

60524
85
A



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Biotransformación de la ridentina y de la
desacetilconfertiflorina con hongos
filamentosos.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ERNESTO RIVERA BECERRIL

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



DIRECTOR: M. en C. ARTURO E. CANO FLORES

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Doy gracias a Dios por guiarme en la vida y por darme salud y fortaleza para concluir este proyecto.

C

A mi Padre:

Emilio Rivera Rosales.

Gracias, por haberme dado la fortaleza necesaria para culminar uno de los objetivos más importantes de mi vida, por haberme tenido paciencia, confianza y sobre todo por haber inculcado en mi los valores que rigen mi vida.

A mi Hermano:

Emilio Rivera

Gracias, por tu apoyo, por tus palabras de aliento en los momentos difíciles que viví durante el transcurso de mis estudios y sobre todo por tener fe y confianza en mí.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A mi Madre:

† *María Elena Becerril Pérez.*

Gracias, por el cariño que me diste, por todos aquellos momentos de felicidad que compartiste conmigo, por todas las cosas hermosas que trajiste a mi vida y por todo el apoyo que recibí de tu parte para lograr culminar un objetivo importante en mi vida. Gracias por tu esmero, tu paciencia y tu comprensión, dondequiera que estés gracias.

A mi Hermana:

Rita Argelia Rivera

Gracias, por brindarme tu apoyo durante la realización de este proyecto, ya que en el transcurso de mis estudios siempre estuviste dispuesta a ayudarme para que lograra salir adelante.

D

A Elizabeth Torres

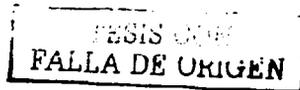
Gracias, por compartir conmigo parte de tu vida, por apoyarme en los momentos en que más te necesite, por darme esa alegría que hizo que nunca cayera en la desesperación y que logró que terminara este proyecto.

A Román Vera.

Gracias, por compartir conmigo tus conocimientos y tu amistad. Agradezco el apoyo incondicional que me brindaste para terminar esta tesis, gracias amigo.

A Erika García Salgado

Gracias, por compartir conmigo tu amistad y confianza, te agradezco el apoyo y las palabras que me brindaste, sabes que siempre tendrás en mí a un amigo.



A Maribel Fabián Castellanos

Gracias, por el apoyo que me brindaste por compartir conmigo tu amistad y por que se que siempre seremos amigos

A mis compañeros de laboratorio:

*Yedith, Vladimir, José Manuel, Dulce,
Gladis y Eloy.*

Gracias, por compartir conmigo parte de su tiempo, por hacer un excelente ambiente de trabajo y sobre todo por brindarme su amistad

A Dayna Merari G. T. , y Familia.

Gracias por la confianza que depositaron en mi, por el apoyo que me brindaron durante mis estudios y por darme su amistad y consejo.

*A Carlos Alberto T. H. Oscar S. N., y
Ricardo B. H.*

Gracias, por su amistad, por hacer que la carrera fuera agradable y por estar siempre a mi lado cuando más los necesité

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

F

Agradecimientos.

Al M en C. Arturo E. Cano Flores por su confianza, apoyo y amistad. Profesor gracias por compartir su experiencia durante la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Francisco Ruiz del Conjunto "E" de la Facultad de Química de la UNAM, por el apoyo y asesorías prestadas durante la elaboración del presente proyecto.

Al Dr. Arturo Navarro del Conjunto "E" de la Facultad de Química de la UNAM, por el apoyo y las facilidades prestadas durante la elaboración del presente proyecto.

Al personal técnico-administrativo del laboratorio L-321 del Conjunto "E" de la Facultad de Química de la UNAM, por las facilidades prestadas en la realización del presente trabajo.

A la carrera de Biología por las facilidades prestadas en la realización del trabajo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

G



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES.

ESTIMADOS MAESTROS :

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

RIVERA BECERRIL ERNESTO

Para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Biotransformación de la ridentina y de la desacetilconfertiflorina con hongos filamentosos.**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE M. en C. FRANCISCA L. SÁNCHEZ GARCÍA FIGUEROA

VOCAL M. en C. ARTURO E. CANO FLORES

SECRETARIO Q. MA. GUADALUPE MIRANDA JIMENO

SUPLENTE Q.F.B. JOSÉ LUIS BALDERAS LÓPEZ

SUPLENTE M. en C. ANGEL TLAPANCO OCHOA

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F., a 17 de julio de 2002.

Q.F.B.-ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ.
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fl

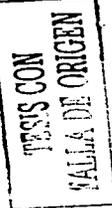
El Presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotransformaciones y Química de Productos Naturales L-314 de la F. E. S. "Zaragoza" Campus II, UNAM, bajo la asesoría del M. en C. Arturo E. Cano Flores y fue presentado en el XXXV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Los Cabos Baja California en noviembre del 2002.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Indice

| | |
|--|----|
| I. Introducción..... | 1 |
| II. Antecedentes..... | 3 |
| 1. Familia <i>Compositae</i> | |
| 1.1 Generalidades..... | 3 |
| 1.2 Constituyentes químicos..... | 3 |
| 2. <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp mexicana..... | |
| 2.1 Descripción botánica..... | 6 |
| 2.2 Constituyentes químicos aislados del género <i>Artemisia</i> ss..... | 6 |
| 2.3 Usos de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp mexicana..... | 9 |
| 2.4 Metabolitos aislados de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp mexicana..... | 10 |
| 3. <i>Ambrosia confertiflora</i> | |
| 3.1 Descripción botánica..... | 14 |
| 3.2 Constituyentes químicos aislados del género <i>Ambrosia</i> ssp..... | 14 |
| 3.3 Usos de <i>Ambrosia confertiflora</i> | 18 |
| 3.4 Metabolitos aislados <i>Ambrosia confertiflora</i> | 18 |
| 4. Lactonas sesquiterpénicas..... | |
| 4.1 Generalidades..... | 20 |
| 4.2 Clasificación de las lactonas sesquiterpénicas..... | 20 |
| 4.3 Biogénesis de las lactonas sesquiterpénicas..... | 22 |
| 4.4 Importancia de las lactonas sesquiterpénicas de la familia <i>Compositae</i> y su uso como agentes biológicos en distintas patologías..... | 26 |
| 5. Propiedades espectroscópicas de las lactonas sesquiterpénicas..... | |
| 5.1 U.V. e IR..... | 30 |
| 5.2 RMN ¹ H..... | 30 |
| 5.3 RMN ¹³ C..... | 32 |
| 5.4 Espectroscopia de Masas..... | 33 |
| 5.5 Ensayos de identidad..... | 35 |
| 6. Biotransformaciones..... | |
| 6.1 Generalidades..... | 35 |
| 6.2 Enzimas..... | 38 |





| | |
|--|-----------|
| 6.3 Hongos..... | 40 |
| 6.4 Biotransformaciones de lactonas sesquiterpénicas con enzimas..... | 41 |
| 6.5 Biotransformación de terpenos y lactonas sesquiterpénicas con hongos..... | 46 |
| III. Planteamiento del Problema..... | 59 |
| IV. Objetivos..... | 60 |
| V. Hipótesis..... | 61 |
| VI. Parte Experimental. | |
| 1. Material..... | 62 |
| 2. Metodología..... | 65 |
| 2.1 Diagrama de flujo para la purificación y biotransformación de la ridentina..... | 65 |
| 2.2 Diagrama de flujo para la purificación y biotransformación de la desacetilconfertiflorina..... | 66 |
| 3. Colecta y diferenciación cromatográfica de las partes aéreas del material vegetal..... | 67 |
| 3.1 Purificación de la ridentina..... | 67 |
| 3.2 Acetilación química de la ridentina..... | 68 |
| 3.3 Acetilación enzimática de la ridentina..... | 70 |
| 3.4 Epoxidación de la ridentina..... | 71 |
| 3.5 Purificación de la desacetilconfertiflorina..... | 72 |
| 3.6 Proceso de biotransformación con hongos filamentosos..... | 73 |
| 3.6.1 Preparación de los microorganismos..... | 73 |
| 3.6.2 Crecimiento de los microorganismos..... | 74 |
| 3.6.3 Determinación de la biomasa por peso húmedo..... | 74 |
| 3.6.4 Determinación de la biomasa por la cuantificación de azúcares reductores..... | 74 |
| 3.6.5 Preparación de la Curva estandar de glucosa..... | 75 |
| 3.7 Procedimiento de la biotransformación de ridentina..... | 75 |
| 3.7.1 Biotransformación de la ridentina con <i>B. bassiana</i> | 76 |
| 3.7.2 Biotransformación de la ridentina con <i>A. niger</i> | 77 |
| 3.7.3 Biotransformación de la ridentina con <i>A. ochraceus</i> | 78 |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



| | |
|--|----|
| 3.8 Biotransformación de la ridentina con cultivo de células de zanahoria..... | 78 |
| 3.9 Procedimiento de la biotransformación de la desacetilconfertiflorina..... | 79 |
| 3.9.1 Biotransformación de la desacetilconfertiflorina con <i>B. bassiana</i> | 80 |
| 3.9.2 Biotransformación de la desacetilconfertiflorina con <i>A. ochraceus</i> | 80 |
| 3.9.3 Biotransformación de la desacetilconfertiflorina con <i>A. niger</i> | 81 |

VII. Resultados y discusión..... 83

VIII. Espectros.

| | |
|--|-----|
| 1. Espectro de IR de la ridentina (48)..... | 94 |
| 2. Espectro de RMN ¹ H de la ridentina (48)..... | 95 |
| 3. Espectro de RMN ¹³ C de la ridentina (48)..... | 96 |
| 4. Espectro de IR del diacetato de la ridentina (205)..... | 97 |
| 5. Espectro de RMN ¹ H del diacetato de la ridentina (205)..... | 98 |
| 6. Espectro de RMN ¹³ C del diacetato de la ridentina (205)..... | 99 |
| 7. Espectro de IR del producto menos polar de la reacción de acetilación de la ridentina ¹ | 100 |
| 8. Espectro de IR del producto de acetilación de la ridentina con LCC ¹ (208)..... | 101 |
| 9. Espectro de IR del producto de la reacción de epoxidación de la ridentina ¹ (206)..... | 102 |
| 10. Espectro de IR del producto de la reacción de epoxidación de la ridentina ¹ (207)..... | 103 |
| 11. Espectro de IR de la desacetilconfertiflorina..(104)..... | 104 |
| 12. RMN ¹ H de la desacetilconfertiflorina (104)..... | 105 |
| 13. Espectro de RMN ¹³ C de la desacetilconfertiflorina (104)..... | 106 |
| 14. Espectro DEPT de la desacetilconfertiflorina (104)..... | 107 |
| 15. Espectro IR del producto de la biotransformación de la ridentina con <i>B. bassiana</i> ¹ (212)..... | 108 |
| 16. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la ridentina con <i>B. bassiana</i> ¹ (215)..... | 109 |
| 17. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la ridentina con <i>B. bassiana</i> ¹ (216)..... | 110 |



| | |
|--|-----|
| 18. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la ridentina con <i>A. niger</i> ¹ (210)..... | 111 |
| 19. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la ridentina con <i>A. niger</i> ¹ (211)..... | 112 |
| 20. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la ridentina con <i>A. ochraceus</i> ¹ (209)..... | 113 |
| 21. Espectro de IR del epímero de la vulgarina (217)..... | 114 |
| 22. Espectro de RMN ¹ H del epímero de la vulgarina (217)..... | 115 |
| 23. Espectro de RMN ¹³ C del epímero de la vulgarina (217)..... | 116 |
| 24. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la desacetilconfertiflorina con <i>B. bassiana</i> ¹ (226)..... | 117 |
| 25. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la desacetilconfertiflorina con <i>B. bassiana</i> ¹ (227)..... | 118 |
| 26. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la desacetilconfertiflorina <i>A. ochraceus</i> ¹ (220)..... | 119 |
| 27. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la desacetilconfertiflorina con <i>A. ochraceus</i> ¹ (221)..... | 120 |
| 28. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la desacetilconfertiflorina con <i>A. ochraceus</i> ¹ (222)..... | 121 |
| 29. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la desacetilconfertiflorina con <i>A. niger</i> ¹ (223)..... | 122 |
| 30. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la desacetilconfertiflorina con <i>A. niger</i> ¹ (224)..... | 123 |
| 31. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la desacetilconfertiflorina con <i>A. niger</i> ¹ (225)..... | 124 |
| 32. Espectro de IR del producto de la biotransformación de la desacetilconfertiflorina con <i>A. niger</i> ¹ (226)..... | 125 |

¹ Sustancias obtenidas en bajo rendimiento (< 5%)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



| | |
|-------------------------------|-----|
| IX. Conclusiones | 126 |
| X. Sugerencias | 127 |
| XI. Bibliografía | 128 |
| XII. Anexos | 140 |

Anexo I. Medio YEPGA y reactivo DNS.

Anexo II. Cinética de crecimiento.

Anexo III. Células de zanahoria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Lista de símbolos y abreviaturas empleadas

| | |
|---------------------------------|--|
| [] | Bibliografía |
| FPP | Pirofosfato de farnesilo |
| ATCC | American Type Collection Culture |
| CAL | Lipasa de <i>Candida antártica</i> |
| LPP | Lipasa de <i>Pancreas porcino</i> |
| LMM | Lipasa de <i>Mucor mibelei</i> |
| LCC | Lipasa de <i>Candida cylindracea</i> |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| CCV | Cromatografía en columna |
| CCP | Cromatografía en placa preparativa |
| PDA | Agar papa dextrosa |
| Py | Piridina |
| Me ₂ CO | Acetona |
| EtOH | Etanol |
| CHCl ₃ | Cloroformo |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| CDCl ₃ | Cloroformo deuterado |
| n-Hex | n-Hexano |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| Ac ₂ O | Anhidrido acético |
| pf | Punto de fusión |
| DNS | Ácido dinitrosalicílico |
| AMCPB | Ácido metacloroperbenzóico |
| DMAP | Dimetilaminopiridina |
| DMSO | Dimetilsulfóxido. |
| RMN ¹ H | Resonancia magnética nuclear de hidrógeno |
| RMN ¹³ C | Resonancia magnética nuclear de carbono 13 |
| COSY | Correlación espectroscópica (Correlation Spectroscopy) |
| DEPT | Distorsión aumentada por una transferencia de polarización |
| J | Constante de acoplamiento |
| δ | Desplazamiento químico |
| TMS | Tetrametilsilano |
| Hz | Hertz |
| IAA | Ácido indolacético. |

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

I. INTRODUCCIÓN.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



México ocupa un lugar privilegiado en el panorama mundial de la diversidad biológica, con una superficie de apenas 1.5 % del área total de la masa continental, ya que en su territorio se encuentran casi todos los biomas que existen en el planeta, y en él viven cerca del 10 % de las especies de plantas y animales terrestres que se conocen actualmente.

Su ubicación geográfica en un área de intersección de la región boreal y la región tropical, sus extensos litorales y su accidentada topografía, han dado lugar a una gran diversidad de climas, suelos y comunidades vegetales, que conforman un mosaico de bosques de coníferas, bosques de encinos, bosques de niebla, selvas altas siempre verdes, matorrales, manglares, dunas costeras, y una gran cantidad de asociaciones de gran interés biológico.

Desde su aparición en estas tierras mexicanas, nuestros antepasados se valieron de estas riquezas biológicas que le provió la naturaleza para satisfacer sus necesidades más básicas. Partiendo del conocimiento empírico adquirido acerca de la utilidad que representaba su entorno, detalló una serie de conocimientos que le permitieron caracterizar y diferenciar entre lo que le era benéfico y aquello que no.

El desarrollo de este conocimiento trajo consigo una serie de adelantos notables en alimentación, fibras, ropa, energía y salud. Sin embargo, el conocimiento sobre el uso de las plantas medicinales se había quedado estancado debido a la poca divulgación del mismo.

Actualmente en materia de salud, se tiene el interés por retomar aquellos conocimientos heredados por nuestros antepasados, sobre el empleo de plantas medicinales, gracias a que se ha comprobado su importante utilidad, y debido a que muchas plantas empleadas para el tratamiento de diversas patologías de aquellos tiempos, han demostrado ser efectivas contra algunas enfermedades actuales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Diversas investigaciones han comprobado que dentro de la inmensa diversidad de plantas conocida por el hombre, es la familia *Compositae*, una de las familias más vastas en cuanto a especies utilizadas en la medicina tradicional y cuya característica distintiva entre estas, es la presencia de lactonas sesquiterpénicas, como parte integral de su composición.

Las lactonas sesquiterpénicas, han sido objeto de numerosos estudios biológicos; donde han destacado por su actividad antimicrobiana, antitumoral, antiparasitaria y antifúngica entre otras, debido a la presencia del grupo carbonilo α,β -insaturado.

Recientemente ha despertado un gran interés el emplear enzimas y microorganismos en la obtención y síntesis de productos químicos importantes, con valor económico, agroindustrial, y farmacológico, entre otros; ya que su estereoespecificidad, los hace una herramienta muy útil para el químico orgánico, en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica —muchas sustancias tras su modificación estructural pueden modificar su actividad biológica—. Sin embargo, existe una descripción limitada acerca del comportamiento de los sistemas enzimáticos de un determinado microorganismo sobre la estructura de estos sustratos.

El presente estudio va encaminado a la purificación de la ridentina —lactona sesquiterpénica con esqueleto de germacrano— y de la desacetilconfertiflorina —lactona sesquiterpénica con esqueleto de pseudoguayano— así como de sus metabolitos de bioconversión con un cultivo de células de zanahoria, lipasas inmovilizadas y los procedentes de la acción microbiana de los hongos filamentosos *A niger*, *A. ochraceus* y la levadura *B. bassiana*, con la finalidad de obtener compuestos químicamente novedosos que puedan ser factibles de ser evaluados biológicamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2-A

II. ANTECEDENTES.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



1. Familia *Compositae*.

1.1. Generalidades.

De las aproximadas 250 000 tipos de plantas que existen en el mundo, sólo una pequeña parte ha sido examinada, por lo que las especies restantes son una fuente inimaginable de compuestos desconocidos con una probable actividad farmacológica; asimismo esas sustancias pueden ser objeto de modificaciones químicas que aumenten su efectividad biológica [1].

La familia *Compositae* constituye la mayor familia de plantas fanerógamas y abarca unos 1000 géneros y alrededor de 20 000 especies [2]. Las compuestas se dividen en dos subfamilias y trece tribus distribuidas como muestra la tabla I.

Tabla I. División taxonómica de la familia *Compositae*.

| TRIBUS Y SUBFAMILIAS QUE CONSTITUYEN LA FAMILIA <i>Compositae</i> | | |
|---|--------------------|---------------------------------|
| SUBFAMILIA | TRIBU | DISTRIBUCIÓN |
| I. <i>Tubuliflorae</i> | <i>Vernoniaeae</i> | América tropical |
| | <i>Eupatorieae</i> | América |
| | <i>Astereae</i> | América extratropical |
| | <i>Inuleae</i> | Cosmopolita |
| | <i>Helianteae</i> | América |
| | <i>Helenieae</i> | México y región meridional |
| | <i>Anthemideae</i> | Región mediterránea y Sudáfrica |
| | <i>Senecioneae</i> | Cosmopolita |
| | <i>Calenduleae</i> | Sudáfrica |
| | <i>Arctodeae</i> | Sudáfrica |
| | <i>Cynareae</i> | Región central (Ecuador) |
| | <i>Mutisieae</i> | Sudamérica |
| II. <i>Liguliflorae</i> | <i>Cichorieae</i> | Hemisferio norte |

IMPRESO CON
PAPEL DE ORIGEN

1.2. Constituyentes químicos de la familia *Compositae*.

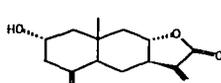
La investigación química realizada en años recientes ha incrementado el interés sobre el estudio de diversas plantas, pertenecientes a la familia *Compositae*, de las cuales se han aislado sustancias tan numerosas como el número de especies pertenecientes a ella, entre las sustancias que se han aislado en esta familia se encuentran los



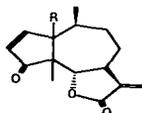
- Diterpenos, triterpenos: Darutigenol, taraxasterol, gemanicol
- Cumarinas: Artelina, Artanina, Dafnetina, Ascortina

Tabla II. Lactonas sesquiterpénicas encontradas en algunas tribus de la familia *Compositae*.

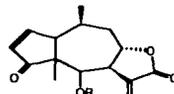
| SUBFAMILIA | TRIBU | ESPECIE | LACTONA SESQUITERPÉNICA | ESTRUCTURA |
|--------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------|
| Tubuliflorae | Heliantheae | <i>I. macrocephala</i> Nutt | Ivalina | 5 |
| | | <i>P. hysterophorus</i> | Partenina | 6 |
| | Heloniaceae | <i>A. maritima</i> | Ambrosina | 7 |
| | | <i>H. autumnale</i> | Helenalina | 8 |
| Anthemideae | <i>H. bigelovii</i> Gray | | Bigelovina | 9 |
| | | <i>Helenium mexicanum</i> | Mexicanina A | 10 |
| | <i>Achillea</i> | Matricarina | 11 | |
| Asteraceae | <i>Artemisia</i> | | Estafiatina | 12 |
| | | <i>Chrysanthemum</i> | Crisartemina A | 13 |
| | <i>A. annuus</i> | Artemisinina | 14 | |
| Liguliflorae | Choriseae | <i>Taraxacum officinale</i> | Lactucopirina | 15 |



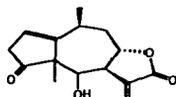
5. Ivalina
(*I. macrocephala* Nutt.)



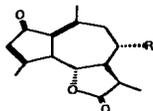
6. R=OH Partenina (*P. hysterophorus*)
7. R=H Ambrosina (*A. maritima*)



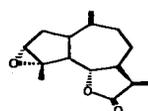
8. R=H Helenalina (*H. autumnale*)
9. R=CO-CH₃ Bigelovina (*H. bigelovii* Gray)



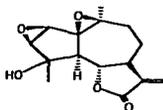
10. Mexicanina A (*Helenium mexicanum*)



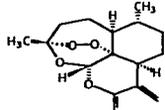
11. R=O-CO-CH₃ Matricarina
(*Achillea*)



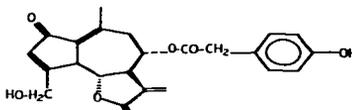
12. Estafiatina
(*Artemisia*)



13. Crisartemina A
(*Chrysanthemum*)



14. Artemisinina
(*A. annuus*)



15. Lactucopirina
(*Taraxacum officinale*)

Esquema 2. Estructuras de lactonas sesquiterpénicas encontradas en algunas tribus de la familia *Compositae*.

**MÁS CON
CALLE DE ORIGEN**



2. *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.

2.1. Descripción botánica.

En la República Mexicana existen 16 especies pertenecientes al género *Artemisia*³, las cuales se encuentran distribuidas principalmente en la región norte del país como se indica en la tabla III [6]. *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, conocida comúnmente como "estafiate"⁴ es una planta nativa del país y se encuentra distribuida en las regiones templadas, principalmente en el Valle de México a una altitud de 2350 a 2900 m snm.

Tabla III. Especies de *Artemisia* que se desarrollan en México.

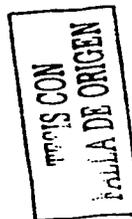
| ESPECIES DE <i>Artemisia</i> EXISTENTES EN MEXICO | |
|--|----------------------------|
| Especies | Región |
| <i>Artemisia absinthium</i> L. | Michoacán |
| <i>Artemisia albulu</i> Wooten | Coahuila |
| <i>Artemisia dracunculoides</i> Pursh | Chihuahua, Baja California |
| <i>Artemisia filifolia</i> Torr | Chihuahua |
| <i>Artemisia frigida</i> Willd | Nuevo León |
| <i>Artemisia fransarvides</i> Greene | Chihuahua, Sonora |
| <i>Artemisia grapheloides</i> | Chihuahua |
| <i>Artemisia heterophylla</i> Nutt | Baja California |
| <i>Artemisia idotzschiana</i> Bess | Hidalgo |
| <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>albula</i> | Baja California |
| <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>medicana</i> | Distrito Federal |
| <i>Artemisia mexicana</i> var. <i>angustifolia</i> | Hidalgo |
| <i>Artemisia palmeri</i> A. Gray | Baja California |
| <i>Artemisia redolens</i> Gray | Chihuahua |
| <i>Artemisia tridentata</i> Nutt | Baja California Norte |
| <i>Artemisia tridentata</i> <i>angustifolia</i> Gray | Baja California Norte |

2.2. Constituyentes químicos aislados del género *Artemisia* ss.

Al final de la década de los años 80 y con el aislamiento de la artemisinina (*Artemisia annua*), la cual demostró tener una gran actividad antimalárica [8], surgió un gran interés por el estudio químico y farmacológico de especies vegetales del género *Artemisia* con el propósito de poder determinar su potencialidad como una posible fuente

³ *Artemisia ludoviciana* es una planta aromática de hasta 1 m de altura, con ramas blanquecinas y hojas divididas en tres con flores amarillas, se asocia a la familia *Compositae* (*Asteraceae*).

⁴ También es conocida como "estayate", "ajenjo del país" o "izahuyatl" [7].

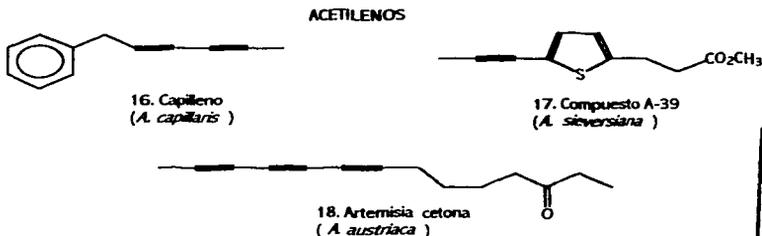




de agentes antimaláricos. En la tabla IV, se describen los constituyentes químicos más frecuentemente aislados del género *Artemisia*, donde destacan los flavonoides y las lactonas sesquiterpénicas [9].

Tabla IV. Principales Constituyentes químicos aislados del género *Artemisia* ss.

| METABOLITOS AISLADOS DEL GÉNERO <i>Artemisia</i> | |
|--|--|
| Acetilenos | <ul style="list-style-type: none"> Trienos conjugados Éteres enol espirocetales Derivados del tiofeno Aromáticos |
| Cumarinas | |
| Flavonoides | <ul style="list-style-type: none"> Flavonas Flavonoles Glicósidos de los anteriores |
| Monoterpenos | |
| Sesquiterpenos | <ul style="list-style-type: none"> Lactonas <ul style="list-style-type: none"> Germacranóidas Eudesmanóidas Guayanóidas Otros esqueletos No lactonas <ul style="list-style-type: none"> Hidroperóxidos acíclicos y cíclicos |
| Triterpenos | |
| Lignanano tipo sesamina | |
| Otros compuestos | |

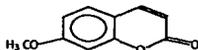


Equema 3. Constituyentes químicos aislados del género *Artemisia* ss.

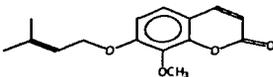
Fuente: CON
 I. A. DE ORIGEN



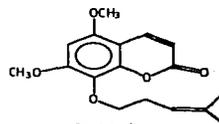
CUMARINAS



19. Hemiarina
(*A. anomala*)

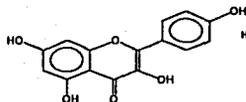


20. Lacinarina
(*A. tanacetifolia*)

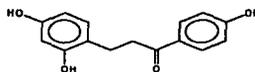


21. Artanina
(*A. tanacetifolia*)

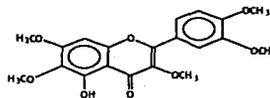
FLAVONOIDES



22. Kaempferol
(*A. absinthium L.*)

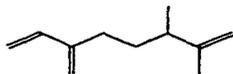


23. Compuesto F-143
(*A. palustris*)

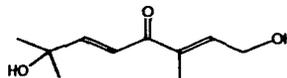


24. Artemetina
(*A. annua*)

MONOTERPENOS

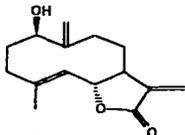


25. (*A. annua*)

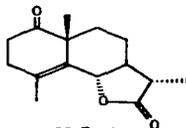


26. (*A. austeri*)

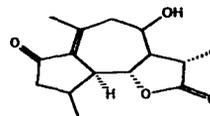
LACTONAS SESQUITERPENICAS



27. Artemorina
(*A. ludoviciana*)



28. Taurina
(*A. drancunculus ssp.*)

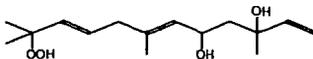


29. Diacetilmatricarina
(*A. austriaca*)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

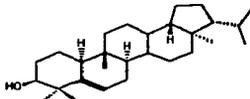


SESQUITERPENOS NO LACTONAS

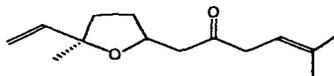


30. (*A. alba*)

TERPENOS

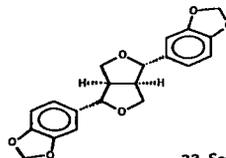


32. Simiarenol
(*A. anomala*)



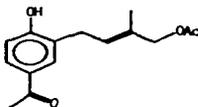
31. Davanona
(*A. douglasiana*)

LIGNANOS TIPO SESAMINA

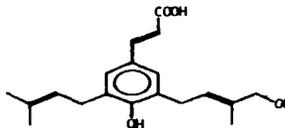


33. Sesamina
(*A. absinthium*)

OTROS COMPUESTOS



34. (*A. campestris*)



35. (*A. capillaris*)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esquema 3. (continuación). Constituyentes químicos aislados del género *Artemisia* ss.

2.3. Usos de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.

De acuerdo a los antecedentes mostrados por las plantas de la familia *Compositae* y el género *Artemisia* en particular se encontró que esta planta nativa de México cuyo uso es compartido y coincidente en todas las regiones donde se localiza, se emplea principalmente para padecimientos digestivos y además se le han atribuido con el tiempo una serie de propiedades curativas; muchas de las cuales no han sido comprobadas, pero que su uso se



remonta desde los Aztecas hasta nuestros días para diversas dolencias y enfermedades como se muestra en la tabla V [10].

Tabla V. Usos de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* en México.

| DOLENCIA O ENFERMEDAD | USOS DE <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> | | | |
|-------------------------------------|---|-------------|----------|---------|
| | Azteca | no Aztecas* | Colonial | Moderno |
| Fiebre acuática | ✓ | | | |
| Fiebre y exceso de flemas | ✓ | | | |
| Demencia | ✓ | | | |
| Epilepsia | | | ✓ | |
| Males debido a opresión del corazón | ✓ | | | |
| Gota, parálisis y entumecimiento | ✓ | | ✓ | |
| Recaídas | ✓ | | | |
| Escupimiento de sangre | ✓ | | | |
| Diurético | ✓ | | | |
| Hinchazones y ampollas | ✓ | ✓ | | |
| Dolores por frío | ✓ | | | ✓ |
| Tos y nariz seca | ✓ | | ✓ | |
| Empacho y cólico | ✓ | | ✓ | |
| Edema | | | ✓ | |
| Obstrucción del riñón | | | ✓ | |
| Vómito | | ✓ | ✓ | ✓ |
| Parasitosis | | | ✓ | ✓ |
| Purgativo | | | ✓ | ✓ |
| Provocación de la menstruación | | | ✓ | ✓ |
| Reumatismo | | ✓ | ✓ | |
| Expulsión de flemas | | | ✓ | |
| Susto | | | | ✓ |
| Diarrea | | | | ✓ |
| Parálisis más reumatismo | | | | ✓ |
| Sordera | | ✓ | | |
| Disentería | | ✓ | | |
| Obstrucción del hígado | | ✓ | | |
| Tratamiento de heridas | | ✓ | | |
| Dolor intestinal | | ✓ | | |
| Rabia | | ✓ | | |
| Escorbuto | | ✓ | | |
| Inflamación de genitales | | ✓ | | |
| Obstrucción del bazo | | ✓ | | |
| Dolores del pecho | | ✓ | | |
| Modificador de la sensibilidad | | | | ✓ |
| Aperitivo | | | | |

*Estos usos no tienen un origen definido presumiblemente provengan de la medicina galénica

2.4. Metabolitos aislados de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Conocidas las propiedades curativas o terapéuticas de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* y en la búsqueda de los constituyentes químicos de esta planta de la familia

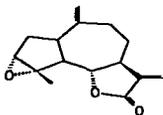


Compositae, se han aislado principalmente lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de eudesmano y guayano, acetilenos y monoterpenos, además de los metabolitos enlistados en la tabla VI, cabe destacar, que ésta es sólo una parte de los muchos metabolitos encontrados, pues existen otros tantos a los que no se les ha asignado un nombre químico en particular.

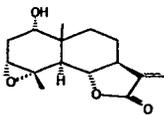
Tabla VI. Metabolitos aislados de *Artemisia ludoviciana ssp mexicana*.

| METABOLITOS AISLADOS DE <i>Artemisia ludoviciana ssp mexicana</i> | | | |
|--|--|------|--------|
| SUSTANCIA | ESTRUCTURA | REF. | |
| LACTONAS | Estafiatina | 36 | 11-13 |
| | Ludoviciana A | 37 | 9, 12 |
| | Ludoviciana C | 38 | 16 |
| | Armexina | 39 | 11, 12 |
| | Ridentina B | 40 | 14, 15 |
| | Rupicolina A | 41 | 14 |
| | Rupicolina B | 42 | 14 |
| | Rupina A | 43 | 14 |
| | 1 α ,3 α -dihidroarbusculina | 44 | 9, 11 |
| | Santamarina | 45 | 9, 11 |
| | Crisartemina B | 46 | 9, 11 |
| | Artemolina | 47 | 9, 11 |
| | Ridentina | 48 | 9, 11 |
| | 3 α -hidroxireynosina | 49 | 9, 11 |
| | Douglalina | 50 | 9, 1 |
| | Ludoviciana B | 51 | 15, 16 |
| | Artemorina | 52 | 9 |
| | Diacetilmatricarina | 53 | 12 |
| | Achiltina | 54 | 12, 13 |
| | Argalina | 55 | 11 |
| Crisartemina A | 56 | 13 | |
| MONOTERPENOS | Aicanfor | 57 | 12 |
| | Borneol | 58 | 12 |
| | Felandreno | 59 | 12 |
| | α -pineno | 60 | 12, 15 |
| FLAVONOIDES | Naringenina | 61 | 14 |
| | Eupatilina | 62 | 9, 11 |
| | Jaceosidina | 63 | 9, 11 |
| ESTEROLES | β -sitosterol | 64 | 11 |
| | Estigmasterol | 65 | 11 |

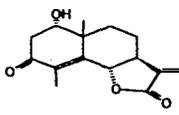
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



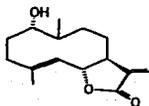
36. Estafatina



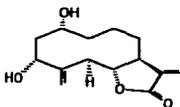
37. Ludovicina A



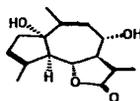
38. Ludovicina C



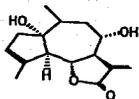
39. Armexina



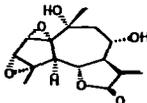
40. Ridentina B



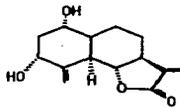
41. Rupicolina A



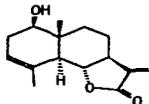
42. Rupicolina B



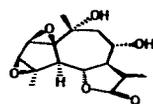
43. Rupina A



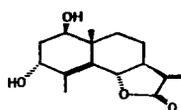
44. 1α,3α-dihydroarbusculina



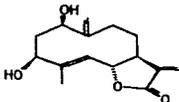
45. Santamarina



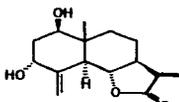
46. Crisartemina B



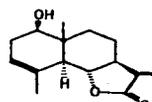
47. Armetolina



48. Ridentina

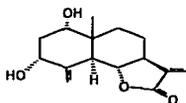


49. 3α-hidroxiyemosina

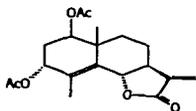


50. Douglanina

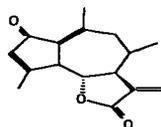
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



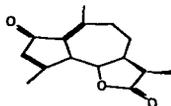
51. Ludoviciana B



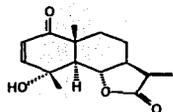
52. Artemorina



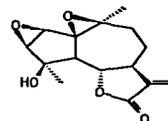
53. Diacetilmatricarina



54. Achillina



55. Arglanina



56. Crisartemina A



57. Alcanfor



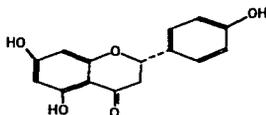
58. Borneol



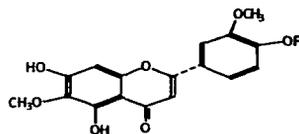
59. Felandreno



60. α -pineno

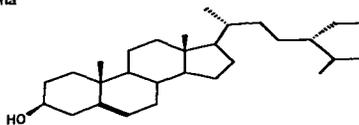


61. Naringenina



62. Eupatilina (R=CH₃)

63. Jaceosidina (R=H)



64. β -sitosterol

65. Δ^{22-23} Stigmasterol

TESIS CON
TALLA DE ORIGEN



3. *Ambrosia confertiflora*.

