



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

Aislamiento y Biotransformación de lactonas sesquiterpénicas
—ludovicina A, Arglanina y Ridentina— de *Artemisia ludoviciana*
ssp mexicana.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO.
P R E S E N T A:
BAYONA INURRETA LUIS BERNARDO.

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



MÉXICO D. F.

AGOSTO 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 Dr. Guillermo Delgado Lamas.

Al laboratorio 1 del edificio C del Instituto de Química.

A la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM.

Dedicatoria.

Dedicó el presente trabajo a mis jefes de trabajo, presentes y anteriores, que han creído en mí y me han permitido colaborar con ellos durante los últimos diez años de mi vida, gracias por el apoyo y su confianza.

Lic. Ricardo Alonso Cortina.

Lic. Norma Molina.

Q.F.B. Concepción Hernández.

Q.F.B. Angélica Cárdenas Corona.

Q. Susana Rodríguez Barbero.

Al profesor:

Samuel Sosol Méndez.

Que con su dedicación, paciencia y esmero en mis estudios de bachillerato me motivo para decidir mi vocación universitaria.

A mi familia, por su tolerancia y apoyo ellos son el motor que mueve mi vida, todos mis esfuerzos son dedicados para ofrecerles una vida mejor, los amo con todo mi corazón.

Lourdes Méndez Romero.

Hugo Enrique Bayona Méndez.

Angélica Bayona Méndez.

Luisa Alejandra Bayona Méndez.

A mi director de tesis, por el haberme permitido realizar el presente trabajo, ya que conozco el grado de exigencia que tiene en la selección de sus tesis, gracias por su confianza.

M. en C. Arturo Eduardo Cano Flores.

ÍNDICE.

	Página.
I. INTRODUCCIÓN.....	1.
II. MARCO TEÓRICO.....	5.
2.1) Generalidades del género <i>Artemisia</i>.	6.
2.2) Generalidades de las lactonas sesquiterpénicas.....	6.
2.3) Lactonas sesquiterpénicas aisladas del género <i>Artemisia</i>.....	7.
Cuadro 1. Lactonas sesquiterpénicas aisladas del género <i>Artemisia</i>	7.
2.4) Generalidades de las biotransformaciones.	8.
2.4.1) Biotransformaciones con células enteras.	9.
2.5) Generalidades de los hongos filamentosos.	10.
Figura 1: Fases del crecimiento microbiano.	17.
2.6) Biotransformación de lactonas sesquiterpénicas.	17.
Esquema 1. Artenuina B con <i>A. flavipes</i> y <i>B. bassiana</i>	18.
Esquema 2. Artemisinina con <i>N. corallina</i> y <i>P. chrysogenum</i>	18.
Esquema 3. 7 α -hidroxifrullanólida con <i>A. niger</i> y <i>A. quadrilatus</i>	19.
Esquema 4. Estructuras químicas de las lactonas sesquiterpénicas biotransformadas con <i>C. echinulata</i> y <i>R. oryzae</i>	20.
Esquema 5. (+)-costunólida con <i>C. echinulata</i>	20.
Esquema 6. (-)-dehidrocostuslactona con <i>R. oryzae</i> y <i>C. echinulata</i>	21.
Esquema 7. (-)-lichnofólida con <i>R. oryzae</i> y <i>C. echinulata</i>	21.
Esquema 8. Partenólida con <i>S. fulvissimus</i>	22.
Esquema 9. Partenólida con <i>R. nigricans</i>	22.
Esquema 10. Piretrosina con <i>R. nigricans</i>	23.
III. JUSTIFICACIÓN.....	24.

IV. OBJETIVOS.....	26.
4.1) Objetivo General.....	27.
4.2) Objetivos Particulares.....	27.
V. HIPÓTESIS.....	28.
VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	30.
6.1) Metodología.....	31.
6.1.2) Estudio químico de la <i>Artemisia ludoviciana ssp mexicana</i> (Willd) Keck, Sn Pedro Actopan, Milpa Alta.	32.
Esquema 11. Lactonas sesquiterpénicas aisladas del extracto CH ₂ Cl ₂ de la <i>Artemisia ludoviciana ssp mexicana</i> , Sn Pedro Actopan, Milpa Alta.	33.
6.1.3) Estudio químico de la <i>Artemisia ludoviciana ssp mexicana</i> (Willd) Keck, Sn Rafael Tlalmanalco, Edo. de México.	37.
6.2) Biotransformaciones de lactonas sesquiterpénicas.....	37.
Esquema 12. Lactonas sesquiterpénicas aisladas del extracto CH ₂ Cl ₂ de la <i>Artemisia ludoviciana ssp mexicana</i> , Sn Rafael Tlalmanalco, Edo de México.	38.
6.2.5) Factibilidad de las biotransformaciones de las lactonas sesquiterpénicas por hongos filamentosos.....	39.
Tabla 1. Resultados de la factibilidad de biotransformación de las lactonas sesquiterpénicas 1-3 , con ocho hongos filamentosos.	40.
6.2.6) Biotransformación cuantitativa de las lactonas sesquiterpénicas 1-3. ...	40.
6.3) Biotransformación de la arglanina (2) con <i>C. blackesleeana</i>.	41.
Esquema 13. Biotransformación de la arglanina con <i>C. blackesleeana</i>	41.
6.4) Biotransformación de la ridentina (3) con <i>C. lunata</i>.	42.
Esquema 14. Biotransformación de la ridentina con <i>C. lunata</i>	42.
6.5) Biotransformación de la ludovicina A con <i>C. lunata</i>.	42.

Esquema 15. Biotransformación de la ludovicina A con <i>C. lunata</i>	42.
6.6) Reacción de epoxidación de la santamarina.	44.
6.7) Biotransformación del epóxido de la santamarina con <i>C. lunata</i>	44.
Esquema 16. Obtención del epóxido de la santamarina y apertura por medio de <i>C. lunata</i>	44.
Esquema 17. Propuesta de un mecanismo de reacción de la 3 α - hidroxireynosina a partir de la apertura estereodiferenciada del epóxido de santamarina.....	45.
VII. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	46.
7.1) Caracterización e identificación de la ridentina (3).	47.
Esquema 18. Fórmula parcial A.....	47.
Esquema 19. Patrón de multiplicidad observada para H ₇ , H ₉ y H ₈ en RMN- ¹ H.	47.
Esquema 20. RMN- ¹ H (COSY) para la ridentina.....	48.
7.2) Obtención del derivado diacetilado de la ridentina.	49.
Esquema 21. Reacción de acetilación de la ridentina.	49.
Tabla 2. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C para la ridentina y su derivado diacetilado.....	50.
7.3) Biotransformación de la ridentina con <i>C. lunata</i>	51.
Esquema 22. Biotransformación de la ridentina con <i>C. lunata</i>	51.
Esquema 23. Estructuras resonantes para H-2 y H-3 en el anillo A.....	51.
Esquema 24. Correlaciones C-H (HSQC) para la vulgarina.....	52.
Esquema 25. (HMBC) para el epímero de la vulgarina.....	53.
Esquema 26. Propuesta de mecanismo para la bioconversión de ridentina al epímero de la vulgarina.....	54.
7.4) Caracterización e identificación de la arglanina.....	55.
Esquema 27. Fórmula parcial y formas resonantes para la arglanina.....	55.
7.5) Biotransformación de la arglanina con <i>C. blackesleeana</i>	56.
Esquema 28. Biotransformación de la arglanina con <i>C. blackesleeana</i>	56.
Esquema 29. Desplazamientos químicos para H-2 y H-3 en la vulgarina (49) y arglanina (2).	57.

