



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**EXTRACCIÓN Y MODIFICACIÓN DEL ÁCIDO BETULÍNICO MEDIANTE
PROCESOS DE BIOCONVERSIÓN**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.A. RAÚL HORACIO CAMARILLO LÓPEZ

TUTOR: ARTURO NAVARRO OCAÑA

AÑO:2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Me complace en reconocer y agradecer ampliamente a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Química por la valiosa formación, educación y apoyo recibidos en sus instalaciones.

Agradezco el apoyo recibido por el Dr. Arturo Navarro Ocaña, profesor titular de carrera de TC del departamento de alimentos y biotecnología en la Facultad de Química de la UNAM para la realización de este trabajo de tesis.

Me es grato distinguir la participación del Dr. Gerardo Valerio Alfaro, Jefe de laboratorio de bioprocesos en el Instituto Tecnológico de Veracruz, así mismo reconocer la valiosa cooperación de los profesores titulares de carrera de TC del departamento de alimentos y biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM: Dr. Francisco Ruiz Teran, Dr. Guillermo Aguilar Osorio y la Dra. Hilda Calderón Villagómez, durante la realización de esta investigación.

Deseo expresar mi sentido de gratitud por el apoyo financiero otorgado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) y por la beca CONACYT (223422) de la que goce durante los estudios de maestría.

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Luis Angel Maldonado Graniel	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Agustin López Munguía Canales	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. José Alfredo Vázquez Martínez	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Hortensia Parra Delgado	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dr. José Fausto Rivero Cruz	Facultad de Química, UNAM

Lugar en donde se llevo a cabo el trabajo de tesis:

*Laboratorio 321 del Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Edificio E de la Facultad de Química de la
Universidad Nacional Autónoma de México.*

Sustentante: Q.A. RAÚL HORACIO CAMARILLO LÓPEZ

Director de tesis: Dr. ARTURO NAVARRO OCAÑA

Dedicated to my lovely canadian Hus. *P@ Thompson*.

This achievement is for and because of you. Thx for being part of my life.

תמיד תישאר בלב שלי. תודה על האמונה בי

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo 1 Marco teórico	5
1.1. Terpenos	5
1.1.1. Biosíntesis y diversidad estructural	5
1.1.2. Función biológica	7
1.2. Triterpenos	7
1.3. Acido betulínico	10
1.3.1. Propiedades Físicoquímicas	10
1.3.2. Biosíntesis	11
1.3.3. Distribución en la naturaleza	12
1.3.4. Métodos de obtención	14
1.3.5. Métodos de análisis	17
1.3.6. Propiedades farmacológicas asociadas	19
1.4. Derivados del ácido betulínico	19
1.4.1. Inconvenientes de la síntesis química	25
1.5. Las bioconversiones como alternativa a la síntesis química	28
1.6. Los procesos de bioconversión	29
1.6.1. Características de las bioconversiones	32
1.7. Bioconversión de terpenos	36
1.7.1. Bioconversiones del ácido betulínico	40
Capítulo 2 Objetivos	48
Capítulo 3 Parte experimental	49
3.1. Materiales y métodos	49
3.2. Plan de trabajo	53
3.2.1. Etapa 1. Obtención del ácido betulínico	54
Sección I: Elección de la fuente de extracción	55
Sección II: Extracción a escala preparativa	56
Sección III: Purificación del ácido betulínico	56
3.2.2. Etapa 2. Bioconversión	57
Sección IV: Biocatálisis	58
Sección V: Obtención de células	61
Sección VI: Biotransformación	61
Capítulo 4 Resultados y Discusión	63
Capítulo 5 Conclusiones	76
Capítulo 6 Perspectivas	77
Capítulo 7 Referencias bibliográficas	78
ANEXOS	88

Abreviaciones

AcOEt: Acetato de etilo
APCI: Ionización química a presión atmosférica
BnCl: Cloruro de bencilo
BnBr: Bromuro de bencilo
CCF: Cromatografía en capa fina
CG: Cromatografía de gases
CHCl₃: Cloroformo
CH₂Cl₂: Diclorometano
DAD: Detector de arreglo de diodos
DIBALH: (DIBAH) Hidruro de diisobutilaluminio
DIF: Detector de ionización de flama
DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-eno
DHP: Dihidropirano
DMAP: 4-Dimetilaminopiridina
DMAPP: Dimetil-alil-pirofosfato
DMF: Dimetilformamida
DMSO: Dimetilsulfóxido
DOXP: 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato
IPP: Isopentenil-pirofosfato
EI: Ionización por impacto electrónico
ELSD: Detector evaporativo de dispersión de luz
EM: Espectrometría de masas
EM-EM: Espectrometría de masas en tandem
Et₂O: éter etílico
ESI: Ionización por electrospray
FPP: Farnesil-pirofosfato
GPP: Geranil-pirofosfato
GFPP: Geranil-farnesil-pirofosfato
GGPP: Geranil-geranil-pirofosfato
HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
Hex: Hexano
MALDI-TOF: Desorción/ionización láser asistida por matriz- detector tiempo de vuelo
MeI: Yoduro de metilo
MEP: 2-C-metileritrodil-fosfato
MeOH: Metanol
MVA: Ácido mevalónico
NaBH₄: Borohidruro de sodio

n-BuOH: Butanol
NaClO₂: Clorito de sodio
NaClO: Hipoclorito de sodio
NaCN: Cianuro de sodio
NaH: Hidruro de sodio
NaH₂PO₄: Fosfato monobásico de sodio
PDA: Detector de arreglo de fotodiodos
Py: Piridina
RMN-¹H: Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN-¹³C: Resonancia magnética nuclear de Carbono
RP-HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa
SGL5: Columna cromatográfica apolar
TBDPS: tert-butildifenilsililo
TEMPO: 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo
THF: tetrahidrofurano
TMSCHN₂: trimetilsilildiazometano
UV: Detector de ultravioleta

Índice de Esquemas

Esquema.1. Biosíntesis de terpenos	6
Esquema.2. Diversidad estructural de triterpenos	9
Esquema.3. Ácido- β -betulínico	10
Esquema.4. Biosíntesis del ácido betulínico	11
Esquema.5. Modificaciones al anillo A del ácido betulínico	22
Esquema.6. Modificaciones a las posiciones C-3 y C-28 del ácido betulínico	23-24
Esquema.7a. Introducción de centros quirales	26
Esquema.7.b. Uso de grupos protectores en la síntesis de derivados	27
Esquema.8. Reactividad de mas de un grupo funcional dentro de la molécula	27
Esquema.9. Biotransformación de terpenoides con <i>Nocardia sp.</i> NRRL 5646	36-37
Esquema.10. Biotransformación del ácido betulónico con <i>Nocardia sp.</i> NRRL 5646	37
Esquema.11. Biotransformación del ácido ursólico con <i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	38
Esquema.12. Biotransformación de ácido oleanólico por <i>Cunninghamella blakesleena</i>	38
Esquema.13. Ruta sintética propuesta para la transformación del ácido oleanólico al compuesto LXXXVIII por chaetumium longirstone	39
Esquema.14. Biotransformaciones del ácido betulínico	41
Esquema.15. Biotransformaciones de betulina por <i>A. foetidus</i> y <i>A. oryzane</i>	42
Esquema.16. Biotransformaciones del ácido betulónico con hongos	42
Esquema.17. Biotransformaciones del ácido betulínico con <i>Bacillus megaterium</i>	43
Esquema.18. Esterificación enzimática del ácido betulínico	45
Esquema.19. Síntesis enzimática del ácido 3-benzoilbetulínico	46
Esquema.20. Síntesis enzimática del éster 3 β -hidroxi-lup-20(29)-ene-28-decanoato	46
Esquema.21. Síntesis enzimática del ácido 3-ftalil-betulínico	47
Esquema.22. Estrategia general de trabajo	53
Esquema.23. Etapa 1. Obtención de ácido betulínico	54
Esquema.24. Etapa 2. Bioconversión del ácido betulínico	57
Esquema.25. Síntesis química de ésteres (C-3) del ácido betulínico	58
Esquema.26. Síntesis química de ésteres (C-28) del ácido betulínico	59
Esquema.27. Identificación de ácido betulínico por CCF	64
Esquema.28. Cromatogramas comparativos por HPLC para la cuantificación del AB	67
Esquema.29. Biotransformación del ácido betulínico con celulas en crecimiento	75
Esquema.30. Biotransformación con células en crecimiento de cepa 1 y 3112	75

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Métodos de análisis de ácido betulínico y otros triterpenos relacionados	18
Cuadro 2. Derivados bifuncionales y/o glicosidados del ácido betulínico	21
Cuadro 3. Bioconversiones industriales relevantes	29
Cuadro 4. Ejemplos de procesos biocatalíticos a gran escala	30
Cuadro 5. Principales clases de enzimas	32
Cuadro 6. Criterios de selección de un catalizador	34
Cuadro 7. Biotransformaciones de terpenos	44-45
Cuadro 8. Reactivos utilizados	49
Cuadro 9. Equipos	50
Cuadro 10. Material biológico (Árboles)	50
Cuadro 11. Material biológico (Células microbianas)	51
Cuadro 12. Material biológico (Enzimas comerciales)	51
Cuadro 13. Reacciones de biocatálisis del ácido betulínico	60
Cuadro 14. Biocatálisis del ácido betulínico	66
Cuadro 15. Datos espectroscópicos del ácido betulínico aislado de <i>P. mexicana</i>	69-70
Cuadro 16. Ensayos de biotransformación del ácido betulínico	73

RESUMEN

La síntesis de los derivados del ácido betulínico (**ácido 3 β -hidroxi-lup-20(9)-en-28-oico**) ha llegado a ser una herramienta útil para el desarrollo de compuestos con actividad farmacológica contra el cáncer y el VIH, sin embargo, los procesos químicos en ocasiones enfrentan inconvenientes (procedimientos complicados y costosos) y su desarrollo se ha visto limitado a la presencia de posiciones activadas dentro de la molécula. Los procesos biotecnológicos han sido considerados como alternativas importantes para la obtención de un gran número de materiales especializados gracias a su versatilidad y eficiencia mostrada durante las últimas décadas.

En este trabajo se presentan los resultados del estudio de una metodología biotecnológica alterna a los procedimientos químicos para la obtención de derivados del ácido betulínico. Nuestra propuesta se divide en dos etapas: 1) la obtención, a escala preparativa, de la materia prima a partir de fuentes renovables y 2) la evaluación de la capacidad que tienen las enzimas y los cultivos celulares de diferentes especies para llevar a cabo modificaciones estructurales a la molécula del ácido betulínico.

Se determinó la concentración de ácido betulínico contenida en los extractos etanólicos de cuatro especies de árboles mexicanos por HPLC y se determinó que la corteza de *Platanus mexicana* es la fuente más apropiada para su extracción por su alto contenido (1.5-2.7%) de este triterpeno. Su extracción con una disolución al uno por ciento de ácido acético en acetato de etilo permitió obtener un extracto crudo que fue purificado por cromatografía en columna y recristalizado de MeOH caliente, logrando obtener 1.42 g de ácido betulínico por cada 100 gramos de materia seca. Análisis posteriores (p.f., HPLC, RMN-¹H y RMN-¹³C) de la muestra permitieron confirmar su identidad y pureza.

Se preparó químicamente el éster metílico, el acetato y el octanoato del ácido betulínico para dar seguimiento por CCF a las reacciones enzimáticas evaluadas con siete enzimas comerciales (PSL, CRL, ECL, ArEst, CCL-IV, RM-IM y CAL-B) para modificar la estructura del ácido betulínico, encontrándose que bajo las condiciones descritas, las enzimas **CAL-B** y **ECL** son capaces de esterificar tanto el grupo hidroxilo en C-3 como el carboxílico en C-28 formando el octanoato y el acetato del ácido betulínico.

Finalmente, se evaluó la capacidad de los cultivos celulares tanto del hongo *Aspergillus sp.* como de los microorganismos aislados de la corteza de *P. mexicana* para llevar a cabo modificaciones estructurales del ácido betulínico, encontrando que bajo las condiciones evaluadas, los sistemas celulares parecen estar catalizando una gran variedad de reacciones químicas de acuerdo a lo observado por las placas de CCF. Sin embargo no se cuenta con la identificación y aislamiento de los productos resultantes de las reacciones evaluadas.

ABSTRACT

The synthesis of betulinic acid derivatives (acid 3 β -hydroxy-lup-20 (9)-en-28-oic acid) has become a useful tool for the development of pharmacologically active compounds for cancer and HIV, However, chemical processes sometimes face difficulties (complicated and costly procedures) and its development has been limited to an activated positions within the molecule. Biotechnological processes have been considered as important alternatives for obtaining a large number of specialized materials due to its versatility and efficiency shown in recent decades.

This paper presents the results of a biotechnological approach to chemical alternative for obtaining betulinic acid derivatives. Our proposal is divided into two stages: 1) obtaining in a preparative scale, the raw material from renewable sources and 2) assessing the ability of enzymes and cell cultures of different species to carry out structural modifications of the betulinic acid molecule.

We determined the concentration of betulinic acid contained in ethanol extracts of four Mexican tree species by HPLC and determined that the bark of *Platanus mexicana* is the most appropriate source of this terpene due to its high content (1.5-2.7%). Its extraction with a solution of acetic acid in ethyl acetate yielded a crude extract that was purified by column chromatography and recrystallized from hot MeOH, obtaining 1.42 g of betulinic acid per 100 grams of dry matter. Further analysis (mp, HPLC, NMR-1H and 13C NMR) of the sample confirmed its identity and purity.

We synthesized three derivatives (methyl ester of betulinic acid, acetate and octanoate ester of betulinic acid) which served as standards to monitor by TLC the enzymatic reactions tested with seven commercial enzymes (PSL, CRL, ECL, ArtEst, CCL-IV, RM-IM and CAL-B) to modify the structure of betulinic acid, finding that under the conditions described, enzyme CAL-B and ECL are able to modify the hydroxyl group at C-3 and the carboxylic group at C-28 of the betulinic acid .

Finally, we evaluated the ability of both cell cultures of the fungus *Aspergillus sp.* and organisms isolated from the bark of *P. mexicana* to carry out structural modifications of betulinic acid, finding that under the conditions tested, whole-cell cultures are able to modify the chemical structure of betulinic acid.

INTRODUCCIÓN

El aislamiento y caracterización estructural de productos naturales ha inspirado el desarrollo de la química orgánica, logrando diversos avances en las metodologías sintéticas. Adicionalmente, las ventajas que ofrecen las técnicas de fraccionamiento y las herramientas analíticas con las que se cuenta hoy en día, han hecho que la comunidad científica se interese ampliamente por la diversidad química y estructural de los productos naturales permitiendo obtener sustancias que por su actividad biológica son utilizadas a diario por el ser humano (Bulter, 2008; Harvey 2008; Newman, 2007). Ejemplo de ello, son los triterpenos pentacíclicos (ampliamente distribuidos en la naturaleza) cuyas propiedades farmacológicas (anti-inflamatorias, anti-bacteriales, anti-virales, hepatoprotectoras, anti-tumorales, anti-oxidantes, etc.) son bien conocidas desde hace bastante tiempo, siendo de las más importantes la actividad anti-melanoma y anti HIV (Einznhamer, 2005; Tolstikova, 2005).

Numerosos investigadores han tratado de incrementar y/o mejorar las propiedades farmacocinéticas, potenciar las propiedades farmacológicas o disminuir los efectos secundarios que presentan los triterpenos pentacíclicos mediante la formación de sus derivados (Aiken, 2005; Gagnon, 2004; Giri 2001; Ghaffari, 2010; Jager, 2009). Sin embargo, a nivel industrial algunos de estos procesos pueden resultar complicados y costosos, por lo que la biotecnología se presenta como una alternativa que ofrece posibilidades de desarrollo de nuevos procesos que cumplan con ciertas exigencias que la industria requiere; como son, procesos compatibles con el medio ambiente, económicamente atractivos y de corta duración a través de los procesos conocidos como bioconversiones (Ayala, 2008; Woodley, 2008).

Una bioconversión se define como cualquier cambio estructural de un compuesto exógeno utilizando metodologías biológicas (biotransformación o biocatálisis) realizado por organismos superiores, microorganismos, plantas, algas, organelos, enzimas o células aisladas. En una biocatálisis se utilizan enzimas aisladas en su estado libre o inmovilizadas, mientras que en una biotransformación usualmente se utilizan células completas. Para evitar confusiones debidas a la terminología utilizada en la literatura, es necesario aclarar que en una biotransformación existen solo uno o dos pasos catalíticos entre el sustrato y el producto, mientras que en una fermentación existen varios pasos catalíticos entre ellos. Adicionalmente, en una biotransformación la estructura química del sustrato y el producto son muy parecidas, mientras que en una fermentación esto no es necesariamente cierto (Leresche, 2006; Schulze, 1999).

Dada la importancia que tiene el ácido betulínico, el interés por la preparación de sus derivados se ha incrementado recientemente, sin embargo, los procesos químicos para su obtención se han visto limitados a las posiciones C-3 y C-28 activadas de la molécula (Bastos, 2007). Adicionalmente, algunos procesos como la esterificación del ácido betulínico en medio ácido o básico, regularmente resultan en una mezcla compleja, derivada del uso de altas temperaturas y de disolventes potencialmente tóxicos que pueden permanecer como trazas en los productos, volviéndose necesaria la aplicación de métodos difíciles y caros para su purificación (Ghaffari, 2010). En este sentido, los procesos microbianos han sido utilizados con la finalidad de funcionalizar posiciones de la molécula difíciles de concretarse mediante procesos químicos (Bastos, 2007) y por otro lado, el uso de los procesos enzimáticos ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para la producción de compuestos valiosos (Ghaffari, 2010).

No obstante, los avances que se han logrado en el campo de la biotecnología y la importancia que estas metodologías han adquirido, la falta de protocolos que describan la obtención de derivados del ácido betulínico mediante este tipo de tecnología se ha visto limitada a muy pocos trabajos. La presente investigación pretende contribuir con el desarrollo de metodologías de bioconversión que puedan ser utilizadas para la obtención de derivados del ácido betulínico.

CAPITULO 1 MARCO TEÓRICO

1.1. Terpenos

El término terpeno tiene su origen en la turpentina (lat. *Balsamun terebinthinae*), conocida como resina de árboles de pino, que no es otra cosa mas que un bálsamo aromático y viscoso que fluye después de realizar un corte o daño a la corteza de varios árboles de la especie *Pinaceae* y que contiene resinas ácidas e hidrocarburos a los cuales originalmente se les nombró como terpenos.

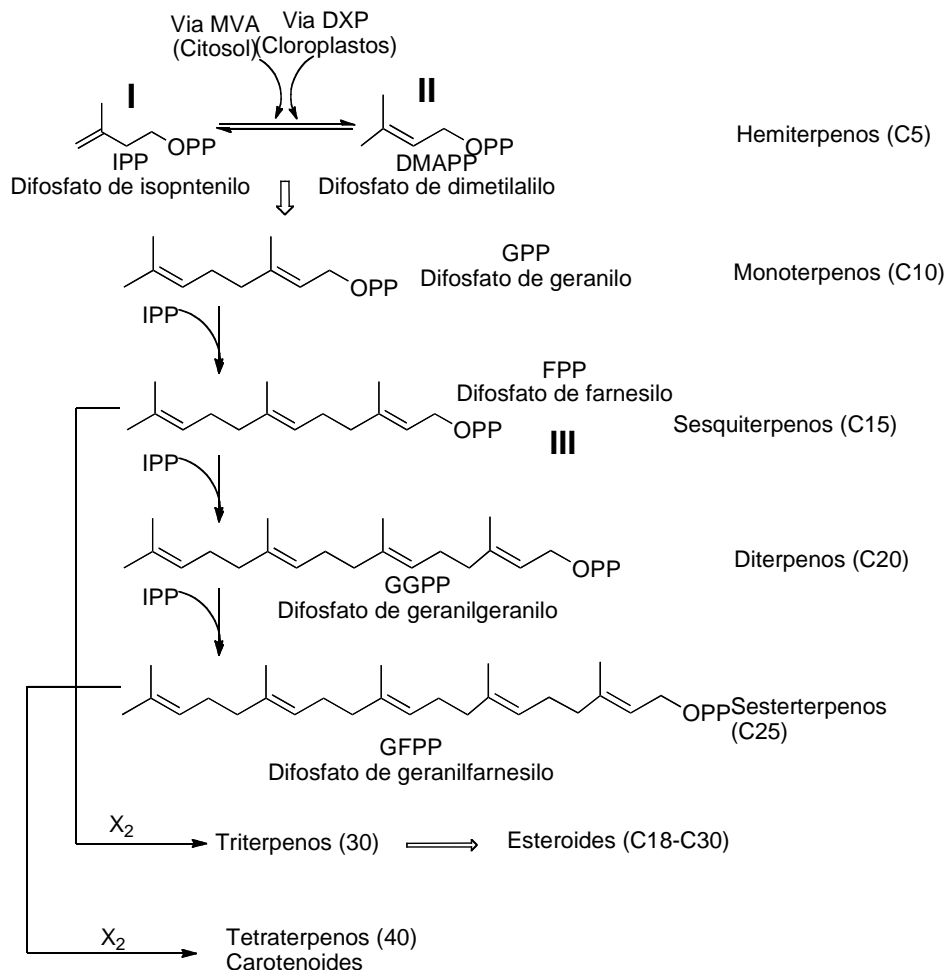
Químicamente, los terpenos forman parte de una familia estructuralmente diversa de sustancias naturales, producidos particularmente por plantas coníferas, aunque algunos insectos también los producen y se pueden obtener de forma sintética. Cuando los terpenos son modificados químicamente, ya sea por oxidación o reorganización del esqueleto hidrocarbonado, los productos resultantes son referidos generalmente como terpenoides. En la naturaleza, los terpenoides se encuentran predominantemente como hidrocarburos, alcoholes y sus derivados glicosidados, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y éteres.

La estructura básica de estos compuestos sigue un principio general establecido por Leopold Ruzicka (1887-1976) conocido como la regla del isopreno, quien observó repetidas unidades de 2-metilbutano (poco preciso pero usualmente conocido como isopreno) dentro de la estructura de estos compuestos unidos en una forma elegantemente llamada “cabeza-cola”. La parte isopropil del 2-metilbutano es conocida como la cabeza y al residuo etílico como la cola. Dependiendo del número de subunidades de isopreno, estos se pueden clasificar como hemi-(C5), mono-(C10), sesqui-(C15), di-(C20), sester-(C25), tri-(C30), tetra-(C40) y poliprenos (C5)_n (Breitmaier, 2006).

1.1.1. Diversidad estructural

Según reportes de Sacchetti, hasta 1997 más de 23,000 isoprenoides habían sido identificados en la naturaleza, sin embargo hoy en día estimaciones conservadoras sugieren que existen al menos 40,000 terpenoides diferentes, formando la mas larga clase de metabolitos provenientes del reino animal y vegetal. La diversidad estructural y química que se encuentra en ellos, es probablemente una reflexión de sus múltiples actividades biológicas en la naturaleza, recurso que ha sido ampliamente utilizado por el hombre para la obtención de ciertos fármacos, fragancias, sabores, suplementos alimenticios, pesticidas y otros insumos de interés para la industria química (Bohlmann, 2008).

La formación de los precursores IPP (**I**) y DMAPP (**II**) es el punto clave para la biosíntesis de la de los terpenos (**Esquema 1**). Tales precursores derivan de dos vías metabólicas cuyos nombres deben su origen a los intermediarios identificados en ellas; la ruta del ácido mevalónico (MVA) y la ruta del 2-C-metileritrodiol fosfato (MEP) también conocida como la ruta de la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DOXP). Los animales, al parecer, carecen de la ruta MEP así que utilizan la del MVA exclusivamente; muchos otros organismos, incluyendo las plantas, tienen la capacidad de emplear ambas. En las plantas, las dos rutas parecen estar compartimentalizadas, ya que las enzimas involucradas en la ruta MVA se encuentran en el citosol, mientras que las enzimas de la ruta MEP se encuentran en los cloroplastos. Los sesquiterpenos, triterpenos y esteroides son formados por la ruta MVA, mientras que otros terpenoides (mono-, di-, tetraterpenos) y carotenoides se forman en los cloroplastos y son derivados de la ruta MEP. Existen por supuesto a esta generalización excepciones y también existen ejemplos donde las dos rutas metabólicas pueden verse involucradas en la síntesis de diferentes partes de una molécula (Dewick P., 2009).



Esquema 1. Biosíntesis de terpenos (Dewick P., 2009)

1.1.2. Función biológica

Los isoprenoides y sus derivados juegan un papel clave en todos los aspectos de la vida. El papel que tienen en la defensa y resistencia a enfermedades es especialmente relevante en plantas leñosas. A pesar de que su bioquímica y la movilización de estas sustancias en las especies madereras es escasamente comprendido, es bastante claro que estos procesos son de central importancia en las interacciones ecológicas con sus parásitos y depredadores asociados. Su acumulación en los órganos de todas las plantas en gran variedad de formas físicas (aceites, resinas, gomas, látex y ceras) puede ser el resultado de los procesos fisiológicos normales o la respuesta a los procesos de corte o infección por otros organismos (Croteau, 1985).

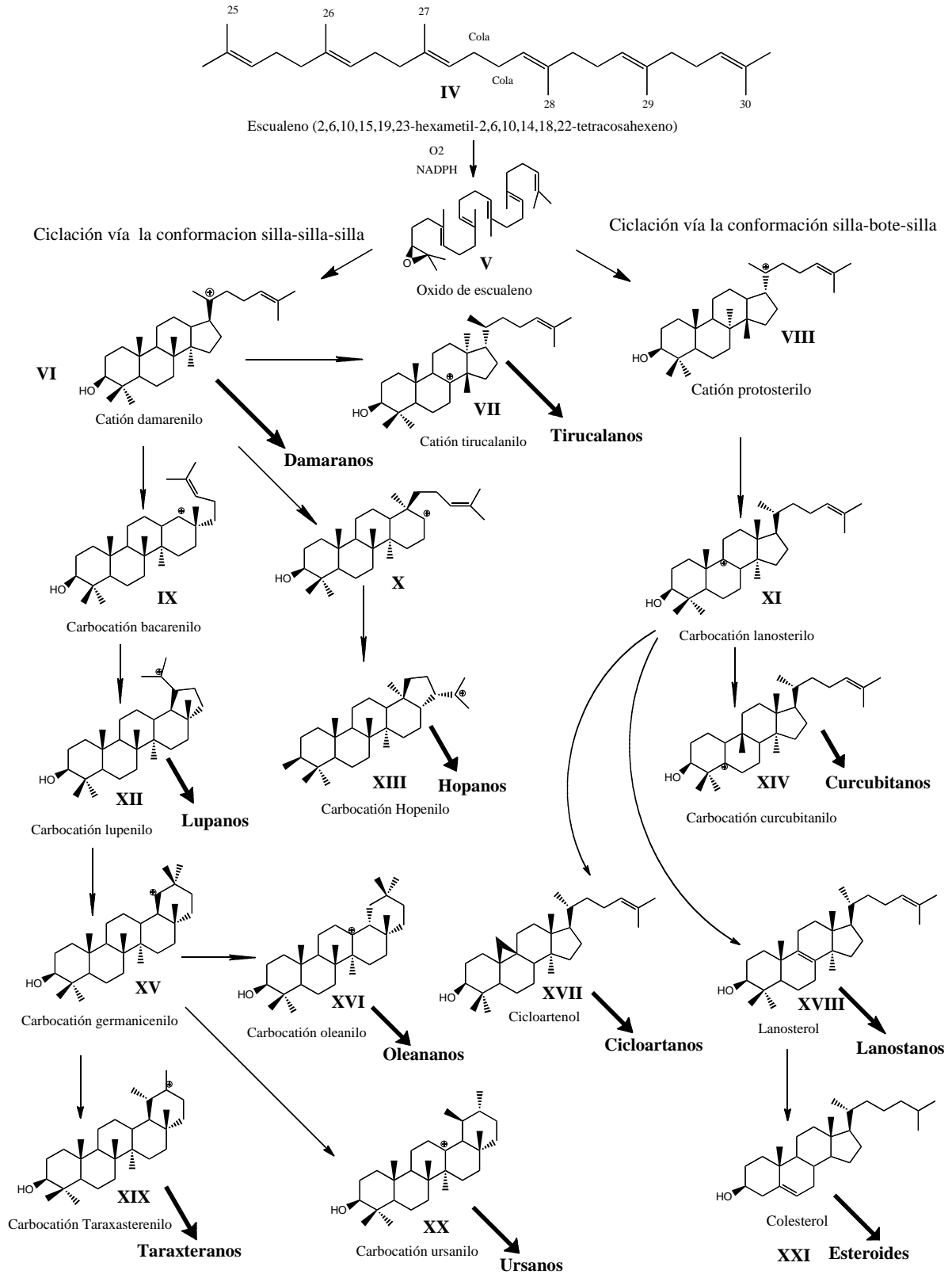
Algunas de sus funciones fisiológicas, metabólicas y estructurales incluyen entre otras; regulación de la expresión genética, constituyentes de membranas, vitaminas, agentes microbianos, feromonas, hormonas reproductivas (Holstein, 2004), captación de la luz en los procesos fotosintéticos, participación en los procesos de defensa, simbiosis y reproducción relacionados con las interacciones tróficas que tienen las plantas con otros organismos actuando como repelentes, atractores, anti-depredadores, toxinas o antibióticos (Gershenzon, 2007). Algunos de estos terpenoides especializados poseen distintos patrones de distribución taxonómica, por lo que ciertos compuestos o grupos de ellos pueden ser encontrados solo en algunas especies de plantas o familias (Bohlmann, 2008).

1.2. Triterpenos.

Los triterpenos son una familia de terpenos que contienen 30 átomos de carbono (procedentes de la incorporación biosintética de seis unidades de isoprenilo (III)) ampliamente distribuidos en la naturaleza y se les puede encontrar ya sea en su estado libre o como glicósidos (saponinas) unidos a diferentes azúcares (Romo, 2006) o como ceras con el grupo 3-hidroxilo esterificado con ácidos grasos (Cert, 1999). Sintetizados en plásticos llamados secretoplastos son transportados a la membrana celular vía el retículo endoplasmático. Existen tres clases principales estructurales de los triterpenos no esteroideos: el grupo tetracíclico, el grupo pentacíclico y las seco-lactonas (Croteau, 1985). La presencia de estos triterpenos es habitual en plantas superiores, pero aparecen también en animales superiores, en hongos y bacterias (Rosellón, 2005).

Se han descrito más de 40 triterpenos cíclicos con fórmula $C_{30}H_{50}$, y alrededor de 150 con fórmula $C_{30}H_{50}O$, además de numerosos compuestos relacionados (Rosellón, 2005) y se piensa que la mayoría tienen su origen biosintético (**Esquema 2**) a partir de la ciclación enzimática del escualeno (**IV**) mediada por la formación del 2,3-óxido de escualeno (**V**) y la adecuada posición que toma sobre la superficie de la enzima, desencadenando una serie de ciclaciones mediadas por carbocarbonos intermedios seguida por una secuencia de migraciones concertadas de Wagner-Meerwein que dan lugar a la formación de nuevos carbocarbonos que finalmente, son neutralizados por eliminación de un protón resultando en la generación de un doble enlace o anillo de ciclopropano, o por la reacción con agua formando un grupo hidroxilo. El tipo de ciclase involucrada en las reacciones de ciclación determina fundamentalmente el tipo de esqueleto que se ha de formar (Vincken, 2007) dando así origen a una gran variedad de triterpenos policíclicos (Dewick, 2009). La biogénesis de las saponinas triterpénicas involucra una serie de modificaciones posteriores (oxidaciones, sustituciones y adición de azúcares en diferentes posiciones) a los esqueletos triterpénicos formados, sin embargo aún no se comprenden con certeza pues poco se sabe sobre las enzimas involucradas en dicho proceso (Haralampidis, 2002).

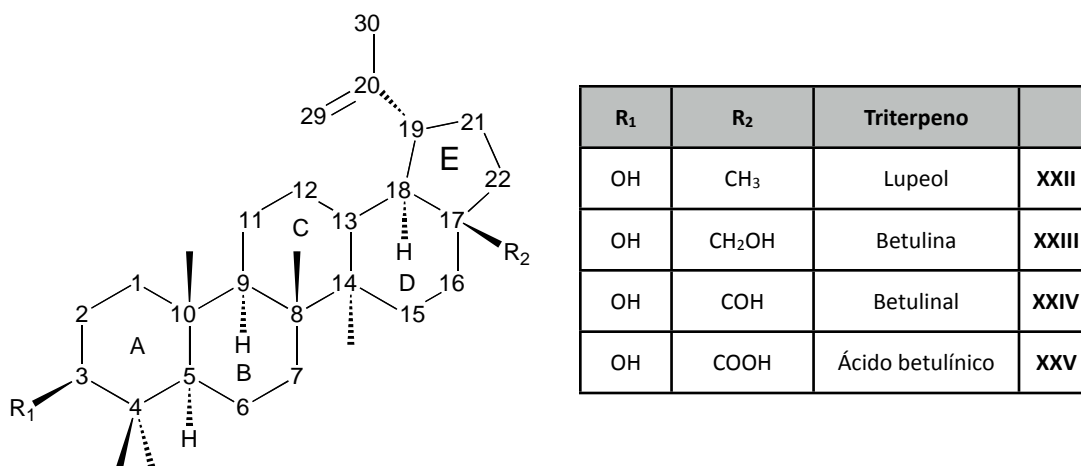
Cerca de 5000 triterpenos naturales se encuentran documentados en la literatura y se han propuesto diversos métodos para su clasificación, entre los que destaca el que los divide por familias considerando el número de anillos que los conforman (acíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos) y dentro de estas familias, se encuentran subclasificados por grupos (α -amirina, β -amirina, lupeol, etc.) (Breitmaier, 2006).



Esquema 2 Diversidad estructural de triterpenos (Vincken, 2007)

1.3. Ácido Betulínico

El ácido betulínico (ácido 3 β -hidroxi-lup-20(9)-en-28-oico) es un triterpeno pentacíclico perteneciente a la familia de los lupanos, el cual está formado por cuatro ciclos de seis átomos de carbono (A, B, C, D) y otro más de cinco átomos de carbono (E) (Gagnon, 2004). Fue aislado por primera vez en Londres (1984) por el científico Brucker a partir de la corteza del árbol de plátano (*Platanus acerifolia*). Sin embargo, se sabía que el ácido betulínico (**XXV**) derivaba de la betulina (también conocida como betulinol), la cual fue aislada por Lowits en 1788 de la corteza de abedul blanco (*Betula alba*) por sublimación de esta. La elucidación estructural de la betulina (**XXIII**) y sus derivados fue hecha por primera vez por Ruzicka en el año de 1941, hecho que permitió determinar que la configuración tridimensional del ácido betulínico (**Esquema 3**) muestra una serie de ciclos orientados en un mismo plano con 4 metilos y un ácido carboxílico en posición axial, mientras que el isopropileno, el alcohol en posición 3 y un metilo en posición 4 se encuentran de forma ecuatorial (Lavoie, 2001).



