

50524
43



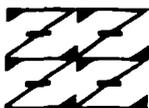
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Transformación Química y Biológica de la
partenolida-Lactona Sesquiterpénica con
esqueleto de Germacrano-

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
ERIKA GARCÍA SALGADO

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



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR: M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

MÉXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Doy gracias a Dios por haberme dado la fuerza y la paciencia para culminar uno de los objetivos más importantes de mi vida, pero sobre todo, le doy gracias por brindarme la oportunidad de continuar en la búsqueda de los demás.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

“Lo que hace que el hombre se supere no es la intensidad de un sentimiento elevado, sino la duración del mismo.”

F. Nietzsche

DEDICATORIAS

A mis Padres:

María Salgado Valdéz

*Gracias, por su apoyo incondicional,
por su ejemplo de tenacidad y sobre todo
por ese gran amor que me reconfortó y
dio fuerzas para seguir adelante.*

Francisco García Vargas

*Gracias, por enseñarme que las cosas no son fáciles y
que hay que ser fuerte ante las adversidades.*

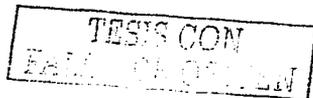
A mis hermanos:

Ma. Eugenia, Andrés, Edgardo y Jaime

*Por que cada uno de ellos, con su ejemplo contribuyó
de una manera u otra en mi formación como
persona y como profesional.*

A Daniel Reyes Chávez:

*Por todo el tiempo que compartimos juntos, por tu
apoyo en los momentos difíciles y por todas las cosas
buenas que posees y conocí de ti. Recuerda que
siempre podrás contar conmigo.*



A Juan Carlos Gallegos Ortega:

Gracias por tu amistad, por todos esos momentos en los que te necesite y siempre estuviste ahí, sereno y con una palabra de aliento. Gracias por todos esos años de tu grata compañía.

A Román Vera Debray:

Gracias, por tu valiosa ayuda para la realización de este trabajo, pero sobre todo por compartir conmigo tu amistad y confianza, al darme la oportunidad de creer en lo que pensabas que no existía.

A Ernesto Rivera Becerril:

Por tu amistad durante la carrera y la realización de ese trabajo, por que siempre creíste en mí, gracias.

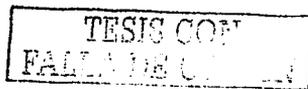
A Maribel Fabián Castellanos:

Gracias, por compartir conmigo tu alegría, tu tranquilidad y por todos los consejos que me ayudaron a mejorar como persona.

A mis amigos:

*Luis Montesinos, Rafael Herrera,
Pedro Alaín, Saraí Campech y
Yolanda López*

Gracias por todas las gratas vivencias, por su amistad a pesar del paso de los años y por ser los culpables de una de las etapas más felices de mi vida.



A mis amigos y compañeros:

*Cecilia, Juan Carlos, Ricardo, Edgar,
Zenaida, Emma, David y Marco.*

*Gracias, por su compañía, confianza y su invaluable
amistad, que espero seguir conservando durante
mucho tiempo.*

A mis compañeros de laboratorio:

*José Manuel, Eloy, Fernando, Marco,
Dulce y Gladys*

Gracias, por todo el tiempo compartido.

A mis sobrinos:

*Abraham, César, Omar, Andrés, Fabián,
Sara, Julio, Adriana y Aarón.*

*Gracias, por todos los momentos de felicidad que
han dejado en mí, al pasar de los años con sus
múltiples ocurrencias.*

A Patricia Ruíz:

*Gracias, por tu amistad, tu confianza y por el
aprecio que sé que me tienes.*

TESIS CON
DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Arturo E. Cano Flores por su confianza y asesoría durante la realización del presente trabajo.

Al personal Técnico-Académico del Instituto de Química de la UNAM.

Al M. en C. Jorge Cárdenas Pérez del Instituto de Química de la UNAM.

Al Dr. Francisco Ruiz Terán y Dr. Arturo Navarro Ocaña, del Laboratorio L-321 de la Maestría en Alimentos, Conjunto "E" Facultad de Química de la UNAM, por el apoyo, asesoría y facilidades prestadas, durante la elaboración del presente proyecto.

Al personal Técnico-Académico del Laboratorio L-321 del Conjunto "E" de la Facultad de Química de la UNAM, por las facilidades prestadas en la realización del trabajo.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez y al Biól. J. M. Hernández Vázquez del Laboratorio L-324, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, *Campus II*. UNAM

TESIS CON
FALLA DE ORDEN



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):

GARCÍA SALGADO ERIKA

Para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito, intitulado: **Transformación Química y Biológica de la partenolida – Lactona Sesquiterpénica con Esqueleto de Germacrano - -**

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

- PRESIDENTE Q.F.B. EVANGELINA MERCADO MARÍN
- VOCAL M. en C. ARTURO E. CANO FLORES
- SECRETARIO. M. en C. SAMUEL SOSOL MÉNDEZ
- SUPLENTE M. en C. LOURDES A. CASTILLO GRANADA
- SUPLENTE DR. ADELFO REYES RAMÍREZ

A T E N T A M E N T E.
"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
VALOR DE ORIGEN

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 XXV Congreso Latinoamericano de Química, Cancún Quintana Roo, en Septiembre del 2002.

TESIS CON
FAN DE ORIGEN

INDICE

TESIS CON
EVALUACION

2

	Página
NOTACIONES EMPLEADAS	i
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
1. TERPENOS	3
2. SESQUITERPENOS	4
2.1 Lactonas sesquiterpénicas	4
2.1.1 Definición	4
2.1.2 Biogénesis	5
2.1.3 Distribución General	9
2.1.4 Aislamiento	9
2.1.5 Reacciones Coloridas	9
2.1.6 Técnicas de Separación	11
2.1.7 Propiedades Espectroscópicas	12
2.1.8 Actividad Biológica	14
3. GERMACRANÓLIDAS	18
3.1 Definición	18
3.2 Distribución	19
4. PARTENÓLIDA	20
4.1 Descripción	20
4.2 Propiedades Físicas	20
4.3 Propiedades Biológicas	20
4.4 Aislamiento	23
5. BIOTRANSFORMACIONES	23
5.1 Definición	23
5.2 Biotransformaciones con microorganismos	25
5.3 Empleo de enzimas en Biotransformaciones y Síntesis Orgánica	27
5.3.1 Clasificación de enzimas	29
5.3.2 Inmovilización de enzimas	31
5.3.3 Métodos de inmovilización de enzimas	32

	Página
5.4 Biotransformación con Cultivos Celulares de Plantas	34
5.4.1 Cultivos Celulares de Plantas Inmovilizados	35
5.4.2 Proyección de las Transformaciones con Cultivos Celulares de Plantas	37
5.5 Biotransformaciones en Lactonas Sesquiterpénicas	38
6. ENSAYOS BIOLÓGICOS	53
6.1 Definición	53
6.2.1 Determinación de la Actividad Antimicrobiana	54
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	56
IV. OBJETIVOS	57
1. OBJETIVO GENERAL	57
1.1 Objetivos Particulares	57
V. HIPÓTESIS	58
VI. MATERIAL	59
1. Biotransformaciones con Microorganismos	59
2. Biotransformaciones con Cultivo de Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	59
3. Transformaciones Químicas de la partenolida	60
4. Ensayo Microbiológico (Determinación de la Actividad Antimicrobiana)	61
VII. METODOLOGÍA Y RESULTADOS	62
1. Transformaciones Químicas de la partenolida	62
1.1 Transformación química en medio ácido, reacción con p-TsOH	62
1.2 Transformación química en medio ácido, reacción con $\text{HClO}_4/(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	63
1.3 Transformación química en medio básico, reacción con $\text{KOH}/\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$	64

TESIS CON
FALLA EN ORIGEN

	Página
2. Transformaciones Biológicas de la partenólida	64
2.1 Transformación biológica con hongos filamentosos	64
2.2 Transformación con <i>B. bassiana</i>	65
2.3 Transformación con <i>A. ochraceus</i>	66
2.4 Transformación con <i>A. niger</i>	67
2.5 Transformación con Cultivo Celular de zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	67
3. Ensayo Microbiológica (Determinación de la Actividad Antimicrobiana)	69
4. Ensayo sobre Línea Celular HeLa (Determinación de la Actividad Antitumoral)	72
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	75
IX. CONCLUSIONES	93
X. ESPECTROS	95
XI. SUGERENCIAS	129
XII. APÉNDICE	130
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

NOTACIONES EMPLEADAS

TRIBU. CON
FALLA DE SERVICIO

2

Transformación Química y Biológica de la parvotórida - Lactona Sesquiterpénica con esqueleto de Germacano -

AcOEt	Acetato de etilo
APD	Agar papa dextrusa
ATCC	American Type Culture Collection
CAL	Lipasa de <i>Candida antartica</i>
CCF	Cromatografía en capa fina
CCP	Cromatografía en capa preparativa
CCV	Cromatografía en columna a vacío
CDCl ₂	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloruro de metileno
(CHCl ₃) ₂ CO	Cloroformo
CL ₅₀	Acetona
COSY	Concentración letal media
δ	Correlación espectroscópica (RMN- ¹ H) Homonuclear Bidimensional.
δ	Desplazamiento químico
d	Doble
dd	Doble de doble
DEPT	Distorsión aumentada por una transferencia de polarización
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
JPP	Pirofosfato de farnesilo
λ	Longitud de onda
m	Multiplete
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MBC	Concentración mínima bactericida
NMO	N-óxido de la 4-metil morfolina
MML	Lipasa de <i>Mucor miehei</i>
m-o	Multiplete observado
MsCl	Cloruro de mesilo
p-TsOH	Ácido p-toluensulfónico
p.f.	Punto de fusión
PPL	Lipasa porcina pancreática
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
r	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
TPAP	Ferrutenato de tetrapropilamonio
THF	Tetrahidrofurano
s	Singlete amplio
s	Singlete
[α] _D ²⁰	Rotación óptica
v	Número de onda
[]	Bibliografía

TESIS COM
PALMIRÓN CALZADILLA

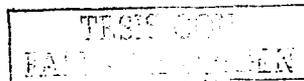
I. INTRODUCCIÓN

TESE CON
FALLA EN BUEN

Actualmente el empleo de enzimas, microorganismos y cultivos celulares de plantas (transformaciones biológicas), en la industria de alimentos, cosméticos y farmacéutica implica un gran avance en productividad y por lo tanto en el aspecto económico y de salud pública. Dichas herramientas permiten obtener intermediarios para moléculas de interés farmacológico, que en algunos casos la síntesis orgánica implica mayor tiempo y costo debido a los pasos y las dificultades que involucra obtener algunos intermediarios por esta vía.

En México se cuenta con una amplia gama de plantas empleadas en la medicina tradicional de las cuales se derivan principios activos con propiedades antitumorales, antiparasitarias, antimicrobianas, analgésicas, antiinflamatorias, etc., como es el caso de las lactonas sesquiterpénicas. En conjunto con herramientas biológicas como enzimas, microorganismos y cultivos celulares de plantas, estos principios activos pueden generar otros compuestos, con ciertos grupos funcionales en posiciones específicas probablemente con las mismas propiedades terapéuticas, pero quizá con propiedades químicas más favorables; dichas herramientas también proveen modelos idóneos para investigar el metabolismo de algunos fármacos.

El presente estudio esta enfocado a la partenólida una lactona sesquiterpénica con esqueleto de germacrano empleada en el tratamiento contra la migraña y como agente antitumoral (entre otros efectos biológicos), de la cual se obtienen derivados por síntesis química (reacción en medio ácido y básico) y transformaciones biológicas (incubación con hongos filamentosos y cultivo celular de zanahoria), dichos derivados son sometidos a



Transformación Química y Biológica de la pterisólida - Lactona Sesquiterpénica con esqueleto de Germacrano -

ensayos biológicos. De este modo se observa la capacidad de los microorganismos y de los cultivos celulares de plantas para transformar sustratos exógenos.

La aplicación de las biotransformaciones en la industria, ya sea farmacéutica o de alimentos, entre otras, confiere un amplio campo de investigación, con una gran proyección que involucre el trabajo interdisciplinario entre Químicos, Microbiólogos, Farmacéuticos, Ingenieros Bioquímicos, Biólogos, etc.

II. MARCO TEÓRICO

2-A

TESIS CON
FALLA DE CIRCUN

I. TERPENOS

Los terpenos son una familia muy diversa de compuestos cuyos esqueletos están compuestos de dos o más unidades de isopreno¹: 2-metil-1,3-butadieno, *ver tabla 1* [1].

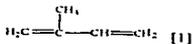
Tabla 1. Clasificación de los terpenos de acuerdo al número de unidades isoprenicas [2].

GRUPO	No. DE CARBONOS	UNIDADES DE ISOPRENO	EJEMPLOS
Monoterpenos	10	2	Mireno, Geraniol, Nerol, Limoneno, Mentol.
Sesquiterpenos	15	3	Lactonas sesquiterpénicas, Famesano, Canofilano, Aromadendrano.
Diterpenos	20	4	Labdano, Pimarano, Abietano, Laurano.
Sesterterpenos	25	5	Ácido gascárido, Nitenina.
Triterpenos	30	6	Lanostano, Lupano, Ursano.
Politerpenos	n	n	Hule y gutapercha

Muchos monoterpenos se aíslan como constituyentes de los aceites esenciales de las plantas, los cuales pueden obtenerse de hojas, cortezas, flores y frutos de varias plantas, por medio de la destilación por arrastre con vapor. Con frecuencia los aceites esenciales tienen sabores o aromas agradables, lo que permite que sean empleados en la industria del perfume, alimenticia, farmacéutica, entre otras [1].

Los diferentes tipos de terpenoides antes mencionados, son metabolitos secundarios de plantas con excepción del grupo de los sesterpenos, ya que estas sustancias solo se encuentran en hongos y en el insecto parásito *Ceroplastes albotneatus* [2].

¹ En 1887, el Químico alemán Otto Wallach determinó la estructura molecular de varios terpenos, y descubrió una característica estructural común, que todos ellos están formados por dos o más unidades de isopreno:



2. SESQUITERPENOS

Son productos naturales con 15 átomos de carbono, formados por la unión de tres unidades de isopreno. El sesquiterpeno más sencillo y al que se le considera el precursor de los demás sesquiterpenos es el farnesol, sustancia de olor agradable que, aunque se encuentra en numerosas plantas, siempre está en pequeñas cantidades [2].

El farnesol y su acetato, *ver figura 1*, así como muchos sesquiterpenos, tienen interesantes propiedades biológicas [2].

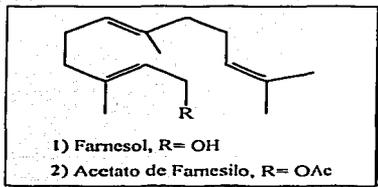


Figura 1. Ejemplos de sesquiterpenos

Algunos sesquiterpenos tienen actividad citotóxica y promotora en la formación de raíces en cortes de plantas que los contienen. Dentro de los sesquiterpenos se encuentran las lactonas sesquiterpénicas, metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal [2].

2.1 Lactonas Sesquiterpénicas

2.1.1 Definición.

Las lactonas sesquiterpénicas son una clase de sesquiterpenoides —esqueleto de 15 átomos de carbono— con un anillo lactónico, las cuales poseen un sabor amargo y se encuentran en algunas familias de plantas empleadas en la medicina tradicional, por lo que probablemente son los principios activos [3]; son incoloras y relativamente estables con sustituyentes lipofílicos [4,5].

2.1.2 Biogénesis

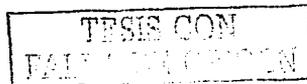
Las lactonas sesquiterpénicas se forman en la planta a partir de dióxido de carbono atmosférico después continúan el camino biosintético señalado en el *esquema 1* [2]. Biosintéticamente se derivan del *trans-trans* farnesil pirofosfato [4,5], siguiendo inicialmente una ciclización y después una oxidación [4,6,7], para dar compuestos con anillos de diez miembros a los que se les conoce como derivados del germacrano. Los germacranólidos o lactonas de primer paso biogénico se seguirán transformando para dar origen a los diversos esqueletos sesquiterpénicos, como se muestra en el *esquema 2* [2].

La mayoría de los tipos de lactonas resultan a partir de esta ciclización mediada por enzimas y se clasifican sobre la base de los siguientes esqueletos carbocíclicos: germacranólidas, guayanólidas, pseudoguayanólidas, eudesmanólidas, eremofilanólidas y xantanólidas, *ver esquema 2* [4]².

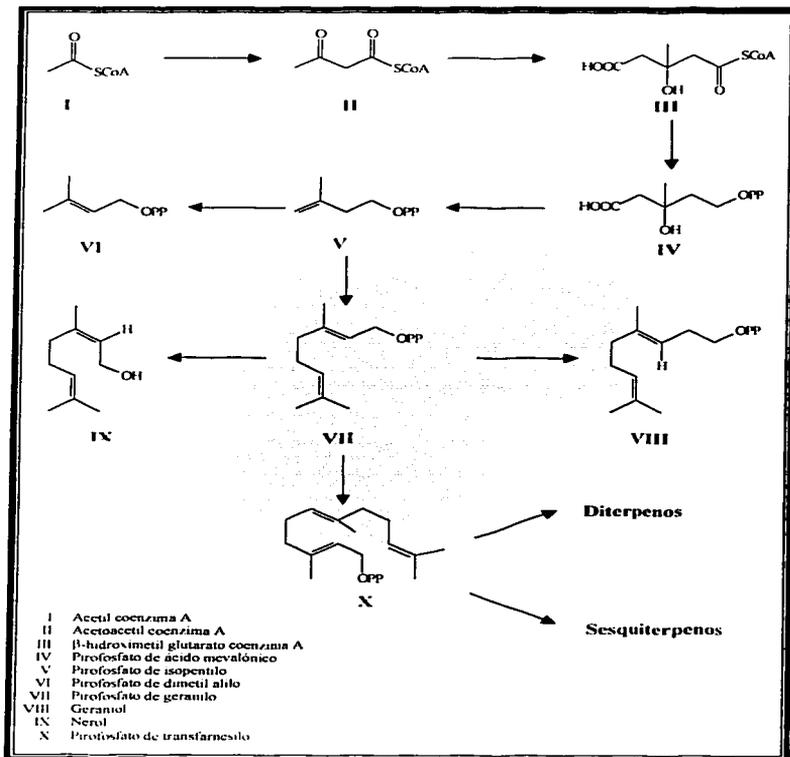
En las lactonas sesquiterpénicas, la cadena de isopropilo ha sido oxidada a ácido carboxílico. La hidroxilación en las posiciones C-6 ó C-8, seguida de una reacción de esterificación intramolecular origina el anillo de la lactona; de tal modo que el anillo lactónico se forma mediante una reacción de esterificación entre el grupo carboxilo del C-11 y el grupo hidroxilo de los C-6 ó C-8 [7]. Por lo tanto, las lactonas α - β insaturadas *cis* o *trans* se encuentran fusionadas en la posición C-6 y C-7 ó C-8 y C-7 del esqueleto carbocíclico. Las modificaciones estructurales del esqueleto básico de terpeno involucran la incorporación de un epóxido, grupos hidroxilo (generalmente esterificados), y/o ácido tiglico ó ácido anélico [4,8]. Algunas lactonas sesquiterpénicas contienen átomos de halógeno enlazados covalentemente [3,5].

Se asume que los esqueletos de guayano y de eudesmano se originan a partir de un precursor de germacrano en común, esta es la vía en la que el acetato pasa a mevalonato y finalmente a pirofosfato de farnesilo con la presencia de germacrano sintetasa y una enzima del grupo de las sesquiterpencilasas.

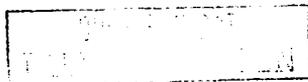
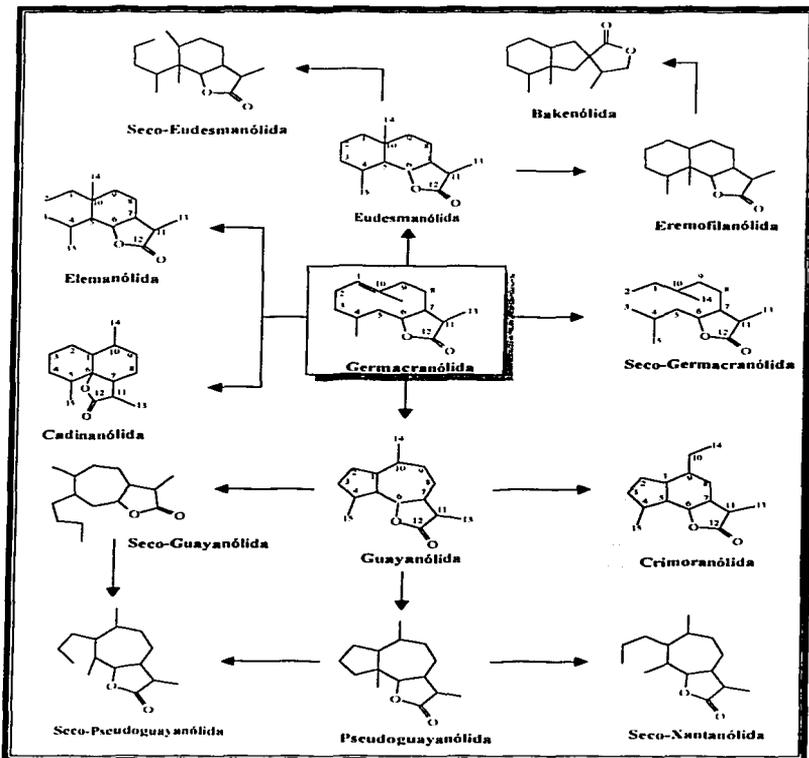
² El sufijo "ólida" sirve para describir la lactona α , β -insaturada [3].



Esquema 1. Biogénesis de las Lactonas Sesquiterpénicas.

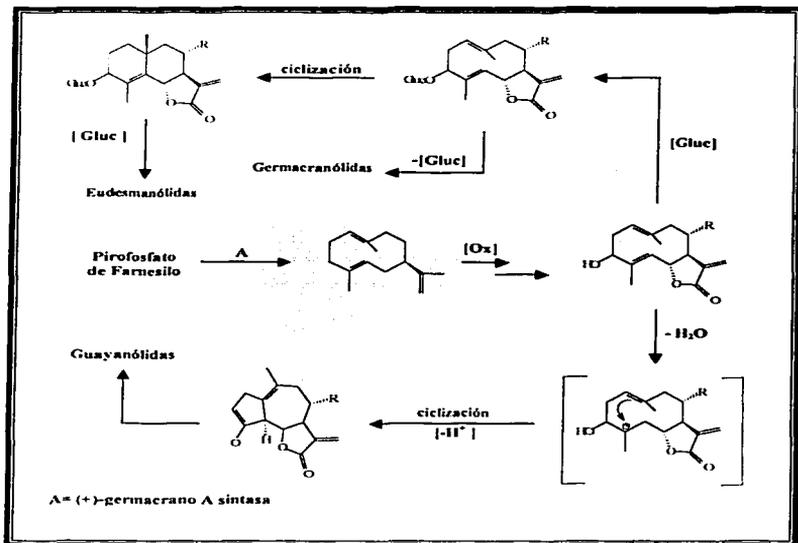


Esquema 2. Tipos de Lactonas Sesquiterpénicas.



La ruta de biogénesis de las eudesmanólidas y guayanólidas como derivados del germacrano, se ha comprobado mediante estudios con isótopos de C^{13} en donde, este es empleado como precursor en el metabolismo secundario de la planta; en el proceso de ciclización en el cual se forma dicho intermediario, se puede formar el Germacrano A o el Germacrano B [9]. A través de diferentes pasos oxidativos el germacrano A tiene la capacidad de transformarse en una germacránólida, la cual es un precursor en la biosíntesis de eudesmanólidas, guayanólidas y de germacránólidas, *ver esquema 3* [9,10].

Esquema 3. Ruta de biosíntesis de eudesmanólidas y guayanólidas a partir del intermediario germacrano A [9]



2.1.3 Distribución general

Durante el paso de los años un gran número de lactonas sesquiterpénicas han sido aisladas de diversas especies vegetales, principalmente de la familia *Compositae* y ocasionalmente de otras familias de Angiospermas, ver tabla 2 [4,11]. Se ha informado que un gran número de lactonas sesquiterpénicas (más de 3000 estructuras) han sido aisladas a partir de la tribu *Asteraceae*, las cuales generalmente se encuentran en hojas, tallos y brácteadas de las inflorescencias, principalmente en forma libre y raramente como glicósidos [12]. Algunas plantas de importancia medicinal como *Arnica montana*, *Artemisa annua* y *Tanacetum parthenium*, contienen lactonas sesquiterpénicas como constituyentes activos [13].

2.1.4 Aislamiento

Debido a que la gran mayoría de las lactonas sesquiterpénicas naturales se encuentran en forma libre en las plantas que las poseen, tienen las propiedades características de la gran mayoría de los terpenoides, por lo que son solubles en disolventes como CHCl_3 , CH_2Cl_2 , benceno; Et_2O y en EtOH ó MeOH caliente; son lo suficientemente polares para ser insolubles en éter de petróleo, aunque también son insolubles en agua. Estas propiedades son utilizadas para extraerlas y separarlas de otros compuestos. Se puede realizar extracciones del material vegetal seco y molido, con CHCl_3 , el extracto concentrado se redisuelve en EtOH caliente y se añade una solución acuosa de acetato de plomo al 4%, con lo cual precipitan las sustancias más polares, se filtra y el filtrado se concentra y se somete a cromatografía [3].

2.1.5 Reacciones coloridas

Algunas reacciones coloridas que dan las lactonas sesquiterpénicas con ciertos reactivos pueden ser empleadas como pruebas de identidad, las siguientes son algunas de ellas:

Ensayo de Hidroxamato férrico. Las γ -lactonas forman con facilidad los hidroximatos férricos de color púrpura. Las cumarinas, otras lactonas y en general los ésteres, dan

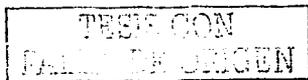
Transformación Química y Biológica de la pteridóida — Lactona Sesquiterpénica con esqueleto de Germacano—

positiva esta prueba. La muestra se disuelve en etanol se añade solución de clorhidrato de hidroxilamina y KOH. La mezcla se calienta hasta que aparezca una espuma de color rojizo. Se enfría y se acidula con HCl. Se añade cloruro férrico y se forma una coloración violeta, se basa en la formación de un complejo entre el ácido hidroxámico formado y el cloruro férrico [3].

Tabla 2. Distribución de diferentes clases estructurales de lactonas sesquiterpénicas en la familia *Compositae* [4]

TRIBUS (No. DE GÉNEROS)	No. DE GÉNEROS	ESQUELETO
Eupatoneae (50)	4	Germacranólidas, Elemanólidas, Guayanólidas, Ambrosanólidas, Seco-ambrosanólidas.
Vernoniaeae (50)	4	Germacranólidas, Elemanólidas, Guayanólidas.
Astereae (100)	1	Guayanólidas, Germacranólidas.
Inuleae (300)	5	Germacranólidas, Elemanólidas, Guayanólidas, Xantanólidas, Ambrosanólidas, Helenanólidas, Seco-eudesmanólidas, Seco-ambrosanólidas.
Helenieae (60)	11	Germacranólidas, Elemanólidas, Guayanólidas, Eudesmanólidas, Helenanólidas, Seco-eudesmanólidas, Seco-helenanólidas.
Heliantae ³ (250)	24	Germacranólidas, Elemanólidas, Guayanólidas, Eudesmanólidas, Xantanólidas, Ambrosanólidas, Helenanólidas, Seco-eudesmanólidas, Seco-ambrosanólidas, Seco-helenanólidas.
Senecioneae (50)	4	Germacranólidas, Eremofilanólidas, Xantanólidas, Helenanólidas, Bakenólidas.
Antemideae (50)	10	Germacranólidas, Eudesmanólidas, Guayanólidas, Helenanólidas, Cadmanólidas.

³ Incluye subtribu *Ambrosinae* [4]



Transformación Química y Biológica de la paracetámbala — Lactona Sesquiterpénica con esqueleto de Germaciano —

Ensayo de Legal. Las lactonas α,β -insaturadas dan la prueba de Legal, producen una coloración rosa cuando se disuelven en piridina, se añade nitroprusiato de sodio y un álcali (4 gotas de hidróxido de potasio 2N). La prueba también la dan positiva las lactonas β,γ -insaturadas cuando no se controla el pH, ya que se isomerizan en medio alcalino. La prueba también la dan positiva las metiléncetonas [3].

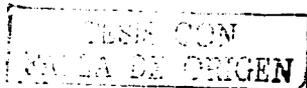
Ensayo de Baljet. Las lactonas sesquiterpénicas producen coloraciones naranja cuando se tratan con picrato de sodio y potasio. Se emplean dos soluciones que se mezclan en iguales volúmenes antes de usarse. Solución A, 1 g de ácido picrico en 100 mL de etanol, solución B, 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Para realizar la prueba se toman de 2 a 3 mg de compuesto y se agregan de 3 a 4 gotas de reactivo, la prueba es positiva si la solución se torna de anaranjada a roja oscura [3].

Espejo de plata. Las lactonas α,β -insaturadas reducen el Reactivo de Tollens ($\text{AgNO}_3 / \text{NaOH}/\text{NH}_3$) formando un "espejo de plata". Las lactonas β,γ -insaturadas son reductores tan fuertes que pueden reducir el reactivo de Tollens aún en ausencia de NaOH por lo cual se pueden diferenciar de las lactonas α,β -insaturadas [3].

2.1.6 Técnicas de separación

Las lactonas sesquiterpénicas pueden separarse y analizarse por técnicas cromatográficas; cromatografía en columna o cromatografía en capa fina, utilizando como adsorbentes sílica gel y empleando eluyentes como cloroformo-metanol 9:1, cloroformo-éter etílico 4:1, benceno-acetato de etilo 1:1, benceno-acetona 4:1, entre otras mezclas. Actualmente se pueden analizar y separar mezclas de lactonas sesquiterpénicas en poco tiempo por Cromatografía de Líquido de Alta Resolución (HPLC).

Los reveladores más utilizados son: ácido sulfúrico y calentamiento, vapores de yodo, luz ultravioleta 254 nm, permanganato de potasio al 1%, vainillina al 1% en etanol y ácido fosfórico al 10% en etanol [3].



2.1.7 Propiedades espectroscópicas

Una vez que se ha aislado una nueva lactona sesquiterpénica las técnicas para elucidar su estructura involucra datos espectrofotométricos que se obtienen a partir de las siguientes técnicas:

Espectroscopia de Ultravioleta [3]. La absorción en el ultravioleta depende de los grupos cromóforos que posea la molécula:

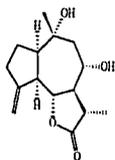
- Las lactonas saturadas no absorben después de 200 nm
- Las lactonas α,β -insaturadas muestran una intensa banda terminal entre 205 y 225 nm
- La presencia de sistemas de ciclohexanona (eudesmanólidicos) o de ciclopentanona origina máximos de absorción entre 214-230 nm.

Espectroscopia de Infrarrojo [3]. Las absorciones en infrarrojo son bastantes características:

- Lactonas saturadas 1770 cm^{-1}
- Lactonas α,β -insaturadas 1750 cm^{-1} (las variaciones se deben a fusiones *trans* que originan valores hasta de 1795 cm^{-1}).
- Anillo de ciclopentanona 1740 cm^{-1}
- Ciclohexanona 1690 cm^{-1}
- Ciclopentenona 1620 cm^{-1}
- Metileno exocíclico, que forma parte de la lactona α,β -insaturada, absorbe a $1665, 1405, 965$ y 890 cm^{-1} .

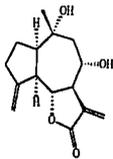
Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear. Presentan señales características, con multiplicidad y constantes de acoplamiento bien relacionadas, las cuales están de acuerdo con el tipo de esqueleto base que presentan. En el *esquema 4* se indican los desplazamientos químicos de $\text{RMN-}^1\text{H}$, para algunas lactonas ya informadas en la literatura [3a-3c].

Esquema 4. Desplazamientos químicos de RMN-¹H para algunas lactonas sesquiterpénicas.



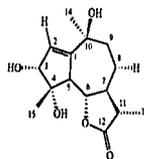
11α-Dehidroflabellina

H-5	δ 2.81 (<i>dd</i> , <i>J</i> =10 y 7 Hz)
H-6	δ 3.88 (<i>t</i> , <i>J</i> =10 Hz)
H-11	δ 2.55 (<i>m</i>)
H-13	δ 1.41 (<i>d</i> , <i>J</i> =7 Hz)



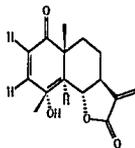
Flabellina

H-5	δ 2.91 (<i>s.a</i>)
H-6	δ 3.88 (<i>t</i>)
H-7	δ 3.45 (<i>dddd</i> , <i>J</i> =11, 11, 3.5 y 3.0)
H-14	δ 1.33
H-15	δ 5.16 y 5.02 (<i>s.a</i>)



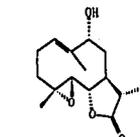
3α,4α,10β-hidroxi-11βH-guai-1-en-12,6α-olida

H-2	δ 3.82 (<i>s.a</i>)
H-6	δ 4.19 (<i>dd</i> , <i>J</i> =10.5 y 10.4)
H-7	δ 1.68 (<i>m</i>)
H-9 y H-8	δ 1.76 (<i>m</i>)
H-9' y H-8'	δ 1.58 (<i>m</i>)
H-14	δ 1.33 (<i>s</i>)
H-15	δ 1.18 (<i>s</i>)



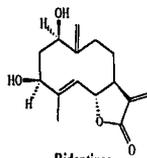
Eudesmanólidis

H-2	δ 5.88 (<i>d</i> , <i>J</i> =11 Hz)
H-3	δ 6.60 (<i>d</i> , <i>J</i> =11 Hz)
H-5	δ 2.55 (<i>d</i> , <i>J</i> =11 Hz)
H-6	δ 4.12 (<i>dd</i> , <i>J</i> =12 y 11 Hz)
H-13	δ 5.48 (<i>d</i> , <i>J</i> =3 Hz)
H-13'	δ 6.15 (<i>d</i> , <i>J</i> =3 Hz)
H-14	δ 1.57 (<i>s</i>)



(-)-9α-hidroxiidihipartenólida

H-1	δ 4.05 (<i>dd</i> , <i>J</i> =12 y 2.2 Hz)
H-5	δ .75 (<i>t</i> , <i>J</i> =8.7 Hz)
H-9	δ 4.11 (<i>dd</i> , <i>J</i> =7.5 y 3.9 Hz)
H-11	δ 2.26 (<i>dg</i> , <i>J</i> =11.4 y 7.2 Hz)
H-13	δ 1.24 (<i>d</i> , <i>J</i> =7.2 Hz)
H-14	δ 1.68 (<i>s</i>)
H-15	δ 1.26 (<i>s</i>)



Ridentinas

H-1	δ 4.05 (<i>dd</i> , <i>J</i> =9 y 4 Hz)
H-3	δ 3.76 (<i>dd</i> , <i>J</i> =9 y 4 Hz)
H-6	δ 4.48 (<i>t</i> , <i>J</i> =10 Hz)
H-13	δ 5.54 (<i>d</i> , <i>J</i> =3 Hz)
H-13'	δ 5.97 (<i>d</i> , <i>J</i> =3 Hz)
H-14	δ 5.03-4.79 (<i>s.a</i>)
H-15	δ 1.58 (<i>d</i> , <i>J</i> =1.5 Hz)

Espectrometría de masas [3]. Se ha encontrado que generalmente la señal base es el ion molecular, siendo predominantes los correspondientes a M-18 si hay hidroxilos y M-60 cuando hay grupos acetoxi.