3.1. Descripción botánica.

El género *Ambrosia* (*Compositae*), se localiza principalmente en Norte América — Costa de San Diego, Riverside, Baja California, y México— y es conocido por su contribución de polen alérgeno a la atmósfera; crece en forma de hierbas anuales, bienales o perennes, con tallos erectos y ramificados en la mitad superior. Sus hojas son, pecioladas y divididas, con flores amarillas y anteras apiculadas de base redondeada.

El periodo de floración abarca los meses de agosto y septiembre. Los granos de polen de *Ambrosia* son achatados esféroidales, y miden alrededor de 20 micrometros de diámetro [17].

3.2. Constituyentes químicos aislados del género *Ambrosia* ss.

Durante varios años este género ha sido tema de estudio de varios grupos de investigación, resaltando los estudios de Mabry y Trimmermann; quienes aislaron diversas sustancias de este género de plantas, como brevemente se muestra en la tabla VII [18].

Tabla VII. Metabolitos aislados del género *Ambrosia* ss.

| METABOLITOS AISLADOS DE <i>Ambrosia</i> ss. | | | |
|--|---|------------|------------|
| Especies | Constituyentes químicos | Estructura | Referencia |
| <i>A. artemisiifolia</i> | ácido ambrósico | 66 | 19 |
| | 8-acetoxi-3-oxo-pseudoguaiian-6, 12-ólido | 67 | 20 |
| | 4-hidroxi-3-oxo-pseudoguaiian-6, 12-ólido | 68 | |
| | psilostaquina B | 69 | 21 |
| | psilostaquina C | 70 | 22 |
| | aceites esenciales | | 23 |
| <i>A. camphorata</i> | costunólido | 71 | 24 |
| <i>A. confertiflora</i> | dehidrocitral | | 25 |
| <i>A. cordifolia</i> | canambrina | 72 | 26 |
| | cordilina | 73 | |
| | psilostaquina B | 69 | |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VII. (continuación). Metabolitos aislados del género *Ambrosia* ss.

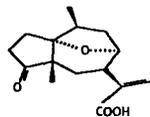
| METABOLITOS AISLADOS DE | | | |
|-------------------------|--|------------|------------|
| <i>Ambrosia</i> ss | | | |
| Especies | Constituyentes químicos | Estructura | Referencia |
| <i>A. cumanensis</i> | germacreno D | 74 | 27 |
| | 6-acetil-2, 2-dimetil-croman-4-ona | 75 | |
| | acetato de lupeol | | |
| | neocambrosina | 76 | |
| | ácido ambrosico | 66 | |
| | aminoácidos | | |
| | ácido cítrico | | |
| | fructosa | | |
| | altamisinina | 90 | 28 |
| | pauilitina | 91 | 29 |
| | isopauilitina | 92 | |
| | luposina | | 30 |
| | 10 α -hidroxí-isopelostaquina C | 93 | 31 |
| | 4-hidroxí-3-metoxi-cinamaldehído (coniferaldehído) | | |
| | benzaldehído | | |
| | esteroides | | 32 |
| triterpenos | | | |
| <i>A. eriocentra</i> | 5,4'-dihidroxí-3,7-dimetoxiflavona | 77 | 33 |
| | 7, 6-dihidroxí-3, 5, 6, 3', 4'-pentametoxiflavona | 78 | 34 |
| <i>A. grayi nelson</i> | 5, 7, 4'-trihidroxí-3, 6-dimetoxiflavona | 79 | |
| | 5, 7, 4'-trihidroxí-3, 6, 6-trimetoxiflavona | 80 | |
| | 5, 7-dihidroxí-3, 6, 6, 4'-tetrametoxiflavona | 81 | |
| | neocambrosina | 76 | 35 |
| | ácido damésico | 82 | |
| <i>A. hispida</i> | ácido 12-oxo-ent-kaur-en-19-óico | 83 | |
| | éster de ácido damésico | 84 | |
| | 2-hidroxí-ambrosina | | |
| | partenina | 6 | 36 |
| | neocambrosina | 78 | |
| <i>A. martina</i> | isodamsina | 85 | |
| | 13-hidroxí-isodamsina | 86 | |
| | 3-oxo-damsina | 87 | |
| | (11S)-11, 13-dihidroddamsina | 88 | |
| | 2, 3 (2H), 2, 3-epoxi-ambrosina | 89 | |
| | psilostaquina B | 69 | |
| <i>A. dumosa</i> | canambina | 72 | |
| | cordulina | 73 | |
| | dumosina | | 37 |
| <i>A. olitor</i> | 3, 5, 7, 3'-tetrahidroxí-8, 4'-dimetoxiflavona | 94 | |
| | constituyentes del polen: | | 38 |
| | hidrocarburos, α , β amirin | | |
| | α -amirin acetato | | |
| | ácidos grasos | | |
| | β -sitosterol | | |
| | campesterol | | |
| | himerina | 95 | 39 |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

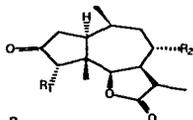


Tabla VII. (continuación). Metabolitos aislados del género *Ambrosia* ss.

| METABOLITOS AISLADOS DE <i>Ambrosia</i> ss. | | | |
|--|--------------------------------|------------|------------|
| Especies | Constituyentes químicos | Estructura | Referencia |
| <i>A. polistachya</i> | ivasperina | | 40 |
| | granilina | | |
| <i>A. tenuifolia</i> | peruvina | 96 | 40-41 |
| | ácido ambrósico | 86 | |
| | 11, 13-dihidro-psilostaquina C | 97 | |
| | psilostaquina C | | |
| | altamisina | | |
| | ácido altamísico | | |
| | cumanina | 98 | 40-42 |

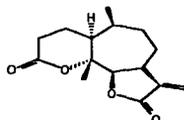


66. Ac ambrósico

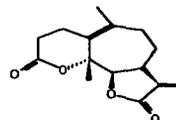


67. H OAc; 8-Acetoxy-3-oxo-pseudogualan-6, 12-díido

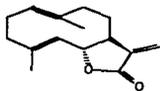
68. OH H; 4-Hidroxi-3-oxo-pseudogualan-6, 12-díido



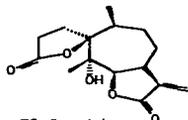
69. Psilostaquina B



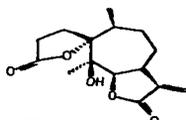
70. Psilostaquina C



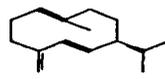
71. Costunólido



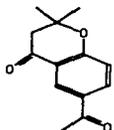
72. Canambrina



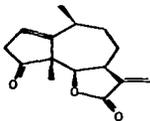
73. Cordiina



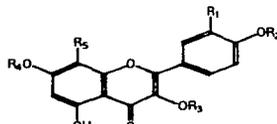
74. germacrano D



75. 6-Acetil-2, 2-dimetilcroman-4-ona



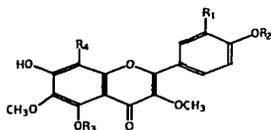
76. neoambrosina



77. R₁=H R₂=H R₃=CH₃ R₄=CH₃ R₅=H
 5, 4'-Dihidroxi-3, 7-Dimetoxiflavona
 94. R₁=OH R₂=CH₃ R₃=H R₄=H R₅=OCH₃
 3, 5, 7, 3'-Tetrahidroxi-8, 4'-dimetoxiflavona

Esquema 5. Metabolitos aislados del género *Ambrosia* ss.

TESIS CON
FALLA DE ORIGE

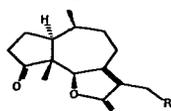


78. $R_1 = OCH_3$ $R_2 = CH_3$ $R_3 = CH_3$ $R_4 = OH$
7,8-dihidro-3,6,3',4'-Pentametoxtiflavona

79. $R_1 = H$ $R_2 = H$ $R_3 = H$ $R_4 = H$
5,7,4'-Trihidro-3,6-Dimetoxtiflavona

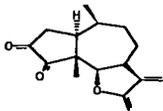
80. $R_1 = H$ $R_2 = H$ $R_3 = H$ $R_4 = OCH_3$
5,7,4'-Trihidro-3,6,8-Trimetoxtiflavona

81. $R_1 = H$ $R_2 = CH_3$ $R_3 = H$ $R_4 = OCH_3$
5,7-Dihidro-3,6,8,4'-Tetrametoxtiflavona

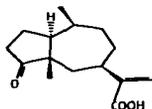


85. $R = H$; Isodamsina

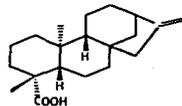
86. $R = OH$; 13-Hidroxisodamsina



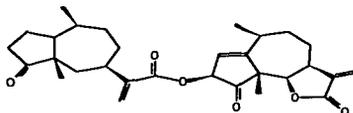
87. 3-oxodamsina



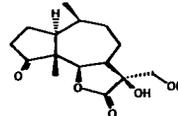
82. Ac Damsino



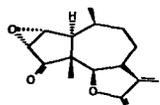
83. Ac. 12-Oxo-ent-kaur-en-19-ico



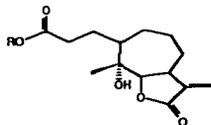
84. Ester de ácido damsínico



88. (115), 11,13-Dihidrodamisina

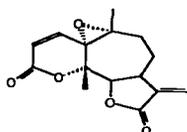


89. 2,3-epoxidambrosina

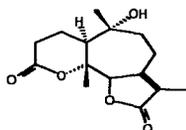


90. $R = CH_2CH_3$; Altamisina

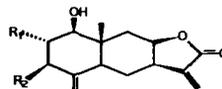
91. $R = H$; Paultina



92. (1,10) α -epoxy-isopaultina
(1,10) β -epoxy-isopaultina

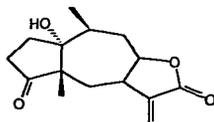


93. 10 α -Hidroxisiposilostaquina C

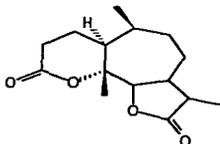


95. $R_1 = H$ $R_2 = OH$; Himenina
 $R_1 = OH$ $R_2 = H$

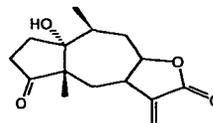
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



96. Peruvina



97. 11, 13-dihidropsilostaquina



98. Cumanina

Esquema 5. (continuación). Metabolitos aislados del género *Ambrosia* ss.

3.3. Usos de *Ambrosia confertiflora*.

El género *Ambrosia*, ha mostrado tener propiedades biológicas; se informó que esta planta es el principal contribuyente de polen alérgeno a la atmósfera, ya que una simple planta de *Ambrosia* puede generar un millón de granos de polen al día.

Aunque no se ha establecido aún completamente el posible papel que desempeña la presencia regional de *Ambrosia* en la polinosis estival tardía, se debe considerar su riesgo potencial en un futuro próximo debido a que es un alérgeno muy común. Además se ha informado de una acción vascular, ya que se localiza dentro del listado de plantas con actividad vascular de California [43].

3.4. Metabolitos aislados de *A. confertiflora*.

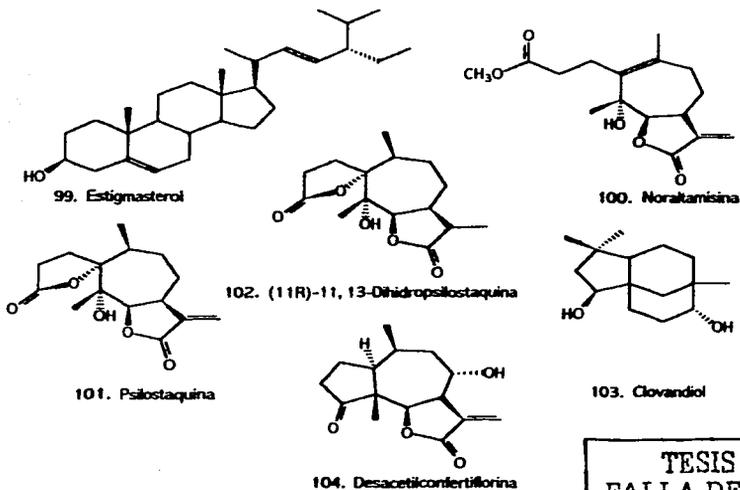
A. confertiflora, posee una gran variedad de sustancias sesquiterpénicas como se ha reseñado previamente obteniéndose lactonas sesquiterpénicas de primer, segundo y tercer paso biogenéticos como se ha descrito en la literatura [44]. Sin embargo, el análisis fitoquímico exhaustivo de una población colectada en Zacatecas revela la presencia de nuevas moléculas dentro de esta planta, como lo es el caso del dihidrocitral, un monoterpeno aislado de esta especie que se adiciona a la lista de constituyentes químicos de ésta, así como los metabolitos enlistados en la tabla VIII.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Tabla VIII. Metabolitos aislados de *Ambrosia confertiflora*.

| METABOLITOS AISLADOS DE <i>Ambrosia confertiflora</i> | | | |
|--|------------|------|----|
| SUSTANCIA | ESTRUCTURA | REF. | |
| TRITERPENO | | | |
| Estigmasterol | | 99 | 45 |
| SESQUITERPENO | | | |
| 1'-nor-altamisina | | 100 | 45 |
| Psilostaquina | | 101 | |
| (11R)-11, 13-dihidro-psilostaquina | | 102 | |
| Psilostaquina B | | 69 | |
| Clovandiol | | 103 | |
| Psilostaquina C | | 70 | |
| desacetilconfertiflorina | | 104 | 45 |



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esquema 6. Metabolitos aislados de *Ambrosia confertiflora*.



4. Lactonas sesquiterpénicas.

4.1. Generalidades.

Con respecto a las lactonas sesquiterpénicas se han escrito monografías, que describen las características principales de este grupo de compuestos, pero los continuos descubrimientos de nuevos compuestos con sutiles pero importantes modificaciones estructurales las hacen obsoletas.

Las lactonas sesquiterpénicas son sustancias amargas, lo suficientemente polares para ser insolubles en éter de petróleo, aunque también son insolubles en agua. El etanol o el metanol caliente las disuelven pero son aún más solubles en cloroformo o éter etílico; estas propiedades son utilizadas para extraerlas y separarlas de otras.

La mayoría de las lactonas sesquiterpénicas se han aislado de los vástagos de las plantas principalmente en extractos de flores o partes aéreas del grupo de plantas pertenecientes a la familia de las compuestas, siendo lo suficientemente típicos para tener valor quimiotaxonomico y constituyen alrededor del 5% del peso seco de estas [46].

4.2. Clasificación de las lactonas sesquiterpénicas .

Como se mencionó las lactonas sesquiterpénicas son derivados del *trans-trans*-pirofosfato de farnesilo, su clasificación de acuerdo a su esqueleto carbocíclico se establece en cuatro grupos principales :[47]

- Germacranólidas (con un anillo de 10 miembros)
- Eudesmanólidas (compuestos 6/6 bicíclicos)
- Guayanólidas (compuestos 5/7 bicíclicos)
- Pseudoguayanólidas (compuestos 5/7 bicíclicos)

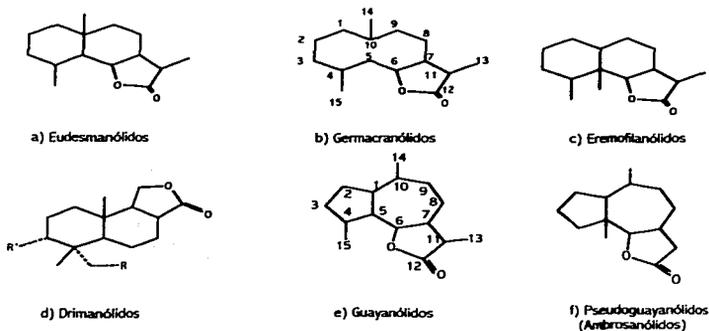
Estos cuatro grupos se pueden ciclizar para generar las lactonas cerradas hacia la posición del carbono 6 o del carbono 8. La distribución de los diversos tipos de lactonas sesquiterpénicas, varía en los diferentes grupos en que se divide la familia de las *Compuestas*.



Una característica importante es la presencia de un anillo γ -lactona, el cual en muchos casos presenta un grupo α -metileno conjugado con el grupo carbonilo [48]. Las lactonas sesquiterpénicas poseen un esqueleto fundamental de 15 átomos de carbono que teóricamente deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) [49], cabeza, cola y algunos productos de transposición (pseudoguyanólidos); parte del esqueleto es un anillo de metilbutenólido.

Por deshidrogenación pueden formarse derivados del naftaleno, como ocurre con los del tipo eudesmanólido o selenanólido, germacranólido, eremofinalónido y drimanólido, como muestra el esquema 7, y las del tipo guayanólido (ambrosanólido) que forman derivados del azuleno

En algunas lactonas sesquiterpénicas el oxígeno de la lactona se halla en C-3, con grupos epóxido, acetoxi o carbonilo como parte de la molécula, contribuyendo a incrementar los miembros de este grupo, conociéndose actualmente cerca de doscientos [50].



Esquema 7. Esqueletos base de lactonas sesquiterpénicas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

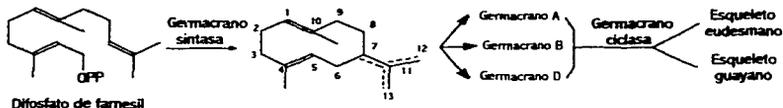


4.3. Biogénesis de las lactonas sesquiterpénicas.

Algunos autores asumen que el esqueleto guayano y eudesmano se originan de un precursor en común del tipo germacrano, que es formado a partir del acetato-mevalonato-FPP, en donde la enzima germacrano sintasa corresponde a la ciclación del grupo sesquiterpeno, este germacrano común es el precursor en la transformación del esqueleto en un grupo guayano o eudesmano, dependiendo de la posición de la epoxidación mediada por la enzima. Un germacrano epoxidado en la posición C₄-C₅ suele dar un esqueleto guayano, mientras que un germacrano epoxidado en la posición C₁-C₁₀, suele generar un eudesmano [51].

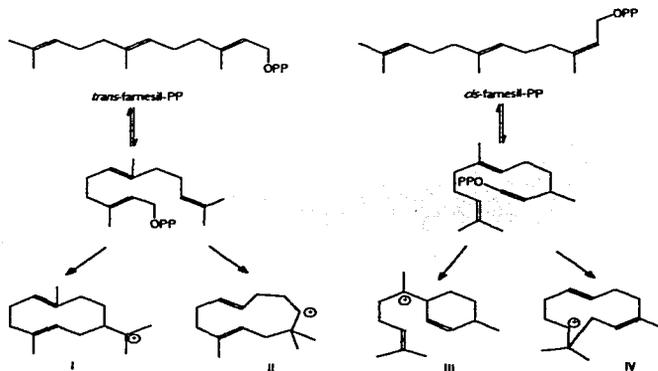
Por esta razón fue postulado que a parte de la oxidación enzimática, dos enzimas ciclizadoras son involucradas en la biosíntesis del guayanólido o eudesmanólido. Una enzima que lleva a cabo la ciclación del FPP a un esqueleto germacrano y una enzima separada que cicliza el esqueleto germacrano a un esqueleto guayano o eudesmano. De entre los diferentes tipos de germacrano encontrados, los indicados en el esquema 8, A, B y D son los principales precursores para la formación de las lactonas sesquiterpénicas en las compuestas.

Estos germacrano no sólo son los precursores de los esqueletos eudesmanólido o guayanólido sino que lo son de la mayoría de las lactonas sesquiterpénicas y básicamente en este proceso de bioconversión resultan cuatro cationes fundamentales en la formación de estos compuestos como se muestra en el esquema 9 [52].



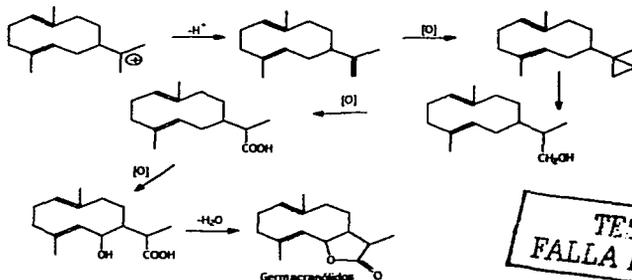
Esquema 8. Germacrano encontrados en la familia *Compositae*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Esquema 9. Biotagénesis de los cationes precursores de los sesquiterpenos.

La lactonización de este último se produce por un mecanismo de oxidación de un grupo metilo hasta carboxilo, la oxidación de un carbono adyacente y finalmente la condensación entre ambos, generan la γ -lactona, como se describe en el esquema 10 [53].

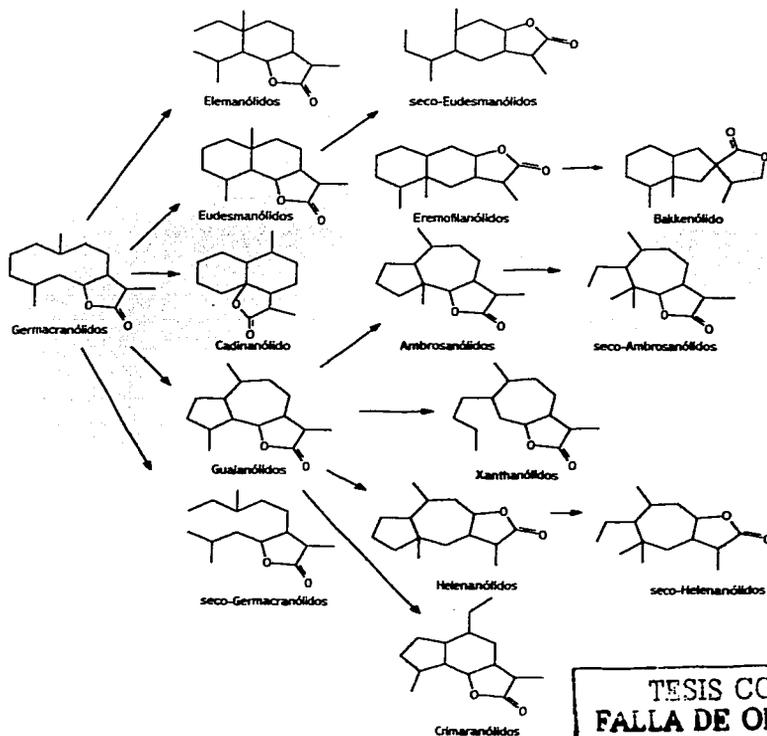


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esquema 10. Biotagénesis del anillo lactónico de las lactonas sesquiterpénicas.



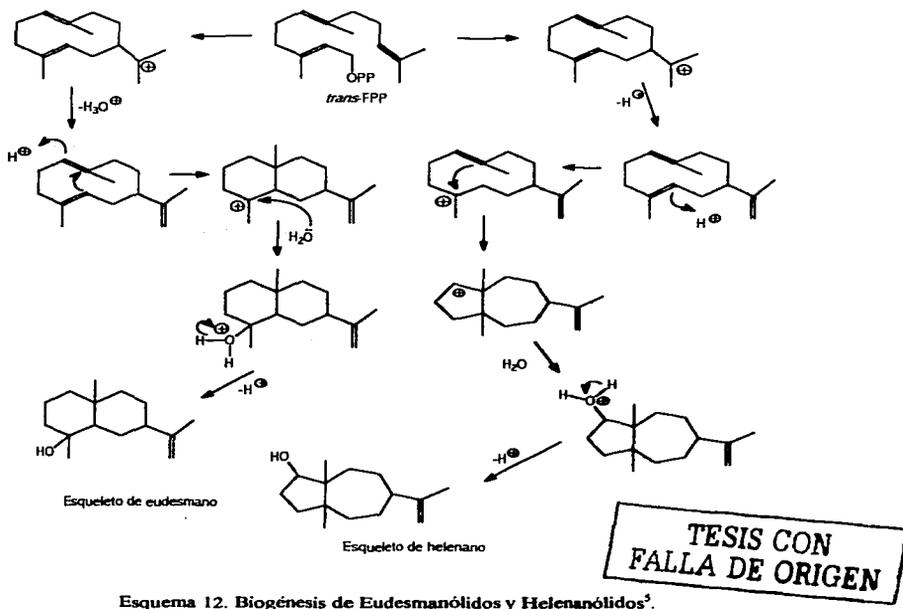
Las relaciones biogenéticas propuestas para las diversas clases de lactonas sesquiterpénicas, son las descritas en el esquema 11 [54].



Esquema 11. Relaciones biogenéticas en las lactonas sesquiterpénicas.



De acuerdo a lo descrito en la literatura se observa que la ruta biogénica para la formación de los grupos eudesmano y helenano es la ejemplificada en el esquema 12, a partir del *trans*-pirofosfato de farnesilo [55].



Esquema 12. Biogénesis de Eudesmanólidos y Helenanólidos⁵.

⁵ El grupo lactona se obtiene como fue descrito en el esquema 10, la terminación óxida se adiciona al final del nombre del esqueleto base cuando se encuentra el grupo lactona .



4.4. Importancia de las lactonas sesquiterpénicas de la familia *Compositae* y su uso como agentes biológicos en distintas patologías.

Dos razones incrementan el interés en el estudio de este grupo de productos naturales. Primero; las lactonas sesquiterpénicas son usadas como marcadores en bioquímica sistemática (quimiotaxonomía) en los estudios de especies importantes que pertenecen a la familia *Compositae*. Segundo; recientemente se han aislado diferentes tipos de lactonas sesquiterpénicas, muchas de las cuales tienen actividad biológica destacando la actividad: citotóxica, antibacteriana, antimicótica, antiprotozoaria, antiinflamatoria y antiviral, como se muestra en la tabla IX [56].

En la actividad citotóxica se ha demostrado que reaccionan con los grupos tiol de la cisteína, lo que lleva a una pérdida de la actividad de las enzimas sulfhidrido, fosfofructoquinasa y glicógeno sintasa. Estos estudios refuerzan la teoría de que las lactonas inhiben el crecimiento de los tumores por alquilación selectiva de las macromoléculas reguladoras del crecimiento [57]. Los estudios realizados tratando de definir la actividad antibacteriana y antimicótica en relación a la estructura-actividad, contra algunas bacterias y hongos, no concluyen algo en definitivo; sin embargo, se piensa en una posible relación con la presencia del grupo α -metileno- γ -lactona, o bien con el anillo de la ciclopentenona β -insaturado. El mecanismo de acción es probablemente la reacción con el grupo tiol de la cisteína, de la misma forma en que actúan las sustancias que poseen actividad antitumoral.

También se ha informado la actividad antiprotozoaria —contra algunos protozoarios patógenos como *Entamoeba histolytica* y *Trichomona vaginalis*— principalmente se demostró que la sustancia denominada Artemisina (Qinghaosu), obtenido de *Artemisia annua*, posee actividad contra la mayoría de *Plasmodiums*, agentes causantes de la malaria [58], recientemente se ha demostrado que la partenólida y la costunólida —aisladas de *Magnolia grandiflora*— poseen actividad antiinflamatoria [59] y lactucina, 8-desoxilactucina y lactucopiricina —aisladas de dos especies de lechuga, *Lactuca saligna* y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

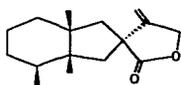


Lactuca virosa—mostraron ser resistentes al virus del mosaico del pepino y de la lechuga [60].

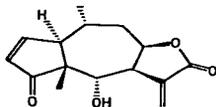
Tabla IX. Lactonas sesquiterpénicas de la familia *Compositae*.

| LACTONAS SESQUITERPÉNICAS AISLADAS DE LAFAMILIA <i>Compositae</i> | | | |
|---|---------------------------------|-----------------------------|-------|
| LACTONA | FUENTE VEGETAL | ACTIVIDAD BIOLÓGICA* | REF |
| Bakkenólida A | <i>Petasis albus</i> | I | 61-62 |
| Helenalida | <i>Helenium autumnale</i> | I,II,VIII | 61-63 |
| Parthenina | <i>Parthenium hysterophorus</i> | I,III,VIII,XI | 61,64 |
| Xantatína | <i>Xanthium pennsylvacum</i> | II,III | 61 |
| Mikanólida | <i>Mikania monogasensis</i> | II,III | 61 |
| Cnicina | <i>Cinicas benedictus</i> | II | 61 |
| Pseudovalina | <i>Inula sp</i> | III | 61 |
| Partenólida | <i>Tanacetum vulgare</i> | II | 61 |
| Saurina | <i>Saussurea sp.</i> | IV | 61 |
| Sauripína | <i>Saussurea sp.</i> | IV | 61 |
| Qinghaosu | <i>A. Annua</i> | V | 61-65 |
| Eremantina | <i>Eremanthus elaeagnus</i> | VI | 62 |
| Constunólida | <i>E. elaeagnus</i> | VI,XI | 62 |
| Alantolactona | <i>Inula helenium</i> | II,VII,VIII,IX,b,c | 61,64 |
| Isoalantolactona | <i>I. Helenium</i> | II,VIII,IX,b,c | 61,64 |
| α-Santonina | <i>Artemisia sp.</i> | VII,VIII | 61,62 |
| Canina | <i>A. cana.</i> | VIII | 61,62 |
| Coronopitina | <i>Iva xanthifolia</i> | II,VIII,X | 61,64 |
| Inulicina | <i>I. Japonica</i> | IX a. | 61 |
| Amaralina | <i>Helenium amarum</i> | IX d. | 61 |
| Enhidrina | <i>Enhydra fluctuans</i> | IX C. | 61 |
| Damsina | <i>Pennisetum hysterophorus</i> | IX e | 61 |
| Ridentina B | <i>Artemisia sp.</i> | I,V | 62 |
| Arteglasina A | <i>A. douglasiana</i> | I,XI | 62 |
| Vulgarina | <i>A. vulgaris</i> | I | 62,65 |
| Ludovicina A | <i>A. ludoviciana</i> | I,V | 61,62 |
| Arbusculina A | <i>A. tridentata</i> | X | 62 |
| Achillina | <i>A. tridentata</i> | V,X | 62 |
| | <i>A. Ludoviciana</i> | | |
| Diacetilmatricarina | <i>A. tridentata</i> | X | 62 |
| Arglanina | <i>A. ludoviciana</i> | V | 16 |
| Santamarina | <i>A. ludoviciana</i> | V | 61,62 |
| Arnefolina | <i>A. ludoviciana</i> | V | 61 |
| Estafiatina | <i>A. ludoviciana</i> | V | 61,65 |
| Crisartermina B | <i>A. ludoviciana</i> | V | 64 |
| I. Actividad citotóxica y antitumoral | | IX. Actividad farmacológica | |
| II. Actividad antibacterial | | IX.a. Estimulante del SNC | |
| III. Actividad antifúngica | | IX.b. Expectorante | |
| IV. Actividad antiambiana | | IX.c. Hipotensiva | |
| V. Actividad antimalárica | | IX.d. Analgésica | |
| VI. Actividad anti-schistosomicida | | IX.e. Anticolinérgica | |
| VII. Actividad antihelmíntica | | X. Efecto tóxico en plantas | |
| VIII. Actividad insecticida | | XI. Dermatitis | |

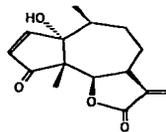
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



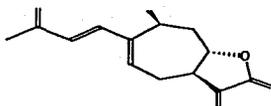
105. Bakkenóida A
(*Pectis albus*)



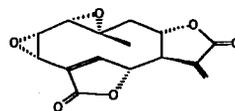
106. Hefenólina
(*Helenium autumnale*)



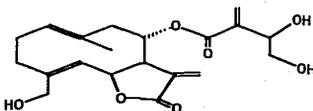
107. Partenina
(*Parthenium hysterophorus*)



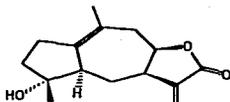
108. Xantánina
(*Xanthium pennsylvanicum*)



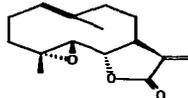
109. Mikánóida
(*Mikania monoglossensis*)



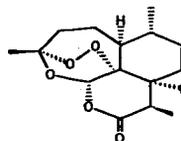
110. Críona
(*Crucas benedictus*)



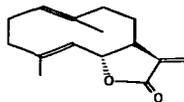
111. Pseudonolina
(*Inula* ssp.)



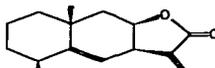
112. Partenólida
(*Tanacetum vulgare*)



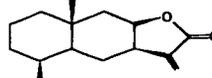
113. Qinghaosu
(*Artemisia annua*)



114. Constunólida
(*Eremanthus ciliacynus*)

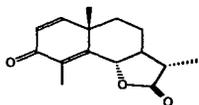


115. Alantolactona
(*Inula helenium*)

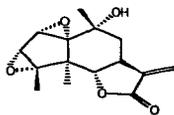


116. Isoalantolactona
(*Inula helenium*)

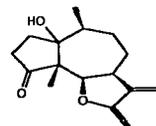
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



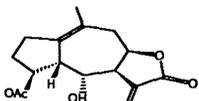
117. α -Santonina
(*Artemisia* ssp.)



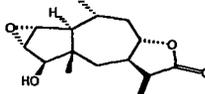
118. Canina
(*Artemisia cana*)



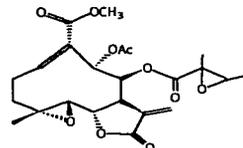
119. Coronopilina
(*Iva xanthifolia*)



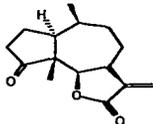
120. Inulicina
(*Inula japonica*)



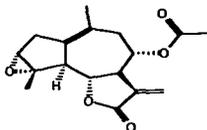
121. Amaralina
(*Helenium amarum*)



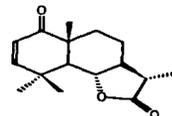
122. Enthrida
(*Enhydra fluctuans*)



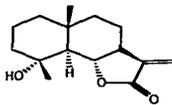
123. Damsina
(*Panicetum hysterophorus*)



124. Artegiasina A
(*Artemisia douglasiana*)



125. Vulgarina
(*Artemisia vulgaris*)



126. Arbusolina A
(*Artemisia tridentata*)

**TIENE CON
FALLA DE ORIGEN**



5. Propiedades espectroscópicas de las lactonas sesquiterpénicas.

5.1. U.V e I.R.

Las lactonas sesquiterpénicas dadas sus características químicas poseen la propiedad de absorber dentro del U.V e I.R, con señales particulares, lo que hace estas técnicas herramientas útiles para su identificación y su caracterización como lo muestra la tabla X [66].

Tabla X. Absorción U.V. e I.R. de las lactonas sesquiterpénicas

| ESTRUCTURA | ABSORCIÓN | |
|--------------------------------|-----------|--------------------------|
| | U.V. (nm) | I.R. (cm ⁻¹) |
| Saturados | < 200 | 1,770 |
| α,β -insaturados | 205-225 | 1750* |
| ciclohexanona (eudesmanolidos) | 214-230 | 1,690 |
| ciclopentanona | | 1,820 |
| Ciclopentanona | | 1,740 |
| metileno exo cíclico | | 1,665, 1405 |
| α,β -insaturada | | 965 y 840 |

*Las variaciones son debidas a funciones trans que originan valores hasta de 1,795 cm⁻¹

5.2. Espectroscopia de RMN¹H

Los espectros de RMN¹H de las lactonas sesquiterpénicas muestran señales características, las cuales se utilizan para elucidar la estructura molecular de la lactona sesquiterpénica como muestra la tabla XI.

