



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de Biólogo

Laboratorio de Biotransformaciones y Química de Productos Naturales, L-314. Campo II.

Informe:

Laboratorio de Investigación Formativa VII y VIII.

**“Biotransformación de la esclareólida con
Aspergillus niger (ATCC 9029) en tres medios de
cultivo diferentes”**

Que para obtener el título de:

B I Ó L O G O

Presenta:

Ramos Velázquez José Rigoberto

Director del Tesis:

M. en C. Arturo Eduardo Cano Flores



México, D.F.

Marzo 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

A la DGAPA, a través del programa de apoyo a proyectos para la innovación y mejoramiento de la enseñanza (PAPIME) por el apoyo otorgado a través del proyecto PE205910.

Al personal técnico académico del Instituto de Química.

Al laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química, a la M. en C. María Teresa Ramírez y al M. en C. Antonio Nieto.

Al laboratorio 1 del edificio C del Instituto de Química, al Dr. Guillermo Delgado Lamas.

A la carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM.

Dedicatoria

Agradezco en primer lugar y por ser la persona más importante dentro de mi desarrollo como persona, a mi preciosa madre, por que ha sido quien me ha dado los principios y los mejores ejemplos para ser una persona trabajadora y honesta, por que ella ha hecho demasiados sacrificios para que pueda ser una persona de provecho.

Sra. Alicia Velázquez Casillas

Gracias a mi hermana la mayor, por que desde niño ha visto por mi y ha hecho muchos esfuerzos para que en muchas situaciones no me faltara nada y me dio el ejemplo de lo que es el trabajo y aprender a superarme cada día, además de siempre razonar.

María Luisa Ramos Velázquez

También le doy las gracias a mi otra hermana, por que en los momentos más difíciles siempre me apoyo y en demasiadas ocasiones y que pensaba en mi y se preocupo cuando no muchas personas lo hacían me dio diferentes formas de ver las cosas y consejos para tener siempre los pies en la tierra.

Claudia Monica Ramos Velázquez

A mis tías y tíos que en algún momento de mi vida me apoyaron y me tendieron su mano, me abrieron las puertas de sus casas y tenían siempre una palabra de aliento y de mutuo respeto.

A todos mis primos con los que compartí siempre tanto situaciones agradables como desagradables a pesar de nuestras diferencias estamos siempre apoyándonos y acompañándonos unos a otros.

Familia Velázquez

A todas las personas importantes para mí que en algún momento de su vida me tendieron su mano y que juntos compartimos tanto situaciones buenas y malas, pero siempre tratamos de nada nos afectará y seguir siempre juntos y aun que estemos lejos tener buenos recuerdos de nuestras aventuras.

Amigos

Un agradecimiento especial a mi director de tesis por el apoyo brindado en cada uno de los momentos en los que yo realice mi trabajo y por que también tenía alguna palabra de aliento para mí, le tengo un gran aprecio por que es un excelente maestro pero más aun una persona íntegra y un buen ejemplo.

M. en C. Arturo Cano Flores

Finalmente gracias a la vida por haberme relacionado con todas las personas importantes para mí y que de igual manera espero ser importantes para todos, por haberme dado una razón y la capacidad de tener decisión y afrontar las consecuencias.

Atte.

Rigoberto Ramos Velázquez.

Biólogo.

Índice

1. Introducción.....	2
2. Marco teórico.	7
2.1. Generalidades de las biotransformaciones.	7
2.2. Biohidroxilación complejo Citocromo P45.....	7
<i>Esquema 1:</i> Grupos hemo de CYP450.....	8
<i>Tabla 1:</i> Principales reacciones de la biotransformación de algunos compuestos xenobióticos en las diferentes fases del metabolismo.	9
<i>Tabla 2:</i> Sustratos exógenos y endógenos para los CYP450.	11
2.3. Diferencias entre una biotransformación y una fermentación.....	11
<i>Tabla 3:</i> Diferencias entre un proceso fermentativo y un proceso de bioconversión..	11
2.4. Comparación entre una transformación microbiológica vs síntesis química.....	12
<i>Tabla 4:</i> Características generales de una reacción enzimática y una reacción química.....	12
2.5. Generalidades de los hongos filamentosos.....	12
2.5.1. Generalidades.....	12
2.5.2. Ciclo de vida de los hongos.....	13
2.5.3. Nutrientes de los hongos.....	15
2.5.4. Reproducción.....	16
2.5.5. Medio cultivo (generalidad).....	17
2.5.6. Cinética Enzimática.....	18
<i>Figura 1:</i> Fases del crecimiento microbiano.....	21
2.6. <i>Aspergillus niger</i>	21
2.6.1. Taxonomía.....	21
<i>Figura 2:</i> Crecimiento colonial de <i>Aspergillus niger</i>	21
<i>Figura 3:</i> Estructuras microscópicas de <i>Aspergillus niger</i>	22
2.6.2. Historia natural distribución registros biológicos.	22
2.6.3. Ejemplos de aplicaciones.	23
2.7. Fuentes naturales de la Esclareólida (1).....	24
<i>Esquema 2:</i> Estructura de la hispanona y sus derivados.....	25
2.8. Ejemplos de biotransformaciones.....	26

Esquema 3: Biotransformación del ácido betulínico con <i>Cunninghamella sp</i>	26
Esquema 4: Biotransformación del ácido betulínico con <i>B. megaterium</i>	27
Esquema 5: Biotransformación de ácido betulínico con <i>M. mucedo</i> y <i>C. elegans</i>	27
Esquema 6: Biotransformación del ácido ursólico con <i>Nocardia sp</i>	28
Esquema 7 Biotransformación de ursolato de metilo con <i>M. plumbeus</i>	29
Esquema 8: Biotransformación de 5 α -hidroxil-14-epidior-11-en-3-ona con <i>R. nigricans</i>	29
2.9. Biotransformaciones de la esclareólida	30
Esquema 9: Biotransformación de la esclareólida con <i>M. plumbeus</i>	30
Esquema 10: Biotransformación de esclareólida con <i>C. aphidicola</i>	30
Esquema 11: Biotransformación de esclareólida con <i>C. lunata</i> , <i>A. niger</i> y <i>G. fujikuroii</i>	31
Esquema 12: Biotransformación de esclareólida con <i>F. lini</i>	31
Esquema 13: Biotransformación de esclareólida con <i>C. elegans</i>	32
3. Planteamiento del Problema	34
4. Justificación	36
5. Hipótesis	38
6. Objetivos	40
6.1. Objetivo general	40
6.2. Objetivos particulares	40
7. Método	42
7.1. Resiembr a de <i>A. niger</i> (ATCC 9029).....	42
7.2. Preparación de la solución densa de esporas	42
7.3. Preparación de los medios para la bitransformación	42
7.3.1. Medio A (YEPGA)	42
7.3.2. Medio B	42
7.3.3. Medio C (Czapek-Dox)	43
7.4. Factibilidad de biotransformación de la esclareólida por <i>A. niger</i>	43
Tabla 5: Factibilidad de biotransformación de 1 en diferentes medios de cultivo con ocho hongos filamentosos	44

7.5. Inoculación de los medios y proceso de biotransformación cuantitativa.....	44
7.6. Obtención de la mezcla de productos de biotransformación.....	45
7.7. Diagrama de flujo de la metodología seguida de la biotransformación de la esclareólida con <i>Aspergillus niger</i>	45
7.8. Biotransformación de la esclareólida con <i>A. niger</i>	49
<i>Tabla 6:</i> Porcentaje de los productos de la esclareólida con <i>A. niger</i>	49
7.8.1. Biotransformación de la esclareólida con <i>A. niger</i> en el medio A.....	49
7.8.2. Biotransformación de la esclareólida con <i>A. niger</i> en medio B.....	50
7.8.3. Biotransformación de la esclareólida con <i>A. niger</i> en medio C.....	52
8. Resultados.....	54
<i>Tabla 7:</i> Factibilidad de biotransformación de la esclareólida por hongos filamentosos.....	54
<i>Tabla 8:</i> Porcentaje (%) de los productos de biotransformación de la esclareólida con <i>A. niger</i>	54
<i>Tabla 9:</i> Datos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C para los productos de biotransformación.....	55
9. Análisis y discusión de resultados.....	57
<i>Esquema 14:</i> Espectro de RMN ¹³ C (DEPT) para el compuesto (22).....	58
<i>Figura 4:</i> Posibles formulas parciales de localizar al grupo hidroxilo en el esqueleto de la esclareólida.....	58
<i>Esquema 15:</i> Patrón de multiplicidad de H-1 y H-7, observado en RMN- ¹ H (espectro 12.3) para 22.....	59
<i>Esquema 16:</i> Espectro NOESY del compuesto 22.....	59
<i>Esquema 17:</i> Espectro HMBC del compuesto 22.....	60
<i>Esquema 18:</i> Espectro HSQC del compuesto 30.....	61
<i>Esquema 19:</i> Espectro HSQC del compuesto 31.....	62
10. Conclusiones.....	66
11. Bibliografía.....	69
12. Espectros.....	73
Espectro 12.1: RMN- ¹ H de la 3-cetoescclareólida. (21).....	73
Espectro 12.2: RMN ¹³ C de la 3-cetoescclareólida. (21).....	74
Espectro 12.3: RMN- ¹ H de la 3β-hidroxiesclareólida. (23).....	75

Espectro 12.4: RMN ¹³ C de la 3β-hidroxiessclareólida. (23)	76
Espectro 12.5: RMN- ¹ H de la 1β-hidroxiessclareólida. (25)	77
Espectro 12.6: RMN ¹³ C de la 1β-hidroxiessclareólida. (25)	78
Espectro 12.7: RMN- ¹ H de la 3α,6β-hidroxiessclareólida. (30)	79
Espectro 12.8: RMN ¹³ C de la 3α,6β-hidroxiessclareólida (30)	80
Espectro 12.9: RMN- ¹ H de la 1-cetoesclareólida. (31)	81
Espectro 12.10: RMN ¹³ C de la 1-cetoesclareólida. (31)	82
Espectro 12.11: RMN- ¹ H de la 3-ceto, 15-hidroxiessclareólida. (32)	83
Espectro 12.12: RMN ¹³ C de la 3-ceto, 15-hidroxiessclareólida. (32)	84
Espectro 12.13: RMN- ¹ H de la 3β, 15-dihidroxiessclareólida. (33)	85
Espectro 12.14: RMN ¹³ C de la 3β, 15-dihidroxiessclareólida. (33)	86
Lista de abreviaturas y Simbolos	87

1.- INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, la utilización de microorganismos en la obtención de productos comerciales data de las primeras civilizaciones en el mundo, las cuales tenían un desconocimiento sobre la acción de los sistemas enzimáticos en la transformación de diversos productos, pero sin embargo utilizaban bacterias y hongos para la fermentación de cereales y obtención de bebidas alcohólicas, entre otras. Actualmente se emplean enzimas libres o inmovilizadas en muchos de los procesos biotecnológicos. Los cuales inician con los trabajos de Luis Pasteur —químico francés, 1822-1895—, quien fue el primero en demostrar que todo proceso de fermentación se debe a la acción de organismos vivos. En 1907, Eduard Büchner —químico alemán, 1860-1917— recibió el premio Nobel de Química por su descubrimiento sobre el proceso de la fermentación, demostrando que la fermentación alcohólica se debe a la acción de unas enzimas llamadas “*zimasas*” y no a la simple acción fisiológica de las células de las levaduras (en concreto sobre la fermentación alcohólica) en ausencia de células vivas.

Por otra parte, durante la Primera Guerra Mundial se obtuvieron a escala industrial productos resultantes de la fermentación como, por ejemplo, la obtención de grandes cantidades de glicerol, el cual era de gran importancia para la fabricación de explosivos; así como la obtención de grandes cantidades de acetona por el proceso ABE¹ (Acetona, Butanol, Etanol). La obtención del butanol por vía fermentativa fue utilizada por numerosos países antes de los años 50s.

En la década de los 40, los antibióticos como la penicilina² pasaron a ser producidos por procesos fermentativos, actualmente antibióticos como la estreptomina (*Streptomyces griseus*), cloranfenicol (*Streptomyces venezuelae*), neomicina (*Streptomyces fradiae*) y cefalosporina (*Cephalosporium acremonium*) son producidos utilizando cepas de bacterias y hongos.

¹ Proceso que utiliza la fermentación bacteriana para la obtención de acetona por la fermentación del almidón en presencia de *Clostridium acetobutylicu*, proceso desarrollado por el químico Chaim Weizmann (Primer Presidente del Estado de Israel).

² Antibiótico descubierto por el Biólogo y Farmacólogo Sir Alexander Fleming a partir del hongo *Penicillium notatum*.

Con el descubrimiento y la estructura tridimensional del ADN por Watson y Crick en 1953 y las técnicas de manipulación genética, basadas en la tecnología del ADN recombinante, han permitido la obtención de diferentes productos por medio de dichas técnicas, donde sobresale la producción de insulina recombinante.

Por otro lado, en la literatura especializada se ha reseñado el uso de hongos, bacterias, cultivo de tejidos vegetales, enzimas libres o inmovilizadas para la transformación de muchas sustancias de interés farmacéutico, agroquímico, de química fina, en la industria de los alimentos, los cuales son procesos “amigables” con el medio ambiente.

En la última década, las biotransformaciones han adquirido un interés creciente y actualmente se han constituido en una de las áreas más promisorias de investigación científica, debido a su posible aplicación en la obtención de materias primas y productos útiles en diferentes procesos industriales; así como en sectores tan importantes como el farmacéutico, el químico, el de alimentos y el agrícola; de ahí que en el mundo se destinen altas inversiones para su desarrollo. Se considera que de los 134 procesos industriales reconocidos que utilizaron este tipo de procesos, más de la mitad aparecieron en los últimos diez años y la tendencia aumenta notablemente. De estos procesos la mayor parte corresponde al sector farmacéutico, con un 55% y tiene como finalidad obtener fármacos quirales enantioméricamente puros. En esta industria la modificación estructural de los compuestos esteroidales también es una prioridad.

Con base en lo anterior, una biotransformación se puede definir como el proceso en el cual se realizan cambios estructurales a un compuesto químico utilizando organismos completos (hongos, bacterias, plantas), partes de organismos, células aisladas o modificadas y enzimas puras o inmovilizadas —biocatálisis—. Las biotransformaciones y la biocatálisis presentan ventajas y desventajas. Una ventaja de el uso de células completas es la disponibilidad del agente que biotransforma (en el caso de los hongos estos pueden ser aislados de su propio hábitat). Por otro lado, las enzimas puras son más estables y fáciles de usar, es decir son más específicas para un sustrato, conduciendo

frecuentemente a productos con un elevado grado de pureza y de un valor económico agregado.

Actualmente el uso de los microorganismos como biocatalizadores ha despertado un interés particular, en parte como consecuencia de su habilidad para producir grandes cantidades de biomasa y una amplia variedad de enzimas diferentes en un corto tiempo. Además, muchos microorganismos pueden crecer bajo condiciones diversas y en una amplia variedad de sustratos. Esta flexibilidad metabólica exige que los microorganismos posean la capacidad de producir enzimas diferentes para toda clase de reacciones. Adicionalmente, diversas enzimas, requeridas para llevar a cabo una biotransformación determinada, pueden estar presente en las células completas de un microorganismo y actuar simultáneamente sin generar interferencia entre ellas.

Una de las principal aplicación de las biotransformaciones en síntesis orgánica está en la preparación de compuestos enantiopuros, estas también se usan para efectuar transformación de grupos funcionales quirales —principalmente grupos hidroxilo—, ya que las biotransformaciones se llevan a cabo, generalmente a temperatura ambiente y presión atmosférica, evitándose con ello el uso de condiciones de reacción extremas, las cuales pudieran causar isomerización, racemización, epimerización y transposición. Estas ventajas significativas resultan más importantes aún si se considera que los productos obtenidos tendrán aplicación en el tratamiento de algún tipo de enfermedad, o en el caso de los agroquímicos, a través de los alimentos ingeridos, para mejorar la calidad de vida del ser humano.

Cabe destacar, que las biotransformaciones son el principio de la biorremediación, lo que constituye una contribución a la generación de procesos industriales de bajo impacto ambiental, ya que los organismos eucariotas tienen un sistema de defensa en contra de agentes químicos externos (agentes xenobióticos) que le pudieran causar algún daño total o parcial, esto se logra por diferentes procesos químicos, los cuales se llevan en condiciones fisiológicas. Esto quiere decir que el organismo biotransforma dichas sustancias para posteriormente eliminarlas. Lo anterior se logra por medio de un sistema

enzimático, que actúa como biocatalizador para transformarlas en agentes químicos menos reactivos o menos tóxicos.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se dan a conocer los resultados obtenidos de la biotransformación de la esclareólida (**1**) con *A. niger* (ATCC 9029), entre medios de cultivo³ diferentes.

³ Medio A: Extracto de levadura, Peptona, Extracto de carne, Glucosa; Medio B: Glucosa, Glicerol, Peptona, Extracto de levadura, KH₂PO₄, NaCl; Medio C: Sacarosa, NaNO₃, MgSO₄, KCl, FeSO₄, KH₂PO₄, Agar.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Generalidades de las biotransformaciones.

La incorporación de las transformaciones biológicas por medio de microorganismos y/o enzimas, se ha incrementado en los últimos años en la industria y en los laboratorios de síntesis orgánica, con la finalidad de investigar nuevas rutas de producción para la obtención de compuestos en química fina, farmacéutica, agroquímicos, entre otros [1-4]. De manera, que hoy son consideradas como herramientas de uso frecuente, económica y ecológicamente competitivas por los químicos orgánicos sintéticos.

Desde el punto de vista de los procesos semisintéticos de productos naturales, la introducción de un grupo hidroxilo es muy útil, ya que es un grupo funcional muy versátil que abre una serie de posibilidades de reacción en el carbono sobre el que está situado y sobre la zona vecina de la molécula. En este caso los sistemas enzimáticos involucrados son monooxigenasas, particularmente el Citocromo P-450 [5-6]. La “*biohidroxilación*” ha tenido un gran desarrollo, principalmente en el campo de los esteroides y terpenoides debido a la gran demanda industrial de sus productos finales [7-8].

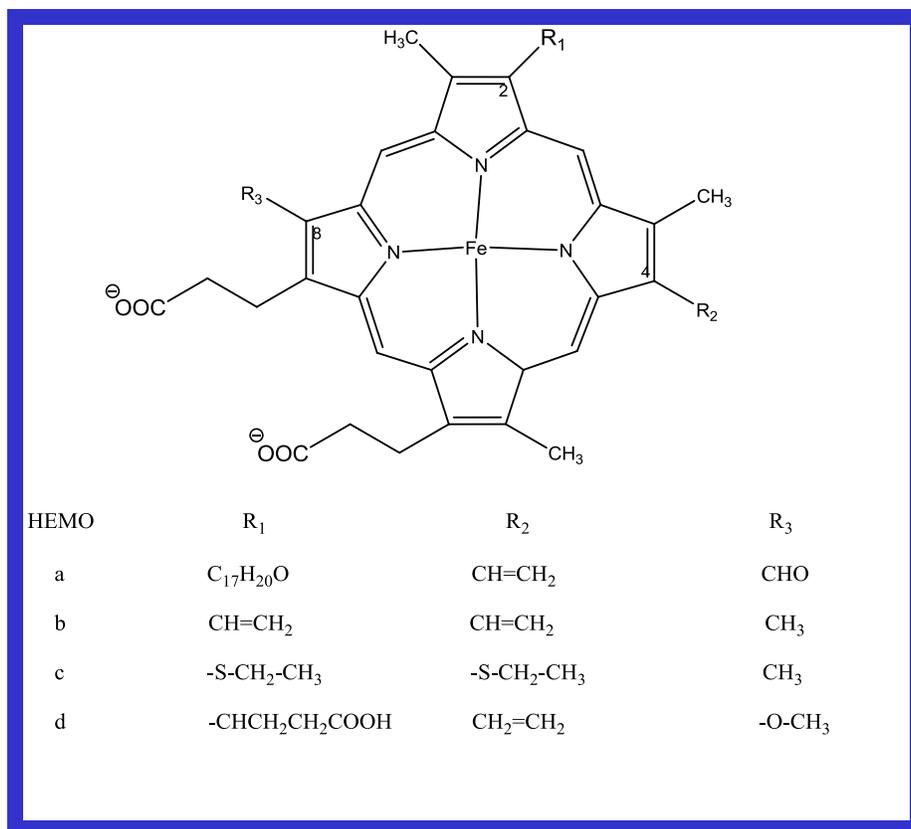
Algunas enzimas presentan especificidad casi absoluta por un determinado sustrato y no actúan sobre moléculas con estructura incluso similar. Otras, sin embargo, no poseen esa especificidad y son capaces de actuar sobre un gran número de moléculas que poseen características comunes [9].

2.2. Biohidroxilación complejo Citocromo P450⁴.

Los citocromos son proteínas transportadoras de electrones que catalizan diversas reacciones de óxido-reducción. Estas proteínas contienen un grupo prostético hemo que reversiblemente alterna entre los estados de oxidación ferroso y férrico [Fe (+2) y Fe (+3)] durante el transporte de electrones en la respiración y en la fotosíntesis. Se dividen en cuatro grupos **a**, **b**, **c** y **d** dependiendo de la naturaleza de las cadenas laterales del

⁴ La función del citocromo P450 fue establecida por Estabrook y col. (1963), quienes mostraron que la hidroxilación en el C-21 de la 17-hidroxi-progesterona podía inhibirse con CO, mientras que la irradiación con luz liberaba el efecto inhibidor del CO.

grupo prostético hemo, es decir, cada uno de los cuatro tipos contiene una cadena lateral diferente en su porfirina, ver esquema 1[10].



Esquema 1: Estructuras de los grupos hemos de los citocromos P 450.

Numerosos compuestos químicos que se encuentran en el interior de las células, como ácidos grasos y esteroides (*endobióticos*); así como diversos compuestos químicos extraños⁵ al metabolismo celular que se encuentran en el ambiente, como: hidrocarburos alifáticos y aromáticos, insecticidas, herbicidas, agentes terapéuticos, los cuales son metabolizados por las oxidasas —enzimas de función mixta— que se encuentran en las células de diversos seres vivos, ver tabla1 [11].

⁵ Son compuestos exógenos —xenobióticos— que son biotransformados como mecanismo de desintoxicación pero que en ocasiones puede ser un proceso de activación de compuestos inicialmente inertes a metabolitos intermedios muy reactivos.

Reacción	Enzima	Sustrato
<i>Fase I — Funcionalización</i>		
Oxidación	Oxidasas de función mixta	Alcanos, alquenos, arenos, aminas
Oxidación	Alcohol deshidrogenasas	Alcoholes
Reducción	Oxidasas de función mixta	Grupos azo y nitro
Hidrólisis	Esterasas	Ésteres
<i>Fase II — Conjugación con</i>		
Agua	Epóxido-hidrolasa	Epóxidos
Glutación	Glutación transferasas	Electrofílicos
Ácido glucurónico	Glucoronil-transferasas	Fenoles, tioles, aminas
Ácido acético (Acetil-CoA)	N-acetiltransferasas	Aminas

Tabla 1: Principales reacciones de biotransformación de algunos compuestos xenobióticos en las diferentes fases del metabolismo.

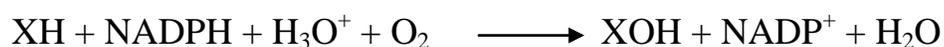
La biotransformación es el proceso mediante el cual un sustrato exógeno (xenobióticos), esencialmente poco soluble en agua se convierte en un metabolito más hidrosoluble y más fácilmente excretable.

Para su estudio, las biotransformaciones pueden dividirse en dos fases: **F-I**, se refiere a todas las reacciones que introducen grupos funcionales o reactivos a las moléculas, estas transformaciones metabólicas incluyen, reacciones: como la hidrólisis, la oxidación y la reducción. Esta fase es catalizada principalmente por el sistema enzimático de los citocromos P450. **F-II** del metabolismo, es la conjugación de los metabolitos generados en la **F-I** con aminoácidos, ácido glutámico o glutación, estas conjugaciones facilitan el transporte y eliminación de los metabolitos, fase que es catalizada fundamentalmente por la glutación transferasas, ver tabla 1.

Las oxidasas consumen una molécula de oxígeno molecular por cada molécula de sustrato, insertando un átomo de oxígeno en el sustrato y catalizan la reducción equivalente del otro átomo de oxígeno —hasta agua— de ahí el nombre de monooxigenasas.

El sistema CYP 450, interviene en diferentes rutas metabólicas y posee al menos tres tipos de actividad:

a). **Actividad de monooxigenasas.** Se lleva a cabo en presencia de oxígeno y NADPH; a través de esta actividad los compuestos xenobióticos inertes sufren diversos tipos de reacciones que pueden resumirse como:



b). **Actividad de oxidasa.** En ella ocurre la transferencia de electrones de un P450 reducido al oxígeno molecular acompañado de la formación de radicales aniónicos superóxido (O_2^-) y de peróxido de hidrógeno. La reacción general es:



c). **Actividad de reductasa.** Ocurre en condiciones anaerobias, y en ella se da la transferencia de electrones a sustratos para producir radicales libres.

Como la incorporación de oxígeno molecular al sustrato generalmente lo hace hidrófilo muchas de las reacciones mediadas por los citocromos P450 son de desintoxicación. Cuando el sustrato se hace más soluble en agua tiende a reducir su capacidad para unirse a compuestos grasos, por lo cual aumenta también su arrastre y transporte fuera del organismo. Por otro lado, otras reacciones catalizadas por los citocromos P450 son de bioactivación, generándose así compuestos electrofílicos que pueden reaccionar con los grupos nucleofílicos de diversas macromoléculas celulares o que pueden ser conjugados por las enzimas de la fase II y ser excretados, ver tabla 2 [12].

Sustratos exógenos	Sustratos endógenos
Agentes terapéuticos	Esteroides
Antibióticos	Eicosanoides
Antioxidantes	Ácidos grasos
Disolventes	Hidroperóxidos (lípidos)
Anestésicos	Retinoides
Pesticidas	Acetona
Derivados del petróleo	Acetona
Alcoholes	

Tabla 2: Sustratos exógenos y endógenos para los citocromos P450.

2.3. Diferencias entre una biotransformación y una fermentación.

Hay dos vías que usan los microorganismos en la producción de compuestos útiles; una se refiere a la fermentación⁶ y la otra a la biotransformación^{7,8} de un sustrato exógeno. En la tabla 3, muestran las diferencias que existen entre ambos procesos [13].

	Biotransformación	Fermentación
Microorganismo	Células en crecimiento, en reposo o modificadas	Células en crecimiento
Reacción	Catálisis simple (en uno o más pasos).	Proceso natural (múltiples procesos)
Tiempo de reacción	Corto	Largo
Sustrato	Caros	Simples fuentes de carbono y nitrógeno
Producto	Natural o sintético	Natural
Concentración del producto	Alta	Baja
Aislamiento del producto	Fácil	Difícil

Tabla 3: Diferencias entre un proceso fermentativo y un proceso de bioconversión [13].