2.1.8 Actividad biológica

Las lactonas sesquiterpénicas son un grupo muy grande y estructuralmente diverso de metabolitos de plantas con más de 4000 estructuras informadas [13,14].

La razón por la cual las lactonas sesquiterpénicas representan un grupo de productos naturales importantes y objeto de numerosos estudios, es por su utilidad como marcadores en química sistemática (quimiotaxonomía) y por la gama de propiedades biológicas que poseen [10]. Donde destaca su eficacia en el tratamiento de úlceras estomacales, tumores, migraña, así como cardiotónicos y más recientemente como inhibidores de la expresión ciclooxigenasa y aromataza [14]⁴. En la *tabla 3* se enlistan los efectos biológicos mostrados por algunas lactonas sesquiterpénicas.

Estas actividades biológicas son generalmente el resultado de una reacción de adición de Michael entre los grupos sulfihídrido de moléculas biológicas y las estructuras carbonílicas α - β insaturadas de las lactonas sesquiterpénicas [15].

El grupo tiol de las enzimas es considerado especialmente susceptible a esta reacción y en las lactonas sesquiterpénicas ha sido demostrado la inhibición de una variedad de enzimas con el grupo sulfihídrido relacionadas con glicogensintetasa, inosínfosfato-deshidrogenasa, ribonucleotida-reductasa y muchas más [14].

Por lo tanto la presencia del grupo α -metilen-y-lactona se relaciona con la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas, *ver figura 2* [4,16-18].

⁴ Las lactonas sesquiterpénicas producen dermatitis al contacto con la piel [4, 15-17]

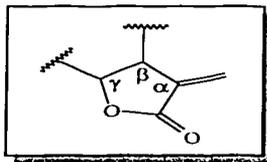
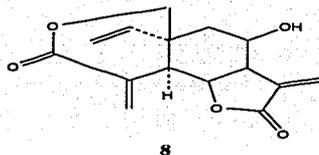
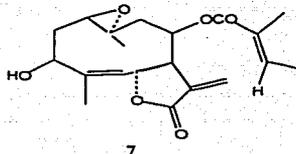
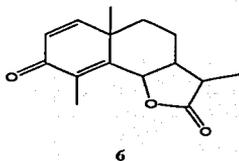


Figura 2. Grupo α -Metileno- γ -lactona

Sus propiedades biológicas varían desde la antihelmíntica de la santonina (6), pasando por la actividad reguladora del crecimiento vegetal, de la heliangina (7) y la inhibidora de tumores cancerosos que posee la vernolepina (8), [2]. Se ha sugerido que su actividad citotóxica está relacionada con el grupo exometileno-buténolido y también que este grupo modifica el crecimiento de vegetales [4].



Lactonas sesquiterpénicas aisladas a partir de *Tithonia diversifolia* y *Magnolia grandiflora* se relacionan estrechamente con el factor de transcripción NF- κ B, que es uno de los reguladores de genes involucrados en la respuesta inmune y antiinflamatoria, mostrando una gran actividad para inhibir la activación este factor, que se activa por estímulos pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), lipopolisacáridos, radiación ultravioleta y oxidantes [19-22]

Otras lactonas tienen importancia agroquímica, ya que presentan propiedades antifúngicas o fitotóxicas [18,23]. En la agricultura se emplean las lactonas sesquiterpénicas debido a sus propiedades antimicrobianas, citotóxicas y alérgicas para adquirir resistencia contra virus, que atacan a algunos vegetales de importancia económica, como por ejemplo la lechuga (ampliamente utilizada en el campo alimenticio) [24].

Al mismo tiempo las lactonas sesquiterpénicas también pueden estimular la germinación de semillas en ausencia de condiciones apropiadas, lo que resultaría en la muerte de la planta. De este modo, estos productos naturales ofrecen una alternativa cuando las plantas no se encuentran en las condiciones óptimas para su desarrollo [25]. El efecto estimulante de la germinación, se ha estudiado con semillas de *Orobancha sp.*, lo que se ve favorecido por la relación estructura actividad de las lactonas sesquiterpénicas, la efectividad de estos compuestos se compara al mismo tiempo con un bioensayo estándar para determinar el grado de estimulación de la germinación [26].

La helenalina es la sustancia mayoritaria en las flores de diferentes especies de *Arnica* [27], la cual junto con sus derivados han mostrado poseer una importante actividad antineoplásica y antiinflamatoria, entre los efectos que se han investigado se incluye parámetros bioquímicos como la síntesis de proteínas, actividad de algunas enzimas y niveles de glutatión en hígado [18].

Recientemente se ha informado de la actividad de varias especies de plantas, donde se han encontrado constituyentes característicos muchos de los cuales son empleados en la medicina tradicional [28].

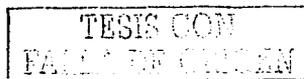
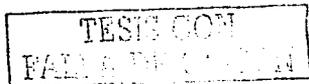


Tabla 3. Efectos Biológicos de Lactonas Sesquiterpénicas.

EFECTO BIOLÓGICO	REFERENCIAS
Anticancerígeno	4, 14, 17, 27, 31, 33-34
Antipirético	14, 21
Antiúlceroso	14
Antimigrañoso	14, 27, 35- 37
Cardiotónico	14
Citotóxico	4, 27, 37
Antibiótico	4, 38
Genotóxico	27
Antiinflamatorio	21, 22, 27
Hipoglucémico	27, 31
Hipotensivo	27
Antifungal	27, 39
Fitotóxico	27
Antibacterial	27, 38, 40
Analgésico	22, 41
Desintoxicante	34
Antimalarial	21, 31, 34
Neurotoxicidad	28
Repelente de insectos y como antídoto para el tratamiento de mordeduras de víboras y picaduras de insectos.	31, 41
Inhibición del factor NF-kB	19, 20-22
Estimulación del proceso de germinación de semillas	25, 26

Las lactonas sesquiterpénicas aisladas presentan esqueletos de: guayanólidas, germacránólidas, eudesmanólidas y elemanólidas. Muchas de ellas exhiben actividad biológica como: citotoxicidad, neurotoxicidad, fitotoxicidad, entre otras [28].

Las guayanólidas representan uno de estos amplios grupos, y algunas de su tipo, se ha comprobado que poseen actividad antitumoral, antihelmíntica, anticonceptiva,



estimulación de la germinación y actividad para inhibir las úlceras estomacales, entre otras [29]. Especies de *Eupatorium* poseen también lactonas sesquiterpénicas con propiedades citotóxicas y antitumorales [30]. Asimismo se ha informado que *Neurolaena lobata*, planta medicinal empleada en América Central contra la malaria, cáncer, desinteria, diabetes y como repelente de insectos, muestra como constituyentes principales, lactonas sesquiterpénicas [31].

Se han realizado estudios sobre la zoofarmacognosia, farmacología y neurotoxicología de lactonas sesquiterpénicas, ya que algunos animales (por ejemplo, los chimpancés) consumen plantas que las contienen, con fines curativos [13]. Las lactonas sesquiterpénicas también han sido empleadas en estudios en los que se describe la producción y caracterización de anticuerpos policlonales contra lactonas sesquiterpénicas obtenidas a partir de *Cichorium intybus* L. [32].

3. GERMACRANÓLIDAS

3.1 Definición.

Las germacranólidas, *figura 3*, son las primeras lactonas sesquiterpénicas que se forman a partir de la ciclización del pirofosfato de farnesilo y las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal —actualmente se conocen alrededor de 300 compuestos— y son de donde se derivan otras lactonas sesquiterpénicas estructuralmente más complejas [2,42,43].

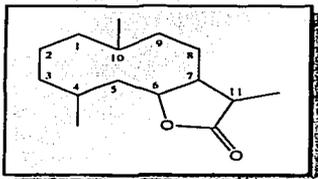
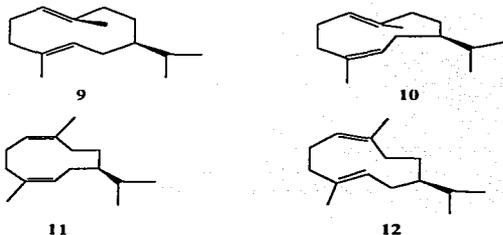


Figura 3. Esqueleto de Germacranólida

En función de su estructura, se puede encontrar un gran número de posibilidades, tomando en cuenta la estereoquímica de las dobles ligaduras C-1 y C-4, lo que da cuatro diferentes tipos de compuestos, *figura 4*:

1. Germacranólidas (ambas dobles ligaduras *trans*), (9).
2. Heliangólidas doble ligadura C-1 (10) *trans* y C-4 *cis*, (10).
3. Melampólidas doble ligadura C-1 *cis* y C-4 *trans*, (11).
4. Lactonas *cis-cis*, (12).

Figura 4.



Dado que en cada uno de los cuatro grupos se puede tener la lactona cerrada hacia C-6 ó C-8, se tienen ocho posibilidades estructurales diferentes; además de distintas funciones oxigenadas en cada uno de los 15 átomos de carbono, por lo que su diversidad estructural es mayor [2].

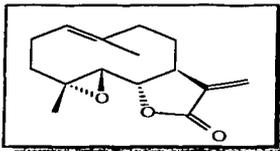
3.2 Distribución de Germacranólidas

La distribución de los diversos tipos de lactonas sesquiterpénicas, varía en los diferentes grupos en los que se divide la familia *Compositae*. Las germacranólidas son el tipo más numeroso de sesquiterpenlactonas y pueden encontrarse en casi todas las tribus de la familia *Compositae* (Tabla 2), además en *Magnoliáceas* y en *Umbelíferas* [2,27,41,44].

4. PARTENOLIDA

4.1 Descripción

Lactona sesquiterpénica del tipo de las germacranólidas [46].



4.2 Propiedades Físicas

- > $C_{15}H_{20}O_3$
- > PM= 248.32 g/mol
- > C 72.55%, H 8.12%, O 19.33%
- > Cristalizado a partir de éter isopropílico, cristales transparentes, p.f. 115-116°C.
- > $[\alpha]^{20} -81.4$ (c, 1.04 en $CHCl_3$).
- > UV máx. 214 nm (log E 4.22) [46].

Lactona sesquiterpénica constituyente de *Tanacetum parthenium*, *Chrysanthemum parthenium* y *Michelia champapa*. Su derivado, la 9 α -hidroxipartenólida es constituyente de *Anvillea garcini*; cristales con punto de fusión 141-143°C [47,48 y 49].

4.3 Propiedades Biológicas

La planta *Tanacetum parthenium*⁵, es común en los jardines, ha sido usada por centurias en la medicina herbolaria tradicional para el tratamiento de la migraña [51]. En modernos ensayos clínicos se ha verificado esta eficacia, con la reducción de la frecuencia

⁵ En México, esta especie se conoce con el nombre vulgar de: Santa María, altamiza, hierba santa, manzanilla grande, manzanilla romana, mastranzo, yerba santa [51,52]; y en América del Norte como, *feverfew* (jocafiebre) [36].

y severidad de los ataques de migraña. Esto se lleva a cabo basándose en la inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro* y a la inhibición de la liberación de hidróxitriptamina (serotonina), a partir de las plaquetas [36].

El extracto *in vitro*, muestra modelos que reducen la formación de prostanglandinas, además de 5-lipooxigenasa y ciclooxigenasa. La partenólida es considerada el principal componente activo en *Tanacetum parthenium*. Se encontró que inhibe proteintirocinas y proteincinasas C. Esto ha servido como pauta para estudiar el efecto de la partenólida sobre el crecimiento *in vitro* de células tumorales, algunas proteincinasas son muy importantes en varios aspectos de ciclo celular. En muchos trabajos se ha considerado a la partenólida como una sustancia citotóxica basado en un corto tiempo de exposición (menor a tres horas a concentraciones relativamente altas del compuesto), ver tabla 4 [36].

El extracto con éter de petróleo de *Magnolia grandiflora* mostró actividad inhibitoria en carcinoma epidermoide humano de tejido nasofaríngeo, el examen preliminar del extracto con éter de petróleo que contenía como componente mayoritario, a la partenólida; mostró actividad citotóxica a una concentración de 2.3 $\mu\text{g/mL}$, la actividad en el cultivo celular se definió como la DE_{50} menor o igual a una dilución de 20 $\mu\text{g/mL}$ del extracto "crudo" de la planta *Magnolia grandiflora*, ver tabla 4 y 5 [35].

Además la partenolida, es un potente inhibidor del factor de transcripción NF- κ B, lo cual se comprobó en un modelo fisiológico para evaluar la actividad antiinflamatoria [50]. Así mismo se ha demostrado que interviene también en la inhibición del polimorfismo nuclear de leucocitos (PMNL), esto es una muestra de la actividad farmacológica existente en el género *Tanacetum* [53].

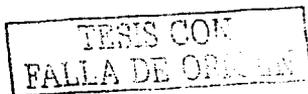


Tabla 4. Actividad Biológica de la partenólida.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
Antitumoral. Alquilación selectiva de grupos nucleofílicos (grupo sulfhidrido) en enzimas de control en la división celular.	4, 35-37
Citotóxica Inhibe el crecimiento celular de manera irreversible, también actúa como citostático dependiendo de la concentración empleada, en líneas celulares	4, 36
Antibacterial Inhibe el crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y <i>M. avium</i> .	36, 38, 54, 56
Herbicida Como agente alelopático, actúa sobre el crecimiento y germinación de plantas mono y dicotiledonas. Induce la germinación de especies como <i>Orobancha</i> ssp. El efecto inhibitorio radica en la presencia de un grupo nucleofílico, en la lactona.	50, 55
Antimigrainoso Inhibe la agregación plaquetaria y la liberación de serotonina.	13, 21, 36, 53-54, 58
Antiulcerosa Restaura los grupos -SH de la mucosa gástrica	59
Antiinflamatorio	57, 59
Anticonceptivo Efecto encontrado en ratas y ratones	57
Antiartrítico	57
Inhibición de polimorfismo nuclear en leucocitos	53-54
Inhibición del factor NF-κB Este factor esta involucrado en la respuesta inmune y antiinflamatoria y se activa por factores proinflamatorios como radiación UV, oxidantes, lipopolisacáridos, etc.	19, 20-22

4.4 Fuentes de Aislamiento

La partenólida se ha encontrado en combinación con otras lactonas sesquiterpénicas como la tamaulipín-A [52]. A partir de *A. dumosa* fueron aisladas las lactonas sesquiterpénicas: coronopilina, ambrosiol, psilostaquina y partenólida [60].

Tabla 5. Especies vegetales de las cuales ha sido aislada la partenólida

ESPECIE VEGETAL	REFERENCIA
<i>Tanacetum parthenium</i>	22
<i>Chrysanthemum parthenium</i>	46, 60, 61
<i>Magnolia glandiflora</i>	47
<i>Ambrosia confertiflora</i>	61
<i>Mitchelia champaca</i>	61
<i>Ambrosia dumosa</i>	61, 62

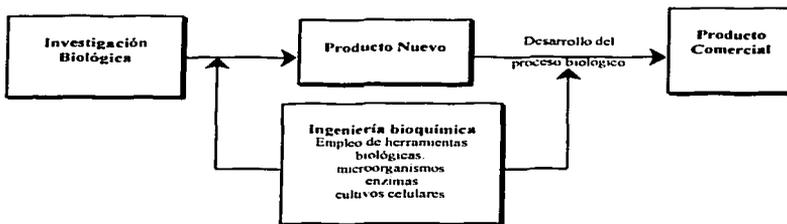
5. BIOTRANSFORMACIONES

5.1 Definición

Cada cambio catalizado por enzimas específicas en una estructura química en particular, o en sí por un organismo viviente como pueden ser: microorganismos y cultivos de células de tejido vegetales o animales, es denominado como biotransformación [63].

El desarrollo de la ingeniería bioquímica y su incursión en áreas como la síntesis orgánica permiten realizar transformaciones de sustratos *exógenos*, empleando sistemas biológicos, aprovechando su habilidad para asimilarlos y convertirlos, hoy en día la síntesis orgánica no únicamente cuenta con las transformaciones químicas para obtener derivados o productos de interés, sino que los sistemas biológicos (enzimas, ya sean inmovilizadas o no y una amplia gama de microorganismos y los cultivos de células vegetales y animales) proporcionan una herramienta sumamente valiosa para la transformación de una gran diversidad de sustratos, lo que representa ventajas impresionantes con respecto a los métodos de obtención convencionales; con una gran proyección a nivel industrial, ver *esquema 4*.

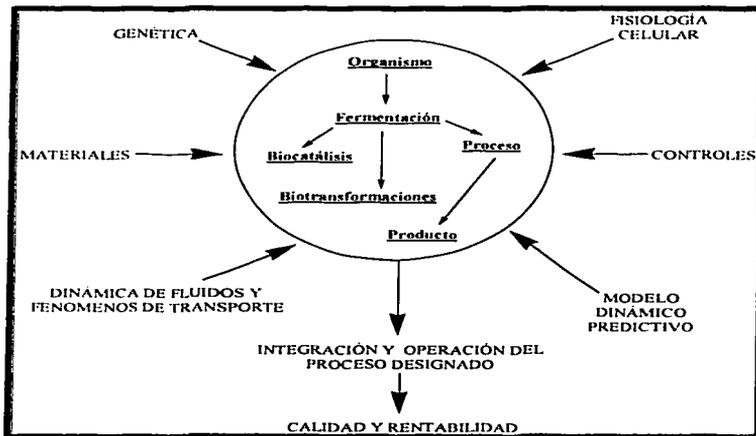
Esquema 5. Interacción de la ingeniería bioquímica con el desarrollo y aplicación de un proceso biológico [64].



Estas reacciones de biotransformación involucran el metabolismo y sistema enzimático, tanto de microorganismos como de cultivos celulares; la elección del sistema biológico empleado para dicha transformación, involucra la estructura del sustrato, el tipo de reacción que es capaz de realizar el sistema biológico, su disponibilidad y costo, así como las propiedades que se desea conferir al sustrato con la conversión.

La transformación de los compuestos se da por la interacción del sustrato con las enzimas producidas del metabolismo secundario de los microorganismos o del cultivo celular (vegetal o animal). Los microorganismos empleados en las biotransformaciones a escala industrial, son modificados antes de su empleo, para convertirse en especialistas metabólicos capaces de producir específicamente y con un alto rendimiento metabolitos, particulares. A fin de obtener esta especializada capacidad metabólica las cepas pueden ser modificadas por mutación o por recombinación. Las cepas industriales pueden desarrollarse satisfactoriamente bajo las condiciones muy especializadas de la fermentación, pero pueden presentar propiedades pobres de crecimiento en medios ambientes competitivos naturales. De tal forma, el empleo de herramientas biológicas en campos en los cuales comúnmente no se acostumbraba, involucra un trabajo interdisciplinario, para el desarrollo de nuevas propuestas, como se ilustra en el *esquema 6*.

Esquema 6. Factores que integran el desarrollo y establecimiento de un proceso biológico a escala industrial [64]



5.2 Biotransformaciones con microorganismos.

Los microorganismos tienen la capacidad de modificar químicamente una amplia variedad de compuestos orgánicos. Tales cambios son denominados transformaciones microbianas o biotransformaciones. En estas reacciones enzimáticas el sustrato puede ser metabolizado. Las biotransformaciones pueden emplearse en procesos industriales y suelen preferirse por sobre las síntesis química debido a que se llevan a cabo con:

- Especificidad del sustrato
- Especificidad de sitio (regioespecificidad)
- Estereoespecificidad
- Condiciones de reacción suaves

Las reacciones microbianas más importantes se enlistan en la tabla 6, agrupadas desde el punto de vista químico y el microorganismo capaz de llevarlas a cabo [65].

Tabla 6. Tipos de reacciones de biotransformación con microorganismos[65].

TIPO DE REACCIÓN	MICROORGANISMO
A. Oxidaciones	
Hidroxilación	<i>Bacillus subtilis</i>
Epoxidación	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
Ruptura oxidativa de sustituyentes (desaminación oxidativa, desmetilación)	<i>Cunninghamella blakesleana</i> ATCC 9245
Degradación oxidativa de las cadenas laterales	<i>Nocardia opaca</i>
Ruptura oxidativa de anillos aromáticos	<i>Corynebacterium</i> nov. sp. ATCC 15570
Oxidación de heterofunciones	<i>Streptomyces</i> sp.
B. Reducciones	
Reducción de funciones carboxilo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Reducción de heterofunciones	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Hidratación de dobles enlaces C-C	<i>Clostridium</i> La1
C. Reacciones Hidrolíticas	
Hidratación de dobles enlaces C-C	<i>S. aureofaciens</i> ATCC 10762
Hidrólisis de ésteres ácidos carboxílicos	<i>Mycobacterium phlei</i>
Hidrólisis de N-derivados	<i>Brevibacterium</i>
D. Condensaciones	
Fosforilación	<i>S. griseus</i>
N-Glicosilación	<i>E. coli</i> ATCC 10798
O- Glicosilación	<i>Sporotrichum sulfurescens</i> ATCC 7159
N-Acilación	<i>Kluyvera citrophila</i>

Hoy en día los microorganismos son utilizados como reactivos químicos para la preparación de intermediarios clave, necesarios en síntesis orgánica (por ejemplo, ácido 6-aminopenicilánico por desacetilación microbiana de penicilinas G y V, para el uso en la síntesis de las penicilinas semisintéticas) o para la producción económica de productos finales, especialmente hormonas esteroidales; los microorganismos *Rhizopus nigricans* y *Aspergillus ochraceus* se utilizan comercialmente para la 11 α -hidroxilación y *Curvularia lunata* y *Cunninghamella blakesleana* para la 11 β -hidroxilación de dichos compuestos [66].

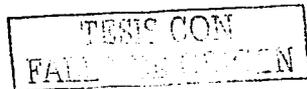
Los microorganismos sirven como fuente de enzimas para uso en sistemas analíticos y las transformaciones microbianas juegan un papel importante en los estudios del metabolismo que debe acompañar a las evaluaciones clínicas de los fármacos.

Los modelos microbianos son útiles para predecir, y a veces necesarios para preparar, los metabolitos derivados de los fármacos administrados a los animales y al hombre [66].

5.3 Empleo de enzimas en transformaciones biológicas y síntesis orgánica

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica, formadas por una o varias cadenas polipeptídicas, capaces de desempeñar o catalizar una gran cantidad de procesos metabólicos en los seres vivos; sin embargo sus características, como especificidad y las condiciones suaves para llevar a cabo su acción, las hacen factibles de ser empleadas en la síntesis de algunos productos de interés comercial (industria de alimentos y farmacéutica).

En la conversión microbiana de compuestos orgánicos pueden ser utilizados sistemas de esporas, cultivos en crecimiento, células en reposo, enzimas, células inmovilizadas o enzimas inmovilizadas [65].



Las enzimas exhiben muchas propiedades que difieren de las mostradas por los catalizadores en general. Las tres propiedades más importantes son:

- Alto poder catalítico
- Especificidad
- Capacidad para regular su actividad mediante diversos compuestos de origen natural

Por lo tanto las enzimas, tienen un gran potencial para ser usados como reactivos en síntesis química, puesto que catalizan reacciones estereoespecíficas rápidamente en condiciones suaves y porque transforman un amplio rango de sustratos y dan lugar a pocos o ningún subproducto. Las enzimas son mucho más específicas que los reactivos químicos correspondientes estando limitada su acción a moléculas estructuralmente relacionadas, siendo además mucho más específicas de la reacción, sea una isomerización, oxidación, transferencia o reacción de condensación cualquiera que pueda tener lugar.

Las enzimas son reactivos quirales estrictos, como catalizadores asimétricos acordes con una estructura asimétrica pronunciada, la pureza óptica de los productos de las reacciones enzimáticas es una ventaja atractiva, especialmente cuando se exige la producción de materiales ópticamente puros, y cuando aumenta la demanda de nuevos y más sofisticados productos, como hormonas y esteroides [67].

Los procedimientos enzimáticos permiten que determinados sistemas puedan sintetizarse con buen rendimiento y alto grado de pureza, no existiendo alternativas paralelas para su obtención, aunque se hayan descrito procedimientos químicos para la obtención de hidroxilaciones en carbonos secundarios y terciarios. Algunas enzimas presentan especificidad casi absoluta por un determinado sustrato y no actúan sobre moléculas con estructura incluso similar. Otras sin embargo, no poseen esa especificidad y son capaces de actuar sobre un gran número de moléculas que poseen características comunes [68].

Desde el punto de vista de los procesos semisintéticos de productos naturales, uno de los cambios en la estructura, es la introducción de un grupo hidroxilado, ya que es un grupo funcional muy versátil que abre una serie de posibilidades de reacción en el carbono sobre el que está situado y sobre la zona vecina de la molécula. En este caso los sistemas enzimáticos involucrados son monooxigenasas, particularmente el citocromo P-450 [68].

Existen una gran variedad de enzimas disponibles comercialmente que difieren en la fuente biológica, actividad, pureza, forma física y características tales como pH y temperatura óptima [67].

Desventajas en el empleo de enzimas:

- Son provistas por la naturaleza solo en una forma de enantiomero.
- Requieren parámetros específicos para que puedan llevar a cabo su función.
- Tienen una gran actividad catalítica en agua, por lo que el empleo de solventes orgánicos para la reacción, puede mermar su actividad.
- Necesitan de cofactores naturales para poder activar su función catalítica y a menudo no se encuentran presentes cuando se emplean en síntesis orgánica.

5.3.1 Clasificación de enzimas

Entre los principales grupos de enzimas empleados en síntesis química están:

- Hidrolasas (incluye lipasas)
- Liasas
- Transferasas
- Oxidoreductasas
- Isomerasas
- Ligasas

Lipasas. Las lipasas (glicerol ester hidrolasas), cortan las grasas (esteres del glicerol) en di o mono glicéridos y ácidos grasos. Son generalmente enzimas extracelulares. Los hongos productores de lipasas incluyen *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum* y las levaduras *Torulopsis* y *Candida*. Entre las bacterias productoras de lipasas se encuentran: *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Staphylococcus*. De estos organismos solamente se utilizan comercialmente *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Candida*. Una aplicación potencialmente importante de las lipasas es en la síntesis de esterés a partir de ácidos y alcoholes en medios no acuosos [65].

Tabla 7. Temperatura y pH óptimo de varias lipasas microbianas [65].

ORGANISMO	pH ÓPTIMO	TEMPERATURA ÓPTIMA
<i>Penicillium chrysogenum</i>	6.2-6.8	37°C
<i>Pseudomonas fragi</i>	7.0-7.2	32°C
<i>Rhizopus delemar</i>	5.6	35°C
<i>Aspergillus niger</i>	5.6	35°C
<i>Penicillium roqueforti</i>	8.0	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.5	45°C
<i>Geotrichum candidum</i>	8.2	37°C
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	7.0	37°C

Liasas. Actúan introduciendo dobles enlaces C=C, C=N, C=O, etc. Por ejemplo; C=O, aldolasas; mandelonitril liasa; C=C, aspartasa, fumarasa. De 255 enzimas identificadas de este tipo, se encuentran disponibles comercialmente solo 35.

Transferasas. Estas enzimas se encargan de transferir grupos ester, anhídrido, péptidos, glicéridos, etc. Las transaminasas y cinasas pertenecen a este tipo de enzimas; son empleadas en síntesis orgánica.

Oxidoreductasas. Son capaces de convertir cetonas en alcoholes (reducción), dobles enlaces en enlaces sencillos, etc. Por ejemplo, oxigenasas, deshidrogenasas.

Isomerasas. Realizan reacciones de isomerización, enlaces C=C, racemizaciones cis-trans, etc.; como fructosa isomerasa y glucosa isomerasa.

Ligasas. Favorecen la formación de enlaces C-O, C-S, C-N y enlaces P-P. Son sumamente importantes en los procesos que involucra la biología molecular [65].

5.3.2 Inmovilización de enzimas

Considerando las propiedades de las enzimas es también importante examinar las implicaciones de cualquier modificación hecha en la estructura enzimática [69].

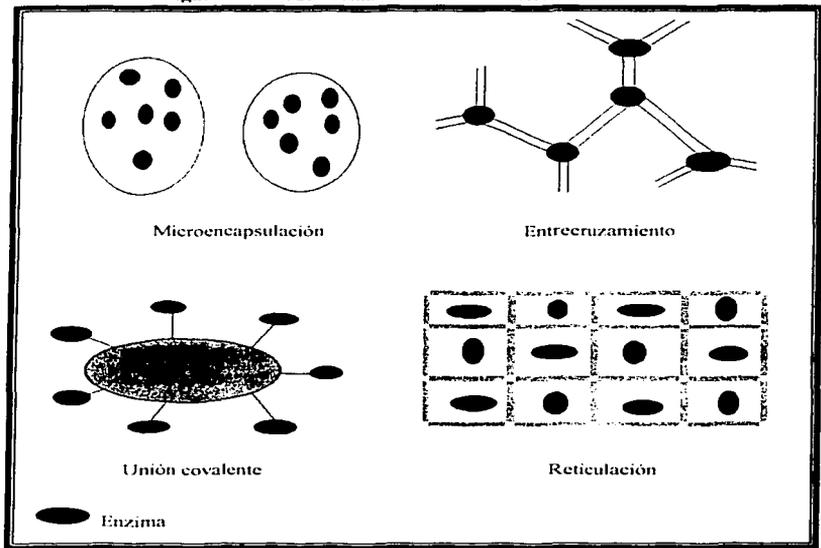
La inmovilización se define como el proceso por el cual el movimiento de las enzimas, células, orgánulos, etc. en el espacio se ve restringido total o parcialmente, dando lugar a una forma de enzima insoluble en agua. Las enzimas inmovilizadas son enzimas unidas, insolubilizadas, soportadas o ligadas a una matriz. En la industria se usan frecuentemente enzimas o células inmovilizadas, ya que se pueden reutilizar, las células o enzimas libres son muy difíciles de volver a utilizar o de emplearse en continuo, puesto que ambos son demasiado pequeños para ser filtrados, y su recuperación mediante centrifugación es muy cara [67]. La inmovilización esta dirigida a inducir cambios en el medio ambiente de la enzima y por lo tanto provoca cambios en las propiedades observadas. El tipo y la magnitud de estos cambios depende de la enzima y del método de inmovilización empleado [69].

La unión de una enzima a otra o a un portador debe tener lugar sin cambiar la estructura tridimensional en el sitio activo de la molécula. Ni la especificidad de sustrato ni la especificidad de la reacción deben perderse como resultado del proceso de inmovilización. Los grupos funcionales presentes sobre la molécula de la enzima que son adecuados para realizar la inmovilización son los grupos α, β y γ -carboxilo, los grupos α y β -amino y los grupos fenilo, hidroxilo, sulfhidrido o imidazol de los aminoácidos correspondientes. Los grupos utilizados no deben ser críticos para la actividad de la enzima [65].

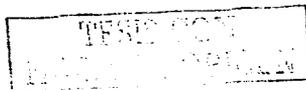
5.3.3 Métodos de inmovilización de enzimas

Los principales métodos de inmovilización de enzimas son: adsorción, unión covalente, microencapsulación, reticulación y entrecruzamiento, *ver figura 5.* [69].

Figura 5. Métodos comunes en inmovilización de enzimas.



Las enzimas pueden ser adsorbidas sobre la superficie de un soporte. Este proceso resulta de interacciones físicas más que químicas (efectos de carga e interacciones hidrofóbicas) y la flexibilidad de este tipo de inmovilización reduce al mínimo las



posibilidades de distorsión estructural de la enzima. Se considera que la adsorción es análoga a lo que ocurre en las enzimas unidas a membranas "in vivo", este es un proceso reversible [69].

La unión covalente de enzimas solubles a un soporte insoluble es el método más común para la inmovilización de enzimas habiéndose utilizado una amplia gama de técnicas y soportes para este propósito. Aunque parte de la actividad puede perderse durante el proceso de acoplamiento [69].

Como una alternativa a la unión de la enzima a un soporte se puede adoptar un método de atrapamiento. En este caso la enzima permanece en un estado sin modificar, pero es atrapada en una gotita de disolvente dentro de una matriz polimérica. Para la encapsulación se lleva a cabo una aproximación más controlada y la enzima es atrapada en pequeñas cápsulas [69].

Cuando una enzima es inmovilizada la actividad de la preparación es siempre diferente a la de la forma natural. Las razones para ello son muchas pero es posible identificar las tres principales influencias: efectos conformacionales, de partición y difusionales. La inmovilización puede causar perturbaciones estructurales en la proteína, reduciéndola eficacia catalítica de la enzima, también se reduce el acceso del reactivo al centro activo de la enzima, ambos fenómenos se clasifican como conformacionales. Los efectos de partición ocurren cuando las concentraciones de reactivo o de otros compuestos relacionados con la actividad de la enzima, pueden ser diferentes en la superficie del soporte matriz de las observadas en el grueso de la solución; estos efectos pueden surgir por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas [69].

Los efectos difusionales o de transferencia de masa pueden ser de dos tipos, internos o externos. La resistencia externa proviene de la presencia de una película de líquido inmóvil alrededor de la enzima inmovilizada, la resistencia interna a la transferencia de masa surge cuando las enzimas quedan atrapadas en polímeros [69].

5.4 Biotransformaciones con cultivos celulares de plantas

Los sistemas enzimáticos de los cultivos celulares son los que desencadenan y llevan a cabo las biotransformaciones cuando se les adiciona un sustrato exógeno [63].

El potencial bioquímico de cultivos celulares de plantas para producir metabolitos secundarios como fármacos, flavonoides, pigmentos y agroquímicos es de gran interés en conjunto con otras técnicas biotecnológicas [70].

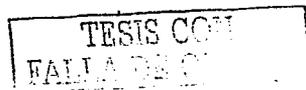
Esto se evidencia por la habilidad de transformar sustratos exógenos específicos administrados a cultivos celulares; en donde el cultivo es empleado como un bioreactor. La investigación sobre estos cultivos esta enfocada a su habilidad de biotransformar sustratos exógenos [70].

Las reacciones de biotransformación ocurren en todas las células, el resultado es el producto de procesos de transformación catabólicos y anabólicos del mecanismo general biosintético de una célula [63].

El tipo de reacción, estereoespecificidad, enantioselectividad y mecanismo que involucra la biotransformación con cultivos celulares se llevan a cabo en los siguientes tipos de reacciones [70].

