
Empleo de herramientas termodinámicas para la selección de solvente en la oxidación químico-enzimática de monoterpenos

Scilipoti, José¹; Parodi, Adrián R.¹; Reinoso, Elina²; Cariddi, Noelia²; Andreatta, Alfonsina³; Magario, Ivana M.^{1*}

¹Instituto de Investigación en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada. IPQA (UNC - CONICET), Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Av. Vélez Sarsfield 1611, X5016GCA, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina. e-mail: ivana.magario@unc.edu.ar

²Instituto de Biotecnología Ambiental y Salud. INBIAS (UNRC-CONICET), Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Ruta 36 Km 601, Río Cuarto, Córdoba.

³Departamento de Ingeniería Química - Facultad Reg. San Francisco (UTN).

Palabras Claves: limoneno, pulegona, lipasa, equilibrio de fases, selección de solvente

Resumen

En este trabajo, estudiamos una metodología basada en un enfoque termodinámico como herramienta para estimar el efecto del tipo de solvente en la cinética de reacciones de oxidación químico-enzimática de monoterpenos. La metodología fue validada contrastando nuestros cálculos con valores experimentales encontrados en la bibliografía. Se demostró que en tolueno tanto la epoxidación de limoneno como la de pulegona son posibles con rendimientos aceptables. No obstante, a través del cálculo de la propiedad “poder solvente” hacia el reactivo oxidante H₂O₂ se proponen sustancias de baja toxicidad como solventes alternativos al tolueno.

Abstract

The scope of this work was the study of a thermodynamically based methodology as a tool for the estimation of the effect of solvent type in the reaction kinetics of the chemo-enzymatic oxidation of monoterpenes. This methodology was validated by comparing our calculations with experimental values found in the open literature. It was confirmed that, in toluene the epoxidation of limonene and pulegone was achieved with acceptable yields. However, through the calculation of the “solvent power” property toward the applied oxidant H₂O₂, we proposed alternative and less toxic solvents for this reaction.

Introducción

Las reacciones enzimáticas en sistemas bifásicos con frecuencia se encuentran en procesos de síntesis química. En estos sistemas, los reactantes y catalizadores pueden existir en diferentes fases líquidas, dando lugar a nuevos caminos de síntesis como así también a altas selectividades, conversión y rendimiento. La fase hidrofóbica puede consistir principalmente por un solvente orgánico, un solvente supercrítico, un líquido iónico o un solvente fluorado, e incluso por otra fase acuosa inmiscible. Debido a la distribución de los componentes en ambas fases, no es posible obtener directamente información relacionada al equilibrio de la reacción, lo cual repercute en la evaluación de las condiciones óptimas de operación. Una de las variables que posee una gran influencia en este aspecto es el tipo de solvente utilizado en la fase hidrofóbica.

Los solventes pueden ejercer diversas influencias sobre las reacciones químicas. En reacciones endotérmicas, por ejemplo, el calor podría ser suministrado a través de un solvente inerte precalentado con una alta capacidad calorífica, mientras que, en reacciones exotérmicas, el excedente energético puede ser removido permitiendo que un solvente hierva o absorba calor. En reacciones que involucran reactivos sólidos, un solvente puede utilizarse para disolver a los reactivos y permitir el contacto entre ellos. Cuando existe equilibrio líquido-líquido entre los reactivos un solvente adecuado que no intervenga en la reacción puede garantizar que en todo el trayecto reactivo el sistema continúe siendo homogéneo. De manera similar, las reacciones en fase gaseosa, que generalmente se llevan a cabo en condiciones de elevada temperatura y/o presión, pueden producirse en una fase líquida a temperaturas y/o presiones significativamente menores. También, aquellos reactivos que presentan una alta reactividad en cierto solvente, podrían ser estudiados de forma segura en otro solvente. Finalmente, un solvente puede ser utilizado para influenciar una reacción a través de la remoción de uno o más productos del medio reactivo.