7.6)	Caracterización e identificación de la ludovicina A.....	57.
	Esquema 30. Espectro COSY de la ludovicina A.....	58.
7.7)	Biotransformación de la ludovicina A. con <i>C. lunata</i>	59.
	Esquema 31. Biotransformación de ludovicina A con <i>C. lunata</i>	59.
	Esquema 32. Desplazamientos químicos para el sistema carbonílico α - β insaturado presente en la tuberiferina.....	59.
	Esquema 33. COSY para la tuberiferina.	60.
	Esquema 34. COSY de la ludovicina B.....	62.
	Esquema 35. Propuesta de mecanismo para la bioconversión de ludovicina A con <i>C. lunata</i> para dar ludovicina B.....	63.
	Esquema 36. Propuesta de mecanismo para la bioconversión de ludovicina A con <i>C. lunata</i> para dar tuberiferina.....	64.
VIII. CONCLUSIONES.....		65.
IX. BIBLIOGRAFÍA.....		67.
X. ESPECTROS.....		72.

NOTACIONES EMPLEADAS

(Abreviaturas y símbolos)

AcOEt	Acetato de etilo.
AMCPB	Ácido meta cloro perbenzóico.
APD	Agar papa dextrosa.
D ₂ O	Agua deuterada.
ATCC	American Type Culture Collection
Ac ₂ O	Anhídrido acético.
NRRL	ARS Culture Collection.
ax	Axial.
C	Carbono.
cm ⁻¹	Centímetro ⁻¹ .
CDCl ₃	Cloroformo deuterado.
J	Constante de acoplamiento (Hz).
COSY	Correlación homonuclear bidimensional H-H.
CCF	Cromatografía en capa fina.
CCP	Cromatografía en capa preparativa.
CC	Cromatografía en columna.
CCV	Cromatografía en columna por elución a vacío.
δ	Desplazamiento químico.
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado.
DEPT	Distortion Enhancement by Polarization Transference.
<i>d</i>	Doble.
<i>dd</i>	Doble de doble.
<i>dt</i>	Doble de triplete.
<i>ec.</i>	Ecuatorial.
C-H	Enlace carbono-hidrógeno.
FAB ⁺	Espectrometría de masas de alta resolución (FAB ⁺).

EM (IE)	Espectrometría de masas por impacto electrónico.
IR	Espectroscopía de infrarrojo.
RMN ¹³ C	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de C-13.
RMN ¹ H	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de H-1.
FAO	Fondo de las Naciones Unidas para la Alimentación.
Hz	Hertz.
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
M ⁺	Ion molecular.
Ls	Lactonas sesquiterpénicas.
MHz	Mega Hertz.
CH ₂	Metileno.
CH ₃	Metilo.
CH	Metino.
<i>m</i>	Multiplete.
NOESY	Nuclear Overhauser Effect.
Ω	Número de insaturaciones.
<i>v</i>	Número de onda.
ppm	Partes por millón.
pf	Punto de fusión.
m/z	Relación masa-carga.
rpm	Revoluciones por minuto.
<i>s</i>	Singulete.
ssp .	Subespecie.
TMS	Tetrametilsilano.
<i>t</i>	Triplete.

I. INTRODUCCIÓN.

La aplicación de procesos biotecnológicos es conocida por la humanidad desde hace miles de años¹. En 1992 fue establecida la definición en el marco de la convención sobre Diversidad Biológica, como “*cualquier aplicación tecnológica que usa sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados, para crear o modificar productos y procesos para usos específicos*”, esta definición fue ratificada más tarde por 168 países y aceptada por la FAO y la OMS. Los primeros relatos de estos procesos realizados por civilizaciones antiguas, se refieren a la fermentación de cereales y granos para la producción de bebidas alcohólicas por los sumerios y babilonios (6,000 años a. C.). En 1856, Luis Pasteur con la ayuda de un microscopio, probó que las fermentaciones las realizaban microorganismos y que cada proceso fermentativo es característico de un tipo particular de organismo. En 1897, Eduard Büchner, refirió que los extractos celulares aislados de las levaduras eran capaces de promover la fermentación alcohólica, concluyendo así que el agente responsable del proceso no era la maquinaria celular completa, sino una sustancia soluble llamada “*zimaza*”, iniciando en ese momento las biotransformaciones con extractos celulares.

Por lo anterior, una biotransformación se puede definir como, “*una conversión enzimática que sufre un producto de manera natural y que da como resultado un metabolito secundario o dicho de otra manera una nueva molécula con diferentes reactividades químicas*”. Las biotransformaciones son realizadas por enzimas, que son proteínas que catalizan la “*Química de la vida*” y por lo tanto contribuyen a la supervivencia y reproducción de los organismos vivos; además pueden catalizar procesos de síntesis controlados. La “*especificidad*” entre el sustrato y la enzima se ha concebido como la relación de una “*llave*” y su “*cerradura*”². La molécula del sustrato constituye la llave y la proteína constituye la cerradura; en la superficie de la proteína existe una zona específica, es decir, la estructura de plegamiento tridimensional de la macromolécula, denominada sitio activo o catalítico, que está determinado sobre todo por su secuencia de aminoácidos y por la estructura terciaria, a la cual se une la

¹ La palabra biotecnología fue usada inicialmente en 1919 por el ingeniero húngaro Karl Ereky.

² Emil Fischer (1894) sugirió que el reconocimiento de un sustrato implica una compatibilidad estructural única entre el sitio activo de la enzima y el sustrato, a la que se le denominó la hipótesis de llave-cerradura

molécula del sustrato para experimentar la transformación catalítica³. El estudio de las enzimas ha permitido comprobar que este mecanismo es una manera sencilla de ejemplificar los mecanismos de interacción enzima-sustratos; sin embargo, una enzima puede ser capaz de actuar en una gran variedad de reacciones de síntesis, por lo que se les han llamado *moléculas promiscuas* [1]. Dichos procesos se pueden llevar a cabo, ya sea utilizando extractos de enzimas aisladas y purificadas; o bien, con el uso de cultivos celulares, hasta sistemas biológicos completos [2]. Las biotransformaciones son un ejemplo impresionante de la capacidad de los microorganismos para alterar solo uno de muchos grupos funcionales con propiedades de reacción muy similares.