- > Hidroxilación
- > Oxido-reducción de alcoholes y cetonas
- > Reducción de dobles enlaces C=C
- > Conjugación de glucósidos
- > Hidrólisis

La introducción regio y estereoselectiva de funciones oxigenadas en varias posiciones de la molécula es una de las categorías más importantes de las reacciones de biotransformación de sustratos *exógenos* [70], ya que es una herramienta de gran utilidad para la síntesis de determinados compuestos hidroxilados que por vía química involucra



más pasos o simplemente resulta más difícil; lo que representa una generalidad de las reacciones de biotransformación con respecto a la síntesis orgánica.

Otro caso es el de las reacciones de hidrólisis, este tipo de reacciones es importante por que puede ser empleada para la resolución de mezclas racémicas de acetatos. Muchos otros tipos de biotransformación han sido informados como es el caso de las reacciones de isomerización, epoxidación, degradación y deshidrogenación. [70].

Los tipos de reacción y la estereoquímica en la biotransformación dependen de los grupos funcionales del sustrato adicionado y de la estructura en la cercanía del grupo funcional.

En este tipo de reacciones de biotransformación la concentración del producto final es comúnmente el resultado de la actividad sintética y metabólica de la célula así como del grado de diferenciación y de la edad del cultivo celular. Por ejemplo, en un cultivo de suspensión de *Nicotiana sylvestris*, la máxima actividad de glicosil-transferasa ocurre varias horas después del punto máximo de síntesis de proteína [63].

5.4.1 Cultivos de células de plantas inmovilizados [70]

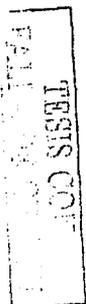
Los cultivos de células también pueden emplearse inmovilizados, lo que provee ventajas para la biotransformación de sustratos *exógenos*, ya que:

- Las células favorecen la resistencia por lo que se disminuyen el daño por inmovilización.
- Las células inmovilizadas pueden ser usadas varias veces por un periodo prolongado.
- Se consiguen altas concentraciones de biomasa, por lo tanto se obtienen altos rendimientos en la conversión de sustratos.
- El método facilita el recobro de la masa celular y de los productos.
- Es posible un tratamiento químico secuencial.

Tabla 8. Reacciones de biotransformación realizadas por cultivos celulares de plantas

SUSTRATO	PRODUCTO	TIPO DE REACCIÓN	ESPECIE DE PLANTA	CULTIVO CELULAR	REF.
(3R)-Linalol	(3R)-8-hidroxilinalol	Hidroxiclación	<i>Nicotiana tabacum</i>	SC*	70
Digitoxigenina	5-β-hidroxitigitoxigenina	Hidroxiclación	<i>Daucus carota</i>	CI*	63, 70
Ciclopentanol	Ciclopentanona	Redox	<i>Nicotiana tabacum</i>	SC*	70
l-feniletanol	Acetofenona	Oxidación de OH	<i>Spirodela oligorrhiza</i>	SC*	70
Geraniol	Gerianal	Oxidación de OH	<i>Glycine max</i>	SC*	63, 70
Codoinona	Codoina	Reducción de C=O	<i>Papaver somniferum</i>	CI*	70
Benzaldehido	Alcohol benílico	Reducción de C=O	<i>Lavandula angustifolia</i>	SC*	63, 70
Pulegona	Neomentol	Reducción de C=C y C=O	<i>Mentha sp</i>	CI*	63, 70
Geraniol	Acetato de geraniol	Esterificación	<i>Citrus sp.</i>	SC*	63, 70
Quercetino	Quercetino-3-O- glucosido	Glicosidación	<i>Cannabis sativa</i>	SC*	63, 70
Geraniol	Nerol	Isomerización	<i>Glycine max</i>	SC*	63, 70
8-acetoxi-p-ment-1-eno	8-acetoxi-2-epoxi-4-p-mentano	Epoxidación	<i>Nicotiana Tabacum</i>	SC*	70
Dafnetina(7,8-OH-cumarina)	7-OH,8-metoxi cumarina	Metilación	<i>Nicotiana tabacum</i>	SC ¹	63, 70

*SC denota que se empleo una suspensión de células para la biotransformación y CI células inmobilizadas.



5.4.2 Proyección de las biotransformaciones con cultivos celulares de plantas

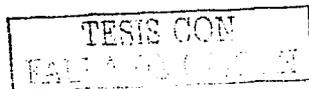
Algunas biotransformaciones *in vitro* ya esta aplicándose a escala industrial; por ejemplo la papaína aislada principalmente de *Carica papaya*, es inmovilizada sobre cuentas de vidrio poroso en un compartimiento celular de látex, y se emplea en el proceso de clarificación de cerveza. Otras enzimas aisladas de especies vegetales se enlistan en la *tabla 9* [63].

Tabla 9. Ejemplos de enzimas aisladas de diferentes plantas, empleadas en biotecnología o en transformaciones biológicas *in vitro*.

ENZIMA	PLANTA	EMPLEO
Papaína	<i>Carica papaya</i>	Eliminar la turbidez en la cerveza
Bromelina	<i>Ananas comosus</i>	Se une a amidas y esterés de leucina y glicina como sustituto para la pepsina y tripsina: agente ablandador de carne, empleada contra la tromboflebitis
Ficina	<i>Ficus lami-folia</i> <i>Ficus glabrata</i>	
β -amilasa	<i>Glycine max</i>	Producción de maltosa pura para infusiones, soluciones y uso comestible

Las células de plantas tienen un crecimiento lento comparado con el de los microorganismo (por ejemplo, las bacterias); sin embargo se ha encontrado que son igualmente eficientes para transformar moléculas, y capaces de emplear los sustratos exógenos que les son adicionados, dependiendo de la estructura de dicha sustancia; así como de la especie empleada en el cultivo celular. La especie *Nicotiana tabacum* (tabaco) es capaz de llevar a cabo una gran gama de transformaciones entre las cuales se encuentran: reacciones de hidroxilación, glicosilación, oxidación-reducción y metilación [70].

Se considera que las biotransformaciones con cultivos celulares de plantas representan una herramienta importante para la modificación estructural de compuestos, para obtener moléculas con propiedades útiles, ya sea de aplicación en el área farmacéutica, agroquímica, de alimentos o simplemente como intermediarios en síntesis orgánica [70].

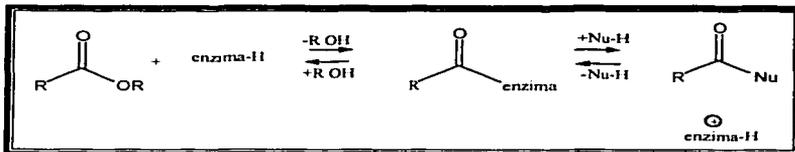


5.5 Biotransformación en Lactonas Sesquiterpénicas

En la literatura se han descrito transformaciones químicas, enzimáticas y/o microbianas sobre lactonas sesquiterpénicas. Las lactonas sesquiterpénicas se forman por la oxidación de la “cabeza” del grupo metilo del farnesol hasta ácido carboxílico y por hidroxilación enzimática en los carbonos C-6 y C-8, resultando finalmente en la formación de la lactona mediante una reacción de sustitución nucleofílica en C sp², para generar las sesquiterpenlactonas cerradas en el C-6 y C-8 [71].

Para llevar a cabo la transformación química, enzimática y microbiológica de la α -santonina hacia análogos de la sivanólida y yomogina, mediante transformaciones químicas, enzimáticas y microbiológicas [72-74], se realizó la hidrogenación catalítica de la α -santonina (6) obteniendo una mezcla de hexahidro derivados 13 (62%), 14 (26%) y 15 (10%), los cuales fueron aislados de manera secuencial como los correspondientes derivados acetilados, obtenidos de la transformación enzimática selectiva por medio de lipasas⁶ [72]. En el *esquema 7*, se muestra el principio de transformación de esterhidrolasas.

Esquema 7. Principio de transformación de las esterhidrolasas



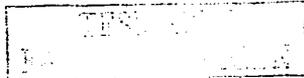
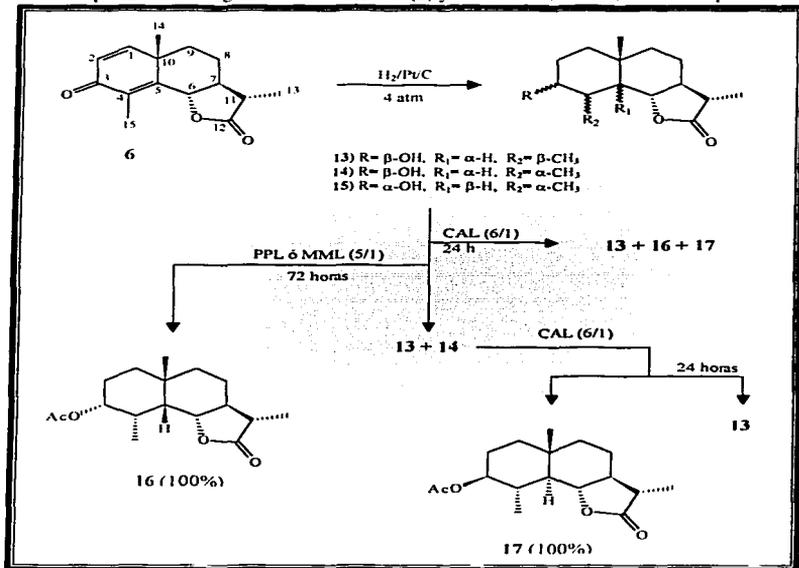
El tratamiento de 13, 14 y 15 con PPL o MML (5/1) por 72 horas produjo la acetilación completa de 15. Mientras que la recuperación de 13 y 14 por métodos cromatográficos, seguido del tratamiento con CAL en acetato de vinilo, después de 24 horas, produjo el compuesto 17. La dificultad experimental que se encontró para separar y purificar los hexahidroderivados y sus acetilados correspondientes, por métodos

⁶ Los tres tipos de enzimas (lipasas) empleadas fueron: CAL, MML, PPL.

cromatográficos, llevó a proponer una acetilación selectiva por medio del empleo de enzimas, *esquema 8*.

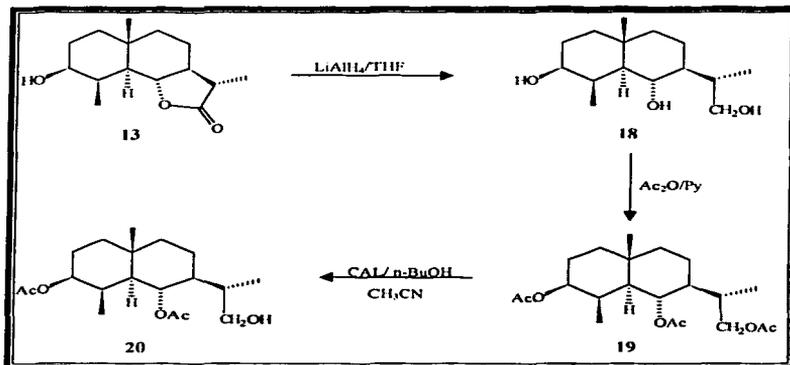
Observándose que las enzimas PPL y MML en este tipo de sustrato muestran una preferencia hacia la acetilación en las 3-hidroxi-sesquiterpenóidas con conformación de la *cis*-decalina, mientras que CAL muestra una gran selectividad hacia los productos con disposición H_α-5 (*trans*-decalina) o H_β-5 (*cis*-decalina), pero siempre con una configuración H_β-4 [72].

Esquema 8. Hidrogenación catalítica de (6) y transformación selectiva con lipasas



La 3 β -hidroxi-4 α -5 α -7 α -11 β -H-eudesman-6 α -12-olida (**13**), fue tratada con LiAlH₄, para obtener el triol (**18**), que después se acetiló mediante Ac₂O/Py para obtener el derivado triacetilado (**19**). La desacetilación enzimática regioselectiva fue probada en diferentes disolventes (MeOH, acetonitrilo, dioxano) obteniéndose un mayor rendimiento (95%) del 3,6 diacetoxi derivado (**20**) empleando CAL como enzima, n-butanol como nucleófilo y acetonitrilo como disolvente, como se muestra en el *esquema 9* [72].

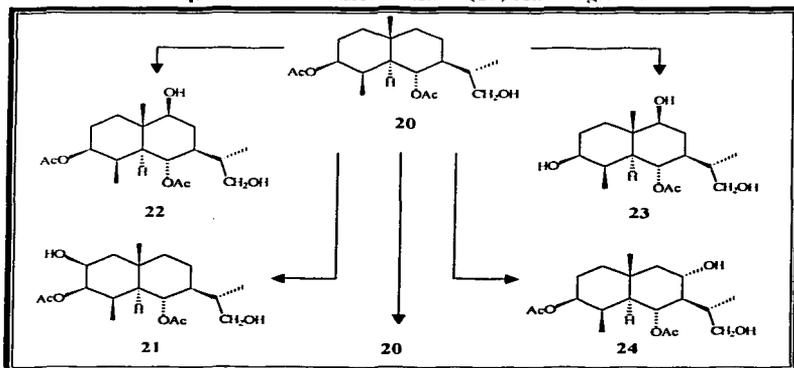
Esquema 9. Transformaciones químicas y desacetilación enzimática de (**19**) con CAL



La incubación de *Rhizopus nigricans* con el sustrato, [3 β ,6 α -diacetoxi-12-hidroxi-4 α ,5 α ,7 α ,11 β -H-eudesmano (**20**)], por 11 días generó los productos **21** (15%), **22** (20%), **23** (15%) y **24** (20%), y el producto de partida (20%). En el *esquema 10* se ilustra dicha transformación, donde se observa que la acción de este microorganismo consistió en la hidroxilación de los C-3, C-8 y C-9; así como la desacetilación del C-3 [72].

Con la incubación del 3 β ,6 α -diacetoxi-12-hidroxi-4 α ,5 α ,7 α ,11 β -H-eudesmano (20) con *Gliocadium roseum* por 11 días, se obtuvo el triol 18 (1%), 25 y 85% del producto de partida, como se ilustra en el esquema 11; esto indica que este hongo dirige la acción hacia la desacetilación en C-3 (25), ó en C-3 y C-6, producto 18.

Esquema 10. Biotransformación de (20) con *R. nigricans*

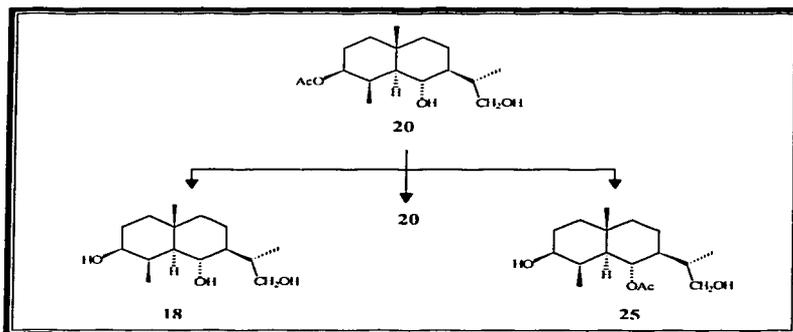


Por otro lado, la incubación de 3 β ,12-diacetoxi-*cis*-6-decalona con *Rhizopus nigricans* y *Gliocadium roseum* dio bajo rendimientos en productos. Por lo tanto se puede concluir que los 5 β -H-eudesmanos no son sustratos apropiados para ser incubados con este tipo de hongos [72].

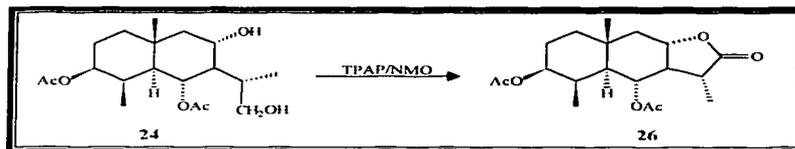
El producto 3 β ,6 α -diacetoxi-8 α ,12-dihidroxi-4 α ,5 α ,7 α ,11 β -H-eudesmano (24) obtenido de la hidroxilación con *Rhizopus nigricans* del 3 β ,6 α -diacetoxi-12-hidroxi-4 α -5 α -7 α ,11 β -H eudesmano (20); fue oxidado con TPAP/NMO para obtener 3 β ,6 α -diacetoxi-4 α ,5 α ,7 α ,11 β -H-eudesman-8 α ,12-olida (26), como resultado de la

oxidación del grupo hidroxilo del C-12 y el cierre del anillo mediante una lactonización hacia C-8, *esquema 12* [72].

Esquema 11. Biotransformación de (20) con *C. roseum*



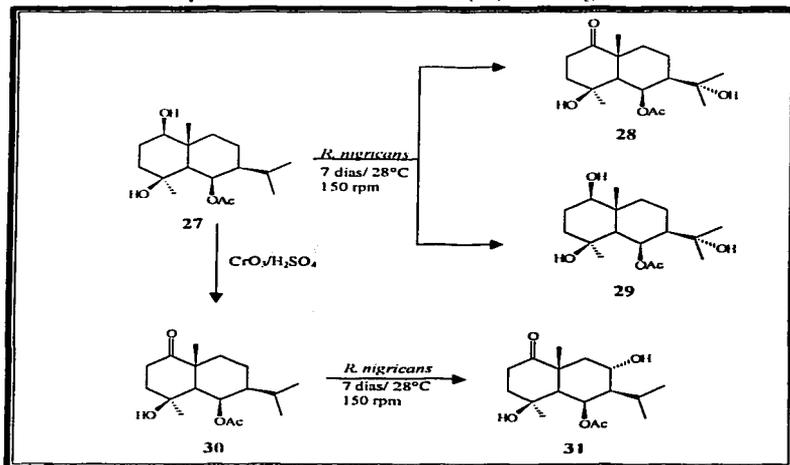
Esquema 12. Oxidación con TPAP/NMO de (24)



La estructura 26 es análoga de las 8,12-eudesmanólidas naturales, como la yomogina aislada de *Artemisia* y la sivasinólida a partir de *Tanacetum*. De aquí la necesidad de preparar nuevos sustratos que puedan ser hidroxilados en el C-8 por *Rhizopus nigricans* e incrementar el rendimiento de la hidroxilación en dicho átomo de carbono [72].

En el esquema 13, muestran los productos obtenidos de la incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano (27) con *Rhizopus nigricans* por 7 días, de donde se aisló una mezcla de productos (57 %), de la cual se obtuvo (28) (70% de la mezcla), (29) (30% de la mezcla) y el material de partida (27) (21%). Observándose que *Rhizopus nigricans* oxida el C-1 e hidroxila la posición C-11.

Esquema 13. Biotransformación de (27) con *R. nigricans*

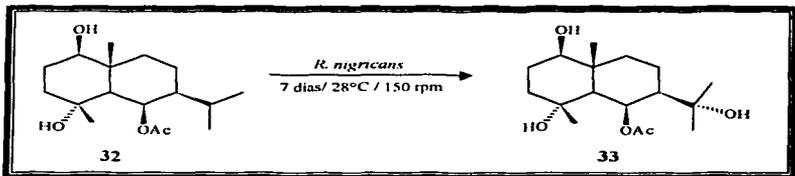


La presencia del grupo acetoxi en el C-6, aparentemente es un requisito necesario para que *Rhizopus nigricans* actué en este tipo de sustancias, ya que el derivado no acetilado del compuesto (27), fue recuperado después de siete días de incubación con dicho hongo [75].

Para incrementar el rendimiento del compuesto (28) hidroxilado en el C-11, se incubó el producto (30) con *Rhizopus nigricans*, después de tres días se aislaron los compuestos (28), (72%) y el compuesto (31), este último muestra hidroxilación en el C-8, dicho compuesto puede ser usado como sustrato de partida para la síntesis de lactonas cerradas en C-8 [75].

El epímero en C-4 (32) del compuesto 27, fue biotransformado con buen resultado después de siete días de incubación con *R. nigricans* para dar el derivado hidroxilado 33, en el C-11 (18%), ver esquema 14 [75].

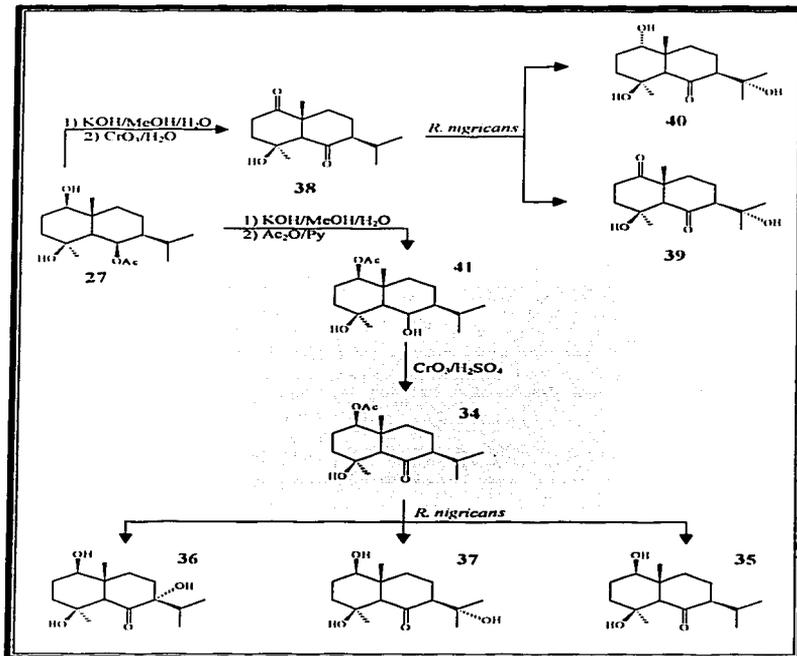
Esquema 14. Biotransformación de (32) con *R. nigricans*



La incubación de (34), con *Rhizopus nigricans* por tres días, produjo una cantidad mínima del producto de partida (17%), y tres productos adicionales (35) (55%), (36) (5%) y (37) (14%), que fueron aislados. En el esquema 15, se muestran las transformaciones químicas y biológicas para el 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano (27).

De este esquema, se puede concluir que la acción de *Rhizopus nigricans* sobre este tipo de compuestos, resulta en: desacetilación en C-1 en los compuestos 35, 36 y 37, e hidroxilación en C-7 y C-11, ver compuestos 36 y 37 [75].

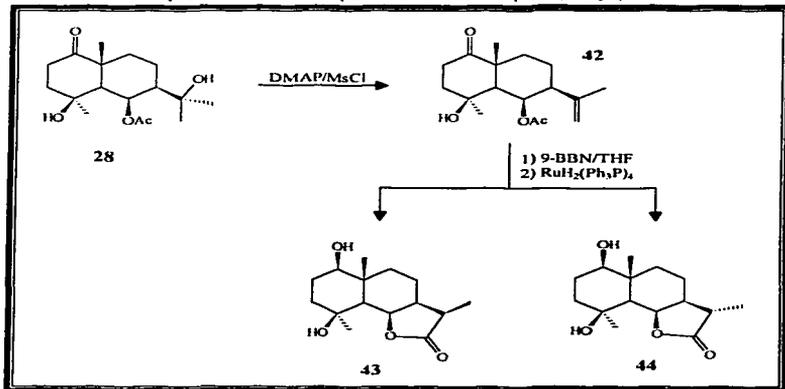
Esquema 15. Transformaciones químicas y biológicas de (27)



La incubación del compuesto (38) [1,6-diceto derivado] con *R. nigricans* durante 4 días, produjo el compuesto (39) (32%), hidroxilado en C-11; además el compuesto (40) (53%) hidroxilado en el C-11 y reducido en el C-1, para dar el alcohol con configuración

absoluta (*S*). Para transformar los derivados 11-hidroxilados en 12-hidroxilados, se empleó el sustrato (**28**), el cual fue deshidratado con DMAP/*M*sCl para dar el compuesto (**42**), el cual mediante una hidrobioración con 9-BBN/THF, seguido de una oxidación, permitió la obtención de los 6β-eudesmanólidas [75]. Este tipo de lactonas son escasas en la naturaleza, de ahí que se ha informado de algunos métodos parciales de síntesis, como las que se describen en el *esquema 16*, para la 11-*R*-6-*epi*-dendroserina (**43**) y la 11-*S*-6-*epi*-dendroserina (**44**) [75].

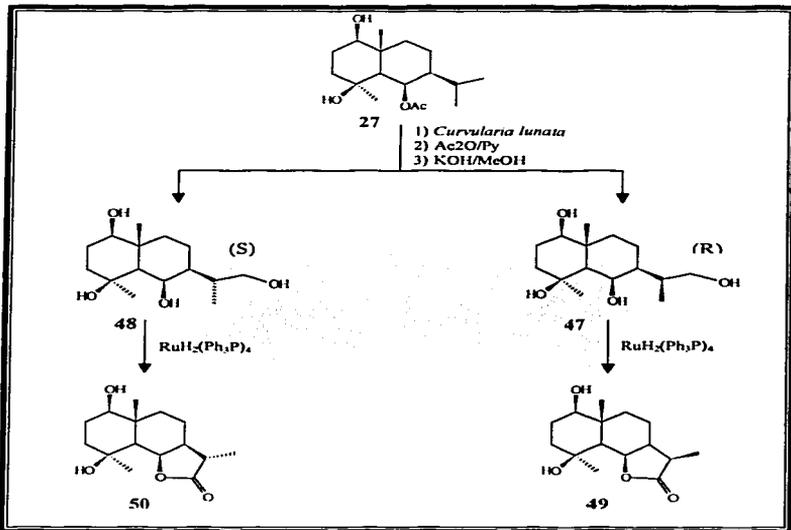
Esquema 16. Métodos parciales de síntesis para (**43**) y (**44**)



En el *esquema 17*, se muestran las conclusiones obtenidas por García Granados [75], donde las 6β,12-eudesmanólidas son eficientemente obtenidas a través de la biotransformación con *R. nigricans* a partir de los 11-hidroderivados, que por la hidroxilación del C-12 con *C. lunata*. Este procedimiento constituye un método viable para obtener 6β,12-sesquiterpenólidas de sesquiterpenos hidroxilados en el C-6.

Por otro lado, se ha informado de la biotransformación de eudesmanos 1,6-difuncionalizados en cultivos de *C. lunata* para obtener 11(R) y 11(S)-6 β ,12-hidroieudesmanólidas, las cuales fueron oxidadas con $\text{RuH}_2(\text{Ph}_3\text{P})_4$ para dar 11(R) y 11(S)-6 β -eudesmanólidas. Para lo cual se incubó el 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroieudesmano (27) con *Curvularia lunata* por 12 días, obteniéndose una mezcla de metabolitos polares (23%), los cuales fueron acetilados, separados por cromatografía e hidrolizados, como se indica en el *esquema 18*. La oxidación selectiva con $\text{RuH}_2(\text{Ph}_3\text{P})_4$ produjo la lactona 49 (43%) y 50 (41%), respectivamente de (47) y (48) [76].

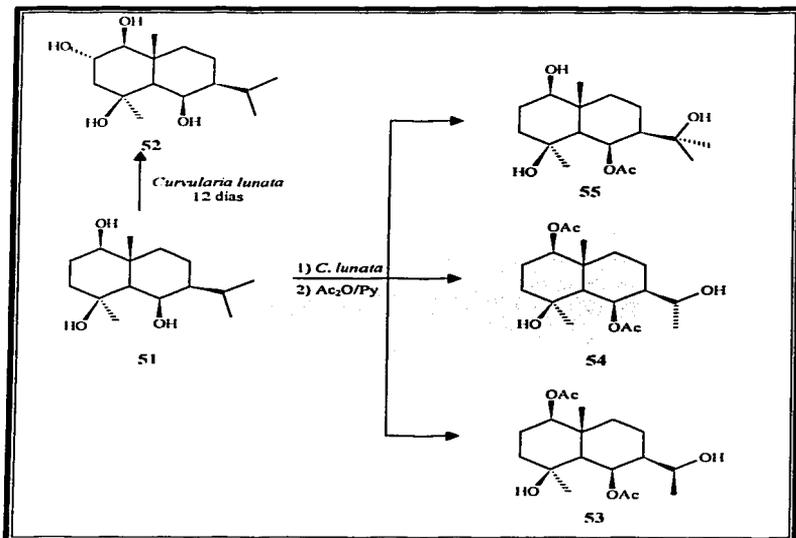
Esquema 18. Transformaciones químicas y biológicas de (27)



El producto **51**, que fue incubado con *Curvularia lunata* por 12 días, para obtener 79% del compuesto **51** y (2%) de un metabolito más polar **52**, el cual muestra una nueva hidroxilación en el C-2; así como también una mezcla de productos, que después de acetilar se separaron en **53** (55%), **54** (24%) y **55** (21%), dichos compuestos son producto de la hidroxilación en el C-11 y C-12 por parte de *C. lunata*, ver esquema 19 [76].

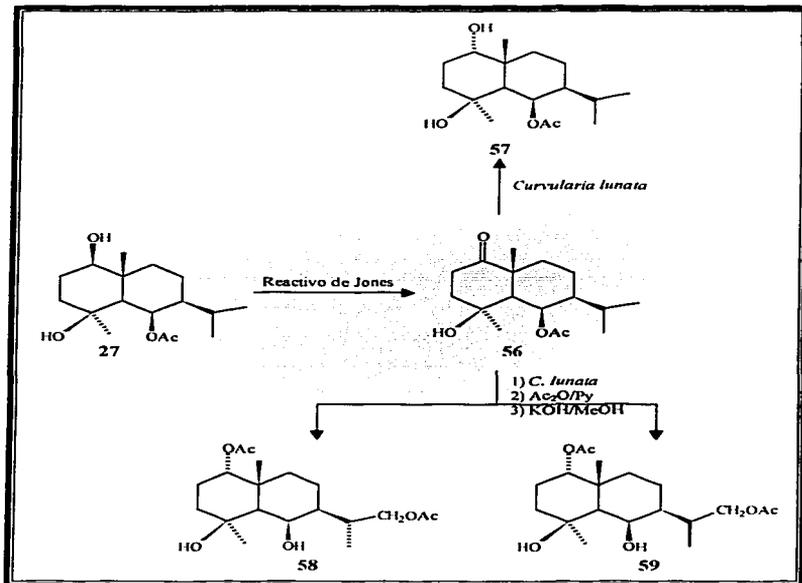
El producto **56** se incubó por 12 días con *Curvularia lunata*, de donde se aisló **56** (43%) y **57** (42%) y una mezcla de compuestos muy polares (10%). De la acetilación de la misma mezcla se obtuvo **58** (51%) y **59** (49%) [76].

Esquema 19. Biotransformación de (**51**) con *C. lunata*

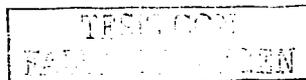


La reducción microbiana de un grupo carbonilo normalmente produce alcoholes con configuración (*S*) [76a]; así también la reducción de un grupo ceto similar presente en eudesmanólidas y eudesmanos genera alcoholes con configuración (*S*), los cuales son difíciles de obtener por vía química [76, 76b].

Esquema 20. Transformación química y biológica de (27) por *C. lunata*



La saponificación de 58 y 59 da 60 y 61 respectivamente, ver figura 6. Estas sustancias (59 y 60) fueron comparadas con los 12-hidroxiderivados (47 y 48) obtenidos de



la incubación de (27), encontrándose que 60 es un epímero de 47 y 61 de 48, la configuración en el C-11 es (*R*) para 47 y (*S*) para 48, ver figura 6, dicha determinación fue confirmada por la formación de las lactonas respectivas por medio de la oxidación con $\text{RuH}_2(\text{Ph}_3\text{P})_4$ [76].

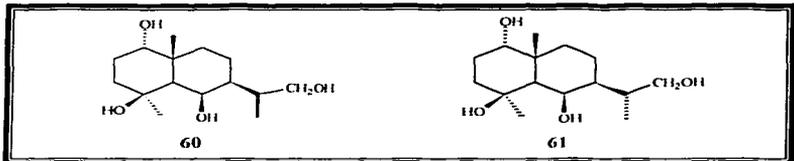


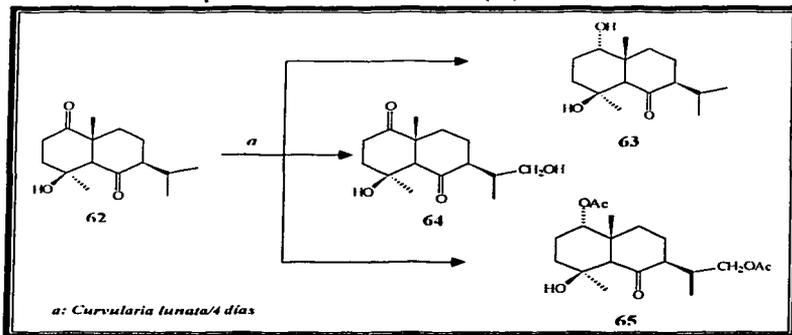
Figura 6

Por otro lado, la incubación del sustrato 62, por 4 días con *Curvularia lunata*, produjo 63 (1 α ,4 β -dihidroxicudesman-6-ona, 28%), 64 (4 β ,12-dihidroxicudesman-11(*R*)-ano-1,6-ona, 32%) y 65 (1 α ,12-diacetoxi-4 β -hidroxicudesman-11(*R*)-ano-6-ona, 11%). El compuesto 63 fue el resultado de la reducción regio y estereoselectiva del grupo ceto en C-1 del sustrato 62, esquema 21, mientras el compuesto 64 fue el resultado de la hidroxilación en el C-12 del sustrato 62; 65 se aisló después de la reacción de acetilación [76].

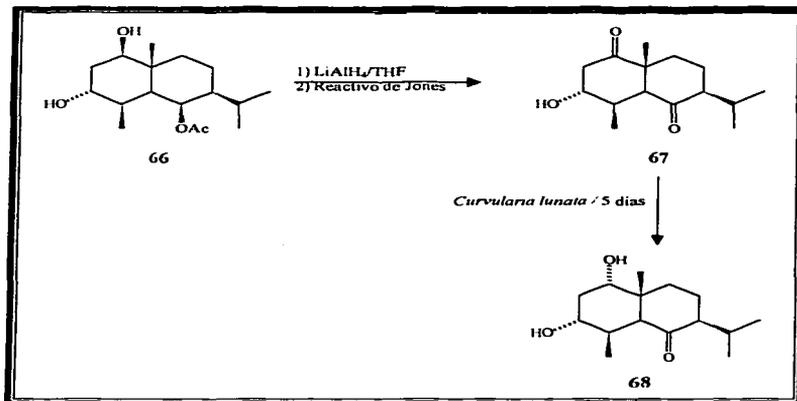
Los 4 α -hidroxi análogos fueron incubados con *Curvularia lunata*; encontrándose que este microorganismo es capaz de hidroxilar el C-12; después la incubación del sustrato 66 con *Curvularia lunata* por 14 días, permitió recuperar a la materia prima intacta [76].

En el esquema 22, se muestra la transformación química de 66 y la transformación microbiológica del sustrato 67, con *Curvularia lunata* por 5 días, para dar el producto 68 (64%). El resultado más importante de este proceso fue que el metabolito 68 (64%) presentó un grupo hidroxilo en el C-1 con configuración (*S*) [76].