La oxidación de monoterpenos ampliamente disponibles en la naturaleza está cobrando interés como una vía de valorización de la biomasa. Los derivados oxigenados de terpenos sencillos son estructuras potenciales de presentar bioactividad como por ejemplo actividad insecticida [1] además de constituir estructuras claves en síntesis orgánica [2]. Una posible ruta de oxidación de monoterpenos es a través de la epoxidación de sus sitios olefínicos. El grupo oxirano es altamente reactivo permitiendo, a través de su hidroxilación controlada, anclar covalentemente moléculas bioactivas a estructuras poliméricas otorgándole así determinada funcionalidad. Tanto limoneno como el aceite esencial de peperina han sido eficaces como agentes antimicrobianos contra *Streptococcus uberis*, el organismo causante de mastitis bovina [3]. El aceite esencial de peperina contiene pulegona, un monoterpeno insaturado susceptible de epoxidación. Por su parte, eugenol es un monoterpeno insaturado presente en el aceite esencial del clavo de olor con probada actividad insecticida [4].

Los epóxidos se sintetizan predominantemente a través de la reacción de Prilesjajew empleando ácidos percarboxílicos como el agente oxidante. Debido a sus propiedades detonantes, formas seguras de llevar a cabo esta reacción es generando in-situ los ácidos percarboxílicos así como emplear bajas temperaturas de reacción. Diversas lipasas han sido capaces de catalizar esta reacción a temperatura ambiente, ya que tienen suficiente versatilidad para emplear la molécula de H_2O_2 como agente nucleofílico sobre el sustrato acilo, en este caso, un ácido graso. La lipasa de *Candida antarctica* B expresada en *Aspergillus oryzae* e inmovilizada en resina acrílica es la enzima por excelencia para estos sistemas [5]. Esta reacción ha sido así acoplada a diversos sustratos olefínicos desde triglicéridos, ácidos grasos insaturados, alquenos [5] y recientemente a monoterpenos insaturados [2] demostrando excelentes resultados.

Esta epoxidación químico-enzimática expuesta arriba presenta no obstante, el requerimiento de un ambiente hidrofóbico para disolver los sustratos de interés y preservar la actividad de la lipasa. Por lo tanto, el sistema de reacción presenta la complejidad de que la molécula de H_2O_2 necesita ser transferida desde la fase acuosa en la cual se encuentra a la fase hidrofóbica. El solvente mayormente empleado para esta reacción ha sido tolueno y existen escasos reportes que exploren el empleo de otros solventes. Un ejemplo es el estudio de Ranganattan *et al.* [2] que mide la cinética de epoxidación de limoneno en diferentes solventes.

En la industria, la selección de solventes en procesos que involucran reacciones químicas comúnmente se realiza en base a los conocimientos y experiencias. Sin embargo, resulta necesario desarrollar metodologías que combinen estos enfoques basados en la experiencia, con otros basados en el cálculo. El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de la epoxidación químico-enzimática de monoterpenos de interés tales como eugenol o pulegona -en comparación con limoneno- empleando tolueno como solvente de reacción y la propuesta de empleo de solventes alternativos basado en cálculos

termodinámicos los cuales se validan en el presente trabajo con datos experimentales de la literatura abierta.

Metodología

Reacciones de epoxidación químico-enzimática:

R-(+)-limoneno 98%, eugenol 99% y lipasa inmovilizada en resina acrílica (Novozyme 435) fueron provistos a través de Sigma Aldrich (San Luis, Estados Unidos). El aceite esencial de peperina (48,7% mentona, 30,6% pulegona y 1,4% limoneno) fue provisto por el departamento de Microbiología e Inmunología de la Fac. Cs Exactas, Fco-Qcas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Ácido laurico fue provisto por Serquim (Bs.As., Argentina) mientras que peróxido de hidrógeno al 30% y tolueno fueron provistos por Cicarelli (Santa Fe, Argentina). Todos los demás analitos fueron de grado analítico. 5 mL de medio de reacción se preparó en cada caso en frascos de vidrio de 10 ml adicionando los componentes en el siguiente orden: tolueno, solución 700 mM de ácido laurico en tolueno (70 mM), aceite esencial (100 mM), perlas de resina acrílica con lipasa inmovilizada (20 g/L) y H₂O₂ (500 mM). Las cantidades fueron tales que las concentraciones de cada especie al inicio de la reacción se denotan entre paréntesis más arriba. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación magnética. El H₂O₂ se adicionó por goteo durante seis minutos. Luego de la última gota de H₂O₂ se anotó la hora de inicio de reacción. Se tomaron muestras libres de lipasa (deteniendo la agitación) de 500 ul en distintos intervalos de tiempo y se mezclaron con 1 ml de solución de NaHCO₃ al 5% para extraer el ácido láurico y el peróxido de hidrógeno remanente en la fase acuosa. Luego se tomaron 400 ul de la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro. Finalmente, se disolvieron 30 ul de muestra seca con 970 ul de tolueno y se reservó en heladera hasta su medición por cromatografía gaseosa.

