

BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS COMPUESTOS 2-FENILETANOL Y ACETOFENONA MEDIANTE EL HONGO FITOPATÓGENO *Botryodiplodia theobromae*

BIOTRANSFORMATION OF THE COMPOUNDS 2-PHENYLETHANOL AND ACETOPHENONE BY THE PHYTOPATHOGEN FUNGUS *Botryodiplodia theobromae*

Rodrigo VELASCO B.¹, Iván D. VALVERDE P.¹, Diego L. DURANGO R.¹, Carlos M. GARCÍA P.^{1*}

Recibido: Agosto 1 de 2007 Aceptado: Septiembre 17 de 2007

RESUMEN

En este estudio se evalúan las biotransformaciones realizadas por el hongo filamentoso fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae* sobre los sustratos 2-feniletanol 1 y acetofenona 2; los procesos se realizan 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. El patógeno es obtenido a partir de frutos comerciales de aguacate infectado con la enfermedad, adquiridos en los centros de mercadeo de la ciudad de Medellín (Antioquia-Colombia) y es caracterizado morfológicamente en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. En la biotransformación a partir del sustrato 1 se obtienen los metabolitos feniletanodiol 3, ácido 2-fenilacético 4, fenilacetato de 2-feniletanol 5, acetato de 2-feniletanol 6; y desde el sustrato 2, los metabolitos 1-feniletanol 7, ácido 2-fenilacético 4, 2-feniletanol 1, 2-feniletanal 8, o-hidroxiacetofenona 9 y acetato de 1-feniletanol 10. Los productos de la transformación microbiana se identifican mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y resonancia magnética nuclear de protón y carbono (RMN ¹H y ¹³C). Se observa una tendencia marcada del patógeno a producir hidroxilaciones sobre la cadena alquílica y parcialmente sobre la cadena aromática; igualmente tiene la capacidad de reducir el grupo carbonilo y esterificar los grupos hidroxilo.

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

ABSTRACT

In this study, biotransformations of the substrates 2-phenylethanol 1 and acetophenone 2 achieve by the filamentous phytopathogenic fungus *Botryodiplodia theobromae*, are evaluated; the process is carried out in liquid media culture Czapeck-Dox to an average temperature 24 °C, relative humidity between 45 % to 60 % and with agitation in shaker 150 rpm. The pathogen is obtained from infected commercial fruits of avocado, acquired at the centers of trade in the city of Medellín (Antioquia-Colombia) and it is characterized morphologically in the Phytopathology Laboratory of the University National Colombia, Medellín. The biotransformation of the substrate 1 produces the metabolites phenylethanodiol 3, 2-phenylacetic acid 4, phenylacetate 2-phenylethyl 5, acetate of 2-phenylethanol 6, and from substrate 2 are obtained the metabolites 1-phenylethanol 7, 2-phenylacetic acid 6, 2-phenylethanol 1, 2-phenylethanal 8,

¹ Grupo de Química de los Productos Naturales y los Alimentos. Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: cmgarcia@unalmed.edu.co

o-hydroxiacetophenone 9 and acetate of 1-phenylethanol 10. The structures of metabolic products are determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and nuclear magnetic resonance of proton and carbon (^1H and ^{13}C NMR). The process is marked by tendency of the pathogen to produce hydroxylations on the alkylic chain and some on the aromatic chain. Additionally, it has the capability to reduce to the carbonyl group and produce esterification reaction in the hydroxyl groups.

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

INTRODUCCIÓN

Los procesos de biotransformación han sido utilizados con gran éxito en la obtención de nuevas moléculas y en la modificación estructural de sustratos orgánicos, con la finalidad de incrementar su valor comercial o científico. Las ventajas de su aplicación en la síntesis orgánica están principalmente relacionadas con la preparación de compuestos ópticamente activos con elevada estereoselectividad bajo condiciones suaves y amigables con el ambiente (1-3). Las aplicaciones más importantes de las transformaciones biológicas han sido adoptadas para la producción de aditivos alimenticios, farmacéuticos, agroquímicos y materiales especializados, ya que gran parte de sus materias primas y productos deben ser obtenidos mediante procesos de síntesis asimétrica (4-6).