Esquema 21. Biotransformación de (62) con *C. lunata*



Esquema 22. Transformación química y biológica de (67)



En general se encontró que los sustratos 4 β -hidroxilados fueron transformados a los 12-hidroxiderivados. Los sustratos con un sustituyente ceto en el C-6 fueron más eficientes, aunque más selectivos en la obtención de los compuestos 12-hidroxilados con la configuración 11-*R*. Entonces, de todos esos sustratos (62), es posible obtener 6 β -lactonas ya que presenta dos grupos ceto, en el C-1 y C-6, siendo el sustrato más óptimo para biotransformar [76].

6. ENSAYOS BIOLÓGICOS

6.1 Definición

En algunos casos cuando se está estudiando una especie vegetal, para facilitar la localización de alguna actividad biológica, el estudio se hace biodirigido⁷ [77,78]. Los métodos de seguimiento incluyen ensayos biológicos puesto que se busca una determinada respuesta frente a diversos organismos de prueba, *ver tabla 10*; lo que puede dar indicios de una actividad específica que se investigará posteriormente. Es recomendable que estos métodos sean rápidos, seguros, baratos y convenientes [77-79].

Tabla 10. Ensayos biológicos empleados en la investigación biodirigida.

ACTIVIDAD	ENSAYOS BIOLÓGICOS	BLANCO
Antibacterial	Bacterias patógenas (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>)	
Antifúngica	Hongos y levaduras patógenos (<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus ssp.</i>)	
Toxicidad	<i>Artemia salina</i> L. (camarón de mar)	
Antitumoral (Ensayo con discos de papa)	Células de papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	
Insecticida	<i>Spodoptera ssp.</i> (gusano africano), <i>Epilachna varivestis</i> (escarabajo de haba mexicano)	
Larvicida	<i>Aedes aegypti</i> (mosquito vector de la fiebre amarilla)	
Moluscocida	Caracol transmisor de la esquistosomiasis (<i>Bromphalaria glabrata</i>)	

⁷ Un estudio biodirigido tiene como fin seguir la actividad biológica durante el fraccionamiento de extractos. La actividad biológica a través de un ensayo permite conocer la naturaleza, constitución o potencia de un material vegetal o sustancia pura de acuerdo con la dosis empleada [77].



6.1.1 Determinación de la actividad antimicrobiana (Ensayo microbiológico)

Los métodos para determinar la actividad antimicrobiana son varios y se emplean de acuerdo a su sensibilidad, la facilidad y rapidez que involucran. Los métodos empleados para determinar la actividad antimicrobiana de extractos o productos puros aislados de plantas son:

- Método de difusión
- Método de dilución
- Método autobiográfico

Método de difusión. En este método se puede determinar la actividad antimicrobiana empleando dos diferentes ensayos de difusión, uno que involucra cilindros llenos con una solución de concentración conocida de la sustancia problema, colocados sobre la superficie de agar (solidificado) en la cual se incorpore previamente una suspensión de microorganismos (antes de que el agar solidifique, teniendo la precaución de añadir dicha suspensión a una temperatura no extremosa para evitar que el microorganismo muera por este motivo) determinando después del tiempo de incubación, el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento microbiano, para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

El otro método se realiza con discos de papel impregnados de la solución de la sustancia problema de concentración conocida, de la misma forma que en el ensayo anterior se mide el diámetro de los halos de inhibición; el agar en el cual se colocan los discos se prepara de la misma forma que para el ensayo de cilindros [80,81]. Ambos métodos se fundamentan en la ley de difusión de Fick. Se recomienda su empleo cuando la sustancia problema es muy soluble en agua, por lo que no es aceptable en casos de aceites esenciales o extractos de polares [82].

Método de dilución. El método de dilución es más exacto que el de difusión, para determinar la prueba de susceptibilidad a antibióticos, sin embargo el procedimiento es

tedioso, por lo que es menos usado que el anterior [83]. La técnica de dilución incluye un medio líquido y un medio sólido, ambos se basan en la dispersión homogénea de la muestra en un medio de cultivo [82]. Este método es el más recomendado para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de una muestra pura y la Concentración Mínima Bactericida (MCB). En este método la turbidez es tomada como un indicador del crecimiento bacteriano [84]. Se sugiere su empleo cuando la sustancia a probar no difunde fácilmente en el agar por lo que puede ser incorporada directamente al medio de cultivo. La ventaja de este método es que se pueden sembrar hasta seis microorganismos diferentes en una misma caja [82].

Método bioautobiográfico. Se basa en los efectos biológicos de las sustancias, que se detectan en cromatogramas. Las sustancias más comúnmente detectadas por la bioautografía son los antibióticos [85]. Con este método se han detectado sustancias tóxicas a partir de hongos [86], así como de *Erwinia carotovora* y *E. herbicola* [87].

En este método se localiza la actividad antibacteriana en un cromatograma. Casi todos los métodos se basan en el proceso de difusión en agar, en el cual los compuestos antibacteriales difunden de la superficie de la capa cromatográfica, hacia la superficie del agar previamente inoculado, después se visualizan las zonas de inhibición [88].

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

55-A

TESIS COM
FALLA DE CASCEN

Actualmente existe en la literatura especializada una descripción muy limitada acerca del conocimiento sobre el comportamiento de los sistemas biológicos —enzimas, microorganismos, cultivos de tejido celular— en función de la estructura del sustrato. Además, el conocimiento que se tiene sobre la biotransformación de las lactonas sesquiterpénicas —terpenoides— con hongos filamentosos es muy escaso, a pesar de existir demasiada información con respecto a su aislamiento, caracterización y en algunos casos a sus propiedades biológicas. Con base en lo anterior, el presente proyecto tiene como finalidad obtener y caracterizar los derivados químicos de la partenólida por medio de transformaciones químicas y biológicas, para poder evaluar su potencial como agentes antimicrobianos y antitumorales.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Obtención y evaluación biológica —actividad antimicrobiana y antitumoral— de la partenólida y de sus productos de transformación química y biológica (*Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* *Bauveria bassiana* y cultivo de tejido de zanahoria).

1.1 Objetivos Específicos

- 1.1.1 Realizar la investigación bibliográfica sobre biotransformaciones enzimáticas y con microorganismos de Lactonas Sesquiterpénicas.
- 1.1.2 Realizar la investigación bibliográfica sobre la extracción, aislamiento y caracterización de la partenólida.
- 1.1.3 Realizar la investigación bibliográfica sobre la determinación de las propiedades biológicas de la partenólida.
- 1.1.4 Realizar las biotransformaciones de la partenólida con hongos filamentosos, (*Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Bauveria bassiana*) y cultivo de tejido de zanahoria
- 1.1.5 Aislar, caracterizar e identificar los productos obtenidos de la biotransformación de la partenólida.
- 1.1.6 Obtención de algunos derivados de la partenólida por medio de transformaciones químicas.
- 1.1.7 Aislar, caracterizar e identificar los productos obtenidos de la transformación química de la partenólida.
- 1.1.8 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los derivados mayoritarios obtenidos en el punto 1.1.4 y 1.1.6
- 1.1.9 Evaluación de la Actividad Antitumoral^a de los derivados mayoritarios obtenidos en el punto 1.1.4 y 1.1.6
- 1.1.10 Discusión de los resultados obtenidos de dicho proyecto.

^a La Actividad Antitumoral fue determinada en el Laboratorio L-324 de Biología Celular y Molecular del Cáncer FES Zaragoza, Campus II, UNAM.

V. HIPÓTESIS

57-A

Las lactonas sesquiterpénicas representan un grupo de productos naturales muy importantes debido a su amplia gama de propiedades biológicas que presentan, las cuales están relacionadas con su estructura molecular.

Entonces, el presente proyecto se propone obtener y caracterizar los productos químicos derivados de la transformación química y biológica de la partenólida (*Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* *Bauveria bassiana* y cultivo de tejido de zanahoria); con la finalidad de evaluar su potencial como posibles agentes antimicrobianos y antitumorales.

VI. MATERIAL

58-A

TESIS CON
FALLA DE GREEN

1. Material para las Transformaciones con Microorganismos

Material de vidrio

Probeta 100, 1000 mL
Pipetas graduadas 5, 10, 20 mL
Tubos de ensaye con tapón de rosca 13x100, 18x150
Cajas Petri
Varilla de vidrio
Pipetas Pasteur

Sustancias

Partenólida
Medio de cultivo Agar Soya Trypticaseína (AST)
Medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA)
Medio de cultivo Caldo Soya Trypticaseína (CST)

Material biológico

Aspergillus niger ATCC 16404
Rhizopus nigricans ATCC
Bauveria bassiana ATCC
Cultivo de tejido de zanahoria

Disolventes

Cloroformo, grado analítico (Merck)
Etanol^o, grado técnico (Merck)

Equipo

Rotavapor (Buchi B-481)
Balanza Analítica (Ainsworth 100 A)
Balanza semianalítica (OHAUSE 400)
Autoclave (Hirayama)
Fermentador (Orbital shaker, Forma Scientific, modelo 4518)

2. Material para la transformación con el cultivo de zanahoria

Material de vidrio

Probeta 100, 1000 mL
Pipetas graduadas 5, 10, 20 mL
Pipetas graduadas 5, 10, 20 mL
Probeta 10 mL
Mortero con pistilo

^o El disolvente fue purificado mediante destilación fraccionada.

Sustancias
Partenólida

Material biológico
Cultivo de tejido de zanahoria

Disolventes
Cloroformo, grado analítico (Merck)
Agua destilada

Equipo
Rotavapor (Buchi B-481)
Balanza Analítica (Ainsworth 100 A)
Balanza semianalítica (OHAUSE 400)
Autoclave (Hirayama)
Fermentador (Orbital Shaker, Forma Scientific, modelo 4518)

3. Material para Transformación Química de la partenólida

Apertura de epóxido en medio ácido con HClO_4 /acetona, APTS/AcOEt y en medio básico KOH/MeOH- H_2O

Material de vidrio
Matraz Erlenmeyer (25, 50 mL)
Matraz bola con boca esmerilada 24/40 (100, 250 mL)
Vaso de precipitado (50, 100, 250 mL)
Embudo de separación (125 mL, 250 mL)
Pipeta graduada (5, 10 mL)
Probeta (100 mL)
Termómetro (-10-100°C)
Embudo de talle corto
Varilla de agitación

Sustancias
Partenólida

Reactivos
KOH al 5% / MeOH- H_2O al 75%
 Na_2SO_4 anhidro
 HClO_4
Acido p-toluensulfónico
 MgSO_4

Disolventes

Metanol, grado analítico (Merck)
Cloroformo, grado analítico (Merck)
Acetona^v, grado técnico (Merck)
Acetato de etilo^o, grado técnico (Merck)

Equipo

Rotavapor (Buchi B-481)
Balanza Analítica (Ainsworth 100 A)
Balanza semianalítica (OHAUSE 400)
Placa de agitación

Instrumentos

Espectrofotometro de IR Perkin-Elmer modelo 283 y 681
Espectrofotometro de RMN Varian FT VxR-300 S

4. Material para Ensayo Microbiológico (Determinación de Actividad Antimicrobiana)

Material de vidrio

Cajas de Petri
Frascos viales (10mL) estériles
Matraz erlenmeyer 25 mL
Matraz erlenmeyer 50 mL
Matraz bola boca esmerilada 24/40 100 mL
Pipeta 5 mL
Pipeta 10 mL
Probeta 10 mL
Varilla de agitación

Sustancias

Partenólida
Tween 80
Cloruro de sodio (NaCl)

Equipo

Autoclave
Incubadora
Balanza Analítica (Ainsworth 100 A)
Balanza semianalítica (OHAUSE 400)

VII. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

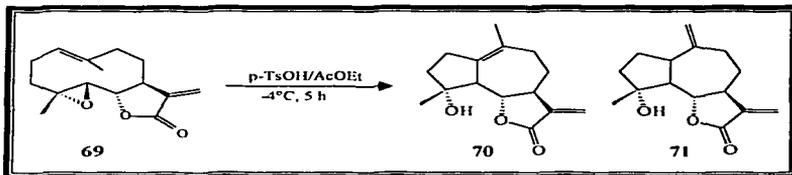
61-Δ

TESES CON
FALLA DE CUBEN

I. TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LA PARTENÓLIDA

1.1 Transformación de la partenólida en medio ácido (*p*-TsOH/AcOEt).

Se pesaron 100 mg de partenólida (69) y se disolvieron en 15 mL de AcOEt, en un baño de hielo a -4°C , a continuación se adicionaron 100 mg de *p*-TsOH, ver esquema 23, la reacción fue monitoreada por CCF. Después de 5 h de reacción, se adicionaron 5 mL de H_2O . Para separar cada uno de los componentes se procedió a realizar extracciones con CH_2Cl_2 (3 x 15 mL). El exceso de *p*-TsOH fue eliminado mediante lavados con NaHCO_3 al 10% (4 x 5 mL), seguido de dos lavados con agua de 5 mL, para finalmente secar la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro, el disolvente fue removido a vacío, para obtener 73 mg de una mezcla de dos productos, los cuales se separaron por CCP, empleando como sistema de elusión: [Hexano-AcOEt (6:4)], obteniéndose 33 mg (33%) de un sólido blanco de p.f. $138\text{-}140^{\circ}\text{C}$ que fue identificado como la miquenólida (70), lactona sesquiterpénica aislada previamente de *Michelia compressa*. La sustancia minoritaria (12 mg, 12%) corresponde a la 11 β H,13-dehidrocompresanolida (71) la cual presenta un p.f. $145\text{-}147^{\circ}\text{C}$.



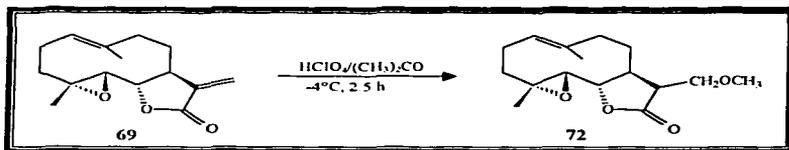
Esquema 23. Transformación de la partenólida (69) con ácido *p*-toluensulfónico.

Tabla 11. Datos de IR de los productos de transformación de partenólida con *p*-TsOH.

COMPUESTO	ν (cm^{-1})
Miquenólida (70)	3588, 2977, 2931, 2859, 1765, 1674, 1440, 1379, 1307, 1139, 1112, 1088, 986, 944, 843

1.2 Transformación química de la partenólida en medio ácido ($\text{HClO}_4/\text{acetona}$)¹⁰.

Se disolvieron 100 mg de (69) en 1 mL de acetona, la solución resultante se colocó en una mezcla frigorífica a -4°C , adicionando lentamente 10 mL de HClO_4 , *ver esquema 24*. El curso de la reacción se siguió por CCF, después de transcurridas 2.5 h, se adicionaron 40 mL NH_4OH para neutralizar. Una vez concluida la reacción, se procedió a recuperar los productos por medio de extracciones con CHCl_3 (4 x 15 mL), finalmente la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a baja presión. La purificación de los productos se llevó a cabo por medio de CCF preparativa, obteniéndose tres productos, A (2.5 mg, 2.5%), B (3 mg, 3.0%) y (72) 13 mg (13%), la recrystalización de (72), por par de disolventes [$\text{AcOEt}-\text{PrOH}$ (1:1)] permitió obtener un sólido blanco. Los datos espectroscópicos de IR para dichos compuestos se muestran en la *tabla 12*.



Esquema 24. Reacción de la partenólida en medio ácido con HClO_4

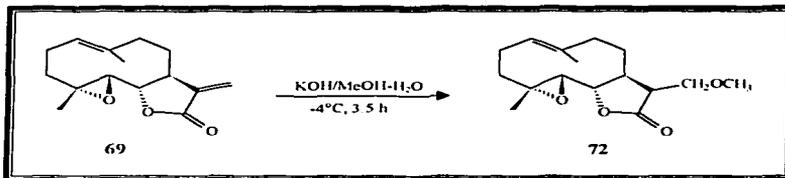
Tabla 12. Datos de IR de los productos de transformación en medio ácido $\text{HClO}_4/(\text{CH}_3)_2\text{CO}$.

COMPUESTO	ν (cm^{-1})
(72)	3388, 2927, 2854, 1601, 1529, 1476, 1424, 1020, 924.
A	3610, 3529, 2929, 2856, 1725, 1460, 1378, 1179, 1028, 917.
B	2930, 2872, 1764, 1439, 1380, 1169, 920.

¹⁰ Se propone que el producto obtenido bajo estas condiciones, se obtuvo por la presencia de metanol en la acetona, ya que se utilizó acetona grado técnico

1.3 Transformación química de la partenólida en medio básico (KOH/MeOH-H₂O).

Se disolvieron 100 mg de partenólida en 1 mL de CHCl₃ y se adicionaron 30 mL de una solución de KOH/MeOH-H₂O al 5%¹¹ a -4°C, ver *esquema 25*. El curso de la reacción se siguió por CCF; una vez que la reacción finalizó (3.5 h) se realizaron extracciones con CHCl₃ (4x10 mL), la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró en el rotavapor. Finalmente por CC vía húmeda se obtuvieron 20 mg (20%) de un sólido blanco cristalino (72) de p.f. 146-148°C.



Esquema 25. Reacción de la partenólida en medio básico con KOH/MeOH-H₂O.

2. TRANSFORMACIÓN BIOLÓGICA DE LA PARTENÓLIDA.

2.1. Transformación Biológica con Hongos Filamentosos.

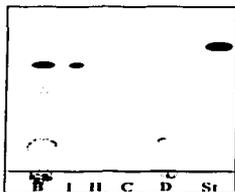
El medio de cultivo empleado para determinar la cinética de crecimiento estaba constituido de peptona (0.1%), extracto de levadura (0.1%), extracto de carne (0.1%) y glucosa (0.5%) en agua a pH 7. A 12 matraces Erlenmeyer de 250 mL, se les adicionó 120 mL de medio de cultivo, para posteriormente esterilizarlos en el autoclave (120°C/1.5 lb/15 min) e inocularlos con una suspensión densa de *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Beauveria bassiana* (cuatro matraces para cada microorganismo). Los medios de cultivo se incubaron en agitación a 150 rpm y 30°C, hasta obtener cultivos de 48 h de

¹¹ Se preparó una solución al 70% de MeOH-H₂O y con la solución resultante se realizó la solución de KOH al 5%.

crecimiento para *A. niger*, 72 h de crecimiento para *A. ochraceus* y 96 h de crecimiento para *B. bassiana* (ver Apéndice).

2.2. Transformación biológica de la partenólida con *Beauveria bassiana*.

Se distribuyeron 100 mg de partenólida disuelta en 10 mL de EtOH, en cuatro matraces erlenmeyer de 250 mL con un cultivo de *B. bassiana* de 96 h de crecimiento (de acuerdo a la cinética de crecimiento, (ver Apéndice), los cuales fueron incubados en agitación a 150 rpm y 30°C, siguiendo el curso de la biotransformación por CCF¹². Después de 14 días, se procedió a filtrar los medios de cultivo, se reunió el filtrado y se lavo con agua, el sobrenadante se saturó con NaCl y se realizaron extracciones con CH₂Cl₂ (4 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a baja presión, de donde se obtuvo una mezcla de productos, ver figura 7, los cuales se purificaron por CCP, para obtener finalmente cuatro productos: La 11βH,13-dihidropartenólida (42 mg (42%) con p.f. 134-136°C (73), la 1,10-epoxi-11βH,13-dihidropartenólida (20 mg (20%) de p.f. 146-148°C (74), de los dos productos minoritarios restantes se obtuvieron 4.5 mg (4.5%) (C) y 3.5 mg (3.5%) (D), razón por la cual no pudieron ser caracterizados. En la tabla 13, se enlistan los datos de IR para las sustancias (73), (74) y (C) respectivamente.



- B. Biotransformación de la partenólida con *B. bassiana*.
I. Producto (73) de la biotransformación de partenólida con *B. bassiana*.
II. Producto (74) de biotransformación de partenólida con *B. bassiana*.
C. Producto de biotransformación con *B. bassiana*.
D. Producto de biotransformación con *B. bassiana*.
St. Estándar de partenólida.
Mezcla de elusión: Hex:AcOEt (3:7)
Revelador: sulfato cénico de amonio

Figura 7. CCF de la transformación biológica de la partenólida con *Beauveria bassiana*.

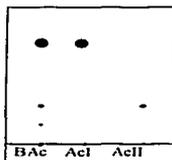
¹² Durante el periodo de incubación (cada 12 h) se tomó una alícuota de 1 mL de medio de cultivo, de dicha alícuota se realizaron extracciones con CH₂Cl₂ y se siguió el curso de la biotransformación por CCF.

Tabla 13. Datos de IR para los productos de transformación biológica con *B. Bassiana*.

COMPUESTO	ν (cm^{-1})
(73)	2980, 2932, 1774, 1456, 1385, 1168, 1004, 981.
(74)	3686, 2972, 2932, 1780, 1602, 1460, 1388, 1173, 1018, 988.
(C)	3606, 3514, 2930, 2858, 1776, 1459, 1384, 1138, 1001, 980.

2.3. Transformación biológica de la partenólida con *Aspergillus ochraceus*.

A cuatro matraces Erlenmeyer de 250 mL con cultivo de *A. ochraceus* de 72 h de crecimiento, se adicionaron 100 mg de partenólida disueltos en 10 mL de EtOH, y se incubaron durante 14 días a 150 rpm y 30°C, siguiendo el curso de la transformación por CCF (como se indica para *B. Bassiana*). Una vez concluida, se procedió a retirar los pellets por filtración de los medios de cultivo, *ver figura 8*. El filtrado se saturó con NaCl y se realizaron extracciones con CHCl_3 (4 x 20 mL), la fase clorofórmica resultante se secó empleando Na_2SO_4 anhidro y se concentró a baja presión. Los productos de transformación se purificaron por CCP, de donde se obtuvieron 20 mg (20%) de la 11 β H,13-dihidropartenólida (73) y 3.0 mg (3%) de un polvo blanco muy fino de p.f. 142-145°C que fue identificado como el producto (75).



BAc: Biotransformación con *A. ochraceus*.
 Acl: Producto de biotransformación (73) de la partenólida con *A. ochraceus*.
 AclII: Producto de biotransformación (75) de la partenólida con *A. ochraceus*.
 Mezcla de elusión: Hex-Ac:3:2 (8:2) 4 veces
 Revelador: Sulfato cúbico de amonio

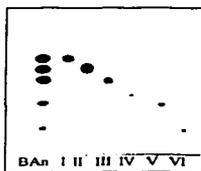
Figura 8. CCF de la transformación biológica de la partenólida con *Aspergillus ochraceus*.

Tabla 14. Datos de IR para los productos de transformación con *A. ochraceus*.

COMPUESTO	ν (cm^{-1})
(73)	2981, 2932, 1775, 1443, 1385, 1060, 1004, 982.
(75)	3686, 3601, 2928, 1729, 1602, 1522, 1424, 1332, 1018, 928.

2.4. Transformación biológica de la partenólida con *Aspergillus niger*.

Se distribuyeron 100 mg de (69) disuelta en 10 mL de EtOH, en matraces Erlenmeyer de 250 mL con cultivo de *Aspergillus niger* de 48 h de crecimiento, se incubaron durante 14 días a 150 rpm y 30°C. El curso de la transformación se llevó a cabo por CCF, ver figura 9. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a filtrar los pellets, se lavaron con agua y el filtrado se saturó con NaCl para realizar extracciones con CHCl_3 (4 x 20 mL), finalmente la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro para después concentrarse a baja presión. La mezcla de productos fue purificada por CCP.



BAn: Biotransformación de la partenólida con *A. niger*
I: Producto I de biotransformación con *A. niger*
II: Producto (76) de biotransformación con *A. niger*
III: Producto III de biotransformación con *A. niger*
IV: Producto IV de biotransformación con *A. niger*
V: Producto V de biotransformación con *A. niger*
VI: Producto VI de biotransformación con *A. niger*
Mezcla de elución: Hex-AcOEt (7:3)
Revelador: Sulfato cúprico de amonio

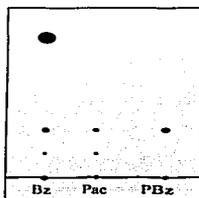
Figura 9. CCF de la transformación biológica de la partenólida con *Aspergillus niger*.

3. TRANSFORMACIÓN BIOLÓGICA CON CULTIVO CELULAR DE ZANAHORIA.

Después de tener el cultivo celular de zanahoria con una cantidad de biomasa considerable, aproximadamente a 30 días de haber hecho la incubación, se adicionaron 50 mg de partenólida disueltos en 5 mL de acetona, y se incubó por seis días a 28°C y

Transformación Química y Biológica de la partenólida - Lactaria Sesquiterpénica con esqueleto de Germacrano -

150 rpm. Al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones se realizó un blanco del cultivo celular de zanahoria, al cual no se le adiciono partenólida para descartar cualquier producto que no fuera de transformación. Para la obtención de los productos, todos los matraces se filtraron y el sobrenadante se saturó con NaCl, las células filtradas se maceraron en un mortero y se hicieron lavados con acetona (3 x 5 mL), dichos lavados se reunieron con el filtrado y se les realizaron extracciones con CHCl_3 (4 x 20 mL), a continuación se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a baja presión. La separación de los productos se realizó por CCP, de donde se obtuvieron 4 mg (4%) de un polvo blanco muy fino de p.f. 142-145°C. Encontrándose que dicho producto presenta el mismo R_f y su espectro de IR es similar al producto (75), ver figura 10, obtenido de la biotransformación de la partenólida con *A. ochraceus*.



- Bz: Biotransformación de la partenólida con cultivo celular de zanahoria
 - Pac: Producto (75) de biotransformación de la partenólida con *A. ochraceus*
 - PBz: Producto de biotransformación de la partenólida con cultivo celular de zanahoria.
- Mezcla de elución: Hex-AcOEt (7:3)
3 veces

Figura 10. CCF de la biotransformación de la partenólida con cultivo de zanahoria y con *A. ochraceus*.

Tabla 15. Datos de IR para los productos de transformación con cultivo celular de zanahoria.

COMPUESTO	ν (cm^{-1})
(75)	3686, 3605, 2958, 2958, 1728, 1602, 1520, 1425, 1334, 1020, 928

4. ENSAYO MICROBIOLÓGICO (DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA) [90]

4.1. Preparación de la muestra.

Se pesaron 4 mg de partenólida (69), los cuales se disolvieron en 0.2 mL de tween 80 y 18 mL de solución salina estéril al 0.8%. Una vez disuelta, se adicionó aseptícamente al matraz Erlenmeyer que contenía 38 mL del medio AST previamente estéril y a 50°C, para obtener una concentración de 1 mg/mL. El medio de cultivo con (69) se adiciono en partes iguales en dos cajas de Petri estériles, posteriormente se incubo a 37°C durante 24 h con la finalidad de realizar la prueba de esterilidad¹³. Se prepararon con el mismo procedimiento las cajas de los sólidos (70), (72)-(74) y (76) y estreptomycin (blanco), además de los controles positivo y negativo¹⁴ para el ensayo.

4.2 Preparación de los microorganismos.

Los microorganismos se mantuvieron en el medio de cultivo AST, para el bioensayo se preparó medio CST, el cual se colocó en tubos de ensaye con tapón de bakelita, después de ser esterilizados con el medio CST se inocularon (del tubo de cultivo en AST) e incubaron durante 24 h a 37°C; excepto *Micrococcus luteus*, el cual se incubó durante 48 hr. Después de la incubación, se tomó una alcuota de 0.1 mL de medio de cultivo y se diluyó con 9.9 mL de solución salina estéril para alcanzar una dilución final de 1:100 misma que se utilizó para el ensayo.

4.3 Bioensayo.

Después de la prueba de esterilidad, las cajas de Petri que contenían los medios de cultivo y la partenólida, se inocularon con los diferentes microorganismos; para ello se

¹³ La prueba consiste en incubar las cajas preparadas con la sustancia a probar, durante 24 h, para verificar que no hubo contaminación al momento de prepararlas, por lo que no debe crecer ninguna colonia en dichas cajas, si crece alguna colonia la caja se elimina automáticamente del ensayo.

¹⁴ El control positivo, es una caja que se abre cuando se hace la siembra de las cepas en las cajas, el control negativo se mantiene cerrado.

dividió la caja en 7 sectores iguales como se muestra en la *figura 11*, el sembrado de los 7 microorganismos se llevo a cabo por medio de la técnica de estria.

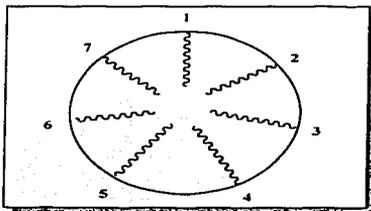


Figura 11. División y forma de sembrado de los diferentes microorganismos

Las cajas de Petri se incubaron durante 24 h, tiempo en el cual se determino su actividad antimicrobiana, por medio de la inhibición del crecimiento de los microorganismos. La lista de microorganismo que se emplearon para el bioensayo es la siguiente:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC6538p
2. *Micrococcus luteus* ATCC9341
3. *Salmonella typhy* ATCC6539
4. *Bacillus subtilis* ATCC6633
5. *Escherichia coli* ATCC536
6. *Candida albicans* ATCC10231
7. Blanco, no se siembra ninguna cepa

Los resultados de este ensayo se muestran en la *tabla 16*.

5. ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN LÍNEA CELULAR HeLa.

La actividad antitumoral se considera como la disminución de la proliferación presentada por las células estimuladas por los compuestos químicos, en comparación con la proliferación presentada por las células en condiciones de control.

5.1 Incubación de la línea celular HeLa¹⁵.

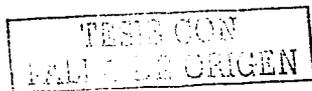
En una placa de 96 pozos que contiene RPMI al 10% de suero fetal bovino, se sembraron 5×10^3 células HeLa por pozo, incubándose a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y una humedad a punto de rocío, con la finalidad de que las células se adhieran al plato de cultivo.

5.2 Bioensayo.

Una vez que las células están adheridas, se retira el medio de cultivo. Posteriormente las células son inducidas con las sustancias a probar: (69), (70)-(72) y (75), de la siguiente manera; se preparan cuatro concentraciones diferentes: 0,1, 1, 10, 25 µg/mL en RPMI al 10% de suero fetal bovino y se colocan en un mínimo de tres pozos por condición y se incuban por 48 h bajo las mismas condiciones establecidas previamente.

Al mismo tiempo se realiza un control con etanol, que es considerado como el 100% de crecimiento celular. Transcurrido el período de incubación las células se lavan tres veces con solución salina buffer de fosfatos (SBF) y son fijadas con una solución de glutaraldehído al 1.1% por 15 minutos, el exceso es retirado mediante lavados con SBF, finalmente se dejan secar al aire libre. Una vez secas, las células son teñidas con el colorante cristal violeta durante 20 minutos, el exceso es retirado con lavados de agua desionizada y se deja secar a temperatura ambiente. Posteriormente el colorante retenido es solubilizado con una solución de ácido acético al 10% y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm.

¹⁵ La línea celular HeLa, es una línea de células tumorales provenientes de carcinoma cérvico-uterino



5.3 Determinación del número celular.

La medición del efecto de proliferación se realizó por espectrofotometría, usando la técnica de cristal violeta. Utilizando placas de 96 pozos se realizó una curva estándar (número celular vs absorbancia) sembrando una cantidad conocida de células por pozo, manteniéndose el tiempo necesario para que las células se adhirieran al piso, después se procedió a realizar una tinción con cristal violeta, finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm. La determinación del número celular así como su desviación estándar de los cultivos evaluados se realizó con base a la ecuación de la curva estándar. Los datos obtenidos de los estímulos de cada compuesto se compararon con las mediciones de los controles (100% de proliferación). El número celular y la desviación estándar son convertidos a porcentajes de esta manera la actividad antitumoral obtenida por la disminución de la proliferación se expresa en porcentaje celular. Los resultados obtenidos en este ensayo, ver gráfico 1, para los productos de transformación química y biológica de la partenólida se encuentran descritos en la tabla 17.

Gráfico 1. Determinación de Actividad Antitumoral sobre línea celular HeLa.

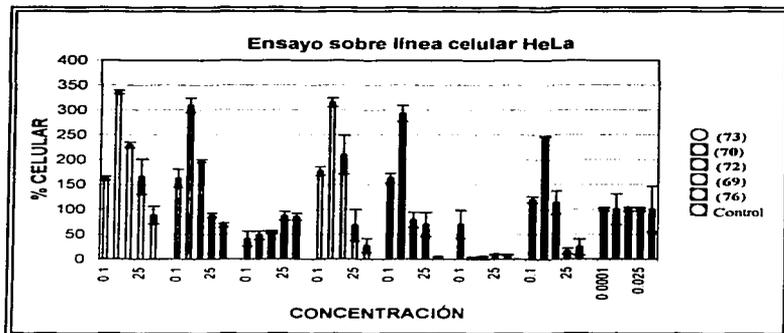


Tabla 17. Actividad Antitumoral de los derivados de la parthenólita obtenidos por transformación química y biológica.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	PROLIFERACIÓN CELULAR	% INHIBICIÓN DE PROLIFERACIÓN CELULAR
69	0.1	69.71 \pm 27.78	30.29
	1	3.54 \pm 0.38	96.46
	10	5.32 \pm 0.68	94.68
	25	9.77 \pm 0.81	90.23
	50	8.85 \pm 0.73	91.15
70	0.1	40.91 \pm 14.84	59.09
	1	47.41 \pm 8.47	52.59
	10	53.99 \pm 1.71	46.01
	25	86.78 \pm 8.94	13.22
	50	84.89 \pm 6.62	15.11
72	0.1	163.12 \pm 9.51	-
	1	293.18 \pm 16.18	-
	10	79.17 \pm 15.40	20.83
	25	70.11 \pm 24.38	29.89
	50	4.68 \pm 0.73	95.32
73	0.1	162.04 \pm 3.42	-
	1	335.96 \pm 3.46	-
	10	229.78 \pm 5.13	-
	25	166.66 \pm 35.76	-
	50	88.54 \pm 17.67	11.46
76	0.1	119.78 \pm 6.09	-
	1	246.59 \pm 0.38	-
	10	113.80 \pm 23.28	-
	25	15.51 \pm 5.68	84.49
	50	23.95 \pm 16.20	76.05
Control	0.01%	100.00 \pm 3.23	-
	0.10%	100.00 \pm 31.21	-
	1.00%	100.00 \pm 3.76	-
	2.50%	100.00 \pm 3.25	-
	5.00%	100.00 \pm 45.66	-

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

74-A

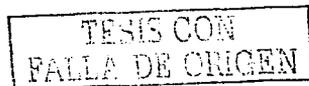
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un grupo importante de sustancias, denominadas productos naturales —alrededor de 5000 estructuras conocidas— las cuales han sido aisladas principalmente de la familia *Compositae*. Además, poseen un amplio espectro de actividad biológica, y se cree que son un mecanismo de defensa para la planta que las contiene y fueron descritas en los tratados antiguos de Materia Médica bajo el nombre evocador de “principio amargo”.