Para las mediciones cromatográficas se utilizó un cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 500 equipado con un detector de ionización de llama (FID), una columna de sílice fundida (PE Elite-1, 15 m x 0.53 mm DI x 3 µm espesor de película; Perkin Elmer, Shelton, U.S.A) con una fase estacionaria de 100% dimetil polisiloxano y una precolumna de sílice desactivada de 5 m x 0.53 mm DI. Todas las inyecciones fueron de 1 µL y se realizaron on-column (en columna). Se utilizó nitrógeno como gas portador con el siguiente programa de flujo: 3 mL/min por 20.5 min, incremento de 0.7 mL/min hasta 6 mL/min y mantenimiento hasta el fin de las corridas. Programa del inyector: 70°C (5 min), incremento de 4°C/min hasta 130°C (0 min), incremento hasta los 180°C (4 min). Programa del horno: 60°C (5 min), incremento de 4°C/min hasta 120°C (0 min), incremento de 20°C/min hasta 170°C (4 min). Tiempo total de análisis: 26.5 min. La temperatura del detector fue de 250°C. El software utilizado fue el Total Chrom Workstation Versión 6.3.1

Para la identificación de productos de reacción se empleó un cromatógrafo gaseoso GCMS SQ8, (Perkin Elmer). Los datos fueron adquiridos empleando el programa TurboMass 6.1.0. Columna: Elite 5MS (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm de espesor de film) (Perkin Elmer). Carrier: Helio 1 ml/min, Inyector: 250 °C. Programa del horno: temp inicial 60 °C (3 min), Rampa I: 4°C/min hasta 130 °C, Rampa II: 20°C/min hasta 200 °C por 3 minutos. Transfer Line: 200°C. La muestra se inyectó en modo de inyección Split, con una relación 1:50. Volumen inyección: 1 µL. El cromatograma fue obtenido en modo "scan", desde m/z: 50 a 300 uma, (scan time: 0.2 s, inter-scan time: 0.1s), solvent delay: 6.5 min.

Selección de solvente aplicando herramientas termodinámicas:

En la industria, la selección de solventes en procesos que involucran reacciones químicas comúnmente se realiza en base a los conocimientos y experiencias. Sin embargo, resulta necesario desarrollar metodologías que combinen estos enfoques basados en la experiencia, con otros basados en el cálculo. Con este objetivo utilizamos los datos experimentales publicados por Ranganathan *et al.* [2], en donde se muestra el efecto de distintos solventes en la velocidad de reacción de epoxidación de

monoterpenos, y evaluamos una propiedad conocida como Poder Solvente (PS) para cada uno de estos componentes.

El PS es una propiedad que hace referencia a la capacidad del solvente para disolver un soluto (H_2O_2 en este caso) y es inversamente proporcional a la cantidad de solvente necesaria en un sistema determinado. Se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$PS = \frac{1}{\gamma_{A,S}} \quad (1)$$

Donde $\gamma_{A,S}$ es el coeficiente de actividad del componente A en el solvente S a dilución infinita. Para realizar este cálculo utilizamos el modelo termodinámico a contribución grupal UNIFAC [6,7], que ha demostrado ser una herramienta simple y confiable para la predicción de coeficientes de actividad en fase líquida.

Resultados y discusión

Oxidación enzimática de monoterpenos

La Figura 1 muestra la conversión de los monoterpenos seleccionados con el tiempo de reacción. Limoneno resultó ser la estructura más reactiva obteniendo el 100% de conversión luego de 5 h de reacción. Resultados similares fueron observados por Ranganathan *et al.* [2] luego de optimizar las condiciones de esta reacción para maximizar la eficiencia de la conversión.