En este trabajo se explora la dinámica de las biotransformaciones que puede efectuar el hongo filamentosofito patógeno *Botryodiplodia theobromae*, el cual se encuentra frecuentemente en zonas tropicales y subtropicales donde ocasiona pérdidas económicas significativas en los procesos de poscosecha de frutas, verduras, flores y maderables (7-9). En Colombia, este microorganismo es considerado como un patógeno de consideración para la agricultura (10). La mayor parte de los estudios que se encuentran en la literatura sobre este microorganismo se refieren a su fisiología, y han sido realizados con el fin de conocer la dinámica de los procesos infectivos en plantas y frutos (11-14). Debido a estas circunstancias de índole económica, *B. theobromae* ha sido estigmatizado por su carácter nocivo y considerado únicamente desde la perspectiva de su control, desconociéndose y subvalorando su potencialidad para la realización de procesos de biotransformación (15-18).

Con el objetivo de conocer la selectividad del sistema enzimático de este patógeno para modificar algunos grupos funcionales aquirales y anillos aromáticos sustituidos, se sometieron a biotransformación los

sustratos 2-feniletanol y acetofenona. En este artículo se reportan los productos metabólicos resultantes del proceso y se discute la posible secuencia de formación de los metabolitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Métodos y equipos de uso general

Los sustratos empleados de calidad grado analítico y los medios nutritivos de calidad microbiológica se obtuvieron de las casas comerciales Aldrich y Merck. Todos los solventes empleados se bidestilaron antes de su utilización. La cromatografía de columna (CC) se llevó a cabo empleando como fase estacionaria Sephadex LH-20 (Pharmacia) o Silica gel 60 (0.040 mm - 0.063 mm; Merck). La cromatografía de capa fina (CCF) se realizó en cromatoplasmas de silica gel 60F254 (0.25 mm o 0.50 mm de espesor, Merck) y los compuestos se visualizaron mediante luz UV (254 nm, 310 nm) y vapores de yodo sublimado, o mediante aspersión con FeCl_3 al 5 % y mezcla H_2SO_4 -Ac. Acético-Agua, seguido por un calentamiento suave. La cromatografía de gases (CG) se efectuó en un cromatógrafo acoplado a espectrometría de masas, Agilent Technologies modelo 6890 N, equipado con una columna HP-5 de naturaleza no polar, 30 m x 0.25 mm i.d., 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 minutos; tiempo de corrido del análisis 30 minutos. El flujo de la columna fue de 1 mL.min⁻¹ con N_2 calidad analítica como gas de arrastre. Los espectros de masas por ionización electrónica (EM-IE) se realizaron usando cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) y los compuestos se identificaron por comparación de los espectros de masas e índices de retención,

disponibles en la literatura y la base de datos NIST (National Institute of Standards and Technology), (19) y con compuestos de referencia. Los espectros infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro Bruker (modelo IFS 28/55), en el rango de frecuencias 4000 cm⁻¹ - 400 cm⁻¹. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono se determinaron usando cloroformo deuterado en un espectrómetro Bruker AMX 300 con 300.12 MHz para el núcleo de ¹H- y 75.42 MHz para el núcleo ¹³C. Las multiplicidades se establecieron mediante la secuencia de pulsos ¹³C 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 patógeno se obtuvo de frutos comerciales de aguacate (*Persea americana*) infectados y la identificación se realizó mediante características morfológicas en los Laboratorios 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 del 45 % a 60 %.

Evaluación de la actividad fungicida o fungistática de los sustratos 2-feniletanol 1 y acetofenona 2

Las evaluaciones se llevaron a cabo empleando la metodología de la placa perforada, para la cual se utilizaron los frotis del microorganismo realizados sobre PDA e incubados durante 48 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, con una regla milimetrada, cada 24 horas y durante un tiempo entre 3 y 5 días. Cada una de las evaluaciones se realizó por triplicado y se repitió en el tiempo para mirar su reproducibilidad; cada uno de los ensayos se respaldó con los correspondientes testigos (blanco absoluto y blanco de solventes). Los porcentajes de inhibición se calcularon utilizando la expresión:

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

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

Procesos de biotransformación

En los procesos de biotransformación se utilizó el medio de cultivo líquido Czapeck-Dox, y se substituyó la glucosa de la formulación original por sacarosa en la misma proporción. El proceso se realizó en erlenmeyers de 1,0 litro (4) con 500 ml de medio. La inoculación se realizó con el micelio proveniente de trozos de cultivos con edad no superior a 10 días; los erlenmeyers inoculados se taponaron con tarugos de algodón estéril y se preincubaron durante 4 a 5 días en un shaker a 150 rpm; una vez terminado el periodo de preincubación, se retiró 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 disueltos en etanol a la concentración del 50 % v/v. La biotransformación se extendió por un periodo máximo de 7 días, procurando que el hongo convierta la mayor parte del sustrato de partida y en los medios de cultivo se obtenga una gama amplia de productos metabólicos.