⁶Fermentación alcohólica, ácidos orgánicos, disolventes, antibióticos, aminoácidos, ácidos nucleicos y compuestos relacionados.

⁷ El proceso vital de un microorganismo requiere de la producción de enzimas y el microorganismo mismo es capaz de usar una serie de enzimas como catalizadores. Por ejemplo la síntesis de la pregnolona por *Rhizopus arrhizus*.⁰

⁸ En 1952 el grupo de investigación de la compañía Upjohn dirigido por Piterson y Murray, encontró que el hongo *Rhizopus arrhizus*, aislado al exponer una placa de agar en una ventana de modo fortuito transforma la progesterona en la 11 α -hidroxiprogesterona en buenos rendimientos.

2.4. Transformación microbiológica contra síntesis química.

Una reacción química llevada a cabo por un microorganismo o catalizada por una enzima⁹ es la misma que puede ser llevada a cabo de manera convencional en la síntesis química. En la tabla 4, se enlistan las características generales de una reacción enzimática y una reacción química [13].

	Reacción enzimática	Reacción química
Condiciones de la reacción		
> <i>Temperatura</i>	Fisiológica	Alta
> <i>Presión</i>	Fisiológica	Alta
Fuente de energía	Cambios en la conformación (formando y rompiendo enlaces secundarios)	Térmica
Disolvente	Agua	Agua o disolventes orgánicos
Especificidad		
> <i>Del sustrato</i>	Alta	Baja
> <i>Estereo</i>	Alta	Baja
> <i>Regio</i>	Alta	Baja
Concentración de sustrato y/o producto	Baja	Alta

Tabla 4: Características generales de una reacción enzimática y una reacción química [13].

2.5. Generalidades de los hongos filamentosos

2.5.1. Generalidades

El crecimiento de un organismo puede definirse como el aumento coordinado de todos los componentes químicos y estructurales que lo integran. El crecimiento es el resultado del equilibrio entre las reacciones metabólicas del organismo, el cual se puede cuantificar de manera muy diversa, lo que permite conocer si un organismo es más eficiente que otro en

⁹ La unión internacional de bioquímica lista más de 2000 enzimas. Las cuales han sido clasificadas por la reacción que catalizan, más de 800 enzimas purificadas se encuentran comercialmente disponibles.

su metabolismo, conocer que nutrientes o condiciones del medio favorecen el crecimiento, entre otros.

El crecimiento de un organismo no es siempre constante y ocurre en diferentes etapas, con distinta velocidad. En muchos organismos el crecimiento es acompañado por cambios estructurales y/o cambios que dan lugar a la especialización del organismo en su totalidad, en alguna parte u órgano específico, a este proceso se le conoce como diferenciación.

El estudio de los fenómenos de diferenciación en los hongos ha sido muy importante, ya que ha permitido comprender su crecimiento y los fenómenos que regulan la esporulación y la germinación de las esporas. Cabe señalar que un importante modelo para analizar la diferenciación celular ha sido el dimorfismo, es decir, la capacidad que tienen para crecer en forma de micelio o de levadura, dependiendo de las condiciones ambientales. Por otro lado, la diferenciación de los hongos ha sido muy útil desde el punto de vista de la biología comparada, ya que ha demostrado la conservación de los fenómenos básicos del desarrollo en todos los eucariotas, incluyendo organismos aparentemente tan simples como los hongos.

2.5.2. Ciclo de vida de los hongos

El ciclo de vida de un hongo incluye todos los estadios diferenciativos por los que transcurre la vida del organismo, desde su nacimiento hasta su reproducción. En la mayoría de los hongos miceliales el ciclo de vida se puede dividir en asexual-sexual y asexual en cuyos casos ambos procesos ocurren de manera intermitente. En el primer caso podemos partir de esporas¹⁰ especializadas, bajo condiciones adecuadas. Las esporas germinan y producen un micelio vegetativo con forma y función diferente a la de la espora inicial. Al darse ciertas condiciones se forma el micelio aéreo que va a dar lugar a las esporas que cierran el ciclo de vida del organismo.

¹⁰ Las esporas de un hongo colocadas en un medio adecuado germinan para producir el micelio vegetativo. Cabe señalar que las esporas son estructuras de resistencia que permiten la perpetuación de la especie a manera de las semillas de un vegetal.

La actividad metabólica de las esporas es mínima, casi no respiran, y no sintetizan proteínas o ácidos nucleicos. El inicio de la germinación coincide con la aparición de los primeros síntomas de la aparición metabólica, aumenta la respiración, se inicia la síntesis de macromoléculas y ocurren cambios significativos en la composición química. Las condiciones del medio que se requieren para la germinación de las esporas son muy variables. Algunas sólo requieren de alta humedad, otras de una fuente de carbono accesible y otras de fuentes de carbono y nitrógeno. Es importante señalar que aunque la espora se halla en presencia de una fuente de carbono como un azúcar, los primeros estadios en su germinación ocurren a expensas del material de reserva acumulado en la espora, fundamentalmente del disacárido trehalosa. Parece ser, por lo tanto, que el azúcar exógeno actúa como una señal que activa a la espora, más que como un material energético.

Los hongos son organismos vivos que pueden ser unicelulares o pluricelulares, tienen una distribución cosmopolita, son importantes dentro de las cadenas tróficas pues estos se alimentan principalmente de materia orgánica muerta y por medio de su complicado metabolismo y también en algunas ocasiones, los hongos ayudan a plantas, por ejemplo, en la fijación de nitrógeno, las formas en que podemos encontrar a los hongos son muy variadas, desde unicelulares como las levaduras hasta pluricelulares como los hongos filamentosos.

Las células de los hongos son eucarióticas y por lo tanto tienen todos los orgánulos celulares, sus formas pueden ser en caso de unicelulares ovaladas y muy pequeñas y en caso de pluricelulares son alargadas y cilíndricas y en conjunto lineal forman filamentos llamados hifas, estas en algunas ocasiones pueden crecer en colonias y dar un aspecto algodonoso o bien tener una estructura filamentosa definida.

Cuando son hongos filamentosos, se dividen por las características de sus hifas en Inferiores: poseen hifas anchas, sin fabricación y por ello varios núcleos para un citoplasma, forman mohos. Superiores: tienen hifas finas y sus células están divididas aunque comunicadas entre sí por el citoplasma, forman mohos y setas.

2.5.3 Nutrientes de los hongos

Los hongos están considerados como quimioheterótrofos estrictos. Son incapaces de fotosintetizar y por consiguiente necesitan sustratos ricos en energía y biomasa. Los hongos producen una amplia variedad de enzimas extracelulares, principalmente oxidasas e hidrolasas y pueden utilizar la mayor parte de los sustratos orgánicos que existen naturalmente, incluyendo la celulosa, quitina, almidón, azúcares, hemicelulosa y lignina. Normalmente los carbohidratos son las principales fuentes de carbono accesibles a los hongos; son metabolizados para proporcionar energía y también actúan como precursores para la síntesis del material celular. Puesto que los hongos son heterótrofos clásicos su metabolismo básico es esencialmente idéntico al mostrado por otros organismos, como las bacterias que emplean esta estrategia metabólica.

Otras fuentes de carbono utilizadas por los hongos incluyen alcoholes, hidrocarburos, glicerol y almidón. Los hongos utilizan nitrógeno fundamentalmente en la forma de amonio, aunque casi todos pueden utilizar nitrato. El nitrito es generalmente tóxico para los hongos. Otras fuentes de nitrógeno incluyen urea, hidroxilamina, L-aminoácidos y péptidos.

Los hongos asimilan al azufre en estado inorgánico oxidado, como sulfatos, su utilización implica por lo tanto una reducción preliminar a sulfuro para su incorporación al material celular —reducción asimiladora de sulfatos— .

El fósforo es utilizado a partir de fosfatos, concentraciones elevadas de este elemento, determinan la inhibición en el crecimiento de muchos microorganismos, aunque algunos son tolerantes.

El oxígeno, como constituyente universal de las células es un nutriente proporcionado en cantidades abundantes por el agua; sin embargo, la mayoría de los microorganismos requieren además de oxígeno molecular, el que para cubrir las necesidades energéticas actúa como aceptor final de electrones —aerobios estrictos—.

Los hongos generalmente crecen en el laboratorio sobre medio definido que contiene azúcares como glucosa y sacarosa, o sobre polímeros como celulosa. Hasta recientemente

los micólogos utilizaban también medios complejos no definidos sobre los que crecen los hongos, incluyendo el medio papa-dextrosa-agar (PDA), y medios basados en vegetales. El nitrógeno inorgánico generalmente se suministra a los medios en forma de amonio, nitrato, amidas o aminoácidos.

Otros nutrientes minerales importantes requeridos por los hongos, para un máximo rendimiento incluyen fósforo, azufre, potasio y magnesio. También se requieren para el funcionamiento de las enzimas en condiciones de crecimiento rápido nutrientes menores como zinc, cobre, molibdeno [14].

Lo que se refiere a su metabolismo los hongos son heterótrofos, los nutrientes complejos se digieren mediante exoenzimas liberadas al medio y posteriormente serán absorbidos, realizan la glucólisis de donde obtiene energía a partir de la glucosa, son aerobios pues no les es suficiente la energía obtenida de la fermentación, aunque existen hongos que son anaerobios pues les es suficiente la energía de la glucólisis y las fermentaciones anaeróbicas que producen diversos metabolitos, pero su crecimiento anaeróbico es más lento.

Debido a que los hongos se pueden desarrollar en diferentes medios, los cuales están constituidos por diferentes sustratos, sus requerimientos nutricionales son variados y poco específicos, por este motivo pueden ser fácilmente cultivados *in vitro*.

2.5.4 Reproducción

Esta etapa de su desarrollo es algo compleja por que no existe un patrón, pues la reproducción sexual puede llevarse a cabo tanto en hongos unicelulares como en filamentosos, por tanto los hongos que realizan la reproducción sexual se llaman perfectos y por consiguiente los hongos que se reproducen asexualmente se llaman hongos imperfectos.

En la reproducción asexual de las levaduras se da por gemación, esto es, de una célula madre por división mitótica, se crea una célula hija, cada célula está totalmente separada; en los filamentosos se da por la formación de diferentes tipos de esporas y estas se crean

en distintos tipos de hifas especializadas, las esporas pueden ser internas llamadas esporangiosporas formadas dentro de una estructura sacular llamada esporangio y la hifa con esta especialización es un esporangioforo, y las esporas externas se llaman conidios y se encuentran en la punta de hifas especializadas que son los conidióforos. Otro tipo de esporas que se pueden encontrar en las formas vivas de los hongos son las clamidosporas, las cuales pueden soportar condiciones extremas y quiescencia.

Por otro lado, encontramos la reproducción sexual la cual en ambas formas de hongos, está dada por la unión de dos células en dos fases diferentes la primera es la unión de citoplasmas (plasmogamia), la segunda es la fusión de los núcleos (cariogamia), esto nos da esporas haploides que se diferencian según su estructura y morfología, zigosporas, ascosporas y basidiosporas.

2.5.5. Medio de cultivo (generalidad)

Un cultivo es una población microbiana obtenida en el laboratorio bajo condiciones controladas. Para poder trabajar con una cepa determinada, en investigación, identificación, aplicación o control de un microorganismo, es necesario contar con un cultivo puro; es decir, aquel en el cual sólo existe un tipo de microorganismo, descendiente de un individuo con características idénticas.

Los medios selectivos son aquellos que contienen una sustancia que inhiben algunos microorganismos pero no afectan la especie o al grupo que se desea aislar. La variedad de medios de cultivo son enormes, pueden prepararse en el laboratorio, agregando algún antibiótico, alguna sal o modificando el pH y pueden adquirirse en el mercado, generalmente deshidratados.

La elección del medio depende desde luego del microorganismo o grupo microbiano que se desea aislar, así como de las características del contaminante

2.5.6. Cinética Enzimática

Se entiende por crecimiento microbiano el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por tanto, no se refiere al crecimiento de un único microorganismo (*ciclo celular*) sino al demográfico de una población.

Se denomina ciclo celular al proceso de desarrollo de un hongo considerado de forma aislada. A lo largo del ciclo celular, tiene lugar la replicación del material del hongo, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento. La duración del ciclo celular coincide con el tiempo de generación y depende, en general, de los mismos factores de los que depende este.

El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos los individuos. Este crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Por consiguiente, en un momento determinado en una población se encuentran células que acaban de dividirse, otras que están replicando su ADN y elongándose, otras que están iniciando la división celular, entre otros.

En un crecimiento sincrónico todas las células se encuentran simultáneamente en la misma fase del crecimiento celular. Los cultivos sincrónicos son muy difíciles de mantener por lo que su importancia está principalmente ligada a los estudios básicos de biología microbiana. Sin embargo, en la naturaleza, las bacterias del suelo se encuentran en condiciones de crecimiento próximas a la fase estacionaria (en la que se produce una cierta sincronización del cultivo) y, por consiguiente, durante cierto tiempo las poblaciones naturales probablemente se comporten como relativamente sincrónicas.

Las poblaciones de hongos pueden crecer de una forma explosiva acumulando grandes números en un periodo de tiempo muy reducido. Puesto que el efecto nocivo (infecciones o intoxicaciones) de los microorganismos depende de su número en la mayoría de los

casos, entender cómo se produce el crecimiento microbiano es importante para poder evitar o reducir dichos efectos nocivos.

Se denomina crecimiento equilibrado a aquél en el que toda la biomasa, número de células, cantidad de proteínas, de ADN, entre otros, evolucionan en paralelo. El crecimiento equilibrado probablemente ocurra en muy contadas ocasiones en condiciones naturales.

Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse (cuando no hay crecimiento). Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduzca, por ejemplo, en liberación de toxinas.

El crecimiento explosivo de un microorganismo¹¹ produce un gran número de células a partir de una célula única inicial, de forma que tras un periodo de tiempo de incubación en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia de individuos iguales.

Para crecer, un microorganismo necesita nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan —autótrofos y heterótrofos—.

Los medios de cultivo se pueden clasificar en definidos (composición química definida) y complejos, cuando están constituidos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, entre otros). Por otra parte, los medios de cultivo

¹¹ La fórmula elemental de un microorganismo es, aproximadamente, $C_4H_7O_2N$ lo que supone que los componentes de las células son: carbono que representa alrededor del 50% del peso seco, oxígeno (32%), nitrógeno (14%) y debe estar disponible, normalmente, en forma de NH_4 o de aminoácidos a los que se pueda tomar su grupo amino; fósforo (3%) y debe estar en forma de PO_4^{3-} , azufre que representa en torno al 1% y procede de aminoácidos sulfurados o de SO_4^{2-} ; y otros elementos traza entre los que se encuentran Fe, K, Mg, Mn, Co, Mb, Cu y Zn.

pueden ser líquidos o sólidos (agar). Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos¹².

En un cultivo microbiano en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano: a) *Fase lag o de adaptación*: Los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial, b) *Fase exponencial o logarítmica*: en esta fase la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante dicha fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima, c) *Fase estacionaria*: en ella no se incrementa la cantidad de biomasa ni variación de los parámetros de cultivo. Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente en comparación a las células que se encuentran en la fase exponencial; además se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios.

Un microorganismo entran en fase estacionaria por el consumo de algún nutriente esencial del medio, por la eliminación de productos liberados durante la fase de crecimiento exponencial, que hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento. La importancia de la fase estacionaria reside en que hay una mayor fidelidad al estado metabólico real de los microorganismos en muchos ambientes naturales, d) *Fase de muerte*: en dicha fase se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo.

¹² a) Recuento directo, b) turbidez del cultivo, c) Recuento de viables, d) medidas de parámetros bioquímicos y e) medida de la actividad metabólica.

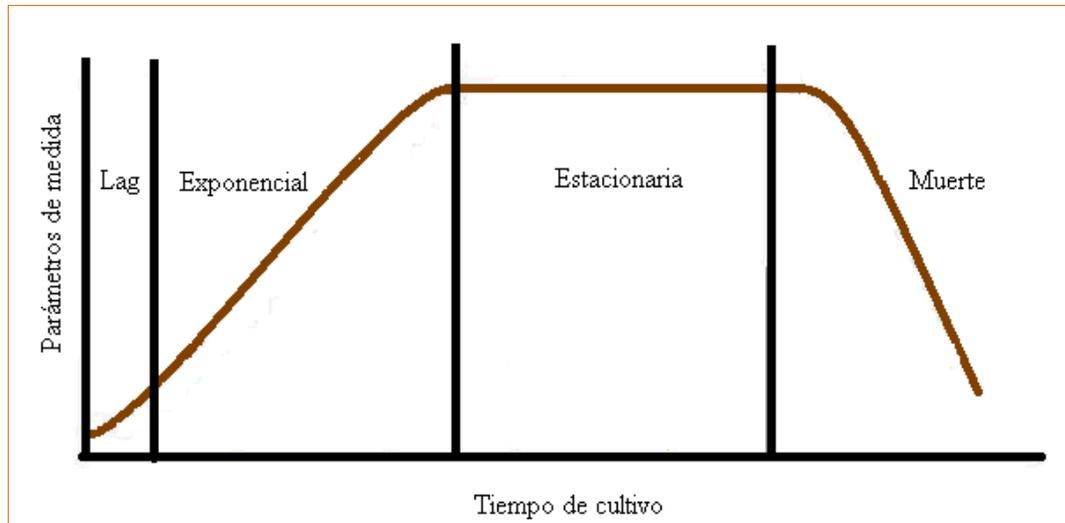


Figura1: Fases del crecimiento microbiano.

2.6. *Aspergillus niger* [15]

2.6.1. Taxonomía (van Tieghem 1867)

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: *Aspergillus*

Especie: *Aspergillus niger*

Características macroscópicas: Colonias de color negro o marrón muy oscuro; reverso incoloro a amarillo; colonia densa y granular.

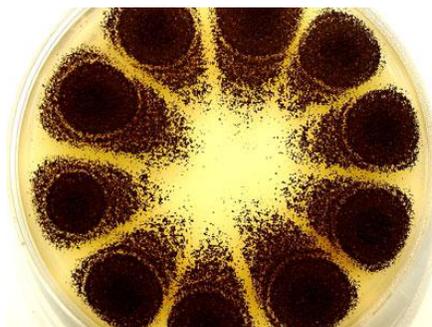


Figura 2: Crecimiento colonial de *Aspergillus niger*.

Características microscópicas: Cabezas conidiales biseriadas y radiales; estipes de paredes gruesas, lisos, hialinos, amarillentos o de color marrón pálido, en especial cerca de la vesícula. Vesícula casi esférica; métulas ocupando toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos de color marrón, normalmente muy rugosos con crestas irregulares y protuberancias.

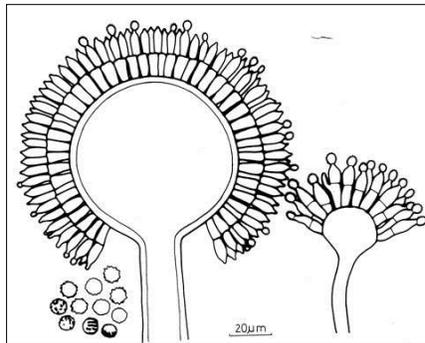


Figura 3: Estructuras microscópicas de *Aspergillus niger*.

2.6.2. Historia natural, distribución y registros biológicos.

Esta especie tiene una amplia distribución mundial, su ocurrencia ha sido documentada desde la región ártica hasta el trópico. A diferencia de otras especies, los informes de *A. niger* en el trópico no superan el 50% del total estimado; sin embargo, se reconoce que es más común en regiones cálidas.

Es considerado un microorganismo saprobio común del suelo. Sin embargo, en su interacción con el hombre y animales, este hongo se reconoce como patógeno asociado a infecciones del oído medio y externo, también se ha asociado a enfermedades pulmonares y renales.

Considerando su distribución con respecto al clima, la vegetación y el suelo, se presenta la siguiente lista representativa de los hábitat en los que se ha informado: Suelos glaciares en Alaska, pastizales, suelos secos con vegetación de estepa, bosques de coníferas, suelo de

trufas, suelos desérticos, dunas de arena, estuarios, manglares; asimismo en ambientes acuáticos marinos y de agua dulce, aguas contaminadas y lechos de ríos.

De acuerdo con numerosos informes, esta especie se distribuye en suelos con pH entre 4-8 y su abundancia relativa aumenta luego de las actividades de labranza y fertilización del suelo, tolera altas concentraciones de herbicidas. Se encuentran también sobre una variedad de sustratos incluyendo: granos, forraje, frutos, vegetales, semillas y en la rizósfera de una gran variedad de plantas como banano, trigo, arroz, algodón, café, caña de azúcar, cebada, avena, maíz y guisantes, entre otros. Como fitopatógeno se ha asociado a lesiones en la raíz de cacahuetes y síntomas en sorgo, cebolla y ajo. Algunas cepas, que provienen de suelos ácidos, tienen la capacidad de solubilizar el fosfato de calcio en medio de cultivo.

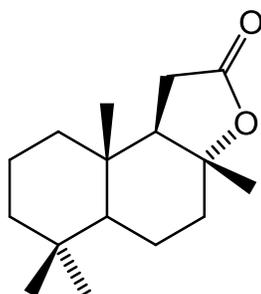
2.6.3. Ejemplos de aplicaciones.

Este hongo es empleado en varios procesos industriales por la variedad de enzimas que produce. Los ácidos cítrico y glucónico son obtenidos comercialmente por el uso de este microorganismo. Asimismo se producen preparaciones enzimáticas y algunos antibióticos.

La cepa de referencia ATCC-10579 produce inulinasa (*endo*inulinasa), mientras la cepa de referencia ATCC-10864 produce grandes cantidades de maltasa y pequeñas cantidades de α -amilasa, también produce etanol a partir de almidón de papa cuando se cocultiva con *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC-26603) y degrada el almidón no hidrolizado de la papa. Produce además enzimas como: acetil-xilan-esterasa, acetilesterasa, α -glucosidasa (maltasa), α -amilasa 1A; glucoamilasa, monoamino oxidasa y enzimas sacarificantes. La cepa de referencia ATCC-11414 produce ácido cítrico, 6-fosfofructo-2-kinasa, ATP-citrato-liasa, carnitina acetiltransferasa y poligalacturonasa. La cepa de referencia ATCC-12845, produce ácido cítrico y degrada melazas. Las cepas de referencia ATCC-13496 y 13497 producen glucoamilasa [15].

2.7 Fuentes naturales de la Esclareólida (1).

Dentro de las fuentes naturales de donde se ha aislado la esclareólida (1) como constituyente minoritario se encuentra: *Árnica angustifolia*, *Sideritis nutans* y *Kyllinga erecta*.



(1)

El género *Árnica* consta aproximadamente de 30 especies vegetales, son plantas perennes, herbáceas, que pertenecen a la familia *Asteráceae*.¹³

Este género circumboreal y montaño florece en su mayoría en las regiones templadas del Occidente de Norteamérica; siendo *A. angustifolia* y *A. montana* especies endémicas del continente Europeo.

- Familia: *Asteraceae*
- Género: *Árnica*
- Especies: *angustifolia*



- País: España
- Familia: *Labiataeae*
- Género: *Sideritis*
- Especie: *nutans*

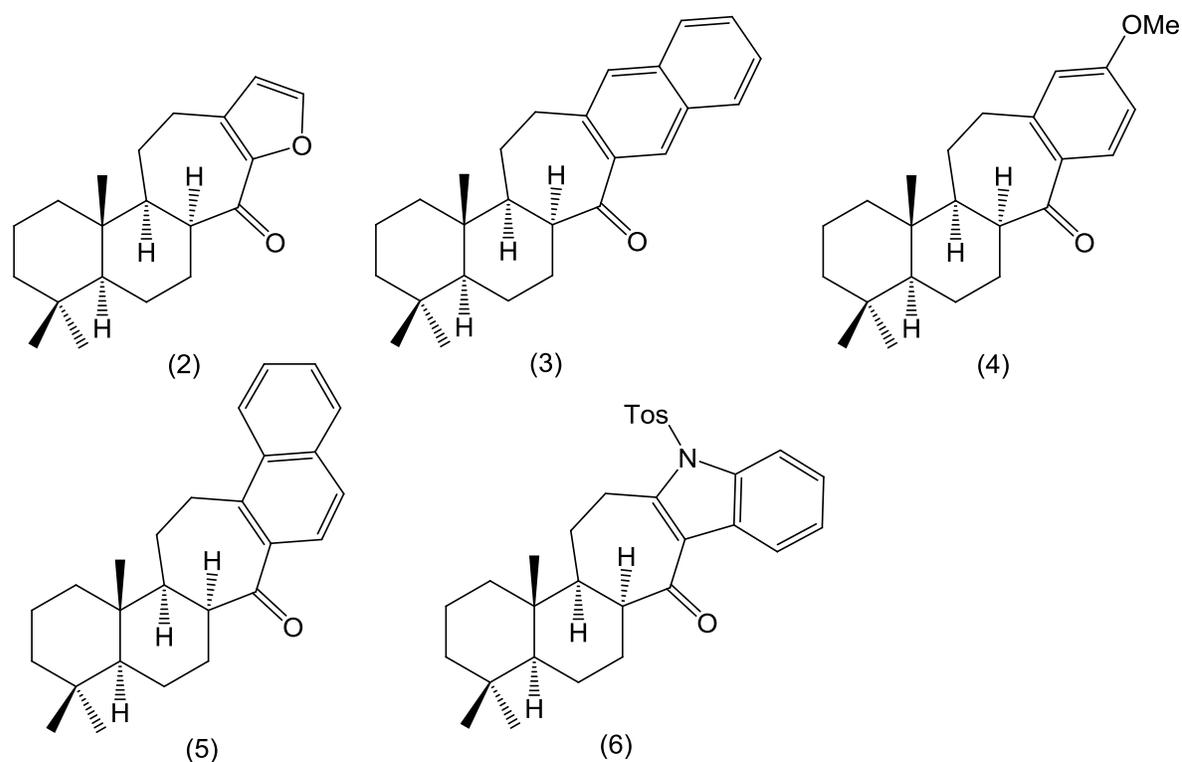


¹³ Su nombre común en español es árnica y significa *piel de cordero*, aludiendo al tacto de sus hojas, suaves y peludas.

- País: Sur África
- Familia: *Cyperaceae*
- Género: *Kyllinga*
- Especies: *Kyllinga erecta*



La (R)-(+)-esclareólida (**1**) se ha utilizado como materia prima para desarrollar una metodología para la síntesis de labdanos¹⁴, como la preparación de la hispanona (**2**) y sus derivados (**3-6**) ver esquema 2, [16]. La utilidad de la esclareólida como materia prima en la síntesis de dichos compuestos es como bloque de construcción quiral [17-18].



Eur. J. Org. Chem., **2002**, 4169-4173.

