

OBTENCIÓN DE ALCOHOL PERÍLICO POR BIOTRANSFORMACIÓN DEL LIMONENO

RESUMEN

El limoneno es el monoterpeno cíclico más abundante en la naturaleza. El R-(+)-limoneno es el componente principal del aceite del flavedo en frutos cítricos (naranja, limón, mandarina, pomelo) y del aceite esencial de alcaravea (*Caraway*). El limoneno puede oxidarse en cualquiera de sus carbonos, de las cuales son interesantes la oxidación en C7 para producir alcohol perílico, perilaldehído y ácido perílico; o en C6 para producir carveol o carvona. En este estudio se evaluó la biotransformación del limoneno empleando como biocatalizador *Aspergillus niger* en diferentes medios de reacción. Fue posible la obtención de α -terpineol y alcohol perílico como componentes principales.

PALABRAS CLAVES: limoneno, alcohol perílico, biotransformación, *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

Limonene is the most abundant cyclic monoterpene in nature. R-(+)-limonene is the main compound of citrus fruits flavedo (orange, mandarin, lemon, and tangerine) and Caraway essential oil. Limonene can be oxidized in anyone of its carbon atoms. For instance, C7 is interesting for production of perillyl alcohol, perillaldehyde and perillic acid. Another remarkable carbon atom is C6 for carveol and carvone production. In this work, limonene biotransformation was evaluated using Aspergillus niger as biocatalyst in different culture media. It was possible the obtaining of α -terpineol and perillyl alcohol as the main components.

KEYWORDS: limonene, perillyl alcohol, biotransformation, *Aspergillus niger*.

1. INTRODUCCIÓN

En diversas ocasiones se han discutido las ventajas que ofrece el uso de biocatalizadores como tecnologías alternativas emergentes, en comparación con los catalizadores o métodos sintéticos convencionales [7, 8, 10, 15]. Es de aceptación general que los biocatalizadores funcionan bajo condiciones suaves de reacción, poseen alta actividad catalítica y permiten regio/estereoselectividad superior, en la mayoría de casos. Dentro de los compuestos naturales susceptibles a transformaciones biocatalíticas se encuentran los monoterpenos, principalmente el limoneno, presente en los frutos cítricos en cantidades tan altas como el 98%, con predominancia del (R)-(+)-limoneno, isómero más frecuente y constituyente de los aceites cítricos donde representa entre el 70 y 96 % de su composición. De esta forma es un candidato ideal para la elaboración de derivados con mayor valor en el mercado y con diversas aplicaciones, en áreas de perfumería y farmacología. El limoneno usualmente es separado de los aceites por un proceso de deterpenación, que lo hace abundante y disponible a bajo precio. Es interesante destacar que la industria de jugos de cítricos aporta cientos de toneladas de cáscaras como subproductos que pueden emplearse en la obtención del limoneno [2].

FABIÁN E. CASTELLANOS

Químico, M Sc.
Investigador Auxiliar
CENIVAM-CICTA
Universidad Industrial de Santander
maequi3@uis.edu.co

AIDÉ PEREA VILLAMIL

Química, M Sc,
Doctora en Química.
Investigadora Principal
CENIVAM-CICTA
Universidad Industrial de Santander
aperea@uis.edu.co

CLAUDIA ORTÍZ LÓPEZ

Microbióloga, M Sc.
Doctora en Ciencias.
Investigadora Principal
CENIVAM
Universidad Industrial de Santander
ortizc@uis.edu.co

Debido a la creciente preferencia de los consumidores por productos naturales, la clasificación de “sintético” o “artificial” tiene un impacto negativo en el valor de un producto, por ello ha aumentado la tendencia a pensar en transformaciones biocatalíticas obteniendo derivados que se consideran “productos naturales”. El precio de un producto natural puede ser mucho mayor a su análogo sintético, como sucede con la vainillina, el saborizante más importante a nivel mundial en términos de consumo y obtenida principalmente a partir del guayacol, cuyo valor es de USD 15/kg, mientras que la vainillina natural extraída tiene un costo superior a los USD 1200/kg [12].