- Los grupos metileno terminales aparecen como 2 dobletes entre δ 6.0-6.2 y δ 5.6-5.5, con J= 3 Hz.
- Los grupos metilos ligados al anillo saturado aparecen como dobletes δ 1.1, J=7 Hz.
- Los metilos unidos a carbonos secundarios aparecen como dobletes δ 1.12, J=7 Hz.
- Los metilos ligados a carbonos terciarios aparecen como singuletes δ 0.7-1.2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla XI. Señales de RMN¹H de algunos sistemas de lactonas sesquiterpénicas.

| En el sistema: | Se observa: |
|---|--|
| <p>Achillina</p> <p>δ 6.14 (q) H δ 3.80 (r) H δ 1.14 (d) H δ 2.66 (dc) H</p> | H-6 (δ 4.4-5.0, d) ($J=10$ Hz) H-7 (δ 3.4, m) |
| <p>Estafiatina</p> <p>δ 2.06 (dc) H δ 3.38 (dc) H δ 2.21 (dc) H δ 4.94-4.86 s.a. H</p> | Los protones 6 y 7 aparecen como dobles o multipletes |
| <p>9 8 7 6</p> | Los protones 7 y 8 aparecen como dobles triplete (δ 4.5). Los metilos unidos a carbonos secundarios (δ 1.12, d, $J=7$ Hz), y los metilos ligados a carbonos terciarios (δ 0.7-1.2, s, $J=7$ Hz). |
| <p>Santamarina</p> <p>δ 5.30 (m) H δ 2.06 (d) H δ 3.93 (dc) H δ 5.38 (d) H δ 6.05 (d) H</p> | El protón vinílico aparece como un multiplete δ 5.5-5.7, si el espectro es de baja resolución. |

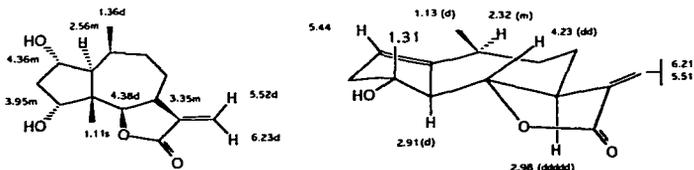
Los pseudoguaianólidos se diferencian de los Guayanólidos, debido al δ químico del grupo CH₃-15 como un singulete alrededor de δ 1.1.

Los esquemas 14 y 15 muestran algunos datos del espectro RMN¹H (60 MHz, CDCl₃) de dos sesquiterpenlactonas: apoludina y partenólida respectivamente. Los protones

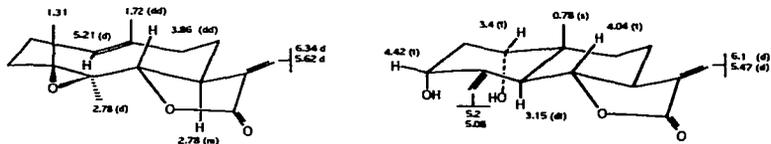
TESIS CON
CALLA DE ORIGEN



olefinicos del grupo metileno se observan como dobletes alrededor de δ 5.5-6:3, lo que constituye una característica clave para el reconocimiento de lactonas sesquiterpénicas con dicho grupo *exo*-metileno.



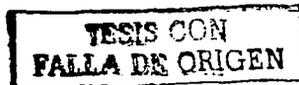
Esquema 14. Desplazamientos químicos en el espectro RMN¹H de la apoludina (60 MHz, CDCl₃) y la 1,2-dehidro-4 α -hidroxiguayanólida (400 MHz).

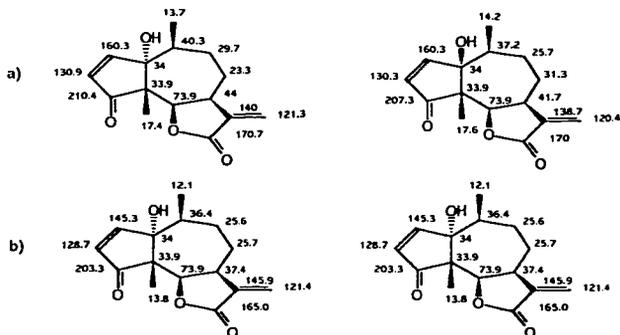


Esquema 15. Desplazamientos seleccionados del espectro RMN¹H de la partenólida y la ludovicina B (200 MHz, CDCl₃).

5.3. Espectroscopia RMN¹³C

La espectrometría de RMN C¹³ es muy utilizada para identificar estas sustancias. El esquema 16, muestra los valores característicos de desplazamientos en RMN¹³C de dos lactonas sesquiterpénicas.



Esquema 16. Desplazamientos químicos en RMN^{13}C de dos lactonas sesquiterpénicas⁶.

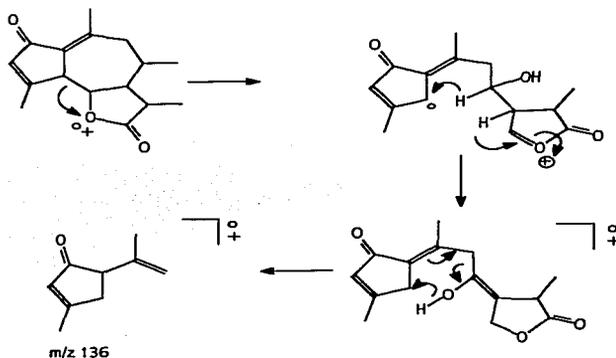
5.4. Espectroscopia de Masas (70 eV).

Debido a la gran diversidad estructural de las sesquiterpenlactonas encontradas, no se tienen todavía patrones de fragmentación bien definidos como en el caso de otros productos naturales.

Un estudio de alta resolución para la grosmicina (esquema 17) reveló que todos los iones de masa superior a 145 se originan por pérdidas consecutivas de fragmentos pequeños como agua, metilo, monóxido de carbono y etileno. Se observó también que el fragmento m/z 136 se origina por un mecanismo probable como el mostrado en el esquema 17. La retención de la carga por el anillo carbocíclico más pequeño se observa también en los espectros de otros guayanólidos más oxigenados; Canina, Rupina A, Rupina B como se muestra en el esquema 18 [67].

⁶ a) Valores hallados experimentalmente, b) valores informados en la literatura.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

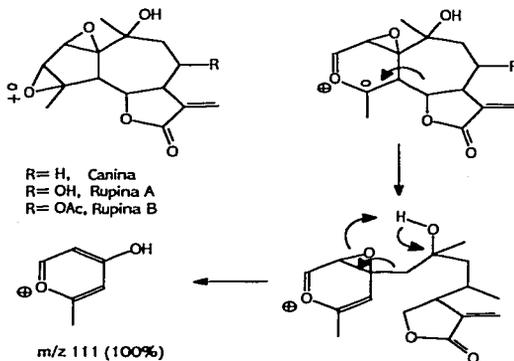


Esquema 17. Mecanismo de formación del ión m/z 136 de la grosmicina.

Se ha encontrado que generalmente la señal base es el ión molecular, siendo predominantes los fragmentos AM-18 si hay hidróxilos; la presencia de grupos acetilo se reconoce por el fragmento M-60. En la alfa santonina 120, el pico base es m/e 246 (100 %), M-15 (30 %) (pérdida de un metilo) y M-28 (11 %) pérdida de CO, probablemente procedente del grupo 3-oxo. El ión m/e 173 (M-73), correspondiente a $C_{12}H_{13}O^+$ es muy abundante en todas las santoninas (60-90 %) y corresponde a la pérdida del anillo de lactona junto con un protón. Un patrón de fragmentación similar se observa en la Artemisina, desoxigeigerina y achillina.

En la geigerina predomina m/e 151, $C_9H_{11}O_2^+$. Otra señal abundante (14-42 %) es M-101, tanto en las santoninas como en otros sistemas en que se puede perder CO y $CH_3CH=C(OH)O$. Los anillos con siete carbonos dan una señal a m/e 91 (30%) típica del ión tropilico $C_7H_7^+$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Esquema 18. Mecanismo de formación del ión m/z 111 en los espectros de masas de la canina y las rupinas A y B.

5.5. Ensayos de identidad de las lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénica pueden ser caracterizadas cualitativamente a partir de ensayos de identidad, entre los cuales se encuentran: el ensayo del hidroxamato férrico, el ensayo para lactonas insaturadas de Legal, el ensayo de Kedde, formación del espejo de plata por lactonas insaturadas con el reactivo de Tollens ($\text{AgNO}_3/\text{NaOH}/\text{Amoniac}$) [68].

6. Biotransformaciones .

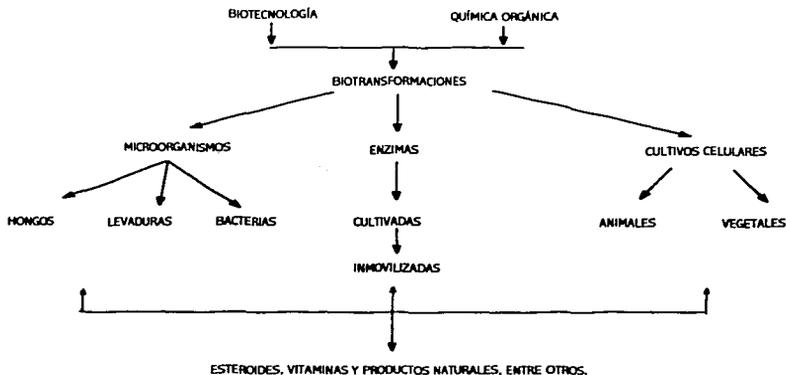
6.1. Generalidades.

Para comprender diversos procesos naturales actualmente el químico se vale de la biotecnología como herramienta, para mejorar los procedimientos químicos que antiguamente eran muy difícil o incluso imposibles de realizar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Las herramientas biológicas se utilizan en la elaboración de una amplia gama de productos tales como: aditivos alimenticios, compuestos farmacéuticos, productos de química fina, industria cervecera, industria vinícola, entre otras. Así como en el campo de la agricultura, bioquímica y microbiología. Estos procesos que involucran entidades biológicas se denominan biotransformaciones y principalmente se llevan a cabo con hongos y enzimas, aunque también suelen utilizarse en los procesos de bioconversión: bacterias, levaduras y diversos tipos de cultivos celulares como se muestra el esquema 19 [69].



Esquema 19. Principales sistemas biológicos empleados en los procesos de bioconversión.

El desarrollo de un proceso de bioconversión básicamente puede ser resumido por la ecuación (1).



⁷ El sustrato es la sustancia a biotransformar

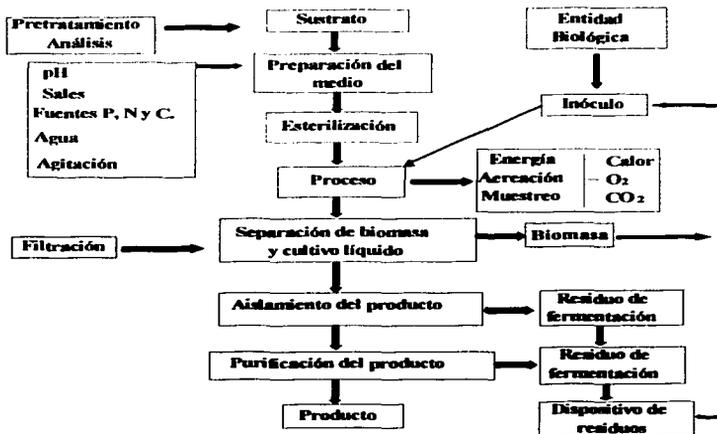
⁸ La entidad biológica puede ser: bacterias, hongos, levaduras, células, etc.

⁹ El producto a recobrar puede ser biomasa celular, un producto metabólico, o un producto transformado a partir de un sustrato

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



El proceso de ingeniería consiste en la manufacturación propia del mismo, el cual incluye el control de variables que darán la pauta para lograr su optimización. Básicamente este se formula en base a la ecuación anterior como se estudia en el esquema 20 [70].



Esquema 20. Metodología y controles de los procesos de bioconversión.

Para la formulación de un medio adecuado se deben tomar en cuenta las exigencias de la entidad biológica a emplear, básicamente el medio debe satisfacer los requerimientos elementales para el desarrollo de la biomasa celular, y la producción de metabolitos; además debe ser un adecuado soporte de energía para la biosíntesis y mantenimiento celular [71].

Para emplear un microorganismo como inóculo en un proceso de bioconversión se debe tener un control óptimo de su crecimiento (anexo II), ya que la viabilidad de los microorganismos, en cada fase va a depender de la optimización del proceso de bioconversión.



6.2. Enzimas

Las enzimas son proteínas de elevado peso molecular que tienen la función de catalizar reacciones biológicas. El mecanismo más sencillo de la acción enzimática, es conocido como el mecanismo de Michaelis-Menten, el cual involucra una especie reaccionante, llamada sustrato, que se une a un lugar activo de la enzima, con lo que resulta un complejo enzima-sustrato, el cual finalmente se disocia generando el producto y la enzima original, es decir se establece un mecanismo de reacción en dos etapas, las cuales son reversibles.

Las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de reacción que catalizan, como se indica en la tabla XII, en la cual se proporcionan algunos ejemplos de aquellas que se han usado en procesos de biocatálisis [72].

Tabla XII Clasificación de las enzimas con base en su actividad.

| Clasificación de las enzimas | |
|--|---|
| Categoría | enzimas usadas en síntesis |
| Oxireductasas Interconversión de cetonas con alcoholes, dobles enlaces con enlaces simples, etc. | levaduras, deshidrogenasas oxigenasas |
| Transferasas Transferencia de grupos acil, fosforil, azúcares, grupos amino, etc. | transaminasas, cinasas |
| Hidrolasas Hidrólisis de ésteres, peptidos, glicéridos, anhídridos, etc. | lipasas, esterasas, acilasas, proteasas, fosfatasas |
| Liasas Adición a dobles enlaces C=C, C=N, C=O, etc. | (C=O) aldolasas (C=C) aspartasas, fumarasas |
| Isomerasas Isomerizaciones, migración de enlaces C=C, <i>cis,trans</i> racemizaciones, etc. | fructosa-glucosa isomerasa |
| Ligasas formación de C-O, C-S, C-N, y enlaces fosforil | importantes en biología molecular |

Entre las diferencias en el uso de enzimas en procesos de bioconversión con respecto a los procesos de química clásica que emplean catalizadores, se puede afirmar que

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



las enzimas catalizan eficientemente las reacciones aumentando su velocidad en un factor de 10^4 - 10^{10} llegando a ser en ocasiones excedida hasta 10^{12} [73].

Otra diferencia del uso de enzimas, es que el empleo de estas puede realizarse en forma de cascada, esto es una mezcla de enzimas puede emplearse para realizar un proceso de bioconversión completo. El producto obtenido mediante el uso de una enzima puede usarlo otra enzima contenida en la misma mezcla para desarrollar otro proceso de bioconversión.

Las ventajas del uso de enzimas se encuentran en que actúan en diversas condiciones de temperatura, presión y pH, no llegando a ser cambios tan drásticos, dichas condiciones son muy cercanas a las ambientales.

Entre las propiedades de las enzimas se encuentra que son quimioselectivas, —actúan sobre un determinado grupo funcional sin afectar los otros grupos funcionales presentes en la molécula a biotransformar— regioselectivas —tienen la capacidad de distinguir entre grupos funcionales que químicamente están situados en otras regiones de la molécula o sustrato— y además son enantioselectivas —capaces de reconocer entre una mezcla racémica teniendo actividad sólo sobre una forma geométrica— [74].

Las reacciones que se efectúan con estos catalizadores biológicos destacan las siguientes:

- Reacciones de hidrólisis-síntesis: ésteres, amidas, lactonas, lactamas, éteres, anhídridos, epóxidos y nitrilos.
- Reacciones de adición-eliminación: agua, amonio, HCN.
- Reacciones de halogenación, alquilación-desalquilación, carboxilación-descarboxilación e isomerización.
- Reacciones de óxido reducción: alcanos, alquenos, compuestos aromáticos, alcoholes, aldehídos, cetonas, sulfuros, y sulfóxidos.
- Reacciones de Diels-Alder [75].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Entre las enzimas empleadas para llevar a cabo los procesos de bioconversión destacan las lipasas, ya que son activas catalíticamente en solventes orgánicos, además de que están implicadas en reacciones quirales, debido a su capacidad de resolver mezclas racémicas (estereoselectividad) y catalizar reacciones de esterificación y transesterificación.

Las lipasas son producidas por microorganismos entre los que se incluyen bacterias, hongos y levaduras, las fuentes tradicionales para la producción comercial son *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Aspergillus* spp y *Candida rugosa* siendo esta última de mayor interés comercial debido a su alto rendimiento, trabajan en un pH comprendido entre 8 y 9 a una temperatura de 30-40 °C y suele estimularse su actividad con la adición de iones Ca⁺⁺.

El uso de las enzimas inmovilizadas en química fina es un procedimiento sencillo, debido a que se emplea la enzima como si esta fuese un reactivo más en una síntesis, las ventajas de utilizar estos reactivos biológicos es que son de fácil separación [76], trabajan a temperaturas bajas en comparación con las vías químicas, los rendimientos son más altos, y requieren de menor número de pasos para llegar a la obtención de un compuesto de interés.

6.3 Hongos.

El empleo de hongos en los procesos de bioconversión es destacado debido a que estos microorganismos transforman un grupo sin afectar a otro que exista en la molécula y por otro lado la posibilidad de acceder a posiciones de la molécula que por vía química resultaría al menos problemático, el auge de la utilización de hongos para procesos de bioconversión surgió tras observarse la posibilidad de estos microorganismos de transformar los esteroides¹⁰ en compuestos de importancia biológica [77].



¹⁰ Los esteroides derivan químicamente del sistema perhidrociclopentanofenantreno y la mayoría de ellos poseen actividad biológica [78].



La meta de un proceso de biotransformación empleando hongos es la obtención de un producto por medio de sus rutas metabólicas con materiales biológicos y no biológicos, ya que se ha observado experimentalmente que dichos procesos son específicos, de alto rendimiento, de fácil separación, y suelen llevarse a cabo en condiciones menos drásticas de reacción.

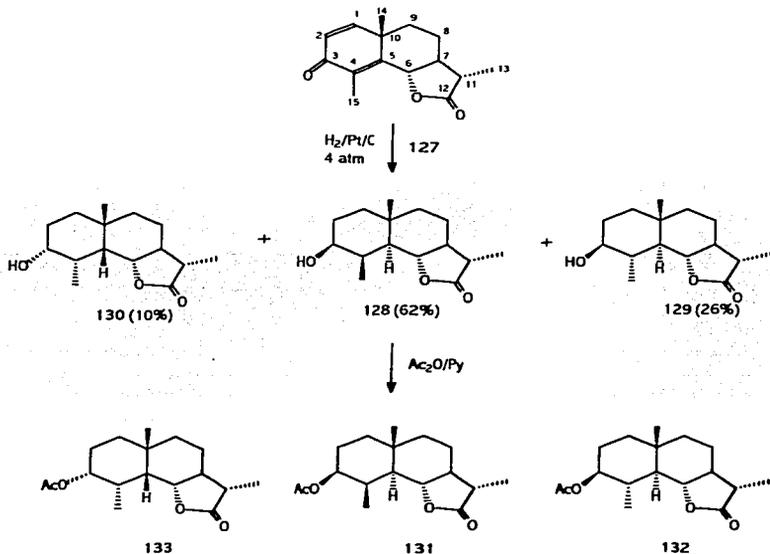
Para optimizar el proceso de bioconversión es recomendable el control de la biomasa a partir del cálculo de la cinética de crecimiento del hongo, para asegurar el tiempo o recolecta de la biomasa a emplear en la biotransformación, el inóculo adecuado, el acortamiento o inhibición de la fase lag, y los adecuados controles (mencionados en el esquema 20) que se han de llevar durante el proceso [79].

6.4. Biotransformaciones con enzimas.

En la literatura se ha informado que la hidrogenación catalítica de la α -santonina (127), genera tres compuestos hexahidroderivados **128** (62%), **129** (26%) y **130** (10%) como se muestra en el esquema 21. De su tratamiento químico con piridina y anhídrido acético se obtuvieron sus respectivos derivados acetilados **131**, **132**, y **133** observándose que la acetilación selectiva de estos compuestos por vía química no ocurre. Por lo tanto se propuso realizar la acetilación selectiva por medio de lipasas inmovilizadas¹¹, debido a su alta estereoselectividad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

¹¹ Las lipasas inmovilizadas son de fácil separación debido a que el soporte de inmovilización es insoluble en solventes orgánicos.



Esquema 21. Acetilación química de los productos de hidrogenación de la α -santonina.

Utilizando lipasas inmovilizadas de *Candida antártica* (CAL), *Páncreas porcino* (LPP), y *Mucor mihalei* (LMM), se realizó el estudio pertinente para la elección de las condiciones óptimas de la reacción de acetilación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XIII [80].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Tabla XIII. Ensayo para la elección de las condiciones de acetilación enzimática

| Enzima | Enzima/Sustrato | Tiempo (h) | 131 (%) | 132 (%) | 133 (%) |
|--------|-----------------|------------|---------|---------|---------|
| PPL | 2/1 | 4 | x | x | 60 |
| | 3.5/1 | 24 | x | x | 80 |
| | 5/1 | 72 | x | x | 100 |
| MML | 2/1 | 4 | x | x | 30 |
| | 3.5/1 | 24 | x | x | 80 |
| | 5/1 | 72 | x | x | 100 |
| CAL | 2/1 | 4 | x | 70 | 60 |
| | 3.5/1 | 24 | x | 95 | 90 |
| | 6/1 | 24 | x | 100 | 100 |

x: No detectado

Ninguna lipasa logró la acetilación del producto **128** (para dar **131**), pero existió completa acetilación de **130** (dando **133**) cuando la relación enzima sustrato es 5/1 (para MML y PPL) con un tiempo de reacción de 72 horas. El tratamiento de **128**, **129** y **130** con CAL (6/1 por 24 horas) logra sólo la acetilación de **129** y **130**, dando **132** y **133** y el producto **128** fue recuperado inalteradamente.

Conforme al estudio preliminar se estableció un procedimiento general que involucra como paso determinante la acetilación diastereoselectiva de la mezcla con PPL o MML y después con CAL para aislar e identificar los compuestos **128**, **129** y **130**, como se muestra en el esquema 22. Los derivados acetilados resultantes fueron separados por técnicas cromatográficas, y sus estructuras fueron deducidas por sus propiedades espectroscópicas observando que la acetilación selectiva de **129** y **130** generó los correspondientes derivados 3 β -acetoxi (**132** y **133**) y la separación inalterada de la 3 β -hidroxiudesmanólida **128**.

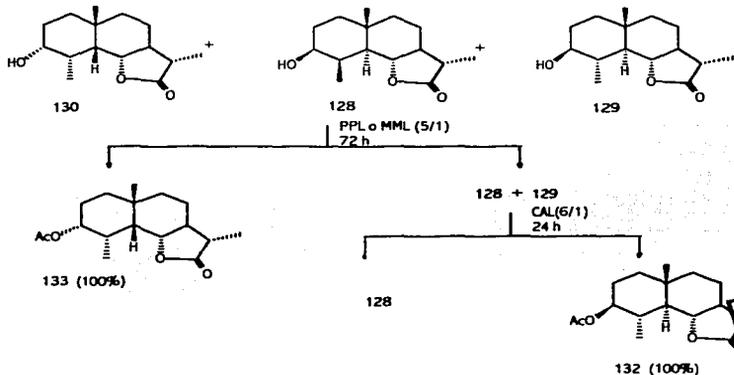
Por lo que PPL y MML en este tipo de sustrato muestran más preferencia hacia la acetilación en los 3 α -hidroxisesquiterpenólicas con conformación de *cis*-decalina, mientras que CAL muestra una gran selectividad hacia los productos con disposición H α -5 (*trans*-decalina) o H β -5 (*cis*-decalina), pero siempre con una configuración H β -4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



El producto 3β -hidroxi- $4\alpha,5\alpha,7\alpha$ - 11β - 4 -eudesman- 6α - 12 -olida **128**, fue reducido con LiAlH_4 para obtener el alcohol correspondiente (**134**), el cual produce el derivado triacetilado (**135**).

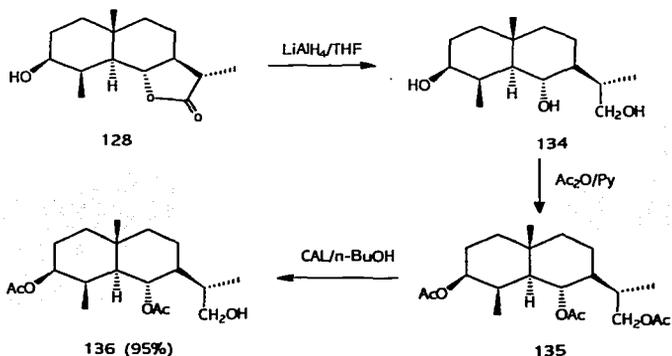
La desacetilación enzimática regioselectiva de **135** fue probada con diferentes disolventes (MeOH , dioxano y acetonitrilo) obteniéndose un rendimiento mayor de **136** (95%), empleando CAL, n-butanol como nucleófilo y acetonitrilo como disolvente, el sitio de desacetilación fue fácilmente establecido por comparación directa de RMN^{13}C y H^1 de los datos de **135** y **136** como se muestra en el esquema 23.



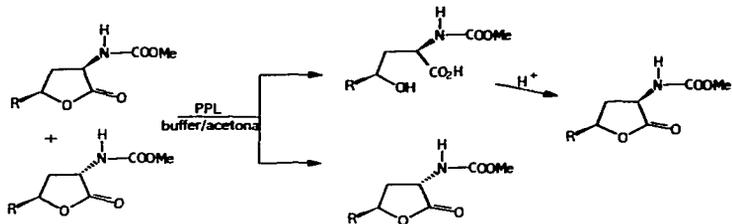
Esquema 22. Acetilación selectiva catalizada por lipasas de PPL, MML y CAL.

La PPL ha sido usada también, para la apertura de anillos γ -sustituidos α -amino lactonas de una manera enantioselectiva cuando se encuentran inmersas en su mezcla racémica. La separación del producto formado del sustrato sin hidrolizar aprovecha las propiedades de solubilidad y pH, la lactona que no reacciona se separa por medio de extracción con éter de la fase acuosa a pH 7.5 como se describe en el esquema 24.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



Esquema 23. Desacetilación regioselectiva por la enzima CAL.



Esquema 24. Apertura de anillos γ -sustituídos α -amino lactonas por PPL.

Hasta el momento las transformaciones de lactonas sesquiterpénicas a partir de rutas enzimáticas que involucran el uso de enzimas inmovilizadas está aún en comienzo debido a que sólo se han recabado escasos datos experimentales sobre este tipo de bioconversiones, pero las principales biotransformaciones informadas de este tipo de compuestos ha sido a

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

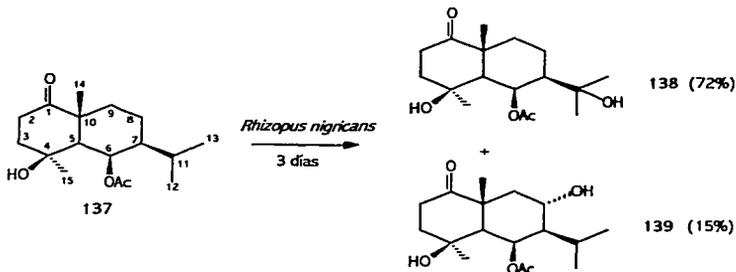


partir del uso de los hongos, lo cual conlleva a un interesante y amplio tema de investigación a fin de elucidar los cambios estructurales y la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas a partir de las enzimas que generan los microorganismos en cuestión.

6.5. Biotransformación de terpenos y lactonas sesquiterpénicas con hongos.

Las transformaciones microbianas de las lactonas sesquiterpénicas por los hongos, se han llevado a cabo principalmente con lactonas de esqueleto de eudesmano, debido a que este tipo de esqueletos son los más abundantes en la naturaleza, y además su química y procesos de biotransformación se encuentran ampliamente detallados en la literatura [81].

La síntesis de 6 β -eudesmanolidas (6 β -dendroserina) por derivados 11-hidroxi se lleva a cabo por medio del hongo *Rhizopus nigricans*. La transformación de 6 β -acetoxieudesmanona (137) por cultivo de *R. nigricans* proporciona un alto rendimiento (72%) del 11-hidroxi derivado como se muestra en el esquema 25.



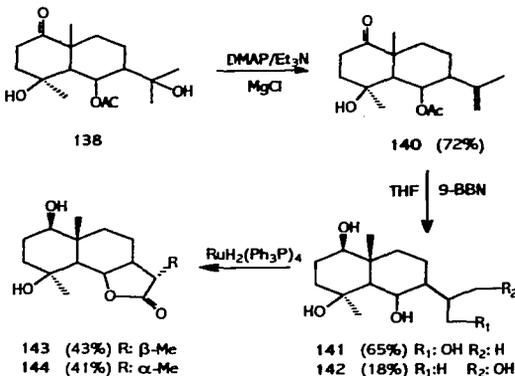
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esquema 25. Hidroxilación de *R. nigricans* sobre 6 β -acetoxieudesmanona.



La hidroxilación en C-11 por *R. nigricans* en **137** produce **138** (72%), el tratamiento posterior de **138** con DMAP (4-dimetilamino piridina), genera el producto de deshidratación **140** (72%), el cual es hidroxilado eficientemente con 9-BBN (9-borabicyclononano) para dar la mezcla de los 12-hidroxiderivados **141**, **142** de acuerdo al esquema 26.

La oxidación con $\text{RuH}_2(\text{Ph}_3\text{P})_4$ de (**141-142**) conlleva a la formación del anillo de la lactona para la obtención de las 6 β -eudesmanolidas [11(R) y 11(S)-6-epi-dendroserina]. Es aceptable que la formación de la lactona sesquiterpénica ocurre a través del grupo hidroxilo en C-12, el cual es formado vía epóxido o hidroperóxido. La posterior hidroxilación enzimática en C-6 o C-8 seguida por la lactonización rinde la correspondiente sesquiterpenóida.



Esquema 26. Obtención de 6 β -eudesmanolidas -dendroserina-

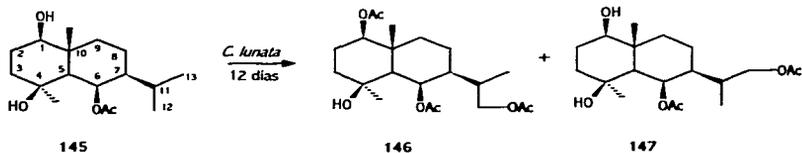
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La estereoselectividad fue observada con los derivados 11-(R)-12hidroxi **141** (65%) y en 11-(S)-tetrahidroxi **142** (18%) obtenidos de la biotransformación, de la misma manera



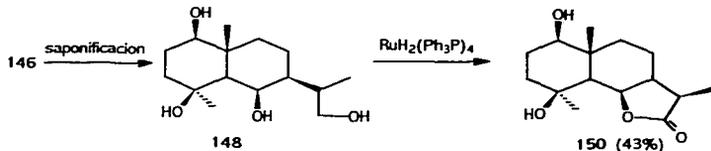
empleando *C. lunata* se aisló la correspondiente 6- β , 12-olida **150** (43%) y **151** (41%), tras la reducción con $\text{RuH}_2(\text{Ph}_3\text{P})_4$ de los epímeros tetrahidroxi **146** y **147** obtenidos.

La incubación de **145** (6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmanólida) con *C. lunata* por 12 días, genera una mezcla de metabolitos polares (23%), los cuales al acetilarlos químicamente generaron los triacetatos **146** (1 β , 6 β , 12-triacetoxi-4 β -hidroxiudesman-11(R)-anos, 51% de la mezcla polar) y **147** (1 β , 6 β , 12-triacetoxi-4 β -hidroxiudesman-11(S)-ano, 49% de la mezcla polar). La evidencia espectroscópica de los productos, indica que las hidroxilaciones ocurren en el C-12 y C-13, por lo que dichos productos acetilados son epímeros en C-11 como puede observarse en el esquema 27 [82].



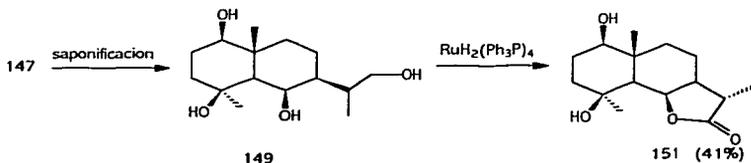
Esquema 27. Biotransformación de 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmanólida por *C. lunata*.

De la saponificación de los compuestos triacetilados **146** y **147** se obtuvieron **148** y **149**, los cuales al oxidarlos por separado con $\text{RuH}_2(\text{Ph}_3\text{P})_4$, se obtienen las lactonas **150** (43%) y **151** (41%) como se observa en el esquema 28.



Esquema 28. Productos de oxidación de la saponificación de **146** y **147**.

RECIBIDO CON
IMPRESION
A. M. DE ORIZABA



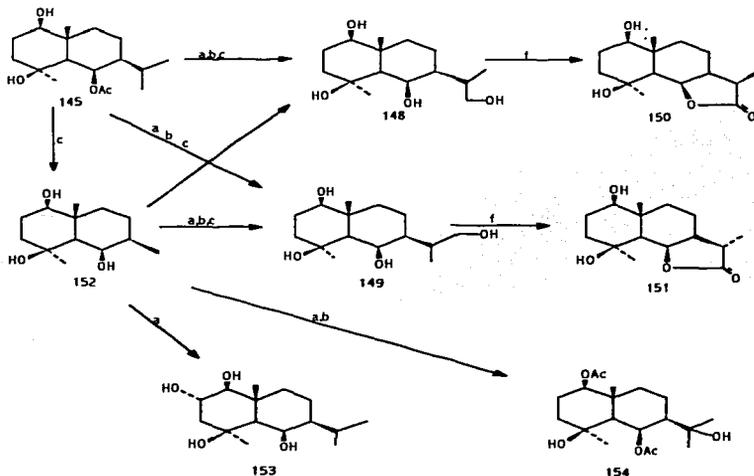
Esquema 28. (continuación). Productos de oxidación de la saponificación de 146 y 147.

La saponificación de 145 genera 152 (90%), el cual al incubarse por 12 días con *C. Lunata*, produce malos resultados en comparación con la incubación del producto 145 sin saponificar. El sustrato 152 fue recuperado inalterado en un 79%, y una pequeña cantidad de metabolitos polares (2%) de la cual se aisló el producto 153 y posteriormente a la acetilación se recuperaron tres productos más 154 (55%), 146 (24%) y 147 (21%).

El metabolito 153 mostró una nueva hidroxilación en C-2, que de acuerdo a datos espectroscópicos se ubicó en posición α (ecuatorial). La incubación de 153 produce un limitado rendimiento del compuesto hidroxilado en C-12, (148). Por otro lado, el producto 154, muestra un grupo hidroxilo en C-11, como se indica en el esquema 29.