El interés en el estudio de las lactonas sesquiterpénicas por diversos grupos de investigadores de todo el mundo, se basa principalmente en sus propiedades químicas y biológicas, debido a su notable reactividad por la presencia del anillo α -metilen- γ -lactona y a otro tipo de funcionalidades que puede presentar, como epóxidos, grupos carbonilo α,β insaturados, grupos hidroxilo, grupos *endo*-peróxidos, entre otros. Como ejemplo se puede citar a la partenólida —germacranólida— aislada de *Magnolia grandiflora* y *Tanacetum parthenium*, de esta última es considerada el principio activo; su uso popular esta dirigido al tratamiento de la migraña, ya que inhibe la agregación plaquetaria, actuando sobre los receptores de serotonina 5-HT [48,49] y como antipirético [58], de ahí deriva su nombre popular de “feverfew” (poca fiebre).

La partenólida posee una amplia gamma de propiedades biológicas, entre las que destacan: antiulcerosa y antitumoral [36], antiinflamatorio [50], antimigrañosa y antibacterial [54], entre otras; además pertenece al primer grupo de lactonas sesquiterpénicas que se forma por la ciclización del *trans,trans*-pirofosfato de famesilo, para posteriormente generar sustancias cada vez más complejas, las cuales están relacionadas con la evolución de la propia especie que las contiene.

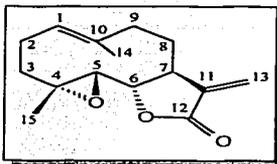
La partenólida (69), materia prima empleada en las biotransformaciones químicas y biológicas, se obtuvo a partir de AldrichChem, su número de registro en el *Chemical Abstracts* es [20554-84-1]. $C_{15}H_{20}O_3$ PM=248.32 g/mol, p.f. 115-116°C. $[\alpha]^{20}_D = -84^\circ$ (c=0.25, CH_2Cl_2), pureza del 97%. La partenólida muestra en su espectro de IR (*Espectro 1*), una banda intensa en 1767 cm^{-1} , que corresponde a la lactona α,β -insaturada.



La vibración $\nu(\text{H-C}_{\text{sp}^2})$, se observa arriba de los 3000 cm^{-1} y la presencia del grupo oxirano está confirmada por las bandas en 1289 y 1141 cm^{-1} .

En su espectro de RMN- ^1H (*Espectro 2*), se observan las señales características de una lactona sesquiterpénica: el sistema AB en $\delta 6.33$ (*d*, $J=3.6 \text{ Hz}$) y 5.22 (*d*, $J=3.3 \text{ Hz}$) que corresponden a los hidrógenos del metileno α -oxocíclico conjugado con la γ - lactona y un triplete en $\delta 3.86$ (*t*, $J=8.7 \text{ Hz}$, 1H) del hidrógeno del C-6 con una disposición β -axial, donde se cierra el anillo de la lactona. En su espectro COSY (*Esquema 26*) se observa el acoplamiento de H-6 con las señales superpuestas del H-7 (señal múltiple) y H-5, este último base del oxirano y cuya multiplicidad corresponde a una señal *doble* ($J= 8.5$), *ver tabla 18*.

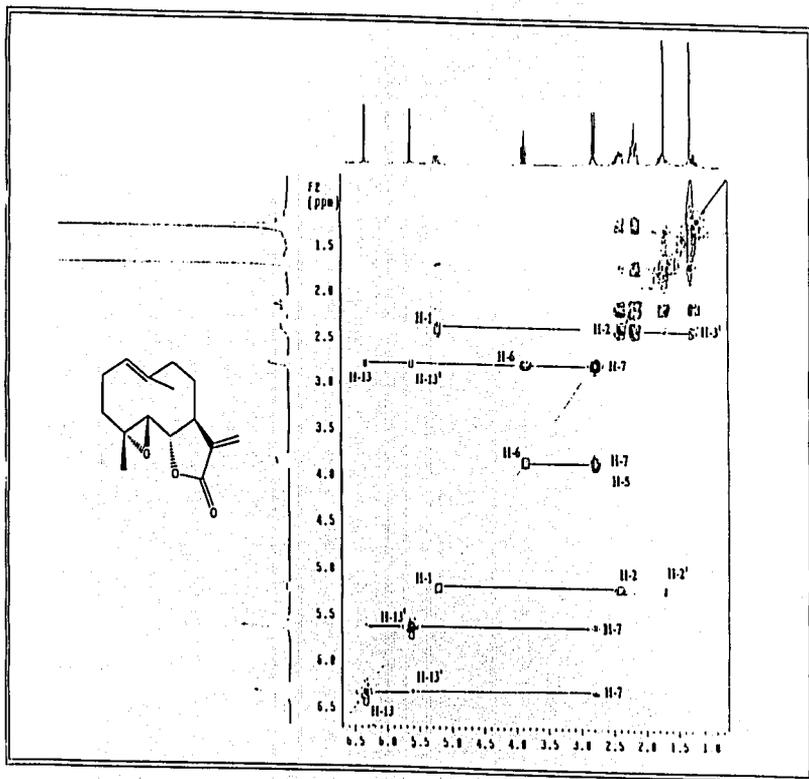
La señal *dd* en $\delta 5.21$ ($J=12.0$ y 2.4 Hz) se asignó al hidrógeno vinílico del C-1, el cual se acopla con la señal en $\delta 1.72$ (C-14) y con las señales complejas centradas en $\delta 2.44$ - 2.34 y $\delta 2.21$ - 2.13 que corresponden a los hidrógenos del C-2 [93]¹⁶ y finalmente al CH_3 en la posición 15, se le asignó la señal en $\delta 1.31$. Por lo anterior, se confirma la estructura **69** para la sustancia objeto del presente estudio.



69

¹⁶ Catal. A. *et al.*, asignan a H-2 α ($\delta 2.22$ - 2.09) y H-2 β ($\delta 2.46$, *ddd*, $J=13.8$, 12.5 y 12.2).

Esquema 26. Espectro COSY (300 Hz, CDCl₃) de la partenólida (69).



I. TRANSFORMACIÓN DE LA PARTENÓLIDA CATALIZADA EN MEDIO ÁCIDO

Del tratamiento químico de la partenólida con *p*-TsOH, se obtuvieron dos productos (70, 33%) y (71, 12%). El compuesto menos polar, (*ver figura 12*), muestra en su espectro de RMN-¹H (*Espectro 6*), un sistema AB en δ 6.22 ($J=3.0$ Hz) y δ 5.50 ($J=3.3$ Hz) que corresponden a los H-13 _{β} y H-13 _{α} respectivamente y un triplete en δ 3.82 ($J=10.2$ Hz) del H-6; las cuales son señales características del sistema de la α -metilen- γ -lactona.

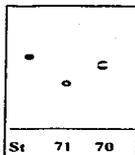


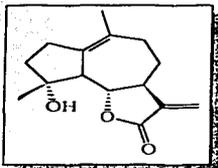
Figura 12. CCF de los productos de reacción de (69) con *p*-TsOH.

Al comparar el espectro de RMN-¹H de la partenólida con el de sustancia en discusión (70), se observa (*tabla 18*), la ausencia de la señal *dd* en δ 5.1 ($J=12$ y 2.4 Hz), que corresponde al hidrógeno vinílico del C-1 (69), lo cual sugiere que se trata de una doble ligadura *tetra* sustituida y que se comprueba por RMN-¹³C. Las señales simples en δ 1.59 (3H) y δ 1.31 (3H), se asignaron al CH₃-14 y CH₃-15 respectivamente.

En su espectro de RMN-¹³C de 70, (*Espectro 7*), se observa la presencia de 15 átomos de carbono, la naturaleza del grupo funcional y el grado de hidrogenación de estos átomos se dedujo con base en su desplazamiento químico y por la naturaleza de los átomos de carbono mostrada en el espectro de RMN-¹³C, aplicando la técnica DEPT (*Espectro 8*).

Al comparar los desplazamientos químicos de la sustancia (69) y (70) *ver tabla 19*, se observan diferencias notables en el C-1 ($\Delta\delta=-6.7$) y C-4 ($\Delta\delta=-18.8$), debido a la formación del esqueleto de guayano (5.7) y por el cambio en el grupo funcional. Con base

en la discusión anterior se pudo concluir que se trataba de la miquenólida (70), sustancia aislada como producto natural de *Michelia compressa* [92].



(70)

Tabla 18. Datos de RMN-¹H de la partenólida y sus derivados químicos de la reacción con *p*-TsOH.

PROTÓN	PARTENÓLIDA (69)	MIQUENÓLIDA [93] (70)	11,13-DIHIIDROCOMPRESANOLIDA [94] (71)
H-1	5.21 (<i>dd</i> , 11.6, 7.9)	-	3.04 (<i>ddd</i> , 13, 8.7, 8.4)
H-2	2.48-2.35	2.21 (<i>m</i>)	1.88-1.77
H-2*	2.24-2.11	2.39 (<i>ddd</i> , 15.9, 8.5, 8.5)	1.88-1.77
H-3	1.25	1.82 (<i>m</i>)	1.86-1.76
H-3*	2.24-2.11	1.77 (<i>m</i>)	1.89 (<i>mo</i>)
H-4	-	-	-
H-5	2.78 (<i>d</i> , 8.5)	2.73 (<i>d</i> , 10.3)	2.37 (<i>dd</i> , 11.9, 11.9)
H-6	3.86 (<i>dd</i> , 9.2, 8.5)	3.82 (<i>r</i> , 10.2)	4.06 (<i>dd</i> , 11.4, 9)
H-7	2.78 (<i>mo</i>)	2.65 (<i>m</i>)	2.76 (<i>ddd</i> , 11.3, 8.6, 3.2, 3.2, 3)
H-8	1.74 (<i>m</i>)	2.09 (<i>ddd</i> , 13.6, 10.3, 9.2, 2.3)	1.38 (<i>m</i>)
H-8*	2.24-2.11	1.35 (<i>m</i>)	2.29 (<i>ddd</i> , 13.1, 12, 11.7, 3.9)
H-9	2.24-2.11	2.25 (<i>m</i>)	1.93
H-9*	2.35-2.48-	2.25 (<i>m</i>)	2.70 (<i>r</i> , 9, 3.6)
H-13	6.34 (<i>d</i> , 3.7)	6.22 (<i>d</i> , 3.3)	6.20 (<i>d</i> , 3.9)
H-13	5.62 (<i>d</i> , 3.1)	5.50 (<i>d</i> , 3.0)	5.54 (<i>d</i> , 3.0)
H-14	1.72 (<i>s.a.</i>)	1.68 (<i>s.a.</i>)	5 (<i>s.a.</i>) 4,988 (<i>s.a.</i>)
H-15	1.31 (<i>s</i>)	1.30 (<i>s</i>)	1.32 (<i>s</i>)

El producto minoritario (71) corresponde a la sustancia más polar, la cual muestra en su espectro de RMN-¹H el sistema AB [δ 5.54 (J=3) y δ 6.2 (J=3.9)] del metileno

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

exocíclico de la γ -lactona y la señal triplete en δ 4.06 ($J=10.2$) correspondiente al H-6, donde se cierra el anillo de la γ -lactona.

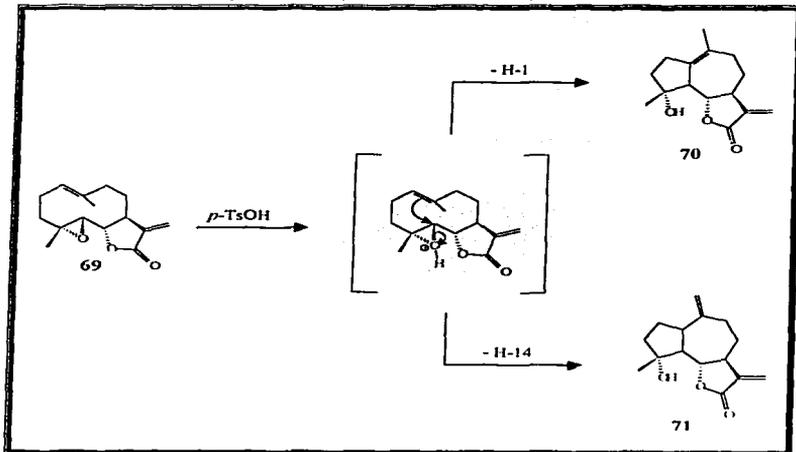
Tabla 19. Datos de RMN- ^{13}C de la partenólida y sus derivados químicos de la reacción con p -TsOH.

CARBONO	PARTENÓLIDA (69)	DEPT	MIQUENÓLIDA [94] (70)	DEPT	$\Delta\delta$ (69-70)	11,13-DEHIDRO- COMPRESA- NÓLIDA [94] (71)	DEPT	$\Delta\delta$ (69-71)
C-1	125.3	CH	132.0	C	-6.70	43.6	CH	81.7
C-2	24.1	CH ₂	25.8	CH ₂	-10.9	25.8	CH ₂	-1.7
C-3	36.4	CH ₂	35.0	CH ₂	-1.9	39.6	CH ₂	-3.2
C-4	61.5	C	80.3	C	-18.8	79.2	C	-17.7
C-5	66.4	CH	58.7	CH	7.7	55.3	CH	11.1
C-6	82.4	CH	84.5	CH	-2.1	83.5	CH	-1.1
C-7	47.6	CH	49.6	CH	-2.0	46.7	CH	0.9
C-8	30.6	CH ₂	30.1	CH ₂	4.8	30.9	CH ₂	-0.3
C-9	41.2	CH ₂	38.3	CH ₂	11.1	39.3	CH ₂	1.9
C-10	134.6	CH	130.9	C	3.7	147.7	C	-13.1
C-11	139.2	C	138.9	C	0.3	138.4	C	0.8
C-12	169.2	C	169.7	C	-0.5	169.4	C	-0.2
C-13	121.2	CH ₂	119.4	CH ₂	1.8	120.0	CH ₂	1.2
C-14	16.9	CH ₃	22.7	CH ₃	-5.8	112.1	CH ₂	-95.2
C-15	17.3	CH ₃	23.9	CH ₃	-6.6	23.4	CH ₃	-6.1

De acuerdo con la *tabla 18*, el compuesto (71) presenta a diferencia de los compuestos (69) y (70), una señal en δ 3.02 (*dd*, $J=12.1$, 8.7), esto se puede comprobar con base en los resultados de la *tabla 19*, donde se observa que el grado de hidrogenación para los átomos de C-5, C-6 y C-7 corresponden a tres metinos, *ver espectro 11*, para las tres sustancias. Sin embargo el compuesto 69, muestra un metino adicional (δ 125.3) que corresponde al C-1, similar situación se presenta para el compuesto (71), pero observándose un cambio en el tipo de hibridación para el C-1 (sp^2 a sp^3), ya que dicho metino presenta un δ 43.6, esto sugiere que la doble ligadura del C-1 y C-10, presente en la miquenólida puede situarse en los C-10 y C-14, para generar la 11 β H,13-dehidrocompresanólida (71), sustancia previamente aislada como producto natural de *M. compressa* [92]

Una posible explicación en la formación de la miquenólida (70) y 11,13-dehidrocompresanólida (71) se describe en el *esquema 27*, donde la transformación de la partenólida, inicia con la protonación del oxirano, el cual es atacado nucleofílicamente por la doble ligadura Δ^{1-10} , para formar el esqueleto de guayano (5/7), y generar un carbocatión terciario, el cual es estabilizado mediante dos formas: a) la pérdida del hidrógeno del C-1 que conlleva a la formación de la doble ligadura *endocíclica*, para la obtención del compuesto (70) y b) la formación del compuesto (71) debido a la sustracción de un hidrógeno del C-14 [94].

Esquema 27. Mecanismo propuesto para la formación de los productos de transformación química de la partenólida con ácido *p*-TsOH.



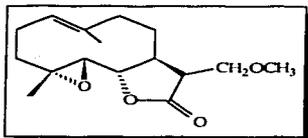
2. REACCIÓN DE LA PARTENÓLIDA CON HClO_4 EN ACETONA.

Del tratamiento de (69) con HClO_4 en acetona, se obtuvieron tres productos. El producto mayoritario (72) fue caracterizado con base en sus propiedades espectroscópicas, mientras que de los productos restantes sólo se enlistan sus números de onda debido al bajo rendimiento obtenido. El producto (72) muestra en su espectro de RMN^{-1}H (*Espectro 12*) una señal *triple* en δ 3.87 ($J=9$ Hz) característica del H-6 con una disposición β -axial, el cual se acopla con la señal *doble* en δ 2.74 ($J=9$ Hz) que se asigna a H-5, mientras que la señal *doble* ($J=9.9$ Hz) en δ 5.21, corresponder al hidrógeno vinílico del C-1. Lo anterior sugiere que el esqueleto de germacrano no fue transformado bajo estas condiciones. La presencia de un *quintuplete* en δ 2.58 ($J=1.8$) fue asignada al H-7, lo cual resulta una diferencia notable en comparación con el espectro de la partenólida, esta variación sugiere que ha sido el metileno *exocíclico* la parte reactiva de dicha molécula; lo anterior se puede justificar en función del espectro de RMN^{-13}C aplicando la técnica DEPT (*Espectro 1-4*) de la sustancia 72, donde se observa la presencia de 16 átomos de carbono, *ver tabla 20*.

Tabla 20. Datos de RMN^{-13}C para el derivado de la partenólida obtenido con HClO_4 .

CARBONO	PARTENÓLIDA	13-METOXIPARTENÓLIDA	$\Delta\delta$
	(69)	(72)	(69-72)
C-1	125.3	123.9	1.4
C-2	24.1	23.1	1.0
C-3	36.4	38.6	-2.2
C-4	61.5	60.4	1.1
C-5	66.4	65.3	1.1
C-6	82.4	81.0	1.4
C-7	47.6	47.6	0.0
C-8	30.6	28.7	1.9
C-9	41.2	40.1	1.1
C-10	134.6	133.6	1
C-11	139.2	44.2	95
C-12	169.2	174.1	-4.9
C-13	121.2	67.1	54.1
C-14	16.9	15.9	1
C-15	17.3	16.3	1
C-16	-	58.3	-

Sin embargo se puede afirmar con base en la multiplicidad y desplazamientos químicos observados que fue el metileno *exocíclico* de la γ -lactona, el grupo funcional que reaccionó mediante una adición de Michael con el ion metoxilo. La señal en δ 2.49 (*ddt*, $J = 11.7, 7.3, 3.3$ Hz) se asignó al hidrógeno del C-11; los hidrógenos del C-13 aparecen como dos señales *doble de doble* en δ 3.74 ($J = 9.9$ y 3.3) y en δ 3.62 ($J = 6.0$ y 3.3) respectivamente. Lo anterior se puede comprobar con base en su espectro de RMN- ^{13}C , ver *Espectro 13*, en donde se observa como diferencias notables los desplazamientos para el C-11 (metino), C-13 (metileno), los cuales aparecen en δ 42.5 ($\Delta\delta = 96.7$), y δ 67.1 ($\Delta\delta = 107.8$) respectivamente, además de la señal en δ 58.3 que corresponde al metilo del grupo metoxilo. De tal forma se explica la presencia de un átomo de carbono adicional; el cual resultó de la adición del ión ($^-\text{OCH}_3$) a la doble ligadura α,β -insaturada de la γ -lactona. Por lo que se concluyó que se trata de la 13-metoxipartenólida (72).



72

En la literatura se ha informado de la reacción de aminas secundarias en el grupo α -metileno de germacránolidas [95]; así como también de la reacción de aminas derivadas del germacrano (*Paramichelia baillonii*) [96]. Desde el punto de vista de la actividad biológica del grupo α -metileno- γ -lactona, es un lugar reactivo para los nucleófilos biológicos, como los grupos tioles y amino de las enzimas [96-99], de ahí su amplio espectro sobre sus actividades biológicas descritas sobre este grupo de sustancias.

3. TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE (69) CON KOH/MeOH-H₂O

Del tratamiento de la partenólida (69) con MeOH en medio básico, se obtuvo un sólido blanco de p.f. 146-148°C, que fue caracterizado con base en su espectro de RMN-¹H (Espectro 17) y de RMN-¹³C (Espectro 18). En la figura 13 y 14, se enlistan los desplazamientos químicos de RMN-¹H y ¹³C respectivamente, para el compuesto obtenido de la reacción de (69) con KOH/MeOH-H₂O.

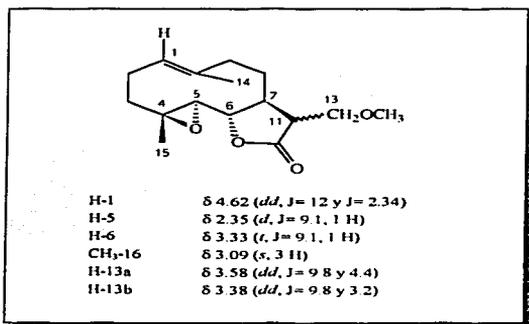


Figura 13. Desplazamientos químicos para el compuesto (72)

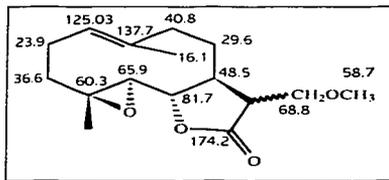


Figura 14. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C del compuesto (72)

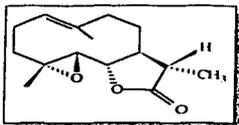
De acuerdo con los datos espectroscópicos para este compuesto (*Espectros 17-19*), se observa que son valores similares a los obtenidos para (72) producto de la reacción de (69) con HClO_4 , por lo que se sugiere que la estructura de este compuesto es también (72).

4. TRANSFORMACIÓN MICROBIOLÓGICA DE (69) CON *Bauveria. bassiana*

De la transformación biológica de (69) con *B. bassiana*, se obtuvieron cuatro productos, dos de los cuales se encuentran en bajo rendimiento C (4.5 mg) y D (3.5 mg) ver *figura 7*.

Los productos mayoritarios 73 (42 mg) y 74 (20 mg) fueron caracterizados con base en sus propiedades espectroscópicas. El producto menos polar (73), ver *figura 7*, muestra en su espectro de RMN- ^1H , (*Espectro 21*) un triplete en δ 3.82 (J=8.9 Hz) que corresponde al H-6, donde se cierra el anillo de la γ -lactona. La ausencia del sistema AB [(δ 6.33, d, 1H) y (δ 5.22, d, 1H)] correspondiente al metileno *exocíclico*, de la lactona α,β -insaturada, sugiere que el grado de hidrogenación en los C-11 y C-13 fue modificado por la acción de *B. bassiana*. Sin embargo se observa una nueva señal doble que integra para tres protones y la cual es atribuida al metileno del C-11, confirmando que el grado de hidrogenación en los C-13 y C-11 fue modificado por la acción de *B. bassiana*.

Lo anterior fue confirmado por de RMN- ^{13}C (*Espectro 22*), donde se observa 15 átomos de carbono, además de una diferencia notable en el desplazamiento químico de los C-11 $\Delta\delta = 96.7$ y C-13 $\Delta\delta = 107.8$ (*tabla 20*), con respecto a la partenólida (69) debido al cambio de hidrogenación para dichos carbonos, *Espectro 23*. Las propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto (73) son similares a los informados previamente en la literatura para la 11 β H,13-dihidropartenólida [94]. Por lo tanto, de acuerdo con la discusión anterior se llegó a la conclusión de que la sustancia obtenida es la 11 β H,13-dihidropartenólida (73) [94].



74

Tabla 21. Datos de RMN-¹H para los derivados de la partenólida obtenidos con *B. hassiana*.

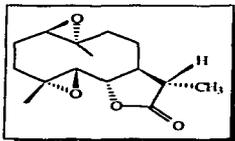
CARBONO	PARTENÓLIDA (69)	11β,13- DIHIDRO- PARTENÓLIDA (73)	Δδ (69-73)	1,10-EPOXI- 11β,13- DIHIDROPARTE- NÓLIDA (74)	Δδ (69-74)
C-1	125.3	125.2	0.1	63.8	61.5
C-2	24.1	24.7	0.0	23.8	0.3
C-3	36.4	36.7	-0.3	35.2	1.2
C-4	61.5	61.4	0.1	60.5	1.0
C-5	66.4	66.4	0.0	64.5	1.9
C-6	82.4	82.2	0.2	81.4	1.0
C-7	47.6	51.9	-4.3	51.8	-4.2
C-8	30.6	29.8	0.8	25.5	5.1
C-9	41.2	41.2	0.0	40.1	1.1
C-10	134.6	134.4	0.2	60.4	74.2
C-11	139.2	42.5	96.7	42.7	96.5
C-12	169.2	177.3	-8.1	176.8	-7.6
C-13	121.2	13.3	107.8	12.9	108.3
C-14	16.9	16.9	0.0	16.9	0.0
C-15	17.3	17.2	0.1	17.4	-0.1

Para el compuesto (74) en su espectro de RMN-¹H (*Espectro 25*), se observan señales similares al compuesto (73). El espectro de RMN-¹³C (*Espectro 26*), indica la presencia de 15 átomos de carbono, ver *tabla 21*, de los cuales al realizar una comparación con los desplazamientos químicos de (69), se observa que hay diferencias significativas en C-1 (Δδ= 61.4), C-10 (Δδ=74.2), C-11 (Δδ=96.5) y C-13 (Δδ=108.3), los cuales corresponden a los átomos de carbono que forman parte de las dobles ligaduras.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Conforme a los datos informados en la literatura [96,100-101], la diferencia de desplazamientos químicos para los C-1 y C-10 de (74) con (69) se debe a que la transformación biológica con *B. hassiana*, además de hidrogenar la doble ligadura exocíclica de la γ -lactona realizó la epoxidación del doble enlace Δ^{1-10} , ya que de acuerdo a los desplazamientos químicos en la *tabla 21*, el C-1 se encuentra en δ 63.8 y C-10 en δ 60.4, mientras que los desplazamientos químicos son similares en los C-4 (δ 61.5) y C-5 (δ 66.4), en donde originalmente se encuentra el epóxido en (69), el cual esta acorde con lo informado en la bibliografía [96,101] sobre los desplazamientos químicos para átomos de carbono base de oxiranos (66.6-60.6 ppm).

Tomando en cuenta la discusión anterior, se plantea que la sustancia aislada es la 1,10-epoxi-11 β ,13-dehidropartenólida, (74).



74

4. BIOTRANSFORMACIÓN CON *A. ochraceus*.

De la biotransformación de (69) con *A. ochraceus* se obtuvieron dos compuestos: el producto mayoritario [20 mg, 20%] que corresponde a la 11 β H,13-dihidropartenólida (73), el cual fue identificado y caracterizado con base en sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas y el producto minoritario (75) como un sólido blanco de pf. 142-145°C, el cual muestra la presencia en 3686 y 3601 ν (OH) del grupo hidroxilo y en 1729 ν (C=O) de un grupo cetona. Por otro lado, en su espectro de RMN- 13 C (*espectro 29*) se observan un

total de 15 átomos de carbono, los cuales corresponden a tres metinos, cuatro metilenos, tres metilos y tres carbonos cuaternarios.

En la región de 200-100 ppm, se observa unicamente en aproximadamente δ 177.1 la señal correspondiente a un carbono carbonílico, esto sugiere la ausencia del metileno *exocíclico* de la γ -lactona. Lo anterior es confirmado en su espectro de RMN-¹H (*Espectro 32*) donde se observa la señal de H-6 en δ 3.53 (1H, *dd*, J= 12 y 9.9 Hz), la cual muestra acoplamiento con la señal doble en δ 1.94 (1H, *d*, J= 11.4 Hz) y la señal compleja entre 1.09-0.98 ppm, que corresponde a los hidrógenos de la posición C-5 y C-7 respectivamente; además de las señales simples para el CH₃-14 (δ , *s*, 3H) y CH₃-15 (δ , *s*, 3H).

De la discusión anterior, se puede concluir que la acción de *A. ochraceus* es sobre las dobles ligaduras de la partenólida, ya que al comparar los espectros de la sustancia (69), con el de la sustancia en discusión se observa claramente la ausencia del hidrógeno vinílico del C-1 y como ya se indico la ausencia del sistema AB de la doble ligadura del metileno *exocíclico* de la γ -lactona. Observándose una nueva señal doble, que presenta un desplazamiento químico en 0.93 (3H, *d*, J= 7.1 Hz), la cual se acopla con el *doble de quintetos* (1H, J= 12.3 y 7.6 Hz) que corresponde a H-11.

La esteereoquímica del metilo en el C-11 se estableció por la magnitud de la constante de acoplamiento entre H-7 e H-11 que es de aproximadamente de 11.3 Hz, lo cual esta de acuerdo para lactonas con esqueleto de guayano estructuralmente semejantes, como la 3 α ,4 α ,10 β -trihidroxi-11 β H-guai-1-en-12,6 α -olida [102], con base en lo mencionado anteriormente, se propone la *formula parcial A*; la cual presenta cuatro grados de insaturación y una formula C₁₃H₂₀O₂, los fragmentos restantes involucrarían 2 carbonos, 8 hidrógenos y 2 oxígenos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

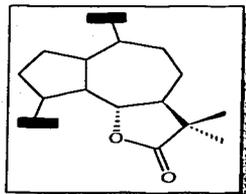
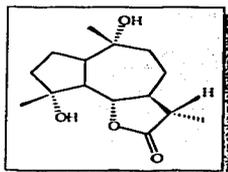


Figura 14. Fórmula parcial A del producto de biotransformación con *A. ochraceus*

De acuerdo con la transformación química de la partenólida con *p*-TsOH, se estableció que la protonación del epóxido seguido del ataque nucleofílico de la doble ligadura, generaba un carbocatión terciario, el cual representa un receptor nucleofílico, que puede estar involucrado en la acción biológica de estos compuestos.

En la literatura, se ha descrito que la acción de muchos hongos es hidroxilar ciertas partes de las moléculas, como en los diterpenos [68] y triterpenos [104, 109]. Situación observada con *A. ochraceus* en la obtención del compuesto en discusión, razón por la cual se propuso como hipótesis la estructura (75), que fue comprobada con base en sus desplazamientos de RMN-¹³C (DEPT), y por comparación con los desplazamientos químicos de lactonas sesquiterpénicas estructuralmente semejantes, concluyendo que el producto de biotransformación de (69) por *A. ochraceus* es la 4 α ,10 α -dihidroxi-11 β H-guai-12,6 α -olida (75).



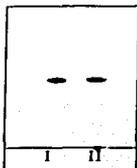
75

89

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. TRANSFORMACIÓN BIOLÓGICA DE LA PARTENÓLIDA (69) CON CULTIVO CELULAR DE ZANAHORIA

De la biotransformación de (69) con cultivo celular de zanahoria, se obtuvo un sólido blanco de p.f. 142-145 °C que fue identificado con base en sus propiedades físicas y espectroscópicas como la 4 α ,10 α -dihidroxi-11 β H-guai-12,6 α -olida (75), sustancia aislada de la biotransformación de *A. ochraceus*, ver figura 13.



- I. Producto de biotransformación con *A. ochraceus* (75).
- II. Producto de biotransformación con Cultivo de células de zanahoria (75).

Figura 13. CCF del producto de biotransformación obtenido con *A. ochraceus* y el cultivo celular de zanahoria

6. TRANSFORMACIÓN BIOLÓGICA DE (69) CON *Aspergillus niger*.

De la transformación biológica de (69) con *A. niger*, se obtuvo la 1 β , 4 α -dihidroxiudesmanólida (76) [105]. En su espectro de RMN-¹H (*Espectro 32*), se observan las señales características de una lactona α,β -insaturada; ya que en δ 3.54 se observa una señal *doble de doble* (1H, J= 9 y 7.6 Hz) que corresponde a H-6, el cual se acopla con las señales *doble* (d, J= 9.0) que pertenece a H-5 y una señal múltiple centrada en 2.44 ppm que se asigna a H-7, además de un sistema AB que corresponde al metileno exocíclico de la γ -lactona en 6.13 (d, J= 3Hz) y 4.96 (d, J= 2.9 Hz).

Lo anterior esta de acuerdo con lo que se muestra en su espectro de RMN-¹³C (*Espectro 33*), donde los desplazamientos químicos asignados a dicha parte de la molécula

se encuentran en la *formula parcial B*, la naturaleza de cada átomo de carbono se obtuvo a partir del espectro de RMN- ^{13}C , (*Espectro 3-4*) (DEPT).

La asignación de desplazamientos químicos adicionales de RMN- ^{13}C , se hicieron por comparación con los desplazamientos químicos de sustancias estructuralmente semejantes informados previamente en la literatura [106], con base en lo anterior, se hicieron las asignaciones como se muestra en la *formula parcial C*.

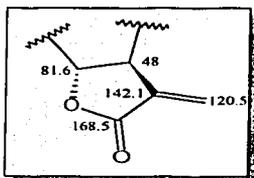


Figura 15. Formula parcial B, desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C .

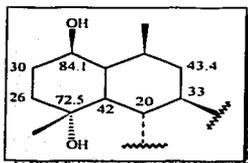
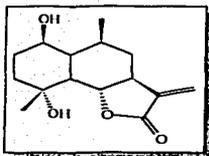


Figura 16. Formula parcial C, desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C .

La formación del compuesto (76), puede ser explicado por la apertura nucleofílica del anillo del oxirano seguido de la ciclización para dar el anillo de eudesmano y la

formación de un carbocatión secundario para posteriormente hidroxilarse en el C-1. Lo anterior esta de acuerdo, con lo que se ha propuesto que puede ocurrir en la planta [108,109].