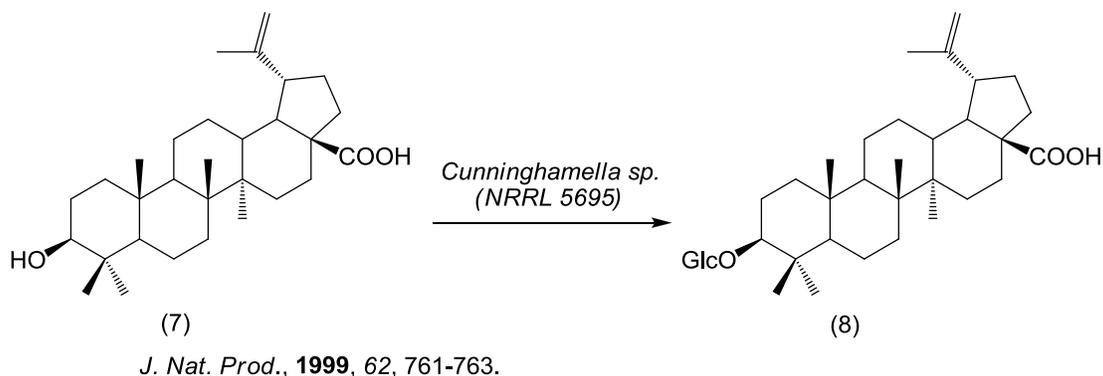
Esquema 2: Estructuras de la hispanona (**2**) y sus derivados (**3-6**).

¹⁴ Diterpenos ampliamente distribuidos en la naturaleza, los cuales pueden presentar un anillo del furano unido al resto de una estructura isoprénica.

2.8 Ejemplos de biotransformaciones.

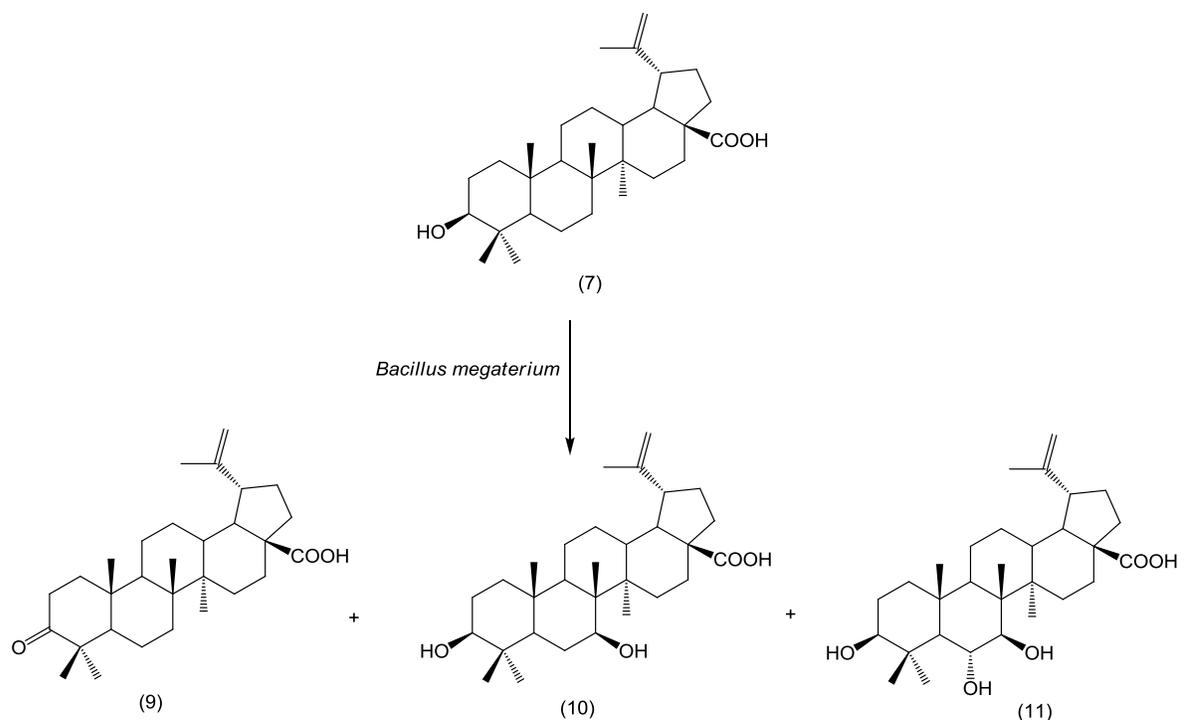
El ácido betulínico (**7**) es un triterpeno derivado del lupano, se distribuye ampliamente en el reino vegetal —el árbol abedul es una fuente importante— en la literatura, se ha informado que presenta diversas actividades biológicas como: anti-melanómica, anti-leucémica, anti-neuroblastoma, anti-VIH y anti-malárica [19].

La biotransformación de (**7**) con *Cunninghamella sp* (NRRL 5695), dio lugar a la producción de un nuevo metabolito (**8**), en el cual el hongo introdujo un β -D-glucopiranosil, glucosilando el grupo hidroxilo del C-3 [19].



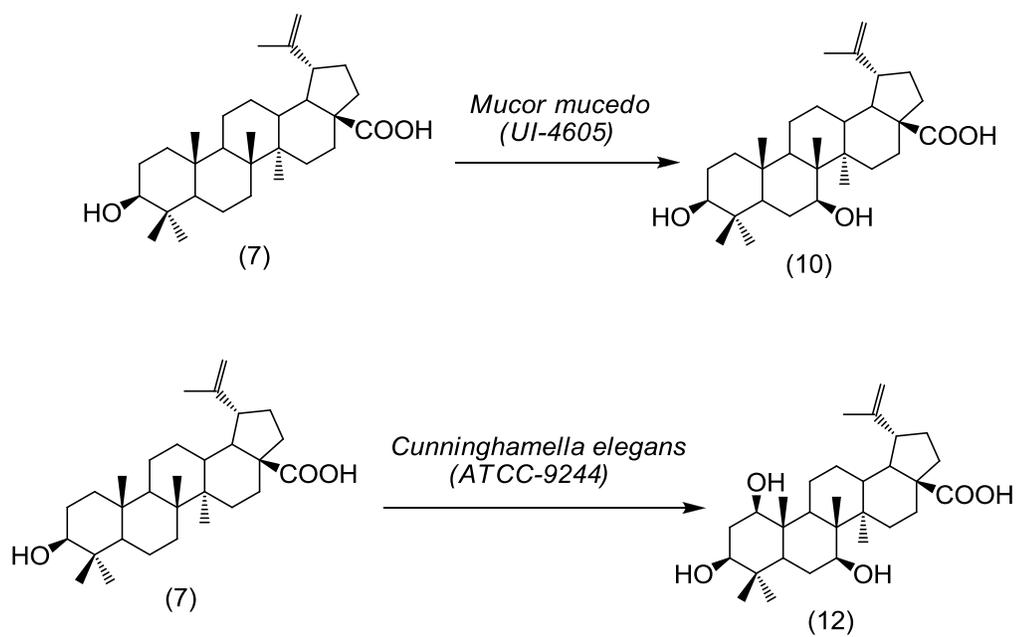
Esquema 3: Biotransformación del ácido betulínico (**7**) con *Cunninghamella sp.*

La incubación de **7** con *Bacillus megaterium* (ATCC 14581) dio tres compuestos: el ácido 3-oxo-betulónico (**9**), y dos compuestos novedosos: ácido 7β -hidroxibetulínico (**10**) y el ácido $6\alpha,7\beta$ -dihidroxibetulínico (**11**). *Mucor mucedo* (UI-4605) también produjo (**10**), mientras que *Cunninghamella elegans* (ATCC 9244) dio el ácido $1\beta,7\beta$ -dihidroxibetulínico (**11**) [20], ver los esquemas 4 y 5.



J. Nat. Prod., **1999**, *62*, 761-763.

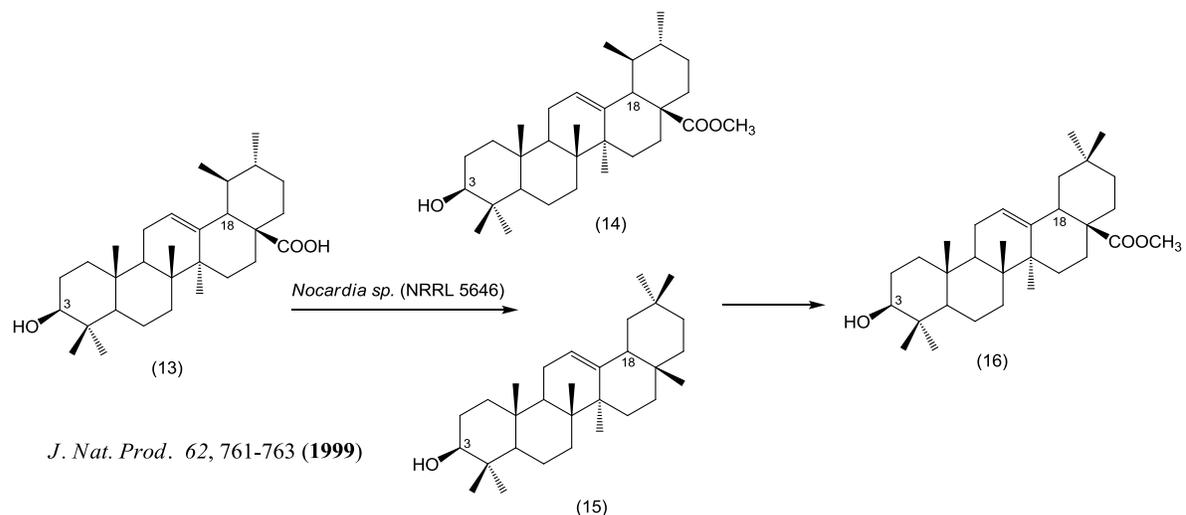
Esquema 4: Biotransformación de **7** con *B. megaterium*.



J. Nat. Prod., **1999**, *62*, 761-763.

Esquema 5: Biotransformación de **7** con *M. mucedo* y *C. elegans*.

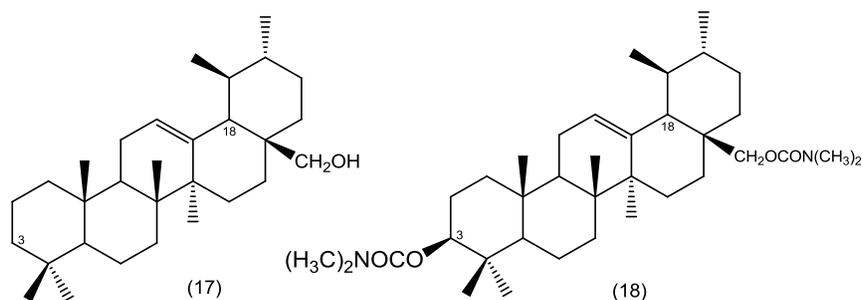
El ácido ursólico (**13**) es un triterpeno ampliamente distribuido en el reino vegetal, al cual se le atribuyen actividades citotóxica y antiviral (VIH). *Nocardia sp* (NRRL 5646) biotransformó **13** a **16** a través de dos intermediarios, ácido oleanólico (**14**) y ursolato de metilo (**15**), ver esquema 6. Esta reacción de metilación en el C-28 del grupo carbonilo se produjo a través de la catálisis por el sistema enzimático de *Nocardia sp.*.



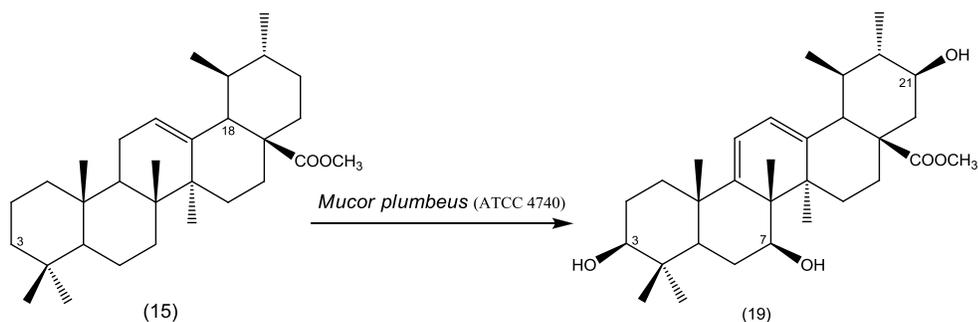
Esquema 6: Biotransformación del Ácido ursólico (**13**) con *Nocardia sp.*

Los dos metabolitos tipo oleanano **14** y **16** se forman por la transposición de un grupo metilo del C-19 al C-20 [21].

Por otro lado, los metabolitos **15**, uvaol [3 β ,28-dihidroxiurs-12-eno] **17** y **18** [3 β ,28-bis(dimetilcarbamoxil)urs-12-eno] fueron incubados con *Mucor plumbeus* (ATCC 4740), mientras que los sustratos **17** y **18** se recuperaron del medio de cultivo sin biotransformar.



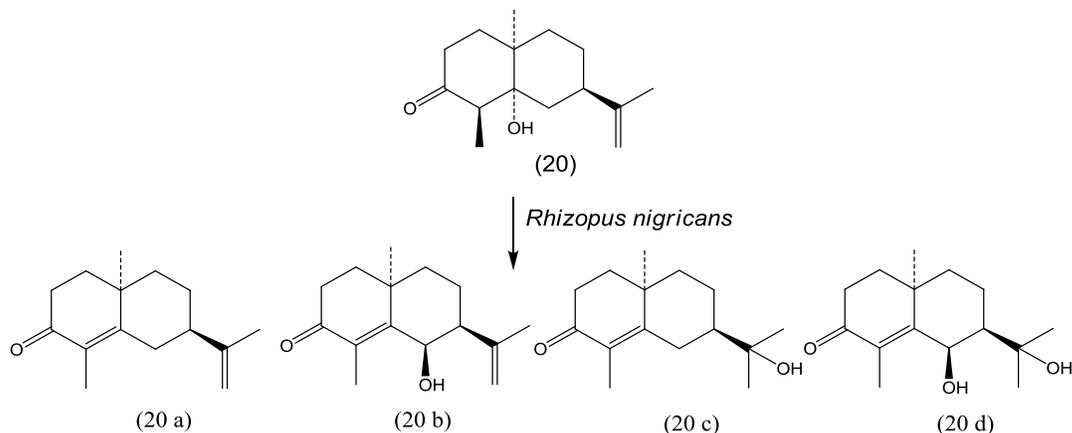
Por otro lado, **15** fue biohidroxilado para dar el 3 β ,7 β ,21 β -trihidroxiursa-9(11),12-dieno-28-oato (**19**), como único producto, ver esquema 7. El doble enlace en las posiciones C-9 y C-11 en **19**, probablemente fue formado a través de un intermediario hidroxilado en C-11, el cual fue eliminado para formar el dieno conjugado [22].



J. Nat. Prod. 62, 761-763 (1999)

Esquema 7: Biotransformación del ursólato de metilo (**15**), con *M. plumbeus*.

El 5 α -hidroxi-14-eudesm-11-en-3-ona (**20**) fue metabolizado por *Rhizopus nigricans*, *Cunninghamella elegans* y *Mucor plumbeus* para producir cuatro productos de bioconversión. Observándose la hidroxilación regioselectiva en los C-6 y C-11, ver esquema 8. El compuesto hidroxilado en C-11 fue posteriormente transformado al α -agarofurano [23].

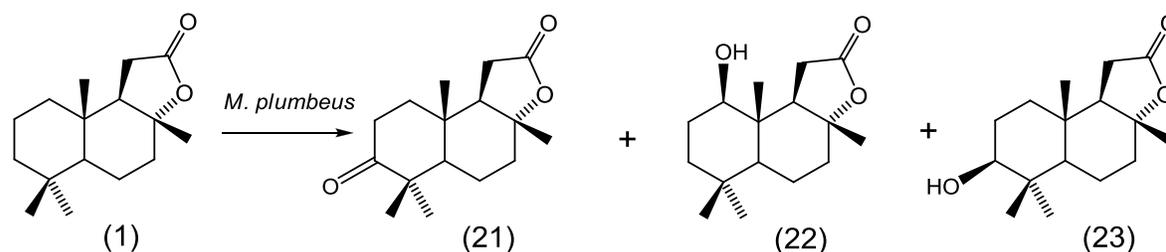


J. Mol. Catal. B: Enzym. 48, 23-27 (2007)

Esquema 8: Biotransformación del 5 α -hidroxi-14-eudesm-11-en-3ona (**19**) con *R. nigricans*.

2.9 Biotransformación de la Esclareólida (1)

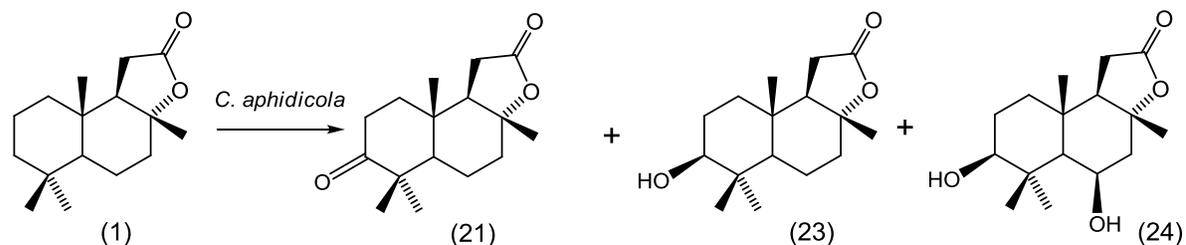
De la oxidación microbiológica de la esclareólida (1) por *Mucor plumbeus* se obtuvieron 3-cetoescclareólida (21), 1β-hidroxiesclareólida (22) y 3β-hidroxiesclareólida (23), de acuerdo con lo informado por Aranda y col., ver esquema 9 [24].



Tetrahedron 39, 8339-8350 (1991)

Esquema 9: Biotransformación de la esclareólida (1) con *M. plumbeus*.

Asimismo, las sustancias 21, 23, y 3β,6β-dihidroxiesclareólida (24), son los productos obtenidos de la bioconversión de 1 con *Cephalosporium aphidicola*, ver esquema 10 [25].

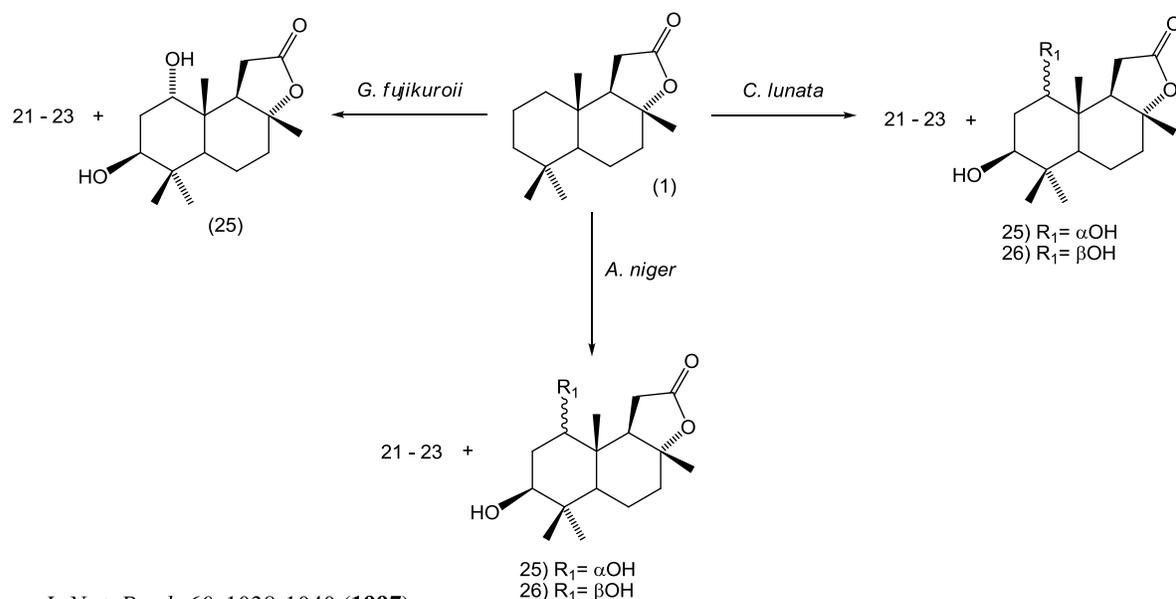


Phytochemistry 42, 1021-1023 (1996)

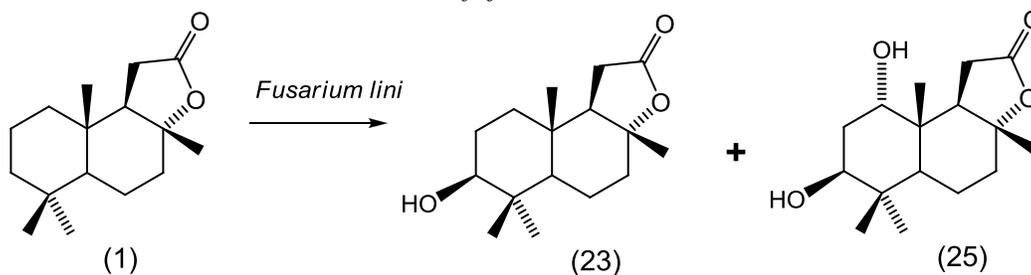
Esquema 10: Biotransformación de la esclareólida (1) con *C. aphidicola*.

Por otro lado, Atta-ur-Rahman [26] describe la transformación microbiológica de 1, con *Curvularia lunata* y *A. niger*, para obtener las sustancias 21-23 y dos compuestos adicionales 1α,3β-dihidroxiesclareólida (25) y 1β,3β-dihidroxiesclareólida (26), mientras

que *Gibberella fujikuroii* produjo **21-23** y **25-26** y *Fusarium lini* **23** y **25**, como se ilustra en los esquemas 11 y 12.



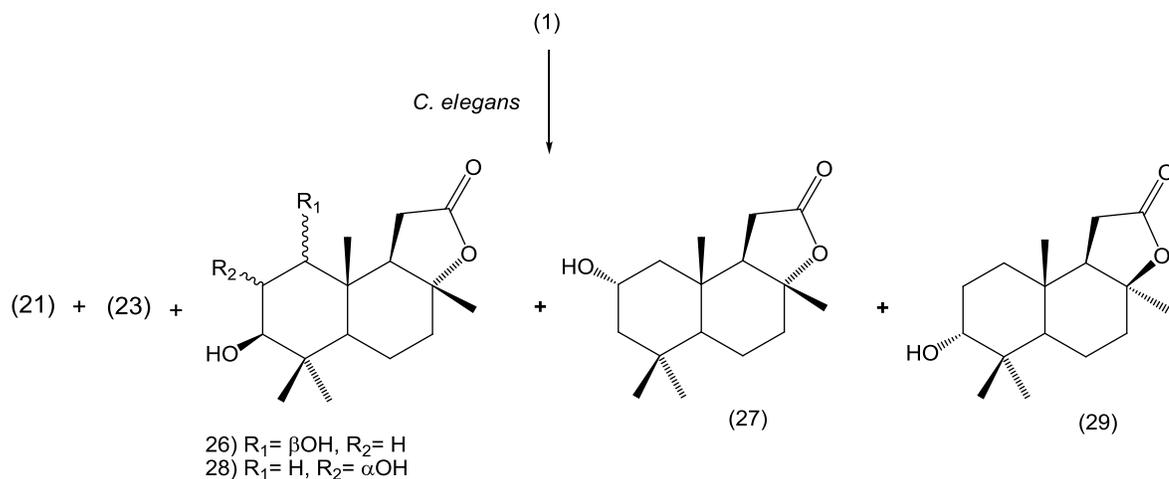
Esquema 11: Biotransformación de la esclareólida (**1**) con *C. lunata*, *A. niger* y *G. fujikuroii*.



J. Nat. Prod. 60, 1038-1040 (1997)

Esquema 12: Biotransformación de la esclareólida (**1**) con *F. lini*.

Tres nuevos compuestos de bioconversión fueron descritos por Choudhary y col. [27] a partir de **1** con *Cunninghamella elegans*: 2α-hidroxiesclareólida (**27**), 2α,3β-dihidroxiesclareólida (**28**) y 3β-hidroxi-8-epiesclareólida (**29**), además de **21**, **23** y **26**, ver esquema 13.



Helv. Chim. Acta 87, 2685-2694 (2004)

Esquema 13: Biotransformación de la esclareólida (**1**) con *C. elegans*

Evidentemente el principal problema que se plantea es la falta de conocimiento de cómo se comportan los sistemas enzimáticos de un determinado microorganismo en función de la estructura del sustrato. Por lo cual, en el presente proyecto se plantea la posibilidad de bioconvertir a la esclareólida **1** con *Aspergillus niger* en tres medios de cultivo diferente.

3. Planteamiento del Problema.

Actualmente existe en la literatura química especializada una descripción muy limitada acerca del comportamiento de los sistemas biológicos —microorganismos, enzimas y cultivos celulares de tejidos— en función de la estructura del sustrato. Además, el conocimiento que se tiene sobre las transformaciones biológicas de sesquiterpenos con hongos filamentosos es muy escaso, a pesar de existir una vasta información con respecto a su aislamiento, caracterización y en algunos casos a sus propiedades biológicas. Con base en lo anterior, el presente proyecto tiene como finalidad obtener y caracterizar los derivados químicos novedosos de la esclareólida (**1**), por medio de su bioconversión con *A. niger*, en tres medio de cultivo diferentes, para comprobar si el medio de cultivo determina la variación en el rendimiento y diversidad de los productos de bioconversión.

4. Justificación.

Los procesos de biotransformación han adquirido importancia creciente a nivel mundial debido a las posibilidades y ventajas que ofrecen en la obtención e investigación de compuestos químicos con diferentes aplicaciones, como: en la industria de los agroquímicos, de la química pura e industria farmacéutica. Además, las biotransformaciones son consideradas actualmente una metodología de rutina ecológica y económicamente competitivas por los químicos sintéticos.

A pesar de la importancia práctica que tienen las biotransformaciones como herramienta en la síntesis de compuestos con actividad biológica, farmacológica, entre otras. Es actualmente un área del conocimiento que se encuentra muy poco desarrollada en nuestro país. Predecir los sitios de hidroxilación es extremadamente difícil, pero esta situación puede ser mejorada a través de un amplio *screening* con varios hongos, condiciones de crecimiento, modificaciones en la estructura del sustrato, entre otros.

Las biohidroxilaciones se han desarrollado principalmente en el campo de los esteroides y terpenoides debido a la gran demanda industrial que tienen sus productos terminales. En particular las biotransformaciones de productos naturales constituyen un área de gran interés farmacéutico, dado que es posible potenciar su actividad biológica a través de reacciones *regio* y *estero* selectivas. En especial la biotransformación de terpenos son muy estudiadas por que permiten la producción de compuestos enantioméricamente puros bajo condiciones suaves de reacción que puedan ser utilizados en la industria farmacéutica.