La oxidación de 145 con el reactivo de Jones generó 155, el cuál fue incubado por 12 días con *C. lunata* obteniendo 155 (43%), 156 (42%) y una mezcla de metabolitos más polares (10 %). Esta última mezcla fue acetilada y se recuperó 157 (1 α ,12-diacetoxi-4 β ,6 β -dihidroxiudesm-11(R)-ano, 51% de la mezcla) y 158 (1 α ,12-diacetoxi-4 β ,6 β -dihidroxiudesm-11(S)-ano, 49 %). El metabolito 155 muestra un peso molecular de acuerdo con la reducción del grupo carbonilo en C-1, el cuál fue confirmado espectroscópicamente. La reducción del grupo carbonilo por el microorganismo normalmente da (S)-alcoholes. La reducción del grupo carbonilo es similar en eudesmanolidas y eudesmanos generando (1S)-alcohol. El nuevo grupo con orientación α en el C-1 produce un efecto γ , sin efecto en C-3 ($\Delta\delta=-4.83$) y C-5 ($\Delta\delta=-3.26$). Las reducciones producen (1S)-alcoholes, que es muy difícil obtenerlos por medios químicos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Esquema 29. Transformaciones químicas y biológicas del sustrato 152¹².

Los acetilados 157 y 158 parecen ser resultado de la reducción del sustrato 155 para dar α -hidroxi derivados, como es descrito para 156, y posteriormente la hidroxilación en C-12 para dar dos epimeros derivados en C-11. La saponificación de 157 y 158 dan respectivamente 159 y 160. Estos productos fueron comparados con los derivados 12-hidroxi 147 y 148, obtenidos por incubación de 145. Las evidencias espectroscópicas indican que el producto 159 es el epimero en C-1 de 148, los cuales tuvieron configuración (11-R). Por otro lado, el producto 160 fue el epimero en C-1 de 149 (11S). La configuración en C-11 fue confirmada por la formación de las respectivas lactonas 161

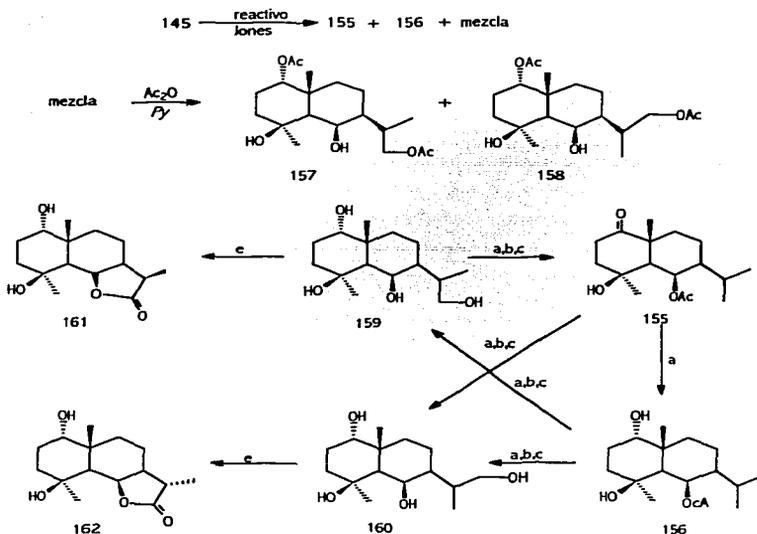
¹² a: *Curvularia lunata*; b: $\text{Ac}_2\text{O-Py}$; c: KOH alc ; d: H_2BNA ; e: reactivo de Jones; f: $\text{RuH}_2(\text{Ph}_3\text{P})_4$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



(63%) y **162** (63%) por oxidación con $\text{RuH}_2(\text{Ph}_3\text{P})_4$, con la misma configuración en C-11 descritas por las lactonas **150** y **151**.

El mejor rendimiento en las oxidaciones de **159** y **160** puede ser debido a la pequeña cantidad de acetona usada como aceptor de hidrógeno. El rendimiento obtenido de las lactonas **161** y **162** a partir de **155** (2.5% para *c/u*), fue duplicado al incubación el producto **156** por 12 días, la primera acción del microorganismo consistió en la reducción del grupo carbonilo del C-1, como se describe en el esquema 30 [83].



Esquema 30. Transformaciones químicas y biológicas de los productos de oxidación de **145**.¹³

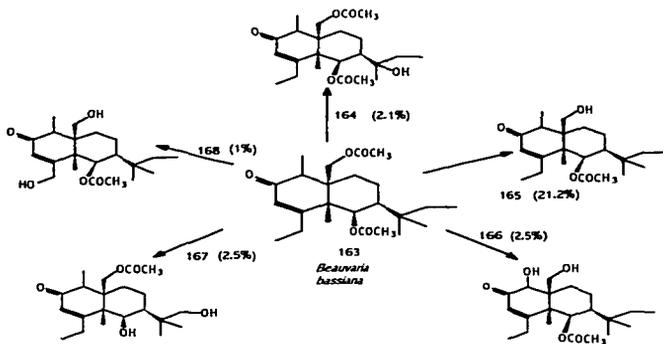
¹³ a: *Curvularia lunata*; b: Ac_2O - Py ; c: KOH alc; d: H_4BNa ; e: reactivo de Jones; f: $\text{RuH}_2(\text{Ph}_3\text{P})_4$.



De los resultados descritos se deduce que los compuestos del tipo 4 β -hidroxieudesmano son biotransformados mediante la hidroxilaci3n en C-12. Los sustratos con un grupo cetona en C-6 son m1s eficientes, aunque existe mayor selectividad en la producci3n de 12-hidroxil compuestos, con s3lo la configuraci3n 11-R, todos estos sustratos son 1tiles para la obtenci3n de 6 β -lactonas.

En la literatura se informa que una lactona sesquiterp3nica (Plectranona 163), con esqueleto *cis*-eudesmano, fue aislada de las partes aereas de *Plectranthus cylindraceus*, (planta usada como desinfectante y desodorante), para determinar sus metabolitos de biotransformaci3n por diversos tipos de hongos, destacando *B. bassiana*, por ser la cepa que gener3 la m1s eficiente metabolizaci3n de la Plectranona 163, dando cinco metabolitos (164-168), los metabolitos se aislaron por extracci3n con disolventes y se purificaron por cromatograf1a, adem1s de ser identificados por sus propiedades espectrosc3picas [84].

De acuerdo a los resultados, se observ3 que de la mezcla de metabolitos generada por la incubaci3n de Plectranona con *B. bassiana*, un metabolito mayoritario 165, fue capaz de hidrolizar el ester del C-17, como se muestra en el esquema 31.

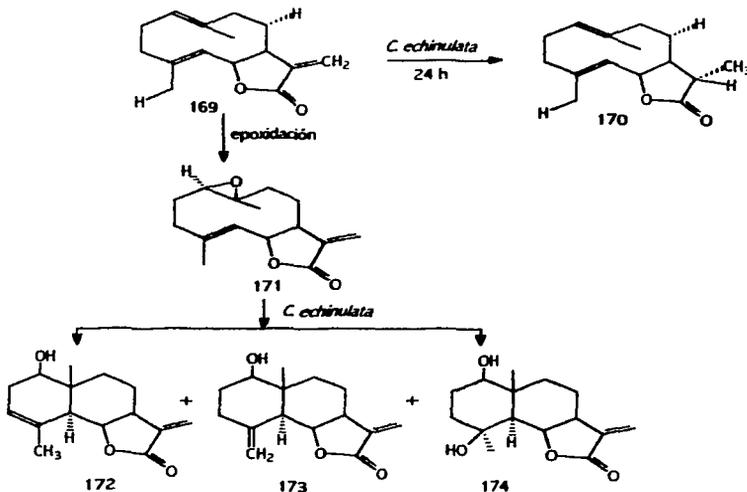


Esquema 31. Metabolitos obtenidos de plectranona con *B. bassiana*.

FALTA DE ORIGEN
NO TERS CON



Otra lactona sesquiterpénica (+)- costunolida 169 incubada con un cultivo de *C. echinulata* durante 24 h, rindió un producto de hidrogenación identificado como (+)-1 β ,13-dihidrocostonolida 170, observándose una inhibición del crecimiento, por lo que la transformación no fue completa. La incubación del compuesto 171 con un cultivo de 48 horas de *C. echinulata*, generó tres productos de oxidación, 1 β -hidroxieudesmanolida (+)-santamarina 172, (+)-reynosina 173 y (+)-1 β , hidroxiarbusculina A 174. La formación de los compuestos 172-174, puede ser explicada por la epoxidación de la costunolida 169 a 1 β ,10 α -epoxicostonolida 171, seguido de la apertura electrofílica del epóxido con un rearrreglo del esqueleto de eudesmanolida como probablemente ocurre en la biogénesis de las plantas de 1 β -hidroxieudesmanolidas como se muestra en el esquema 32 [85].



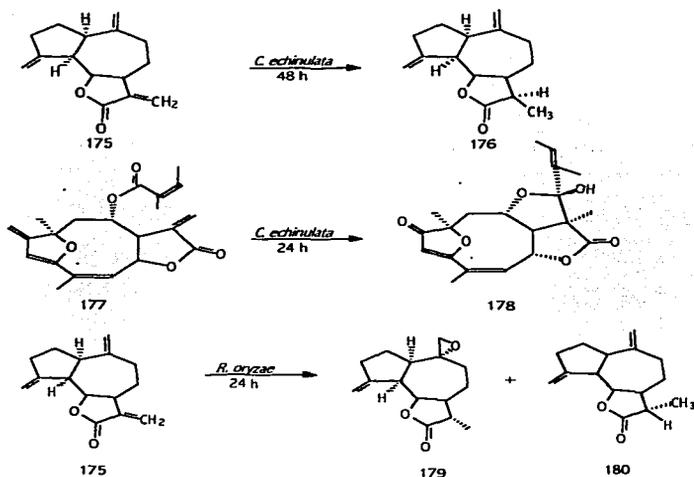
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esquema 32. Biotransformación de la costunólida con *C. echinulata*.



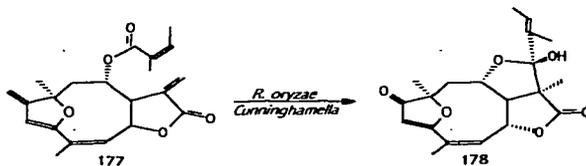
Al incubar la (-)-dihidrocostulactona **175** con un cultivo de 24 horas de *C. echinulata*, se observó una completa inhibición del crecimiento; sin embargo al incubar este compuesto con un cultivo de 48 horas generó un guayanolído (+)-11 α , 13-dihidrodehidrocostulactona **176**.

La incubación de lichnopholida **177** con *C. echinulata* (cultivo de 24 horas) genera (-)-16-(1-metil-1-propenil) cremantolanolida **178**. Asimismo la incubación de (-) dihidrocostulactona **175**, con un cultivo de 24 horas de *R. oryzae*, genera dos productos (+)-11 β ,13-dihidrodehidrocostulactona **179** y (+)-11 β ,13-dihidro-10,14-epoxydehidrocostulactona **180** y finalmente la transformación microbiana de lichnopholida **177**, generó el mismo compuesto obtenido por *C. echinulata* como se observa en el esquema 33.



Esquema 33. Biotransformación de lactonas sesquiterpénicas por *C. echinulata* y *R. oryzae*

TESIS CON
UN
DE

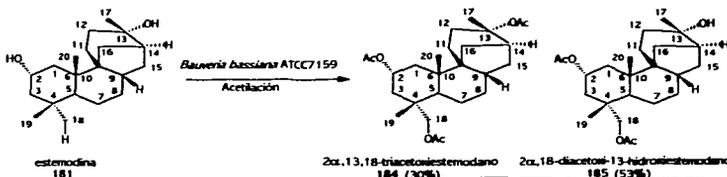


Esquema 33 (continuación). Biotransformación de lactonas sesquiterpénicas por *C. echinulata* y *R. oryzae*

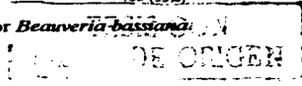
Las reacciones de epoxidación e hidrogenación de el doble enlace Δ^{11-13} son las transformaciones realizadas por *C. echinulata* y *R. oryzae*, en donde la reacción de hidrogenación regioselectiva generada por estos microorganismos es considerado un sistema de defensa a la actividad fungicida de estas lactonas sesquiterpénicas.

La planta *Stemodia maritima* conocida en Jamaica coloquialmente como potencia para el hombre débil, contiene diversos diterpenos entre los que destacan estemodina 181, estemodinona 182 y estemarina 183, los cuales han mostrado tener especial actividad antiviral [86].

La biotransformación de estemodina 181 se llevó a cabo con *B. bassiana* ATCC 7159, generando un producto, el cual fue acetilado por vía química observándose dos productos, los cuales fueron purificados por técnicas cromatográficas, como se muestra en el esquema 34, sus estructuras se elucidaron con base en sus propiedades espectroscópicas.

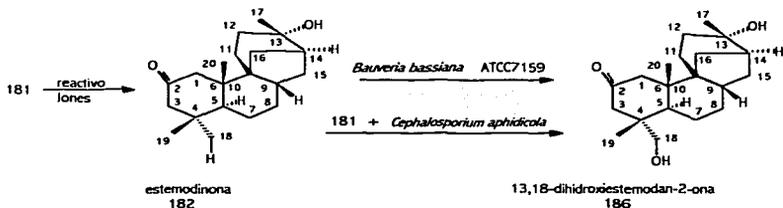


Esquema 34. Biotransformación de estemodina por *Beauveria bassiana*.



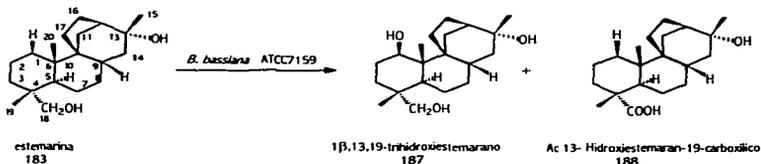


De acuerdo a los resultados obtenidos en el esquema se puede concluir que *B. bassiana* hidroxiló la posición C-18 de la estemodina **181**. Por otro lado, la estemodinona **185** fue obtenida con un alto rendimiento por medio de la oxidación de **181** con el reactivo de Jones, posteriormente la incubación con *B. bassiana*, por 14 días, permitió aislar a la 13,18-dihidroxiestemodan-2-ona **186**, la cual fue aislada de la fermentación de **181** con *Cephalosporium aphidicola* como se observa en el esquema 35.



Esquema 35. Hidroxilación de la estemodina por *B. bassiana* y *C. aphidicola*

La incubación de estemarina **183** con *B. bassiana* resultó en la formación de diversos productos, de los cuales sólo dos fueron obtenidos en la cantidad suficiente para poder ser caracterizados, 1 β ,13,19-trihidroxiestemarano **187** y el ácido 13-hidroxiestemarano-19-carboxílico **188**, como se observa en el esquema 36.



Esquema 36. Incubación de estemarina con *B. bassiana*.

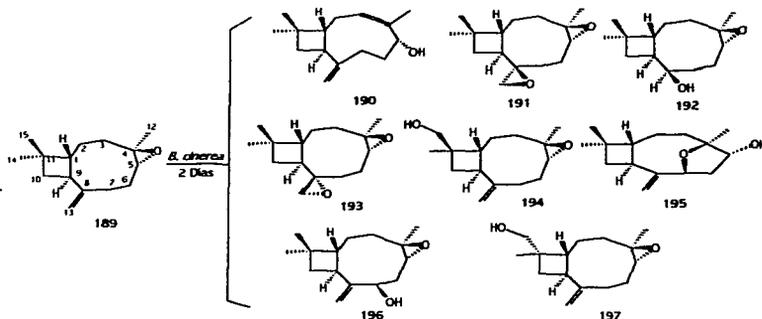
TESIS CON
DE ORIGEN



Más recientemente en la literatura se informa de nuevas biotransformaciones empleando un hongo patógeno (*Botrytis cinerea*), para una gran variedad de plantas comestibles (lechuga, tomates y uvas, entre otras), produciendo como principales metabolitos sustancias con esqueleto de cariofileno (botridial); las cuales juegan un papel importante en su patogenicidad.

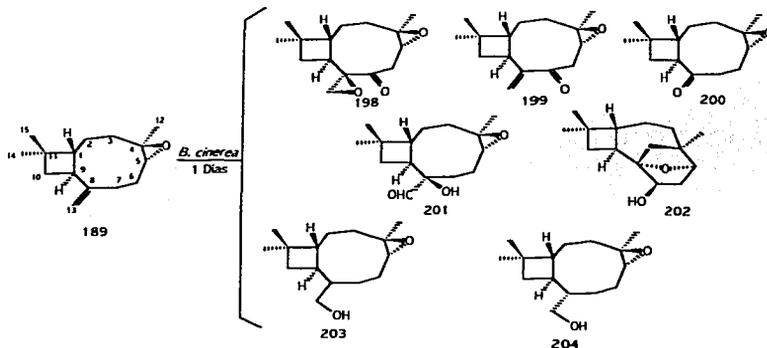
Los estudios biosintéticos sugieren que la formación de estos compuestos derivan del farnesilpirofosfato, con la formación y ciclización del catión cariofileno. La biotransformación de óxido de cariofileno por *B. cinerea* en un tiempo de cultivo de dos días, produce diversos productos oxigenados como se ilustra en el esquema 37.

En un segundo proceso de biotransformación se separó la biomasa y se procedió a utilizarla para incubar al sustrato 189 en un medio sin glucosa durante 24 horas, obteniéndose algunos de los metabolitos del proceso anterior (191, 193-197), además los metabolitos descritos en el esquema 38.



Esquema 37. Productos de la biotransformación de óxido de cariofileno con *Botrytis cinerea* en un cultivo de 2 días.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Esquema 38. Productos de la biotransformación de óxido de cariofileno con *Botrytis cinerea*.

La mejor ruta de biotransformación involucra la epoxidación estereoselectiva en C-8 y C-13 y la hidroxilación en C-7, la presencia de kobusona (199) y el aldehído (201) en el medio de fermentación indica que otra ruta de biotransformación procedió de la hidrólisis del 8, 13-epóxido y además un proceso de oxidación [87].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

58-A

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Actualmente existe un gran interés económico, agroindustrial y farmacológico por emplear enzimas y microorganismos en la obtención y síntesis de productos químicos; ya que su estereoespecificidad los hace una herramienta muy útil para el químico orgánico. Sin embargo, existe una descripción limitada acerca del comportamiento de los sistemas enzimáticos de un determinado microorganismo sobre la estructura de un sustrato, los cuales al transformar su estructura modifican su actividad biológica.

Por otro lado, las lactonas sesquiterpénicas han sido objeto de numerosos estudios biológicos, donde destacan por su actividad antimicrobiana, antitumoral, antiparasitaria y antifúngica entre otras, debido a la presencia del grupo carbonilo α , β -insaturado.

Por lo tanto, el presente estudio va encaminado al aislamiento y elucidación estructural de los productos de biotransformación con un cultivo de células de zanahoria, lipasas inmovilizadas y los procedentes de la acción microbiana de los hongos filamentosos: *Aspergillus niger* y *Aspergillus ochraceus* además de la levadura *Beauveria bassiana*, sobre la ridentina y desacetilconfertiflorina con la finalidad de obtener compuestos químicos novedosos que puedan ser factibles de ser evaluados biológicamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

59-A

IV. OBJETIVOS.

... CON
... ORIGEN

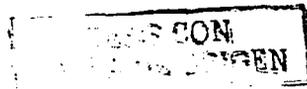


Objetivo general.

Realizar las transformaciones químicas y biológicas de la ridentina y desacetilconfertiflorina, lactonas sesquiterpénicas aisladas de las plantas medicinales mexicanas, *A. ludoviciana ssp mexicana* y *A. confertiflora* respectivamente, con la finalidad de obtener compuestos químicamente novedosos que puedan ser factibles de ser evaluados biológicamente.

Objetivos específicos.

- a) Realizar la investigación bibliográfica sobre biotransformaciones enzimáticas y con microorganismos de lactonas sesquiterpénicas.
- b) Realizar la investigación bibliográfica sobre la extracción, aislamiento, caracterización y propiedades biológicas de lactonas sesquiterpénicas.
- c) Purificación de la ridentina a partir de las fracciones del extracto etanólico y diclorometánico de *A. ludoviciana ssp mexicana* (colectada en San Rafael Tlalmanalco y Milpa Alta respectivamente).
- d) Purificación de la desacetilconfertiflorina a partir de las fracciones del extracto diclorometánico de *A. confertiflora*.
- e) Realizar la acetilación química de la ridentina.
- f) Realizar la acetilación enzimática de la ridentina con lipasas inmovilizadas.
- g) Determinar el tiempo óptimo del proceso de bioconversión, a partir de la curva de crecimiento del microorganismo (peso húmedo) y fuentes de carbono (técnica del DNS).
- h) Realizar la biotransformación de la ridentina con hongos filamentosos.
 - i) Realizar la biotransformación de la desacetilconfertiflorina con hongos filamentosos
 - j) Separar y purificar los metabolitos obtenidos en los procesos de bioconversión.
 - k) Aplicar las técnicas espectrométricas y espectroscópicas, en la caracterización e identificación de los productos de biotransformación.



60-A

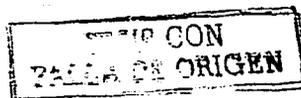
V. HIPÓTESIS.

IMPRESO CON
MATERIA ORIGIN



Las lactonas sesquiterpénicas son un grupo de compuestos muy importantes debido a su amplia gama de propiedades biológicas que presentan de acuerdo a su estructura molecular, específicamente por el anillo α -metilen- γ -lactona y su diversidad en cuanto a su grado de funcionalidad.

Entonces, por medio de los procesos de bioconversión con hongos filamentosos, lipasas inmovilizadas y un cultivo de células de zanahoria se obtendrán variaciones estructurales en la ridentina —germacranólido— y en la desacetilconfertiflorina —pseudoguayanólido— generando productos novedosos con probable actividad biológica.



61-A

VI. PARTE EXPERIMENTAL.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



1. Material.

1.1. Material vegetal.

- *Artemisia ludoviciana* ssp mexicana silvestre
- *Ambrosia confertiflora* silvestre

1.2 Material para la extracción, purificación y elucidación estructural de la ridentina y de la desacetilconfertiflorina, así como de sus productos de biotransformación.

1.2.1 Material de vidrio.

- Matraces Erlenmeyer de 50, 125 y 250 mL
- Matraces redondos de 100, 250 y 500 mL
- Matraces kitazato de 125 mL, 250 y 500 mL
- Frascos viales de 5 y 10 mL
- Probetas graduadas de 10, 50 y 100 mL
- Embudos de tallo corto
- Camaras de elución para cromatofolios de diferentes tamaños
- Embudo Hirsch de porcelana
- Placa de toque de porcelana
- Columnas cromatográficas de diferentes dimensiones
- Equipo para destilación simple, fraccionada y a presión reducida
- Campanas de vacío

1.2.2 Sustancias.

- Silica gel 60 GF para CCF (Merck)
- Sulfato de sodio anhidro (Aldrich)
- Celita 545 (Merck)
- Sulfato cérico amónico (Baker)
- Piridina
- Ácido *meta*-cloroperbenzoico
- Anhídrido acético
- Dimetilsulfóxido
- Ácido sulfúrico (Baker)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



1.2.3 Disolventes.

- Acetato de etilo, grado técnico¹⁴
- Acetona, grado técnico¹⁴ (Merck)
- n-Hexano, grado técnico¹⁴ (Merck)
- Etanol, , grado técnico¹⁴ (Merck)
- Metanol, grado técnico¹⁴ (Merck)
- Cloroformo, grado analítico (Merck)
- Diclorometano, grado técnico¹⁴ (Merck)
- Éter etílico, grado analítico (Merck)
- Éter isopropílico, grado analítico (Merck)
- Agua destilada.

1.2.4 Material especial.

- Cromatofolios AL TLC silica gel 60 F₂₅₄ (Merck)
- Cromatofolios de sílica gel 60 A*

1.2.5 Equipo.

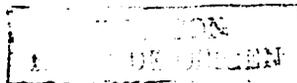
- Balanza granataria OHAUS 700-800
- Rotavapor Yamato RE47
- Balanza semianalítica OHAUS E 400
- Balanza analítica Ainsworth 100 A
- Baño de agua Yamato BM-42
- Lámpara UV 254/366 nm mineralight
- Aparato Fisher Johns
- Espectrofotómetro de IR Perkin-Elmer modelo 283 y 681
- Espectrofotómetro Nicolet FT-IR 5 SX
- Espectrofotómetro de masas Hewlett Packard 5985 GC/MS System 70 e V
- Espectrofotómetro de RMN Varian FT VxR-300 S

1.3 Material para el proceso de biotransformación.

1.3.1 Material de vidrio.

- Matraces Erlenmeyer de 25, 50 y 250 mL
- Matraces redondos de 100, 250 y 500 mL
- Probetas graduadas de 10, 50 y 100 mL
- Cámaras de elución para cromatofolios de diferentes tamaños
- Tubos capilares
- Tubos de ensaye

¹⁴ El disolvente fue purificado mediante destilación fraccionada.





1.3.2 Material biológico.

Cepas de los siguientes microorganismos:

- *Aspergillus niger* ATCC
- *Aspergillus Ochraceus* ATCC
- *Beauveria Bassiana* ATCC
- Kit de lipasas inmovilizadas (Aldrich)

1.3.3 Sustancias.

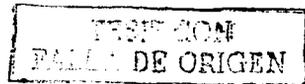
- Acetato de vinilo
- Glucosa anhidra
- Peptona
- Extracto de carne
- Extracto de levadura
- Ácido dinitrosalicílico
- Fenol
- Tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle)
- Nitrito de sodio
- Agar PDA

1.3.4 Equipo.

- Agitador rotatorio perkin-Elmer
- Campana de flujo laminar
- Balanza semianalítica OHAUS E 400
- Balanza analítica Ainsworth 100 A
- Balanza granataria
- Autoclave
- Estufa de incubación
- Centrifuga
- Espectrofotómetro Nicolet FT-IR 5 SX

1.3.5 Material especial.

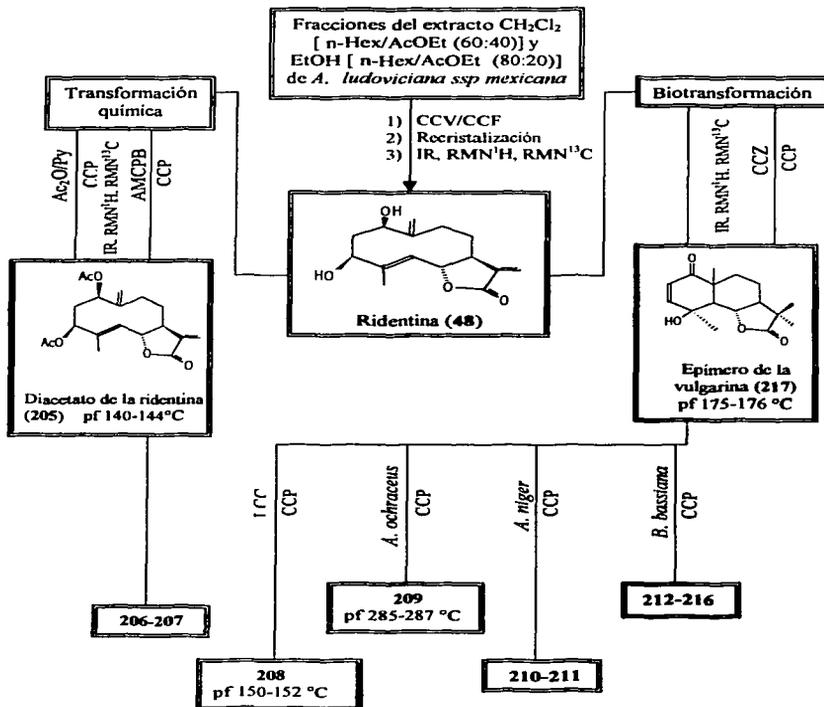
- Tijeras
- Cutter
- Gasa
- Algodón
- Papel de estraza





2. Metodología.

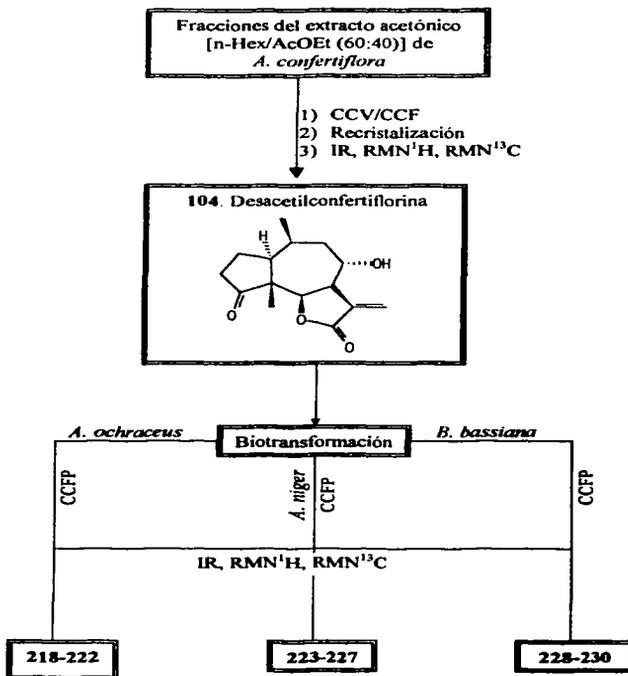
2.1 Diagrama de flujo para la purificación y biotransformación de la ridentina.



TESIS CON
PALLA DE ORIGEN



2.2 Diagrama de flujo para la purificación y biotransformación de la desacetilconfertiflorina



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



3. Colecta y diferenciación cromatográfica de las partes aéreas del material vegetal.

El material vegetal de *Artemisia ludoviciana* ssp *mexicana*, fue colectado en septiembre de 1996, a 50 metros al norte de la carretera la Cruz-Loma Bonita, San Pedro Actopan, Milpa Alta, D.F., por el Q.F.B. José Luis Balderas y el M en C. Arturo Cano, mientras que la identificación fue realizada por el Biólogo Oswaldo Téllez del Instituto de Biología de la U.N.A.M.

El material vegetal de *Ambrosia confertiflora*, fue colectado en septiembre de 1997, en la carretera Zacatecas-Durango Km 12.5 al norte de la ciudad de Zacatecas sobre la carretera No. 45, por el M en C. Arturo Cano, e identificado por el biólogo Esteban Martínez del Instituto de Biología de la U.N.A.M.

3.1. Purificación de la ridentina.

De las fracciones obtenidas del estudio químico de los extractos etanólico [*n*-hex/*AcOEt* (80:20)] y diclorometánico [*n*-hex/*AcOEt* (60:40-40:60)] de *A. ludoviciana* ssp *mexicana* (Milpa Alta y San Rafael Tlalmanalco) [88], que presentaban como constituyente a la ridentina fueron purificadas por CCV y CCF preparativa.

La ridentina obtenida, se purificó por cristalización por par de disolventes ($\text{Me}_2\text{CO}:\text{AcOEt}$, $\text{EtOH}:\text{AcOEt}$) (1.85 g¹⁵, 0.061 %), y fue caracterizada con base en sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas.

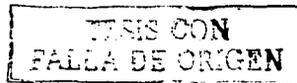
pf: 235-236 °C

Soluble en Me_2CO y EtOH caliente, insoluble en *n*-hexano.

[α]_D²⁵ = + 82.50 (c. 1.60; MeOH)

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$, espectro 1; ridentina **48**): 3334, 3073, 2944, 2878, 1868, 1763, 1666, 1639, 1445, 1403, 1306, 1264, 1156, 1504, 893, 813, 771, 703, 590.

¹⁵ Se partió de 3935.4 g de partes aéreas de la planta seca.





RMN¹H (CDCl₃, TMS, espectro 2; ridentina **48**): δ 5.97 (1H, *d*, J=3 Hz, H-13b), δ 5.54 (1H, *d*, J=3 Hz, H-13a), δ 5.28 (1H, *d*, J=10 Hz, H-5), δ 5.03 (1H, *s.a.*, W_{1/2}=3, H-14 b), δ 4.70 (1H, *s.a.*, W_{1/2}=3, H-14 a), δ 4.48 (1H, *t*, J=10 Hz, H-6), δ 4.05 (1H, *dd*, J=9, 4 Hz, H-1), δ 3.76 (1H, *dd*, J=9, 4 Hz, H-3), δ 2.79 (1H, *dddd*, J=10, 3 Hz, H-7), δ 2.38 (1H, *ddd*, J=14, 9, 3 Hz, H-9 b), δ 2.23 (1H, *ddd*, J=14, 9, 3 Hz, H-9 a), δ 1.89 (1H, *ddd*, J=14, 9, 4 Hz, H-2a), δ 1.82 (1H, *ddd*, J=14, 9, 4 Hz, H-2b), δ 1.89 (1H, *m*, J=14, 9, 3 Hz, H-8b), δ 1.52 (1H, *ddd*, J=14, 10, 9, 3 Hz, H-8a) δ 1.58 (1H, *d*, J=1.5 Hz, CH₃-15).

RMN¹³C (CDCl₃, TMS, espectro 3; ridentina **48**): δ 73.64 (C-1), δ 41.46 (C-2), δ 73.75 (C-3), δ 147.26 (C-4), δ 120.46 (C-5), δ 79.59 (C-6), δ 43.30 (C-7), δ 25.75 (C-8), δ 30.45 (C-9), δ 144.86 (C-10), δ 140.08 (C-11), δ 169.31 (C-12), δ 117.56 (C-13), δ 109.60 (C-14), δ 11.2 (C-15).

EM (IE). 264 (M⁺; 0.10), 219(10), 175(32), 149(40), 105(48), 91(100), 79(50), 53(66), 43(60), 41(55).

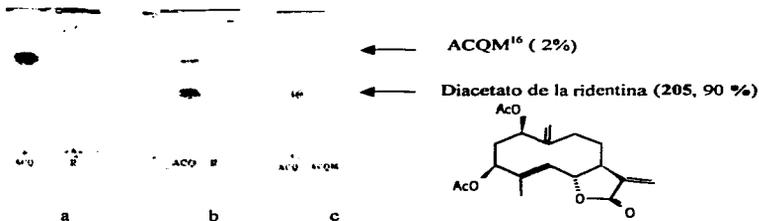
3.2. Acetilación química de la ridentina.

Se disolvieron 100 mg de **48** en 23 mL de CHCl₃ y se hicieron reaccionar con 3 mL de Py y 3 mL de Ac₂O a reflujo durante 28 h, el curso de la reacción se siguió por CCF, como se observa en el esquema 39 a .

Una vez concluida la reacción (esquema 39 b) se adicionó 1 g de hielo picado, y se procedió a la separación de los componentes mayoritarios, para ello la fase orgánica se lavó con HCl (10%, 3 x 10 mL) para eliminar la Py, posteriormente se trató con una solución saturada de NaHCO₃ (3 x 10 mL) y finalmente se lavó con agua destilada (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se procedió a la eliminación del disolvente por medio del rotavapor.

La separación de los productos de interés se realizó por CCP [n-hex/AcOEt (55:45)], como se muestra en el esquema 39 c.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Esquema 39. CCF [n-hex/AcOEt (55:45)] de la reacción de acetilación de la ridentina¹⁷.

El compuesto mayoritario con $R_f = 0.66$ (n-hex/AcOEt (55:45)) corresponde al diacetato de la ridentina (205).

pE: 140-144 °C

Soluble en CH_2Cl_2 , CHCl_3 y Me_2CO

IR ν (cm^{-1} , espectro 4; diacetato de la ridentina 205): 2937, 2858, 1763, 1738, 1670, 1448, 1373, 1303, 1140, 1027, 976, 912.

