

**BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS SUSTRATOS 2-FENILETANOL
Y ACETOFENONA CON EL HONGO FITOPATÓGENO
*Colletotrichum acutatum***

**BIOTRANSFORMATION OF 2-PHENYLETHANOL AND ACETOPHENONE
BY THE PLANT PATHOGENIC FUNGUS *Colletotrichum acutatum***

**BIOTRANSFORMAÇÃO DOS SUBSTRATOS 2-FENILETANOL
E ACETOFENONA COM O FUNGO FITOPATOGÊNICO
*Colletotrichum acutatum***

Diego A. Aristizábal¹, Clara S. Lezcano¹, Carlos M. García¹, Diego L. Durango^{1,2}

Recibido: 2/09/07 – Aceptado: 7/04/08

RESUMEN

En este estudio se evaluaron las biotransformaciones realizadas por el hongo fitopatígeno *Colletotrichum acutatum*, sobre los sustratos 2-feniletanol **1** y acetofenona **2**; los procesos se realizaron en el medio de cultivo líquido Czapeck-Dox a temperatura promedio de 24 °C, humedad relativa entre 45 y 60%, y agitación a 150 rpm en un agitador orbital tipo *shaker*. En la biotransformación a partir del sustrato **1** se obtuvieron los productos metabólicos 1-fenil-1,2-etanodiol **3**, (2-metoxietil) benceno **4** y acetato de 2-feniletilo **5**, y desde el sustrato **2** los compuestos 1-fenil-1,2-etanodiol **3**, 1-feniletanol **6** y 2-feniletanol **1**. Los productos de la trans-

formación microbiana se identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), y resonancia magnética nuclear de protón y carbono (RMN ¹H y ¹³C). Se observó una tendencia marcada del patógeno a producir hidroxilaciones sobre el sustituyente del anillo aromático; igualmente, tiene la capacidad de reducir el grupo carbonilo y esterificar los grupos hidroxilo de alcoholes primarios. Se discute una posible ruta metabólica para la transformación de los sustratos.

Palabras clave: hidroxilaciones enzimáticas, reducción enzimática de cetonas aromáticas, esterificación enzimática de alcoholes.

1 Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Calle 59A No. 63-020 Autopista Norte, Medellín, Colombia.

2 dldurango@unalmed.edu.co, dldurango@unal.edu.co

ABSTRACT

The microbial transformation of 2-phenylethanol **1** and acetophenone **2** was investigated using the plant pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*; the process was carried out in liquid media culture Czapeck-Dox at an average temperature of 24 °C, a relative humidity between 45% and 60% and with agitation in a shaker at 150 rpm. The biotransformation of the substrate **1** produced the metabolic products 1-phenyl-1,2-ethanediol **3**, (2-methoxyethyl)benzene **4** and 2-phenylethyl acetate **5**, and from substrate **2** were obtained the compounds 1-phenyl-1,2-ethanediol **3**, 1-phenylethanol **6** and 2-phenylethanol **1**. The structures of metabolic products were determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and nuclear magnetic resonance of proton and of carbon (^1H and ^{13}C NMR). The process has a strong tendency of the pathogen to produce hydroxylations on the substituents attached to the aromatic ring. Additionally, *C. acutatum* was effective to reduce the carbonyl group and produce esterification reactions in the hydroxyl groups from primary alcohols. The metabolic pathway of both substrates is discussed..

Key words: Enzymatic hydroxylations, enzymatic reduction of aromatic ketone, enzymatic esterification of alcohols.

RESUMO

Neste estudo foi analisada as biotransformações feitas pelo fungo fitopatogênico *Colletotrichum acutatum*, nos substratos 2-feniletanol **1** e acetofenona **2**; os processos forem feitos no meio de cultura

Czapeck-Dox a uma temperatura média de 24 °C, umidade relativa entre 45 e 60% e agitação 150 rpm em um agitador orbital tipo shaker. Na biotransformação do substrato **1** é obtido os produtos metabólicos 1-fenil-1,2-etanodiol **3**, (2-metoxietil)benzeno **4** e acetato de 2-feniletanol **5**, e do substrato **2** os compostos 1-fenil-1,2-etanodiol **3**, 1-feniletanol **6** e 2-feniletanol **1**. Os produtos da transformação microbiana foram identificados por meio do cromatografia de gás acoplada ao espectrometria de massas (CG-EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN ^1H e ^{13}C). Uma tendência marcada do patógeno é observada para produzir hidroxilações na cadeia lateral do anel aromático; também tem a capacidade de reduzir ao grupo carbonilo e esterificar dos grupos hidroxila da função álcool primária. Uma rota metabólica possível para a transformação das substratos é discutida.

Palavras-chave: Hidroxilações enzimática, redução enzimática da cetona aromática, esterificação enzimática do álcool.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de la industria farmacéutica de obtener moléculas quirales cada vez más complejas ha propiciado el desarrollo de nuevos procesos de biocatálisis o biotransformación combinados con nuevas tecnologías de ingeniería bioquímica (1, 2). Las enzimas son excelentes catalizadores en las reacciones regio- y estereo-selectivas en condiciones suaves (3, 4). Además, pueden aceptar como sustratos muchos compuestos artificiales.

