 60 °C hasta 135 °C a 5 °C/min y de 135°C hasta 220°C a 20°C/min; temperatura del inyector y del detector 240°C; inyección: split (relación 1:50); flujo de gas portador ( $\text{N}_2$ ) 1,4 mL/min. Se determinó la relación de áreas  $\alpha$ -terpineol /alcanfor para cada inyección, promediándose las correspondientes a cada relación de masas. Se construyó la curva cuya ecuación resultó ser:

$$y_1 = 0,7963 x_1 + 0,0707 \quad \text{con un coeficiente de regresión } R^2 = 0,9991$$

Donde  $y_1$  es la relación masa  $\alpha$ -terpineol/masa alcanfor, y  $x_1$  es la relación área  $\alpha$ -terpineol/área alcanfor.

La curva de calibración para la carvona, se realizó a partir de la misma solución estándar de alcanfor utilizada para determinar  $\alpha$ -terpineol y de una solución de carvona 99,62 mg/mL en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A partir de estas soluciones se obtuvieron mezclas de con las relaciones de masa carvona/alcanfor: 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 y 1,4. Cada solución se inyectó en el cromatógrafo de gases del modo y en las condiciones descritas anteriormente. Se construyó la curva de calibración de ecuación:

$$Y_2 = 1,0399 x_2 + 0,0741 \quad R^2 = 0,9991$$

Donde  $y_2$  es la relación masa carvona/masa alcanfor, y  $x_2$  es la relación área carvona/área alcanfor.

Para realizar las curvas de calibración correspondientes al *cis*- y *trans*-carveol, se utilizó la misma solución estándar de alcanfor usada para determinar  $\alpha$ -terpineol y se preparó una solución de 100,30 mg/mL en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de carveol (mezcla de isómeros,

siendo por lo tanto 56,97 mg/mL en *trans*-carveol y 43,33 mg/mL en *cis*-carveol). A partir de estas soluciones se prepararon mezclas obteniendo las relaciones masa *trans*-carveol/alcanfor: 0,51; 0,58; 0,67; 0,73; 0,81; 0,87 y 0,95, y *cis*-carveol/alcanfor: 0,39; 0,44; 0,51; 0,55; 0,62; 0,66 y 0,72. Cada solución se analizó por GC en las condiciones descritas y se construyeron las curvas de calibración que arrojaron las siguientes ecuaciones:

$$Y_3 = 0,7839 x_3 + 0,0513 \quad R^2 = 0,9981$$

Donde  $Y_3$  es la relación masa *trans*-carveol/masa alcanfor, y  $x_3$  es la relación área *trans*-carveol/área alcanfor.

$$Y_4 = 0,7892 x_4 + 0,0391 \quad R^2 = 0,9979$$

Donde  $Y_4$  es la relación masa *cis*-carveol/masa alcanfor, y  $x_4$  es la relación área *cis*-carveol/área alcanfor.

#### *Cuantificación de los monoterpenos oxigenados extraídos en cada ensayo*

Se preparó una solución estándar de alcanfor en diclorometano de concentración 9,02 mg/mL. Los 6 extractos obtenidos de diferentes formas, se transfirieron cuantitativamente a matraces aforados de 10,0 mL, llevándose a volumen con el mismo solvente con que fue realizado cada extracto. De cada solución se tomó exactamente 1,0 mL, que se mezcló con 1,0 mL de la solución estándar. La solución homogeneizada de extracto más estándar se inyectó por triplicado en el cromatógrafo de gases, en las condiciones antes mencionadas. Toda la operación de dilución e inyección se repitió para cada extracto, obteniéndose por lo tanto seis valores de relación de áreas terpeno/alcanfor, para cada uno de los cuatro monoterpenos, en cada uno de los 6 ensayos. Dichos valores se promediaron siempre y cuando  $CV \leq 2,0\%$ . Las relaciones de área promedio se interpolaron en la curva correspondiente para cada caso, obteniéndose una relación de masas, de la que se dedujo la masa recuperada de cada monoterpeno en cada uno de los 6 ensayos.

## 2.4 Biotransformación de limoneno

### 2.4.1 Condiciones generales

Excepto indicación en contrario, se utilizaron las mismas condiciones generales para todos los ensayos de bioconversión de  $\alpha$ -limoneno. La metodología fue la de cultivos en crecimiento (Sección 1.1.8). Un inóculo fresco de suspensión de esporas de *Aspergillus niger* del orden de  $10^7$  esporas/mL, preparada según se describió en la Sección 2.1, fue agregada al medio de cultivo correspondiente en cantidad adecuada para obtener una concentración final de  $1 \times 10^5$  esporas/mL. Se dejó crecer al hongo por 48 horas, y en ese momento se agregó el sustrato directamente al medio de manera de obtener una concentración final de limoneno de 0,5% (v/v). El agregado directo del sustrato se eligió por ser lo más sencillo y, a pesar de su poca solubilidad en agua, ser esta es suficiente para alcanzar la concentración final deseada (Fichan et al., 1999). La temperatura se ajustó a 28°C en todos los casos. La agitación fue 100 rpm en el caso del agitador orbital, y 150 rpm para las paletas del fermentador. Las biotransformaciones se dejaron transcurrir por 5 días desde el agregado del sustrato. El tiempo de reacción y la concentración de sustrato fueron elegidas de acuerdo al trabajo previo realizado por la Dra. Pilar Menéndez (Menéndez, 1995).

### *Recuperación de los productos desde el medio de cultivo (work-up)*

Transcurridos los 5 días de biotransformación se filtró mediante papel, separándose la biomasa del medio de cultivo. Este último se extrajo con diclorometano (tres veces, cada vez con un volumen aproximadamente igual a la mitad del medio acuoso a extraer). El micelio separado se lavó con el mismo solvente y se filtró. Las fases orgánicas (extracción y lavado) se juntaron, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró mediante papel y se concentró en rotavapor cuidando que la temperatura no superara los 40°C, hasta un volumen aproximado de 5 mL para los extractos provenientes de biotransformaciones en matraces y 10 mL para los que se obtuvieron del biorreactor. Los extractos obtenidos se mantuvieron en freezer (-18°C) hasta su análisis.

### *Preparación de la muestra para análisis (clean-up)*

Previo al análisis cromatográfico gaseoso y a los efectos de proteger los instrumentos, los extractos concentrados fueron eluidos a través de una pequeña columna de sílica gel, de manera de retener los compuestos más polares no provenientes de la biotransformación. Para las muestras derivadas de los ensayos en matraces se colocaron aproximadamente 5 cm de sílica gel 60 (0,63-0,2 mm) en una pipeta Pasteur, se sembró el extracto y se eluyó con diclorometano hasta ausencia de productos de interés en el eluato, lo que se verificó mediante cromatografía en capa fina (TLC). Con las muestras obtenidas de los experimentos en fermentador se procedió de la misma forma pero utilizando una pipeta de mayor diámetro, que permitió empacar el doble de fase estacionaria.

### *Análisis cromatográfico y espectrométrico*

Las reacciones de biotransformación fueron analizadas mediante TLC, GC y GC-MS.

Las TLC se desarrollaron en el sistema de solventes Hexano-AcOEt-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30:15:10). El revelador utilizado fue anisaldehído (Sección 2.2), colocando la placa a 100°C durante 5 minutos luego de su aplicación.

La cromatografía gaseosa se realizó en un GC Shimadzu 6AM ó en un Shimadzu 14 (Sección 2.2), utilizando columnas SE52 (30 m x 0,32 mm de diámetro interno x 0,40 µm de espesor de film) o Carbowax 20M (25 m x 0,32 mm de diámetro interno x 0,25 µm de espesor de film). Para la fase estacionaria SE52 el programa de temperatura utilizado fue: 60 °C constante durante 8 min, 3 °C/min hasta 210°C, y 20°C/min hasta 290°C; temperatura del inyector y del detector 310°C; inyección: split (relación 1:50); flujo de gas portador (N<sub>2</sub>) 1,4 mL/min en el caso del cromatógrafo modelo 6AM y 1,1 mL/min cuando se usó el modelo 14. Al trabajar con la fase Carbowax 20M el programa usado fue: 60°C constante durante 8 min, 3°C/min hasta 210°C, y 15°C/min hasta 240°C; temperatura del inyector y del detector 250°C; inyección: split (relación 1:50); flujo de gas portador (N<sub>2</sub>) 1,2 mL/min en el cromatógrafo modelo 6AM y 1,1 mL/min en el modelo 14.

El análisis por GC-MS se llevó a cabo en las condiciones indicadas en la Sección 2.2, en un instrumento Shimadzu QP 5050 y utilizando las mismas fases estacionarias

que para el análisis por GC. El gas portador fue Helio, 122.2 kPa cuando la columna fue SE52 y 92.6 kPa cuando se utilizó Carbowax 20M; energía de ionización 70 eV; temperatura de la interfase 250°C y rango de adquisición  $m/z$  40-400.

#### *2.4.2 Influencia del medio de cultivo y la geometría del sistema de fermentación*

Para el estudio de la influencia de estos parámetros se efectuaron 4 ensayos (Tabla 5). Los medios de cultivo ensayados fueron Caldo Triptona Soja (TSB) (Sigma) y Caldo Malta (CM) (ver Anexo I). La bioconversión se llevó a cabo en dos tipos de sistemas: bioreactor (fermentador) con vaso de 3 L de capacidad (BIOFLO III Batch/Continuos Fermentor, New Brunswick Scientific) (Figura 10) y matraces dispuestos en agitador orbital (Sanyo IOXX400.XX2.C) (Figura 11).



*Figura 10. Fermentador New Brunswick Scientific, modelo BIOFLO III.*



*Figura 11. Agitador orbital Sanyo IOXX400.XX2.C, conteniendo las matraces donde se lleva a cabo la biotransformación.*

<b>Ensayo</b>	<b>Geometría del sistema</b>	<b>Medio</b>	<b>Agitación</b>	<b>Temperatura</b>
<b>1</b>	Fermentador 3L	TSB (1,5L)	150 rpm	28°C
<b>2</b>	Matraces 1L en agitador	TSB (0,2L)	100 rpm	28°C
<b>3</b>	Fermentador 3L	CM (1,5L)	150 rpm	28°C
<b>4</b>	Matraces 1L en agitador	CM (0,2L)	100 rpm	28°C

*Tabla 5. Ensayos realizados para determinar la influencia de la geometría del sistema y del medio nutriente en la biotransformación de limoneno por *A. niger*.*

Para cada experimento llevado a cabo en fermentador (ensayos 1 y 3, Tabla 5) se agregó al vaso de reacción 1,5 L del medio de cultivo correspondiente, se esterilizó el vaso y sus accesorios mediante autoclave y se inoculó de la forma antes mencionada. La temperatura y agitación se ajustaron a los valores arriba indicados y la aireación se ajustó al mínimo posible, siendo aproximadamente 2 mL/min. A las 48 h de inoculado se adicionaron en condiciones estériles 7,5 mL de  $\alpha$ -limoneno. A los 5 días se detuvo la biotransformación, se filtró el medio como se indicó en la Sección 2.4.1 y se controló el pH del filtrado. Para el medio TSB el pH se situó en 7,9 y se ajustó a 7,0 con HCl 5%. En CM el pH fue 5,5 y no se modificó. Se extrajeron los productos, se lavó el micelio y

se prepararon las muestras para su análisis de la forma indicada en la Sección 2.4.1. En las condiciones mencionadas se obtuvieron los cromatogramas que se muestran en la Figura 12 y 13. Con cada uno de los dos medios nutrientes se realizaron dos experimentos de control. El primero se realizó en exactamente las mismas condiciones pero sin el agregado de sustrato (se llamó "blanco hongo"). El otro control también se hizo respetando las condiciones fijadas pero se adicionó suero fisiológico estéril en vez de la suspensión de esporas (se identificó este control como "blanco limoneno"). En ninguno de los controles se obtuvieron picos coincidentes con los productos de biotransformación en los cromatogramas correspondientes.

Para estudiar el sistema de matraces dispuestos en agitador (ensayos 2 y 4, Tabla 5), se utilizaron matraces Erlenmeyers de 1L conteniendo 200 mL de medio nutriente e inoculados de la forma ya descrita. A las 48 h se agregó 1,0 mL de  $\alpha$ -limoneno. Paralelamente se realizaron dos ensayos de control para cada medio, uno sin agregar sustrato (blanco hongo) y otro sustituyendo el inóculo por suero fisiológico estéril (blanco limoneno). A los 5 días se detuvo la biotransformación, se filtró el medio contenido en cada matraz como se indicó en la Sección 2.4.1 y se controló el pH de cada filtrado. Los pH de todos los medios TSB se situaron en el entorno de 8,0 y se ajustaron a 7,0 con HCl 5%. Los pH de todos los medios CM se situaron entre 5,5 y 6,0 y no se modificaron. La extracción de los productos, el clean-up de cada muestra y su análisis cromatográfico se realizaron según lo descrito en la Sección 2.4.1. Los cromatogramas obtenidos se muestran en las Figuras 14 y 16.

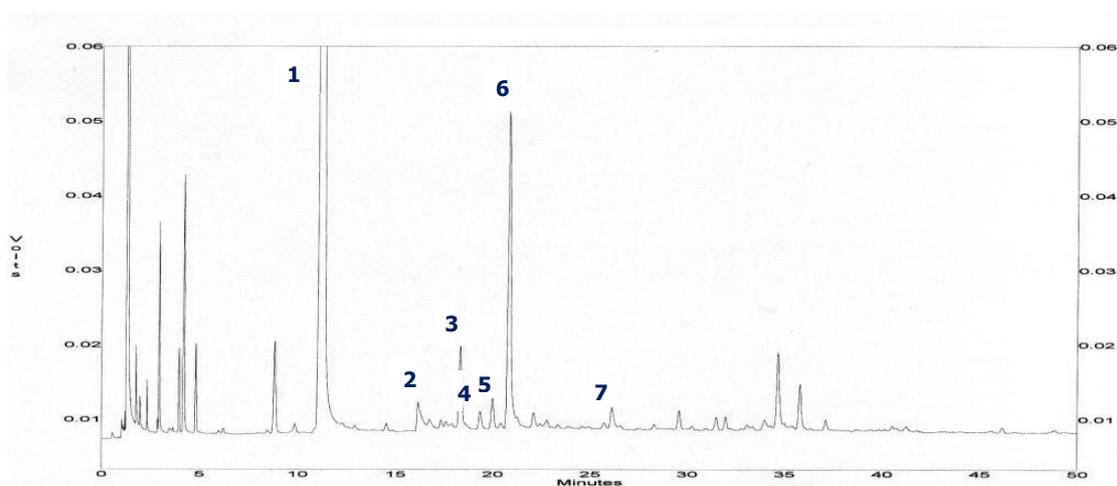


Figura 12. Cromatograma de gases correspondiente a la biotransformación de *d*-limoneno en el medio CM realizada en fermentador. Fase estacionaria SE52. 1: limoneno, 2: linalool, 3: *cis*- $\beta$ -terpineol, 4: *trans*- $\beta$ -terpineol, 5: 4-terpineol, 6:  $\alpha$ -terpineol, 7: alcohol perílico.

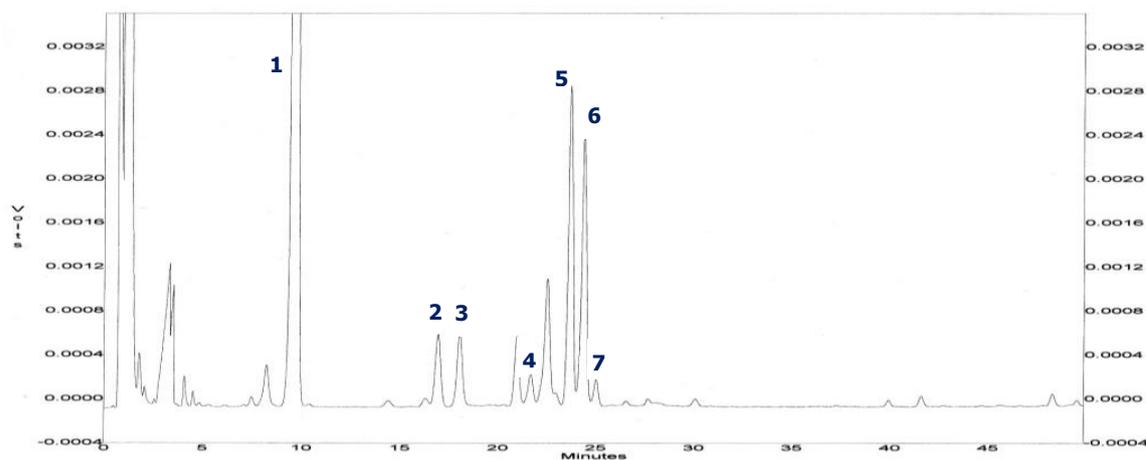


Figura 13. Cromatograma de gases del producto de la biotransformación de *d*-limoneno en el medio TSB realizada en fermentador. Fase estacionaria SE52. 1: limoneno, 2: *trans*-*p*-menta-2,8-dien-1-ol, 3: *cis*-*p*-menta-2,8-dien-1-ol, 4: dihidrocarvona, 5: *trans*-carveol, 6: *cis*-carveol, 7: carvona.

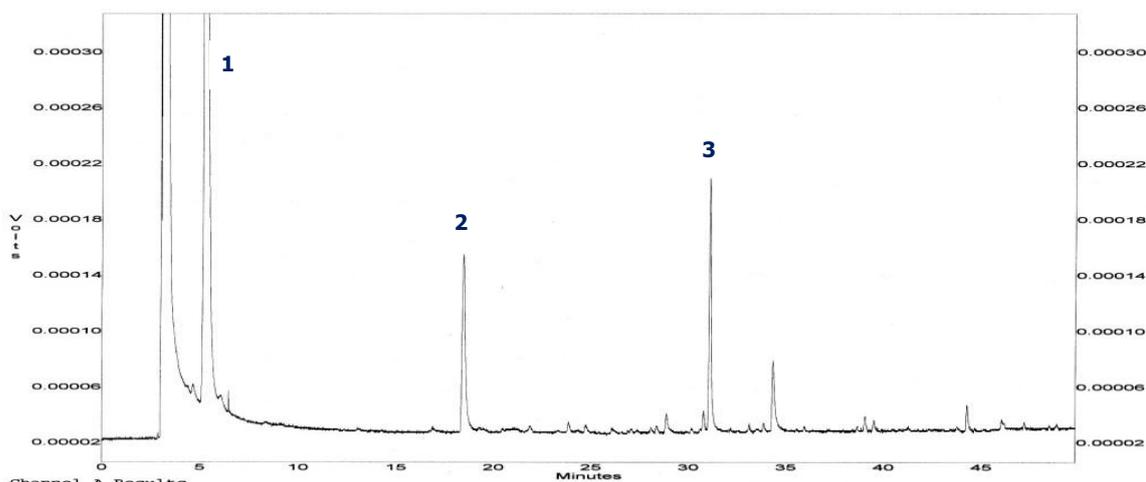


Figura 14. Cromatograma de gases de la biotransformación de *d*-limoneno en el medio CM realizada en shaker. Fase estacionaria Carbowax. 1: limoneno, 2: 4-terpineol, 3: alcohol perílico.

La identificación de los compuestos se realizó por comparación de sus espectros de masa con biblioteca de espectros (Adams, 2007; McLafferty & Stauffer, 1991), por comparación de sus índices de retención (índices de Kovats) con bibliografía (Adams, 2007), y por comparación de los tiempos de retención con el de los respectivos estándares cuando fue posible. La determinación de los índices de Kovats se llevó a cabo coinyectando la muestra problema con una solución mezcla de alcanos de C-9 a C-26 en una columna de fase estacionaria SE52. La cuantificación de los productos de bioconversión se determinó mediante el método de normalización de áreas de picos de

los correspondientes cromatogramas gaseosos. En la Tabla 6 se resumen los parámetros utilizados en la identificación de los principales productos de biotransformación.

Compuesto	IK teo <sup>(a)</sup>	IK exp <sup>(b)</sup>	MS 70 eV: <i>m/z</i> (int. rel.)
Alcohol perílico	1295	1294	152 [M <sup>+</sup> ] (5), 134 (10), 121 (38), 109 (18), 93 (48), 79 (79), 68 (88), 55 (57), 41 (100)
<i>cis</i> -carveol <sup>(c)</sup>	1229	1229	152 [M <sup>+</sup> ] (1), 134 (37), 119 (24), 109 (51), 91 (25), 84 (83), 69 (43), 55 (68), 41 (100)
<i>trans</i> -carveol <sup>(c)</sup>	1217	1216	152 [M <sup>+</sup> ] (6), 137 (8), 134 (4), 119 (14), 109 (100), 91 (26), 84 (91), 69 (33), 55 (56), 41 (94)
Carvona <sup>(c)</sup>	1243	1240	150 [M <sup>+</sup> ] (1), 135 (3), 122 (2), 108 (30), 93 (31), 82 (100), 54 (68), 41 (39)
Dihidrocarvona	1193	1184	152 [M <sup>+</sup> ] (10), 137 (10), 121 (12), 109 (29), 95 (56), 81 (37), 67 (93), 55 (47), 41 (100)
4-terpineol	1177	1181	154 [M <sup>+</sup> ] (6), 136 (7), 111 (33), 93 (33), 86 (16), 71 (100), 55 (33), 43 (93)
$\alpha$ -terpineol <sup>(c)</sup>	1189	1193	136 [M <sup>+</sup> - H <sub>2</sub> O] (15), 121 (19), 107 (3), 93 (31), 81 (21), 67 (14), 59 (100), 55 (13), 43 (59)
<i>cis</i> - $\beta$ -terpineol	1144	1151	136 [M <sup>+</sup> - H <sub>2</sub> O] (11), 121 (12), 107 (14), 93 (28), 79 (12), 71 (50), 55 (23), 43 (100)
<i>trans</i> - $\beta$ -terpineol	1163	1160	136 [M <sup>+</sup> - H <sub>2</sub> O] (15), 121 (12), 107 (16), 93 (19), 79 (13), 71 (41), 55 (21), 43 (100)
<i>trans</i> - <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	1123	1119	152 [M <sup>+</sup> ] (2), 137 (14), 134 (6), 121 (19), 109 (30), 94 (37), 91 (20), 79 (39), 67 (17), 55 (17), 43 (100)
<i>cis</i> - <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	1138	1134	152 [M <sup>+</sup> ] (1), 137 (18), 134 (30), 119 (17), 109 (34), 91 (19), 79 (35), 67 (17), 55 (18), 43 (100)
Linalool	1097	1107	136 [M <sup>+</sup> - H <sub>2</sub> O] (3), 121 (6), 93 (31), 80 (16), 71 (57), 55 (56), 43 (100)
Ácido propanoico <sup>(c)</sup>	-	nd	74 [M <sup>+</sup> ] (72), 57 (29), 45 (100), 44 (18)
Ácido isobutanoico <sup>(c)</sup>	-	nd	88 [M <sup>+</sup> ] (4), 73 (20), 55 (4), 43 (100)
Ácido isopentanoico <sup>(c)</sup>	-	nd	87 (21), 74 (61), 60 (84), 57 (37), 41 (100)

Tabla 6. Identificación de los principales productos de biotransformación de limoneno. (a) Índices de retención de Kovats reportados por R. Adams (Adams, 2001). (b) Índices de retención de Kovats obtenidos experimentalmente en una fase estacionaria SE52 en las condiciones descritas en el texto. (c) compuestos cuyo tiempo de retención en GC se comparó y coincidió con el del estándar correspondiente. nd: no determinado.

### 2.4.3 Aproximación al mecanismo enzimático implicado

Sobre el ensayo realizado en TSB y matraces dispuestos en agitador, se profundizó en busca de una orientación sobre el mecanismo enzimático involucrado en la biotransformación (Menéndez et al., 2002). Para ello se adicionó al medio ketoconazol (Figura 15), un reconocido inhibidor de la citocromo P450 (Correia & Ortiz de Montellano, 2005), con el que se preparó una solución de 11,5 mg en 100  $\mu$ L de etanol.

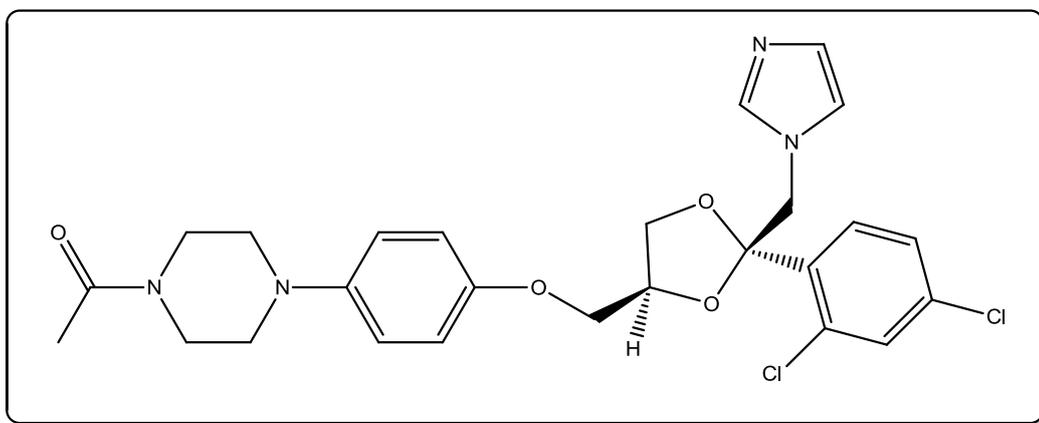


Figura 15. Ketoconazol, un imidazol inhibidor de la citocromo P450 que actúa al ligarse un nitrógeno heterocíclico al hierro de la coenzima.

Se repitió por cuadruplicado el ensayo indicado en la Sección 2.4.2, para la biotransformación llevada a cabo en matraces y con el medio TSB. Sobre dos de los 4 matraces, 48 h luego de agregada la suspensión de esporas y previo al agregado del sustrato, se adicionó la solución de ketoconazol de manera de obtener una concentración final de 50  $\mu$ M del imidazol (Karp et al., 1990). El limoneno se agregó 15 minutos después del inhibidor. Paralelamente se realizaron los ensayos de control para el experimento con y sin inhibidor agregado: uno sin agregar sustrato (blanco hongo) y otro sustituyendo el inóculo por suero fisiológico estéril (blanco limoneno). A los 5 días se detuvo la biotransformación, se filtró el medio contenido en cada matraz como se indicó en la Sección 2.4.1 y se controló el pH de cada filtrado. El pH de todos los medios filtrados se situaron entre 8,0 y 9,0 y se ajustaron a 7,0 con HCl 5%. La extracción de los productos, el clean-up de cada muestra y su análisis cromatográfico se realizaron

según lo descrito en la Sección 2.4.1. Los cromatogramas obtenidos se muestran en las Figuras 16 y 17.

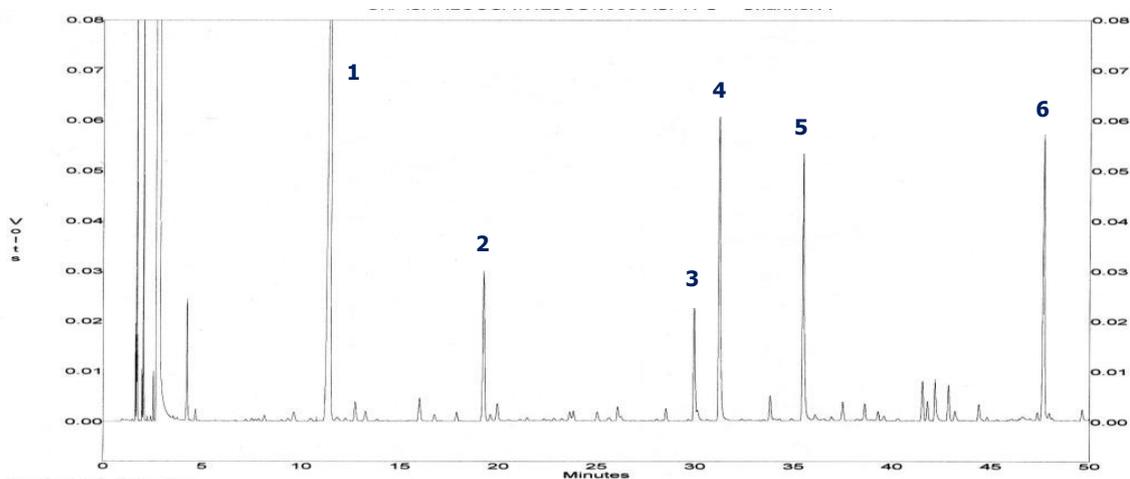


Figura 16. Cromatograma de gases correspondiente a la biotransformación de *d*-limoneno en TSB realizada en shaker. Fase estacionaria Carbowax 20M. 1: limoneno, 2: 2,5-dimetilpirazina, 3: ácido propanoico, 4: ácido isobutírico, 5: ácido 3-metilpentanoico, 6: alcohol perílico.

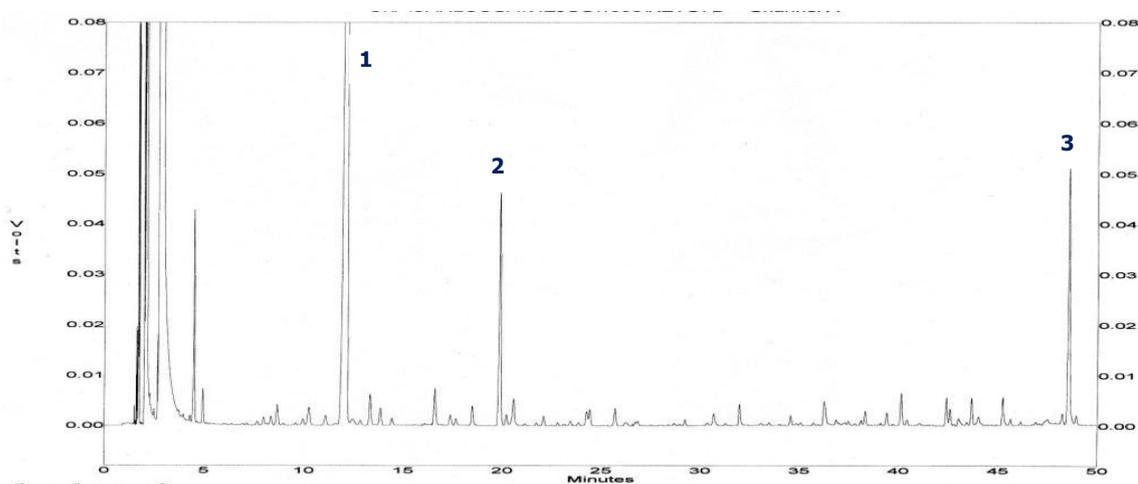


Figura 17. Cromatograma de gases correspondiente a la biotransformación de *d*-limoneno realizada en shaker, en el medio TSB, con agregado de ketoconazol. Fase estacionaria Carbowax 20M. 1: limoneno, 2: 2,5-dimetilpirazina, 3: alcohol perílico.

La identificación de los compuestos se realizó de la forma indicada en la Sección 2.4.2. Además el alcohol perílico, único producto de la bioconversión detectado al utilizar ketoconazol, fue aislado y caracterizado mediante experimentos  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C}$ -

NMR y  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC (Anexo II). Los resultados espectrales y su comparación con datos bibliográficos se presentan en la Sección 3.2.2.

El aislamiento del alcohol perílico se realizó en dos etapas. Primero se sometió al extracto diclorometánico a una cromatografía líquida a vacío (VLC), con sílica gel 60 (0,63-0,2 mm) como fase estacionaria. Se eluyeron 3 fracciones de aproximadamente 5 mL cada una con los siguientes solventes: fracción 1)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , fracción 2)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt (9:1), fracción 3)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt (8:2). Las fracciones se analizaron por TLC según lo descrito en la Sección 2.4.1, utilizando además de anisaldehído, solución de  $\text{CuSO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$  como revelador. La mayoría del alcohol perílico se halló en la fracción 2. Con la misma se procedió a realizar una TLC-preparativa, en las mismas condiciones, separándose el alcohol terpénico a un  $R_f$  de 0,56. Se desorbió de la sílica con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se filtró con papel, se rotavaporó y se obtuvo un líquido incoloro de consistencia oleosa, sobre el que se realizaron los experimentos espectrocópicos indicados.

## 2.5 Biotransformación de 1,8-cineol

### 2.5.1 Condiciones generales

Al igual que lo indicado para el  $\alpha$ -limoneno en la Sección 2.4.1, la metodología para llevar a cabo las biotransformaciones de 1,8-cineol fue la de cultivos en crecimiento (Sección 1.1.8) de *Aspergillus terreus*. Para cada experimento se realizó una suspensión fresca de esporas del hongo del orden de  $10^7$  esporas/mL, según procedimiento descrito en la Sección 2.1. Con dicha suspensión se inoculó el medio de cultivo, de forma de obtener una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas/mL. Se permitió crecer al hongo durante 48 horas en el sistema correspondiente (agitador orbital o fermentador), y bajo las condiciones especificadas en cada caso. Transcurrido ese período el microorganismo se desarrolló bajo la forma de *pellets*, y en ese momento se agregó el 1,8-cineol directamente al medio, cabiendo aquí las mismas consideraciones realizadas para el  $\alpha$ -limoneno. La temperatura se ajustó a 28°C en todos los casos. La agitación fue 100 rpm en el caso del agitador orbital, y también 100 rpm para las paletas del fermentador.

### *Recuperación de los productos desde el medio de cultivo (work-up)*

Finalizada la biotransformación, se separó la biomasa del medio filtrando mediante papel. El medio de cultivo filtrado se extrajo con diclorometano (tres veces, cada vez con un volumen aproximadamente igual a la mitad del medio acuoso a extraer). El micelio separado se lavó con el mismo solvente y se filtró. Las fases orgánicas (extracción y lavado) se juntaron, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró mediante papel y se concentró en rotavapor cuidando que la temperatura no superara los 40°C. Los extractos obtenidos se mantuvieron en freezer (-18°C) hasta su análisis.

### *Preparación de la muestra para análisis (clean-up)*

Del mismo modo que se procedió con los productos de la biotransformación de limoneno, previo al análisis instrumental los extractos concentrados fueron eluidos a través de una pequeña columna de sílica gel. Para ello se llevó el extracto a un volumen tal que el sustrato agregado originalmente estuviera en una concentración 5 % (v/v). De esta solución se tomó 1 mL y se sembró en una columna armada con aproximadamente 5 cm de sílica gel 60 (0,63-0,2 mm) en una pipeta Pasteur. Se eluyó con AcOEt-Hexano (1:1) hasta ausencia de productos de interés en el eluato (aproximadamente 5 mL), lo que se verificó mediante TLC.

### *Análisis cromatográfico y espectrométrico*

Las reacciones de biotransformación fueron analizadas mediante TLC y GC, y cuando correspondió GC-MS y GC-GC.

Las TLC se desarrollaron en el sistema de solventes Hexano-AcOEt-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30:15:10) y/o AcOEt-Hexano (3:2). El revelador utilizado fue anisaldehído (Sección 2.2), colocando la placa a 100°C durante 5 minutos luego de su aplicación.

La cromatografía gaseosa se realizó en un GC Shimadzu 2014, en un Shimadzu 14B ó en un Shimadzu 8A (ver Sección 2.2). Con el modelo 2014 se utilizaron columnas capilares Carbowax 20M y SE52 de las mismas dimensiones (30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 µm de espesor de film) e hidrógeno como gas portador. Para la

fase Carbowax, salvo indicación en contrario, el programa de temperatura fue de 60°C constante durante 5 min y 10°C/min hasta 220°C donde se mantuvo 3 min. La temperatura del inyector 220°C, la del detector 240°C, el flujo 1,0 mL/min y la relación de split 1:50. Para la fase SE52 se usó la rampa de temperaturas comenzando a 60°C elevando a razón de 5°C/min hasta 90°C, continuando a 2,5°C/min hasta 120°C, y finalizando a 20°C/min hasta 280°C, donde se mantuvo por 3 min. La temperatura del inyector fue 280°C, la del detector 300°C, el flujo 1,5 mL/min y la relación de split 1:50. Con el modelo 14B se utilizó únicamente una columna de fase SE52 (25 m x 0,32 mm de diámetro interno x 0,40-0,45 µm de espesor de film) y nitrógeno como fase móvil. Programa de temperatura: 60°C hasta 180°C a 3°C/min, 180°C hasta 250°C a 20°C, donde se matuvo por 3 min. La temperatura del inyector y detector fue 280°C, el flujo 1,5 mL/min y la relación de split 1:100. Con el modelo 8A se utilizó una columna semicapilar de fase SE52 (30 m x 0,53 mm d.i.) y nitrógeno como fase móvil. El programa de temperatura fue el mismo que el utilizado en el modelo 14B, y el flujo de gas portador fue 3,2 mL/min.

Para la determinación de la distribución enantiomérica se utilizó un tándem GC-GC quiral con las especificaciones descritas en la Sección 2.2. En el primer cromatógrafo, equipado una columna de fase SE52, se utilizó el mismo programa descrito en el párrafo precedente para este tipo de columna utilizada en el cromatógrafo 2014, y como gas portador helio a 90 kPa. Para el cromatógrafo equipado con la columna quiral las condiciones cromatográficas fueron: programa de temperatura comenzando en 50°C, constante por 6 min, 2°C/min hasta 90°C permaneciendo 20 min a esa temperatura, para luego alcanzar 180°C a 2°C/min, y permanecer a 180°C por 10 min; la temperatura de interfase fue 200°C; la temperatura del FID 280°C; el gas portador fue helio a 110 kPa; y el modo de inyección fue split con una relación de split 1:15.

El análisis por GC-MS se llevó a cabo en las condiciones indicadas en la Sección 2.2, en un instrumento Shimadzu QP 5050, utilizando las mismas fases estacionarias que para el análisis por GC y helio como gas portador. La energía de ionización fue 70 eV; la temperatura de la interfase 250°C y el rango de adquisición  $m/z$  40-400.

## 2.5.2 Influencia de las condiciones de bioconversión

### 2.5.2.1 Geometría del sistema y tiempo de reacción

Para estudiar la influencia de la geometría del sistema y el tiempo de reacción sobre los resultados de la bioconversión, los ensayos se llevaron a cabo en el medio de cultivo YMPG (extracto de levadura, extracto de malta, peptona, glucosa; ver Anexo I). Al igual que con el limoneno, los sistemas estudiados fueron: fermentador con vaso de 3 L de capacidad (BIOFLO III Batch/Continuos Fermentor, New Brunswick Scientific) y matraces dispuestos en agitador orbital (Sanyo IOXX400.XX2.C). En ambos sistemas se determinaron los porcentajes de biotransformación a los 5, 7, 10 y 14 días de reacción.

Para el experimento llevado a cabo en fermentador se agregó al vaso de reacción 2,0 L del medio de cultivo y se inoculó de la forma mencionada en la Sección 2.5.1. La temperatura y agitación se ajustaron a los valores arriba indicados y la aireación se ajustó al mínimo posible, siendo aproximadamente 2 mL/min. A las 48 h se verificó el crecimiento del hongo como *pellets* y se adicionaron en condiciones estériles 2,0 mL de 1,8-cineol (0,1% (v/v)). A los 5, 7 y 10 días, mediante un dispositivo adecuado y en condiciones estériles, se tomó una muestra de aproximadamente 15 mL del medio de reacción. A los 14 días se detuvo la biotransformación. Con cada muestra de 15 mL y el volumen total remanente al día 14 se procedió a separar la biomasa y extraer los productos de la biotransformación como se indicó en la Sección 2.5.1. Previo a la extracción se controló el pH del filtrado, obteniéndose los valores indicados en la Tabla 7. El pH del filtrado del día 14 se ajustó a 7 con HCl 5%. Los filtrados de los días 5, 7 y 10 no se modificaron en cuanto a su acidez.

Al igual que con las biotransformaciones de limoneno se realizaron dos experimentos de control, uno sin agregar sustrato (blanco hongo) y otro sustituyendo el inóculo por suero fisiológico estéril (blanco cineol). En ninguno de los controles se obtuvieron manchas en la TLC ó picos en el GC coincidentes con los productos de biotransformación en los cromatogramas correspondientes.

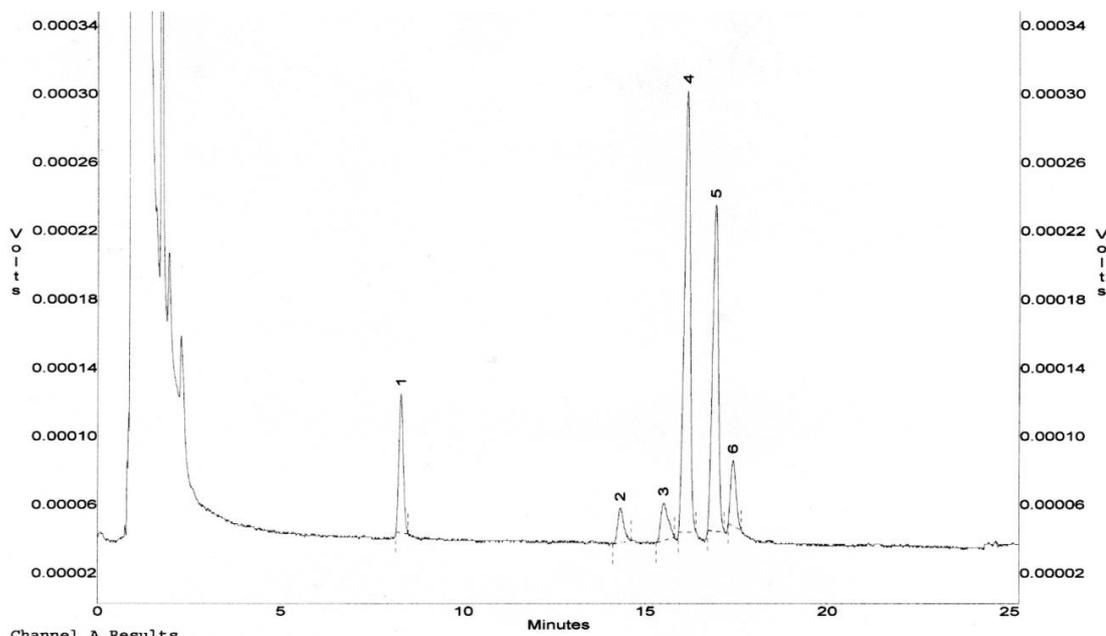
<b>Muestra</b>	<b>pH</b>
Día 5	5,5
Día 7	6,0
Día 10	7,0
Día 14	8,0

*Tabla 7. pH del medio de cultivo (YMPG) filtrado, a diferentes tiempos de iniciada la biotransformación de 1,8-cineol por A. terreus.*

Cada una de las muestras fue preparada para su análisis de la forma indicada en la Sección 2.5.1 (clean-up) y analizada por TLC y GC. Las TLC se llevaron a cabo con la fase móvil Hexano-AcOEt-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30:15:10), y en todos los casos se obtuvieron 3 manchas principales (Tabla 8), las que fueron asignadas por comparación con estándares obtenidos según se describe en la Sección 2.5.5. La cromatografía gaseosa se realizó en el equipo Shimadzu 8A en las condiciones descritas en la sección anterior. En la Figura 18 se muestra el cromatograma obtenido para el día 14 de la biotransformación.

<b>R<sub>f</sub></b>	<b>Color</b>	<b>Asignación</b>
0,26	Azul	3- <i>exo</i> -hidroxicineol
0,34	Rojo-púrpura	2- <i>exo</i> -hidroxicineol
0,61	Violáceo	1,8-cineol

*Tabla 8. Resultado de la TLC realizada a los extractos de los productos de biotransformación del 1,8-cineol en las condiciones descritas en el texto, y revelada con solución de anisaldehído.*



Channel A Results

*Figura 18. Cromatograma de gases correspondiente a la biotransformación de 1,8-cineol en el medio YMPG realizada en fermentador. Fase estacionaria SE52. Asignación de picos: 1) 1,8-cineol; 2) 2-endo-hidroxicineol; 3) 2-oxocineol; 4) 2-exo-hidroxicineol; 5) 3-exo-hidroxicineol; 6) 3-endo-hidroxicineol.*

Para estudiar el sistema de matraces dispuestos en agitador se utilizaron 10 matraces Erlenmeyers de 1L conteniendo 200 mL de medio nutriente. 9 de ellos fueron inoculados de la forma ya descrita, quedando el décimo matraz para realizar el ensayo de control "blanco cineol". A las 48 h se agregaron 0,2 mL de 1,8-cineol a 9 de los matraces inoculados y al matraz sin inocular. El matraz inoculado al que no se agregó sustrato se utilizó para realizar el ensayo de control "blanco hongo". A los 5, 7, 10 y 14 días de iniciada la biotransformación, se detuvo la biotransformación de dos de los matraces (cada ensayo se realizó por duplicado). Los dos ensayos de control se detuvieron en el día 14. Se filtró el medio contenido en cada matraz como se indicó en la Sección 2.5.1 y se controló el pH de cada filtrado. En todos los casos el pH se situó entre 6 y 7 y no fue modificado. La extracción de los productos, el clean-up de cada muestra y su análisis cromatográfico se realizaron de la misma manera que para el ensayo en fermentador.

La separación, el aislamiento (cuando fue posible) y la identificación de los compuestos se realizaron según lo indicado en la Sección 2.5.4.

### 2.5.2.2 Medio de cultivo

Para estudiar los efectos del medio de cultivo en la biotransformación, además de la ya descrita bioconversión en YMPG, se ensayaron otros dos medios ricos: Caldo de Triptona Soja (TSB) y Caldo Malta (CM), un medio mínimo mineral tamponado (MM, adaptado de Deacon, 2006), un medio mínimo con fuente de nitrógeno (base nitrogenada para levaduras, YNB), y finalmente estos dos medios mínimos con glucosa como fuente de carbono (MM+Glu e YNB+Glu). La composición de todos los medios de cultivo se detalla en el Anexo I.

En todos los casos las biotransformaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ó 500 mL, conteniendo un 20% de su volumen de medio de cultivo, por duplicado. Los matraces fueron dispuestos en un agitador orbital en las condiciones antes mencionadas. El sustrato se agregó en una única adición a las 48 h de inoculado el medio en una concentración de 0,1%, excepto a los medios mínimos MM e YNB. Con estos medios, donde el cineol fue la única fuente de carbono, se agregó el mismo en tres etapas a las 0, 24 y 48 h de inoculado el medio. La recuperación de los productos desde el medio y la preparación de la muestra para el análisis se hicieron según lo mencionado en la Sección 2.5.1. Se evaluaron las biotransformaciones a los 5, 7, 10 y 14 días para los medios ricos YMPG, TSB, CM e YNB+Glu, y a los 5 y 7 días para los medios mínimos MM e YNB y el medio MM+Glu. Previo a la extracción se midió el pH de cada filtrado, obteniéndose los valores indicados en la Tabla 9. El pH del medio TSB obtenido a todos los tiempos de reacción se ajustó a 7,0 con HCl 5%; el de los medios YNB+Glu y MM+Glu se llevó a 7,0 con NH<sub>4</sub>OH 1M; mientras que el pH del resto de los medios de cultivo no fue modificado. Cuando se extrajo con diclorometano el medio TSB se observó una importante emulsión, la cual fue tratada con una solución saturada de cloruro de sodio para ayudar a la separación de las fases. Para el análisis cromatográfico (TLC y GC) de cada una de las muestras se procedió de la misma forma que con los ensayos realizados en YMPG descritos en el ítem anterior.

<b>Medio</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 7</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 14</b>
TSB	8,0	8,0	8,0	8,0
CM	5,5	5,5	5,5	6,0
YNB	6,0	6,5	nd	nd
YNB+Glu	3,5	3,5	3,0	3,0
MM	7,5	7,5	nd	nd
MM+Glu	3,0	3,0	nd	nd

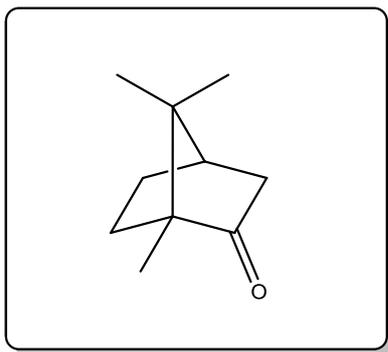
*Tabla 9. pH ( $\pm 0,5$ ) de los medios de cultivo a diferentes tiempos de iniciada la biotransformación de 1,8-cineol por *A. terreus*. nd: no determinado.*

Para cada uno de los medios de cultivo ensayados se realizaron dos experimentos de control, uno sin agregar sustrato (blanco hongo), que fue evaluado sólo en el día 7, y otro sustituyendo el inóculo por suero fisiológico estéril (blanco cineol), que se evaluó sólo en el día 10. En ninguno de los controles se obtuvieron manchas en la TLC ó picos en el GC coincidentes con los productos de biotransformación en los cromatogramas correspondientes.

Además de determinar los porcentajes de bioconversión por cromatografía gaseosa (método de normalización de áreas), se determinó la distribución enantiomérica de los principales productos obtenidos en los medios ricos, mediante GC-GC según condiciones descritas en la Sección 2.5.1.

### *2.5.3 Determinación del rendimiento de la biotransformación*

Más allá de los porcentajes de bioconversión determinados en cada caso, se evaluó el rendimiento de la reacción de biotransformación (porcentaje de masa obtenida de productos respecto al sustrato agregado) para el ensayo llevado a cabo en el medio Caldo Malta con una concentración de sustrato de 0,1%. La cuantificación de los productos y del sustrato remanente se realizó por cromatografía gaseosa, mediante el agregado de alcanfor (Figura 19) como estándar interno.



*Figura 19. Alcanfor. Monoterpeno oxigenado utilizado como estándar interno para cuantificar el 1,8-cineol y sus derivados hidroxilados.*

Se utilizaron 15 matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo cada uno 50 mL de medio. El procedimiento general y las condiciones de biotransformación fueron los mismos que los indicados en la sección anterior. La reacción de biotransformación se evaluó por triplicado a los 3, 5, 7, 10 y 14 días. Transcurridos cada uno de esos tiempos y previo al work-up, se agregaron al medio aproximadamente 10 mg de alcanfor. Para ello se preparó una solución 10,4 mg/mL de alcanfor en etanol, de la cual se adicionó 1,0 mL al medio, se agitó manualmente el matraz y se procedió al work-up de la manera previamente indicada.

Como se mencionó (Sección 2.5.1), una vez finalizada la reacción se realiza un proceso de recuperación de los productos desde el medio, seguido de una etapa de preparación de la muestra para su análisis. Durante dichas instancias es factible que ocurran pérdidas de los productos de interés. Para evaluar dichas pérdidas se determinó el alcanfor remanente luego de estos procesos, utilizando undecano como un segundo estándar interno (Chamblee et al., 1991). La secuencia de operaciones se resume en el Esquema 16. Cada extracto obtenido luego del work-up se concentró en rotavapor hasta un volumen de 1 mL y se procedió a la preparación de la muestra para el análisis de la forma indicada en la Sección 2.5.1. El eluato obtenido se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 10,0 mL, se adicionaron 5  $\mu$ L de undecano y se enrasó con AcOEt-Hexano (1:1). Cada una de las soluciones fue inyectada por duplicado en un GC Shimadzu 2014 equipado con una columna Carbowax 20M, en las condiciones mencionadas en la Sección 2.5.1. Con los valores de área bajo la curva

obtenidos se determinó la relación de áreas undecano/alcanfor, alcanfor/cineol y alcanfor/hidroxicineol para cada inyección. Como área de hidroxicineol se consideró la sumatoria de áreas de los 4 hidroxicineoles principales productos de la biotransformación (2-*exo*-, 3-*exo*-, 2-*endo*- y 3-*endo*-hidroxicineol). La relaciones de áreas promedio de las dos inyecciones obtenidas para cada ensayo se interpolaron en la curva de calibración correspondiente, obteniendo una relación de masas a partir de la cual se obtuvieron las masas de alcanfor remanente (post work-up y clean-up) y 1,8-cineol e hidroxicineol presentes al finalizar la reacción.