76

IX. CONCLUSIONES

92-A

Transformación Química y Biológica de la partenólida — Lactona Sesquiterpénica con esqueleto de Germacrano —

- Se realizó la transformación química de la partenólida en medio ácido con *p*-TsOH, de donde se obtuvieron dos productos mayoritarios:
 - miquenólida (70)
 - 11 β ,13-dehidrocompresanólida (71)

- De la transformación química de la partenólida con HClO₄/acetona, se obtuvo:
 - 13-metoxipartenólida (72)

- La partenólida se transformó químicamente con KOH/MeOH-H₂O, para obtener :
 - 13-metoxipartenólida (72)

- De la transformación biológica de la partenólida con *B. Bassiana*, se obtuvieron dos derivados caracterizados como:
 - 11 β ,13-dihidropartenólida (73)
 - 1,10-epoxi-11 β ,13-dihidropartenólida (74)

- De la transformación biológica con *A. ochraceus*, se obtuvieron los siguientes derivados:
 - 11 β ,13-dihidropartenólida (73)
 - 4 α ,10 α -dihidroxi-11 β H-guai-1-en-12 α -olida (75)

- De la biotransformación con *A. niger* se obtuvo:
 - 1 β -hidroxi-4 α -hidroxieudesmanólida (76)

- De la transformación con cultivo celular de la zanahoria, se aisló:
 - 4 α ,10 α -dihidroxi-11 β H-guai-1-en-12 α -olida (75)

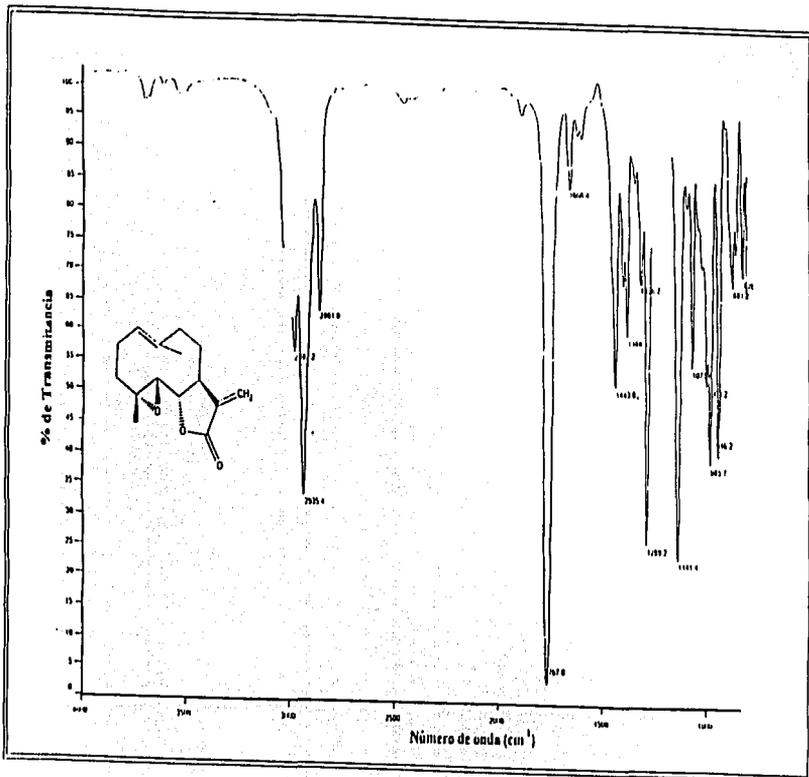
- Se encontró que *B. Bassiana* fue el microorganismo más eficiente (de los tres empleados) para biotransformar la partenólida, ya que el rendimiento de los derivados biológicos fue el más alto.
- Se determinó la actividad antimicrobiana de la partenólida y de sus derivados químicos y biológicos, en donde se observó que los compuestos (69), (70) y (72) inhiben el crecimiento de *C. albicans* y *M. luteus*.
- Al realizar la determinación de la actividad antitumoral de la partenólida y de sus derivados químicos y biológicos se encontró que los compuestos (69) y (70), presentan actividad antitumoral frente a la línea celular de carcinoma cérvico-uterino en concentraciones de 0.1-50 µg/mL. De igual manera el compuesto (72) presenta dicha actividad solo en concentraciones de 50 µg/mL

X. ESPECTROS

94-A

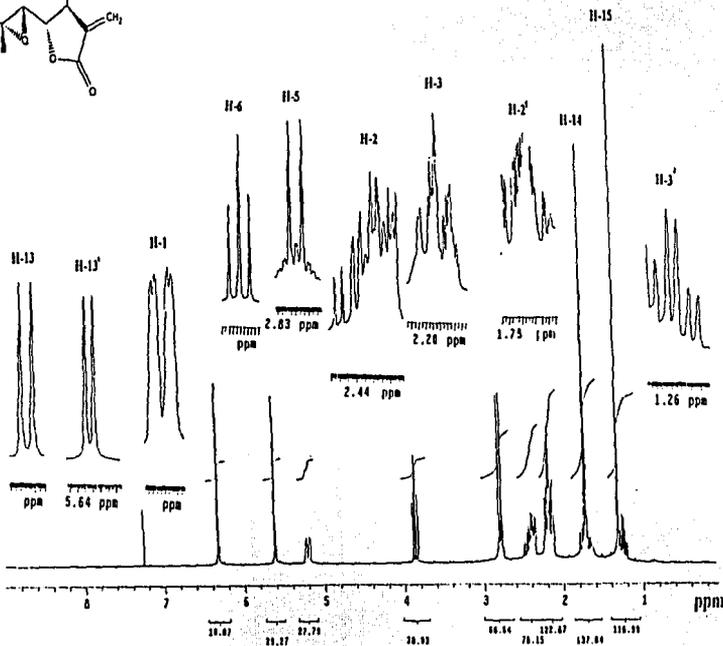
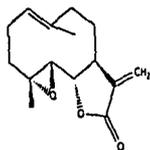
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESPECTRO I. IR (CHCl₃) DE LA PARTENÓLIDA (69).

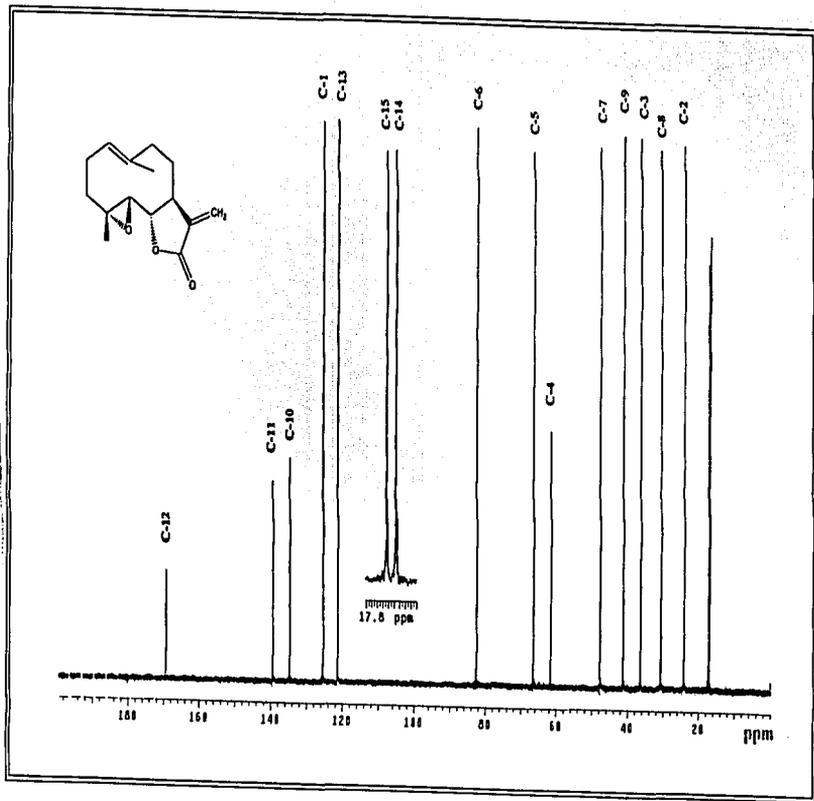


Transformación Química y Biológica de la partenólida — Lectura Sequituripica con espectro de Grmasano

ESPECTRO 2. RMN-¹H (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA PARTENÓLIDA (69).



ESPECTRO 3. RMN-¹³C (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA PARTENÓLIDA (69).

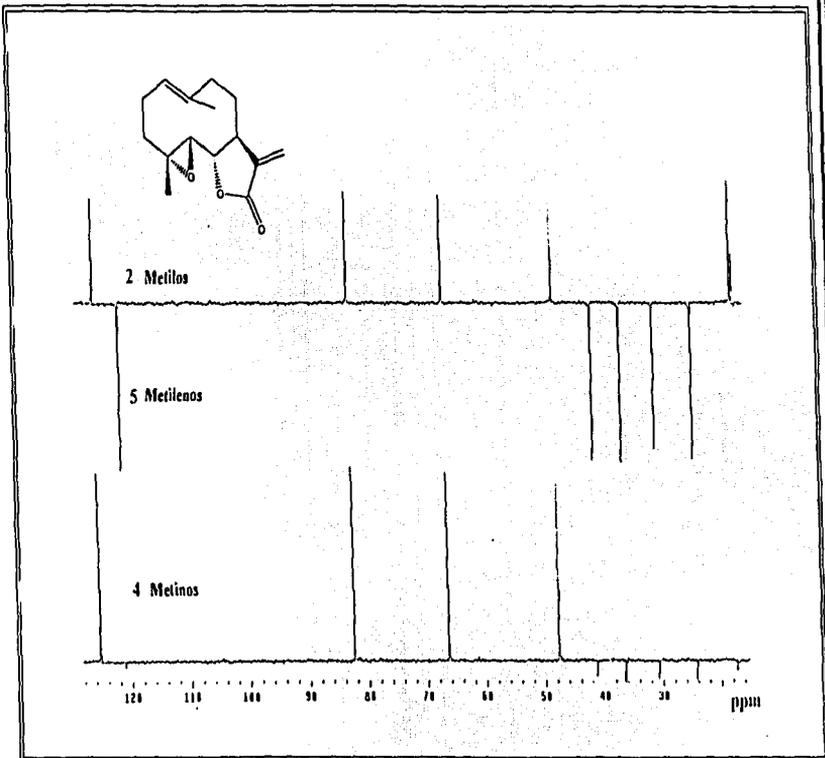


97

Transformación Química y Biológica de la partenólida — Lactona Sesquiterpénica con esqueleto de Graminano

FALLA DE ORIGEN

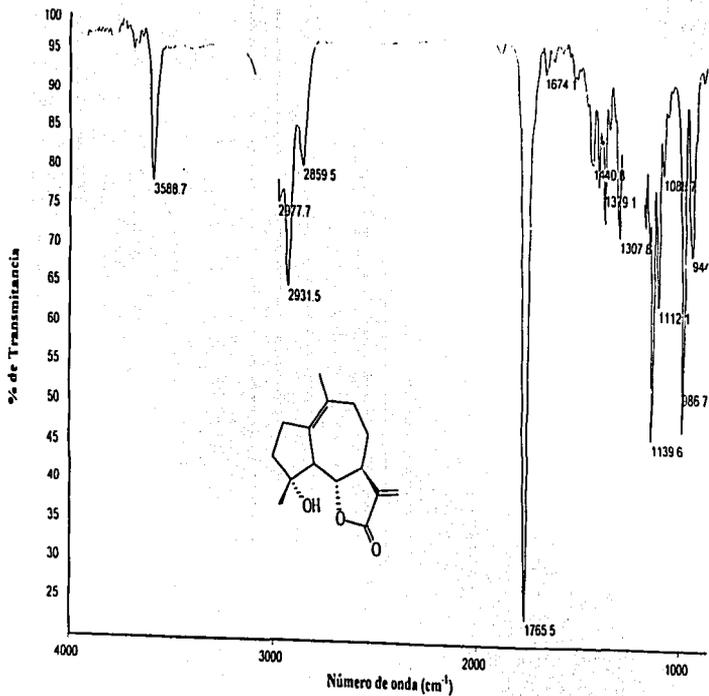
ESPECTRO 4. DEPT (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA PARTENÓLIDA (69).



Transformación Química y Biológica de la partenólida — Laguna Saguitapeteca con esquistos de Cerrozano

TESIS CON
FOLIA DE ORIGEN

ESPECTRO 5. IR (CHCl₃) DE LA MIQUENÓLIDA (70).



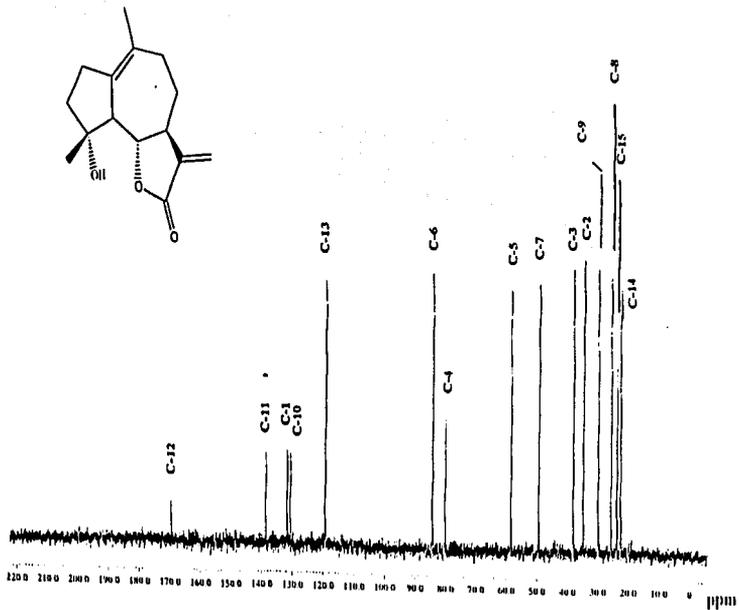
66

LABORATORIO DE QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Transformación Química y Biológica de la Paracetamida — Lactona Sequiterpénica con espectro de Graciano

ESPECTRO 7. RMN-¹³C (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA MIQUENÓLIDA (70).

Transformación Química y Biológica de la penicilina — Lactona *Sesquiterpénica* con esqueleto de *Germaano* —

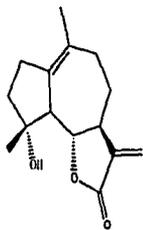
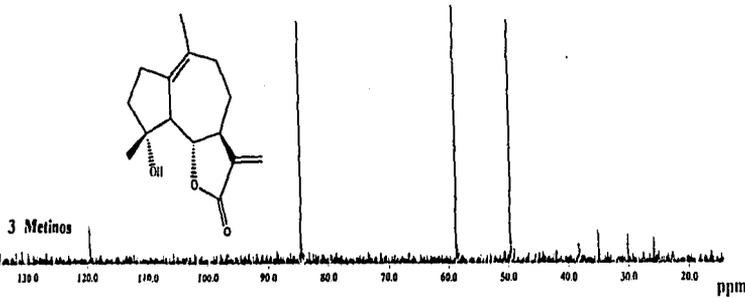
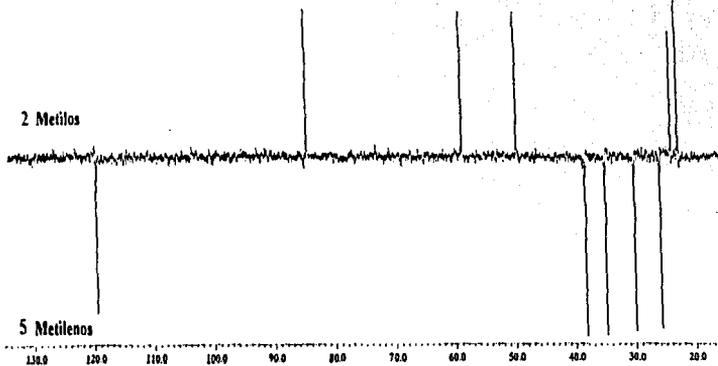


101

LABORIO
DE ORIGEN

ESPECTRO 8. DEPT (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA MIQUENÓLIDA (70).

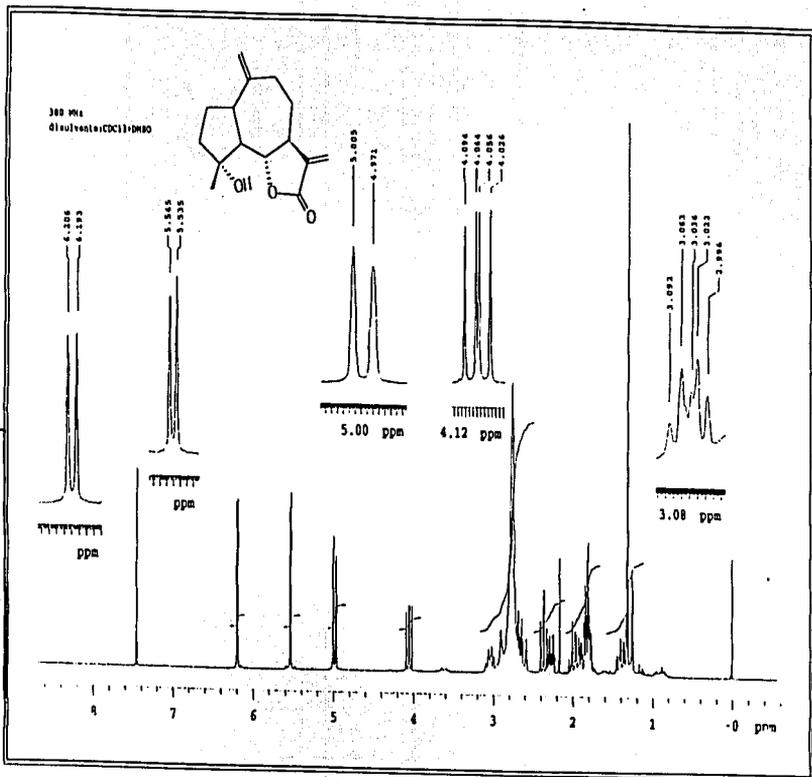
Transformación Química y Biológica de la pterodilida — Lactona Sagittaridina con espectro de Resonancia



TESIS CON
VALOR DE ORIGEN

ESPECTRO 9. RMN-¹H (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 11βH,13-DEHIDROCOMPRESANÓLIDA (71).

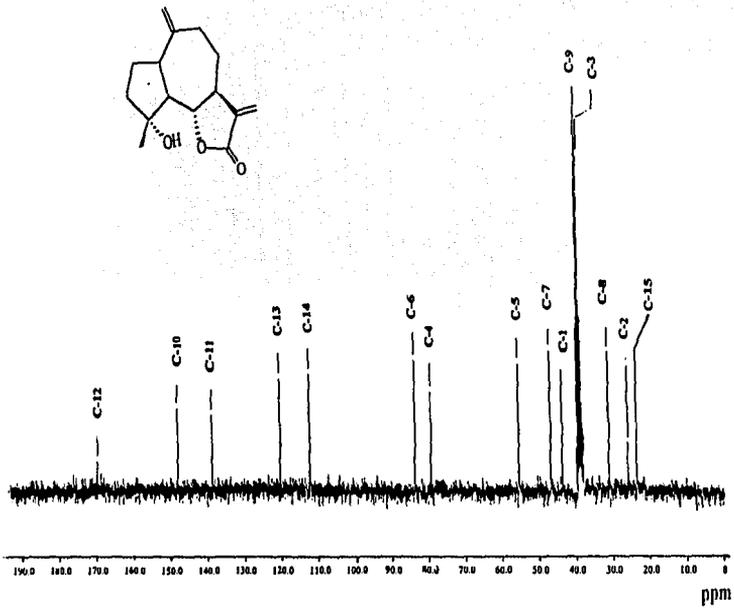
Transformación Química y Biológica de la penicilina — Lección Semipreparativa con equipos de Laboratorio —



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

ESPECTRO 10. RMN-¹³C (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 11βH,13-DEHIDROCOMPRESANÓLIDA (71).

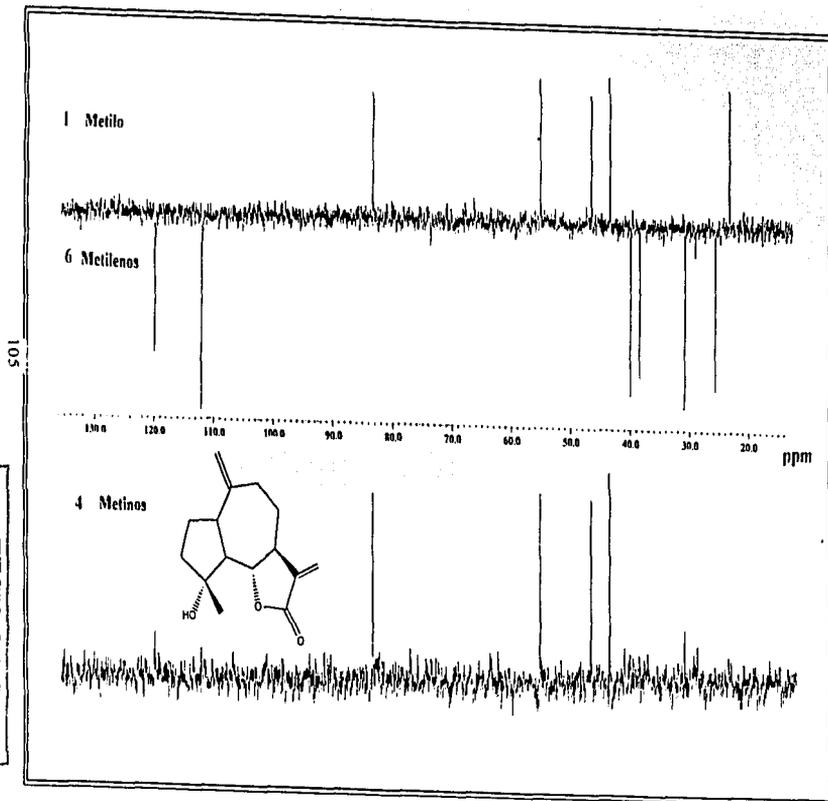
Transformación Química / Biología de la pteridolida — Lactona, Squiperfina con efecto de Germano —



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESPECTRO 11. DEPT (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 11βH,13-DEHIDROCOMPRESANÓLIDA (71).

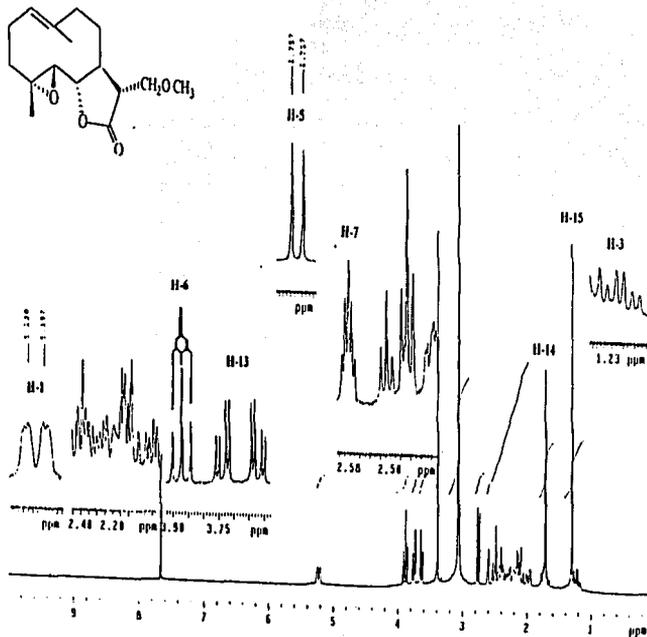
Transformación Química y Biológica de la jarenilida — Lactona β -quiterpénica con esqueleto de Gamarano —



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

ESPECTRO 12. RMN-¹H (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 13-METOXIPARTENÓLIDA (72)*.

Transformación Química y Biológica de la partenólida — Lactona Sesquiterpénica con esqueleto de Germacrano —



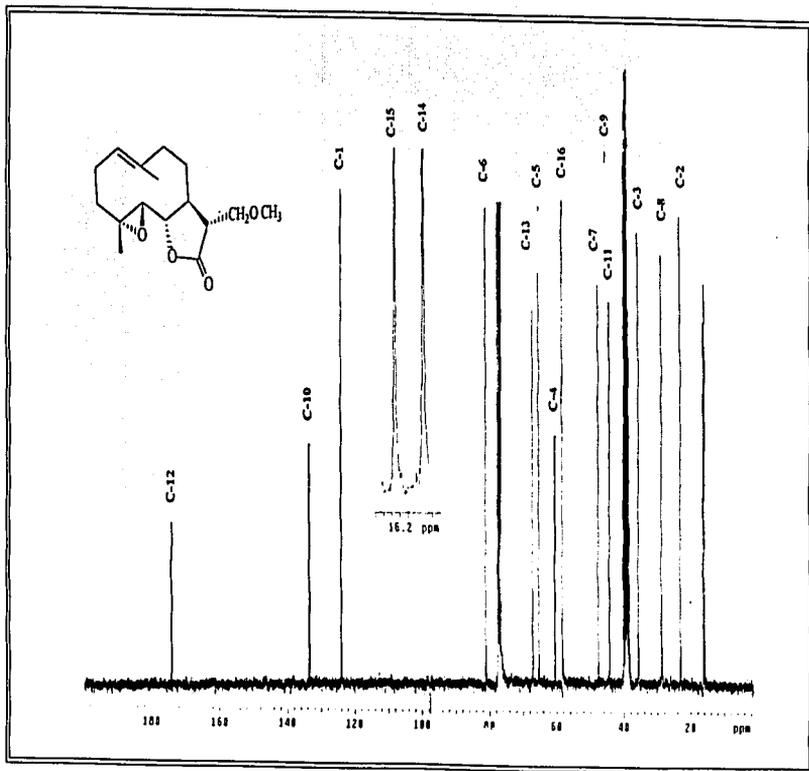
106

TEMAS CON FALLA DE ORIGEN

* Obtenido de la transformación química en medio ácido (HClO₄/acetona).

ESPECTRO 13. RMN-¹³C (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 13-METOXIPARTENÓLIDA (72)*.

Transformación Química y Biológica de la partenólida — Lactona Seguitropina con espectro de C¹³marcado

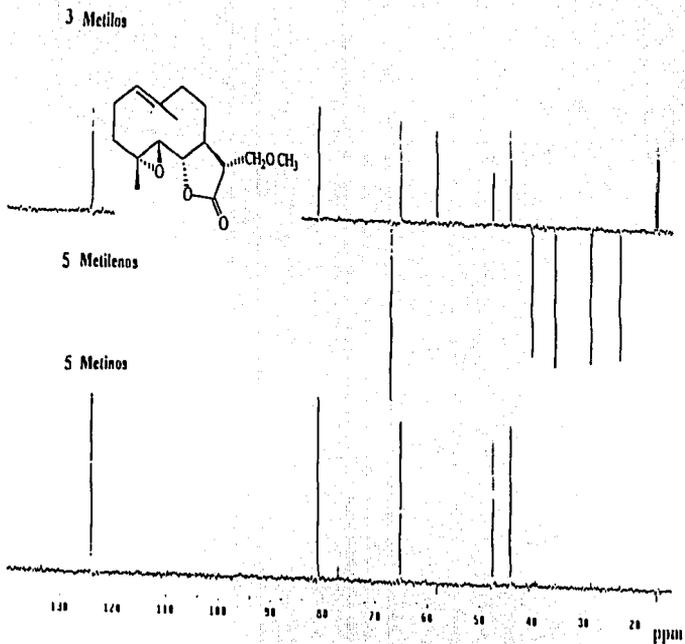


* Obtenido de la transformación química en medio ácido (HClO₄/acetona)

ESPECTRO 14. DEPT (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 13-METOXIPARTENÓLIDA (72)*.

Transformación Química y Biológica de la parthenólida — lactona, sequiterpeno con epóxido de Camerazoa —

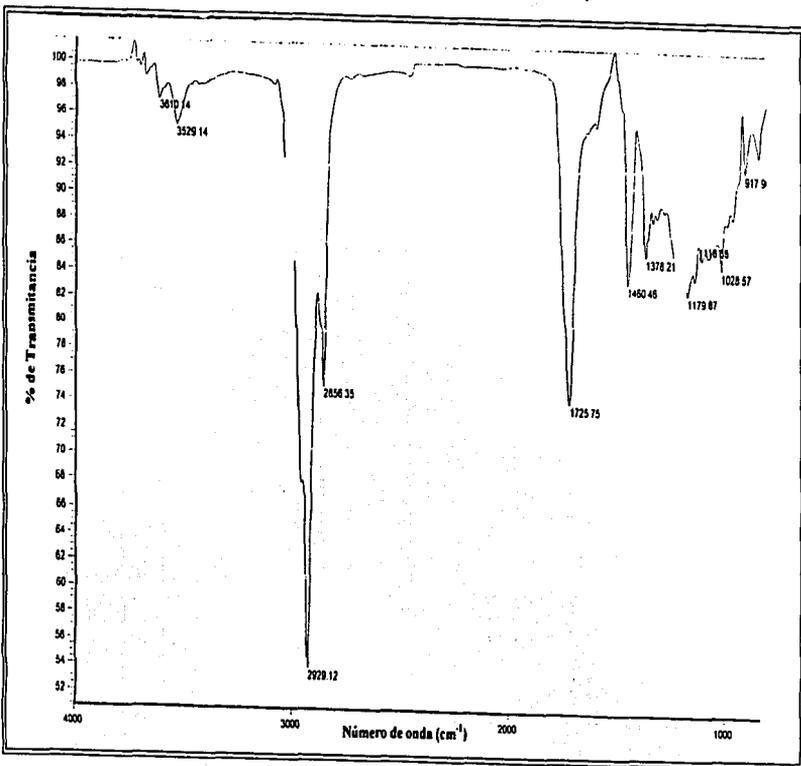
108



*Obtenido de la transformación química en medio ácido (HClO₄/acetona).

TESTIS CON
FALSA DE ORIGEN

ESPECTRO 15. IR (CHCl₃) DEL PRODUCTO A.

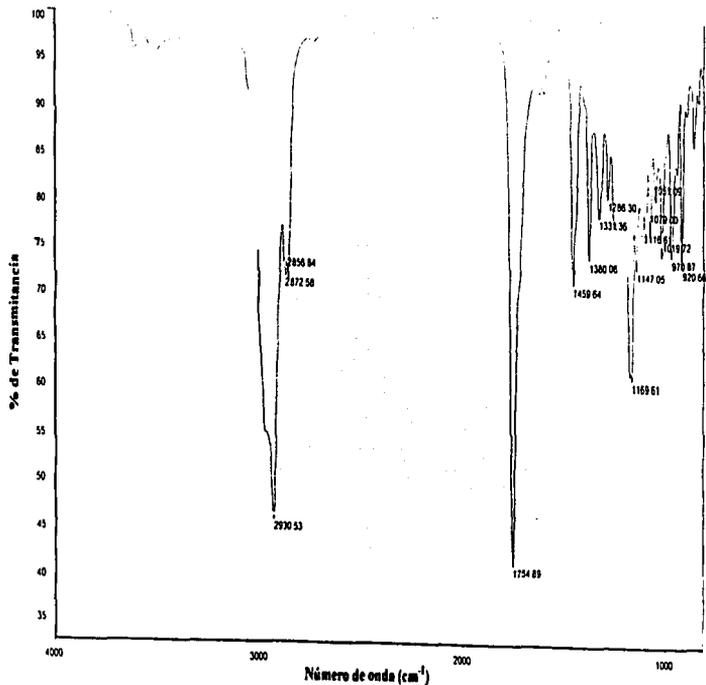


Transformación Química y Analítica de la paracetamol — Lectora Seguirtecnica con espectro de Camaronau

100

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESPECTRO 16. IR (CHCl₃) DEL PRODUCTO B.

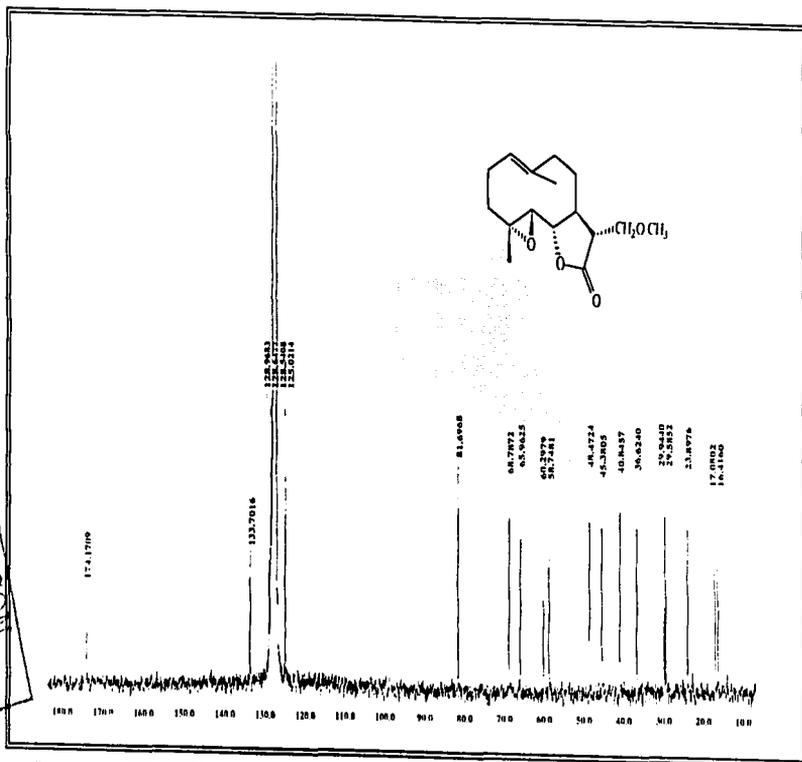


110

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

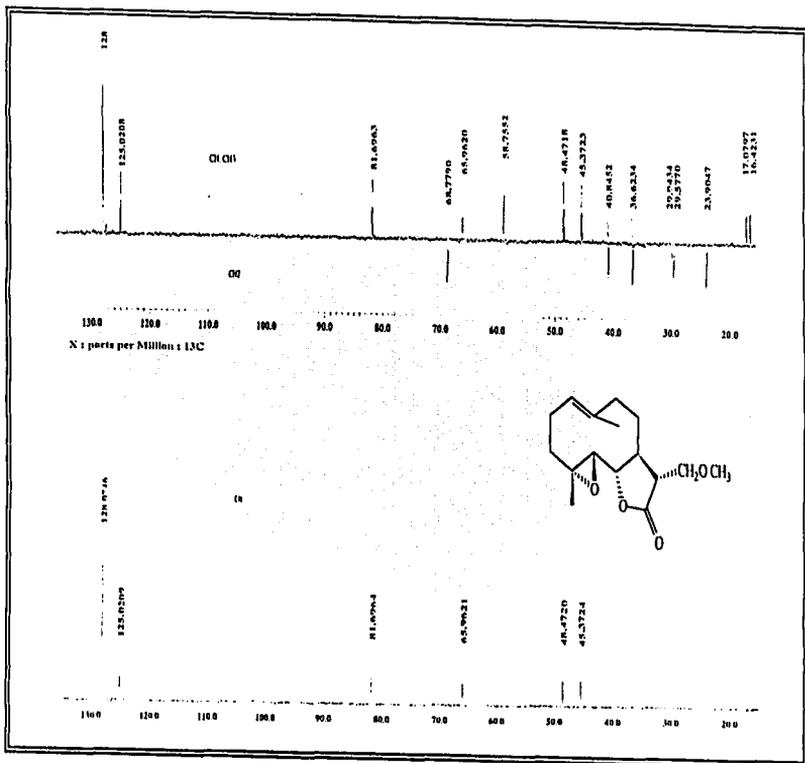
ESPECTRO 18. RMN-¹³C (300 Hz, C₆D₆, TMS) DE LA 13-METOXIPARTENÓLIDA (72)*

Transformación Química y Biológica de la partenólida — Lactona Seguiriyevina con esqueleto de Camphano



ESPECTRO 19. DEPT (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 13-METOXIPARTENÓLIDA (72)*

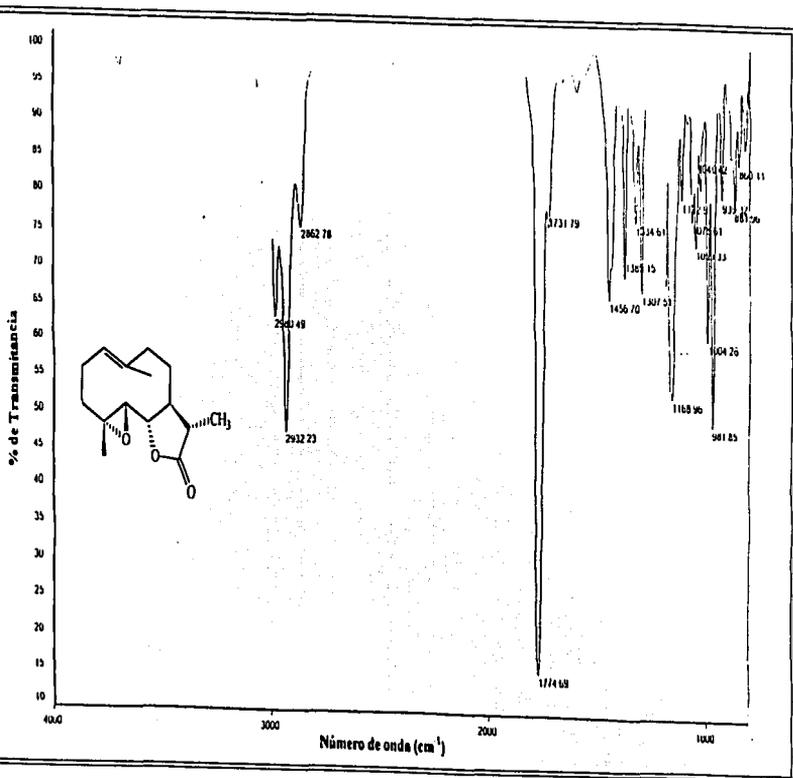
Transformación Química y Histórica de la partenólida — Lactona Secundaria con carácter de Gemarano —



* Obtenido de la transformación química en medio básico (KOH/MeOH-H₂O).