Por biotransformación o biocatálisis se entiende todo proceso por el que una sustancia se transforma en otra mediante una reacción o conjunto de reacciones bioquímicas (5). Aunque la principal aplicación de las biotransformaciones en síntesis orgánica está en la preparación de compuestos enantiopuros, éstas también se usan para efectuar transformaciones de grupos funcionales quirales, ya que las biotransformaciones se llevan a cabo generalmente a temperatura ambiente y presión atmosférica, evitándose con ello el uso de condiciones de reacción extremas, las cuales pudieran causar isomerizaciones, racemizaciones, epimerizaciones o transposiciones (6).

Los hongos fitopatógenos del género *Colletotrichum* se han reconocido por su habilidad para transformar diferentes sustratos orgánicos (7-10), algunas veces con la finalidad de hacer frente a los mecanismos de defensa del hospedero. *C. acutatum* es uno de los principales hongos patógenos en la agricultura, y responsable de importantes pérdidas económicas en frutales en áreas tanto de climas templados como subtropicales y tropicales (11-13); en Colombia, este microorganismo afecta principalmente el cultivo de tomate de árbol *Solanum betaceum* (cav.) sinónimo *Cyphomandra betacea* (cav.) (Sendt) (14). Debido a estos factores, la mayor parte de los estudios llevados a cabo sobre *C. acutatum* se han encaminado a conocer aspectos relevantes de su epidemiología y control, desconociéndose su potencialidad para obtener sustancias químicas con valor agregado mediante la biotransformación de sustratos orgánicos. En el presente trabajo se evaluó la capacidad del hongo fitopatógeno *C. acutatum*, de transformar los

compuestos 2-feniletanol y acetofenona. Adicionalmente, se discuten algunas rutas metabólicas empleadas por el patógeno para la transformación de tales sustratos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento general. La cromatografía de capa fina (CCF) se realizó en cromatoplasas (sílica gel 60 F₂₅₄, 0,25 mm, Merck). Los sistemas de solventes fueron hexano/acetato de etilo [sistema de solvente 1 (S1), 1:1 (v/v); sistema de solvente 2 (S2), 4:6 (v/v)]. Los compuestos se visualizaron mediante luz UV (254 nm, 310 nm) y vapores de yodo sublimado, o mediante aspersión con FeCl₃ al 5%, y posteriormente la mezcla ácido acético-H₂SO₄-agua (7:1.5:1.5, v/v), seguida por un calentamiento suave. La cromatografía de gases (CG) se realizó en un cromatógrafo acoplado a espectrometría de masas, Agilent Technologies modelo 6890 N equipado con una columna de naturaleza no polar HP-5, 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 mm de espesor de película. Las condiciones del análisis cromatográfico fueron las siguientes: temperatura inicial de la columna, 50 °C; temperatura del inyector, 230 °C; temperatura del detector, 280 °C; programa de temperatura para el horno: rampa de calentamiento a razón de 10 °C/min hasta 250 °C, y conservada durante 6 min; tiempo de corrido del análisis 30 minutos. Como gas de arrastre se empleó N₂ calidad analítica a un flujo de 1 mL.min⁻¹. Las determinaciones de espectrometría de masas por ionización electrónica (EM-IE) se obtuvieron usando cromatografía de gases- espectrometría de masas (CG-EM), empleando las condiciones citadas previamente. Los es-

pectros infrarrojo (IR) se llevaron a cabo con un espectrómetro con transformada de Fourier Perkin Elmer Paragon 1000 empleando como solvente cloroformo. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón y carbono-13 se determinaron usando deuterocloroformo como solvente en un espectrómetro Bruker AMX 300 con 300,12 MHz para el núcleo de ^1H - y 75,42 MHz para el núcleo ^{13}C . Las multiplicidades se establecieron mediante la secuencia de pulsos ^{13}C JMOD. Los desplazamientos químicos están expresados como valores de δ (ppm) y las constantes de acoplamiento J en Hertz (Hz). Las biotransformaciones se realizaron en un agitador orbital tipo *shaker*, marca Centricol serie 0239 con cámara de incubación; los aislamientos e inoculaciones se realizaron en una cámara de flujo laminar clase 2, tipo A, de la compañía de Control de Contaminación Colombiana, modelo CSB-180 A. El

de la placa perforada para la cual se utilizaron los frotis del microorganismo realizados sobre PDA e incubados durante 72 horas, después de lo cual se retiraron con un sacabocados de 6 mm de diámetro los correspondientes cilindros, que se utilizaron para inocular nuevas cajas que contenían el medio de cultivo y el sustrato de interés a diferentes concentraciones. El inóculo se colocó en estas cajas dentro de las perforaciones que se habían realizado previamente con un sacabocados de diámetro idéntico. La actividad antifúngica se determinó midiendo los diámetros de crecimiento micelial cada 24 horas y durante un tiempo de 15 días. Las evaluaciones se realizaron por triplicado y se repitieron en el tiempo para observar la reproducibilidad; los ensayos se respaldaron con los correspondientes testigos (blanco absoluto y blanco de solventes). Los porcentajes de inhibición se calcularon utilizando la expresión:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Diámetro promedio del testigo} - \text{Diámetro promedio del ensayo}}{\text{Diámetro promedio del testigo}} \times 100\%$$

patógeno se obtuvo de frutos comerciales de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) infectados con antracnosis, y la identificación se realizó mediante caracterización morfológica y molecular en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Las cepas se mantuvieron en medio de cultivo sólido PDA, a temperatura promedio de 24 °C y humedad relativa de 45 a 60%.