La curva de calibración utilizada para evaluar el alcanfor remanente se realizó a partir de las relaciones de áreas undecano/alcanfor obtenidas al inyectar en el GC, en las condiciones arriba mencionadas, soluciones de estos compuestos en AcOEt-Hexano (1:1) con las siguientes relaciones de masas (undecano/alcanfor): 0,243; 0,335; 0,426; 0,534; 0,628 y 0,722. De esta manera se construyó la curva cuya ecuación resultó ser:

$$y = 0,8588 x + 0,0016 \quad \text{con un coeficiente de regresión } R^2 = 0,9990$$

Donde  $y$  es la relación masa undecano/masa alcanfor, y  $x$  es la relación área undecano/área alcanfor.

Del mismo modo se procedió para realizar la curva de calibración para la determinación de hidroxicineol al finalizar la bioconversión, inyectando soluciones de alcanfor e hidroxicineol con las relaciones de masas (alcanfor/2-*exo*-hidroxicineol): 5,122; 6,863; 8,640, 10,446 y 12,101. Para ello se utilizó un 2-*exo*-hidroxicineol (97,2% puro por GC) obtenido sintéticamente como se menciona en la Sección 2.5.4. La ecuación de la curva obtenida fue:

$$y = 0,6618 x - 0,4052 \quad \text{con un coeficiente de regresión } R^2 = 0,9996$$

Donde  $y$  es la relación masa alcanfor/masa 2-*exo*-hidroxicineol, y  $x$  es la relación área alcanfor/área 2-*exo*-hidroxicineol.

Para la determinación del 1,8-cineol remanente de la biotransformación se realizaron 4 curvas de calibración, debido a la gran dispersión en la relación alcanfor/cineol obtenida a lo largo de los diferentes períodos donde se evaluó la biotransformación. De esta manera, una primera curva se construyó a partir de soluciones de alcanfor y cineol que guardaban las relaciones de masas (alcanfor/1,8-cineol): 1,896; 3,676; 5,147 y 7,352, y cuya ecuación resultó ser:

$$y = 0,8757 x + 0,1833 \quad \text{con un coeficiente de regresión } R^2 = 0,9986$$

Una segunda curva se realizó inyectando soluciones con las relaciones de masas: 10,331; 14,797; 22,904 y 30,539, obteniéndose la ecuación:

$$y = 0,8802 x - 1,3938 \quad \text{con un coeficiente de regresión } R^2 = 0,9950$$

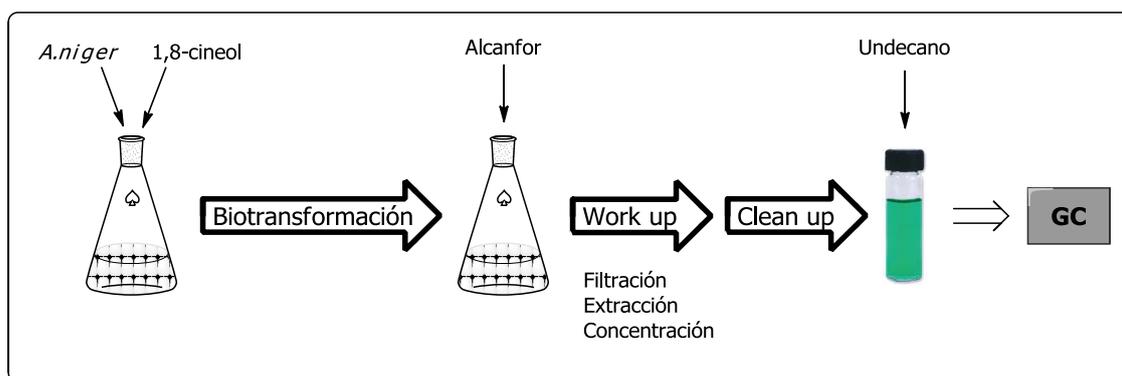
Para construir la tercera curva se usaron soluciones con las relaciones de masas: 134,08; 154,70; 182,83 y 223,46, resultando la ecuación:

$$y = 0,8705 x - 5,1138 \quad \text{con un coeficiente de regresión } R^2 = 0,9954$$

La última curva para dosificar el cineol se realizó a partir de soluciones con relaciones de masas: 868,6; 1098,3; 1419,2 y 1718,0, siendo la ecuación de la misma:

$$y = 0,9741 x - 551,91 \quad \text{con un coeficiente de regresión } R^2 = 0,9996$$

En todos los casos  $y$  es la relación masa alcanfor/masa 1,8-cineol, y  $x$  es la relación área alcanfor/área 1,8-cineol.



Esquema 16. Secuencia de etapas llevadas a cabo para la dosificación de los productos de biotransformación del 1,8-cineol y la determinación del rendimiento de la misma.

#### 2.5.4 Separación, aislamiento y caracterización de los productos

La separación de los principales productos de la biotransformación del 1,8-cineol pudo realizarse por cromatografía gaseosa en las condiciones arriba mencionadas, utilizando tanto una fase estacionaria polar (Carbowax 20M) como una fase apolar (SE52) (Figura 20). Esto permitió la determinación de los índices de retención de Kovats en ambos tipos de columnas (Tabla 10), la comparación de los tiempos de retención con los de los respectivos estándares (obtenidos como se indica más adelante), la obtención de los espectros de masas correspondientes cuando se acopló un MS al GC, y la determinación de la distribución enantiomérica de los principales productos obtenidos en los medios ricos por GC-GC. La cromatografía gaseosa se realizó en un GC Shimadzu

2014 y del mismo modo que el análisis por GC-MS y por GC-GC quiral, se realizaron en las condiciones mencionadas en la Sección 2.5.1. La determinación de los índices de Kovats se llevó a cabo coinyectando la muestra problema con una solución mezcla de alcanos de C-9 a C-26 en las mismas condiciones.

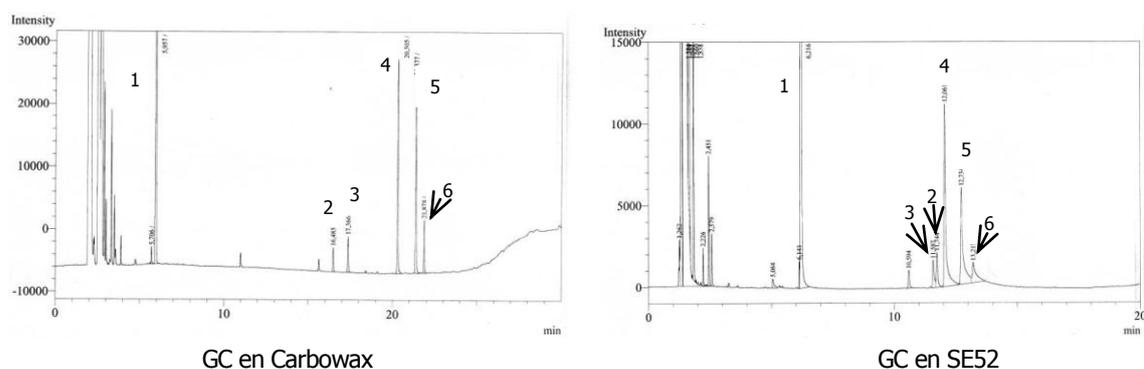


Figura 20. Cromatogramas de los productos de biotransformación del 1,8-cineol en YMPG, utilizando dos fases estacionarias diferentes: Carbowax 20M y SE52. 1) 1,8-cineol; 2) 2-oxocineol; 3) 2-endo-hidroxicineol; 4) 2-exo-hidroxicineol; 5) 3-exo-hidroxicineol; 6) 3-endo-hidroxicineol.

Compuesto	IK Carbowax	IK SE52
1,8-cineol	1204	1030
3-oxo-cineol <sup>(b)</sup>	1640	1180
2-oxo-cineol <sup>(a,b)</sup>	1682	1213
2-endo-hidroxicineol <sup>(a,b)</sup>	1722	1209
2-exo-hidroxicineol <sup>(a,b)</sup>	1854	1221
3-exo-hidroxicineol <sup>(a)</sup>	1900	1238
3-endo-hidroxicineol <sup>(a,b)</sup>	1928	1249

Tabla 10. Índices de retención de Kovats del 1,8-cineol y sus derivados oxidados, determinados en una fase estacionaria polar (IK Carbowax) y otra apolar (IK SE52). (a) productos de la biotransformación del 1,8-cineol, (b) compuestos obtenidos sintéticamente.

Se intentaron aislar los productos de biotransformación mediante cromatografía líquida con sílica gel 60 (0,63-0,2 mm) como fase estacionaria. Luego de varios intentos ensayando diferentes fases móviles (como hexano-acetato de etilo; diclorometano-

acetato de etilo y diclorometano-metanol, en diversas proporciones) no se logró obtener ningún compuesto con un grado de pureza adecuado. Entonces se pasó a utilizar sílica gel 60 *flash* (0,04-0,2 mm) como fase estacionaria. Con una fase móvil compuesta por Hexano y Acetato de etilo (2:1) se logró aislar el producto mayoritario 2-*exo*-hidroxicineol, de los productos de biotransformación en CM e YMPG, y mediante la misma técnica el 3-*exo*-hidroxicineol de la bioconversión en YMPG. El resto de los productos no fue posible aislarlos a pesar de las diferentes variantes cromatográficas ensayadas.

Con los compuestos aislados se realizaron los experimentos  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  y espectros de masa. Los datos espectrales obtenidos para el 2-*exo*-hidroxicineol coincidieron con el de su homólogo sintético (Tabla 12), y los obtenidos para el 3-*exo*-hidroxicineol se describen en la Tabla 11. Los espectros correspondientes se presentan en el Anexo II. Para ambos compuestos se determinaron además los índices de retención de Kovats en las dos fases estacionarias indicadas (Tabla 10). Para el 2-*exo*-hidroxicineol obtenido en el medio CM, dada que su distribución enantiomérica surgida del análisis por GC-GC indicó un producto prácticamente homoquiral, se determinó su poder rotatorio específico en las condiciones mencionadas en la Sección 2.2, obteniéndose  $\alpha_D^{22} = + 6,1^\circ$  ( $c = 1,6$ , MeOH). También se determinó el poder rotatorio del 3-*exo*-hidroxicineol de la bioconversión en YMPG:  $\alpha_D^{20} = + 0,1^\circ$  ( $c = 0,9$ , MeOH)

Los productos de la biotransformación que no pudieron ser aislados se identificaron al ser comparados sus tiempos de retención, índices de retención de Kovats y espectros de masa con el de los correspondientes productos obtenidos sintéticamente, cuya obtención se describe en la siguiente sección.

<b><math>^1\text{H NMR } \delta</math>:</b>	4,47-4,51 (1H, brd, $J = 9,5$ ; H-3 $\beta$ ), 2,12-2,18 (1H, ddd, $J = 14$ ; 9,5; 3; H-2 $\beta$ ), 2,03-2,12 (1H, dddd, $J = 13,5$ ; 10; 6; 2, H-5 $\alpha$ ), 1,77-1,85 (1H, m, H-5 $\beta$ ), 1,45-1,70 (sc, H-4, H-6 $\alpha$ , H-6 $\beta$ ), 1,32-1,36 (1H, dd, $J = 14$ ; 3), 1,32 y 1,23 (c/u 3H, s, H-9 y H10), 1,09 (3H, s, H-7)
<b><math>^{13}\text{C NMR } \delta</math>:</b>	73,3 (C-8), 70,9 (C-1), 65,3 (C-3), 42,9 (C-2), 40,3 (C-4), 31,0 (C-6), 29,0 y 28,4 (C-9, C-10), 27,1 (C-7), 13,9 (C-5)
<b>MS <math>m/z</math> (int. rel.):</b>	170 ( $\text{M}^+$ ) (2), 137 (3), 127 (3), 111 (4), 108 (6), 93 (11), 87 (12), 69 (15), 59 (14), 43 (100)

Tabla 11. Datos espectroscópicos obtenidos y utilizados para la identificación del 3-*exo*-hidroxicineol. brd: doblete ancho, sc: señal compleja.

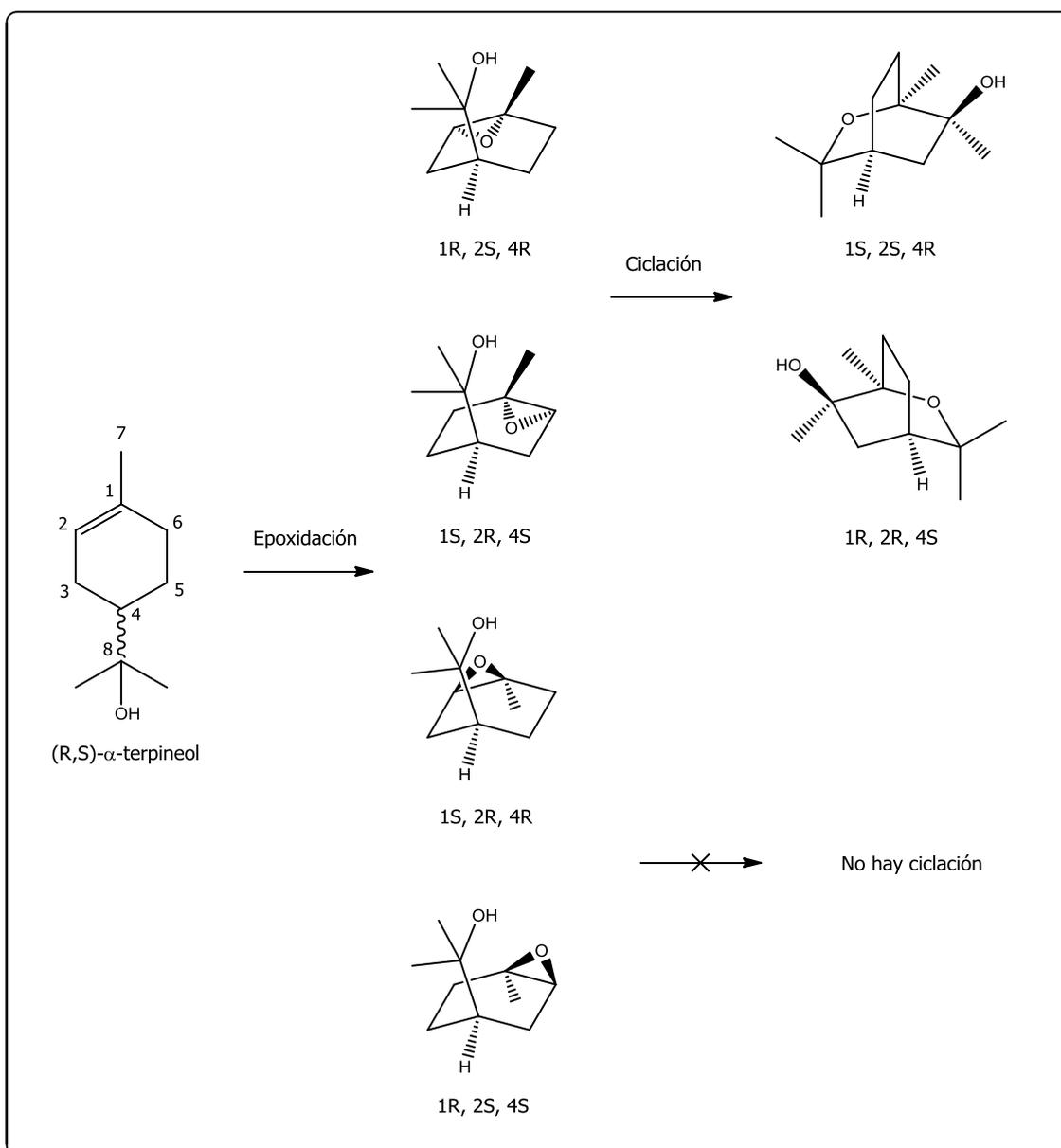
## 2.5.5 Síntesis de derivados oxigenados del 1,8-cineol

### 2-*exo*-hidroxicineol

La síntesis del 2-*exo*-hidroxicineol se realizó a partir de  $\alpha$ -terpineol adaptando la técnica descrita por Bitteur y colaboradores (Bitteur et al., 1990) (Esquema 17). En un balón de 250 mL se agregaron 50 mL de diclorometano en los que se disolvieron 2,07 g de ácido 3-cloroperoxibenzoico. La solución se agitó magnéticamente sobre baño de hielo y se agregaron 1,08 g de  $\alpha$ -terpineol técnico (90%) previamente disueltos en 20 mL de diclorometano. Se dejó reaccionar por 20 h y se agregaron 1,52 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> manteniendo la agitación sobre baño de hielo por 1 h. Se adicionó a la mezcla una punta de espátula de ácido p-toluensulfónico y se mantuvo la agitación toda la noche. Se filtró por papel y se lavó una vez con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub>, se extrajo la fase orgánica, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se eliminó el solvente por rotavaporación, obteniéndose 1,76 g de un sólido blanco amorfo. Una TLC (fase móvil Hexano-AcOEt-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30:15:10), revelador anisaldehído) mostró la presencia de varias manchas, destacándose la correspondiente al  $\alpha$ -terpineol (azul-violáceo, R<sub>f</sub> = 0,59) y una mancha rojiza-púrpura con R<sub>f</sub> = 0,33. Mediante una cromatografía líquida en columna abierta con sílica gel como fase estacionaria y Hexano-AcOEt (7:3) como fase móvil, se lograron aislar 210 mg del compuesto correspondiente a esta última mancha, puro por TLC y 98,7 % por GC. La eliminación del solvente por rotavaporación arrojó un líquido oleoso incoloro, de aroma característico. El comportamiento cromatográfico (índice de retención de Kovats) fue similar al hallado para el 2-*exo*-hidroxicineol producto de la biotransformación (Tabla 10). La información espectral obtenida (NMR, MS) se describe en la Tabla 12. La distribución enantiomérica del alcohol (GC-GC quiral) indicó una mezcla casi racémica, siendo la relación de áreas de los picos de cada enantiómero 46:54.

<b><sup>1</sup>H NMR <math>\delta</math>:</b>	3,74-3,77 (1H, ddd, $J$ = 10; 4,5; 2,5; H-2 $\beta$ ), 2,50-2,58 (1H, m, H-3 $\beta$ ), 1,88-2,02 (2H, m, H-5, H-6), 1,53-1,58 (m, H-4, H-5, H-6), 1,30-1,35 (ddd, H-3 $\alpha$ ), 1,30 (3H, s, H-7), 1,22 (3H, s, H-10), 1,12 (3H, s, H-9)
<b><sup>13</sup>C NMR <math>\delta</math>:</b>	73,5 (C-8), 72,5 (C-1), 71,1 (C-2), 34,6 (C-3), 34,3 (C-4), 29,0 y 28,7 (C-9, C-10), 24,9 (C-6), 24,1 (C-7), 22,7 (C-5)
<b>MS <math>m/z</math> (int. rel.):</b>	170 (M <sup>+</sup> ) (2), 126 (14), 111 (10), 108 (21), 93 (12), 83 (12), 71 (28), 69 (15), 55 (14), 43 (100)

Tabla 12. Datos espectroscópicos obtenidos para el 2-*exo*-hidroxicineol.



Esquema 17. Síntesis de 2-exo-hidroxicineol a partir de  $\alpha$ -terpineol (Bitteur et al., 1990). El primer paso resulta en la formación de cuatro epóxidos, pero por impedimento estérico del grupo isopropilhidroxilo se esperan mayoritariamente los compuestos donde el epóxido está opuesto a dicho grupo (los enantiómeros 1R,2S,4R y 1S,2R,4S). En el segundo paso se da la adición del hidroxilo de C8, no siendo posible el cierre del anillo en los epóxidos minoritarios. De esta manera se obtiene únicamente los dos enantiómeros del 2-exo-hidroxicineol.

### 2-oxocineol

La obtención de esta cetona se realizó a partir de la oxidación del 2-exo-hidroxicineol sintético. Para ello se ensayaron dos agentes oxidantes: ácido o-

iodoxibenzoico (IBX) (Dess & Martin, 1983) y clorocromato de piridinio (PCC) (Tietze & Eicher, 1989).

En la primera reacción, 55 mg de 2-*exo*-hidroxicineol se disolvieron en 20 mL de diclorometano bajo atmósfera de nitrógeno con agitación magnética. Se agregaron 150 mg de IBX y se dejó transcurrir la reacción toda la noche. Una TLC (fase móvil AcOEt-Hexano (3:2), revelador anisaldehído) mostró además del alcohol una tenue mancha amarillenta con  $R_f = 0,82$ . El análisis por GC del crudo de reacción indicó que el producto luego identificado como 2-oxocineol se hallaba en un 13,8%.

El PCC se preparó de acuerdo a lo descrito por Tietze y Eicher (Tietze & Eicher, 1989), obteniéndose el reactivo sobre alúmina en una relación 1,1 mmol/g. Para realizar la oxidación se procedió de la misma manera que con el IBX, pero utilizando 50 mL de diclorometano, 48 mg de 2-*exo*-hidroxicineol y 540 mg de PCC sobre alúmina (0,6 mmoles de reactivo oxidante). Transcurrida la reacción se filtró por papel, y se lavó la fase orgánica con solución acuosa de bisulfito de sodio hasta ausencia de  $Cr^{+6}$ . Posteriormente se extrajo la fase orgánica dos veces con solución acuosa de sulfato de cobre (para eliminar la piridina proveniente del PCC). Por último se lavó la fase orgánica con solución saturada de cloruro de sodio, se secó con  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtró y se analizó por TLC y GC, obteniéndose un 65,7% de la cetona. Debido al mejor rendimiento con este reactivo oxidante se repitió la reacción partiendo de 546 mg del alcohol. El crudo de reacción (485 mg) se sembró en una columna abierta con sílica gel como fase estacionaria y Hexano-AcOEt (7:3) como fase móvil, logrando aislar 149 mg de un líquido oleoso incoloro puro por TLC y 99,0 % por GC. Para este compuesto se determinaron los índices de retención de Kovats (Tabla 10) y los espectros de masa y de  $^1H$  y  $^{13}C$ -NMR (Anexo II). Los datos espectroscópicos obtenidos se resumen en la Tabla 13.

<b><math>^1H</math> NMR <math>\delta</math>:</b>	2,77-2,83 (1H, dt, $J = 19; 3$ ; H-3 $\beta$ ), 2,21-2,26 (1H, dd, $J = 19; 3$ ; H-3 $\alpha$ ), 2,13-2,19 (1H, m), 2,00-2,08 (2H, m), 1,63-1,70 (m), 1,51-1,59 (1H, m), 1,41 (3H, s), 1,26 (3H, s), 1,16 (3H, s)
<b><math>^{13}C</math> NMR <math>\delta</math>:</b>	210,3 (C-2), 75,6 (C-1), 74,3 (C-8), 40,9 (C-3), 36,5 (C-4), 28,6 y 27,9 (C-9, C-10), 28,7 (C-6), 21,8 (C-5), 19,5 (C-7)
<b>MS <math>m/z</math> (int. rel.):</b>	168 ( $M^+$ ) (2), 140 (9), 111 (6), 97 (5), 83 (8), 82 (67), 69 (17), 67 (23), 58 (6), 55 (22) 43 (100)

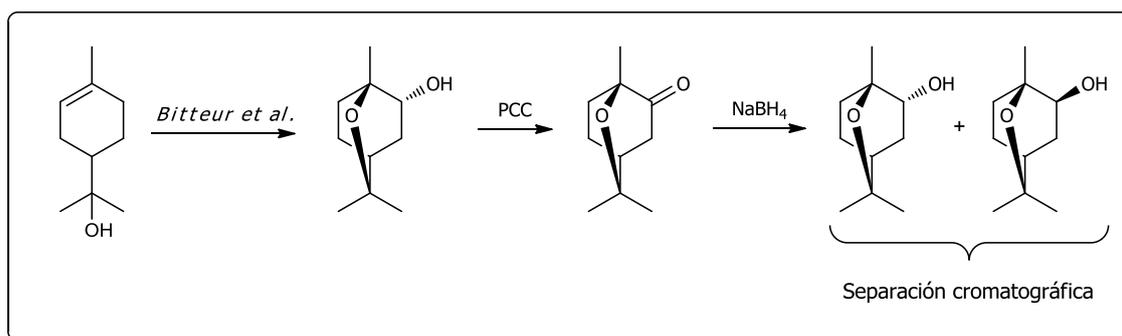
Tabla 13. Datos espectroscópicos del 2-oxocineol

## 2-endo-hidroxicineol

La estrategia sintética para obtener este alcohol implicó oxidar el 2-*exo*-hidroxicineol para obtener la cetona y luego reducir la misma (Esquema 18). Dicha reducción al no ser regioespecífica da tanto el isómero *endo* como el *exo*, pudiéndose separar el producto de interés (2-*endo*) mediante técnicas cromatográficas comunes. De esta manera, 210 mg del 2-oxocineol se disolvieron en 20 mL de metanol puro para análisis, se agregaron 52 mg de NaBH<sub>4</sub> y se agitó con pastilla magnética. A la hora se controló la reacción por TLC (fase móvil AcOEt-Hexano (3:2), revelador anisaldehído), observándose solamente dos manchas: una púrpura con R<sub>f</sub> = 0,61 correspondiente al 2-*exo*-hidroxicineol, y otra con R<sub>f</sub> = 0,48 luego asignada al 2-*endo*-hidroxicineol, no observándose mancha correspondiente a la cetona. La solución metanólica se diluyó en 50 mL de éter etílico y se lavó en bola de decantación, una vez con 20 mL de solución de HCl 5% y dos veces con agua destilada. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y rotavaporó obteniéndose 84 mg de un líquido oleoso incoloro. Para aislar el alcohol de interés se realizó una cromatografía líquida con sílica gel 60 *flash* como fase estacionaria y como fase móvil hexano-acetato de etilo (2:1). Se recogieron fracciones de aproximadamente 10 mL, lográndose aislar 33 mg de un líquido oleoso incoloro, que resultó un compuesto puro por TLC y por GC (en las condiciones antes mencionadas). Para este compuesto se determinaron los índices de retención de Kovats (Tabla 10), se obtuvo su espectro de masa (GC-MS) y los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C-NMR (Anexo II), en las condiciones antes mencionadas. En la tabla 14 se presentan los principales datos espectroscópicos obtenidos.

<b><sup>1</sup>H NMR δ:</b>	3,48-3,56 (1H, brt, J = 6, H-2α), 1,94-2,10 (3H, m), 1,78-1,89 (1H, m), 1,44-1,55 (2H, m), 1,33-1,42 (1H, m), 1,31 y 1,29 (c/u 3H, s, H-9 y H-10), 1,13 (3H, s, H-7)
<b><sup>13</sup>C NMR δ:</b>	74,0 (C-8), 72,5 (C-1), 70,5 (C-2), 35,4 (C-3), 33,4 (C-4), 29,1 y 29,0 (C-9, C-10), 28,3 (C-6), 23,2 (C-7), 22,1 (C-5)
<b>MS m/z (int. rel.):</b>	170 (M <sup>+</sup> ) (3), 126 (16), 111 (12), 108 (25), 93 (14), 83 (10), 71 (29), 69 (16), 55 (15), 43 (100)

Tabla 14. Datos espectroscópicos del 2-endo-hidroxicineol



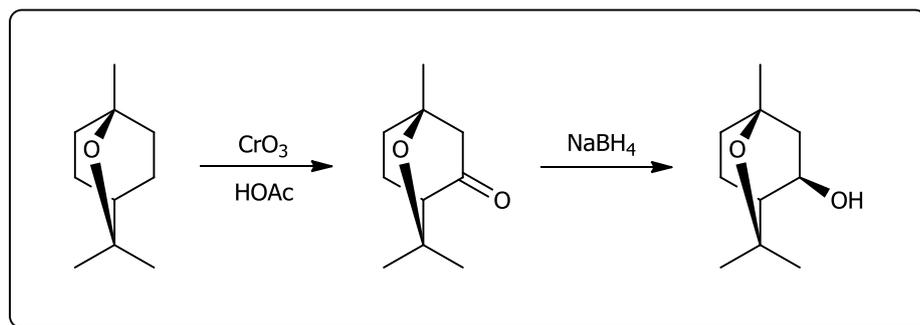
Esquema 18. Estrategia sintética para obtener el 2-oxocineol y el 2-endo-hidroxicineol

### 3-oxohidroxicineol

La síntesis del 3-oxocineol se realizó a partir de 1,8-cineol según técnica descrita por Carman y colaboradores (Carman et al., 2005) (Esquema 19). 9,6 g de trióxido de cromo se agregaron de a pequeñas cantidades, lentamente y con agitación sobre una mezcla de 20 mL de ácido acético y 38 mL de anhídrido acético mantenida a 0°C. Esta solución se agregó gota a gota sobre 1 g de 1,8-cineol disuelto en 30 mL de diclorometano a 10°C. Se dejó reaccionar por 24 h a T ambiente, y la solución verde obtenida se volcó sobre aproximadamente 40 g de hielo y se neutralizó con carbonato de sodio. Se agregaron 10 mL más de diclorometano y la capa orgánica se extrajo, se lavó con solución saturada de cloruro de sodio, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se eliminó el solvente por rotavaporación, obteniéndose una sustancia de consistencia oleosa. El análisis por TLC (fase móvil AcOEt-Hexano (3:2), revelador anisaldehído) mostró 3 manchas principales: una violácea de R<sub>f</sub> = 0,95 correspondiente al cineol, una amarronada de R<sub>f</sub> = 0,73 y otra rojiza-amarronada de R<sub>f</sub> = 0,51. Según los autores de la técnica seguida, estas dos manchas debieron corresponder al 3-oxocineol y el 3,5-dioxocineol respectivamente. El crudo de reacción se sembró en una columna abierta con sílica gel como fase estacionaria, usando como fase móvil Hexano-AcOEt (9:1) al comienzo aumentando gradualmente la polaridad hasta Hexano-AcOEt (4:1), cuando eluyó el compuesto responsable de la mancha de R<sub>f</sub> = 0,73. Se eliminó el solvente por rotavaporación dando un líquido oleoso incoloro puro por TLC y 99,6 % por GC. Para este compuesto se determinaron los índices de retención de Kovats (Tabla 10), los espectros de masa y de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C-NMR. Los principales datos espectrales se resumen en la Tabla 15.

<b><sup>1</sup>H NMR δ:</b>	2,37-2,44 (1H, dd, <i>J</i> = 19; 3; H-2β), 2,20-2,31 (2H, m, H-2α y H-5β), 2,18-2,20 (1H, dd, <i>J</i> = 4; 2; H-4), 1,84-1,93 (1H, m), 1,72-1,81 (1H, m), 1,63-1,67 (m), 1,33, 1,26 y 1,17 (c/u 3H, s, H-7, H-9 y H-10)
<b><sup>13</sup>C NMR δ:</b>	213,4 (C-3), 73,6 (C-1), 73,6 (C-8), 51,9 (C-4), 49,1 (C-2), 30,7 (C-9), 30,4 (C-6), 26,9 (C-7), 26,3 (C-10), 18,3 (C-5)
<b>MS <i>m/z</i> (int. rel.):</b>	168 (M <sup>+</sup> ) (2), 153 (14), 125 (9), 111 (16), 83 (21), 82 (23), 67 (13), 55 (35), 43 (100)

Tabla 15. Datos espectroscópicos del 3-oxocineol



Esquema 19. Síntesis de 3-oxocineol y 3-endo-hidroxicineol a partir de 1,8cineol (Carman et al., 2005)

### 3-endo-hidroxicineol

Para la síntesis de este alcohol también se siguió lo descrito por Carman y colaboradores (Carman et al., 2005), y se resume en el Esquema 19. La reducción con hidruro de la cetona obtenida más arriba, rinde sólo el producto de la adición del hidruro por el lado menos impedido, o sea el 3-*endo*-hidroxicineol. De esta manera, 96 mg de NaBH<sub>4</sub> se agregaron a una solución de 183 mg de 3-oxocineol disueltos en 20 mL de metanol puro para análisis, con agitación. A las 2 horas se controló la reacción por TLC (fase móvil AcOEt-Hexano (3:2), revelador anisaldehído), observándose una mancha principal de color azulado con R<sub>f</sub> = 0,49. La solución metanólica se diluyó en 50 mL de éter etílico y se lavó en bola de decantación, una vez con 20 mL de solución de HCl 5% y dos veces con agua destilada. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y rotavaporó obteniéndose 144 mg de un líquido oleoso incoloro. Para aislar el alcohol de interés se realizó una cromatografía líquida con sílica gel como fase estacionaria y como fase móvil hexano-acetato de etilo (7:3), lográndose aislar 88 mg de un líquido oleoso incoloro, que resultó un compuesto puro por TLC y por GC (en las condiciones antes mencionadas). Para este compuesto se determinaron los índices de

retención de Kovats (Tabla 10), se obtuvo su espectro de masa (GC-MS) y los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -NMR, de los cuales se extrajo la información presentada en la Tabla 16.

<b><math>^1\text{H}</math> NMR <math>\delta</math>:</b>	4,10-4,18 (1H, ddd, $J = 10,5, 6, 2$ ; H-3 $\alpha$ ), 2,01-2,10 (2H, m, H2 $\alpha$ y H5 $\beta$ ), 1,67-1,73 (1H, ddd, $J = 14; 6; 3$ , H-2 $\beta$ ), 1,50-1,64 (2H, m), 1,44 (3H, s, H-9), 1,36-1,42 (2H, m), 1,25 (3H, s, H10), 1,12 (3H, s, H-7)
<b><math>^{13}\text{C}</math> NMR <math>\delta</math>:</b>	73,4 (C-8), 70,8 (C-3), 70,2 (C-1), 43,2 (C-2), 40,8 (C-4), 30,8 y 30,5 (C-9, C-10), 30,1 (C-6), 26,9 (C-7), 21,4 (C-5)
<b>MS <math>m/z</math> (int. rel.):</b>	155 (10), 137 (3), 127 (4), 111 (2), 108 (5), 93 (15), 85 (10), 69 (11), 59 (17), 43 (100)

Tabla 16. Datos espectroscópicos del 3-endo-hidroxicineol

### 2.5.6 Esporas como agente biocatalizador

El ensayo de biotransformación del 1,8-cineol con un cultivo de esporas de *A. terreus* en lugar de un cultivo en crecimiento, se llevó a cabo en matraces dispuestos en agitador orbital, agregando la suspensión de esporas a un buffer fosfato (pH = 7,4). Se utilizaron 10 matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo cada uno 50 mL de solución buffer fosfato: 30,8 mL de solución acuosa de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1M + 19,2 mL de solución acuosa de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M. Nueve de los matraces se inocularon con una suspensión de esporas preparada en suero fisiológico según lo descrito en la Sección 2.1, de manera de tener una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL. El restante matraz se utilizó para control (blanco cineol), por lo que a este y a 8 de los 9 matraces inoculados se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de 1,8-cineol (concentración final de sustrato en el medio 0,1%). El matraz con esporas y sin sustrato se utilizó para el segundo control (blanco esporas). Todos los matraces se dispusieron en agitador orbital a 28°C y 100 rpm. A los 5, 7, 10 y 14 días de iniciada la biotransformación, se detuvo la biotransformación de dos de los matraces (cada ensayo se realizó por duplicado). Los dos ensayos de control se detuvieron en el día 14. Como no se observó biomasa macroscópica en ninguno de los matraces, se evitó el filtrado. Se controló el pH de cada ensayo y en todos los casos se situó entre 6,5 y 7,5, por lo que no fue modificado. Se extrajo el medio con diclorometano (3 veces con 30 mL cada vez). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró mediante papel y se concentró en rotavapor cuidando que la temperatura no superara los 40°C. Los extractos obtenidos se mantuvieron en freezer (-18°C) hasta su análisis. Cada muestra se analizó por TLC y GC en las condiciones

descritas, no observándose manchas o picos correspondientes a productos de biotransformación.

### 2.5.7 Aceite de *Eucalyptus* como sustrato

Para estudiar la biotransformación de aceite de *Eucalyptus*, se procedió de la misma manera que lo indicado en la Sección 2.5.2, utilizando matraces de 250 mL con 50 mL de medio Caldo Malta cada uno, y agregando el aceite esencial al 0,1% en vez del 1,8-cineol. Se utilizó un aceite de *Eucalyptus* obtenido en la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales mediante destilación por arrastre con vapor exógeno de hojas de *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* Labill (Mantero et al., 2007).

El aceite fue analizado cromatográficamente en el GC Shimadzu 2014 (Sección 2.2), utilizando una columna capilar Carbowax 20M (30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de film) e hidrógeno como gas portador (0,96 mL/min). El programa de temperatura comenzó a 40°C constante durante 8 min, una primera rampa de 3°C/min hasta 180°C y una segunda rampa de 20°C/min hasta 220°C donde se mantuvo 4 min. La temperatura del inyector y detector fue 240°C, y la relación de split 1:50. Inyectando 0,2 mL de una dilución 1/50 del aceite esencial en diclorometano se obtuvo el perfil cromatográfico que se muestra en la Figura 21 y la composición resumida en la Tabla 17.

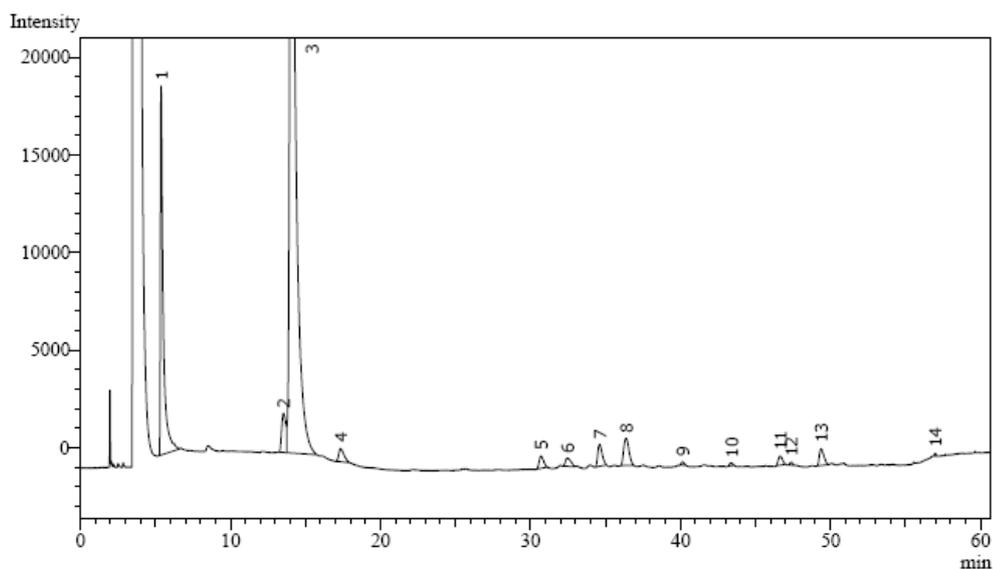


Figura 21. Cromatograma del aceite esencial de *Eucalyptus* utilizado como sustrato de biotransformación por *Aspergillus terreus*. Principales componentes: 1)  $\alpha$ -pineno, 2) limoneno, 3) 1,8-cineol.

<b>Compuesto</b>	<b>Composición (%)</b>
$\alpha$ -pineno	16,4
Limoneno	2,5
1,8-cineol	72,2
Otros	8,9

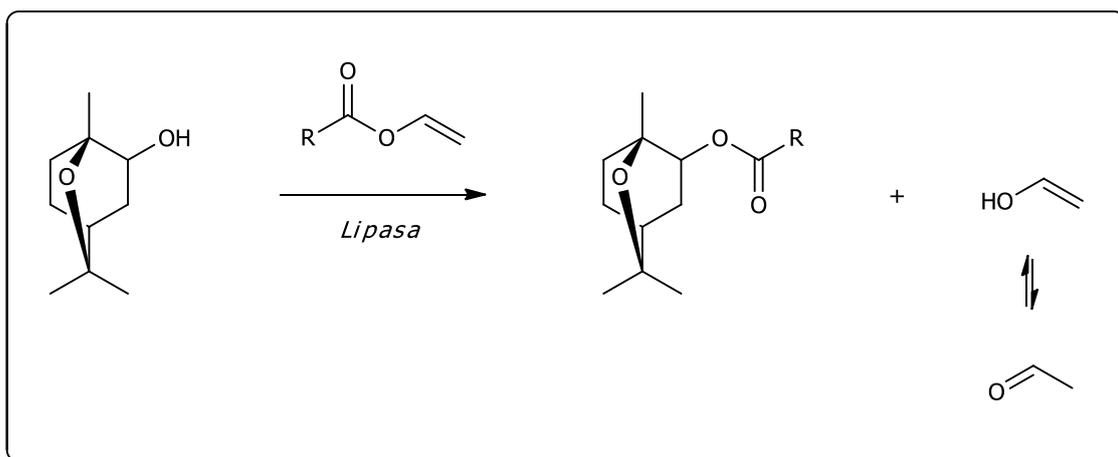
*Tabla 17. Composición del aceite esencial de Eucalyptus globulus utilizado como sustrato de la biotransformación.*

La biotransformación se analizó a los 5, 7 y 10 días. Se filtró el medio contenido en cada matraz como se indicó en la Sección 2.5.1 y se controló el pH de cada filtrado. En todos los casos el pH se situó en 6 y no fue modificado. La extracción de los productos y el clean-up de cada muestra se realizaron de la forma ya indicada. Previamente se comprobó que el clean-up era adecuado y durante el mismo no se perdían componentes del aceite de manera detectable por GC. El análisis cromatográfico de cada muestra se realizó en el GC Shimadzu 2014, utilizando una columna capilar Carbowax 20M en las condiciones descritas en la Sección 2.5.1.

Se realizaron paralelamente dos ensayos de control sustituyendo el inóculo por suero fisiológico estéril ("blanco aceite"), los que se analizaron a los días 7 y 10 de iniciada la biotransformación. En ninguno de los controles se obtuvieron picos en el GC coincidentes con los productos de biotransformación.

## **2.6 Biotransformación enzimática de los hidroxicineoles**

El abordaje de esta etapa implicó realizar ensayos de esterificación de los alcoholes derivados del cineol (obtenidos de la biotransformación del monoterpeno por *A. terreus*), con diversos ácidos grasos utilizando lipasas comerciales como catalizadores. La estrategia elegida fue la de transesterificar con ésteres vinílicos como agentes acilantes, según la reacción general indicada en el Esquema 20 (Reetz, 2002).



Esquema 20. Reacción de transesterificación de un hidroxicineol con un éster del alcohol vinílico. Este alcohol tautomeriza a acetaldehído que al volatilizarse desplaza el equilibrio hacia los productos.

Se realizó un primer ensayo con la mezcla de alcoholes obtenida en la biotransformación del 1,8-cineol en el medio YMPG (Sección 2.5.2), con una lipasa comercial de *Candida rugosa* (CRL) y acetato de vinilo como donador de acilo. Luego se ensayó exclusivamente con el 2-*exo*-hidroxicineol (principal producto de la biotransformación del 1,8-cineol) con la lipasa mencionada y una lipasa comercial de páncreas porcino (PPL).

### 2.6.1 Acetilación de los productos de biotransformación en YMPG

El extracto diclorometánico del producto de la biotransformación del 1,8-cineol por *Aspergillus terreus* llevada a cabo en el medio YMPG, se sometió a una cromatografía líquida a vacío (VLC) a los efectos de enriquecerlo en los alcoholes productos de la biotransformación. El extracto se sembró en una pequeña columna de VLC conteniendo sílica gel 60 y se eluyó con una mezcla Hexano-AcOEt (2:1), se rotavaporó y se obtuvo una mezcla de monoterpenos cuya composición porcentual (determinada por GC en las condiciones mencionadas en la Sección 2.5.2) se indica en la Tabla 18.

<b>Compuesto</b>	<b>Composición porcentual (GC)</b>
1,8-cineol	5,3
2- <i>endo</i> -hidroxicineol	3,0
2-oxocineol	3,9
2- <i>exo</i> -hidroxicineol	45,8
3- <i>exo</i> -hidroxicineol	33,6
3- <i>endo</i> -hidroxicineol	8,4

*Tabla 18. Composición (determinada por GC) de la mezcla producto de biotransformación del 1,8-cineol por A. terreus en YMPG, utilizada como sustrato de la biotransformación con acetato de vinilo catalizada con una lipasa de Candida rugosa.*

En un balón de 10 mL de capacidad, 24 mg de esta mezcla se disolvieron en 2,5 mL de acetato de vinilo a los que se agregó aproximadamente 1 mg de CRL (una punta de espátula). Se sometió la mezcla a agitación magnética a T ambiente durante 48 h, y se siguió la reacción por TLC (fase móvil Hexano-AcOEt-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30:15:10), revelador anisaldehído) y GC (Shimadzu 8A, equipado con una columna SE52 con las características y en las condiciones descritas en la Sección 2.5.1). Los tiempos de reacción evaluados fueron 1, 2, 3, 4, 5, 24 y 32 h. A las 48 h se detuvo la reacción, se filtró por papel y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se obtuvo un sobrenadante límpido el cual se analizó de la misma forma que las tomas de seguimiento, y sobre el que además se realizó un GC-GC quiral en las condiciones descritas en la Sección 2.5.1.

A todos los tiempos se observó en la TCL, con creciente intensidad relativa, una sola nueva mancha rojo-púrpura con  $R_f = 0,73$  respecto de la mezcla inicial sometida a la reacción enzimática. Del mismo modo en el GC se observó un solo nuevo pico como se muestra en la Figura 22. La comparación del tiempo de retención y coinyección con un acetato de 2-*exo*-hidroxicineol (obtenido y caracterizado como se indica en la siguiente sección) confirmó que se trataba de ese compuesto. Con la cromatografía en columna quiral se determinó la distribución enantiomérica del 2-*exo*-hidroxicineol remanente de la reacción y del acetato formado (Figura 23).

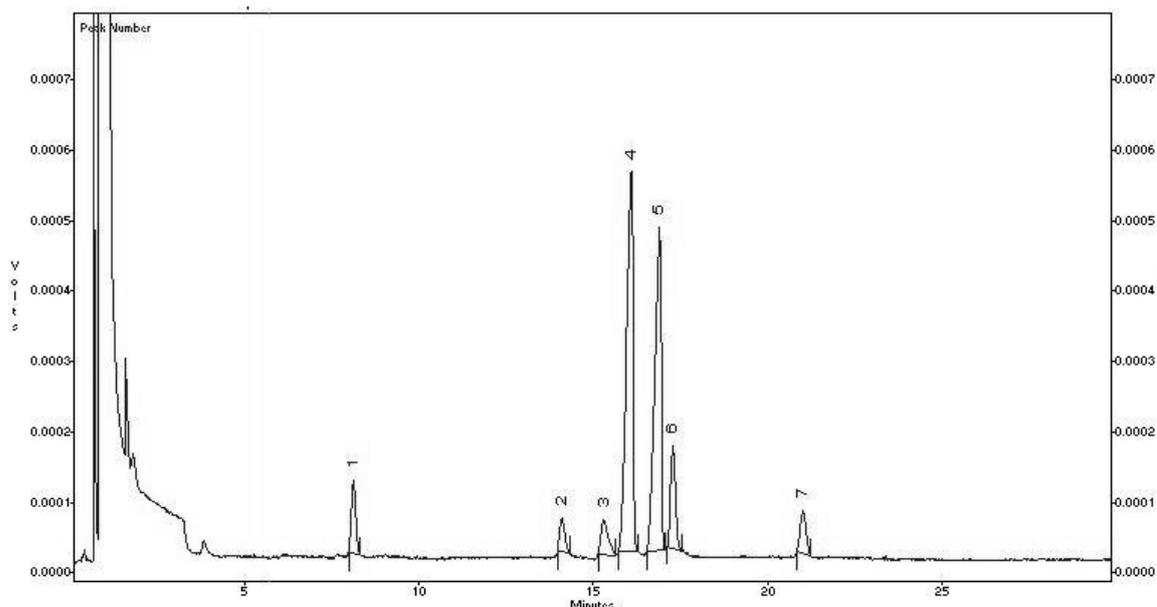


Figura 22. GC del producto de la biotransformación de la mezcla indicada en la Tabla 13 con acetato de vinilo y lipasa de *Candida rugosa*, a las 5 horas: 1) 1,8-cineol, 2) 2-endo-hidroxicineol, 3) 2-oxocineol, 4) 2-*exo*-hidroxicineol, 5) 3-*exo*-hidroxicineol, 6) 3-endo-hidroxicineol, 7) acetato de 2-*exo*-hidroxicineol.

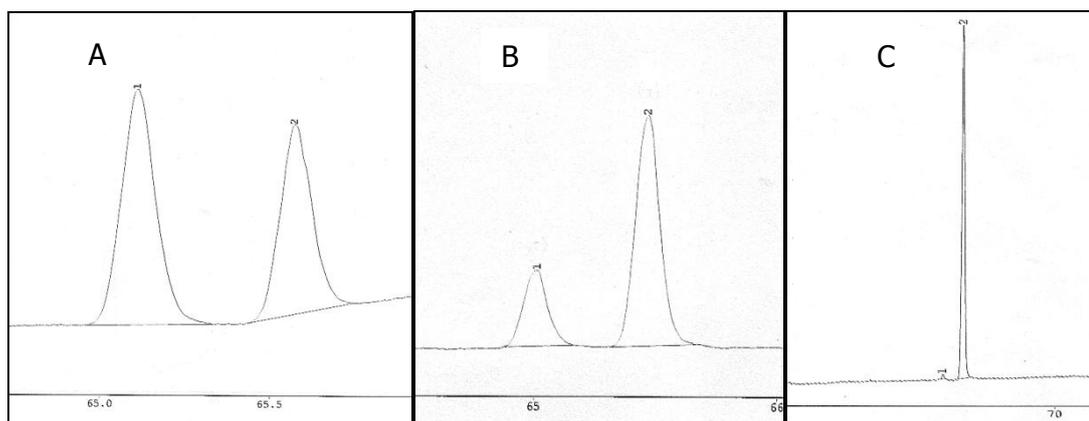


Figura 23. Cromatogramas quirales correspondientes a: A) 2-*exo*-hidroxicineol producto de la biotransformación de 1,8-cineol con *A. terreus* en YMPG (pico 4 en el cromatograma de la figura 22). B) El mismo producto remanente de la reacción de bioacetilación. C) Acetato de 2-*exo*-hidroxicineol obtenido por bioacetilación del alcohol con acetato de vinilo y lipasa de *Candida rugosa*.

## 2.6.2 Esterificación del ( $\pm$ )-2-*exo*-hidroxicineol sintético

Para llevar a cabo los ensayos de esterificación sobre el alcohol aislado se utilizó 2-*exo*-hidroxicineol sintético obtenido según se describió en la Sección 2.5.5, que resultó ser una mezcla prácticamente racémica, similar al mismo producto que fue

sustrato de la reacción mencionada en la sección anterior. Como agentes acilantes se utilizaron cuatro ésteres vinílicos comerciales: acetato de vinilo, butirato de vinilo, laureato de vinilo y estearato de vinilo. Como biocatalizadores se ensayaron las lipasas CRL y PPL arriba descritas.

En todos los casos se procedió a realizar las reacciones en balones, bajo agitación magnética y a dos temperaturas: ambiente y 35°C. En cada ensayo se partió de aproximadamente 50 mg de 2-*exo*-hidroxicineol. Para el caso del acetato de vinilo, el alcohol se disolvió directamente en el éster vinílico (5 mL) y luego se agregó la enzima (aproximadamente 2 mg de CRL y 60 mg de PPL, y cantidades similares de cada enzima en todos los demás ensayos). Con el butirato de vinilo se disolvió primero el alcohol en diclorometano (5 mL) y luego se agregó el éster (0,5 mL) y la enzima. Para el resto de los casos tanto el hidroxicineol como el éster se disolvieron en diclorometano (2 mL de laureato de vinilo en 5 mL de diclorometano y 40 mg de estearato de vinilo en 1,5 mL del mismo solvente), se mezclaron y posteriormente se agregó la enzima. Las reacciones fueron seguidas por TLC y GC (en las mismas condiciones que las indicadas en la Sección 2.6.1) y evaluadas a los 30 minutos y 1, 2, 6, y 24 horas.