Las biotransformaciones más efectivas de monoterpenos se han realizado con hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, ya que sus características los hacen catalizadores casi insuperables gracias a su resistencia ambiental y química, su abundancia, y el poder de transformación hacia muchos sustratos difíciles, con alta selectividad [5]. Uno de los compuestos derivados del limoneno que despierta gran interés, es el alcohol perílico, junto con la carvona y el α -terpineol. El alcohol perílico es un monoterpeno cíclico que se encuentra en muy baja cantidad en aceites esenciales de lavanda, hierbabuena, menta y alcaravea. Es un agente relativamente no tóxico que ha sido usado en pruebas preclínicas debido a sus propiedades terapéuticas y

actividad quimiopreventiva contra una amplia variedad de cánceres [3, 4, 11, 16].

El precio del alcohol perílico con 85% de pureza es aproximadamente de USD 1880/kg en comparación con el bajo costo del limoneno enantiopuro, aproximadamente USD 2/kg [13]. Es por estas razones de precios que actualmente existen procesos exitosos que emplean enzimas como catalizadores, los cuales demuestran claramente la importancia de estudiar las reacciones de biotransformación aplicadas a la industria.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Microorganismos, medios y reactivos

Para la biotransformación se empleó la cepa *Aspergillus niger* DSM 821 obtenida de DSMZ. Como sustrato R-(+)-limoneno, reactivo para síntesis (>97%) marca MERCK. Como medios de cultivo se emplearon MEA (Oxoid), TSB (Oxoid CM129), TSA (Oxoid CM131), PDA (Oxoid), YMPG y PDB. Solventes como diclorometano, hexano y etanol fueron grado analítico ACS marca MERCK.

2.2 Análisis de muestras con GC/MS

Los análisis fueron hechos con un cromatógrafo de gases modelo HP5890A Series II equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (relación de *split* 30:1), inyector automático HP 7683 Series. Para la separación de los analitos se empleó una columna capilar de sílice fundida HP-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). La programación de temperatura fue desde 50 °C mantenidos por 5 min, con velocidad de calentamiento de 5 °C/min hasta 250 °C y mantenida por 20 min. Se empleó un detector selectivo de masas modelo HP 5972 con sistema de ionización por impacto de electrones (70 eV) y analizador de masas cuadrupolar operado en modo de barrido completo desde 40 hasta 400 Dalton (*m/z*). La identificación se realizó comparando los espectros de masas obtenidos empleando el sistema de datos HP *Enhanced Chemstation* G1701BA y las bases de datos NBS75K y WILEY 138.

2.3 Preparación de patrones y calibración

Se preparó una solución *stock* a partir de R-(+)-limoneno con una concentración de 84000 ppm. A partir del *stock* se prepararon cuatro soluciones patrón con concentraciones entre 160 y 1800 ppm y se emplearon para realizar la curva de calibración. Cada determinación se hizo por triplicado.

2.4 Extracción, secado y concentración de analitos

Una vez completada la transformación, a cada tubo de reacción se adicionaron 2 porciones de 3 mL de diclorometano cada una. Se agitó vigorosamente durante 15 minutos hasta rompimiento de las células, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min. y se extrajo completamente la capa orgánica. Este procedimiento se repitió con la segunda porción de solvente y se mezclaron ambas porciones

orgánicas. El extracto obtenido fue secado empleando sulfato de sodio anhidro y luego concentrado con una corriente de nitrógeno gaseoso hasta obtener 1 mL exacto del extracto. Este concentrado se analizó directamente por cromatografía de gases.