Bajo esta perspectiva se enmarca la biotransformación de la esclareólida con *A. niger* para la obtención de compuestos biohidroxilados, los cuales pueden estar determinados por el medio de cultivo tanto en lo que se refiere a su rendimientos como a su diversidad estructural.

5. Hipótesis

Dado el potencial que constituyen las biotransformaciones en la obtención de productos de acceso limitado por quimiotransformación, y considerando que los sesquiterpenos, representan un grupo de productos naturales muy importante debido a la amplia gama de propiedades biológicas que presentan, las cuales están relacionadas con su estructura molecular. Entonces es viable la biotransformación de la esclareólida con *Aspergillus niger*, para la obtención de compuestos oxidados y/o hidroxilados en carbonos no activados, los cuales podrán estar determinados en rendimiento y diversidad estructural, por la naturaleza del medio de cultivo en el que se desarrolla dicho hongo.

6. Objetivos.

6.1 Objetivo general

Realizar la biotransformación de la esclareólida con *Aspergillus niger* (ATCC 2029) en tres medios de cultivo diferentes para aislar, caracterizar e identificar los productos de bioconversión obtenidos en cada uno de los medios.

6.2 Objetivos particulares

- Realizar la investigación bibliográfica sobre biotransformación de diterpenos con hongos filamentosos, específicamente en sesquiterpenos.
- Realizar la revisión bibliográfica sobre la biotransformación de la esclareólida con hongos filamentosos.
- Determinar la factibilidad de la biotransformación de la esclareólida con *A. niger* en tres diferentes medios. [Medio YEPGA: peptona, glucosa, extracto de levadura y extracto de carne), Medio B (glucosa, glicerol, peptona, extracto de levadura, NaCl, KH₂PO₄), Medio Csapek-Dox (NaNO₃, MgSO₄, KCl, FeSO₄, KH₂PO₄, agar).
- Realizar la biotransformación de la esclareólida con *A. niger* en tres medios de cultivo diferentes de manera cuantitativa de acuerdo al objetivo anterior.
- Determinar la cantidad de biomasa por el método de peso seco y determinación de azúcares reductores.
- Determinar el tiempo de la biotransformación, mediante el seguimiento de la bioconversión por CCF.
- Separación de la biomasa y del medio de cultivo (fase acuosa).
- Extracción y purificación de los productos de biotransformación de la esclareólida con *A. niger*.
- Caracterizar e identificar los productos obtenidos de la biotransformación de la esclareólida con *A. niger*.
- Análisis de Resultados y Conformación del Trabajo Escrito Final.

7. Método.

7.1 Resiembra de *A. niger*

Se realizó la resiembra de la cepa *A. niger* (ATCC 2029) en 5 tubos (18x150) con 15 mL de medio PDA (agar papa dextrosa).

7.2 Preparación de la solución densa de esporas

Para la preparación de 150 mL de PDA, se pesaron 5.85 g de PDA y se disolvieron en 150 mL de agua destilada hasta disolución total por medio de calentamiento. El medio fue esterilizado a 1.5 lbs. de presión, 120°C durante 15 minutos. Se agregaron 15 mL de medio PDA estéril en 5 matraces Erlenmeyer de 50 mL; los cuales se incubaron a temperatura ambiente hasta esporulación (aproximadamente entre 4-5 días). Posteriormente, se agregaron 10 mL de agua destilada estéril para obtener una solución densa de esporas de *A. niger*.

7.3 Preparación de los medios para la biotransformación

7.3.1 Medio A (YEPGA)

Para preparar 4 litros de medio A: se pesaron 40 g de extracto de levadura, 40 g de peptona, 40 g de extracto de carne, 80 g de glucosa, los cuales se disolvieron en 4 L de agua destilada y se ajustó a pH = 6.

Posteriormente se llevó a esterilizar a 120°C y 1.5 lbs. de presión durante 15 minutos. Una vez esterilizado el medio se distribuyeron en 30 matraces Erlenmeyer de 250 mL (125 mL de medio).

7.3.2 Medio B.

Para preparar 4 litros de medio B: se pesaron 40 g de glucosa, 40 g de glicerol, 20 g de peptona, 20 g de extracto de levadura, 20 g de KH_2PO_4 y 20 g de NaCl y el pH se ajustó a 7, se esterilizó a 120°C y 1.5 lbs. de presión durante 15 minutos.

Después de esterilizado el medio se distribuyeron en 30 matraces Erlenmeyer de 250 mL, (125 mL de medio).

7.3.3 Medio C (Czapek-Dox)

Para preparar 4 litros de medio C: se pesaron 120 g de sacarosa, 12 g de NaNO₃, 1 g de MgSO₄, 1 g de KCl, 0.04 g de FeSO₄, 4 g de KH₂PO₄, 52 g de agar, ajustando el pH=7.

Posteriormente, se esterilizó a 120°C y 1.5 lbs de presión durante 15 minutos, para finalmente distribuir 125 mL de medio en 30 matraces Erlenmeyer de 250 mL.

7.4. Factibilidad de biotransformación de la Esclareólida (1) por *A. niger*

Para determinar la factibilidad de biotransformación de *A. niger* sobre (1) se procedió a pesar de 10-15 mg de sustrato, el cual se adicionó a 25 mL del medio correspondiente (matraces Erlenmeyer de 250 mL) previamente inoculados con una solución de esporas de *A. niger*, incluyendo 3 controles: control del medio, control del sustrato y control del hongo para eliminar la posibilidad de que los productos aislados fueran metabolitos secundarios del hongo y/o producto de descomposición del medio y/o descomposición de la materia prima, ver tabla 5.

Tabla 5: Factibilidad de Biotransformación de (1) en diferentes medios de cultivo con ocho hongos filamentosos.

Fungi	Productos						
	21	22	23	30	31	32	33
<i>A. niger</i> ^a	++++	—	++++	—	—	—	—
<i>A. niger</i> ^b	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>C. blackesleeana</i> ^a	++++	—	++++	—	—	—	—
<i>C. blackesleeana</i> ^b	++++	—	++++	++++	++++	—	—
<i>C. lunata</i> ^a	++++	—	++++	—	++++	—	—
<i>B. bassiana</i> ^a	—	—	++++	—	—	—	—
<i>R. oligosporus</i> ^a	++++	—	++++	—	—	—	—
<i>R. nigricans</i> ^a	++++	—	++++	++++	—	—	—
<i>M. miehei</i> ^a	++++	—	++++	—	—	—	—
<i>F. moliniforme</i> ^a	++++	—	++++	++++	—	—	—

^a medio A (YEPGA), ^b medio B : glucosa, glicerol, peptona, extracto de levadura, KH₂PO₄, NaCl, ^c medio C (Czapek-Dox).

7.5. Inoculación de los medios y proceso de biotransformación cuantitativa.

A cada uno de los matraces que contienen el medio para biotransformar se agregan 2 mL de la solución densa de esporas (excepto uno que será el blanco del medio) y se lleva a incubar en un fermentador a 26°C y 150 rpm. Después de 72 horas se disolvió 1 en acetona y se distribuyó en cada uno de los matraces (excepto en el blanco del hongo y blanco del medio). El curso de la biotransformación se siguió por medio de CCF, después de 48 horas de incubación se procedió a tomar una alícuota de 2 mL del sistema de biotransformación, del blanco del medio, del blanco del hongo y del blanco de la sustancia, durante 15 días.

A cada alícuota se le realizó una extracción líquido-líquido con CH_2Cl_2 ; la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se aplicó en un cromatograma de CCF.

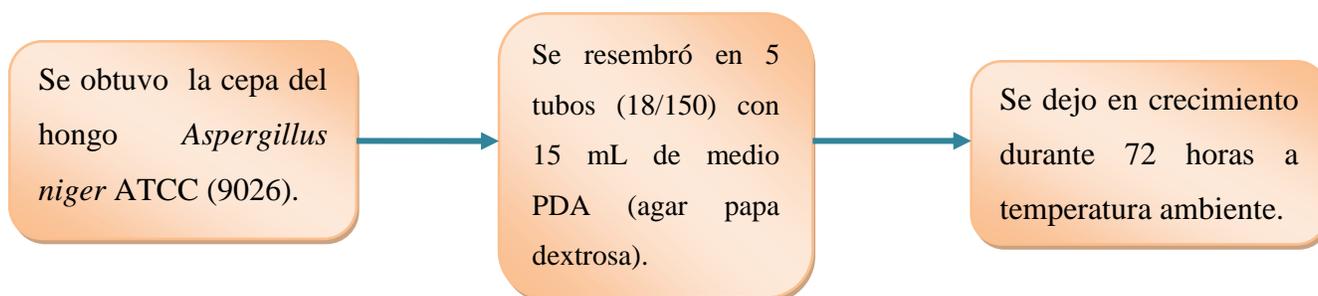
7.6 Obtención de la mezcla de productos de biotransformación.

Después de 15 días, el sistema de cultivo se filtró a vacío para separar la biomasa del medio líquido. A la fase acuosa se le determinó su pH y posteriormente fue saturada con NaCl . Para recuperar la mezcla de biotransformación, se realizó una extracción líquido-líquido con CH_2Cl_2 , la fase orgánica resultante se secó con Na_2SO_4 anhidro y finalmente fue concentrado por medio del rotavapor.

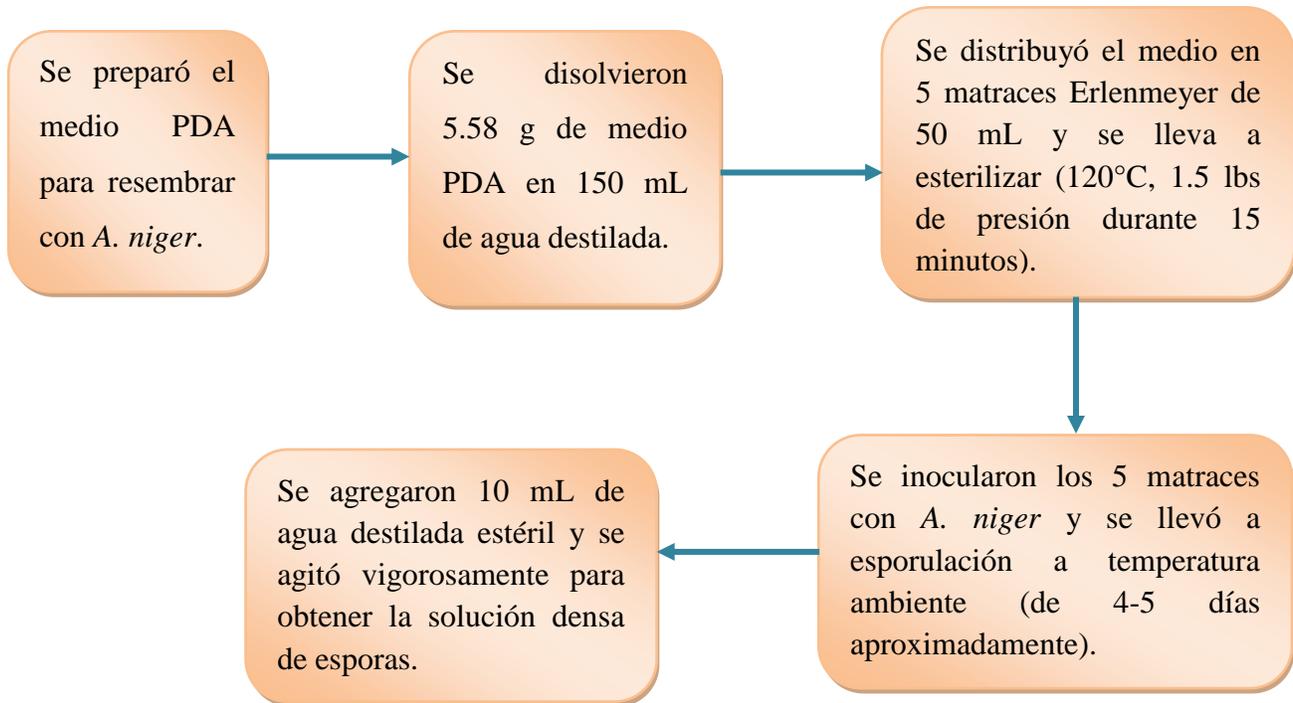
A la biomasa se le agregó CH_2Cl_2 y se agitó durante un intervalo de tiempo determinado, el cual fue fijado por la extracción de los productos que habían sido retenidos en la biomasa, esto se determinó por medio de CCF.

7.7 Diagrama de flujo seguida en la biotransformación de 1 con *A. niger*.

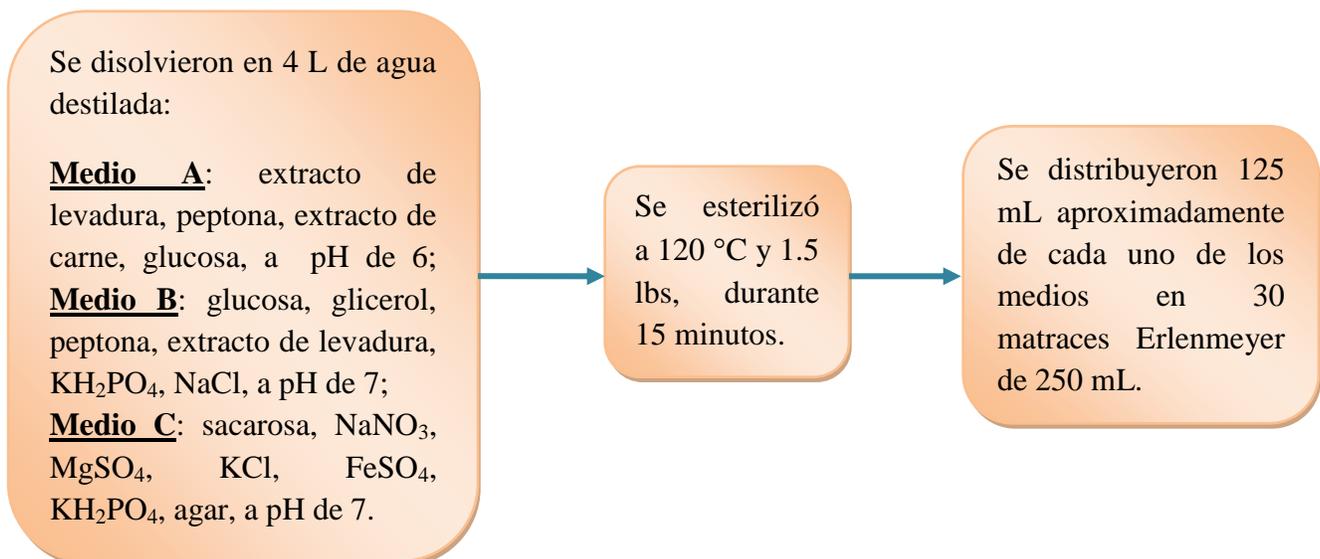
❖ Resiembra de *Aspergillus niger*.



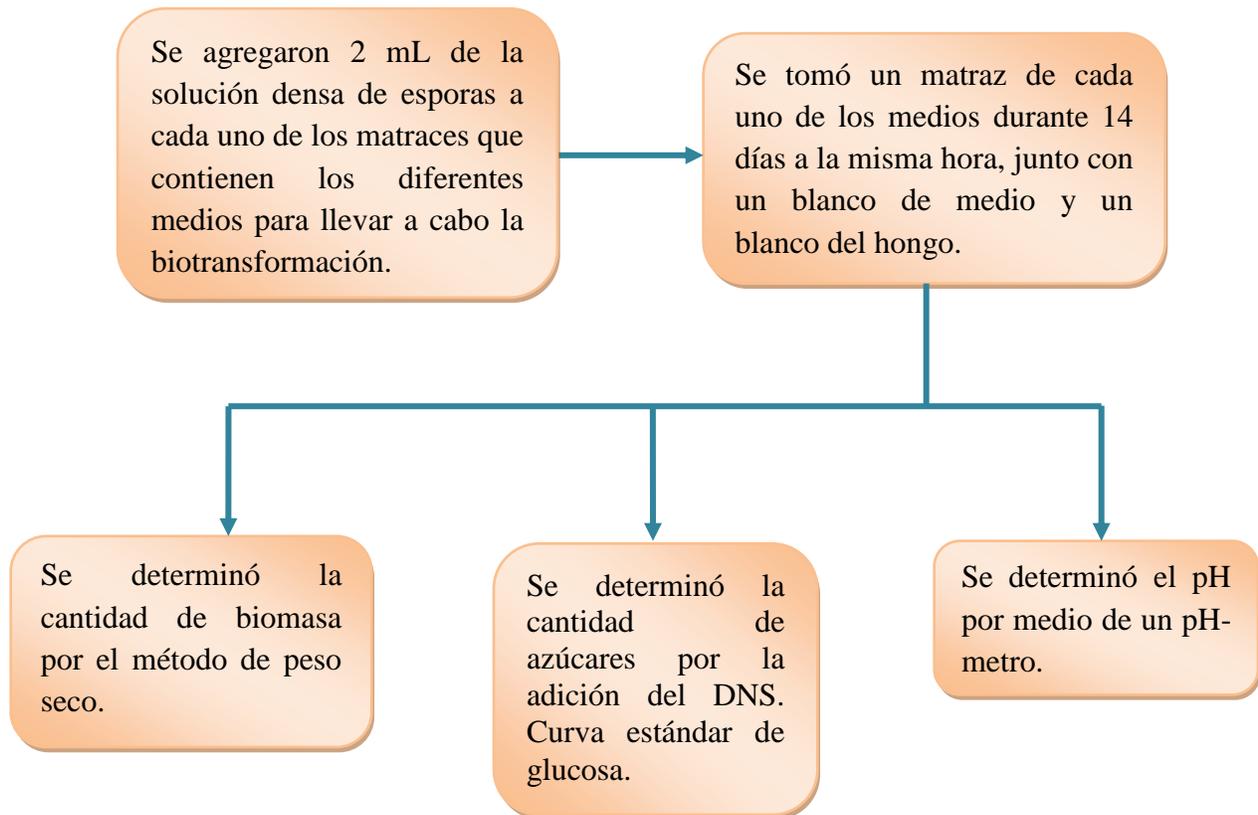
❖ **Preparación de la solución densa de esporas.**



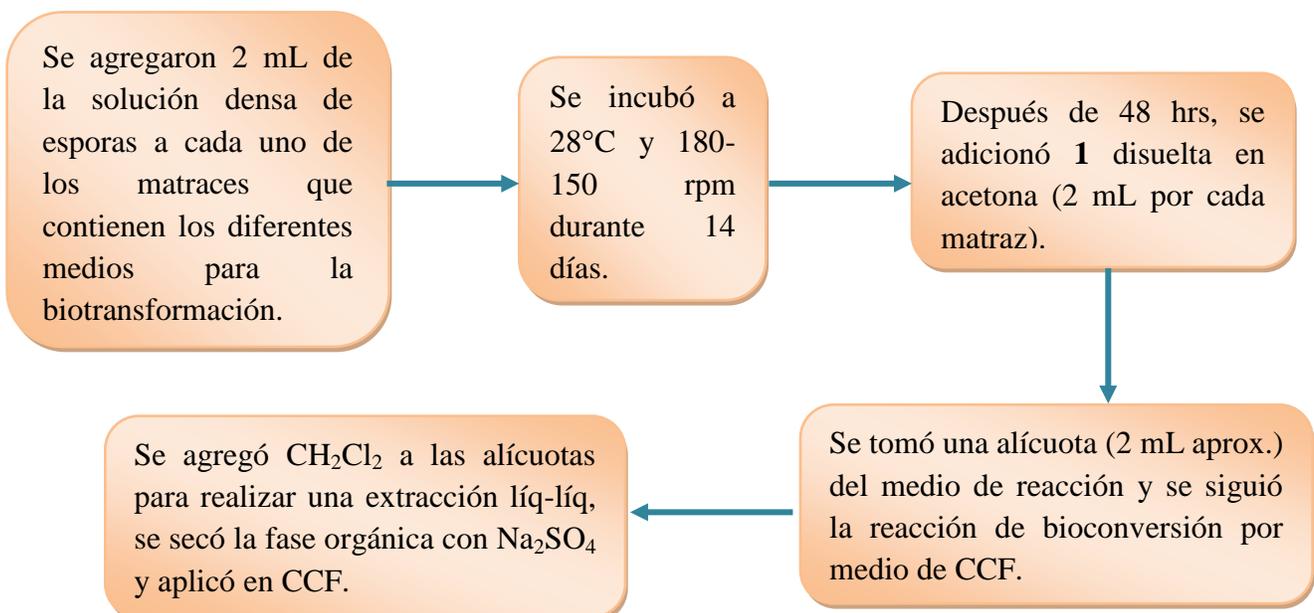
❖ **Preparación de los medios para la Biotransformación.**



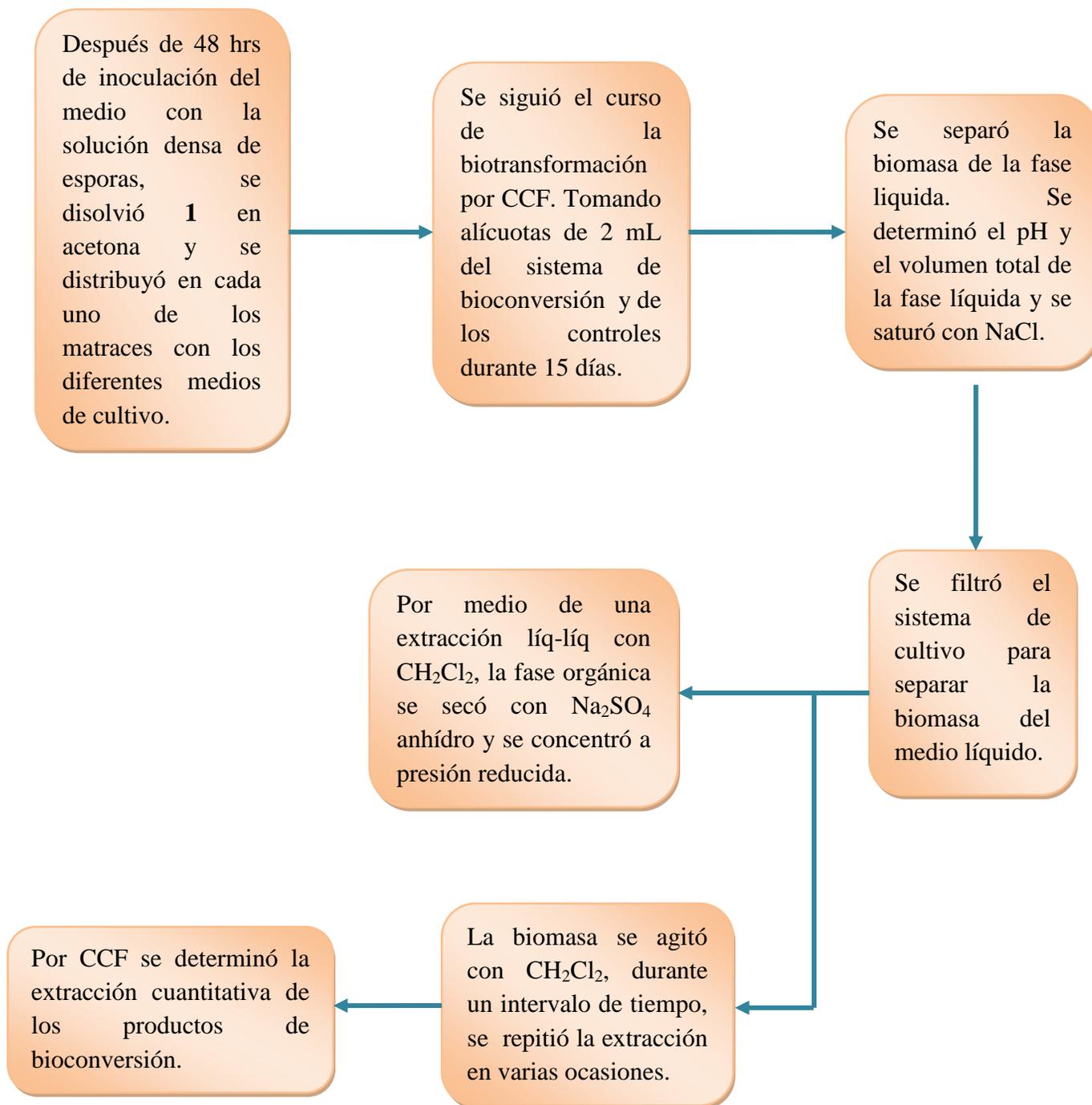
❖ Determinación de la biomasa.



❖ Factibilidad de bioconversión.



❖ Biotransformación cuantitativa



❖ **Separación, purificación, caracterización e identificación de los productos de biotransformación.**



7.8 Biotransformación de la Esclareólida (1) con *A. niger*

Tabla 6: Porcentaje (%) de los productos de biotransformación de (1) con *A. niger*.

Hongo	Productos (%)						
	1	21	23	25	30	31	32
<i>A. niger</i> ^a	6.5	22.7	37.4	6.8	—	—	—
<i>A. niger</i> ^b	2.8	11.7	27.7	—	5.9	10.1	12.4
<i>A. niger</i> ^{c,d}	+++	+++	+++	—	+++	+++	+++

^a: medio YEPGA — extracto de levadura, extracto de carne, glucosa, peptona—

^b: medio B —glucosa, glicerol, peptona, extracto de levadura, KH₂PO₄ y NaCl. —

^c: medio Czapek-Dox —sacarosa, NaNO₃, MgSO₄, KCl, FeSO₄, KH₂PO₄, agar—

^d: En el medio C (Czapek-Dox) los diferentes compuestos sólo fueron identificados por CCF.

7.8.1. Biotransformación de la esclareólida (1) con *A. niger* en el medio A.

De la biotransformación de 1 (204.3 mg disueltos en 10 mL de acetona) en el medio A con *A. niger*. Después de 15 días de incubación el sistema fue procesado como se indica arriba para obtener un residuo aceitoso (194.3mg) de color amarillo. De la separación cromatográfica (CCV), empleando como fase estacionaria sílica gel y mezclas de n-

hexano-AcOEt de polaridad creciente, se obtuvieron la 3-cetoesclareólida (**21**, 44.2 mg, 22.7%), 3 β -hidroxiesclareólida (**23**, 72.7 mg, 37.4%), y 12.6 mg (6.5%) de **1**.

7.8.2 Biotransformación de (**1**) con *A. niger* en medio B

De la biotransformación de **1** (210 mg disueltos en 10 mL de acetona), se distribuyeron en 20 matraces Erlenmeyer 125 mL de medio B, previamente (48 hrs inoculados con una suspensión densa de esporas. La biotransformación fue seguida por 15 días y el sistema de biotransformación fue tratado como se indica en la parte superior para obtener: **1** (6 mg, 2.8 %), **21** (24.5 mg, 11.7 %), 1 β -hidroxiesclareólida (**22**, 6.8 mg, 3.4 %), (**23**, 58.2 mg, 27.7 %), 3 α ,6 β -dihidroxiesclareólida (**30**, 22.4 mg, 5.9 %), 1-cetosclareólida (**31**, 21.2 mg, 10.1 %), 3-ceto-15-hidroxiesclareólida (**32**, 26 mg, 12.4 %) y 3 β ,15-dihidroxiesclareólida (**33**, 19.7 mg, 9.4 %).