Evaluación de la actividad antifúngica de los sustratos 2-feniletanol 1 y acetofenona 2. Las evaluaciones se llevaron a cabo empleando la metodología

Para los sustratos se construyeron las correspondientes curvas de toxicidad contra el patógeno, y para el proceso de biotransformación se seleccionó la concentración que produjo un porcentaje de inhibición entre 50 y 60%.

Procesos de biotransformación. En el proceso de biotransformación se utilizaron 3 L de medio de cultivo líquido Czapeck-Dox, preparado con los siguientes componentes: *Fuente de carbono y nitrógeno*, disolución A: 5% de glucosa y 0,1% de extracto de levadura, en agua destilada (hasta completar 1000 mL); *Micronutrientes*, disolución B: 0,5% de

K_2HPO_4 , 0,2% de $NaNO_3$, 0,05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,001% de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, en agua destilada (1000 mL). La glucosa fue sustituida de la formulación original por sacarosa en la misma proporción. Para la preparación del medio de cultivo se esterilizaron por separado las disoluciones A y B con el fin de evitar la degradación de los componentes; la mezcla se realizó antes de su utilización, combinando partes iguales en volumen de la disolución A, B y agua estéril. El proceso de biotransformación se realizó en erlenmeyers de base ancha de 1,0 L conteniendo 500 mL de medio. La inoculación se realizó con trozos de siembra en placa por extendido provenientes de cajas con edad de 20 días; se utilizó una caja de cultivo por litro de medio. Los erlenmeyers se cerraron con tarugos de algodón estéril, y se realizó una preincubación del hongo antes del proceso de biotransformación; se emplearon las colonias de un aislado monospórico de *C. acutatum* cultivadas durante 7 días como máximo, en un agitador orbital tipo *shaker* a 170 rpm. Terminado el periodo de preincubación se retiró asépticamente la biomasa, mediante filtración con un lienzo de nylon estéril, y se transfirió a un nuevo medio de cultivo fresco; sobre este material se adicionó cada uno de los sustratos a las concentraciones que producen inhibiciones del crecimiento micelial entre 50 y 60%.

El proceso de biotransformación se extendió por un periodo de tiempo de 14 días; en este rango de tiempo se espera que el hongo transforme la mayor parte posible del sustrato de partida, y en los medios de cultivo se obtenga una gama amplia de compuestos, incluyendo intermediarios y productos de biotransformación más avanzados.

Estudios en el curso del tiempo. Los estudios en el curso del tiempo para la biotransformación de ambos sustratos se iniciaron a partir del séptimo día. Los muestreos se realizaron cada 48 horas, retirándose a través de una sonda estéril 50,0 mL de medio de cultivo e incluyendo parte de micelio; este material se mezcló con 50,0 mL de etanol al 95% con la finalidad de inhibir el proceso enzimático y detener la biotransformación. Cada una de las muestras se saturó con cloruro de sodio y se extrajo con tres porciones de 50,0 mL de acetato de etilo. Los extractos se mezclaron y secaron con sulfato de sodio anhidro, y posteriormente se filtraron y destilaron a presión reducida mediante un rotaevaporador con una temperatura inferior a 45 °C. Las muestras fueron posteriormente pasadas por una columna de Sephadex LH-20 eluida inicialmente con una mezcla de éter de petróleo (40-60 °C)- CH_2Cl_2 -MeOH, 2:1:2 v/v, para eliminar el material lipídico, y finalmente metanol. La fracción obtenida por elusión con metanol se concentró a sequedad en un rotoevaporador, se redisolvió con 5,0 mL de cloroformo grado análisis, se filtró a través de un microfiltro Whatman (0,45 μm), y se almacenó a 4 °C hasta su análisis por CCF y CG-EM. La relación entre el sustrato y los productos metabólicos se determinó con base en el área de los picos en CG.

Extracción y purificación de los productos de biotransformación. Finalizada la biotransformación de cada uno de los sustratos, los medios de cultivo obtenidos se filtraron sobre una malla de nylon para retirar la mayor parte de la biomasa (micelio); el filtrado se saturó con cloruro de sodio y acetato de etilo, y se sometió nuevamente a un proceso de

filtración sobre tierra de diatomeas (celita). El filtrado se reunió y se extrajo tres veces con acetato de etilo, empleando en cada extracción un tercio de su volumen; el extracto obtenido se denominó *fracción neutra*. La fase acuosa se llevó a un pH de 2 con solución de HCl al 10%, y se sometió a una nueva extracción utilizando las mismas proporciones anteriores de acetato de etilo; el extracto obtenido se denominó *fracción ácida*. El micelio se saturó con cloruro de sodio, se adicionó acetona hasta cubrirlo completamente, y se dejó en reposo durante una hora. La masa resultante se extrajo tres veces con acetona y la fase orgánica obtenida se reunió, filtró y destiló a presión reducida hasta retirar la acetona. El extracto acuoso resultante se saturó con NaCl, y se extrajo con acetato de etilo tres veces; el extracto obtenido se denominó *fracción micelio*.