RMN^1H (CDCl_3 , TMS, espectro 5; diacetato de la ridentina 205): δ 6.20 (1H, *d*, $J=3.6$ Hz, H-13b), δ 5.52 (1H, *d*, $J=9.6$ Hz, H-13a), δ 5.47 (1H, *d*, $J=3$ Hz, H-5), δ 5.31 (1H, *dd*, $J=2.7, 1.5$ Hz, H-1), δ 5.27 (1H, *dd*, $J=4.2$ Hz, H-3), δ 5.1 (1H, *s.a.*, $W_{1/2}=3$, H-14 b), δ 5.05 (1H, *s.a.*, $W_{1/2}=3$, H-14 a), δ 4.48 (1H, *t*, $J=9.9$ Hz, H-6), δ 2.77 (1H, *dddd*, $J=10, 3$ Hz, H-7), δ 2.57 (1H, *ddd*, $J=14, 9, 3$ Hz, H-9 b), δ 2.23 (1H, *ddd*, $J=14, 9, 3$ Hz, H-9 a), δ 1.89 (1H, *ddd*, $J=14, 9, 4$ Hz, H-2a), 1.89 (1H, *m*, $J=14, 9, 3$ Hz, H-8b), δ 1.82 (1H, *ddd*, $J=14, 9, 4$ Hz, H-2b), δ 1.52 (1H, *ddd*, $J=14, 10, 9, 3$ Hz, H-8a) δ 1.58 (1H, *d*, $J=1.5$ Hz, CH_3 -15). δ 2.06 (3H, *s*, CH_3CO), δ 1.97 (3H, *s*, CH_3CO).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

¹⁶ Producto de acetilación química de la ridentina compuesto menos polar

¹⁷ a: seguimiento de la reacción; b: fin de reacción (ausencia de ridentina); c: separación por CCF preparativa



RMN ^{13}C (CDCl_3 , TMS, espectro 6; diacetato de la ridentina **205**). δ 75.4 (C-1), δ 35.8 (C-2), δ 75.6 (C-3), δ 142.7 (C-4), δ 124.2 (C-5), δ 79.5 (C-6), δ 48.5 (C-7), δ 26.1 (C-8), δ 29.6 (C-9), δ 145.9 (C-10), δ 139.4 (C-11), δ 169.5 (C-12), δ 110.9 (C-13), δ 114.3 (C-14), δ 12.4 (C-15), δ 21.1 (CH_3CO), δ 21.9 (CH_3CO).

El compuesto de menor polaridad (ACQM $R_f = 0.84$, n-hex/AcOEt (55:45)) se obtuvo en bajo rendimiento (2%), por lo cual sólo se enlistan sus datos de IR.

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$, espectro 7; producto menos polar de la reacción de acetilación de la ridentina (ACQM) 3695, 2959, 2932, 2870, 2853, 1754, 1602, 1463, 1376, 1168, 1039.

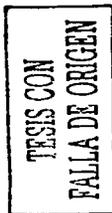
3.3. Acetilación enzimática de la ridentina.

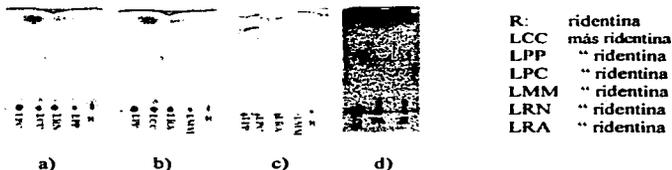
En cuatro matraces Erlenmeyer de 25 mL, se disolvieron 10 mg de **48** en 17 mL CHCl_3 por cada matraz, posteriormente se adicionaron 20, 40 y 60 mg de lipasa inmovilizada de *Candida cylindracea*¹⁸ respectivamente, finalmente se vertieron 0.5 mL de acetato de vinilo (AV) a cada matraz.

Las mezclas de reacción se colocaron en un sistema con agitación rotatoria a 180 rpm, y se siguió el curso de reacción por CCF. Una vez finalizada la reacción (76 h), se eliminó la enzima por filtración a vacío. De la mezcla de reacción se separaron por CCF preparativa **48** y el producto de acetilación **208** ($R_f = 0.60$ [n-hex/AcOEt (60:40)]), como se observa en el esquema 40.

El procedimiento descrito anteriormente, se siguió para las siguientes enzimas: lipasa de *Pseudomonas cepacea* (LPC), lipasa de *Candida antártica* (LCA), y lipasa de *Páncreas porcino* (LPP), las cuales no lograron acetilar a **48**, como se observa en el esquema 40.

¹⁸ Las condiciones de reacción con LCC se establecieron de acuerdo a un previo ensayo de reacción de esta enzima con moléculas menos complejas tales como el mentol, el isomentol, y el *ent*-kaurano, así como con ridentina.





Esquema 40. Reacción de acetilación de ridentina con lipasas¹⁹, mezcla de elusión [AcOEt/n-Hex (40:60)].

El producto de acetilación de ridentina con la enzima LCC, se recrystalizó con CHCl_3 para determinar sus propiedades físicas y debido a su bajo rendimiento (1.43 %) sólo se enlistan sus datos de IR

pf 150-152 °C.

Soluble en CH_2Cl_2 , CHCl_3 , Me_2CO

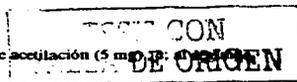
IR ν (cm^{-1} , espectro 8; 208): 2937, 2858, 1763, 1738, 1670, 1448, 1373, 1303, 1140, 1027, 976, 912.

3.4. Epoxidación de la ridentina.

Se disolvieron 100 mg de **48** en la mínima cantidad de CHCl_3 (25 mL), con agitación mecánica, en un matraz erlenmeyer de 50 mL, a temperatura ambiente, una vez disuelta la ridentina, se agregaron 100 mg de ácido *meta*-cloroperbenzoico (AMCPB) y el matraz de reacción se colocó dentro de un baño de hielo con sal (-5°C).

El curso de la reacción fue seguido por medio de CCF [AcOEt (100%)], después de aproximadamente 48 horas de reacción, se procedió a detener la reacción, adicionando 1 g de hielo picado, al término de la fusión del hielo se colocó la mezcla de reacción en un

¹⁹ Las placas a y b corresponden a la primera prueba de la reacción de acetilación (5 mg), a la segunda prueba (10 mg) y d; al cuarto ensayo de la reacción (40 mg).





embudo de separación y se realizaron extracciones con CHCl_3 (3 x 5 mL), la fase orgánica obtenida se lavó (2 x 10 mL) con bisulfito de sodio al 10 %, para eliminar el exceso de AMCPB, posteriormente se procedió a lavar la fase orgánica (2 x 10 mL) con bicarbonato de sodio al 10 %.

Finalmente, la fase orgánica se lavó dos veces con agua, y se procedió a secarla con Na_2SO_4 anhidro, la eliminación del exceso de disolvente se realizó por destilación a presión reducida. La mezcla de productos se purificó por CCF preparativa [AcOEt/n-Hex (70:30) dos veces], como se observa en el esquema 41; obteniéndose **206** ($R_f=0.3$) y **207** ($R_f= 0.63$) en muy bajo rendimiento (2.1 % y 1.32 %) por lo cual sólo se enlistan sus datos de IR.



R: ridentina

ER1: Epoxido de ridentina, producto más polar (**206**)

ER2: Epoxido de ridentina, producto menos polar (**207**)

Esquema 41. Epoxidación de ridentina, mezcla de elusión [AcOEt/n-Hex (70:30)].

IR ν (cm^{-1} , espectro 9; **206**): 3693, 3606, 2927, 2855, 1795, 1752, 1602, 1459, 1379, 1152, 1042, 959.

IR ν (cm^{-1} , espectro 10; **207**): 3693, 3602, 2928, 2855, 1793, 1727, 1602, 1454, 1380, 1175, 1706, 1019, 958.

3.5. Purificación de la desacetilconfertiflorina

De las fracciones obtenidas del estudio químico del extracto Me_2CO de *A. confertiflora* [n-hex/ AcOEt (60:40)] [89], se procedió a la purificación por técnicas cromatográficas (CCV y CCF) de la desacetilconfertiflorina **104**.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Posteriormente, **104** fue purificada por cristalización con el par de disolventes (AcOEt/n-hex) obteniendo 6 g (0.55%)²⁰ y determinando sus propiedades físicas, así como sus constantes espectroscópicas para poder llegar a su identificación.

pf 209-210 °C

soluble en AcOEt, EtOH, Me₂CO calientes

IR ν (cm⁻¹, espectro 11; desacetilconfertiflorina **104**): 3608, 2968, 2933, 2887, 1764, 1743, 1658, 1471, 1406, 1391, 1328, 1275, 1163, 1141, 1112, 1062, 1017, 986, 965.

RMN¹H (CDCl₃, TMS, espectro 12; desacetilconfertiflorina **104**): δ 6.35 (1H, *dd*, J= 0.5, 3 Hz, H-13b), δ 5.95 (1H, *dd*, J=1, 2.5 Hz, H-13a), δ 4.61 (1H, *d*, J=8.5 Hz, H-6), δ 2.46 (1H, *dddd*, J=9.5, 9.3, 8.5 Hz, H-10), δ 1.16 (1H, *d*, J=3.75 Hz, H-14).

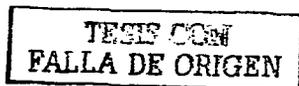
RMN¹³C (CDCl₃, TMS, espectro 13; desacetilconfertiflorina **104**): δ 46 (C-1), δ 23.9 (C-2), δ 44 (C-3), δ 218 (C-4), δ 54 (C-5), δ 80 (C-6), δ 52 (C-7), δ 66 (C-8), δ 35.4 (C-9), δ 32 (C-10), δ 137 (C-11), δ 169 (C-12), δ 124 (C-13), δ 16 (C-14), δ 12 (C-15).

3.6. Proceso de biotransformación con hongos filamentosos.

3.6.1. Preparación de los microorganismos.

Se realizó la resiembra de las cepas ATCC de *A. niger*, *A. ochraceus* y *B. bassiana* en tubos inclinados de agar PDA. Se incubó a temperatura ambiente durante 48 h²¹ y posteriormente se adicionaron 5 mL de agua destilada en condiciones asépticas a cada tubo para obtener la suspensión de las esporas de los microorganismos.

²⁰ Este rendimiento se obtuvo a partir de 1.072 Kg de partes aereas secas.





3.6.2. Crecimiento de los microorganismos.

Se adicionaron a cuatro matraces Erlenmeyer de 250 mL, 120 mL de medio YEPGA (ver Anexo I) y se esterilizaron a 15 lb/15 min/121 °C en un autoclave, se inocularon los matreces con 1 mL de la suspensión de esporas en condiciones estériles y se incubaron en un fermentador 36 °C, 169 h a 180 rpm.

3.6.3. Determinación de la biomasa por peso húmedo.

De los matraces de crecimiento microbiano, se tomó 1 ml de medio de cultivo en tubos de ensaye de 13x100 previamente llevados a peso constante y en condiciones asepticas a diferentes intervalos de tiempo (0-169 h). Todos los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 min, se decantó la fase acuosa²² y por diferencia en peso se determinó la cantidad de biomasa, finalmente se graficó el logaritmo natural de la biomasa con respecto al tiempo (Anexo II).

3.6.4 Determinación de la biomasa por la cuantificación de azúcares reductores.

Se vertió 1 ml de los sobrenadantes obtenidos en la determinación de biomasa por peso húmedo, en tubos de ensaye de 18x150. Se les adicionó 1 mL del reactivo DNS (ver anexo I) a cada uno de estos tubos y se colocaron todos al mismo tiempo en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, posteriormente se enfriaron al chorro de agua y se llevaron a un volumen de 10 mL con agua destilada. Finalmente se dejaron reposar por 20 minutos y se realizó la medición espectrofotométrica a 575 nm como se muestra en el anexo I, la concentración de azúcares reductores se determinó a partir de la curva estandar de glucosa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

²¹ Aproximadamente en este tiempo (48 h) de incubación se observó la máxima formación de esporas.

²² Estos sobrenadantes se cuantificaron en la cuantificación de azúcares reductores por el metodo del DNS.



3.6.5. Preparación de la Curva estandar de glucosa.

De una solución de glucosa al 10 % , se tomaron 5 alícuotas²³ y se aforaron a 10 mL respectivamente, para obtener las concentraciones de 1.0- 0.1 % de glucosa.

De las soluciones obtenidas se tomó 1 mL y se vertieron en 5 tubos de ensaye, posteriormente a cada tubo de ensaye se les adicionó 1 mL de reactivo de DNS y se introdujeron en un baño de agua hirviendo²⁴ durante 5 minutos, se enfriaron los tubos al chorro de agua y se llevaron a un volumen de 10 mL, se dejaron reposar durante 20 min y finalmente se determinó por espectrofotométrica a 575 nm la absorbancia de cada una de las soluciones, se graficó en papel milimétrico la concentración *versus* absorbancia como se muestra en el anexo II y finalmente se realizaron las correcciones pertinentes de acuerdo a los factores de dilución para cada caso.

3.7. Procedimiento de la biotransformación de ridentina.

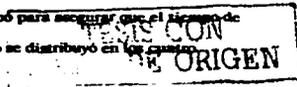
Se adicionaron 120 mL de medio YEPGA (ver anexo I) a cuatro matraces Erlenmeyer de 250 mL, se inocularon como se mencionó en la sección 2.9.1 y se incubaron en un fermentador a 36 °C, 180 rpm. De acuerdo a los resultados de la cinética de crecimiento de los microorganismos (anexo II), se interpoló el tiempo óptimo para la adición del sustrato 48 (100 mg) previamente disuelto en la mínima cantidad de etanol²⁵ (16 mL), finalmente el proceso se siguió por medio de cromatografía en capa fina por 169 h.

Este procedimiento se empleó para la biotransformación de 48 con los microorganismos: *B. bassiana*, *A. ochraceus* y *A. niger* como se muestra en el esquema 42.

²³ Las alícuotas fueron de 1.0, 0.7, 0.5, 0.3 y 0.1 mL.

²⁴ La introducción de los tubos al agua hirviendo se realizó al mismo tiempo para asegurar que el tiempo de reacción fuera igual.

²⁵ Después de la disolución de las lactonas en etanol, el volumen empleado se distribuyó en los cuatro matraces para la biotransformación.





R: ridentina
B: biotransformación con *B. bassiana*.
O: biotransformación con *A. ochraceus*
N: biotransformación con *A. niger*.

Esquema 42. Biotransformación de 48 con *B. bassiana*, *A. niger* y *A. ochraceus*, mezcla de elusión [Hex/AcOEt (9:1)].

Al final de los procesos (14 días) se filtró la biomasa²⁶ por medio de un embudo Büchner a vacío y se realizaron extracciones con cloroformo (4 x 20 mL), de la fase acuosa, finalmente se secó la fase orgánica filtrando sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró en un rotavapor.

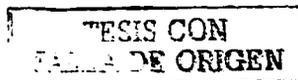
La fase orgánica así obtenida, se concentró por destilación a vacío y se procedió a la separación de los productos de interés por técnicas cromatográficas.

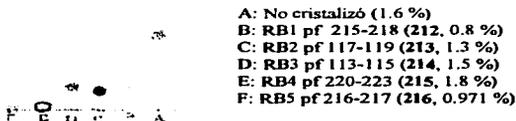
3.7.1. Biotransformación de ridentina con *B. bassiana*.

La biotransformación de 48 se llevó a cabo como se mencionó en la sección 2.10, disolviendo 100 mg de la lactona en 16 mL de etanol, este volumen de disolución se distribuyó en los cuatro matraces después de un tiempo de 96 h de incubación del microorganismo (ver anexo II). La separación de los productos de interés se realizó a partir de CCF preparativa, como se muestra en el esquema 43.

De la biotransformación de la ridentina con *B. bassiana* se purificaron los siguientes sólidos (212, 215 y 216), de los cuales sólo se describen sus datos de IR, debido a los bajos rendimientos obtenidos.

²⁶ La biomasa obtenida se esterilizó para ser desechada





Esquema 43. Biotransformación de ridentina con *B. bassiana*. mezcla de elusión [Hex/AcOEt (9:1)].

IR. $\nu(\text{cm}^{-1})$, espectro 15; 212): 3688, 2930, 2858, 1736, 1602, 1520, 1465, 1377, 1043.

IR. $\nu(\text{cm}^{-1})$, espectro 16; 215): 3684, 2958, 2931, 2870, 1734, 1520, 1468, 1426, 1376, 1021, 971.

IR. $\nu(\text{cm}^{-1})$, espectro 17; 216): 3686, 2928, 2856, 1737, 1601, 1522, 1463, 1107, 927.

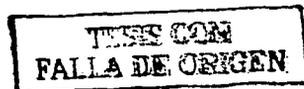
3.7.2. Biotransformación de ridentina con *A. niger*.

La biotransformación de 48 con *A. niger* se llevó a cabo como se describió en la sección 2.10, disolviendo 100 mg de la lactona en 16 mL de etanol, este volumen de disolución se distribuyó en los cuatro matraces después de un tiempo de 48 h de incubación del microorganismo (ver anexo II). Al final del proceso se realizó la separación de los productos de interés a partir de CCF preparativa, como se muestra en el esquema 44.



R: ridentina
1: RN1 pf 120-123 (210, 1.7 %)
2: RN2 pf 125-127 (211, 2.8 %)
3: RN3 pf 190-191

Esquema 44. Biotransformación de ridentina con *A. niger*, mezcla de elusión [Hex/AcOEt (9:1)].





Los tres productos de biotransformación con *A. niger*, fueron obtenidos con un bajo rendimiento (ver esquema 44), por lo que sólo se enlistan sus datos de IR.

IR. $\nu(\text{cm}^{-1}$, espectro 18; 210): 3686, 2927, 2855, 1729, 1602, 1520, 1463, 1377, 1022, 927

IR. $\nu(\text{cm}^{-1}$, espectro 19; 211): 2926, 2855, 1733, 1523, 1462, 1376, 926.

3.7.3. Biotransformación de ridentina con *A. ochraceus*.

La biotransformación de 48 con *A. ochraceus* se llevó a cabo como se mencionó en la sección 2.10, disolviendo 100 mg de la lactona en 16 mL de etanol, este volumen de disolución se distribuyó en los cuatro matraces después de un tiempo de 72 h de incubación del microorganismo (ver anexo II). Al final del proceso precipitó un sólido de la fase orgánica, con un bajo rendimiento (2.3 %) por lo que sólo se enlistan sus datos de IR, y no se obtuvo otro producto de bioconversión.

IR. $\nu(\text{cm}^{-1}$, espectro 20; 209): 3429, 2926, 1621, 1376, 1152, 1097, 802, 500, 473.

3.8. Biotransformación de ridentina con cultivo de células de zanahoria.

La bioconversión de 48 con un cultivo de células de zanahoria (Anexo II), produjo un producto de biotransformación como se observa en el esquema 45. Posteriormente a la purificación de esta mezcla de reacción, se obtuvo un sólido que fue caracterizado con base en sus propiedades físicas y espectroscópicas.



BCZ: biotransformación con células de zanahoria

R: ridentina

BC: blanco de células de zanahoria

P1: producto 217 caracterizado (7 %)

P2: aguas madres

Esquema 45. Biotransformación de ridentina con células de zanahoria, mezcla de elusión
[AcOEt/n-Hex (45:55)].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Pf 172-174 °C.

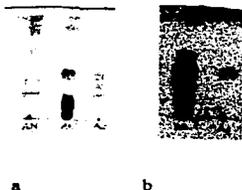
IR. ν (cm⁻¹, espectro 21; de 217): 3573, 2928, 2855, 1785, 1728, 1683, 1459, 1380, 1271, 1106, 1062, 1000, 966, 925.

RMN¹H (CDCl₃, TMS, espectro 22; de 217): δ 6.62 (1H, *dd*, J= 10.3, H-3), δ 5.91 (1H, *ddd*, J=11.2, H-2), δ 2.48 (1H, *dd*, J=11.4, H-5), δ 4.37 (1H, *ddd*, J=11.2, H-6).

RMN¹³C (CDCl₃, TMS, espectro 23; de 217): δ 201.6 (C-1), δ 125.7 (C-2), δ 151.7 (C-3), δ 70.2 (C-4), δ 55.1 (C-5), δ 78.6 (C-6), δ 48.3 (C-7), δ 20.0 (C-8), δ 34.2 (C-9), δ 45.8 (C-10), δ 37.8 (C-11), δ 178.8 (C-12), δ 9.67 (C-13), δ 19.7 (C-14), δ 24.0 (C-15).

3.9 Procedimiento de la biotransformación de la desacetilconfertiflorina.

La biotransformación de la desacetilconfertiflorina se realizó como se describió en el apartado 2.10 para la biotransformación de la ridentina. La desacetilconfertiflorina 104 (100 mg), se disolvió previamente en la mínima cantidad de etanol (10 mL) y se distribuyó en volúmenes iguales de disolución en los cuatro matraces de acuerdo al tiempo óptimo de crecimiento (anexo II). El proceso fue seguido por CCF por 169 h. La biotransformación de 104 con *B. bassiana*, *A. ochraceus* y *A. niger* se muestra en el esquema 46.



Ac: desacetilconfertiflorina. (a)
AO: biotransformación con *A. ochraceus*. (a)
AN: biotransformación con *A. Niger*. (a)
AB: biotransformación con *B. bassiana*.(b)

Esquema 46. Biotransformación de 104 con *A. niger*, *A. ochraceus* y *B. bassiana*, mezcla de elusión [AcOEt/hex (80:20)].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



3.9.1. Biotransformación de la desacetilconfertiflorina con *B. bassiana*.

La biotransformación de la desacetilconfertiflorina se realizó de la misma manera en que se indicó en el apartado 2.12. La purificación de los productos de biotransformación se realizó a partir de CCF preparativa, obteniendo dos productos de bioconversión como se observa en el esquema 47.

| |
|---------------------------------|
| AC: desacetilconfertiflorina |
| P1: DCF |
| P2: DCF |
| P3: DB1 pf 131-133 (226, 2.3%) |
| P4: DB2 pf 119-121 (227, 2.17%) |
| PA: DB3 |

Esquema 47. Biotransformación de desacetilconfertiflorina con *B. bassiana* mezcla de elución [AcOEt/hex (80:20)].

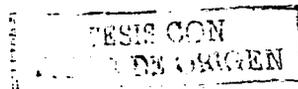
Para los productos 226 y 227 sólo se enlistan sus datos de IR, debido a su bajo rendimiento (2.3 % y 2.17 %).

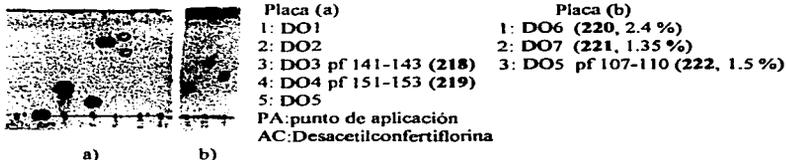
IR. $\nu(\text{cm}^{-1})$, espectro 24; de 226): 2927, 2855, 1765, 1519, 1464, 1383, 1021, 927.

IR. $\nu(\text{cm}^{-1})$, espectro 25; de 227): 2959, 2926, 2854, 1766, 1520, 1462, 1381, 1022, 926.

3.9.2. Biotransformación de la desacetilconfertiflorina con *A. ochraceus*.

La biotransformación de la desacetilconfertiflorina se realizó como se indicó en el apartado 2.12. La purificación de los productos de interés se realizó a partir de CCF preparativa, obteniendo cinco productos de bioconversión 218, 219, 220, 221 y 222 como se observa en el esquema 48, los cuales mostraron un bajo rendimiento por lo que sólo se enlistan los datos de IR de 222 (1.5%), 221 (1.4 %) y 220 (2.4 %).





Esquema 48. Biotransformación de la desacetilconfertiflorina con *A. ochraceus*, mezcla de elusión AcOEt:hex (7:3).

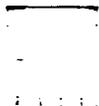
IR. $\nu(\text{cm}^{-1}$, espectro 26; de 220): 3697, 3605, 2957, 2928, 2855, 1730, 1602, 1520.4, 1465, 1379, 1098.

IR. $\nu(\text{cm}^{-1}$, espectro 27; de 221): 3691, 3607, 2927, 2854, 1727, 1677, 1602, 1462, 1377, 1109, 921.

IR. $\nu(\text{cm}^{-1}$, espectro 28; de 222): 3374, 2957, 2928, 2855, 1728, 1663, 1603, 1465, 1380, 1145, 1078.

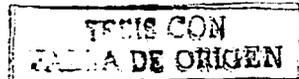
3.9.3. Biotransformación de la desacetilconfertiflorina con *A. niger*.

La biotransformación de la desacetilconfertiflorina se realizó como se indicó en la sección 2.12. Los cuatro productos de interés se purificaron a partir de CCF preparativa con bajo rendimiento por lo que sólo se enlistan sus datos de IR.



1:DN1 (223, 1.2 %)
2:DN2 (224, 1.73 %)
3:DN3 (225, 0.84 %)
4:DN4 (226, 1.33 %)

Esquema 49. Biotransformación de la desacetilconfertiflorina con *A. nige*, mezcla de elusión [AcOEt:Hex (65:35)].





IR. $\nu(\text{cm}^{-1})$, espectro 29; de **223**): 3403, 2927, 2855, 1726, 1678, 1600, 1463, 1427, 1378, 1139, 1075.

IR. $\nu(\text{cm}^{-1})$, espectro 30; de **224**): 1927, 2854, 1728, 1662, 1565, 1462, 1377, 1118, 1087, 880.

IR. $\nu(\text{cm}^{-1})$, espectro 31, de **225**): 3686, 3373.9, 2927.2, 2854.7, 1764.9, 1741.6, 1663, 1601, 1526, 1469, 1423, 1020.

IR. $\nu(\text{cm}^{-1})$, espectro 32; de **226**): 3599, 3377, 2957, 2926, 2854, 1736, 1601, 1464, 1074, 930.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

82-A

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



De los extractos EtOH y CH₂Cl₂, de *A. ludoviciana ssp mexicana* se obtuvo la ridentina (48), que en su espectro de IR muestra las absorciones características para el grupo hidroxilo (3334 cm⁻¹) y el grupo α-metilen-γ-lactona (1763 cm⁻¹).

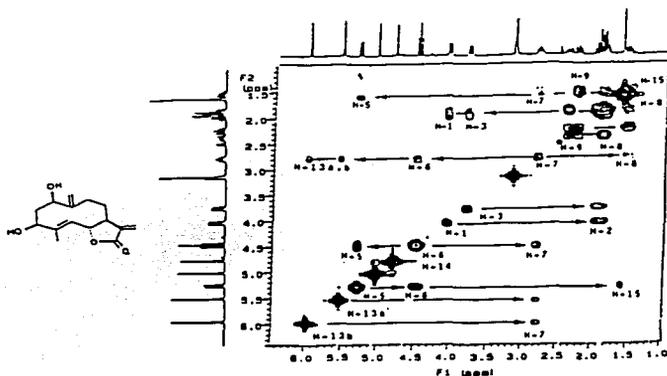
Por otro lado, en su espectro de masas (IE) presenta un ión molecular de m/z 264 que corresponde a una fórmula molecular C₁₅H₂₀O₄ (Ω= 6), mientras que en su espectro de RMN¹H se observa un par de dobletes en δ 5.97 (1H, d, J= 3 Hz) y δ 5.54 (1H, d, J= 3 Hz), que corresponden al metileno exocíclico de la γ-lactona.

Además de una señal triple en δ 4.48 (1H, t, J= 10 Hz), que se asigna a H-6, el cual se acopla con el H-vinílico del C-5 en δ 5.28 (1H, d, J= 10 Hz) (en el esquema 50 se muestra su espectro COSY), lo cual indica que existe un doble enlace entre C-4 y C-5, siendo en el C-4, donde se localiza el grupo metilo (C-15), que resuena en δ 1.52 (1H, d, J= 1.5 Hz). En δ 5.03 y δ 4.79 se observan dos señales anchas, que corresponden al metileno exocíclico que se encuentra en el C-10, lo cual permitió proponer como hipótesis estructural una lactona sesquiterpénica con esqueleto de germacrano.

Otras señales adicionales que se observan en el espectro de RMN¹H de esta molécula, son los hidrógenos geminales a grupos hidroxilo, la ubicación de los grupos hidroxilo se realizó mediante el análisis de su espectro COSY (esquema 50), que resolvió las señales entre δ 2.79 y δ 1.52 [90]. La señal en δ 2.79 se asignó a H-7 por su interacción con H-6 y H-13. La integral de la señal entre δ 1.89 y δ 1.82 en su espectro unidimensional indica la presencia de 3 hidrógenos, 2 de ellos acoplándose con hidrógenos geminales a grupo hidroxilo, por lo que la única posibilidad de situarlos es sobre los C-1 y C-3.

Los hidrógenos restantes que se encuentran en esta región corresponden a H-8 que interacciona con H-9, esto puede observarse mejor con las señales localizadas entre 2.38 y 2.23 ppm que integra para 2-hidrógenos, tal señal corresponde a los hidrógenos alílicos de H-9.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Esquema 50. Espectro COSY de la ridentina.

Con base en este análisis se corrobora que la sustancia aislada corresponde a la ridentina, germacranólida aislada de otras especies de *Artemisia*, [91-94] en la tabla XIV se enlistan los desplazamientos químicos de C^{13} para la ridentina.

Tabla XIV. Desplazamientos químicos de $RMN^{13}C$ para la ridentina y su diacetato.

| C | RIDENTINA | DIACETATO DE RIDENTINA (206) |
|---------------------|-----------|------------------------------|
| C-1 | 73.64 | 75.4* |
| C-2 | 41.46 | 35.79 |
| C-3 | 73.75 | 75.63* |
| C-4 | 147.26 | 142.75 |
| C-5 | 120.46 | 124.15 |
| C-6 | 79.59 | 79.52 |
| C-7 | 43.3 | 48.49 |
| C-8 | 25.75 | 26.13 |
| C-9 | 30.45 | 29.66 |
| C-10 | 144.16 | 145.93 |
| C-11 | 140.08 | 139.41 |
| C-12 | 169.31 | 169.52 |
| C-13 | 117.56 | 110.9 |
| C-14 | 109.6 | 114.32 |
| C-15 | | 12.38 |
| CH ₃ -CO | | 21.15 |
| CH ₂ -CO | | 20.98 |

*Señales Intercambiables

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

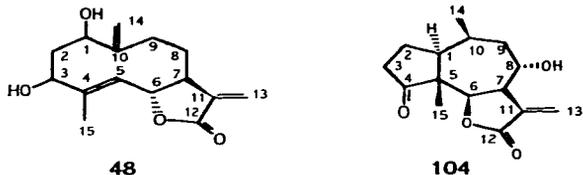


Diacetato de la ridentina (205).

Al comparar el espectro de RMN¹H de la ridentina con su derivado, se observan dos señales simples características del grupo acetilo en δ 2.6 y δ 1.99; además se observa que las señales correspondientes a H-1 y H-3, han sufrido un desplazamiento a campo bajo debido al cambio del grupo funcional. En la tabla XIV. Se enlistan los desplazamientos químicos de RMN¹³C para ridentina y su derivado diacetilado.

Desacetilconfertiflorina (104).

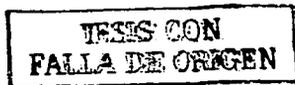
La desacetilconfertiflorina—lactona sesquiterpénica mayoritaria del extracto acetónico de *A. confertiflora*—muestra en su espectro de RMN-H¹ las señales características del grupo lactona α , β -insaturada: δ 6.35 (1H, *dd*, J=3, 0.5 Hz, H-13b), δ 5.95 (1H, *dd*, J=2.5 Hz, H-13a), el análisis de dicho espectro muestra para H-6 una señal doble en δ 4.61 (J=8.5 Hz), sugiriendo como esqueleto base a un ambrosanólido [95], como se muestra en el esquema 51, donde el H-6 para la ridentina aparece como un triplete, debido al acomplamiento con H-5 y H-7.



Esquema 51. Estructura de la ridentina y de la desacetilconfertiflorina

Por otro lado, la señal *dddd* centrada en δ 3.28 (1H, J=8.5, 6, 5.5, 2.5 Hz) se asignó al H-7, lo cual se verificó con el espectro COSY como indica el esquema 52²⁷.

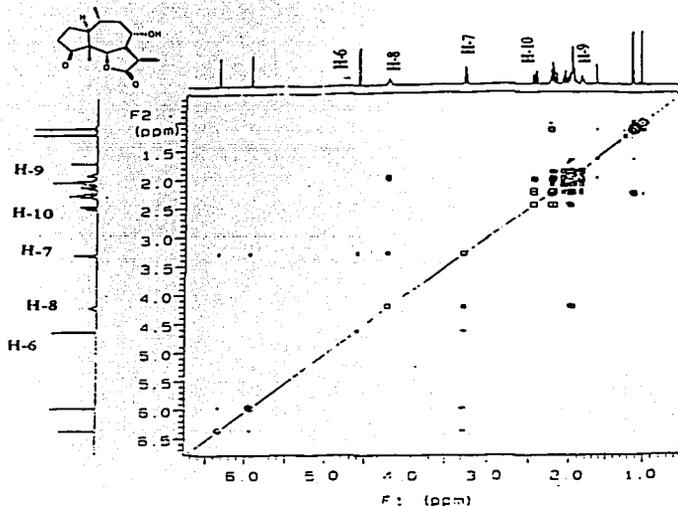
²⁷ La señal amplia en 4.19 ppm corresponde al H-8 de acuerdo al esquema 52.



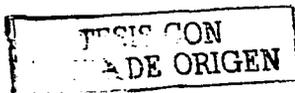


La señal en δ 2.47 que aparece como un *ddd* ($J=9.5$ y 1.5 Hz), se asignó a H-10, la señal simple en δ 1.05 se asignó al CH_3 -15 y la señal doble en δ 1.17 al CH_3 -14.

Aunado a la discusión anterior, en su espectro de RMN-C^{13} se observan 15 señales, que corresponden a cinco metinos, cuatro metilenos, dos metilos y tres carbonos cuaternarios, el grado de hidrogenación de cada átomo de carbono se dedujo con base a dicho espectro y a la técnica DEPT (espectro 14).



Esquema 52. Espectro COSY de la desacetilconfertiflorina.





Epoxidación de la ridentina.

De la reacción de epoxidación de la ridentina con AMCPB, se obtuvieron los productos 206 y 207, los cuales se obtuvieron en muy bajo rendimiento (2.1 y 1.32), lo cual hace suponer que la disposición estructural de los dobles enlaces en la ridentina, se encuentran impedidos, tomando en cuenta el mecanismo de reacción de la epoxidación de los dobles enlaces con un perácido [96].

Transformación con hongos filamentosos.

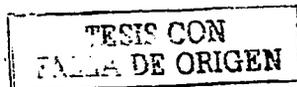
Los rendimientos obtenidos de la biotransformación de la ridentina y la desacetilconfertiflorina con hongos filamentosos son muy bajos como se muestra en la tabla XV, y sólo se dan a conocer sus datos de IR como una justificación a la obtención de dichos compuestos.

Por lo anterior, las biotransformaciones de estas lactonas sesquiterpénicas con estos sistemas biológicos son factibles con la limitante del bajo rendimiento, existiendo así la evidencia de que este tipo de productos naturales es susceptible de una modificación estructural por estas vías.

Tabla XV. Rendimientos de los productos de bioconversión²⁸.

| Sustancia | % Rendimiento | Sustancia | % Rendimiento |
|---|---------------|-----------------------------------|---------------|
| Ridentina (68) | 0.08% | Desacetilconfertiflorina (184) | 0.55% |
| <i>B. bassiana</i> ²⁸ | | <i>B. bassiana</i> ²⁸ | |
| 212 | 0.80% | 220 | 2.30% |
| 215 | 1.80% | 227 | 2.17% |
| 218 | 0.97% | | |
| <i>A. ochraceus</i> ²⁸ | | <i>A. ochraceus</i> ²⁸ | |
| 209 | 2.30% | 229 | 2.40% |
| | | 221 | 1.50% |
| | | 222 | 1.35% |
| <i>A. niger</i> ²⁸ | | <i>A. niger</i> ²⁸ | |
| 210 | 1.70% | 223 | 1.20% |
| 211 | 2.80% | 224 | 1.73% |
| | | 225 | 0.84% |
| | | 226 | 1.33% |
| Diacetato de ridentina ²⁸ (206) | 92% | | |
| Epímero de la α -vulgarina ²⁸ (217) | 7% | | |
| 206 | 2.10% | | |
| 207 | 1.32% | | |
| 208 | 1.53% | | |

²⁸ Se partió de 100 mg para cada proceso.

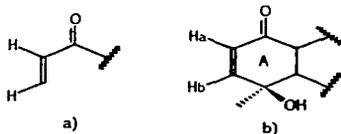




Biotransformación con cultivo de células de zanahoria.