El desarrollo de la ingeniería bioquímica y su incursión en áreas como la síntesis orgánica permiten realizar transformaciones de sustratos *exógenos*; empleando sistemas biológicos, los cuales aprovechan su habilidad para asimilarlos y convertirlos, por lo que hoy en día la síntesis orgánica no únicamente cuenta con las transformaciones químicas para obtener derivados o productos de interés, sino que los sistemas biológicos proporcionan una herramienta sumamente valiosa para la transformación de una gran diversidad de sustratos, lo que representa ventajas con respecto a los métodos de obtención convencionales, con una gran proyección a nivel industrial [3-4], siendo estas sus características:

- Reacciones de *selectividad*: cada enzima realiza una reacción de modo que no hay reacciones laterales.
- Reacciones de *regio-especificidad*: la enzima conduce una única reacción de tal manera que lo realiza en un lugar determinado de la molécula
- Reacciones de *estéreo-selectividad*: las enzimas pueden distinguir entre los enantiómeros de un racemato, por la conversión exclusiva o de preferencia, de solo una de las dos formas enantioméricas.
- Condiciones de reacción suaves: las reacciones enzimáticas se realizan en un medio a pH y temperaturas adecuadas cerca de soluciones neutrales, por debajo de 40 ° C (excepto para la esterilización), además de requerir de poca energía,

³ Koshland, D., propuso la teoría del ajuste inducido, la cual considera que la estructura conformacional de una proteína es flexible; y se sugiere que la interacción inicial de unión del sustrato inicia pequeñas alteraciones en la conformación proteica produciendo la orientación óptima de los residuos del sitio activo para la máxima unión con el sustrato

por esta razón aún los compuestos más sensibles son convertidos sin sufrir daños [5].

- Uso de nutrientes naturales y soluciones buffers económicas.
- Se desarrolla en medio acuoso (excepto para la extracción del producto)
- Vía de síntesis corta.
- Producción reducida de residuos químicos y reciclaje de los disolventes de extracción [6].

Uno de los propósitos más importantes desde el punto de vista químico y biológico, de una biotransformación es:

- Hallar productos novedosos con propiedades biológicas modificadas o potencializadas, y con efectos colaterales disminuidos.

Por lo que estos mecanismos son de gran importancia en lo que ha sido denominado “*Química verde*”.

Generalmente, los procesos de biotransformación a los que son sometidos los productos aislados en el campo de los productos naturales tienen la finalidad de aumentar la polaridad de éstos, disminuir sus propiedades tóxicas y en ciertos casos potenciar su actividad farmacológica, si es de ellos conocida [7-10].

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se realizó la biotransformación de tres lactonas sesquiterpénicas aislada de *Artemisia ludoviciana* ssp *mexicana* —arglanina, ridentina y ludovicina A— con hongos filamentosos.

II. MARCO TEÓRICO.

2.1) Generalidades del género *Artemisia*.

La familia *Asteráceae* y especialmente el género *Artemisia*, se caracteriza por biosintetizar productos naturales con diversas estructuras químicas, donde sobresalen las lactonas sesquiterpénicas (Ls) en importantes cantidades y con distintos arreglos estructurales, por lo que dicho género se puede considerar como una fuente potencial de dichas sustancias, las cuales representan al menos el 5 por ciento del peso seco de estas plantas [10], muchas veces consideradas marcadores taxonómicos del género [11]. En México, se han descrito 16 especies de Artemisias [12-13], dentro de las cuales destaca *Artemisia ludoviciana* ssp *mexicana* —estafiate— especie vegetal muy apreciada en la medicina tradicional mexicana, para el tratamiento de padecimientos relacionados con el aparato digestivo, su actividad antimalárica, anticitotóxica, actividad antiinflamatoria, actividad bactericida y antifúngica [14-19].

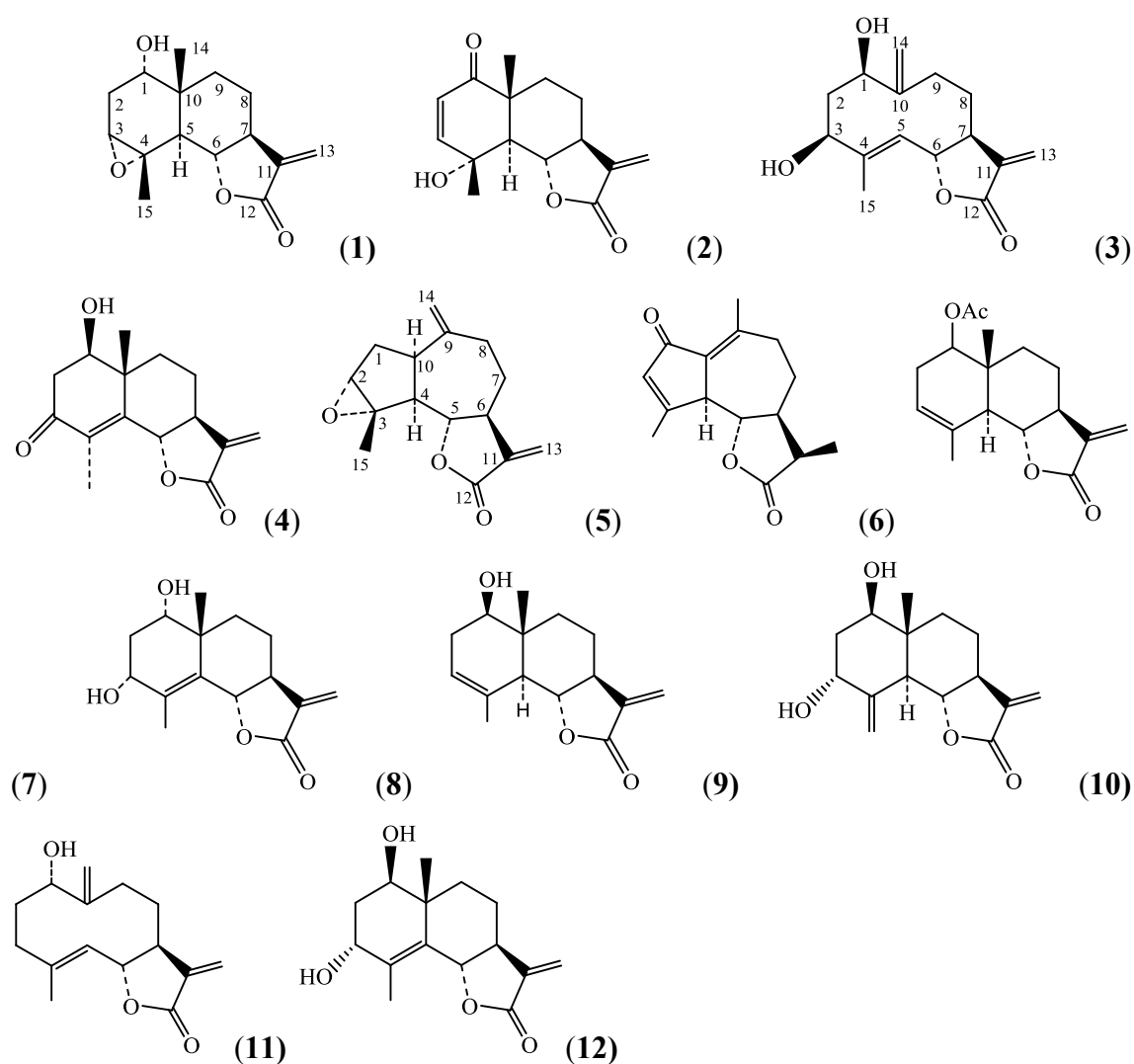
2.2) Generalidades de las Lactonas sesquiterpénicas (Ls).