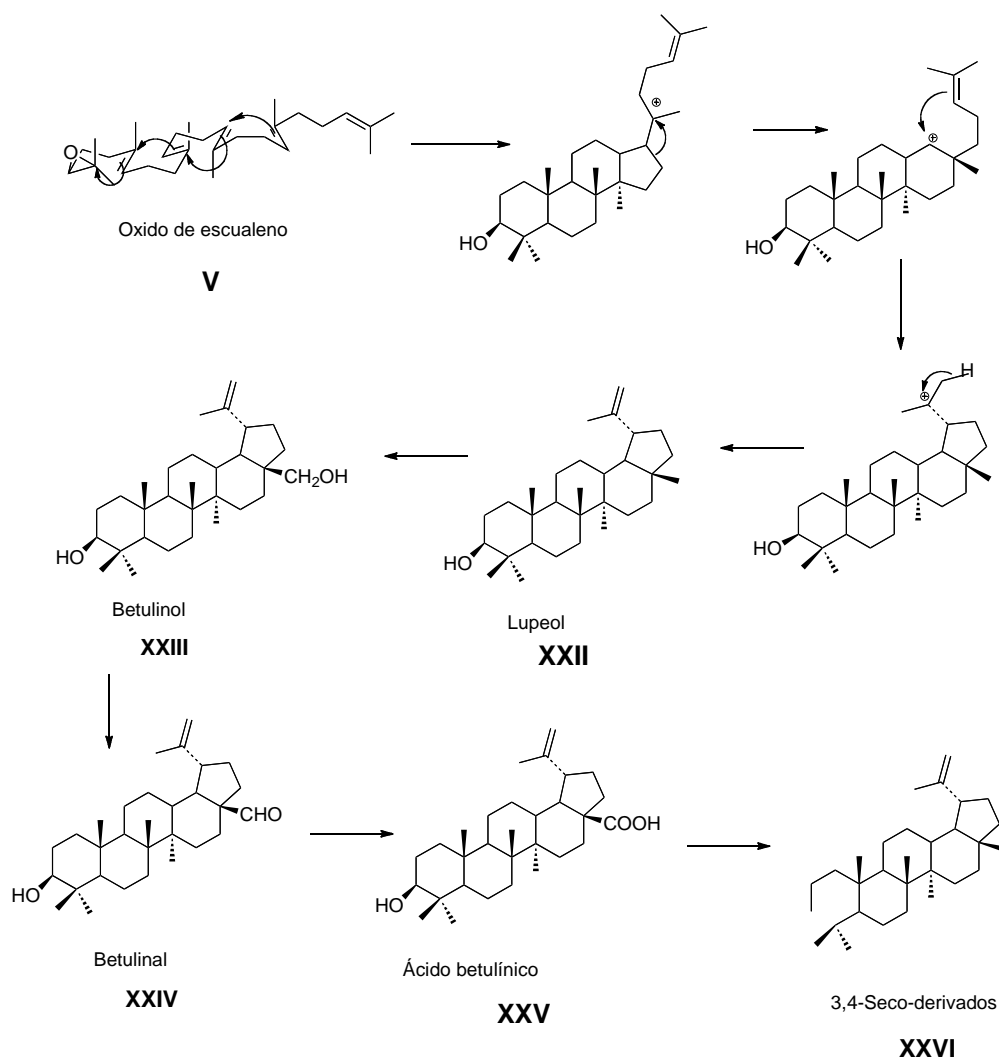
Esquema 3. Ácido 3- β -betulínico

1.3.1. Propiedades fisicoquímicas

El ácido betulínico (**XXV**) es un compuesto de fórmula condensada C₃₀H₄₈O₃ y de masa molecular de 456.71 g/mol, que al ser recristalizado de disolventes como metanol o etanol forma cristales blancos bien definidos en forma de agujas, sin embargo cuando se utiliza cloroformo, diclorometano o hexano se forman polvos blancos. Es altamente soluble en benceno y piridina, soluble en acetato de etilo, metanol, etanol, de mediana solubilidad en diclorometano o cloroformo y de solubilidad limitada en agua (Merck, 2005). Su punto de fusión oscila alrededor de los 300 °C. Estas y otras propiedades fisicoquímicas han sido ampliamente informadas por diversos autores (Abyshv, 2007, Flekhter, 2004, Peng, 1998).

1.3.2. Biosíntesis

Sus características estructurales son el resultado de los mecanismos biosintéticos de esta familia de terpenos mediada por la enzima ciclasa lupeol-sintasa, responsable de la síntesis de triterpenos como la betulina (**XXIII**) y el ácido betulínico (**XXV**) (Ayashi, 2004). Una vez formado el esqueleto de lupano, la reacción termina con la eliminación de un protón, creando el doble enlace del grupo isopropileno; de esta forma se sintetiza el lupeol (**XXII**). Oxidaciones sucesivas en la posición 28 conducen a la formación de la betulina (**XXIII**), después al betulinal (**XXIV**) y finalmente al ácido betulínico (**Esquema 4**). De igual forma, el esqueleto de tipo lupano puede sufrir modificaciones (**Esquema 2**) para formar los esqueletos de otras familias como los oleananos o los ursanos (Lavoie, 2001) o bien sufrir la ruptura de uno de sus anillos (**Figura 4**) formando 3,4-seco-derivados (**XXVI**) (Vincken, 2007).



Esquema 4. Biosíntesis del ácido betulínico.

1.3.3. Distribución en la naturaleza

Este tipo de triterpenos se encuentran muy a menudo en plantas superiores y probablemente sirve como barrera hidrofóbica y antibiótica (Ayashi, 2004). El Instituto Nacional de Cancerología de los Estados Unidos lo ha encontrado en varias plantas provenientes de un cribado de 2500 extractos. Algunas de las principales especies reportadas son; *Tryphyllum peltatum*, *Ancistrocladus heyneus*, *Diospyros leucomelas*, *Tetracera boliviana*, *Zizyphus joazeiro*, *Z. mauritania*, *Syzygium fornosum* (Baglin, 2003).

Investigaciones hechas en 1956 por el Instituto de Química de la UNAM, en conjunto con la Universidad de Wayne a cargo del Dr. Djerassi muestran la gran variedad de fuentes de ácido betulínico (**XXV**) en plantas mexicanas, entre las que destacan las cactáceas *Lemaireocereus*, *Trichocereus* y *Escontria chiotilla*. Posteriormente, en el año de 1974, Pavanasasiva informó de la presencia de ácido betulínico en diversas plantas pertenecientes a la familia *Dilleniaceae* entre las que destacan las siguientes; *Apocynaceae* (0.8%), *Akaniaceae* (0.02%), *Avicenniaceae* (0.3%), *Balanopaceae* (0.009%), *Betulaceae* (0.21%), *Cactaceae* (2%), *Cornaceae* (2%), *Dilleniaceae* (0.75%), *Dipterocarpaceae* (0.014%), *Ebenaceae* (2%), *Ericaceae* (2%), *Flacourtiaceae* (0.006%), *Gentianaceae* (0.1%), *Guttiferaceae* (0.01%), *Labiatae* (0.01%), *Loranthaceae* (1.7%), *Myrtaceae* (1.2%), *Platanaceae*, (1.8%), *Rhamnaceae* (0.02%), *Sapotaceae* (0.03%), *Scophulariaceae* (0.25%), *Terstroemiaceae* (2%), *Theaceae* (1.8%), *Verbenaceae* (1%) (Pavanasasiva, 1974). Más tarde, en 1980, un estudio hecho por Geevananda sobre 44 especies de plantas endémicas de Sri Lanka pertenecientes a la familia de las *Dipterocarpaceae*, confirmó por un análisis en CCF, la presencia del ácido betulínico en esta familia.

Los estudios hechos hasta 1999 sobre la presencia del ácido betulínico (**XXV**) han sido en su mayoría sobre corteza de árboles que no se encuentran fácilmente en Europa, motivo por el cual Galgon (1999) cuantificó el ácido betulínico (**XXV**) en la corteza de *Platanus acerifolia*, árbol ampliamente distribuido en ese continente, encontrando un alto contenido de este triterpeno (3.4%). Adicionalmente, cantidades considerables de este compuesto (hasta 2.5%) se encuentran disponibles en la corteza exterior de una gran variedad de especies de árboles con importancia para la industria maderera (Yogeeswari, 2005).

Así mismo, diversos estudios también del Instituto de Química de la UNAM, determinaron que en el extracto clorofórmico de *Salvia mexicana* (*Labiatae*) se encontraba presente el alcohol betulínico (**XXV**). De *Salvia nicolsoniana*, originaria de la Sierra Madre del Sur (Guerrero), se encontraron los ácidos ursólico, oleanólico y betulínico (**XXV**). El género *Lepechinia glomerata* resultó ser una fuente de ácido betulínico (**XXV**) al igual que la Salvia blanca (*Hyptis albida*) originaria de la cuenca del río Balsas en Michoacán (Romo, 2006).

Los triterpenos ácidos (Betulínico (**XXV**), oleanólico y ursólico) se pueden encontrar frecuentemente como constituyentes de varias plantas, llegando a concentraciones de hasta 2-3%. Un análisis sobre 39 especies de plantas demuestra la presencia de triterpenos pentacíclicos, donde el ácido betulínico (**XXV**) se encuentra en concentraciones del 0.02-2.44 g/100 g de materia seca, siendo *Platanus acerifolia* la especie con mayor contenido (2.44 %) llegando hasta 3.3 % de acuerdo con lo informado por Galgon (1999). La familia *Lamiaceae* es especialmente rica en ácido ursólico, oleanólico y betulínico (**XXV**), llegando a una concentración máxima en las hojas de romero. Einzhamer (2004) señala que la concentración del ácido betulínico (**XXV**) en hojas de romero es del 8.6%, aunque esto no es mencionado en los artículos que él cita (Abe F., 2002). Por su parte, Razbrorsek (2008) encontró un 0.6% de ácido betulínico (**XXV**) en las hojas de romero (Jager, 2009).

La corteza de abedul parece ser la fuente mas apropiada, industrial y económicamente, para la obtención de ácido betulínico (**XXV**) y de productos semi-sintéticos derivados de entre otras fuentes posibles ya informadas (Krasutsky, 2006). Las familias *Betulacea*, *Ebenacea* y *Peoniacea*, son consideradas como la fuente más confiable de este compuesto. Los extractos de la corteza de abedul (género *Betula*) contienen una mezcla de triterpenoides pentacíclicos (lupanos y oleananos) dentro de los componentes mayoritarios y tal vez entre los más importantes se encuentran la betulina (**XXIII**), el ácido betulínico (**XXV**), el lupeol (**XXII**) y el ácido oleanólico.

Otras fuentes alternas a la corteza de abedul blanco (*Picramnia pentadra*, *Arbutus menziessi*, *Zizyphus mauritiana*) también han sido utilizadas para su obtención, pero estos materiales son difíciles de conseguir y el ácido betulínico (**XXV**) extraído representa tan solo una pequeña parte de una mezcla de compuestos que ha de ser separada por procedimientos de purificación (Ramadoss, 2001). Un estudio más reciente sobre el género *Uapaca* (*Euphorbiaceae*) el cual comprende aproximadamente 105 especies, 49 de las cuales están confinadas en el continente africano, menciona que este género puede ser una muy buena fuente de ácido betulínico (**XXV**) al ser encontrado en un 1.5-1.9% (Nyasse, 2009).

1.3.4. Métodos de obtención

a) Extracción

La preparación de un extracto crudo a partir de materia vegetal es un punto clave en el análisis de los componentes químicos presentes en el tejido (Martelanc, 2007). Usualmente, la materia vegetal primero se seca ya sea a temperatura ambiente, a 40°C o usando microondas, después es pulverizada y cernida. Las técnicas clásicas de lixiviación se basan principalmente en el uso de calor y/o agitación para incrementar la transferencia de masa al medio. La extracción de triterpenos tradicionalmente se realizan por maceración usando etanol, metanol, cloroformo o AcOEt. Esta técnica a menudo es ineficiente, consume mucho tiempo y requiere grandes cantidades de disolventes orgánicos, lo que se traduce en costos adicionales y riesgos ambientales. Afortunadamente, en los últimos años se han propuesto técnicas alternativas de lixiviación como soxhlet, ultrasonido, las microondas, los fluidos supercríticos y la extracción con líquidos a presión que han demostrado incrementar la eficiencia de los procesos de extracción así como de reducir el tiempo de operación y el volumen del medio lixiviante (Sánchez, 2007; Muffler, 2010). Una vez obtenido el extracto crudo, su fraccionamiento por cromatografía en columna seguida de una cromatografía en capa preparativa, son métodos efectivos en la mayoría de los casos para el aislamiento y purificación de un triterpeno en particular (Mahato, 1997).

Un procedimiento de extracción de ácido betulínico (**XXV**) a partir de *Zizipus jujuba* propuesto por Ramadoss (2001) utilizando recristalizaciones con disolventes ha mostrado prescindir de separaciones cromatográficas para su purificación. De igual forma, Draeger (2001) informa otro procedimiento para la obtención de ácido betulínico a partir de la corteza de *Platanus sp.* basado en la extracción con disolventes de mediana polaridad como diclorometano, cloroformo o éter dietílico a presiones hidrostáticas y sucesivas recristalizaciones, obteniendo en pocos pasos y sin necesidad de separaciones cromatográficas cristales puros de ácido betulínico (**XXV**). Este proceso, sin embargo, no es adecuado para la producción industrial de una gran cantidad de ácido betulínico, ya que se tienen que utilizar grandes volúmenes de disolvente (7 litros de diclorometano por cada 150 g de corteza molida) y además, la extracción se lleva a cabo en una columna de vidrio bajo presiones hidrostáticas, la cual no es adecuada para grandes cantidades por presentar problemas relacionados con la seguridad.

En 2005, Sauter patentó un procedimiento mejorado para la obtención de cristales altamente puros de ácido betulínico (**XXV**) utilizando una metodología de extracción con alcoholes y una mezcla de hidrocarburos diluyentes. Así mismo, se puede obtener por extracción fraccionada y subsecuente recristalización a bajas temperaturas, con el concomitante uso de grandes volúmenes de disolvente, haciendo el proceso poco adecuado para aplicación industrial (Csuck, 2006).

Un año mas tarde, Carsten (2007) propuso una metodología mejorada para la extracción a escala industrial de ácido betulínico (**XXV**) a partir de corteza de plátano. La extracción se caracteriza por el uso de disolventes hidrocarbonados como tolueno, xileno o tolueno/xileno en mezcla con uno o mas alcoholes de 1-6 átomos de carbono, y ésteres del ácido acético o cetonas de 3-6 átomos de carbono. Se recomienda que previo a la extracción la corteza sea humedecida para facilitar su manejo y evitar el polvo que puede ocasionar problemas de contaminación a los operadores. El proceso puede ser llevado a cabo de forma continua o por lotes, pero se recomienda que sea continuo con un flujo de la mezcla de disolventes entre 0.2 m³/h y 6m³/h a una temperatura entre 20°C y 100°C. La remoción del disolvente genera un extracto crudo, el cual es disuelto en otro disolvente apropiado (mezcla de cloroalcanos o ésteres del ácido acético y alcoholes de cadena corta) y mediante un sistema de agitación se hace precipitar el ácido betulínico cuya pureza es del orden de 83.9%. Finalmente, una segunda recristalización del ácido betulínico crudo puede incrementar su pureza hasta 93.8%.

Actualmente, la bibliografía señala dos fuentes primordiales para su extracción: 1) la corteza de los árboles de la familia *Betulaceae* que contienen grandes cantidades (*B. pendula* 78%, *B. papyrifera* 72%, *B. neoalaskana* 68%) de su precursor directo (el alcohol betulínico (**XXIII**)) el cual por una oxidación química puede ser transformado en ácido betulínico (**XXV**) (Krasutsky, 2006) y 2:) la corteza de *Platanus acerifolia* que contiene altos porcentajes (2.44% - 3.3%) de ácido betulínico (**XXV**) (Galgon, 1999; Jager, 2009; Zhao, 2007). Sin embargo, la transformación de la corteza de abedul en productos naturales nunca ha sido realizada a escala industrial a pesar de que la industria maderera puede ser considerada como una de las fuentes más ricas en corteza de abedul, ya que el mercado de triterpenoides (betulina (**XXIII**), ácido betulínico (**XXV**), lupeol (**XXII**), ácido oleanólico) como químicos finos es usualmente satisfecho por laboratorios que realizan extracción a pequeña escala (0.1-10 Kg) por año (Breitmaier, 2006).

b) Semi-síntesis

Debido a la limitada disponibilidad del ácido betulínico (**XXV**) en algunas especies vegetales, y a la abundancia de su precursor biogenético (**XXIII**) en la naturaleza, se han hecho muchos esfuerzos por obtenerlo por medio de la semi-síntesis. En 1939, L. Ruzicka y A. Robertson establecieron metodologías de síntesis con varios pasos que ofrecían rendimientos muy bajos. En 1998, Pezzuto estableció dos metodologías de síntesis a partir de la betulina (**XXIII**); en la primera utilizando un proceso de oxidación-reducción (75% rendimiento) y en la segunda utilizando un proceso de cinco pasos utilizando protección y desprotección de grupos funcionales (80% rendimiento) para evitar la isomerización del grupo hidroxilo en posición C-3. En 2001, Krasutsky informó un procedimiento basado en el uso de grupos protectores que permite la obtención a escala industrial del ácido betulínico (**XXV**) a partir de su precursor y que utiliza reactivos menos tóxicos, con mejores rendimientos, resulta ser menos costoso y más efectivo que en el caso de los métodos propuestos previamente por Pezzuto.

Posteriormente se informaron otras dos aproximaciones. En la primera de ellas se describe la oxidación del alcohol betulínico (**XXIII**) al ácido betulónico seguido de una reducción del grupo carbonilo en C-3 para obtener el ácido betulínico (**XXV**). A pesar de que las dos reacciones ofrecen rendimientos entre buenos y moderados, la reducción fue poco estereoselectiva obteniéndose una mezcla de epímeros (Baltina, 2003; Kogai, 2006; Levdanskij, 2006) que fueron difíciles de separar. El segundo procedimiento hace uso de grupos protectores, lo que resulta en un proceso más largo y consecuentemente se reducen los rendimientos de una forma significativa (Kim, 2001; Krasutsky, 2001).

En otra aproximación se ha recomendado la oxidación directa de la betulina (**XXIII**) utilizando el reactivo de Jones ($\text{Cr}_3\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{acetona}$) para obtener el ácido betulónico (**XXV**), el cual se dice se puede reducir estereoselectivamente con NaBH_4/THF para obtener los ácidos 3- α y 3- β betulínico (**XXV**) en una relación de peso 5:95. También se ha propuesto otro procedimiento de 5 pasos que involucra la protección del alcohol primario formando el éter-THP, protección del grupo hidroxilo secundario en posición 3 como el acetato, remoción del grupo protector en posición 28, una oxidación de Jones para obtener el 3-acetato del ácido betulínico y finalmente una hidrólisis alcalina del acetato para obtener el ácido 3- β -betulínico (**XXV**) con un rendimiento del 55% (Krasutsky, 2006).

Un proceso de dos etapas que utiliza óxido de cromo en un soporte sólido y permanganato de potasio (Pichette, 2005) y otro proceso electroquímico mediado por TEMPO (Menrad, 2004) han permitido obtener el ácido betulínico (**XXV**) a pequeña escala con rendimientos moderados. Sin embargo, estos inconvenientes podrían ser superados con un nuevo procedimiento de una sola etapa que ha sido desarrollado por Csuck (2006) utilizando TEMPO, NaClO_2 , NaClO a 50°C ofreciendo un rendimiento del 86%.

c) Síntesis

La síntesis total de triterpenos de tipo lupano ha sido un proyecto ambicioso por mucho tiempo, lo que ha llevado a la síntesis total de varios triterpenos: lupeol (**XXII**) (Stork, 1971), ácido oleanólico (Corey, 1993) y soforadiol. Una de las aproximaciones más espectaculares consiste en preparar un homólogo fluorado del escualeno (**IV**) para lograr hacer una pentaciclación (Johnson, 1993). Por otro lado, un intento por sintetizar el esqueleto del ácido betulínico (**XXV**) usando una síntesis convergente fue evaluado por Jung en 2006. Desafortunadamente la ciclación final del anillo C no pudo ser concretada debido a las fuertes interacciones estéricas en la vecindad de los grupos metilos, además de que las interacciones 1,3 diaxiales en el sistema anular impidieron la ciclación para formar los anillos. Desde el punto de vista costo-efectividad, muchos terpenoides con actividad biológica promisorias son estructuralmente muy complejos para ser sintetizados con facilidad por medio de la síntesis total a partir de materiales comercialmente disponibles (Wang, 2008).

1.3.5. Métodos de Análisis

Después de su extracción, la identificación de los compuestos triterpénicos puede llevarse a cabo por cromatografía en capa fina (CCF) generalmente sobre placas de gel de sílice, desarrolladas en diferentes sistemas (diclorometano-éter de petróleo, diclorometano-metanol-ácido acético, cloroformo-metanol) y utilizando anisaldehído, anhídrido acético o 10% de ácido sulfanílico en etanol seguido de calentamiento como reveladores para su identificación (Muffler, 2010). La cromatografía de líquidos ha sido menos utilizada para la separación de estos compuestos debido a la falta de sistemas de detección con la sensibilidad y selectividad adecuada. Sin embargo, su acoplamiento a la espectrometría de masas en tándem ha promovido su uso para la identificación y determinación de triterpenos en muestras vegetales (Sánchez, 2007). Así mismo, en casos donde se tengan mezclas complejas o productos isoméricos cercanamente relacionados (Mahato, 1997).

Para su análisis por HPLC, las muestras tienen que ser disueltas en algún disolvente adecuado (generalmente en MeOH) y ser filtradas por una membrana para remover las partículas suspendidas que de otra forma podrían dañar el equipo. Las columnas de fase reversa y los métodos isocráticos con detección por UV son comúnmente utilizadas para tal propósito. La fase móvil puede ser entre otras acetonitrilo:agua (91:9 v/v), acetonitrilo : 1.25% de ácido fosfórico (86:14 v/v), acetonitrilo:agua acidulada a pH 3 con ácido fosfórico (9:1), metanol : 0.1% de ácido fórmico (92:8), metanol : 0.03 M de una solución buffer de fosfatos a pH 2.8 (88:12 v/v), metanol:agua:tetrahidrofurano (94:5:1 v/v). Las longitudes de onda comúnmente utilizadas son; 206 nm, 210 nm, 212 nm o 220 nm. Si el análisis es acoplado a un espectrómetro de masas, se puede obtener un análisis más preciso de su estructura. Los triterpenos neutros (que poseen solo un grupo hidroxilo) no pueden ser fácilmente ionizados por electrospray (ESI), sin embargo la técnica por ionización química a presión atmosférica es más adecuada para estas moléculas. Información estructural adicional relativa al esqueleto carbonado puede ser obtenida con el uso de técnicas como HPLC-RMN (Muffler, 2010).

La cromatografía de gases puede ser usada para determinar la concentración de algún triterpeno en particular, sin embargo, debido a la baja volatilidad y altos pesos moleculares de los triterpenos, un requerimiento previo a su análisis es su derivatización, un proceso que puede llevarse a cabo haciendo reaccionar el triterpeno con una mezcla de piridina:hexametildisilazano: clorotrimetilsilano (50:40:10) a 75°C por 20 minutos, o bien utilizando reacciones de acilación o alquilación para incrementar su volatilidad. La separación de los compuestos es entonces llevada a cabo sobre una columna HP5 con helio como gas acarreador y un detector de ionización de flama. Una aproximación más sofisticada es el uso de espectrómetros de masas acoplados a la cromatografía de gases (por ejemplo, sistemas CG-ESI/MS en modo negativo) (Muffler, 2010).

La determinación de triterpenos pentacíclicos en aceite de oliva hecha por Cert en 1999 utilizando un análisis por GC-DIF (Columna SGL5 de fenilmetilsilicona) después de haber sido extraídos con éter de petróleo y separados por cromatografía en columna (gel de sílice) es solo un ejemplo del uso de las técnicas mencionadas anteriormente. Procedimientos acoplados (CG-EM y HPLC-EM) para la determinación de ácido betulínico han sido informados por Oliviera en 2002. Adicionalmente, en el **Cuadro 1** se presentan diversos ejemplos de metodologías utilizadas para la identificación de ácido betulínico y otros triterpenos relacionados en materia vegetal.

Cuadro 1. Métodos de análisis de ácido betulínico y otros triterpenos relacionados

Terpeno	Fuente	Método	Referencia
Ácido betulínico, oleanólico y ursólico	Hojas de fresno	CC	Pérez 1997
Ácido betulínico	Corteza de <i>Platanus acerifolia</i>	CG-DIF, CG-EM-ESI	Galgon, 1999
Ácido betulínico	<i>Doliocarpus schottianus</i>	CC y HPLC-PDA	Oliviera, 2002
Ácido betulínico	Corteza de Abedul amarillo	CG-EM-EI	Lavoie, 2005
Ácido betulínico	Corteza de <i>Syzygium jambos</i>	CC	Kuiate, 2007
Ácido oleanólico	Hojas de Olivo	CG	Albi, 2001
Ácido oleanólico, ursólico, uvalol y eritrodiool	Hojas de Olivo	CG-EM-EI	Sánchez, 2007
Lupeol, α -amirina y β -amirina	Hojas de col	HPLC-UV-EM-EM-APCI	Martelanc, 2007
α -amirina	Corteza de <i>Mallotus philippensis</i>	CCF	Dalvi, 2007
Ácido ursólico	Cascara de manzana (<i>Malus domestica</i>)	CG-EM-EI	Frighetto, 2008
Lupeol, α -amirina y β -amirina	Resinas y plantas de México y España	RP-HPLC-UV	Hernández 2010
Ácido betulínico	Hojas de <i>T. indica</i>	CC	Shehla, 2007
Ácido betulínico	<i>Ziziphi spinosae</i>	HPLC-ELSD	Zhang, 2008
Ácido betulínico	Corteza de Abedul	CC y HPLC-UV, MALDI-TOF	Drag, 2009
Ácido betulínico	Material vegetal diverso	CG-DIF, HPLC-UV	Jäger, 2009
Ácido betulínico	Raíz de <i>S. lappa</i>	CC	Choi, 2009
Ácido betulínico	Frutos de <i>Z. jujuba</i>	HPLC-DAD	Guo, 2009
Ácido betulínico	Hojas de olivo	RP-HPLC-EM-EM-ESI	Sánchez, 2009

1.3.6. Propiedades farmacológicas asociadas

El consumo de frutas y especies mediterráneas ha sido asociado con una baja incidencia de cáncer y otras enfermedades, hecho que se encuentra altamente relacionado con su contenido de triterpenos pentacíclicos del tipo lupano, oleanano y ursano. Diversos estudios han mostrado que dichas sustancias poseen importantes propiedades farmacológicas contra varias líneas celulares y contra el VIH-1 (Gagnon, 2004; Jager, 2009; Sami, 2006).

Particularmente se ha visto que el ácido betulínico aislado de las hojas de *Vitex negundo* y de la planta brasileña *Zizyphus jaazerio* poseen actividad antibacterial contra *Bacillus subtilis* y bacterias gram positivas respectivamente. Adicionalmente se ha observado que posee actividad antimalaria cuando se probó in vitro contra *Plasmodium falciparum*, sin embargo, cuando fue probado in vivo en un modelo murino la dosis máxima utilizada no fue efectiva y además presentó problemas de toxicidad (Yogeeswari, 2005).

Diversas investigaciones señalan que presenta actividad anti-inflamatoria y analgésica en ratones, es capaz de modificar los niveles de calcio intracelular ocasionando cambios en la presión arterial, así mismo, se ha observado que es capaz de disminuir significativamente el peso corporal, la acumulación de grasa abdominal en ratones alimentados con una dieta alta en grasa y regular los niveles de glucosa sanguínea, triglicéridos en plasma y colesterol total. Hallazgos que sugieren podría ser utilizado para el desarrollo de un tratamiento contra la obesidad (De Melo, 2009; Tolstikova, 2005; Yogeeswari, 2005).

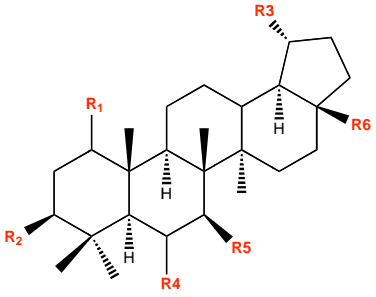

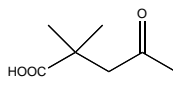

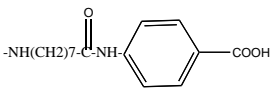




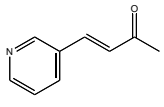

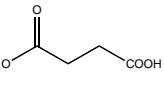

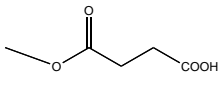
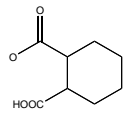

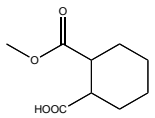
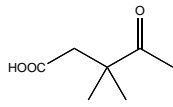

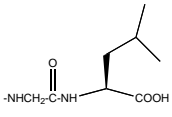
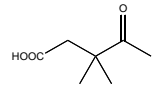

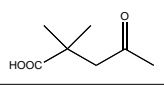

1.4. Derivados del ácido betulínico

Ya que los derivados naturales del ácido betulínico (**XXV**) han mostrado poseer la actividad anti-tumoral y anti-VIH más promisorias de entre más de cincuenta derivados naturales de tipo lupano (Tolstikova, 2006) y tomando en cuenta que tiene tres posiciones (C-3, C-20 y C-28) principales susceptibles de ser modificadas, se ha considerado que la síntesis de sus derivados puede conducir al desarrollo de nuevos compuestos que sirvan como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades importantes como el cáncer, la diabetes y el VIH (Kim, 2001; Baglin, 2003). Además, podrían llegar a ser utilizados en conjunto con otros medicamentos que actualmente se ocupan contra el VIH-1 (Yogeeswari, 2005).

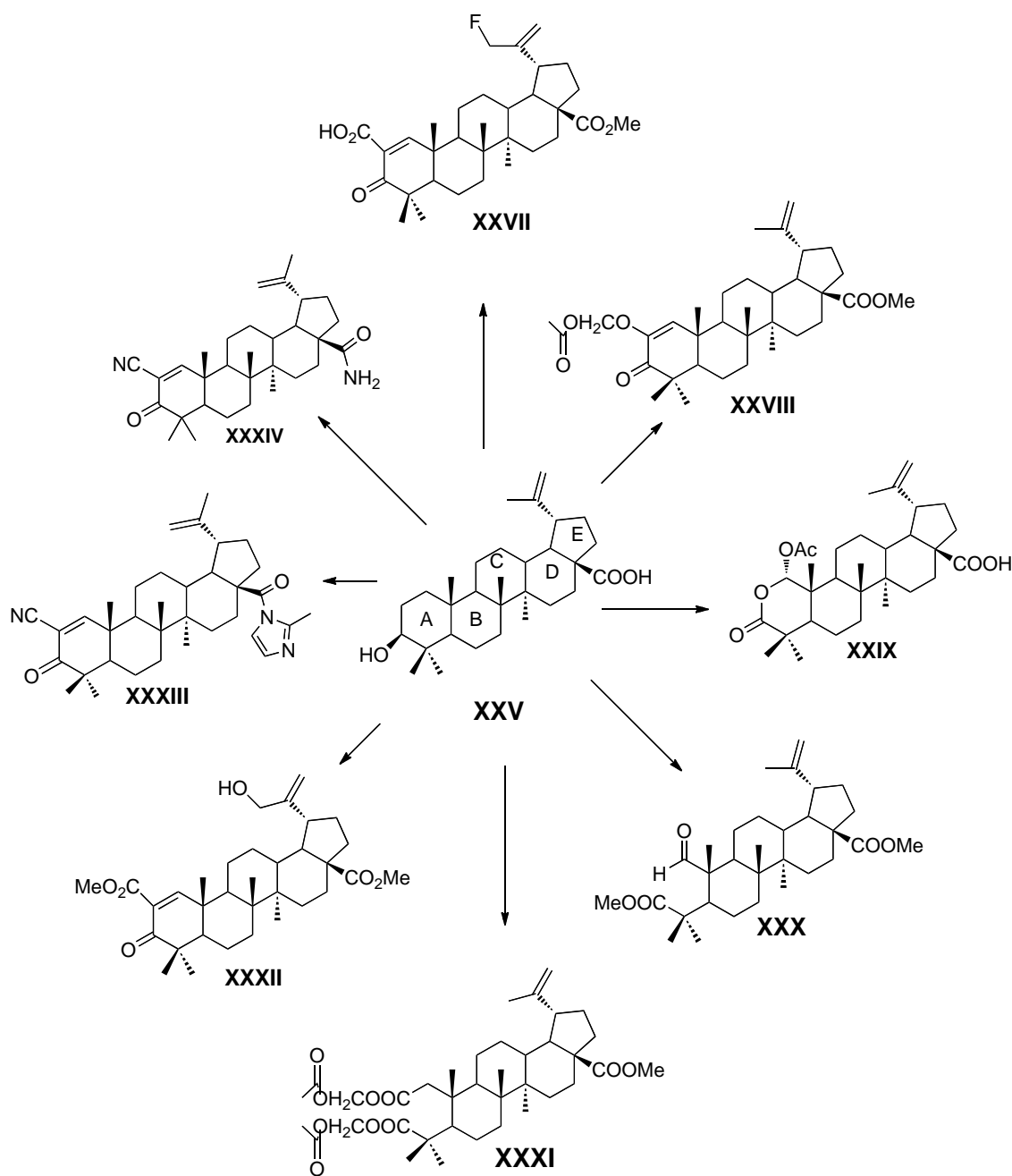
Diversos estudios de estructura-actividad hechos tanto a los derivados naturales del ácido betulínico (**XXV**) como a las modificaciones sintéticas en sus posiciones C-3 y C-28 (casi exclusivamente esterificaciones) han sido de gran utilidad para determinar que una elevada densidad electrónica de los sustituyentes en C-3 y la presencia del ácido carboxílico libre en C-28 influyen de forma importante en su actividad citotóxica y anti-VIH. Particularmente, se ha observado que la presencia de ésteres alquílicos en C-28 mejora las propiedades químicas y farmacológicas del compuesto aunque compromete su actividad citotóxica, adicionalmente se ha demostrado que la hidrogenación del doble enlace presente en C-20(29) incrementa su actividad citotóxica (Baglin, 2003; Urban, 2005; Kvasnica, 2005).

Las propiedades farmacológicas de los derivados semisintéticos del ácido betulínico con los que se contaba hasta el momento fueron discutidas por Tolstikova en 2006 encontrando que los derivados modificados en C-3 pueden inhibir la maduración del VIH mientras que los derivados modificados en C-28 pueden bloquear su entrada a la célula, hallazgo que alentó el interés de la comunidad científica por sintetizar derivados bifuncionales y/o glicosidados (**Cuadro 2**) que favorecieran el desarrollo de nuevos fármacos contra el VIH y cuyas propiedades farmacocinéticas (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) permitieran solucionar los problemas de solubilidad que algunos derivados presentaban (Gauthier, 2006; Huang, 2006).