2.5 Preparación de medios y crecimiento del hongo

Para el crecimiento de *A. niger* se probaron dos medios sólidos, PDA y MEA. Se inoculó con aguja en cajas de Petri con 25 mL de cada medio. Luego de 15 días se observó el crecimiento y esporulación. Se realizó la estandarización del inóculo preparando una solución de esporas en un medio salino fisiológico con un agente surfactante y se ajustó hasta concentración de 10^7 esporas/mL. Se preparó la solución acuosa con NaCl (0,85 % p/v) y Tween 80 (0,1 % p/v), esterilizando a 15-20 psi y 121°C durante 15 minutos. Una vez fría la solución se tomaron 20 ml y se adicionaron al *A. niger* esporulado, se transfirieron las esporas a la solución y se guardó en tubo de ensayo. De esta solución se tomó una alícuota para dilución, se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 10^7 esporas / mL, la cual fue usada como inóculo en los ensayos. Para llevar a cabo la biorreacción se prepararon cuatro medios diferentes: PDA, PDB, YMPG y solución de esporas.

2.6 Ensayos de biotransformación

En al menos 40 experimentos, se evaluaron los medios de reacción PDA, PDB, YMPG y la solución de esporas. Se sirvieron 5 ml de cada medio en tubos de 20 ml. La solución de esporas se empleó tal y como fue preparada. Los medios YMPG, PDA y PDB fueron inoculados con 50 μ l de solución de esporas, se taparon con algodón y se sometieron a agitación orbital constante (300 rpm) en temperatura ambiente. A diferentes intervalos de tiempo (1-8 días) se agregaron a cada tubo 10 μ l de solución de limoneno al 40% en etanol absoluto, sellando inmediatamente el frasco y manteniendo agitación constante durante el tiempo requerido. Una vez finalizadas las reacciones (72h) se efectuó la extracción de productos. Adicionalmente se realizaron blancos donde se adicionó el limoneno en solución, sin presencia de *A. niger*, bajo condiciones idénticas y, una vez transcurridas 72 h, se realizó la extracción.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

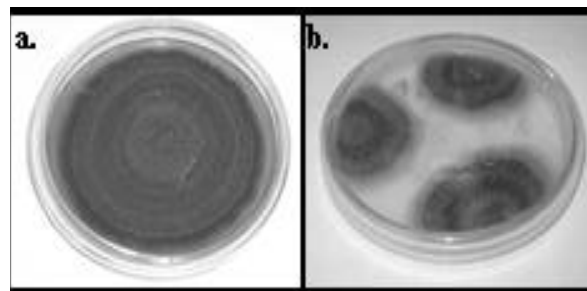


Figura 1. Crecimiento de *A. niger* en medios: a) MEA y b) PDA

3.1 Crecimiento del hongo

Aspergillus niger presentó mayor biomasa y mejor esporulación en medio MEA, por tanto, este medio fue seleccionado para el crecimiento. A partir del hongo esporulado en MEA se preparó la suspensión usada como inóculo. En la Figura 1 se observa la diferencia de crecimiento entre los medios PDA y MEA.

3.2 Ensayos de biotransformación

Cada uno de los productos de reacción fue analizado por GC/MS, determinando la presencia de compuestos oxigenados y concluyendo la eficiencia de biotransformación. La formación de compuestos oxigenados se inició a partir del segundo día y progresivamente aumentó hasta el octavo día. La máxima cantidad de estos compuestos se observó entre el cuarto y octavo día. El perfil cromatográfico del producto con predominio de alcohol perílico se indica en la Figura 2 y en la Figura 3 el espectro de masas obtenido.