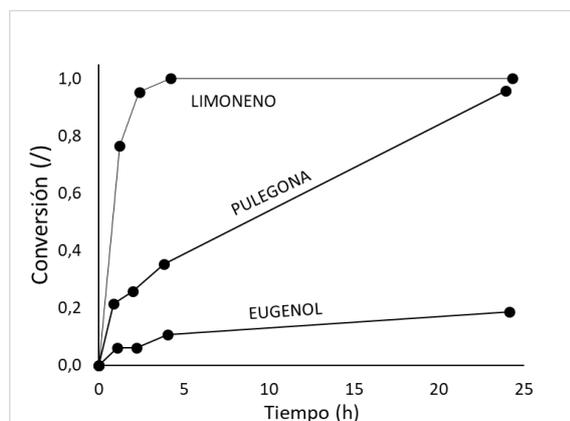


Figura 1. Conversión de monoterpenos

Contrariamente a lo esperado, eugenol presentó la reactividad más baja ante la epoxidación de su doble enlace mientras que pulegona, presente en el aceite esencial de peperina, pudo ser convertido en un 96% luego de 24 h de reacción. La mayor reactividad encontrada en limoneno en comparación con pulegona puede explicarse en parte a la presencia, en el primero, de dos sitios olefínicos susceptibles a la epoxidación. Por otro lado, tanto pulegona como eugenol constituyen ambos monoterpenos oxigenados lo que puede ocasionar repulsión estérica al ataque del ácido perlaurico.

La Figura 2 muestra cromatogramas de medios de reacción a distintos intervalos de tiempo. Las flechas ascendentes indican productos de reacción mientras que las flechas descendentes indican consumo de especies intervinientes.

Para limoneno se observa que este disminuye en el tiempo mientras que emergen nuevas estructuras a mayores tiempos de retención. Los picos que se encuentran debajo de la letra A en la Figura 2 fueron ambos identificados por GC-MS como limoneno epóxido. A su vez, ambos picos comienzan a desaparecer luego de 5 horas de reacción y en su lugar aumenta la concentración de la especie B, la cual fue identificada como limoneno diepóxido siendo la especie mayoritaria a las 24 h de reacción.

Con respecto al aceite esencial de peperina, se observa la aparición de al menos 3 nuevas estructuras a causa de la reacción de epoxidación químico-enzimática. La estructura C pudo ser identificada por GC-MS como cis-pulegona óxido mientras que la estructura D pertenece a mentona lactona.

Con eugenol como sustrato, no se observaron picos emergentes que denoten productos de reacción. Los pequeños picos que aparecen a altos tiempos de retención en los tres sistemas han sido identificados por GC-MS como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, por lo que no se asocian a productos de la epoxidación aunque muy probablemente a la presencia de impurezas.

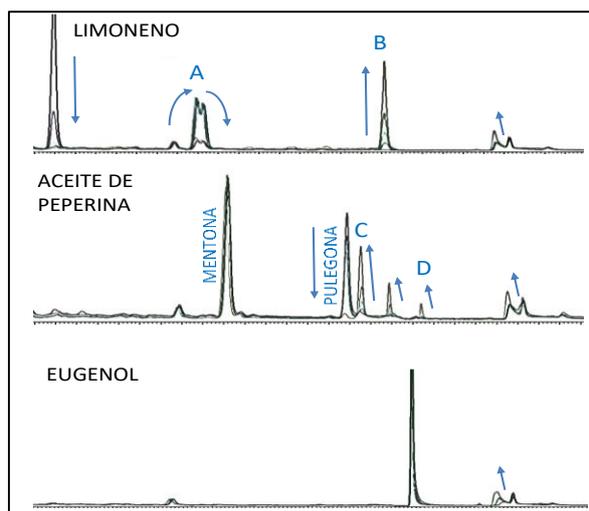


Figura 2. Cromatogramas de medios de reacción en diferentes intervalos de tiempo.