Cuadro 2. Derivados bifuncionales y/o glicosidados del ácido betulínico

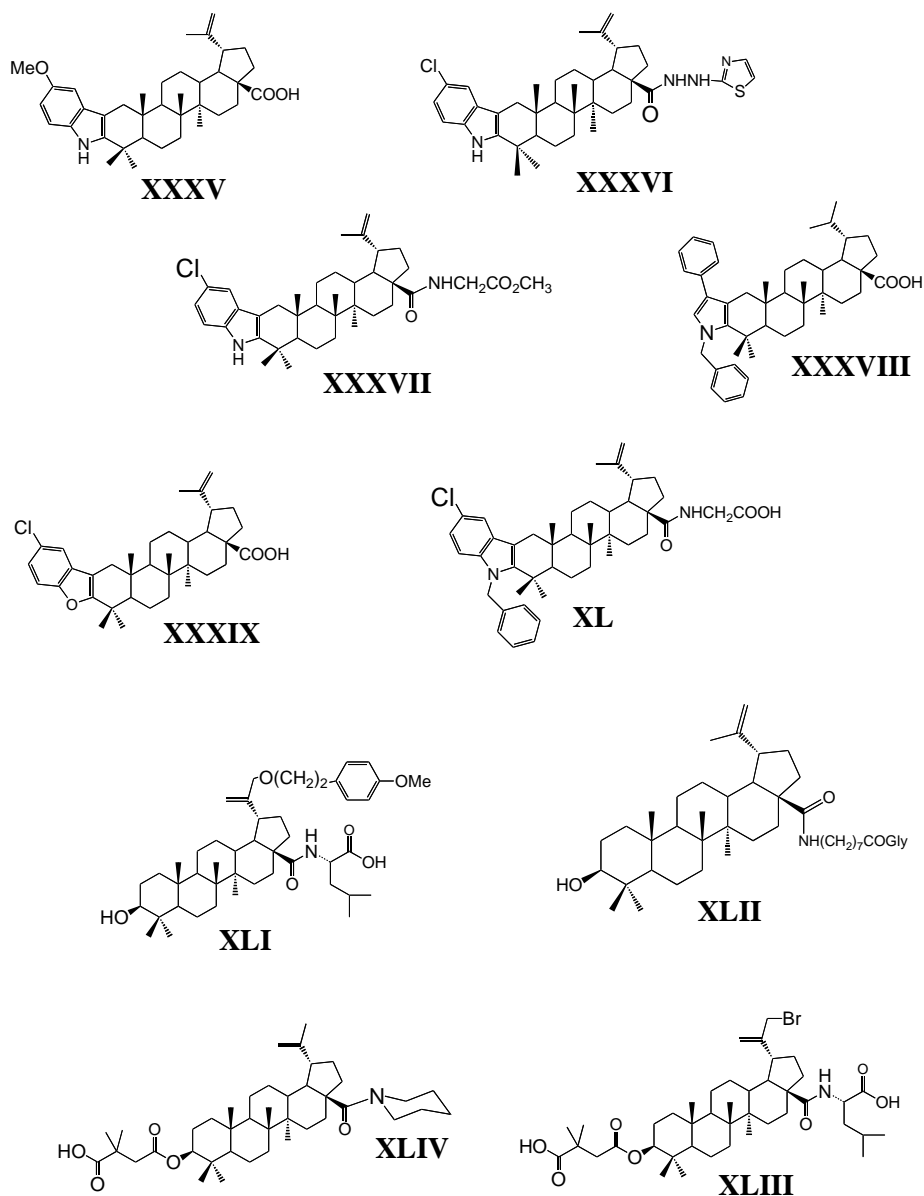
					
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
	HO-N=		H	H	CHNOH
			H	H	
	D-Glc / L-Rha / D-Ara		H	H	COOMe
	D-Glc / L-Rha / D-Ara		H	H	CH ₃
	O-D-Glc / O-L-Rha / O-D-Ara		H	H	CH ₂ OH
	OH		H	H	CH ₂ O-D-Glc / CH ₂ O-D-Rha / CH ₂ O-D-Ara
H			H	H	β-D-Glc(OAc) ₄
H			H	H	
H			H	H	
H			H	H	
H			H	H	-NH-(CH ₂) ₁₀ -COOH
H			H	H	-NH-(CH ₂) ₉ -NH-COCH ₃

Tiempo después, estudios relacionados con las propiedades anti-inflamatorias del ácido oleanólico, permitieron determinar que la combinación de un grupo funcional enona con un grupo ciano o carboxílico en posición C-2 es esencial para su actividad y que las modificaciones a la posición C-17 afectan tanto su efectividad como a sus propiedades farmacocinéticas. Hallazgo que inspiró el desarrollo de nuevos derivados (**XXVII-XXXIV**) del ácido betulínico (**XXV**) con modificaciones al anillo A (**Esquema 5**) en un intento por mejorar sus propiedades anti-inflamatorias (Gribble, 2007).

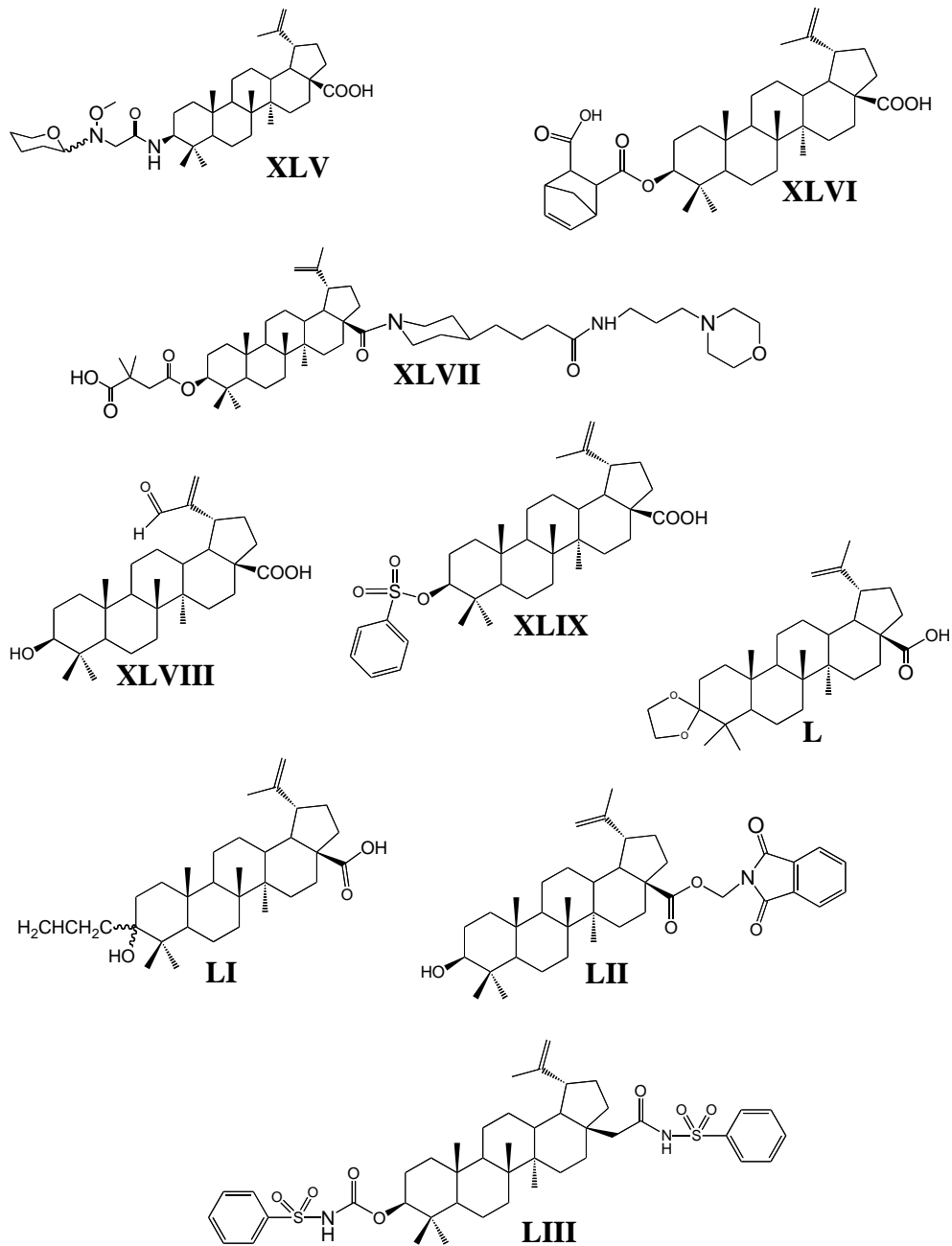


Esquema 5. Modificación al anillo A del ácido betulínico

Desafortunadamente algunos de estos productos no han sido clínicamente los adecuados o los candidatos correctos, ya que sus propiedades farmacocinéticas no han sido las más eficientes, por lo que aún persiste la necesidad de obtener nuevos derivados del ácido betulínico (**XXXV**) que no solo sean potentes, sino que además, sean clínicamente seguros y que tengan muy buenas propiedades farmacocinéticas. Razón por la cual se ha continuado con el desarrollo de nuevos derivados (**XXXV-LIII**) agregando un grupo heterocíclico entre las posiciones C-2 y C-3, formando un grupo amida o introduciendo aminoácidos terminales en C-28 o bien sintetizando análogos conformacionalmente restringidos en C-3 (**Esquema 6**) entre otras posibilidades (Dang, 2009; Kumar, 2008 ; Qian, 2010).



Esquema 6. Modificaciones en C-3 y/o C-28 del ácido betulínico



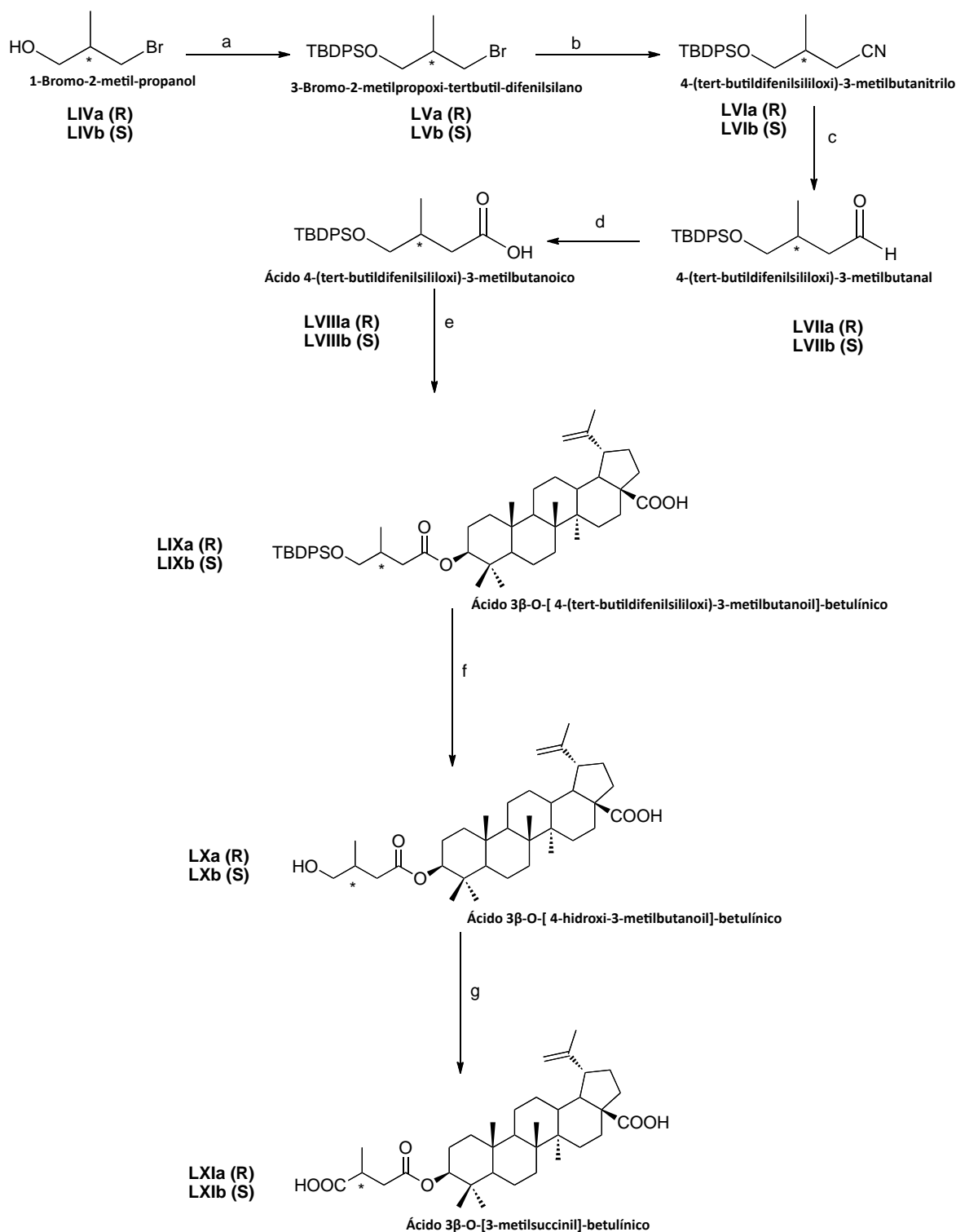
Continuación del esquema 6. Modificaciones en C-3 y/o C-28 del ácido betulínico

1.4.1. Inconvenientes de la síntesis química

En esta búsqueda por obtener derivados altamente efectivos cuyas propiedades permitan el desarrollo farmacéutico (Ghaffari, 2010), la química del ácido betulínico (**XXV**) se ha enfrentado a una serie de inconvenientes que han limitado la obtención de sus derivados.

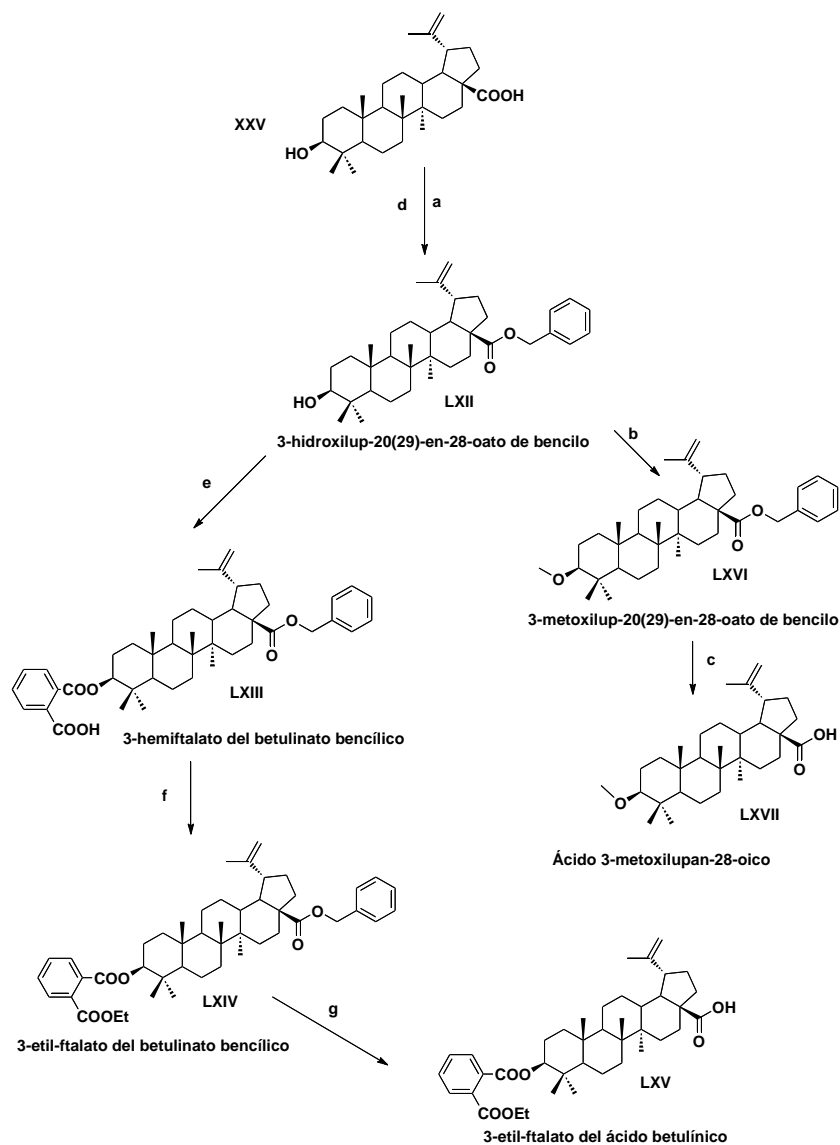
En principio, las modificaciones al esqueleto del ácido betulínico (**XXV**) se han centrado principalmente en las posiciones activadas y de fácil acceso como son el grupo hidroxilo C-3, grupo carboxílico C-28 y grupo isopropilo C-20 (Bastos, 2007). Por otra parte, algunos procesos como por ejemplo los de esterificación en medio ácido o básico, usualmente resultan en una mezcla compleja, normalmente ocurren a elevadas temperaturas en presencia de disolventes relativamente tóxicos quedando como trazas en los productos y que por ende requieren de procesos difíciles y costosos para ser purificados (Ghaffari, 2010).

El uso de catalizadores químicos conduce a diversos problemas, tal es el caso de los ácidos corrosivos que no se pueden reutilizar, la neutralización de la mezcla de reacción que conduce a la generación de grandes volúmenes de sales disueltas y la pérdida de los rendimientos de conversión y selectividad (Yamin, 2008). Además, la introducción de centros quirales (**Esquema 7a**) en la molécula (Qian, 2010) y ciertas reacciones como la acilación (Kvasnica, 2005) en ocasiones requieren de tediosas etapas de protección y desprotección de grupos funcionales (**Esquema 7b**), incrementando el número de ellas en el proceso sintético (Pollard, 2006, Woodley, 2008). Por lo general, el uso de este tipo de estrategias es común cuando la molécula cuenta con varios grupos funcionales que pudieran reaccionar y se desea que solo uno de ellos lo haga, evitando la formación de otros productos (**Esquema 8**) no deseables (Genet, 2010). En algunos otros casos, es necesario usar exceso de reactivos y largos tiempos de reacción a elevadas temperaturas para que se completen en su totalidad las transformaciones, tal como en el ejemplo de la reacción de los triterpenos con el anhídrido ftálico en la que se requieren excesos de reactivos que posteriormente necesitan ser separados de la mezcla de reacción (Kvasnica, 2005).



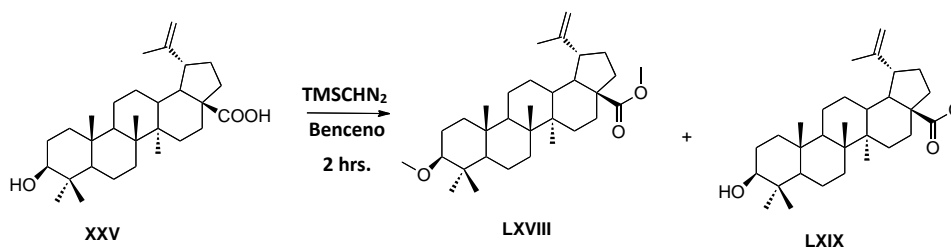
Reactivos: (a) TBDPSCI/Imidazol; (b) NaCN /DMSO 93%; (c) DIBALH /Tolueno 95%; (d) NaClO₂, NaH₂PO₄ / DMSO; (e) Ácido betulínico /EDCI, DMAP 25-48%; (f) TBAF/THF; (g) TEMPO, PhI(OAc)₂ /H₂O, CH₂Cl₂ 75-88%

Esquema 7a. Introducción de centros quirales (Qian, 2010).



Reactivos: (a) $\text{Cs}_2\text{CO}_3, \text{BnCl}$, DMF, 5 hrs; (b) NaH, DMF, 2hrs, MeI, 24 hrs; (c) Pd/C, H_2 , MeOH/THF, 12 hrs; (d) DBU, BnBr; (e) Anhidrido ftálico/DMAP/Py; (f) $\text{CH}_3\text{CHN}_2/\text{Et}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$; (g) 1,4-ciclo-hexadieno/Pd-C/THF/EtOH.

Esquema 7b. Uso de grupos protectores en la síntesis de derivados del ácido betulinico (Kvasnica, 2005; Genet, 2010).



Esquema 8. Reactividad de más de un grupo funcional dentro de la molécula.

1.5. Las bioconversiones como alternativa a la síntesis química

Muchos de los productos naturales biológicamente activos tienen estructuras complejas y múltiples grupos funcionales, reflejo del poder catalítico que poseen las enzimas presentes en los sistemas vivos. En contra parte, la química orgánica cuenta con una amplia variedad de reacciones y muchas de ellas son similares a los procesos biológicos que ocurren en la naturaleza. Se puede decir que existen algunas similitudes entre lo que el químico puede hacer en el laboratorio y lo que la naturaleza es capaz de hacer. Sin embargo, algunos de los procesos que ocurren en la naturaleza no son fáciles de llevarse a cabo en el laboratorio, ya que sus características estructurales hacen difícil su manipulación química, de forma que se sugiere la utilización de métodos biológicos para su síntesis o como aproximación para la resolución de problemas de especial interés en la química de productos naturales (Rosazza, 1984 ; Lavoie, 2001). Tal es el caso de la funcionalización selectiva de enlaces C-H no activados, la cual puede lograrse por métodos químicos clásicos solo en algunos casos concretos. Sin embargo, se ha hecho evidente que la naturaleza dispone de catalizadores (enzimas) que pueden desempeñar esta tarea formidable (Kelly, 1998) y que la habilidad que las transformaciones microbianas poseen para introducir un grupo hidroxilo con regio y estereoselectividad sobre un carbono saturado, aun permanece sin ser sobrepasada por los procesos químicos existentes (Patel, 2000).

Es por ello que durante los últimos años los químicos de proceso en la industria han dirigido su atención a la aplicación de los procesos biológicos utilizando enzimas aisladas y/o inmovilizadas o bien células completas, ya que la versatilidad, la eficiencia, los altos niveles de regio-, quimio-, y enantioselectividad y especificidad de estos sistemas puede ser utilizado para resolver algún centro quiral o mas aún, para crear uno nuevo. Adicionalmente, los procesos enzimáticos implicados han logrado que en la mayoría de los casos, no se requiera la protección de grupos funcionales específicos del sustrato, haciendo que la obtención de productos se de en forma más directa y económica que en el caso de los procesos químicos análogos (Asha, 2009; Correa, 2009; Woodley, 2008).

Por otra parte, las condiciones suaves (fisiológicas) bajo las cuales los sustratos son sometidos a la transformación , el bajo consumo de energía, la baja toxicidad de los disolventes y reactivos utilizados, la reducción de la proporción de los residuos son características que ubican a las bioconversiones en el campo de la biotecnología blanca o la química verde por ser considerados procesos ecológicamente competitivos para la búsqueda de nuevos compuestos de interés industrial o bien para modificar los ya existentes mejorando su bioactividad o reduciendo sus efectos secundarios. Adicionalmente se les considera como una herramienta importante para el estudio de fármacos en desarrollo y comprender su metabolismo, toxicidad, distribución, excreción y almacenamiento en el organismo (Ayala, 2008; Borges, 2009 Correa, 2009; Chatterjee, 2000; Woodley, 2008).

1.6. Los procesos de bioconversión

Los microorganismos han jugado un papel importante a través de la historia de la humanidad y con el paso del tiempo se descubrió que eran capaces de modificar ciertos compuestos por medio de reacciones simples y químicamente bien definidas, las cuales eran catalizadas por enzimas (Vasick-Racki, 2006). Sin saberlo, desde épocas muy remotas, la dinámica enzimática de los sistemas biológicos ha sido explotada por los seres humanos (**Cuadro 3**) y así por ejemplo en la antigua China y Japón, el hombre utilizaba amilasas y proteasas para la producción de alimentos derivados de la soya y bebidas alcohólicas (Bulchholz, 2005). Adicionalmente, la Biblia hace alusión a la elaboración del vino y el vinagre y aunque no describe detalladamente el proceso de su obtención, si se hace referencia táctica a las metodologías de su elaboración; igualmente la aplicación de levaduras para la elaboración de pan y quesos fermentados provienen de épocas muy antiguas (Correa, 2009).

Cuadro 3. Bioconversiones industriales relevantes (Leresche, 2006).

Año	Proceso
500 A.C.	Producción de vinagre
800 A.C.	Hidrólisis de caseína para la producción de queso
1670	Producción industrial de ácido acético a partir de etanol
1897	E. Buchner descubre que las levaduras transforman el azúcar en alcohol
1934	Oxidación regioselectiva de sorbitol a sorbosa para la síntesis de vitamina C
1940	Inversión de la sacarosa usando una invertasa
1950	Bioconversión de esteroides
1970	Hidrólisis de la penicilina al ácido 6-aminopenicilánico
1974	Isomerización de la glucosa a la fructosa con glucosa isomerasa inmovilizada
1985	Producción de acrilamida
1990	Hidrólisis de la insulina porcina a la insulina humana por una proteasa (Tripsina)
1995	Biotransformación de nicotinitrilo a nicotinamida

Los desarrollos científicos datan de principios del siglo XIX cuando en 1835 Berzelius descubrió el efecto catalítico de una diastasa al hidrolizar el almidón, conocimiento que diez años más tarde sería utilizado por Payen y Persoz en la industria cervecera. Las investigaciones científicas continuaron centrándose enfáticamente en las fermentaciones alcohólicas generando importantes hallazgos que ayudaron a definir la naturaleza del agente catalizador (Buchholz, 2005), tal es el caso del documento presentado por Kuhne en 1876 en el cual sugiere que se nombren como enzimas a estos agentes catalíticos (Leresche, 2006). El continuo desarrollo tecnológico a principios del siglo XX condujo a la hidroxilación microbiológica de la progesterona llevada a cabo por *Rhizopus arrhizus* (reportada por Peterson en 1953), convirtiéndose en uno de los mayores progresos económicos y tecnológicos de la historia ya que simplificó y mejoró considerablemente la eficiencia de la complicada síntesis química (31 etapas) de las hormonas corticosteroidales reduciendo su costo de 200 a 6 dólares por gramo (Vasick-Racki, 2006). Sin duda alguna a través de la historia este y otros acontecimientos han sido relevantes en el desarrollo de tecnologías alternas para la síntesis de compuestos de valor agregado (**Cuadro 4**) para el ser humano.

Cuadro 4. Ejemplos de procesos biocatalíticos a gran escala (Kelly, 1998).

Proceso	Catalizador	Producto	Producción anual (Toneladas)
hidrólisis	Amiloglucosidasa	Glucosa	10X10 ⁶
	Nitrilo hidratasa	Acrilamida	8X10 ³
Resolución con racemización	Hidantoinasa	4-hidroxifenilglicina	1000
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Cisteína	500
Oxidación	Sorbitol deshidrogenasa	L-sorbosa	5X10 ³
	hidrolasa	Carnitina	150
Reducción	Ciclopentadiona reductasa	13-etil-estradiol	1 ?
	Cetosulfona reductasa	Hidroxisulfona	1-3
Isomerización	Glucosa isomerasa	Isoglucosa	8X10 ⁶
Síntesis de C-C	Piruvato descarboxilasa	Fenilacetilcarbinol	300-500
	Tirosina fenol liasa	L-Dopa	50
Síntesis de péptido	Termolisina	Aspartame	2000
	tripsina	Insulina	1

En su mayoría, las transformaciones que se han llevado a cabo en síntesis orgánica han sido desarrolladas por hidrolasas, seguido por las oxidoreductasas y finalmente el resto de ellas que han sido solo moderadamente explotadas. Tal como se mencionó anteriormente, existe una larga variedad de procesos catalizados por enzimas, estos procesos tienen una reacción equivalente en síntesis orgánica y algunos ejemplos de ellos incluyen reacciones de: (1) hidrólisis y síntesis de ésteres, lactonas, lactamas, epóxidos; (2) oxidación-reducción de alquenos, alcoholes, sulfuros y sulfóxidos; (3) adición-eliminación de agua o amonio; (4) halogenación-deshalogenación; (5) acilación, condensación aldólica y Diels-Alder (Loughlin, 2000).

Hoy en día, estos procesos son catalogados por algunos autores como biotransformaciones (Vasick-Racki, 2006), mientras que otros los definen como procesos de biocatálisis. Se hace necesario entonces aclarar la terminología utilizada en este texto para evitar confusiones durante su lectura. A la transformación química de un sustrato utilizando métodos biológicos (ya sea por una enzima, un complejo enzimático, un organelo celular o bien por una célula completa cuyo origen puede ser microbiano, animal o vegetal) se le define como **bioconversión**; cuando ésta es llevada a cabo por enzimas puras o parcialmente puras en su estado libre o inmovilizadas se le conoce como **biocatálisis**, y cuando es llevada a cabo por células completas que contienen la maquinaria enzimática necesaria para dicha transformación, se les conoce como **biotransformación** (Leresche, 2006; Buchholz, 2005).

Es evidente que las enzimas utilizadas en dichos procesos son exquisitamente **selectivas y específicas** (regio-, quimio- y enantioselectivos) capaces de aceptar una amplia gama de moléculas como sustrato y desde el punto de vista económico y ambiental son considerados como catalizadores más eficientes que los químicos (Ishige, 2005). Cabe la pena señalar que el término **selectividad** es utilizado cuando la materia prima es proquiral y los productos son estereoisómeros producidos en iguales cantidades, mientras que el término **especificidad** es usado cuando la materia prima son estereoisómeros que dan productos diferentes durante la reacción (Anthonsen, 2005).

En la actualidad, se conocen más de 3000 enzimas, pero esta cantidad representa un porcentaje muy pequeño en comparación con las que existen en la naturaleza. El progreso de la bioquímica en 1950 permitió aislar y caracterizar un gran número de ellas. Alrededor de 300 han sido investigadas y son accesibles comercialmente, lo que da idea del grado de desarrollo que aún es posible en este campo. Las enzimas se clasifican generalmente en seis categorías (**Cuadro 5**) según el tipo de reacción que catalizan de acuerdo a la unión internacional de bioquímica y biología molecular (IUBMB) en conjunto con la IUPAC (Gonzalo, 2003; Hoh, 2006).

Cuadro 5. Principales clases de enzimas (Hoh, 2006)

	Clase	Reacción
1	Oxidoreductasas	Procesos de oxido-reducción
2	Transferasas	Transferencia de grupos funcionales de una molécula a otra (ejemplo: acilos o fosfatos)
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (lipasas, amidasas y esterases)
4	Liasas	Ruptura de enlaces C-C, C-O y C-N que no sean efectuados por procesos hidrolíticos o redox; típicamente estos procesos involucran eliminación o adición a dobles enlaces
5	Isomerasas	Reacciones de isomerización como epimerización y racemización
6	Ligasas	Formación intermolecular de enlaces acoplados con la ruptura de ATP o cualquier otro nucleotido de trifosfato

1.6.1. Características de las bioconversiones

Las principales características que deben ser consideradas para llevar a cabo una conversión se detallan a continuación.

1) **Sustrato:** Debe tener la adecuada solubilidad en el medio de reacción al cual se agrega ya sea en solución o adsorbido en algún material inerte como las arcillas. No debe ejercer algún efecto tóxico al catalizador utilizado ya que puede inhibir su desarrollo y por consecuencia influir en el rendimiento de la reacción (López, 2007).

2) **Estrategia:** El tipo de reacción que se desea catalizar, el uso de cofactores y reciclaje de los mismos, la escala a la cual se desea llevar, la tolerancia a los disolventes orgánicos y el costo de los catalizadores son algunos factores que deben ser considerados al elegir el tipo de estrategia que ha de ser utilizada (biotransformaciones o biocatálisis) en un proceso de bioconversión. Este puede incluir biocatálisis utilizando una etapa enzimática, biotransformaciones con células completas que pueden catalizar varios pasos a partir de una molécula precursora o completar las rutas fermentativas utilizando azúcares simples que resultan en la formación de un producto deseado (Straathof, 2005).

a) **Células completas:** Generalmente son o pueden resultar más baratas que las enzimas en su estado libre ya que son fáciles de obtener, manejar y son más estables a largo plazo debido a que las enzimas que se encuentran dentro de ellas están protegidas de factores ambientales externos (Ishige, 2005). Sin embargo, el aislamiento de los productos obtenidos puede resultar complicado debido a la presencia de la biomasa y a la presencia de reacciones secundarias incluyendo el metabolismo propio del sustrato, volviendo muy complejo el medio de reacción y haciendo más difícil su control y reproducibilidad (Kelly, 1998; López, 2007; Shaw, 2003).

Debido a que requieren tiempos de incubación relativamente cortos, pueden utilizarse como células en crecimiento o en suspensión. Cuando se utilizan las células en crecimiento, el sustrato se adiciona al medio de reacción al momento de la inoculación o bien en la última fase de desarrollo con la finalidad de inducir la o las enzimas responsables de la conversión. En cambio cuando se utilizan las células en suspensión, el biocatalizador previamente incubado en condiciones óptimas se concentra y se resuspende en un medio adecuado al cual se le adicionará el sustrato. En este caso, se logran eliminar problemas de inhibición del crecimiento además de tener un mejor control en la concentración del sustrato. En ocasiones el uso de células en crecimiento puede resultar perjudicial, sobre todo cuando el sustrato o el producto pueden servir como fuente de carbono para el desarrollo celular (Carvalho, 2006; López, 2007).

b) **Enzimas:** Estos catalizadores altamente selectivos pueden ser utilizados en soluciones concentradas o en disolventes orgánicos en diferentes formas: en su estado salvaje, recombinantes o genéticamente modificadas para incrementar su especificidad o actividad, en solución, en un reactor de membrana, en suspensión, purificadas o inmovilizadas. Adicionalmente, su remoción del medio de reacción puede resultar más sencillo que en el caso de las células completas (Shaw, 2003). En el caso de las enzimas purificadas, estas son utilizadas en reacciones a escala preparativa, siempre se encuentran disponibles ya que son de tipo comercial y la concentración del sustrato puede variarse sin problemas de toxicidad para el catalizador. Por el contrario, las enzimas inmovilizadas están fijadas en un soporte sólido con la finalidad de incrementar su estabilidad operacional y a pesar de que están confinadas en áreas restringidas de las que no pueden escapar, aún permanecen activas aunque en ocasiones su actividad catalítica puede verse disminuida (López, 2007). En ocasiones la necesidad de emplear enzimas con alto nivel de purificación obedece al hecho de que hay una difusión inapropiada de los sustratos a transformar a través de la membrana de las células, o bien que el producto de la transformación no se difunda una vez producido. Obviamente, esto tiene la desventaja de que los procesos de purificación y separación de enzimas en ocasiones pueden resultar largos y costosos (Ayala, 2008).

La decisión final sobre lo que se debe utilizar (enzimas, microorganismos, estado de pureza, etc.) depende de diversos factores (**Cuadro 6**) como: el tipo de reacción que han de catalizar, la presencia de cofactores que deban ser reutilizados y la escala en la cual la transformación se ha de llevar a cabo entre otros (Faber, 2004).