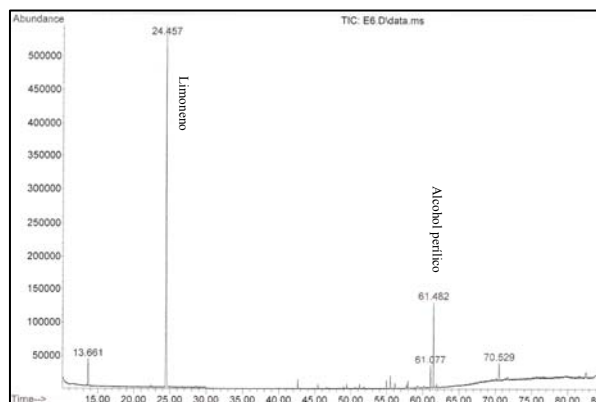


Figura 2. Perfil cromatográfico del producto obtenido

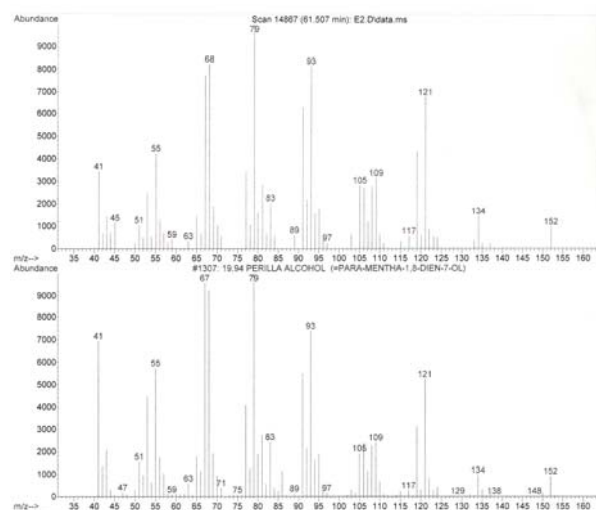


Figura 3. Espectro de masas del alcohol perílico obtenido

Empleando medio líquido YMPG se obtuvo el alcohol perílico como producto principal (14,7%). En este caso además del alcohol perílico solo fue detectado otro componente (no identificado) y limoneno remanente, es decir que se favorece la producción con selectividad hacia el alcohol.

En medio PDA se logró la formación de alcohol perílico (4,9%), sin embargo los productos mayoritarios fueron α -terpineol (19,7 %) y p-mentano-1,8-diol (12,2 %), por tanto la selectividad a la formación del alcohol es menor en comparación con YMPG. Al emplear medio PDB el producto mayoritario fue alcohol perílico (14,6%), con un resultado casi idéntico al obtenido con YMPG. El alcohol perílico predomina como producto en los medios líquidos YMPG y PDB que mostraron selectividad hacia el alcohol.

El alcohol perílico solo se ha encontrado en cantidades menores del 0,1% en algunos aceites esenciales extraídos de lavanda, hierbabuena, menta y alcaravea. En estudios animales ha demostrado causar la regresión en tumores pancreáticos, mamarios y del hígado, así como ser quimiopreventivo en cánceres de colon, piel y pulmón. También ha demostrado inhibir la fotocarcinogénesis en cánceres inducidos por rayos UV y tumores no melanomas [3, 4, 11, 16]. La bioproducción de alcohol perílico es difícil y poco común, solo se ha reportado su obtención a partir de limoneno empleando *Aspergillus* y células vegetales [9]. En ninguno de los casos las soluciones de esporas de *A. niger* condujeron a biotransformación y aunque tales soluciones se han empleado con éxito en otros trabajos, no fue posible obtener conversión.

Entre los productos interesantes obtenidos empleando el medio PDA, se encuentran el α -terpineol y el p-mentano-1,8-diol. El α -terpineol es un ingrediente empleado en perfumes y cosméticos, especialmente en productos de limpieza debido a su bajo costo (USD 9/kg) y a su alta estabilidad. Ha sido reportado como producto de la oxidación del limoneno empleando diferentes géneros de hongos, incluido *Aspergillus* [6], *Penicillium* y *Fusarium* [1, 14], logrando rendimientos mayores al 90% con tiempos de reacción de 8 horas. El p-mentano-1,8-diol o hidrato de terpineo, tiene propiedades farmacológicas y se usa en algunos medicamentos para la bronquitis y la tos, ya que actúa como expectorante. Su costo aproximado es de US\$ 86/kg con pureza del 98 %. Diferentes hidroximientoles y otros compuestos hidroxilados se han logrado obtener a partir de monoterpenoides empleando *A. niger*.