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 1/3 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 las fracciones ácida y neutra provenientes de la biotransformación del 2-feniletanol y la acetofenona, presentan similitud en su composición cualitativa y por ello se reunieron en una sola fracción denominadas "F12" la obtenida de la combinación de las fracciones ácida y neutra provenientes del 2-feniletanol, y "A12" 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. Las fracciones "F12" y "A12" fueron sometidas a procesos de purificación cromatográfica, utilizando columnas de adsorción sobre sílica Gel 60 y geles de Sephadex LH-20.

Aislamiento de los productos de biotransformación 3 - 6

La fracción "F12", obtenida a partir del 2-feniletanol, se sometió a CC empleando como fase estacionaria sílica gel 60, y como fase móvil mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo de polaridad creciente, AcOEt y finalmente metanol. Las subfracciones obtenidas se cromatografiaron nuevamente mediante permeación en gel de sephadex LH-20, empleando como eluyente la mezcla éter de petróleo-CH₂Cl₂-MeOH, 2:1:1 (v/v), para obtener los productos metabólicos 3 (18 mg), 4 (10 mg) y 6 (23 mg). Un análisis por CG-EM de una fracción refinada también reveló la presencia de 5, cuya estructura se determinó mediante comparación de su EM-IE con el reportado en la base de datos NIST (19).

Compuesto 3: Material semisólido a temperatura ambiente. Mediante análisis CG-EM, presentó

un tiempo de retención, tR de 10.57 min. EM-IE, m/z (% Intensidad relativa): 138 (8) [M+], 120 (5) [M-H₂O]+, 107 (100) [M-CH₃OH]+, 77 (48) [C₆H₅]+. IR $\nu_{\max}$ (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, J = 7.5, 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).

Compuesto 4: Mediante análisis CG-EM, presentó un tR de 7.99 min. EM-IE, m/z (% Intensidad relativa): 136 (57) [M+], 118 (10) [M-H₂O]+, 91 (100) [M-HCOOH]+. IR $\nu_{\max}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 3500-2500, 1680 (C=O), 1615, 1508, 1468, 1420, 1238. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 12.10 (1H, s); 3.45 (2H, s); 7.14 (5H, m). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 178.03 (C=O), 135.00 (C-1'), 129.90 (C-2' y 6'), 128.85 (C-3' y 5'), 127.30 (C-4'), 43.82 (C-2).

Compuesto 5: Mediante el análisis CG-EM, mostró un tiempo de retención, tR de 19.53 min. EM-IE, m/z (% Intensidad relativa): 104 (100) [M-C₆H₅CH₂CO₂H]+, 91 (58) [C₇H₇]+, 77 (9) [C₆H₅]+.

Compuesto 6: Líquido incoloro, viscoso, de olor agradable. En el análisis CG-EM presentó tR de 10.69 min. EM-IE, m/z (% Intensidad relativa): 104 (100) [M-CH₃CO₂H]+, 91 (23) [C₇H₇]+. IR $\nu_{\max}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 3060, 2950, 1750 (C=O), 1660 (C=C aromático), 1490, 1370, 1240. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 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 ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.46 (C=O), 138.28 (C-1'), 129.34 (C-2' y 6'), 128.95 (C-3' y 5'), 127.02 (C-4'), 65.38 (C-1), 35.55 (C-2), 21.40 (CH₃).

Aislamiento de los productos de biotransformación 1, 4 y del 7 - 10

La fracción "A12", obtenida a partir de la acetofenona, se cromatografió por 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 metanol. Las subfracciones obtenidas se sometieron a sucesivas CC empleando sephadex LH-20 como fase estacionaria y la mezcla éter de petróleo-CH₂Cl₂-MeOH, 2:1:1 y finalmente metanol. Se obtuvieron los productos de transformación microbiana 1 (17 mg), 4 (6 mg), 7 (22 mg), 8 (10 mg)

y 10 (5 mg). El producto de biotransformación 9 se determinó mediante análisis cromatográfico (CG-EM) y se identificó por comparación de su EM-IE con el reportado en la base de datos NIST.