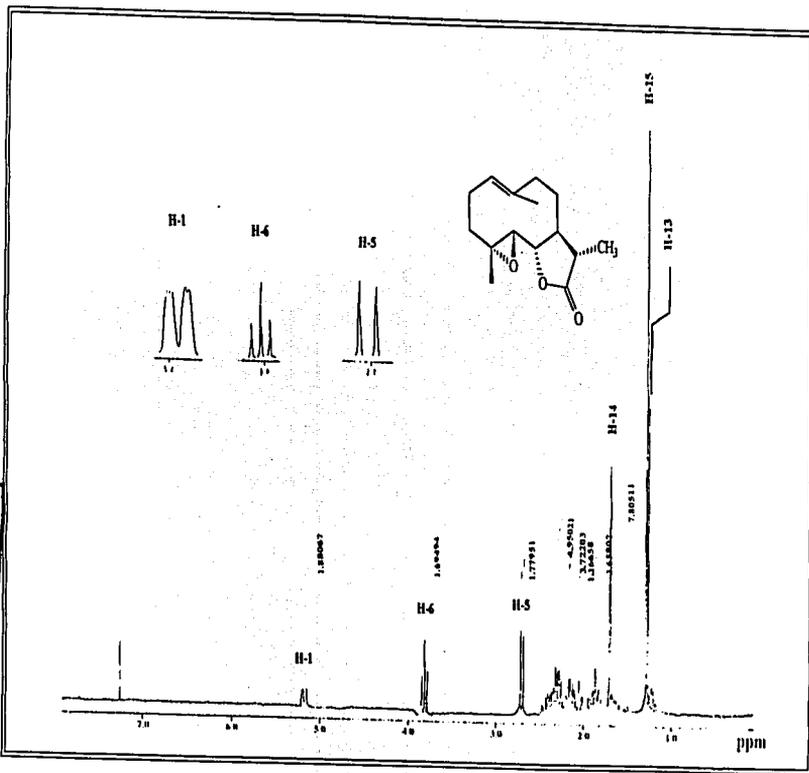
ESPECTRO 20. IR (CHCl₃) DE LA 11β,13-DIHDROPARTENÓLIDA (73).

Transformación Química y Biológica de la partenólida — *Lección Squipipéridos con espectro de Graciano*



ESPECTRO 21. RMN-¹H (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 11βH,13-DIHDROPARTENÓLIDA (73).

Transformación Química y Biológica de la partenólida — *Laccaria Securidiphila* con sustrato de Germacuran

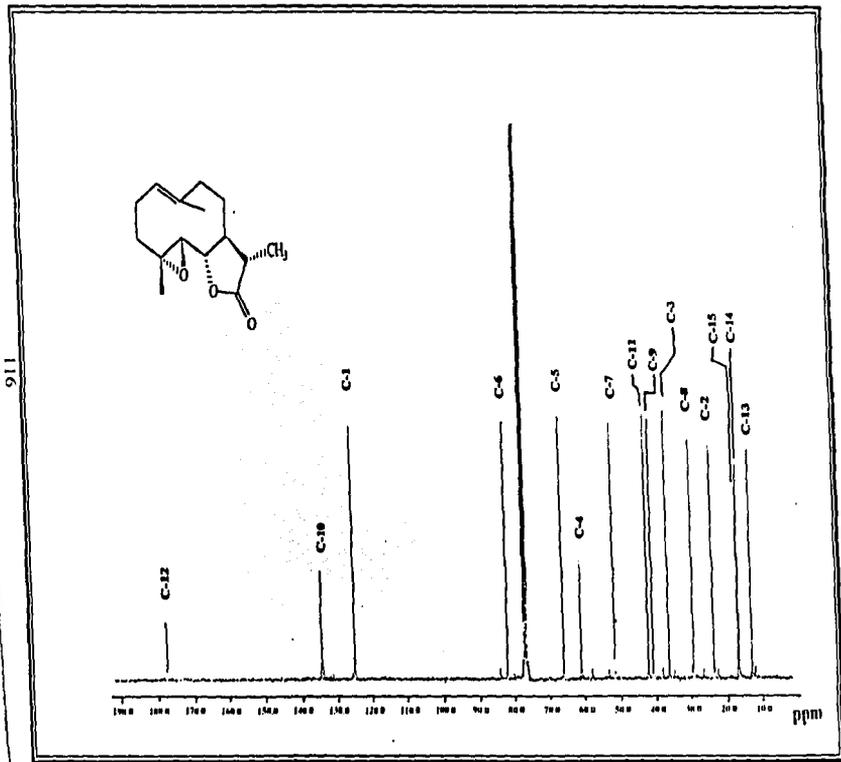


115

TESIS CON
DE CALIFICACION

ESPECTRO 22. RMN-¹³C (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 11β,13-DIHDROPARTENÓLIDA (73).

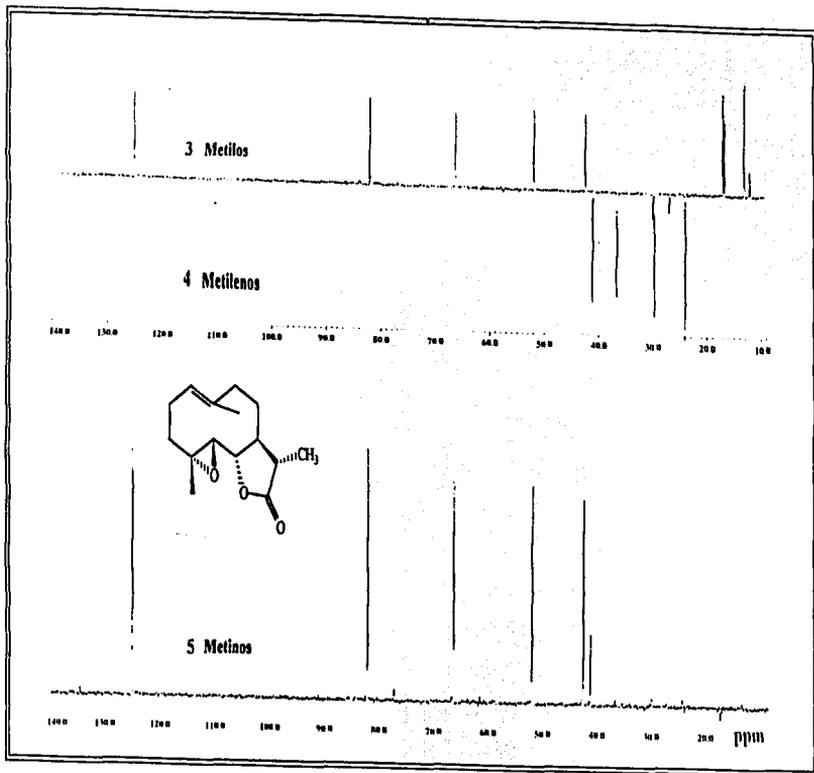
Transformación Química y Biológica de la partenólida — Lectura Suplementaria con espectro de Resonancia



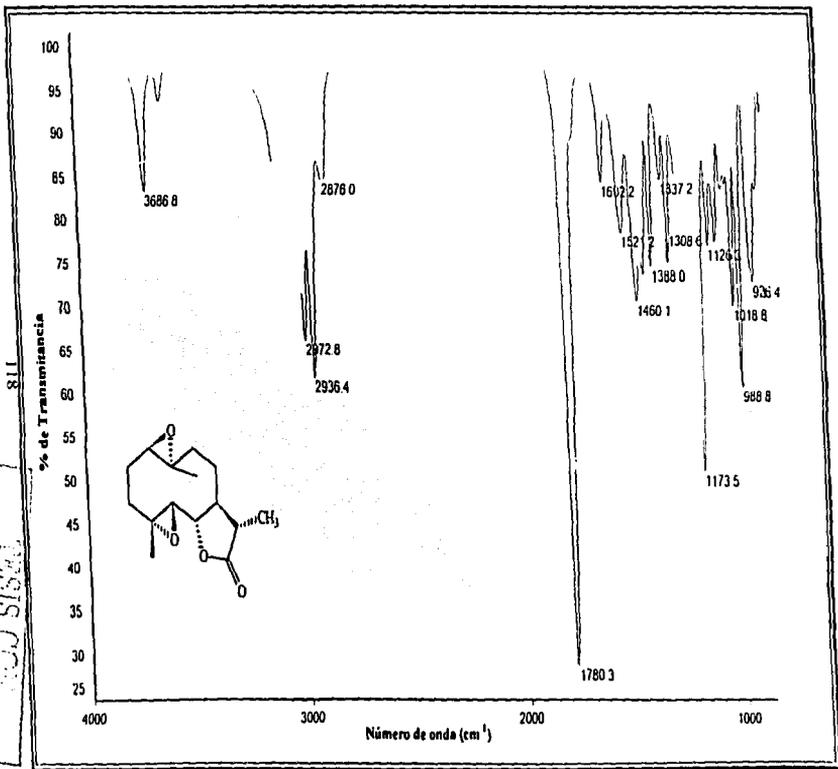
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

ESPECTRO 23. DEPT (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 11βH,13-DIHDROPARTENÓLIDA (73).

Transformación Química y Biológica de la partenólida — Lactona Squibberiana con respecto a Camazotro



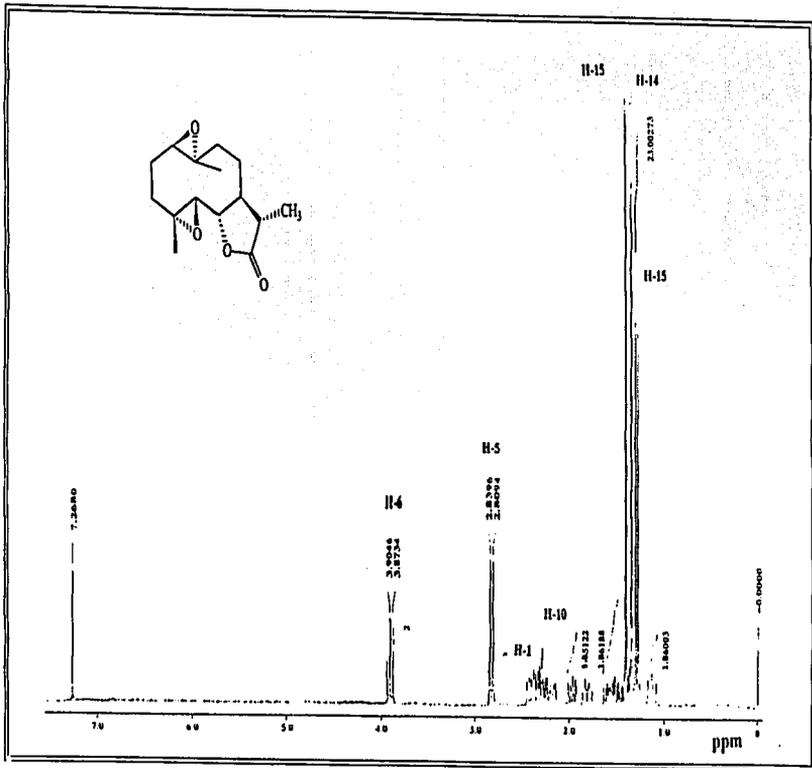
ESPECTRO 24. IR (CHCl₃) DE LA 1,10-EPOXI-11βH,13-DIHDROPARTENÓLIDA (74).



Transformación Química y Biológica de la partenólida — Lactona Sesquiterpénica con esqueleto de Germacreno —

ESPECTRO 25. RMN-¹H (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 1,10-EPOXI-11βH,13-DIHDROPARTENÓLIDA (74).

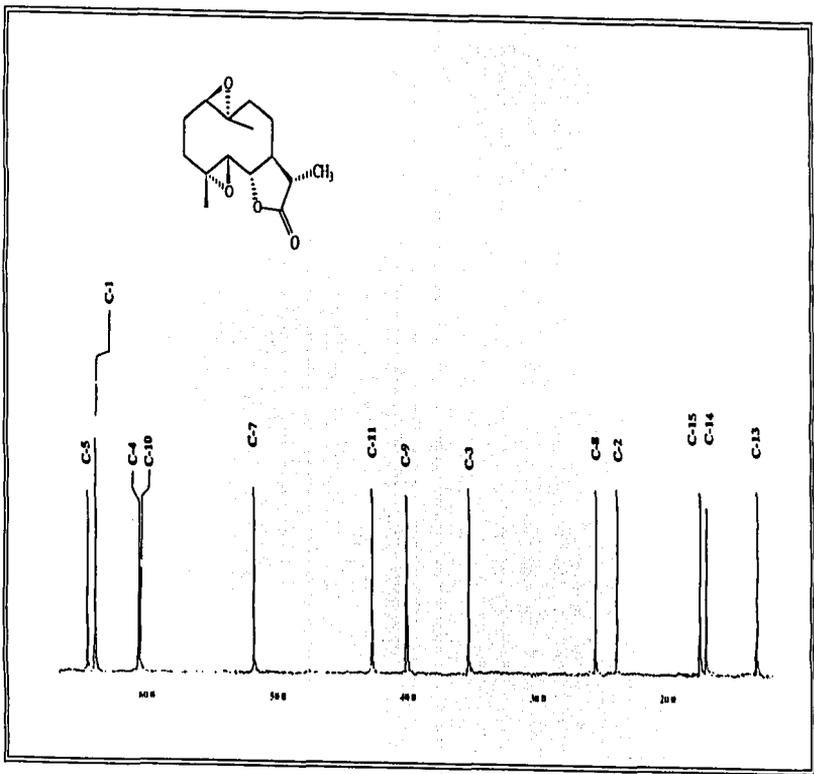
Transformación Química y Biológica de la partenólida — Lectora Siquierreñica con efecto de Germánico



TESIS CON
VALIA DE ORIGEN

ESPECTRO 26. RMN-¹³C (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 1,10-EPOXI-11βH,13-DIHDROPARTENÓLIDA (74).

Trasmisión Química y Biológica de la partecilla — Lanza Seguirse con seguridad de Camarero —

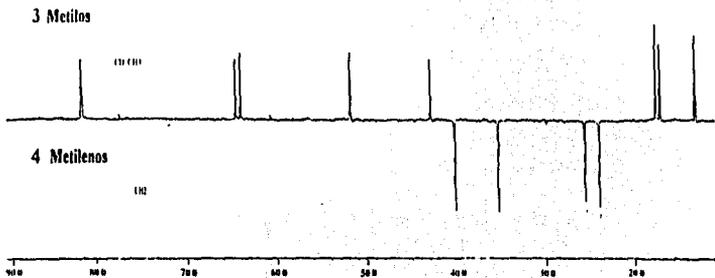


120

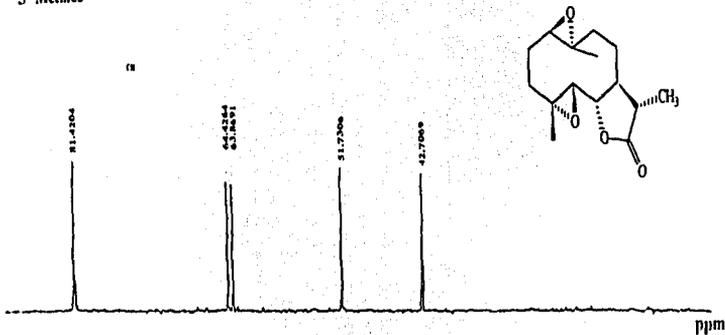
TESIS CON
DE ORIGEN

ESPECTRO 27. DEPT (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 1,10-EPOXI-11βH,13-DIHDROPARTENÓLIDA (73).

Transformación Química y Biológica de la parthenólida — Lactona Sesquiterpénica con epóxido de Cerasarano



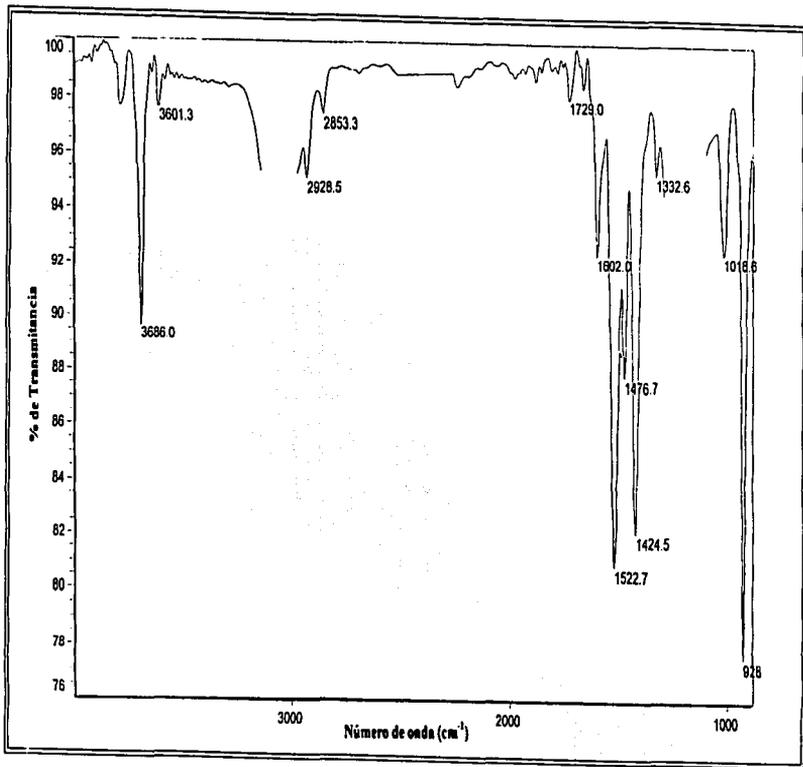
5 Metinos



121

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESPECTRO 28. IR (CHCl₃) DE LA 4 α ,10 α -DIHIDROXI-11 β H-GUAI-12,6 α -ÓLIDA (75).

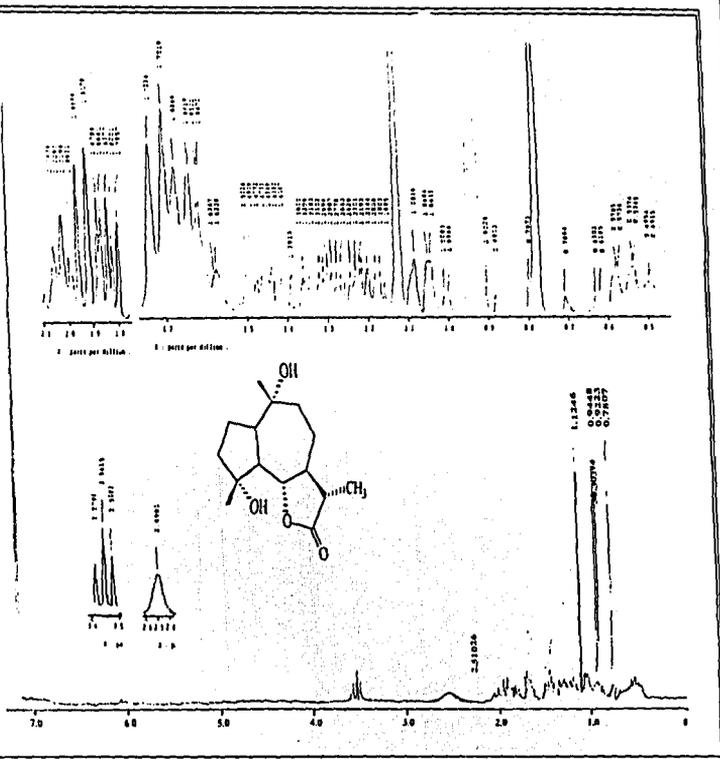


Transformación Química y Biológica de la purosólida — Lactona Secuiterpénica con espectro de Grimauro

TESIS CON
DE ORIGEN

ESPECTRO 29. RMN-¹H (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 4α,10α-DIHIROXI-11βH-GUAI-12,6α-ÓLIDA (75).

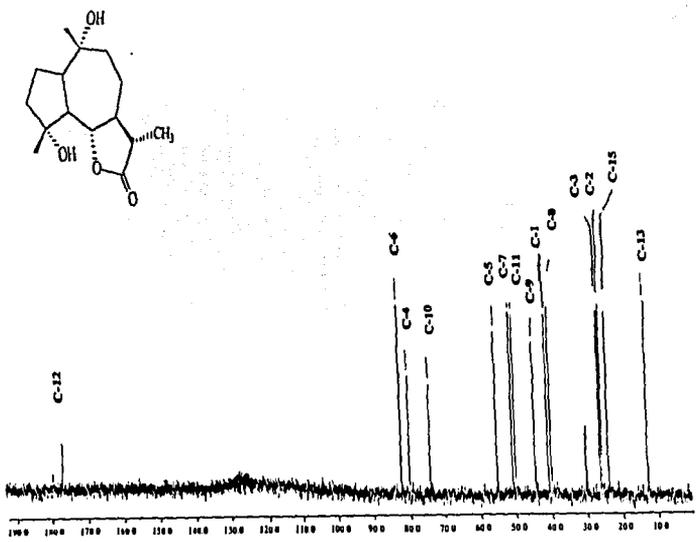
Transformación Química y Biológica de la paracetamol — Lectura Suplementaria con espectro de Estramoni



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ESPECTRO 30. RMN-¹³C (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 4 α ,10 α -DIHIDROXI-11 β H-GUAL-12,6 α -ÓLIDA (75).

Transformación Química y Biológica de la penicilina — Lactona Seguinipéptica con esqueleto de Camazotran

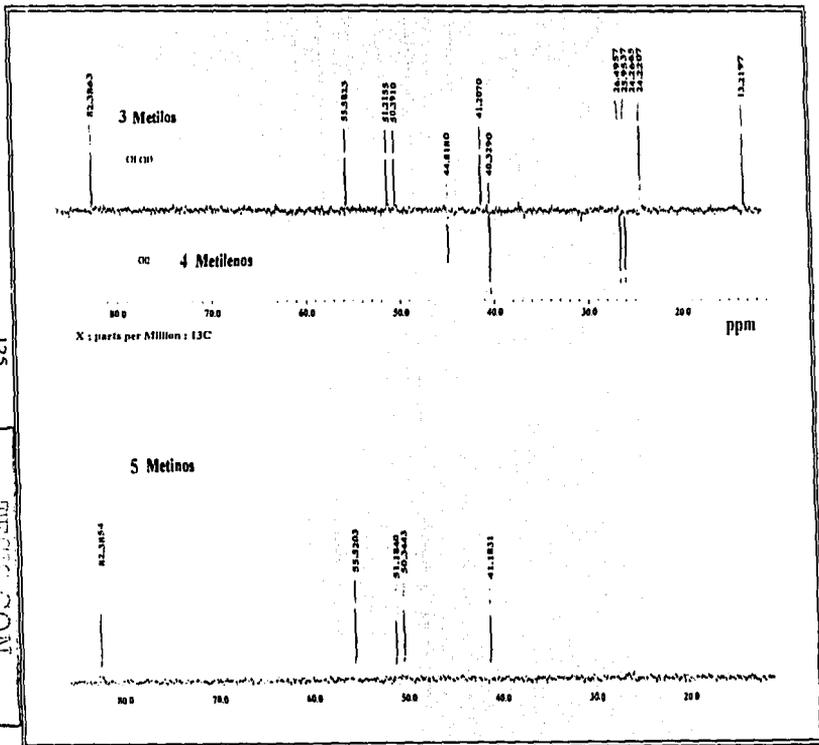


124

TTTTT CON
PUNTO DE ORIGEN

ESPECTRO 31. DEPT (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 4 α ,10 α -DIHIDROXI-11 β H-GUAI-12,6 α -ÓLIDA (75).

Transformación Química y Biológica de la paracetamida — Laura Seguiricinas en espectro de Gema-cruzo

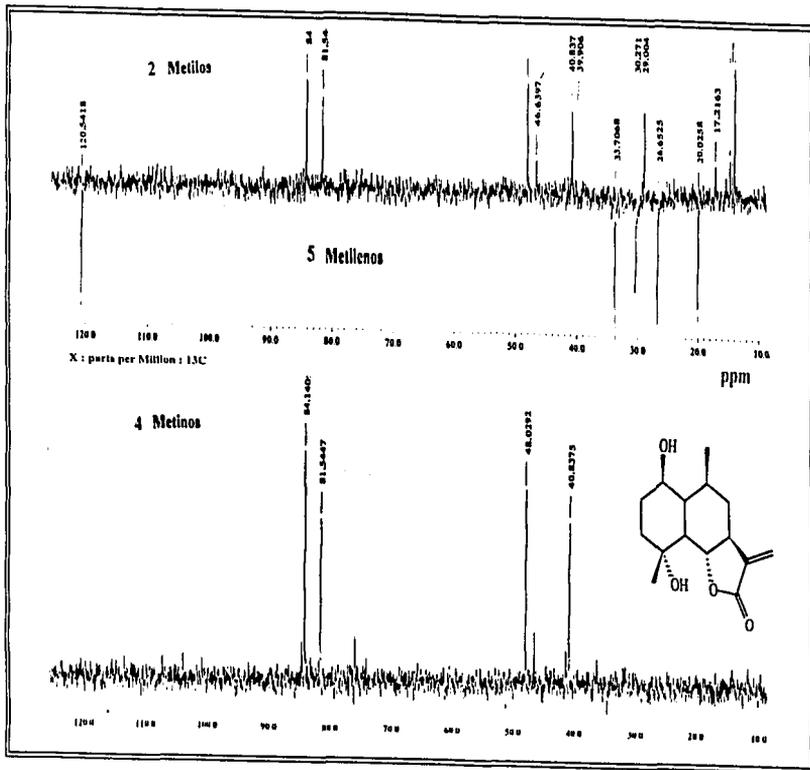


125

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ESPECTRO 34. DEPT (300 Hz, CDCl₃, TMS) DE LA 1 β -HIDROXI-4 α -HIDROXIEUDESMANÓLIDA (76).

Transformación Química y Biológica de la pterinósida — Lactona Sesquiterpénica con esqueleto de Camarcario —



XI. SUGERENCIAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

129-A

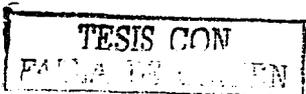
- Realizar el escalamiento de la biotransformación de la partenólida con *B. hassiana*, *A. ochraceus*, *A. niger* y cultivo celular de zanahoria.

- Realizar la biotransformación, separando la biomasa obtenida del medio de cultivo de crecimiento, para adicionarla en medio de cultivo fresco con el sustrato a biotransformar como única fuente de carbono.

- Determinar la actividad citotóxica (CL₅₀) de los productos mayoritarios de la biotransformación de la partenólida.

- Realizar la biotransformación de la partenólida con otros hongos filamentosos, como *R. nigricans* y *C. lunata*.

- Determinar la actividad biológica antimicrobiana, citotóxica y antitumoral de los productos mayoritarios de la biotransformación de la partenólida obtenidos con otros hongos filamentosos.



XII. APÉNDICE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

124-A

1. CRECIMIENTO MICROBIANO.

Los medios utilizados en el cultivo de microorganismos contienen todos los elementos en una forma adecuada para la síntesis del material celular y para la producción de productos metabólicos. Un medio de cultivo óptimamente equilibrado es obligatorio para conseguir la máxima producción.

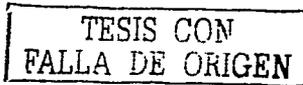
En un medio de apoyo para el crecimiento adecuado los microorganismos unicelulares aumentan de tamaño y por último se dividen en dos por un proceso de fisión binaria o gemación. Las células microbianas requieren un alto grado de adaptabilidad para responder a cambios tanto en el medio físico como en el químico.

Los organismos unicelulares responden a cambios en el medio al exhibir un conjunto diferente de actividades metabólicas. Así, un microbio facultativo inducirá las enzimas necesarias para el metabolismo oxidativo (respiratorio) cuando el oxígeno se ha suministrado a un medio anaerobio. Los organismos unicelulares son capaces de existir en una variedad de estados fisiológicos y pueden cambiar rápidamente de un estado a otro.

El crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo, lo cual, para los organismos unicelulares, conduce a un aumento en el número de individuos en la población. Se puede considerar el crecimiento a nivel de individuos dentro de una población (ciclo celular) o el crecimiento de poblaciones celulares (ciclo de crecimiento), este último en sistemas cerrados (cultivo intermitente) y en sistemas abiertos (cultivo alimentado por lotes y cultivo continuo).

Para medir el crecimiento es necesario realizar mediciones cuantitativas y en poblaciones microbianas puede medirse en términos de masa celular o números de células, entre estos métodos se encuentran:

- Peso seco celular
- Métodos espectrofotométricos, absorción
- Peso húmedo



- Volumen de células empacadas
- Número de células
- Masa de un componente celular
- Mediciones físicas, como la producción de calor durante el proceso de fermentación

El cultivo por lotes o intermitente representa el crecimiento en un sistema cerrado, puesto que no se añade medio nuevo al cultivo. Cuando un medio de crecimiento adecuado se inocula con células, tiene lugar una secuencia de eventos característicos llamada ciclo de crecimiento, el cual se puede describir por medio de una gráfica de peso seco celular (X), ($g \cdot L^{-1}$) contra el periodo de incubación en horas (h).

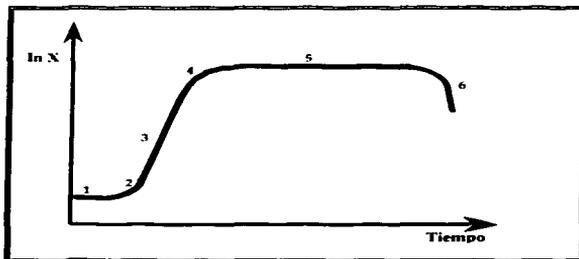


Figura 1. Ciclo de crecimiento. Fases de crecimiento: 1, fase lag; 2, aceleración; 3, fase exponencial; 4, desaceleración; 5, fase estacionaria; 6, declinación; X, peso seco celular.

2. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO PARA *Aspergillus niger* ATCC16404, *Beauveria bassiana* y *Aspergillus ochraceus*.

Resiembra de hongos filamentosos¹⁷.

Se prepararon 25 mL de Agar Papa Dextrosa (APD) y se distribuyeron en tres matraces Erlenmeyer de 50 mL, (aproximadamente 8 mL por cada matraz) y se esterilizaron a 121°C/1 lb/15 min., se dejó solidificar el medio de cultivo, para proceder a sembrar los hongos empleados en este trabajo. Se incubaron a temperatura ambiente hasta su esporulación¹⁸.

Preparación de la suspensión de esporas

Una vez que los hongos esporularon, se adicionó a cada matraz 10 mL de agua destilada estéril para obtener una suspensión de esporas de cada uno de los hongos.

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo empleado para la biotransformación fue el YEPGA. Se prepararon 720 mL de medio, y se distribuyeron 120 mL de este, en seis matraces Erlenmeyer de 250 mL (cada microorganismo se incuba por duplicado). El medio de fermentación se compuso de los siguientes nutrientes: **0.1% de peptona**, **0.1% de extracto de levadura**, **0.1% de extracto de carne** y **0.5% de glucosa**, en agua destilada a un pH de 7. Los matraces con el medio YEPGA se esterilizaron a 121°C/1 lb/15 min. y se inocularon con 2 mL de la suspensión de esporas de cada hongo (dos matraces para cada hongo filamentosos) en una campana de flujo laminar. Los matraces se incubaron en agitación a 150 rpm y 30°C, durante 196 h.

¹⁷ Los microorganismos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Beauveria bassiana* se obtuvieron del cepario de la Facultad de Química, UNAM y se mantuvieron en el medio de cultivo YEPGA.

¹⁸ El tiempo necesario de incubación, para la producción de esporas fue: *A. niger* 72 h, *A. ochraceus* 96 h y *B. bassiana* 120 h

2.1 Determinación del crecimiento microbiano por el método de Peso Húmedo.

Se tomaron muestras de 2 mL, de cada uno de los seis matraces, a diferentes intervalos de tiempo¹⁹. Todas las muestras tomadas durante estos tiempos de muestreo, se colocaron en tubos de ensaye de 13 x 100 y se centrifugaron a 3000 rpm durante cinco minutos, después se retiró el sobrenadante y se colocó en tubos de ensaye de 18 x 150 (para ser empleado en la prueba de DNS, determinación del consumo de sustrato), una vez que se eliminó todo el sobrenadante se pesó cada tubo y por diferencia se determinó la cantidad de biomasa presente a cada tiempo de muestreo; con los valores obtenidos se construyó la curva de crecimiento, *gráfico 2*, tiempo *versus* ln de la biomasa. El punto máximo de producción de biomasa para cada hongo filamentosos fue: *Aspergillus niger* 48 h, *Aspergillus ochraceus* 72 h y *Beauveria bassiana* 96 h, ver *tabla 22*, 23.

¹⁹ Tiempo cero, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 21 h, 25 h, 28 h, 45 h, 52 h, 71 h, 78 h, 97 h, 104 h, 169 h y el respectivo blanco del medio antes de inocular con los hongos filamentosos.

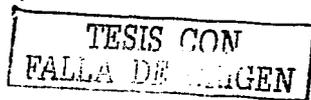


Tabla 22. Determinación de la cinética de crecimiento por el Método de Peso Húmedo.

TIEMPO	PRODUCCIÓN DE BIOMASA (g)																
	0 h	0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	21 h	25 h	28 h	45 h	52 h	71 h	78 h	97 h	104 h	169 h
MUESTRA																	
A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.3	0.48	0.5	0.28	0.3	0.2	0.20	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	0.20
B1	0	0.1	0.1	0.1	*	*	0	0.1	0.1	0.3	0	0	0.1	0	0	0.62	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	0.50	0.50
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	0.40	0.30

* Indica que las muestras fueron eliminadas del estudio¹⁶.

Tabla 23. Valores logarítmicos para la determinación de la cinética de crecimiento microbiano, por el Método de peso Húmedo.