❖ 1 β -hidroxiesclareólida (**22**):

pf. 180-182°C

IR ν_{\max} / cm⁻¹ (CHCl₃):

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): ver tabla 9.

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): ver tabla 9.

EM (IE) m/z: [M⁺+1, 267], [M⁺, 266], 233(45.3%), 140(60%), 136(70.5%), 121(56.3%), 109(42.2%), 93(50%), 81(60.2%), 55(55.5%), 41(50.8%) y 28(42.9%).

❖ 3 α ,6 β -dihidroxiesclareólida (**30**):

pf. 188-190°C.

[α]_D²⁵ = +30.3 (c 0.30, CHCl₃).

EM (AR) FAB: m/z 283.1915 $[M+H]^+$, $C_{16}H_{26}O_4+H$. Calcd. 283.1909).

IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CHCl_3): 3618, 2933, 1758.

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): ver tabla 9.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): ver tabla 9.

EM (IE) m/z (rel. int.): 267 (24), 249 (56), 169 (83), 43 (100).

❖ **1-cetosclareólida (31):**

pf. 152-153 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +83.8$ (c 0.11, CHCl_3).

EM (AR) FAB: m/z 265.1805 $[M+H]^+$, $C_{16}H_{24}O_3+H$. Calcd. 265.1804).

IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CHCl_3): 2958, 1774, 1708, 1232, 1199, 925.

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): ver tabla 9.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): ver tabla 9.

EIMS m/z (rel. int.): 264 (17), 205 (86), 55(69), 43 (100).

❖ **3-ceto-15-hidroxiesclareólida (32):**

pf. 169-171 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +29.3$ (c 0.20, MeOH).

EM (AR) FAB: m/z 281.1751 $[M+H]^+$, $C_{16}H_{24}O_4+H$, Calcd 281.1753).

IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (CHCl_3): 3459, 2985, 2952, 1773, 1698, 1431, 1234, 1174, 920.

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): ver tabla 9.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): ver tabla 9.

EIMS m/z (rel. int.): 280 (12), 278 (36), 277 (11), 250 (67), 235 (48), 81 (41), 43 (100).

❖ **3 β ,15-dihidroiesclareólida (33):**

pf. 157-158°C.

$[\alpha]_D^{25} = +49.2$ (c 0.13, MeOH).

EM (AR) FAB. m/z 283.1908 $[M+H]^+$, $C_{16}H_{26}O_4+H$, Calcd 283.1909)

IR ν_{max}/cm^{-1} ($CHCl_3$): 3489, 2944, 1767, 1603, 1457, 1349, 1243, 920.

RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz): ver tabla 9.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz): ver tabla 9.

EIMS m/z (rel. int.): 282 $[M^+$, 20], 264 $[M^+-H_2O$, 41], 251 (57), 233 (56), 181 (12), 173 (30) 147 (69), 121 (64), 93 (52), 81 (41), 43 (100), 18 (36).

7.8.3 Biotransformación de (1) con *A. niger* en medio C.

De la biotransformación de **1** (100 mg disueltos en 10 mL de acetona), se distribuyeron en 20 matraces Erlenmeyer 125 mL de medio C, después de 48 hrs de haber inoculado con una suspensión densa de esporas. La biotransformación fue seguida por 15 días y el sistema de biotransformación fue tratado como se indica en la parte superior para obtener los compuestos **1**, **21**, **22**, **23**, **30-33**. La presencia de los diferentes productos de biotransformación fueron determinados por medio de CCF, empleando como referencias muestras auténticas.

8. Resultados.

Tabla 7. Factibilidad de la biotransformación de **1** por hongos filamentosos

Hongo	Productos						
	21	22	23	30	31	32	33
<i>A. niger</i> ^a	++++	—	++++	—	—	—	—
<i>A. niger</i> ^b	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>C. blackesleeana</i> ^a	++++	—	++++	—	—	—	—
<i>C. blackesleeana</i> ^b	++++	—	++++	++++	++++	—	—
<i>C. lunata</i> ^a	++++	—	++++	—	++++	—	—
<i>B. bassiana</i> ^a	—	—	++++	—	—	—	—
<i>R. oligosporus</i> ^a	++++	—	++++	—	—	—	—
<i>R. nigricans</i> ^a	++++	—	++++	++++	—	—	—
<i>M. miehei</i> ^a	++++	—	++++	—	—	—	—
<i>F. moliniiforme</i> ^a	++++	—	++++	++++	—	—	—

^a: medio YEPGA — extracto de levadura, extracto de carne, glucosa, peptona—

^b: medio B —glucosa, glicerol, peptona, extracto de levadura, KH₂PO₄ y NaCl. —

Tabla 8. Porcentaje (%) de los productos de biotransformación de **1** con *A. niger*.

Hongo	Productos (%)						
	1	21	23	25	30	31	32
<i>A. niger</i> ^a	6.5	22.7	37.4	6.8	—	—	—
<i>A. niger</i> ^b	2.8	11.7	27.7	—	5.9	10.1	12.4
<i>A. niger</i> ^{c,d}	+++	+++	+++	—	+++	+++	+++

^a: medio YEPGA — extracto de levadura, extracto de carne, glucosa, peptona—

^b: medio B —glucosa, glicerol, peptona, extracto de levadura, KH₂PO₄ y NaCl. —

^c: medio Czapek-Dox —sacarosa, NaNO₃, MgSO₄, KCl, FeSO₄, KH₂PO₄, agar—

^d: En el medio C (Czapek-Dox) los diferentes compuestos sólo fueron identificados por CCF.

Tabla 9. Datos de RMN- ¹H y RMN ¹³C (δ en ppm) para los compuestos **23**, **25**, **30** – **33** (500 y 125 MHz, CDCl₃).

	22		23		30		31		32		33	
Posición	δ _H	δ _C	δ _H	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
1	α ₂₃ : 3.32 dd (10.8, 4.8)	79.2	β ₂₂ : 1.19 ddd (13.5, 13.5, 4)	37.8	β ₂₂ : 1.18 ddt (14, 4, 3.5)	37.1	214.1	β ₂₂ : 1.74 m	37.6	β ₂₂ : 1.47 m	37.4	
			α ₂₃ : 1.45 m		α ₂₃ : 1.68 ddd (14, 14, 4)			α ₂₃ : 1.62 m		H-1α ₂₃ : 1.24 m		
2		20.5	1.69 m	26.8	β ₂₃ : 1.48 ddd (14, 4, 3)	26.0	β ₂₃ : 2.68 ddd (16, 9, 5)	34.5	β ₂₃ : 2.67 ddd (17, 13, 7)	34.8	1.74-1.68 m	26.4
					α ₂₂ : 2.16 ddd (14.5, 4, 3)		α ₂₂ : 2.29 ddd (16, 8, 4)		α ₂₂ : 2.42 ddd (13, 7, 3)		1.74-1.68 m	
3	α ₂₂ : 1.32 m β ₂₂ : 1.47 m	40.3	α ₂₃ : 3.27 dd (11, 5)	78.6	α ₂₃ : 3.37 dd (3, 3)	72.6	α ₂₃ : 1.69 m	39.2		216.1	α ₂₃ : 3.70 dd (10, 5)	75.4
							β ₂₂ : 1.84 m					
4		32.7		38.8		34.0	α ₂₃ : 1.69 m	32.4		52.6		42.0
5	α ₂₃ : 1.02 dd (12.8, 2.8)	54.9	α ₂₃ : 1.09 dd (11, 3)	55.3	α ₂₃ : 1.54 d (3)	50.3	α ₂₃ : 1.51 dd (12, 3)	53.8	α ₂₃ : 2.04 dd (10, 2)	47.9	α ₂₃ : 1.11 m	49.6
6	α ₂₃ : 1.60 m	28.2	β ₂₃ : 1.47 m	20.3		69.0	β ₂₃ : 1.59 dddd (12, 12, 12, 3)	21.1	β ₂₃ : 2.13 m	37.7	1.49-1.41 m	20.2
	β ₂₂ : 1.67 m		α ₂₂ : 1.89 m		α ₂₂ : 4.70 ddd (3, 3, 3)		α ₂₂ : 1.90 m		α ₂₂ : 2.13 m		1.74-1.68 m	
7	β ₂₂ : 2.08 ddd (12, 3, 6, 3, 2)	38.5	β ₂₂ : 2.09 ddd (12, 3, 5, 3, 5)	38.4	β ₂₂ : 2.04 dd (13, 4)	46.7	β ₂₂ : 2.08 ddd (12, 3, 3)	37.2	β ₂₂ : 1.65 m	21.0	β ₂₂ : 2.10-2.05 m	38.2
	α ₂₃ : 1.66 m		α ₂₃ : 1.64 m		α ₂₃ : 1.95 dd (13, 3)		α ₂₃ : 1.68 m		H-7α ₂₃ : 1.80 m		α ₂₃ : 1.74-1.68 m	
8		86.1		86.1		86.3		85.6		85.6		85.9
9	α ₂₃ : 1.99 dd (14, 7, 2)	57.9	α ₂₃ : 1.92 dd (15, 6, 5)	58.9	α ₂₃ : 2.58 dd (14, 7 Hz)	51.8	α ₂₃ : 2.16 dd (14, 7)	52.0	α ₂₃ : 2.07 dd (15, 7)	58.1	α ₂₃ : 1.95 dd (16, 7)	58.9
10		41.4		35.8		39.7		49.7		35.5		35.8
11	β ₂₃ : 2.63 dd (17, 14)	31.9	β ₂₃ : 2.42 dd (16, 15)	28.7	β ₂₃ : 2.46 dd (16, 14)	28.5	β ₂₃ : 2.96 dd (17, 14)	30.8	β ₂₃ : 2.49 dd (16, 15)	28.6	β ₂₃ : 2.42 dd (16, 15)	28.7
	α ₂₂ : 2.56 dd (17, 7, 4)		α ₂₂ : 2.24 dd (16, 6, 5)		α ₂₂ : 2.38 dd (16, 7)		α ₂₂ : 2.53 dd (17, 7)		α ₂₂ : 2.31 dd (16, 7)		α ₂₂ : 2.25 dd (16, 7)	
12		177.5		175.5		177.1		176.7		175.8		176.3
13	1.34 s (0.8)	21.6	1.34 s	21.5	1.59 s	23.0	1.35 s	21.7	1.41 s	21.3	1.34 s	21.5
14	0.84 s	11.0	0.93 s	15.1	1.29 s	16.9	1.19 s	14.4	1.13 s	14.7	0.97 s	15.4
15	0.88 s	32.6	0.81 s	15.0	1.21 s	23.5	1.06 s	23.2	1.00 s	16.3	0.88 s	11.2
16	0.92 s	20.8	1.01 s	27.9	1.04 s	32.4	1.03 s	31.3	H-16 ₂ : 3.76 d (11)	66.6	H-16 ₂ : 3.72 (10.5)	70.9
									H-16 ₂ : 3.39 d (11)		H-16 ₂ : 3.43 d (10.5)	

Constante de acoplamiento (J en Hz)

9. Análisis y discusión **de resultados.**

Del extracto orgánico crudo obtenido de la incubación de la esclareólida (**1**) en el medio de cultivo A (YEPGA) fueron separadas por CCV [28]: la 3-cetoesclareólida (**21**) y la 3 β -hidroxiesclareólida (**23**), previamente descritas en la literatura [24, 26-27].

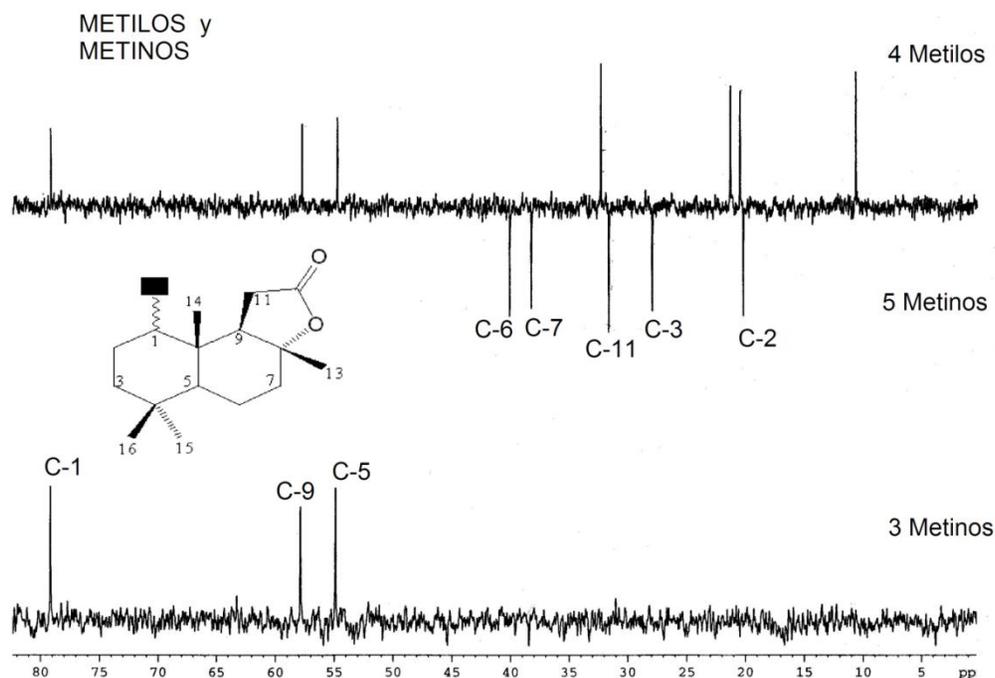
En el medio B, se obtuvieron **21**, 1 β -hidroxiesclareólida **22** y **23**, y cuatro productos adicionales: 3 α ,6 β -dihidroxiesclareólida (**30**), 1-cetoesclareólida (**31**), 3-ceto-15-hidroxiesclareólida (**32**), 3 β ,15-dihidroxiesclareólida (**33**). Por otro lado, en el medio C (Czapek-Dox) se obtuvieron **21- 23** y **30-33**.

El compuesto **21**, fue identificado como el 3-cetoesclareólido por comparación con sus propiedades espectroscópicas (RMN- ^1H , espectro 12.1; RMN ^{13}C , espectro 12.2. [24 y 26].

El compuesto (**22**), fue identificado como el 1 β -hidroxiesclareólida por comparación de sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas IR, RMN- ^1H , espectro 12.3; RMN ^{13}C (espectro 12.4) [26].

En su espectro de masas por impacto electrónico se observa el ion molecular con m/z 266 [M^+], el cual sugiere una fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_3$, lo cual está de acuerdo con el número de carbonos observados en su espectro de RMN ^{13}C en desacoplamiento total, (espectro 12.4).

Por otro lado, en su espectro de RMN ^{13}C por el experimento (DEPT), se observa la presencia de cuatro metilos (4 CH_3), cinco metilenos (5 CH_2), tres metinos (3 CH) y cuatro carbonos cuaternarios (4 C), mientras que para la esclareólida corresponden 4 CH_3 , 6 CH_2 , 2 CH y 4 C , sugiriendo que un metileno se transformó a un metino por la acción de *A. niger*, ver esquema 14.



Esquema 14. Espectro de RMN¹³C (DEPT) para el compuesto **22**.

En su espectro de RMN-¹H (espectro 12.3) se observa una señal en δ_H 3.32 (*dd*, $J = 10.8$ y 4.8 Hz, 1H), la cual puede corresponder a un hidrógeno unido a un carbono base de hidroxilo, existiendo cuatro posibilidades de ubicar al grupo hidroxilo en el esqueleto de la esclareólida, de acuerdo a las formulas parciales de la A-D, ver figura 4.

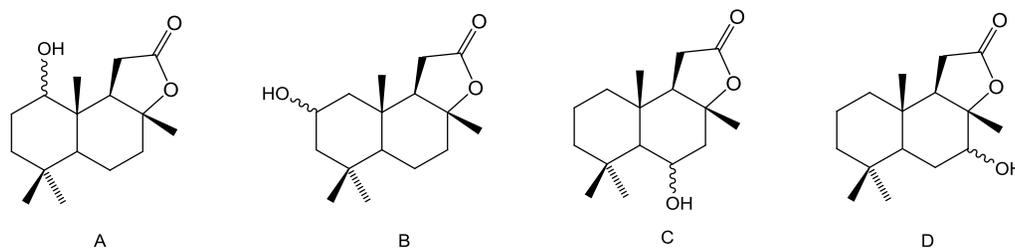
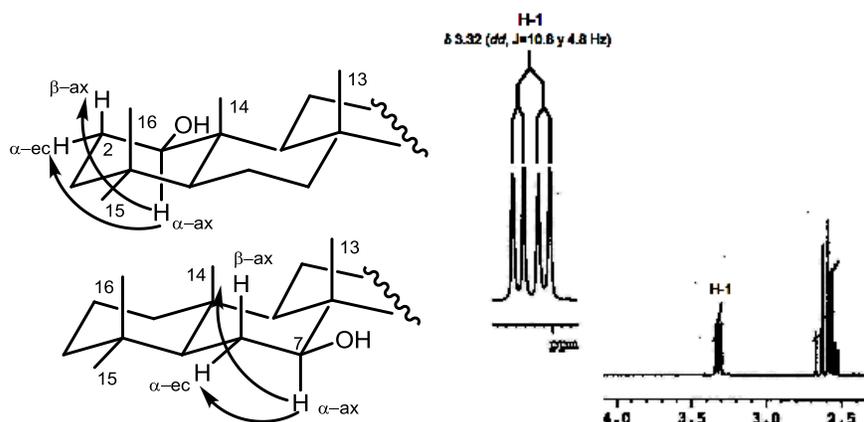


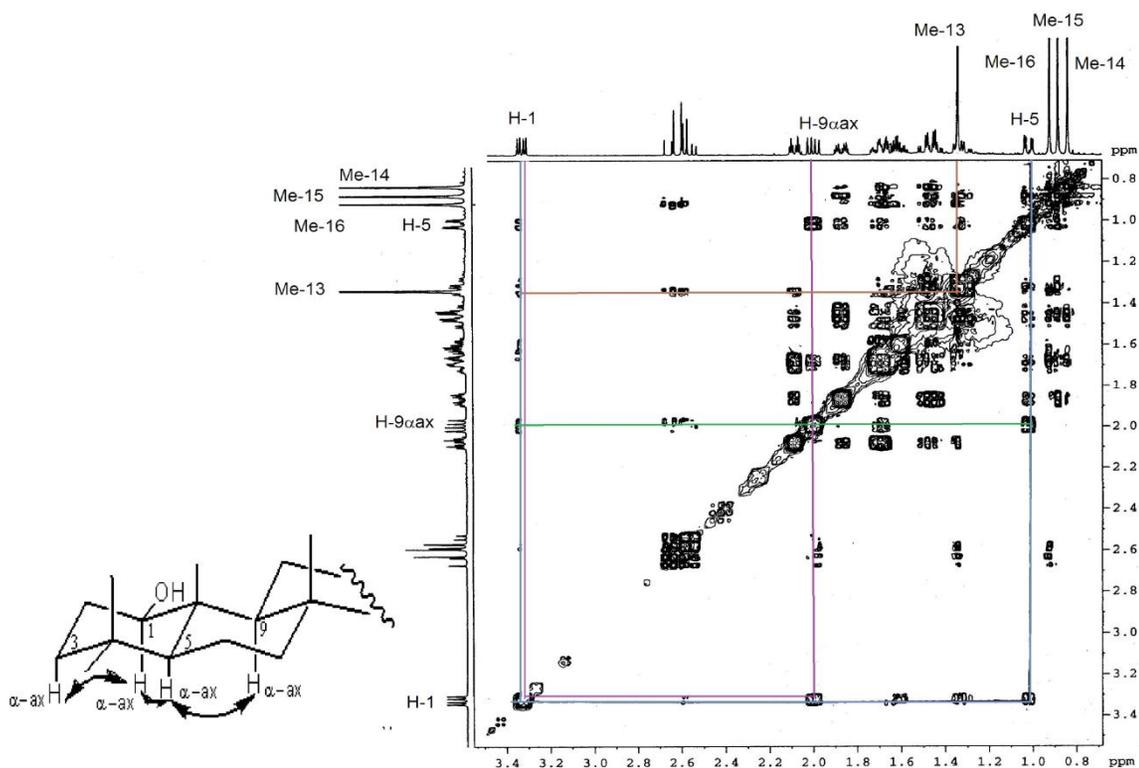
Figura 4. Estructuras posibles de localizar al grupo hidroxilo en el esqueleto de **1**.

De acuerdo a la multiplicidad observada y a sus constantes de acoplamiento [$J_{H\beta_{ax}-H\alpha_{ax}} = 10.8$ Hz; $J_{H\alpha_{ec}-H\alpha_{ax}} = 4.8$ Hz] en su espectro de RMN-¹H, se puede concluir que las dos posibilidades de ubicar al grupo hidroxilo (con una orientación β -ecuatorial), son en C-1 y C-7, donde se observa una señal doble de doble (*dd*), ver esquema 15.



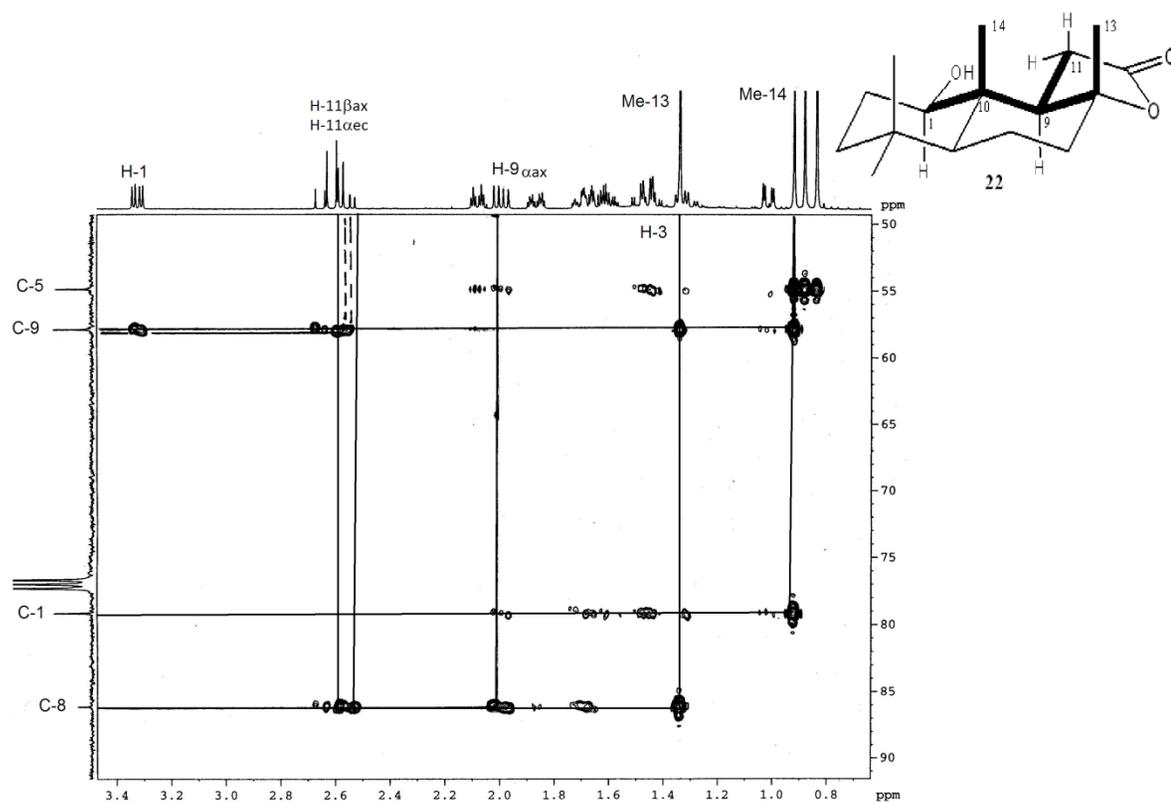
Esquema 15. Patrón de multiplicidad de H-1 y H-7, observado en RMN-¹H (espectro 12.3) para 1β-hidroxiesclareólida (**22**).

Con base en el esquema 16, se pudo concluir que la formula parcial A corresponde al compuesto en discusión; lo cual es apoyado por su espectro NOESY, donde se observa las interacciones de los hidrógenos del C₁-H (δ_C 79.1) con C₃-H (δ_C 40.3) C₅-H (δ_C 54.9) y C₉-H (δ_C 57.9). Asimismo, se comprobó la orientación del grupo hidroxilo con una orientación β-ecuatorial.



Esquema 16. Espectro NOESY del compuesto **22**.

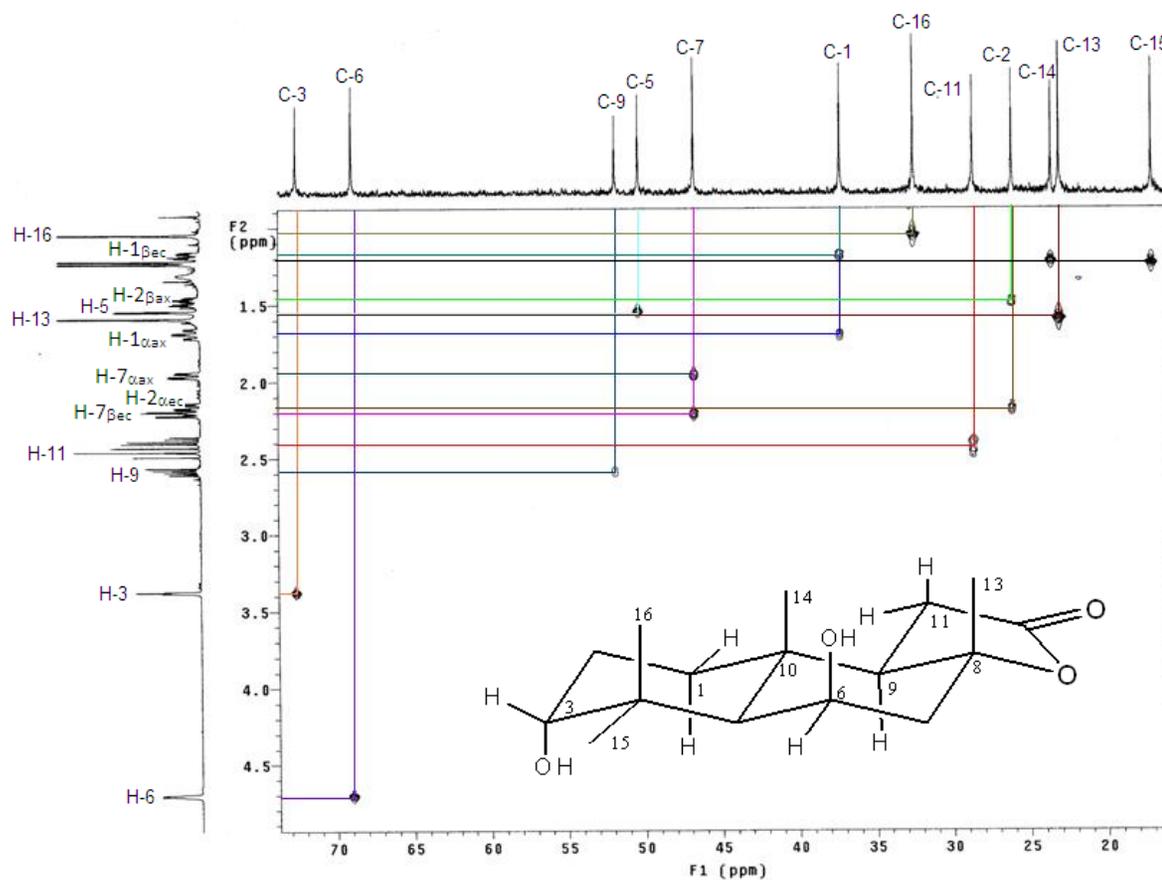
De la discusión anterior se pudo concluir que el producto de biotransformación obtenido de la bioconversión de **1** con *A. niger* es el 1 β -hidroxiesclareólida, lo cual queda comprobado con el espectro bidimensional HMBC de **22**, ver esquema 17.