De la biotransformación de la ridentina con cultivo de células de zanahoria, se obtuvo una sustancia que en su espectro de IR muestra absorciones características para una lactona sesquiterpénica: en 3520 ν (OH), 1775 (γ -lactona) y 1665 cm^{-1} ν (Csp^2 - Csp^2).

En su espectro de RMN¹H (espectro 18), se observa un sistema AB en δ 6.61 (*d*, $J = 10.3$ Hz) y δ 5.90 (*d*, $J = 10.3$ Hz) conjugado a un grupo carbonilo (Esquema 53a), que por su desplazamiento químico y constante de acoplamiento no corresponde al metileno exocíclico de la γ -lactona; el cual fue hidrógenado en estas condiciones, ya que en δ 1.24 se observa una señal *d* ($J = 7.1$), que corresponde a CH_2 -13. Por lo tanto, el fragmento de la lactona α , β insaturada se ubicó en el anillo A del esqueleto de eudesmano como se observa en el esquema 53.



Esquema 53. a) Fragmento de un sistema AB; b) Anillo A del eudesmano.

Si se toma en consideración el efecto de anisotropía [97] generado por el carbonilo, resultaría que la señal en δ 6.61 corresponde a Ha mientras que a Hb la señal centrada en δ 5.90. La señal δ 1.58 (s, 3H), corresponde a un metilo geminal a un grupo hidroxilo, para generar la estructura parcial b del esquema 53.

Lo anterior está de acuerdo con los desplazamientos químicos de RMN¹³C, observados en el espectro 23, los cuales se enlistan en la tabla XVI, y se comparan con los informados en la literatura para lactonas sesquiterpénicas con esqueleto muy similares.

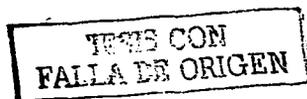




Tabla XVI. Desplazamientos químicos de C¹³, para cuatro lactonas sesquiterpénicas.

| | a)* | b)* | c)* | d)* | 217 | $\Delta\delta_{e-217}$ | $\Delta\delta_{b-217}$ | $\Delta\delta_{c-217}$ | $\Delta\delta_{d-217}$ |
|------|-------|-------|--------|--------|--------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| C-1 | 40.2 | 201.7 | 201.44 | 157.82 | 201.61 | 161.41 | 0.09 | 0.17 | 43.79 |
| C-2 | 25.9 | 125.6 | 125.64 | 126.81 | 125.71 | 99.81 | 0.11 | 0.07 | 1.1 |
| C-3 | 73 | 151.8 | 151.64 | 200.44 | 151.74 | 78.74 | 0.06 | 0.1 | 48.7 |
| C-4 | 34.4 | 70.1 | 70.07 | 42.09 | 70.16 | 35.76 | 0.06 | 0.09 | 28.07 |
| C-5 | 49.79 | 54.6 | 54.93 | 52.27 | 55.09 | 5.3 | 0.49 | 0.16 | 2.82 |
| C-6 | 80.1 | 79.6 | 79.67 | 82 | 78.59 | 1.51 | 1.01 | 1.08 | 3.41 |
| C-7 | 53.6 | 52.4 | 49.62 | 50.21 | 48.26 | 5.34 | 4.14 | 1.36 | 1.95 |
| C-8 | 23.5 | 22.7 | 21.1 | 21.23 | 20.03 | 3.47 | 2.67 | 1.07 | 1.2 |
| C-9 | 35.9 | 34.3 | 33.92 | 37.23 | 34.2 | 1.7 | 0.1 | 0.28 | 3.03 |
| C-10 | 43.3 | 46.3 | 46.24 | 38.52 | 45.82 | 2.52 | 0.48 | 0.42 | 7.3 |
| C-11 | 41.9 | 40.6 | 137.48 | 138.32 | 37.79 | 4.11 | 2.81 | 99.69 | 100.53 |
| C-12 | 178.7 | 178.3 | 169.52 | 170.12 | 178.83 | 0.13 | 0.53 | 9.31 | 8.71 |
| C-13 | 12.6 | 12.5 | 117.21 | 117.48 | 9.89 | 2.91 | 2.81 | 107.52 | 107.79 |
| C-14 | 21.1 | 19.8 | 18.15 | 19.32 | 19.72 | 1.38 | 0.08 | 1.57 | 0.4 |
| C-15 | 8.8 | 23.8 | 23.78 | 14.04 | 23.97 | 15.17 | 0.17 | 0.19 | 9.93 |

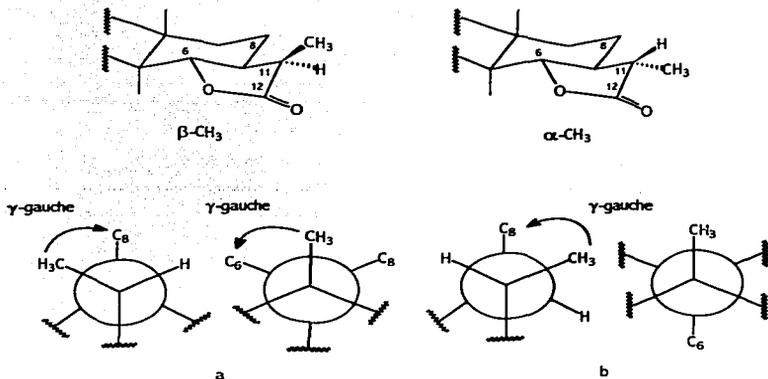
* a) 3 β -hidroxi-4 α , 5 α , 11 β -H-eudesman-6 α , 12-olida; b) vulgarina; c) arglanina y d) tuberiferina, 217 epímero de la vulgarina.

TESTE CON
FALTA DE ORIGEN



La señal triple de δ 4.37 (1H, $J=11.2$) corresponde al hidrógeno β axial del C-6, el cual muestra un acoplamiento *trans*-diaxial con C₅-H (δ 2.48, d , $J=11.4$) y C₇-H. La señal singlete en δ 1.4 (s, 3H) corresponde al CH₃-14.

La orientación del grupo metilo del C-11, se estableció por el valor de la constante de acoplamiento entre H-7 y H-11 ($J=7.1$). Este valor está de acuerdo para una disposición *cis* de los hidrógenos mencionados y por lo tanto el CH₃-13 tiene una orientación β , dicha posición es confirmada al considerar el efecto γ -gauche (efecto de protección), que ejerce el CH₃-13 en los C-8 y C-6, como se ilustra en el esquema 54 a.



Esquema 54. Efecto γ -gauche mostrado por CH₃-13 en: a) C₆ y C₈; b) C₆.

Si el CH₃-13 se ubica con una orientación α , solamente el efecto de protección se observaría en el C₈ como se muestra en el esquema 54 b.

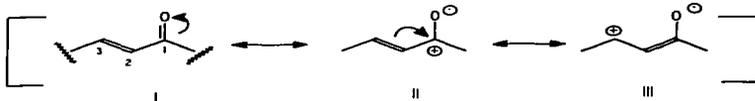
HECHO CON
PALLA DE ORIGEN



El desplazamiento químico para el CH_3 -13 ($\Delta\delta = 2.81$) aparece a campo más alto con respecto al mostrado en la vulgarina²⁹ [98], esta diferencia puede ser originada debido al efecto de anisotropía generado por el grupo carbonilo de la lactona.

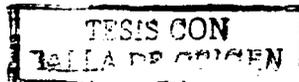
La esteereoquímica del C-4, se dedujo con base en los desplazamientos de C^{13} , debido al efecto γ -gauche que ejerce el grupo hidroxilo en los C-10 y C-6; donde la orientación β del grupo hidroxilo genera un efecto de protección sobre dichos átomos de carbono (Esquema 56), mientras que si el grupo hidroxilo fuera α -pseudoecuatorial, el único carbono protegido sería el C-6. Dicho efecto, se manifiesta al comparar los desplazamientos químicos de los C-6 y C-8 para una serie de sustancias estructuralmente parecidas, como se indicó en la tabla XVI.

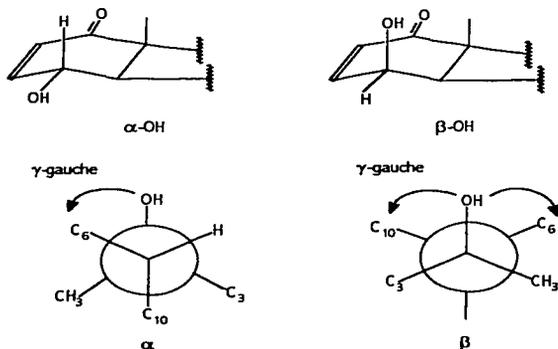
²⁹ Nota: se encontró que existe un error, debido a que el desplazamiento químico informado en la literatura para los C-2 y C-3 de la vulgarina, no son consistentes en función del efecto de resonancia presentado en el sistema carbonílico α, β -insaturado, ya que es el C-3 el que presenta una mayor deficiencia electrónica.



Esquema 55. Estructuras de resonancia para un sistema α, β insaturado.

Además al comparar los datos de RMN^1H para la sustancia (a) de la tabla XV, se observa que existe una inconsistencia en la asignación de los desplazamientos químicos para los C-9 y C-10, C-9 δ (43.3) y en C-10 δ (35.9) los cuales están invertidos.



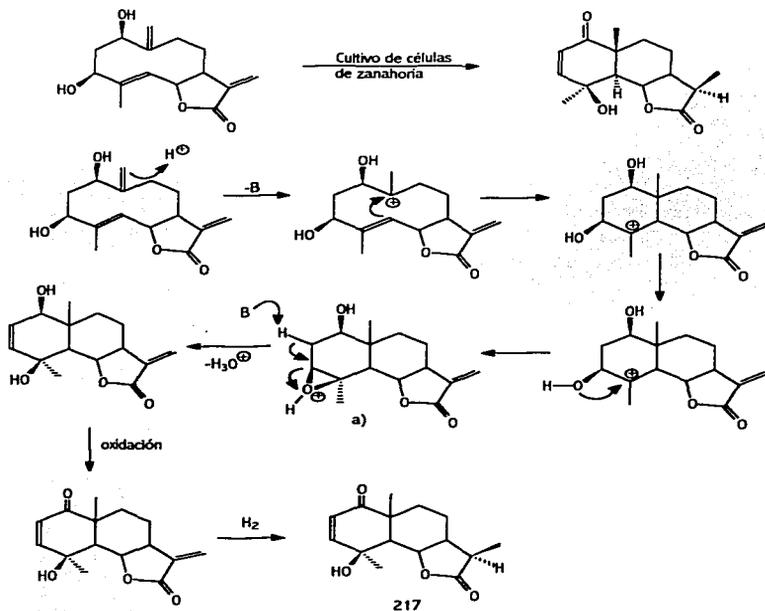


Esquema 56. Efecto γ -gauche en los C_6 y C_{10} con respecto al grupo hidroxilo de C_4 .

Aunado a la discusión anterior en el esquema 57, se muestra una posible propuesta en la formación del compuesto en discusión, la cual inicia con la protonación del doble enlace Δ^{10-14} , para generar un carbocatión terciario seguido de la formación del anillo (6/6) del eudesmano y generación del carbocatión terciario respectivo.

El carbocatión en C-4, es estabilizado por el ataque nucleofílico del oxígeno del grupo hidroxilo β -pseudoequatorial del C-3, para generar la estructura a.

La migración de un hidruro y la apertura del epóxido hacia el C-4 (carbono más impedido) genera un carbocatión secundario en C-2, el cual es estabilizado por la sustracción de un protón del C-3 para formar un doble enlace C_2-C_3 . Finalmente la oxidación del C-1, conlleva a la formación del grupo carbonilo α, β -insaturado y la hidrogenación en Δ^{11-13} a la formación de la sustancia 217.



Esquema 57. Propuesta del mecanismo de reacción para la obtención de 217.

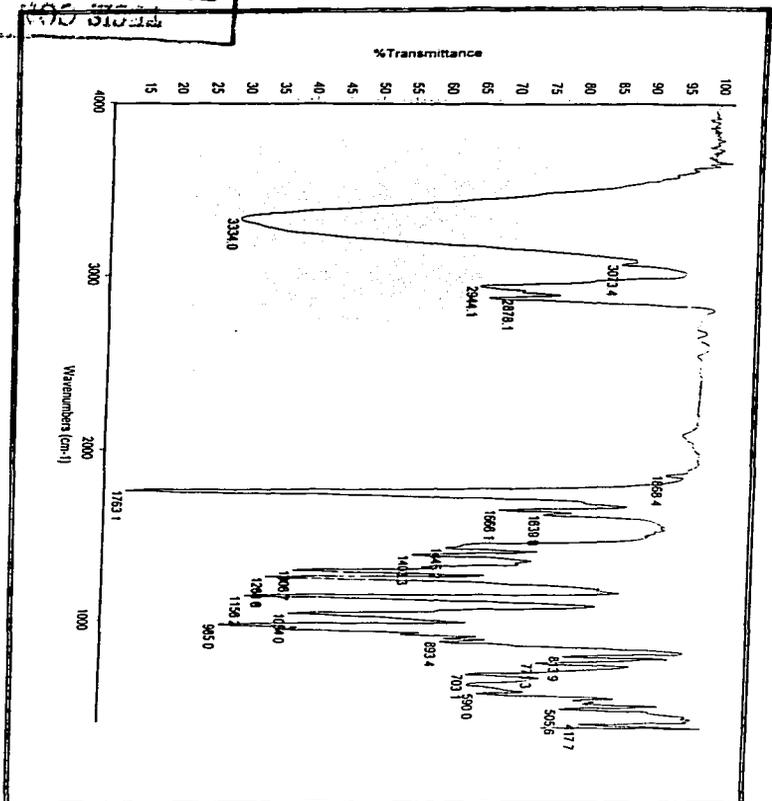
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

93-A

VIII. ESPECTROS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 1. IR (CHCl₃) de la ridentina (48).

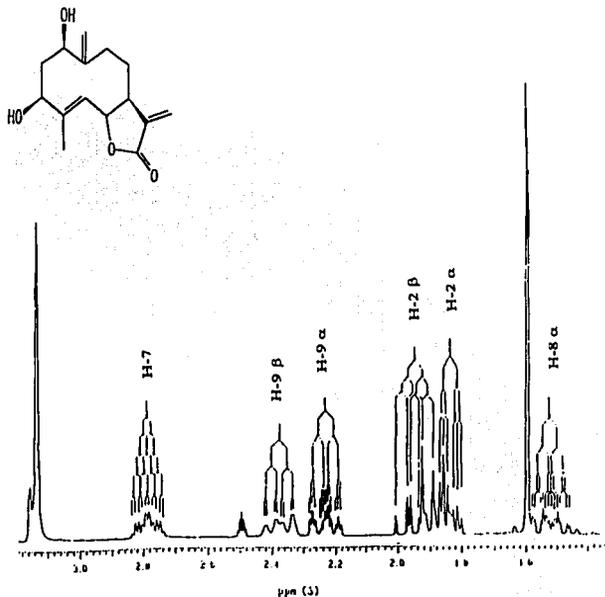


FALLA DE ORIGEN

Espectro 2. RMN¹H (300 Hz, CDCl₃, TMS) de la ridentina (48).

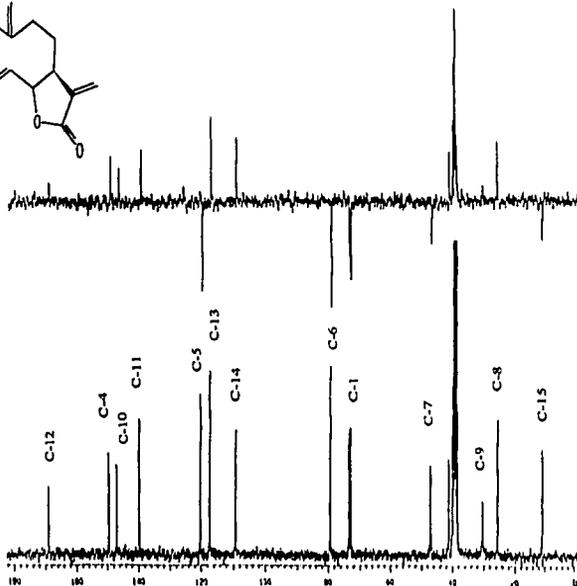
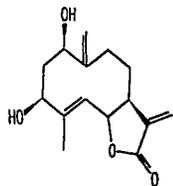


Biotransformación de la ridentina y de la desacetilcortefilarina con hongos filamentosos.



TESIS CON
TALA DE ORIGEN

Espectro 3. RMN¹³C (300 Hz, CDCl₃, TMS) de la ridentina (48).



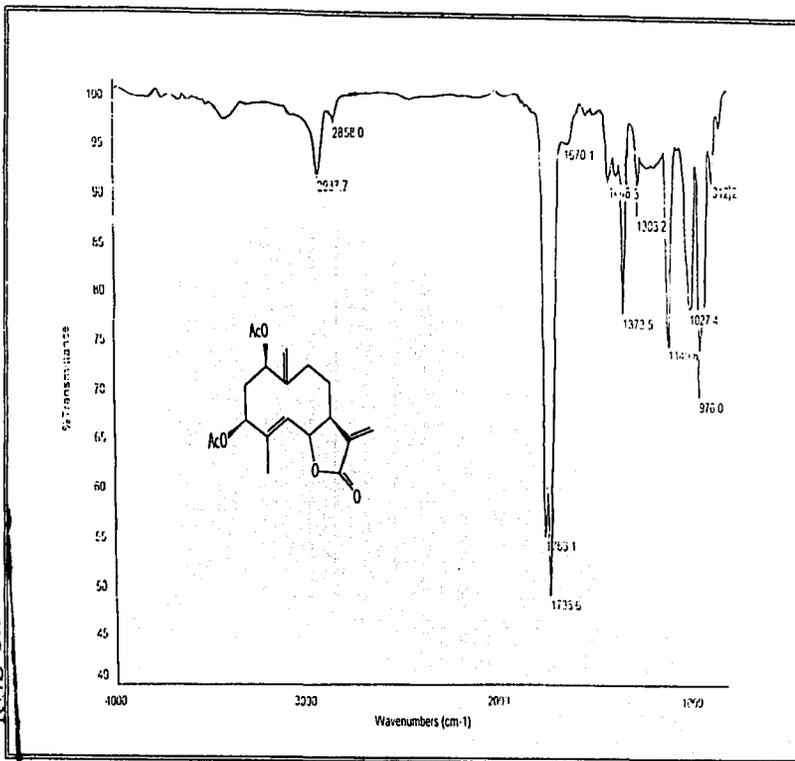
44 (13)

NOV 1971

Espectro 4. IR (CHCl₃) del diacetato de la ridentina (205).

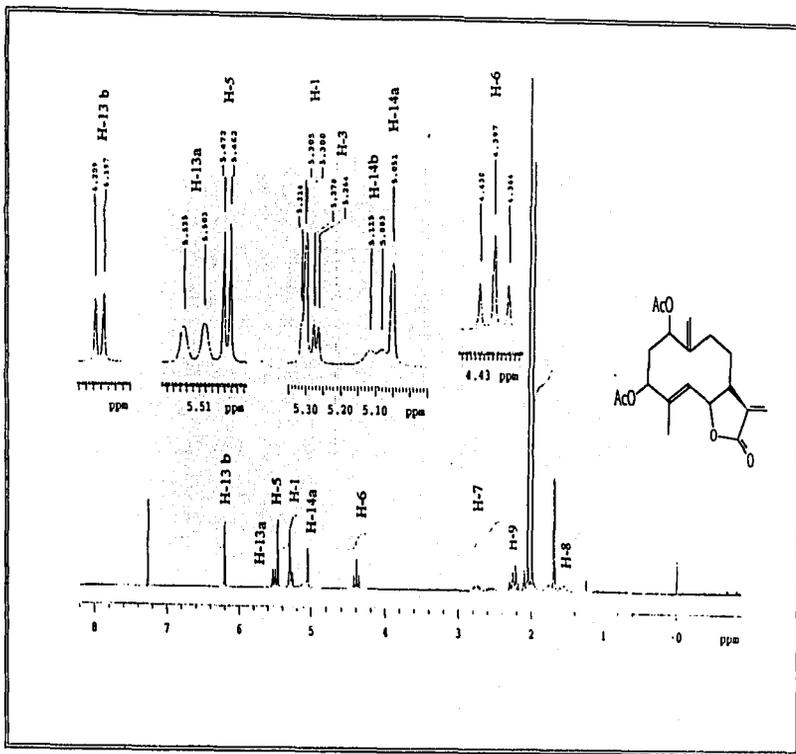


Biotransformación de la ridentina y de la desacetilbaccatrilina con *Monilia filamentosa*.



RECIBO DE LA
N.º 1111
CON

Espectro 5. RMN¹H (300 Hz, CDCl₃, TMS) del diacetato de la ridentina (205).

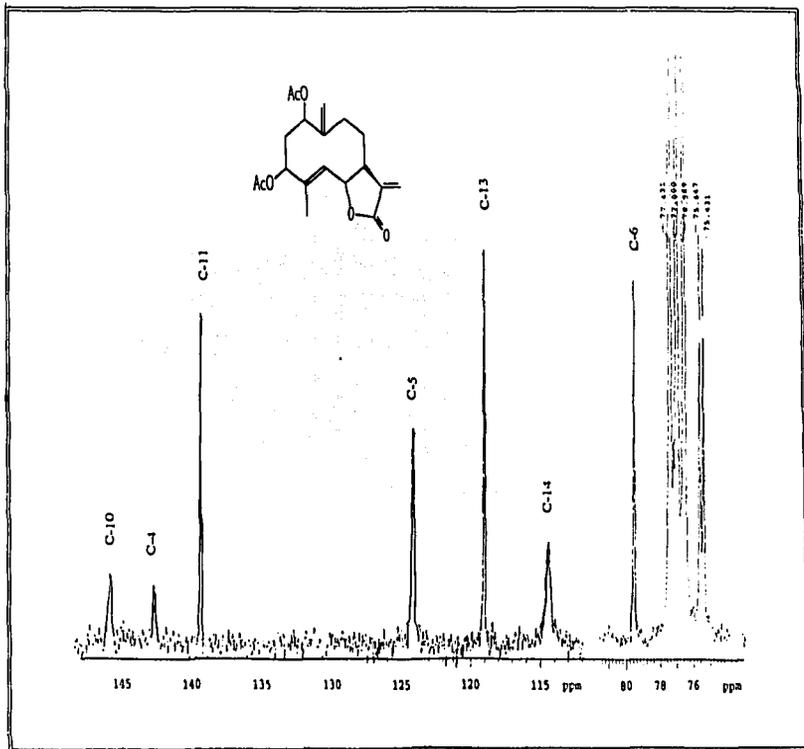


TESIS CON
FUNDAMENTO DE ORIGEN

Espectro 6. RMN¹³C (75 Hz, CDCl₃, TMS) del diacetato de la ridentina (205).



Biotransformación de la ridentina y de la desacetilicoflorina con *hueso*. *Flamenco*.

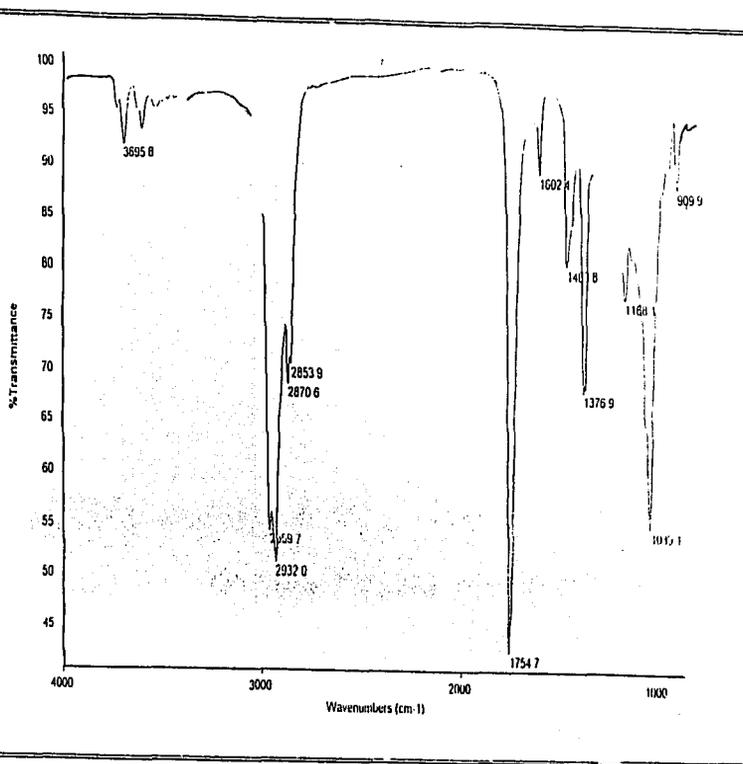


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 7. IR (CHCl₃) del producto de acetilación menos polar de la ridentina.



Biotransformación de la ridentina y de la desacetilridentina con hongos filamentosos.

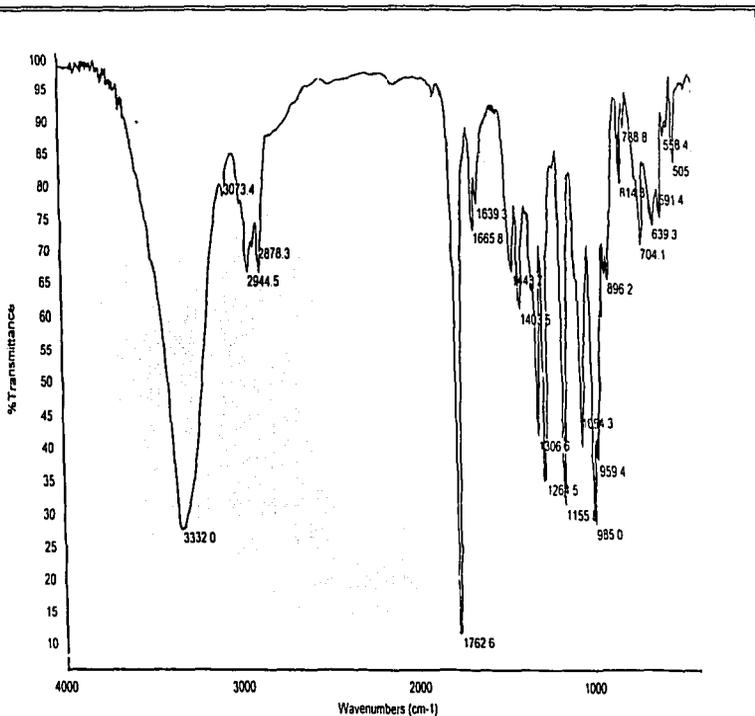


TEJER CON
FALTA DE ORIGEN

Espectro 8. IR (CHCl₃) del acetilado de ridentina con LCC (208).



Biotransformación de la ridentina y de la desacetilatorfiorina con bosporo. Filamentosos.

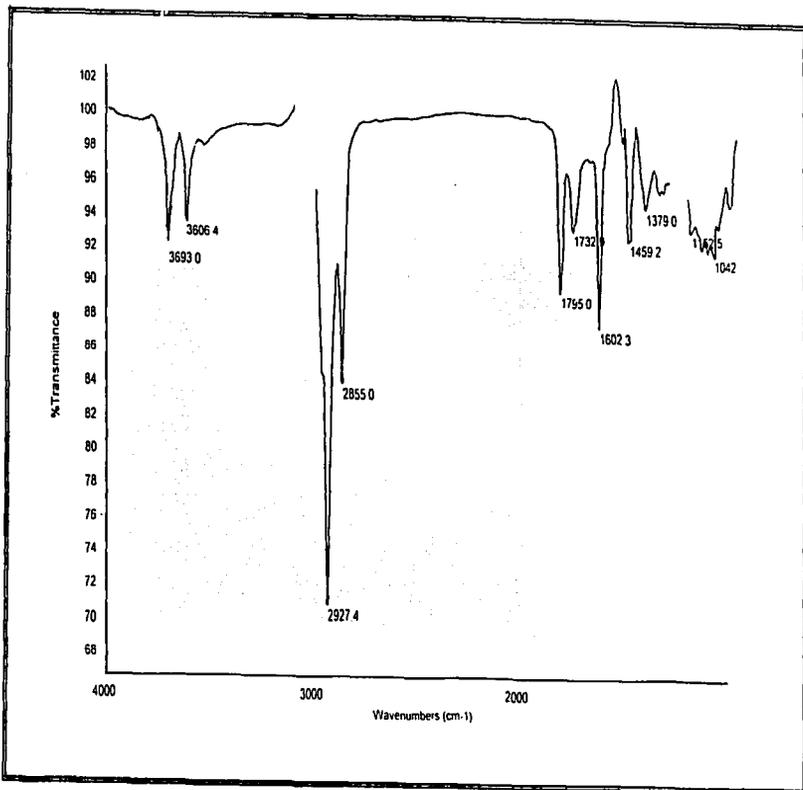


TEJEM CON
PALA DE ORIGEN

Espectro 9. IR (CHCl₃) del producto 206.



Bioreformación de la ridentina y de la decacetilciferriforina con hongos filamentosos. 102

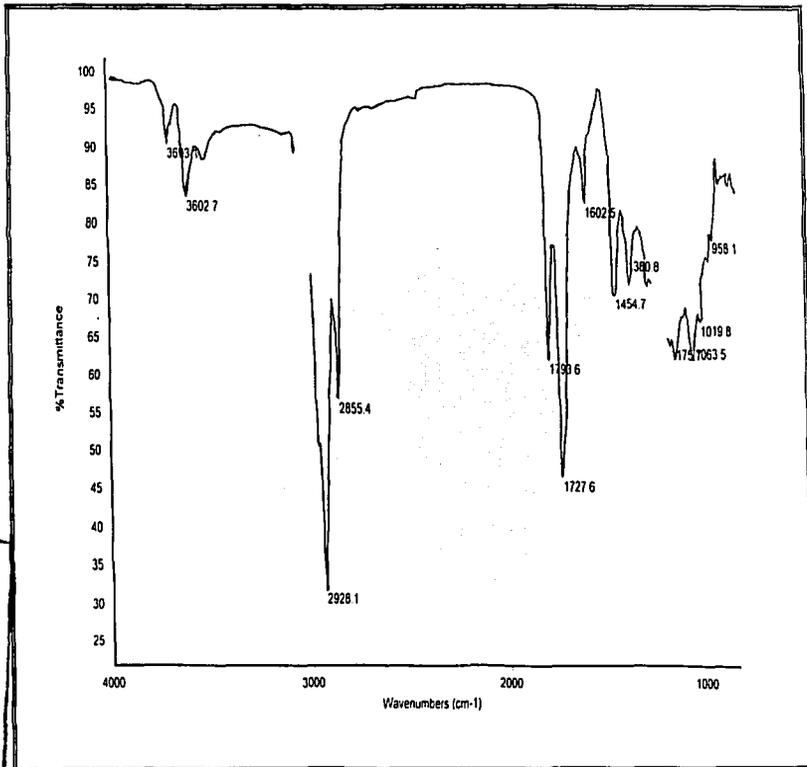


TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectro 10. IR (CHCl₃) de 207.



Biotransformación de la ridentina y de la desacetilcentriflorina con hongos filamentosos.

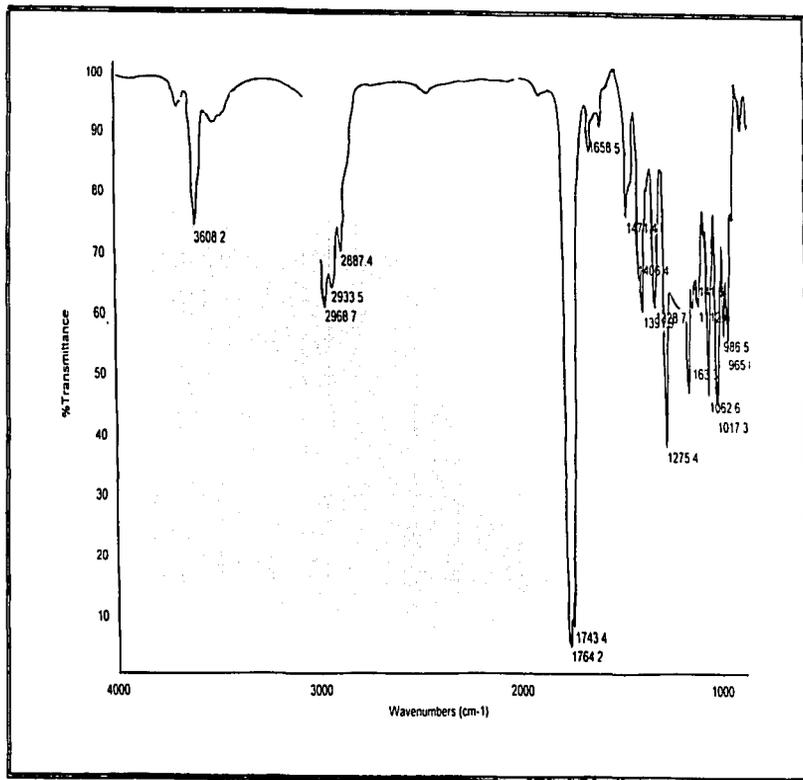


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 11. IR (CHCl₃) de la desacetilconferitlorina (104).

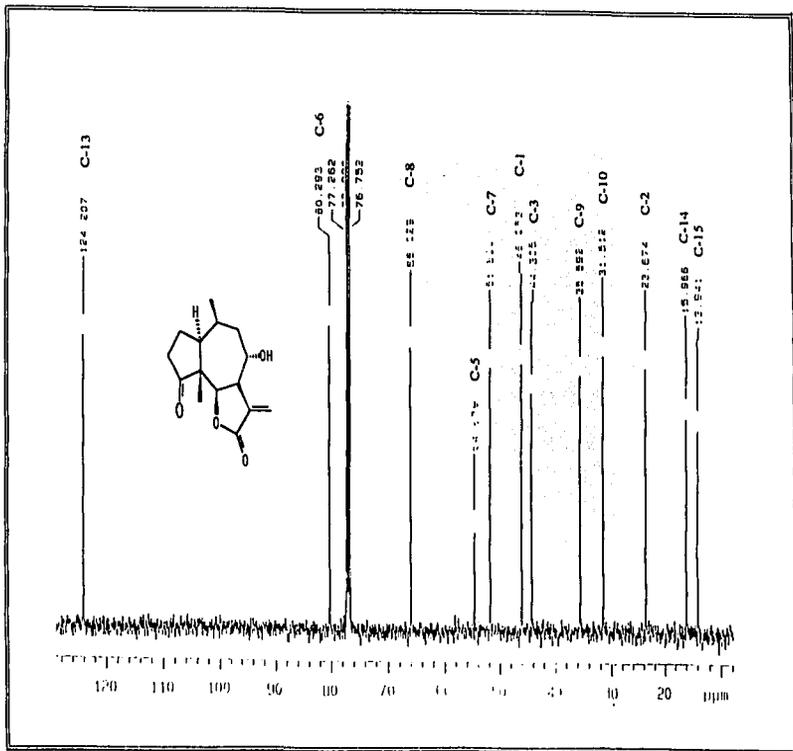


Biotransformación de la ridentina y de la desacetilconferitlorina con hongos filamentosos. 104



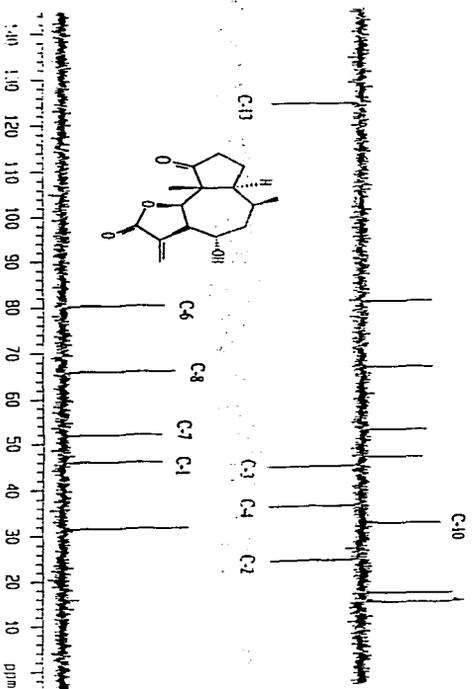
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Spectro 13. RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃, TMS) de la desacetilconfertiflorina (104).