Cuadro 6. Criterios de selección de un catalizador (Straathof, 2005)

	Extracto celular	Enzima purificada	Celulas en crecimiento	Celulas en reposo
Actividad	Moderada	Alta	Moderada ¹	Alta
Especificidad				Moderada
Reciclado de cofactores	Requerido		No requerido	
Transporte del sustrato	No requerido		Requerido	
Subproductos	Pocos	Muy pocos	Varios ²	Algunos ²
Costo	Moderado	Alta	Moderadamente bajo	
Reutilización	No	Si	No	Si
Tolerancia a los disolventes	Alta		Baja	Alta
Concentración del producto				
Recuperación del producto	Relativamente compleja	Fácil	Compleja	Relativamente compleja
Equipo	Barato		Caro	Barato
Desperdicio	Pocos		Biomasa	
Puede incrementarse (1) o reducirse (2) al utilizar cepas recombinantes				

3) Condiciones de la reacción: Generalmente los catalizadores biológicos poseen una alta actividad en condiciones suaves de temperatura (alrededor de 40°C), pH cercano a la neutralidad, presiones atmosféricas normales en un medio de reacción acuoso u orgánico (López, 2007).

4) Medio de reacción: Tradicionalmente, las biotransformaciones se han llevado a cabo en sistemas acuosos debido a que las enzimas y células en crecimiento son compatibles con dicho medio. En el caso particular de los terpenos, estos son pobremente solubles en agua, pero el uso de una fase orgánica en el sistema de reacción podría mejorar su transformación en comparación con un sistema meramente acuoso debido a que el biocatalizador permanece en la fase acuosa mientras que la fase orgánica sirve como almacén para el sustrato y el producto.

La incorporación continua del producto a la fase orgánica modifica el equilibrio termodinámico favoreciendo la formación de productos, manteniendo la transformación y disminuyendo los efectos de inhibición del catalizador por producto. Adicionalmente, la recuperación tanto del biocatalizador como del producto se vuelve más fácil en comparación con un medio estrictamente acuoso. En el caso particular de algunos terpenos, estos poseen actividad antimicrobiana y el uso de disolventes orgánicos ayuda a reducir su toxicidad frente a los microorganismos que se usan en la biotransformación. Sin embargo, los disolventes orgánicos pueden inactivar a las enzimas y causar pérdida de la viabilidad celular por interferir con la membrana. Otros medios no convencionales que pueden ser utilizados en los estudios de bioconversión incluyen a los líquidos iónicos y los fluidos supercríticos. Los líquidos iónicos son sales de bajo punto de fusión, disolventes polares no acuosos que pueden disolver muchos compuestos y han demostrado efectividad en la producción/transformación de terpenos, además de que pueden actuar como reservorio del sustrato en el medio de reacción (Carvalho, 2006; López, 2007). El uso de detergentes y éteres corona puede llegar a incrementar la eficiencia de las enzimas bajo la hipótesis de que se remueve agua ligada al sitio activo de la enzima, lo que ocasiona su activación. Además una de las ventajas potenciales de llevar a cabo transformaciones en sistemas orgánicos es la de incrementar la solubilidad de ciertos sustratos hidrofóbicos o cambiar su especificidad y enantioselectividad (Loughlin, 2000).

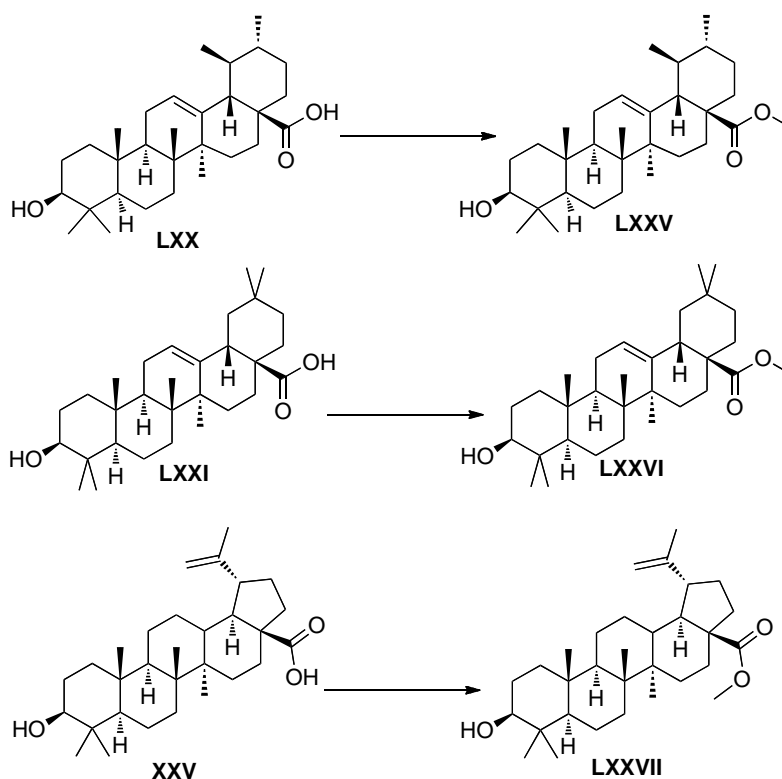
5)Extracción del producto y purificación: Una vez concluido el proceso de transformación, la separación del catalizador por técnicas de extracción, precipitación, centrifugación y destilación se realizará en función de las propiedades fisicoquímicas del sistema. Una vez extraídos los productos, estos se purificarán por técnicas de cromatografía, destilación fraccionada o recristalización entre otros (López, 2007).

6)El tipo de reacción: Originalmente casi todas las aplicaciones de los procesos biológicos para llevar a cabo una transformación involucraban reacciones hidrolíticas, pero actualmente existe una gama más amplia de reacciones que se ha aplicado a escala comercial o a nivel de laboratorio (Buchholz, 2005). Las reacciones que involucran hidrolasas frecuentemente han sido utilizadas como enzimas puras debido a que no requieren de cofactores, a que se encuentran comercialmente disponibles y a que pueden ser utilizadas en disolventes orgánicos. Adicionalmente, las reacciones de adición-eliminación (llevadas a cabo por las liasas), las de transferencia (transferasas), las de isomerización (isomerasas) y las ligasas típicamente han sido utilizadas en su forma de extracto celular o como enzimas purificadas. En cambio, las reacciones que requieren de oxidoreductasas (enzimas relativamente complejas, frecuentemente constituidas por más de una proteína) son llevadas a cabo por células completas debido a que el costo del reciclado de los cofactores requeridos para la reacción, con frecuencia resulta más elevado que el mismo proceso catalítico. En cambio otras como las hidrolasas solo requieren de una tarea tan sencilla como controlar el pH (Kelly, 1998; López, 2007; Straathof, 2005).

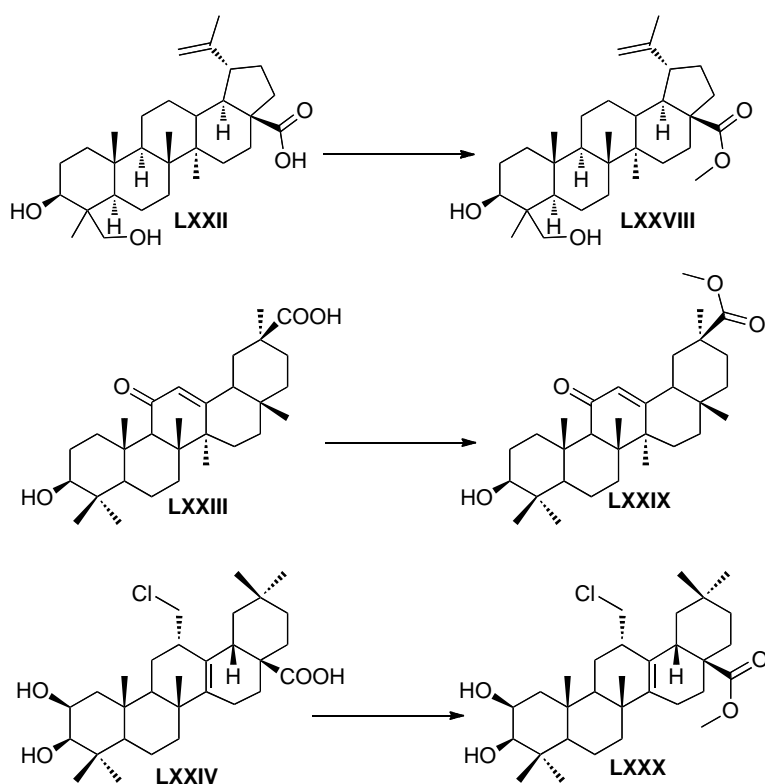
1.7. Bioconversión de terpenos

Diversos estudios han descrito la transformación de **terpenos** utilizando enzimas, extractos celulares y células completas de bacterias, cianobacterias, levaduras, microalgas, hongos y plantas. Dos terceras partes de los manuscritos publicados sobre la producción y/o biotransformación de terpenos en la última década, señalan a las células bacterianas y de hongos como los biocatalizadores más utilizados (41% y 33% respectivamente), mientras que solo el 7% de los estudios han utilizado enzimas aisladas (Carvalho, 2006). Sin embargo, la transformación de **triterpenos** se ha limitado a unos pocos y para el caso particular del ácido betulínico (**XXV**) se reducen aún más.

Algunas transformaciones de productos naturales hechas por *Nocardia sp.* NRRL 5646 han sido descritas en la literatura, pero la transformación de ácidos terpénicos por esta cepa no había sido informado sino hasta hace relativamente poco cuando se observó que era capaz de metabolizar los ácidos ursólico (**LXX**), oleanólico (**LXXI**), betulínico (**XXV**), 23-hidroxibetulínico (**LXXII**), glicirretínico (**LXXIII**) y la senegéina (**LXXIV**) formando sus correspondientes ésteres metílicos (**LXXV-LXXX**) en C-28 (**Esquema 9**). Adicionalmente, se observó que era capaz de romper el enlace C-C en C-12 de la senegéina (**LXXIV**) y catalizar la conversión del esqueleto del grupo de los ursanos (**XX**) para formar el esqueleto oleanano (**XVI**) vía una migración del carbono C-19 al C-20 (Muffler, 2010).

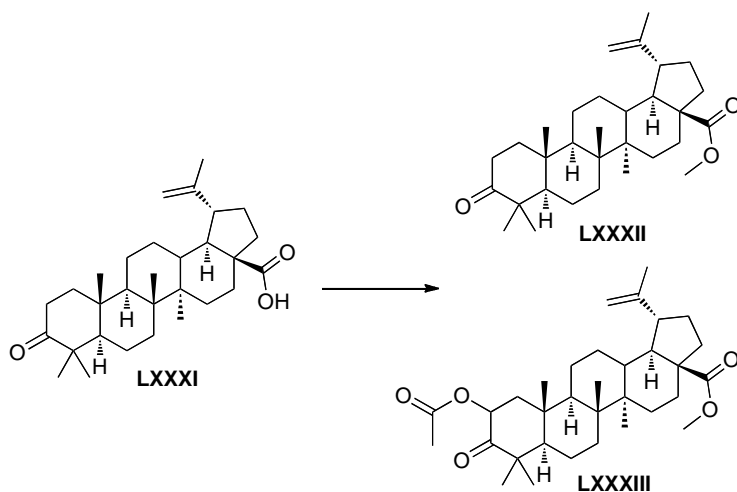


Esquema 9. Biotransformación de terpenoides con *Nocardia sp.* NRRL 5646



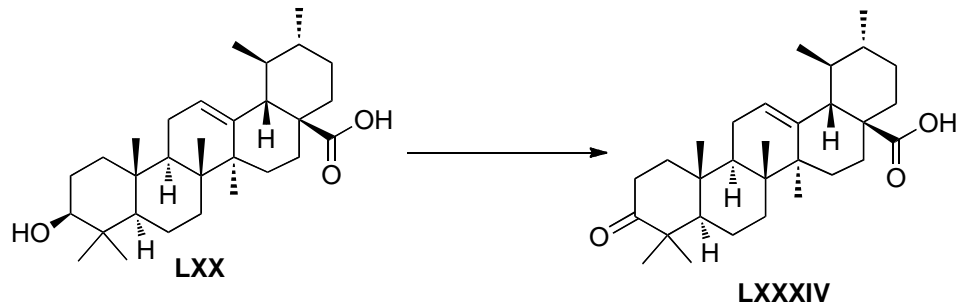
Esquema 9. Continuación. Biotransformación de terpenoides con *Nocardia sp.* NRRL 5646

Esta misma cepa de *Nocardia* se utilizó para producir el éster metílico (LXXXII) en C-28 del ácido betulónico (LXXXI), pero de la mezcla de reacción también se aisló el nuevo metabolito 2 α -acetoxi-3-oxo-lup-20(29)-en-28-oato de metilo (LXXXIII) poniendo en evidencia su capacidad para introducir un grupo hidroxilo en posición C-2 seguida de una acetilación (Esquema 10) del mismo (Muffler, 2010).



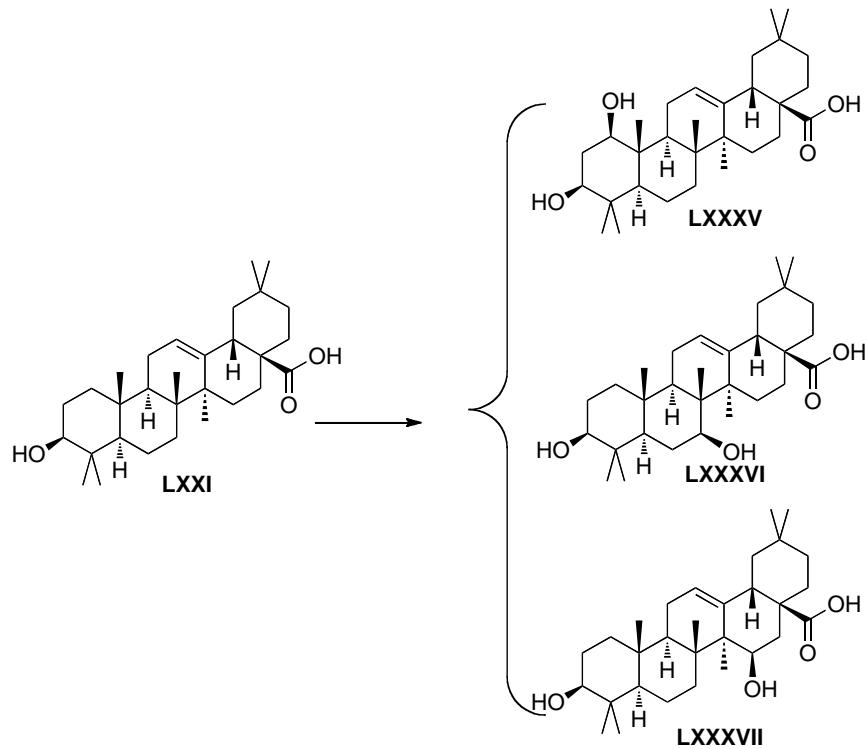
Esquema 10. Biotransformación del ácido betulónico con *Nocardia sp.* NRRL 5646

El uso de *Aspergillus flavus* ATCC 9170 para catalizar la transformación del ácido ursólico (LXX) en ácido 3-oxo-ursólico (LXXXIV) mostró la capacidad que tienen estos cultivos para llevar a cabo la deshidrogenación de un alcohol secundario (Esquema 11) (Ibrahim, 2008).



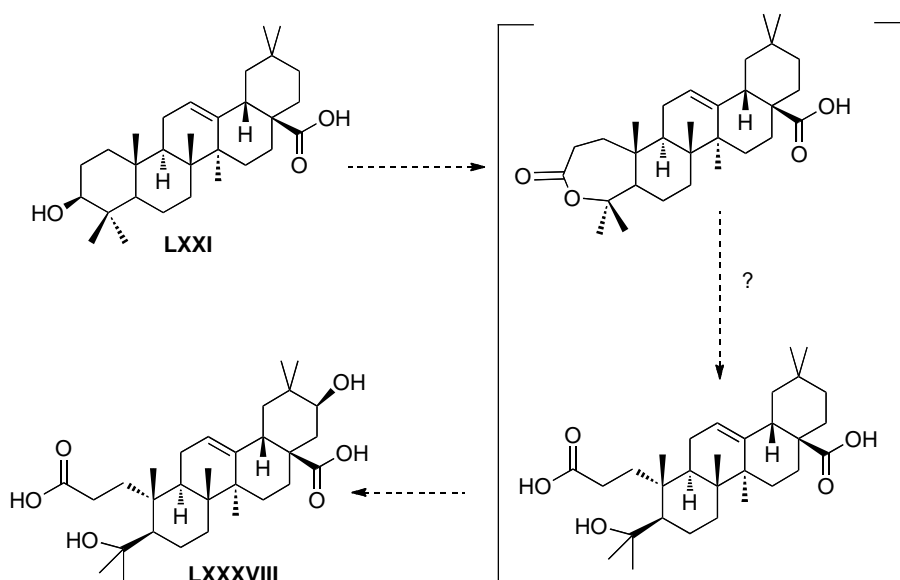
Esquema 11. Biotransformación del ácido ursólico por *Aspergillus flavus* ATCC 9170

Biotransformaciones del ácido oleanólico (LXXI) hechas con cultivos de *Cunninghamella blakesleena* mostraron la capacidad de estos sistemas para llevar a cabo hidroxilaciones en las posiciones C-1 β , C-7 β o C-13 β (Esquema 12) y de igual forma la *Curvularia lunata*, un hongo utilizado para hidroxilar esteroides en posición C-11, ha sido usado para hidroxilar terpenoides del tipo oleanano.



Esquema 12. Biotransformación del ácido oleanólico por *Cunninghamella blakesleena*

Adicionalmente, una cepa de *Mucor spinosus* AS 3.3450 ha mostrado poseer la capacidad de oxidar selectivamente terpenoides del tipo de los ginsenósidos, mientras que los hongos filamentosos de *Chaetomium longirstone* RF-1095 han sido utilizados para la formación de derivados hidroxilados y con ruptura del anillo A (ácido 4-hidroxi-3,4-seco-3-oico (LXXXVIII)) del ácido oleanólico (LXXI). Se supone que estos compuestos provienen de una oxidación de Baeyer-Villiger de la cetona en posición C-3 seguida de una hidrólisis de la lactona resultante (Esquema 13). Reacciones similares de ruptura del anillo, hidroxilaciones y descarboxilaciones llevadas a cabo por la misma cepa, han sido descritas para el ácido betulónico, mientras que cepas de *Septomyxa affinis* ATCC 6737 y *Glomerella fusarioides* ATCC 9552 han mostrado la capacidad de romper el anillo A de otros triterpenoides en general (Muffler, 2010).



Esquema 13. Ruta sintética propuesta para la transformación del ácido oleanólico al compuesto LXXXVIII por *Chaetomium longirstone*.

Comparado con el uso de células completas, la aplicación de enzimas aisladas para la modificación de **triterpenos** se han informado muy raramente. La aplicación mas relevante de enzimas aisladas se resume a continuación presentando algunos de los trabajos mas representativos utilizando principalmente ciclizaciones, ruptura del enlace glicosídico y oxidaciones/hidroxilaciones.

La ciclación del escualeno (**IV**) y el 2,3-oxidoescualeno (**V**) que dan origen a la formación de triterpenos policíclicos ha sido un tema interesante por muchos años debido a la alta estereoselectividad del proceso que es realizado en etapas bien definidas. En principio la enzima se une al sustrato adoptando una conformación específica para él en particular, seguido de la protonación de un doble enlace o un epóxido que genera cationes seguida por el cierre de anillos y reordenamientos sucesivos. Este hecho ha generado la publicación de numerosas investigaciones relacionados con las rutas sintéticas que desarrollan enzimas como la hopano-ciclasa (HSC) y la oxidoescualeno-ciclasa (OSC) para llevar a cabo dichas ciclaciones.

Otro grupo de enzimas importantes para la transformación de triterpenos son las glicosidasas. En este sentido Shafiee (2001) evaluó la capacidad de 27 enzimas (glicosidasas, glucoronidasas e hidrolasas) para romper el enlace glicosídico de la enfumafungina (un triterpeno con actividad antifúngica) y observó que solo una glicosidasa recombinante era capaz de romper dicho enlace y mantener sus propiedades biológicas intactas, lo que representó el punto de partida para la producción de otros derivados.

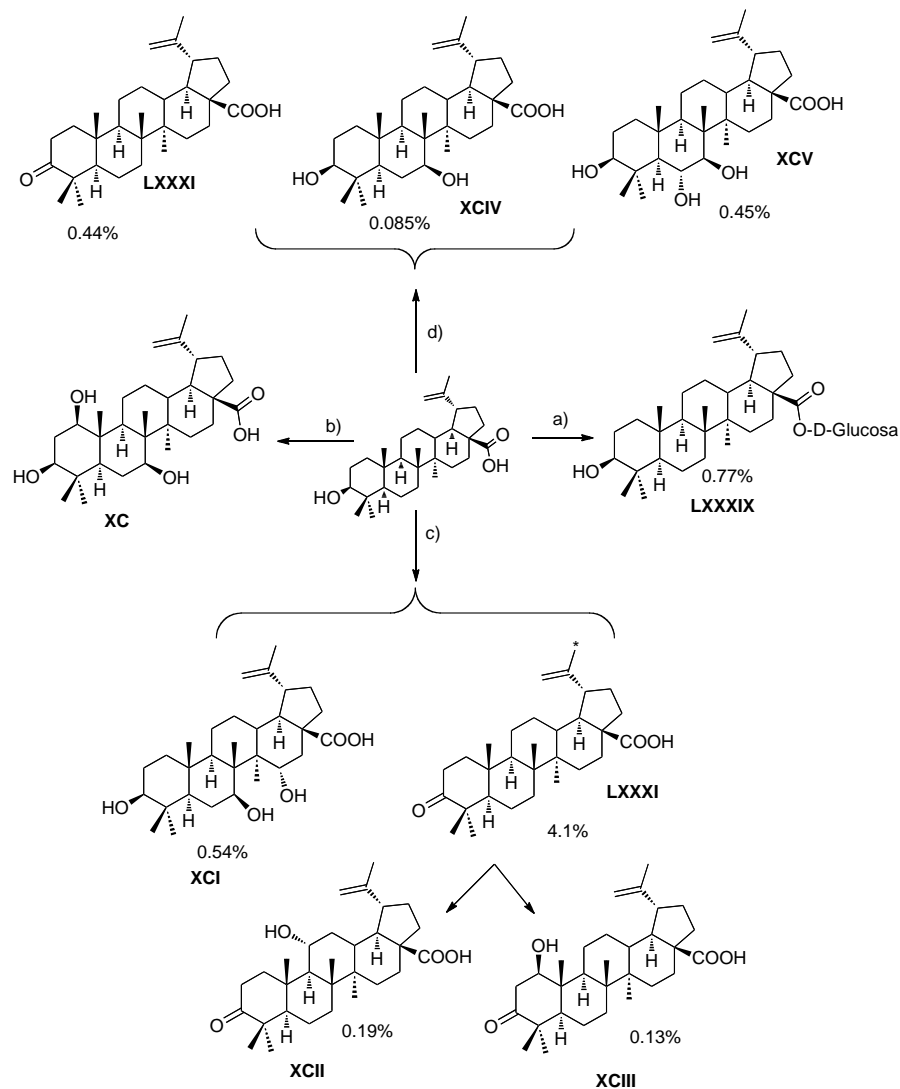
Por último, un grupo de enzimas bastante grande que al parecer se encuentra en casi cualquier organismo es el grupo de los citocromo p450 (detalles mas específicos se encuentran en el apartado de anexos), sistemas capaces de desarrollar oxidaciones, reducciones y peroxidaciones que pueden ser utilizados para diferentes tareas, por ejemplo, en la síntesis de químicos finos (Muffler, 2010). El principal problema al tratar de purificar estos sistemas enzimáticos es su inestabilidad y baja expresión que poseen (Van den Brink, 1998), además de que en su mayoría dependen de la interacción con uno o más proveedores de equivalentes redox (como las cadenas de transferencia de electrones) para llevar a cabo la vasta gama de reacciones que son capaces de catalizar, razón por la que su uso como sistemas purificados puede llegar a ser complicada. En 2006, Fujii utilizó un sistema recombinante de citocromo-p450 monoxigenasa proveniente de *Nonomuraea recticatena* expresado en células completas de *Escherichia coli* para hidroxilar el ácido oleanólico (LXXI) y obtener ácido queretaroico. Adicionalmente, su interés por mejorar los resultados obtenidos lo llevó a usar lisados celulares y NADH/NADPH como cofactores redox logrando incrementar en un 17% los rendimientos en comparación con la estrategia de las células completas. Este hallazgo puede ser un indicador de la mínima permeabilidad al ácido oleanólico que existe en la célula impidiendo que esté disponible el sustrato para llevar a cabo la reacción. Por lo anterior señala que una aproximación con el uso de lisados celulares puede ser una herramienta poderosa para identificar moléculas indetectables al usar células completas debido a la falta de permeabilidad de la membrana celular (Muffler, 2010).

1.7.1. Bioconversiones del ácido betulínico

La bioconversión del ácido betulínico se ha visto limitada a pocos trabajos (**Esquema 14 y Cuadro 7**) a nivel mundial. En su mayoría estos han sido desarrollados con el uso de células microbianas, mientras que el uso de enzimas purificadas se ha visto bastante limitado.

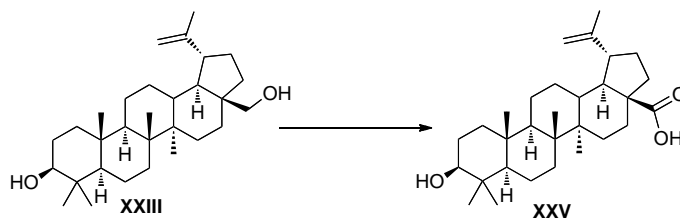
a) Utilizando células completas: El primer informe sobre procedimientos microbianos hecha por Chatterjee (1999), describe la producción de un nuevo triterpenoide (LXXXIX) pentacíclico glicosidado (éster 28-O- β -glucopiranosílico del ácido betulínico) con un rendimiento del 0.77% utilizando una suspensión de células en reposo de *Cunninghamella sp.* NRRL 5695 (**Esquema 14 a**).

La biotransformación del ácido betulínico (**XXV**) hecha por Kouzi (2000) con células en crecimiento del hongo *Cunninghamella elegans* ATCC 9244 (**Esquema 14 b**) produjo un metabolito más polar vía la introducción de dos grupos hidroxilos en las posiciones C-1 y C-7 resultando en la formación del (**XC**) ácido tri-hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (Muffler, 2010). Un año mas tarde Chaterjee, (2000) aisló tres derivados hidroxilados (**XCI-XCIII**) en posiciones C-1, C-7, C-11 y C-15 del ácido betulínico (**XXV**) y ácido betulónico (**LXXXI**) utilizando una suspensión de células en reposo de *Bacillus megaterium* (**Esquema 14 c**). Ese mismo año, Kouzi observó la capacidad de esta misma cepa para producir metabolitos oxidados en la posición C-3, C-7 y C-6 (**LXXXI, XCIV, XCV**), mientras que el uso de células en crecimiento de *Mucor mucedo* produjo un metabolito idéntico al obtenido con *Bacillus megaterium* (**Esquema 14 d**) oxidado en posición C-7 (**XCIV**).



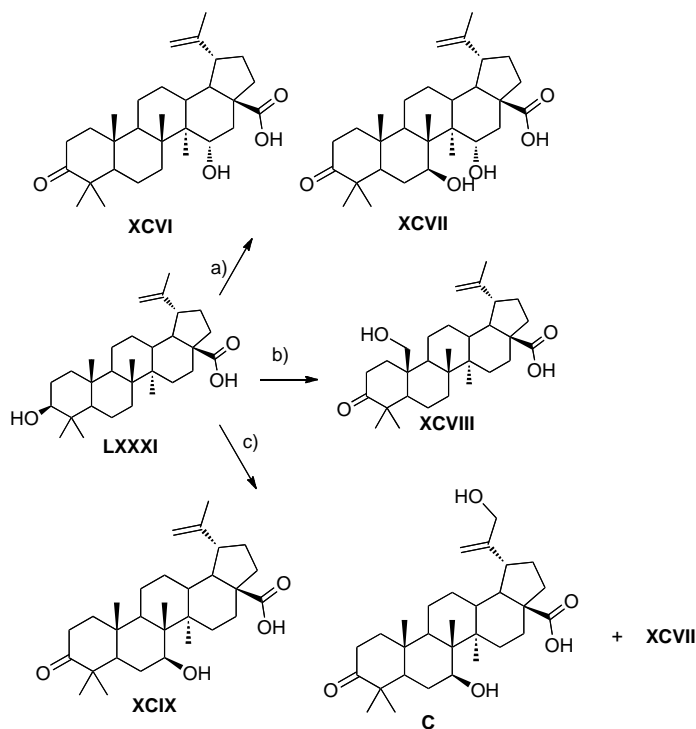
Esquema 14. Biotransformaciones de ácido betulínico; a)Chaterjee 1999, b) y d) Kouzi 2000, c)Chaterjee 2000

A pesar de que existen pocos informes sobre transformaciones de triterpenos en general y en especial del tipo lupano llevadas a cabo por hongos (Bastos, 2007; Qi-he, 2009), un estudio reciente ha mostrado la capacidad que tienen los hongos del género *Arthrotrrys*, *Chaetophoma*, *Dematium* y *Colletotrichum* para llevar a cabo reacciones de oxidación selectivas sobre sustratos con esqueleto del tipo lupano como el ácido betulínico (XXV) y el betulónico (LXXXI). Muy recientemente, varios hongos filamentosos fueron probados para llevar a cabo la transformación de la betulina (XXIII) en ácido betulínico (XXV) y de estos, dos cepas de *Aspergillus* (*A. foetidus* ZU-G1 y *A. oryzae* AS 3.498) mostraron poseer una gran capacidad para oxidar el grupo hidroxilo en posición C-28 (Esquema 15). El mecanismo enzimático de esta reacción no ha sido elucidado (Muffler, 2010).



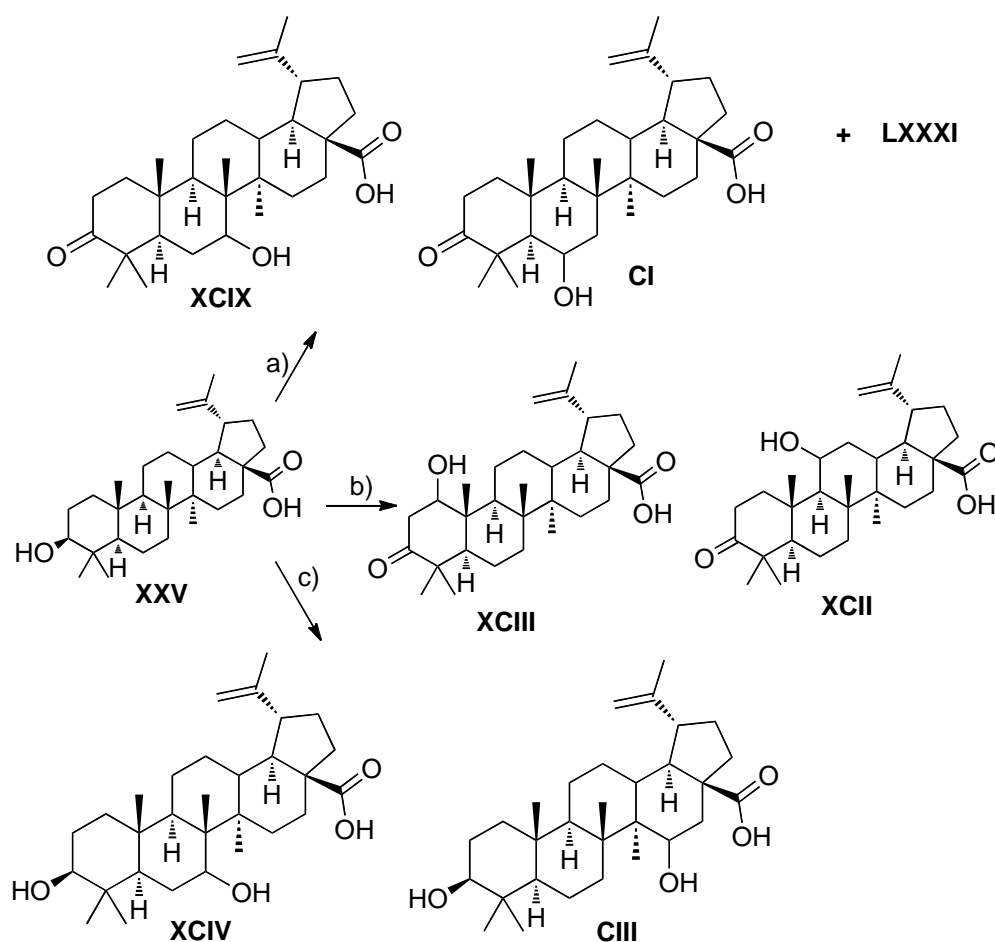
Esquema 15. Biotransformaciones de betulina por *A. foetidus* y *A. oryzae*

Se pudieron efectuar Oxidaciones selectivas en las posiciones C-7, C-15, C-25 y C-30 (Esquema 16) del ácido betulónico (LXXXI) utilizando los hongos *Arthrotrrys* (c) y *Chaetophoma* (b), aislados de la corteza de *Platanus orientalis*, y *Colletotrichum* (a) aislado de hojas de maíz (Bastos, 2007).



Esquema 16. Biotransformaciones del ácido betulónico con los hongos
a) *Colletotrichum*, b) *Chaetophoma*, c) *Arthrotrrys*

La formación del ácido betulónico (LXXXI) a partir del ácido betulínico (XXV) se ha llevado a cabo utilizando dos cepas de *Bacillus megaterium*: la cepa ATCC 14581 (Esquema 17 a) produjo ácido betulónico (LXXXI) y dos derivados hidroxilados en las posiciones C-7 (XCIX) y C-6 (CI), mientras que las células en reposo de la cepa ATCC 13368 (Esquema 17 b y c) produjeron derivados hidroxilados en las posiciones C-1 (XCIII) y C-11 (XCII) del ácido betulónico (LXXXI) y derivados hidroxilados en posición C-7 β (XCIV) y C-15 α (CIII) del ácido betulínico (Muffler, 2010).



Esquema 17. Biotransformaciones del ácido betulínico con *Bacillus megaterium*
a) Cepa ATCC 14581, b) y c) Cepa ATCC 13308

Algunas de las transformaciones de triterpenos que se han llevado a cabo hasta el momento se presentan a continuación.