Esquema 17. Espectro HMBC del compuesto **22**.

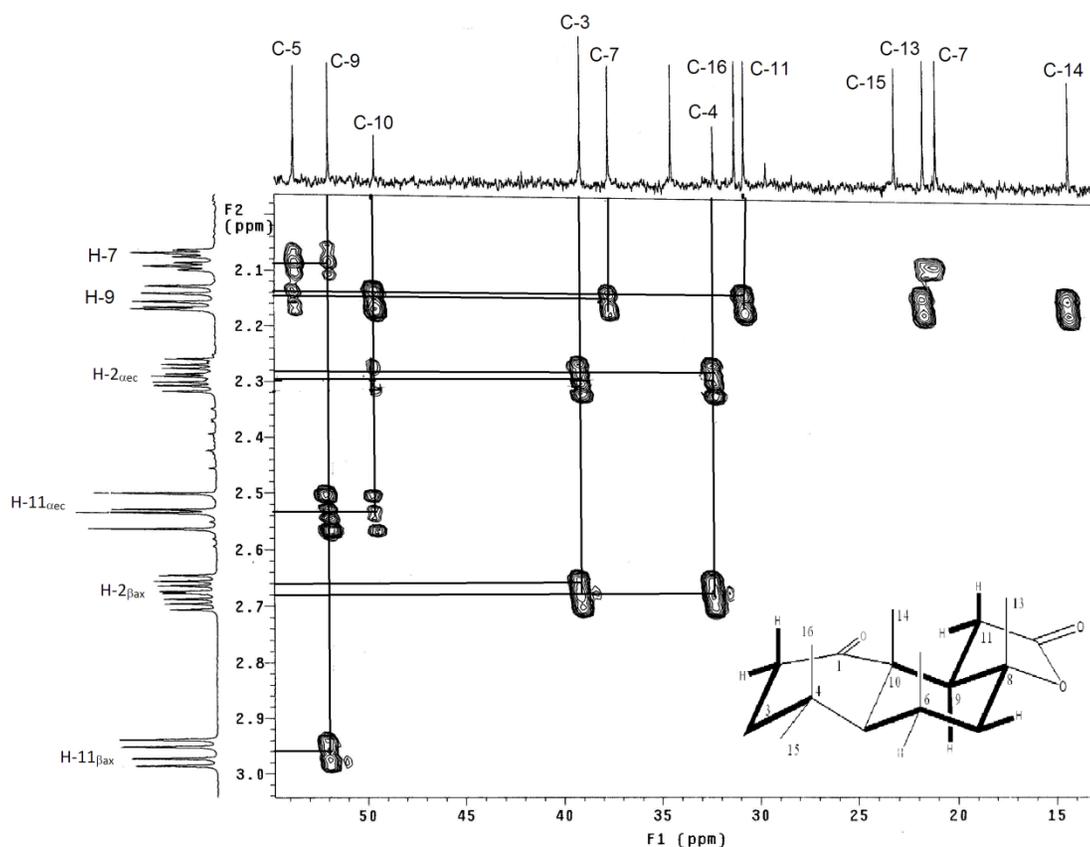
El compuesto **23**, fue identificado como el 3 β -hidroxiesclareólida con base en su espectro de RMN- ^1H (espectro 12.5), el cual muestra una señal δ_{H} 3.27 (*dd*, $J = 11, 5$ Hz, 1H), que indica una orientación axial de H-C₃ (δ_{C} 78.6). La localización del grupo hidroxilo en el C-3 fue confirmado con base al experimento HMBC de este compuesto, el cual fue identificado como el 3 β -hidroxiesclareólida [24, 26-27]. En la tabla 9, se muestran las asignaciones específicas para cada hidrógeno y carbono (espectro 12.6) de dicha molécula.

El compuesto **30** presenta una fórmula molecular $C_{16}H_{26}O_4$ $[M+H]^+$, 283.1915, Calcd. 283.1909 ($C_{16}H_{26}O_4+H$) por EM(AR)FAB⁺; su espectro de RMN-¹H (espectro 12.7) muestra dos señales en δ_H 3.37 (*dd*, *J*= 3, 3 Hz, 1H) y δ_H 4.70 (*ddd*, *J*= 3, 3, 3 Hz, 1H), las cuales sugieren una orientación ecuatorial en los C-3 (δ_C 72.6) y C-6 (δ_C 69.0), respectivamente. La localización de los grupos hidroxilos en los C-3 y C-6, fueron confirmados con base en el experimento HMBC, en particular CH₃-16 (δ_H 1.21) y CH₃-15 (δ_H 1.04), los cuales interactúan con C-3 (δ_C 72.6) y las interacciones entre H-6 (δ_H 4.70) y C-4 (δ_C 34.0), C-5 (δ_C 50.3), C-10 (δ_C 39.7), C-7 (δ_C 46.7), y C-8 (δ_C 86.3). Los experimentos COSY, NOESY y HSQC, permitieron la completa asignación para todos los protones y carbonos como se ilustra en el esquema 18, confirmando la estructura de 3 α ,6 β -dihidroxiesclareólida (**30**).



Esquema 18. Espectro HSQC del compuesto **30**.

El metabolito **31** fue obtenido como un sólido cristalino blanco, el cual presenta un ion molecular a m/z 265.1805, que corresponde a una fórmula molecular $C_{16}H_{25}O_3$ (Calcd 265.1804 ($C_{16}H_{24}O_3+H$)). Los datos espectroscópicos de IR, muestran la presencia de una γ -lactona (1774 cm^{-1}) y un grupo carbonilo de cetona (1708 cm^{-1}); cabe señalar que estos datos fueron similares a los observados para el compuesto **21**. Los datos de RMN- ^{13}C (espectro 12.10), muestran la presencia de 16 carbonos y el experimento DEPT establece la multiplicidad para cada uno de ellos, observándose 4 CH_3 , 4 CH_2 , 2 CH y 5 C cuaternarios. Su espectro de RMN- 1H (500MHz, espectro 12.9) muestra cuatro señales simples en δ_H 1.35, 1.19, 1.06 y 1.03, los cuales fueron asignados CH_3 -13, CH_3 -14, CH_3 -15 y CH_3 -16 respectivamente. En particular el CH_3 -13 localizado a campo bajo (δ_H 1.35) es debido a la unión con el C-8 donde se encuentra el cierre de la lactona. La señal en δ_H 1.19 muestra en su espectro NOESY, la interacción con H-11 (δ_H 2.96) y el espectro HMBC muestra la interacción de la señal δ_C 52.00 (C-9) con CH_3 -14.



Esquema 19. Espectro HSQC del compuesto **31**.

La localización del grupo carbonilo de la cetona en C-1 fue determinada por su espectro HMBC (esquema19), donde se observa la interacción de la señal en δ_H 1.19 (CH₃-14) con el C-1 a tres enlaces. La asignación para todos los hidrógenos y carbonos fueron determinados con base en los experimentos COSY, HMBQC, HMBC, NOESY respectivamente.

El compuesto **32** fue obtenido como un sólido cristalino blanco, el cual muestra en su espectro de IR las vibraciones características para los grupos hidroxilo: 3459 (O-H), 1767 (C=O) and 1120 (C-O) cm⁻¹. En el EM (IE) de alta resolución exhibe [M+H]⁺ at *m/z* 281.1751, que corresponde a una fórmula molecular C₁₆H₂₄O₄ (Calcd 281.1753 (C₁₆H₂₄O₄+H)).

El espectro de RMN¹³C (espectro 12.12, DEPT) muestra la presencia de 16 átomos de carbono, que corresponden a tres metilos, seis metilenos, dos metinos y cinco carbonos cuaternarios. Por otro lado, su RMN-¹H (espectro 12.11, CDCl₃, 500 MHz) muestra tres señales simples a δ_H 1.41, 1.13 y 1.00, los cuales corresponden a los CH₃13, CH₃14, CH₃15 respectivamente. Su espectro NOESY muestra las interacciones en el espacio entre los C-13 y C-14 y entre los C-14 y C-16. Una notable diferencia con **1** (4,4'-dimetil) es la ausencia de uno de los grupos metilos y la presencia de un sistema AB (δ_H 3.76 and 3.39, J= 11 Hz), el cual fue asignado a los protones del metileno C-15 (δ_C 66.6). La señal en δ_C 216.1 corresponde a un grupo carbonilo de cetona localizado en el C-3, debido a la correlación observada en su espectro HMBC con el sistema AB (H-15_a and H-15_b), H-2 _{β ax} (δ_H 2.67), H-2 _{α ec} (δ_H 2.42), H-1 _{β ec} (δ_H 1.74) y CH₃-16 (δ_H 1.00). La asignación de los desplazamientos químicos de RMN-¹H y ¹³C para el compuesto **32**, confirman que el compuesto en discusión es el 3-ceto-15-hidroxi-esclareólida.

El producto **33** es un sólido cristalino color crema. Su espectro de IR muestra las vibraciones en 3489 (O-H) y 1767 (C=O) cm⁻¹. El EM (IE) muestra un ion molecular 283.1908 que corresponde a una fórmula molecular C₁₆H₂₆O₄ (Calcd 283.1909 (C₁₆H₂₆O₄+H)).

Con base en su RMN¹³C (espectro 12.14) se determina la presencia de 16 átomos de carbono, que corresponden a tres metilos, seis metilenos, tres metinos y cuatro carbonos

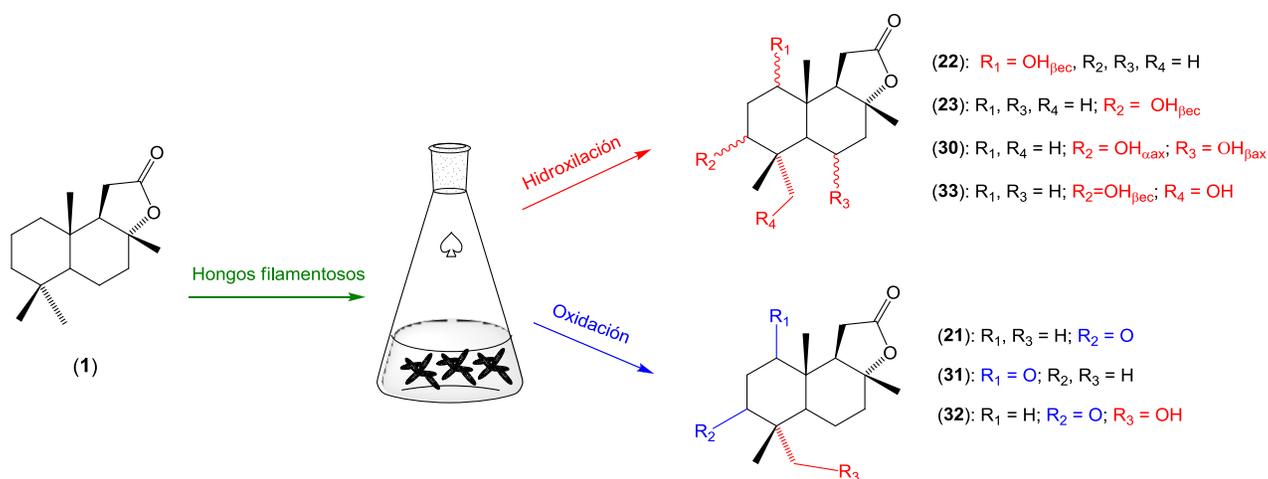
cuaternarios. El RMN-¹H (espectro 12.13) muestra tres singuletes δ_{H} 1.34, 0.97 y 0.88, asignados a CH₃-13, CH₃-14, CH₃-16 respectivamente. La comparación entre los compuestos **32** y **33**, muestran un sistema AB en δ_{H} 3.72 and 3.43 ($J = 10.5$ Hz), el cual indica la hidroxilación en el C-15 (δ_{C} 70.9), el cual se traslapa con la señal doble de doble (δ_{H} 3.70, 3J 10, 5 Hz), que corresponde al H-3_{ax}. La señal δ_{C} 75.4 asignada a C-3, muestra una correlación en su espectro HMBC con los hidrógenos (H15_a, H15_b) del sistema AB y con el CH₃16 (δ_{H} 0.88). La asignación de todos los hidrógenos y carbonos para el compuesto **33** se realizó con base en los experimentos COSY, HMQC, HMBC, NOESY, concluyendo que se trata del 3 β ,15-dihidroxi esclareólida (**33**).

10. Conclusiones.

Del presente estudio se pudo concluir que existe una diversidad estructural en los productos de biotransformación de la esclareólida (**1**) con *Aspergillus niger* en tres medios de cultivo diferentes. Donde la acción principal de dicho hongo sobre **1** es la hidroxilación de los C-3, C-6 y C-15; además de la oxidación en el C-1 y C-3 de dicha sustancia.

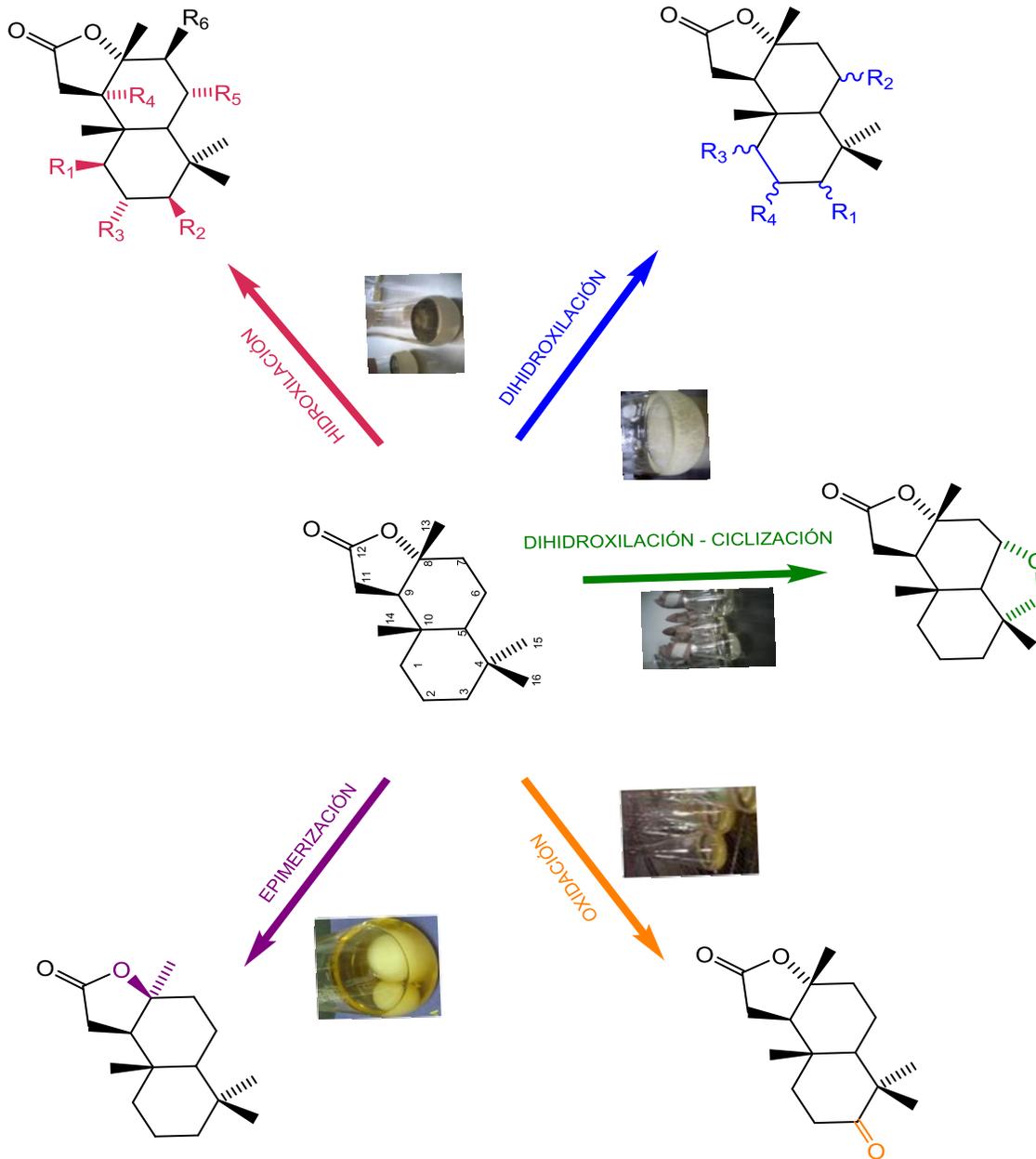
Por otro lado, la diferencia en la composición del medio (A, B y C) determinó la diversidad de los productos aislados. En el medio A, los productos obtenidos fueron **21** y **23**. En los medios B y C, los productos obtenidos fueron similares **21- 23, 30-33**. Lo anterior puede ser explicado, al considerar que los medios B y C, tienen una mayor cantidad de nutrientes y condiciones más oxidativas que el medio A.

De los resultados sobre la factibilidad de biotransformación de **1**, se puede afirmar que dicha sustancia es susceptible de ser biotransformada con cualquiera de los ocho hongos filamentosos ensayados de manera cualitativa.



$R_1 = OH$ $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
 $R_2 = OH$ $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
 $R_3 = OH$ $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
 $R_4 = OH$ $R_1 = R_2 = R_3 = R_5 = R_6 = H$
 $R_5 = OH$ $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_6 = H$
 $R_6 = OH$ $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$

$R_1 = R_2 = \beta OH; R_3, R_4 = H$
 $R_1 = \beta OH$ $R_3 = \alpha OH; R_2, R_4 = H$
 $R_1 = \beta OH$ $R_3 = \beta OH; R_2, R_4 = H$
 $R_1 = \beta OH$ $R_4 = \alpha OH; R_2, R_3 = H$
 $R_1 = \alpha OH$ $R_2 = \alpha OH; R_3, R_4 = H$



11. Bibliografía.

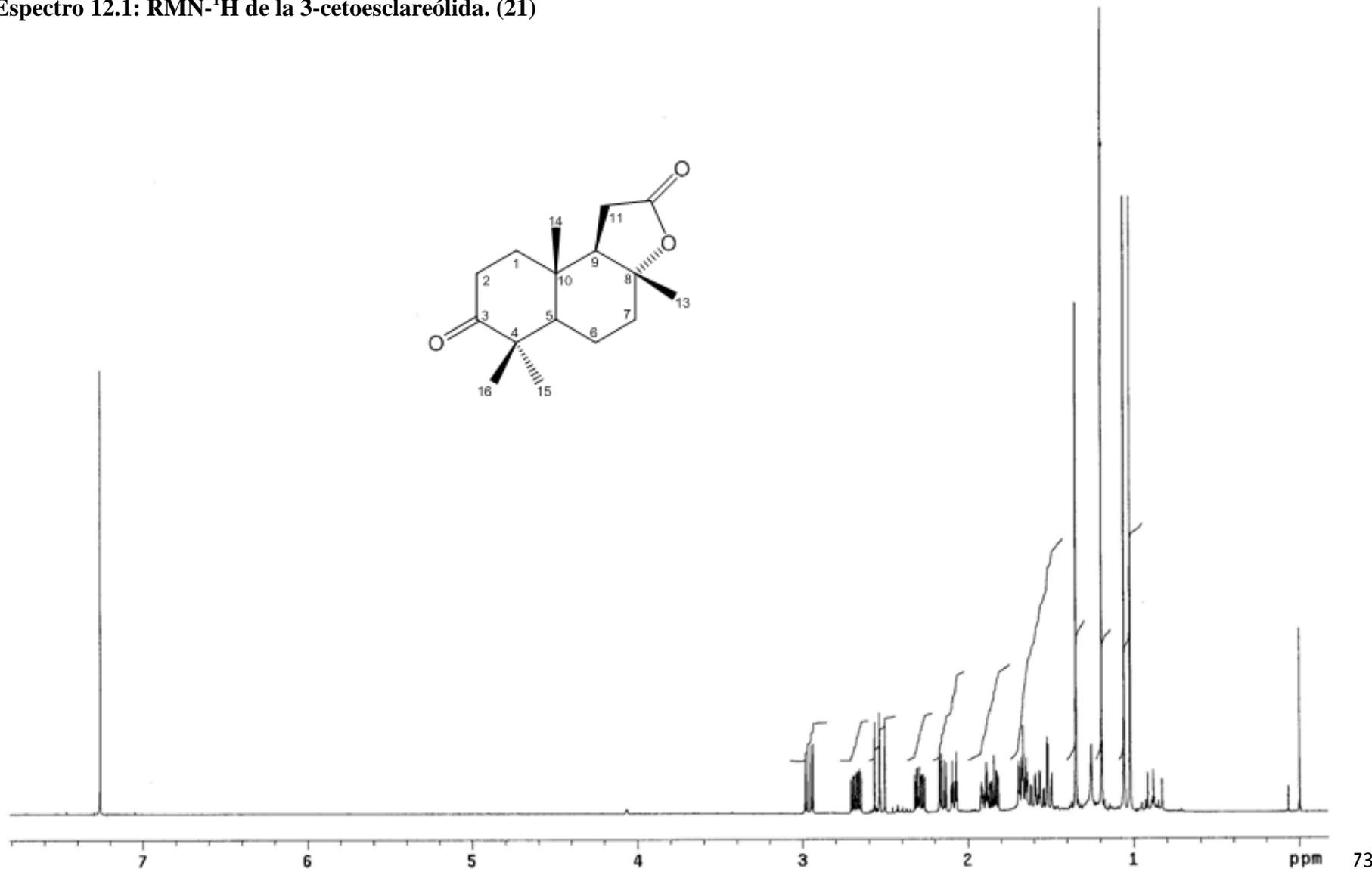
- 1.- Straathof, A. J., Panke, S., Schmid, A., **2002**. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 548-556.
- 2.- Thomas, S. M., Di Cosimo, R., Nagarajan, V., **2002**. Biocatalysis applications and potentials for the chemical industry. *Trends Biotechnol.* **6**, 238-42.
- 3.- Zaks, A., **2001**. Industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 130-136.
- 4.- Huisman, G. W., Gray, D., **2002**. Towards novel processes for the fine chemical and pharmaceutical industries. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 352-358.
- 5.- Kieslich, K., **1976**. Microbial transformation of nonsteroid cyclic compounds. Thieme:Stuttgart,
- 6.- Faber, K., **2000**. Biotransformations in Organic Chemistry.Germany. Springer-Verlag.
- 7.- Lehman, L. R., Stewart, J. D., **2001**. Filamentous fungi: potentially useful catalyst for the biohydroxylations of non-activated carbon centers. *Curr. Org. Chem.* **5**, 439-470.
- 8.- Urlacher, V., Schmid, R. D., **2002**. Biotransformations using prokariotic P450 monooxygenases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 557-564.
- 9.- Loughlin, W. A., **2000**. Biotransformations in Organic Synthesis. *Bioresource Technology* **74**, 49-62.
- 10.- Lehman, L. R.; Stewart, J. D.; **2001**. Filamentous fungi: potentially useful catalysts for the biohydroxylation of non-activated carbon centers. *Curr. Org. Chem.* **5**, 439-470
- 11.- Schmid, A.; Dordick, J. S.;Hauer, B.; Keener, A.; Wubboita, M.;Witholt, B.; **2001**. industrial biocatalycis today and tomorrow. *Nature*, **409**, 258-268.
- 12.- Holland, H. L.; Weber, K. H.; **2000**. Enzymatic hydroxylation reactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 547-553.
- 13.- Hideaki, Y.; Sakayu, S.; **1988**. Microbial and enzymatic processes for the production of biologically and chemically useful compounds, *Angwe. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**, 622-642.
- 14.- Wainwright, M.; **1995**. Introducción a la biotecnología de los hongos, Edit. Acribia, S.A. Zaragoza, España, pp. 10-22
- 15.- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., van Djck, P. W. M.; **2002**. On the safety of *Aspergillus niger*-a review. *Appl. Mecrobiol. Biotechnol.* **59**, 426-435.

- 16.- De La Torre, M. C.; Garcia, I.; Sierra, M. A., **2005**. Diversity Oriented Synthesis of hispanane-like terpene derivatives from (R)-(+)-Sclareolide, *Chem. Eur. J.*, *11*, 3659 – 3667.
- 17.- Zoretic, P.A., Fang, H., **1998**. Synthesis of Acuminolide and 17-O-acetylacuminolide from (+)-esclareolida. *J. Org. Chem.* *63*, 1156-1161.
- 18.- Rosselli, S., Bruno, M., Pibiri, I., Piozzi, F., **2002**. Synthesis of β -ethylfurolabdanes from (+)-Sclareolide. *Eur. J. Org. Chem.* 4169-4173.
- 19.- Chatterjee, P.; Pezzuto, J. M.; Kouzi, S. A., **1999**. Glucosidation of betulinic acid by *Cunninghamella* species. *J. Nat. Prod.*, *62*, 761-763.
- 20.- Kouzi, S. A.; Chatterjee, P.; Pezzuto, J. M.; Hamann, M. T., **2000**. Microbial transformations of the antimelanoma agent betulinic acid. *J. Nat. Prod.*, *63*, 1653-1657.
- 21.- Zhang, J.; Cheng, Z.; Yu, B.; Cordell, G. A.; Qiu, S. X., **2005**. Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. (NRRL 5646), *Tetrahedron Lett.*, *46*, 2337-2340.
- 22.- Collins, D.O.; Ruddock, P.L.D.; Chiverton de Grasse, J.; Reynolds, W.F.; Reese, P.B., **2002**. Microbial transformation of cadina-4,10(15)-dien-3-one, aromadendr-1(10)-en-9-one and methyl ursolate by *Mucor plumbeus* (ATCC4740). *Phytochemistry*, *59*, 479-488.
- 23.- Alarcon, J.; Aguila, S.; Cornejo, F.; Alderete, J., **2007**. Bitransformation of 5 α -hidroxy-14-eudesm-11-en-3-one by *Rhizopus nigricans*, *Cunninghamella elegans* and *Mucor plumbeus*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* *48*, 23-27
- 24.- Aranda, G.; El-Korbi, M. S.; Lallemand, J-Y; Neuman, A.; Hammoumi, A.; Bacón, I.; Azerad, R. **1991**. Microbial transformation of diterpenes: Hydroxylation of sclareol, manool and derivates by *Mucor plumbeus*. *Tetrahedron*, *39*, 8339-8350.
- 25.- Hanson, J.; Truneh, A., **1996**. The biotransformation of ambrox and sclareolide by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, *42*, 1021-1023.
- 26.- Atta-ur-Rahman, Farooq, A.; Choudhary, M. I., **1997**. Microbial transformation of sclareolide. *J. Nat. Prod.*, *60*, 1038-1040.
- 27.- Choudhary, M. I.; Musharraf, G.; Atta-ur-Rahman., **2004**. Microbial transformation of sesquiterpenes, (-)-ambrox and (+)-sclareolide. *Helv. Chim. Acta*, *87*, 2685-2694.

