

## OXIDACIÓN DE R-(+)-LIMONENO POR LA CLOROPEROXIDASA DE *CALDARIOMYCES FUMAGO*

Sergio Águila<sup>a</sup>, Raunel Tinoco<sup>b</sup>, Rafael Vázquez-Duhalt<sup>b</sup>, Gina Pecchi<sup>a</sup> y Joel B. Alderete<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Casilla 160-C, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

<sup>b</sup>Instituto de Biotecnología UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62210, México

*Palabras Clave:* Cloroperoxidasa, oxidación, R-(+)-Limoneno

**Introducción.** La biocatálisis ha sido reconocida, por mucho tiempo, como una excelente herramienta en el área farmacológica<sup>1</sup>, agrícola, alimenticia, remediación ambiental<sup>2</sup>, producción de combustible<sup>3</sup> y química fina<sup>4,5</sup>. Una de las ventajas de la biocatálisis convencional sobre los procesos catalíticos convencionales es su elevada regio y estereoselectividad. Por ejemplo, la cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago* cataliza diferentes reacciones, tales como, hidroxilaciones y epoxidaciones de una amplia variedad de olefinas con altos rendimientos y excesos enantioméricos<sup>6,7</sup>. En este trabajo se pretende mostrar que la oxidación de R-(+)-Limoneno **1** catalizada por CPO es regio y estereoselectiva y sus productos pueden ser usados como precursores de moléculas bioactivas.

**Materiales y métodos.** La mezcla de reacción (1 ml) contenía: 2,2 pM de CPO, 0,15-0,80  $\mu$ M de **1** en solución amortiguadora de fosfatos 60 mM (pH 3,0 y 6,0) en 15 % de acetonitrilo (ACN) o metanol (MeOH). Las reacciones fueron realizadas a temperatura ambiente iniciándose con la adición de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El progreso de la reacción fue monitoreado a través de HPLC-UV. La identificación de los productos de reacción fue realizada a través de GC-MS.

**Resultados y discusión.** Un derivado dihidroxilado fue observado a pH 6.0 proveniente probablemente de un epóxido. De la mezcla acuosa de reacción, el epóxido no fue aislado como producto, debido a que éste es hidrolizado espontáneamente en agua (Fig. 1), generando un derivado dihidroxilado con un exceso diastereomérico (*de*) > 99.0 %. La velocidad de la reacción fue mayor a pH 6.0 que a pH 3.0 (Fig. 2). La estereoselectividad desaparece (*de* = 5.4 %) cuando hay presencia de cloruro en la mezcla de reacción. Sin embargo la regioselectividad fue retenida, es decir, la oxidación sigue ocurriendo en el doble enlace del anillo.

En otra reacción, derivados epoxidados de limoneno (*cis* y *trans*) fueron incubados en medio acuoso en ausencia de CPO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados muestran que los derivados epoxidados fueron hidrolizados espontáneamente.

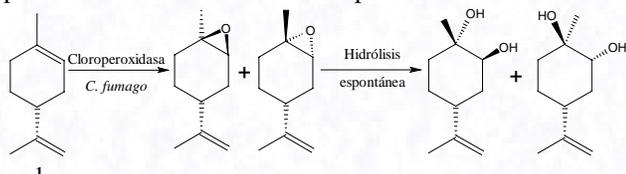


Fig. 1. Esquema de los productos de reacción de R-(+)-Limoneno con CPO e hidrólisis espontánea de mezcla de derivados epoxidados en medio acuoso.

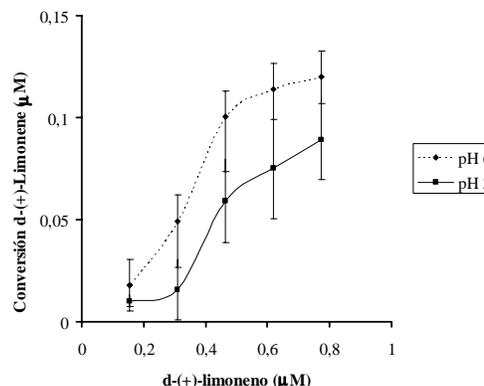


Fig. 2. Efecto del pH en la oxidación de R-(+)-Limoneno en ausencia de cloruro.

**Conclusiones.** La oxidación de **1** por CPO de *C. fumago* en ausencia de cloruro fue regio y estereoselectiva en las condiciones de reacción usadas. La cinética de la reacción es mayor en presencia de cloruro, manteniendo su regioselectividad, pero desaparece la estereoselectividad.

**Agradecimientos.** A CONICYT, PROYECTO MECESUP N° UCH-408 y al Depto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología UNAM por financiar este trabajo.

### Bibliografía.

- Gotor, V. (2002) Biocatalysis Applied to the Preparation of Pharmaceuticals. *Org. Process Res. Dev.* 6(4): 420-426.
- Tinoco, R. and Vazquez-Duhalt R. (1998) Chemical Modification of Cytochrome c Improve Their Catalytic Properties in Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 8-12.
- Kim, J., Grate, J.W. and Wang P. (2006) Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* 61(3): 1017-1026.
- Kazlauskas, R. (2004) Integrating biocatalysis into organic synthesis. *Tetrahedron: Asymm.* 15(18): 2727-2728.
- Wells, A. (2006) What Is in a Biocatalyst? *Org. Process Res. Dev.*
- Allain, E.J. and Hager, L.P. (1993) Highly Enantioselective Epoxidation of Disubstituted Alkenes with Hydrogen Peroxide Catalyzed by Chloroperoxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 115(10): 4415-4416.
- Dexter, A. F.; Lakner, F. J.; Campbell, R. A.; Hager, L. P. (1995) Highly Enantioselective Epoxidation of 1,1-Disubstituted Alkenes Catalyzed by Chloroperoxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 117(23): 6412-6413.