Cuadro 7. Biotransformaciones de terpenos (Muffler, 2010)

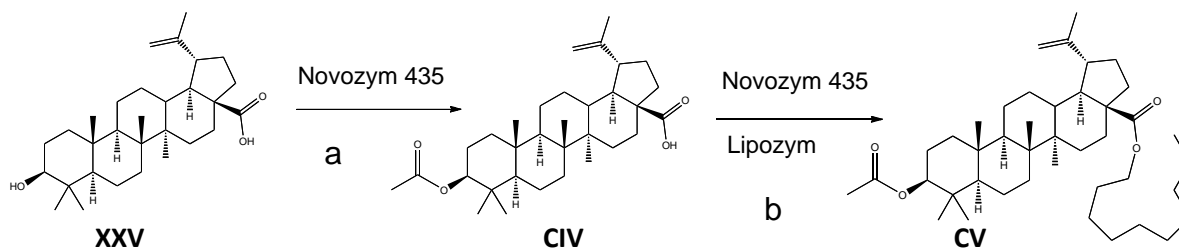
Triterpenoide	Microorganismo	Reacción	Referencia
ácido ursólico	<i>Nocardia sp.</i> NRRL 5646	Esterificación del grupo carboxilo en C-28	Zhang, 2005
		Conversión del esqueleto de ursano al esqueleto de oleanano por migración del grupo metilo de C-19 a C-20	
	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	Deshidrogenación del grupo hidroxilo en C-3	Ibrahim, 2008
ácido oleanólico	<i>Nocardia sp.</i> NRRL 5646	Esterificación del grupo carboxilo en C-28	Zhang, 2005
	<i>Cunninghamella blakesleena</i>	Hidroxilaciones diversas en C-1, C-7 y C-13	Parra, 2009
		Deshidrogenación del grupo hidroxilo en C-3	
		Formación de lactonas	
<i>Chaetomium longirostre</i> FR-1095	Ruptura oxidativa del anillo A, hidroxilación en C-21	Shirane, 1996	
ácido liquirítico	<i>Curvularia lunata</i> ATCC 13432	Hidroxilaciones en C-7 y/o C-15	Parra, 2009
	<i>Cunninghamella</i> ATCC 3299		
ácido betulínico	<i>Nocardia sp.</i> NRRL 5646	Esterificación del grupo carboxilo en C-28	Zhang, 2005
	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	Deshidrogenación del grupo hidroxilo en C-3	Kouzi, 2000
		Hidroxilación en C-6 y C-7	
	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 13368	Deshidrogenación del grupo hidroxilo en C-3	Chaterjee, 2000
		Hidroxilaciones en C-7 y C-15	
	<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 9244	Hidroxilaciones diversas en C-1 y C-7	Kouzi, 2000
<i>Cunninghamella sp.</i> NRRL 5695	Introducción de un glucopiranosido en C-28	Chaterjee, 1999	
Senegéina	<i>Nocardia sp.</i> NRRL 5646	Esterificación del grupo carboxilo en C-28 y ruptura del enlace C-C en posición C-12	Qian, 2009

Continuación del cuadro 7. Biotransformaciones de terpenos (Muffler, 2010)

Triterpenoide	Microorganismo	Reacción	Referencia
ácido betulónico	<i>Nocardia sp.</i> NRRL 5646	Esterificación del grupo carboxilo en C-28, hidroxilación en C-2	Qian, 2009
	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 13368	Hidroxilaciones diversas en C-1, C-7 y C-11	Chatterjee, 2000
	<i>Chaetomium longirostre</i> FR-1095	Ruptura oxidativa del anillo A, hidroxilación y descarboxilación	Akihisa, 2002
Betulina	<i>Aspergillus foetidus</i> ZU-G1	Transformación del grupo carboxilo en C-28 a un grupo hidroxilo	Chen, 2009
	<i>Aspergillus oryzae</i> AS 3.498		
ácido 23-hidroxibetulónico	<i>Nocardia sp.</i> NRRL 5646	Esterificación del grupo carboxilo en C-28	Zhang, 2005
ácido glicirretínico			

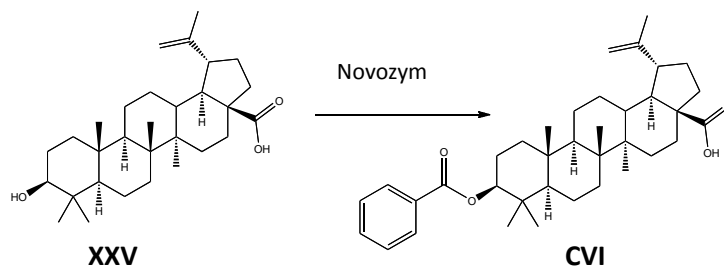
b) Utilizando enzimas

El primer informe que se tiene sobre la preparación enzimática de derivados del ácido betulónico (**XXV**) en disolventes orgánicos (Anishah, 2004) describe la preparación del ácido 3 β -acetoxi-lup-20(29)-ene-28-oico (**CIV**) en 85% de rendimiento usando Novozym 435 como catalizador (**Esquema 18**). La modificación posterior de este derivado llevada a cabo por las lipasas inmovilizadas (Novozym 435 y Lipozym) de *Candida antarctica* y *Mucor miehei* (**Esquema 18**) resultó en la formación del 3 β -acetoxi-lup-20(29)-ene-28-oato de decilo (**CV**). Al estudiar los parámetros que afectan la reacción, se encontró que usando Novozym 435, un tiempo de reacción de 24 horas, una actividad acuosa de 0.33 y una proporción sustrato:agente acilante de 1:15 en cloroformo, se obtenían los mayores rendimientos.



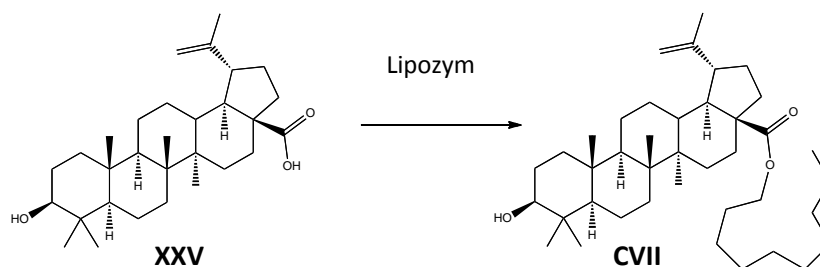
Esquema 18. Esterificación enzimática del ácido betulónico (Anishah, 2004)
a) Anhídrido acético, b) 1-decanol

La síntesis enzimática del ácido 3-O-benzoilbetulínico (**CVI**) con cloruro de benzoilo fue descrita por Yamin en 2004 y 2008 (**Figura 19**) y debido a la promisoría actividad citotóxica de este derivado, se realizaron estudios de optimización encontrándose que la enzima Novozym tenía una muy buena eficiencia catalítica de manera que los rendimientos de la reacción fueron del 45.3%. Las condiciones óptimas encontradas mediante una metodología de superficie de respuesta fueron: 12 horas de reacción a una temperatura de 50°C utilizando cloroformo, una actividad acuosa de 0.12, 150 mg de enzima.



Esquema 19. Síntesis enzimática del ácido 3-O-benzoilbetulínico (Yamin, 2004 y 2008)

La esterificación del grupo carboxílico del ácido betulínico (**XXV**) llevada a cabo por una lipozima (lipasa inmovilizada) en un medio orgánico (cloroformo) fue descrita por S. Omar un año más tarde en 2005 (**Figura 20**). Las condiciones de reacción (agitación en un baño María a 37°C durante 24 horas) bajo las cuales el ácido betulínico (**XXV**) se esterificó con el 1-decanol ofrecieron elevados rendimientos de formación del éster 3 β -hidroxi-lup-20(29)-ene-28-oato de decilo (**CVII**).

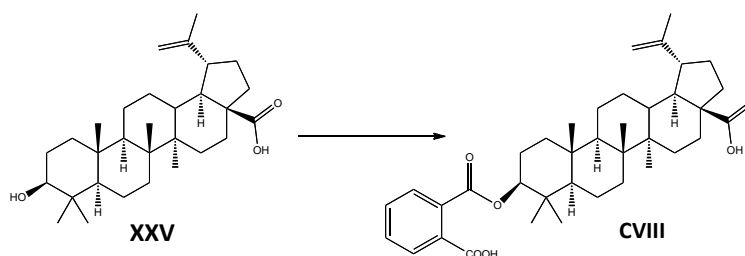


Esquema 20. Síntesis enzimática del éster 3 β -hidroxi-lup-20(29)-ene-28-oato de decilo (S. Omar, 2005)

La introducción de grupos polares (ftalatos, aminoácidos o azúcares) en posiciones C-3 y C-28 del ácido betulínico (**XXV**) se han informado con anterioridad utilizando métodos químicos. Sin embargo diversos problemas de toxicidad, purificación y costos entre otros, motivaron a llevar a cabo un estudio de optimización basado en un modelo de respuesta de superficie para sintetizar el ácido 3-O-ftalil-betulínico (**CVIII**) usando la lipasa de *Cándida antarctica* (Novozym 435) como catalizador (**Esquema 21**).

De este estudio se encontró que se pueden conseguir altos rendimientos cuando se tienen concentraciones elevadas del sustrato en presencia de un co-disolvente, sin embargo, cuando el sustrato se encuentra en exceso, la viscosidad de la fase líquida alrededor de la enzima se eleva haciendo que los reactantes no se mezclen adecuadamente. Adicionalmente se observó que un incremento tanto en la concentración de la enzima utilizada como en la temperatura de la reacción favorecen el rendimiento de la misma, sin embargo, un exceso en alguna d estas variables puede llevar a la disminución del rendimiento debido a un efecto limitante del sustrato o bien por la desactivación de la enzima.

Basados en el modelo de superficie de respuesta para esta reacción, los autores encontraron que las condiciones óptimas para la síntesis enzimática del ácido 3-O-ftalil-betulínico (**CVIII**) ocurre en 64.7% de rendimiento en un tiempo de reacción de 20.3 horas a una temperatura de 53.9°C, utilizando 145.6 mg de la enzima y una relación molar ácido betulínico : anhídrido ftálico 1:1.11 (Ghaffari, 2010).



Esquema 21. Síntesis enzimática del ácido 3-O-Ftalil-betulínico (Ghaffari, 2010)

Es evidente que hoy día se cuenta con un amplio conocimiento sobre las transformaciones en sistemas biológicos, además de que se ha incrementado el interés por los procesos biotecnológicos debido a la habilidad que tienen los sistemas microbianos y enzimáticos para funcionalizar posiciones no activadas dentro de una molécula, adicionalmente, aun existen aspectos fundamentales que no han sido elucidados sobre el comportamiento enzimático en medios no acuosos (Khmelnitsky, 1999), razón por la cual es necesario continuar investigando sobre este apasionante tema.

CAPITULO 2

OBJETIVOS

Dada la importancia que tiene el ácido betulínico para la obtención de derivados que permita el desarrollo de nuevos fármacos contra enfermedades importantes como el cáncer o el VIH, y tomando en cuenta las bondades y características interesantes que presentan los procesos biotecnológicos, se plantean los siguientes objetivos.

Objetivo General

Evaluar la capacidad de los sistemas biológicos para realizar modificaciones estructurales al ácido betulínico que permitan en un futuro obtener de forma biológica sus derivados

Objetivos Particulares

Identificar la presencia del ácido betulínico en 4 especies vegetales y cuantificar su contenido por HPLC como un esfuerzo por encontrar fuentes de este triterpeno alternas a las ya existentes.

Extraer y purificar a escala preparativa el ácido betulínico a partir de la materia prima cuyo contenido resulte más elevado.

Evaluar las esterificación de la posición C-3 del ácido betulínico empleando siete lipasas comerciales (PSL, CRL, ECL, ArEst, CCL-IV, RM-IM y CAL-B).

Evaluar las esterificación de la posición C-28 del ácido betulínico empleando siete lipasas comerciales (PSL, CRL, ECL, ArEst, CCL-IV, RM-IM y CAL-B).

Evaluar los procesos de biotransformación del ácido betulínico utilizando cultivos celulares del género *Aspergillus sp.* y de cepas aisladas de la corteza del mismo árbol del que fue extraído.

CAPITULO 3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y métodos

En los cuadros 8, 9 y 10 se muestran los reactivos, equipos y material biológico empleados.

Cuadro 8 Reactivos utilizados

Reactivos					
Nombre	Procedencia	Grado	Nombre	Procedencia	Grado
Acetato de Etilo	Reasol	Analítico	Eter de Petróleo	Química Meyer	Técnico
Acetona	Distribuidora Química ALVI	Q.P.	Extracto de levadura	Bixon	Técnico
ACN	Fermont	HPLC-MS	KH ₂ PO ₄	J.T.Baker	Analítico
Ac. Acético Glacial	J.T.Baker	Q.P.	K ₂ HPO ₄	J.T.Baker	Analítico
Ac-octanoico		Reactivo	Glucosa	Sigma	Analítico
H ₂ SO ₄	J.T.Baker	Q.P.	Hexano	Reasol /J.T. Baker	Analítico / HPLC
PDA	Bixon	Técnico	MeOH	Distribuidora Química ALVI	Q.P.
Carbón activado	Merck	Reactivo	MeOH	J.T. Baker	HPLC-MS
CH ₂ Cl ₂	Distribuidora Química ALVI	Q.P.	Anisaldehído	Sigma	Reactivo
DCC	Fluka	Reactivo	Sulfato de amonio	Sigma-Aldrich	Reactivo
DMAP		Reactivo	Sulfato de Cerio IV	Aldrich	Reactivo
EtOH absoluto	Analytyka	Reactivo	MN gel de sílice 60 malla 200-400	Macherey-Nagel	Reactivo

Cuadro 9 Equipos

Equipo					
Equipo	Modelo	Marca	Equipo	Modelo	Marca
Autoclave	Hirayama	Amerex Instruments	Lampara de UV (254 y 366 nm)	-	Camag
Agitador orbital	Max Q 4000	Thermo Scientific	Liofilizadora	77530-00 I	Labconco
Campana de flujo laminar	1001	VECO	Rotavapor	R-205	BUCHI
HPLC Binary Pump	2487	Waters	Baño Ultrasónico	1510R-MTH	Branson
HPLC Dual λ Absorbance Detector	1525	Waters	Placa de aluminio 20 X20	Alugram SIL-G 60/ UV245 nm, 0.2 mm	Macherey Nagel
HPLC Syring 50 μ L	1705	Hamilton	Placa de vidrio 20 X 20 cm	SIL-G 60/ UV245 nm, 0.2 mm	Macherey Nagel
HPLC Columna	Symetry C-18, 5 μ m, 3.9 x150 mm	Waters	Placa preparativa 20 X 20 cm	SIL-G 200/ UV245 nm, 2 mm	Macherey Nagel

Cuadro 10 Material biológico (Especies vegetales)

Árbol	Familia	Nombre científico	Procedencia	Recolección
Fresno	Oleaceae	<i>Fraxinus uhdei</i>	UNAM-CU, DF	Feb-Mar 2009
Haya	Platanaceae	<i>Platanus mexicana</i>	Parque España, D.F. / Jalapa, Ver.	Mar-Jul 2009 / Sept-Oct 2009
Liquidambar	Hamamelidaceae	<i>Liquidambar styraciflua L.</i>	UNAM-CU, DF	Mar-Abr 2009
Abedul	Betulaceae	<i>Alnus acuminata</i>	UNAM-CU, DF	Nov 2008 - Feb 2009

Cinco cepas del género *Aspergillus* fueron proporcionadas por el laboratorio 221 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM. Adicionalmente, a partir de la corteza del árbol de *platanus mexicana* fueron aislados cuatro cultivos celulares en el laboratorio 321 del mismo departamento, cuyas características morfológicas observadas bajo el microscopio permitieron identificar la presencia de bacilos esporulados, levaduras, estructuras levaduriformes o estructuras de hifas sin septos, que parecen corresponder a alguna especie de hongo zygomycete perteneciente a la familia *mucoraceae*.

Cuadro 11 Material biológico (Células microbianas)

Colección E-221		Cepas de <i>Platanus mexicana</i>	
Clave	Cepa	Clave	Cepa
100	Negra**	1	Bacilos y levaduras
402	Niger*	2	Micelio***
460	Negra**	3	Bacilos y levaduras
3112	Awamori	4	Bacilos y levaduras
4030	Negra**		
*Cepa de referencia ** <i>Aspergillus niger</i> (genérico) ***Aparentemente puro			

Siete enzimas comerciales (**Cuadro 12**) pertenecientes al grupo de las hidrolasas fueron utilizadas como parte de un ensayo exploratorio de la transformar el ácido betulínico (**XXV**).

Cuadro 12 Material biológico (Enzimas comerciales)

Enzimas comerciales	
Clave	Nombre
PSL	Chirazyme L-1, Lipasa de <i>Pseudomonas cepacea</i>
CRL	Aldrich, Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
ECL	Lipasa de <i>Candida cylindracea</i> ¹
ArEst	Esterasa ²
CCL-IV	Sigma, Lipasa de <i>Candida cylindracea</i>
RM-IM	Lipozyme, RM-IM de novozymes
CALB	Lipasa de <i>Candida antarctica-B</i>

1 proporcionada por Edmundo Castillo

2 Origen Alemán

Reveladores cromatográficos

a) Sulfato cérico: Revelador de uso general para cromatografía en capa fina. En un matraz Erlenmeyer se colocaron 300 g de hielo, se adicionaron 12 gramos de sulfato cérico y 22.2 mL de ácido sulfúrico y concentrado, la mezcla se calienta hasta completa disolución del sulfato cérico.

a) Anisaldehído: Revelador ampliamente utilizado para detectar e identificar una gran variedad de productos naturales y sintéticos, entre los que se incluyen; antioxidantes, esteroides, prostaglandinas, carbohidratos, fenoles, glicósidos, terpenos, anticuerpos y micotoxinas. Los límites de detección usualmente se encuentran entre 50 y 100 ng. El color puede variar dependiendo del tipo de compuesto, temperatura y duración del calentamiento. Los mecanismos de las reacciones involucradas no han sido elucidados. Los grupos funcionales que forman color incluyen dobles ligaduras y éteres cíclicos. El reactivo puede prepararse mezclando 0.5 mL de anisaldehído con 10 mL de ácido acético y 85 mL de metanol seguido de la adición de 5 mL de ácido sulfúrico (96%) concentrado. Una vez preparado, el reactivo permanece estable por al menos algunos meses en congelación, varias semanas en el refrigerador o de uno a dos días a temperatura ambiente.

Medios de cultivo

a) Cajas petri con medio PDA: En un litro de agua destilada se suspendieron 39 gramos de medio PDA. En otro litro se suspendieron 19.5 gramos de medio PDA y se les adicionaron 1.501 gramos de extracto de levadura. Ambos recipientes se calentaron mientras se agitaban constantemente hasta la completa disolución de los sólidos y se mantuvieron en ebullición por espacio de 1 minuto. Una vez preparados, se esterizaron en una autoclave a 121°C por espacio de 15 minutos, se dejaron enfriar y dentro de una campana de flujo laminar se vertieron en cajas petri, se enfriaron, se taparon y se conservaron en refrigeración hasta su uso.

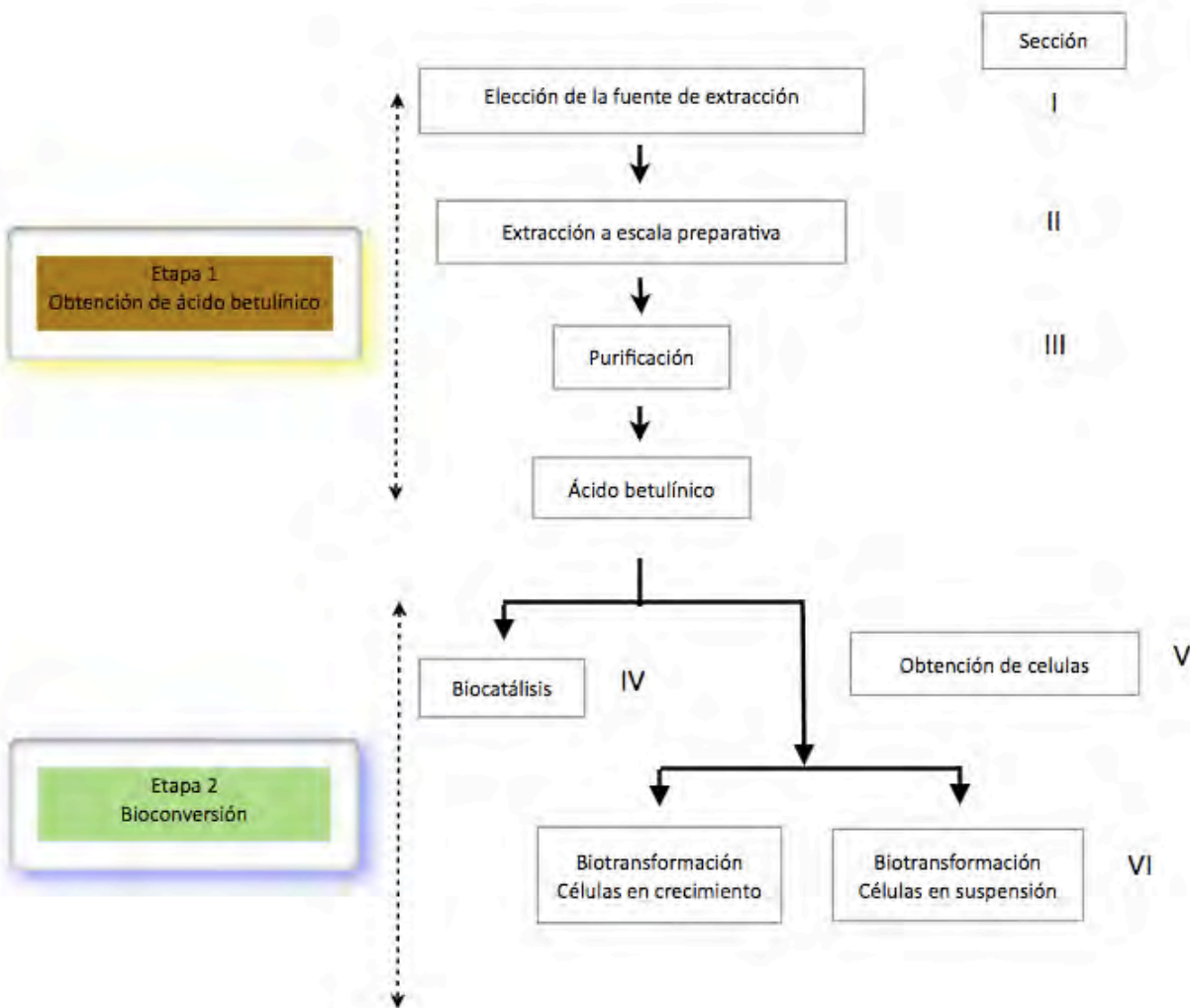
b) Medio de cultivo líquido (1): En un litro de agua destilada se suspendieron 5 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 gramos de extracto de levadura, 200 gramos de glucosa, se adiciono 0.2% de una solución buffer de fosfatos, se ajusto el pH a 5 con ácido acético y se esterilizo en autoclave a 121°C por espacio de 15 minutos, se enfrió y se conservo en refrigeración hasta su uso.

c) Medio de cultivo líquido (2) con peptona de soya: En un litro de agua destilada se suspendieron 200 gramos de glucosa, 20 gramos de peptona de soya, 10 gramos de extracto de levadura, se caliento hasta la completa disolución de los sólidos y se esterilizo en autoclave a 121°C por espacio de 15 minutos, se enfrió y se conservo en refrigeración hasta su uso.

d) Medio de cultivo PDB: En un litro de agua destilada se adicionaron 20 gramos de glucosa y 200 mL de caldo de papa (preparado en casa), se agito constantemente y se esterilizo en autoclave a 121°C por espacio de 15 minutos, se enfrió y se conservo en refrigeración hasta su uso.

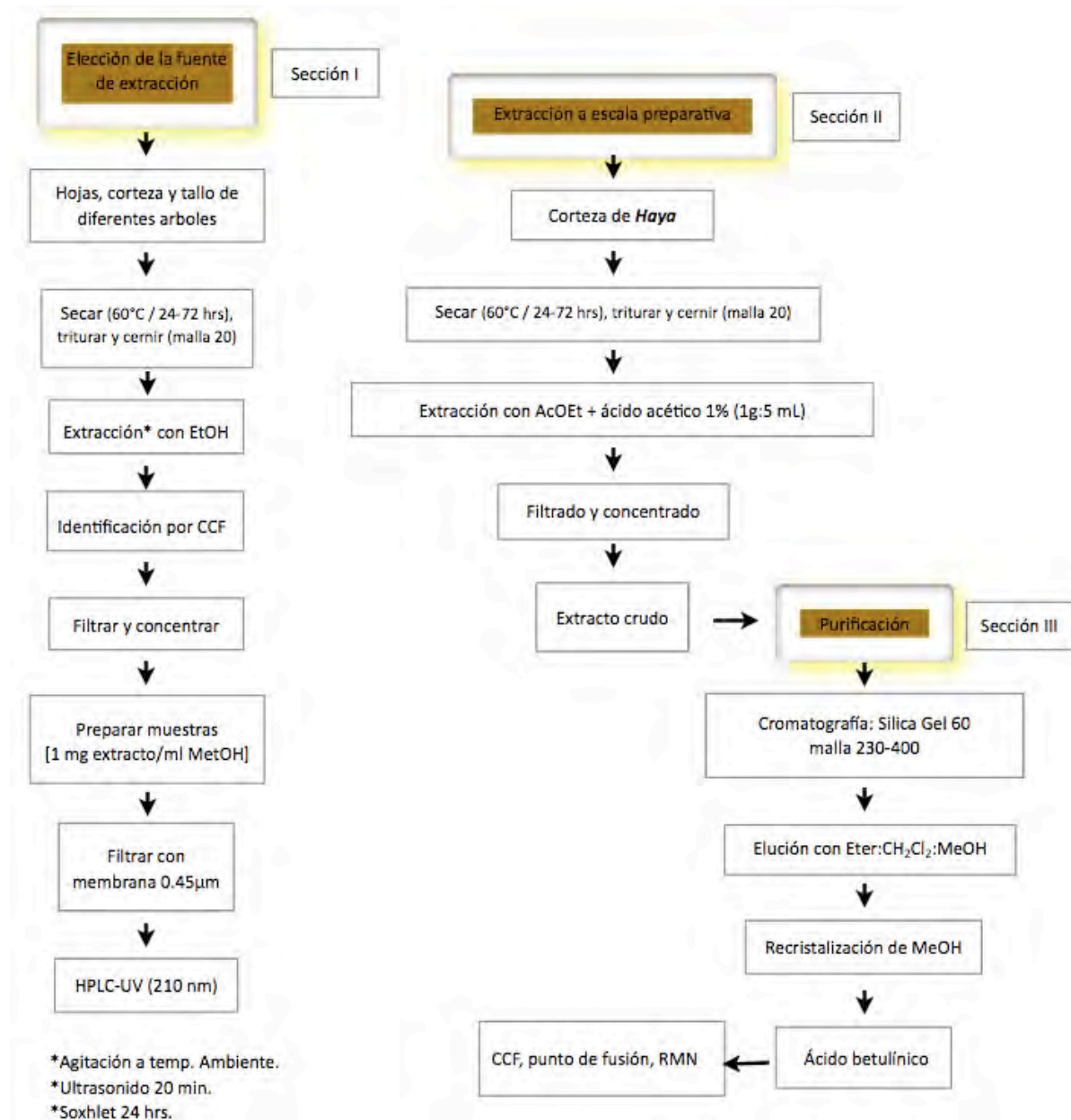
3.2. Plan de trabajo

Esta sección describe la estrategia metodológica utilizada en el presente trabajo y en el **Esquema 22** se muestra el diagrama de flujo general con el que se desarrollo la investigación, la cual comprende dos etapas fundamentales: La primera consistió en obtener a escala preparativa (gramos) la materia prima (ácido betulínico) para realizar las bioconversiones, mientras que la segunda consistió en evaluar la capacidad de los sistemas biológicos (células microbianas y enzimas) para funcionalizar la molécula del ácido betulínico. A su vez, cada etapa se divide en tres secciones, las cuales son explicadas con más detalle y en los **Esquemas 23 y 24**.



Esquema 22. Estrategia general de trabajo.

3.2.1. Etapa 1. Obtención del ácido betulínico



Esquema 23. Etapa 1. Obtención de ácido betulínico

Sección I: Elección de la fuente de extracción

Se recolectaron hojas, corteza y tallos de 4 especies de árboles (*Olea europea*, *Fraxinus uhdei*, *Platanus mexicana*, *Liquidambar styraciflua*) de la ciudad de México. *Platanus mexicana* también fue colectada de la región de San Pablo Coapan, Veracruz. Las muestras se secaron en una estufa a 60°C durante 24-72 horas, se trituraron en una licuadora hasta obtener un tamaño de partícula fino y se filtraron por una malla número 20. Se pesaron 10 gramos de cada una de las muestras y se extrajeron con 200 mL de EtOH bajo las siguientes condiciones: a) Temperatura ambiente en matraz con agitación por 8 horas, b) Soxhlet por 24 horas, c) Ultrasonido por 20 minutos. Con ayuda de un capilar se colocaron de 10 a 30 gotas de los extractos crudos sobre una placa de aluminio con 0.2 mm de espesor de gel de sílice 60-UV245 nm. Las placas se colocaron en una cámara de elución previamente saturada con una solución de Hex:AcOEt (7.5:2.5) + 10µL de ácido acético. Para el revelado se impregnaron en su totalidad con anisaldehído y se calentaron durante 1-2 minutos sobre una parrilla a 100-150°C.

Una vez identificada la presencia del ácido betulínico en los extractos crudos, éstos se decoloraron con carbón activado calentando durante 2 minutos y se filtraron tres veces hasta obtener una solución traslúcida y libre de sólidos a la cual se le retiró el disolvente a presión reducida. Los extractos limpios se colocaron en una estufa a 60°C por 24 horas, se pesaron cuidadosamente 5 mg de cada uno de ellos y se disolvieron en 1 mL de MeOH grado HPLC, se agitaron con ayuda de un vortex y/o se calentaron por 1 minuto.

Previo al análisis por HPLC se buscó la presencia de otros compuestos relacionados y para ello se aplicaron 20µL de estándares de amirina, esteroides, lupeol (**XXII**) y ácido oleanólico (**LXXI**) sobre placas de vidrio (10 X 20 cm) con 0.2 mm de espesor de gel de sílice 60-UV245 nm, se eluyeron en una cámara previamente saturada con 100 mL de una mezcla de Hex:AcOEt (7.5:2.5) + 100µL de ácido acético. Para el revelado se impregnaron en su totalidad con anisaldehído y se calentaron durante 3-5 minutos sobre una parrilla forrada de aluminio (para prevenir la ruptura de la placa de vidrio) a 100-150°C.

Para cuantificar el ácido betulínico presente en los extractos se tomaron 20µL de las muestras preparadas y filtradas con una membrana millipore de 0.45µm y se inyectaron por triplicado en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia. Se utilizó una columna C₁₈ (250 mm X 3 mm) como fase estacionaria y una mezcla de elución de acetonitrilo: ácido acético al 0.1% en una proporción 98:2 como fase móvil con un flujo de 1 mL/min. Se utilizó un detector de UV a 210 nm. La curva patrón se elaboró inyectando 20µL de disoluciones estándar de ácido betulínico disuelto en MeOH grado HPLC en un intervalo de concentraciones de 0.01-2 mg/mL.

Sección II: Extracción a escala preparativa

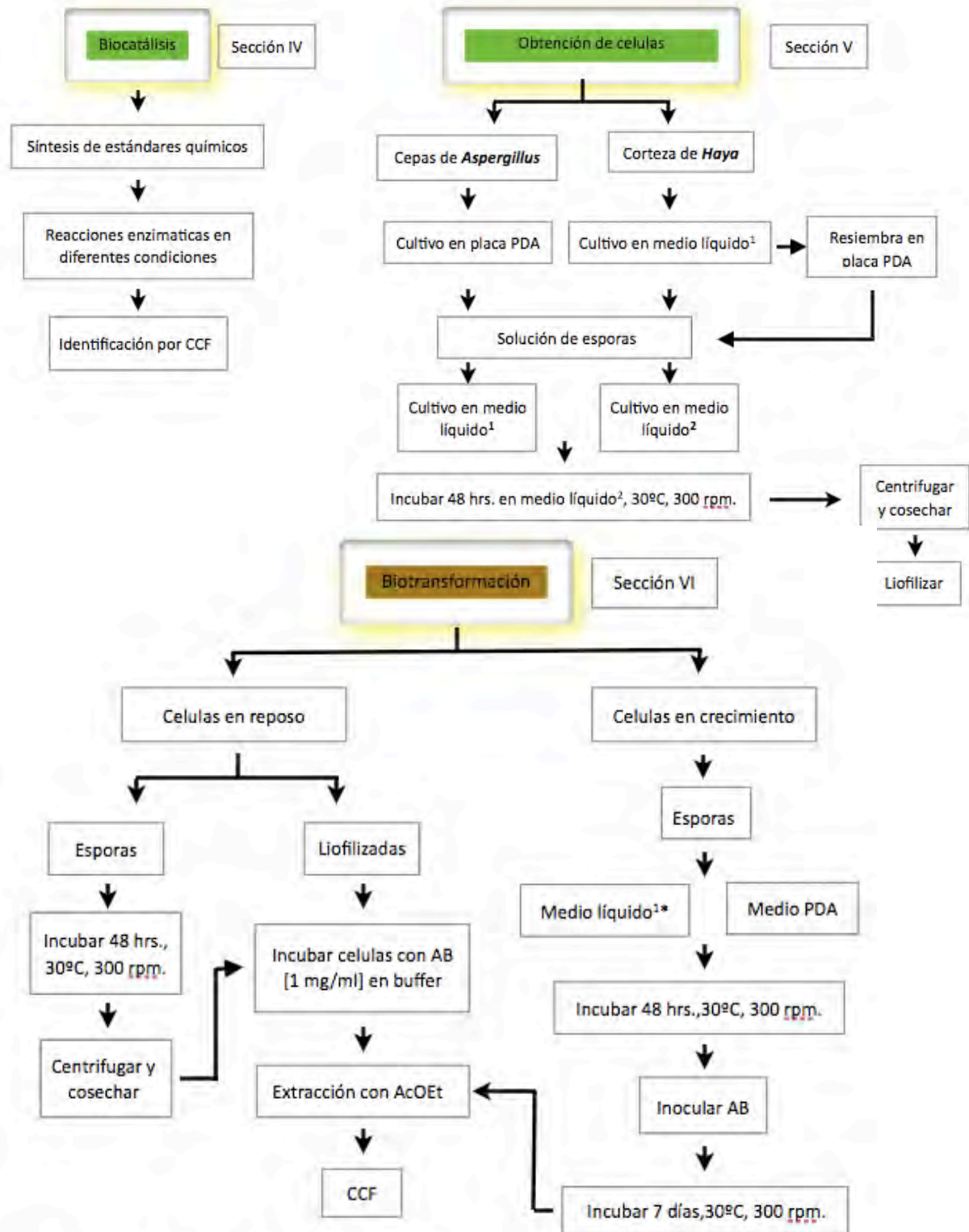
7 Kg de la materia vegetal seleccionada para su extracción (corteza de *Platanus mexicana*) fueron colectados durante los meses de Septiembre y Octubre de 2009 en la región de San Pablo Coapan, Veracruz. La corteza se secó durante una semana a temperatura ambiente y luego en la estufa a 60°C por 24 horas. Una vez seca, se trituró finamente y se paso por una malla del número 20 para obtener un polvo fino. Los 6.79 Kg obtenidos fueron divididos en dos lotes iguales que durante 21 días, fueron extraídos con una mezcla de acetato de etilo y ácido acético (1%) en proporción 1:5 (sólido:líquido) a temperatura ambiente. La mezcla de extracción se filtró y el disolvente fue eliminado a presión reducida con ayuda de un rotavapor, obteniendo un extracto amarillento con fuerte olor a ácido acético. Para eliminar el exceso de ácido acético, el extracto crudo se mantuvo por 72 horas en la estufa a 60°C y posteriormente se mantuvo en un desecador de vidrio conectado al vacío durante una semana. Finalmente, el extracto se lavó con agua fría para eliminar residuos de ácido acético, se filtró y se secó durante una noche a 60°C obteniendo un extracto crudo de color marrón u ocre.