Mediante análisis comparativo realizado por cromatografía de capa fina se observó que la *fracción ácida* y *neutra* provenientes de la biotransformación del 2-feniletanol y la acetofenona, presentan similitud en su composición cualitativa, por ello se reunieron en una sola fracción y se denominaron "2FAN", a la obtenida de la combinación de las fracciones *ácida* y *neutra* provenientes del 2-feniletanol, y "AAN" a la que resulta de la mezcla de las mismas fracciones pero a partir de la acetofenona. Las *fracciones micelio*, procedentes de la biotransformación de los dos sustratos, no presentaron una composición cualitativa (CCF) promisorio por estar constituidas fundamentalmente por material lipídico, y no fueron consideradas en este análisis. Los componentes presentes en las fracciones "2FAN" y "AAN" fueron sometidos a procesos de purificación cromatográfica, utilizando columnas suce-

sivas de sílica gel 60 y Sephadex LH-20. La cromatografía de adsorción sobre sílice empleaba como sistema de elusión gradientes de polaridad creciente de éter de petróleo (40-60 °C) y acetato de etilo, mientras que la cromatografía por exclusión molecular utilizaba inicialmente el sistema éter de petróleo-diclorometano-metanol en proporción en volumen 2:1:1 y finalmente metanol.

Aislamiento de los productos de biotransformación 3, 4 y 5. La fracción "2FAN", obtenida a partir del 2-feniletanol, se sometió a CC empleando como fase estacionaria sílica gel 60, y como fase móvil mezclas de polaridad creciente de éter de petróleo-acetato de etilo. Las subfracciones obtenidas se refinaron nuevamente mediante cromatografía de permeación en gel empleando Sephadex LH-20, y como eluyente la mezcla éter de petróleo-CH₂Cl₂-MeOH, 2:1:1 (v/v), para obtener los productos metabólicos 3 (36 mg) y 5 (18 mg). Un análisis por CG-EM de una fracción refinada también reveló la presencia de 4, cuya estructura se determinó mediante comparación de su EM-IE con el reportado en la base de datos NIST (19).

Compuesto 3: se aisló como un material semisólido a temperatura ambiente. Mediante análisis CG-EM presentó un tiempo de retención, t_R de 10,57 min. EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 138 [M]⁺ (8), 120 [M-H₂O]⁺ (5), 107 [M-CH₃O]⁺ (100), 77 [C₆H₅]⁺ (48). IR ν_{max} (CHCl₃) cm⁻¹: 3350 (OH), 3100, 2980, 1493, 1454, 1212, 1150. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,26 (5H, m); 4,81 (1H, d, H-1); 3,75-3,60 (2H, m, H-2 y 2'). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 140,98 (C-1'), 128,93 (C-3' y 5'),

128,36 (C-4'), 126,51 (C-2' y 6'), 75,13 (C-2), 68,48 (C-1). El análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C reveló que la estructura del compuesto coincide con la del 1-fenil-1,2-etanodiol.

Compuesto 4: en el análisis por CG-EM presentó un t_R de 9,85 min. EM-IE, m/z (% int. rel.): 136 $[\text{M}]^+$ (52), 104 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$ (25), 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ (100), 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (22), 65 $[\text{C}_5\text{H}_5]^+$ (32), 51 (28), 45 (44). Este producto de transformación se identificó como el éter metílico del 2-feniletanol, el (2-metoxietil)benceno.

Compuesto 5: se aisló como un líquido incoloro, viscoso y de olor agradable. En el análisis CG-EM presentó t_R de 10,69 min. EM-IE, m/z (% int. rel.): 104 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}]^+$ (100), 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ (23). IR ν_{max} (CHCl_3) cm^{-1} : 3060, 2950, 1750 ($\text{C}=\text{O}$), 1660 ($\text{C}=\text{C}$ aromático), 1490, 1370, 1240. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,64-7,02 (5H, m), 4,60 (2H, t, $J = 7,0$, H-1), 3,01 (2H, t, $J = 7,0$, H-2), 2,10 (3H, s). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 171,46 ($\text{C}=\text{O}$), 138,28 (C-1'), 129,34 (C2' y 6'), 128,95 (C3' y 5'), 127,02 (C-4'), 65,38 (C-1), 35,55 (C-2), 21,40 (CH_3). El compuesto **5** presentó una fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$ de acuerdo con el EM-IE. A partir de otros datos espectroscópicos, **5** posee un grupo acetil (δ_{H} 2,10; δ_{C} 171,46, 21,40; ν_{max} 1759, 1240 cm^{-1}). Las propiedades cromatográficas y espectroscópicas de **5** son totalmente concordantes con las de una muestra auténtica de acetato de 2-feniletanol obtenida por acetilación del 2-feniletanol.

Aislamiento de los productos de biotransformación 1, 3 y 6. La fracción "AAN", obtenida a partir de la acetofe-

nona, se sometió a cromatografía de columna empleando como fase estacionaria sílica gel 60, y como eluyente éter de petróleo, mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo de polaridad creciente, acetato de etilo puro, y finalmente con metanol. Las subfracciones obtenidas se sometieron posteriormente a sucesivas CC empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y la mezcla éter de petróleo- CH_2Cl_2 -MeOH, 2:1:1, y finalmente metanol. Se obtuvieron los productos de transformación microbiana **1** (8 mg), **3** (22 mg) y **6** (19 mg).