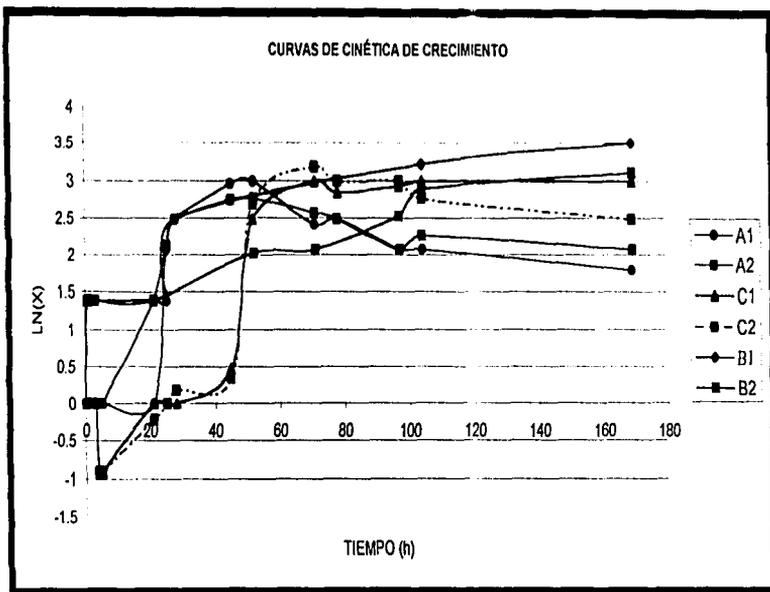
TIEMPO	ln (x) ^a																
	0 h	0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	21 h	25 h	28 h	45 h	52 h	71 h	78 h	97 h	104 h	169 h
MUESTRA																	
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	2.079	2.485	2.955	2.996	2.416	2.485	2.079	2.079	1.792
A2	-	-	-	-	-	-	-	1.386	2.128	2.485	2.747	2.773	2.58	2.485	2.079	2.262	2.079
B1	-	1.386	1.386	1.386	*	*	-	1.386	1.386	2.485	-	-	1.386	-	-	3.210	3.500
B2	-	1.386	1.974	-	1.386	-	-	1.386	-	-	-	2.028	2.079	-	2.532	2.890	3.110
C1	-	-	-	*	-	-0.92	-0.92	-	-	-	0.470	2.485	2.996	2.845	2.934	2.996	2.996
C2	-	-	-	-	-	-0.92	-0.92	-0.22	0.346	0.182	0.336	2.695	3.178	2.996	2.996	2.773	2.485

^a Donde (x) es la producción de biomasa expresada en (g).

* Indica que las muestras fueron eliminadas del estudio.

¹⁶ Las muestras se eliminaban del estudio, bajo el criterio de pérdida de algún volumen de la misma, durante su tratamiento

Gráfico 2. Curvas de cinética de crecimiento microbiano para tres hongos filamentosos por el Método de Peso Húmedo.



A *Aspergillus niger*

B *Beauveria bassiana*

C *Aspergillus ochraceus*

1 y 2 indican que el ensayo se realizó por duplicado.

Transformación Química y Biotecnología de la Invernicultura - Lección 5: Seguridad y Salud con el medio ambiente

TESIS CON
FALTA DE
FIRMAS

Tabla 24. Datos de Consumo de glucosa de tres hongos filamentosos (Método de DNS).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (g/100 mL)									
	0 h	0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	21 h	25 h	
A1	0.585485103	0.62276547	0.63919022	0.64834225	0.38551566	0.34077922	0.12641711	0.09557678	0.08540871	
A2	0.706646295	0.73480657	0.59258976	0.45185638	0.41347594	0.18623377	0.08557678	0.06296057	0.04111616	
B1	0.775263561	0.76256684	0.72528648	0.69977082	0.6065699	0.66249045	0.55810542	0.50870894	0.50684492	
B2	0.774331551	0.77267657	0.6973262	0.63068389	0.62453832	0.60913321	0.60190985	0.59072574	0.47422461	
C1	0.641405653	0.85576776	0.68206264	0.58140565	0.48913675	0.54878533	0.50311688	0.38381871	0.37093937	
C2	0.660045836	0.76443086	0.62800611	0.58699771	0.48261268	0.47795264	0.43974026	0.40007447	0.37657844	

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (g/100 mL)							
	28 h	45 h	52 h	71 h	78 h	97 h	104 h	169 h
A1	0.07532468	0.04491979	0.01694578	0.01191291	0.0107013	0.00678686	0.00557525	0.00100841
A2	0.02033613	0.01592055	0.01331092	0.00911688	0.01377693	0.0107945	0.00706648	0.00138121
B1	0.51430099	0.47608862	0.45838044	0.41864018	0.38976318	0.11726509	0.05016043	0.03642475
B2	0.44906035	0.42646634	0.37915966	0.28972243	0.19763178	0.14636968	0.09510759	0.08170996
C1	0.35772345	0.17436211	0.13801375	0.08811306	0.07413293	0.06341482	0.05828877	0.05782277
C2	0.32958638	0.10847976	0.06600458	0.05295646	0.08278075	0.02160581	0.01564095	0.00169595

A: *Aspergillus niger*

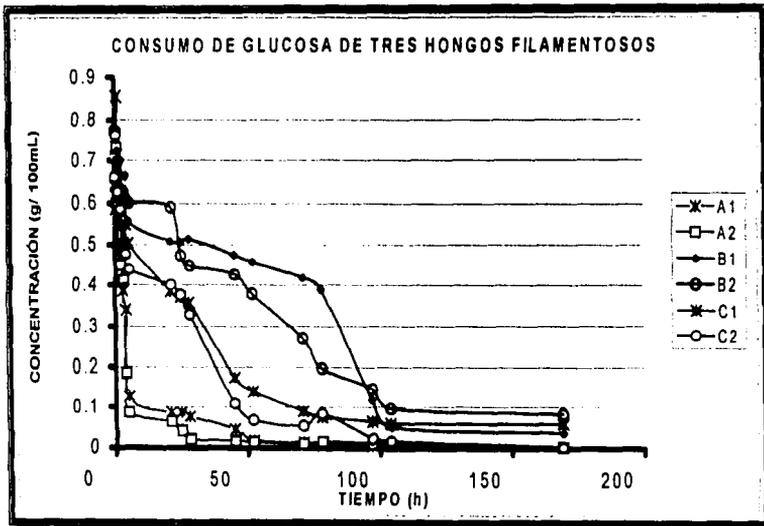
B: *Beauveria bassiana*

C: *Aspergillus ochraceus*

1 y 2 indican que la prueba se realizó por duplicado.

TESTES COM
 PALLA DE CAJEN

Gráfico 3. Consumo de glucosa para tres hongos filamentosos.



A: *Aspergillus niger*

B: *Beauveria bassiana*

C: *Aspergillus ochraceus*

1 y 2 indican que la prueba se realizó por duplicado

2.2 Determinación de consumo de glucosa por el Método de DNS

Fundamento

En solución alcalina caliente la glucosa reduce el ácido dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de color anaranjado rojo. La densidad óptica del color producido es directamente proporcional a la cantidad de cuerpo reducido y a la cantidad de glucosa en solución [103].

El ácido dinitrosalicílico [Summer y col.] es utilizado para la determinación de azúcares reductores y esta formado por ácido dinitrosalicílico, Sal de Rochelle (Tartrato de sodio y potasio), fenol, bisulfito de sodio e hidróxido de sodio. De acuerdo con Summer, la sal de Rochelle se adiciona con el fin de prevenir la acción del oxígeno sobre el reactivo; el fenol y el bisulfito sirven para incrementar la intensidad y estabilidad del color de la solución obtenida durante la reacción. El hidróxido de sodio es necesario para la acción reductora de la glucosa sobre el ácido dinitrosalicílico [104].

Preparación del reactivo de DNS

Disolver las siguientes cantidades por cada 100 mL y en el orden en que se mencionan: 1.4 g de hidróxido de sodio, 0.75 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 21.6 g de la Sal de Rochelle, 0.54 g de fenol y 0.59 g de bisulfito de sodio [104]. Se mezcla hasta la disolución completa y se guarda en un frasco hermético de cristal ámbar protegido de la luz.

Metodología

El sobrenadante obtenido al determinar el peso húmedo, se empleo en esta prueba, se coloco 1 mL de cada muestra en tubos de ensaye de 18 x 150 y se adicionó a cada uno, 1 mL de reactivo de DNS, después se colocaron en agua a ebullición durante 5 minutos, todos al mismo tiempo, incluyendo el blanco, que estaba constituido por 1 mL de agua destilada y 1 mL de reactivo de DNS y el blanco del medio (muestra tomada antes de

inocular). Posteriormente todas las muestras se colocaron (al mismo tiempo) en un baño de agua con hielo durante cinco minutos, se adicionaron 8 mL de agua destilada y se leyó cada una de las muestras en un espectrofotómetro a 558 nm, se hicieron diluciones de las muestras cuando la absorbancia fue mayor a 1. Se construyó un gráfico (*gráfico 3*) de concentración (%) versus tiempo, para determinar el tiempo en el que el sustrato ha sido consumido casi en su totalidad por el microorganismo, *ver tabla 23*.

Curva estándar de glucosa.

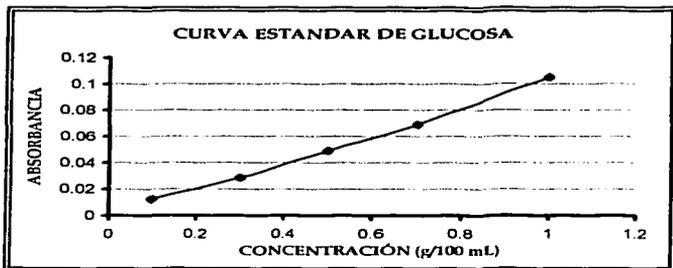
Para la determinación de consumo de sustrato (glucosa), se realizó una curva estándar de glucosa con las siguientes concentraciones: 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 1% (P/V), la determinación se realizó por triplicado, se calculó el coeficiente de correlación (r^2) y a partir de esta curva se interpolaron los datos obtenidos en DNS para determinar la concentración y consumo de glucosa, con respecto a los tiempos de muestreo. La curva patrón (*gráfico 3*) se construye al graficar tiempo *versus* concentración, *ver tabla 24*.

Tabla 24. Datos de la Curva estándar de glucosa para la determinación de consumo de sustrato (Método de DNS).

CONCENTRACIÓN (%)	ABSORBANCIA
0.1	0.0125
0.3	0.0285
0.5	0.049
0.7	0.069
1	0.105

$r^2 = 0.99471549$, $m = 0.10311475$, $b = -0.00081967$

Gráfico 4. Curva estándar de glucosa para la determinación de consumo de sustrato (Método de DNS).



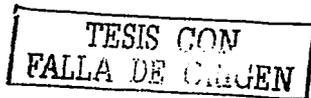
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

140-A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

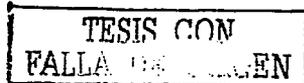
Transformación Química y Biológica de la partenólita — Lactona Sesquiterpénica con esqueleto de Germacrano —

1. Wade, L.G. 1993. *Química Orgánica*. 2a edición. Prentice-Hall Hispanoamericana. México. pp. 1232-1235.
2. Romo de Vivar, A. 1985. *Productos Naturales de la Flora Mexicana*. Editorial Limusa. México. pp. 69-137.
3. Domínguez, X. 1979. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa. México. pp. 93-110.
- 3a. Ruiz, C. A., Cano, F. A. and Delgado, G. 1993. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*. *Phytochemistry*. **33**; 1113-1115.
- 3b. Ruangrunsi, N., Rivepiboon, A., Lange, G.L. and Decicco, C. P. 1988. Constituents of *Paramichelia Baillonii* three new germacránolidas. *J. Nat. Prod.* **51**; 163-167.
- 3c. Tan, R. X., Tang, H. Q., Hu, J. and Shuai, B. 1998. Lignans and sesquiterpene lactones from *Artemisia seversiana* and *Inula racemosa*. *Phytochemistry*. **49**, 157-161.
- 3d. Góiew, N., Tahtasaka, E., Krawiec, M. and Watson, W. 1998. Guaianolides from *Tanacetum argenteum* subsp. canum var. canum. *J. Nat. Prod.* **61**; 560-563.
4. Rodríguez, E., Towers, G. H. and Mitchell, J. C. 1976. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. *Phytochemistry* **15**; 1573-1580.
5. Hertz, W. 1973. *Chemistry in Botanical Classification: Nobel Symposia 25* (Benz, G. and Santesson, J., eds.) Academic Press, New York. pp. 153-173.
6. Yoshioka, H., Mabry, T. J. and Timmermann, B. N. 1973. *Sesquiterpene Lactones: Chemistry, NMR and Plant Distribution*. University of Tokyo Press, Tokyo. pp. 115-148.
7. Fisher, N. H., Wiley, R. A. and Perry, D. L. 1976. *Rev. Latinoamer. Quím.* **8**; 84-96.
8. Geissman T. A. & Crout, D. G. H. 1969. *Organic Chemistry of secondary Plant Metabolism*. Freeman. Cooper & Company. United States of America. pp. 268-287.
9. Kraker, J. W., Franssen, M. C., Groot, A., König, W. A. and Bouwmeester, H. J. 1998. (+)-Germacrane A Biosynthesis. *Plant. Physiol.* **117**; 1381-1392.
10. Zechmerster, L., Fisher, H. D. and Fisher, N.H. 1979. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. **38**; 48-151.
11. Runeckles, V. C. and Mabry, T. J. 1973. *Terpenoids: Structure, Biogenesis and Distribution in Recent Advances in Phytochemistry*. Vol. 6. Academic Press. New York and London. pp. 65-95.



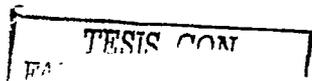
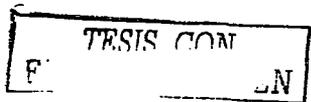
12. Thomson, R. M. 1993. *The Chemistry of Natural Products*. Blackie Academic & Professional. Second edition. Great Britain. pp. 118-123.
13. Robles, M., Aregullin M., West J. and Rodríguez E. 1995. Recent Studies on the Zoopharmacognosy, Pharmacology and neurotoxicology of Sesquiterpene Lactones. *Plant. Med.* **61**; 199-203.
14. Liebert, J.J., Murias, M. and Bloszyk, E. 2000. Effect of Sesquiterpene Lactones on Antioxidant Enzymes and Some Drug-Metabolizing Enzymes in Rat Liver and Kidney. *Plant. Med.* **66**; 199-205.
15. Balderas, L. J. 1996. Químico Farmacéutico Biólogo. *Estudio Químico y Biológico de Artemisa ludoviciana ssp. mexicana*. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México. pp. 15-46.
16. Kelsey, G.R. and Shafizadeh, F. 1983. Canain from *Artemisia cana Pursh ssp. cana*. Crystal Structure and Identification of Chrysartemin A. *J. Org. Chem.* **48**; 125-127.
17. Gordon, L. A. 1999. Compositae Dermatitis. *Australasian Journal of Dermatology* **40**; 123-130.
18. Liebert, J.J., Murias, M. and Blosszyk, E. 1999. Effect of Several Sesquiterpene Lactones on Lipid Peroxidation and Glutathione Level. *Plant. Med.* **65**; 320-324.
19. Hyeon, K. T., Hyung, L. J., Joo, P. Y., Soo, H. Y., Sub, K. H., Won, K. K. and Joon, L. J. 2001. A Sesquiterpene Lactone, Costunolide, from *Magnolia grandiflora* Inhibits NF- κ B by Targeting I κ B Phosphorylation. *Plant. Med.* **67**; 103-107.
20. Jin, L. H., Kyung, J. M., Ja, S. H, Mi, K. K. and Hawn, S. D. 1999. A sesquiterpene, Dehydrocostus Lactone, Inhibits the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and TNF- α in LPS-Activated Macrophages. *Plant. Med.* **65**; 104-108.
21. Rungeler, P., Lyb, G., Castro, V., Mora, G., Pahl, H. L. and Merfort, I. 1998. Study of tree Sesquiterpene Lactones from *Tithonia diversifolia* on their Anti-Inflammatory Activity using the Transcription Factor NF- κ B and Enzymes of the Arachidonic Acid Pathway as Targets. *Plant. Med.* **64**; 588-593.
22. Youl, C. J., Park, J., Sook, Y. E., Baik, K. U., Hyung, J. J., Lee, J. and Hwan, P. M. 1998. Inhibitory Effect of Sesquiterpene Lactones from *Saussurea lappa* on Tumor Necrosis Factor- α Production in Murine Macrophage-Like Cells. *Plant. Med.* **64**; 594-597.
23. Wedge, D. E., Galindo, J. C. G. and Macías, F. A. 2000. Fungicidal activity of natural synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry* **53**; 747-757.

24. Tamaki, H., Robinson, R. W., Anderson, J. L., and Stoewsand, G. S. 1995. Sesquiterpene Lactones in Virus-Resistant Lettuce. *J. Agric. Food Chem.* **43**; 6-8.
25. Fisher, N. H., Weidenhamer, J. D., Riopel, J. L., Quijanos, L., and Menelau, M. A. 1990. Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: A structure-activity study. *Phytochemistry* **29** (8); 2479-2483.
26. Luque, A. P., de., Galindo, J. C. G., Macias, F. A. and Jorrin, J. 2000. Sunflower sesquiterpene lactone models induce Orobanche cumana seed germination. *Phytochemistry* **53**; 45-50.
27. Passreiter, C. M., De Carlo, M. and Steigel, A. 1999. Sesquiterpene Lactone Glycosides from *Arnica longifolia*. *Plant. Med.* **65**; 153-156.
28. Skaltsa, H., Lazari, D., Georgiadou, E., Kakavas, S. and Constantinidis, T. 1999. Sesquiterpene Lactones from Centaurea Species: *C. Thessala* subsp. *drakiensis* and *C. attica* subsp. *attica*. *Plant. Med.* **65**; 393.
29. Yuuya, S., Hagiwara, H., Suzuki, T., Ando, M. and Yamada, A. Guaianolides as Immunomodulators. Synthesis and Biological Activities of Dehydrocostus Lactone, Mokko Lactone, Eremanthin, and Their Derivatives. 1999. *J. Nat. Prod.* **62**; 22-30.
30. Hertz, W. De Groote, R. and Murari, R. 1978. Sesquiterpene Lactones of Eupatorium recurvans. *J. Org. Chem.* **43** (18); 3559-3564.
31. Passreiter, C. M., Medinilla, A. E. 1998. Variability of Sesquiterpene Lactones in *Neurolaena lobata* of Different Origin. *Plant. Med.* **64**; 427-430.
32. Peters, A. M., Haagsma, N., Gensch, K. H. and Amerongen, A. 1996. Production and Characterization of Polyclonal Antibodies against the Bitter Sesquiterpene Lactones of Chicory (*Cichorium intybus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **44**; 3611-3615.
33. Dewanckele, J. M., Zutterman, F. and Vandewalle, M. 1983. Sesquiterpene Lactones. A Total Synthesis of (+/-) Quadrone. *Tetrahedron* **39**; 3235-3244.
34. Beckman, C. A., Wierenga, P. K., Woerdenbag, H. J., Van Uden, W., Pras, N., Konings, A. W., El-Feraly, F. S., Galal, A. M. and Wikstrom, H. V. 1998. Artemisinin-Derived Sesquiterpene lactones as Potential Antitumor Compounds: Cytotoxic Action against Bone Marrow and Tumor Cells. *Plant. Med.* **64**; 615-619.
35. Wiedhopf, M. R., Young, M., Bianchi, E. and Cole, J. R. 1973. Tumor Inhibitory Agent from *Magnolia grandiflora* (Magnoliaceae) I: Parthenolide. *J. Pharm. Sci.* **62**; 345.

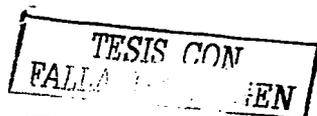


Transformación Química y Biológica de la partenólida — Lactona Sesquiterpénica con esqueleto de Germacrano —

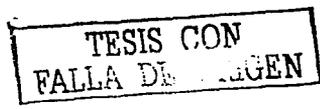
36. Heptinstall, S., Awang, C., Dawson, B. and Kindack, D. 1992. Partenolide Content and Bioactivity of Feverfew (*Tanacetum parthenium* (L.) Shultz-Bip). Estimation of Commercial and Authenticated Feverfew Products. *J. Pharm. Pharmacol.* **44**; 391-395.
37. Ross, J.J., Amason, T. and Birnboim, C.H. 1999. Low Concentrations of the Feverfew Component Parthenolide Inhibit *In Vitro* Growth of Tumor Lines in a Cytostatic Fashion. *Plant. Med.* **65**; 126-129.
38. Cantrell, L. C., Abate, L., Frank, R., Franzblau, S., Quijano, L. and Fisher, H. 1999. Antimicrobial Eudesmanolides from *Inula helenium* and *Rudbeckia subtomentosa*. *Plant. Med.* **65**; 351-355.
39. Maoz, M., Kashman, Y. and Neeman, I. 1999. Isolation and Identification of a New Antifungal Sesquiterpene Lactone from *Inula viscosa*. *Plant. Med.* **65**; 281-282.
40. Roos, G., Prawat, H., Walter, C. U., Klaiber, I., Vogler, B., Guse, J. H. and Kraus, W. 1998. New Sesquiterpene lactones with Antibacterial Activity from *Vernonia fastigiata*. *Plant. Med.* **64**; 673-674.
41. Shi, P. Y., Guo, W. and Jian, J. Z. 1999. Germacranolides from *Carpesium lipskyi*. *Plant. Med.* **65**; 94-96.
42. Barrero, A. F. Ed. All. 1999. Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. *Canescens*. A conformational análisis of the germacrane ring. *Phytochemistry* **51**. 529-541.
43. Barrero, A. F., Oltra, J. E. and Álvarez, M. 1998. Palladium II Promoted Rearrangement of Germacranolides. Synthesis of (+)-Stoebenolide and (+)-Dehydromelitensin. *Tetrahedron Letters* **39**; 1401-1404.
44. Rustaiyan, A. Dabiri, M. and Jakupovic, J. 1986. Germacranolides from *Anvillea garcini*. *Phytochemistry* **25**; 1229-1230.
45. Quijano, L., Ortega, A., Ríos, T. and Romo de Vivar, A. 1975. Elementólidas III Estructura de las Zinaflorinas Nuevas Lactonas Sesquiterpénicas, Aisladas de *Zinnia pauciflora* L. *Rev. Latinoamer. Quím.* **6**; 94-101.
46. Merck. *The Merck Index. Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*. 1996. Merck Research Laboratories Division of Merck & CO. United States of America. pp. 1115.
47. *Dictionary of Organic Compounds*. 1982. Fifth Edition. Vol. Four. Chapman and Hall. United States of America. pp. 4494.



48. Germman, T. A. 1987. *Dictionary of Plant Toxins*. Ed. Freeman, Cooper and Company. United States of America. pp. 167.
49. Govindachari, T. R., Joshi, B. S. and Kamat, V. N. 1965. Structure of Parthenolide. *Tetrahedron* 21; 1509-1519.
50. Bork, P. M., Schmitz, M. L., Kuhnt, M. Escher, C. Heinrich, M. 1997. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants. *FEBS Letters* 402; 85-90.
51. Linares, M. *Selección de Plantas Medicinales de México*. 1996. Editorial Limusa. México. pp. 74.
52. Argueda, V. A., Cano Asselcih, L. M. Rodarte, M. A. 1994. *Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Tomo III. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. pp. 1273-1275.
53. Brown, A. M. G., Edwards, C. M., Davey, M. R., Power, J. B. and Lowe, K. C. 1997. Pharmacological activity of feverfew (*Tanacetum parthenium* (L) Shultz-Bip): assessment by inhibition of human polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence in-vitro. *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 49; 558-561.
54. Hawlett, M. J., Begley, M. J., Groenewegwn, W. A., Heptinstall, S., Knight, D. W., May, J., Salan, U. and Toplis, D. 1996. Sesquiterpene lactones from feverfew, *Tanacetum parthenium*: isolation, structural revision, activity against human blood platelet function and implications for migraine therapy. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* 16; 1979-1986.
55. Macias, F.A., Galindo, J. C. G., Castellano, D. and Velasco, R.F. 1999. Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models (I): *trans,trans*-germacranolides. *J. Agric. Food Chem.* 47; 4407-4414.
56. Fisher, N.H., Lu, TiangSheng., Cantrell, C.L., Castaneda-Acosta, J., Quijano, L. and Franzblau, S.G. 1998. Antimycobacterial evaluation of germacranolides. *Phytochemistry* 49; 559-564.
57. Jain, N.K. and Kulkarni, S.K. 1999. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Tanacetum parthenium* L. extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 68; 251-259.
58. Hendriks, H., Anderson-Wildeboer, Y., Engels, G., Bos, R. and Woerdenbag, H. J. 1997. The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. *Plant. Med.* 63; 356-359.
59. Tournier, H., Shinella, G., Balsa, E. M. de., Buschiazzo, H., Manez, S. and Mordujovich de Buschiazzo, P. 1999. Efecto of the cloroform extract of *Tanacetum*

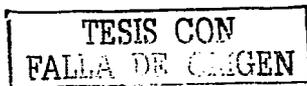


- vulgare and one of its active principles, partenolide, on experimental gastric ulcer in rats. *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 51; 215-219.
60. Romo de Vivar, A. and Jiménez H. 1965. Structure of Santamarine, a New Sesquiterpene Lactone. *Tetrahedron* 21; 1741-1745.
61. Yoshioka, H., Renold, W., Fisher, N. H., Higo, A. and Mabry, T.J. 1970. Sesquiterpene Lactones from *Ambrosia confertiflora* (Compositae). *Phytochemistry* 9; 823-832.
62. Geissman, T.A. and Matsueda, S. 1968. Sesquiterpene Lactones. Constituents of Diploid and Polyploid *Ambrosia dumosa* Gray. *Phytochemistry* 7; 1613-1621
63. Endress, R. 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer – Verlag. Germany. pp. 307-318.
64. Malcom, D. L. 1997. The development of biochemical engineering science in Europe. *Journal of Biotechnology* 59; 11-18.
65. Crueger W. 1996. *Biotechnology Manual de Microbiología Industrial*. Ed. Acribia. España. pp. 234-248.
66. Owen, P. W. 1989. *Biología de la Fermentación*. Ed. Acribia. España. pp. 209.
67. Wiseman, A. 1991. *Manual de Biología de las Enzimas*. Ed. Acribia. pp. 274-313.
68. García-Granados, A. 1994. Biotransformación de Sesquiterpenos y Diterpenos: Una bien Herramienta para la Semisíntesis de Productos Naturales. *Rev. Latinoam. Quím.*, 23; 50-59.
69. Gacesa, P. Hubble, J. 1990. *Tecnología de las enzimas*. Ed. Acribia. España. pp. 86-110.
70. Suga, T. and Hirata, T. 1990. Biotransformation of Exogenous Substrates by Plant Cell Cultures. *Phytochemistry* 29; 2393-2405.
71. García-Granados, A., Martínez, A., Rivas, F., Onorato, M. E. and Arias, J. M. 1991. Chemical-Microbiological Synthesis of 6 β -Eudesmanolides from 11-Hydroxyl Derivates: Synthesis of 6 β -Dendroserins by *Rhizopus nigricans*. *Tetrahedron Letters* 32; 5383-5384.
72. García-Granados, A., Parra, A., Simeó, Y. and Extremera, L. A. 1998. Chemical, Enzymatic and Microbiological Synthesis of 8,12-Eudemanolides: Synthesis of Sivasinolide and Yomogin Analogues. *Tetrahedron* 54; 14421-14436.
73. Cejudo, J. J., García-Granados, A., Parra, A. and Rivas, F. 1992. Partial Síntesis of 6 β -Sesquiterpenolides from 6 α -Sesquiterpenolides. *Tetrahedron Letters* 33; 3935-3938.



74. Cejudo, J. J., García-Granados, A., Parra, A. and Rivas, F. 1994. Partial Synthesis of 6 β -Eudesmanolides and 6 β -Guaianolides from 6 α -Eudesmanolides: Synthesis of Analogues of Artepaulin, Colartin and Tannunolide D. *Tetrahedron*, **50**; 2917-2928.
75. García-Granados, A., Martínez, A., Parra, A., Rivas, F., Onorato, M. E. and Arias, J. M. 1993. Chemical-Microbiological Síntesis of 6 β -Eudesmanolides from 11-Hydroxyl Derivatives obtained by *Rhizopus nigricans* cultures: Synthesis of 6 β -Dendroserins. *Tetrahedron* **49**; 1091-1102.
76. García-Granados, A., Martínez, A., Onorato, M. E., Rivas, F. and Arias, J. M. 1991. Chemical-Microbiological Synthesis of 6 β -Eudesmanolides by *Curvularia lunata* Cultures from Eudesmanes with Functions at C-1 and C-6. *Tetrahedron* **47**; 91-102.
- 76a. Rosazza, J. P. and Sih, C. J. 1976. *Applications of Biochemicals System in Organic Chemistry*. Wiley. New York. pp. 35-105.
- 76b. Arias, J. M., Breton, J. L., Gaven, J. A., García-Granados, A., Martínez, A. and Honorato, M. E. 1987. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*. 471.
77. Hostettmann, K. Hostettmann, M. and Martson, A. 1991. *Modern Phytochemical Methods*. Plenum Press. USA. pp. 1-3
78. Meyer, B., Ferrigni, N., Putman, J., Jacobsen, L., Nicholson, D. and McLaughlin, J. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant. Med.* **45**; 31-34.
79. Perez A. C. 1994. Plantas Medicinales, Etnobotánica y Fitoquímica: Importancia de la Investigación Interdisciplinaria. *Folium*. **7**; 2,3.
80. Gutierrez, L. M. T., Barrientos, B. T., Luna, B., Ramírez G. R. M., Bye R., Linares E. and Mata, R. 1996. Antimicrobial and citotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican Medicinal Plants. *Phytomedicine* **2**; 341-347.
81. Bauer, W. A., Kirby, M. N., Sherris, C. J. and Turck, M. 1966. Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology* **45**; 493-496.
82. Rios, L. J., Recio, M. C., and Villar, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal de ethnopharmacology* **23**; 127-149.
83. Marymont, H. J., and Wentz, M. B. 1996. Serial dilution antibiotic sensitivity testing with the microtiterator system. *The American Journal of Clinical Pathology* **45**; 548-550.

84. Sokomba, E., Wambee, C., Chowdhury, K. B., Iriah, J., Ogbeide, N. O. and Orkot, D. 1986. Preliminary phytochemical, pharmacological and bacterial studies of the alkaloidal extracts of the leaves of *Synclitaea scabrida* miers. *Journal of Ethnopharmacology* **18**; 173-185.
85. Betina, V. 1973. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. Chromatog.* **78**; 41-51.
86. Penzes, L. P. and Coertell, G. W. 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatog.* **51**; 327-329.
87. Lund, B. and Lyon G. 1975. Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *E. herbicola* on thin-layer chromatograms. *J. Chromatog.* **110**; 193-196.
88. Hamburger, O. M. and Cordell, A. G. 1987. A direct bioautographic TLC assay for antimicrobial activity. *J. Nat. Prod.* **50**; 19-22.
89. Lester, A., Mitscher, Ruy-Ping, Mohindar, S. Bathala, Wu-nan Wu and Jack, L. B. 1972. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and methodology. *Lloydia* **35**; 157-166.
90. Kieslich, K. 1976. *Microbial Transformations of Non-steroid Cyclic Compounds*. John Wiley & Sons. Germany. pp. 1-8.
91. Breitmaier, E. 1993. *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry. A Practical Guide*. John Wiley & Sons. Great Britain. pp. 1-95.
92. Ogura, M. et al. 1978. Constituents of *Paramichelia bailloni*. *Phytochemistry*. **17**, 957.
93. Galal, A. M., Ibrahim, A. S., Mossa J. S. and El-Feraly, F. S. Microbial transformation of parthenolide. 1999. *Phytochemistry* **51**; 761-765.
94. Castañeda-Acosta, J. and Fischer, N. K. Biomimetic transformations of parthenolide. 1993. *J. Nat. Prod.* **56**; 90-98.
95. Lina, M. and Rabi, J. A. 1985. *J. Nat. Prod.* **48**, 986.
96. Ruangrunsi, N. Rivepiboon, A. Constituents of *Paramichelia baillonii*: a new antitumor germacranolide alkaloid. 1987. *J. Nat. Prod.* **50**; 891-896.
97. Marles, R. J. Pasos-Sanon, L. et al. *Sesquiterpene Lactones Revisited: Recent Developments in the Assessment of Biological Activities and Estructure relationships*. In *Phytochemistry of Medicinal Plants*. 1995. (Arnason J. T., Mata R. and Romeo J. T. eds). Plenum Press. New York. pp 333-356.



98. Galindo, J. C. G., De Luque, A. P., Jorrín, J. and Macías, F. A. Studies of sesquiterpene lactones as *Orobanche cumana* seed germination stimulants. 2002. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1911-1917.
99. Fisher, N. H., Lu, T., Cantrell, C. L., Castañeda-Acosta, J., Quijano, L. and Franzblau, S. G. Antimicrobial evaluation of germacranolides. 1998. *Phytochemistry*, **49**, 559-564.
100. Lutje, S. J., Rink, R. Kellog, R. M. and Janssen, D. B. Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from *Agrobacter radiobacter*. 1998. *Tetrahedron: Asymmetry* **9**; 459-466.
101. Ruangrunsi, N. Rivepiboon, A. Constituents of *Paramichelia baillonii* three new germacranólidas. 1988. *J. Nat. Prod.* **51**; 163-167.
102. Tan, R. X. Tang, H. Q., Hu, J. and Shuai, B. Lignans and sesquiterpene lactones from *Artemisia sieversiana* and *Inula racemosa*. 1998. *Phytochemistry*, **49**, 157-161.
103. Mahato, S. B. and Garai, S., 1997. Advances in microbial steroid biotransformation *Steroid*, **62**, 332-345.
104. Marco, J. A., Sanz, J. F. and Carda, M. 1992 13C-NMR Spectra of eudesmane derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **30**, 678-685.
105. Barrero, A. F., Oltra, J. E., Raslan, D. and Saúde, D. A. 1999. Microbial transformation of sesquiterpene lactones by the fungi *Cunninghamella echinulata* and *Rhizopus oryzae*. *J. Nat. Prod.* **62**, 726-729.
106. Marco, J. A. Carda, M. 1987. 13C-NMR Spectra of eudesmanolides. I-eudesman 12,6-olides. *Magn. Reson. Chem.* **25**, 628-634 .
- 107.- Galicia, J. N. Espinoza, C. M. Ruiz-Cancino, A., Cano, A. Delgado, G. 2003. *Rev. Soc. quim. Mex.*, en prensa.
- 108.- Barrero, A. F., Oltra, J. E., Morales, V., Alvarez, M. 1997. Biotransformations of lactones sesquiterpénica of *Sideritis Almeriensis*. *J. Nat. Prod.* **60**, 1034-1035.
- 109.- Barrero, A. F., Oltra, J. E. Barragán. 1995. *Tetrahedron Lett*, **36**, 311-314.