Compuesto 1: Líquido incoloro, viscoso. Mediante análisis CG-EM, presentó un tiempo de retención, tR de 7.88 min. EM-IE, m/z (% Intensidad relativa): 122 (30) [M+], 104 (5) [M-H₂O]+, 91 (100) [C₇H₇]+. IR $\nu_{\max}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 3400 (-OH), 3030, 2950, 1600 (C=C aromático), 1493, 1454, 1050. RMN 1H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.27-7.07 (5H, m), 3.69 (2H, t, J = 7.0, H-2), 2.76 (2H, t, J = 7, H-1). RMN 13C (75 MHz, CDCl₃): 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).

Compuesto 7: Se aisló como líquido de color amarillo, viscoso. En CG-EM mostró un tR de 7.15 min. EM-IE, m/z (% Intensidad relativa): 122 (20) [M+], 107 (100) [M-CH₃]+, 77 (42) [C₆H₅]+. IR $\nu_{\max}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 3386 (-OH), 3040, 2975, 1675 (C=C aromático), 1492, 1451, 1217. RMN 1H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.38-7.25 (5H, m), 4.88 (1H, c, J = 6.5, H-1), 1.50 (3H, d, J = 6.5). RMN 13C (75 MHz, CDCl₃): 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 (CH₃).

Compuesto 8: De acuerdo con el análisis CG-EM, mostró un tiempo de retención, tR de 8.43 min. EM-IE, m/z (% Intensidad relativa): 120 (28) ([M+], 92 (32) [M-CO]+, 91 (100)[M-HCO]+, 65 (32) [C₅H₅]+. IR $\nu_{\max}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 2970, 2850, 2760, 2660, 1690 (C=O), 1570, (C=C aromático), 1475, 1430. RMN 1H (300 MHz, CDCl₃): δ 9.72 (1H, s); 7.30 (5H, m); 3.66 (2H, s). RMN 13C (75 MHz, CDCl₃): δ 199.40 (C=O), 131.75 (C-1'), 129.54 (C-2' y 6'), 128.90 (C-3' y 5'), 127.32 (C-4'), 50.50 (C-2).

Compuesto 9: Mediante análisis CG-EM, presentó un tiempo de retención, tR de 12.60 min. EM-IE, m/z (% Intensidad relativa): 136 (44) [M+], 121 (100) [M-CH₃]+, 93 (23) [M-CH₃CO]+, 65 (35) [C₅H₅]+. IR $\nu_{\max}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 3300 (OH), 1650 (C=O conjugado), 1620 (C=C aromático), 1580, 1480, 1450, 1300, 1250, 1210. RMN 1H (300 MHz, CDCl₃): δ 12.25 (OH fenólico quelado), 7.70 (1H, dd, J = 8.0, H-6'), 7.40 (1H, td, J = 8.0, J = 2.0, H-4'), 6.80-7.00 (2H, m, H-3' y 5'), 2.60 (3H, s).

Compuesto 10: Presentó en el análisis por CG-EM un tR de 13.96 min. EM-IE, m/z (% Intensidad relativa): 122 (87)[M-CH₃CO]+, 104

(100) [M-CH₃CO₂H]+, 77 (41) [C₆H₅]+, 43 (76) [CH₃CO]+.

RESULTADOS

Toxicidad de los sustratos hacia *B. theobromae*

Previamente a las biotransformación de los sustratos 1 y 2, se evaluó la toxicidad de cada uno de ellos sobre el microorganismo en medio sólido (PDA), a diferentes concentraciones, durante un periodo de 2 días, obteniéndose de este modo un porcentaje de inhibición del crecimiento radial entre 50% y 60%, para concentraciones de 1000 mg/L para acetofenona y 3500 mg/L para 2-feniletanol; estas concentraciones se seleccionaron para el proceso de biotransformación.