Selección de solvente de reacción aplicando herramientas termodinámicas

La Tabla 1 presenta los valores de PS obtenidos para los solventes estudiados por Ranganathan *et al.* [2] y el efecto de estos solventes en la velocidad de reacción. A partir del análisis de estas tablas podemos concluir que existe cierta correlación entre el PS de un componente para disolver el H₂O₂ y su efecto en la velocidad de reacción. Es de esperar que esto suceda, puesto que la reacción enzimática de peracidación se lleva a cabo en la fase hidrofóbica y, por lo tanto, la velocidad de reacción se verá favorecida mientras mayor sea la concentración de reactivos en esta fase.

Tabla 1: Velocidades de reacción de peracidación de ácido octanóico medida en distintos medios reactivos [2] (1 mayor, 5 menor) comparadas con el poder solvente de cada componente.

Solvente	Poder Solvente	Velocidad de reacción
Acetonitrilo	1.712E-01	2
Tolueno	2.030E-03	1
Xileno	1.900E-03	4
Heptano	9.733E-05	3
Metilciclohexano	3.603E-05	5

En base a estos resultados, en este trabajo estudiamos otras alternativas al uso de tolueno como solvente para llevar a cabo reacciones de oxidación químico-enzimática de monoterpenos, puesto que este solvente presenta numerosos riesgos medioambientales y de toxicidad en seres humanos. La Tabla 2 presenta los valores de PS calculados para el dimetil sulfóxido y el acetato de etilo, ambos de baja toxicidad.

Tabla 2: Valores de PS calculados para dos compuestos potencialmente alternativos al tolueno como solventes

Solvente	Poder Solvente
Dimetil sulfóxido	5.479E+00
Acetato de etilo	1.940E-02

Ranganattan *et al.* [2] demostró que la concentración de H₂O₂ en la fase hidrofóbica es la variable que más influye en la velocidad y el equilibrio de reacción. La concordancia de esta demostración con los resultados obtenidos en este trabajo, respalda la propuesta que tanto el dimetil sulfóxido como el acetato de etilo, son dos posibles opciones no sólo para reemplazar al tolueno como solvente de reacción por razones medioambientales, sino también para mejorar la velocidad y rendimiento de la misma.

Conclusiones

En este estudio, se presenta una metodología basada en un enfoque termodinámico, utilizando el modelo UNIFAC para la evaluación de coeficientes de actividad, como herramienta para estimar el efecto del tipo de solvente utilizado en reacciones de oxidación químico-enzimática de monoterpenos. La metodología fue validada comparando los valores calculados con datos experimentales presentados por Ranganattan *et al.* [2]. Esta validación nos permite suponer que el uso extrapolado de este enfoque a la epoxidación de pulegona, sería una herramienta útil para la elección del solvente a utilizar.

Agradecimientos

Agradecemos al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de promoción Científica y Tecnológica (PICT 2016) y el Gobierno de Córdoba (PIODO 2017) por la ayuda financiera a este proyecto.

Referencias

- [1] A.K. Tripathi, V. Prajapati, S. Kumar, Bioactivities of l-carvone, d-carvone, and dihydrocarvone toward three stored product beetles, *J. Econ. Entomol.* 96 (2003) 1594–1601.
- [2] S. Ranganathan, J. Tebbe, L.O. Wiemann, V. Sieber, Optimization of the lipase mediated epoxidation of monoterpenes using the design of experiments — Taguchi method, *Process Biochem.* 51 (2016) 1479–1485. doi:10.1016/j.procbio.2016.07.005.
- [3] I.D. Montironi, L.N. Cariddi, E.B. Reinoso, Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis, *Rev. Argent. Microbiol.* 48 (2016) 210–216.
- [4] J.O. Ogendo, M. Kostyukovsky, U. Ravid, J.C. Matasyoh, A.L. Deng, E.O. Omolo, S.T. Kariuki, E. Shaaya, Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products, *J. Stored Prod. Res.* 44 (2008) 328–334.
- [5] S. Bhattacharya, Solvent-free chemo-enzymatic epoxidation: Experimental and kinetic modelling studies, (2011) 175.
- [6] A. Fredenslund, R.L. Jones, J.M. Prausnitz, Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures, *AIChE J.* 21 (1975) 1086–1099. doi:10.1002/aic.690210607.
- [7] A. Fredenslund, Vapor-liquid equilibria using UNIFAC: a group-contribution method, Elsevier, 1977.