Son una gran variedad de compuestos naturales que se encuentran en más de 100 familias de plantas con flores. Son compuestos orgánicos que poseen 15 átomos de carbonos (prefijo *sesqui*), las cuales se derivan del farnesilpirofosfato, se encuentran agrupadas en cuatro grandes familias: 1) germacranólidas (10 carbonos), 2) eudesmanólidas (6/6), 3) guayanólidas (5/7), 4) pseudoguayanólidas (5/7); el sufijo “*ona*”, indica la presencia de un grupo funcional cetona [16]. Todas las Ls tienen en común un grupo α -metil- γ -lactona, que es muy reactivo con los mercaptanos, actúan con el grupo tiol y es una de las moléculas que las identifica [17-19]. Por otro lado, se han determinado sus actividades: antibactericida, antiviral, antiinflamatoria y antitumoral [18-20]. Pueden ser responsables de alergias de piel en el ser humano y también actuar como frenadores de la alimentación de insectos [21].

Las lactonas sesquiterpénicas son interesantes por el hecho de que constituyen una de las áreas más activas de la investigación en fitoquímica [15, 18-20, 22-25].

2.3) Lactonas sesquiterpénicas aisladas del género *Artemisia*.

De un análisis químico comparativo realizado a dos poblaciones de *A. ludoviciana ssp mexicana*, fueron aisladas: ludovicina A (1), arglanina (2), ridentina (3), armexifolina (4), estafiatina (5), achillina (6), acetato de douglanina (7), 1 α , 3 α -dihidroxi-arbusculina (8), santamarina (9), 3 α -dihidroxi-reynosina (10), artemorina (11), armetafolina (12), todas ellas han sido previamente descritas en esta especie vegetal [23-24]. En el cuadro 1 se muestran sus estructuras:



Cuadro 1. Fórmulas químicas de las lactonas sesquiterpénicas aisladas de la especie *Artemisia ludoviciana ssp mexicana*.

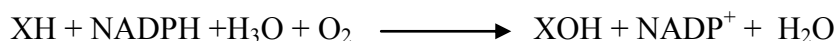
2.4) Generalidades de las biotransformaciones.

La incorporación de las biotransformaciones 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. De esta manera son consideradas actualmente como una herramienta de uso frecuente, económica y ecológicamente competitivas por los químicos orgánicos sintéticos.

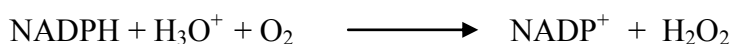
Desde el punto de vista de los procesos semisintéticos de productos naturales, la introducción de un grupo hidroxilo es muy útil, ya que es un grupo funcional muy versátil que abre una serie de posibilidades de reacción en el carbono sobre el que está situado y sobre la zona vecina de la molécula. En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

El sistema citocromo P-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 componentes xenobióticos inertes sufren diversos tipos de reacciones que pueden resumirse, mediante la siguiente ecuación química.



- b) Actividad de oxidasa. En ella ocurre la transferencia de electrones de un P-450 reducido al oxígeno molecular, acompañado de la formación de radicales aniónicos superóxido (O_2^{\ominus}) y de peróxido de hidrógeno. La reacción general es:



- c) Actividad de reductasa. Ocurre en condiciones anaerobias y en ellas se da la transferencia de electrones a sustrato para producir radicales libres

2.4.1) Biotransformación con células enteras.

La aplicación de enzimas como “reactivos” es una de las áreas de mayor crecimiento en el ancestral campo de la química orgánica. Los microorganismos frecuentemente contienen enzimas solubles dentro del citosol y enzimas particulares unidas a la membrana. Las enzimas de biotransformación pueden estar presentes dentro o fuera de las células que las producen. Si las enzimas no son constitutivas, su formación en microorganismos puede ser algunas veces inducidas por sustrato de interés o por compuestos relacionados. Las enzimas inducidas pueden catalizar una variedad de reacciones sobre los sustratos [26-28]. El éxito de las biotransformaciones microbianas ha estado basado en los ensayos de factibilidad de enzimas microbianas para catalizar nuevas reacciones o en los ensayos con enzimas conocidas para realizar una actividad desconocida con sustratos sintéticos.

En su función natural las enzimas catalizan y controlan reacciones anabólicas y catabólicas necesarias para procesos de ensamblaje, polimerización, biosíntesis y energéticos. Las enzimas anabólicas involucradas en rutas biosintéticas requieren usualmente sustratos específicos, mientras muchas enzimas catabólicas involucradas en digestión, defensa y roles similares de degradación en organismos vivos parecen haber desarrollado rangos más amplios de especificidad [29-30].

Hongos: Importancia en la biotransformación. Los hongos son bien conocidos por su capacidad para producir metabolitos secundarios a través de la biotransformación. Aunque los hongos son predominantemente quimioheterótrofos existe una evidencia limitada que sugiere que exhiben un metabolismo más diverso de lo que es normalmente conocido. Por ejemplo, muchas especies filamentosas pueden oxidar formas reducidas de nitrógeno (nitrificar), oxidar azufre, hierro y manganeso, y pueden incluso participar, en un grado limitado, en el proceso de desnitrificación.

La baja solubilidad en agua, una alta volatilidad y citotoxicidad de las Ls, hace difícil su producción, por otro lado el aislar un único compuesto puro aumenta la dificultad de este proceso. En años recientes la biotransformación con hongos es una tecnología que se está usando con este fin.

2.5.) Generalidades de los Hongos filamentosos.

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 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.

2.5.1) Ciclo de vida de los Hongos.

El ciclo de vida de un hongo incluye todos los estadios diferenciados 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 esporas⁴ especializadas, bajo condiciones adecuadas. Las

⁴ 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.

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.

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 actividad 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.

2.5.2) 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 [31].

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*.

2.5.3) 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.

2.5.4) 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.

2.5.5) 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 microorganismo⁵ 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 pueden ser líquidos o sólidos (agar). Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos⁶.

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

⁵ 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.

⁶ a) Recuento directo, b) turbidez del cultivo, c) Recuento de viables, d) medidas de parámetros bioquímicos y e) medida de la actividad metabólica.

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.