Sección III: Purificación del ácido betulínico

Utilizando una columna de vidrio ($\Phi=4.5$ cm, H=31 cm) empacada con 190 g de gel de sílice 60 se cromatografiaron 40 gramos del extracto crudo en lotes de 9.5 gramos cada uno (correspondiente al 5% del peso de la sílice en la columna) utilizando como eluyente una mezcla de polaridad ascendente compuesta por hexanos, diclorometano y metanol, recolectando fracciones de 500 ml c/u para ser monitoreadas por CCF. Las fracciones que contenían ácido betulínico se reunieron y el disolvente se eliminó a presión reducida hasta obtener un sólido de color amarillo enriquecido con ácido betulínico.

Como parte final de la purificación el sólido amarillento se disolvió en una mezcla caliente de MeOH:AcOEt (95:5) en una proporción sólido:disolvente de 1g:70 mL. Una vez alcanzada la saturación del sistema, la disolución se filtró por gravedad dejando enfriar el filtrado a temperatura ambiente y en reposo durante 3 días hasta obteniendo cristales en forma de agujas de color blanco o ligeramente amarillentos los cuales fueron filtrados al vacío y lavados con MetOH frío obteniéndose cristales blancos de ácido betulínico puro. Este material se analizó por CCF comparándolo contra estándares de ácido betulínico y alcohol betulínico (betulinol /betulina) y contra una mezcla del material aislado enriquecido con estándares. Las placas se desarrollaron sobre una cámara saturada con una solución de Hex:AcOEt (7.5:2.5) + 10 μ L de ácido acético y se revelaron con anisaldehído. Adicionalmente, se determinó su pureza por el análisis de los espectros de RMN¹H y RMN¹³C.

3.2.2. Etapa 2. Bioconversión



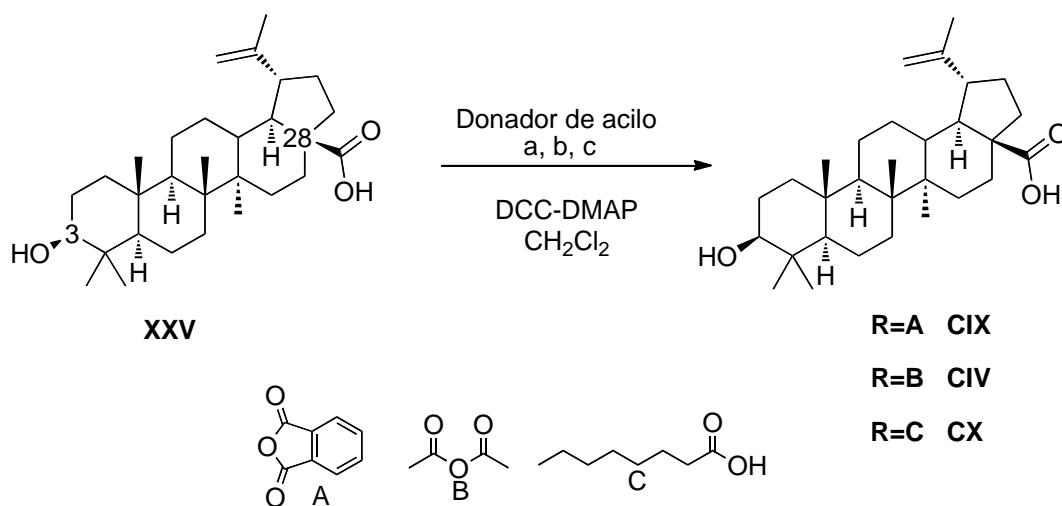
*Buffer, extracto de levadura, glucosa, sulfato de amonio

Esquema 24. Etapa 2. Bioconversión del ácido betulínico

Sección IV: Biocatálisis

a) Preparación química de estándares

La preparación química de los ésteres en C-3 (**Figura 25**) y C-28 (**Figura 26**) del ácido betulínico fué necesaria para contar con compuestos que habrían de servir como referencia para comparar con las reacciones enzimáticas que se deseaba evaluar.



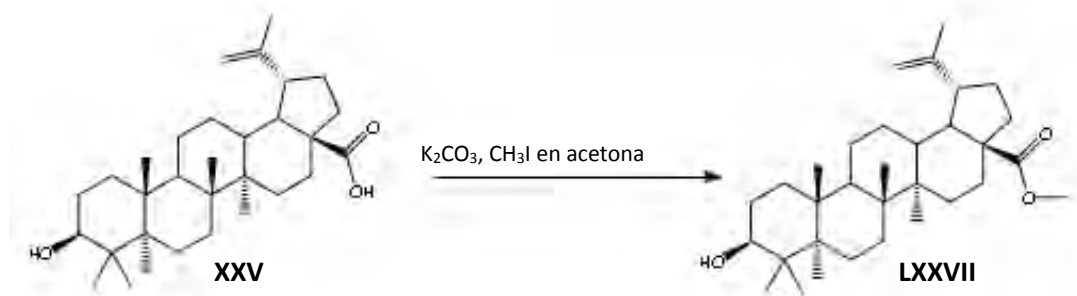
Esquema 25 Síntesis química de ésteres (C-3) del ácido betulínico

Donador de grupo acilo: a) Anhídrido ftálico; b) Anhídrido acético; c) Ácido octanoico

Para sintetizar el ftalato del ácido betulínico (**CIX**) se colocaron 53 mg (0.116 mmoles) de ácido betulínico (**XXV**), 73 mg (0.486 mmoles) de anhídrido ftálico y 26 mg (0.21 mmoles) de DMAP en un matraz de bola, se adicionaron 5 mL de piridina, se agitó con ayuda de un agitador magnético durante toda la noche (19 hrs) y se mantuvo a 60°C. La reacción se monitoreó por CCF.

La síntesis química del acetato del ácido betulínico (**CIV**) se preparó utilizando una mezcla de ácido betulínico (200 mg), anhídrido acético (20 mL) y piridina (10 mL) en constante agitación magnética a temperatura ambiente durante 4 días. La mezcla de reacción se vertió en agua destilada (400 mL) y la suspensión resultante, se extrajo con AcOEt (2 X200 mL). Las fases orgánicas se reunieron y la mezcla resultante se lavó con volúmenes iguales de HCl (5%), NaOH (3%), agua destilada y una solución saturada de NaCl. Finalmente se secó con sulfato de magnesio, se filtró y concentró en rotavapor dando 190 mg (95%) del producto acetilado (**CIV**).

El octanoato del ácido betulínico (**CX**) se preparó disolviendo en un matraz bola 36 mg de DCC (0.1744 mM) y 21 mg (0.176 mM) de DMAP, en 2.5 mL de diclorometano seco (almacenado una noche con 5% p/p de mallas moleculares) se agregó una solución de 40 mg (0.0877 mM) de ácido betulínico (**XXV**) en 3.0 mL de diclorometano seco y después una solución de 19 mg de ácido octanoico en 1.5 mL de diclorometano seco. La mezcla de reacción se agitó magnéticamente durante 20 horas, se monitoreó por CCF (Hex:AcOEt; 9:1) hasta la formación completa del producto deseado y se purificó por CC (Hex:AcOEt; 9:1). De la primera fracción (20 mL) se obtuvieron 28 mg del éster (55.17% rendimiento).



Esquema 26 Síntesis química del betulinato de metilo

La síntesis del éster (C-28) metílico del ácido betulínico (**LXXVII**) se llevó a cabo tomando como referencia el trabajo hecho por Domínguez en 2010. Se mezcló 1 g de ácido betulínico (**XXV**), 14.8 g de K_2CO_3 anhidro, 74 mL de CH_3I y 74 mL de acetona. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 horas y se adicionaron 200 mL de agua destilada. La fase acuosa resultante se extrajo con AcOEt (2X200mL), las fases orgánicas se reunieron, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se concentró con ayuda de un rotavapor. El residuo resultante se recristalizó de acetona (40 mL) obteniendo 0.7 g de cristales blancos (68.2% rendimiento).

b) Biocatálisis del ácido betulínico

En el **Cuadro 13** que se presenta a continuación, se resumen las condiciones bajo las cuales se evaluó la actividad enzimática de siete enzimas comerciales (**Cuadro 12**) para esterificar las posiciones C-3 y C-28 del ácido betulínico. La comparación de sus valores de R_f con los de estándares obtenidos de forma sintética permitieron identificar si ocurría alguna transformación enzimática. Las reacciones enzimáticas se efectuaron en cuatro disolventes orgánicos, modificando las proporciones enzima:sustrato y la temperatura. El procedimiento general se describe a continuación; se colocó en un vial con disolvente seco el sustrato, la enzima y el agente acilante (anhídrido ftálico, ácido octanoico y acetato de isopropenilo) y se adicionó malla molecular (para controlar la aw). Se cerró herméticamente y se colocó en agitación constante (200 r.p.m.).

Esquema 13 Reacciones de biocatálisis del ácido betulínico

Sustrato mg (mmol)	Agente acilante mg (mmol)	Enzima (mg)	Disolvente (mL)	T°C / t
AB / Am 25 / 23.5 (0.05)	AnhF 8.8 (0.06)	CALB (88)	Hex:CHCl ₃ (1:1) (6)	55-60 °C / 7 días
AB / Am 50 / 47 (0.11)	AnhF 36 (0.24)	CALB (200)	Hex:CHCl ₃ (1:1) (40)	37°C / 32 hrs
	AnhF 16 (0.10)	CALB (50)		55 °C / 72 hrs
Am 15 (0.03)	C7-COOH 9 (0.06)	ECL / CALB (40)	Hex (2)	50 °C / 7 días
AB 16 (0.03)			CHCl ₃ (2)	
AB / Am 55 / 50 (0.12)	C7-COOH 80 (0.55)	ECL / CALB (200)	Dioxano (10)	60 °C / 10 días
AB 100 (0.21)		ECL / CALB (130)		
AB 55 (0.12)		ECL (110)		
AB 102 (0.22)	C7-COOH 100 (0.69)	ECL / CCL IV PSL / RM-IM (52)		60 °C / 7 días
AB 20 (0.04)	C7-COOH 25 (0.17)	ECL (52) PSL (100)		
AB / Am 20 (0.04)	C7-COOH 16 (0.11)	ECL / CCL IV (50)		Dioxano (2)
AB / Am 30 (0.07)	C7-COOH 70 (0.48)	ECL (40)	Dioxano (4)	30°C / 7 días
AB 55 (0.12)	AcOiso 5 mL	ECL (110)	Dioxano (10)	55 °C / 72 hrs
AB / Am 20 (0.04)	AcOiso 250 µg (0.4)	CALB (50)	t-BuOH / Py (9:1)	55°C / 10 días
Esterificación de la función ácida en C-28 por esterificación directa y transesterificación.				
AB 20 (0.04)	C10-OH 35 mg (0.22)	PSL / CRL CALB / ECL ArEST (50)	CHCl ₃ (5)	55°C / 90 hrs
MeAB 20 (0.04)				
<i>Agente acilantes:</i> AnhF (Anhídrido ftálico), C7-COOH (ácido octanoico), C10-OH (decanol), AcOiso (acetato de isopropenilo)				
Sustratos	AB (ácido betulínico), Am (Amirinas) MeAB (éster metílico del ácido betulínico).			
Enzimas	Véase Cuadro 12			

Sección V: Obtención de células

Inicialmente, se prepararon suficientes cajas petri con agar PDA y se colocaron en la estufa a 37°C por 24 horas como prueba de esterilidad. Una colección de cepas de *Aspergillus sp* (conservada en refrigeración sobre chaquira) se reactivó sembrando en cajas petri con medio PDA, incubándolas durante 72 horas a 37°C. Las cepas que NO crecieron se sembraron en medio PDA complementado con 0.3% de extracto de levadura e incubadas durante 24 horas a 37°C. Las cajas que mostraron crecimiento de micelio (**Cuadro 11**) se les agregó 5 mL de agua destilada estéril (manipuladas dentro de una campana de flujo laminar), se mezcló la solución con ayuda de una varilla de agitación en forma de "L" y con ayuda de una pipeta automática se trasvasó a un vial con tapa que se mantuvo en refrigeración hasta su uso. Se inoculó parte de la suspensión de esporas de *Aspergillus sp.* en medio líquido (1) ajustado a pH 5 y se incubó durante 48 horas a 30°C en una agitadora orbital a 300 r.p.m. El micelio se recuperó centrifugando y lavando con agua destilada y una solución salina isotónica fría. El pellet obtenido se congeló y liofilizó (5×10^{-3} MBar, -50°C) durante 48 horas. El micelio liofilizado se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

A dos matraces Erlenmeyer con 10 g de *corteza de Haya* (proveniente de Veracruz) cada uno y otros 2 matraces con 10 g de corteza del parque España (Ciudad de México) cada uno, se les agregó 100 mL de medio de cultivo líquido (1) ajustado a pH 5. Un matraz con la corteza de Veracruz y uno con la corteza del Parque España fueron incubados por 72 horas a 37°C con una agitación de 300 r.p.m. Los otros dos matraces fueron incubados en reposo a temperatura ambiente. Los cultivos, fueron resembrados en un medio líquido fresco por espacio de 48 horas bajo las mismas condiciones. De estos medios se tomó una asada y se sembró por estría en placas de PDA que fueron incubadas por 48 horas en una estufa a 30°C. De esta primera siembra en medio PDA se resembró hasta dos veces mas en medio PDA bajo las mismas condiciones y de aquí se preparó una solución de esporas que se conservó en refrigeración hasta ser utilizada. Parte de la suspensión de esporas (100µL) fué inoculada en medio líquido (2) y se incubó por 72 horas a 37°C con una agitación de 300 r.p.m. La biomasa obtenida se recupero centrifugando y lavando con agua destilada y una solución isotónica fría. El pellet se congeló, se liofilizó y se conservó en refrigeración hasta su uso.

Sección VI: Biotransformación

En un intento por obtener una metodología que permitiera funcionalizar posiciones no activadas dentro de la molécula del ácido betulínico, se evaluaron dos estrategias de biotransformación con células en suspensión y con células en crecimiento, las cuales se describen a continuación. Las reacciones fueron monitoreadas por CCF y se prepararon controles de sustrato (medio de reacción + sustrato sin microorganismos) y de medio de reacción (medio de reacción + microorganismos sin sustrato).

a) Células en suspensión

En una solución buffer de fosfatos (pH 5) se suspendieron 25 mg de micelio previamente liofilizado, y se le añadió una solución [0.1 mg/mL] de ácido betulínico (3 mg) disuelto en 1.5 mL de acetona o EtOH. La reacción se monitoreo por CCF y después de 6 días de incubación en una agitadora orbital (150 rpm) a 30 °C, el medio de reacción se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtro y evaporo a presión reducida.

Se inocularon aproximadamente 100 μL de la solución de esporas en 150 mL del medio líquido (1), se incubaron por 48 horas a 30°C y 300 rpm. Después de este tiempo, las células se centrifugaron a 20,000 rpm / 5 minutos, se lavaron con solución isotónica y agua destilada. 100 mg del pellet obtenido se resuspendio en 28.5 mL de una solución buffer de fosfatos (pH 5) y se le añadió 1.5 mL de una solución [0.1 mg/mL] de ácido betulínico (3 mg) disuelto en acetona o EtOH. Después de 6 días de incubación en una agitadora orbital (150 rpm) a 30 °C, el medio de reacción se extrajo con AcOEt y la fase orgánica se seco con NaSO_4 , se filtro y evaporó a presión reducida.

b) Células en crecimiento

Para crecer las células microbianas utilizadas durante la transformación se probaron dos medios de cultivo (medio líquido 1 y medio PDA). De igual forma que en el caso de las reacciones con células en suspensión, los cambios en la reacción fueron monitoreados por CCF y se prepararon controles de sustrato (medio de reacción + sustrato sin microorganismos) y de medio (medio de reacción + microorganismos sin sustrato).

Se inocularon aproximadamente 100 μL de la solución de esporas en matraces con 150 mL de medio de cultivo (líquido 1 o PDB) y se incubaron a 30 °C por 48 horas y 300 rpm. Transcurrido este tiempo se añadieron 2 mL de una solución de ácido betulínico [7.5 mg/mL] disuelto en acetona al medio de reacción. El sustrato que ahora se encuentra en una concentración de 0.1 mg/mL, se dejo reaccionar 7 días bajo las mismas condiciones. Después del periodo de incubación el medio de reacción se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se seco con Na_2SO_4 , se filtro y evaporo a presión reducida.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

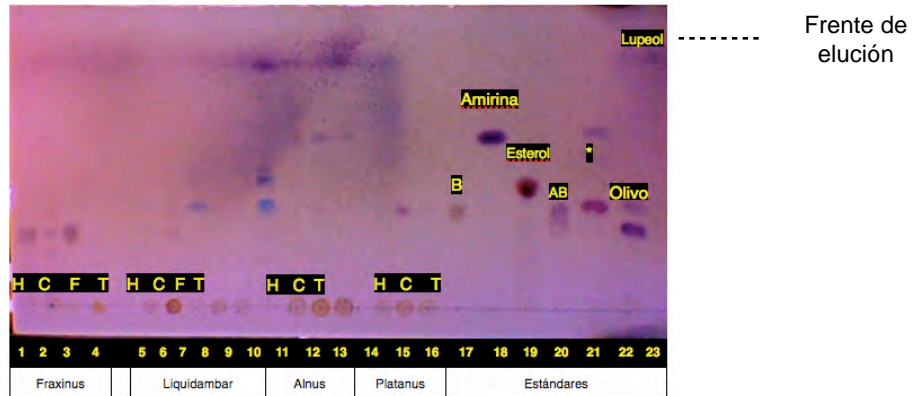
4.1. Etapa 1. Obtención del ácido betulínico

Dentro del marco teórico se comentó que el ácido betulínico (**XXV**) ha sido encontrado en gran variedad de plantas superiores del reino vegetal, que ha sido aislado por diversas metodologías y que su disponibilidad se encuentra limitada en algunas especies (Krasutsky, 2006). Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes para su extracción y a impulsar el desarrollo de metodologías analíticas que deriven en protocolos para su cuantificación. Particularmente en México, este desarrollo se ha visto limitado a muy pocas investigaciones (Djerassi, 1956; Perez-Castronera, 1997; Romo de Vivar, 2006) considerando la gran diversidad ecológica de nuestro país en sus casi 2 millones de Km² (Villaseñor, 2003).

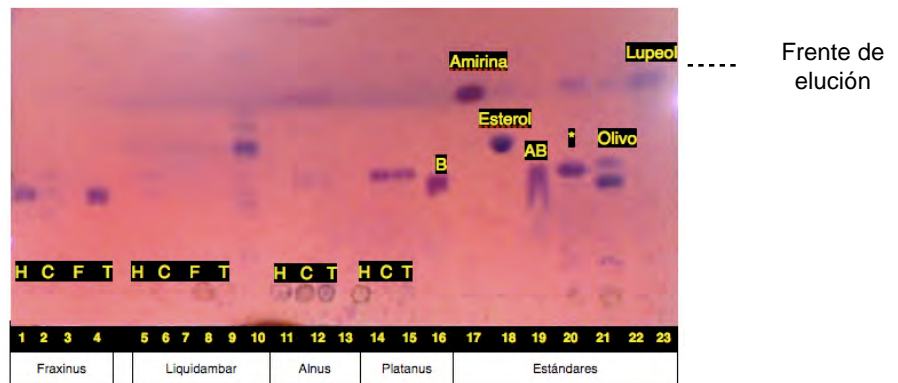
Sección I: Elección de la fuente de extracción

Como una aproximación al desarrollo de metodologías que permitan ampliar el conocimiento sobre la distribución del ácido betulínico (**XXV**) en el reino vegetal (en particular dentro de la riqueza natural de México), se llevó a cabo un análisis cualitativo por CCF y un análisis cuantitativo por HPLC de los extractos etanólicos de las 4 especies seleccionadas previamente por su amplia distribución en el territorio nacional. El disolvente utilizado para llevar a cabo el proceso de extracción fue el EtOH ya que se menciona en la literatura (Marcin, 2009) que éste disolvente permite la extracción casi completa del ácido betulínico (**XXV**) de fases sólidas.

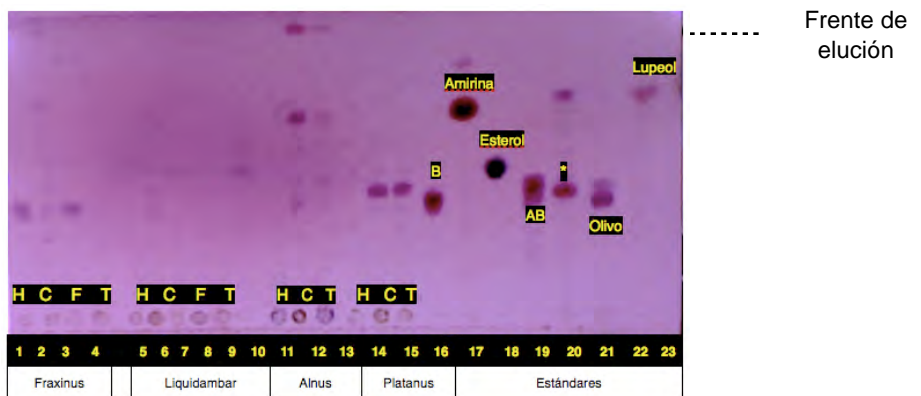
Un análisis preliminar de los extractos etanólicos obtenidos, mostró la presencia de varios compuestos que por comparación con un estándar del ácido betulínico (**XXV**) se pudo identificar su presencia en el material vegetal analizado. El sistema de elución que se utilizó (Hex:AcOEt; 7.5:2.5 adicionado con 10µL de ácido acético) permitió observar una adecuada separación de los componentes presentes en los extractos con lo cual se pudo corroborar su presencia al comparar el valor de R_f de las muestras con los estándares del ácido betulínico (R_f 0.65) y de su precursor el alcohol betulínico (R_f 0.57). Adicionalmente, utilizando estándares de terpenos relacionados al ácido betulínico, se llevó a cabo otro análisis por CCF (**Figura 27**) de las muestras evaluadas en un afán por conocer la composición de los extractos en función de las metodologías utilizadas para su obtención, además de especular sobre la eficiencia del proceso y obtener información que permitiera identificar de forma presuntiva, rápida y sencilla la fuente mas adecuada para la extracción del ácido betulínico.



A) Extracción a temperatura ambiente



B) Extracción por Soxhlet



C) Extracción por Ultrasonido

Esquema 27. CCF comparativa de los extractos en estudio eluida con un sistema Hex:AcOEt (7.5:2.5) adicionado con 10µL de ácido acético

Para efectos de comparación entre las placas, se llevo a cabo una estandarización de las muestras, aplicando en cada punto aproximadamente 0.02 mg de cada una de ellas y se utilizó una mezcla de elución de Hex:AcOEt (7.5:2.5) adicionado con 10µL de ácido acético. En las placas se observa que en las hojas y frutos de *Fraxinus uhdei* se encuentra presente una banda cuyo R_f se asemeja al del ácido oleanólico o ursólico. En el caso de los extractos de *liquidambar styraciflua*, las bandas que se identifican pueden estar relacionadas con la presencia de esteroides y terpenos pertenecientes a la familia de los oleananos y/o lupanos. Las bandas que se distinguen en los extractos de *Alnus acuminata* se cree tienen relación con la presencia de compuestos como las amirinas, los esteroides y el lupeol, mientras que las bandas presentes en los extractos de *Platanus mexicana* corroboran la presencia del ácido betulínico.

De acuerdo con **El esquema 27**, tanto la identidad como la intensidad de las bandas presentes en el extracto de la corteza de *Platanus mexicana* apuntan a que esta especie pudiera ser la fuente mas apropiada para su extracción. Adicionalmente, se observa que el perfil de compuestos presentes en los extractos puede estar influenciado por la metodología de extracción utilizada, sin embargo las limitaciones de la CCF no permiten determinar con claridad cual de los métodos de extracción pudiera ser el mas eficiente.

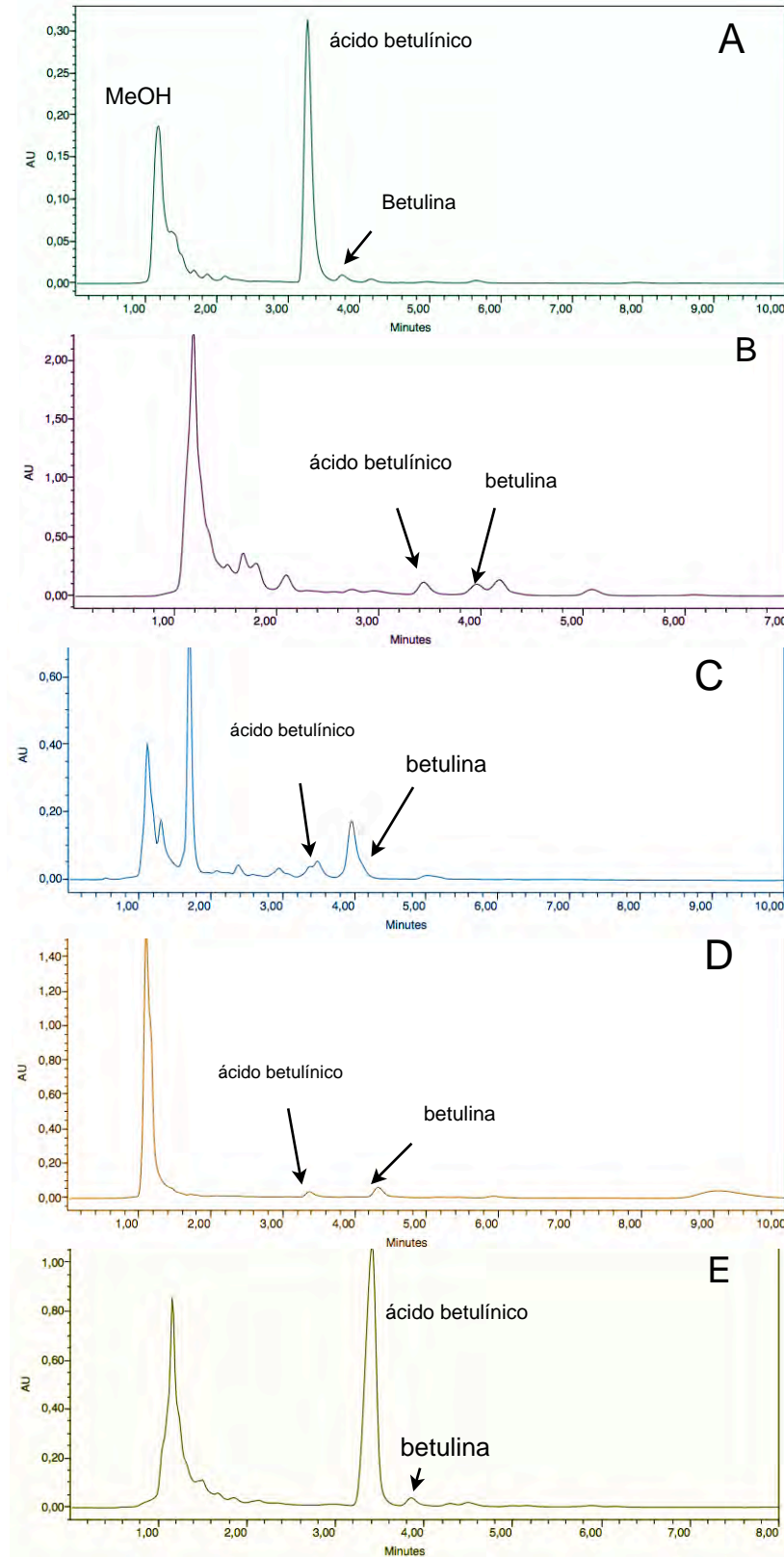
El **Cuadro 14** muestra el contenido relativo de ácido betulínico (expresado como porcentaje) en los extractos etanólicos de las 4 especies de arboles analizadas. Tal como se mencionó en el capítulo de la metodología, la extracción del ácido betulínico a partir de las matrices biológicas se realizó una sola vez y cada una de ellas fue inyectada en el cromatografo de líquidos por triplicado, por lo que, los resultados presentados a continuación se muestran como un promedio de estas determinaciones. Al parecer la corteza de *Platanus mexicana* contiene la mayor cantidad de ácido betulínico (**XXV**) con un valor del 2.7% (para el caso del extracto hecho por Soxhlet), cifra que se encuentra dentro de los valores informados en la literatura (0.09-3.41%) para el género *Platanus* (Galgon, 1999; Jager, 2009). Este hallazgo es consistente con los resultados obtenidos del análisis de CCF descrito anteriormente (**Esquema 27**), donde para el género *Platanus* se observa una banda intensa a la altura del estándar del ácido betulínico (**XXV**) mientras que para las otras especies difícilmente se puede distinguir. Aún así, al parecer el contenido de este terpeno en el resto de las especies analizadas es de aproximadamente 1.2% en promedio.

Cuadro 14. Contenido de ácido betulínico (gramos de ácido betulínico / 100 gramos de materia seca)

		Temperatura Ambiente	Soxhlet	Ultrasonido
		%	%	%
Fresno	Hojas	1.35	1.17	0.32
	Corteza	1.34	0.12	0.23
	Fruto	0.21	*	0.24
	Tallo	1.49	0.18	0.37
Liquidambar	Hojas	1.12	0.37	*
	Corteza	0.78	1.25	0.14
	Fruto	0.11	0.35	0.01
	Tallo	0.46	0.81	*
Alnus	Hojas	0.67	0.07	*
	Corteza	0.99	0.51	0.71
	Tallo	0.49	1.15	0.71
Platanus	Hojas	1.35	2.01	0.71
	Corteza	2.3	2.7	1.51
	Tallo	1.98	2.52	0.66

* No detectable

La cuantificación del ácido betulínico en los extractos obtenidos se llevo a cabo utilizando un método cuyo limite de detección fue de 0.05 mg/mL, mientras que su limite de cuantificación fue de 0.14 mg/mL. La linealidad del análisis se encuentra representada por el valor de R^2 (0.998) de la curva de calibración ($y=221397 X \pm 1035.8$) evaluada en el intervalo de 0.01-2 mg/mL. El **esquema 28** presenta de forma comparativa los cromatogramas representativos del análisis hecho a las muestras vegetales por HPLC utilizando un sistema de detección UV (210 nm) y una columna de fase reversa C_{18} . El inciso **A** representa los estándares del ácido betulínico y la betulina, El inciso **B** representa la muestra de *Fraxinus uhdei*, el inciso **C** representa la muestra de *Liquidambar styraciflua*, el inciso **D** representa la muestra de *Alnus acuminata* y finalmente el inciso **E** representa la muestra de *Platanus mexicana*.



Esquema 28. Cromatogramas comparativos por HPLC para la cuantificación del ácido betulínico

Sección II: Extracción a escala preparativa

De los resultados presentados en la sección anterior, se determinó que la fuente más apropiada para la extracción del ácido betulínico (**XXV**) es la corteza de *Platanus mexicana*, también conocida como HAYA en algunos lugares de la república mexicana y especialmente en el estado de Veracruz (CONAFOR, 2010). La elección del disolvente está ligada a las características del compuesto que se desea extraer y para el caso de los triterpenos, estos pueden ser adecuadamente extraídos con solventes como el acetato de etilo aunque en ocasiones los sistemas de extracción pueden mejorarse acidulando el medio con ácido acético (Oleszek, 2008). Por esta razón se eligió como medio de extracción una mezcla de dichos disolventes para extraer 6.79 Kg de corteza de *Platanus mexicana*, obteniendo 172.7 g de extracto crudo, lo que representa un 2.54% de rendimiento de extracción.

Sección III: Purificación del ácido betulínico

La purificación de 40 gramos de extracto crudo de *Platanus mexicana* por columna, y su posterior recristalización de MeOH, permitieron la obtención de 22.37 gramos de cristales blancos de ácido betulínico (**XXV**) en forma de agujas blancas, lo que representa un rendimiento de 1.42 gramos por cada 100 gramos de corteza seca, cantidad que representa aproximadamente el 50% de lo que se puede obtener de esta corteza según los resultados del análisis por HPLC efectuado previamente. Este hecho tiene lógica pues el procedimiento de extracción utilizado no se llevo a cabo de forma exhaustiva y además durante los procesos a gran escala presentan algunos fenómenos de transferencia de masa limitando la extracción del compuesto.

La identidad y pureza del ácido betulínico (**XXV**) se corroboró comparando su punto de fusión (302-310°C) con el de un estándar comercial (294-302°C) de pureza mayor a 98% , comparando su R_f (0.61) con el de un estándar en una placa de cromatografía en capa fina desarrollada con Hex:AcOEt (7.5:2.5) acidificada con ácido acético y mediante los datos espectroscópicos (**Cuadro 15**) del compuesto aislado.

Cuadro 15. Datos espectroscópicos del ácido betulínico aislado de *P. mexicana* (1. Peng, 1998)

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)		$\delta^1\text{H}$ (ppm)	
	Teórica ¹	Experimental	Teórica ¹	Experimental
2	28.3		1.85 (m)	1.82
3	78.1	76.6	3.45 (t, J \ 7.2 Hz)	3.60
5	55.9		0.82 (m)	
6	18.8		a : 1.56 (m) ; b : 1.38 (m)	
7	34.8		a : 1.45 (m) ; b : 1.38 (m)	
8	41.1	41.2	----	----
9	50.9		1.38 (m)	1.38
11	21.2		a : 1.43 (m) ; b : 1.21 (m)	
12	26.1		a : 1.21 (m) ; b : 1.94 (m)	1.96
13	38.6		2.74 (m)	2.75
14	42.9	41.92	-----	-----
15	30.3	29.7	a : 1.26 (m) ; b : 1.88 (m)	1.86
16	32.9	31.4	a : 1.55 (m) ; b : 2.63 (m)	2.67
17	56.6	55.1	-----	-----
18	49.8	49.4	1.77 (t, J \ 11.5 Hz)	1.78
19	47.8	48.3	3.52 (m)	3.47

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)		$\delta^1\text{H}$ (ppm)	
	Teórica ¹	Experimental	Teórica ¹	Experimental
20	151.3	149.1	-----	-----
23	28.6		1.22 (s)	1.25
24	16.3		1.00 (s)	1.1
25	16.4		0.83 (s)	0.85
26	16.4		1.06 (s)	1.03
27	14.9		1.07 (s)	1.08
28	178.8	177.7	-----	-----
29	109.9	109.0	a : 4.95 (s) ; b : 4.77 (s)	4.97; 4.80
30	19.5		1.79 (s)	2.25

4.2. Etapa 2. Bioconversión del ácido betulínico

Puesto que las bioconversiones son reacciones químicas catalizadas por células, organelos celulares o enzimas que exhiben una elevada especificidad y/o selectividad bajo condiciones suaves de reacción (Ishige, 2005), estas metodologías pueden ser utilizadas para llevar a cabo la modificación de sustratos complejos, teniendo el gran potencial de poder generar nuevos compuestos o producir los ya conocidos de una forma más eficiente (Giri, 2001). La modificación estructural (específicamente las posiciones C-3 y C-28) del ácido betulínico (**XXV**) está ampliamente informado en la literatura y gran parte de ellos son el resultado de un esfuerzo por obtener derivados que ofrezcan propiedades y actividades farmacológicas mejoradas. Las reacciones de esterificación son uno de estos ejemplos ya que los ésteres usualmente son más solubles en disolventes orgánicos que los ácidos libres lo que conduce a derivados con mejores propiedades químicas y farmacológicas (Urban, 2005).