Propiedades físicas y datos espectroscópicos de los productos de biotransformación

La fórmula molecular del compuesto 1 corresponde al C₈H₁₀O, que se determinó con base en su espectro de masas. Otros datos espectrales indican la presencia de un grupo hidroxilo primario (δ C 59.40; $\nu_{\max}$ 3400, 1050 cm⁻¹). Los espectros de RMN 1H y 13C corresponden con los del 2-feniletanol; adicionalmente, las características espectroscópicas (EM-IE, RMN 1H y 13C) y el comportamiento cromatográfico (tR) se compararon con las de una muestra auténtica de 2-feniletanol (Merck), coincidiendo perfectamente.

El espectro de masas indicó que el compuesto 3 posee una fórmula molecular C₈H₁₀O₂. A partir de los datos espectroscópicos, 3 posee un grupo hidroxilo primario (δ H 3.75-3.60; δ C 68.48; $\nu_{\max}$ 3400, 1150 cm⁻¹) y un grupo hidroxilo secundario (δ H 4.81; δ C 75.13; $\nu_{\max}$ 3400, 1212 cm⁻¹). El análisis de los espectros de RMN 1H y 13C reveló que la estructura del compuesto coincide con la del feniletanodiol.

El compuesto 4 presentó una fórmula C₈H₈O₂ con base en su EM-IE. Los datos espectrométricos indican la presencia de un grupo ácido carboxílico [M-HCO₂H]+. La estructura se confirmó por comparación del tR y el espectro de masas con los de una muestra auténtica de ácido fenilacético.

El espectro de masas indicó una fórmula molecular C₁₆H₁₈O₂ para el compuesto 5. La estructura del compuesto se determinó por comparación del espectro de masas y el tR, con los reportados en la

base de datos NIST, correspondiendo al fenilacetato de 2-feniletanol.

El compuesto **6** presentó una fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$, de acuerdo con el EM-IE. A partir de otros datos espectroscópicos, **6** posee un grupo acetil (δH 2.10; δC 171.46, 21.40; ν_{max} 1759, 1240 cm^{-1}). Las propiedades cromatográficas y espectroscópicas de **6** son totalmente concordantes con las de una muestra auténtica obtenida por acetilación (CH_3COCl , Pyr) del 2-feniletanol.

La fórmula molecular del compuesto **7** se determinó a partir del EM-IE como $C_8H_{10}O$. Sus datos espectroscópicos indican la presencia de un grupo hidroxilo secundario (δH 4.88; δC 71.09). El producto de transformación **7** se identificó como el 1-feniletanol.

El espectro de masas indicó que el compuesto **8** posee una fórmula molecular C_8H_8O . El compuesto posee un grupo formil (m/z : 91 $[M-HCO]^+$; δH 9.72; δC 199.40). Los datos cromatográficos y los espectros de masas RMN 1H y ^{13}C son totalmente concordantes con los de una muestra genuina de fenilacetaldehído (Aldrich).

El compuesto **9** presentó una fórmula molecular $C_8H_8O_2$, de acuerdo con el EM-IE. Los espectros de masas IR y RMN 1H coincidieron completamente con aquellos de la 2'-hidroxiacetofenona.

El espectro de masas indicó una fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ para el compuesto **10**. La estructura del compuesto se determinó por comparación del espectro de masas y el tR, con los reportados en la base de datos NIST, correspondiendo con el acetato de 1-feniletanol.

DISCUSIÓN

A partir de las estructuras de los productos obtenidos, se plantearon posibles rutas metabólicas para la biotransformación de **1** (véase figura 1) y **2** (véase figura 2) por el hongo fitopatogénico *B. theobromae*. En la transformación de **1** se aprecia la capacidad del microorganismo para efectuar reacciones de esterificación (acetilación y benzoilación), para la formación de **5** y **6**. Este último es resultante de la condensación del ácido fenilacético (**4**) y el 2-feniletanol (**1**). Adicionalmente se visualiza la formación de los productos de oxidación **3** y **4**, provenientes de procesos oxidativos en el carbono bencílico (monohidroxilación) y en el carbono carbinólico del 2-feniletanol.