Compuesto 1: se aisló como un líquido incoloro y viscoso. Mediante análisis CG-EM presentó un tiempo de retención t_R de 7,88 min. EM-IE, m/z (% int. rel.): 122 $[\text{M}]^+$ (30), 104 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (5), 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ (100). IR ν_{max} (CHCl_3) cm^{-1} : 3400 ($-\text{OH}$), 3030, 2950, 1600 ($\text{C}=\text{C}$ aromático), 1493, 1454, 1050. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,27-7,07 (5H, m), 3,69 (2H, t, $J = 7,0$, H-2), 2,76 (2H, t, $J = 7,0$, H-1). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 134,86 (C-1'), 125,09 (C-2' y 6'), 124,49 (C-3' y 5'), 122,34 (C-4'), 59,40 (C-1), 35,19 (C-2). Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C corresponden con los del 2-feniletanol; adicionalmente, las características espectroscópicas (EM-IE, RMN ^1H y ^{13}C), y el comportamiento cromatográfico (t_R) se compararon con las de una muestra auténtica de 2-feniletanol (Merck) coincidiendo perfectamente.

Compuesto 6: se aisló como un líquido de color amarillo, viscoso. En CG-EM mostró un t_R de 7,15 min. EM-IE, m/z (% int. rel.): 122 $[\text{M}]^+$ (20), 107 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ (100), 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (42). IR ν_{max} (CHCl_3) cm^{-1} : 3386 ($-\text{OH}$), 3040, 2975, 1675 ($\text{C}=\text{C}$ aromático), 1492, 1451, 1217.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,38-7,25 (5H, m), 4,88 (1H, c, $J = 6,5$, H-1), 1,50 (3H, d, $J = 6,5$). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 146,51 (C-1'), 129,20 (C 2' y 6'), 128,16 (C 4'), 126,10 (C3' y 5'), 71,09 (C-1), 25,85 (CH_3). El producto de transformación **6** se identificó como el 1-feniletanol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Toxicidad de los sustratos hacia *C. acutatum*. Previo al proceso de biotransformación se evaluó la toxicidad de los sustratos sobre el microorganismo en medio sólido (PDA), a diferentes concentraciones durante un periodo de 14 días. Los sustratos 2-feniletanol y acetofenona presentan una moderada actividad antifúngica contra *C. acutatum* (Figuras 1 y 2). A una concentración de 1000 mg/L la acetofenona inhibió casi completamente el crecimiento radial del hongo fitopatógeno du-

rante los quince días de la evaluación, mientras que el 2-feniletanol sólo lo hizo en aproximadamente un 60%. De las Figuras 1 y 2 se determinó que para una inhibición del crecimiento radial entre el 50 y 60% después de 14 días de incubación, se requiere de una concentración de acetofenona de 1000 mg/L y de 2-feniletanol de 750 mg/L. Con estas concentraciones se llevó a cabo el procedimiento de biotransformación de los sustratos, a fin de garantizar una adecuada actividad enzimática y conversión del sustrato por parte del microorganismo.

Experimentos en el curso del tiempo. La abundancia relativa en el curso del tiempo para los metabolitos se observó cualitativamente por CCF y se midió cuantitativamente mediante GC (Figuras 3 y 4). En este sistema, el sustrato de partida 2-feniletanol **1** se transformó principalmente a **3** y **5**, y tan sólo el 20% de **1** se

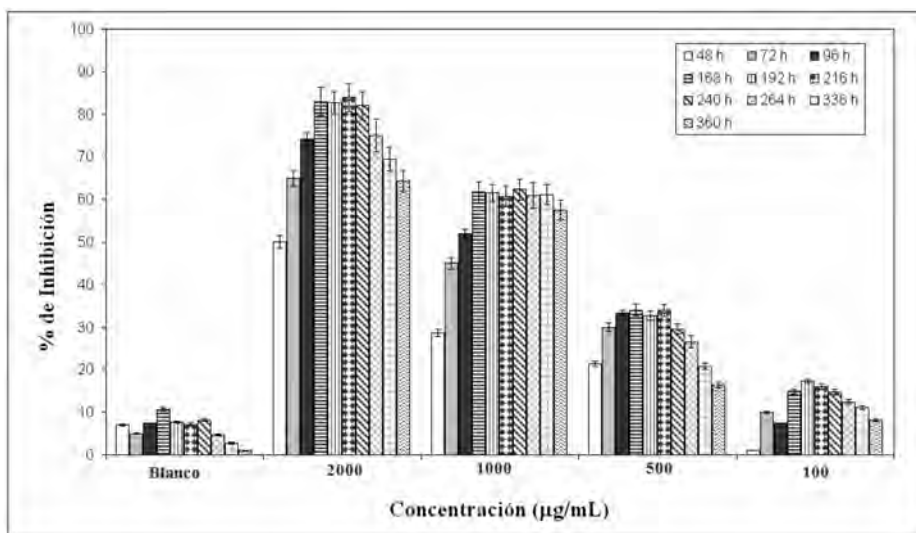


Figura 1. Actividad antifúngica del 2-feniletanol **1** contra el hongo *C. acutatum* durante los 15 días.