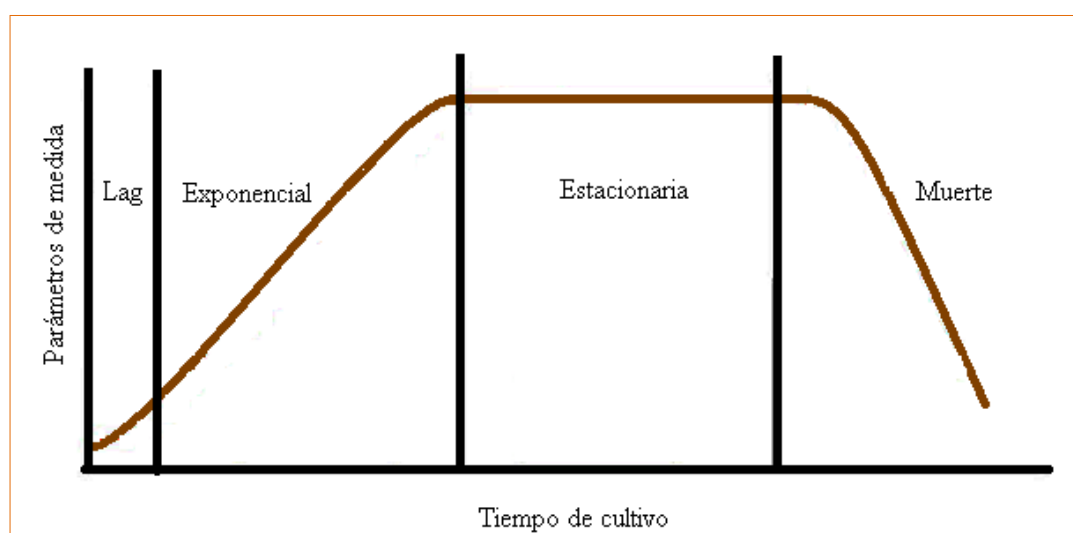
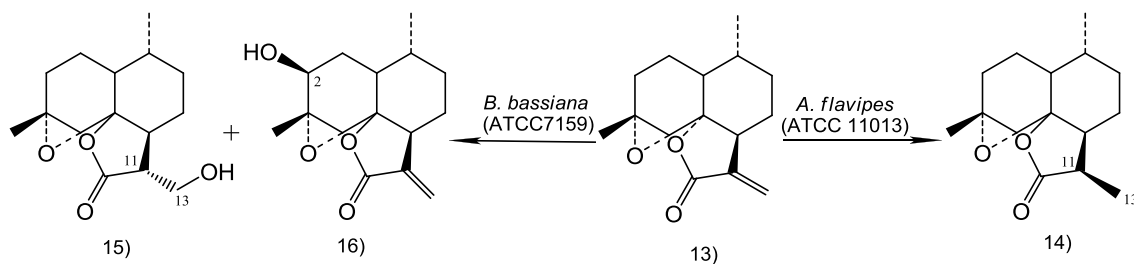


Figura1: Fases del crecimiento microbiano.

2.6) Biotransformación de lactonas sesquiterpénicas.

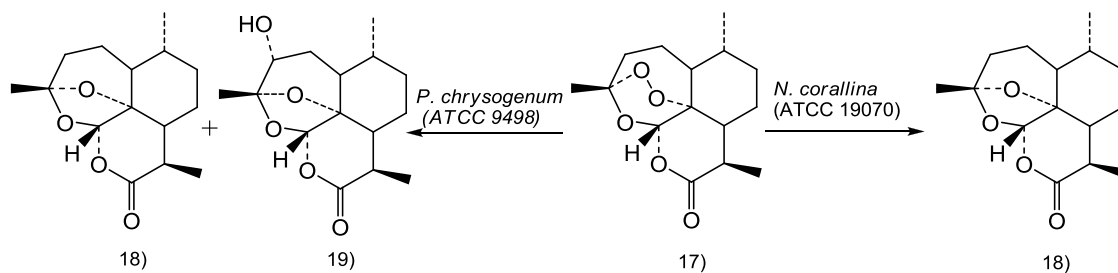
Estos son algunos ejemplos de biotransformación promovidas por hongos a los que han sido expuestas algunas lactonas sesquiterpénicas; *Aspergillus flavipes* (ATCC 11013) biotransformó a la arteannuina B (**13**) a la dehidroarteannuina B (**14**), como producto principal de la bioconversión, ver esquema 1; mientras que con *Beauveria bassiana* (ATCC 7159), se aislaron los productos 13-hidroxi-11-epi-dihidroarteannuina (**15**) y 3 β -hidroxiarteannuina B (**16**), ver esquema 1 [32].



Elmarakby, S. A., El-Feray, F., S., Elsohly, H., N., Croom, E., M., Hufford, C., D., *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 903-909.

Esquema 1. Biotransformación de la artemunina B (**13**) con *A. flavipes* (ATCC 11013) y con *B. bassiana* (ATCC 7159).

La artemisinina (**17**), potente antimalárico y constituyente principal de *Artemisia annua* L. (Compositae), fue biotransformada por *Nocardia corallina* (ATCC 19070), la cual redujo la función *endo*-peróxido para dar deoxiartemisinina (**18**), mientras que de la acción de *Penicillium chrysogenum* (ATCC 9498) se obtuvieron deoxiartemisinina (**18**) y 3 α -hidroxideoxiartemisinina (**19**), donde se observa la reducción de la función *endo*-peróxido y la hidroxilación α en C-3, la 3 α -hidroxideoxiartemisinina (**19**), había sido caracterizado como el producto del rearrreglo térmico de (**17**) [33].

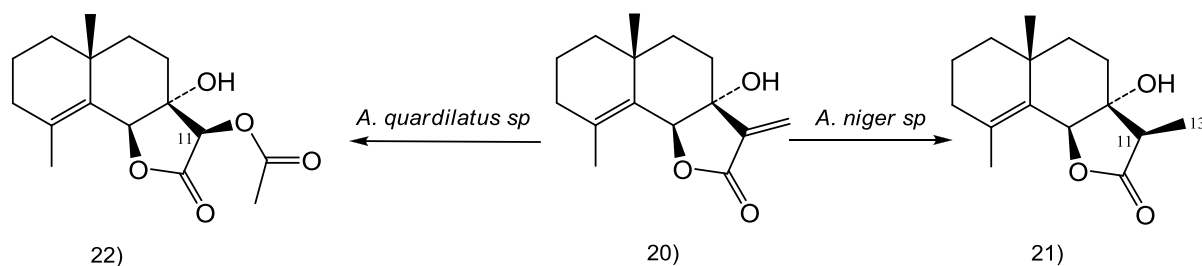


Lee, I-S, ElSohly, H. N., Croom, E., Hufford, C., *J. Nat. Prod.* **1989**; *52*, 337-341.

Esquema 2. Biotransformación de artemisinina (**17**) con *N. corallina* (ATCC 19070) y *P. chrysogenum* (ATCC 9498).

De la transformación biológica de 7 α -hidroxifrullanólida⁷(**20**) —*Sphaeranthus indicus*—por *A. niger* y *A. guardilatus*, se encontraron los productos de hidrogenación del $\Delta^{11,13}$ y acetilación en C-13, para dar 7 α -hidroxi-11,13-dihidrofrullanólida (**21**) y 13-acetil-7 α -hidroxifrullanólida (**22**) respectivamente [34].