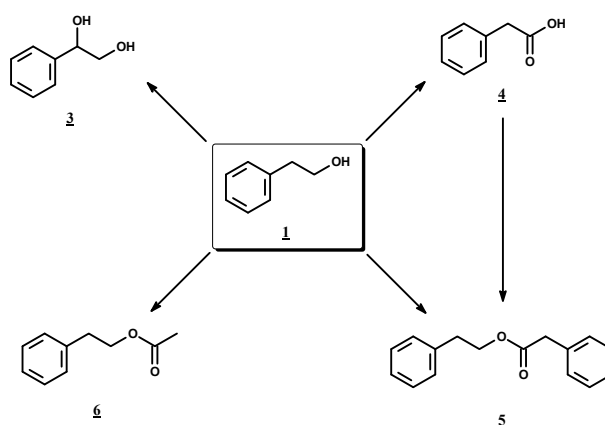


Figura 1. Proceso de biotransformación del sustrato 2-feniletanol **1** mediante el hongo *B. theobromae*.

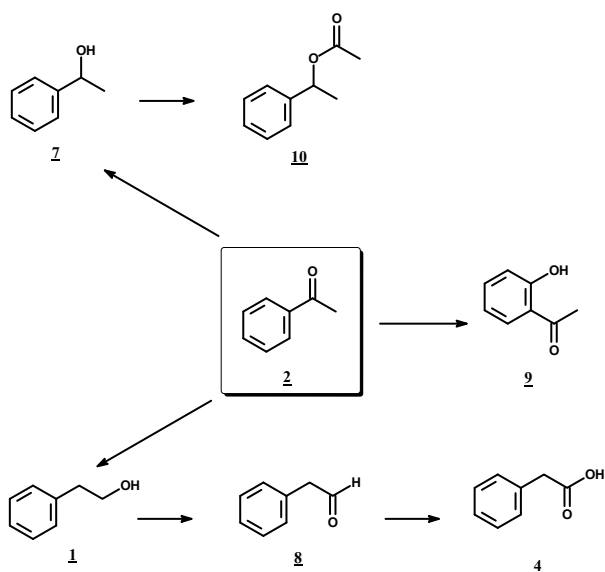


Figura 2. Proceso de biotransformación del sustrato acetofenona **2** mediante el hongo *B. theobromae*.

En la biotransformación del sustrato **2**, el producto **10** se considera proveniente de la ruta (**2** $\rightarrow$ **7** $\rightarrow$ **10**). En esta secuencia, la acetofenona **2** es inicialmente reducida para formar el alcohol secundario 1-feniletanol **7**, el cual es posteriormente acetilado. A diferencia de los productos de esterificación provenientes de la biotransformación del 2-feniletanol, **5** y **6**, el compuesto **10** resulta de la acilación de un alcohol secundario. Por su parte, el producto **4** resulta de la ruta metabólica (**2** $\rightarrow$ **1** $\rightarrow$ **8** $\rightarrow$ **4**). En esta secuencia se presenta una primera conversión que permite la obtención del 2-feniletanol **1**, la cual puede proceder, posiblemente, de acuerdo con dos secuencias (véase figura 3). Debido a que en esta transformación microbiana no se detectó el producto **3**, es posible que dicha conversión se presente de acuerdo con la

ruta B, que no involucra la formación de este glicol. Después de la formación de 1, una secuencia de procesos de oxidación enzimática conduce a la formación de 4.