Para el ensayo con el acetato de vinilo y CRL se observó en las cromatografías un solo nuevo producto. Las características de la mancha en TLC y tiempo de retención en el GC fueron las mismas que para el producto obtenido en el ensayo con la mezcla de alcoholes (Sección 2.6.1). Esta reacción se siguió por ambas técnicas a las 1,5, 3, 4 y 5 horas, además de los tiempos arriba indicados. Para el resto de los ésteres ensayados con CRL y para todos los ésteres con PPL, no se observó ninguna alteración en los cromatogramas respecto de las condiciones iniciales.

El compuesto obtenido de la biotransformación del 2-hidroxicineol con acetato de vinilo y CRL, se aisló mediante una cromatografía líquida con sílica gel 60 como fase estacionaria y como fase móvil hexano-acetato de etilo (9:1), lográndose aislar 86 mg de un líquido oleoso incoloro, que resultó un compuesto puro por TLC y por GC (en las condiciones antes mencionadas). Para este compuesto se determinaron los índices de retención de Kovats en dos fases estacionarias (Carbowax y SE52) del mismo modo que se indicó en la Sección 2.5.4 (Tabla 19). Además se obtuvo su espectro de masa (GC-MS) y los espectros de NMR de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (Anexo II), en las condiciones antes mencionadas (Sección 2.2). La información espectral obtenida se describe en la Tabla

20. Estos datos permitieron identificar al compuesto como acetato de 2-*exo*-hidroxicineol.

Con el producto de reacción obtenido a las 24 h se realizó un GC-GC quiral en las condiciones descritas en la Sección 2.5.1, lo que arrojó un producto con un exceso enantiomérico del 98%. Se midió el poder rotatorio específico del compuesto aislado según se describió en el párrafo anterior, en las condiciones mencionadas en la Sección 2.2, obteniéndose  $\alpha_D^{25} = -18,3^\circ$  ( $c = 2,3$ , MeOH).

	<b>IK Carbowax</b>	<b>IK SE52</b>
Acetato de 2- <i>exo</i> -hidroxicineol	1719	1344

Tabla 19. Índices de retención de Kovats del acetato de 2-*exo*-hidroxicineol en una fase estacionaria polar (IK Carbowax) y otra apolar (IK SE52).

<b><sup>1</sup>H NMR <math>\delta</math>:</b>	4,68-4,73 (1H, ddd, $J = 10; 4; 2$ ; H-2 $\beta$ ), 2,59-2,69 (1H, dddd, $J = 15; 10; 4; 3,5$ ; H-3 $\beta$ ), 2,08 (3H, s, H-12), 1,97-2,06 (1H, m, H-5), 1,85-1,93 (1H, m, H-6 $\alpha$ ), 1,59-1,66 (m, H-6 $\beta$ ), 1,50-1,58 (2H, m, H-4, H-5), 1,28-1,34 (1H, ddd, $J = 15; 4; 2,5$ ; H-3 $\alpha$ ), 1,24 y 1,30 (c/u 3H, s, H-9 y H10), 1,06 (3H, s, H-7)
<b><sup>13</sup>C NMR <math>\delta</math>:</b>	170,6 (C-11), 73,8 (C-8), 72,9 (C-2), 70,8 (C-1), 33,8 (C-4), 32,7 (C-3), 28,6 y 28,9 (C-9, C-10), 25,9 (C-6), 24,2 (C-7), 22,0 (C-5), 21,3 (C-12)
<b>MS <math>m/z</math> (int. rel.):</b>	212 (M <sup>+</sup> ) (2), 126 (8), 111 (7), 109 (8), 108 (18), 93 (10), 82 (9), 71 (14), 55 (8), 43 (100)

Tabla 20. Datos espectroscópicos obtenidos y utilizados en la identificación del acetato de 2-*exo*-hidroxicineol.

### 2.6.3 Hidrólisis del (-)-acetato de 2-*exo*-hidroxicineol

El acetato homoquiral obtenido en la transesterificación con CRL se sometió a una hidrólisis básica en metanol, a los efectos de obtener el alcohol correspondiente. 140 mg de KOH se disolvieron en 30 mL de metanol, los que se agregaron a 70 mg de acetato de 2-*exo*-hidroxicineol disueltos en 20 mL de metanol. La reacción se dejó transcurrir toda la noche y se evaluó por TLC en las condiciones antes mencionadas, observándose una única mancha de aspecto y relación de frente idéntica a la del 2-*exo*-hidroxicineol. Sobre el crudo de reacción se agregaron 20 mL de agua, se neutralizó con

HCl 5% y se extrajo con diclorometano (3 x 50 mL). Las fases orgánicas se juntaron, se lavó primero con agua y luego con solución saturada de NaCl. La solución de diclorometano se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró por papel y se rotavaporó obteniéndose 39 mg de un líquido oleoso incoloro.

El producto obtenido fue puro por TLC y 97,5% por GC (realizado en las condiciones arriba mencionadas). Su identidad se confirmó al comparar los tiempos de retención y coinyectar el producto con un 2-*exo*-hidroxicineol sintético. Se realizó un GC-GC quiral (de la forma indicada en la Sección 2.5.1) que arrojó un exceso enantiomérico > 99%. Se midió el poder rotatorio específico del compuesto aislado (en las condiciones mencionadas en la Sección 2.2), obteniéndose  $\alpha_D^{25} = -5,5^\circ$  ( $c = 1,3$ , MeOH).

## **2.7 Actividad biológica de los productos de bioconversión del 1,8-cineol y sus derivados**

### *Productos ensayados*

Mediante los bioensayos específicos indicados más adelante, fue evaluada la potencial actividad fitotóxica de 7 productos: 1) mezcla de los hidroxicineoles productos de la biotransformación de 1,8-cineol por *A. terreus* llevada a cabo en YMPG (Sección 2.5.2.1); 2) ídem 1 pero en CM (Sección 2.5.2.2; 3) ( $\pm$ )-2-*exo*-hidroxicineol de síntesis (Sección 2.5.5); 4) (+)-2-*exo*-hidroxicineol aislado de los productos de biotransformación del 1,8-cineol en CM (Sección 2.5.4); 5) (-)-2-*exo*-hidroxicineol producto de la hidrólisis del acetato obtenido por catálisis enzimática (Sección 2.6.3); 6) acetato de (-)-2-*exo*-hidroxicineol (Sección 2.6.2), y 7) 1,8-cineol.

Las mezcla de alcoholes productos de biotransformación del cineol (productos 1 y 2), fueron obtenidas luego de someter al extracto crudo del producto de bioconversión a una separación por cromatografía líquida, en una columna empacada con sílica gel 60 (100 veces el peso del extracto seco) y utilizando Hexano-AcOEt (2:1) como fase móvil. De esta manera se lograron obtener las mezclas de alcoholes que se indican en la Tabla 21.

<b>Compuestos</b>	<b>YMPG (%)</b> (Producto 1)	<b>CM (%)</b> (Producto 2)
2- <i>endo</i> -hidroxicineol	6,4	3,4
2- <i>exo</i> -hidroxicineol	45,9	87,6
3- <i>endo</i> -hidroxicineol	11,1	1,6
3- <i>exo</i> -hidroxicineol	36,5	7,4

*Tabla 21. Composición de las mezclas de alcoholes productos de biotransformación del cineol en los medios YMPG y CM por A. niger, cuya fitotoxicidad fue evaluada mediante bioensayos específicos. La composición porcentual está determinada por el método de normalización de áreas de los cromatogramas de gases realizados en un cromatógrafo Shimadzu GC 2014, equipado con una columna Carbowax 20M, bajo las condiciones mencionadas en la Sección 2.5.1.*

### *Metodología*

La metodología utilizada para la evaluación de la fitotoxicidad se realizó adaptando lo reportado en el trabajo de Francisco Macías (Macías, 1995). Además se tomó en consideración para el diseño del experimento lo indicado por Leather y Einhellig (Leather & Einhellig, 1988), Macías y colaboradores (Macías et al., 2000) y Hoagland y Williams (Hoagland & Williams, 2004), prestando especial atención a la aplicación de un análisis estadístico apropiado.

De esta manera, cada producto fue ensayado en soluciones acuosas de dos concentraciones ( $10^{-3}$  y  $10^{-6}$  molar), y se midieron tres efectos biológicos en dos especies vegetales. Los efectos evaluados fueron la germinación de semillas, la elongación de raíz y la elongación de tallo de las plántulas germinadas. Las especies utilizadas fueron *Triticum aestivum* L. (trigo), una monocotiledónea, y *Lactuca sativa* L. (lechuga), una dicotiledónea, cuyas especificaciones se detallan en la Sección 2.2.

Para los bioensayos se utilizaron placas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían un círculo de aproximadamente el mismo diámetro de papel de filtro, en el cual se embebieron las soluciones que fueron testeadas. En todos los casos se midió el pH de las mismas previo al ensayo, encontrándose en el entorno de 6,5, por lo que no fue necesario su ajuste. La disolución de los productos en solución acuosa se realizó mediante

el agregado de cosolventes, como se explica más adelante. El volumen de solución agregada a cada placa fue de 5 mL en los ensayos con semillas de trigo y 4 mL en los de semillas de lechuga. Previo a su uso, las semillas fueron seleccionadas una a una evitando aquellas que presentaban irregularidades o daños visibles a simple vista. Una vez colocadas las semillas en las placas, estas se incubaron en oscuridad en una estufa a 25 °C. Los efectos sobre la germinación se determinaron a los 2 días y la medida de longitudes de tallo y raíz se efectuó a los 5 días de puestas a germinar las semillas. Debido a la imposibilidad de medir todos los tallos y raíces al mismo tiempo por el gran número de replicas (como se verá, cada ensayo implicó 150 semillas de trigo y 375 de lechuga), las placas que no fueron observadas al quinto día fueron guardadas en freezer a -22 °C hasta su evaluación.

### *Preparación de las soluciones*

A los efectos de asegurar una dispersión en agua completamente homogénea de los compuestos ensayados, se agregaron cosolventes en la mínima cantidad necesaria para su disolución. De esta manera, 60 mg de la mezcla de alcoholes obtenida por bioconversión del cineol en YMPG y 31 mg de la obtenida en CM (productos 1 y 2) se disolvieron en 350 y 180  $\mu\text{L}$  de acetona respectivamente. Del mismo modo se procedió con los 2-hidroxicineoles (productos 3, 4 y 5): 67 mg de 2-*exo*-hidroxicineol de síntesis, 19 mg de (+)-2-*exo*-hidroxicineol y 28 mg de (-)-2-*exo*-hidroxicineol, se disolvieron en 400, 130 y 180  $\mu\text{L}$  de acetona respectivamente.

Para disolver 27 mg de acetato de hidroxicineol (producto 6) se utilizaron 300  $\mu\text{L}$  de tetrahidrofurano. A cada una de estas soluciones se les agregó 10 mL de agua destilada, se agitó en vortex durante un minuto y se colocó en baño de ultrasonido por 5 minutos. Luego se agregó agua en cantidad suficiente para lograr una solución  $10^{-2}\text{M}$  y se homogeneizó agitando manualmente. Se realizó una dilución 1/10 de la solución resultante para obtener la solución  $10^{-3}\text{M}$  que fue ensayada, y una dilución 1/1000 de esta última para obtener la solución  $10^{-6}\text{M}$  que también fue ensayada. Para preparar las soluciones de 1,8-cineol se disolvieron 15 mg del monoterpeno en 300  $\mu\text{L}$  de etanol, se agregaron 10 mL de agua y se agitó en vortex un minuto y se sonicó por 2 minutos. Se agregó agua suficiente para lograr la solución  $10^{-3}\text{M}$ , y de una dilución 1/1000 de esta se obtuvo la solución  $10^{-6}\text{M}$ .

### *Diseño experimental*

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio con 5 repeticiones por producto y concentración, incluyendo un tratamiento "blanco", el cual se hizo con agua en vez de soluciones de los productos, agregando los cosolventes correspondientes en cada caso. Se utilizaron 25 semillas de lechuga por placa, mientras que para trigo se usaron 10. De esta manera cada producto ensayado implicó un set de 30 placas: 5 placas por cada concentración ensayada (blanco, 10E-6 y 10E-3), y por cada tipo de semilla (trigo y lechuga). Esto totaliza 50 semillas de trigo y 125 semillas de lechuga para cada concentración. Los efectos sobre la germinación fueron evaluados comparando los promedios de las proporciones de germinación (número semillas germinadas/número semillas totales). Las semillas se consideraron germinadas si se observaba un brote de radícula mayor a 1 mm. Los efectos sobre el desarrollo de raíz se determinaron comparando los promedios en las longitudes de las mismas, y para evaluar el desarrollo de tallos se compararon los promedios en las longitudes de epicótilos en la monocotiledónea e hipocótilos en la dicotiledónea.

### *Análisis estadístico*

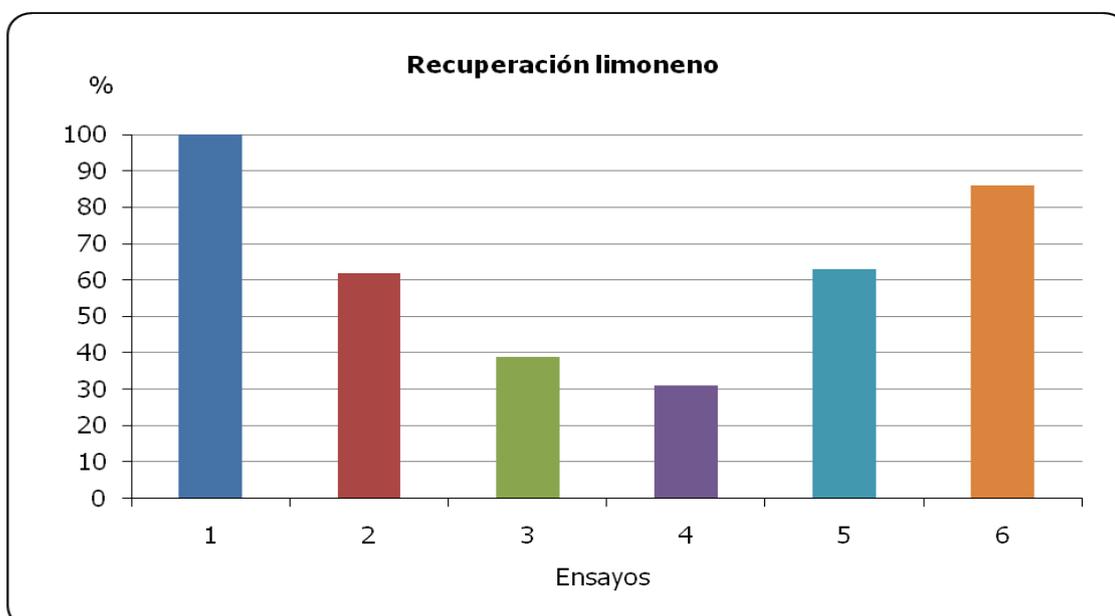
Las pruebas estadísticas para demostrar la significancia de los resultados, se realizaron de acuerdo a las sugerencias indicadas por el Dr. Jorge Franco (Departamento de Biometría, Estadística y Computación, Facultad de Agronomía, UdelaR). Para la determinación de los efectos en la germinación, se asumió una distribución binomial de la variable medida (número germinadas/semillas totales) y se planteó un modelo lineal generalizado. La significancia de la diferencia entre las proporciones de germinación de los ensayos del producto en sus dos concentraciones y el control (blanco), fue determinada mediante pruebas de Razón de Verosimilitud (Chi-cuadrado). Mientras que los efectos sobre la elongación de raíz y tallo fueron analizados mediante el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. Las pruebas estadísticas realizadas con los resultados experimentales obtenidos fueron llevadas a cabo por el Dr. Franco utilizando la herramienta SAS (Statistical Analysis System).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

#### 3.1 Recuperación del limoneno y sus productos de biotransformación desde el medio de cultivo

Los resultados expresados como porcentajes de recuperación de los distintos terpenos se muestran en los gráficos de las figuras 24 a 28.



*Figura 24. Porcentajes de recuperación de limoneno desde el medio de cultivo. Ensayo 1: extracción con diclorometano a  $t = 0$  h, sin hongo agregado. Ensayos 2, 3, 4 y 5: extracción con destilación por arrastre con vapor de agua, hexano, acetato de etilo y diclorometano respectivamente; todos a  $t = 2$  h, en medios con hongo crecido 72 h. Ensayo 6: extracción con diclorometano a  $t = 2$  h, sin hongo agregado.*

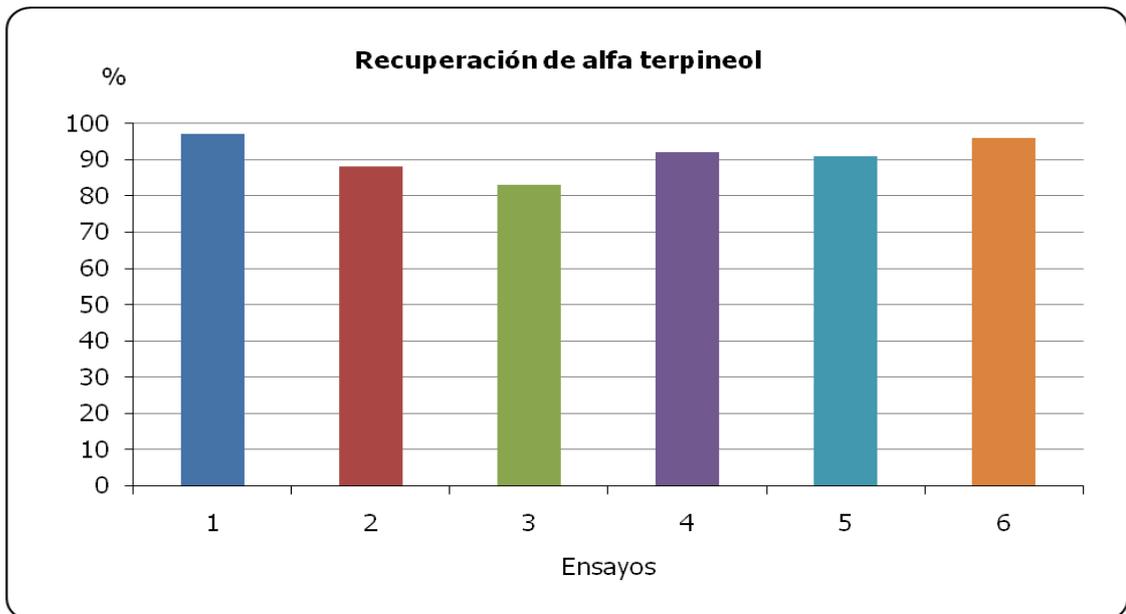


Figura 25. Porcentajes de recuperación de  $\alpha$ -terpineol desde el medio de cultivo. Los ensayos son los mismos que los referidos en la Figura 24.

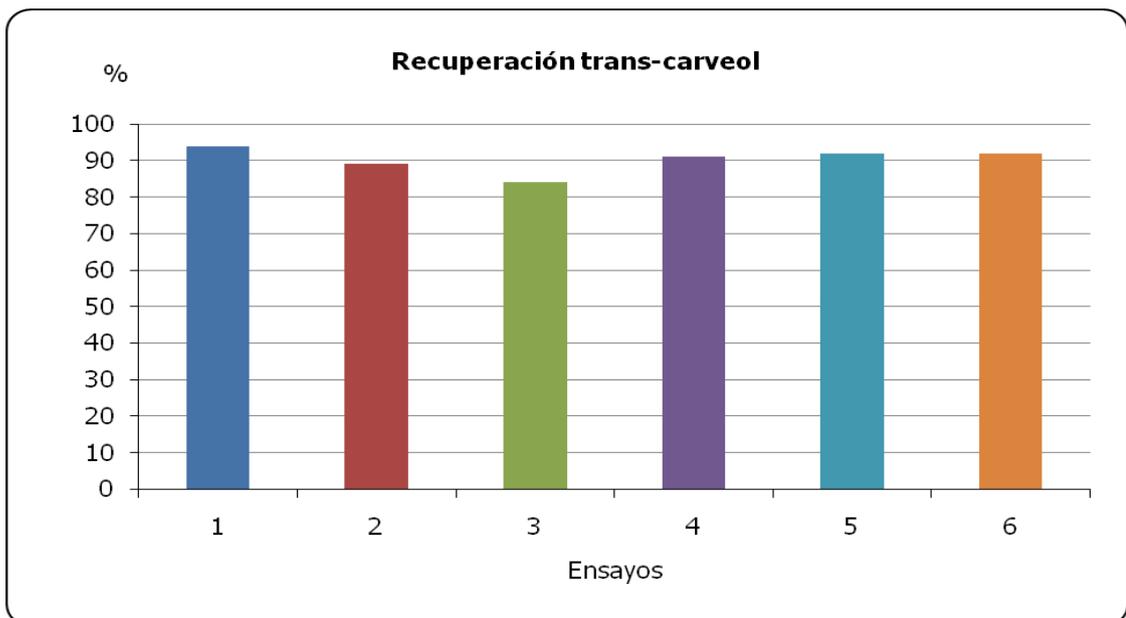


Figura 26. Porcentajes de recuperación de trans-carveol desde el medio de cultivo. Los ensayos son los mismos que los referidos en la Figura 24.

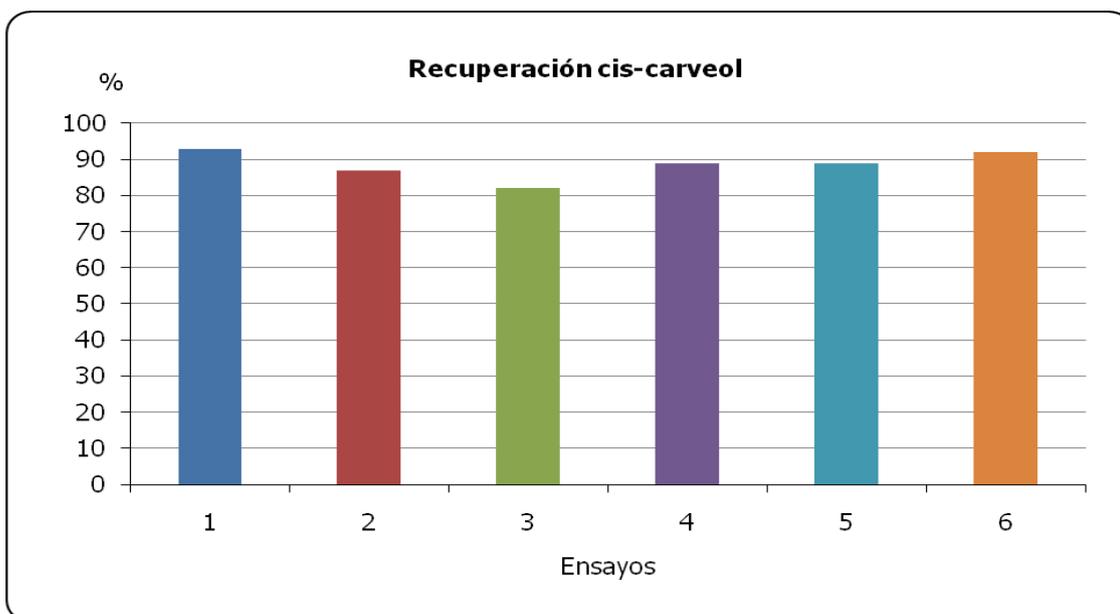


Figura 27. Porcentajes de recuperación de cis-carveol desde el medio de cultivo. Los ensayos son los mismos que los referidos en la Figura 24.

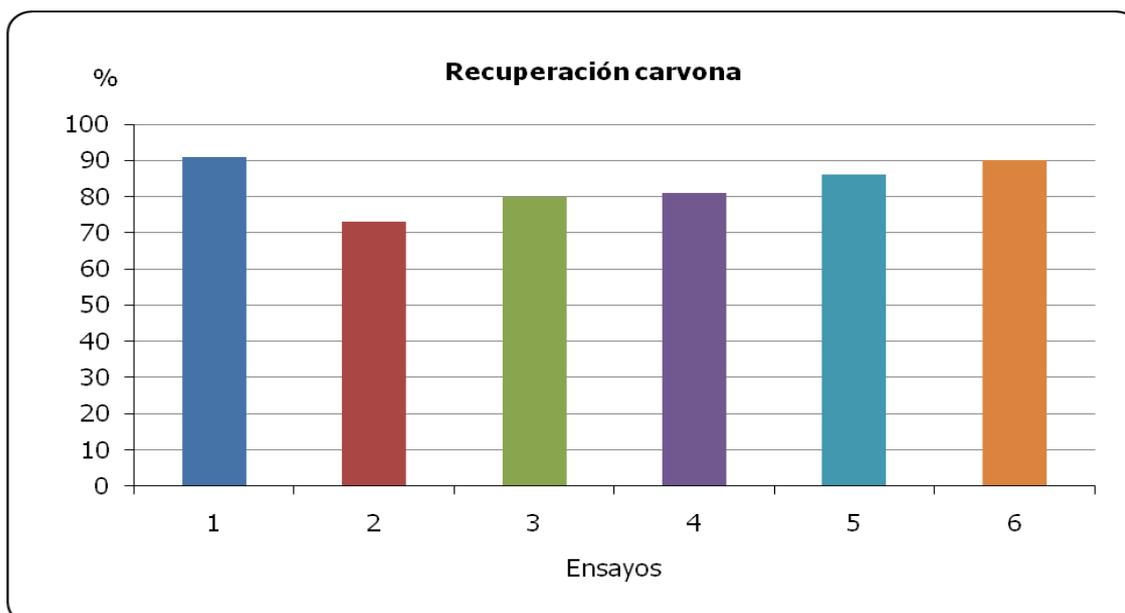


Figura 28. Porcentajes de recuperación de carvona desde el medio de cultivo. Los ensayos son los mismos que los referidos en la Figura 24.

Como se mencionó (Sección 1.5.2), dadas las características del sustrato utilizado y de los productos esperados, existen por lo menos dos métodos para su recuperación: la extracción líquido-líquido directa con solventes orgánicos (la de mayor aplicación en la bibliografía consultada) y la destilación por arrastre con vapor de agua. De esta forma se ensayaron tres solventes orgánicos de polaridades diferentes, usados

en trabajos de biotransformación de limoneno con hongos en cultivos en crecimiento: hexano (Mukherjee et al., 1973), acetato de etilo (Pinheiro & Marsaioli, 2007; Abraham et al., 1986) y diclorometano (Divyashree et al., 2006; De Oliveira & Strapasson, 2000; Adams et al., 2003) (ensayos 3, 4 y 5 respectivamente). La destilación por arrastre con vapor de agua es el método de elección para la extracción de la mayoría de los aceites esenciales desde la planta (Evans, 1989). La ventaja sobre los métodos de extracción con solventes orgánicos es la ausencia de compuestos no volátiles en el extracto, lo que evita la necesidad de un *cleanup* posterior que podría llevar a pérdidas de producto (Schaneberg & Khan, 2002). Este mismo planteo se puede extrapolar para la extracción de los monoterpenos desde un medio acuoso como lo es el medio de fermentación, y por ello se ensayó dicha forma de extracción (ensayo 2).

De estas cuatro formas de recuperación (ensayos 2 a 5), la extracción con diclorometano resultó ser la más eficaz en todos los casos. Para la recuperación de limoneno, la destilación por arrastre con vapor (con posterior extracción con diclorometano), mostró valores similares a la extracción directa con diclorometano (62 y 63 % respectivamente). Para los tres alcoholes, el acetato de etilo arrojó porcentajes de recuperación similares a los del solvente clorado, entre 89 y 92 %. Para la carvona ningún método igualó a la extracción directa con diclorometano (86 %), siendo el acetato de etilo el segundo en eficacia para extraer dicha cetona (81 %). Las diferencias en los porcentajes de recuperación entre el limoneno y los terpenos oxigenados podrían explicarse por las diferencias en la lipofilia y volatilidad de estos compuestos, como se verá a continuación. En cuanto a la eficacia de cada método para recuperar la totalidad de los terpenos, en la Tabla 22 se muestra el índice de recuperación promedio de los 5 terpenos para cada método.

<b>Método de extracción</b>	<b>IR</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84
Arrastre c/vapor de agua	80
AcOEt	77
Hexano	74

*Tabla 22. Índice de recuperación promedio para cada uno de los métodos. IR =  $\Sigma$  (porcentajes de recuperación para cada terpeno)/5.*

De acuerdo con Crueger, en el procesamiento posterior a las reacciones de biotransformación con hongos filamentosos el micelio es usualmente removido por filtración, y debe ser lavado reiteradas veces con agua o solventes orgánicos debido a que una cantidad significativa de producto de reacción puede quedar adsorbido en las células (Crueger & Crueger, 1990). Los compuestos lipofílicos como los terpenoides, tienden a quedar retenidos en un sistema lipofílico como las membranas de las células fúngicas (Onken & Berger, 1999b). Para evaluar este efecto en el problema en estudio, se realizó un ensayo de extracción con diclorometano al mismo tiempo que los anteriores (2 h), pero desde un medio sin hongo (ensayo 6). La comparación de los ensayos 5 y 6 permitieron observar la influencia de este fenómeno en el sistema en estudio. En todos los casos se observó una disminución en la recuperación al estar presente la biomasa fúngica, excepto para el *trans*-carveol donde el porcentaje fue el mismo. El  $\alpha$ -limoneno se recuperó en un 86 % cuando se extrajo de un medio sin micelio, y ese porcentaje cayó a 63 % cuando el hongo estaba presente. Esta gran diferencia no se observó con los terpenos oxigenados, lo que está acorde con una mayor lipofilia del hidrocarburo (Fichan et al., 1999) y por ende mayor acumulación del mismo en la biomasa. Este resultado también va en línea con lo reportado por Onken y Berger, quienes biotransformando limoneno con el basidiomiceto *Pleurotus sapidus* determinaron que a los 2 días de iniciada la biotransformación, el 97 % del sustrato se había acumulado en el micelio, y sólo el 3 % restante estaba presente en el medio de cultivo (Onken & Berger, 1999a). Por ello, la eficiencia del solvente al extraer dependerá, no sólo de una buena constante de reparto del compuesto a extraer favorable al solvente, sino también de que tanto el mismo pueda penetrar y destruir el micelio de manera de liberar los diferentes productos allí retenidos.

Los compuestos con aroma en general están presentes en bajas concentraciones en los sistemas fermentativos (entre otras cosas debido a su volatilidad), por lo que resulta primordial un proceso de recuperación eficiente (Maróstica y Pastore, 2007). Para evaluar una posible pérdida por volatilización, se realizó un ensayo de extracción con diclorometano inmediatamente después de agregado el terpeno al medio sin hongo (ensayo 1). La comparación con la extracción realizada a las 2 horas desde un medio sin hongo (ensayo 6) permitió determinar la influencia de la volatilidad como una causa de pérdida en la recuperación de los productos de biotransformación. De esta forma se observó que la disminución de la recuperación es mínima (1 a 2 %) cuando se trata de monoterpenos oxigenados, pero esta cae significativamente (de 100 a 86 %) para el

caso del limoneno. Los resultados obtenidos para este hidrocarburo están en consonancia con lo informado por varios autores. Divyashree y colaboradores (Divyashree et al., 2006), estudiando la biotransformación de limoneno (y otros monoterpenos) con una cepa de *A. niger*, encontraron que alrededor del 10% del sustrato se perdió durante las primeras 6 horas de incubación probablemente debido a la evaporación. Demyttenaere y su equipo, trabajando con una cepa de *Corynespora cassiicola*, realizaron un control del limoneno recuperado, encontrando que la concentración del mismo cayó a la mitad de la inicial en menos de una hora, y todo el limoneno se evaporó en 6 horas (Demyttenaere et al., 2001). Por su parte, Adams y colaboradores reportaron que la recuperación de limoneno agregado en concentración de 0,1% a matraces conteniendo solamente agua destilada y tapados con tapones de vidrio y celulosa, fue de 78% para el primer caso y 61% para el segundo, luego de 8 hs de agitación a 150 rpm y 26 °C (Adams et al., 2003). Los autores hacen notar que en los matraces cerrados con tapón de vidrio la pérdida de limoneno por evaporación solo puede ocurrir cuando los frascos se abrieron para el muestreo. La diferencia entre las cantidades recuperadas de limoneno y sus derivados oxidados, se puede explicar por la mayor presión de vapor de los monoterpenos hidrocarbonados respecto a la de los oxigenados (Fichan et al., 1999).

A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos, se sistematizó el método de extracción del limoneno y sus productos de biotransformación desde el medio de cultivo, lo que se puede resumir en las siguientes etapas:

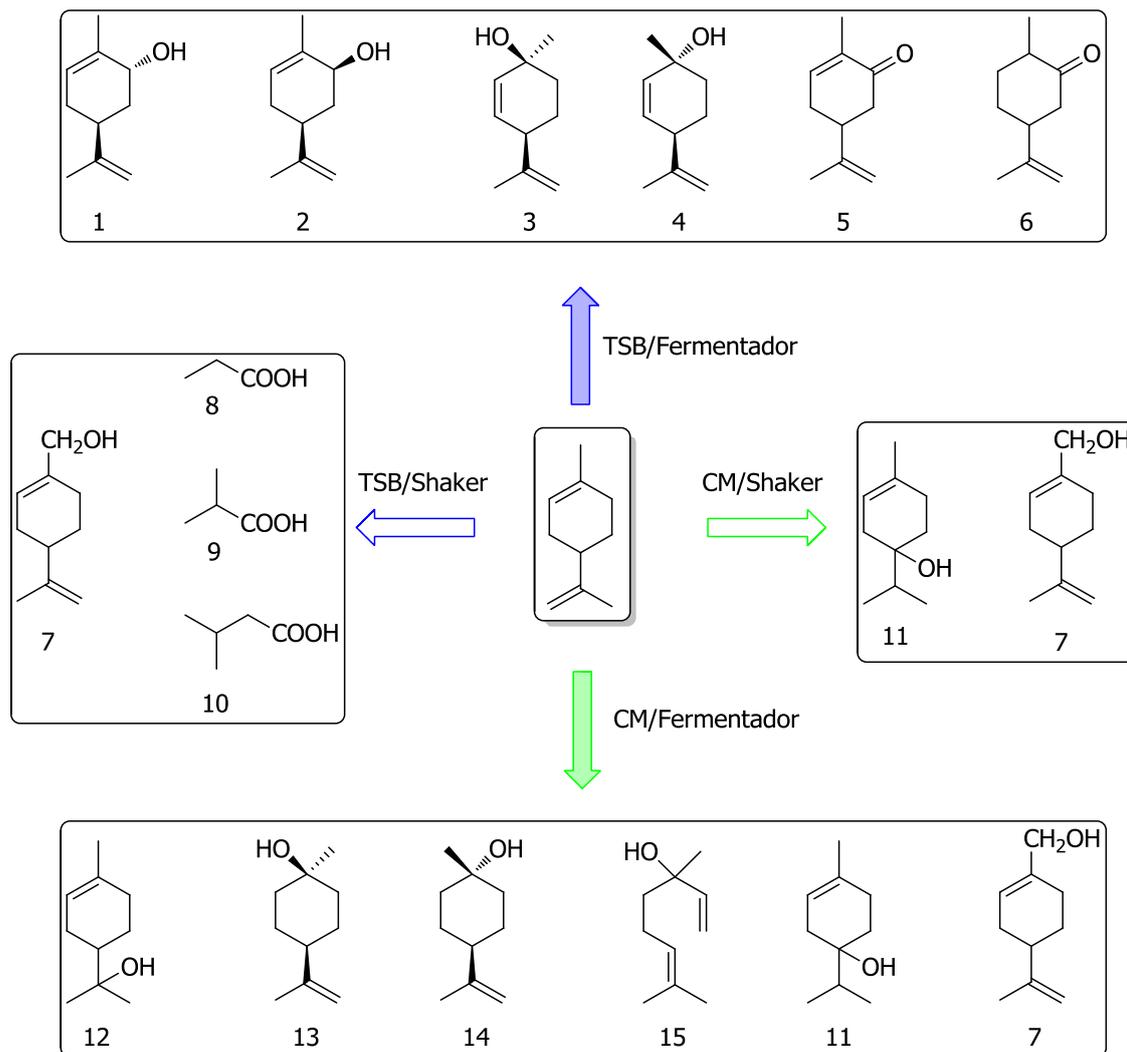
- a) filtro mediante papel para separar la biomasa del medio de cultivo,
- b) tres extracciones sucesivas con diclorometano del filtrado,
- c) lavado de la biomasa retenida con el mismo solvente,
- d) unificación de las fases orgánicas, secado con sulfato de sodio anhidro, filtrado.

Esta metodología se hizo extensiva a las biotransformaciones de cineol.

### **3.2 Biotransformación de limoneno**

Se lograron identificar un total 15 productos de biotransformación del limoneno en las distintas condiciones ensayadas. Entre estos se destacan los productos de monohidroxilación (alcoholes primarios, secundarios y terciarios), que en total resultaron cerca del 80 % de los productos obtenidos. Las estructuras de los productos

de biotransformación identificados en cada uno de los cuatro ensayos realizados (ver Sección 2.4.2) se muestran en el Esquema 21. Mientras que los porcentajes de limoneno y los diferentes productos obtenidos al final de la bioconversión se presentan en la Tabla 23. Dichos porcentajes surgen de aplicar el método de normalización de áreas a los cromatogramas obtenidos por GC.



*Esquema 21. Productos de biotransformación del d-limoneno en las diferentes condiciones ensayadas: medios de cultivo (CM y TSB); sistemas de fermentación (fermentador y matraces dispuestos en agitador (shaker)). 1) trans-carveol, 2) cis-carveol, 3) cis-p-menta-2,8-dien-1-ol, 4) trans-p-menta-2,8-dien-1-ol, 5) carvona, 6) dihidrocarvona, 7) alcohol perílico, 8) ácido propanoico, 9) ácido isobutanoico, 10) ácido isopentanoico, 11) 4-terpineol, 12)  $\alpha$ -terpineol, 13) cis- $\beta$ -terpineol, 14) trans- $\beta$ -terpineol, 15) linalool.*

Producto	TSB/Fer	TSB/Sh	CM/Fer	CM/Sh
Limoneno	66,1	50,1	91,8	78,0
<i>trans</i> -carveol	10,7	-	-	-
<i>cis</i> -carveol	9,4	-	-	-
<i>cis</i> -p-menta-2,8-dien-1-ol	2,7	-	-	-
<i>trans</i> -p-menta-2,8-dien-1-ol	2,7	-	-	-
Carvona	0,8	-	-	-
dihidrocarvona	0,9	-	-	-
alcohol perílico	-	14,3	0,4	8,7
ácido propanoico	-	5,1	-	-
ácido isobutanoico	-	16,3	-	-
ácido isopentanoico	-	13,3	-	-
4-terpineol	-	-	0,4	9,5
$\alpha$ -terpineol	-	-	4,8	-
<i>cis</i> - $\beta$ -terpineol	-	-	1,1	-
<i>trans</i> - $\beta$ -terpineol	-	-	0,4	-
Linalool	-	-	0,6	-
no identificado	6,5	0,9	0,3	3,8

*Tabla 23. Rendimientos globales de las bioconversiones en las diferentes condiciones ensayadas, expresados como porcentajes de limoneno y sus productos de bioconversión determinados por cromatografía gaseosa.*

Los resultados obtenidos no escapan al común de la mayoría de los reportes bibliográficos, donde los bajos porcentajes en la biotransformación de limoneno son habituales. Toniazzo y colaboradores señalan que la principal dificultad relacionada con el uso de transformaciones microbianas para la obtención de derivados oxigenados de hidrocarburos monoterpenos, está asociada con el bajo rendimiento obtenido en las reacciones (Toniazzo et al., 2005). Esta es una de las razones por las cuales las aplicaciones de transformaciones de monoterpenos con microorganismos enteros en general sean meramente académicas, siendo inviables de aplicarse industrialmente (Maróstica & Pastore, 2007).

En la literatura consultada se destacan dos aspectos principales que contribuirían a los bajos rendimientos de este tipo de biotransformaciones: la potencial toxicidad del monoterpeno y la baja solubilidad en agua del mismo.

Varios estudios revelan un efecto inhibitor del limoneno en diversos microorganismos. Compuestos como el limoneno aumentan la fluidez de las membranas de hongos filamentosos, lo que lleva a una permeabilidad no específica, pérdida de integridad celular, e inactivación de energía metabólica debido a la disipación de la fuerza protón motriz (Maróstica & Pastore, 2007). Según Pescheck y colaboradores, un estudio de la tolerancia de varios hongos filamentosos al limoneno arrojó que para más del 90 % de los mismos una concentración de 15 mM (0,24%) era letal (Pescheck et al., 2009). Sin embargo, varios son los trabajos donde se utilizaron hongos para biotransformar el limoneno usando este sustrato en concentraciones superiores. Por ejemplo, Tan y Day (Tan & Day, 1998b) llegaron a utilizar concentraciones de hasta 8% con una cepa de *Penicillium digitatum*, obteniendo con un 4% el mejor rendimiento para la bioconversión del limoneno en  $\alpha$ -terpineol. En ese caso se utilizaron las células del hongo inmobilizadas en alginato de calcio, lo que según los autores permite mayor tolerancia al sustrato. La toxicidad no sería un inconveniente mayor en el presente trabajo, pues la concentración de sustrato utilizada (0,5%) demostró ser no tóxica para este microorganismo en el trabajo previo llevado a cabo por la Dra. Menéndez (Menéndez, 1995). No obstante, los resultados obtenidos podrían mejorarse mediante el agregado secuencial del monoterpeno al medio. Para el caso de otro hidrocarburo monoterpénico como el  $\beta$ -pineno, se han informado resultados relativamente mejores mediante el agregado secuencial de pequeñas cantidades de sustrato en vez de un único agregado (Toniazzi et al., 2005). Sin embargo los porcentajes de bioconversión no superaron el 4% en ningún caso. Tan y colaboradores encontraron que la actividad de una cepa de *Penicillium digitatum* aumenta 4 veces luego de una inducción por el sustrato (Tan et al., 1998a; Tan et al., 1998). Adams y colaboradores también investigaron la influencia del agregado secuencial de limoneno para la biotransformación del mismo por una cepa de *P. digitatum*, encontrando que el agregado secuencial del sustrato mejora relativamente el resultado de la bioconversión (Adams et al., 2003). Estos mejores rendimientos, aunque mínimos, se explicarían por ser inducibles las monooxigenasas responsables de la bioconversión.

La baja solubilidad del limoneno en agua hace que en la casi totalidad de los experimentos de biotransformación donde no se utilicen tensoactivos, se tenga un sistema bifásico, donde sólo una pequeña cantidad del sustrato se disuelve y el resto permanece en una fase separada, más o menos dispersa según la agitación. Esto pudo haber contribuido a los bajos porcentajes de bioconversión, dado que el mismo se adicionó directamente al medio de cultivo, sin tomar ninguna medida previa que mejorara su dispersión en el medio acuoso y por lo tanto facilitara la accesibilidad del mismo al biocatalizador. Existen varias formas de lograr una dispersión homogénea del sustrato hidrofóbico en el medio (Roberts et al., 1995), entre las cuales se consideran adecuadas de ser aplicadas en este caso: a) agregar el  $\alpha$ -limoneno disuelto en el mínimo volumen posible de un solvente orgánico miscible con el agua (por ejemplo etanol), b) utilizar surfactantes, c) combinar ambos métodos. Sin embargo esto no siempre garantiza una mejora en los rendimientos de la biorconversión. Tan y Day estudiaron el efecto de varios tensoactivos y cosolventes orgánicos en la biotransformación de limoneno en  $\alpha$ -terpineol por *P. digitatum* (Tan & Day, 1998a). La biotransformación mediada por células libres no mejoró con el agregado de surfactantes habituales como Tween 80 o Triton 100-X, ni con una veintena de cosolventes ensayados, pero sí con algunos cosolventes particulares como ftalato de dioctilo y decanoato de etilo al 1,5 %. Adams y colaboradores no encontraron diferencias significativas en el rendimiento de la bioconversión de limoneno con *Penicillium digitatum*, al utilizar tres cosolventes distintos (etanol, metanol y acetona) en tres concentraciones diferentes (Adams et al., 2003). En el mismo trabajo, y probando el decanoato de etilo como cosolvente, encontraron que si bien se aumentó la concentración de limoneno disuelto en el medio, el rendimiento de la bioconversión empeoró. Los autores atribuyen estos resultados a los efectos tóxicos del cosolvente en la concentración usada.

Otro aspecto que puede contribuir a los magros resultados de bioconversión es la posible sobremetabolización de los productos. Una de las mayores causas de bajos rendimientos en hidroxilaciones fúngicas es la degradación de los productos por el hongo (Lehman & Stewart, 2001). Esta puede venir por detoxificación del producto de biotransformación realizada por conjugación del producto hidroxilado con otra molécula (glicósidos, sulfatos, glucurónidos, etc), conjugados que se perderían durante el *work-up*. También puede darse por una nueva oxidación del producto hidroxilado, resultando en el carbonilo o carboxilo (por ejemplo, en el ensayo 1 se obtuvieron tanto los

carveoles como la carvona). No se puede descartar la inclusión del producto en alguna ruta catabólica, llevando así a la degradación del mismo por parte del microorganismo. Esto último parecería ocurrir en el ensayo 2, donde se obtuvieron una serie de ácidos orgánicos de cadena corta, hecho que se discute más adelante (Sección 3.2.2).

Más allá de los bajos porcentajes de bioconversión, la misma se dio en todos los casos. Este resultado no deja de ser interesante ya que, como se mencionó en la introducción (Sección 1.3.5), la gran mayoría de los antecedentes de bioconversión de *α*-limoneno mediante *Aspergillus niger* dan cuenta de transformaciones nulas o muy escasas (Demyttenaere et al., 2001; Chatterjee & Bhattacharyya, 2001; Toniazzo et al., 2005; Divyashree et al., 2006; Rozenbaum et al., 2006; Rottava et al., 2010). En dichos trabajos, si bien se ensayaron distintos medios de cultivo, concentraciones de sustrato y formas de utilización del hongo (células en crecimiento, en reposo, inmovilizadas), en prácticamente todos los casos se utilizaron cepas de colección de cultivos. El único trabajo en donde se informa el uso de una cepa salvaje es el realizado por Divyashree y colaboradores, donde el hongo fue aislado de una muestra de suelo. En este caso los autores dan cuenta que no hubo reacción de bioconversión al utilizar *α*-limoneno como sustrato, pero sí obtuvieron carveol y dihidrocarveol como principales productos de biotransformación del *α*-limoneno. Es quizás la condición de inadaptabilidad de las cepas de colección al sustrato lo que pueda en parte explicar la ausencia de bioconversión reportada. Esto no ocurrió en el presente trabajo, ya que la cepa utilizada fue aislada de un medio natural rico en el sustrato.

En cuanto a los experimentos de control realizados, en ninguno de los casos se observó pico alguno en los cromatogramas correspondientes a los ensayos "blanco limoneno", excepto el debido al propio sustrato. Esto da la pauta que los productos obtenidos son auténticos productos de conversión biológica y no productos de la autooxidación del monoterpeno. Esto no deja de ser importante, ya que es bien conocida la oxidación de olefinas en ausencia del agente biotransformador (autooxidación), pudiendo ocurrir epoxidaciones u oxidaciones alílicas mediante la formación de intermediarios radicales libres (Rothenberg et al., 1998). En el caso particular del limoneno, han sido reportados como productos de autooxidación limoneno-1,2-epóxido, carveoles y carvona (Anandaraman & Reineccius, 1986, Pisarenko et al., 2008). Respecto a los ensayos de control "blanco hongo", los cromatogramas correspondientes no mostraron picos a los tiempos de retención de los productos de

biotransformación, excepto en las condiciones del ensayo 2 (medio TSB y matraces en agitador) donde se observó un pico. El mismo pico se observó en el experimento de biotransformación, al agregar limoneno al medio con el microorganismo (Figura 16). El espectro de masa y la comparación con biblioteca de espectros arrojó que se trataba de 2,5-dimetilpirazina. La estructura de dicho compuesto, así como su presencia en el experimento de control donde estaba ausente el sustrato, permiten descartar al mismo como un producto de biotransformación del limoneno, siendo probablemente un producto del metabolismo del hongo crecido en las condiciones del ensayo.

### 3.2.1 Influencia del medio de cultivo y la geometría del sistema

Como se mencionó, en todos los ensayos realizados se obtuvo más de un producto de biotransformación, y estos ocurrieron con variaciones tanto en el tipo de compuestos obtenidos como en la cantidad relativa de los mismos. En la Tabla 24 se muestra la distribución porcentual de los productos de bioconversión obtenidos en las diferentes condiciones. No es de extrañar la ocurrencia de varios derivados oxidados del limoneno ya que son poco frecuentes los casos en que se reportan biotransformaciones con microorganismos salvajes con los que se obtenga un único producto en porcentajes elevados (Menendez et al., 2005). La acumulación de múltiples compuestos, como por ejemplo isómeros de hidroxilimoneno, podría deberse a la presencia de varias oxigenasas con diferentes regioespecificidades o a una enzima simple que presenta una regioespecificidad incompleta (Duetz et al., 2003). Al respecto Cheong y Oriel, trabajando con bacterias, expresaron en *Escherichia coli* un fragmento cromosomal de 3,6-kb de una cepa salvaje de *Bacillus stearothermophilus* que mostró biotransformar al limoneno en alcohol perílico,  $\alpha$ -terpineol y perililaldehído (Cheong & Oriel, 2000). Dicho fragmento se encontró que codificaba una limoneno hidroxilasa que hidroxilaba tanto en C6 como en C7, dando una mezcla de alcohol perílico, carveol, perililaldehído y carvona (estas dos últimos formados a partir de los respectivos alcoholes por medio de una deshidrogenasa no específica de la cepa huésped). Esto sugiere fuertemente que la ocurrencia de múltiples productos es debido a una regioespecificidad enzimática incompleta, más que a una expresión simultánea de varias enzimas con diferentes regioespecificidades. Sin embargo no se produjo el  $\alpha$ -terpineol que se acumulaba en la bioconversión con la cepa original, por lo que aparentemente la formación de este compuesto sea debido a otra enzima codificada por un fragmento diferente al expresado.

Producto	TSB/Fer	TSB/Sh	CM/Fer	CM/Sh
alcohol perílico	-	28,7	4,9	39,5
<i>trans</i> -carveol	31,8	-	-	-
<i>cis</i> -carveol	27,9	-	-	-
4-terpineol	-	-	4,9	43,2
$\alpha$ -terpineol	-	-	58,5	-
<i>cis</i> - $\beta$ -terpineol	-	-	13,4	-
<i>trans</i> - $\beta$ -terpineol	-	-	4,9	-
<i>cis</i> -p-menta-2,8-dien-1-ol	8,0	-	-	-
<i>trans</i> -p-menta-2,8-dien-1-ol	8,0	-	-	-
Linalool	-	-	7,3	-
Carvona	2,4	-	-	-
dihidrocarvona	2,7	-	-	-
ácido propanoico	-	10,2	-	-
ácido isobutanoico	-	32,7	-	-
ácido isopentanoico	-	26,7	-	-

Tabla 24. Distribución porcentual de los productos de biotransformación del limoneno en las diferentes condiciones ensayadas. Las secciones de diferente color separan a los compuestos en: alcoholes primarios, secundarios y terciarios, cetonas y ácidos.