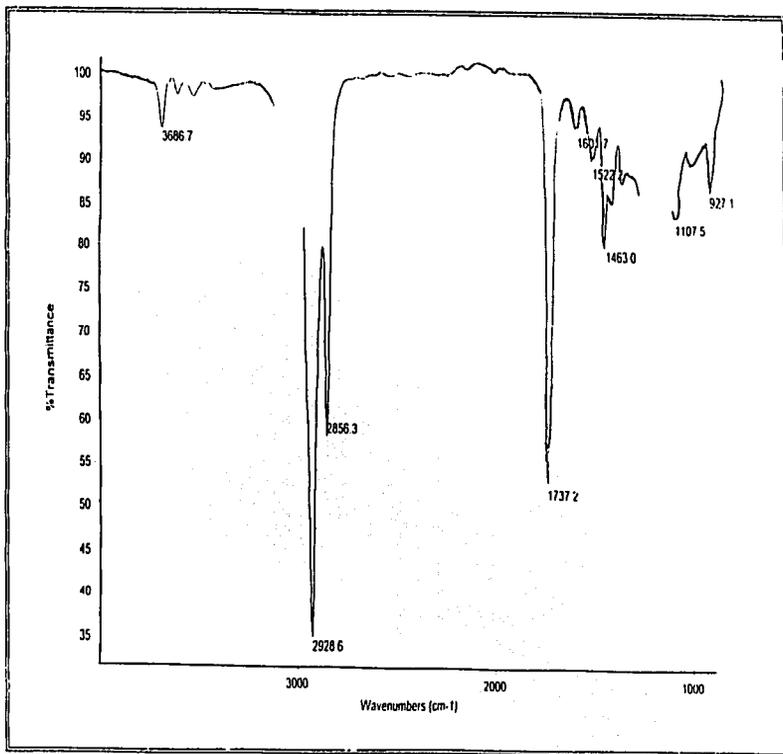
TEMA CON
FALLA DE COBERTA
MEDIO DE TALLA
NICO STEEL

Espectro 14, DEPT (125 MHz, CDCl₃, TMS) de la desacetilconferiflorina.



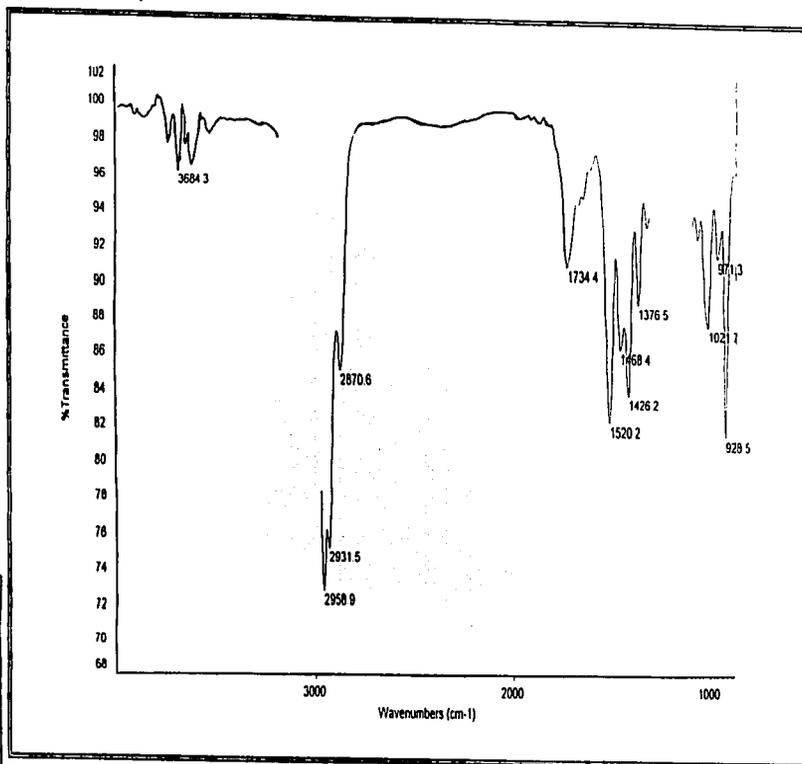
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectro 15. IR (CHCl₃) de 212.



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

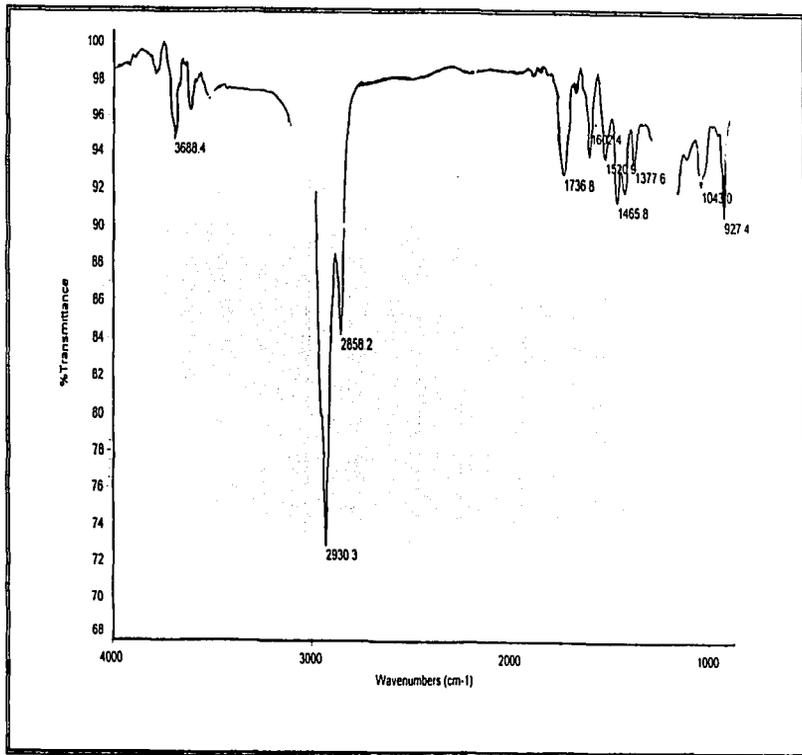
Espectro 16. IR (CHCl₃) de 215.



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



Espectro 17. IR (CHCl₃) de 216.



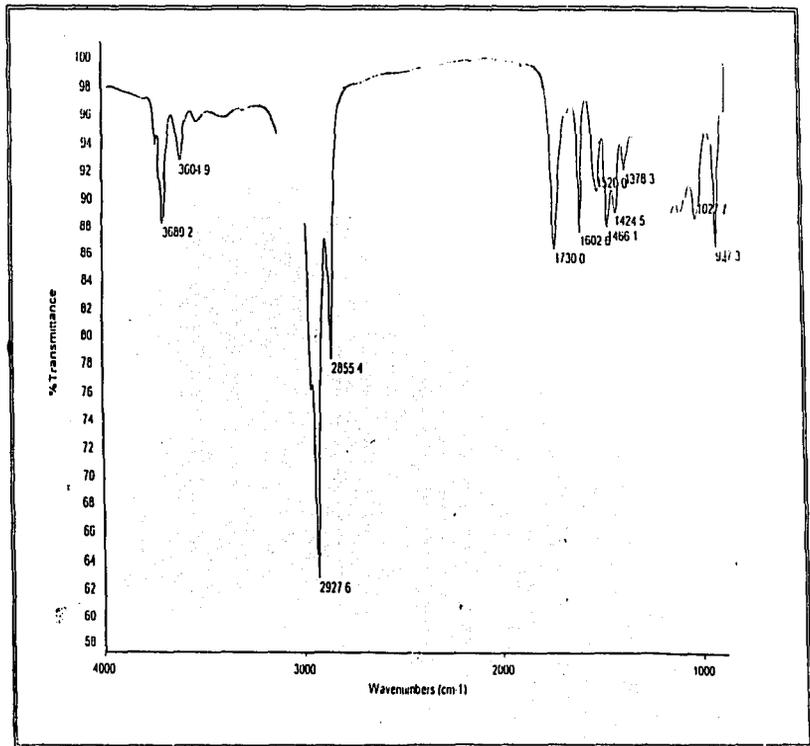
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



Espectro 18. IR (CHCl₃) de 210.

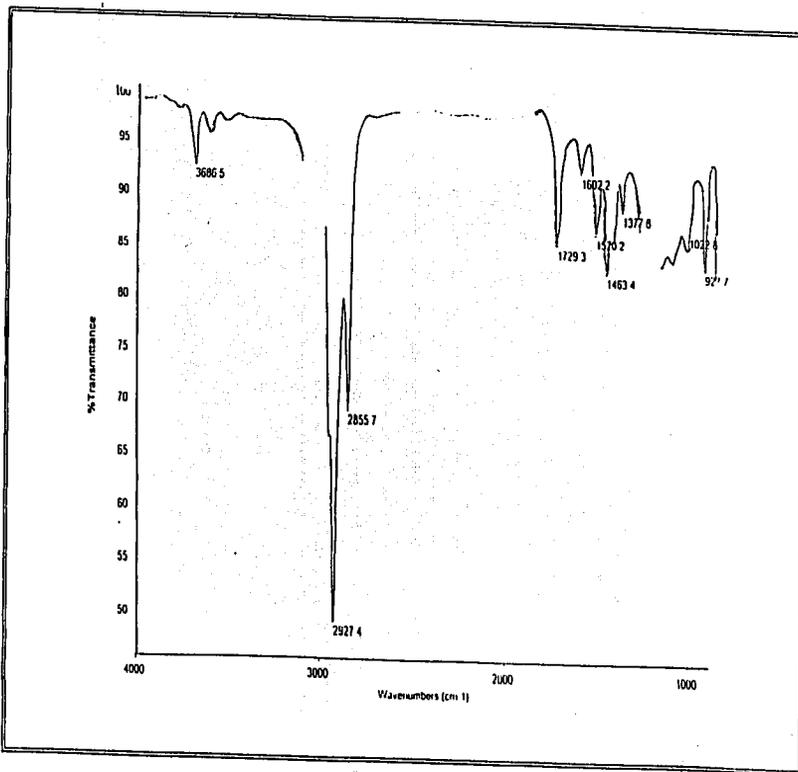


Biotransformación de la rifamicina y de la decaceticorifloxima con *Banana*, *Glaucomox*.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 19. IR (CHCl₃) de 211.



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

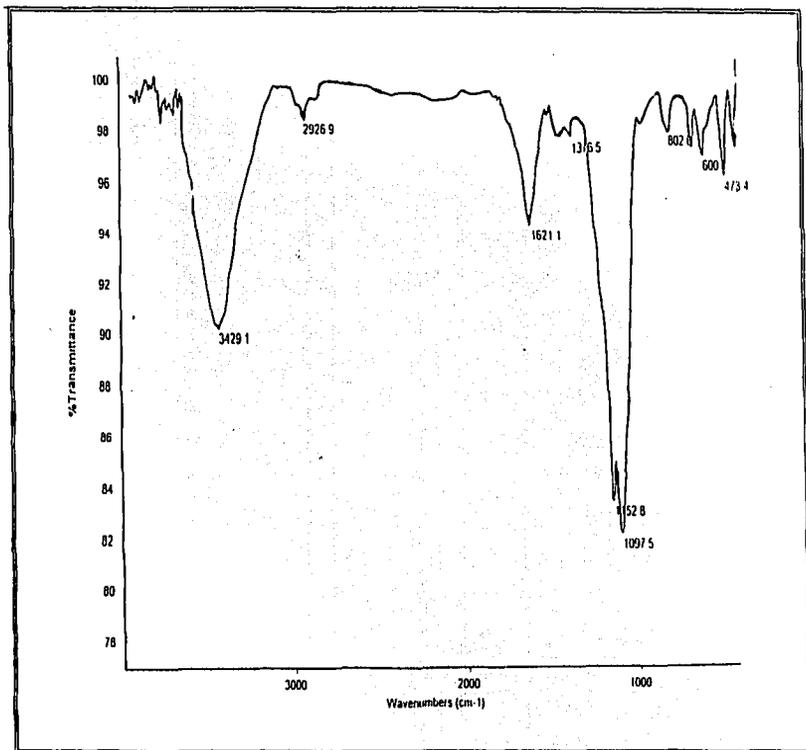


Espectro 20. IR (CHCl₃) de 209



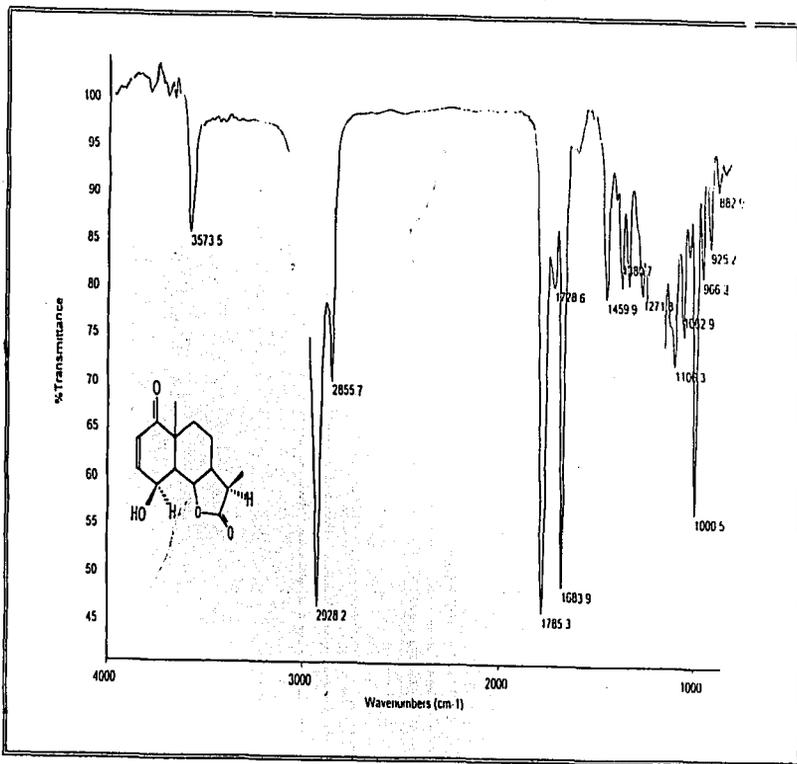
Biotransformación de la ricitonina y de la desacetilricitonina con hongos *Glaucosporium*

113



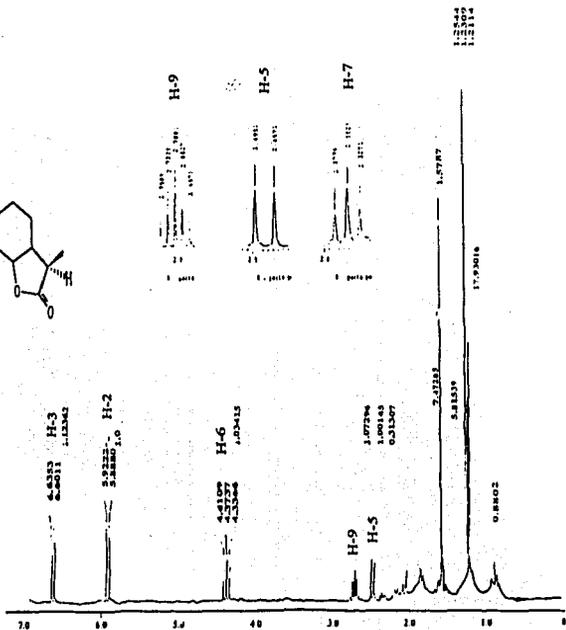
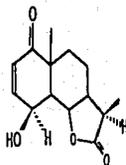
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectro 21. IR (CHCl₃) del epímero de la α -vulgarina (217).



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

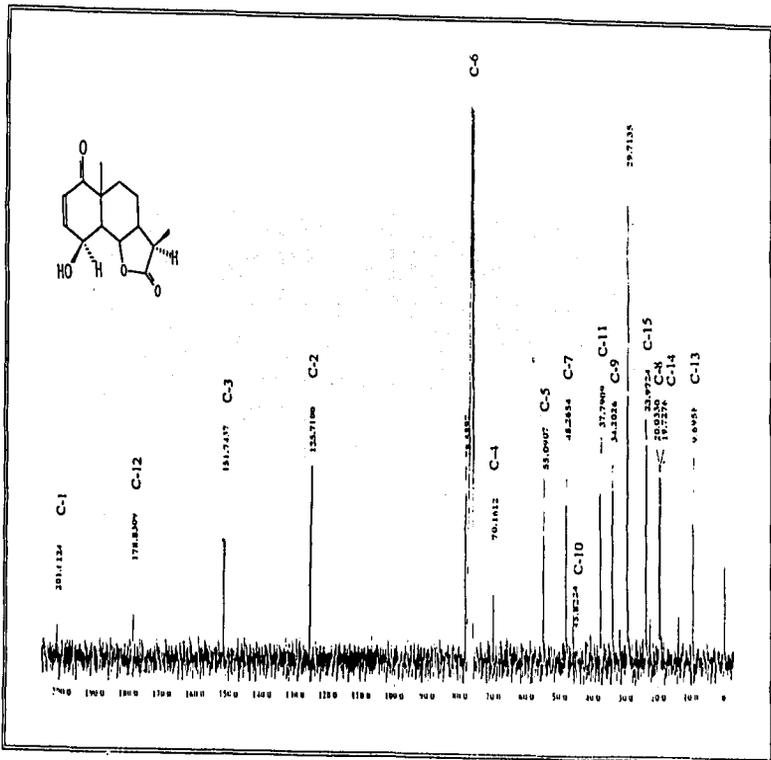
Espectro 22. RMN¹H (300 Hz, CDCl₃, TMS) del epímero de la α-vulgarina (217).



TESTS CON
FALTA DE ORIGEN

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

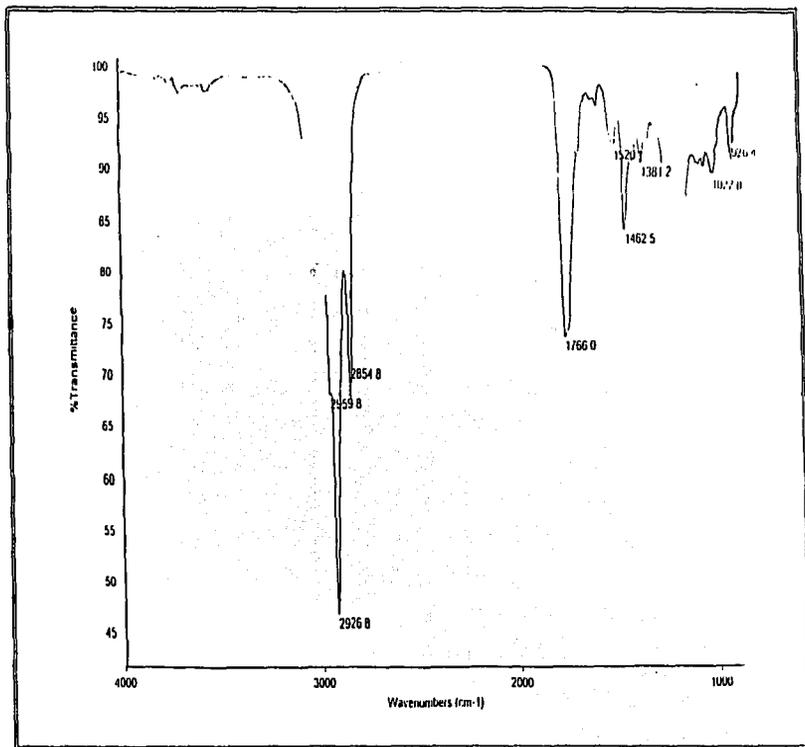
Espectro 23. RMN¹³C (300 Hz, CDCl₃, TMS) del epímero de la α-vulgarina (217).



Espectro 24. IR (CHCl₃) de 226.



Bi-transformación de la ridonina y de la demacetilconferiflorina con *Bombus terrestris*

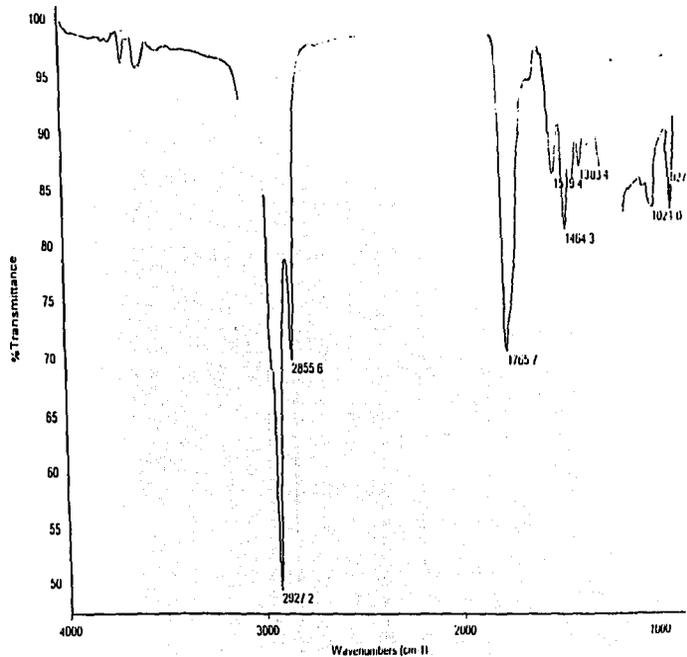


TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectro 25. IR (CHCl₃) de 227.



Biotransformación de la ridemina y de la deacetilkanfericlorina con hongos *Gliomastroma*.

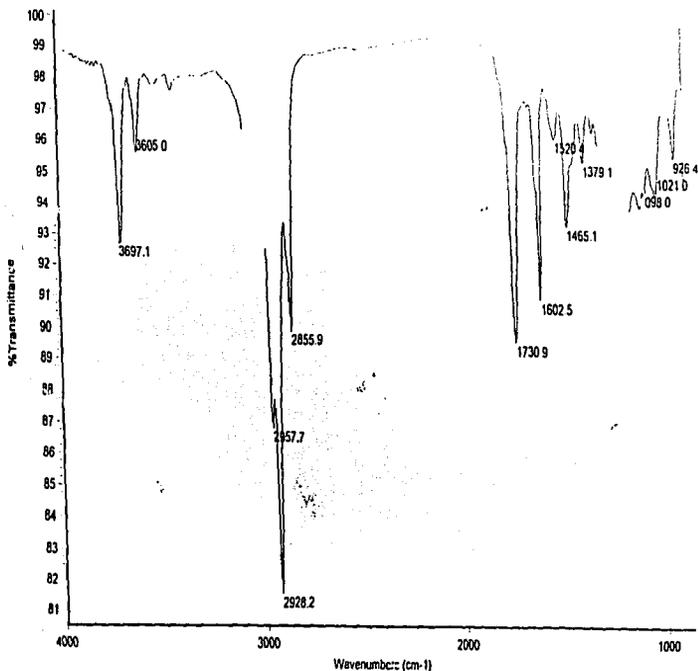


TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectro 26. IR (CHCl_3) de 220.

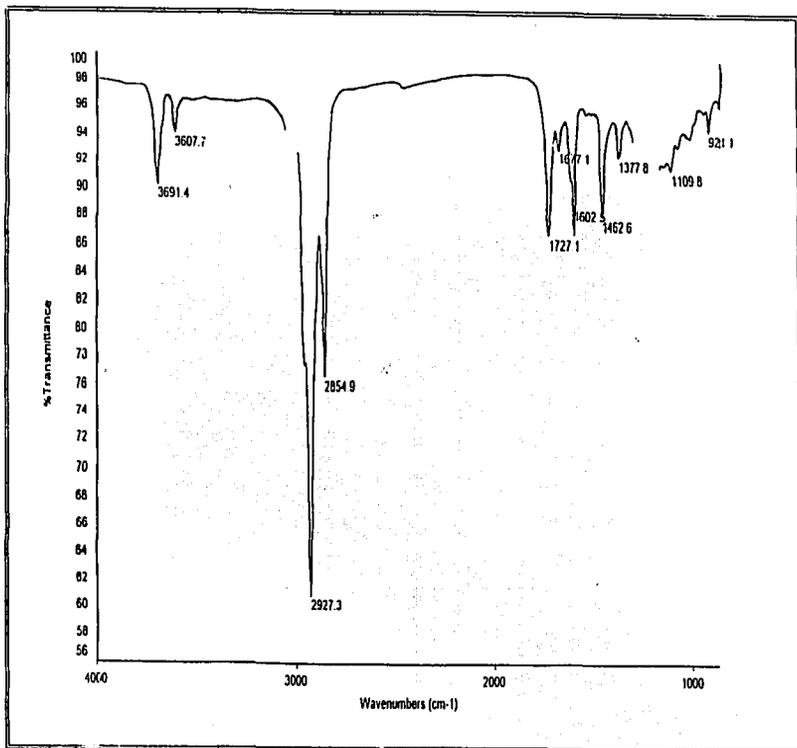


Biotransformación de la rickelina y de la desacetilrickelina con hongos filamentosos.



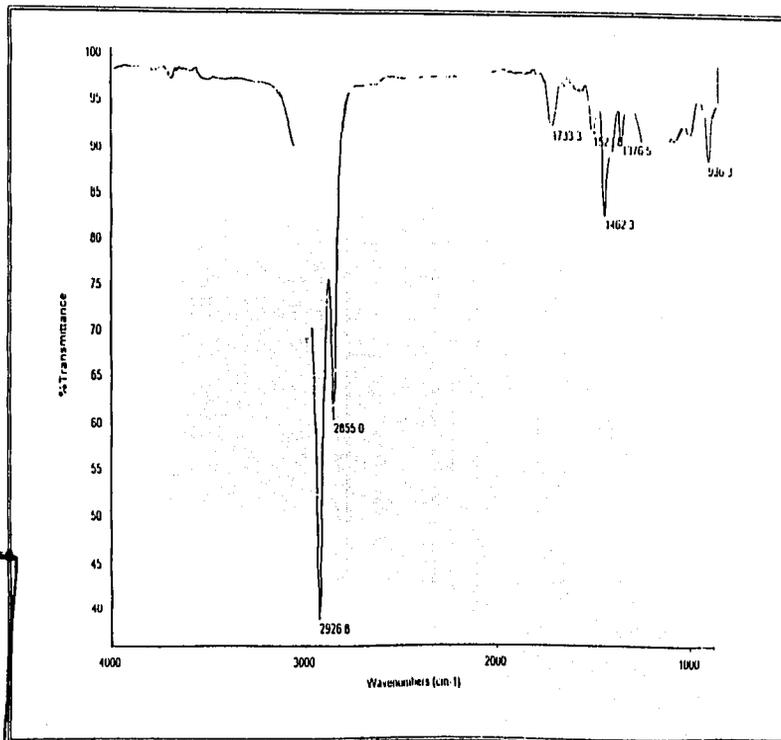
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectro 27. IR (CHCl₃) de 221.



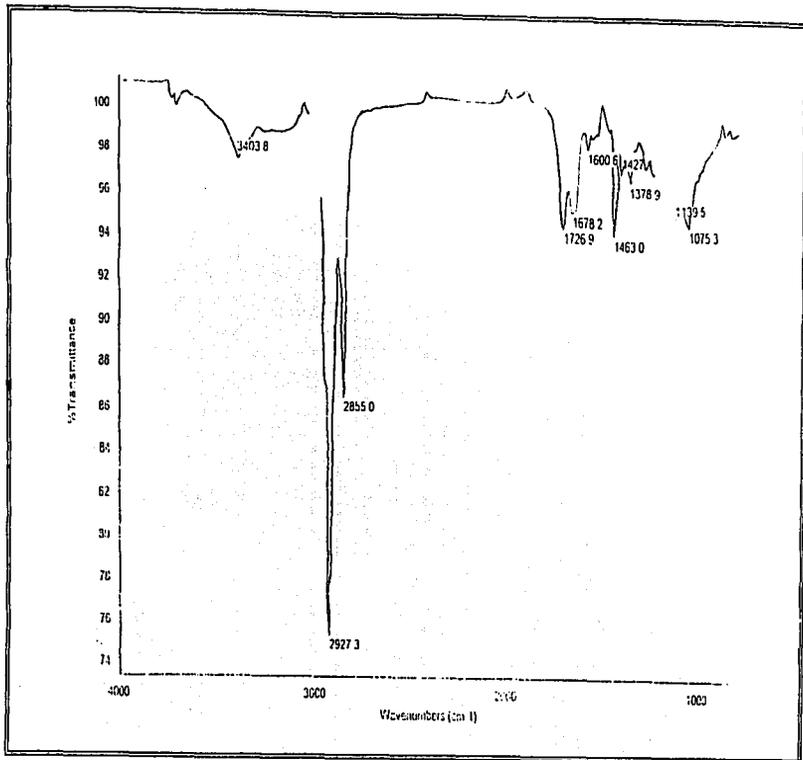
TESIS CON
FILA DE ORIGEN

Espectro 28. IR (CHCl₃) de 222.



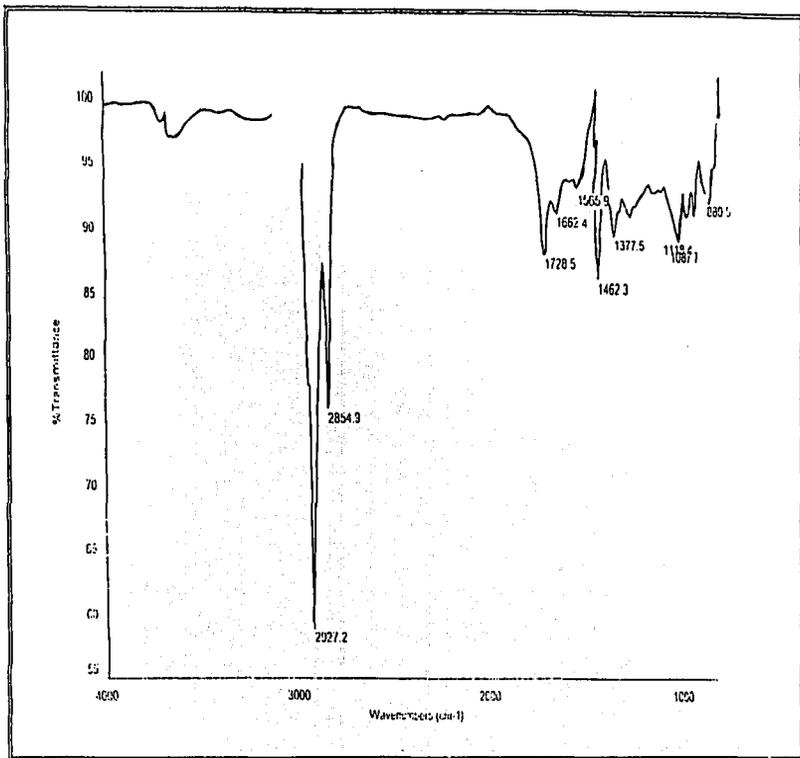
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectro 29. IR (CHCl₃) de 223.



TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN

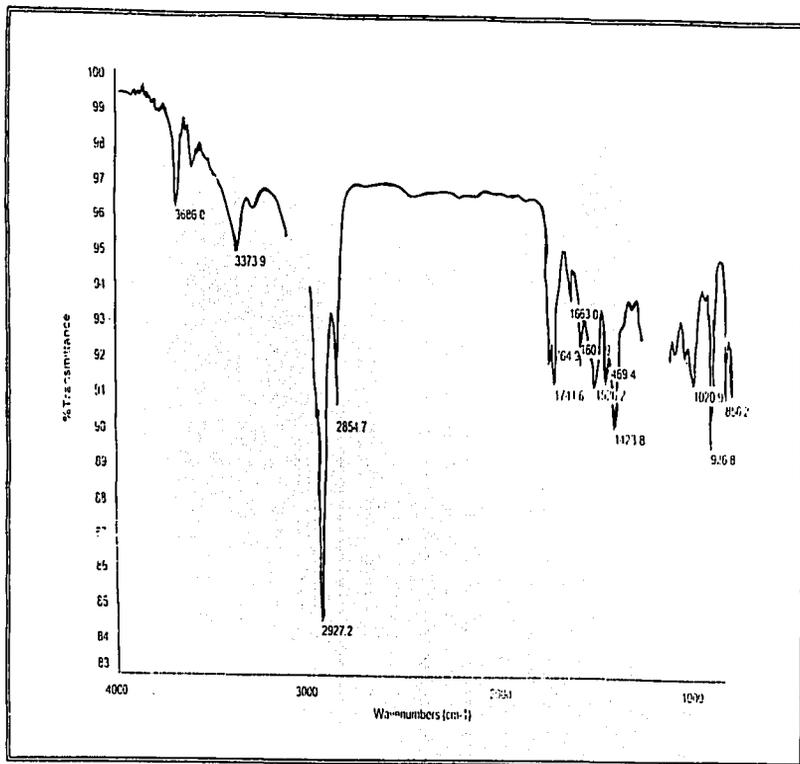
Espectro 30. IR (CHCl₃) de 224.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 31. IR (CHCl₃) de 225.



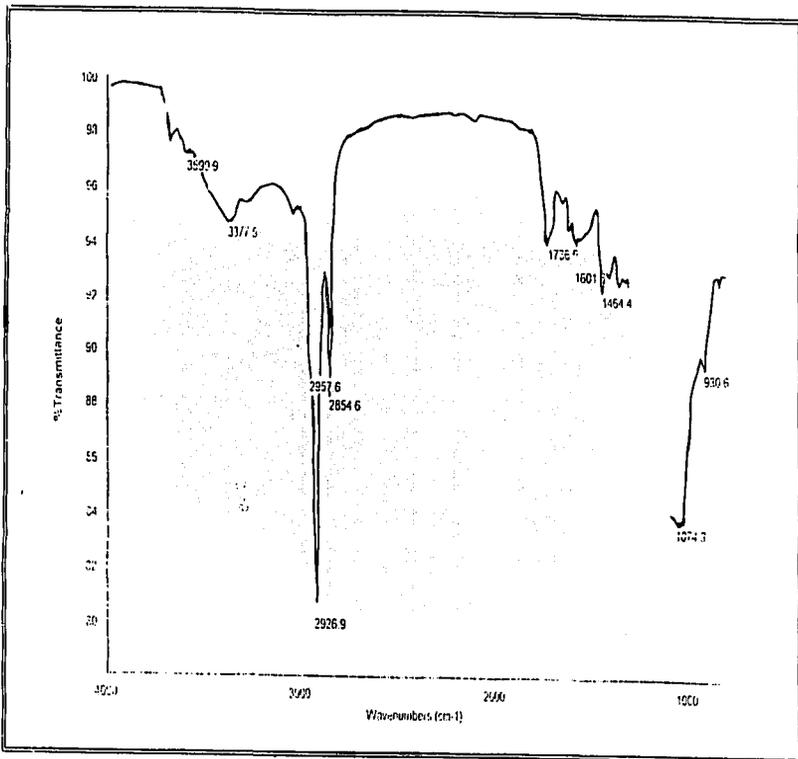
TESIS CONT

Espectro 32. IR (CHCl₃) de 226.



