

## BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOS R(+)-LIMONENO, $\alpha$ -PINENO Y $\beta$ -TERPINENO POR MEDIO DE CLOROPEROXIDASA de *Caldariomyces fumago*

### RESUMEN

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

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

### ABSTRACT

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

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

### 1. INTRODUCCIÓN

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

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

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

### GINNA PAOLA ARIAS

Estudiante de Química  
Universidad Industrial de Santander

### ELENA STASHENKO

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

### RODRIGO TORRES

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

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

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

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

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

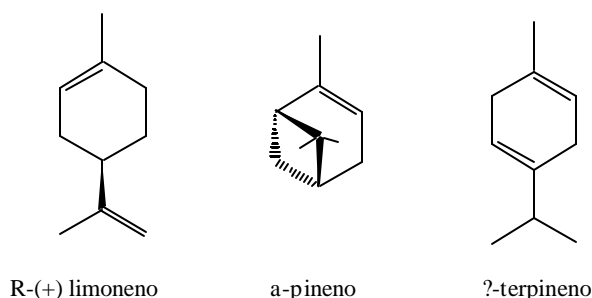


Figura 1. Estructura de los sustratos sometidos a biotransformación con CPO de *Caldariomyces fumago*

## 2. CONTENIDO

### 2.1. Materiales y Métodos

#### 2.1.1 Reactivos

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

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

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

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

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

## 2.2. Resultados y Discusión.

### 2.2.1 Biotransformación de R-(+)-limoneno

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

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

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

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

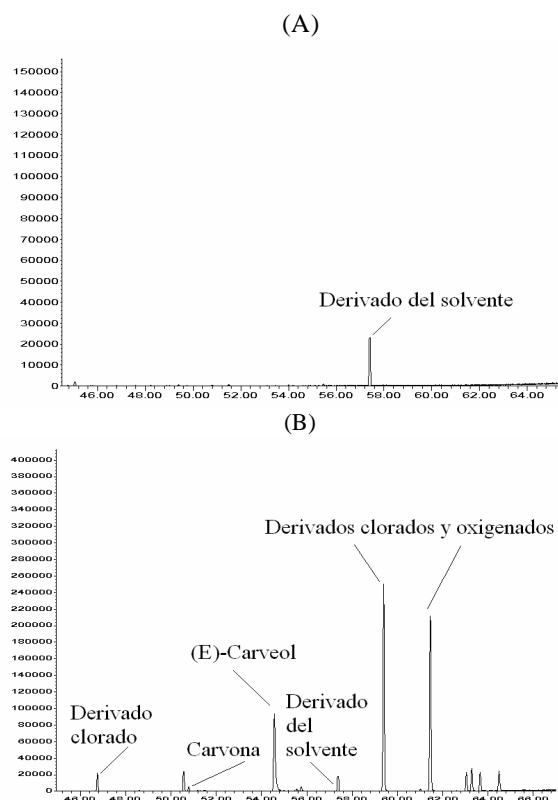


Figura 1. Cromatogramas de: (A) Blanco del sustrato R(+)-limoneno, y (B) Productos de biotransformación de R(+)-Limoneno.