Existe una marcada influencia de las condiciones estudiadas (medio nutriente y geometría del sistema) en los resultados de la biotransformación, tanto cuantitativos como cualitativos. Esto es algo poco reportado, ya que generalmente los trabajos publicados donde se evalúa la influencia de distintos parámetros en la biotransformación hacen referencia a variaciones en el rendimiento de los productos obtenidos (la mayoría de las veces como porcentajes de bioconversión), no así a diferentes estructuras, como es el caso de los resultados obtenidos.

Al comparar los dos sistemas donde se llevaron a cabo las biotransformaciones (matraces dispuestos en agitador orbital y fermentador), se encontró que la reacción realizada en matraces produjo menos productos que cuando se usó el fermentador. 4-terpineol (en CM) y alcohol perílico (en ambos medios) fueron los únicos terpenos encontrados en el sistema de matraces en agitador. También se obtuvieron ácidos

orgánicos de cadena corta al trabajar con matraces y TSB, hecho que se discute en la siguiente sección. Mientras que al menos media docena de compuestos fueron identificados en cada medio al trabajar con fermentador. Con este último sistema, se observó que predominaron los alcoholes terciarios cuando el medio nutriente fue CM (más del 80% de los productos fueron terpineoles), y los secundarios cuando el medio fue TSB (60% de los productos fueron carveoles) (Tabla 24). Los reportes respecto a la comparación de diferentes geometrías de sistemas en la bioconversión fúngica del limoneno, va en línea a lo mencionado en el párrafo anterior. Pescheck y colaboradores informaron la bioconversión regioselectiva de limoneno en  $\alpha$ -terpineol con una cepa de *P. digitatum* en un medio YMPG (Pescheck et al., 2009). Al utilizar un biorreactor con un sistema cerrado de gases y alimentación continua del sustrato obtuvieron un rendimiento casi 10 veces superior respecto al sistema de matraces colocados en agitador, manteniéndose la regioselectividad. Del mismo modo, el grupo del profesor Tan buscando optimizar la transformación de limoneno en  $\alpha$ -terpineol mediante células inmovilizadas de *P. digitatum*, reportó un aumento en el porcentaje de bioconversión al utilizar un fermentador en vez de matraces agitados, no así diferentes productos (Tan & Day, 1998a).

Tomando en cuenta sólo los medios de cultivo, se puede observar una clara predominancia de las hidroxilaciones alílicas a metilos (alcohol perílico) y metilenos (carveoles) cuando el medio fue TSB. Mientras que la formación de terpineoles fue claramente favorecida al utilizar CM como medio nutriente. Con este medio se obtuvo además alcohol perílico en una proporción interesante al llevar a cabo la biotransformación en matraces en agitador. Como se mencionó, los reportes de biotransformación de limoneno en distintos medios de cultivo destacan variaciones en los rendimientos, no así en los productos. Recientemente dos grupos de investigación evaluaron el efecto la composición del medio en la producción de  $\alpha$ -terpineol mediante la biotransformación de limoneno por los hongos *Fusarium oxysporum* (Bicas et al., 2008b) y *Penicillium digitatum* (Badee et al., 2011). En ambos casos los autores informan variaciones en la concentración del alcohol, único producto reportado bajo cualquiera de las condiciones ensayadas. Del mismo modo Adams y colaboradores estudiaron la influencia de algunos parámetros de cultivo en la biotransformación de limoneno mediante diferentes cepas *Penicillium digitatum*. Las diferentes condiciones investigadas fueron el medio de cultivo, el agregado de distintos cosolventes, y el agregado secuencial del sustrato. En todos los casos el producto principal fue  $\alpha$ -

terpineol, y si bien existieron diferencias en los rendimientos entre los ensayos llevados a cabo con diferentes medios de cultivo, estas resultaron poco significativas para una misma cepa (Adams et al., 2003). Por otro lado Demyttenaere y colaboradores investigaron la influencia de las condiciones de cultivo (medio nutriente, pH y cosolvente) en la biotransformación del terpeno acíclico linalool por *A. niger*. Nuevamente se reportan diferentes rendimientos, y no variaciones en el tipo de productos (Demyttenaere et al., 2001).

A la hora de explicar esta variabilidad, se sabe que está bien establecida la influencia de parámetros ambientales y nutricionales en una biotransformación a célula entera. Estos pueden afectar desde el número de células viables por unidad de volumen, hasta la cantidad y actividad de la enzima relevante para una biotransformación (Roberts et al., 1995). Las variaciones cuantitativas obtenidas y reportadas se explican fácilmente de esta manera. Las variaciones cualitativas en los productos obtenidos podrían deberse a un conjunto de causas. Por un lado se trata de un sustrato pequeño y con grupos con similares propiedades electrónicas, susceptible de sufrir biooxidaciones en diferentes puntos como ya se vio en la Introducción (Sección 1.3.5). Por otra parte, en los cultivos sumergidos existe una relación dinámica entre las condiciones ambientales y el patrón de crecimiento de un hongo filamentoso (Znidarsic & Pavko, 2001). Así, diferentes condiciones de cultivo resultan en hifas con distintas características fisicoquímicas y morfológicas. Cambios en la morfología probablemente afecten el transporte de nutrientes y metabolitos desde y hacia las hifas. Esto se traduce en una diferenciación celular en términos de especialización bioquímica y cambios estructurales, por lo que se puede esperar una fuerte relación entre los tipos morfológicos y la producción metabólica. Las especies de *Aspergillus* pueden responder a una variedad de cambios ambientales; y sistemas de transducción de señales median entre dichos cambios y los procesos de desarrollo de la célula, tales como los ciclos de reproducción y la diferenciación de la estructura, lo que produce metabolitos relacionados con estas condiciones fisiológicas (Calvo et al., 2002).

Entre los productos obtenidos es de destacar la presencia de 4-terpineol, compuesto muy escasamente reportado (ver Sección 1.3.5), y los productos de hidroxilaciones alílicas regioespecíficas. Este tipo de biohidroxilaciones son de ocurrencia común en las biotransformaciones fúngicas oxidativas (Lehman & Stewart, 2001). Varios hongos, y entre ellos el *A. niger*, han sido utilizados para llevar a cabo

hidroxilaciones alílicas regioselectivas (Madyastha & Krishna Murthy, 1988; Demyttenaere et al., 2004). El limoneno presenta dos metilos (C7 y C10) y dos metilenos (C3 y C6) alílicos equivalentes, por lo que la hidroxilación regioespecífica de uno de ellos en cada caso resulta de por sí interesante. El alcohol perílico se obtuvo en tres de los cuatro ensayos y en buenos porcentajes relativos, en las biotransformaciones realizadas en matraces dispuestos en agitador (Tabla 24). Con esta geometría y al utilizar TSB como medio de cultivo, fue el único monoterpene obtenido. Este resultado en particular junto con una aproximación orientativa al mecanismo enzimático implicado se discuten en la siguiente sección.

### 3.2.2 Aproximación al mecanismo enzimático

El resultado de la biotransformación en TSB y matraces en agitador resulta particular por dos motivos. Por un lado se obtuvo un único monoterpene derivado oxidado del limoneno, algo que ya se vio es poco frecuente al bioconvertir este terpeno con células enteras de cepas silvestres (Menéndez et al., 2005). Por otro lado se detectaron una serie de ácidos grasos de cadena corta.

La obtención de alcohol perílico a priori se puede suponer que deriva de la acción de una monooxigenasa del tipo citocromo P450. Según se mencionó en la introducción (1.3.5), las biotransformaciones de limoneno generalmente implican un primer paso de hidroxilación de un carbono saturado o de epoxidación de un doble enlace, y se ha postulado que dichas reacciones están catalizadas por citocromos P450 (Menéndez et al., 2005). Un screening de 1800 cepas bacterianas llevado a cabo por van Beilen y colaboradores buscando transformar limoneno en alcohol perílico, arrojó que 10 cepas eran capaces de dar el alcohol como único producto (van Beilen et al., 2005). Entre ellas seleccionaron a un *Mycobacterium* sp. del cual aislaron y purificaron una Cit P450 responsable de la hidroxilación, la cual luego expresaron en una *Pseudomonas putida*, logrando realizar la biotransformación con este organismo recombinante en una escala mayor.

Respecto a los ácidos grasos obtenidos, ya en 1966 el grupo de Bhattacharyya mencionaban que una de las desventajas en las transformaciones de monoterpenos con hongos, era la aparición de productos de origen no terpenoide a veces obtenidos como resultado de cambios metabólicos, producto de trabajar en medios ricos (Dhavalikar &

Battacharyya, 1966). Este parece ser el origen de la 2,5-dimetilpirazina mencionada más arriba, no así de los ácidos pues estos no se detectaron en el ensayo de control "blanco hongo". Por otro lado, el mismo grupo de investigadores fueron quienes propusieron la ruta catabólica del limoneno que comienza con la oxidación en C7, habiendo encontrado como productos de metabolización del terpeno ácidos como 3-isopropenilpimérico, intermediario aceptado en la ruta de catabolización del limoneno (Esquema 10, Sección 1.3.5). Más adelante reportaron fragmentos menores derivados de este ácido dicarboxílico como el ácido isobutírico y la metilisopropil cetona (Hungund et al., 1970). Por ello, si bien en los ensayos de biotransformación no se usó limoneno como única fuente de carbono y energía, al provenir el hongo de un ambiente natural muy rico en este hidrocarburo y al haber sido aislado con este sustrato como única fuente de carbono y energía, se podría suponer que los ácidos orgánicos obtenidos provienen del uso catabólico del monoterpeno por parte del microorganismo.

El uso de inhibidores específicos de la citocromo P450 es una técnica usual para investigar rutas biosintéticas (Menéndez et al., 2005). El ketoconazol es un reconocido inhibidor de la citocromo P450, utilizado como antifúngico pues inhibe una Cit P450 que interviene en un paso clave en la síntesis del ergosterol, el principal esteroide componente de la membrana plasmática de estos microorganismos (Correia & Ortiz de Montellano, 2005). Este compuesto y similares han sido utilizado en el estudio de rutas metabólicas, para determinar la implicancia o no de sistemas Cit P450 (Karp et al., 1990). El agregado de ketoconazol al medio de reacción dio como resultado la obtención de alcohol perílico como único producto de biotransformación, inhibiéndose la producción de los ácidos de cadena corta. El único producto de reacción se aisló y se caracterizó espectroscópicamente. Los desplazamientos para el experimento de  $^1\text{H-NMR}$  (espectro A1 en Anexo II) se muestran en la Tabla 25, junto con la comparación de datos obtenidos de literatura para el mismo compuesto (Chatterjee & Battacharyya, 2001; Oliveira & Strapasson, 2000). Del mismo modo, en la Tabla 26 se presentan los resultados del experimento  $^{13}\text{C-NMR}$  (Anexo II, A2). Además de las señales típicas del  $\text{CHCl}_3$ , se observan señales a 5,32 ppm en el espectro de protón y 53,7 ppm en el carbono que se corresponden con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , remanente de la extracción. La asignación completa de los desplazamientos de protón se realizó completando la información del experimento  $^1\text{H-NMR}$  con la obtenida del experimento bidimensional  $^1\text{H},^{13}\text{C-HSQC}$  (Anexo II, A3). De esta forma se pudieron obviar señales interferentes en el espectro

de protón (en su mayoría de baja intensidad), destacándose un pico a 1,56 ppm que podría corresponder a agua.

$\delta$ (ppm)	Asignación	(A)	(B)
1,46-1,55 (1H, m)	H-5a	-	-
1,77 (3H, s)	H-10	1,76 (3H, s)	1,75 (3-H, s)
1,86-1,92 (1H, m)	H-5b	2,06-2,26 (7H, m)	-
2,11-2,22 (5H, m)	H-3,H-4,H-6		-
4,03 (2H, s)	H-7	3,70 (2H, d, J=4,5Hz)	4,00 (2H, s)
4,74-4,76 (2H, d, J=5 Hz)	H-9	4,74 (2H, d, J=2,0Hz)	4,75 (2H, s)
5,73 (1H, s)	H-2	5,70 (1H, t)	5,70 (1H, s)

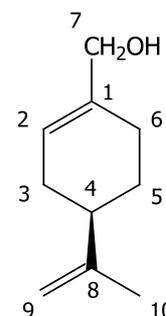


Tabla 25. Desplazamientos de  $^1\text{H}$  correspondientes al alcohol perílico y comparación con datos bibliográficos: (A) Chatterjee & Bhattacharyya (2001), (B) Oliveira & Strapasson (2000).

Carbono	$\delta$ (ppm) (A)	$\delta$ (ppm) (B)	$\delta$ (ppm) (C)
1	137,66	129,90	137,20
2	122,88	128,01	122,26
3	30,81	31,93	30,20
4	41,54	42,81	40,97
5	27,88	29,41	27,27
6	26,51	27,24	25,89
7	67,68	68,92	66,91
8	150,16	144,74	149,83
9	109,04	110,50	108,58
10	21,16	22,72	20,56

Tabla 26. Desplazamientos de  $^{13}\text{C}$  correspondientes al alcohol perílico. (A) Obtenidos en el presente trabajo, (B) extraídos de Chatterjee & Bhattacharyya (2001), (C) extraídos de Oliveira & Strapasson (2000).

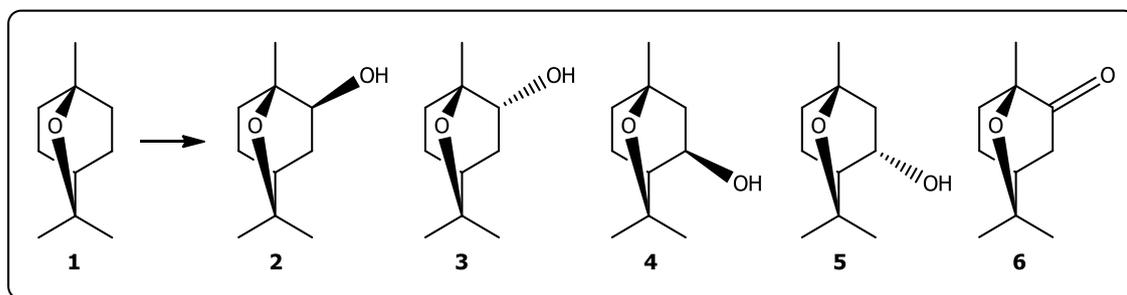
En la ruta de metabolización del limoneno hacia los ácidos grasos participan varias enzimas, entre ellas seguramente Cit P450 monooxigenasas no específicas que serían inhibidas por el ketoconazol, a diferencia de la enzima que iniciaría la ruta (dando lugar a la hidroxilación en C7). El hecho de que se siga obteniendo alcohol perílico a pesar del agregado del ketoconazol, no implica que la enzima involucrada en este proceso no sea una Cit P450. Se podría suponer la existencia de algún sistema de oxigenasas diferente al citocromo P450, como hidroxilasas no-hemo ó metano monooxigenasas halladas en procariotas (van Beilen & Funhoff, 2005). Sin embargo esto no parece ajustarse a las diferentes observaciones reportadas en literatura respecto a la oxidación de xenobióticos por hongos filamentosos. Una razón probable es la existencia de isoenzimas Cit P450 con diferente sensibilidad frente al inhibidor utilizado. Por ejemplo, el efecto inhibitor de ketoconazol se debe no sólo a la unión del nitrógeno al hierro del grupo hemo, sino también a la unión simultánea a regiones lipofílicas del sitio activo (Correia & Ortiz de Montellano, 2005). Variaciones en esta unión podrían dar lugar a diferentes grados de inhibición del imidazol. Por otra parte, la concentración del inhibidor también influye en su actividad. Como antifúngico, el ketoconazol afecta la permeabilidad de la membrana del hongo al inhibir la Cit P450 14-demetilasa fúngica a muy bajas concentraciones, pero la misma inhibición en mamíferos se da a concentraciones mil veces superiores (Correia & Ortiz de Montellano, 2005). Podría entonces no ser suficiente la concentración del imidazol para inhibir la enzima que oxida al limoneno a alcohol perílico, pero sí para inhibir alguna/s enzima/s participantes en su degradación catabólica.

Más allá de los mecanismos involucrados, este es un resultado muy interesante tanto por la regioespecificidad de la biotransformación (un único producto obtenido), como por el valor del producto obtenido. Dicho valor radica principalmente en su potencialidad como antitumoral (García et al., 2010).

### **3.3 Biotransformación de 1,8-cineol**

A diferencia de lo ocurrido en los experimentos con limoneno, se obtuvieron prácticamente los mismos productos de biotransformación en todas las condiciones ensayadas (Esquema 22). Sin embargo, como se verá a continuación, se observaron

importantes variaciones en la regio y estereoselectividad de la bioconversión al variar algunas condiciones.



Esquema 22. Productos identificados en la biotransformación de 1,8-cineol mediante *Aspergillus terreus*. 1) 1,8-cineol, 2) 2-endo-hidroxicineol, 3) 2-exo-hidroxicineol, 4) 3-endo-hidroxicineol, 5) 3-exo-hidroxicineol, 6) 2-oxocineol.

Los hidroxicineoles, principales productos obtenidos en la biotransformación microbiana del 1,8-cineol, son valiosos desde el punto de vista de su aroma. El 2-*exo*-hidroxicineol ha sido reportado como componente de algunas esencias (Choi, 2003; Someya et al., 2001; Bitteur et al., 1990) y de mieles (Vázquez et al., 2006; Shimoda et al., 1996). Además de dichas propiedades resultan interesantes productos a ser evaluados en cuanto a su actividad biológica. En tal sentido se han reportado evaluaciones de actividad antimicrobiana de los hidroxicineoles (Villicco et al., 2008), como de algunos derivados alquil ésteres (Miyazawa & Hashimoto, 2002) y bencil éteres (Silvestre et al., 1999). Pero no se encuentran reportes acerca de la actividad fitotóxica, la que se puede suponer de acuerdo a lo mencionado en la Sección 1.5.2. Este aspecto se evalúa y discute en la Sección 3.5.

### 3.3.1 Influencia de los parámetros de la biotransformación

#### *Geometría del sistema y tiempos de reacción*

Hasta donde se conoce no hay reportes en la literatura sobre la influencia de las condiciones de la biotransformación de 1,8-cineol por microorganismos, en los resultados de la misma. En la Tabla 27 se muestran los porcentajes de bioconversión obtenidos en los distintos sistemas a los diferentes tiempos de seguimiento. De la misma se desprende que para ambas geometrías y a todos los tiempos donde se evaluó la reacción, el 2-*exo*-hidroxicineol fue el producto mayoritario, seguido del 3-*exo*-hidroxicineol. Este resultado coincide con lo reportado por el grupo del Dr. Noma,

quienes informaron ambos alcoholes en proporciones similares a las de este trabajo como principales productos de la biotransformación de 1,8-cineol con una cepa de *A. niger* en un medio rico (Nishimura et al., 1982). En una relación minoritaria se obtuvieron los isómeros *endo*. Esta resulta la primera vez que se obtuvo el 2-*endo*-hidroxicineol como producto de bioconversión del 1,8-cineol por hongos (Nishimura et al., 1982; Rasmussen et al., 2005). En cantidades muy menores y solamente a partir del día 10 de la biotransformación, se pudo identificar el 2-oxocineol. Por lo tanto es muy probable que esta cetona provenga del sobremetabolismo de uno o los dos 2-hidroxicineoles, producto de la acción de una deshidrogenasa. Esto va en línea con el metabolismo del 1,8-cineol propuesto por Rasmussen y colaboradores (Rasmussen et al., 2005).

En cuanto a los experimentos de control realizados, en ninguno de los casos se observó pico alguno en los cromatogramas correspondientes a los ensayos "blanco cineol", excepto el debido al propio sustrato. Del mismo modo, el análisis de los ensayos "blanco hongo" no arrojó ningún producto coincidente con los productos de biotransformación.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Cineol</b>	<b>2-endo</b>	<b>2-exo</b>	<b>3-exo</b>	<b>3-endo</b>	<b>2-oxo</b>
<b>Shaker</b>						
<b>5</b>	94,7	0,4	2,6	1,9	0,4	-
<b>7</b>	86,6	1,0	6,8	4,7	0,9	-
<b>10</b>	74,5	2,6	11,9	8,5	1,9	0,5
<b>14</b>	55,4	4,8	20,7	15,0	2,8	1,1
<b>Fermentador</b>						
<b>5</b>	86,1	0,3	8,2	4,6	0,8	-
<b>7</b>	85,6	0,3	8,6	5,0	0,5	-
<b>10</b>	29,6	2,8	37,9	23,2	4,5	2,0
<b>14</b>	11,0	4,5	41,6	30,3	8,4	4,1

Tabla 27. Porcentajes de bioconversión y 1,8-cineol remanente, obtenidos a los distintos tiempos de reacción, en los dos sistemas ensayados: matraces dispuestos en agitador (*shaker*) y fermentador. Los porcentajes se obtuvieron al aplicar el método de normalización de áreas a los cromatogramas gaseosos correspondientes.

A diferencia de lo ocurrido con la biotransformación de limoneno, el perfil de los productos obtenidos fue similar en los dos sistemas utilizados (Figura 29). En ambos experimentos el biocatalizador no presentó regioselectividad, desde el momento que se obtuvieron los isómeros 2- y 3-hidroxi en cantidades significativas. Pero sí resultó estereoselectivo, ya que se obtuvieron los isómeros *exo* predominantes frente a los *endo* en una relación 85:15. La predominancia de la isomería *exo* puede explicarse por factores estéricos. Trabajando con la bacteria *Bacillus cereus* y en un medio con cineol como única fuente de carbono, Liu y Rosazza obtuvieron 2-*exo*-hidroxicineol como único producto de la biotransformación. Los autores proponen que el puente gem dimetiloxígeno del cineol es voluminoso y eso dificultaría que el sustrato fuera atacado por el lado *pro-endo* (Liu & Rossaza, 1990)

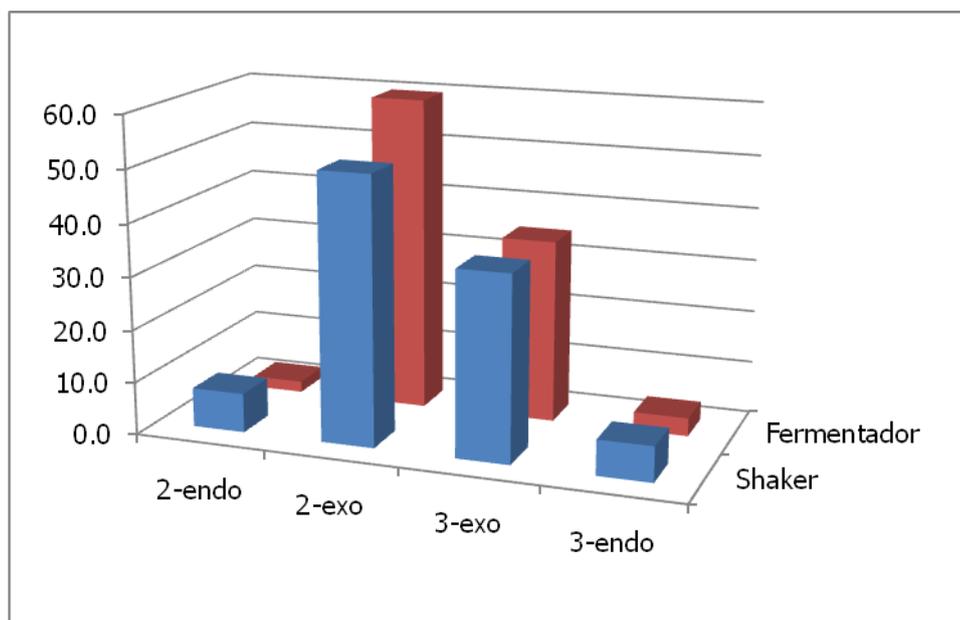


Figura 29. Perfil de los principales productos de biotransformación en ambas geometrías ensayadas. Los porcentajes de los productos de biotransformación corresponden al día 7.

En ambas geometrías se observa un aumento de los porcentajes de biotransformación con el tiempo (Figuras 30 y 31). Estos resultaron mayores al utilizar fermentador en vez de matraces dispuestos en agitador. Sin embargo esto no necesariamente indica un mayor rendimiento, ya que fenómenos como la volatilización pueden ocurrir con diferente intensidad en ambos sistemas. El rendimiento global de la biotransformación se discute en la siguiente Sección.

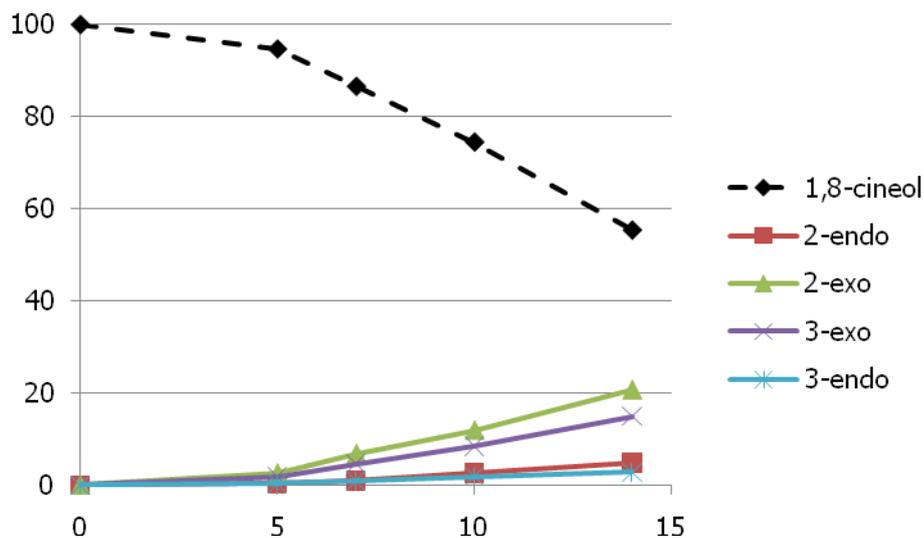


Figura 30. Evolución de la biotransformación de 1,8 cineol llevada a cabo en matraces dispuestos en agitador orbital (shaker).

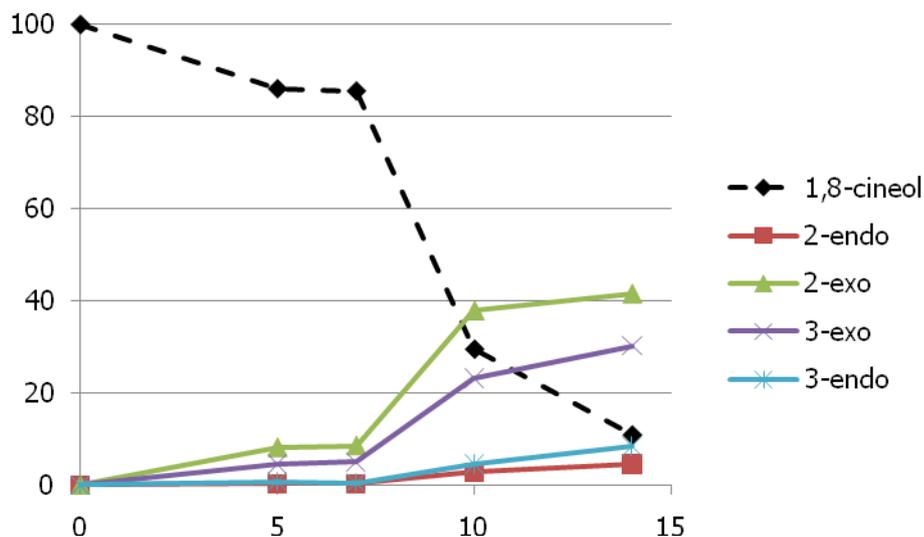
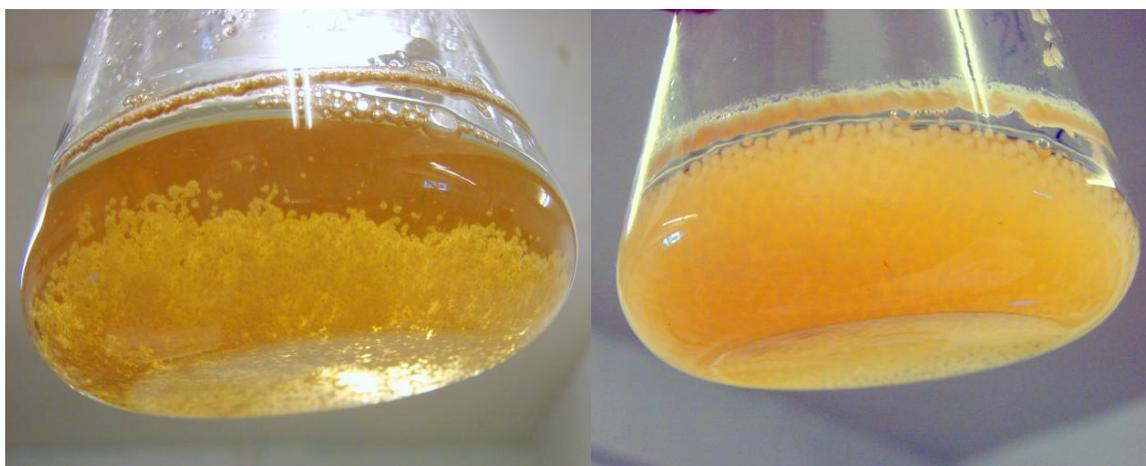


Figura 31. Evolución de la biotransformación de 1,8 cineol realizada en fermentador.

### Medios de cultivo

El desarrollo del hongo varió según el medio usado. De esta manera no se observó crecimiento macroscópico cuando se usó un medio mínimo mineral (MM) y cineol como única fuente de carbono. Al utilizar YNB y cineol como único compuesto

hidrocarbonado se observaron unos pocos pellets (menos de 15) muy pequeños. De todos modos en ninguno de los dos casos se obtuvieron productos de bioconversión a los tiempos evaluados (días 5 y 7). En el resto de los medios donde se adicionó otra fuente de carbono y energía además de cineol, el hongo se desarrolló en forma de pellets, siendo el principal efecto macroscópico observado la variación en el diámetro de los mismos (Figura 32). A las 48 h de sembradas las esporas, en TSB se obtuvieron pellets de aproximadamente 5 mm de diámetro en promedio, de apariencia apenas menor a los obtenidos en YMPG. Mientras que fueron menores en los medios mínimos con glucosa agregada y más chicos aun en CM. Como ya se discutió para la biotransformación de limoneno (Sección 3.2.1), en los cultivos sumergidos existe una relación dinámica entre las condiciones ambientales y el patrón de crecimiento de un hongo filamentoso (Znidarsic & Pavko, 2001). En este caso las diferentes condiciones de cultivo dieron lugar a cambios macroscópicos como el tamaño de los pellets. Esto puede ser importante a los efectos de la biotransformación ya que la actividad de los pellets se da en la superficie de los mismos y no en el centro (Schaffer et al., 2004).



*Figura 32. Desarrollo de los pellets de Aspergillus terreus a las 48 h de sembradas las esporas en el medio de cultivo: a la izquierda Caldo malta y a la derecha TSB.*

Con los diferentes desarrollos fúngicos se obtuvieron algunas variaciones en el perfil de los productos de bioconversión obtenidos. En la Tabla 28 se muestran los porcentajes de biotransformación en los distintos medios (excepto con YMPG cuyos resultados se presentaron en la Tabla 27), según el análisis por cromatografía gaseosa de los productos de las fermentaciones. En los medios ricos se obtuvieron mayores porcentajes de bioconversión respecto de los medios mínimos con glucosa agregada, en

cada uno de los tiempos de evaluación. Con el medio CM se obtuvieron los mejores porcentajes hasta el día 10, mientras que en el día 14 casi un 99% de las áreas de pico en GC correspondieron a productos de biotransformación en el medio TSB. Al variar el medio de cultivo, se observaron algunas variaciones en el perfil de los alcoholes obtenidos (Figura 33). El único reporte encontrado en la literatura de bioconversión de cineol en medios ricos es el del grupo del Dr. Noma (Nishimura et al., 1982) y los resultados reportados presentan un perfil similar a los obtenidos en este trabajo con YMPG. Este fue el único medio donde se obtuvieron cantidades significativas de los isómeros *endo* del hidroxicineol. En general la isomería *exo* fue altamente predominante en todos los medios y a todos los tiempos. En promedio la relación *exo:endo* fue de 9:1, lo que habla de una importante estereoselectividad del biocatalizador, más allá del medio nutriente utilizado. El 2-*exo*-hidroxicineol fue el producto mayoritario en todos los medios, destacándose en CM donde llegó a representar el 95% del total de los productos de biotransformación.

Para ensayos posteriores, como la determinación del rendimiento de la reacción, se eligió continuar trabajando con CM como medio de cultivo por dos razones. Por un lado fue el medio con el cual se obtuvieron mayores porcentajes de bioconversión. Por otra parte, el work-up de la reacción en este medio es menos engorroso que con los demás medios ricos, al formarse una emulsión menos estable durante la extracción.

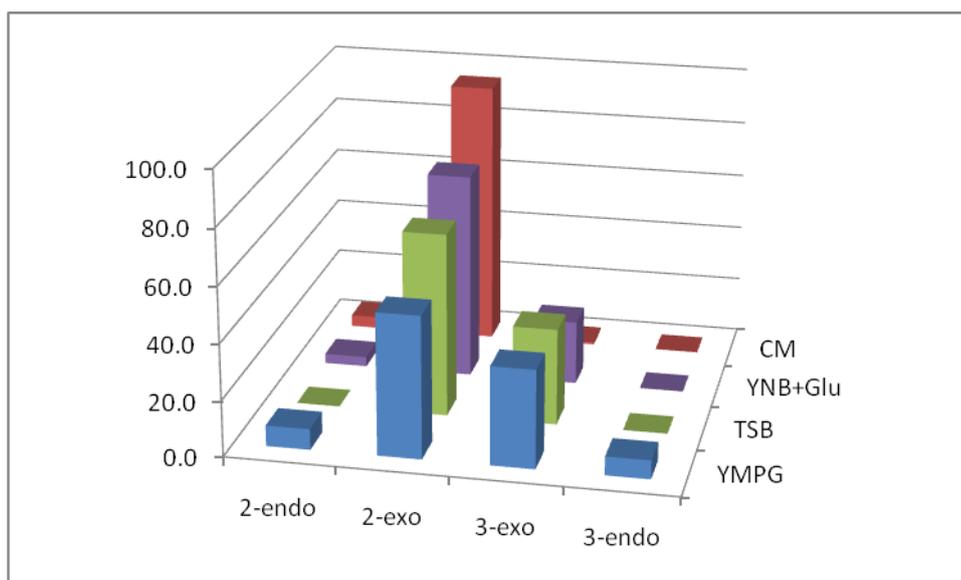


Figura 33. Perfil de los principales productos de biotransformación del 1,8-cineol en cuatro medios de cultivo. Los resultados corresponden al 7mo. día de iniciada la reacción.

Tiempo (días)	Cineol	2-endo	2-exo	3-exo	3-endo	2-oxo
<b>Caldo Malta</b>						
<b>5</b>	86,3	0,3	13,1	0,3	-	-
<b>7</b>	66,3	1,4	31,9	0,3	-	-
<b>10</b>	20,3	8,6	67,0	2,7	1,1	0,3
<b>14</b>	5,0	7,1	80,8	3,9	1,6	1,2
<b>TSB</b>						
<b>5</b>	88,2	-	8,3	3,5	-	-
<b>7</b>	82,3	-	11,6	6,1	-	-
<b>10</b>	37,7	0,3	40,5	21,3	0,1	-
<b>14</b>	1,1	0,6	69,3	28,9	-	-
<b>YNB+Glucosa</b>						
<b>5</b>	98,4	-	1,5	0,1	-	-
<b>7</b>	94,3	0,2	4,2	1,3	-	-
<b>10</b>	76,4	1,0	16,7	5,2	0,3	0,3
<b>14</b>	43,8	3,0	38,8	13,4	0,6	0,4
<b>MM+Glu</b>						
<b>5</b>	96,0	-	3,6	0,2	-	-
<b>7</b>	92,4	0,3	5,8	1,5	-	-

Tabla 28. Porcentajes de cineol remanente y de los productos de biotransformación a los distintos tiempos de evaluación en los diferentes medios de cultivo. Los porcentajes surgen de aplicar el método de normalización de áreas a los cromatogramas gaseosos correspondientes.

En principio se podría decir que las variaciones en los productos de la biotransformación de cineol al cambiar el medio de cultivo fueron relativamente menores. Pero un resultado interesante y novedoso es la distribución enantiomérica obtenida para estos productos, la cual varía según el medio nutriente. Si bien el 1,8-cineol es una molécula sin actividad óptica debido a su simetría, los carbonos 2 y 3 son proquirales y la introducción de un sustituyente como un hidroxilo, crea un nuevo centro quiral que hace al alcohol ópticamente activo. Por esto cada uno de los alcoholes planteados en el Esquema 22 pueden existir bajo dos formas enantioméricas (Figura 34). Buscando determinar dicha distribución enantiomérica, se inyectó la mezcla

de productos de biotransformación en un tándem GC-GC quiral. Se logró con éxito separar los enantiómeros de la mayoría de los alcoholes y de esta forma determinar el exceso enantiomérico de cada uno. Los resultados se muestran en la Tabla 29. En CM la biotransformación fue prácticamente enantioespecífica, obteniéndose uno de los enantiómeros del 2-*exo*-hidroxicineol en un exceso enantiomérico de 96%. Dicho compuesto se separó y aisló por cromatografía líquida, y la determinación de su poder rotatorio ( $\alpha_D^{22} = + 6,1^\circ$ ) indicó que se trataba del isómero dextrógiro: (+)-2-*exo*-hidroxicineol. En el resto de los medios no se observó tal comportamiento, obteniéndose un exceso enantiomérico de 42% para el (+)-2-*exo*-hidroxicineol en TSB, y de 14% para el (-)-2-*exo*-hidroxicineol en YMPG. Una posible explicación a este fenómeno es que el *A. terreus* utilizado posea diferentes isoenzimas Cit P450 capaces de llevar a cabo la hidroxilación en C2 con distinta enantioselectividad, y que la actividad de estas enzimas varíe según el medio utilizado. Asperger y colaboradores, trabajando con los hongos filamentosos *Mortierella alpina* y *Cunninghamella blakesleeana* en la hidroxilación de cicloalquilbenzoxazoles, informaron que los hongos contienen diferentes especies de P450 que hidroxilan en la misma posición pero produciendo estereoisómeros en distintos excesos enantioméricos (Asperger et al., 1999). El único reporte de biotransformación de 1,8-cineol con hongos donde se da cuenta del poder rotatorio de los productos es el realizado con *A. niger* en un medio rico (Nishimura et al., 1982), donde se obtuvieron racematos del 2-*exo*-, 3-*exo*-, y 3-*endo*-hidroxicineol.

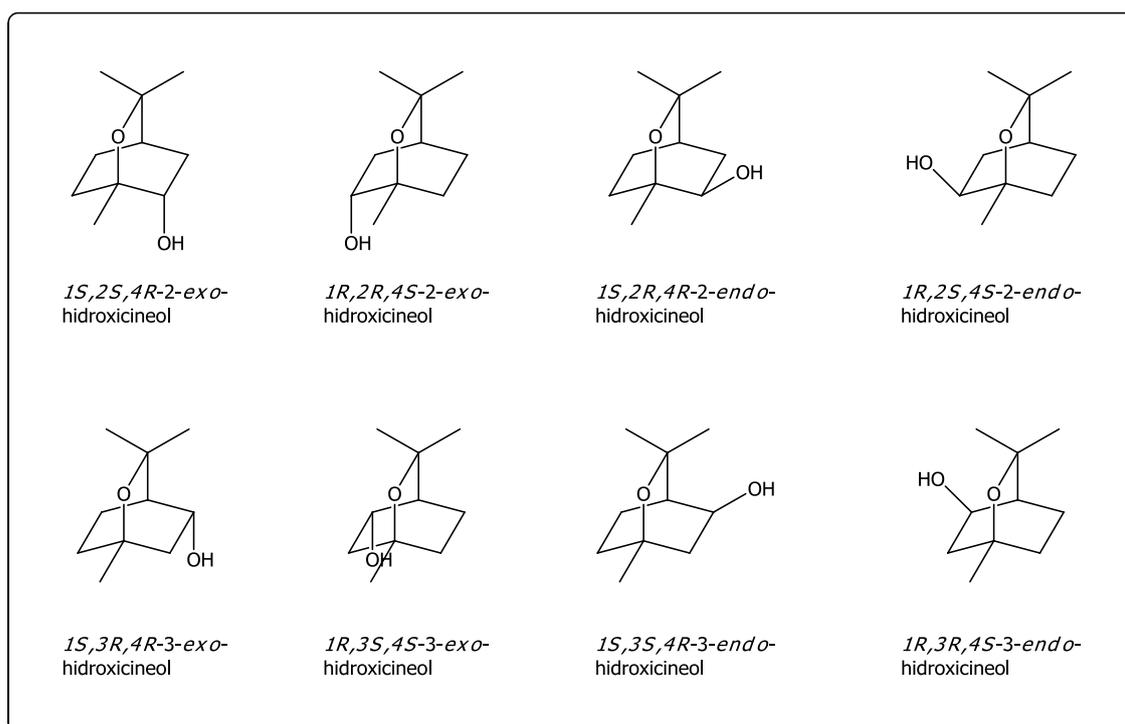


Figura 34. Los 4 pares posibles de enantiómeros de los derivados hidroxilados en C2 y C3 del 1,8-cineol.

	CM	YMPG	TSB	Sintético
<b>2-endo-hidroxicineol</b>	nd	56:44	nd	-
<b>2-exo-hidroxicineol</b>	2:98	57:43	29:71	49:51
<b>3-endo-hidroxicineol</b>	nd	58:42	-	-
<b>3-exo-hidroxicineol</b>	nd	(a)	(a)	-

Tabla 29. Distribución enantiomérica de los productos de biotransformación en los diferentes medios de cultivo. Se informan porcentajes de área obtenidos de la cromatografía quiral, siendo el primero correspondiente al enantiómero de menor tiempo de retención y el segundo el de mayor tiempo de retención. nd: no determinado. (a): solo se obtuvo un pico para el 3-exo-hidroxicineol; la medida del poder rotatorio para el producto obtenido en YMPG indica que se trata de una mezcla racémica.

### 3.3.2 Determinación del rendimiento de la biotransformación

Los resultados informados en la Tabla 28 implican porcentajes de bioconversión, pero nada dicen sobre el rendimiento real de la biotransformación, resultado que generalmente no es informado en trabajos similares publicados. Debido a que durante los procesos de recuperación de los productos desde el medio y de preparación de la muestra

para su análisis, puede haber pérdidas de producto, se utilizaron dos estándares internos. El primero fue alcanfor y se agregó inmediatamente culminada la reacción de biotransformación y previo al work-up. El segundo estándar fue undecano, el que se agregó luego del clean-up e inmediatamente antes del análisis por GC. De esta forma se determinó por un lado la pérdida de producto durante el work-up, y por otro el rendimiento de la reacción y pérdidas durante la misma, al cuantificar tanto el cineol remanente como los alcoholes obtenidos.

La pérdida de monoterpenos durante las etapas de work-up y clean-up se muestra en la Tabla 30. La misma resultó ser de un 24% en promedio. Dichas pérdidas pueden deberse a distintos fenómenos ocurridos durante el proceso. En primer lugar cabe mencionar la retención de los monoterpenos por el micelio. Como ya se demostró para el limoneno (Sección 3.1), una importante cantidad de este terpeno (23%) quedó retenido por la biomasa fúngica. Un segundo factor a considerar es la volatilización de los productos al concentrar el extracto a presión reducida. Este hecho debería ser de una incidencia menor, ya que se tomaron las precauciones para evitar dichas pérdidas (por ejemplo el control de la temperatura) y lograr solamente la destilación del solvente. Otro aspecto es la formación de emulsiones durante la extracción con diclorometano. Como se mencionó este fenómeno varió con los distintos medios usados. Así se obtuvieron emulsiones muy estables al extraer de TSB e YMPG, y de menor estabilidad al extraer de CM. Por esta razón, la pérdida en esta etapa no debería ser relevante. Un último posible punto del proceso donde pueden ocurrir pérdidas de producto es al realizar la columna durante el clean-up. Debido a que este procedimiento se puso a punto de manera de evitar pérdidas detectables por TLC (Sección 2.5.1), es poco probable que ocurriesen aquí pérdidas significativas.

En la Tabla 30 se informan los rendimientos de la biotransformación en los distintos tiempos de reacción, siendo el mayor de 3,3 % el día 7. Este bajo rendimiento redunda en la dificultad de obtener productos puros para su identificación y posterior uso. A la hora de explicar los mismos caben mencionar algunas consideraciones realizadas para el caso del limoneno (Sección 3.2). La toxicidad del monoterpeno para el microorganismo, y su baja solubilidad en agua, son dos factores que pueden haber influido en los resultados. Por otra parte el balance de masa indica una enorme pérdida de sustrato durante la reacción (77 % al tercer día). Esta pérdida puede tener dos causas. La primera y que se sospecha primordial (y quizás única) es la alta volatilidad del cineol. Como se vio

al estudiar la recuperación del limoneno desde el medio (Sección 3.1), este fenómeno resulta relevante en las biotransformaciones de monoterpenos. Otra causa de pérdida de masa, podría ser la sobremetabolización de los hidroxicineoles, como la conjugación de los mismos con algún ácido orgánico o su utilización catabólica. Se debe tener en cuenta que para el cálculo del rendimiento de la reacción, se supuso una pérdida de cineol y los alcoholes de la misma magnitud que la pérdida de alcanfor. Dicho de otra manera, las relaciones masa cineol/masa alcanfor y masa hidroxicineol/masa alcanfor se supusieron constantes. Más allá de estas consideraciones, es al 7mo. día de bioconversión donde el rendimiento es mayor. Esto implica o bien que no se producen más hidroxicineoles a partir de ese día, ó que la velocidad de producción es menor que la de pérdida (volatilización o metabolización). En términos absolutos este rendimiento implica una concentración de 32 mg/L de 2-*exo*-hidroxicineol en el medio de cultivo. Esto está en el orden de lo reportado para la biotransformación de 1,8-cineol con *A. niger* (Nishimura et al., 1982) donde se informó 73 mg/L, pero por debajo de lo reportado en la mayoría de las biotransformaciones bacterianas. En este sentido se destaca los 1400 mg/L obtenidos por Rasmussen y colaboradores con la bacteria *Novosphingobium subterranea* (Rasmussen et al., 2005).

Día	3	5	7	10	14
<b>Rendimiento</b> <sup>(a)</sup>	2,3%	2,9%	3,3%	3,1%	3,0%
<b>Pérdida durante work-up y clean-up</b> <sup>(b)</sup>	29,6%	20,7%	25,0%	17,9%	25,1%
<b>Pérdida durante la reacción</b> <sup>(c)</sup>	77%	79%	90%	96%	97%

Tabla 30. Resultados cuantitativos de la reacción de biotransformación en CM. (a) Rendimiento de la reacción calculado como (moles totales de los alcoholes obtenidos/moles cineol agregado)x100. (b) Pérdida durante de alcanfor desde su agregado hasta el análisis. (c) Pérdida de cineol cuantificada como: (moles cineol agregados - moles cineol remanentes - moles hidroxicineoles) x 100/(moles cineol agregados)

### 3.3.3 Aislamiento y caracterización de los productos de bioconversión

La similitud estructural y los bajos rendimientos de la mayoría de los productos han sido escollos para lograr obtener en forma pura los distintos alcoholes. Por ello sólo se lograron aislar el producto mayoritario 2-*exo*-hidroxicineol, de las biotransformaciones en CM e YMPG y el 3-*exo*-hidroxicineol de la bioconversión en YMPG (Figura 35). El resto de

los productos no fue posible aislarlos a pesar de las diferentes variantes cromatográficas ensayadas. No obstante ello, fue posible su identificación mediante una estrategia de síntesis de estándares y la comparación de los índices de retención (Kovats) y espectros de masas del producto de bioconversión, con los del respectivo sintético.

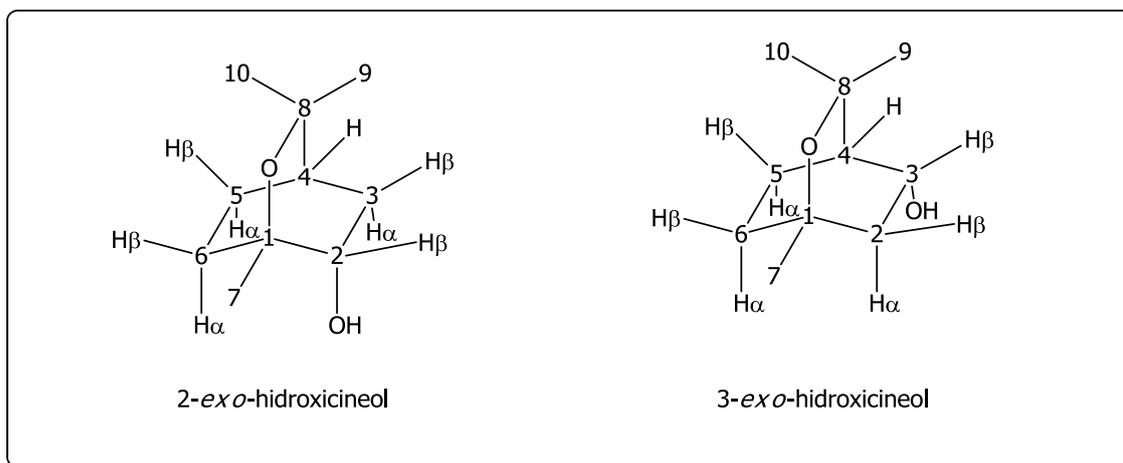


Figura 35. 2- y 3-*exo*-hidroxicineol. Se muestran la numeración y los descriptores que se mencionan en los resultados espectrales. Los descriptores  $\alpha$  y  $\beta$  se utilizan para referir la posición de los protones respecto al plano formado por los carbonos 2, 3, 5 y 6.

Los 2-*exo*-cineoles aislados se identificaron al comparar sus propiedades espectrales ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR y MS) e índices de retención de Kovats con el de su homólogo sintético. La caracterización de cada uno se completó al determinar la distribución enantiomérica, como se explicó en la sección precedente. El 2-*exo*-hidroxicineol sintético se obtuvo como una mezcla racémica (Tabla 29), algo que era de esperar al haber partido de  $\alpha$ -terpineol racémico. A este producto de síntesis se le realizaron los experimentos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -NMR (Anexo II, A4 y A5), cuyos resultados y comparación con datos bibliográficos se muestran en las Tabla 31 y 32. De las mismas se desprende la consistencia de los resultados obtenidos con lo reportado respecto a los desplazamientos de  $^{13}\text{C}$ . En cuanto al espectro  $^1\text{H}$ , no pudo integrarse correctamente el multiplete centrado a 1,56 ppm a causa de una señal interferente, seguramente debida a la presencia de agua. El doblete de doblete de doblete centrado a 1,33 ppm se superpone en una parte de su señal con el singulete metílico a 1,30, por lo que tampoco fue completamente integrado. Sin embargo el estudio de los datos de la literatura y la porción visible de la señal permitió la asignación y el cálculo de las constantes de acoplamiento correspondientes. El espectro de masas obtenido para este

compuesto fue idéntico al presentado por Duisken y colaboradores (Duisken et al., 2005), y el patrón de fragmentación (Tabla 12, Sección 2.5.5) coincidió con lo reportado en literatura (Miyawa & Hashimoto, 2002; Bitteur et al., 1990). Los índices de retención de Kovats (IK) fueron determinados en una columna de fase estacionaria polar (Carbowax 20M) y una columna apolar (SE52) (Tabla 10, Sección 2.5.4). Para Carbowax en este trabajo se obtuvo un IK de 1854, y con la misma fase se reportaron 1822 (Biteur et al., 1990) y 1870 (Shimoda et al., 1996). Con la fase apolar se obtuvo un IK de 1221, lo que es consistente con el IK de 1228 reportado para una fase similar (HP5) (Southwell et al., 2003).