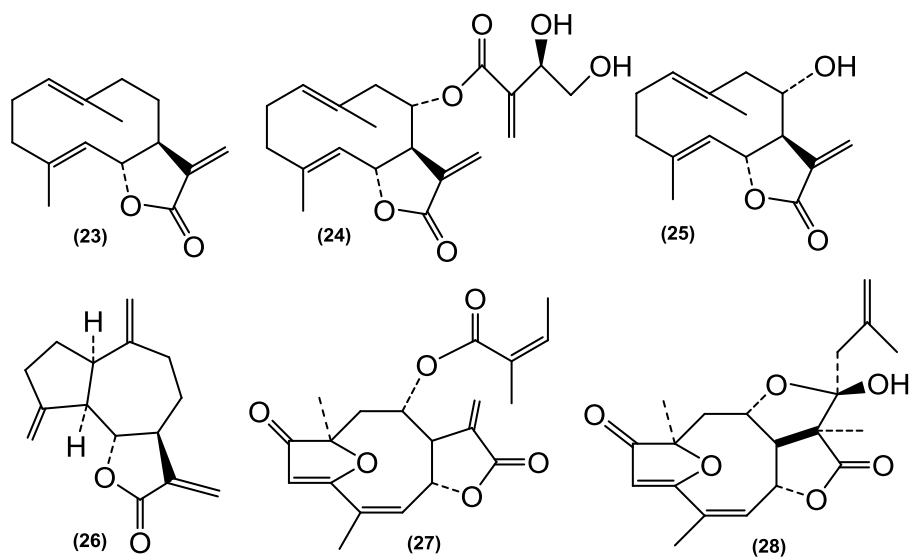
⁷ 7 α -hidroxifrullanólida, aislada de *Sphaeranthus indicus*, presenta una alta actividad citotóxica y antitumoral [34].



Arman, A-U., Choudhary, M: L., Ata, A., Alam, A. F., Perveen, S., Shekhani, M: S., *J. Nat. Prod.* **1994**; 57, 1251-1255.

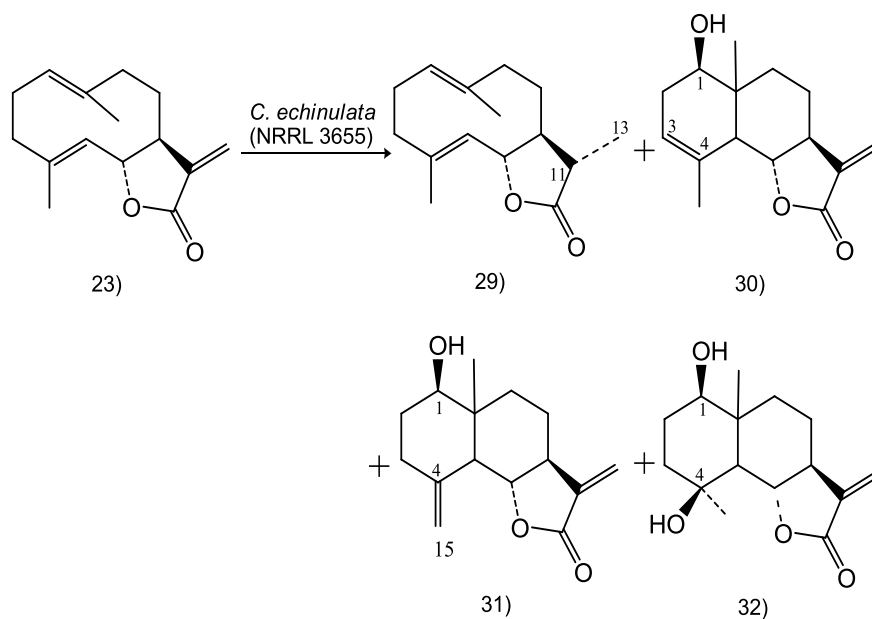
Esquema 3. Biotransformación de la 7 α -hidroxifrullanólida (**20**) con *A. niger sp.* y *A. quardilatus sp.*

La incubación de *C. echinulata* y *R. oryzae* con las lactonas (+)-costunólida (**23**), (+)-cnicina (**24**), (+)-salonitenólida (**25**), (-)-dehidrocostuslactona (**26**), (-)-lichnofólida (**27**) y (-)-eremantólida (**28**), tenía como objetivo la síntesis enantioespecíficas de lactonas naturales con actividad biológica [34]. La incubación de (**23**) con *C. echinulata* (NRRL 3655), produjo los productos (**29**) (+)-11 β ,13-dehidrocostunolida, (**30**) (+)-santamarina, (**31**) (+)-reynosina y (**32**) (+)-1 β -hidroxiarbusculina A, los cuales muestran ser dihidrogenados, y epoxidados. La acción sobre (**24**) fue hidrolizar la cadena, mientras que a (**26**) la transformó en (+)-11 α ,13-dihidrodehidrocostuslactona (**33**). *R. oryzae* bioconvirtió (**26**), por medio de la dihidrogenación $\Delta^{11(13)}$ y epoxidación $\Delta^{10(14)}$ a (+)-11 β ,13-dihidrodehidrocostuslactona (**34**) y (+)-11 β ,13-dihidro-10,14-epoxidehidrocostuslactona (**35**). Asimismo, *C. echinulata* y *R. oryzae* transformaron (**27**) en (-)-16-(1-metil-1-propenil) eremantolanólida (**36**). Por otro lado, (+)-salonitenólida (**25**) y (-)-eremantólida (**28**) no fueron biotransformados por ningún hongo [35].



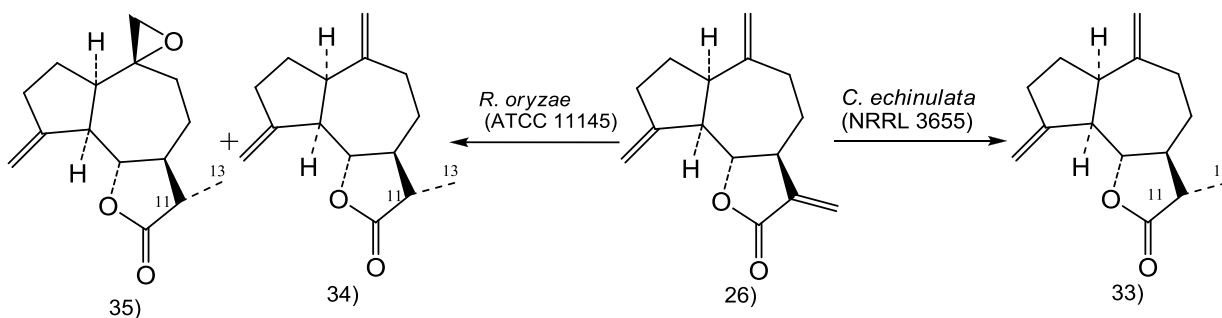
Barrero, A. F., Oltra, J. E., Raslan, D. S., Saúde, D. A., J. Nat. Prod **1999**, 62, 726-729.

Esquema 4. Estructuras químicas de las lactonas sesquiterpénicas **23-28**, biotransformadas con *C. echinulata* y *R. oryzae*.