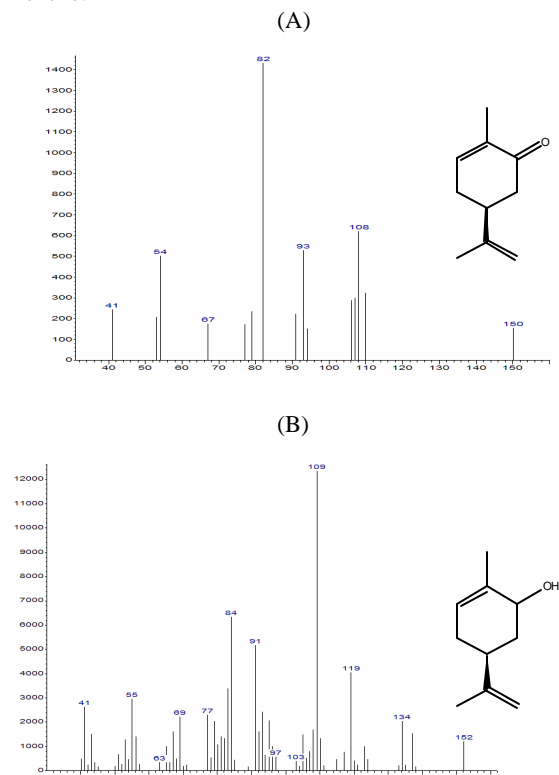


Figura 2. Espectros de masas de: (A) Carvona y (B) (E)-Carveol.

### 2.2.2 Biotransformación de $\beta$ -Terpineno:

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

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

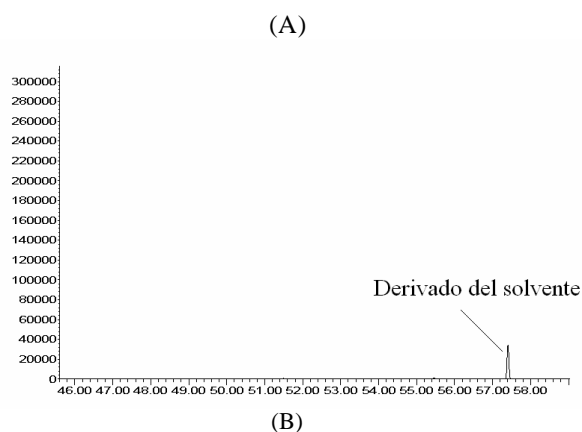


Figura 3. Cromatogramas de: (A) Blanco del sustrato  $\beta$ -Terpineno, y (B) productos de biotransformación de  $\beta$ -Terpineno.

### 2.4. Biotransformación de $\alpha$ -pineno:

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

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

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

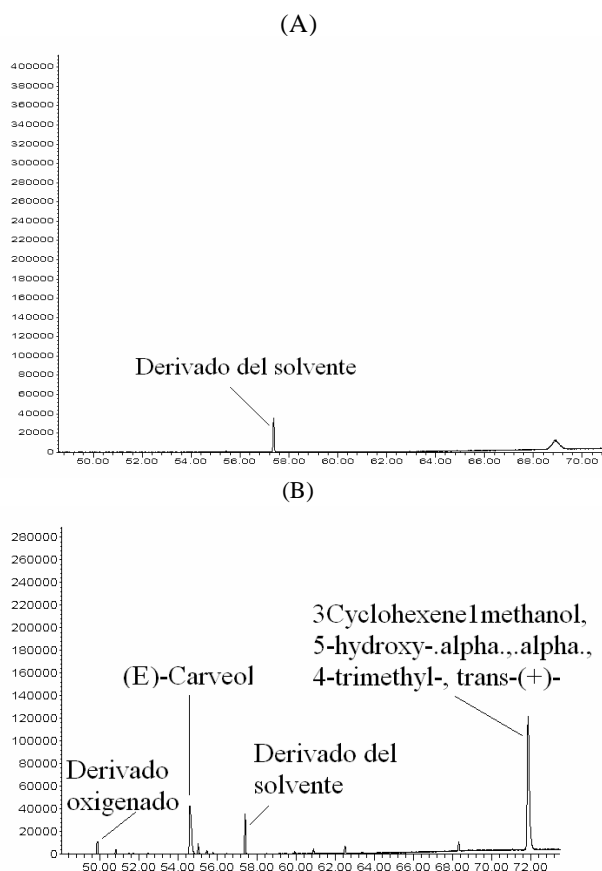


Figura 4. Cromatograma de: (A) Blanco del sustrato a-Pineno, y (B) productos de biotransformación de a-Pineno.

### 3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

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

### 4. AGRADECIMIENTOS

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

### 5. BIBLIOGRAFÍA

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