<b>Carbono</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b><math>\delta</math>-(ppm) (A)</b>	72,5	71,1	34,6	34,3	22,2	24,9	24,1	73,5	28,7	29,0
<b><math>\delta</math>-(ppm) (B)</b>	72,5	71,1	34,6	34,2	22,1	24,9	24,0	73,4	28,6	29,0

Tabla 31. Asignaciones de las señales de  $^{13}\text{C}$ -NMR obtenidas para el 2-exo-hidroxicineol (A) y su comparación con lo reportado por Miyazawa y Hashimoto para el mismo compuesto (Miyazawa & Hashimoto, 2002) (B), las que también son consistentes ( $\pm 0,2$  ppm) con los resultados de otros autores (Carman et al., 1994; Liu & Rosazza, 1990, entre otros). Las asignaciones de los carbonos 9 y 10 podrían estar invertidas.

$\delta$ (ppm)	Integración	Asignación	(A)	(B)
3,74-3,77	(1H, ddd, J=10; 4,5; 2,5)	H-2 $\beta$	3,79-3,82 (1H, m)	3,74 (1H, ddd, J=10; 4; 2)
2,50-2,58	(1H, m)	H-3 $\beta$	2,50-2,58 (1H, m)	2,52 (1H, dddd, J=15; 10; 4; 3)
1,88-1,99	(2H, m)	H-5, H-6	-	1,85-2,01 (2H, m)
1,53-1,58	(3H, m)	H-4, H-5, H-6	-	1,48-1,58 (3H, m)
1,30-1,35	(ddd)	H-3 $\alpha$	-	1,31 (1H, ddd, J=15; 4; 3)
1,30	(3H, s)	H-7	1,32 (3H, s)	1,28 (3H, s)
1,22	(3H, s)	H-10	1,23 (3H, s)	1,20 (3H, s)
1,12	(3H, s)	H-9	1,14 (3H, s)	1,10 (3H, s)

Tabla 32. Desplazamientos de  $^1\text{H}$  correspondientes al 2-*exo*-hidroxicineol y comparación con datos bibliográficos: (A) Rasmussen et al. (2005) realizado a 400 MHz, (B) Miyazawa & Hashimoto (2002) realizado a 270 MHz.

El 3-*exo*-hidroxicineol aislado fue identificado al comparar sus espectros  $^1\text{H}$ -NMR (Anexo II, A7),  $^{13}\text{C}$ -NMR (Anexo II, A6) y MS con lo reportado en literatura. Dichas comparaciones se muestran en las Tablas 33 y 34 para los experimentos de resonancia. Los resultados obtenidos en el experimento de  $^{13}\text{C}$  son totalmente coincidentes con lo hallado en bibliografía. En cuanto al espectro de protón, el mismo resultó algo más complejo y por lo tanto la asignación de señales no fue completa. Sin embargo se pudieron asignar la mayoría de las señales y en estos casos la información obtenida fue consistente con la reportada en literatura. Por ejemplo algunas señales claves como la del protón en el carbono 3 centrada a 4,49 ppm o la de los tres metilos, estuvieron claramente determinadas. Entre 2,03 y 2,18 ppm se pudieron observar las dos secuencias de dobletes correspondientes a los protones 2 $\beta$  y 5 $\alpha$  y se midieron sus constantes de acoplamiento, a pesar de que el último pico del *ddd* de H2 $\beta$  se solapó con el primer pico de la señal de H5 $\alpha$  a aproximadamente 2,12 ppm. Entre 1,45 y 1,85 se observaron una serie de señales complejas. Estas se pudieron separar en un multiplete que integra un protón entre 1,77 y 1,85 (que correspondería a H5 $\beta$ ), y una

señal distorsionada (seguramente debido a la presencia de agua) entre 1,45 y 1,70. Hacia 1,32-1,36 ppm se observó un doble doblete el cual en su parte final se solapó con la señal del metilo centrada a 1,32 ppm. No obstante se pudieron determinar las constantes de desplazamiento y asignarlo al protón 2 $\alpha$ . Del espectro de masa obtenido para el 3-*exo*-hidroxicineol se obtuvieron los principales iones ya resumidos en la Tabla 11 de la Sección 2.5.5. El espectro fue idéntico al presentado por Duisken y colaboradores para este compuesto (Duisken et al., 2005), y el patrón de fragmentación fue consistente con lo reportado en la literatura consultada (Southwell et al, 2003). La caracterización del compuesto aislado se completó al determinar los índices de retención de Kovats (Tabla 10, Sección 2.5.4) y el poder rotatorio. De los dos índices de Kovats, 1900 para Carbowax y 1238 para SE52, este último es consistente con el valor 1246 hallado en literatura (Southwell et al., 2003), no encontrándose el índice de retención en una columna tipo Carbowax 20M en la literatura consultada. El 3-*exo*-hidroxicineol aislado del medio YMPG presentó un solo pico en la cromatografía gaseosa quiral. Esto indica que se trata de un compuesto enantioméricamente puro o de una mezcla de enantiómeros que no se resuelven en las condiciones cromatográficas ensayadas. La obtención de un poder rotatorio prácticamente nulo, indicaría que se trata de lo segundo, siendo la mezcla prácticamente racémica ( $\alpha_D^{20} = + 0,1^\circ$ ).

Los isómeros 2-*exo*-hidroxicineol y el 3-*exo*-hidroxicineol son distinguibles tanto por sus espectros de  $^{13}\text{C}$  como de  $^1\text{H}$ . Frente a igual sustitución el C2 se desplazará a campos menores que su vecino C3 (Carman et al., 1994). De esta manera cuando el alcohol está en C2 este resuena a 72,5 ppm y su vecino metileno a 34,6 ppm; mientras que cuando el hidroxilo está en C3 este carbono resuena a 65,3 ppm y C2 a 42,9 ppm. Según Liu & Rosazza el desplazamiento del protón metínico para el 3-hidroxicineol será mayor a 4 ppm y para el 2-hidroxicineol aproximadamente 3,7 ppm (Liu & Rosazza, 1990), hecho que se verificó en este trabajo.

<b>Carbono</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b><math>\delta</math>-(ppm) (A)</b>	70,9	42,9	65,3	40,3	13,9	31,0	27,1	73,3	28,4	29,0
<b><math>\delta</math>-(ppm) (B)</b>	70,9	42,9	65,3	40,4	13,9	31,0	27,1	73,2	28,3	28,9

Tabla 33. Asignaciones de las señales de  $^{13}\text{C}$ -NMR obtenidas para el 3-*exo*-hidroxicineol aislado de la biotransformación de cineol en YMPG (A) y su comparación con lo reportado por Carman y colaboradores para el mismo compuesto (Carman et al., 2005) (B). Estos datos también coinciden con lo reportado en otros trabajos (Carman et al., 1994; Orihara & Furuya, 1994). Las asignaciones de los carbonos 9 y 10 podrían estar invertidas.

$\delta$ (ppm)	Integración	Asignación	(A)	(B)
4,47-4,51	(1H, brd, J=9,5)	H-3 $\beta$	4,43 (1H, dddd, J=9,5; 3,6; 2,8; 1,6)	4,47 (1H, brd, J=9,5)
2,12-2,18	(1H, ddd, J=14; 9,5; 3)	H-2 $\beta$	2,09 (1H, ddd, J=14,3; 9,5; 3,3)	2,13 (1H, ddd, J=14; 9,5; 3)
2,03-2,12	(1H, dddd, J=13,5; 10; 6; 2)	H-5 $\alpha$	2,02 (1H, dddd, J=13,6; 11,8; 6,1; 2,3)	2,05 (1H, dddd, J=13,5; 11,5; 6; 2)
1,77-1,85	(1H, m)	H-5 $\beta$	1,75 (1H, ddddd, J=13,6; 11,3; 3,5; 3,5; 1,6)	1,79 (1H, ddddd, J=13,5; 11; 3,5; 3; 1,5)
1,45-1,70 (sc)		H-6 $\beta$	1,60 (1H, dddd, J=13,3; 11,3; 6,1; 3,3)	1,63 (1H, dddd, J=13,5; 11; 6; 3)
		H-4	1,51 (1H, ddd, J=3,6; 3,5; 2,3)	1,50 (1H, m)
		H-6 $\alpha$	1,47 (1H, ddd, J=13,3; 11,8; 3,5)	1,50 (1H, ddd, J=13,5; 11,5; 3,5)
1,32-1,36	(dd, J=14; 3)	H-2 $\alpha$	1,28 (1H, dd, J=14,3; 2,8)	1,32 (1H, dd, J=14; 3)
1,32	(3H, s)	H-9 y H-10	1,27 (3H, s)	1,30 (3H, s)
1,23	(3H, s)		1,19 (3H, s)	1,21 (3H, s)
1,09	(3H, s)	H-7	1,04 (3H, s)	1,07 (1H, s)

Tabla 34. Desplazamientos de  $^1\text{H}$  correspondientes al 3-*exo*-hidroxicineol y comparación con datos bibliográficos: (A) Carman et al. (2005) realizado a 400 MHz, (B) Orihara & Furuya (1994) a 300 MHz. brd: doblete ancho, sc: señal compleja.

Los productos de biotransformación minoritarios 2- y 3-*endo*-hidroxicineol y 2-oxocineol se separaron por GC y fueron identificados al comparar sus tiempos de retención, índices de Kovats y espectros de masas con el de los respectivos homólogos sintéticos realizados según se describió en la Sección 2.5.5. También se sintetizó el 3-

oxocineol, pero su tiempo de retención no coincidió con pico alguno del cromatograma de la biotransformación.

Los desplazamientos químicos (Tabla 14, Sección 2.5.5) surgidos del espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR del 2-*endo*-hidroxicineol (Anexo II, A8) coincidieron con lo reportado en literatura (Rasmussen et al., 2005; Asakawa et al., 1988). Según Carman y Fletcher en sistemas cíclicos rígidos aparece un efecto " *$\gamma$ -gauche*" de modo que un carbono a 3 enlaces de distancia de un sustituyente exhibe un desplazamiento a campos mayores debido a la polarización del enlace C-H inducida estéricamente (Carman & Fletcher, 1984). Los autores indican que el 2-*endo*-hidroxicineol y el 2-*exo*-hidroxicineol pueden distinguirse por las señales del carbono 6, el cual es  $\gamma$  respecto al hidroxilo. La señal del C6 del isómero *exo* debería desplazarse a campos mayores respecto del C6 del 1,8-cineol, debido al efecto  *$\gamma$ -gauche*. Esto mismo debería ocurrir de manera mucho menos pronunciada debido a un efecto " *$\gamma$ -trans*" cuando se trata del isómero *endo*. Los resultados obtenidos concuerdan con lo mencionado, ya que los desplazamientos fueron 24,9 ppm para el isómero *exo* y 28,3 ppm para el *endo*, siendo esta la única diferencia significativa entre ambos espectros. En cuanto al espectro de  $^1\text{H}$ -NMR del 2-*endo*-hidroxicineol (Anexo II, A9) si bien no todas las señales pudieron asignarse, sí se hizo con algunas claves como los protones metílicos (1,13, 1,29 y 1,31 ppm) y el metínico sobre C2 (3,48-3,56 ppm). Esta señal resultó ser más bien un triplete ancho, concordante con lo reportado por varios autores (Miyazawa et al., 1989; Williams et al., 1989), más que un doblete como informa Rasmussen y colaboradores (Rasmussen et al, 2005). Según Miyazawa y colaboradores el desplazamiento de esta señal también permite distinguir entre 2-*endo*- y 2-*exo*-hidroxicineol, ya que el efecto anisotrópico del oxígeno del éter desapantalla el protón en el caso del 2-*exo* y por lo tanto su señal se desplazará a campos menores (Miyazawa et al., 1989). Esto se verificó al obtener las señales a aproximadamente 3,76 ppm para el 2-*exo* y 3,52 ppm para el 2-*endo*. El GC-MS arrojó una fragmentación (Tabla 14, Sección 2.5.5) consistente con lo hallado en literatura para este compuesto (Southwell et al., 2003; Williams et al., 1989) y como era de esperar prácticamente similar al del isómero 2-*exo*. Respecto a los índices de retención solo se encontró el obtenido en una columna HP5 con un valor de 1217 (Southwell et al., 2003), lo que es consistente con el valor 1209 obtenido con una fase SE52 en este trabajo (Tabla 10, Sección 2.5.4).

Los espectros de  $^{13}\text{C}$ -NMR y  $^1\text{H}$ -NMR del 3-*endo*-hidroxicineol (Anexo II, A10 y A11 respectivamente) fueron consistentes en líneas generales con lo reportado en literatura (Carman et al., 2005; Luzzio & Dubeau, 2002). Para la distinción entre los isómeros *endo* y *exo* caben las mismas consideraciones que las realizadas para el 2-hidroxicineol, salvo que el carbono  $\gamma$  respecto al hidroxilo será C5. De esta manera el desplazamiento para dicho carbono fue 13,9 ppm en el 3-*exo* y 21,4 en el 3-*endo* (Tabla 16, Sección 2.5.5). En el espectro de protón se encontraron las señales características de los protones metílicos (1,12, 1,25 y 1,44 ppm) y el metínico sobre C3 (4,10-4,18 ppm). Al igual que en el 2-hidroxicineol puede verse la distinción *exo-endo* habiéndose obtenido desplazamientos centrados en 4,49 y 4,14 ppm respectivamente, para los protones en C3. El espectro de masas arrojó un patrón de fragmentación (Tabla 16, Sección 2.5.5) consistente con lo hallado en la bibliografía consultada (Rasmussen et al., 2005), salvo por no haber sido detectado el ión molecular a  $m/z = 170$ . Este espectro no difiere sustancialmente del obtenido para el 3-*exo*-hidroxicineol. Los índices de Kovats para el 3-*endo*-hidroxicineol (Tabla 10, Sección 2.5.4) fueron 1928 y 1249 para las fases Carbowax y SE52 respectivamente. Este último resultó consistente con el valor 1259 hallado en literatura para una columna HP5 (Southwell et al., 2003).

Para las dos cetonas sintetizadas los resultados de los experimentos de  $^{13}\text{C}$ -NMR (Anexo II, A12 para 2-oxo y A14 para 3-oxo) coincidieron con lo hallado en literatura (2-oxocineol: Rasmussen et al., 2005 y 3-oxocineol: Carman et al., 2005). Lo mismo ocurrió con los espectros de protón (Anexo II, A13 para 2-oxo y A15 para 3-oxo) donde, salvo una pequeña dispersión en la integración de las señales en el entorno de 1,60 ppm en ambos casos (quizás debido a la presencia de agua), todas las demás señales coincidieron con lo reportado por los autores mencionados. Los principales iones detectados en el espectro de masas del 2-oxocineol (Tabla 13, Sección 2.5.5) son consistentes con lo publicado por Williams y colaboradores (Williams et al., 1989). Lo mismo ocurre con el 3-oxocineol (Tabla 15, Sección 2.5.5) y lo reportado por Rasmussen y colaboradores (Rasmussen et al., 2005). En la literatura consultada no se hallaron índices de retención en GC para ninguno de estos dos compuestos.

### 3.3.4 Esporas como agente biocatalizador

Como se mencionó en la Introducción, el cultivo de esporas es una de las formas de utilizar un agente biotransformador que posee varias ventajas, pero que está

restringida a ciertos microorganismos capaces de producirlas en cantidad (Sección 1.1.8). Siendo el *Aspergillus terreus* un productor de esporas, se estudió la posible capacidad biotransformadora de las mismas. En la literatura existe más de un reporte de biotransformación de monoterpenos con esporas de hongos filamentosos. Demyttenaere y colaboradores llevaron adelante la bioconversión de limoneno en  $\alpha$ -terpineol con esporas de dos cepas diferentes de *Penicillium digitatum* (Demyttenaere et al., 2001). También se ha reportado la biotransformación de geraniol, nerol y citral en 6-metil-5-hepten-2-ona tanto con una suspensión de esporas del mismo hongo en buffer fosfato (Wolken & van der Werf, 2001), como con un cultivo de superficie esporulada (Demyttenaere and De Kimpe, 2001). Por otra parte con esporas de *Aspergillus* se reportó la hidroxilación de esteroides y la bioconversión de glucosa en ácido cítrico (Wolken et al., 2003).

En este trabajo no se obtuvo ningún producto de biotransformación al trabajar con esporas. Esto evidencia la ausencia de las oxigenasas responsables de la formación de los hidroxicineoles en las esporas. El resultado es consistente con la ausencia de biotransformación al utilizar simplemente un medio mínimo mineral y cineol como única fuente de carbono (Sección 3.3.4).

### 3.3.5 Aceite de *Eucalyptus* como sustrato de la biotransformación

Siendo el aceite esencial de muchas especies de *Eucalyptus* muy rico en su contenido en 1,8-cineol, el mismo podría considerarse como una calidad baja del monoterpeno. De ser posible el uso de la esencia directamente como sustrato se evitaría el costo de separación y purificación del cineol. Para ensayar esta posibilidad se utilizó una esencia de *Eucalyptus globulus* que contenía 72 % de 1,8-cineol (Tabla 17, Sección 2.5.7).

En la tabla 35 se muestran los porcentajes de bioconversión obtenidos al utilizar el aceite como sustrato de biotransformación. Comparado con el ensayo realizado en las mismas condiciones pero utilizando el cineol puro (Tabla 28, Sección 3.3.1), se observa un aumento en los porcentajes relativos de los hidroxicineoles respecto al 1,8-cineol en los distintos días. Esto en gran medida se debe a que el cineol a biotransformar fue 99,5 % puro en un caso y 72 % cuando se utilizó la esencia. De esta, un 16,4 % correspondió a  $\alpha$ -pineno, un hidrocarburo monoterpénico muy volátil (Fichan et al.,

1999) el cual ya no se detectó al día 5 de la biotransformación. Esto contribuye a elevar el porcentaje de los productos de biotransformación. Pero al comparar los perfiles de la bioconversión, o sea los porcentajes relativos de los productos de la biotransformación, se obtiene lo mismo ya sea utilizando el 1,8-cineol puro o como parte del aceite de eucalipto (Figura 36).

Tiempo (días)	Cineol	2-endo	2-exo	3-exo	3-endo	otros
<b>0 (aceite)</b>	72,2	0	0	0	0	27,8*
<b>5</b>	44,7	4,7	45,1	2,8	0,8	5,9
<b>7</b>	21,1	5,0	71,4	1,7	0,8	3,0
<b>10</b>	3,7	8,5	82,1	4,4	1,3	1,6

Tabla 35. Porcentajes de bioconversión del 1,8-cineol utilizando aceite de *Eucalyptus* como sustrato de la biotransformación. \*corresponde a 16,4% de  $\alpha$ -pineno, 2,5% de limoneno y 8,9% de componentes minoritarios de la esencia.

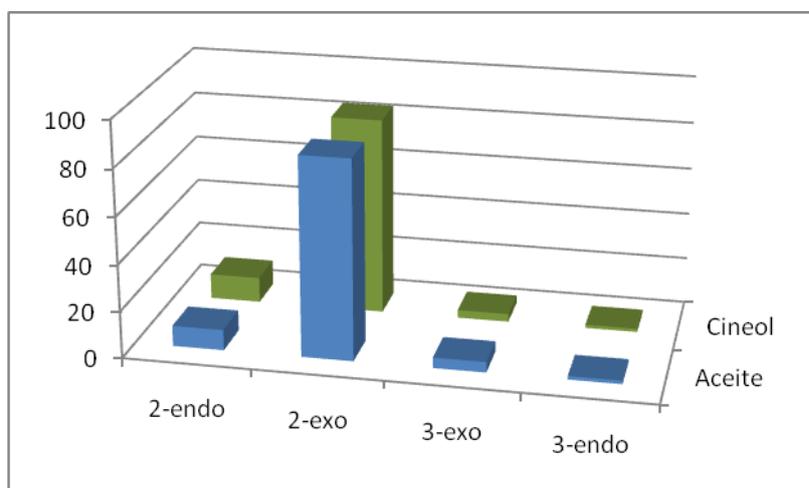


Figura 36. Perfil de los productos de bioconversión utilizando como sustrato cineol puro y aceite de eucalipto. Los porcentajes de los productos corresponden al 10mo. día de biotransformación.

Por lo tanto es posible la utilización del aceite esencial de *Eucalyptus* directamente como fuente de 1,8-cineol para la biotransformación. No se observaron inhibiciones por parte de los demás componentes de la esencia, y el tipo y cantidades relativas de productos obtenidos es el mismo que al utilizar el cineol puro.

### 3.4 Obtención y caracterización de derivados por catálisis enzimática

#### *Acetilación de los alcoholes productos de biotransformación de 1,8-cineol*

La mencionada dificultad para aislar cada uno de los productos obtenidos en la biotransformación a microorganismo entero, llevó a realizar un primer ensayo con la mezcla de los productos de la biooxidación del cineol en el medio YMPG, poniéndola a reaccionar con acetato de vinilo y la lipasa comercial de *Candida rugosa*. El seguimiento de la reacción mediante GC y TLC mostró un único nuevo producto diferente a los componentes de la mezcla de partida. Este nuevo producto aumentaba su concentración relativa con el transcurso de las horas de reacción (Figura 37). El análisis de la composición de los productos a los distintos tiempos de reacción (normalización de áreas en el cromatograma gaseoso), permitió observar que el aumento del área del nuevo pico ocurría concomitante con una disminución del pico correspondiente al 2-*exo*-hidroxicineol, manteniéndose constante la composición relativa de los demás alcoholes (Figura 38). Esto llevó a suponer que el nuevo producto era el acetato del 2-*exo*-hidroxicineol, lo que fue confirmado al coinyectar y comparar el tiempo de retención con el del producto aislado de la acetilación enzimática realizada sobre el 2-*exo*-hidroxicineol sintético, obtenido y caracterizado como se indica más adelante en esta Sección.

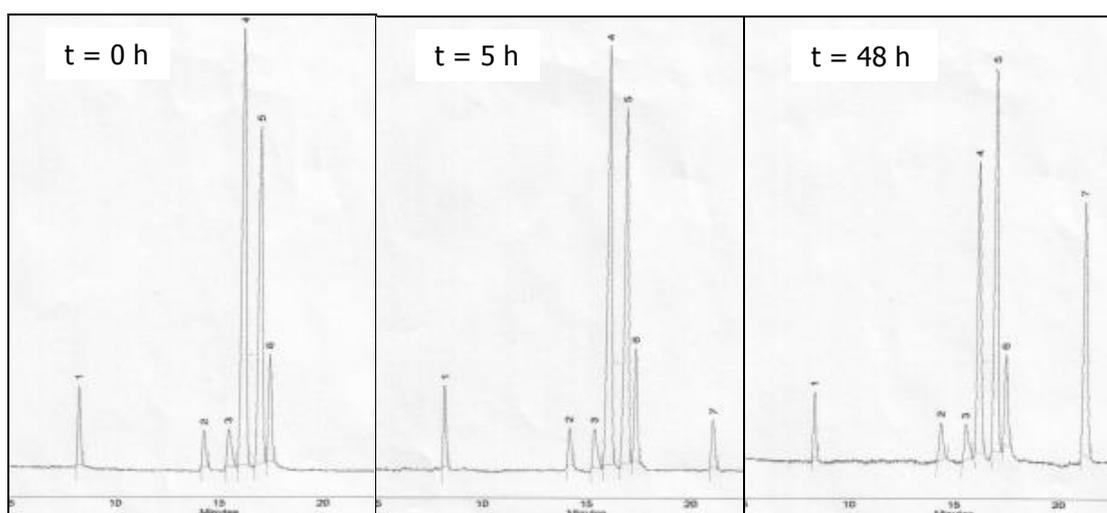


Figura 37. Seguimiento por GC de la reacción de acetilación de los hidroxicineoles con acetato de vinilo catalizada por CRL. 1) 1,8-cineol, 2) 2-*endo*-hidroxicineol, 3) 2-*oxocineol*, 4) 2-*exo*-hidroxicineol, 5) 3-*exo*-hidroxicineol, 6) 3-*endo*-hidroxicineol, 7) acetato de 2-*exo*-hidroxicineol.

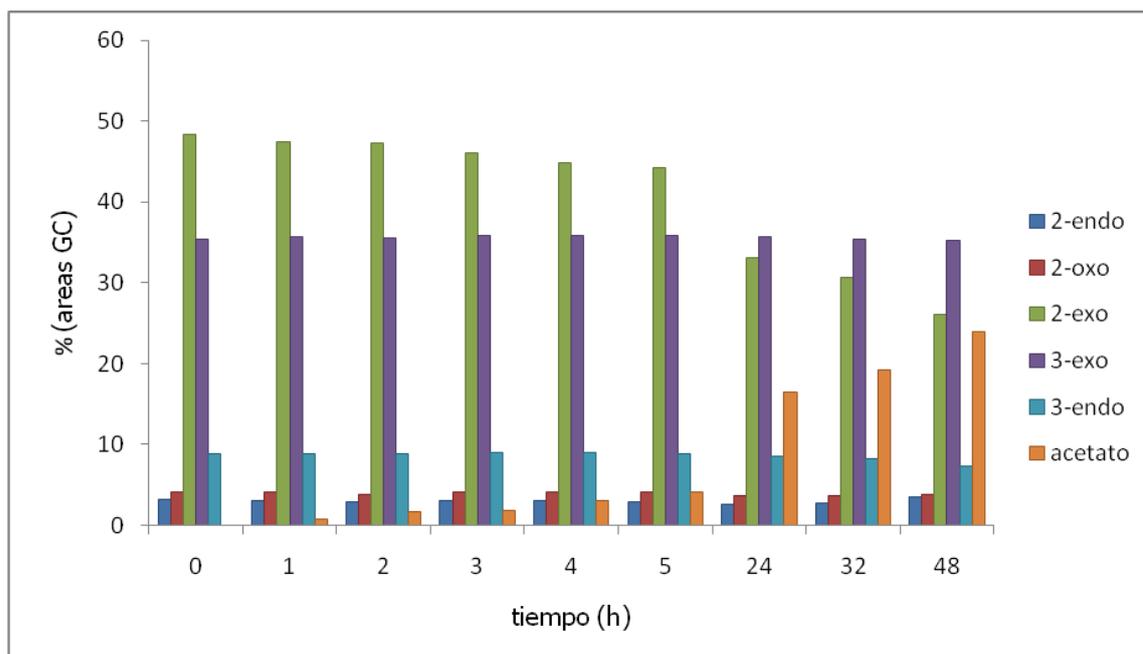
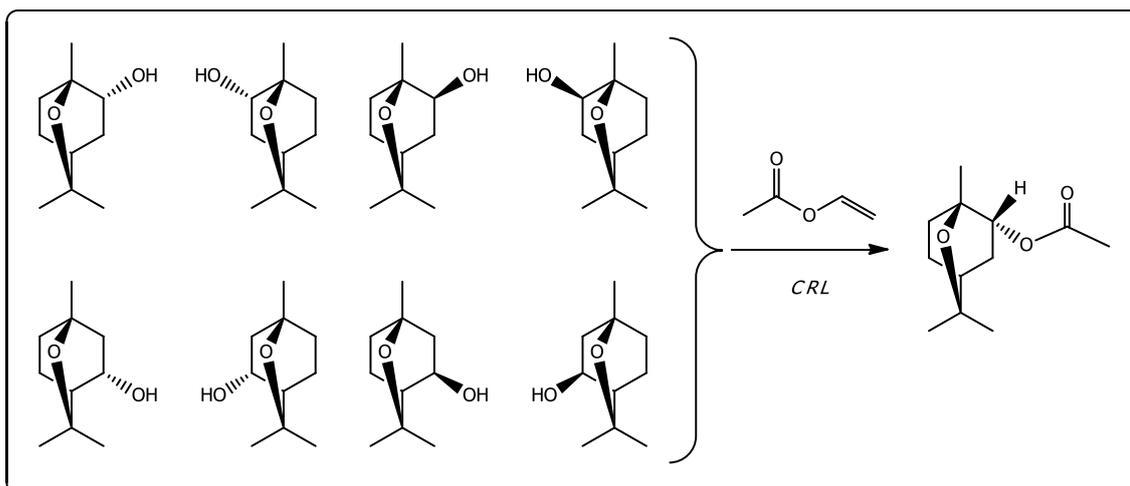


Figura 38. Evolución de la esterificación catalizada con CRL de los productos de bioconversión del 1,8-cineol en YMPG. En la gráfica se observa la disminución de la concentración relativa de 2-*exo*-hidroxicineol (barras verdes) concomitantemente con el aumento del acetato formado (barras naranjas), mientras las concentraciones relativas de los demás compuestos permanecen constantes en el tiempo.

De esta manera, se encontró una bioconversión regio y estereoespecífica para obtener uno de los ésteres derivados de 2-hidroxicineol. Más aún, la reacción resultó ser enantioespecífica, ya que el análisis por GC-GC quiral del producto obtenido arrojó un exceso enantiomérico de 98% para uno de los enantiómeros. La composición enantiomérica de los alcoholes productos de biotransformación en YMPG era casi racémica, como se vio en la Sección 3.3.1 (Tabla 29). De esta manera estaban disponibles para reaccionar todos los 8 enantiómeros posibles, pero la bioacetilación se dio exclusivamente sobre el compuesto (-)-2-*exo*-hidroxicineol, manteniéndose inactivos el resto de los alcoholes (Esquema 23). Por ello, en los siguientes ensayos realizados con lipasas se utilizó como sustrato el 2-*exo*-hidroxicineol sintético, el cual resulta de una composición enantiomérica similar al obtenido en la bioconversión con YMPG, y cuya obtención en cantidades necesarias es menos dificultosa según lo ya mencionado.



Esquema 23. Reacción de acetilación con acetato de vinilo y CRL de los alcoholes productos de biotransformación del 1,8-cineol por *A. niger* en YMPG. El único producto obtenido es el isómero levógiro del acetato de 2-*exo*-hidroxicineol, al que se le asignó la configuración 2*R*. Esta asignación se realizó aplicando la regla de Kazlauskas, lo que se explica en el texto bajo el rótulo "Caracterización del (-)-acetato de 2-*exo*-hidroxicineol".

#### Esterificación del ( $\pm$ )-2-*exo*-hidroxicineol sintético

Buscando aumentar el espectro de productos derivados del 2-hidroxicineol que pudieran tener potencial actividad herbicida, se ensayaron las transesterificaciones del alcohol con los ésteres vinílicos de ácidos grasos disponibles comercialmente, utilizando para ello las lipasas CRL y PPL. El hecho de utilizar los ésteres vinílicos se basa en que de darse la reacción, conjuntamente con el éster se produce el alcohol vinílico, el cual se tautomeriza al acetaldehído volátil, desplazando el equilibrio hacia los productos, favoreciendo así la obtención del éster buscado.

Se obtuvieron resultados positivos solamente con el acetato de vinilo y CRL. Para el resto de los ésteres ensayados con CRL y para todos los ésteres con PPL, no se obtuvo ningún producto de reacción. En la Figura 39 se muestra la evolución del sustrato y el producto con el tiempo.

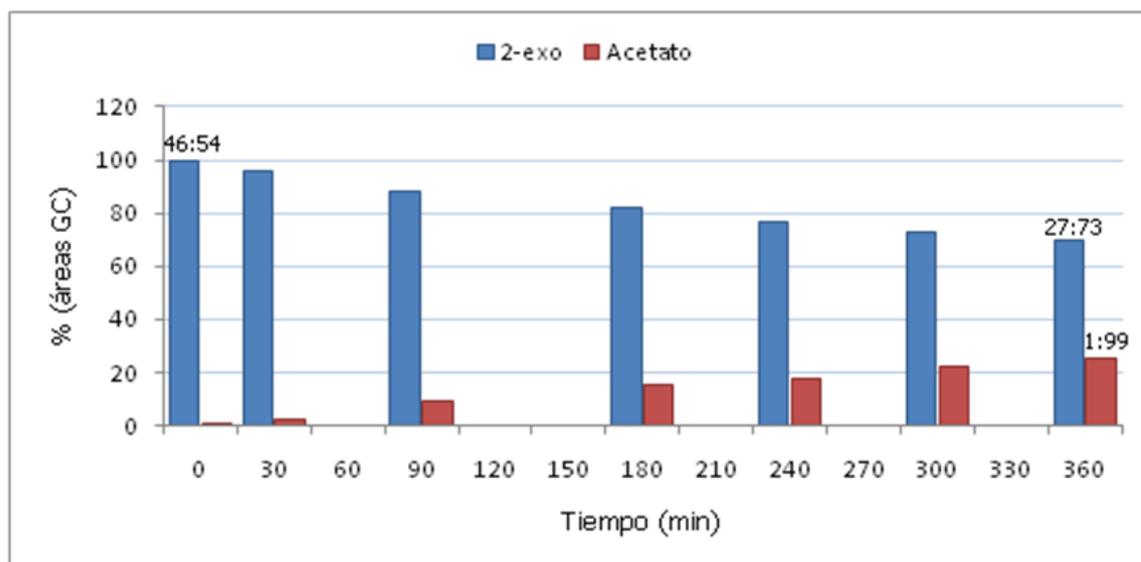


Figura 39. Evolución de la acetilación enzimática del 2-*exo*-hidroxicineol sintético. Los números sobre las columnas muestran la distribución enantiomérica del compuesto al tiempo indicado, determinada por GC-GC quiral en las condiciones mencionadas en el texto.

#### Caracterización del (-)-acetato de 2-*exo*-hidroxicineol

El acetato de 2-*exo*-hidroxicineol (Figura 40) aislado fue identificado al comparar sus espectros de  $^{13}\text{C}$ -NMR (Anexo II, A16),  $^1\text{H}$ -NMR (Anexo II, A17), y MS con lo reportado en literatura. Dichas comparaciones se muestran en las Tablas 36 y 37 para los experimentos de resonancia. Los resultados obtenidos en el experimento de  $^{13}\text{C}$  son totalmente coincidentes con lo hallado en bibliografía. En cuanto al espectro de protón, los resultados son consistentes en la casi totalidad de las señales. Solamente se observa la interferencia de una señal de intensidad similar a la de los metilos a 1,61 ppm, que impide la correcta integración del multiplete asignado al H-6 $\beta$ . Por otra parte el singulete con desplazamiento 1,30 ppm correspondiente a uno de los metilos, está inserto en la señal correspondiente al H-3 $\alpha$ , de forma similar a lo ocurrido con el espectro del 2-*exo*-hidroxicineol. De todos modos la porción visible de la señal permite determinar que se trata de un *ddd* con las constantes de acoplamiento correspondientes. El espectro de masa mostró un patrón de fragmentación (Tabla 20, Sección 2.6.2) consistente con lo reportado en literatura (Miyazawa & Hashimoto, 2002; Kubota et al., 1998).

Como se mencionó, el análisis del producto aislado por cromatografía quiral mostró un producto prácticamente homoquiral, y la determinación de su poder rotatorio

indicó que el mismo es el isómero levógiro. La regla de Kazlauskas es una regla empírica para determinar la preferencia de una lipasa entre dos enantiómeros de un alcohol secundario, basada en los tamaños relativos de los sustituyentes en el centro quiral (Cygler et al., 1994). La aplicación de esta regla indica que la configuración absoluta del éster obtenido corresponde al acetato del 2*R*-*exo*-hidroxicineol, cuya estructura se indicó en el Esquema 23. Para completar la caracterización del acetato se determinaron sus índices de Kovats (Tabla 19, Sección 2.6.2). El índice 1719 calculado en la columna Carbowax 20M es consistente con el valor 1716 hallado en literatura para el mismo tipo de fase estacionaria (Lee et al., 2005). No se encontró reporte del índice de Kovats para este compuesto en una fase tipo SE52.

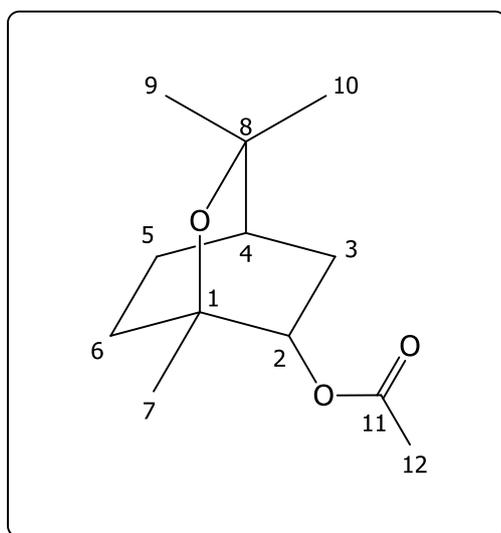


Figura 40. Acetato de 2-*exo*-hidroxicineol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>(A)</b>	70,8	72,9	32,7	33,8	22,0	25,9	24,2	73,8	28,6	28,9	170,6	21,3
<b>(B)</b>	70,8	72,8	32,7	33,8	21,9	25,9	24,1	73,7	28,5	28,8	170,5	21,2

Tabla 36. Asignaciones de las señales de  $^{13}\text{C}$ -NMR obtenidas para el acetato de 2-*exo*-hidroxicineol (A) y su comparación con lo reportado por Miyazawa y Hashimoto para el mismo compuesto (Miyazawa & Hashimoto, 2002) (B), las que también son consistentes con los resultados obtenidos por Kubota y colaboradores (Kubota et al., 1998). Las asignaciones de los carbonos 9 y 10 podrían estar invertidas.

$\delta$ (ppm)	Integración	Asignación	(A)	(B)
4,68-4,73	(1H, ddd, J=10; 4; 2)	H-2 $\beta$	4,69 (1H, ddd, J=10; 4; 2)	4,66-4,71 (1H, m)
2,59-2,69	(1H, dddd, J=15; 10; 4; 3,5)	H-3 $\beta$	2,63 (1H, dddd, J=15; 10; 4; 3)	2,56-2,68 (1H, m)
2,08	(3H, s)	H-12	2,06 (3H, s)	2,06 (3H, s)
1,97-2,06	(1H, m)	H-5	1,96-2,05 (1H, m)	2,00-2,05 (1H, m)
1,85-1,93	(1H, m)	H-6 $\alpha$	1,87 (1H, ddd, J=14; 11; 4)	1,81-1,88 (1H, m)
1,59-1,66	(m)	H-6 $\beta$	1,57-1,64 (1H, m)	1,57-1,65 (1H, m)
1,50-1,58	(2H, m)	H-4, H-5	1,49-1,57 (2H, m)	1,48-1,55 (2H, m)
1,28-1,34	(1H, ddd, J=15; 4; 2,5)	H-3 $\alpha$	1,27-1,32 (1H, m)	1,25-1,33 (1H, m)
1,30	(3H, s)	H-9	1,28 (3H, s)	1,21 (3H,s)
1,24	(3H, s)	H-10	1,22 (3H, s)	1,28 (3H, s)
1,06	(3H, s)	H-7	1,04 (3H, s)	1,04 (3H, s)

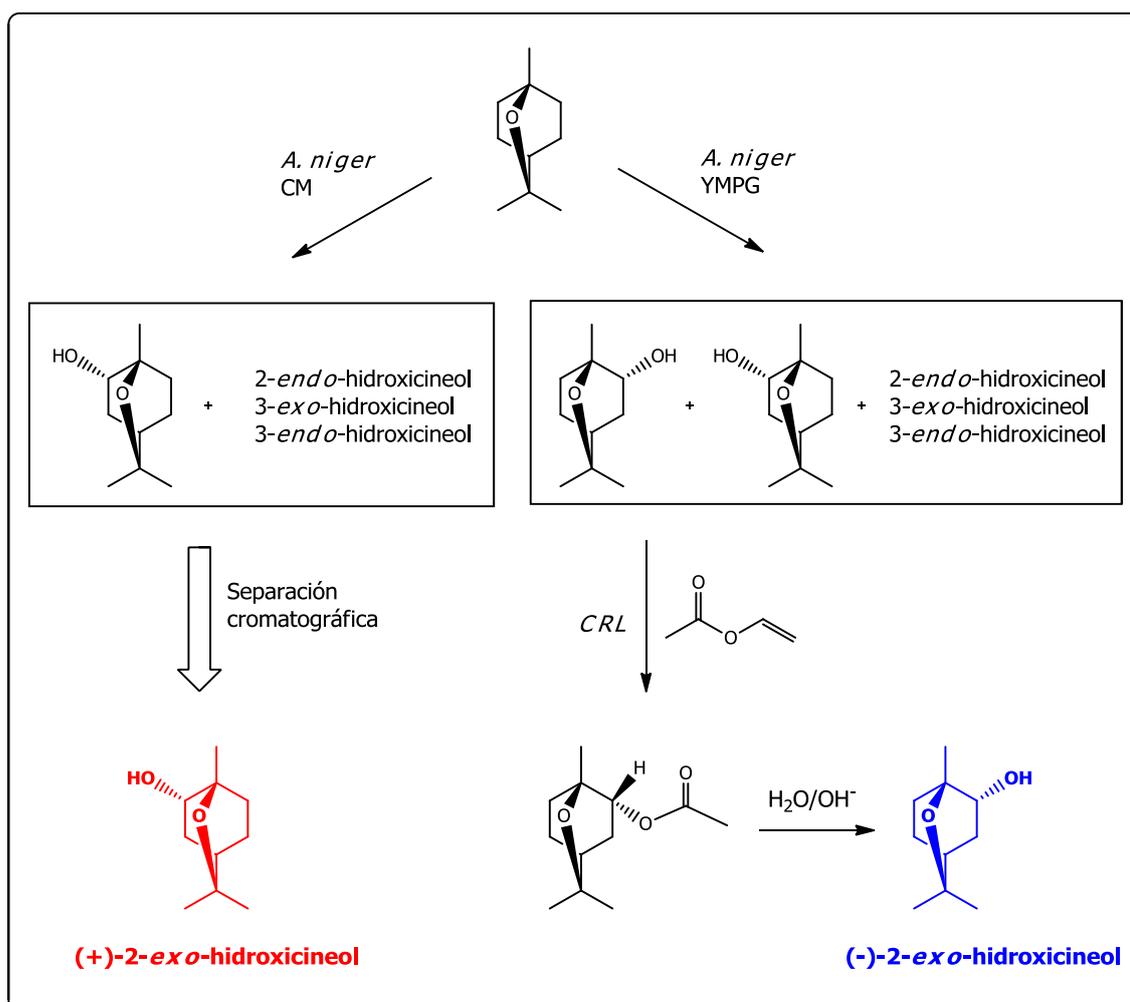
Tabla 37. Desplazamientos de  $^1\text{H}$  correspondientes al acetato de 2-*exo*-hidroxicineol y comparación con datos bibliográficos: (A) Miyazawa & Hashimoto (2002), (B) Kubota et al. (1998).

El éster obtenido resulta valioso tanto desde el punto de vista de su aroma como de su potencial bioactividad. Al igual que los alcoholes de los que derivan, los acetatos de los hidroxicineoles tienen propiedades aromáticas interesantes *per se* (Villecco et al., 2005). Los acetatos de 2- y 3-hidroxicineol fueron detectados como los principios odoríferos de los rizomas de *Alpina galanga* Willd. (Kubota et al., 1998; Kubota et al., 1999). El acetato de 2-*exo*-hidroxicineol también fue encontrado componente del aceite esencial de albahaca (Lee et al., 2005). Miyazawa y Hashimoto sintetizaron el acetato y otros ésteres del 2-*exo*-hidroxicineol, y los evaluaron en cuanto a su aroma y actividad antimicrobiana (Miyazawa & Hashimoto, 2002) (en este artículo si bien los autores nombran al alcohol como 2-*endo*, tanto la estructura presentada como los datos espectroscópicos indican que se trata del isómero 2-*exo*). El acetato y otros ésteres del 2-hidroxicineol también fueron estudiados en cuanto a su potencial uso como perfumes en diferentes aplicaciones cosméticas (Mariani et al, 1995). Pero al igual que con los hidroxicineoles no se encuentran reportes sobre actividad fitotóxica de estos derivados. Este punto se evalúa y discute en la Sección 3.5

### *Obtención del (-)-2-*exo*-hidroxicineol*

La obtención de un acetato de 2-*exo*-hidroxicineol prácticamente homoquiral, condujo a la hidrólisis del mismo para obtener el alcohol correspondiente. Dicho alcohol se obtuvo en una relación enantiomérica 99,7:0,3 (ee 99%). La medida del poder rotario confirmó que se trataba del enantiómero levógiro.

Este resultado se suma a la obtención de (+)-2-*exo*-hidroxicineol mediante la biotransformación de 1,8-cineol por *A. terreus* en el medio Caldo Malta (Sección 3.3.1). De esta forma, mediante diferentes procesos biocatalíticos se lograron obtener por separado dos enantiómeros de un alcohol quiral a partir de un producto natural ópticamente inactivo como el 1,8-cineol (Esquema 24). Ambos enantiómeros poseen propiedades odoríferas diferentes. Miyazawa y Hashimoto encontraron que la mezcla racémica de los acetatos del 2-*exo*-hidroxicineol puede ser resuelta empleando el hongo *Glomerella cingulata*, y que los enantiómeros dextrógiros tanto del acetato como del alcohol poseen un aroma más vivo y dulce que sus antípodas levógiras (Miyazawa & Hashimoto, 2001).



Esquema 24. Obtención de forma independiente de los enantiómeros (+)- y (-) del 2-*exo*-hidroxicineol mediante procesos biocatalíticos. La asignación de las configuraciones 1*S*,2*S*,4*R* al isómero dextrógiro y 1*R*,2*R*,4*S* al levógiro, está basada en la aplicación de la regla empírica de Kazlauskas, como se explicó en el texto de esta misma sección.

### 3.5 Bioactividad de los productos de biotransformación del 1,8-cineol y derivados

La evaluación de la actividad fitotóxica se realizó midiendo tres efectos biológicos en dos especies vegetales. La comparación contra un blanco del porcentaje germinación y de la elongación de raíz y tallo, son los ensayos más reportados en literatura a la hora de evaluar actividad fitotóxica de un compuesto o extracto dado (Hoagland & Williams, 2004). Se buscó de esa manera abarcar distintos probables mecanismos de acción. El uso de una especie de dicotiledónea y otra de monocotiledónea se realizó a los efectos de testear una posible acción selectiva. En las Figuras 41 y 42 se muestran, a modo de ejemplo, las semillas de cada una de las especies luego del quinto día de comenzado un experimento.



*Figura 41. Semillas de trigo al quinto día de puestas a germinar. La placa de la izquierda corresponde al ensayo con una solución  $10^3$  M de 2-exo-hidroxicineol sintético (producto N° 3) y la de la derecha al ensayo blanco.*



*Figura 42. Plántulas de lechuga dispuestas para las mediciones correspondientes luego de germinadas durante 5 días. Las hileras, de arriba hacia abajo, corresponden a semillas tratadas con: una solución  $10^3$  M de 2-exo-hidroxicineol sintético, una solución  $10^6$  M del mismo producto, blanco del ensayo.*

En la Tabla 38 se muestran las medias porcentuales de las proporciones de germinación para los diferentes productos ensayados. Allí se remarcan los resultados con significancia estadística a dos niveles ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ ). La germinación disminuyó

significativamente respecto al control en las semillas de lechuga tratadas con las soluciones  $10^{-3}$  M de todos los productos menos 1,8-cineol. Para la germinación de semillas de trigo no se encontraron diferencias entre el blanco y ninguna de las dos diluciones testeadas de cada producto. Este resultado estaría dando una pauta sobre cierta selectividad en la acción de los compuestos ensayados, ya que tienen acción sobre una dicotiledónea y no sobre una monocotiledónea.

El gráfico de la Figura 43 muestra las variaciones en la germinación de semillas de lechuga en presencia de los productos en estudio respecto al blanco. En el mismo solo se muestran los resultados que tuvieron un nivel de significancia estadística  $P < 0,01$ . Allí se puede observar que en todos los tratamientos con soluciones  $10^{-3}$  M, la germinación se redujo en el entorno de 15 puntos porcentuales, excepto con (-)-2-*exo*-hidroxicineol que fue el inhibidor más potente con una disminución de 46 puntos porcentuales. Los otros productos que mostraron actividad inhibitoria menor a la del (-)-2-*exo*-hidroxicineol, lo contienen en alguna proporción. El producto YMPG contiene aproximadamente un 23%, el alcohol sintético en el entorno del 50% y el acetato puede originarlo si se diera la hidrólisis en el medio. Por lo tanto, cabe plantear la hipótesis de que todas las actividades inhibitorias de la germinación con alto grado de significancia estadística, se deban a este enantiómero. Por otro lado se observa un efecto promotor de la germinación cuando el (+)-2-*exo*-hidroxicineol es aplicado en solución  $10^{-6}$  M, efecto que se revierte al elevar la concentración a  $10^{-3}$  M (pero siendo este último un resultado con un nivel de significancia menor). Este fenómeno ocurre en ocasiones, pues la respuesta bioquímica y/o fisiológica de un organismo frente a un aleloquímico no es siempre lineal. Muchos aleloquímicos son inhibidores a concentraciones de milimoles y estimulan los parámetros medidos a concentraciones de micromoles (Leather & Einhellig, 1988). Macías y colaboradores reportaron efectos estimulatorios en lechuga a bajas concentraciones de terpenoides tipo iononas, que se revertían al aumentar la concentración (Macías et al., 1999).

Producto	LECHUGA			TRIGO		
	blanco	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-3</sup> M	blanco	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-3</sup> M
1) YMPG	64,0	54,4	<b>48,0</b> <sup>(a)</sup>	96	100	100
2) CM	80,8	82,4	<b>68,0</b> <sup>(b)</sup>	96	100	94
3) (±)-2-exo	59,2	53,6	<b>43,2</b> <sup>(a)</sup>	98	100	100
4) (+)-2-exo	23,2	<b>42,4</b> <sup>(a)</sup>	<b>9,6</b> <sup>(b)</sup>	92	98	94
5) (-)-2-exo	48,0	40,0	<b>1,6</b> <sup>(a)</sup>	100	90	100
6) Acetato	44,0	51,2	<b>28,0</b> <sup>(a)</sup>	92	92	98
7) 1,8-cineol	92,0	79,2	92,0	96	98	93

Tabla 38. Medias de las proporciones porcentuales de germinación para cada producto ensayado. Los productos se numeraron de acuerdo a lo indicado en la Sección 2.7, y estos corresponden a: 1) YMPG = mezcla de los hidroxicineoles productos de reacción de la biotransformación de 1,8-cineol en YMPG (Tabla 21, Sección 2.7), 2) CM = los mismo para CM, 3) (±)-2-exo = 2-exo-hidroxicineol sintético, 4) (+)-2-exo = 2-exo-hidroxicineol obtenido y aislado de la biotransformación de 1,8-cineol en CM, 5) (-)-2-exo = 2-exo-hidroxicineol obtenido de la hidrólisis del acetato (producto 6), 6) Acetato = acetato de (-)-2-exo-hidroxicineol obtenido por acetilación enzimática, 7) 1,8-cineol puro. En negrita se destacan las medias cuyas diferencias con el blanco resultaron estadísticamente significantes: (a)  $P < 0,01$ , (b)  $P < 0,05$ .