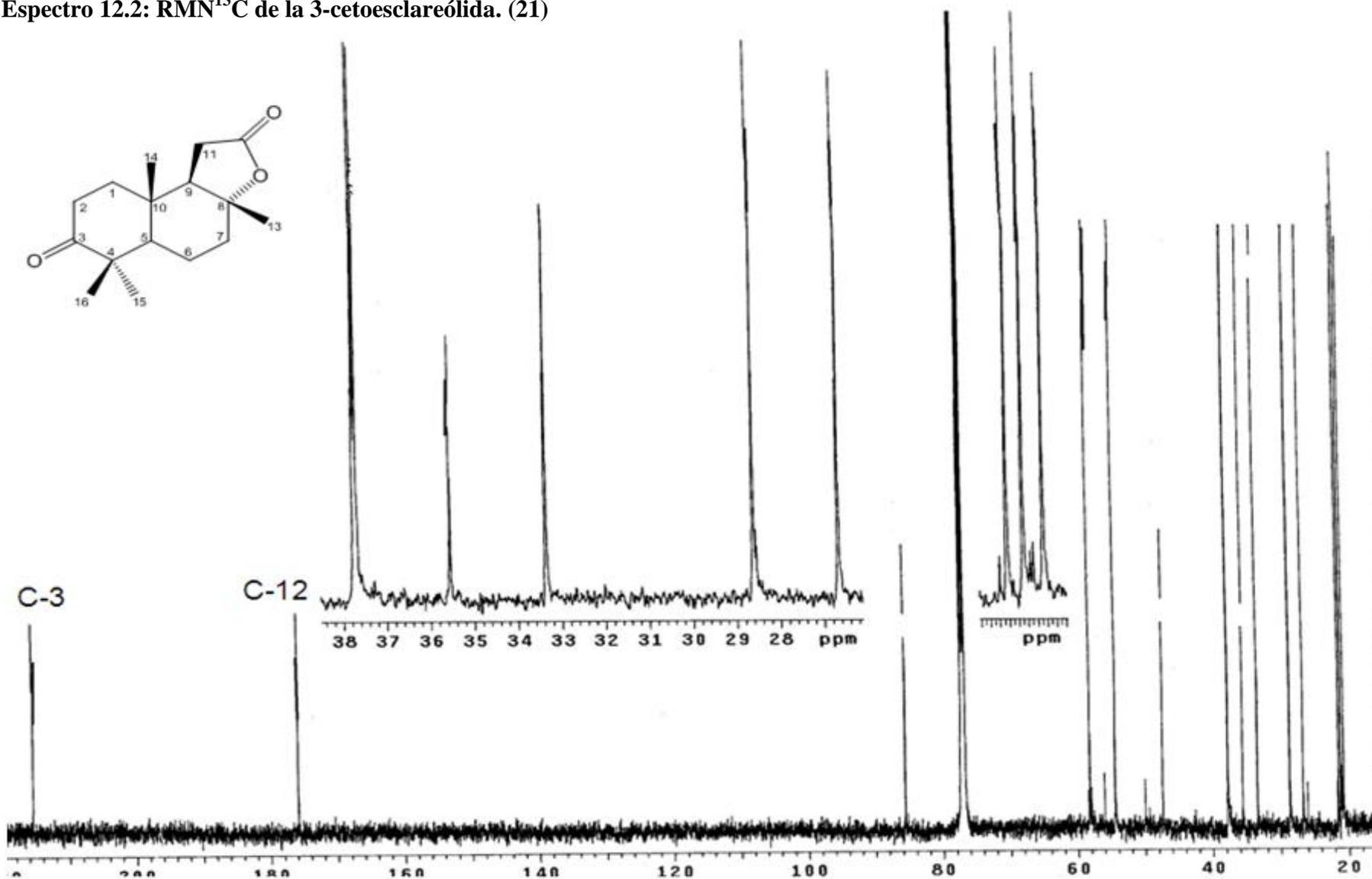
28.- Coll, J.C.; Bowden, B.F.,**1986**. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures; *J. Nat. Prod.*, 49, 936-939.

12. Espectros

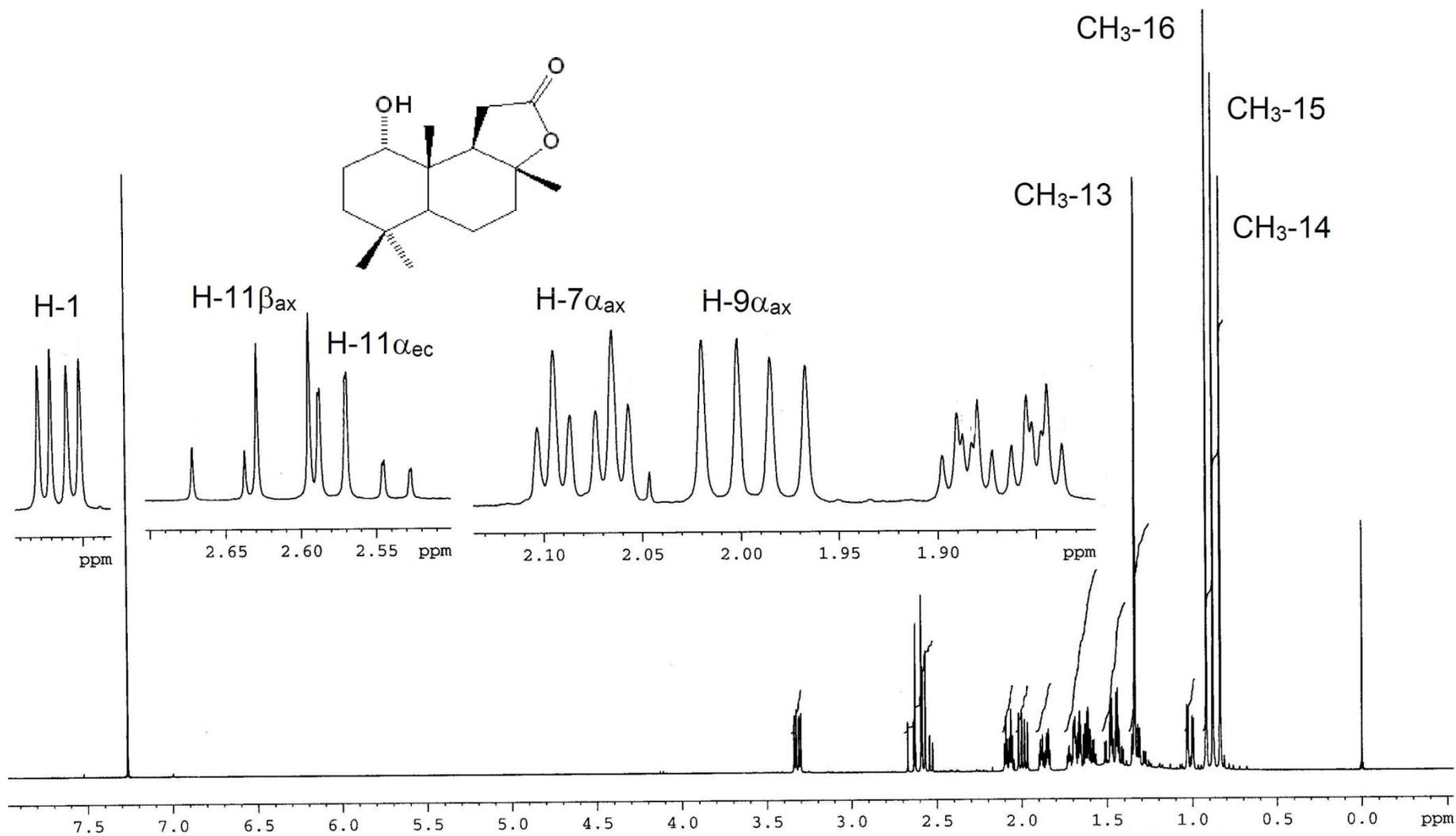
Espectro 12.1: RMN-¹H de la 3-cetoesclareólida. (21)



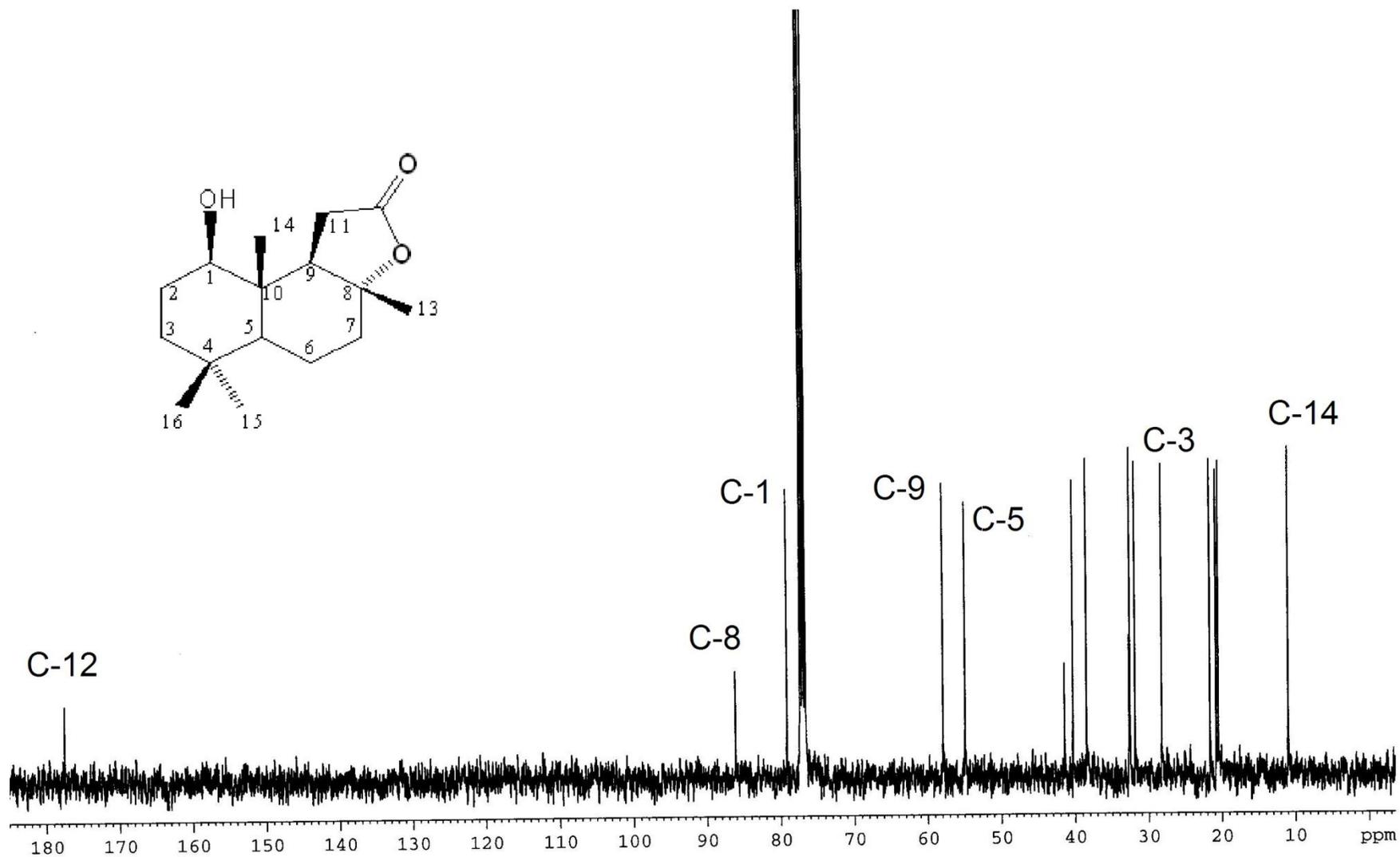
Espectro 12.2: RMN¹³C de la 3-cetoesclareólida. (21)



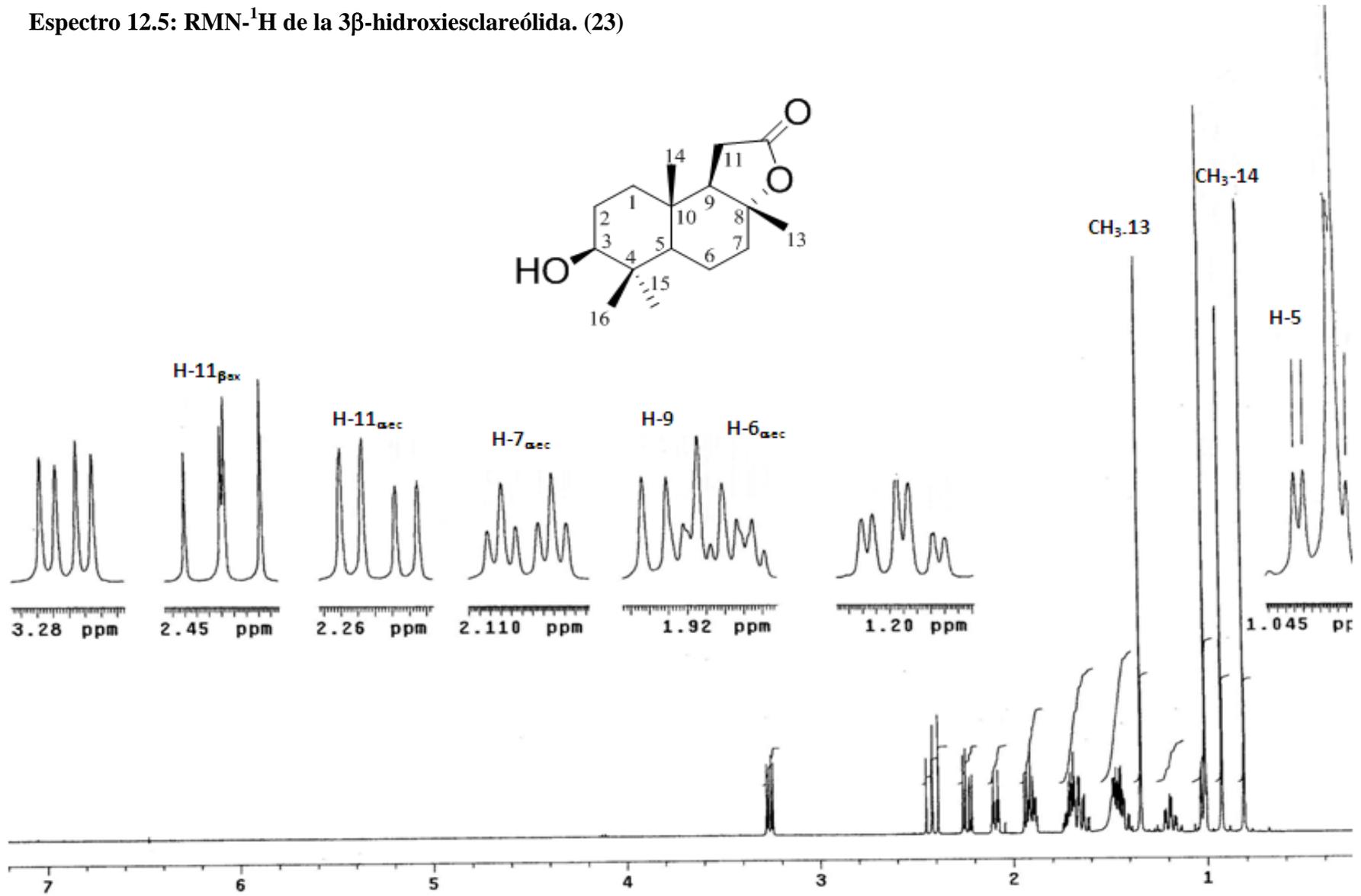
Espectro 12.3: RMN-¹H de la 1β-hidroxisclareólida. (22)



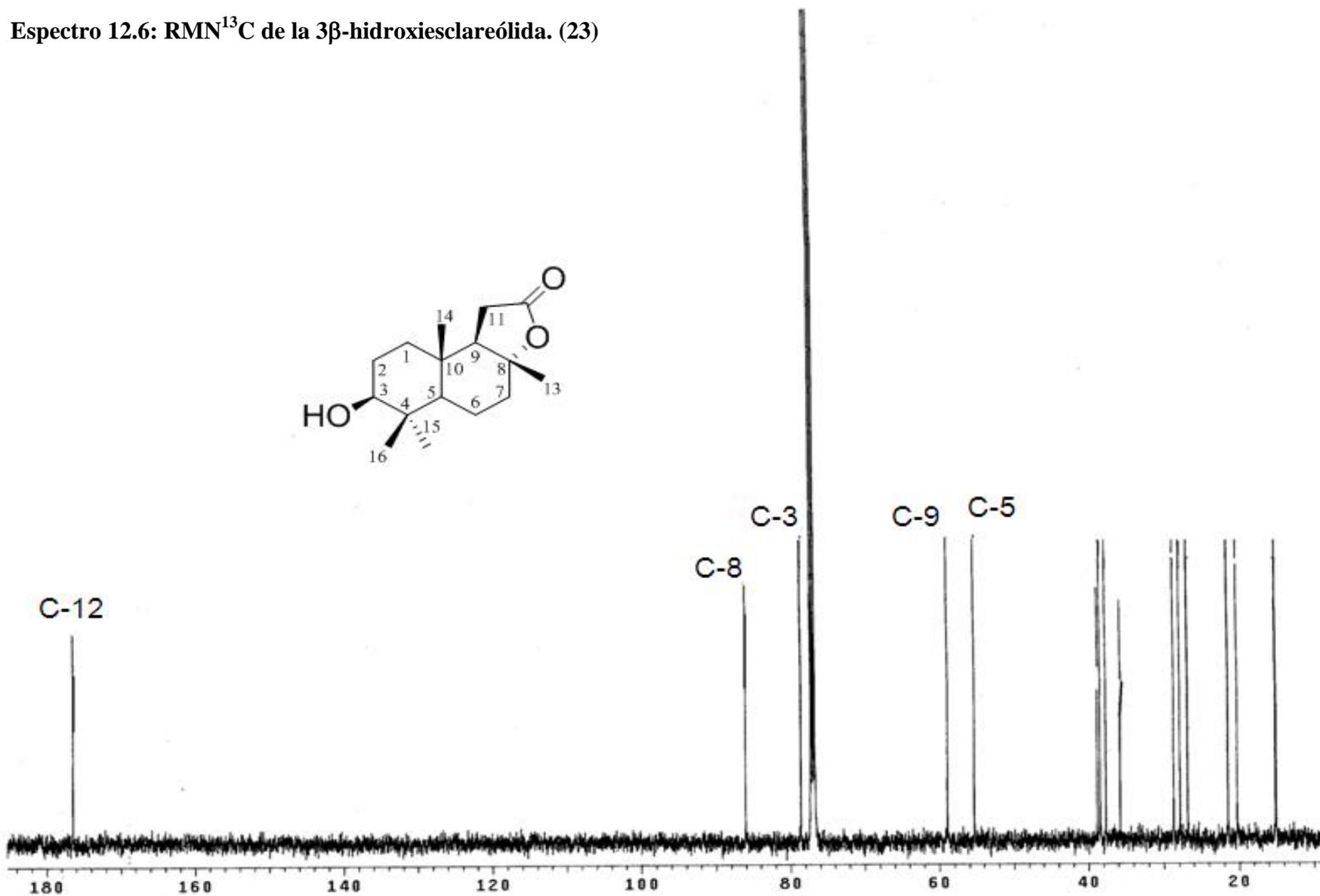
Espectro 12.4: RMN¹³C de la 1β-hidroxisclareólida. (22)



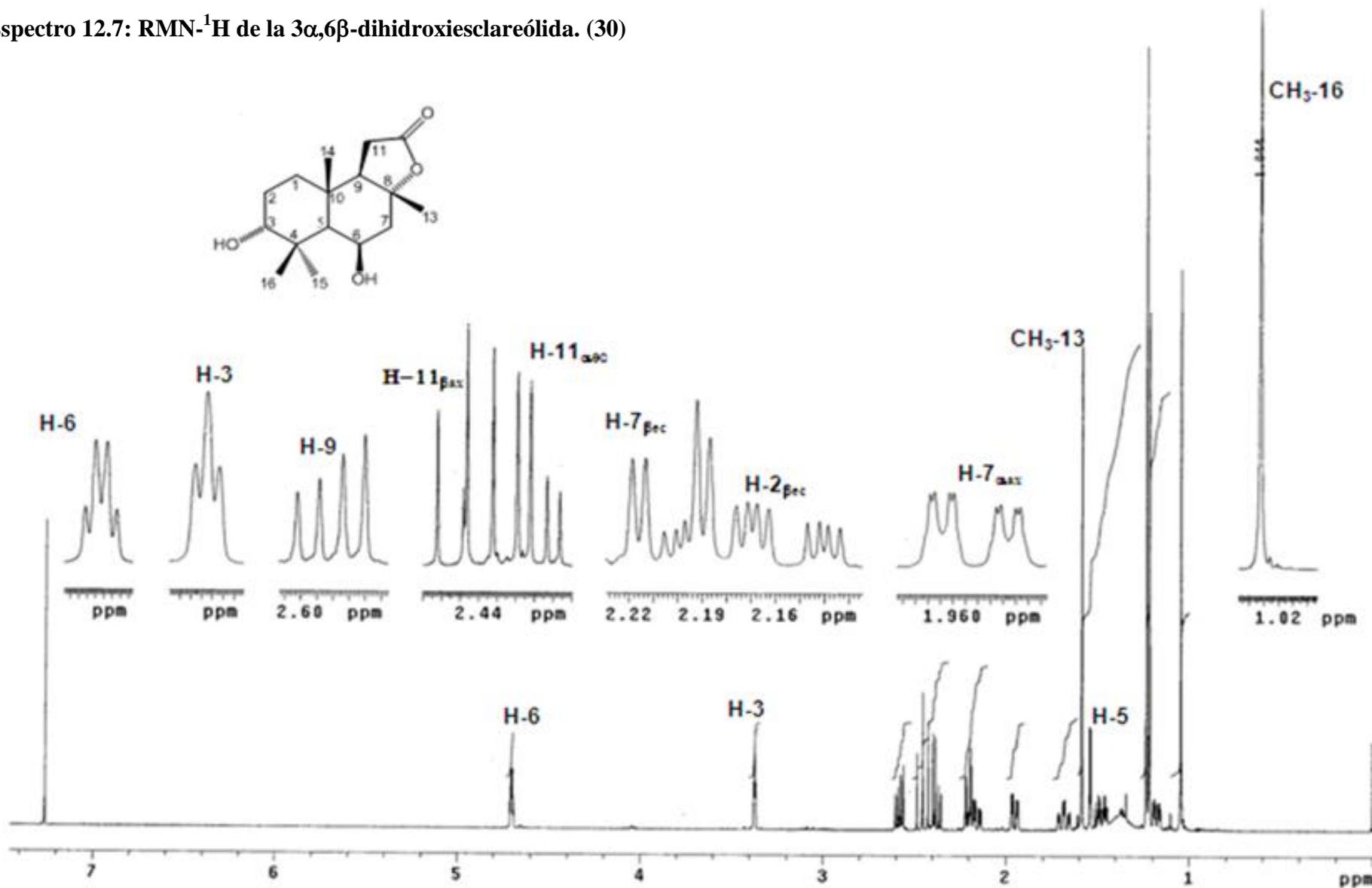
Espectro 12.5: RMN-¹H de la 3β-hidroxisclareólida. (23)



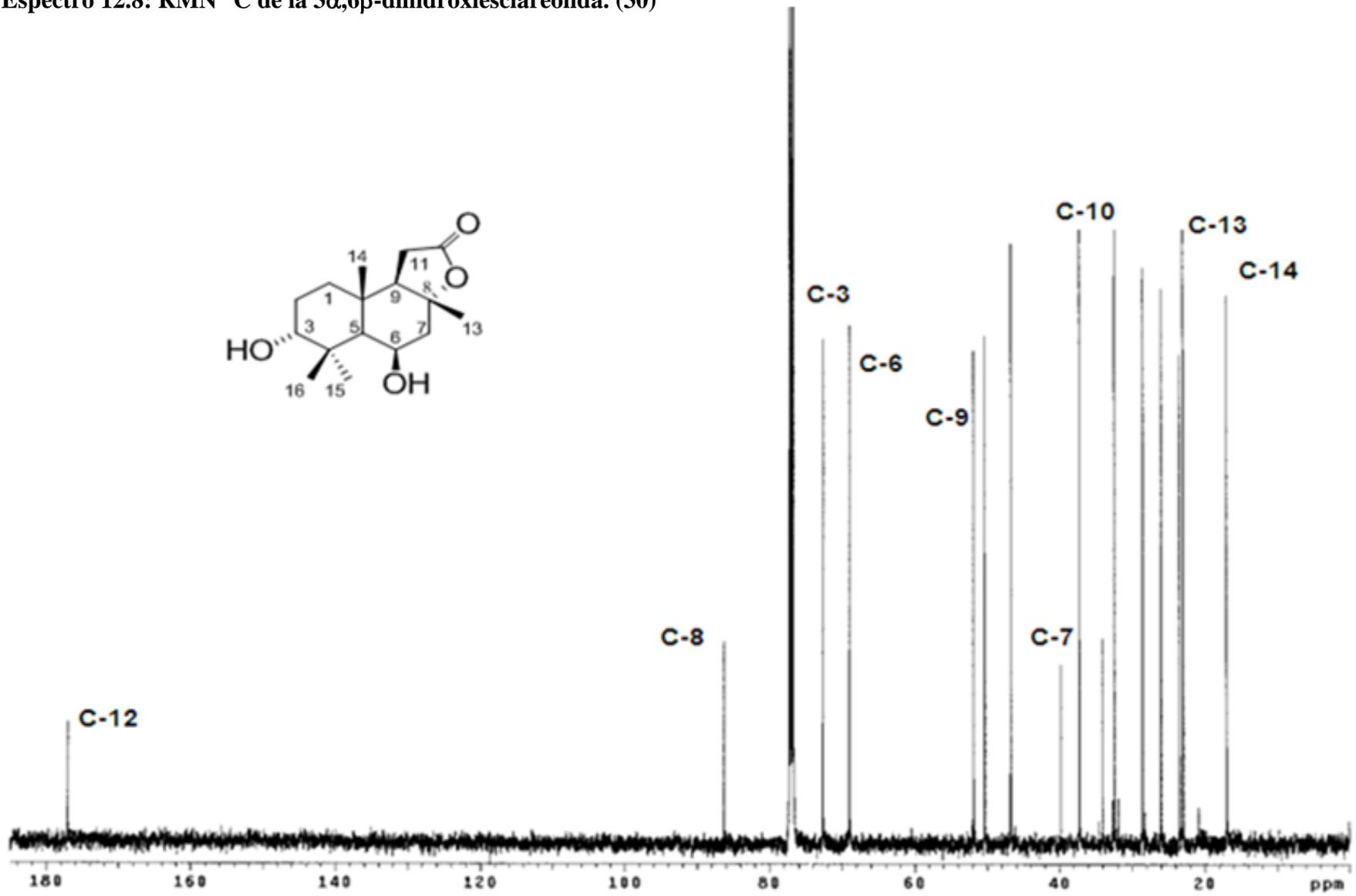
Espectro 12.6: RMN¹³C de la 3β-hidroxiesteroide. (23)