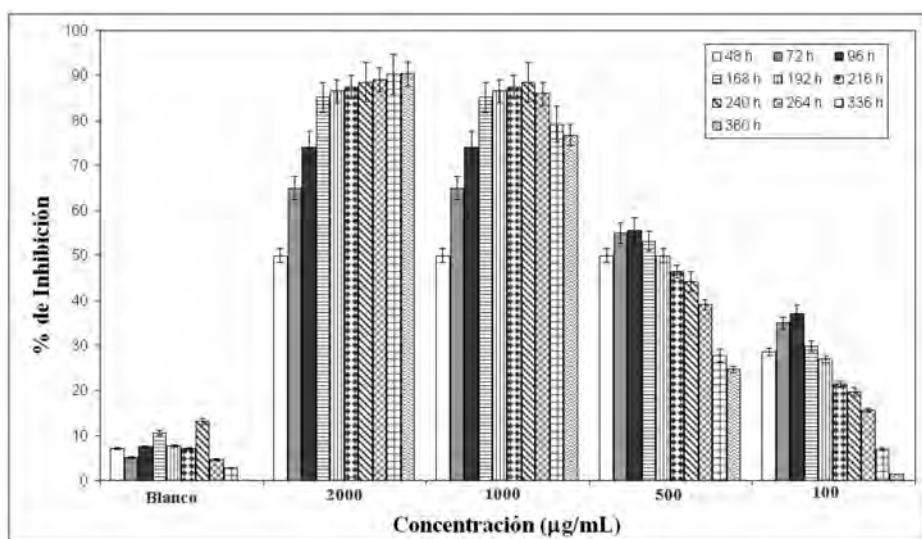


Figura 2. Actividad antifúngica de la acetofenona 2 contra el hongo *C. acutatum* durante los 15 días.

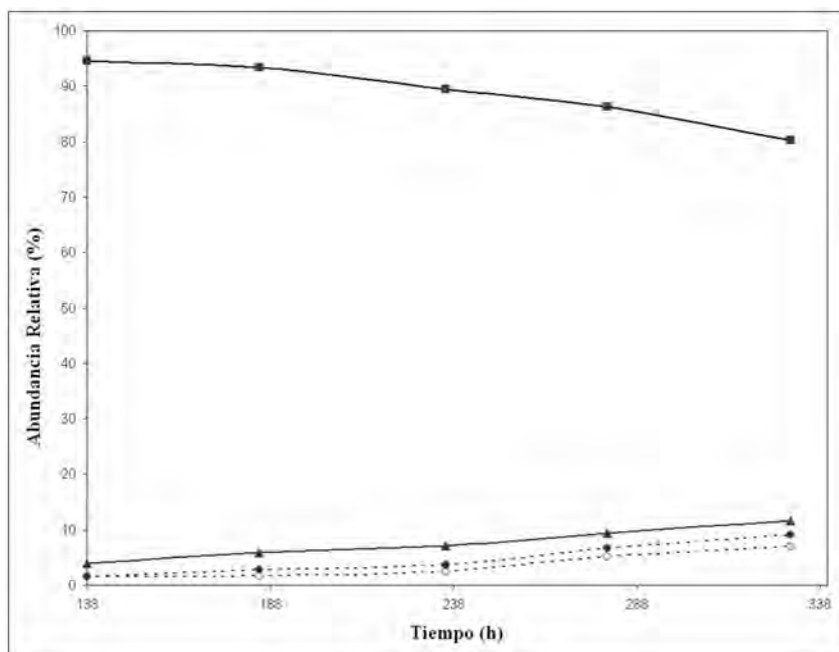


Figura 3. Experimento en el curso del tiempo de la biotransformación de 2-feniletanol 1 por el hongo fitopatógeno *C. acutatum*: (□) 2-feniletanol, 1; (●) 1-fenil-1,2-etanodiol, 3; (▲) acetato de 2-feniletilo, 5; (○) (2-metoxietil)benceno, 4.

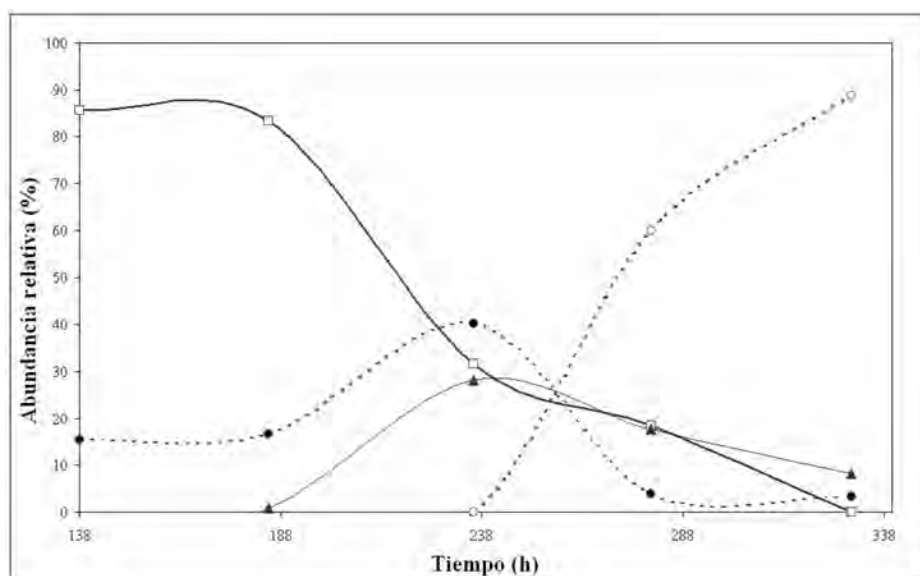


Figura 4. Experimento en el curso del tiempo de la biotransformación de acetofenona 2 por el hongo fitopatológico *C. acutatum*: (□) acetofenona, 2; (●) 1-feniletanol, 6; (▲) 1-fenil-1,2-etanodiol, 3; (○) 2-feniletanol, 1.