Sección IV: Biocatálisis del ácido betulínico

a) Preparación química de estándares

Utilizando las condiciones descritas en los **Esquemas 25 y 26** se sintetizaron químicamente el acetato (**CIV**), el octanoato (**CX**) y el éster metílico (**LXXVII**) del ácido betulínico (Esquema 32) para ser utilizados como punto de referencia y verificar la formación de los productos derivados de las reacciones catalizadas enzimáticamente.

La síntesis del ftalato del ácido betulínico (**CIX**) no pudo ser concretada bajo las condiciones de reacción descritas anteriormente. Es probable que la proporción molar de anhídrido ftálico usado no haya sido suficiente para llevar a cabo la reacción tal como lo sugiere la literatura, ya que de acuerdo a reportes de Kvasnica (2005), en ocasiones el agente acilante necesita estar en exceso molar de hasta 10 veces con respecto del sustrato

b) Reacciones enzimáticas de modificación del ácido betulínico

La comparación de los valores de R_f de los compuestos sintetizados enzimáticamente contra los obtenidos de los estándares químicos en las placas cromatográficas eluidas en un sistema Hex:AcOEt (7.5:2.5) permitieron observar la formación del octanoato del ácido betulínico (**CX**) con un R_f de 0.7 al utilizar la enzima CAL-B en cloroformo o bien la enzima ECL en dioxano. En ninguna de las otras enzimas evaluadas se llegó a observar una transformación del ácido betulínico. Adicionalmente, se observó que al utilizar hexano como medio de reacción no se llevaron a cabo transformación de la materia prima. Estos resultados pueden explicarse gracias a que la actividad enzimática ha sido fuertemente correlacionada con los cambios que sufre su estructura secundaria provocados por la interacción con ciertos disolventes orgánicos. Por ejemplo, se ha visto que el uso de disolventes con un coeficiente de reparto elevado como el cloroformo o el dioxano presentan una mayor actividad enzimática en comparación con disolventes como el hexano e incluso la combinación de ellos puede favorecer la actividad enzimática (Ghaffari, 2010; Khmelnitsky, 1999).

La obtención enzimática del éster acetato del ácido betulínico (**CIV**) con un R_f de 0.8 fue posible gracias a la actividad de las enzimas CAL-B y ECL en presencia de una mezcla de *t*-BuOH y Piridina o en dioxano. La formación del producto se comenzó a observar dentro de las primeras 48 horas de reacción, sin embargo es hasta los 5 días cuando se comienza a observar una mejoría en la producción de este derivado. A pesar de que las bases orgánicas como la piridina pueden mejorar significativamente la actividad catalítica de las enzimas cuando se llevan a cabo reacciones de acilación con anhídridos (Ghaffari, 2010), la presencia de piridina en el medio de reacción no parece haber favorecido la actividad enzimática de la reacción pues la formación del producto se llevo a cabo de forma muy lenta. Quizás el agente acilante se encontraba en una proporción elevada con respecto al sustrato y si bien las reacciones de acilación pueden mejorar sus rendimientos con el uso de concentraciones elevadas de alguno de los reactantes, también podría darse el caso contrario debido a que con el exceso de alguno de ellos, la viscosidad de la fase líquida que rodea la enzima se incrementa llevandose a cabo una mezcla inadecuada de los reactivos (Ghaffari, 2010).

Para la obtención enzimática del ftalato del ácido betulínico (**CIX**), ninguna de las enzimas evaluadas llevo a cabo transformaciones visibles por CCF bajo las condiciones en las que se llevaron a cabo. Uno de los argumentos que pudiera explicar este resultado es que el anhídrido ftálico utilizado en elevadas concentraciones puede llegar a actuar como inhibidor competitivo y/o provocar la desactivación de la enzima al disolverse este en la fase micro-acuosa al rededor de la enzima modificando su pH y por consiguiente un cambio estructural de la enzima. Adicionalmente, se ha reportado que el uso de cantidades mayores a 100 mg de enzima se puede provocar un descenso en el rendimiento de la reacción debida a un efecto limitante del sustrato (Ghaffari, 2010).

La obtención del éster decílico del ácido betulínico (**CXI**) mediante la esterificación directa del grupo carboxílico en C-28 del ácido betulínico (**XXV**) o mediante la transesterificación del éster metílico del ácido betulínico (**LXXVII**) es posible en ambos casos con ayuda de las enzimas CAL-B, ECL y ArEst. Los resultados derivados de los procesos biocatalíticos evaluados en este trabajo, resaltan el gran potencial que estas enzimas poseen para llevar a cabo modificaciones estructurales a la molécula del ácido betulínico. Adicionalmente,

Sección V: Biotransformación del ácido betulínico

El **Cuadro 16** muestra las condiciones bajo las cuales se llevaron a cabo los procesos de biotransformación del ácido betulínico (**XXV**) cuya concentración en los medios de reacción fue de 0.1 mg/mL. Los experimentos donde se pudieron detectar cambios apreciables por CCF se marcaron con un asterisco (*). Estas reacciones pueden significar que bajo las condiciones indicadas, los cultivos celulares utilizados muestran actividad enzimática capaz de modificar el medio de reacción, ya sea por el cambio estructural del ácido betulínico (**XXV**) o por la producción de algún metabolito relacionado con el metabolismo de las células empleadas.

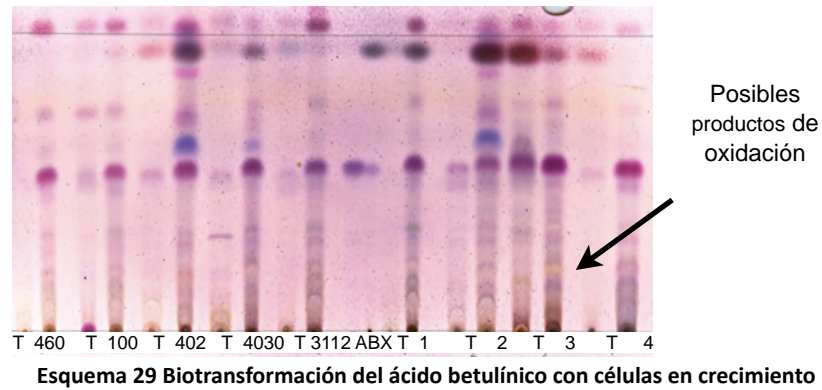
Cuadro 16 Ensayos de biotransformación del ácido betulínico

	Células	Estado	Cepa (mg)	Medio	Condiciones		
1	Reposo	Liofilizadas	100 (25)	Buffer:Disolvente** (95:5)	28-30°C 72-120 hrs (120-150 r.p.m.)	-	
2		Cosechadas	100 (100)			Buffer:EtOH (50:50 y 60:40)	-
3		Liofilizadas		100% EtOH			-
4				100 /402/ 460/ 3112/ 4030		Buffer:AcOEt (95:5)	-
5			1-4 (150-250)***			Buffer:Acetona (95:5)	-
6							Cosechadas
7		Buffer:LI (80:20)	-				
8			-				
9		-					
10 (X2)	Crecimiento	Liofilizadas	1-4/100 /402/ 460/ 3112/ 4030	Simple:Acetona (99:1)	30°C 6 días (150-200 r.p.m.)	-	
11 (X2)				PDB:Acetona (99:1)		* 1 3112	
12			1 / 3112			*(X5)	
	* Aparente actividad enzimática			**Disolvente (Etanol o Acetona)			
	*** No se desarrolló micelio						

Como primera estrategia para llevar a cabo las reacciones de biotransformación del ácido betulínico se utilizó un cultivo de células liofilizadas en reposo de la cepa número 100 en un medio bifásico constituido en su mayoría por un buffer de fosfatos y el disolvente orgánico, sin embargo no se observó al menos por CCF que existiera una transformación del ácido betulínico. Esto probablemente este relacionado con los problemas de solubilidad que presentó el ácido betulínico en el medio de reacción. Con la finalidad de superar este inconveniente se probaron varias mezclas de una disolución de buffer:EtOH con la finalidad de mejorar la solubilidad del sustrato y distribuirlo de forma homogénea en el medio de reacción. Sin embargo bajo dichas condiciones, no se observó al menos por CCF transformación alguna del ácido betulínico.

Considerando que la maquinaria enzimática de algunas cepas haya sido afectada durante los procesos de conservación de los cultivos celulares, o bien que algunos sistemas enzimáticos sean de tipo extracelular como es el caso de los citocromo P450 presentes en gran variedad de hongos filamentosos, se ensayaron reacciones de biotransformación utilizando diferentes cepas de *Aspergillus* sp. de cultivos celulares aislados de la corteza de *P. mexicana*. como células en crecimiento, células en reposo, tanto en un medio líquido simple como en un medio líquido altamente complejo como lo es el PDB. Adicionalmente, se probaron diferentes disolventes orgánicos o medios de reacción que permitieran observar por CCF algún cambio en los medios de reacción.

En el **Esquema 29** se observa una placa cromatográfica de la reacción de biotransformación del ácido betulínico usando nueve cepas de microorganismos en crecimiento dentro de un medio complejo de caldo de papa (PDB). Los carriles marcados con la letra T denotan la reacción testigo llevada a cabo, el medio de reacción en ausencia de sustrato. El carril marcado con AB denota la reacción testigo llevada a cabo con el medio de reacción, el sustrato en ausencia de microorganismos. La complejidad de la placa de CCF demuestra que se están llevando a cabo diversos cambios en el medio de reacción que pueden ser debidos a la transformación del sustrato mediante algún tipo de reacción mediada por los sistemas enzimáticos presentes en las cepas utilizadas o bien que se deban a la biosíntesis de compuestos relacionados con el metabolismo celular de los cultivos utilizados o en su defecto, que sean compuestos presentes en el medio de reacción. También se observan compuestos tanto de baja como de alta polaridad respecto del ácido betulínico. Recordando que los sistemas citocromo p450 son capaces de llevar a cabo una gran cantidad de reacciones de oxidación, es de suponer que las bandas por debajo del ácido betulínico puedan ser productos derivados de su oxidación como por ejemplo la introducción de grupos hidroxilos en posiciones no activadas de la molécula o bien la introducción de grupos polares como el pirofosfato, mientras que las bandas por encima de este puedan ser productos de esterificación del ácido betulínico como por ejemplo la introducción de grupos alquílicos de cadena media o larga en las posiciones C-3 y C-28 o bien la ruptura del esqueleto hidrocarbonado generando la presencia de cadenas alquílicas dentro de la molécula, la introducción de grupos metilos.



Una vez obtenidos estos resultados con células en crecimiento en un medio complejo de PDB, se decidió repetir cinco veces la reacción de transformación utilizando las cepas con clave número 1 y 3112 (**Esquema 30**). Como era de esperarse, se encontró que dicho comportamiento era reproducible lo que significa que el comportamiento observado en el **Esquema 29** no es un evento sucedido al azar, esto hace pensar en la necesidad de aislar e identificar los productos derivados de dicho proceso biotecnológico. Adicionalmente, su reproducibilidad pone de manifiesto que en un futuro se pueda obtener algún compuesto de particular interés .

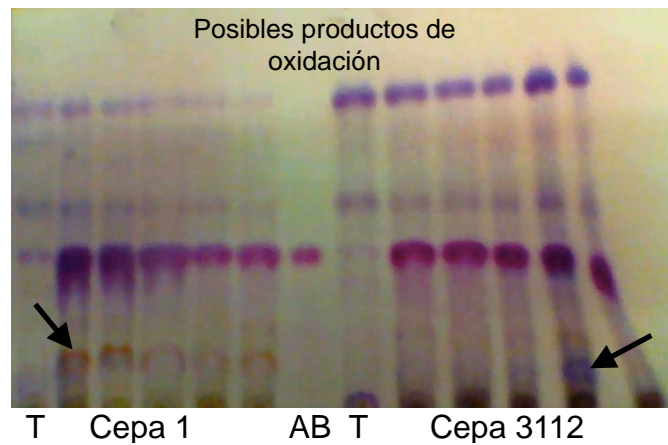


Figura 30 Biotransformación con células en crecimiento de cepa 1 y cepa 3112

Resulta evidente que en una biotransformación existe una gran cantidad de factores involucrados, como la permeabilidad de los sustratos a través de la membrana (León, 1998), reacciones secundarias de degradación de productos, la acumulación de sub productos formados, los efectos del disolvente utilizado, la solubilidad del sustrato etc., por lo que será necesario continuar evaluando los procesos de biotransformación del ácido betulínico.

CAPITULO 5 CONCLUSIONES

-Se identifico la presencia del ácido betulínico en cuatro especies de árboles ampliamente distribuidas en México (*Fraxinus uhdei*, *Liquidambar styraciflua*, *Alnus acuminata* y *Platanus mexicana*).

-Se determino que la corteza de *Platanus mexicana* contiene el porcentaje de ácido betulínico mas elevado (2.7%) respecto de las otras tres especies analizadas por HPLC.

-Adicionalmente se determino que el ácido betulínico se encuentra en mayor cantidad en la corteza de los arboles analizados por HPLC que en cualquier otra de sus partes.

-Se obtuvieron 22.37 gramos de ácido betulínico puros a partir de la corteza de *Platanus mexicana* extraída por maceración con acetato de etilo y ácido acético.

-Se logro corroborar tanto la identidad como la pureza del ácido betulínico extraído de P. mexicana por técnicas espectroscopicas.

-La CCF parece indicar que los cultivos celulares evaluados se encuentran catalizando una gran cantidad de reacciones que podrían llevar a una mayor diversidad estructural del ácido betulínico, lo cual es interesante pues en un futuro esto podría utilizarse para el desarrollo de compuestos de interés farmacológico

-Se lograron reproducir las reacciones de biotransformación del ácido betulínico utilizando las cepas 1 y 3112 creciendo en un medio complejo de PDB

-Se sintetizaron vía enzimática el octanoato, el acetato y el éster metílico del ácido betulínico en medios no acuosos

CAPITULO 6 PERSPECTIVAS

En general, la CCF ha resultado ser un método eficiente para el monitoreo de las transformaciones, aunque sería conveniente complementarla con el uso de metodologías analíticas más sensibles como HPLC o CG-EM que permitan de igual forma la identificación y caracterización de los productos resultantes de la reacción

Así mismo resultaría interesante recurrir al desarrollo de un diseño experimental (tal como en el caso de los estudios de superficie de respuesta descritos en la literatura) que permitiera relacionar las diferentes variables que afectan la eficiencia de la reacción (temperatura, disolvente, relación enzima:sustrato, actividad acuosa, etc.) y de esta forma conocer los parámetros óptimos de la misma.

Es de considerable interés buscar el desarrollo de metodologías que permitan en un futuro sentar las bases de un proceso de obtención de un compuesto derivado del ácido betulínico de interés económico, farmacológico o químico.

Establecer la identidad de las cepas aisladas de la corteza de *P. mexicana* responsables de los cambios observados por CCF.

CAPITULO 7

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abe F.; Yamauchi T.; Nagao T.; Kinjo J.; Okabe H.; Higo H.; Akahane H. Ursolic acid as a typanocidal constituent in rosemary. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 1485-1487.
- Abyshev A.Z.; Agaev E.M.; Guseinov A.B. Studies of the Chemical Composition of Birch Bark Extracts (*Cortex betula*) from the *Betulaceae* Family, *Pharm. Chem. J.* **2007** *41* (8), 22-26.
- Akihisa T.; Takamine Y.; Yoshizumi K.; Tokuda H.; Kimura Y.; Ukiya M.; Nakahara T.; Yokochi T.; Ichiishi E.; Nishino H. Microbial Transformations of Two Lupane-Type Triterpenes and Anti-Tumor-Promoting Effects of the Transformation Products. *J. Nat. Prod.* **2002** *65*, 278-282.
- Anishah, B.I. Preparation of betulinic acid derivatives in organic solvents. Master Science Thesis, Universiti Putra Malaysia, School of Graduate Studies, Malaysia, 2004.
- Anthonsen T., Reactions Catalysed by Enzymes En *Applied biocatalysis*; Second Edition; Straathof A.J.J., Adlercreutz P; Hardwood Academic Publishers, Netherlands, 2005; pp. 18-61.
- Ayala, V., Células Vegetales en Biotransformaciones: Tamizado de la reacción de oxidación de eugenoles/ácidos hidroxicinámicos y dimerización oxidativa del eugenol con cultivos de nueve plantas. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México, 2008.
- Aiken Christopher and Chen Chin Ho., Betulinic Acid Derivatives as HIV-1 Antivirals, *Trends Mol. Med.* **2005**, *11* (1), 31-36.
- Asha S. and Vidyavathi M. Cunninghamella- A Microbial Model for Drug Metabolism Studies- A Review *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27* (1), 16-29
- Ayashi H. H.; Uang P. H.; Akada S. T.; Binata M. O.; Noue K. I. Differential Expression of Three Oxidosqualene Cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra* *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27* (7) 1086-1092.
- Azerad R. Regio- and Stereoselective Microbial Hydroxylation of Terpenoid Compounds. En *Stereoselective Biocatalysis*; Patel R.N., Ed. Marcel Dekker; New York-Basel, 2000; pp 932.
- Baglin I.; mitaine-Offer A.-C.; Nour M.; Tan K.; Cavé C.; Lacaille-Dubois M.-A. A Review of Natural and Modified Betulinic, Ursolic and Echinocystic Acid Derivatives as Potential Antitumor and Anti-HIV Agents, *Mini Reviews in Med. Chem.* **2003**, *3*, 525-539.
- Baltina L.A.; Flekkhter O.B.; Nigmatullina L.R.; Boreko E.I.; Pavlova N.I.; Nikolaeva S.N.; Savinova O.V.; Tolstikov G.A. Lupane Triterpenes and Derivatives with Antiviral Activity. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3549-3552.
- Bar F.M.; Khanfar M.A.; Elnagar A.Y.; Liu H.; Zaghoul A.M.; Badria F.A.; Sylvester P.W.; Ahmad K.F.; Raisch K.P.; El Sayed K.A. Rational Design and Semisynthesis of Betulinic Acid Analogues as Potent Topoisomerase Inhibitors. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1643-1650.

- Bastos Denise Z.L.; Pimentel I.C.; De Jesus D.A.; Oliviera B. H. Biotransformation of Betulinic and Betulonic Acids by Fungi, *Phytochemistry*. **2007**, 68, 834-839.
- Bohlmann J. and Keeling C. I. Terpenoid Biomaterials, *The Plant Journal* **2008**, 54, 656-669.
- Borges K. B.; Borges W. S.; Durán-Patrón R.; Pupo M.T.; Bonato P.S.; Collado I.G. Stereoselective Biotransformations Using Fungi as Biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20 (4), 385-397.
- Breitmaier Eberhard. *Terpenes, Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*, Second Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: Germany 2006.
- Buchholz K. B. and Poulsen P. B., Introduction En *Applied biocatalysis*; Second Edition; Straathof A.J.J., Adlercreutz P; Hardwood Academic Publishers, Netherlands, 2005; pp. 1-17.
- Carsten H.P.; Herbert G.; Markus J.T.; Markus Heitzmann. Process for the extraction of betulinic acid. United States Patent 0149490 A1, 2007.
- Carvalho C.C.C.R. and M.M.R. da Fonseca. Biotransformation of Terpenes. *Biotechnol. Adv.* **2006**, 24, 134-142
- Cert A. and M.C. Pérez-Camino. Quantitative Determination of Hydroxy Pentacyclic Triterpene Acids in Vegetable Oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1558-1562.
- Chatterjee P.; Pezzuto John M.; Kouzi S.A. Glucosidation of Betulinic Acid by *Cunninghamella* Species. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 761-763.
- Chatterjee P.; Kouzi S.A.; Pezzuto John M.; Hamann M.T. Biotransformation of The Anti-Melanoma Agent Betulinic Acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66 (9), 3850-3855.
- Choi J.Y.; Na M.; Hwang I. H.; Lee S.H.; Bae E.Y.; Kim B. Y.; Ahn J.S. Isolation of Betulinic Acid, Its Methyl Ester And Guaiane Sesquiterpenoids With Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity From the Roots of *Saussurea lappa* C.B. Clarke. *Molecules*, **2009**, 14 (1), 266-72.
- Connolly Joseph D. and Robert A. Hill. Triterpenoids, *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, 24, 465-486.
- Corey E.J. and Lee Jaemoon. Enantioselective Total Synthesis of Oleanolic Acid, Erythrodiol, β -Amyrin, And Other Pentacyclic Triterpenes From a Common Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8873-8874.
- Correa Navarro Yaned Milena, Biotransformación de los sustratos cinamaldehído y ácido (\pm)-2,1-isobutilfenilpropanóico mediante el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia-Medellin, Facultad de Ciencias-Escuela de Química, Colombia. 2009
- Croteau Rodney and Johnson Mark A. Biosynthesis of Terpenoid Wood Extractives En *Biosynthesis & biodegradation of wood components*, Takayoshi H.; Academic Press, 1985. pp. 380-422.
- Csuk R.; Schmuck K.; Schafer R. A Practical Synthesis of Betulinic Acid. *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 8769-8770.

- Dang Z.; Lai W.; Qian K.; Ho P.; Lee K.-H.; Chen C.-H.; Huang L. Betulinic Acid Derivatives as Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Inhibitors, *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (23), 7887-7891.
- Dalvi K.; Valdya V.; Menon S.; Kekara M.; Shah W. Thin-Layer Chromatographic Determination of α -Amyrin in the Bark of *Mallotus philippensis Lamk.* *J. Planar Chromatogr.* **2007**, *20* (4), 279-281.
- De Melo C. L.; Queiroz M.G.R.; Arruda Filho A.C.V.; Rodrigues A.M.; Sousa D.F.; Almeida L. J.G.; Pessoa L.O.D. Betulinic Acid, a Natural Pentacyclic Triterpenoid, Prevents Abdominal Fat Accumulation in Mice Fed a High-Fat Diet. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8776-8781.
- Dereth R.P.; Rasbery J.M.; Bartel B.; Matsuda S. PT. Biosynthetic Diversity in Plant Triterpene Cyclization. *Current Opinion in Plant Biology* **2006**, *9*, 305-314.
- Dewick Paul M., *Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach*, 3rd Ed., John Wiley & Sons LTD, 2009.
- Domínguez-Carmona D.B.; Escalante-Eros F.; García-Sosa K.; Ruiz-Pinell G.; Gutierrez-Yapu D.; Chan-Bacab M.J.; Giménez-Turba A.; Peña-Rodríguez. Antiprotozoal Activity of Betulinic Acid Derivatives, *Phytomedicine* **2010**, *17*, 379-382.
- Draeger B.; Galgon T.; Neubert R.; Wohlrab W. Method of Producing Betulinic Acid. U.S. Patent 6175035 B1, Jan. 16, 2001.
- Drag M. Surowiak P.; Drag-Zalesinska M.; Dietel M.; Lage H.; Oleksyszyn J. Comparison of The Cytotoxic Effects of Birch Bark Extract, Betulin And Betulinic Acid Towards Human Gastric Carcinoma And Pancreatic Carcinoma Drug-sensitive Drug-Resistant Cell Lines. *Molecules* **2009**, *14*, 1639-1651.
- Djerassi Carl, Bowers A.; Burstein S.; Estrada H.; Grossman J.; Herrán J.; Lemin A.J.; Manjarrez A.; Pakrashi S.C. Terpenoids. XXII. Triterpenes From Some Mexican and South American Plants, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2312-2315.
- Einzhammer D.A.; Xu Z.Q. Betulinic Acid: A Promising Anticancer Candidate. *IDrugs* **2004**, *4*, 359-373.
- Faber Kurt, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5th edition, Springer, 2004.
- Flekhter O.B.; Nigmatullina L.R.; Baltina L.A.; Karachurina L.T.; Galin F.Z.; Zarudii F.S.; Tolstikov G.A.; Boreko E.I.; Pavlova N.I.; Nikolaeva S.N.; Savinova O.V. Synthesis and Antiviral Activity of Lupane Triterpenoids and their Derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **2004**, *38* (7), 355-358.
- Francis, John K. *Fraxinus uhdei* (Wenzig) Lingelsh. Fresno, tropical ash. SO-ITF-SM-28. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. **1990**, 227-230.
- Fujii Y.; Hirose S.; Fujii T.; Matsumoto N.; Agematu H.; Arisawa A. Hydroxylation of Oleanolic Acid by Cytochrome p450 from *Nonomuraea recticatena*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *9*, 2299-2302.
- Fukuda Y.; Takeshi Y.; Shun-ich W.; Kuniyoshi S.; Shunyo M.; Takatsuki O. Lupane and Oleanane Triterpenoids From the Cones of *Liquidamber styraciflua*, *Journal of Natural Products*, **2006**, *69* (1), 142-144.

- Frighetto R.T.S.; Welendorf R.M.; Nigro E.N.; Frighetto N.; Siani A.C. Isolation of Ursolic Acid From Apple Peels by High Speed Counter-Current Chromatography, *Food Chemistry* **2008**, *106*, 767-771.
- Gagnon Fleur, Formation de Glycoside á Partir de l'Acide Bétulinique. Memoire (Maitrise en ressources renouvelables). Université du Québec a Chicoutimi, Québec, 2004.
- Galgon T.; Hoke D.; Drager B. Identification and Quantification of Betulinic Acid. *Phytochem. Anal.* **1999**, *10* (4), 187-190.
- Gauthier C.; Legault J.; Lebrun M.; Dufour P.; Pichette A. Glycosidation of Lupane-Type Triterpenoids as Potent in Vitro Cytotoxic Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713-6725.
- Geevananda Y. A.; Gunawardana P.; Sultanbawa M.U.S.; Balasubramaniam S. Distribution of Some Triterpenes And Phenolic Compounds in the Extractives of Endemic Dipterocarpaceae Species of Sri Lanka. *Phytochemistry*. **1980**, *19*. 1099-1102.
- Genet C.; Strehles A.; Schmidt C.; Boudjelal G.; Lobstein A.; Schoonjans K.; Schouchet M.; Auwer J.; Saldin R.; Wagnert A. Structure-Activity Relationship Study of Betulinic Acid, a Novel and Selective TGR5 Agonist and Its Synthetic Derivatives: Potential Impact in Diabetes, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 178-190.
- Gershenzon J.; Dudareva N. The Function of Terpene Natural Products in the Natural World. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (7), 408-414.
- Ghaffari M.B.M.; Ahmad F.B.H.; Rahman M.B.A. Lipase-Catalyzed Esterification of Betulinic Acid Using Phtalic Anhydride in Organic solvent Media: Study of Reaction Parameters, *J. Applied Sci.* **2010** *10* (4), 337-342.
- Giri A.; Dhingra V.; Giri C.C.; Singh A.; Ward O.P.; Narasu M.L. Biotransformation Using Plant Cells, Organ Cultures and Enzymes Systems: Current Trends And Future Prospects. *Biotechnology Advances* **2001**, *19*, 175-199.
- Gonzalo de Gonzalo Calvo, Biotransformaciones en la Síntesis y Resolución de Compuestos de Interés Farmacéutico, tesis doctoral, Departamento de Química Orgánica e inorgánica, Univesidad de Oviedo, España 2003.
- Gribble G.W.; Honda T.; Liby K.T.; Su X.; Sundarajan C.; Honda Y.; Suh N.; Risingsong R.; Williams C.R.; Royce D.R.; Sporn M.B. Desing, Synthesis, And Anti-Inflammatory Activity Both in Vitro and in Vivo of New Betulinic Acid Analogues Having an Enone Funtionality in Ring A, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006** *16* (24), 6306-6309.
- Guo S.; Duan JA.; Tang Y.; Su S.; Shang E.; Ni S.; Qian D. High-Performance Liquid Chromatography-Two Wavelength Detection of Triterpenoid Acids From the Fruits of *Zziziphus jujuba* Containing Various Cultivars in Different Regions and Classification Using Chemometric Analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2009**, *49*, 1296-1302.
- Hannemann F.; Bichet A.; Ewen K.M.; Bernardt R. Cytochrome p450 Systems-Biological Variations of Electron Transport Chains. *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, *1770*, 330-344.

- Haralampidis K., Trojanowska M., Osbourn A. E., Biosynthesis of triterpenoid saponins in Plants, En *Advances in biochemical engineering biotechnology*, Sheper T.H., Springer, Berlín 2002, Vol. 75.
- Harvey Alan L. Natural Products in Drug Discovery. *Drug discovery Today* **2008**, 13, Numbers 19/20, 895-901.
- Hernández-Vázquez L.; Mangas S.; Palazón J.; Navarro-Ocaña A. Valuable Medicinal Plants and Resins: Commercial phytochemicals With Bioactive Properties, *Industrial Crops and Products*, **2010**, 31 (3), 476-480.
- Holstein S. and Hohl R.J. Isoprenoids: Remarkable Diversity of Form and Funtion, *Lipids*. **2004** 39 (4), 293-309.
- Hoh C. and Filho M.V. The Enzyme Classification En *Industrial biotransformation*, Second Ed.; Liese A. Seelbach K.; Wandrey C. WILEY-VCHI, 2006.
- Huang L.; Ho. P.; Lee KH.; Chen CH. Synthesis and Anti-HIV Activity of Bi-Functional Betulinic Acid Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 2279-2289.
- Ibrahim A., Kkhalifa S.I.; Khafagi I.; Youssef D.T.; Kkhan S.; Mesbah M.; Khan I. Microbial Metabolism of Biologically Active Secondary Metabolites From *Nerium oleander L.* *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, 56, 1253-1258.
- Ishige T.; Honda K.; Shimizu S. Whole Organism Biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, 9, 174-180.
- Jäger S.; Trojan H.; Kopp T.; Laszczuk M.; Scheffler A. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plant-Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. *Molecules* **2009**, 14, 2016-2031.
- Johnson W.S.; Chenera B.; Tham F.S.; Kulling R.K. The Fluorine Atom as a Cation-Stabilizing Auxiliary in Biomimetic Polyene Cyclizations. 4 Total Synthesis of dl- β -amyrin, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 515-521.
- Jung Michel E. and Duclos Brian A. Synthetic Approach to Analogues of Betulinic Acid, *Tetrahedron* **2006**, 62 , 9321-9334.
- Kelly, D.R.; Rehm H.J.; Reed G. Pulper A.; Stadler P. Introduction, *Biotechnology*, Second Edition (Vol-8a), Wiley-Vch, Germany, 1998
- Khmelnitsky Yuri L., and Joseph O Rich, Biocatalysis in Nonaqueous Solvents, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 47-53.
- Kim J. Y.; Koo H.M.; Kim D.S.H.L. Development of C-20 Modified Betulinic Acid Derivatives as Anti-Tumor Agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2405-2408.
- Kouzi S.A.; Chatterjee P.; Pezzuto J.M.; Hamann Mark T. Microbial Transformations of The Antimelanoma Agent Betulinic Acid. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1653-1657.

- Krasutsky Pavel, Birch Bark Research and Development. Review Article. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 919-942.
- Krasutsky Pavel A. Method for Manufacturing Betulinic Acid, U.S. Patent 6232481 B1, May 15, 2001.
- Kuate J.R.; Mouokew S.; Wabo HK.; Tane P. Antidermatophytic Triterpenoids From *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Phytother. Res.* **2007** *21*, 149-152.
- Kumar V.; rANI n.; Aggarwal P.; Sanna VK.; Singh AT.; Jaggi M.; Sharma PK.; Irchaiya R.; Burman AC. Synthesis and Cytotoxic Activity of Heterocyclic Ring-Substituted Betulinic Acid Derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (18), 5058-5062.
- Kvasnica M.; Sarek J.; Klinotova E.; Dzubak P.; Hajduch M. Synthesis of Phtalates of Betulinic Acid and Betulin With Cytotoxic Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (10), 3447-3454.
- Lavoie Serge, Contribution á la Synthèse de Derivés de l'Acide BÉtulinique á Partir du Betulinol Extrait de l'Écorce du Bouleau Blanc (*Betula papyrifera*), Memoire (B. Sc. Chimie), Université du québec á chicoutimi, 2001.
- Lavoie J.M. and Stevanovic T. Variation of Chemical Composition of The Lipophilic Extracts From Yellow Birch (*Betula alleghaniensis*) Foliage, *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, *53*, 4747-4756.
- León R.; Fernandes P.; Pinheiro H.M.; Cabrai J.M.S. Whole-Cell Biocatalysis in Organic Media. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 483-500.
- Leresche J.E. and Meyer H.-P. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10* (3), 572-580.
- Levdanskiy V. A.; Polezhaeva N.I.; Kuznetsov B.N. RU 2269541 (10.02.2006); *Chem. Abs.* **2006**, 126094.
- López Mejía Ricardo, Reducción Microbiana de Nitroacetanilidas Sustituidas y Fenilnitropropanos. Tesis de Maestria, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México. 2007.
- Loughlin Wendy A. Biotransformations in Organic Synthesis, Review paper. *Bioresour. Technol.* **2000**, *74* (1), 49-62.
- Lozada García Armando José, Biología, Distribuzione e Sistematica Molecolare del Genere Platanus L. nel Mondo. Dottorato di ricerca in biologia avanzata, Universita degli studi di napoli, Italia, 2007.
- Mahato S.B. and Sen S. Advances in Triterpenoid Research, 1990-1994. *Phytochemistry*, **1997** *44* (7), 1185-1236.
- Mallea, Extracto de Hierbas para uso Cosmético. Prácticas de Buena Fabricación y Criterios de Calidad, Universidad mayor de San Andres, Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquímicas, Instituto de Seladis, Vol. VII- Diciembre 1999.
- Martelanc M.; Vovk I.; Simonovska B. Determination of Three Major Triterpenoids in Epicuticular Wax of Cabbage (*Brassica oleracea* L.) by High-Performance Liquid Chromatography With UV and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1164*, 145-152.