Biotransformación de la nicotina y de la desacetilnicotina con *Bacillus thuringiensis*

125



ESTE CON
FALTA DE ORIENTA
NO ESTÁ

IX. CONCLUSIONES.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Del presente trabajo se derivan las siguientes conclusiones:

1. Se asignaron todas las señales correspondientes a los hidrógenos y carbonos que integran la molécula de la ridentina a partir de sus espectros de RMN¹H, y RMN¹³C.
2. Se obtuvo el diacetato de la ridentina, del cual se dan a conocer sus propiedades físicas y espectroscópicas.
3. De la biotransformación de la ridentina con el cultivo de células de zanahoria, se obtuvo el epímero de la α -vulgarina (217), sustancia novedosa caracterizada con base a sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas.
4. De los procesos de biotransformación con hongos filamentosos de la ridentina y de la desacetilconfertiflorina se puede concluir que dicha transformación es factible, con la limitante del bajo rendimiento (<5%) que se obtiene de cada uno de los productos descritos en el presente trabajo.
5. Se asignaron todas las señales correspondientes a los hidrógenos y carbonos que integran la molécula de la desacetilconfertiflorina a partir de sus espectros de RMN¹H, y RMN¹³C.
6. De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que los objetivos planteados para el presente trabajo fueron alcanzados en su totalidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

126-A

X. SUGERENCIAS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



1. Realizar el proceso de biotransformación de la ridentina y de la desacetilconfertiflorina con otros hongos (*Botrytis cinerea*, *Rhizopus ssp.*, *C. echinulata*, *R. oryzae*, entre otros).
2. Optimizar el proceso de bioconversión de la ridentina con el cultivo de células de zanahoria.
3. En la cinética de crecimiento de los microorganismos, determinar el consumo de carbohidratos por un periodo más largo de tiempo (> a 169 h).
4. Llevar acabo el proceso de bioconversión, separando la biomasa obtenida del medio de cultivo y adicionándola a otro medio de cultivo con el sustrato como única fuente de carbono.
5. Evaluar la actividad biológica de los productos de bioconversión (propiedades tóxicas, antimicrobianas, antitumorales, antiinflamatorias, etc).
6. Medir la relación existente entre la biomasa empleada en la biotransformación (antes de la adición del sustrato y después de la transformación del mismo) y la cantidad de producto bioconvertido obtenido, para duplicar la cantidad de biomasa con respecto al sustrato.

RECIBIDO CON
FALLA DE ORIGEN

122-A

XI. BIBLIOGRAFÍA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



1. Namburger, M. and Hostettmann, K. 1991. **Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine.** *Phytochemistry* **30**, 3864.
2. Rzedowski, J. 1972. **Contribuciones a la fitogeografía florística e histórica de México.** Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las *Compositae* mexicanas. *Ciencia* **26**, 123.
3. Bruneton, J. 1991. **Elementos de fitoquímica y farmacognosia.** Edit. Acribia, España 284.
4. Domínguez, X. 1979. **Métodos de investigación en fitoquímica.** Edit. Limusa, México 93.
5. Hegnauer, R. 1964. **Chemotaxonomie der Pflanzen.** Birkharsel Verlag. Stuttgart 448.
6. Linares, E., Flores, B., and Bye, R. 1996. **Selección de plantas medicinales de México.** Ed. Limusa. México 42.
7. Geissman, T. A., and Irwin, M. 1970. **Chemical contributions to taxonomy and phylogeny in the genus *Artemisia*.** *Pure an Applied Chemistry* **21**, 167.
8. Roth, R. and Actobn, N. 1989. **The isolation of Sesquiterpene from *Artemisia annua*.** *Journal of Chemical Education* **66**, 349
9. Cancino, A., Cano, A. and Delgado, G. 1993. **Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp *mexicana*.** *Phytochemistry* **33**, 1113..
10. Ortiz, B. 1986. **Aztec sources of some mexican folk medicine.**The art and the science. (Steiner, R.) American Chemical Society 1-21.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



11. Cancino, A. 1991. **Análisis fitoquímico de *Artemisia ludoviciana* en busca de sustancias con propiedades antimaláricas.** Tesis de Maestría (Química Orgánica). México. Universidad Autónoma del Estado de Morelos
12. Balderas, J. 1996. **Estudio químico de *Artemisia ludoviciana* ssp. *Mexicana*.** Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México (FES-Zaragoza), México.
13. Romo, J., Romo de Vivar, A., Treviño, R., Nathan, J., and Diaz, E; 1970. **Constituents of *Artemisia* and *Crysanthemum* species, the structures of chrysartemins A and B.** *Phytochemistry* **9**, 1615.
14. Jakupovic, J., Tan, R., Bohimann, F., Boldt, P. 1991. **Sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana*.** *Phytochemistry* **30**, 1573.
15. Marco, J. and Barbera, O. 1990. **Natural products from the genus *Artemisia ludoviciana*.** Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier Science. Publishers Amsterdam 119
16. Lee, K. H., and Geissman, T. A. 1970. **Sesquiterpene lactones of *Artemisia* constituents of *A. ludoviciana* ssp. *mexicana*.** *Phytochemistry* **9**, 403.
17. Fischer, N. and Mabry, J. 1967. **New Pseudoguanolides from *Ambrosia confertiflora* D. C.** *Tetrahedron* **23**, 2596.
18. Yoshioka, H., Mabry, T., and Timmerman, B. N. 1973. **Sesquiterpene lactones.** Chemistry, NMR and Plant Distribution. University of Tokyo Press.
19. Inayama, S., Ohkura, T., Kawamata, T., and Yanogito, M. 1974. **Ambrosic acid, a new irritant principle from *Ambrosia artemisiifolia*,** *Chem. and Pharm. Bull* **22**, 1435.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



20. Stefanovic, M., Jockic, A., Behbud, A. Jeremic, D. 1976. New sesquiterpenic lactones from *Ambrosia artemisiifolia*, 8-acetoxy-3-oxopseudoguaian-6, 12-olide and 4-hydroxy-3-oxo-pseudoguaian-6, 12-olide. *Bull. Acad. Serb. Sci. Arts. Science Natura* 54, 43.
21. Raszeja, W., and Gill, S. 1977. Isolation and identification of psilostachyin B from *Ambrosia artemisiifolia*. *Planta Medica* 32, 319.
22. Stefanovic, M., Jockic, A., and Behbud, A. 1972. Psilostachyin and pilostachin C from yugoslav *Artemisia vulgaris* and *Ambrosia artemisiifolia*. *Glas. Hem. Drus* 31, 463.
23. Chubinidze, V., Beradze, L. And Buchridze, L. D. 1984. Chemical Composition of the essential oil of *Ambrosia artemisiifolia*. *Khim. Prir. Soedin.*, 529.
24. Seaman, F. C. and Mabry, T. J. 1979. Sesquiterpene lactones of diploid and tetraploid *Ambrosia comphorata*. *Biochemistry Systemic Ecology* 7, 3.
25. Kumamoto, J., Scora, R. W., and Payne, W. 1975. Ambrosial a dehydrocitril isolated from the leaf oil of *Ambrosia confertiflora*. *Journal of Agriculture food Chemistry* 23, 123.
26. Herz, W., Raulais, D. and Anderson, G. D. 1973. Sesquiterpene lactones of *Ambrosia confertiflora*. *Phytochemistry* 12, 1415.
27. Bohlmann, F., Zdero, C. and Lonitz, M. 1977. New guagen-derivative aus *Parthenium hysteroporus* and ein weitras pseudoguaianolide aus *Ambrosia cumanensis*. *Phytochemistry* 16, 575.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



28. Borges del Castillo, J., Manreza, M. T., Ramón, J. L., and Vázquez, P. 1978. Altamisine a new sesquiterpene lacton from *Ambrosia cumanensis*. *Tetrahedron Letter*. 1513.
29. Borges del Castillo, J., Bradley-Delson, A., Manresa, M. T., Vázquez, P. and Rodríguez, L. 1979. Paulitin and isopaulitin, two new sesquiterpenic lactones from *Ambrosia cumanensis*. *Society Chemistry of Perú* 45, 53.
30. Rodríguez, L. F. and Vázquez, P. 1981. Sesquiterpene lactones from *Ambrosia cumanensis*. H. B. K. *An. Quim. Ser. C* 77, 52.
31. Borges del Castillo, J., Manreza, M. T., Ramón, J. L., and Vázquez, P. 1980. New psilostachyins from *Ambrosia cumanensis*. H. B. K. *An. Quim. Ser. C* 76, 277.
32. Arriaga G. F. Borges del Castillo, J., Vázquez, P. and Rodríguez, L. 1985. Salvadorian *Compositae* Part 8. N-alkanes and Triterpenoids from some Salvadorian *Compositae*. *Fitoterapia* 56, 123.
33. Herz, W., Fitzhenri, B. and Anderson, G. D. 1973. 5, 4'-dihydroxy-3, 7-dimethoxyflavone from *Ambrosia eriocentra*. *Phytochemistry* 12, 1181.
34. Herz, W., Anderson, G. D., Maurer, G., Maurer, I., Flores, G. 1975. Struktur und synthese der flavone von *Ambrosia grayi nelson*. *Tetrahedron* 31, 1577.
35. Herz, W. Gage, D. and Kumar, N. 1981. Damsinic acid and ambrosanolides from vegetatitve *Ambrosia hispida*. *Phytochemistry* 20, 1601.
36. Abdel Solan, N., Mahmol, Z. F., Ziesche, J., and Ja kupovic. 1984. Sesquiterpenic lactones from *Ambrosia maritima*. *Phytochemistry* 23, 2851

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



37. Seaman, F. C. and Mabry, T. J. 1979. **Dumosin a new secoambrosanolide from *Ambrosia dumosa* (Grey).** *Revista Latinoamericana de Química* 10, 85.
38. Galán, C., Cuevas, J., Infante, F., & Domiguez, E. 1990. **Variación anual de la concentración de aeropolen de *Compositae* en la atmósfera de Córdoba.** *Asoc. Palinol. Leng. Española* 5, 19-28.
39. Herz, W., Anderson, G., Gibaja, S, and Raulais, D. 1969. **Sesquiterpene lactones of some *Ambrosia* species.** *Phytochemistry*. 8, 877.
40. Vichnewski, W., Kazumi, Shuahama, I., Rosamke, R. C. 1976. **Granilin and ivasperin from *Ambrosia poyistachya*.** RMN¹³C, espectra of hydroxylated isoalantones. *Phytochemistry* 15, 1531.
41. Oberti, J. C., Silva, G. L., Sosa, V. E., Kulanthaivel, P. and Herz, W. 1986. **Ambrosanolides and secoambrosanolides from *Ambrosia tenuifolia*.** *Phytochemistry* 25, 1355.
42. Morris K., Eakin. M. A. and Thomas A. M. 1971. **Tumor inhibitors. Structure-cytotoxicity relationship among the sesquiterpene lactones.** *Journal of Medicinal Chemistry* 14, 1147.
43. John Randall. 1999. **Checklist of the Vascular Plants of California (excluding grasses and allies).** Federal Status Jun.-Sep. 27.
44. N. H. Fisher, T. J. Mabry, H. B. Kagan. 1968. **The structure of Tamaulipin A, a new germacranolide from *Ambrosia Confertiflora* (Compositae).** *Tetrahedron* 24, 4091.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



45. María Isabel Chávez Uribe. 1987. **Aislamiento y determinación estructural de los sesquiterpenos de una población de *Ambrosia confertiflora*.** Tesis de Licenciatura (Química). Universidad Nacional Autónoma de México.
46. Picman, A; 1986. **Biological activities of sesquiterpene lactones.** *Biochemical Systematics and Ecology* 14, 255.
47. Pérez, M. 1994. **Plantas medicinales, etnobotánica y fitoquímica; importancia de la investigación interdisciplinaria.** *Folium* 7, 2.
48. F. Couillaud. 1998. **Biological Activities of Natural Sesquiterpene Lactones and the Effect of Synthetic Sesquiterpene Derivatives on Insect Juvenile Hormone Biosynthesis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 2030.
49. Morrison and Boyd. 1985. **Organic chemistry.** 4a Edición. Fondo educativo Interamericano. New York University 441.
50. Geissman, T. A. and Crout, D. H. 1969. **Organic chemistry of secondary plant metabolism.** Freeman Cooper and Company. E. U. 269.
51. Willem de Kraker, Jean., Franssen, Maurice C. 1998. **(+)-Germacrane a biosynthesis. The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory.** *Journal of Plant Physiology* 117, 1381.
52. Fischer H. D, Fischer N. H., and Oliver E. J. 1979. **Progress in the chemistry of organic natural products.** Biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. Springer-Verlag. New York 48.
53. Kelsey, R. and Shafizadeh F. 1979. **Sesquiterpene lactones and systematics of the genus *Artemisia*.** *Phytochemistry* 18, 1591.



54. Rodriguez, E., Towers, G. And Mitchell, J. 1976. **Biological activities of sesquiterpenes lactones.** *Phytochemistry* **15**, 1573.
55. Francisco, A. Macias., Juan, C. G., Galindo, Diego Castellano, and Raúl F. Velasco. 1999. **Sesquiterpene Lactones with Potential Use as Natural Herbicide Models (I): trans,trans-Germacranolides.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **47**, 4407.
56. Hall, H. 1978. **Antitumor agents XXX: Evaluation of α -metilen- γ -lactone containing agents for inhibition of tumor growth, respiration, and nucleic acid synthesis.** *Journal of Pharmaceutical Science* **67**, 1235.
57. Thomas J. Schmidt. 1997. **Structure-cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpene lactones.** *Journal of Natural Products* **60**, 252.
58. Khaled Y. Orabi, ahmed M. Galal, Abdel-Rahim S. 1999. **Microbial metabolism of artemisitene.** *Phytochemistry* **51**, 257.
59. Tae Hyeon Koo, Jeong-Hyung Lee, and Yun Joo Park. 2001. **A sesquiterpene lactone, costunolide, from *Magnolia grandiflora* inhibits NF-kB by targeting IkB phosphorylation.** *Planta Medica* **67**, 103.
60. Tamaki, H., Robinson, R. W., Anderson, J. L. and Stoewsand, G. S. 1995. **Sesquiterpene lactones en virus-resistant *Lettuce*.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **43**, 6.
61. Wedge D. E., Galindo J. C., Macias F. A. 2000. **Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs.** *Phytochemistry* **53**, 747.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



62. Segal, A., Katz C, and Van Duuren, B. L. 1971. **Structure and tumor promoting activity of anthralin (1,8-dihydroxy-9-anthrone) and related compounds.** *Journal of Medicinal Chemistry* 14, 1147.
63. Fischer, N. H., T. Lu, C. L. Cantrell, J. Castañeda-Acosta, L. Quijano and S. G. Franzblau. 1998. **Antimycobacterial Evaluation of Germacranolides.** *Phytochemistry* 49, 559.
64. Barrero, A., Mar Herrador M., Quiles, J. F., Alvarez, R. M., and Simmonds, M. S. J. 1999. **Bioactive sesquiterpene from *Santolina rosmarinifolia* ssp *Canescens*.** *Phytochemistry* 51, 529.
65. Fischer N., Weidenhamer J., Riopel J., Quijanos L and Menelaou M. 1990. **Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study.** *Phytochemistry* 29, 2479.
66. Leo A. Paquette, Claudio F. Sturino, Xiaodong Wang, Jeremy C. Prodder, and Dongsoo Koh. 1996. **A Unified Strategy for the Stereocontrolled Construction of Structurally Unusual Sesquiterpene Lactones. Asymmetric Synthesis of Vulgarolide and Deoxocrioplide.** *Journal of the American Chemical Society* 118 5620.
67. Romo de Vivar, A., Vázquez, F. Y y Zetina C. 1977. **Lactonas sesquiterpénicas de *Artemisia mexicana* var *angustifolia*.** *Revista Latinoamericana de Química* 8, 127.
68. Hendrickson, J. B. 1959. **Stereochemical implications in sesquiterpene biogenesis.** *Tetrahedron* 7, 82.
69. Pepler H, Perlman D. 1994. **Microbial technology.** 2a ed. Vol I. Academic-Press, U. S. A. 760-765.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



70. Malcolm D. L. 1977. **The development of biochemical engineering science in Europe.** *Journal of Biotechnology* 59, 11.
71. Black J. 1996. **Microbiology principles and applications.** 3a Ed. Editorial Prentice Hall. U. S. A. 136.
72. Fesner W. 2000. **Biocatalisis.** New York. Springer-Verlag. 6-111
73. Godfrey, T and Reichelt J. 1983. **Industrial enzymology.** Macmillan Publishers Ltd United Kingdom. 17-25
74. Petrucci, R. 1977. **Química general.** Addison Wesley Iberoamericana. México 289-300.
75. Theodore M. Tarasow, Sandra L. Tarasow, Bruce E. 1997. **Application of in vitro selection to isolate pyridine-modified RNA molecules that catalyse a Diels-Alder.** *Nature* 389, 54.
76. Gordon, Bickerstaff, F. 1997. **Immobilization of enzymes and cells.** New Jersey. Editorial, Human Press. 117-133.
77. García-Granados A., Martínez, A., Parra, F. 1992. **Biotransformaciones de sesquiterpenos y diterpenos una herramienta para la semisíntesis de productos naturales.** *Revista Latinoamericana de Química* 23, 49.
78. Pepler, H. 1979. **Microbial Technology.** Academic Press: N.Y. 357-367.
79. Roberts, S. M., Turner, A. J., Willets A., and Turner, M. K. 1995. **Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms,** United States of America: Cambridge University. 11-73.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



80. Granados, A. G., Parra, A. and Simeó Y. 1998. **Chemical enzymatic and microbiological synthesis of 8-12eudesmanolides: synthesis of sivasinolide and yomogin analogues.** *Tetrahedron* 54, 4421.
81. García, A. Granados., Martínez, A., and Rivas F. 1991. **Chemical-microbiological synthesis of 6b-eudesmanolides from 11-hydroxyl derivatives: synthesis of 6b-dendroserins by *Rhizopus nigricans*.** *Tetrahedron Letters* 32, 5383.
82. Garcia, A. Granados., Martínez, A., Onorato E., Arias, Maria., and-Rivas, F. 1991. **Chemical-microbiological synthesis of 6b-Eudesmanolides by *Curvularia lunata* cultures from eudesmanes witch functions at C-1 and C-6.** *Tetrahedron Letters* 47, 91.
83. García, A. Granados., Martínez, A., Parra A., and Rivas F. 1993. **Chemical-microbiological synthesis of 6b-Eudesmanolides from 11-hydroxyl derivatives obtained by *Rhizopus nigricans* cultures synthesis of 6b- dendroserins.** *Tetrahedron Letters* 47, 1091.
84. Khaled Y. Orabi. 2000. **Microbial transformation of the eudesmane sesquiterpene Plectranthone.** *Journal of Natural Products* 63, 1709.
85. Barrero, A. F., Oltra, E. J., Raslan, D. S., and Saúde, D. A. 1999. **Microbial transformation of sesquiterpene lactones by the fungi *Cunninghamella echinulata* and *Rhizopus oryzae*.** *Journal of Natural Products* 62, 726.
86. Buchanan, O. G., and Reese, P. B. 2001. **Biotransformation of diterpenes and diterpenes derivatives by *Beauveria bassiana* ATCC 7159.** *Phytochemistry* 56, 141.
87. Duran R., Corrales E., Hernández R., and Collado I. 1999. **Biotransformations of caryophyllene oxide by *Botrytis Cinerea*.** *Journal of Natural Products* 62, 41.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



88. Elizalde M. Mara Nidia. 1999. **Estudio químico y evaluación biológica de *A. ludoviciana ssp mexicana***. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. FES. Zaragoza, México.
89. Demore, A. E. 1989. **The uses of NMR spectroscopy in the structure determination of natural products.** *Natural Products Report* 6, 111.
90. Irwin, M. A., Lee, K. H., Simpson, R. F., and Geissman, T. A. 1969. **Sesquiterpene lactones of *Artemisia*: Ridentin.** *Phytochemistry* 8, 2009.
91. Irwin, M. A., and Geissman, T. A. 1973. **Ridentin-B: an eudesmanolide from *A. tripantita ssp rupicola*.** *Phytochemistry* 12, 871.
92. Mata, R., Delgado, G., and Romo de Vivar. A. 1984. **Sesquiterpene Lactones of *Artemisia mexicana var angustifolia*.** *Phytochemistry* 23, 1665.
93. Lee, K. H., Simpson, R. F., and Geissman, T. A. 1969. **Sesquiterpenoid lactones of *Artemisia* constituents of *Artemisia cana ssp. cana*: The Structure of Canin.** *Phytochemistry* 8, 1515.
94. Noriega Galicia J., Espinoza Cano M., Ruiz Cancino A., Cano Flores A, y Delgado G. 1993. **Estudio de RMN¹³C en algunas lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de eudesmano y sus derivados.** 3° Congreso Latinoamericano de Fitoquímica, Celaya Gto. México.
95. Vlatka, V. N., Todorovic, M. R., Vele T.B. and Slobodan M. 1999. **Guianólidos from *Centaurea nicolai*.** *Phytochemistry* 52, 385.
96. March. J. 1992. **Advanced organic chemistry reactions, mechanism and structure.** Wiley-Intercience. 4° Ed. New York.

VENIR CON
FALLA DE ORIGEN



97. Amate, Y., García-Granados, A. López, F. A., Saenz de Buruaga. 1990. **Synthesis, biotransformation and stereochemistry of 6b sesquiterpene lactones.** *Tetrahedron*, **46**, 6939.
98. Cejudo, J.J., García Granados A., Parro A, and Rivas F. 1994. **Partial Synthesis of 6 β -eudesmanólides and 6 β -guayanólides from 6 α -eudesmanolides; Synthesis of Analogues of Artepaulin, Colartin and Tannunolide.** *Tetrahedron* **50**, 2917.
99. Lorenz Miller Gail. 1959. **Uses of dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry* **31**, 426.
100. H. Dodds, John and Lorin W, Roberts. 1985. **Experiments in plant tissue culture.** Cambridge University Press. 54.

TECNOLOGIA
FALLA DE ORIGEN

XII. ANEXOS.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ANEXO I.

TESIS CON
FOLIA DE ORIGEN



Medio YEPGA (Yeast extract, peptone, glucose, agar).

Para la selección de un medio de cultivo que provea el crecimiento de biomasa se deben tomar en cuenta las exigencias metabólicas en cuanto a nutrientes por el microorganismo a emplear, ya que los nutrientes son los compuestos químicos procedentes del medio ambiente que son utilizados por una célula para sintetizar las moléculas necesarias para la creación de nuevas células.

Todos los microorganismos requieren de una fuente de carbono (energía) para crecer, alguna forma de nitrógeno (un constituyente de las proteínas y de los ácidos nucleicos), así como de fósforo y de azufre. Algunos elementos traza (compuestos inorgánicos), que se requieren en cantidades pequeñas, tales como el potasio, el hierro y el zinc (cofactores), que los microorganismos necesitan para crecer.

Por lo tanto la mejor elección que asegura estas exigencias es un medio complejo, ya que cuenta con los requerimientos mencionados, el medio líquido YEPGA es un medio complejo utilizado para el crecimiento de hongos en los procesos de biotransformación, el cual permite un incremento de biomasa y se encuentra constituido por:

Medio YEPGA (pH 7)

| | |
|----------------------|--------|
| Extracto de levadura | 0.1 % |
| Extracto de carne | 0.1 % |
| Peptona | 0.1 % |
| Glucosa | 0.5% |
| Agua | 100 mL |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



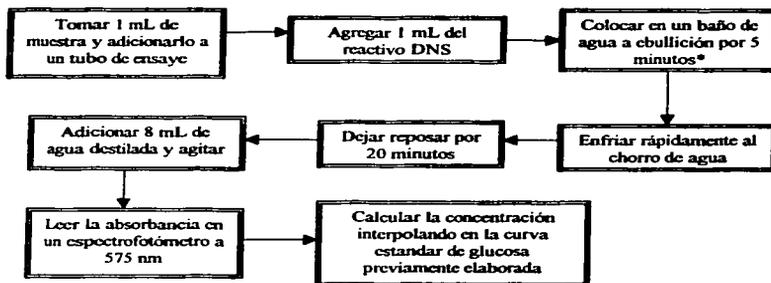
Determinación de azúcares por el método del DNS.

El reactivo del ácido 3, 5-dinitrosalicílico, se desarrolla para la cuantificación de azúcares reductores y está formado por: hidróxido de sodio 1.4 g, ácido 3, 5-dinitrosalicílico 0.75 g, sal de Rochelle (tartrato de sodio y potasio) 21.6 g, fenol 0.54 g, y *m*-bisulfito de sodio 0.59 g, en 100 ml de agua destilada.

En donde la sal de Rochelle, se adiciona para prevenir la acción del oxígeno disuelto sobre el reactivo; el fenol para incrementar la intensidad del color producido, y el bisulfito con la finalidad de estabilizarlo. El álcali se requiere para la acción reductora del carbohidrato sobre el ácido dinitrosalicílico.

El fundamento de reacción es la reducción del ácido 3, 5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico y la oxidación del grupo aldehído a grupo carbonilo. Sin embargo, no se ha esclarecido totalmente la relación estequiométrica entre el ácido aminonitrosalicílico y los azúcares, debido a que los diferentes tipos de azúcares generan diferentes intensidades de color; lo cual sugiere que la química de la reacción puede ser apreciablemente más compleja [99].

Procedimiento



* Cuando son varias muestras, todos los tubos se deben colocar al mismo tiempo.

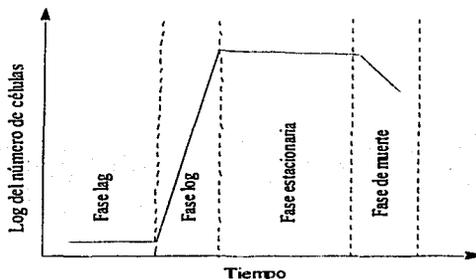
TESIS CON
DE ORIGEN

ANEXO II.

TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN



La curva de crecimiento permite conocer el comportamiento del microorganismo en cuatro fases como se muestra en el esquema 58.



Esquema 58. Curva de crecimiento.

La fase lag, inicia cuando las células son transferidas de un medio a otro, en esta fase el microorganismo comienza a adaptarse a las nuevas condiciones del medio³⁰. En la fase log, las células están adaptadas a las nuevas condiciones de crecimiento, el cual permanece constante y es independiente de la concentración de sustrato³¹.

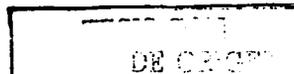
En la fase estacionaria, el crecimiento comienza a cesar hasta mantenerse constante como resultado de la escasez de sustrato, cambio de pH, falta de oxígeno y excreción de metabolitos tóxicos, además algunas células comienzan a aprovechar nutrientes liberados por la lisis de otras células.³²

En la fase de muerte, las reservas energéticas de las células están agotadas, la cantidad de microorganismos sobrevivientes comienza a disminuir de manera exponencial

³⁰ La concentración y el tipo de inóculo puede alterar diversos parámetros como pH, aumento de nutrientes, decremento de inhibidores de crecimiento y duración de esta fase.

³¹ El tipo de crecimiento es descrito cuantitativamente como la duplicación de células por unidad de tiempo en bacterias y levaduras o duplicación de biomasa por unidad de tiempo para hongos, estos datos graficados en papel semilogarítmico dan por resultado una línea recta.

³² Principalmente liberando proteínas.



I. Determinación de biomasa por peso húmedo de los hongos filamentosos *A. ochraceus*, *A. niger* y la levadura *B. bassiana*

| PRODUCCIÓN DE BIOMASA (g) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---|-----|------|-----|-----|------|------|------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|------|
| Tiempo (h) | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 21 | 25 | 28 | 45 | 52 | 71 | 78 | 97 | 104 | 169 |
| Muestra | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 0.3 | 0.48 | 0.5 | 0.28 | 0.3 | 0.2 | 0.2 | 0.15 |
| A2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1 | 0.21 | 0.3 | 0.39 | 0.4 | 0.33 | 0.3 | 0.2 | 0.24 | 0.2 |
| B1 | 0 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | * | * | 0 | 0.1 | 0.1 | 0.3 | 0 | 0 | 0.1 | 0 | 0 | 0.82 | 0.83 |
| B2 | 0 | 0.1 | 0.18 | 0 | 0.1 | 0 | 0 | 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0.19 | 0.2 | 0 | 0.32 | 0.45 | 0.56 |
| C1 | 0 | 0 | 0 | * | 0 | 0.01 | 0.01 | 0 | 0 | 0 | 0.04 | 0.3 | 0.5 | 0.43 | 0.47 | 0.5 | 0.5 |
| C2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.025 | 0.03 | 0.035 | 0.37 | 0.6 | 0.5 | 0.5 | 0.4 | 0.3 |

* Indica que las muestras fueron eliminadas del estudio

| VALORES LOGARITMICOS DE LA BIOMASA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ln(x) ^a | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tiempo (h) | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 21 | 25 | 28 | 45 | 52 | 71 | 78 | 97 | 104 | 169 |
| Muestra | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A1 | | | | | | | | 2.079 | 2.485 | 2.955 | 2.996 | 2.416 | 2.485 | 2.079 | 2.079 | 1.792 | |
| A2 | | | | | | | | 1.386 | 2.128 | 2.485 | 2.747 | 2.773 | 2.58 | 2.485 | 2.079 | 2.262 | 2.079 |
| B1 | | 1.386 | 1.386 | 1.386 | | | 0 | 1.386 | 1.386 | 2.485 | 0 | 0 | 1.386 | 0 | 0 | 3.21 | 3.5 |
| B2 | | 1.386 | 1.974 | 0 | 1.386 | | | 1.386 | | | | 2.028 | 2.079 | | 2.532 | 2.89 | 3.11 |
| C1 | | | | | | -0.92 | -0.92 | | | | 0.47 | 2.485 | 2.996 | 2.845 | 2.934 | 2.896 | 2.996 |
| C2 | | | | | | -0.92 | -0.92 | -0.22 | 0 | 0.182 | 0.336 | 2.895 | 3.178 | 2.996 | 2.996 | 2.773 | 2.485 |

^a x representa la biomasa expresada en g.

** Indica que las muestras fueron eliminadas del estudio.

A: *A. niger*

B: *B. bassiana*

C: *A. ochraceus*

1 y 2 Indican que el estudio fue realizado por duplicado



INSTITUTO DE QUÍMICA

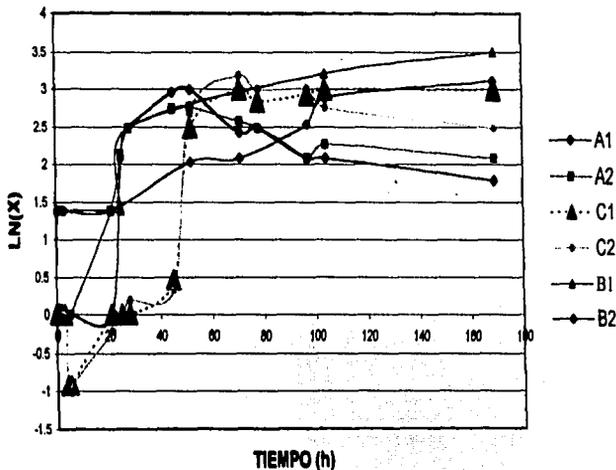
Biomasa producida por los hongos filamentosos *A. niger*, *A. ochraceus* y la levadura *B. basiana*



Biotransformación de la ricinólina y de la deoxiacetilconferiflorina con hongos filamentosos.

ANEXO II

CINÉTICA DE CRECIMIENTO



A: *A. niger*
 B: *B. basiana*
 C: *A. ochraceus*

1 y 2: Indican que el estudio se realizó por duplicado.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

147



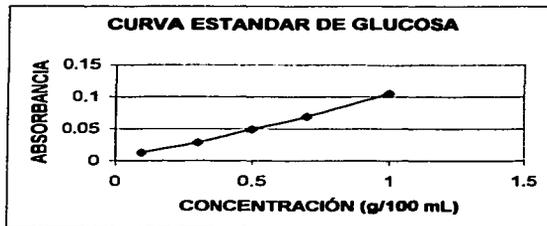
2. Curva estandar de glucosa

| CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA | | | |
|-----------------------------|-----------|------------|-------------|
| CONCENTRACIÓN (g/100 mL) | A1 | A2 | Ap |
| 0.1 | 0.011 | 0.014 | 0.0125 |
| 0.3 | 0.025 | 0.032 | 0.0285 |
| 0.5 | 0.047 | 0.051 | 0.049 |
| 0.7 | 0.067 | 0.071 | 0.069 |
| 1 | 0.107 | 0.103 | 0.105 |
| R ² | 0.9885224 | 0.99869409 | 0.99471549 |
| m= | | | 0.10311475 |
| b= | | | -0.00081987 |

A: absorbancia

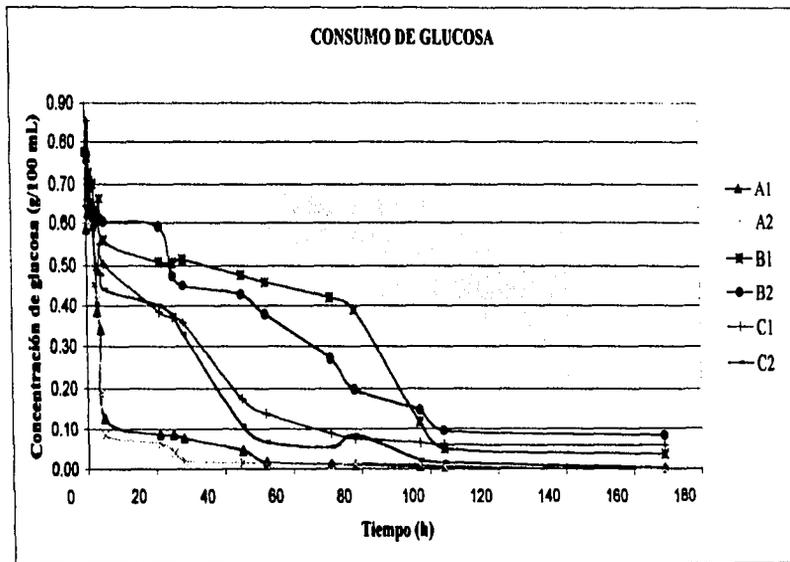
Ap: promedio de las absorbancias

1 y 2 Indican que el estudio se realizó por duplicado.



TESIS CON
VALOR DE ORIGEN

Consumo de glucosa por los hongos filamentosos *A. niger*, *A. ochraceus* y la levadura *B. bassiana*.



A: *A. niger*
B: *B. bassiana*
C: *A. ochraceus*

1 y 2: Indican que el estudio se realizó por duplicado.

Biotransformación de la riboflavin y de la decarboximetilriboflavin con *Aspergillus* filamentosos.

ANEXO II

INSTITUTO NACIONAL DE ORIGEN

ANEXO III.

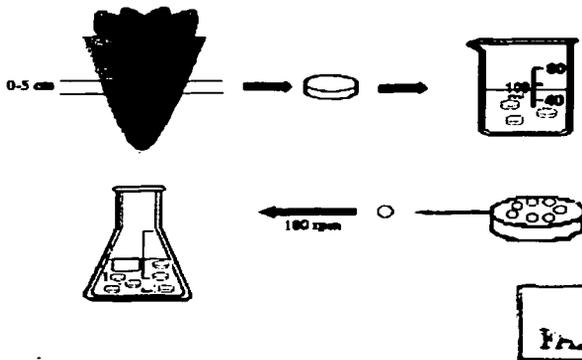
TECIS CON
FALLA DE ORIGEN



Cultivo de células de zanahoria.

La zanahoria se lavó con agua y se removió de 2 a 3 mm del tejido vegetal raspando con una cuchara la superficie del mismo. Se cortó transversalmente la zanahoria en rebanadas de aproximadamente 10 mm de grosor, y se colocaron inmediatamente en un vaso con agua. Posteriormente se transfirieron los discos de zanahoria en una solución de hipoclorito de sodio al 5 % (v/v) por 10 min, y finalmente se colocaron en vasos de presipitados con agua destilada³³, para remover el exceso de hipoclorito de sodio.

Los discos obtenidos del procedimiento anterior se colocaron en condiciones asépticas sobre cajas de Petri y se cortaron discos pequeños de 0.5 cm de diámetro de la zona circundante a el centro, posteriormente estos discos se adicionaron a un medio de cultivo liquido preparado con sucrosa 3 %, IAA (ácido indolacético) 1 % y 0.01 % de cinetina para la inducción del crecimiento celular a 180 rpm 25 °C 120 Horas [100].



DIS CON
DE ORIGEN

³³ Los discos de zanahoria se dejaron reposar por 10 minutos en un vaso de agua destilada y posteriormente se transvasaron a otro vaso con agua destilada limpia.