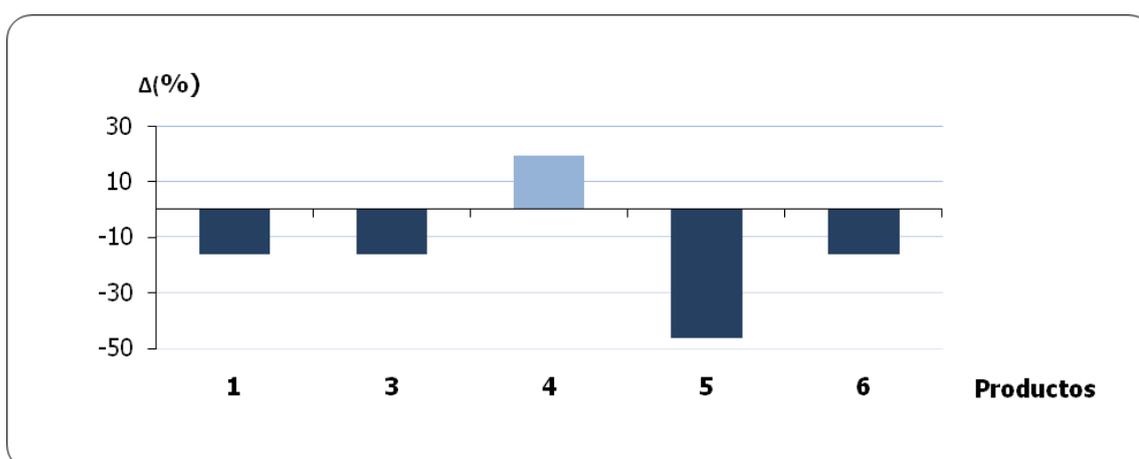


Figura 43. Diferencia en los porcentajes de las proporciones de germinación de semillas de lechuga entre las soluciones ensayadas y el blanco correspondiente. Se presentan solamente para los ensayos que arrojaron diferencias estadísticamente significativas con un nivel  $P < 0,01$ . El número asignado a cada producto es el indicado en la Sección 2.7 y la Tabla 38. Las columnas en oscuro corresponden a la concentración 10<sup>-3</sup>M y en claro a 10<sup>-6</sup>M.

El desarrollo de los tallos de lechuga se vio disminuido con todos los productos ensayados en soluciones  $10^{-3}M$  excepto con el 1,8-cineol, como se muestra en la Tabla 39, con el nivel de significancia ahí expresado. En el gráfico de la Figura 44 se muestran las afectaciones (inhibitorias o estimuladoras) del desarrollo de los tallos (hipocótilos), expresadas como porcentajes respecto del control, solamente cuando estas tuvieron un nivel de significancia  $P < 0,01$ . Los productos que disminuyeron el desarrollo del tallo lo hicieron en el entorno del 20 %, excepto el de mayor actividad que resultó nuevamente el enantiómero levógiro del 2-*exo*-hidroxicineol, el que provocó una disminución de casi un 40 % respecto del control (Figura 44). A las diluciones de  $10^{-6}M$  no se observó acción significativa, excepto cuando se aplicó el 1,8-cineol, quien lejos de inhibir estimuló el desarrollo del tallo en un 32 %.

Sobre los tallos de trigo también hubieron efectos inhibitorios pero menos pronunciados que en lechuga (Tabla 39). Sólo existió disminución del crecimiento del tallo (epicótilo) de trigo con alto nivel de significancia con tres de los siete productos, y en ningún caso esta inhibición fue mayor al 20 % respecto al blanco (Figura 45). Al igual que con la lechuga se observó un fuerte efecto promotor del crecimiento con solución diluidas de 1,8-cineol. Como en el caso de la germinación, puede hablarse de selectividad del producto con mayor actividad hacia la lechuga. Otra vez el (-)-2-*exo*-hidroxicineol resultó ser el más activo y afectó exclusivamente al desarrollo de la dicotiledónea.

Producto	LECHUGA			TRIGO		
	blanco	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-3</sup> M	blanco	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-3</sup> M
1) YMPG	0.62	<b>0.55</b> <sup>(b)</sup>	<b>0.47</b> <sup>(a)</sup>	4.42	4.24	<b>4.03</b> <sup>(b)</sup>
2) CM	1.13	1.15	<b>0.90</b> <sup>(b)</sup>	6.16	6.53	<b>5.43</b> <sup>(a)</sup>
3) (±)-2-exo	0.57	0.49	<b>0.42</b> <sup>(a)</sup>	4.42	4.17	<b>3.54</b> <sup>(a)</sup>
4) (+)-2-exo	1.25	1.10	<b>1.01</b> <sup>(a)</sup>	5.14	4.96	<b>4.54</b> <sup>(b)</sup>
5) (-)-2-exo	1.21	1.20	<b>0.75</b> <sup>(a)</sup>	4.45	4.79	4.38
6) Acetato	0.45	0.42	<b>0.32</b> <sup>(a)</sup>	3.97	3.91	<b>3.58</b> <sup>(a)</sup>
7) 1,8-cineol	0.84	<b>1.11</b> <sup>(a)</sup>	0.90	2.60	<b>4.16</b> <sup>(a)</sup>	2.51

Tabla 39. Medias de los desarrollos de tallo (cm). Los productos son los mismos que se indican en la tabla 38. En negrita se destacan las medias cuyas diferencias con el blanco resultaron estadísticamente significantes: (a)  $P < 0,01$ , (b)  $P < 0,05$ .

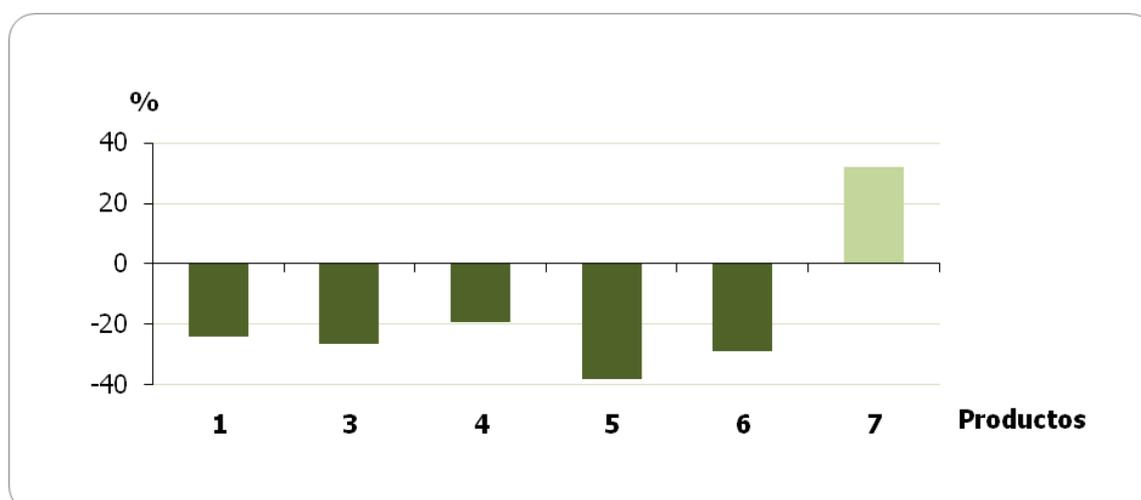


Figura 44. Efectos sobre el desarrollo del tallo de lechuga, expresados como porcentaje respecto del control. El número asignado a cada producto es el indicado en la Sección 2.7 y la Tabla 39. Las columnas en oscuro corresponden a la concentración 10<sup>-3</sup>M y en claro a 10<sup>-6</sup>M.

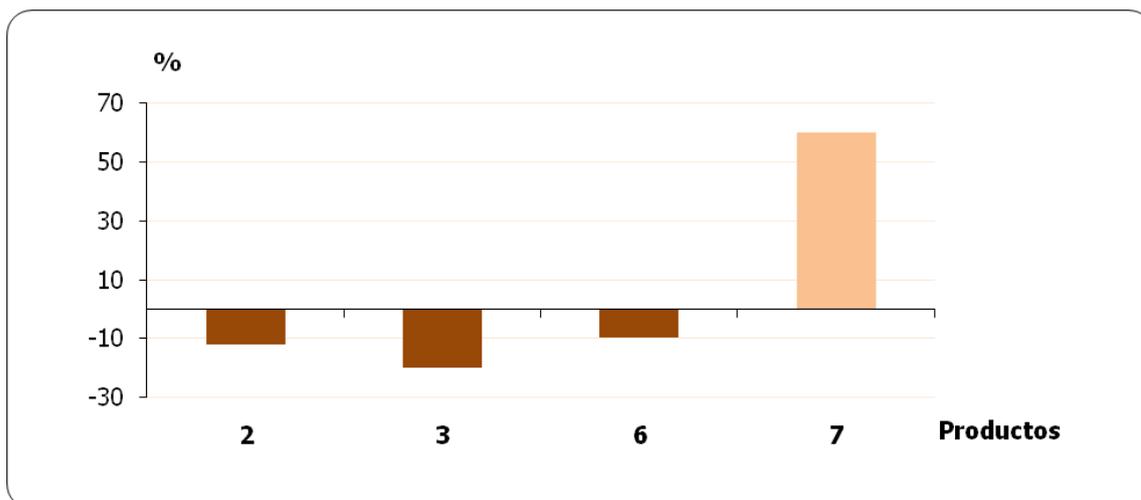


Figura 45. Efectos sobre el desarrollo del tallo de trigo, expresados como porcentaje respecto del control. El número asignado a cada producto es el indicado en la Sección 2.7 y la Tabla 39. Las columnas en oscuro corresponden a la concentración  $10^{-3} M$  y en claro a  $10^{-6} M$ .

Respecto al desarrollo de las raíces, en la Tabla 40 se presentan las longitudes medias de las mismas luego de los diferentes tratamientos. Los resultados con un nivel de significancia  $P < 0,01$  se muestran en los gráficos de las Figuras 46 y 47, para lechuga y trigo respectivamente. La raíz de lechuga se vio fuertemente afectada en forma detrimental por las soluciones  $10^{-3} M$  de ambos enantiómeros del 2-*exo*-hidroxicineol cuando fueron ensayados por separado. Extrañamente no se observó efecto alguno al ensayar el alcohol sintético. El efecto más pronunciado fue nuevamente el debido al enantiómero levógiro del alcohol, inhibiendo el desarrollo de la raíz casi un 70% respecto del blanco. Como con el tallo, el 1,8-cineol mostró un efecto promotor del desarrollo de la raíz, pero esta vez tanto con soluciones del orden de los mili como micromoles.

El efecto sobre las raíces de trigo mostrados en la Figura 47, son similares a los obtenidos sobre el tallo. Los mismos tres compuestos (productos de caldo malta, hidroxicineol sintético y acetato de hidroxicineol) son los que mostraron actividad significativa, con efectos detrimentales de entre un 10 y un 20% respecto del control. También el cineol se mostró como un potente promotor del crecimiento, al ser ensayado en concentración  $10^{-6} M$ . Ninguno de los dos enantiómeros tuvo actividad sobre la raíz de trigo con un nivel de significancia alto. Esto nuevamente es indicativo de determinada selectividad de los productos por la dicotiledónea.

Producto	LECHUGA			TRIGO		
	blanco	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-3</sup> M	blanco	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-3</sup> M
1) YMPG	0.45	0.46	0.47	8.25	8.03	8.16
2) CM	0.95	<b>0.79<sup>(b)</sup></b>	0.80	9.68	9.11	<b>7.86<sup>(a)</sup></b>
3) (±)-2-exo	0.59	0.45	0.58	8.08	8.07	<b>7.00<sup>(a)</sup></b>
4) (+)-2-exo	2.04	2.14	<b>1.11<sup>(a)</sup></b>	7.19	<b>6.19<sup>(b)</sup></b>	<b>6.41<sup>(b)</sup></b>
5) (-)-2-exo	1.77	2.08	<b>0.55<sup>(a)</sup></b>	5.98	5.84	6.04
6) Acetato	0.35	0.35	0.32	7.71	7.58	<b>6.84<sup>(a)</sup></b>
7) 1,8-cineol	0.9	<b>1.54<sup>(a)</sup></b>	<b>1.16<sup>(a)</sup></b>	3.39	<b>7.45<sup>(a)</sup></b>	3.06

Tabla 40. Medias de los desarrollos de raíz (cm). En negrita se destacan las medias cuyas diferencias con el blanco resultaron estadísticamente significativas: (a)  $P < 0,01$ , (b)  $P < 0,05$ .

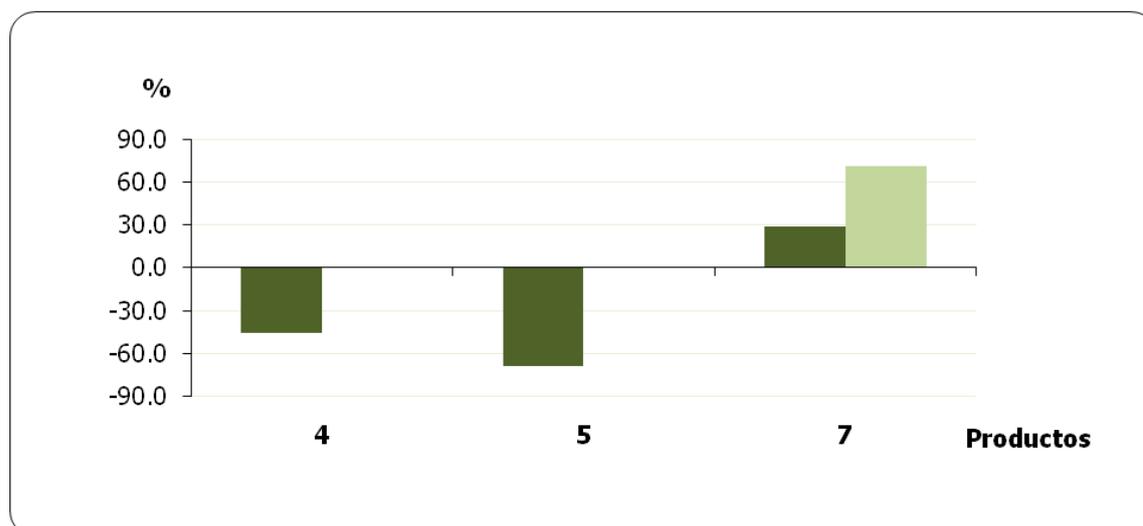


Figura 46. Efectos sobre el desarrollo de la raíz de lechuga, expresados como porcentaje respecto del control. El número asignado a cada producto es el indicado en la Sección 2.7 y la Tabla 40. Las columnas en oscuro corresponden a la concentración 10<sup>-3</sup>M y en claro a 10<sup>-6</sup>M.

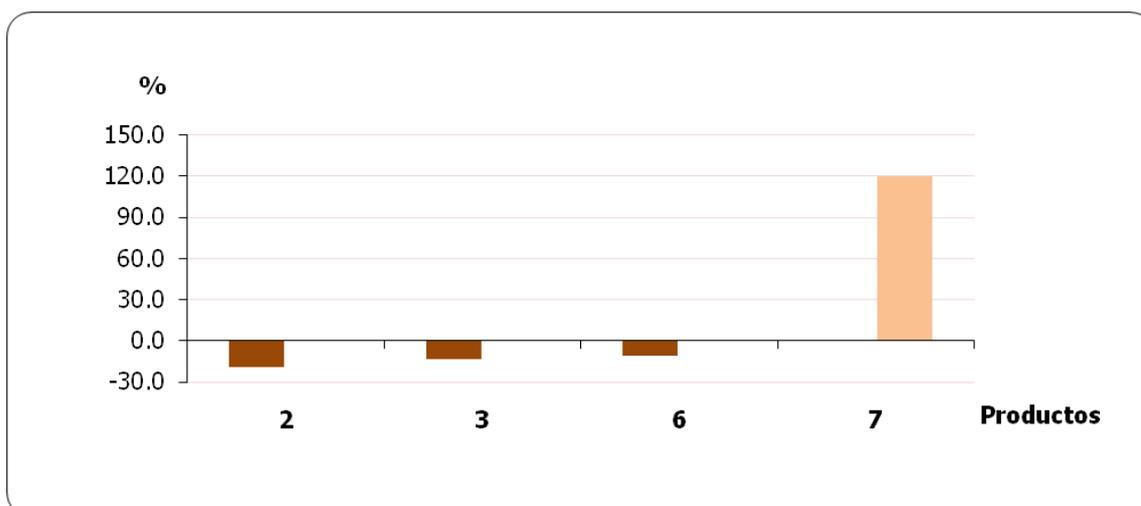


Figura 47. Efectos sobre el desarrollo de la raíz de trigo, expresados como porcentaje respecto del control. El número asignado a cada producto es el indicado en la Sección 2.7 y la Tabla 40. Las columnas en oscuro corresponden a la concentración  $10^3$  M y en claro a  $10^6$  M.

Tomando en cuenta la globalidad de los resultados de los ensayos de bioactividad, se observa cierta diferencia de actividad entre los dos enantiómeros del 2-*exo*-hidroxicineol. Si bien ninguno es significativamente activo sobre el trigo, el enantiómero levógiro presenta efectos más pronunciados que su contraparte destrógiro en lo que refiere a desarrollos de tallo y raíz de lechuga (Figuras 44 y 46). Este aspecto no es novedoso. Por ejemplo Reynolds observó que la (+)-carvona afectaba la germinación de semillas de lechuga a concentraciones  $10^{-5}$  M, mientras que la (-)-carvona lo hacía a concentraciones superiores a  $10^{-4}$  M (Reynolds, 1987). Muchos pesticidas comerciales son una mezcla de estereoisómeros, los cuales a menudo presentan actividades biológicas diferentes (Sekhon, 2009).

Otro hecho que puede llamar la atención fue la actividad del 1,8-cineol, siendo este un reconocido aleloquímico. Este compuesto no afectó la germinación de ninguna de las especies probadas, y resultó un promotor del desarrollo de raíces y tallos de ambas especies al ser tratadas con soluciones  $10^{-6}$  M. Angelini y colaboradores reportaron efectos inhibidores en la germinación de semillas de diferentes malezas y cultivos (entre ellos lechuga) al ser tratados con aceites esenciales que contienen 1,8-cineol entre sus principales componentes; pero no observaron diferencias significativas con el control al aplicar este monoterpeno solo (Angelini et al, 2003). Por otra parte, Romagni y colaboradores encontraron efectos inhibitorios del 1,8-cineol en la germinación y en el desarrollo de raíces de una mono y una dicotiledónea, pero utilizando especies vegetales y

un tipo de bioensayo totalmente diferente al del presente trabajo, lo que hace inviable la comparación (Romagni et al, 2000a). Nishida y colaboradores encontraron que el 1,8-cineol inhibió la germinación de semillas de *Brassica campestris* y el desarrollo de la raíz, no así el tallo (Nishida et al., 2005). Nuevamente la especie ensayada y el bioensayo son diferentes a lo realizado en este trabajo, por lo que no resulta adecuada su comparación. Como se mencionó en la Introducción (Sección 1.4), la alelopatía es un fenómeno ecológico complejo, y el hecho de que un aleloquímico presente actividad en determinadas condiciones, no implica que la misma se reitere bajo otras circunstancias (Weidenhamer, 2008). Los resultados obtenidos bajo las condiciones de este trabajo no refutan en absoluto el hecho de que el 1,8-cineol sea un compuesto con actividad fitotóxica. Pero sí demuestran que los derivados ensayados poseen una actividad mucho más promisoriosa que su predecesor en la búsqueda de un potencial herbicida.

En suma, el (-)-2-*exo*-hidroxicineol fue el único compuesto que presentó actividades detriminales en los tres efectos biológicos evaluados. Más aún, para cada uno de los parámetros fue el compuesto que presentó mayor actividad, y la misma fue selectiva sobre una dicotiledónea, no afectando de manera significativa a la monocotiledónea. Estos resultados primarios deben tomarse como punto de partida para estudios más profundos hacia el desarrollo de un potencial herbicida de aplicación en campo. Entre otras cosas se debe tener en cuenta que la concentración a la que fue activo ( $10^{-3}$  M) está en el límite para ser considerado un buen candidato como modelo de herbicida natural (Macías et al., 1995). No obstante, los resultados de este primer nivel de evaluación de bioactividad son muy promisorios. A partir de los mismos se puede inferir que se estaría en presencia de un compuesto líder hacia la obtención de un herbicida selectivo de origen natural.

## 4. CONCLUSIONES

---

La biotransformación de monoterpenos mediante hongos filamentosos es una herramienta potencialmente muy útil para la obtención de compuestos con mayor valor agregado. Sin embargo presenta diferentes dificultades prácticas, como ser la volatilidad del sustrato y los productos de bioconversión, y la pérdida de estos compuestos por acumulación en la membrana fúngica. Por ello, la metodología de extracción de los productos de una bioconversión a microorganismo entero, puede condicionar fuertemente los rendimientos obtenidos. Para el sistema en estudio, la extracción directa desde el medio de cultivo con diclorometano y el lavado de la biomasa remanente con el mismo solvente, resultó ser el método más eficaz para recuperar sustrato y productos de biotransformación.

Bajo las diferentes condiciones ensayadas se logró la bioconversión del  $\alpha$ -limoneno por parte de una cepa de *Aspergillus niger*. En la literatura consultada la gran mayoría de los antecedentes de bioconversión de  $\alpha$ -limoneno mediante *A. niger* dan cuenta de transformaciones nulas o muy escasas. Un aspecto clave parecería ser que en la mayoría de los reportes se experimentó con cepas de colección de cultivos, no adaptadas al monoterpeno; mientras que en el presente trabajo se utilizó una cepa aislada de una fuente natural rica en el sustrato. No obstante los porcentajes de bioconversión fueron bajos.

La capacidad de biotransformación de la cepa de *A. niger* ensayada, está fuertemente condicionada por el medio de cultivo así como por la geometría del sistema, tanto en lo referido al tipo como la cantidad de productos obtenidos. En líneas generales se observó una mayor variabilidad en el tipo de productos cuando la biotransformación se realizó en un fermentador respecto a cuándo se llevó a cabo en matraces dispuestos en un agitador orbital. En cuanto al medio de cultivo, se observó una predominancia de hidroxilaciones alílicas en TSB y formación de terpineoles y alcohol perílico en CM.

El hecho de que los tipos de productos obtenidos varíen tan fuertemente con las condiciones ambientales, sumado a los magros porcentajes de bioconversión, y a los ya

mencionados problemas de volatilidad, llevan a concluir que resulta inviable proyectar una explotación de esta cepa para la valorización del limoneno.

Más allá de los porcentajes de bioconversión, mediante el uso de un inhibidor enzimático se logró una biotransformación regioespecífica del limoneno. El producto obtenido fue el alcohol perílico, un potencial anticancerígeno, cuya producción a partir del sustrato estaría mediada por una enzima que no inhibe su actividad a pesar del agregado de ketoconazol. Por lo tanto el uso de inhibidores enzimáticos se presenta como una metodología útil a la hora de dirigir los resultados de la bioconversión hacia productos específicos.

La biotransformación de 1,8-cineol mediante *Aspergillus terreus*, a diferencia de lo ocurrido con el limoneno, ocurre con poca variabilidad de productos más allá de las condiciones ensayadas. Prácticamente en su totalidad se obtuvieron productos de la hidroxilación del cineol en alguno de sus metilenos. En general las reacciones fueron estereoselectivas en todos los medios ensayados, predominando la isomería *exo* frente a la *endo* en una relación promedio de 9 a 1. El 2-*exo*-hidroxicineol fue el producto mayoritario bajo todas las condiciones, destacándose en CM donde llegó a representar el 95% del total de los productos de biotransformación. Sin embargo, el medio nutriente sí influyó en la enantioselectividad: para el 2-*exo*-hidroxicineol la biotransformación fue enantioespecífica al realizarse en CM, y rindió prácticamente una mezcla racémica al llevarse a cabo en YMPG.

Para la bioconversión de 1,8-cineol se halló un rendimiento muy bajo (3,3 % en el día 7 de reacción), probablemente consecuencia de la volatilidad de los monoterpenos. Como se mencionó al principio de esta sección, la volatilización es una de las principales dificultades prácticas que se encuentran al biotransformar monoterpenos. Por lo tanto, a la hora de buscar buenos rendimientos no parece ser adecuado el uso de los sistemas tradicionales de matraces dispuestos en agitadores.

Por otra parte, es posible la utilización del aceite esencial de *Eucalyptus* directamente como fuente del sustrato de la biotransformación. Al hacerlo no se observó variación significativa en la actividad biocatalítica del hongo, y el perfil de los productos obtenidos no varió respecto a cuándo se realizó la bioconversión con cineol puro como sustrato.

De los resultados obtenidos con los dos sistemas biocatalizador/sustrato (*A.niger*/limoneno y *A.terreus*/cineol) se puede concluir que los parámetros ambientales y nutricionales pueden afectar significativamente las biotransformaciones con microorganismos enteros, particularmente hongos filamentosos. Estas variaciones pueden ocurrir tanto en la cantidad como en el tipo de productos obtenidos. Esto es algo que muchas veces no se tiene en cuenta, ya que se asocia determinado biocatalizador a una reacción de bioconversión dada sin importar las condiciones.

La esterificación de los hidroxicineoles catalizada por una lipasa comercial de *Candida rugosa* y utilizando acetato de vinilo como donador de acilo, resultó ser una reacción regio- y enantioespecífica. Pero no se obtuvo producto alguno al intentar la esterificación con otros ésteres de vinilo (butirato, laureato y estearato) ni utilizando una lipasa de páncreas porcino como catalizador. Por lo tanto la búsqueda de ésteres derivados de los hidroxicineoles mediante catálisis enzimática dio lugar a un único producto, el (-)- acetato de 2-*exo*-hidroxicineol.

Mediante la combinación de bioconversiones a célula entera y con enzimas aisladas, fue posible obtener los enantiómeros (+) y (-)-2-*exo*-hidroxicineol, con un exceso enantiomérico > 98%, a partir de una molécula ópticamente inactiva como el 1,8-cineol.

Aplicando un bioensayo específico y mediante un tratamiento estadístico apropiado, se logró evaluar y comparar la potencial actividad herbicida del 1,8-cineol, sus productos de biotransformación fúngica y los derivados obtenidos por catálisis enzimática.

El (-)-2-*exo*-hidroxicineol presentó actividades inhibitorias en los tres efectos biológicos evaluados, y selectivamente sobre la especie dicotiledónea, cuando fue aplicado en concentración del orden de los milimoles. Por ello, se puede concluir que dicho compuesto resulta un promisorio modelo para la obtención de un herbicida selectivo de origen natural.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

---

- Abeywickrama K, Adhikari AACK, Paranagama P, Gamage CSP (2006) "The efficacy of essential oil of *Alpinia calcarata* (Rosc.) and its major constituent, 1,8-cineole, as protectants of cowpea against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae)". *Can J Plant Sci*, **86**, 3, 821-827.
- Abraham WR, Stumpf B, Kieslich K (1986) "Microbial transformations of terpenoids with 1-p-menthene skeleton". *Appl Microbiol Biotechnol*, **24**, 24–30.
- Adams RP (2007) "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy". 4<sup>th</sup> ed. Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL, USA.
- Adams A, Demyttenaere JCR, De Kimpe N (2003) "Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-limonene to  $\alpha$ -terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of the culture conditions". *Food Chem*, **80**, 525–534.
- Adams JM, Constable JVH, Guenther AB, Zimmerman P (2001) "An estimate of natural volatile organic compound emissions from vegetation since the last glacial maximum". *Chemosphere (Global Change Science)*, **3**, 73–91.
- Adrio JL & Demain AL (2003) "Fungal biotechnology". *Int Microbiol*, **6**, 191–199.
- Aguirre-Pranzoni CB, Furque GI, Ardanaz CE, Pacciaroni A, Sosa V, Tonn CE, Kurina-Sanz M (2011) "Biotransformation of dihydrocoumarin by *Aspergillus niger* ATCC 11394". *Arkivoc*, **2011**, 170-181.
- Ahmed EM, Dennison RA, Dougherty RH, Shaw PE (1978) "Flavor and Odor Thresholds in Water of Selected Orange Juice Components". *J Agr Food Chem*, **26**, 1, 187–191.
- Aleu J, Bustillo AJ, Hernández-Galán R, Collado IG (2006) "Biocatalysis Applied to the Synthesis of Agrochemicals". *Curr Org Chem*, **10**, 16, 2037-2054.
- Alsaadawi IS, Rice EL, Karns TKB (1983) "Allelopathic effects of *Polygonum aviculare* L." *J Chem Ecol*, **9**, 6, 761-774.
- Anandaraman S & Reineccius GA (1986) "Stability of Encapsulated Orange Peel Oil". *Food Technol – Chicago*, **40**, 11, 88–93.

- Anastas PT & Warner JC (1998) "Green Chemistry: Theory and Practice". Oxford University Press, Oxford.
- Angelini LG, Carpanese G, Cioni PL, Morelli I, Macchia M, Flamini G (2003) "Essential Oils from Mediterranean Lamiaceae as Weed Germination Inhibitors". *J Agr Food Chem*, **51**, 21, 6158–6164.
- Aparicio S, Alcalde R, Dávila MJ, García B, Leal JM (2007) "Properties of 1,8-Cineole: A Thermophysical and Theoretical Study". *J Phys Chem B*, **111**, 3167-3177.
- Arruda DC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Katzin AM, Uliana SRB (2009) "Inhibitory activity of limonene against Leishmania parasites in vitro and in vivo". *Biomed Pharmacother*, **63**, 9, 643-649.
- Arundel AV, van Beuzekom B, Gillespie I (2007) "Defining biotechnology - carefully". *Trends Biotechnol*, **25**, 8, 331-332.
- Asakawa Y, Matsuda R, Tori M, Hashimoto T (1988) "Preparation of biologically active substances and animal and microbial metabolites from menthols, cineoles and kauranes". *Phytochemistry*, **27**, 12, 3861-3869.
- Asperger O, Steinbrenner H, Lehmann A, Petsch M, Griengl H (1999) "Induction and functional role of cytochromes P450 in the filamentous fungi *Mortierella alpina* ATCC 8979 and *Cunninghamella blakesleeana* DSM 1906 during hydroxylation of cycloalkylbenzoxazoles" *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 516-522.
- Azevedo JL (2001) "O uso dos fungos na biotecnologia" en "Biotecnología na agricultura e na agroindústria", Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL (coords.). Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, Brasil.
- Badee AZM, Helmy SA, Morsy NFS (2011) "Utilisation of orange peel in the production of  $\alpha$ -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202)". *Food Chem*, **126**, 849-854.
- Bernhardt R (2006) "Cytochromes P450 as versatile biocatalysts". *J Biotechnol*, **124**, 128-145.
- Berovic M & Legisa M (2007) "Citric acid production". *Biotech Ann Rev*, **13**, 303-343.
- Bicas JL, Fontanille P, Pastore GM, Larroche C (2010) "A bioprocess for the production of high concentrations of R-(+)- $\alpha$ -terpineol from R-(+)-limonene". *Process Biochem*, **45**, 481–486.

- Bicas JL, Fontanille P, Pastore GM, Larroche C (2008a) "Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads". *J Appl Microbiol*, **105**, 1991-2001.
- Bicas JL, Barros FFC, Wagner R, Godoy HT, Pastore GM (2008b) "Optimization of *R*-(+)- $\alpha$ -terpineol production by the biotransformation of *R*-(+)-limonene". *J Ind Microbiol Biot*, **35**, 1061-1070.
- Billany MR, Denman S, Jameel S, Sugden JK (1995) "Topical antirheumatic agents as hydroxyl radical scavengers". *Int J Pharm*, **124**, 279-283.
- Bisogno FR, Orden AA, Aguirre Pranzoni C, Cifuentes DA, Giordano OS, Kurina Sanz M (2007) "Atypical regioselective biohydrolysis on steroidal oxiranes by *Aspergillus niger* whole cells: Some stereochemical features". *Steroids*, **72**, 643-652.
- Bitteur SM, Baumes RL, Bayonove CL, Versini G, Martin CA, Dalla Serra A (1990) "2-*exo*-Hydroxy-1,8-cineole: A New Component from Grape Var. Sauvignon". *J Agr Food Chem*, **38**, 1210-1213.
- Boon PJM, van der Boon D, Mulder GJ (2000) "Cytotoxicity and Biotransformation of the Anticancer Drug Perillyl Alcohol in PC12 Cells and in the Rat". *Toxicol Appl Pharm*, **167**, 55-62.
- Borges KB, Borges WS, Durán-Patrón R, Pupo MT, Bonato PS, González I (2009) "Stereoselective biotransformation using fungi as biocatalysts". *Tetrahedron Asymmetr*, **20**, 385-397.
- Bowen ER (1975) "Potential by-products from microbial transformations of d-limonene". *P Fl St Hort Soc*, **88**, 304-308.
- Boyle R, McLean S, Davies NW (2000) "Biotransformation of 1,8-cineole in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*)". *Xenobiotica*, **30**, 9, 915-932.
- Braddock RJ & Cadwallader KR (1995) "Bioconversion of Citrus *d*-Limonene" en "Fruit Flavors: Biogenesis, Characterization and Authentication", Rouseff RL & Leahy MM (eds.). ACS Symposium Series, 596. American Chemical Society, Washington, DC.
- Bruneton, J (1995) "Pharmacognosy: Phytochemistry, Medicinal Plants". Intercept Ltd., Andover, England.
- Bull SD, Carman RM, Carrick FN, Klika KD (1993) "7-Hydroxy-1,8-cineole and 7-Cineolic Acid. Two New Possum Urinary Metabolites". *Aust J Chem*, **46**, 441-447.

- Bu'lock JD (1991) "Introducción a la biotecnología básica" en "Biotecnología Básica", Bu'lock J & Kristiansen B. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Burton SG (2003) "Lacasses and Phenol Oxidases in Organic Synthesis – a Review". *Curr Org Chem*, **7**, 13, 1317 - 1331.
- Cadwallader KR, Braddock RJ, Parish ME, Higgins DP (1989) "Bioconversion of (+)-Limonene by *Pseudomonas gladiol*". *J Food Sci*, **54**, 5, 1241-1245.
- Calvarano M, Calvarano I, Dellacassa E, Menéndez P, Di Giacomo A (1989) "Su alcune essenze di "mandarino" dell'Uruguay". *Essenze-Derivati Agrumari*, **59**, 397-406.
- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP (2002) "Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development". *Microbiol Mol Biol R*, **66**, 3, 447-459.
- Capotorti G, Digianvincenzo P, Cesti P, Bernardi A, Guglielmetti G (2004) "Pyrene and benzo(a)pyrene Metabolism by an *Aspergillus terreus* Strain Isolated from a Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Polluted Soil". *Biodegradation*, **15**, 2, 79-85.
- Cardozo-Filho L, Ferrua FQ, Meireles MAA (1997) "Estudo no processo da extração supercrítica de óleos essenciais de produtos naturais". *Cienc Tecnol Aliment*, **17**, 4, 449-455.
- Carey F & Sundberg R (1990) "Advanced Organic Chemistry". 3<sup>rd</sup> ed. Plenum Press, New York.
- Carlile MJ & Watkinson SC (1994) "The Fungi". Academic Press Ltd., London.
- Carman RM & Fletcher MT (1984) "The Isomeric 1,3,3-Trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octan-6-ols (2-Hydroxy-1,8-cineoles)". *Aust J Chem*, **37**, 1117-1122.
- Carman RM & Garner AC (1996) "7,9-Dihydroxy-1,8-cineole and 2- $\alpha$ ,7-Dihydroxy-1,8-cineole. Two New Possum Urinary Metabolites". *Aust J Chem*, **49**, 741-749.
- Carman RM, Garner AC, Klika KD (1994) "2,9-Dihydroxy- and 2,10-Dihydroxy-1,8-cineole. Two New Possum Urinary Metabolites". *Aust J Chem*, **47**, 1509-1521.
- Carman RM & Klika KD (1992) "Partially Racemic Compounds as Brushtail Possum Urinary Metabolites". *Aust J Chem*, **45**, 651-657.
- Carman RM & Rayner AC (1994) "2- $\alpha$ ,4-Dihydroxy-1,8-cineole. A New Possum Urinary Metabolite". *Aust J Chem*, **47**, 2087-2097.

- Carman RM, Robinson WT, Wallis CJ (2005) "The 3-hydroxycineoles". *Aust J Chem*, **58**, 785-791.
- Chamblee TS, Clark BC, Brewster GB, Radford T, Jacobucci G (1991) "Quantitative Analysis of the Volatile Constituents of Lemmon Peel Oil. Effects of Silica Gel Chromatography on the Composition of its Hydrocarbon and Oxygenated Fractions". *J Agr Food Chem*, **39**, 162-169.
- Chan KK (2001) "Quantitation of monoterpenoid compounds with potential medicinal use in biological fluids". *J Chromatogr A*, **936**, 47-57.
- Chang HC & Oriel P (1994) "Bioproduction of Perillyl Alcohol and Related Monoterpenes by Isolates of *Bacillus stearothermophilus*". *J Food Sci*, **59**, 3, 660-662.
- Chatterjee T & Bhattacharyya DK (2001) "Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*". *Appl Microbiol Biotechnol*, **55**, 541-546.
- Chen ARM, Reese PB (2002) "Biotransformation of terpenes from *Stemodia maritima* by *Aspergillus niger* ATCC 9142". *Phytochemistry*, **59**, 57-62.
- Chen LJ, Lebetkin EH, Burka LT (2003) "Comparative disposition of (*R*)-(-)-pulegone in B6C3F1 mice and F344 rats". *Drug Metab Dispos*, **31**, 7, 892-899.
- Cheong TK & Oriel PJ (2000) "Cloning and Expression of the Limonene Hydroxylase of *Bacillus stearothermophilus* BR388 and Utilization in Two-Phase Limonene Conversions". *Appl Biochem Biotech*, **84-86**, 903-915.
- Choi HS (2003) "Characterization of *Citrus unshiu* (*C. unshiu* Marcov. forma Miyagawawase) Blossom Aroma by Solid-Phase Microextraction in Conjunction with an Electronic Nose". *J Agr Food Chem*, **51**, 2, 418-423.
- Clark G & Cameron S (2000) "Eucalyptol". *Perfum Flavor*, **25**, 6-16.
- Coppen J & Hone GA (1992) "Eucalyptus oils: a review of production and markets". *NRI Bull*, **56**, 45-75.
- Correia MA & Ortiz de Montellano PR (2005) "Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes" en "Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry", Ortiz de Montellano PR (ed.). 3<sup>rd</sup> ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Cresnar B & Petric S (2011) "Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom". *Biochim Biophys Acta*, **1814**, 29-35.
- Crossley R (1992) "The Relevance of Chirality to the Study of Biological Activity". *Tetrahedron*, **48**, 38, 8155 - 8178.

- Croteau RB, Lupien SL, Karp F (2000) "Recombinant materials and methods for the production of limonene hydroxylases" US Patent 6.083.731.
- Crowell PL, Chang RR, Ren Z, Elson CE, Gould MN (1991) "Selective Inhibition of Isoprenylation of 21-26 – kDa Proteins by the Anticarcinogen  $\alpha$ -limonene and Its Metabolites". *J Biol Chem*, **266**, 26, 17679–17685.
- Crowell PL, Kennan WS, Haag JD, Ahmad S, Vedejs E, Gould MN (1992) "Chemoprevention of mammary carcinogenesis by hydroxylated derivatives of  $\alpha$ -limonene". *Carcinogenesis*, **13**, 7, 1261–1264.
- Crueger W & Crueger A (1990) "Biotechnology. A Textbook of Industrial Microbiology". 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, U.S.
- Cygler M, Grochulski P, Kazlauskas RJ, Schrag JD, Bouthillier F, Rubin B, Serreqi AN, Gupta AK (1994) "A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases". *J Am Chem Soc*, **116**, 3180-3186.
- Da Costa CE, Comasseto JV, Crusius IHS, Andrade LH, Porto ALM (2007) "Biotransformation of  $\beta$ -hydroxyphenyl selenides, diphenyldiselenide, and benzeneseleninic acid by whole cells of *Aspergillus terreus*". *J Mol Catal B-Enzym*, **45**, 135–139.
- de Carvalho CCCR (2011) "Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes". *Biotechnol Adv*, **29**, 75–83.
- de Carvalho CCCR & da Fonseca MMR (2006) "Biotransformation of terpenes". *Biotechnol Adv*, **24**, 134-142.
- de Carvalho CCCR & da Fonseca MMR (2003) "Towards the bio-production of *trans*-carveol and carvone from limonene: induction after cell growth on limonene and toluene". *Tetrahedron Asymmetr*, **14**, 3925-3931.
- de Carvalho CCCR, van Keulen F, da Fonseca MMR (2000) "Biotransformation of Limonene-1,2-epoxide to Limonene-1,2-diol by *Rhodococcus erythropolis* Cells. An Introductory Approach to Selective Hydrolysis and Product Separation". *Food Technol Biotech*, **38**, 3, 181 – 185.
- de Oliveira BH & Strapasson RA (2000) "Biotransformation of the Monoterpene, Limonene, by *Fusarium verticilloides*". *Braz Arch Biol Techn*, **43**, 1, 11–14.
- de Raadt A & Griengl H (2002) "The use of substrate engineering in biohydroxylation". *Curr Opin Biotech*, **13**, 537 – 542.

- Deacon JW (2006) "Fungal Biology". 4<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Degenhardt J, Gershenzon J, Baldwin IT, Kessler A (2003) "Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies". *Curr Opin Biotech*, **14**, 2, 169–176.
- Degtyarenko KN "Directory of P450 – containing Systems", [www.icgeb.org/~p450srv/](http://www.icgeb.org/~p450srv/); consulta: enero, 2011.
- Dellacassa E, Moyna P, Dugo G, Di Giacomo A (1991a) "Los aceites esenciales cítricos del Uruguay. Nota preliminar. La citricultura y la industria de procesamiento cítrico en el Uruguay. Antecedentes y perspectivas". *Essenze-Derivati Agrumari*, **61**, 16–31.
- Dellacassa E, Rossini C, Moyna P, Stagno D'Alcontres I, Mondello L, Dugo G (1991b) "Gli olii essenziali dell'Uruguay. Nota II. Primi risultati sulla composizione della frazione volatile dell'olio essenziale di limone". *Essenze-Derivati Agrumari*, **61**, 291–304.
- Demain AL (2000) "Small bugs, big business: The economic power of the microbes". *Biotechnol Adv*, **18**, 499-514.
- Demyttenaere JCR, Adams A, Vanoverschelde J, De Kimpe N (2001) "Biotransformation of (*S*)-(+)-Linalool by *Aspergillus niger*: An Investigation of the Culture Conditions". *J Agr Food Chem*, **49**, 5895-5901.
- Demyttenaere J & De Kimpe N (2001) "Biotransformation of terpenes by fungi. Study of the pathways involved". *J. Molec. Cat. B: Enz.*, **11**, 265 – 270.
- Demyttenaere JCR & De Pooter HL (1998) "Biotransformation of citral and nerol by spores of *Penicillium digitatum*". *Flavour Fragr J*, **13**, 173 – 176.
- Demyttenaere JCR & De Pooter HL (1996) "Biotransformation of geraniol and nerol by spores of *Penicillium italicum*". *Phytochemistry*, **41**, 4, 1079–1082.
- Demyttenaere JCR, Herrera MC, De Kimpe N (2000) "Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp.". *Phytochemistry*, **55**, 363-373.
- Demyttenaere JCR, Van Belleghem K, De Kimpe N (2001) "Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening". *Phytochemistry*, **57**, 199-208.

- Demyttenaere JCR, Vanoverschelde J, De Kimpe N (2004) "Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextraction for screening". *J Chromatogr A*, **1027**, 137-146.
- Dess DB & Martin JC (1983) "Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones". *J Org Chem*, **48**, 4155-4156.
- Dhavalikar RS & Bhattacharyya PK (1966) "Microbiological Transformations of Terpenes: Part VIII – Fermentation of Limonene by a Soil Pseudomonad". *Indian J Biochem*, **3**, 144-157.
- Dhavalikar RS, Rangachari PN, Bhattacharyya PK (1966) "Microbiological Transformations of Terpenes: Part IX – Pathways of Degradation of Limonene in a Soil Pseudomonad". *Indian J Biochem*, **3**, 158-164.
- Divyashree MS, George J, Agrawal R (2006) "Biotransformation of terpenic substrates by resting cells of *Aspergillus niger* and *Pseudomonas putida* isolates". *J Food Sci Technol*, **43**, 1, 73-76.
- Dodds DR & Jones JB (1988) "Enzymes in Organic Synthesis. 38. Preparations of Enantiomerically Pure Chiral Hydroxydecalones via Stereospecific Horse Liver Alcohol Dehydrogenase Catalyzed Reductions of Decalindiones". *J Am Chem Soc*, **110**, 2, 577 – 583.
- dos Anjos JLV, Neto DS, Alonso A (2007) "Effects of 1,8-cineole on the dynamics of lipids and proteins of stratum corneum". *Int J Pharm*, **345**, 81-87.
- Dotolo V (1983) "Pesticides containing D-limonene". USP 4.379.168
- Draczynska-Lusiak B & Siewinski A (1989) "Enantioselectivity of the metabolism of some monoterpenic components of coniferous tree resin by *Armillariella mellea* (honey fungus)". *J Basic Microb*, **29**, 5, 269-275.
- Duetz WA, Bouwmeester H, van Beilen JB, Witholt B (2003) "Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants". *Appl Microbiol Biotechnol*, **61**, 269–277.
- Duetz WA, Fjällman AHM, Ren S, Jourdat C, Witholt B (2001) "Biotransformation of D-Limonene to (+)-*trans*-Carveol by Toluene-Grown *Rhodococcus opacus* PWD4 Cell". *Appl Environ Microb*, **67**, 6, 2829–2832.
- Duggleby HJ, Tolley SP, Hill CP, Dodson EJ, Dodson G, Moody PC (1995) "Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre". *Nature*, **373**, 6511, 264 – 268.

- Duisken M, Sandner F, Blömeke B, Hollender J (2005) "Metabolism of 1,8-cineole by human cytochrome P450 enzymes: Identification of a new hydroxylated metabolite". *Biochim et Biophys Acta*, **1722**, 304–311.
- Duke SO & Oliva A (2004) "Mode of Action of Phytotoxic Terpenoids" en "Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals", Macías FA, Galindo JCG, Molinillo JMG, Cutler HG (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Duke SO, Rimando AM, Duke MV, Paul RN, Ferreira JFS, Smeda RJ (1999) "Sequestration of Phytotoxins by Plants: Implications for Biosynthetic Production" en "Biologically active natural products: agrochemicals", Cutler HG & Cutler SJ (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Duke SO, Romagni JG, Dayan FE (2000) "Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action". *Crop Prot*, **19**, 583-589.
- Dursun AY, Uslu G, Cuci Y, Aksu Z (2003) "Bioaccumulation of copper(II), lead(II) and chromium(VI) by growing *Aspergillus niger*". *Process Biochem*, **38**, 12, 1647-1651.
- Easton CD, Jacob MV, Shanks RA (2009) "Fabrication and characterisation of polymer thin-films derived from cineole using radio frequency plasma polymerization". *Polymer*, **50**, 3465–3469.
- Edris AE (2007) "Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review". *Phytother Res*, **21**, 308–323
- Einhellig FA (1995a) "Allelopathy: Current Status and Future Goals" en "Allelopathy. Organisms, Processes, and Applications", Inderjit, Dakshini KMM, Einhellig FA (eds.). ACS Symposium Series 582. ACS, Washington DC.
- Einhellig, FA (1995b) "Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy" en "Allelopathy. Organisms, Processes, and Applications", Inderjit, Dakshini KMM, Einhellig FA (eds.). ACS Symposium Series 582. ACS, Washington DC.
- Elander RP (1991) "Examen de microorganismos, selección y mejora de cepas" en "Biotecnología Básica", Bu'lock J & Kristiansen B. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Esmaeili A, Sharafian S, Safaiyan S, Rezazadeh S, Rustaivan A (2009) "Biotransformation of one monoterpene by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp.". *Nat Prod Res*, **23**, 11, 1058-1061.
- Evans WC (1989) "Farmacognosia. Trease y Evans". 13ª ed. Editorial Interamericana – Mc Graw-Hill, México DF.

- Faber K (2000) "Biotransformations in Organic Chemistry. A Textbook". 4<sup>th</sup>. ed. Springer – Verlag, Berlin.
- Faramarzi MA, Yazdi MT, Amini M, Mohseni FA, Zarrini G, Amani A, Shafiee A (2004) "Microbial production of testosterone and testololactone in the culture of *Aspergillus terreus*". *World J Microb Biot*, **20**, 657-660.
- Farooq A, Atta-ur-Rahman, Choudhary MI (2004) "Fungal Transformation of Monoterpenes". *Curr Org Chem*, **8**, 353-366.
- Farooq A, Tahara S, Choudhary MI, Atta-ur-Rahman, Ahmed Z, Baser KHC, Demirci F (2002) "Biotransformation of (-)- $\alpha$ -Pinene by *Botrytis cinerea*". *Z Naturforsch, C, Biosci*, **57**, 303 – 306.
- Federación Europea de Biotecnología (1994) "Biotecnología en Alimentos y Bebidas". EFB, Grupo de Trabajo sobre las Percepciones Públicas de la Biotecnología, Boletín Nº 2.
- Federación Europea de Biotecnología (1999) "Biotecnología Medioambiental". EFB, Grupo de Trabajo sobre las Percepciones Públicas de la Biotecnología, Boletín Nº 4.
- Fichan I, Larroche C, Gros JB (1999) "Water Solubility, Vapor Pressure, and Activity Coefficients of Terpenes and Terpenoids". *J Chem Eng Data*, **44**, 56–62.
- Flynn TM & Southwell IA (1979) "1,3-Dimethyl-2-oxabicyclo[2,2,2]octane-3-methanol and 3-Dimethyl-2-oxabicyclo[2,2,2]octane-3-carboxylic Acid, Urinary Metabolites of 1,8-Cineole". *Aust J Chem*, **32**, 2093-2095.
- Fontanille P, Le Flèche A, Larroche C (2002) "*Pseudomonas rhodesiae* PF1: A New and Efficient Biocatalyst for Production of Isonovalal from  $\alpha$ -pinene oxide". *Biocatal Biotransfor*, **20**, 6, 413-421.
- Fu Y & Viraraghavan T (2003) "Column studies for biosorption of dyes from aqueous solutions on immobilised *Aspergillus niger* fungal biomass". *Water SA*, **29**, 4, 465-472.
- Furusawa M, Hashimoto T, Noma Y, Asakawa Y (2006) "Biotransformation of Aristolane- and 2,3-Secoaromadendrane-Type Sesquiterpenoids Having a 1,1-Dimethylcyclopropane Ring by *Chlorella fusca* var. *vacuolata*, *Mucor* Species, and *Aspergillus niger*". *Chem Pharm Bull*, **54**, 6, 861-868.

- Garcia DG, Amorim LMF, de Castro Faria MV, Freire AS, Santelli RE, Da Fonseca CO, Quirico-Santos T, Burth P (2010) "The anticancer drug perillyl alcohol is a Na/K-ATPase inhibitor". *Mol Cell Biochem*, **345**, 29–34.
- García C, Rodríguez P, Días E, Heinzen H, Menéndez P (2009) "Biooxidation of 1,8-cineole by *Aspergillus terreus*". *J Mol Catal B-Enzym*, **59**, 173–176.
- Gavrilescu M & Chisti Y (2005) "Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry". *Biotechnol Adv*, **23**, 471-499.
- Gerhardt P, Wood WA, Murray RG, Krieg NR (eds.) (1994) "Methods for General and Molecular Bacteriology". American Society for Microbiology, Washington DC.
- Gershenzon J (1994) "Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants". *J Chem Ecol*, **20**, 6, 1281 – 1328.
- Ghasemi Y, Mohagheghzadeh A, Moshavash M, Ostovan Z, Rasoul-Amini S, Morowvat MH, Ghoshoon MB, Raei MJ, Mosavi-Azam SB (2009) "Biotransformation of monoterpenes by *Oocystis pusilla*". *World J Microb Biot*, **25**, 1301–1304.
- Giraud F, Guiraud P, Kadri M, Blake G, Steiman R (2001) "Biodegradation of Anthracene and Fluoranthene by Fungi Isolated from an Experimental Constructed Wetland for Wastewater Treatment". *Wat Res*, **35**, 7, 4126 – 4136.
- Grayson BT, Williams KS, Freehauf PA, Pease RR, Ziesel WT, Sereno RL, Reinsfelder RE (1987) "The physical and chemical properties of the herbicide cinmethylin (SD 95481)". *Pestic Sci*, **21**, 2, 143-153.
- Grogan GJ & Holland HL (2000) "The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp.". *J. Molec Cat B: Enz*, **9**, 1–32.
- Guenther A, Hewitt CN, Erickson D, Fall R, Geron C, Graedel T, Harley P, Klinger L, Lerdau M, McKay WA, Pierce T, Scholes B, Steinbrecher R, Tallamraju R, Taylor J, Zimmerman P (1995) "A global model of natural volatile organic compound emissions". *J Geophys Res*, **100**, D5, 8873–8892.
- Haig T (2008) "Allelochemicals in Plants" *en* "Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry", Zeng RS, Mallik AU, Luo SM (eds.). Springer, New York, USA.
- Hamada HIK, Ishihara K, Nakajima N, Hamada H, Williams HJ, Scott AI (2004) "Enzymatic Oxidation of 1,4 and 1,8-Cineole using Plant Cultured Cells of *Catharanthus Roseus*". *Lett Org Chem*, **1**, 2, 171-172.