- Menard H.; Citriu C.M.; Lalancette J.-M.; Ruest I.; Kaljaca A.; PCT 2006 1063464A1; *Chem. Abs.* **2006**, 604456.
- Mot De Rene, Parret A.H. A Novel Class of Self-Sufficient Cytochrome p450 Monooxygenases in Prokaryotes. *Trends in Microbiology* **2002**, *10* (11), 502-508.
- Muffler K.; Leipold D.; Scheller M.-C.; Hass C.; Steingroewer J.; Bley T.; Neuhaus H.E.; Mirata M.A.; Scradler J.; Ulber R. Biotransformation of Triterpenes. *Process Biochem.* **2010**, doi:10.1016/j.procbio.2010.07.015.
- Muraleedharan G.N. y Okemos Mich, Process For The Isolation And Purification of Taxol and Taxanes From Taxus Using Methanol or Acetone, U.S. Patent 5478736, 1995.
- Nyasse B.; Nono J.-J.; Nganso Y.; Ngantchou I.; Schneider B. Upaca Genus (Euphorbiaceae), a Good Source of Betulinic Acid, *Fitoterapia* **2009**, *80*, 32-34.
- Oleszek W.; Kapusta I.; Stochmal A. TLC of Triterpenes (Including Saponins) En *Thin layer chromatography in phytochemistry*, Waksmundzka-H. M.; Sherma J.; Kowalska T., Chromatographic Science series, CRC Press, Florida, 2008, Volume 99, 519-542.
- Oliviera B.H.; Santos C. A. M.; Espindola A.P. D.M. Determination of The Triterpenoid, Betulinic Acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC, *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 95-98.
- Parra A.; Rivas F.; Garcia-Granados A.; Martinez A. Microbial Tansformation of Triterpenoids. *Mini Rev. Org. chem.* **2009**, *6*, 307-320.
- Patel N. Ramesh, Stereoselective Biocatalysis review, Marcel Dekker ink., CRC Press, 2000.
- Patočka Jiri, Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification, *J. Appl. Biomed.* **2003**, *1*, 7-12.
- Pavanasasiva G. and Sultanbawa M.U.S. Betulinic Acid in The *Dilleniaceae* And a Review of Its Natural Distribution, *Phytochemistry*, **1974**, *13*, 2002-2006.
- Peng C.; bODENHAUSEN g.; Qiu S.; Fong H.H.S.; Farnsworth N.R.; Yuan S.; Zheng C. Computer-Assisted Structure Elucidation: Application of CISOC-SES to The Resonance Assignment and Structure Generation of Betulinic Acid, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 267-278 .
- Perez-Castronera A.L. Constituents of Fruits, Leaves And Bark of Fresno (*Fraxinus uhdei*), *Rev. Latinoamer. Quim.* **1997**, *25* (2), 86-90.
- Pezzuto J.M.; Darrick S.H.L. Kim. Methods of Manufacturing Betulinic Acid, United States Patent 5804575, Sep. 8, 1998.
- Pichette A.; Liu H.; Roy C.; Tanguay S.; Simard F.; Lavoie S. Selective Oxidation of Betulinic for the Preparation of Betulinic Acid, an Antitumor Compound. *ChemInform*, **2005**, *36* (10).

- Pollard D. and Woodley J.M. Biocatalysis for Pharmaceutical Intermediates: The Future is Now, *Trends in Biotechnology*. **2006**, 25 (2),
- Qian K.; Yu D.; Chen C.-H.; Huang L.; Morris-Natschke S.L.; Nitz T.J.; Salzwedel K.; Reddick M.; Allaway G.P.; Lee K.-H. Anti-AIDS agents. 78. Design, Synthesis, Metabolic Stability Assessment, and Antiviral Evaluation of Novel Betulinic Acid Derivatives as Potent Anti-Human Immunodeficiency Virus (HIV) Agents, *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (10), 3248-3258.
- Qian K.;Kuo R.-Y.; Chen C.-H.; Huang L.; Morris-Natschke S.L.; Lee K.-H. Anti-AIDS agents. 81. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship Study of Betulinic Acid and Moronic Acid Derivatives as Potent HIV Maturation Inhibitors, *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (8), 3133-3141.
- Qian L-W.; Zhang J.; Liu J.-H.; Yu B.-Y. Direct Microbial-Catalyzed Asymmetric (Alpha)-Hydroxylation of Betulonic Acid by *Nocardia sp.* NRRL 5646. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 2193-2195.
- Qi-he C.; Liu J.; Zhang H.-F.; He G.-Q.; Fu M.-L. The Betulinic Acid Production From Betulin Through Biotransformation by Fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **2009**, 45 (3), 175-180.
- Ramadoss S.; Ahmed S.; Mohammad J. Extracting Betulinic Acid From Ziziphus jujuba, United States Patent 6264998B1, Jul 24,2001.
- Razbrorsek M.I. Voncina D.B.; Dolecek V.;Voncina E.; Determination of Oleanolic, Betulinic and ursolic acid in Lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia* **2008**, 67, 433-440.
- Romo de Vivar Alfonso, Química de la Flora Mexicana, Investigaciones en el Instituto de Química, UNAM, Primera Edición, 2006, Editor Dr. Alfonso de Vivar. 89-139.
- Rosazza J.P.N. and Sariaslani F.S. Biocatalysis in Natural Products Chemistry, *Enzym. Micro. Technol.* **1984**, 6 (6), 242-253.
- Sacchetti J.C. and Poulter C.D. Creating Isoprenoid Diversity, *Science* **1997**, 277 (5333), 1788-1789.
- S. Omar.; Ahmad F.H.; Hassan H.; Faujan N.H. Enzymatic Esterification of Betulinic Acid. Malaysian Journal of Science, **2005**, 24 (1), 97-98.
- Salama A. M.; Bernal E.; Sandoval B. Composición Quiímica y Actividad Abortiva de las Hojas de Alnus acuminata. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas.* **1989**, 17, 51.
- Sami A.; Taru M.; sALME k.; Jari Y.-K. Pharmacological Properties of the Ubiquitous Natural Product Betulin (2006) *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, 29 (1), 1-13.
- Sánchez Ávila N.; Priego C. F.; Luque de Castro MD. Ultrasound-Assisted Extraction and Silylation Prior to Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Characterization of the Triterpenic Fraction in Olive Leaves. *J. Chromatogr. A.* **2007**, 1165 (1-2), 158-165.
- Sánchez Ávila N.; Priego C.F.; Ruíz-Jiménez J.; de Castro MD. Fast and Selective Determination of Triterpenic Compounds in Olive Leaves by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry With Multiple Reaction Monitoring After Microwave-Assisted Extraction. *Talanta* **2009**, 78 (1), 40-48.

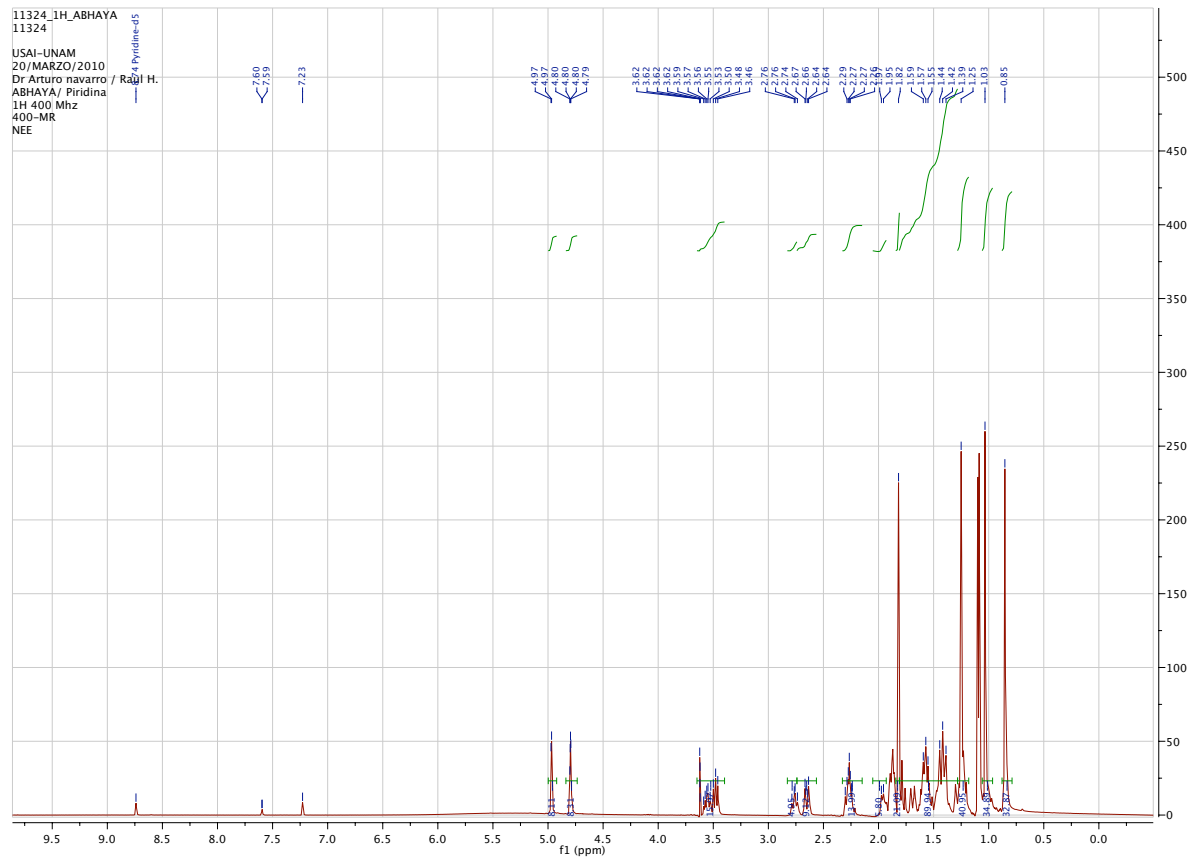
- Sauter, Markus. Process for Obtaining Betulinic Acid, United States Patent 6943260B2, Sep. 13, 2005.
- Schulze B. and Wubbolts M.G. Biocatalysis for Industrial Production of Fine chemicals, *Curr. Op. Biotechnol.* **1999**, *10*, 609-615.
- Shafiee A.; Tsipouras A.; Bouffard A.; Onishi J.C.; Guan Z.; Motamedi H. Enzymatic Deglycosilation of Enfumafungin, a Triterpene Glycoside Natural Product, and its Chemically Synthesized Analogues. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *16*, 27-32.
- Shaw N. Robins K.T.; Kiener Andreas. 20 Years of Biotransformations, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345* (4) 425-435.
- Stork, G., Uyeo, S., Grieco T.W.P.; Labovitz J. The Total Synthesis of Lupeol, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (19), 4945-4947.
- Straathof A.J.J., Adlercreutz P; *Applied biocatalysis*; Second Edition; Hardwood Academic Publishers, Netherlands, 2005.
- Tolstikova T.G.; Sorokina I.V.; Tolstikov G.A.; Tolstikov A.G.; Flekhter O.B. Biological Activity and Pharmacological Prospects of Lupane Terpenoids: I. Natural Lupane Derivatives, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **2006**, *32* (1).
- Urban M.; Sarek J.; Tislerova I.; Dzubak P.; Hajduch M. Influence of Esterification and Modification of A-ring in a Group of Lupane Acids on Their Cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (19), 5527-5535.
- Van den Brink H.M.; Van Gorcom R.F.M.; Van den Hondel A.M.J.J.; Punt P.J. Cytochrome P450 Enzyme Systems in Fungi Review Article, *Fungal Genetics and Biology*. **1998**, *23* (1), 1-17.
- Vasick-Racki D., History of Industrial Biotransformations-Dreams and Realities En *Industrial Biotransformations*, Second Completely Revised and Extended Edition, Liese A.; Seelbach K.; Wandrey C., Germany, 2006.
- Vatsyayan P., Kumar A.K.; Goswami P.; Goswami P. Broad Substrate Cytochrome p450 Monooxygenase Activity in the Cells of *Aspergillus terreus* MTCC 6324, *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 68-75.
- Villaseñor, J. L. Diversidad y Distribución de las Magnoliophyta de México. *INCI*, **2003**, *28* (3) 160-167.
- Vincken J.-P.; Heng L.; Aede D.G.; Gruppen H. Saponins Classification and Occurrence in the Plant Kingdom, *Phytochemistry* **2007**, *68*, 275-297.
- Volkman John K., Sterols and Other Triterpenoids: Source Specificity and Evolution of Biosynthetic Pathways, *Org. Geochem.* **2005**, *36*, 139-159.
- Wang G.; Tang W.; Bidigare R.R. Terpenoids as Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents. En *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*, Zhang L. Humana Press Inc., NJ, 2008.
- Woodley John M., New Opportunities for Biocatalysis: Making Pharmaceutical Processes Greener. *Trends in Biotechnology* **2008**, *26* (6) 321-327.

- Yamin B.Y. Optimization of Lipase Catalyzed Synthesis of 3-O-benzoilbetulinic Acid. PhD Thesis, Universiti Putra, Malaysia, 2004.
- Yamin B.Y.; Basri M.; Ahmad F.; Salleh A.B. Response Surface Methodology as a Tool to Study the Lipase-Catalyzed Synthesis of Betulinic Acid Ester. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 694-698.
- Yogeewari and D. Sriram, Betulinic Acid and Its Derivatives On Their Biological Properties. *Current Med. Chem.* (2005),*12*, 657-666.
- Zhang J.,Cheng Z.-H.; Yu B.-Y.; Cordell G.A.; Qiu S.X. Novel Biotransformation of Pentacyclic Triterpenoid Acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2337-2340.
- Zhang M.; Zhang Y.M Xie J. Simultaneous Determination of Jujubioside A, B and Betulinic Acid in Semen *Ziziphi spinosae* by High Performance Liquid Chromatography-Evaporative Light Scattering Detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 1467-1470.
- Zhao G.; Yan W.; Cao D. Simultaneous Determination of Betulin and Betulinic Acid in white Birch Bark using RP-HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43* (3), 959-962.
- Zhi-Duan Chen, Steven R. Manchester, and Hai-Ying Sun, Phylogeny and Evolution of the Betulacea as Inferred from DNA Sequences, Morphology and Paleobotany, *Am. J. Bot.* **1999**, *86* (8), 1168-1811.

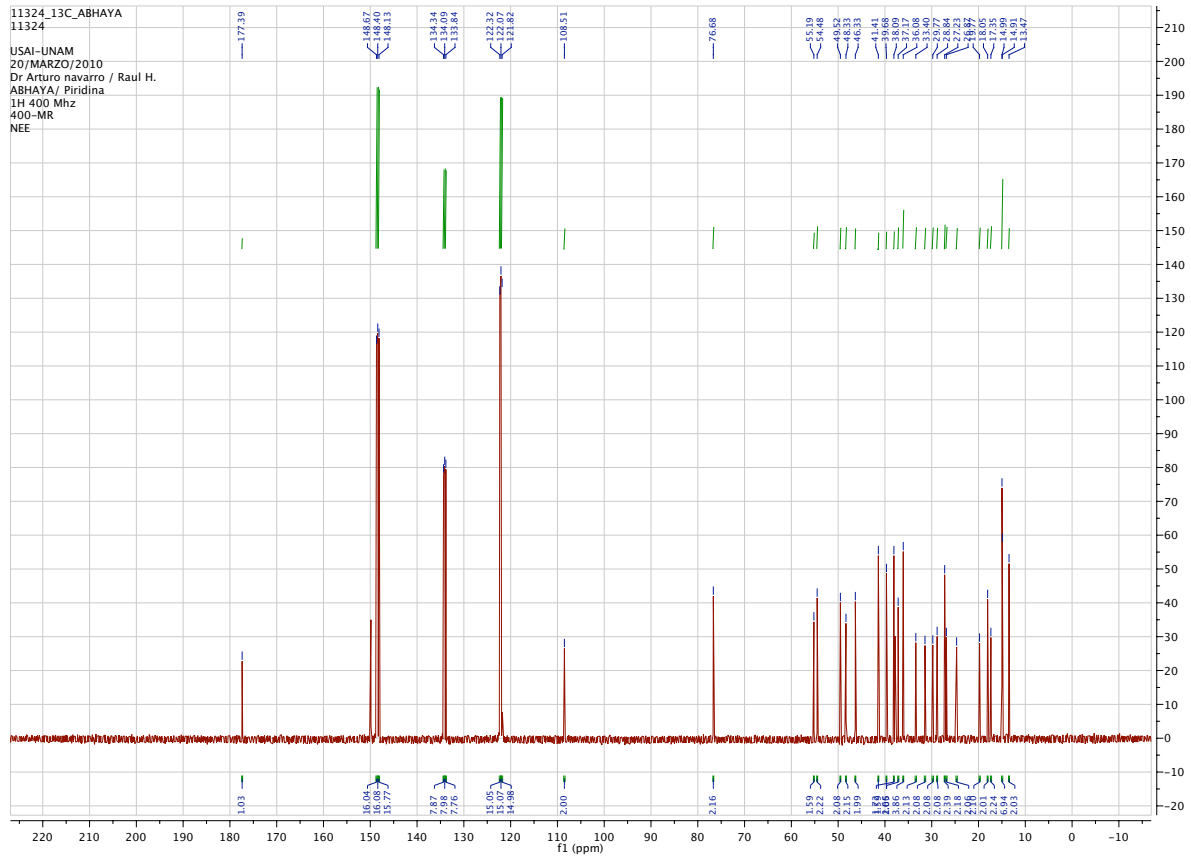
Fichas técnicas

- Comisión Nacional Forestal, *Platanus mexicana* Moric. (1837), Sistema nacional de información forestal 2010.
- Comisión Nacional Forestal, *Fraxinus uhdei*, Sistema nacional de información forestal 2010.
- Comisión Nacional Forestal, *Alnus acuminata*, Sistema nacional de información forestal 2010.
- Liquidambar styraciflua L. Species Plantarum 2: 999. 1753

ANEXOS

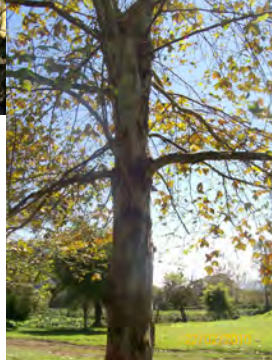
Espectro de NMR¹H del ácido betulínico 400 MHz

Espectro de NMR-¹³C del ácido betulínico 400 MHz

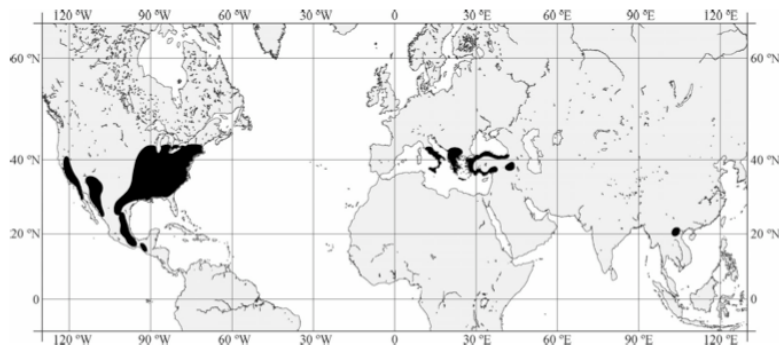


1.-Platanus

Taxonomía (CANAFOR 2010)	
Reino	Plantae
Phyllum	Spermatophyta
Subphyllum	Magnoliophytin
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Hamamelidas
Orden	Hamamelidales
Familia	Platanaceae



La familia *Platanaceae* comprende árboles corpulentos, caducifolios y en raras ocasiones perennifolios; con corteza delgada, algo rugosa que exfolia en placas, quedando el tronco con manchas irregulares con colores de diversa intensidad. Hoy día, esta familia es de temperaturas nórdicas y subtropicales cuyos árboles comprende un solo género, *Platanus L.* con dos subgéneros *Platanus leroy* y *Castaneophyllum leroy*, se encuentra distribuido solo en el hemisferio norte desde el sur de Europa y Medio Oriente, en Asia, en el norte y este de Norte América, México y Guatemala (Lozada, 2007).



Distribución geográfica del genero *Platanus* (Feng Yun et al., 2005)

El subgénero *Platanus* L. engloba 7 especies (*P. orientalis* L., *P. occidentalis* L., *P. racemosa* Nutt., *P. gentryi* Nixon & Poole, *P. mexicana* Moric., *P. rzedowskii* Nixon & Poole), mientras que el subgénero *P. Castaneophyllum* engloba solo a una especie (*P. kerri Gagnepain*)(Feng Yung 2005).

Platanus mexicana es un árbol caducifolio o perennifolio, de 15-25 m (hasta 40 m) de altura que se extiende desde México hasta Guatemala. En México, es conocido con diferentes nombres: Alamo (Tamps., Ver.); Alamo blanco (S.L.P., N.L., Tamps.); Guayabillo (región oriental de Hgo.); *Haya* (Ver.); Acuáhuatl (S.L.P.); Chicolcohuite (Pue.). En otoño las hojas toman un color amarillo o anaranjado. La corteza se encuentra en placas formando áreas blancas. Se encuentra en cañadas, a lo largo de arroyos y ríos, en zonas de cultivo (cafetales). Es un árbol maderable que se utiliza principalmente como ornato en calles, parques y jardines por la belleza de su follaje y por su corteza atractiva. También es utilizado para la fabricación de artículos artesanales, sirve como combustible, es utilizado para la construcción rural, y para la elaboración de artículos domésticos. El uso de la semilla, hoja, corteza y fruto es utilizado con fines medicinales (CONAFOR 2010).

Desde el siglo pasado ha existido controversia respecto a las relaciones de la familia, sin embargo, estudios morfológicos recientes han colocado a la familia *Platanaceae* muy cerca de la familia *Hamamelidaceae* debido a que algunos caracteres como las hojas y las inflorescencias de *Platanus* muestran una fuerte afinidad con *Liquidambar styraciflua* debido a la similitud en sus hojas, pero difieren fuertemente en caracteres como las flores, frutos, polen y en la estructura de su madera (Lozada, 2007).

2.-Liquidambar

Taxonomía (CONAFOR 2010)	
Reino	Plantae
Division	Fanerogama Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Saxifragales
Familia	Altingiaceae
Genero	Liquidambar



Liquidambar es un género de fanerógamas pertenecientes a la familia **Altingiaceae**, que en ocasiones es considerada como una parte de la familia **Hammamelidaceae**; este género engloba 4 especies (***L. acalycina***, ***L. formosana***, ***L. orientalis***, ***L. styraciflua***). Son árboles de 25 a 40 metros de altura, con hojas palmadas en espiral, la corteza externa se encuentra angostamente fisurada y presenta un color moreno-grisacea debido a que esta suberificada. Por otro lado, la corteza interna de color crema amarillento cambiando a pardo es ligeramente amarga y fibrosa, de la cual fluye un liquido resinoso. Es un popular árbol ornamental particularmente en áreas templadas con veranos calurosos, logrando los mas bellos colores en el otoño. Es nativo del sureste, este-central y sur-central de los Estados Unidos, del sur de México y América Central .

En México, ***Liquidambar styraciflua* L. var. mexicana Oerst** (nombre científico: ***Liquidambar macrophylla* Oerst**) es conocida por una gran variedad de sinónimos que dependen de la región en la que se encuentre, sin embargo, entre los mas comunes destacan: Ocozote, sweet gum y liquidambar. Se puede encontrar en la vertiente del Gofu de México a lo largo de la Sierra Madre Oriental desde Nuevo León y Tamaulipas, en la Sierra madre del Sur en Oaxaca y en la Sierra madre del Soconusco en Chiapas. Los productos que se obtienen de esta especie son variados y muy diversos. Es un árbol maderable, utilizado para la obtención de artesanías e instrumentos musicales, combustible, madera para la construcción, pulpa para papel fino entre otros. El bálsamo que se obtiene es utilizado como aromatizante en forma de incienso o puede ser utilizado como fumigador o base para chicle (CONAFOR 2010).

3.- *Alnus*

Taxonomía (CONAFOR 2010)	
Reino	Plantae
Phyllum	Spermatophyta
Subphyllum	Magnoliophytina
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Hamamelidas
Orden	Fagales
Familia	Betulaceas



La familia **betulaceae** es una familia bien definida con seis géneros y aproximadamente 130 especies. La mayoría de las especies se encuentran distribuidas en regiones del hemisferio norte. Solo una de ellas, ***Alnus glutinosa (L.) Gaertn*** se le puede encontrar en Africa. Otra de ellas, ***Alnus acuminata*** HBK se extiende desde América central hasta el norte de Argentina. Diversos autores han apoyado la división de la familia en dos clases o tribus principales; en sentido estricto la llamada ***Betulaceae (Alnus y Betula)*** y la ***Corylaceae (Corylus, Ostryopsis, Carpinus y Ostrya)*** (Zhi-Duan Chen, 1999).

Alnus acuminata

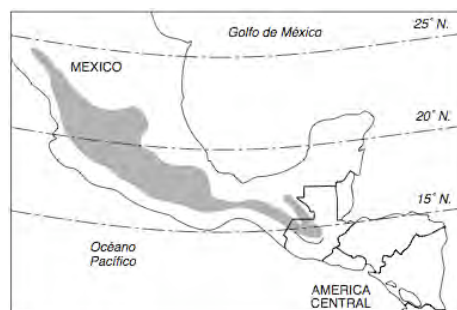
Nativo de México, aunque numerosas especies de *Alnus* se localizan en Norte América, Centro América y en algunas regiones de Sudamérica (Argentina, Perú y Bolivia). Son árboles de 10 a 30 metros de altura, caducifolio con ramas lisas de coloración rojizo, hojas oblongas de 7 a 13 cm de longitud. En México es conocido como Aile, lite, Aliso; Abedul (Veracruz); Aile (Hgo., Oax.); Aliso (Sin.); Elite, Palo de águila (Oax.) y se encuentra distribuido dentro del territorio nacional en los estados de Durango, Sinaloa, Jalisco, Hidalgo, San Luis Potosí, Veracruz y Distrito Federal. Se menciona que es usada en la fabricación de cajas para transporte de hortalizas, hormas para zapato, palillos de fósforos, en carpintería, ebanistería y muebles así como para obtener leña, carbón, aserrío y pulpa para papel. La corteza es astringente y rica en taninos por lo que en México se usa como curtiente, además, la infusión que se obtiene de la corteza se utiliza en medicina casera en enfermedades cutáneas y venéreas, y las hojas son usadas como cataplasmas para heridas de piel, y los extractos del fruto para inflamación de garganta (CONAFOR 2010).

4.- *Fraxinus*

Taxonomía (CONAFOR 2010)	
Reino	Plantae
Phyllum	Spermatophyta
Subphyllum	Magnoliophytina
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridas
Orden	Gencianales
Familia	Oleaceas



Conocido como fresno o tropical ash (en inglés), es un árbol atractivo de tamaño mediano a grande, que alcanza una altura máxima de 37 m. El área de distribución natural del fresno se extiende desde el área central occidental de México a través de Guatemala. Árbol perennifolio o caducifolio que se distribuye desde Sinaloa y Durango hasta Veracruz y Chiapas (CONAFOR 2010). La especie ha sido introducida con propósitos forestales en Hawaii, Puerto Rico y la India. Se ha plantado también como un árbol de sombra en Costa Rica y en áreas subtropicales de los Estados Unidos. En México, la América Central y el suroeste de los Estados Unidos, el fresno es popular como un árbol de sombra en las calles, parques y patios. Se menciona que la madera es muy similar a la del fresno blanco (*Fraxinus americana*). Su color varía de rubio a un color castaño pálido, con poros grandes y una fibra recta. La madera de fresno se utiliza principalmente para bates de béisbol, raquetas de tenis, artesanías, utensilios de cocaína, muebles y molduras. La madera se recomienda también para la construcción, pisos, puntales de mina, hormas para zapatos y chapa (Francis 1990).



Distribución geográfica del genero *Fraxinus* (Francis 1990)

Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis de aceites y grasas con la subsiguiente formación de ácidos grasos libres, digliceroles, monogliceroles y glicerol. Estos biocatalizadores se distribuyen en animales, plantas y microorganismos como enzimas digestivas que facilitan el transporte, la deposición y movilización de las grasas. Además, juegan un papel fundamental en el metabolismo intracelular de lípidos y en el funcionamiento de membranas biológicas. Presentan un elevado potencial sintético en contraste con otras enzimas, ya que no requieren de cofactor y son capaces de aceptar una amplia variedad de sustratos. Así, las lipasas pueden acomodar ésteres alifáticos, aromáticos, bicíclicos e incluso ésteres de compuestos organometálicos tipo sandwich. También se ha descrito el empleo de tioésteres y aminas activadas como sustratos para las lipasas.

Una gran variedad de estos biocatalizadores son producidos por bacterias u hongos y son excretadas como enzimas extracelulares, por lo que su producción a gran escala es un proceso relativamente sencillo. La mayoría de las lipasas existen en los organismos en forma de 2 isoenzimas (A y B), que generalmente presentan la misma enantiopreferencia, pero cuyas ligeras diferencias estructurales provocan variaciones en la enantioselectividad de las reacciones que catalizan. Las preparaciones de lipasas crudas contienen las 2 isoenzimas, salvo en el caso de la lipasa de *Candida antarctica*, donde se han conseguido separar a través de procesos de ingeniería genética. Sólo unas pocas lipasas han conseguido aislarse de mamíferos.

Una característica fundamental de las lipasas, que las diferencia de otras hidrolasas y las convierte en los enzimas con mayor potencial sintético, es la interacción que presentan con los sustratos. Al contrario que las esterasas, las cuales muestran una mayor actividad a mayor concentración de sustrato hasta llegar a la saturación, la catálisis en medio acuoso con lipasas presenta muy baja actividad con sustratos hidrosolubles, pero cuando la concentración del sustrato es tan alta que sobrepasa el límite de solubilidad formando una segunda fase lipofílica, se produce un gran incremento en la actividad de la lipasa. Esta propiedad se conoce como activación interfacial. El hecho de que las lipasas durante la catálisis estén expuestas a una fase lipídica demuestra que son capaces de trabajar en entornos hidrófobos manteniendo su actividad. Por ello, es posible reemplazar el nucleófilo natural de las lipasas (agua) por una gran variedad de nucleófilos orgánicos como alcoholes, aminas, amoniacos, tioles, peróxidos, hidrazinas., etc.

Son capaces de catalizar la esterificación selectiva entre ácidos y alcoholes. También intervienen en reacciones de transesterificación, procesos en los que se produce un intercambio de radicales acilo entre un éster y un ácido (acidólisis), un éster y otro éster (interesterificación) o un éster y un alcohol (alcoholólisis). Las lipasas no están limitadas a reacciones de síntesis e hidrólisis sobre ésteres de ácidos carboxílicos sino que también son capaces de catalizar procesos de aminólisis para la síntesis de amidas.

Independientemente de las diferencias en tamaño, secuencia de péptidos, sustratos, activadores, inhibidores y otras propiedades, las lipasas que han conseguido ser elucidadas hasta la fecha adoptan la misma estructura, conocida como el pliegue de α/β hidrolasa, que consta de una serie de hebras paralelas β rodeadas por hélices α . Una secuencia de aminoácidos aparece en todas las lipasas, el pentapéptido Gli-X-Ser-Y-Gli (donde X e Y son restos variables). La conservación de esta serina y la pérdida de actividad que se produce cuando se modifica o reemplaza indica que este aminoácido es crucial para la catálisis. Además de la serina catalítica, el centro activo de las lipasas consta de histidina (His) y de otro aminoácido que puede ser ácido aspártico (Asp) o glutámico (gLu). Estos tres residuos forman la tríada catalítica, que se encuentra en una cavidad conocida como hueco hidrofóbico de la enzima.

a) Lipasa de *Candida antarctica*

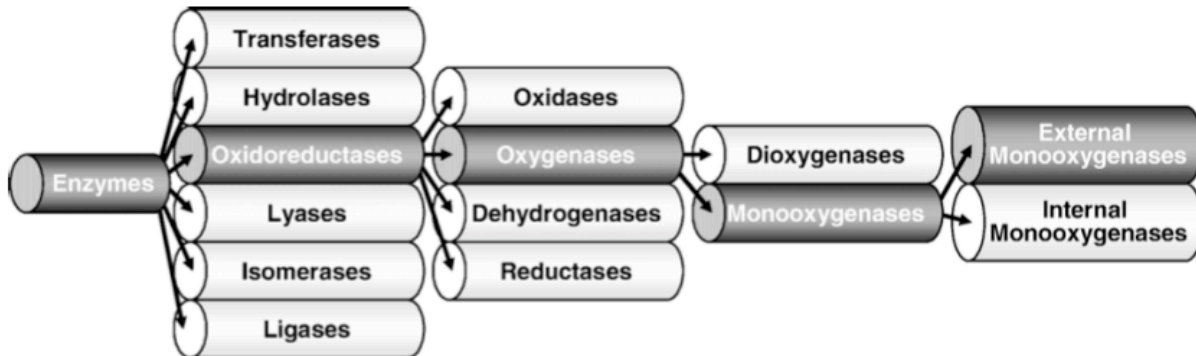
Es una de las lipasas más versátiles empleadas en el campo de las biotransformaciones. Este biocatalizador fue aislado en la Antártida cuando se examinaban enzimas capaces de trabajar en condiciones extremas. Existen dos isoenzimas de esta lipasa, la forma A y la forma B, que presentan ciertas diferencias. La lipasa A es dependiente de Ca^{2+} y más termoestable, mientras que el componente B es menos termotolerante e independiente de metales para su actividad. Su especificidad de sustrato presenta grandes diferencias, ya que la CAL-B es muy activa frente a una gran variedad de sustratos no naturales, mientras que la CAL-A tiene una menor versatilidad. Ambos isoenzimas han sido obtenidos en forma pura a través de procesos de clonación y sobreexpresión en *Aspergillus oryzae*. Para aplicaciones preparativas, el complejo B ha sido mucho más utilizado.

b) Lipasa de *Pseudomonas cepacia*

Esta lipasa al igual que otras aisladas pertenecientes a las especies de pseudomonas, ha sido empleada con alta selectividad tanto en reacciones de hidrólisis y alcoholólisis de ésteres y anhídridos como en procesos de transesterificación de alcoholes. La estructura de rayos X de su conformación abierta ha sido elucidada, presentando la típica estructura de α/β hidrolasa. La enzima está formada por 320 aminoácidos con un peso molecular de 34 KDa. Su tríada catalítica consta de serina, histidina y ácido aspártico mientras que los aminoácidos leucina y glicina contribuyen de manera fundamental a la catálisis por formación de puentes de hidrógeno con el intermedio oxianiónico. Parece que esta lipasa posee un centro activo mucho más estrecho que otras lipasas, ya que en ciertos casos presenta inconvenientes para acomodar sustratos muy voluminosos (Gonzalo, 2003).

Sistemas citocromo-p450

Los citocromos p450 son sistemas de hemo-proteínas que muestran una absorción típica a 450 nm que son codificadas por una súper familia de genes y se encuentran de forma ubicua en diferentes organismos en todos los reinos (hasta 1998 mas de 400 sistemas habían sido informados al comité internacional para la nomenclatura de las enzimas p450). Pertenecen al grupo de mono-oxigenasas externas que transfieren oxígeno molecular a enlaces C-H, N-H o S-H.



. Clasificación del grupo de enzimas citocromo p450 (Hannemann 2007)

Las reacciones que llevan a cabo estos sistemas son extremadamente diversas y contribuyen a la transformación de fármacos, a la bioconversión de xenobióticos, a la bioactivación de carcinógenos químicos, a la biosíntesis de importantes compuestos como los esteroides, ácidos grasos, eicosanoides, vitaminas y ácidos biliares, así como a la degradación de herbicidas e insecticidas y a la conversión de alcanos, terpenos y compuestos aromáticos. A pesar de la gran variedad de reacciones (hidroxilaciones, desalquilaciones, sulfoxidaciones, epoxidaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y peroxidaciones) que estos sistemas pueden catalizar, la ecuación general de todas estas reacciones puede resumirse como sigue: los electrones necesarios para la inserción del oxígeno en el sustrato (R) son obtenidos por un sistema donador de electrones independiente. Estos sistemas donadores de electrones pueden ser un conjunto de dos proteínas (adrenoxina y adrenodoxina reductasas) para citocromos mitocondriales o procaríoticos o bien una sola proteína (citocromo p450 reductasa) para los sistemas localizados en el retículo endoplasmático (en su mayoría identificados en hongos) (Hannemann, 2007; Van den Brink, 1998).