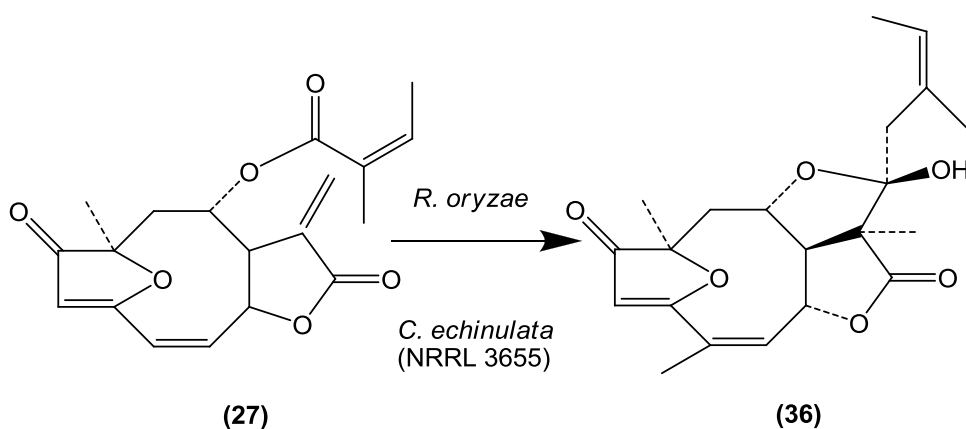
Barrero, A. F., Oltra, J. E., Raslan, D. S., Saúde, D. A., J. Nat. Prod **1999**, 62, 726-729.

Esquema 5. Biotransformación de la (+)-costunólida (**23**) con *C. echinulata* (NRRL 3655).



Barrero, A. F., Oltra, J. E., Raslan, D. S., Saúde, D. A., J. Nat. Prod **1999**, 62, 726-729.

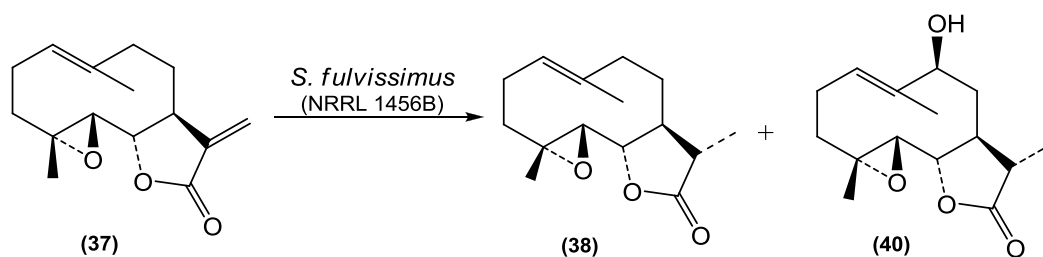
Esquema 6. Biotransformación de la (-)-dehidrocostuslactona (**26**) con *C. echinulata* (NRRL 3655) y con *R. oryzae* (ATCC 11145).



Barrero, A. F., Oltra, J. E., Raslan, D. S., Saúde, D. A., J. Nat. Prod **1999**, 62, 726-729.

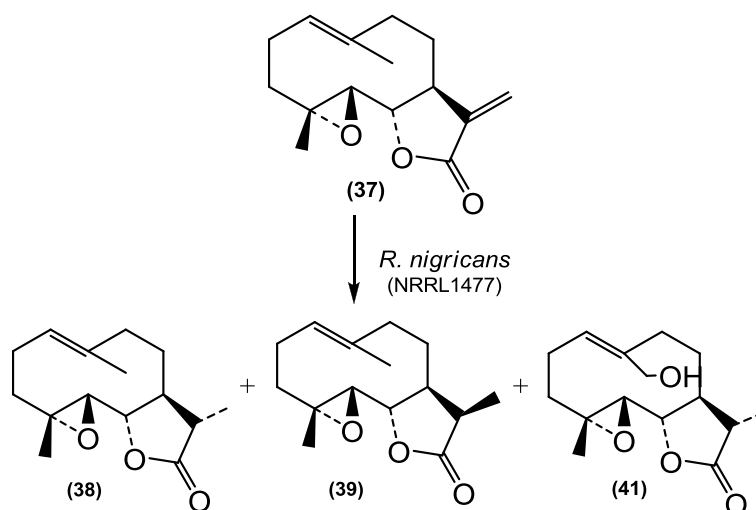
Esquema 7. Biotransformación de (-)-lichnofólida (**27**) con *C. echinulata* (NRRL 3655) y con *R. oryzae* (ATCC 11145).

La partenólida (**37**) —constituyente mayoritario de *Tanacetum parthenium*, “feverfew”— fue biotransformada por *S. fulvissimus* (NRRL 1453B) para dar 11 β H-dihidropartenólida **38** y 9-hidroxi-11 β H-dihidropartenólida **40**, mientras que con *R. nigricans* (NRRL 1477) dio los productos 11 β H-dihidropartenólida **38**, 9 β H-hidroxi-11 β H-dihidropartenólida **39** y 14-hidroxi-11 β H-dihidropartenólida **41**; por otro lado, con *R. rubra* (NRRL 1592) se obtuvieron **38** y **39**, siendo 11 β H-dihidropartenólida (**38**), un producto de bioconversión de **37** para los tres hongos empleados [36].



Galal, A. M., Ibrahim, A-R, Mossa, J., El-Feraly, F. S., *Phytochemistry* **1999**, *51*, 761-765

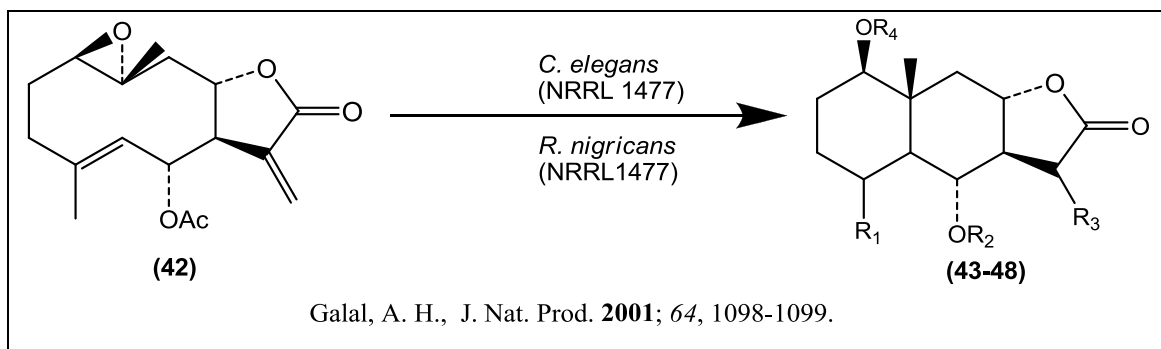
Esquema 8. Biotransformación de la partenólida (37) con *Streptomyces fulvissimus* (NRRL 1453B).



Galal, A. M., Ibrahim, A-R, Mossa, J., El-Feraly, F. S., *Phytochemistry* **1999**, *51*, 761-765

Esquema 9. Biotransformación de la partenólida (37) con *R. nigricans* (NRRL 1477).

Piretrosina (42) aislada de *Crysanthemum cinerariaefolium*, ha demostrado poseer actividad citotóxica, antibacteriana, antifúngica y fitotóxica. *C. elegans* (NRRL 1392) y *Rhizopus nigricans* (NRRL 1477). De la biotransformación cuantitativa de 42 con *R. nigricans*, se obtuvieron cinco compuestos (43-47), 46 resultó ser un nuevo producto con esqueleto de eudesmanólida, mientras 43 fue aislado de las flores *C. cinerariaefolium*, 47 fue aislada de *Cassinia loevis*, 44, 45 y 47 fueron obtenidos previamente a partir de 42 usando trifluoroborato de éter dietílico $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ y ácido p-toluensulfónico [37].