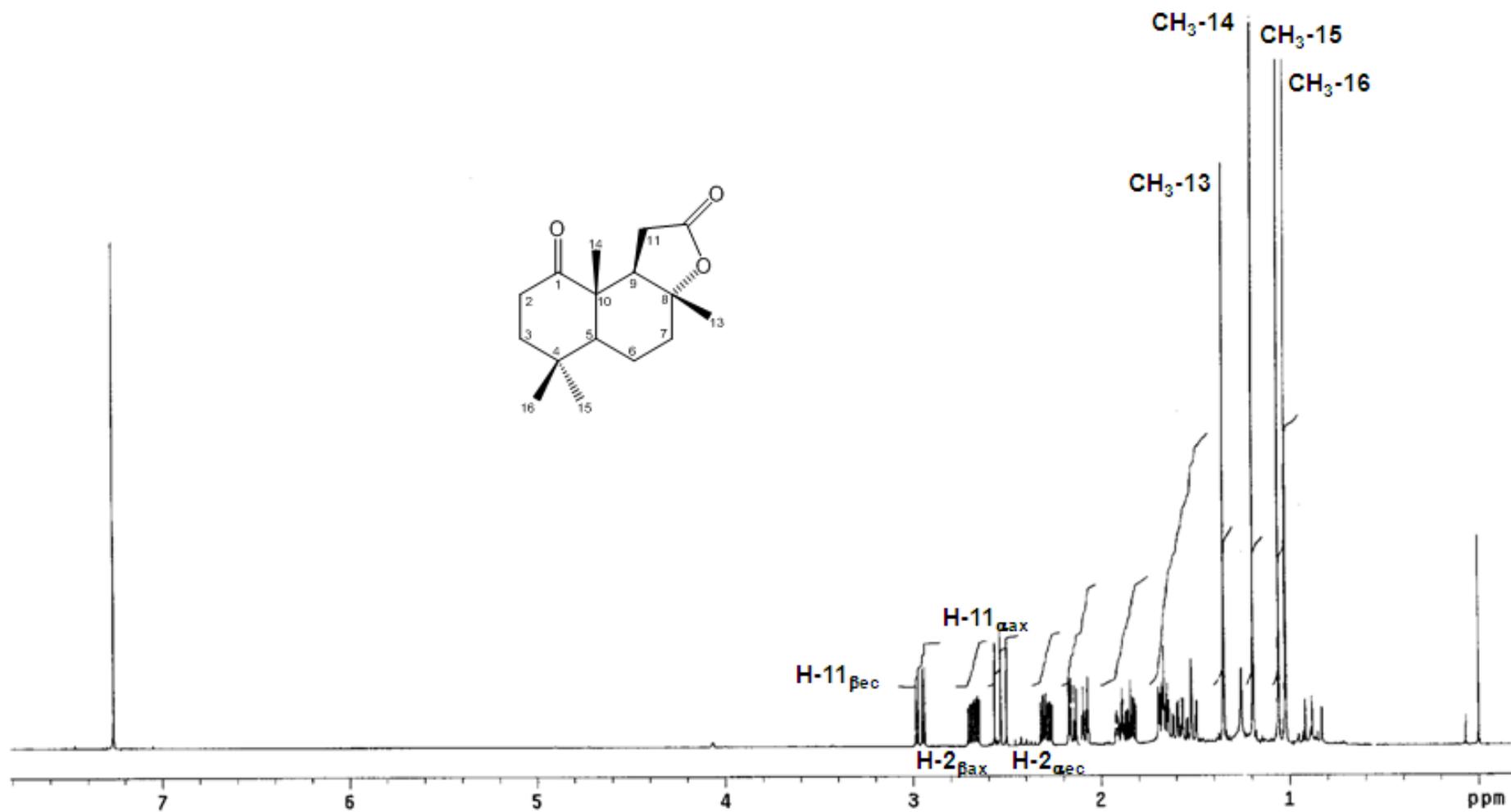
Espectro 12.7: RMN-¹H de la 3 α ,6 β -dihidroxiescalareólida. (30)



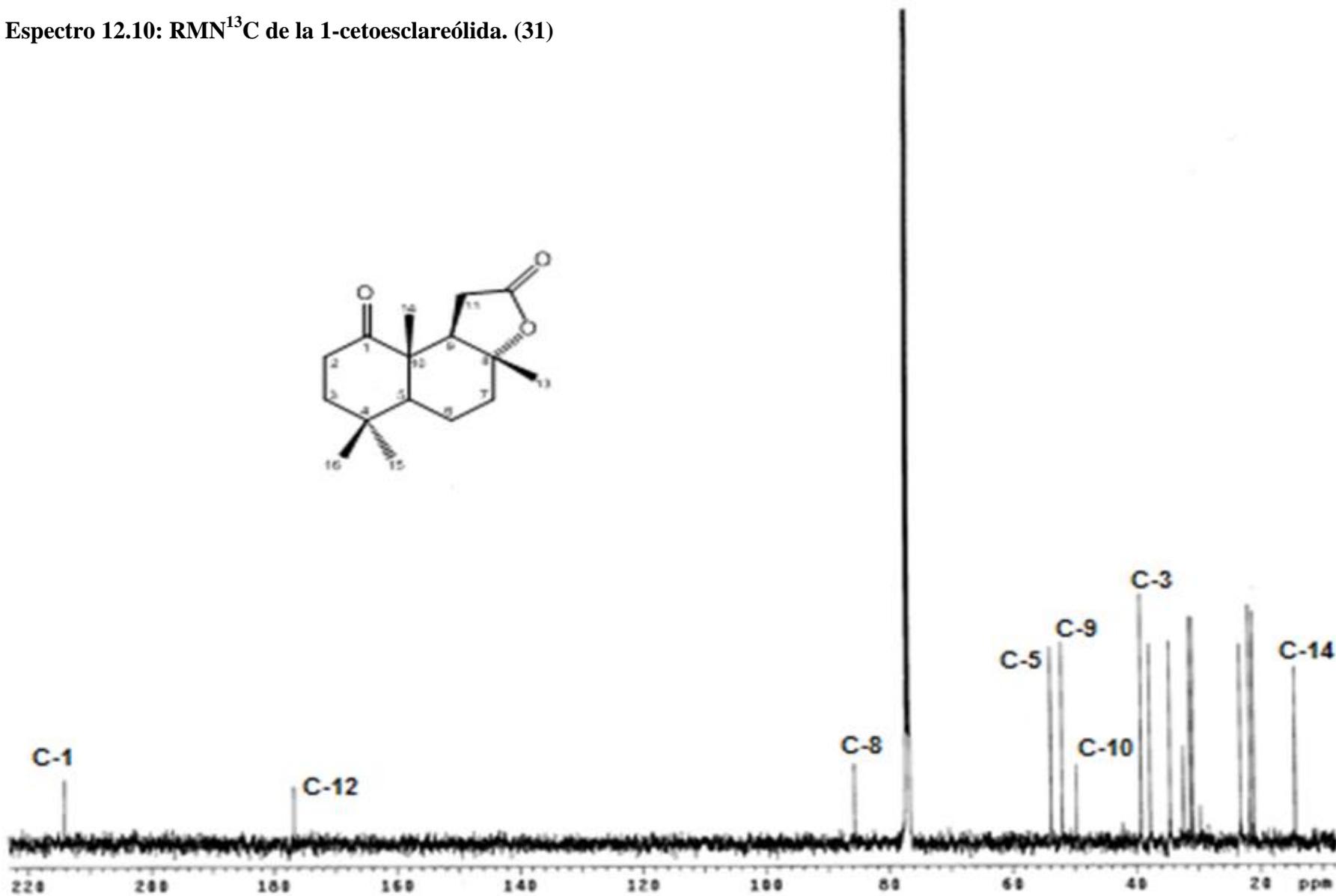
Espectro 12.8: RMN¹³C de la 3 α ,6 β -dihidroxiesteroide. (30)



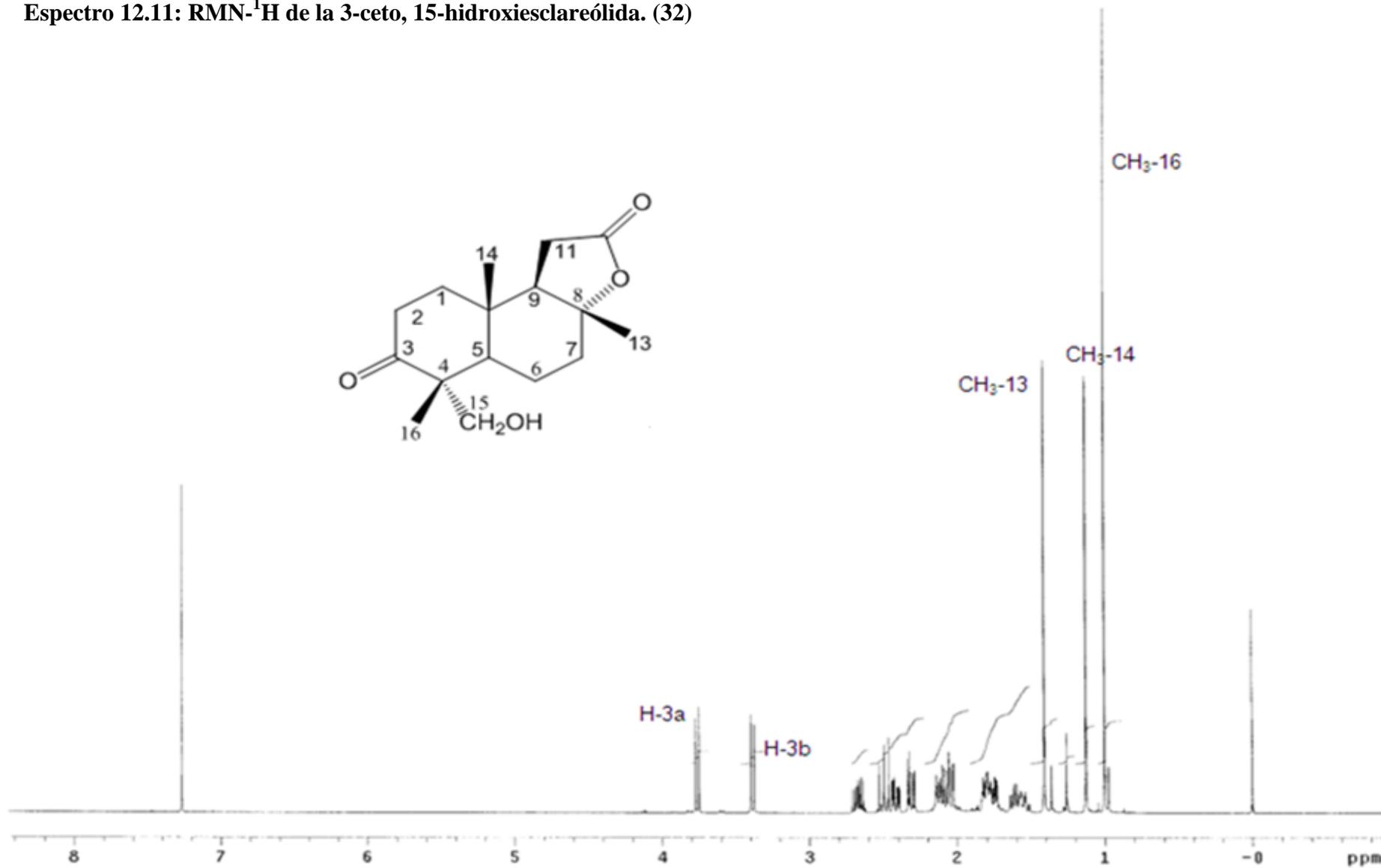
Espectro 12.9: RMN-¹H de la 1-cetoesclareólida. (31)



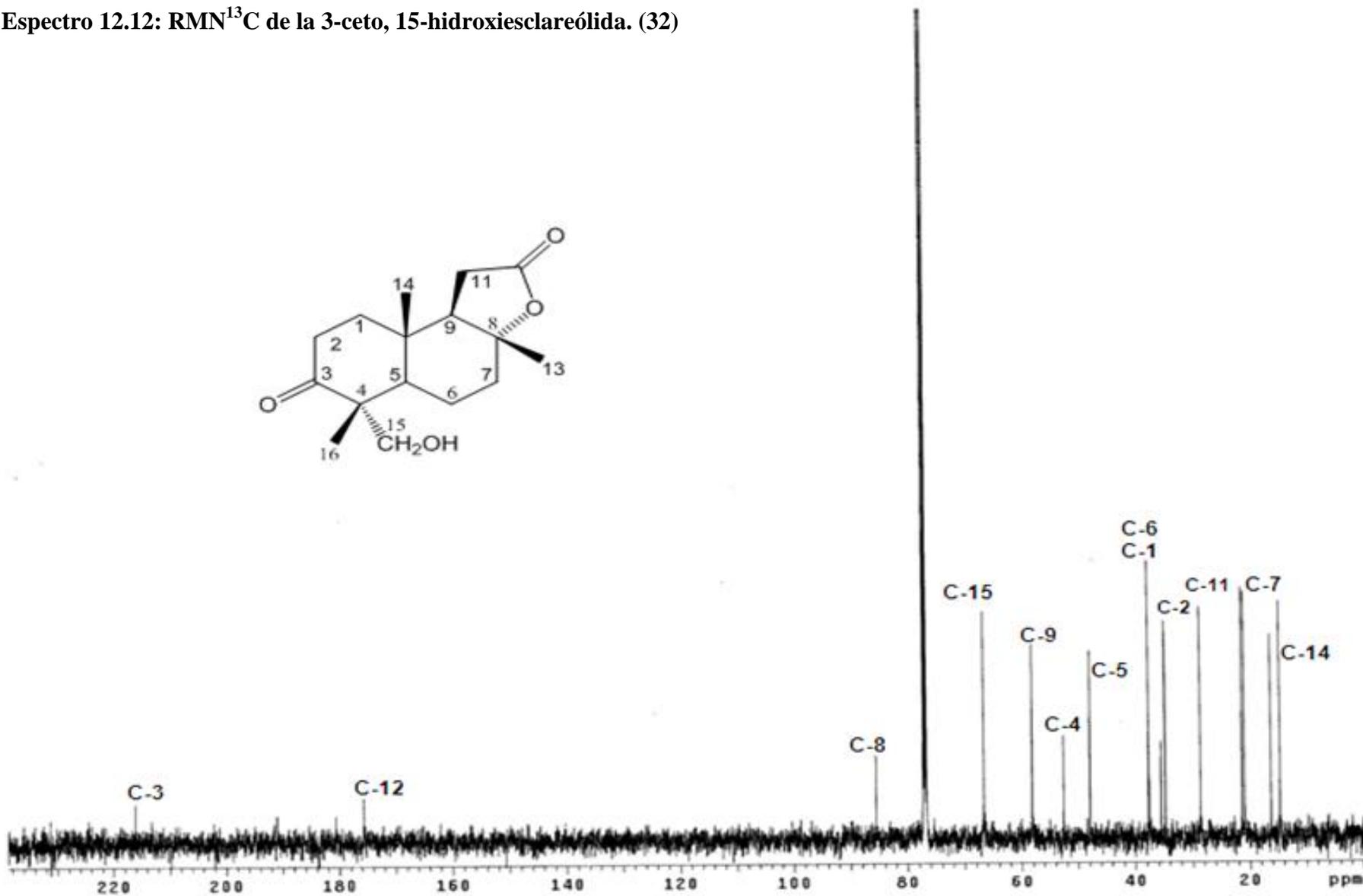
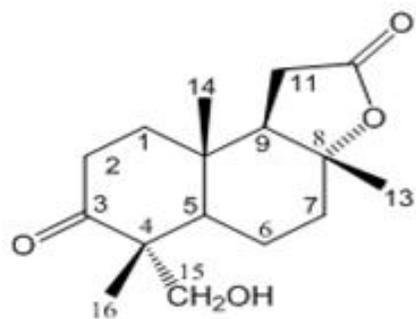
Espectro 12.10: RMN¹³C de la 1-cetoesclareólida. (31)



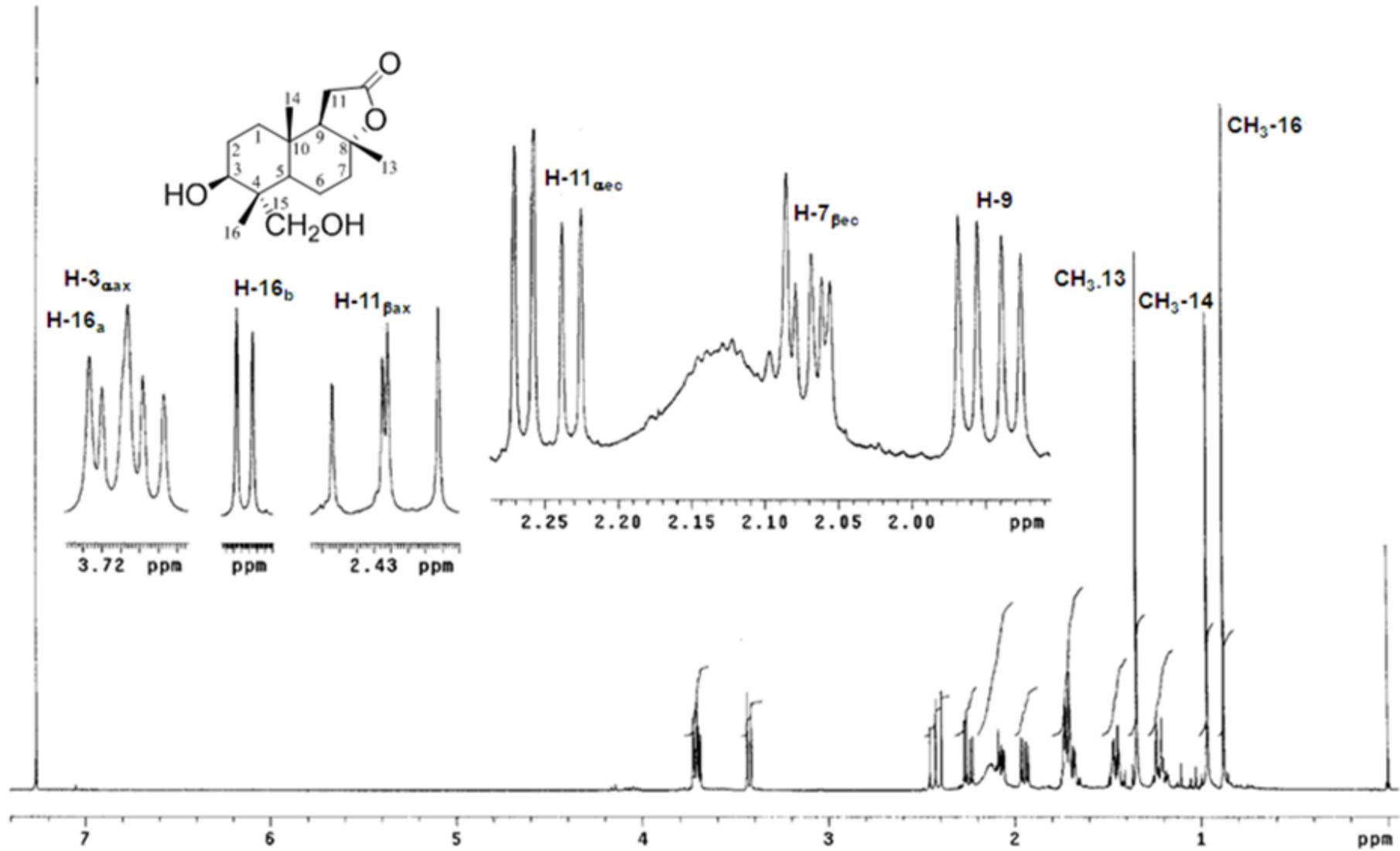
Espectro 12.11: RMN-¹H de la 3-ceto, 15-hidroxiesclareólida. (32)



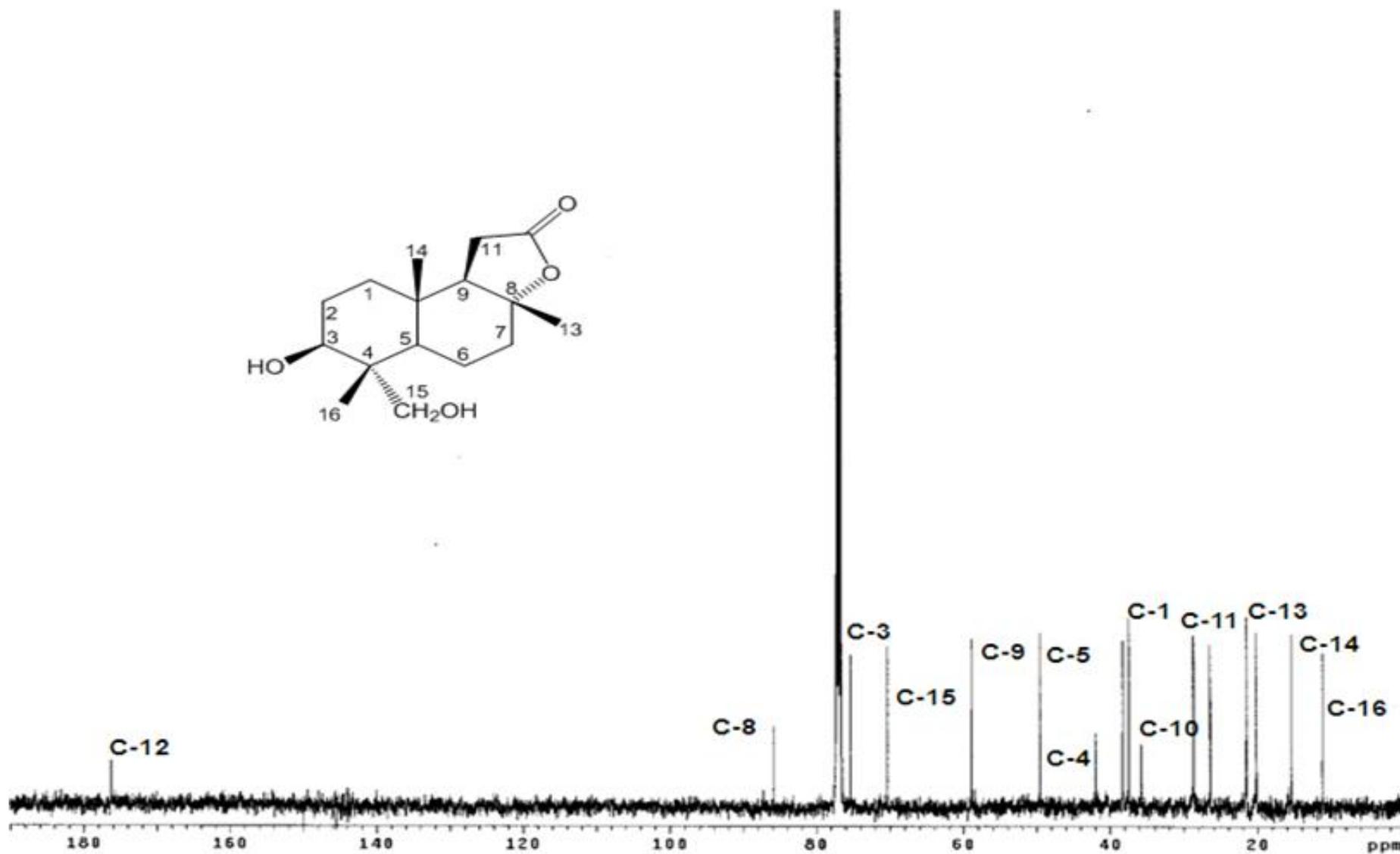
Espectro 12.12: RMN¹³C de la 3-ceto, 15-hidroxiesteroide. (32)



Espectro 12.13: RMN-¹H de la 3β, 15-dihidroxiesteroide. (33)



Espectro 12.14: RMN¹³C de la 3β, 15-dihidroesclareólida. (33)



Lista de abreviaturas y símbolos

Acetil-CoA: Acetil coenzima A

AcOEt: Acetato de etilo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ATCC: American **Type Culture Collection**.

ATP: Adenosín trifosfato.

CCF: Cromatografía en Capa Fina.

CCV: Cromatografía en Columna al Vacío.

CDCl₃: Cloroformo Deuterado.

Csapek-Dox: Medio de Cultivo

COSY: Correlación Homonuclear de Hidrógeno.

CYP P450: Citocromos P450.

δc: Desplazamiento químico en RMN-¹³C

dd: Doble de doble.

DEPT: RMN-¹³C, desacoplamiento parcial de C-¹³.

EM (IE): Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico

EM (AR)FAB: Espectrometría de Masas de Alta Resolución (FAB)

HMBC: Correlación Heteronuclear a larga distancia C-H.

HSQC: Correlación Heteronuclear a un enlace C-H

Hz: Hertz

IR: Infrarojo.

MHz: MegaHertz

m/z: Relación masa/carga

[M+H]⁺: Ion molecular ⁺H

NADP: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato forma oxidada

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato forma reducida

NOESY: Efecto Nuclear Overhauser.

PDA: Agar papa destroxa.

pf: Punto de fusión.

ppm: partes por millón

RMN-¹H: Resonancia Magnética nuclear de hidrógeno.

RMN¹³C: Resonancia Magnética nuclear de carbono.

YEPGA: Medio de cultivo

(rel. Int.): Intensidad relativa

$[\alpha]_D^{25}$: Rotación Óptica