El uso de tapones de celulosa permitió la rápida evaporación del limoneno y probablemente de sus productos, haciendo imposible su detección. Por esta razón no es recomendable su uso y todas las biorreacciones deben permanecer con sellos herméticos durante su transcurso. Los ensayos blanco indicaron que los medios por sí solos no contienen o no se degradan en

componentes volátiles que interfieran en la identificación de productos.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Fue posible lograr la bioconversión del limoneno a alcohol perílico, empleando YMPG, PDA y PDB. Con la solución de esporas no fue posible ningún tipo de conversión. Los mayores porcentajes de alcohol perílico (14,6 % y 14,7 %) fueron logrados con medios PDB y YMPG respectivamente, los cuales favorecen la selectividad hacia el alcohol, con pocos productos colaterales. El medio sólido PDA promueve la formación de α -terpineol y p-mentano-1,8-diol, y aunque se forma el alcohol perílico, es baja su concentración. Se aprecia claramente como el medio de reacción y la fase en que se encuentre incide fuertemente en la transformación fúngica, variando la cantidad y tipo de los productos obtenidos. También se considera importante la presencia de oxígeno disponible, pero siempre en un sistema cerrado que evite la evaporación del sustrato y los productos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] ADAMS, A., DEMYTTEAERE, J.C.R., DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of culture conditions. *Food Chemistry*. 2003, 80: 525-534
- [2] AGER, D.J. Handbook of Chiral Chemicals. New York: Marcel Dekker Incorporated. 1999. p 83
- [3] CHAN, N.L.S., WANG, H., WANG, Y., LEUNG, H.Y. Polycyclic aromatic hydrocarbon induced CYP1B1 activity is suppressed by perillyl alcohol in MCF-7 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006, 213: 98-104
- [4] CHUNG, B.H., LEE, H.Y., LEE, J.S., YOUNG, C.Y.F. Perillyl alcohol inhibits the expression and function of the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Cancer Letters*. 2006, 236: 222-228
- [5] DE CARVALHO, C.C.C.R., DA FONSECA, M.M.R. Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances*. 2006, 24: 134-142.
- [6] DEMYTTEAERE, J.C.R., BELLEGHEM, K.V., DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)- limonene by fungi and use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry*. 2001. 57:199-208
- [7] DUETZ, W.A., VAN BEILEN, J.B., WITHOLT, B. Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001, 12:419-425
- [8] HELD, M., SCHMID, A., VAN BEILEN, J.B. Biocatalysis. Biological systems for the production of chemicals. *Pure and Applied Chemistry*. 2000, 72(7): 1337-1343
- [9] NOMA, Y., YAMASAKI, S., ASAKAWA, Y. Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*. *Phytochemistry*. 1992. 31 (8): 2725-2727
- [10] ROZZELL, J.D. Commercial scale biocatalysis: Myths and realities. *Bioorganic and Medicinal chemistry*. 1999, 7: 2253-2261.
- [11] SAMAILA, D., EZEKWUDO, D.E., YIMAM. Bioactive plant compounds inhibited the proliferation of induced apoptosis in human cancer cell lines, in vitro. *Transactions of the Integrated Biomedical Informatics and Enabling Technologies Symposium Journal*. 2004, 1:34-42.
- [12] SERRA, S., FUGANTI, C., BRENNAN, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*. 2005, 23(4): 193-198.
- [13] *Spectrum Chemicals and Laboratory Products* Catálogo de productos en: <http://www.spectrumchemical.com>
- [14] TAN, Q., DAY, D.F., CADWALLADER, K.R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Process Biochemistry*. 1998. 33(1): 29-31
- [15] THOMAS, S.M., DI COSIMO, R., NAGARAJAN, V. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends in Biotechnology*. 2002, 20(6): 238- 242
- [16] XU, M., FLOYD, H.S., GRETH, S.M., CHANG, W.L. Perillyl alcohol mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004, 195:232-246