consumió durante los 14 días. El metabolito mayoritario 3 alcanzó cerca del 12% de la abundancia relativa pasados los 14 días, mientras que 5 presentó en este mismo lapso de tiempo un 9%. Por otra parte, a partir de la acetofenona 2, se generaron como productos mayoritarios 3 y 6. Este último alcanza su máxima concentración en el décimo día de biotransformación. Por su parte, el producto metabólico 3 se comienza a formar, a expensas de un declive en la concentración de acetofenona, luego del octavo día de biotransformación, y alcanza su concentración mayoritaria (30% de la abundancia relativa) pasados 10 días. Igualmente, el producto 1 sólo se empieza a producir a partir del día 10, a la par con la reducción en los niveles de 6 y 2. A diferencia del sustrato 1, la conversión del sustrato 2 por parte de *C. acutatum* fue mayor, y

cerca de un 90% del sustrato se metabolizó pasados los 14 días del proceso. Estos metabolitos no fueron detectados por análisis mediante CCF y CG a partir de un cultivo de *C. acutatum* carente de los sustratos.

A partir de las estructuras de los productos obtenidos y los experimentos en el curso del tiempo, se plantearon las posibles rutas metabólicas para la biotransformación de 1 (Figura 5) y 2 (Figura 6) por el hongo fitopatológico *C. acutatum*. En la transformación de 1 se manifiesta la capacidad del microorganismo para efectuar reacciones de esterificación (acetilación) y formación de éteres metílicos a partir de alcoholes primarios, para la producción de 5 y 4, respectivamente. Adicionalmente, se aprecia la formación del producto de oxidación 3 (glicol), proveniente del proceso oxidativo en el carbo-

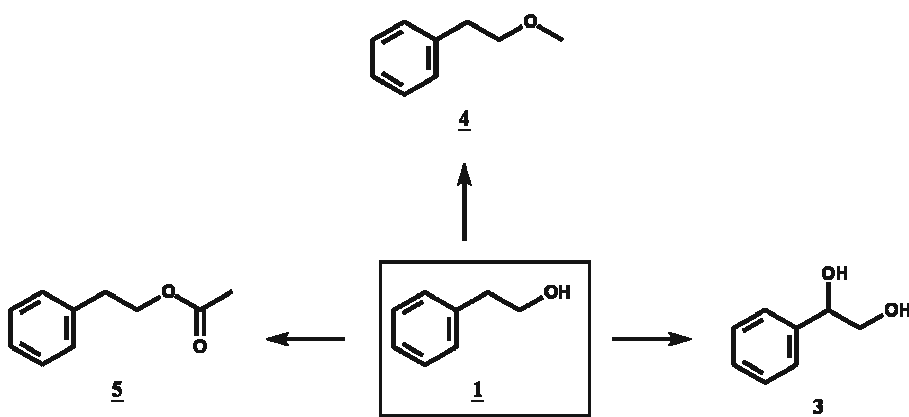


Figura 5. Proceso de biotransformación del sustrato 2-feniletanol **1** mediante el hongo *C. acutatum*.

no bencílico (monohidroxilación) del 2-feniletanol.

De otro lado, en la biotransformación del sustrato **2**, el producto **1** se considera proveniente de la ruta (**2** → **6** → **3** → **1**). En esta secuencia, la acetofenona **2** es inicialmente reducida para formar el alcohol secundario 1-feniletanol **6**; el cual es pos-

teriormente hidróxilado en el carbono metílico para la producción del glicol **3**. La última etapa implica la conversión del 1,2-diol **3**, para la obtención del 2-feniletanol **1**, la cual puede proceder posiblemente de acuerdo con una secuencia de deshidratación selectiva-reducción (véase Figura 7).

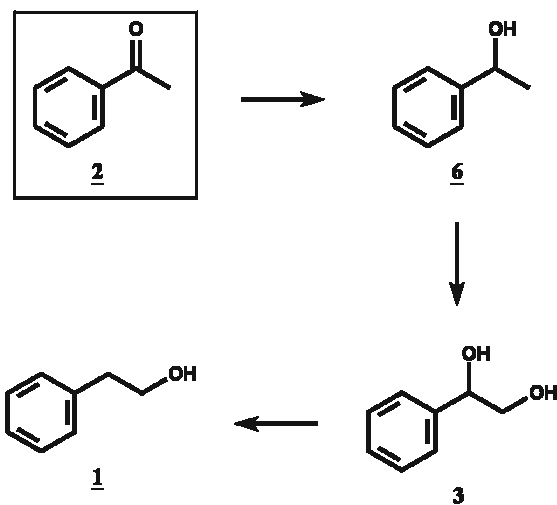


Figura 6. Proceso de biotransformación del sustrato acetofenona **2** mediante el hongo *C. acutatum*.