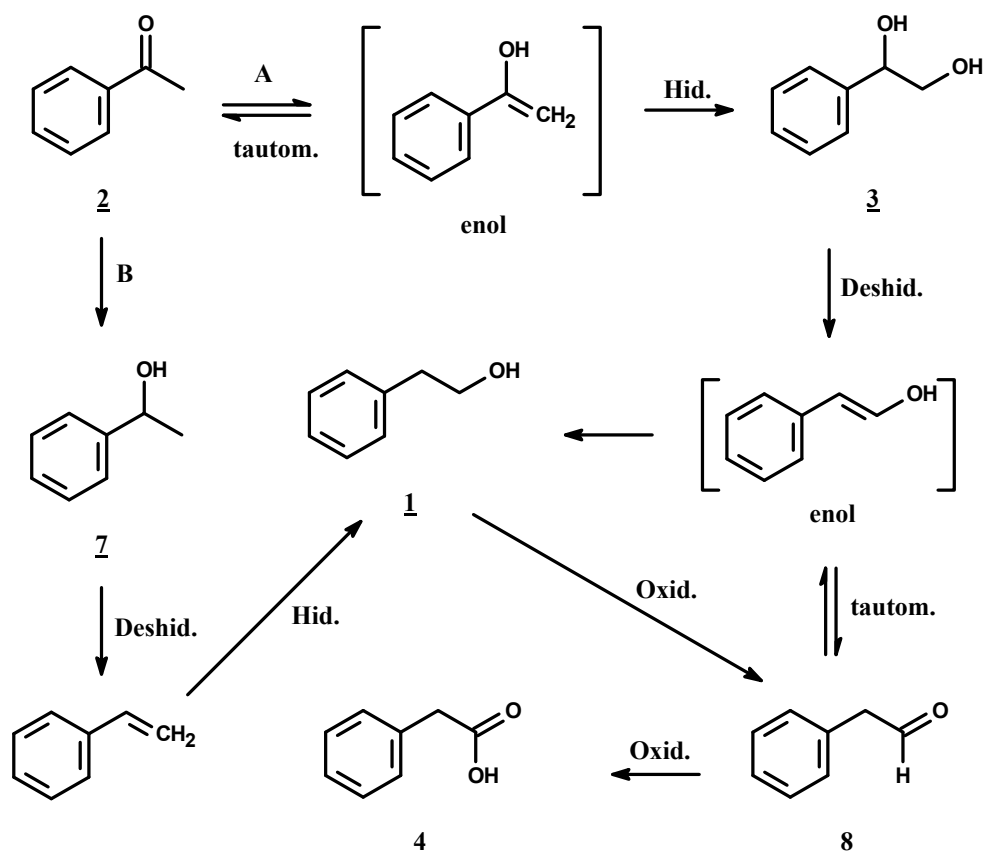


Figura 3. Ruta propuesta para la formación de los productos de la biotransformación de acetofenona con el hongo fitopatológico *B. theobromae*.

El compuesto 9 resulta de la hidroxilación selectiva del anillo aromático en posición orto. En este estudio no se detectaron los compuestos hidroxilados en el anillo aromático en posiciones meta o para; lo anterior demuestra la posible regioselectividad de las transformaciones efectuadas sobre el anillo aromático por parte del hongo *B. theobromae*.

CONCLUSIONES

De la biotransformación del sustrato 2-feniletanol 1 con el hongo *B. theobromae*, se identificaron mediante una combinación de RMN ¹H y ¹³C, EM-IE y comparación de datos cromatográficos y espectrales con bases de datos, los metabolitos feniletanodiol 3, ácido 2-fenilacético 4, fenilacetato de 2-feniletanol 5 y acetato de 2-feniletanol 6; y a partir de la acetofenona 2, se elucidaron los compuestos 1-feniletanol 7, ácido 2-fenilacético 4, 2-feniletanol 1, 2-feniletanal 8, o-hidroxiacetofenona 9 y acetato de 1-feniletanol 10.

Los resultados sugieren que el hongo fitopatológico *B. theobromae* tiene la capacidad de convertir diferentes sustratos mediante reacciones de reducción (2 $\rightarrow$ 7) y oxidación, las cuales pueden ser llevadas a cabo sobre el anillo aromático (2 $\rightarrow$ 9) o el sustituyente (1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 4). Esta versatilidad puede ser aprovechada en la síntesis orgánica de productos más elaborados. *B. theobromae*, además, produce reacciones metabólicas de esterificación (acetilación y benzoilación) sobre los sustratos de tipo alcohol, primarios ó secundarios, permitiendo la obtención de los compuestos fenilacetato de 2-feniletanol 5 y acetato de 2-feniletanol 6 desde el sustrato 1; y el acetato de 1-feniletanol 10, proveniente de la biotransformación del sustrato 2.

Adicionalmente, este hongo fitopatológico presenta cierto grado de selectividad en las hidroxilaciones que realiza sobre el anillo aromático, observándose que en la biotransformación del sustrato 2 hay una preferencia hacia la posición orto, para la formación de la 2'-hidroxiacetofenona.