- Hamada H, Kondo y, Ishihara K, Nakajima N, Hamada H, Kurihara R, Hirata T (2003) "Stereoselective Biotransformation of Limonene and Limonene Oxide by Cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942" *J Biosci Bioeng*, **96**, 6, 581-584.
- Harborne JB (2001) "Twenty-five years of chemical ecology". *Nat Prod Rep*, **18**, 361–379.
- Harborne JB & Baxter H (1993) "Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants". Taylor Franscis, London.
- Hawkes DB, Adams GW, Burlingames AL, Ortiz de Montellanos PR, De Voss JJ (2002) "Cytochrome P450<sub>cin</sub> (CYP176A), Isolation, Expression, and Characterization". *J Biol Chem*, **277**, 31, 27725-27732.
- Held M, Schmid A, van Beilen JB, Witholt B (2000) "Biocatalysis. Biological systems for the production of chemicals". *Pure Appl Chem*, **72**, 7, 1337 – 1343.
- Hink WF & Fee BJ (1986) "Toxicity of D-limonene, the major component of citrus peel oil, to all life stages of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae)". *J Med Entomol*, **23**, 4, 400–404.
- Hoagland RE (1999) "Biochemical Interactions of the Microbial Phytotoxin Phosphinothricin and Analogs with Plants and Microbes" en "Biologically active natural products: agrochemicals", Cutler HG & Cutler SJ (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Hoagland RE & Williams RD (2004) "Bioassays – Useful Tools for the Study of Allelopathy" en "Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals", Macías FA, Galindo JCG, Molinillo JMG, Cutler HG (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Holland HL (1999) "C-H activation". *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 1, 22 – 27.
- Holt JG & Krieg NR (1994) "Enrichment and Isolation" en "Methods for General and Molecular Bacteriology", Gerhardt P, Murray R, Wood W, Krieg N (eds.). American Society for Microbiology, Washington DC.
- Hrdlicka PJ, Sorensen AB, Poulsen BR, Ruijter GJG, Visser J, Iversen JJL (2004) "Characterization of Nerolidol Biotransformation Based on Indirect On-Line Estimation of Biomass Concentration and Physiological State in Batch Cultures of *Aspergillus niger*". *Biotechnol Progr*, **20**, 1, 368-376.
- <http://jan.mannlib.cornell.edu/reports/erssor/specialty/ius-bb/ius5f.asc>; consulta: setiembre 2010.

- [http://www.doctorfungus.org/thefungi/aspergillus\\_spp.php](http://www.doctorfungus.org/thefungi/aspergillus_spp.php); consulta: enero 2011.
- <http://www.bccresearch.com/report/CHM054A.html>; consulta: marzo 2011.
- Huang H, Yu H, Zhang J, Kang L, Feng B, Song X, Ma B (2009) "Biotransformation of glycyrrhizin by *Aspergillus niger*". *Biocatal Biotransfor*, **27**, 2, 90-95.
- Hungund BL, Bhattachryya PK, Rangachari PN (1970) "Terminal Oxidation Pattern of a Soil *Pseudomonad* (PL-strain)". *Arch Microbiol*, **71**, 3, 258-270.
- Hylemon PB & Harder J (1999) "Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems". *FEMS Microbiol Rev*, **22**, 475 – 489.
- Islam A, Ghosh R, Banerjee D, Nath P, Mazumder UK, Ghosal S (2008) "Biotransformation of 3-hydroxydibenzo- $\alpha$ -pyrone into 3,8-dihydroxydibenzo- $\alpha$ -pyrone and aminoacyl conjugates by *Aspergillus niger* isolated from native "shilajit"". *Electron J Biotechnol*, **11**, 3.
- Isman MB (2000) "Plant essential oils for pest and disease management". *Crop Prot*, **19**, 603 – 608.
- Janssens L, De Pooter HL, Schamp NM, Vandamme EJ (1992) "Production of Flavours by Microorganisms". *Process Biochem*, **27**, 195–215.
- Jones JB (1986) "Enzymes in Organic Synthesis". *Tetrahedron*, **42**, 13, 3351 – 3403.
- Kala Raj NK, Puranik VG, Gopinathan C, Ramaswamy AV (2003) "Selective oxidation of limonene over sodium salt of cobalt containing sandwich-type polyoxotungstate  $[\text{WCo}_3(\text{H}_2\text{O})_2\{\text{W}_9\text{CoO}_{34}\}_2]^{10-}$ ". *Appl Catal A-Gen*, **256**, 265-273.
- Kanaly RA, Kim IS, Hur HG (2005) "Biotransformation of 3-Methyl-4-nitrophenol, a Main Product of the Insecticide Fenitrothion, by *Aspergillus niger*". *J Agr Food Chem*, **53**, 6426-6431.
- Karp F, Mihaliak CA, Harris JL, Croteau R (1990) "Monoterpene Biosynthesis: Specificity of the Hydroxylations fo (-)-Limonene by Enzyme Preparations from Peppermint (*Mentha piperita*), Spearmint (*Mentha spicata*), and Perilla (*Perilla frutescens*) Leaves." *Arch Biochem Biophys*, **276**, 1, 219-226.
- Kaspera R, Krings U, Pescheck M, Sell D, Schrader J, Berger RG (2005) "Regio- and Stereoselective Fungal Oxyfunctionalisation of Limonenes". *Z Naturforsch, C, Biosci*, **60**, 459–466.

- Keppler AF, Porto ALM, Schoenlein-Crusius IH, Comasseto JV, Andrade LH (2005) "Enzymatic evaluation of different *Aspergillus* strains by biotransformation of cyclic ketones". *Enzyme Microb Tech*, **36**, 967–975
- Kieslich KWR, Abraham B, Stumpf B, Thede, Washausen P (1986) "Transformation of terpenoides" en "Progress in essential oil research", Brunke EJ (ed). Walter de Gruyter, Berlin, Germany.
- King AJ & Dickinson JR (2003) "Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts". *FEMS Yeast Res*, **3**, 53–62.
- Klein J, Rosenberg M, Markos J, Dolgos O, Kroszlák M, Kristofiková L (2002) "Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger* – study of mass transfer in an airlift bioreactor". *Biochem Eng J*, **10**, 197–205.
- Koskinen A (1993) "Asymmetric Synthesis of Natural Products". John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Kraidman G, Mukherjee BB, Hill ID (1969) "Conversion of D-limonene into an optically active isomer of  $\alpha$ -terpineol by a *Cladosporium* species". *Bacteriol Proc*, 63.
- Krasnobajew V (1984) "Terpenoids" (Chapter 4, Kieslich K, ed.) en "Biotechnology, Vol. VIa", Rehm HJ & Reed G (eds.). Verlag Chemie, Weinheim.
- Kubota K, Nakamura K, Kobayashi A (1998) "Acetoxy-1,8-cineoles as Aroma Constituents of *Alpinia galanga* Willd.". *J Agr Food Chem*, **46**, 5244-5247.
- Kubota K, Someya Y, Yoshida R, Kobayashi A, Morita T, Koshino H (1999) "Enantiomeric Purity and Odor Characteristics of 2- and 3-Acetoxy-1,8-cineoles in the Rhizomes of *Alpinia galanga* Willd.". *J Agr Food Chem*, **47**, 685-689.
- Kurbanoglu EB, Zilbeyaz K, Kurbanoglu NI, Kilic H (2007) "Enantioselective reduction of substituted acetophenones by *Aspergillus niger*". *Tetrahedron Asymmetr*, **18**, 1159-1162.
- Larroche C & Gros JB (1997) "Special Transformation Processes Using Fungal Spores and Immobilized Cells". *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **55**, 179-220.
- Leather GR & Einhellig FA (1988) "Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity". *J Chem Ecol*, **14**, 10, 1821-1828.
- Lee BH, Annis PC, Tumaalii F, Choi WS (2004) "Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects". *J Stored Prod Res*, **40**, 5, 553-564.

- Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, Lee KG (2005) "Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties". *Food Chem*, **91**, 131-137.
- Leguizamón ES "Las Malezas y el Agroecosistema", [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_pasturas/pasturas\\_combate\\_de\\_plagas\\_y\\_malezas/90-malezas\\_y\\_agroecosistema.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_combate_de_plagas_y_malezas/90-malezas_y_agroecosistema.pdf); consulta: febrero 2011.
- Lehman LR & Stewart JD (2001) "Filamentous Fungi: Potentially Useful Catalysts for the Biohydroxylations of Non-Activated Carbon Centers". *Curr Org Chem*, **5**, 4, 439 – 470.
- Leresche JE & Meyer HP (2006) "Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist". *Org Process Res Dev*, **10**, 572-580.
- Lerin L, Toniazzo G, de Oliveira D, Rottava L, Dariva C, Cansian RL, Treichel H, Padilha F, Antunes OAC (2010) "Microorganisms screening for limonene oxidation". *Cienc Tecnol Aliment*, **30**, 2, 399-405.
- Li Z & Chang D (2004) "Recent advances in regio- and stereoselective biohydroxylation of non-active carbon atoms". *Curr Org Chem*, **8**, 1647-1658.
- Li Z, van Beilen JB, Duetz WA, Schmid A, de Raadt A, Griengl H, Witholt B (2002) "Oxidative biotransformations using oxygenases". *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 136 – 144.
- Lichtenthaler HK & Schwender J (1998) "The 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Pathway for Biosynthesis of Carotenoids and Plastidic Isoprenoids" en "Advances in Plant Lipid Research", Sánchez J, Cerdá-Olmedo E, Martínez-Force E (eds.). Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Lindmark-Henriksson M, Isaksson D, Vaněk T, Valterová I, Högberg HE, Sjödin K (2004) "Transformation of terpenes using *Picea abies* suspension culture". *J Biotechnol*, **107**, 173–184.
- Liu WG & Rosazza JPN (1990) "Stereospecific Hydroxylation of 1,8-Cineole Using a Microbial Biocatalyst". *Tetrahedron Lett*, **31**, 20, 2833-2836.
- Luzzio FA & Dubeau DY (2002) "Enzymatic resolution of the 1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane (1,8-cineole) system". *Tetrahedron Asymmetr*, **13**, 1173-1180.
- Mac Rae IC, Alberts V, Carman RM, Shaw IM (1979) "Products of 1,8-Cineole Oxidation by a Pseudomonad". *Aust J Chem*, **32**, 917-922.

- Macías FA (1995) "Allelopathy in the Search for Natural Herbicide Models" *en* "Allelopathy. Organisms, Processes, and Applications", Inderjit, Dakshini KMM, Einhellig FA (eds.). ACS Symposium Series 582. ACS, Washington DC.
- Macías FA, Castellano D, Molinillo JMG (2000) "Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. Selection of Standard Target Species". *J Agr Food Chem*, **48**, 2512-2521.
- Macías FA, Molinillo JMG, Galindo JCG, Varela RM, Torres A, Simonet AM (1999) "Terpenoids with Potential Use as Natural Herbicide Templates" *en* "Biologically active natural products: agrochemicals", Cutler HG & Cutler SJ (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Macías FA, Oliveros-Bastidas A, Marín D, Carrera C, Chinchilla N, Molinillo JMG (2008) "Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models". *Phytochem Rev*, **7**, 179-194
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1999) "Brock, Biología de los Microorganismos". 8<sup>va</sup> ed. Prentice Hall Iberia, Madrid.
- Madyastha KM, Murthy NSRK (1988) "Regioespecific hydroxylation of acyclic monoterpene alcohols by *Aspergillus niger*". *Tetrahedron Lett*, **29**, 5, 579-580.
- Mallik AU (2008) "Allelopathy: Advances, Challenges and Opportunities" *en* "Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry", Zeng RS, Mallik AU, Luo SM (eds.). Springer, New York, USA.
- Mandawa NB (1985) "Chemistry and Biology of Allelopathic Agents" *en* "The Chemistry of Allelopathy. Biochemical Interactions Among Plants", Thompson AC (ed.). ACS Symposium series, 268. American Chemical Society, Washington, DC.
- Mantero C, García C, Rodríguez P, Escudero R, Priore E, Menéndez P (2007) "Potencialidad para producción de aceites esenciales en especies de *Eucalyptus* cultivadas en Uruguay". *Agrociencia*, **11**, 2, 17-23.
- Mariani F, Neuhoff C, Bargagna A, Longobardi M (1995) "Esters of 1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octan-6-ols: synthesis, odour evaluation and *in vitro* preliminary toxicity assays". *Int J Cosmetic Sci*, **17**, 187-196.
- Maróstica MR & Pastore GM (2007) "Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas". *Quim Nova*, **30**, 2, 382-387.

- Mars AE, Gorissen JPL, van den Beld I, Eggink G (2001) "Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillic acid by *Pseudomonas putida* GS1 in a fed-batch reactor". *Appl Microbiol Biotechnol*, **56**, 101-107.
- McLafferty FW & Stauffer DB (1991) "The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data". 5<sup>th</sup> ed. Wiley and Sons, New York.
- McLean S, Boyle RR, Brandon S, Davies NW, Sorensen JS (2007) "Pharmacokinetics of 1,8-cineole, a dietary toxin, in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*): Significance for feeding". *Xenobiotica*, **37**, 9, 903-922.
- Melo V & Cuamatzi O (2007) "Bioquímica de los Procesos Metabólicos". 2<sup>da</sup> ed. Editorial Reverté, México.
- Menéndez MP (1995) "Biotransformación de Productos Naturales". Tesis de Doctor en Química, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo.
- Menéndez MP, García C, Heinzen H (2005) "Biotransformaciones de terpenos, con especial referencia a monoterpenos y los aspectos metodológicos de la biotransformación con microorganismos" en "Plantas iberoamericanas como fuente de terpenoides útiles en química fina", Fernández Barrero A (ed.). Programa CYTED, Madrid.
- Menéndez P, García C, Rodríguez P, Moyna P, Heinzen H (2002) "Enzymatic systems involved in d-limonene bio-oxydation". *Braz Arch Biol Techn*, **45**, 111-114.
- Menéndez P, Rossini C, O'Neill S, Soubes M, Heinzen H, Moyna P (2000) "Biotransformation of R-(+)-Limonene by *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus faecalis*". *An Asoc Quim Argent*, **88**, 5/6, 79-82.
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca) (2005). Boletín Estadístico, Dirección Nacional Forestal, Montevideo, 8-10.
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca) (2010) "Anuario Estadístico Agropecuario 2010", <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2010/DIEA-Anuario-2010w.pdf>; consulta: marzo 2011.
- Mijts BN & Schmidt-Dannert C (2003) "Engineering of secondary metabolite pathways". *Curr Opin Biotech*, **14**, 597 – 602.
- Miller DJ & Hawthorne SB (2000) "Solubility of Liquid Organic Flavor and Fragrance Compounds in Subcritical (Hot/Liquid) Water from 298 K to 473 K". *J Chem Eng Data*, **45**, 315-318.

- Mirata MA, Heerd D, Schrader J (2009) "Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264". *Process Biochem*, **44**, 764-771.
- Misawa M (1994) "Plant Tissue Culture: An Alternative for Production of Useful Metabolite". FAO Agricultural Services Bulletin N° 108, Food and Agriculture Organizations of the United Nations, Roma.
- Miyazawa M & Hashimoto Y (2002) "Antimicrobial and Bactericidal Activities of Esters of 2-*endo*-Hydroxy-1,8-cineole as New Aroma Chemicals". *J Agr Food Chem*, **50**, 3522-3526.
- Miyazawa M & Hashimoto Y (2001) "Microbial resolution of racemic 2-*endo*-acetoxy-1,8-cineole by *Glomerella cingulata*". *Tetrahedron Asymmetr*, **12**, 22, 3185-3187.
- Miyazawa M, Kameoka H, Morinaga K, Negoro K, Mura N (1989) "Hydroxycineole: Four New Metabolites of 1,8-Cineole in Rabbits". *J Agr Food Chem*, **37**, 222-226.
- Miyazawa M, Kasahara H, Kameoka H (1993) "Biotransformation of lignans: A specific microbial oxidation of (+)-Eudesmin and (+)-Magnolin by *Aspergillus niger*". *Phytochemistry*, **34**, 6, 1501-1507.
- Miyazawa M & Shindo M (2001) "Biotransformation of 1,8-cineole by human liver microsomes". *Nat Prod Lett*, **15**, 1, 49-53.
- Miyazawa M, Takahashi K, Araki H (2006) "Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger* as biocatalyst". *J Chem Technol Biot*, **81**, 4, 674-678.
- Miyazawa M, Tsuruno K, Kameoka H (1995a) "Asymmetric reduction of karahanaenone with various microorganisms". *Tetrahedron Asymmetr*, **6**, 9, 2121-2122.
- Miyazawa M, Yokote K, Kameoka H (1995b) "Biotransformation of the monoterpenoid, rose oxide, by *Aspergillus niger*". *Phytochemistry*, **39**, 1, 85-89.
- Mondello L, Catalfamo M, Dugo P, Dugo G (1998) "Multidimensional tandem capillary gas chromatography system for the analysis of real complex samples. Part I: development of a fully automated tandem gas chromatography system". *J Chromatogr Sci*, **36**, 201-209.
- Mondello L, Verzera A, Previti P, Crispo F, Dugo G (1998) "Multidimensional Capillary GC-GC for the Analysis of Complex Samples. 5. Enantiomeric Distribution of Monoterpene Hydrocarbons, Monoterpene Alcohols, and Linalyl Acetate of Bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) Oils". *J Agr Food Chem*, **46**, 4275-4282.

- Moyna P & Menéndez P (2001) "Biotransformações de produtos naturais" en "Biotecnología na agricultura e na agroindústria", Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL (coords.). Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, Brasil.
- Mukherjee BB, Kraidman G, Hill ID (1973) "Synthesis of Glycols by Microbial Transformation of Some Monocyclic Terpenes". *Appl Microbiol*, **25**, 447-453.
- Muller WH & Muller CH (1964) "Volatile growth inhibitors produced by *Salvia* species". *Bull Torrey Bot Club*, **91**, 327-330.
- Muñoz Rustep E (1993) "Biotecnología, Medio Ambiente y Sociedad" en "Estudios sobre Tecnología, Ecología y Filosofía". Organización de los Estados Iberoamericanos, <http://www.campus-oei.org/salactsi/tef05.htm>
- Nishida N, Tamotsu S, Nagata N, Saito C, Sakai A (2005) "Allelopathic Effects of Volatile Monoterpenoids Produced by *Salvia leucophylla*: Inhibition of Cell Proliferation and DNA Synthesis in the Root Apical Meristem of *Brassica campestris* Seedlings" *J Chem Ecol*, **31**, 5, 1187-1203.
- Nishimura H, Hiramoto S, Mizutani J, Noma Y, Furusaki A, Matsumoto T (1983) "Structure and Biological Activity of Bottrospicatol, a Novel Monoterpene Produced by Microbial Transformation of (-)-*cis*-Carveol". *Agr Biol Chem Tokyo*, **47**, 11, 2697-2699.
- Nishimura H, Noma Y, Mizutani J (1982) "*Eucalyptus* as Biomass. Novel Compounds from Microbial Conversion of 1,8-Cineole". *Agric Biol Chem*, **46**, 10, 2601-2604.
- Noma Y, Yamasaki S, Asakawa Y (1992) "Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*". *Phytochemistry*, **31**, 8, 2725-2727.
- Nonino E (1996) "Where is the citrus industry going to?". IFEAT International Conference Proceedings, Tel Aviv, Israel.
- Ohkawa M & Nishikawa Y (1987) "Plant growth inhibitory activity of fatty acids and the related compounds by the *Avena* coleoptile test". *Plant Sci*, **53**, 35-38.
- Onken J & Berger RG (1999a) "Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*". *J Biotechnol*, **69**, 163-168.
- Onken J & Berger RG (1999b) "Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated-membrane bioreactor". *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 158-163.

- Orihara Y & Furuya T (1994) "Biotransformation of 1,8-cineole by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*". *Phytochemistry*, **35**, 3, 641-644.
- Ortiz de Montellano PR & De Voss JJ (2002) "Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450". *Nat Prod Rep*, **19**, 477 – 493.
- Pass GJMS, Stupans I, Davies N (2001) "Microsomal metabolism of the terpene 1,8-cineole in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*), koala (*Phascolarctos cinereus*), rat and human". *Xenobiotica*, **31**, 205-221.
- Patel RN (2008) "Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis". *Coordin Chem Rev*, **252**, 659-701.
- Pertino M, Schmeda-Hirschmann G, Santos LS, Rodríguez JA, Theoduloz C (2007) "Biotransformation of Jatrophone by *Aspergillus niger* ATCC 16404". *Z Naturforsch B*, **62**, 2, 275-279.
- Pescheck M, Mirata MA, Brauer B, Krings U, Berger RG, Schrader J (2009) "Improved monoterpene biotransformation with *Penicillium* sp. by use of a closed gas loop bioreactor". *J Ind Microbiol Biotechnol*, **36**, 827–836.
- Pinheiro L & Marsaioli AJ (2007) "Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds". *J Mol Catal B-Enzym*, **44**, 78–86.
- Pisarenko LM, Krugovov DA, Shchegolikhin AN, Kasaikina OT (2008) "A kinetic model for limonene oxidation". *Russ Chem B+*, **57**, 83-89.
- Pitt J & Hocking A (1999) "Fungi and Food Spoilage". 2<sup>nd</sup> ed. Aspen Publisher Inc., Maryland.
- Quecini VM & Carneiro Vieira ML (2001) "Plantas transgênicas" en "Biotecnología na agricultura e na agroindústria", Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL (coords.). Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, Brasil.
- Rama Devi J & Bhattacharyya PK (1978) "Molecular Rearrangements in the Microbiological Transformations of Terpenes and the Chemical Logic of Microbial Processes". *J Indian Chem Soc*, **55**, 1131-1137.
- Rasmussen JM, Henderson KA, Straffon MJ, Dumsday GJ, Coulton J, Zachariou M (2005) "Two New Biocatalysts for Improved Biological Oxidation of 1,8-Cineole". *Aust J Chem*, **58**, 912-916
- Ravía SP, Carrera I, Seoane GA, Vero S, Gaménara D (2009) "Novel fungi-catalyzed reduction of  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -keto esters". *Tetrahedron Asymmetr*, **20**, 1393-1397.

- Reetz MT (2002) "Lipases as practical biocatalysts". *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 2, 145-150.
- Regnault-Roger C & Hamraoui A (1995) "Fumigant Toxic Activity and Reproductive Inhibition Induced By Monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a Bruchid of Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)". *J Stored Prod Res*, **31**, 4, 291-299.
- Reynolds T (1987) "Comparative effects of alicyclic compounds and quinones on inhibition of lettuce fruit germination". *Ann Bot*, **60**, 2, 215-223.
- Roberts SM, Turner NJ, Willets AJ, Turner MK (1995) "Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Micro-organisms". Cambridge University Press, Cambridge.
- Rodríguez P (2006) "Biotransformación de 1,8-cineol: obtención de cepas bacterianas capaces de biotransformar 1,8-cineol en derivados oxigenados de mayor valor agregado a partir de hábitats naturales". Tesis de Magíster en Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Rodríguez P, Sierra W, Rodríguez S, Menéndez P (2006) "Biotransformation of 1,8-cineole, the main product of *Eucalyptus* oils". *Electr J Biotech* (online), **9**, 3, <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue3/full/28/>
- Rohdich F, Kis K, Bacher A, Eisenreich W (2001) "The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates". *Curr Opin Chem Biol*, **5**, 535 – 540.
- Romagni JG, Allen SN, Dayan FE (2000a) "Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species". *J Chem Ecol*, **26**, 1, 303-313.
- Romagni JG, Duke SO, Dayan FE (2000b) "Inhibition of Plant Asparagine Synthetase by Monoterpene Cineoles". *Plant Physiol*, **123**, 725-732.
- Romagni JG, Duke SO, Dayan FE (2005) "Retracted article: Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineoles". *Plant Physiol*, **137**, 1487.
- Rothenberg G, Yatziv Y, Sasson Y (1998) "Comparative Autoxidation of 3-Carene and  $\alpha$ -Pinene: Factors Governing Regioselective Hydrogen Abstraction Reactions". *Tetrahedron*, **54**, 593-598.
- Rottava I, Toniazzo G, Cortina PF, Martello E, Grando CE, Lerin LA, Treichel H, Mossi AJ, de Oliveira D, Cansian RL, Antunes OAC, Oestreicher EG (2010) "Screening of microorganisms for bioconversion of (-)- $\beta$ -pinene and R-(+)-limonene to  $\alpha$ -terpineol". *Food Sci Technol-Leb*, **43**, 1128-1131.

- Rozenbaum, HF, Patitucci ML, Antunes OAC, Pereira N (2006) "Production of aromas and fragrances through microbial oxidation of monoterpenes". *Braz J Chem Eng*, **23**, 3, 273-279.
- Samuelsson G (1992) "Drugs of Natural Origin". 3<sup>rd</sup> ed. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm.
- Sangwan NK, Verma BS, Verma KK, Dhindsa KS (1990) "Nematicidal activity of some essential plant oils". *Pestic Sci*, **28**, 3, 331-335.
- Sanseverino AM, da Silva FM, Jones J, de Mattos MCS (2000) "Cohalogenation of Limonene, Carvomenthene and Related Unsaturated Monoterpenic Alcohols". *J Braz Chem Soc*, **11**, 4, 381-386.
- Sayer JA, Cotter-Howells JD, Watson C, Hillier S, Gadd SM (1999) "Lead mineral transformation by fungi". *Curr Biol*, **9**, 13, 691 - 694.
- Schäfer S, Schrader J, Sell D (2004) "Oxygen uptake rate measurements to monitor the activity of terpene transforming fungi". *Process Biochem*, **39**, 2221-2228.
- Schaneberg BT & Khan IA (2002) "Comparison of Extraction Methods for Marker Compounds in the Essential Oil of Lemon Grass by GC". *J Agr Food Chem*, **50**, 1345-1349.
- Sefidkon F, Bahmanzadegan A, Assareh MH (2008) "Effect Of Distillation Methods And Harvesting Times On The Essential Oil And Cineole Content Of *Eucalyptus dealbata*". *Chem Nat Compd*, **44**, 2, 250-253.
- Sekhon BS (2009) "Chiral pesticides". *J Pestic Sci*, **34**, 1, 1-12.
- Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL (2001) "Biotecnología: princípios e aplicações" en "Biotecnología na agricultura e na agroindústria", Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL (coords.). Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, Brasil.
- Shimoda M, Wu Y, Osajima Y (1996) "Aroma Compounds from Aqueous Solution of Haze (*Rhus succedanea*) Honey Determined by Adsorptive Column Chromatography". *J Agr Food Chem*, **44**, 3913-3918.
- Sigma-Aldrich (2007) "Handbook of Fine Chemicals". Sigma-Aldrich Co.
- Silveira MM & Berbert MA (2002) "Fermentação: forma da valorização de resíduos agrícolas e agroindustriais" en "Biotecnología: avanços na agricultura e na agroindústria", Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL (coords.). Editora da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

- Silvestre AJD, Cavaleiro JAS, Feio SS, Roseiro JC, Delmond B, Filliatre C (1999) "Synthesis of Some New Benzylic Ethers from 1,8-Cineole with Antimicrobial Activity". *Monatsh Chem*, **130**, 589-595.
- Slessor KE, Stok JE, Cavaignac SM, Hawkes DB, Ghasemi Y, De Voss JJ (2010) "Cineole biodegradation: Molecular cloning, expression and characterisation of (1*R*)-6 $\beta$ -hydroxycineole dehydrogenase from *Citrobacter braakii*". *Bioorg Chem*, **38**, 81-86.
- Smith D & Onions AHS (1994) "The Preservation and Maintenance of Living Fungi". 2<sup>nd</sup> ed. CAB International, Wallingford, UK.
- Someya Y, Kobayashi A, Kubota K (2001) "Isolation and Identification of *trans*-2- and *trans*-3-hydroxy-1,8-cineole Glucosides from *Alpinia galanga*". *Biosci Biotech Bioch*, **65**, 4, 950-953.
- Southwell IA, Russell MF, Maddox CDA, Wheeler GS (2003) "Differential metabolism of 1,8-cineole in insects". *J Chem Ecol*, **29**, 1, 83-94.
- Speelmans G, Bijlsma A, Eggink G (1998) "Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain". *Appl Microbiol Biotechnol*, **50**, 538-544.
- Spraul MH, Nitz S, Drawert F (1991) "Photochemical reactions of p-mentha-1,3,8-triene and structural related p-menthadienes". *Tetrahedron*, **47**, 18, 3037-3044.
- Sun J (2007) "D-limonene: Safety and clinical applications". *Altern Med Rev*, **12**, 3, 259-264.
- Svoboda KP & Greenaway RI (2003) "Lemon Scented Plants". *Int J Aromath*, **13**, 1, 23-32.
- Tan Q & Day DF (1998a) "Bioconversion of limonene to  $\alpha$ -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*". *Appl Microbiol Biotechnol*, **49**, 96-101.
- Tan Q & Day DF (1998b) "Organic co-solvent effects on the bioconversion of (R)-(+)-limonene to (R)-(+)- $\alpha$ -terpineol". *Process Biochem*, **33**, 7, 755-761.
- Tan Q, Day DF, Cadwallader KR (1998) "Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. Digitatum* (NRRL 1202)". *Process Biochem*, **33**, 1, 29-37.
- Tao J & Xu JH (2009) "Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes". *Curr Opin Chem Biol*, **13**, 43-50.

- Taylor JW, Spatafora J, Berbee M (2006) "Ascomycota. Sac Fungi", <http://tolweb.org/Ascomycota/20521> en "The Tree of Life Web Project", <http://tolweb.org/>; consulta: enero 2011.
- The Merck Index (2006). 14<sup>th</sup> ed. Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, USA.
- The Pesticide Manual (2006) Tomlin CDS (ed.). 14<sup>th</sup> ed. BCPC, Alton, Hampshire, UK.
- Thomas AF & Bessière Y (1989) "Limonene". *Nat Prod Rep*, **6**, 3, 291–309.
- Thompson ML, Marriott R, Dowle A, Grogan G (2010) "Biotransformation of  $\beta$ -myrcene to geraniol by a strain of *Rhodococcus erythropolis* isolated by selective enrichment from hop plants". *Appl Microbiol Biotechnol*, **85**, 721–730.
- Tietze LF & Eicher TH (1989) "Reactions and Synthesis in the Organic Chemistry Laboratory". University Science Books, Mill Valley, California.
- Toniazzo G, De Oliveira D, Dariva C, Oestreicher EG, Antunes OAC (2005) "Biotransformation of (-)- $\beta$ -Pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642" *Appl Biochem Biotech*, **123**, 837-844.
- Tortella GR, Diez MC, Durán N (2005) "Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants". *Crit Rev Microbiol*, **31**, 4, 197-212.
- Tripathi AK, Prajapati V, Khanuja SPS, Kumar S (2003) "Effect of d-limonene on three stored-product beetles". *J Econ Entomol*, **96**, 3, 990–995.
- Trytek M & Fiedurek J (2005) "A novel psychrotrophic fungus, *Mortierella minutissima*, for D-limonene biotransformation". *Biotechnol Lett*, **27**, 149-153.
- Trytek M, Fiedurek J, Skowronek M (2009) "Biotransformation of (*R*)-(+)-Limonene by the Psychrotrophic Fungus *Mortierella minutissima* in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxygenated Culture". *Food Technol Biotech*, **47**, 2, 131-136.
- Tundo P, Anastas P, Black D, Breen J, Collins T, Memoli S, Miyamoto J, Polyakoff M, Tumas W (2000) "Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview". *Pure Appl Chem*, **72**, 7, 1207 – 1228.
- Valdez JS, Martin DK, Mayersohn M (1999) "Sensitive and selective gas chromatographic methods for the quantitation of camphor, menthol and methyl salicylate from human plasma". *J Chromatogr B*, **729**, 163–171.
- van Beilen JB & Funhoff EG (2005) "Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications". *Curr Opin Biotech*, **16**, 308-314.

- van Beilen JB, Holtackers R, Lüscher D, Bauer U, Witholt B, Duetz WA (2005) "Biocatalytic Production of Perillyl Alcohol from Limonene by Using a Novel *Mycobacterium* sp. Cytochrome P450 Alkane Hydroxylase Expressed in *Pseudomonas putida*". *Appl Environ Microb*, **71**, 4, 1737-1744.
- van den Brink HM, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ (1998) "Cytochrome P450 Enzyme Systems in Fungi". *Fungal Genet Biol*, **23**, 1, 1 – 17.
- van der Werf MJ, Keijzer PM, van der Schaft PH (2000) "*Xanthobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene". *J Biotechnol*, **84**, 133–143.
- van der Werf MJ, Swarts HJ, de Bont JAM (1999) "*Rhodococcus erythropolis* DCL14 Contains a Novel Degradation Pathway for Limonene". *Appl Environ Microb*, **65**, 5, 2092–2102.
- van Dyk MS, van Rensburg E, Moleleki N (1998) "Hydroxylation of (+)limonene, (-) $\alpha$ -pinene and (-) $\beta$ -pinene by a *Hormonema* sp.". *Biotechnol Lett*, **20**, 4, 431-436.
- van Rensburg E, Moleleki N, van der Walt JP, Botes PJ, van Dyk MS (1997) "Biotransformation of (+)limonene and (-)piperitone by yeasts and yeast-like fungi". *Biotechnol Lett*, **19**, 8, 779-782.
- van Vuuren SF & Viljoen AM (2007) "Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination". *Flavour Fragr J*, **22**, 540-544.
- Varga J, Rigó K, Téren J (2000) "Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species". *Int J Food Microbio*, **59**, 1–7.
- Vázquez LC, Díaz-Maroto MC, Guchu E, Pérez-Coello MS (2006) "Analysis of volatile compounds of eucalyptus honey by solid phase extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry". *Eur Food Res Technol*, **224**, 27-31.
- Verzera A, Cavazza A, Dellacassa E, Lorenzo D, Moyna P (1997) "Uruguayan Essential Oils. Part V. Composition of Bergamot Oil". *J Essent Oil Res*, **9**, 419–426.
- Vezina C (1991) "Biotransformaciones" en "Biotecnología Básica", Bu'lock J & Kristiansen B. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Vidya CM & Agrawal R (2003) "Production of verbenol, a high valued food flavourant from a fusant strain of *Aspergillus niger*". *Appl Microbiol Biotechnol*, **62**, 421-422.

- Vilches MA, Casas JL, Sánchez JA, Fernández JM, Chisti Y (2005) "Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutants for overproduction of lovastatin". *World J Microb Biot*, **21**, 123-125.
- Vilela GR, de Almeida GS, D'Arce MABR, Moraes MHD, Brito JO, da Silva MFGF, Silva SC, Piedade SMS, Calori-Domingues MA, da Gloria EM (2009) "Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare". *J Stored Prod Res*, **45**, 108–111.
- Villecco MB, Catalán JV, Vega MI, Garibotto FM, Enriz RD, Catalán CAN (2008) "Synthesis and Antibacterial Activity of Highly Oxygenated 1,8-Cineole Derivatives". *Nat Prod Commun*, **3**, 303-312.
- Villecco MB, Muro AC, Catalán JV, Catalán CAN (2005) "Síntesis de derivados de 1,8-cineol, cariofileno y cariolan-1-ol con utilidad en perfumería y farmacología" en "Plantas iberoamericanas como fuente de terpenoides útiles en química fina", Fernández Barrero A (ed.). Programa CYTED, Madrid.
- Vitas M, Smith KE, Plavec J, Kesselmeier J, Paji T, Ferlan A, Zigon D, Kelly SL (1999) "Induction of steroidal hydroxylase activity by plant defence compounds in the filamentous fungus *Cochliobolus lunatus*". *Chemosphere*, **38**, 4, 853 – 863.
- Vyvyan JR (2002) "Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals". *Tetrahedron*, **58**, 1631-1646.
- Wagner H & Bladt S (1996) "Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas." 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Waller GR (2004) "Reality and Future of Allelopathy" en "Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals", Macías FA, Galindo JCG, Molinillo JMG, Cutler HG (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Ward OP, Qin WM, Dhanjoon J, Ye J, Singh A (2006) "Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*". *Adv Appl Microbiol*, **58**, 1-75.
- Weidenhamer JD (2008) "Allelopathic Mechanisms and Experimental Methodology" en "Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry", Zeng RS, Mallik AU, Luo SM (eds.). Springer, New York, USA.
- Whysner J & Williams GM (1996) "d-Limonene Mechanistic Data and Risk Assessment: Absolute Species – Specific Cytotoxicity, Enhanced Cell Proliferation, and Tumor Promotion". *Pharmacol Ther*, **71**, 127–136.

- Williams DR, Trudgill PW, Taylor DG (1989) "Metabolism of 1,8-Cineole by a *Rhodococcus* Species: Ring Cleavage Reactions". *J Gen Microbiol*, **135**, 1957-1967.
- Williams GM (2001) "Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment". *Toxicology*, **166**, 3–10.
- Willis RJ (2007) "The History of Allelopathy". Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Wittstock U & Gershenzon J (2002) "Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens". *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 4, 300–307.
- Wolken WAM, Tramper J, van der Werf MJ (2003) "What can spores do for us?". *Trend Biotechnol*, **21**, 8, 338-345.
- Wolken WAM & van der Werf MJ (2001) "Geraniol biotransformation-pathway in spores of *Penicillium digitatum*". *Appl Microbiol Biotechnol*, **57**, 713-737.
- Worth H, Schacher C, Dethlefsen U (2009) "Concomitant therapy with Cineole (Eucalyptole) reduces exacerbations in COPD: a placebo-controlled double-blind trial". *Respir Res* (online), **10**: 69, <http://respiratory-research.com/content/10/1/69>
- Xanthakis E, Magkouta S, Loutrari H, Stamatis H, Roussos C, Kolisis FN (2009) "Enzymatic synthesis of perillyl alcohol derivatives and investigation of their antiproliferative activity". *Biocatal Biotransfor*, **27**, 3, 170-178.
- Yamazaki Y, Hayashi Y, Hori N, Mikami Y (1988) "Microbial Conversion of  $\beta$ -Myrcene by *Aspergillus niger*". *Agric Biol Chem*, **52**, 11, 2921-2922.
- Znidarsic P & Pavko A (2001) "The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as a Bioprocess Parameter". *Food Technol Biotech*, **39**, 3, 237–252.

## **ANEXO I: Medios de Cultivo**

---

### Agar Malta (AM)

Extracto de malta (Amresco®)	3,0 g
Agar (Bacteriological Agar, Sigma®)	2,0 g
Agua destilada csp	100 mL

### Medio mínimo BG-11 (Gerhardt et al., 1994)

NaNO <sub>3</sub>	1,5 g	Solución A5:	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,04 g		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,075 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28,6 mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,036 g	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	18,1 mg
Ácido cítrico	0,006 g	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,22 mg
Citrato de amonio férrico	0,006 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4,39 mg
EDTA	0,001 g	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,79 mg
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02 g	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,494 mg
Solución A5	1,0 mL	Agua destilada csp	10 mL
Agua destilada csp	1 L		

### BG-11 Agar

Al medio mínimo BG-11 arriba indicado se le agrega un 2% de Agar (Bacteriological Agar, Sigma®).

### Agar Papa Dextrosa (PDA)

PDA (Difco®)	39 g
Agua destilada csp	1 L

### Caldo Triptona Soja (TSB)

TSB (Difco®)	30 g
Agua destilada csp	1 L

### Caldo Malta (CM)

Extracto de malta (Amresco®)	3,0 g
Agua destilada csp	100 mL

### YMPG (Yeast Malt Peptone Glucose)

Extracto de levadura (Difco®)	0,5 g
Extracto de malta (Amresco®)	1,0 g
Peptona	0,5 g
Glucosa	1,0 g
Agua destilada csp	100 mL

### Medio Mínimo mineral tamponeado (MM) (Deacon, 2006)

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,0 g	Solución A:	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16 g	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,84 g	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,5 g	CuSO <sub>4</sub>	0,5 g
KCl	0,5 g	Agua destilada csp	100 mL
CaCl <sub>2</sub>	0,5 g		
Solución A	1,0 mL		
Agua destilada csp	1 L		

### Medio Mínimo mineral tamponeado + 1% de Glucosa (MM+Glu)

A 95 mL de la solución anterior (MM) autoclavada, se agregan en condiciones estériles 4 mL de una solución de glucosa previamente autoclavada de 0,25 g/mL.

### YNB (Yeast Nitrogen Base, DIFCO®)

YNB	6,7 g
Agua destilada csp	100 mL

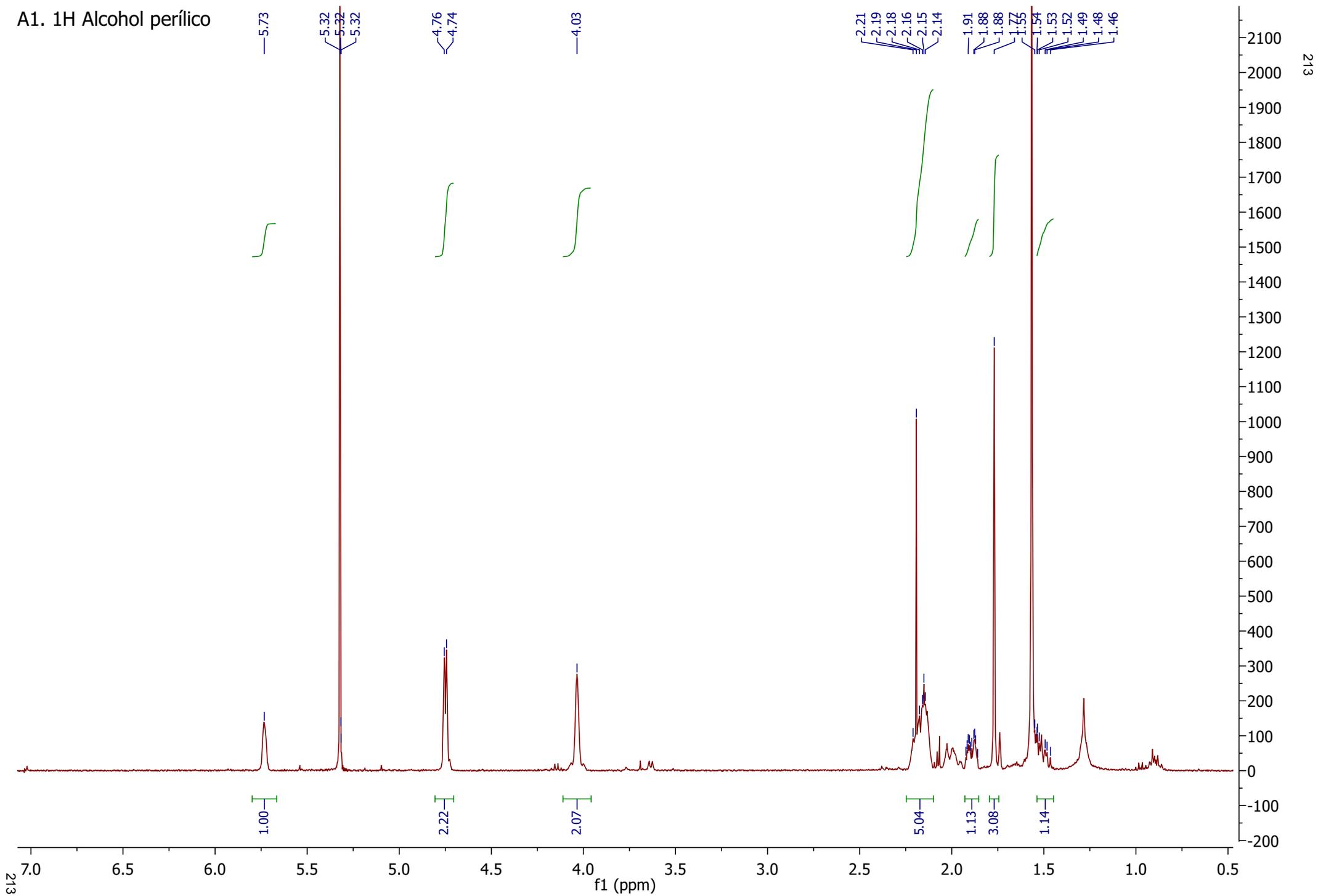
YNB + 0,5% de Glucosa (YNB+Glu)

A 98 mL de la solución esterilizada de YNB básico, se agregan en condiciones estériles 2 mL de una solución de glucosa previamente autoclavada de 0,25 g/mL.