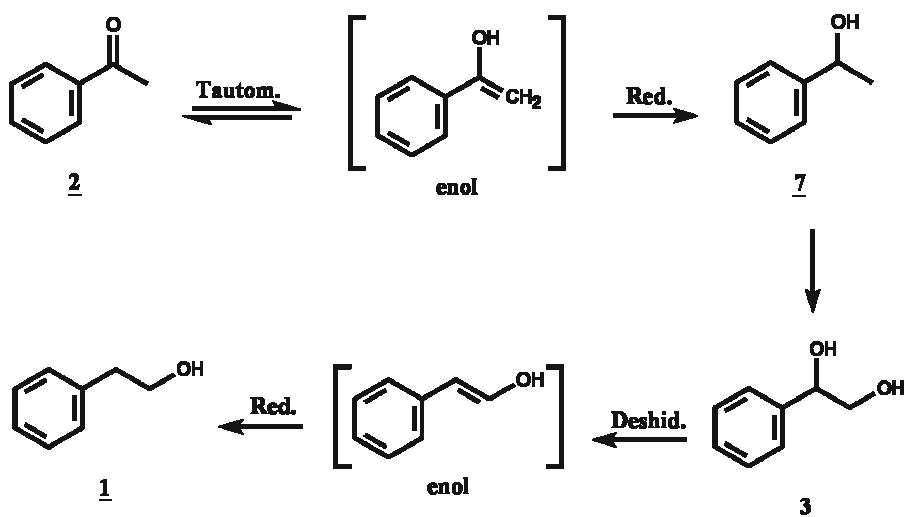


Figura 7. Ruta propuesta para la formación de los productos de la biotransformación de acetofenona con el hongo fitopatógeno *C. acutatum*.

CONCLUSIONES

De la biotransformación del sustrato 2-feniletanol **1** con el hongo *C. acutatum*, se identificaron mediante una combinación de RMN ^1H y ^{13}C , EM-IE, y por comparación con los datos cromatográficos y espectrales obtenidos para muestras auténticas y reportados en la literatura, los metabolitos 1-fenil-1,2-etanodiol **3**, acetato de 2-feniletanol **5** y el éter metílico del 2-feniletanol, y a partir de la acetofenona **2**, se elucidaron los compuestos 1-feniletanol **6**, 2-feniletanol **1** y 1-fenil-1,2-etanodiol **3**.

Los resultados sugieren que el hongo fitopatógeno *C. acutatum* tiene la capacidad de convertir diferentes sustratos mediante reacciones de reducción (**2** $\rightarrow$ **6**) y oxidación (**1** $\rightarrow$ **3**) sobre el sustituyente del anillo aromático. Esta versatilidad puede ser aprovechada en la síntesis orgánica para la obtención de productos más especializados. Adicionalmente, *C. acu-*

tatum produce reacciones metabólicas de esterificación (acetilación) y formación de éteres metílicos sobre los sustratos del tipo alcohol primario, permitiendo desde el sustrato **1** la obtención de los compuestos, acetato de 2-feniletanol, **5** y (2-metoxietil)benceno, **4**.

Los resultados sugieren la posibilidad de efectuar reacciones de hidroxilación en la posición bencílica, reducción de grupos carbonilo y acilaciones sobre alcoholes primarios empleando el hongo fitopatógeno *C. acutatum*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Huisman G.W.; Gray D. Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. **13**: 352-358.

2. Straathof A. J.; Panke S.; Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. **13**: 548-556.
3. Kirk O.; Borchert T.V.; Fuglsang C.C. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. **13**: 345-351.
4. Schmid A.; Hollmann F.; Park, J. B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. **13**: 359-366.
5. Faber, K. Biotransformations in organic chemistry. 3 ed. Berlin Heidelberg New York: Springer. 1997.
6. Luna H. Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 2004. **48**: 211-219.
7. Romano A.; Romano D.; Ragg E.; Constantino F.; Lenna R.; Gandolfi R.; Molinari F. Steroid Hydroxylations with *Botryodiplodia malorum* and *Colletotrichum lini*. *Steroids*. 2006. **71**: 429-434.
8. Miyazawa M.; Akazawa S.; Sakai H.; Nankai H. Biotransformation of (-)-Dihydromyrcenyl Acetate Using the Plant Parasitic Fungus *Glomerella cingulata* as a Biocatalyst. *J. Agric. Food Chem.* 2000. **48**: 4826-4829.
9. Nankai H.; Miyazawa M.; Akazawa S.; Kameoka H. Biotransformation of (±)-Lavandulol by the Plant Pathogenic Fungus *Glomerella cingulata*. *J. Agric. Food Chem.* 1998. **46**: 3858-3862.
10. Miyazawa M.; Nankai H.; Kameoka H. Biotransformations of Acyclic Terpenoids, (±)-trans-Nerolidol and Geranylacetone, by *Glomerella cingulata*. *J. Agric. Food Chem.* 1996. **44**: 1543-1547.
11. Fernando T.H.; Jayasinghe C.K.; Wijesundera R.L. Factors affecting spore production, germination and viability of *Colletotrichum acutatum* isolates from *Hevea brasiliensis*. *Mycological Research*. 2000. **104** (6): 681-685.
12. Freeman, S.; Shabi E.; Katan T. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*Anemone coronaria* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. **66** (12): 5267-5272.
13. Freeman S.; Katan T.; Shabi E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*. 1998. **82** (6): 596-605.
14. Saldarriaga A.; Bernal J.; Tamayo P. Reconocimiento y manejo de las enfermedades del cultivo del tomate de árbol en Antioquia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Medellín, Colombia. Boletín de Sanidad Vegetal N° 31. 2000. 44 p.