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bu'lock J, Kristiansen B. *Biotecnología básica*. Zaragoza: Acribia. 1991.
2. Gavrilescu M, Chisti Y. *Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry*. *Biotech Adv*. 2005; 23: 471-499.
3. Wendy AL. *Biotransformations in organic synthesis - Review*. *Bioresour Technol*. 2000; 74: 49-62.
4. Rasor JP, Voss E. *Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry - Review*. *Appl Catal*. 2001; 221: 145-158.
5. Panke S, Wubbolts M. *Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates*. *Curr Opin Chem Biol*. 2005; 9:188-194.
6. De Souza PR. *The use of Baker's Yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds - Review*. *Crc Cr Rev Biotechn*. 1998; 18: 25-64.
7. Mortuza MG, Ilag LL. *Potencial for Biocontrol of Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griff. & Maubl. in Banana Fruits by Thrycoderma species*. *Biol Control*. 1999; 15: 235-240.
8. Ponte JJ. *Uma nova doença da ateira (Annona squamosa) e da graviroleira (A. muricata), causada por Botrydiplodia theobromae*. *Fitopatol Bras*. 1985; 10: 689-691.
9. Cedeño L, Carrero C, Mohali S, Palacios-Prü E, Quintero K. *Muerte regresiva en parchita causada por Lasiodiplodia theobromae en Venezuela*. *Fitopatol Venez*. 1995; 8(1): 11-14.
10. Tamayo PJ. *Enfermedades del Aguacate*. *Revista Politécnica*. 2007; 1(1): 51-70.
11. Ismail M, Zhang J. *Post-harvest citrus diseases and their control*. *Outlooks Pest Manage*. 2004; 15: 29-35.
12. Wilson CL, Pusey PL. *Potential for biological control of post-harvest plant disease*. *Plant Dis*. 1985; 69: 375-378.
13. Apetorgbor MM, Darkwa NA, Frimpong O, Agyeman VK. *Biodeteriorating agents associated with three tropical timber species*. *Forest Ecol Manag*. 2004; 195: 311-323.
14. Antony S, Abeywickrama K, Dayananda R, Wijeratnam S, Arambewe L. *Fungal pathogens associated with bananas fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils*. *Mycopathologia*. 2004; 157: 91-97.
15. Romanoa A, Romanoa D, Raggb E, Costantinoc F, Lennac R, Gandol'd R, Molinaria F. *Steroid hydroxylations with Botrydiplodia malorum and Colletotrichum lini*. *Steroids* 2006; 71: 429-434.
16. Yang Q, Toshima H, Yoshihara T. *Syntheses of β -resorcylic acid derivatives, novel potato micro-tuber inducing substances isolated from Lasiodiplodia theobromae*. *Tetrahedron* 2001; 57: 5377-5384.
17. Krishna-Kumari GN, Masilamani S, Ganesh MR, Aravind S. *Microbial transformation of zaluzanin-D*. *Phytochemistry* 2003; 62: 1101-1104.
18. Yang Q, Toshima H, Yoshihara T. *Syntheses of β -resorcylic acid derivatives, novel potato micro-tuber inducing substances isolated from Lasiodiplodia theobromae*. *Tetrahedron*. 2001; 57: 5377-5384.
19. Stein SE. *Mass Spectra*. En: Linstrom PJ, Mallard WG, eds. *NIST Chemistry WebBook*. NIST Standard Reference Database Number 69, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 20899 (<http://webbook.nist.gov>), 2005.



CIDUA
Centro de Información y Documentación
de Medicamentos, Alimentos, Cosméticos y Productos
Naturales de la Universidad de Antioquia

Teléfono 210 54 55
cidua@farmacia.udea.edu.co

Consúltenos sobre:

Medicamentos: Absorción, distribución, metabolismo y excreción; contraindicaciones y precauciones; interacciones con otros medicamentos/ó alimentos; mecanismo de acción; presentación comercial y forma farmacéutica; reacciones adversas y efectos secundarios; vías de administración; riesgos en el embarazo; normatividad vigente.

Alimentos: Normatividad vigente; composición natural; aditivos y conservantes para resaltar o mejorar las condiciones de forma, presentación y durabilidad; procesos a que son sometidos; avances tecnológicos; técnicas de manipulación; enfermedades transmitidas por alimentos; análisis fisicoquímico y control microbiológico; materiales de empaque.

Cosméticos: Control fisicoquímico y microbiológico; materias primas; producto terminado; normatividad vigente.

Productos Naturales: Plantas medicinales y tóxicas; normatividad sobre productos homeopáticos y fitoterapéuticos.

Está siendo renovada tecnológicamente con el apoyo de la vicerrectoría de extensión.

Atención personalizada en el bloque 02-123, de lunes a viernes en horario de 8 a.m. a 6 p.m.