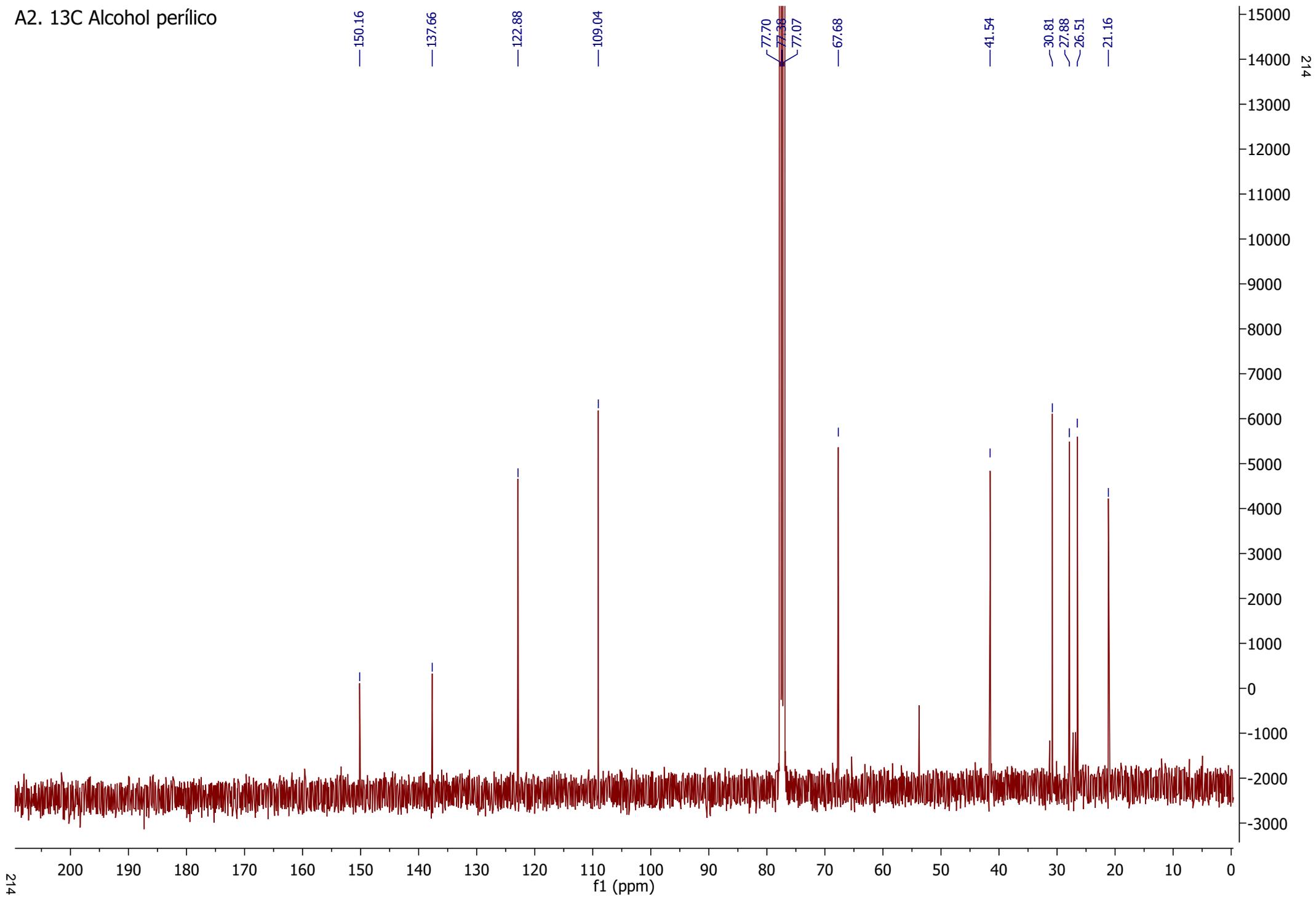
## **ANEXO II: Espectros de RMN**

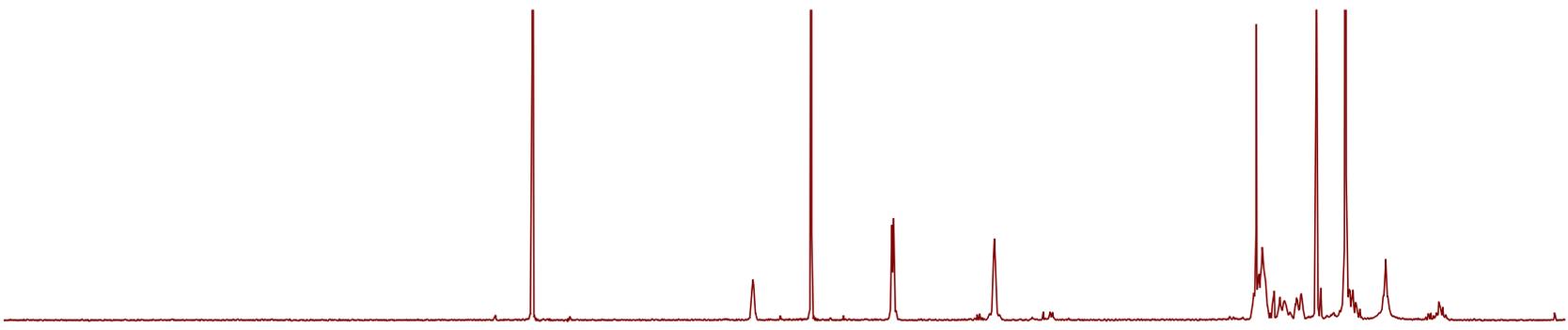
---

A1. 1H Alcohol perfílico

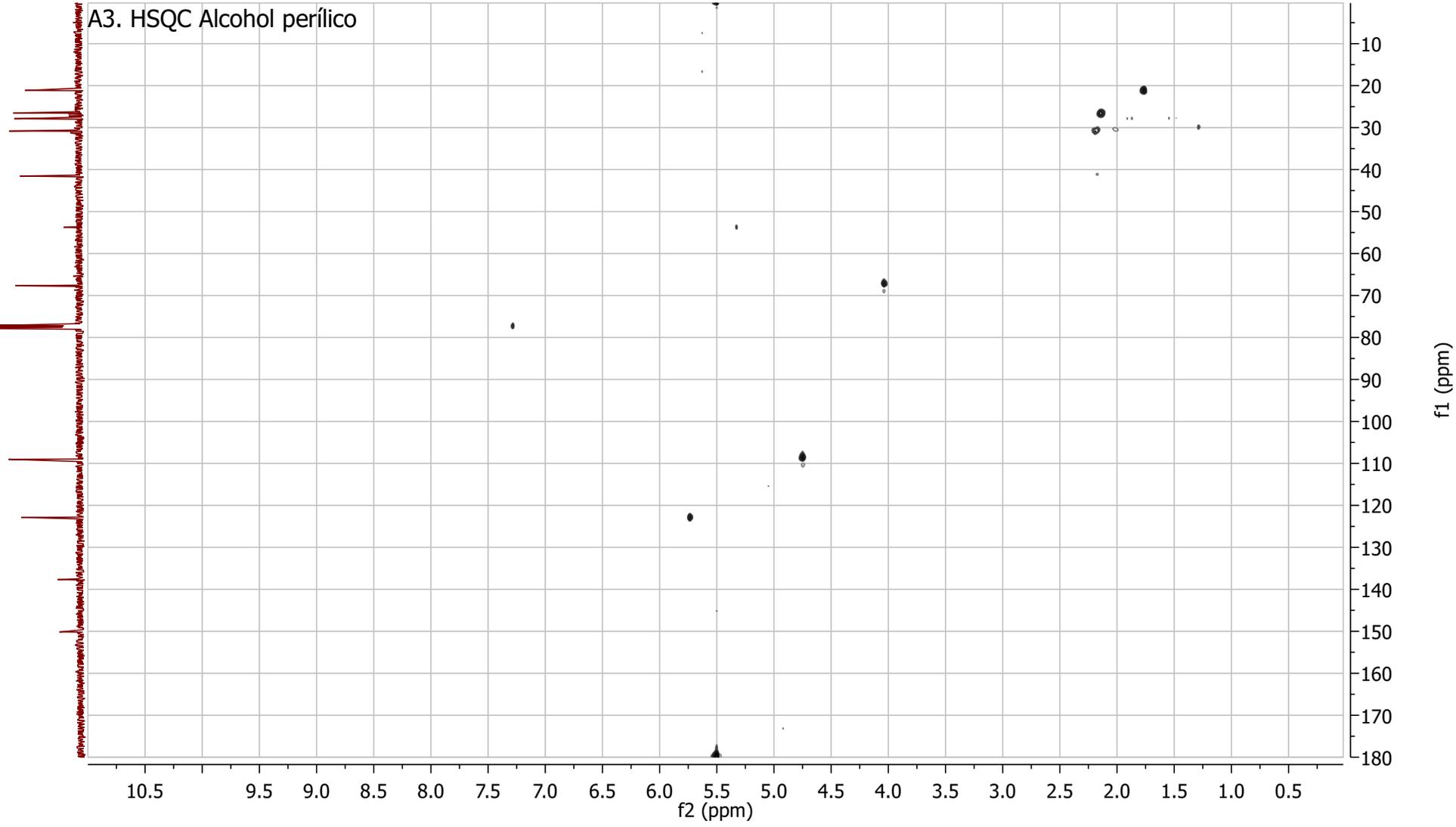


# A2. <sup>13</sup>C Alcohol perfílico

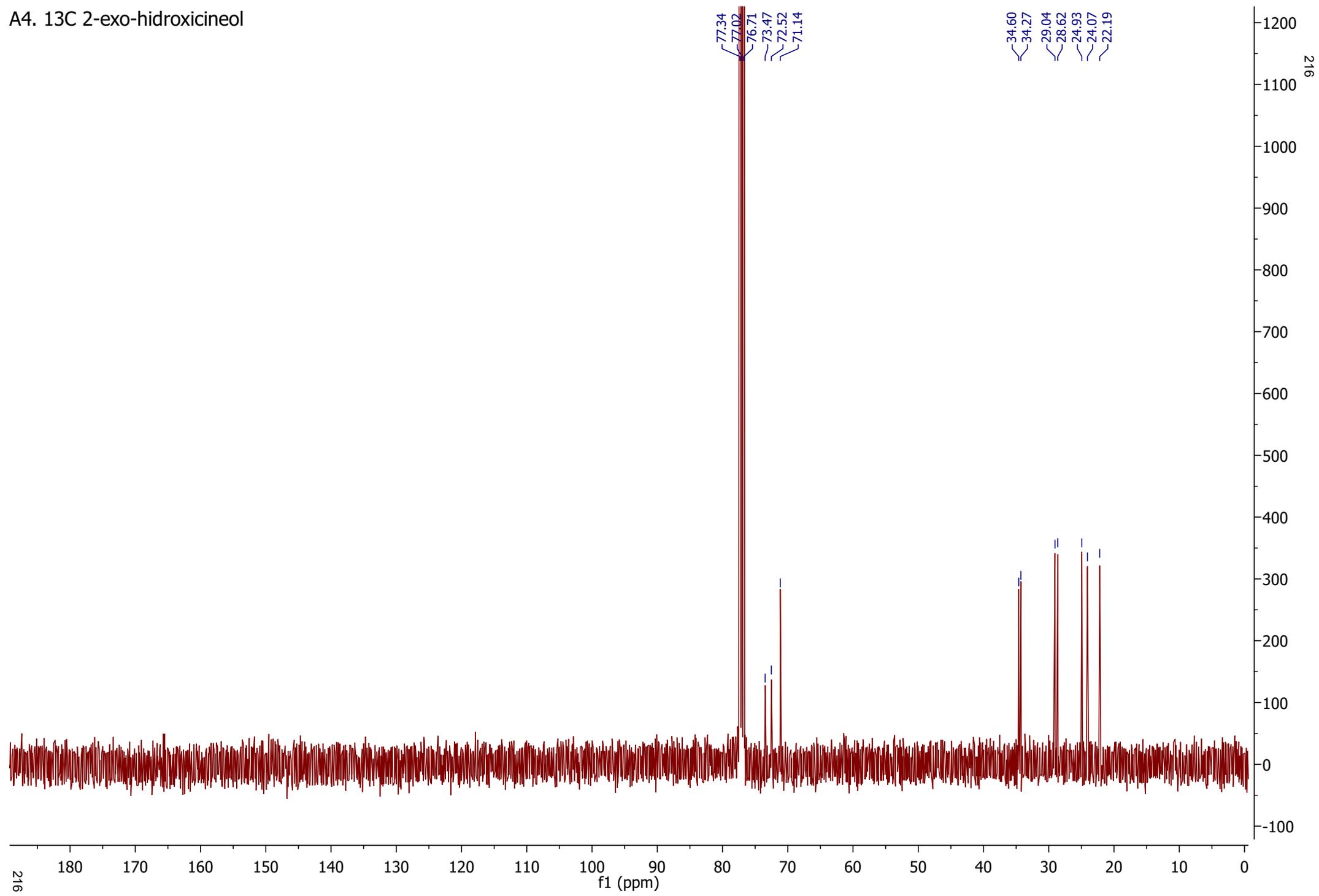




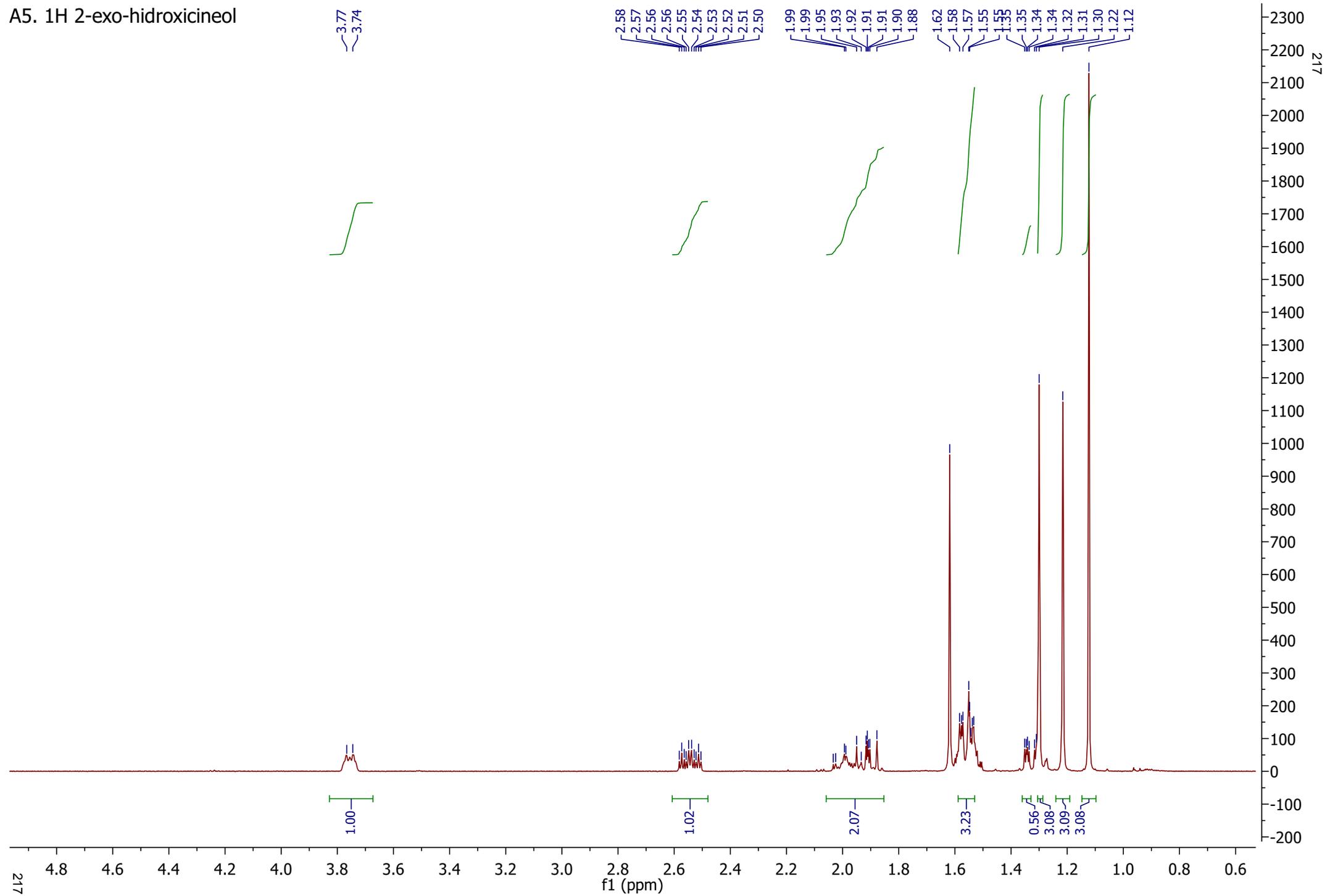
A3. HSQC Alcohol perílico



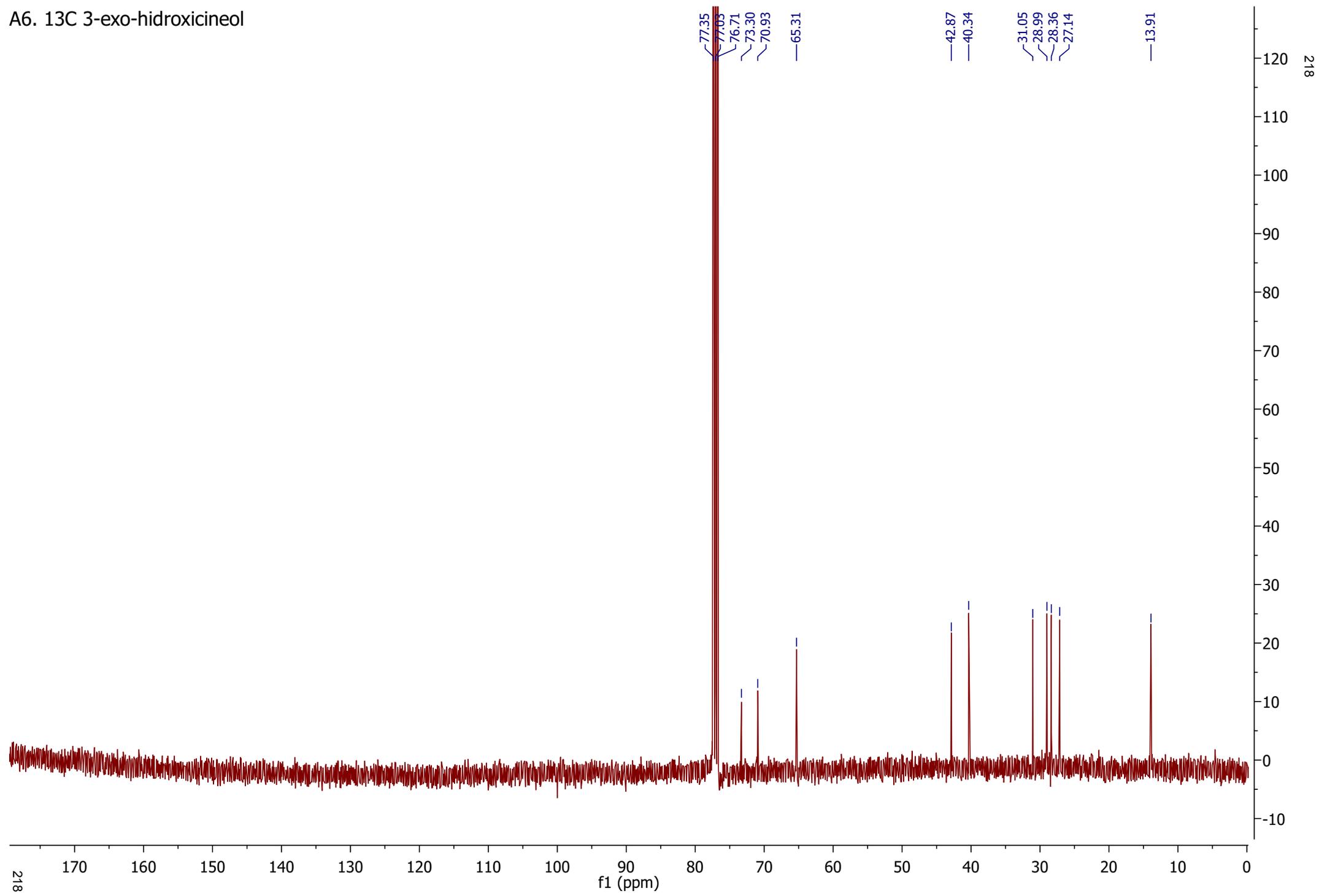
A4. <sup>13</sup>C 2-exo-hidroxicineol



A5. 1H 2-exo-hidroxicineol

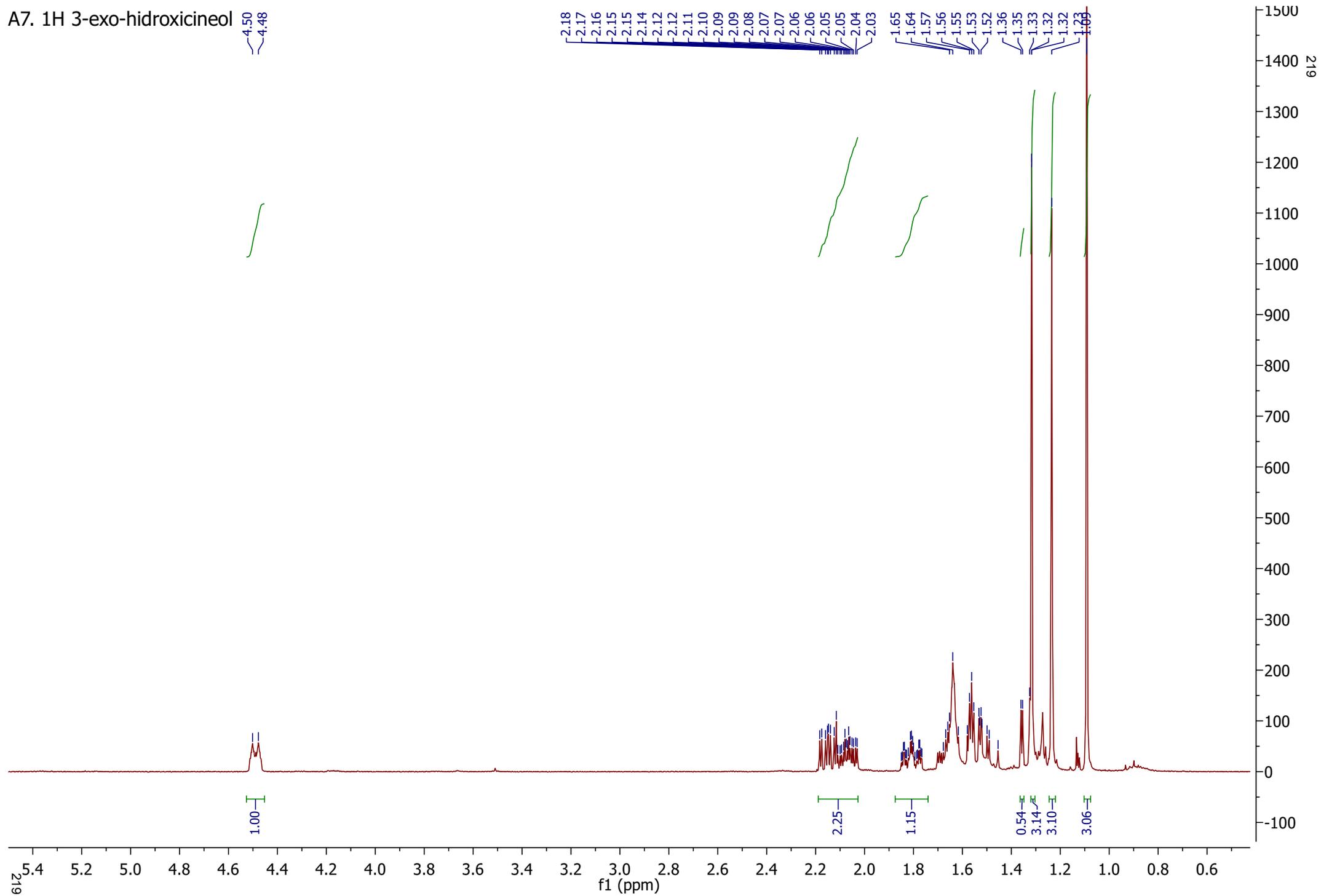


A6. <sup>13</sup>C 3-exo-hidroxicineol

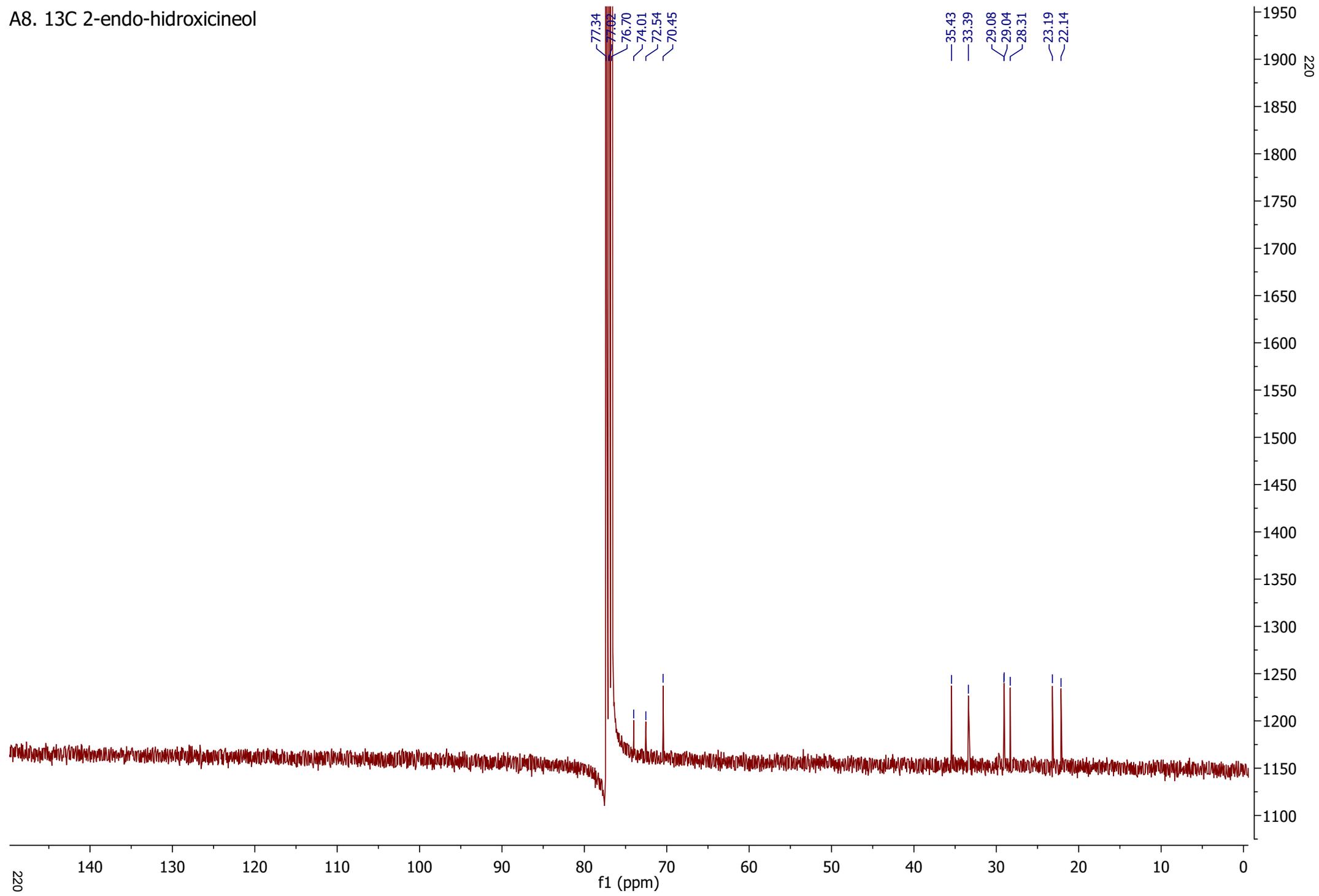


A7. 1H 3-exo-hydroxicineol

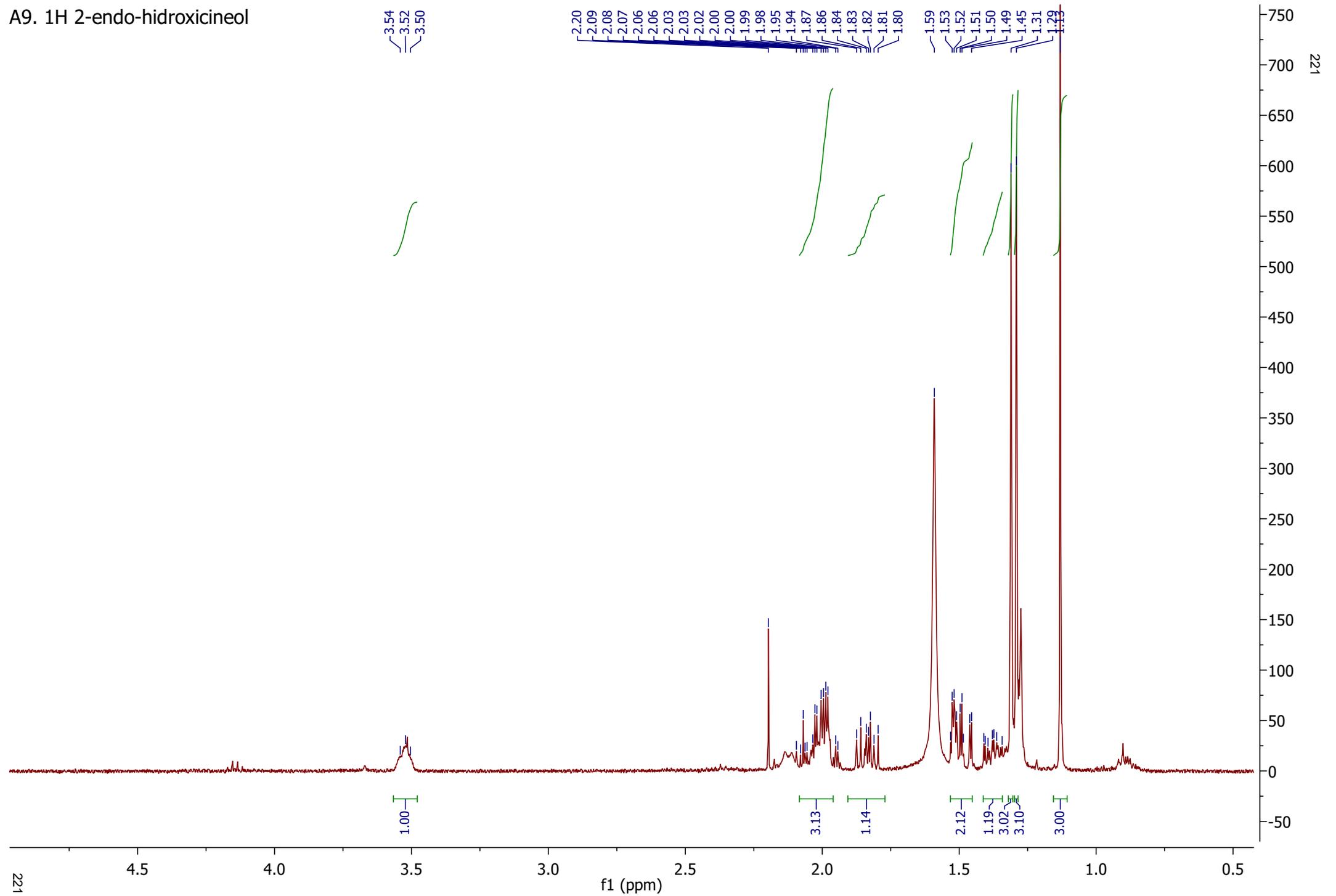
4.50  
4.48



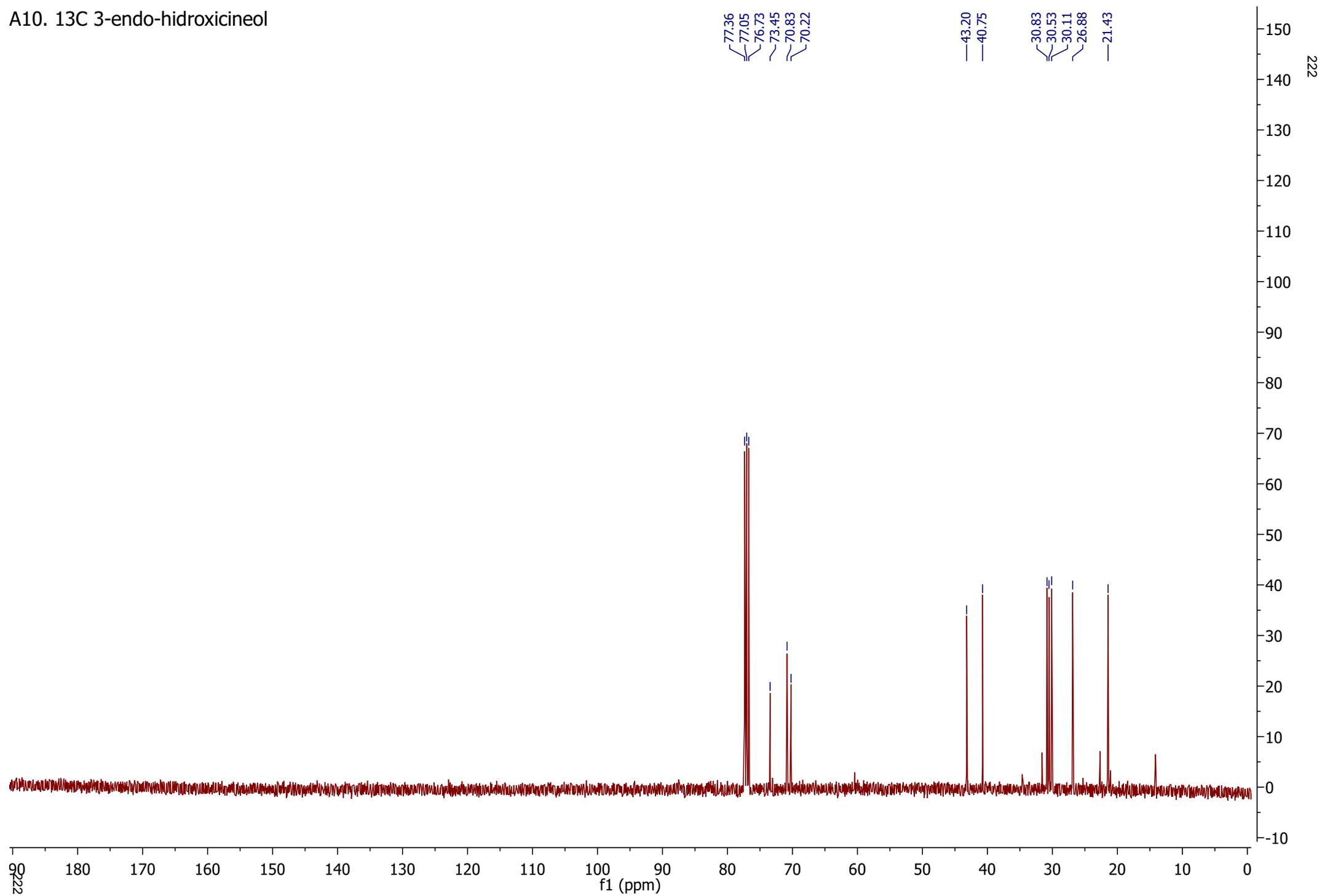
A8. 13C 2-endo-hidroxicineol



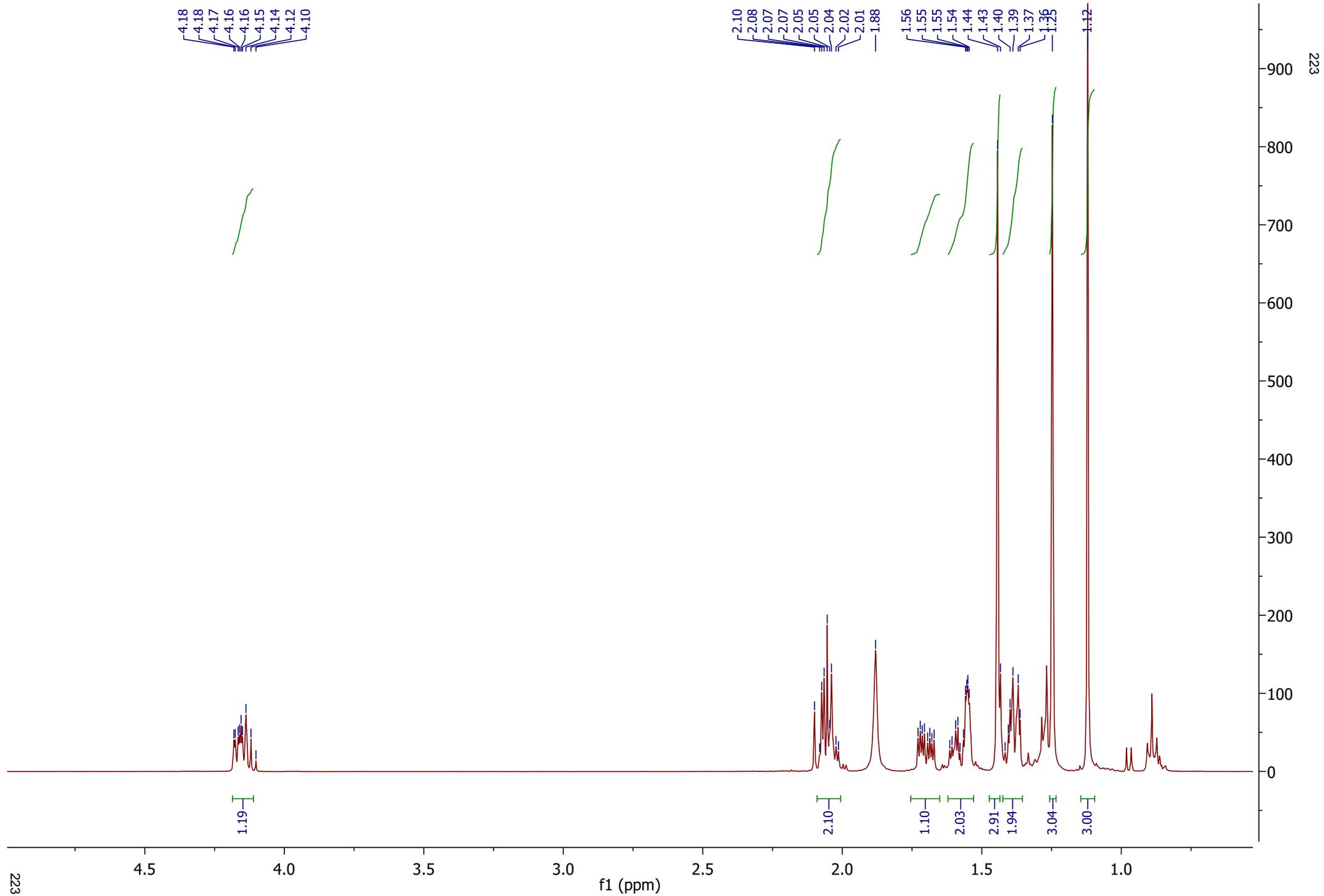
A9. 1H 2-endo-hidroxicineol



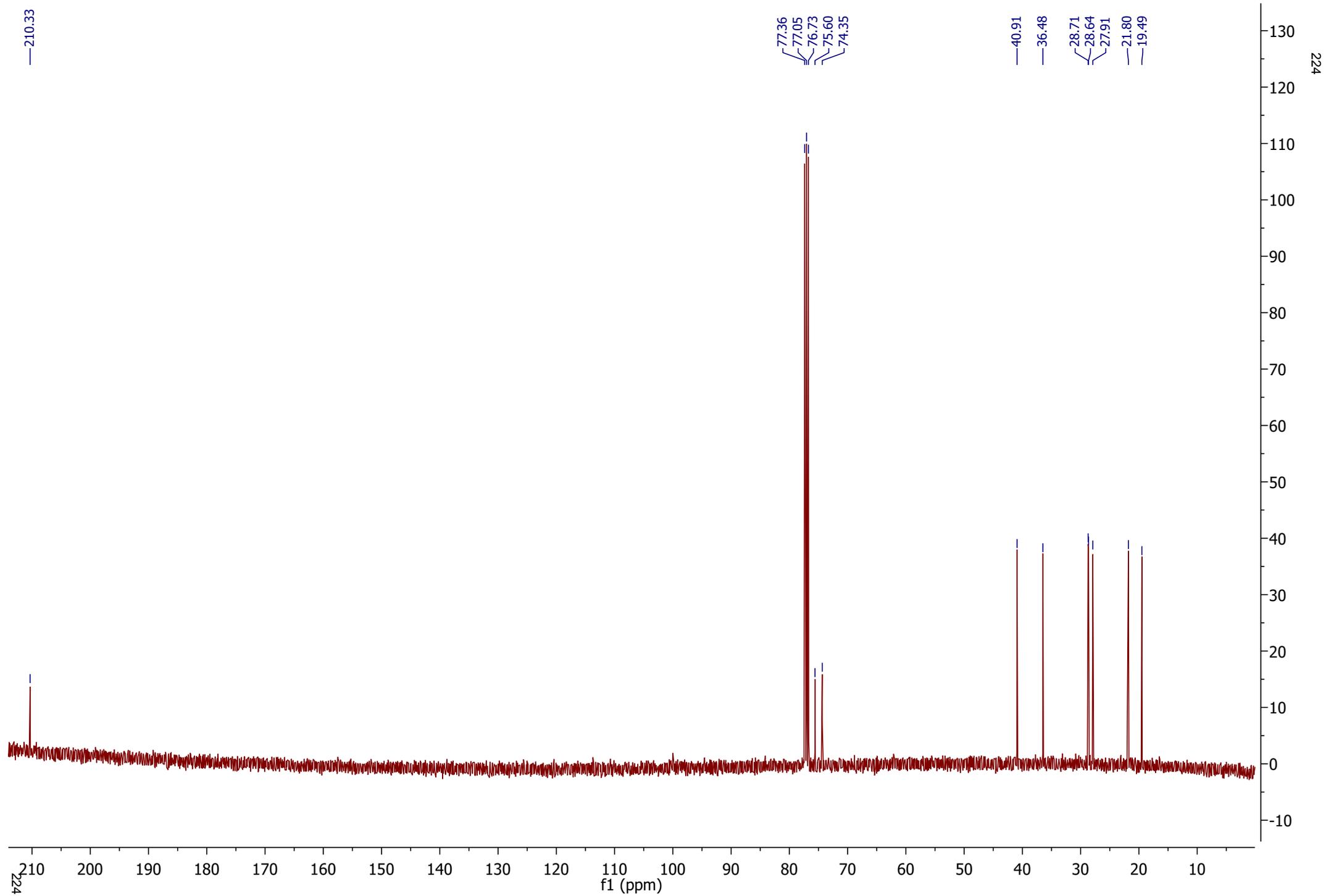
A10. <sup>13</sup>C 3-endo-hidroxicineol



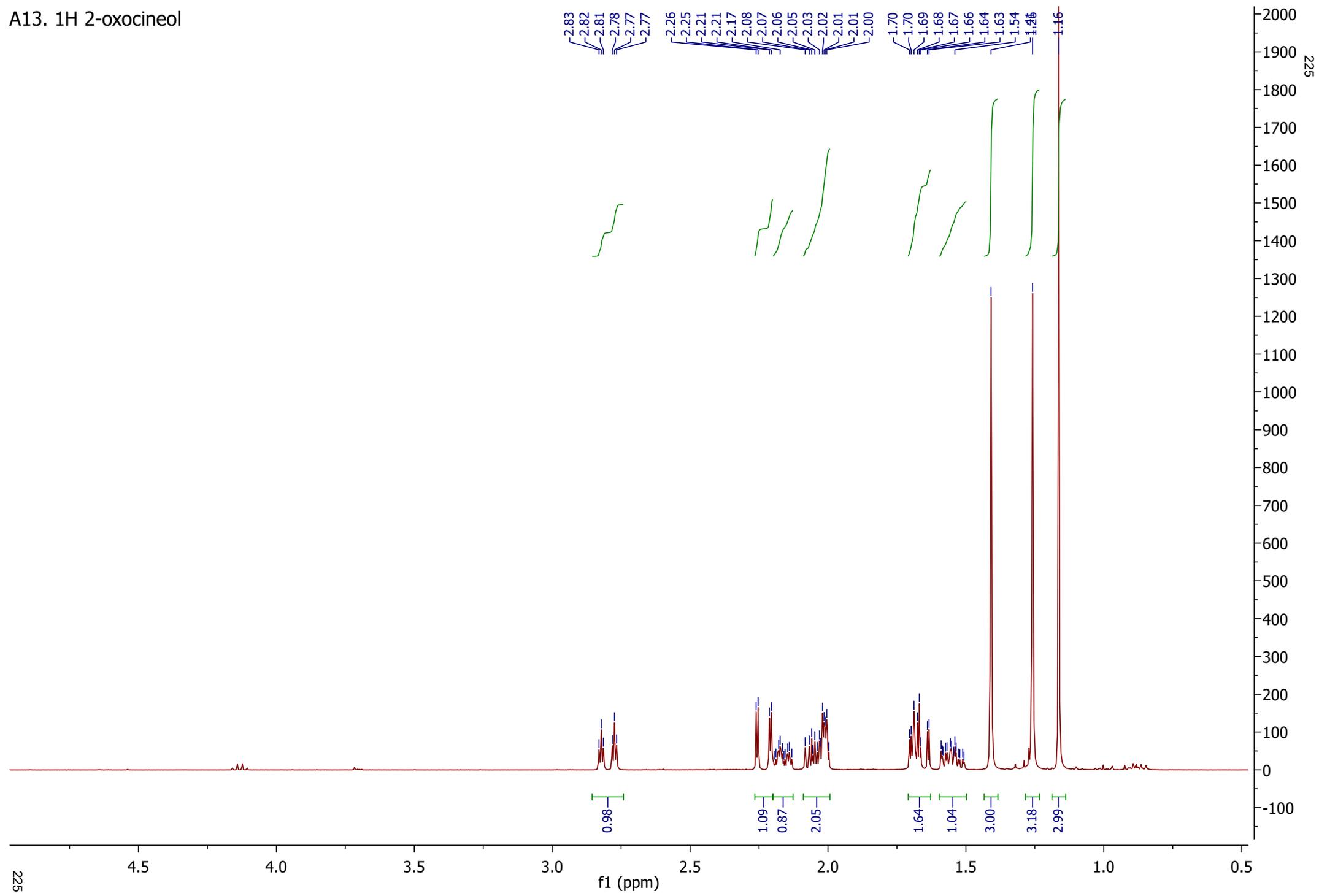
A11. 1H 3-endo-hydroxicineol



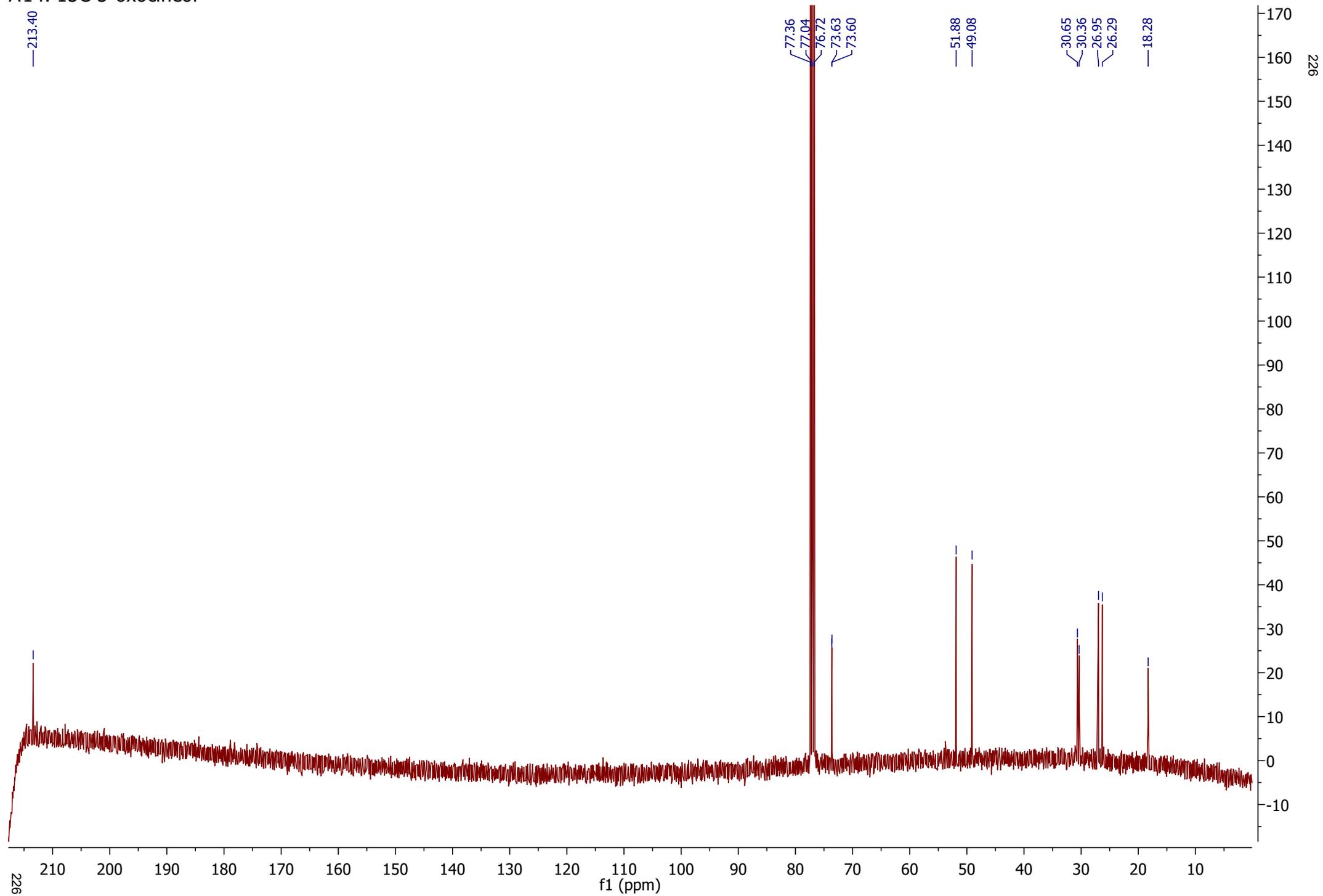
A12. <sup>13</sup>C 2-oxocineol



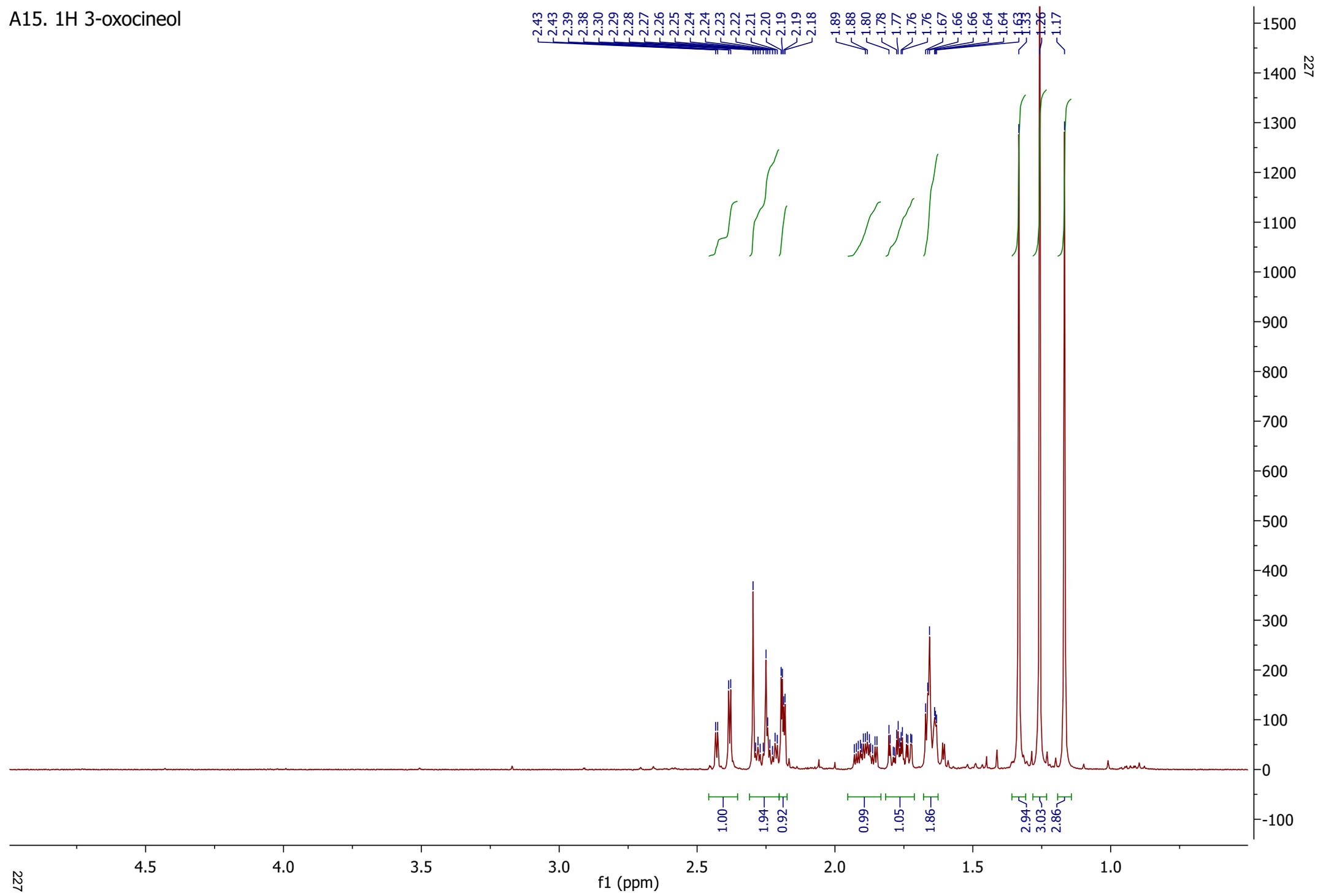
A13. 1H 2-oxocineol



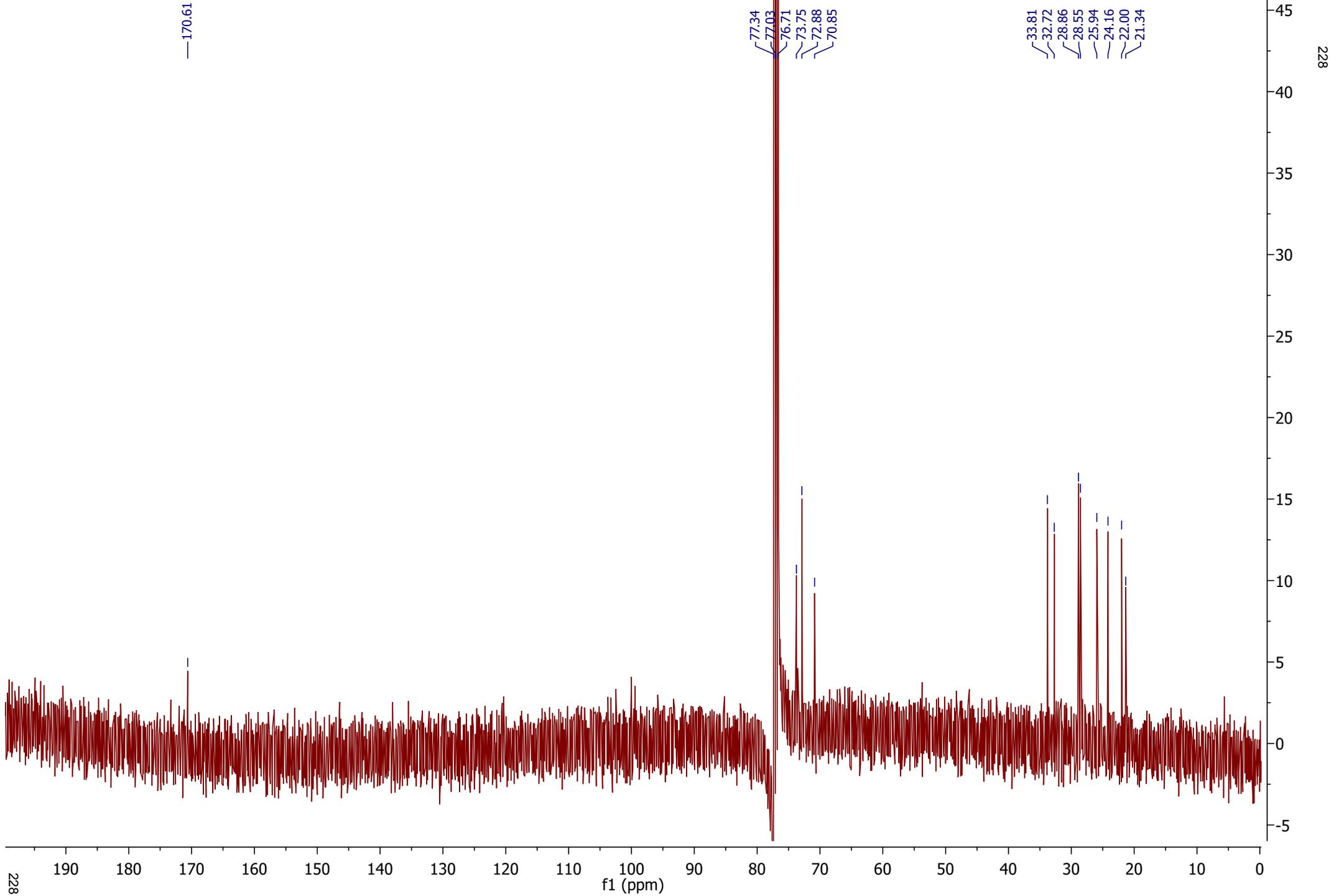
A14. <sup>13</sup>C 3-oxocineol



A15. 1H 3-oxocineol



A16. <sup>13</sup>C Acetato de 2-exo-hidroxicineol



A17. 1H Acetato de 2-exo-hidroxicineol