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Otros
43	$\Delta^{4,15}$	Ac	α -CH ₃	H	---
44	CH ₃	H	α -CH ₃	H	$\Delta^{3,4}$
45	$\Delta^{4,15}$	H	α -CH ₃	H	---
46	α -OH, β -CH ₃	Ac	α -CH ₃	H	---
47	α -OH, β -CH ₃	Ac	$\Delta^{11,13}$	H	---
48	α -OH, β -CH ₃	Ac	α -CH ₃	Ac	---

Esquema 10. Biotransformación de la Piretosina (**42**) con *R. nigricans* (NRRL 1477).

III. JUSTIFICACIÓN.

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 amplia evaluación con varios hongos, medios de cultivo, modificaciones en la estructura del sustrato entre otros.

Por otro lado, México cuenta con una gran biodiversidad (cuarto lugar a nivel mundial con 26,000 especies de plantas) además se estima que más del veinticinco por ciento del total de las especies de plantas superiores que hay en nuestro país posee algún uso, lo cual constituye un universo vegetal de un potencial incalculable. Esto conlleva a tener de manera implícita una gran diversidad de estructuras moleculares, las cuales pueden ser objeto de *bio-* o *quimio-* transformaciones que generen sustancias químicamente novedosas, las cuales pueden poseer bioactividad.

Dentro de las plantas medicinales mexicanas, empleadas con mayor frecuencia para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el aparato digestivo, se encuentra *A. ludoviciana* ssp mexicana (estafiate). Cabe destacar que dicha especie vegetal es fuente de lactonas sesquiterpénicas, de donde se han aislado: ludovicina A (**1**), arglanina (**2**), y ridentina (**3**) por encontrarse en mayor proporción. El interés de realizar la biotransformación de dichas lactonas sesquiterpénicas, estriba, en su actividad citotóxica, lo cual requiere que dichas sustancias sean más solubles en agua. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se realizó la biotransformación de dichas lactonas con diferentes hongos filamentosos para determinar su actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino.⁸

⁸ La determinación de la actividad citotóxica se realiza en el laboratorio de Biología Molecular, a cargo del Dr Luis Sánchez Sánchez.

IV. OBJETIVOS.

4.1) Objetivo General.

Realizar el aislamiento, identificación y biotransformación por medio de hongos filamentosos, de tres lactonas sesquiterpénicas — ludovicina A (1), arglanina (2) y ridentina (3) — del extracto CH₂Cl₂ de *Artemisia ludoviciana ssp mexicana*.

4.2) Objetivos Particulares.

4.2.1) Realizar la búsqueda bibliográfica sobre la biotransformación de lactonas sesquiterpénicas con hongos filamentosos.

4.2.2) Preparación de los extractos crudos de dos poblaciones de *Artemisia mexicana* —estafiate— con disolventes de polaridad creciente. [n-hexano, AcOEt y MeOH].

4.2.3) Aislamiento, purificación e identificación de la ludovicina A (1), arglanina (2) y ridentina (3).

4.2.4) Factibilidad de biotransformación de las tres lactonas sesquiterpénicas con 8 hongos filamentosos

4.2.5) Biotransformación cuantitativa con base en los resultados de factibilidad de las lactonas antes mencionadas.

4.2.6) Purificación de los productos obtenidos de la biotransformación cuantitativa.

4.2.7) Caracterización e identificación de los productos de biotransformación obtenidos, mediante sus propiedades físicas, ópticas, espectroscópicas —IR, RMN-¹H y ¹³C— y espectrométricas —EM(IE), FAB⁺—.

4.2.8) Transformaciones químicas que ayuden a la confirmación de la estructura propuesta en el punto 4.2.7.

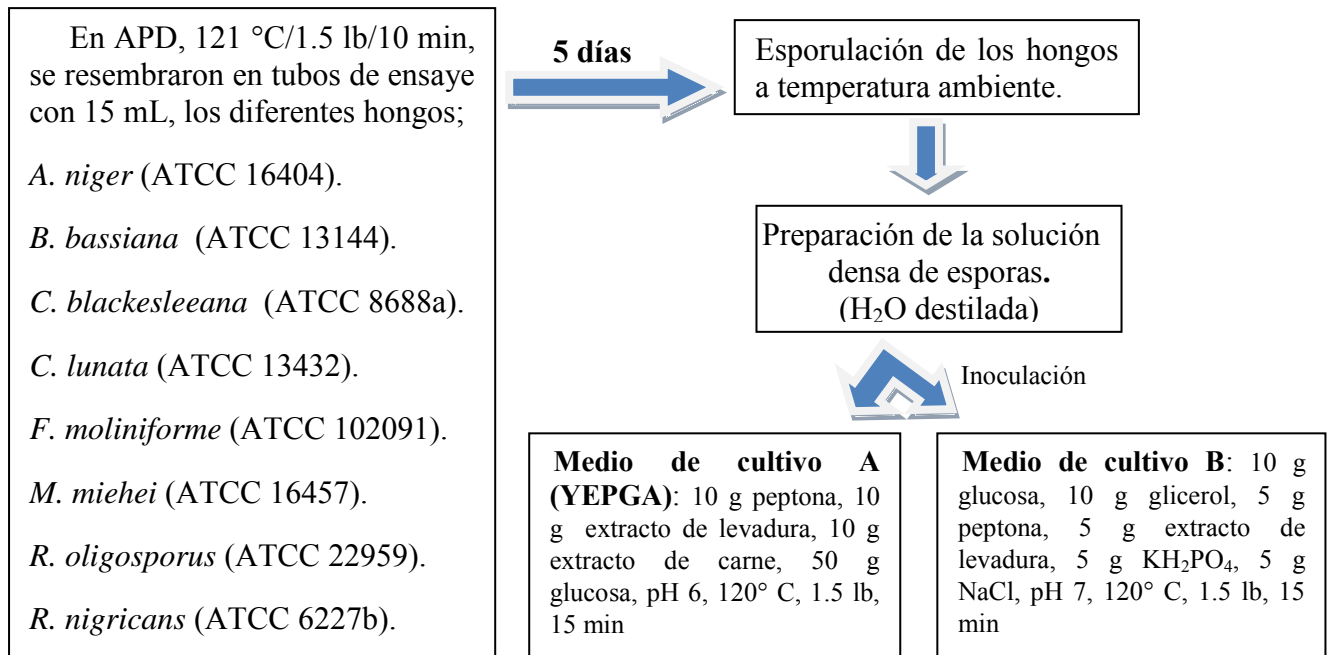
V. HIPÓTESIS.

La biotransformación de productos naturales constituye un área de gran interés farmacéutico, dado que es posible potenciar su actividad biológica a través de reacciones biocatalíticas altamente *regio-*, *quimio-* y *enantio-*selectivas. Además, las biotransformaciones son consideradas actualmente una metodología de rutina ecológica y económicamente competitivas por los químicos sintéticos, debido a las posibilidades y ventajas que ofrecen en la obtención e investigación de compuestos químicos con diferentes aplicaciones.

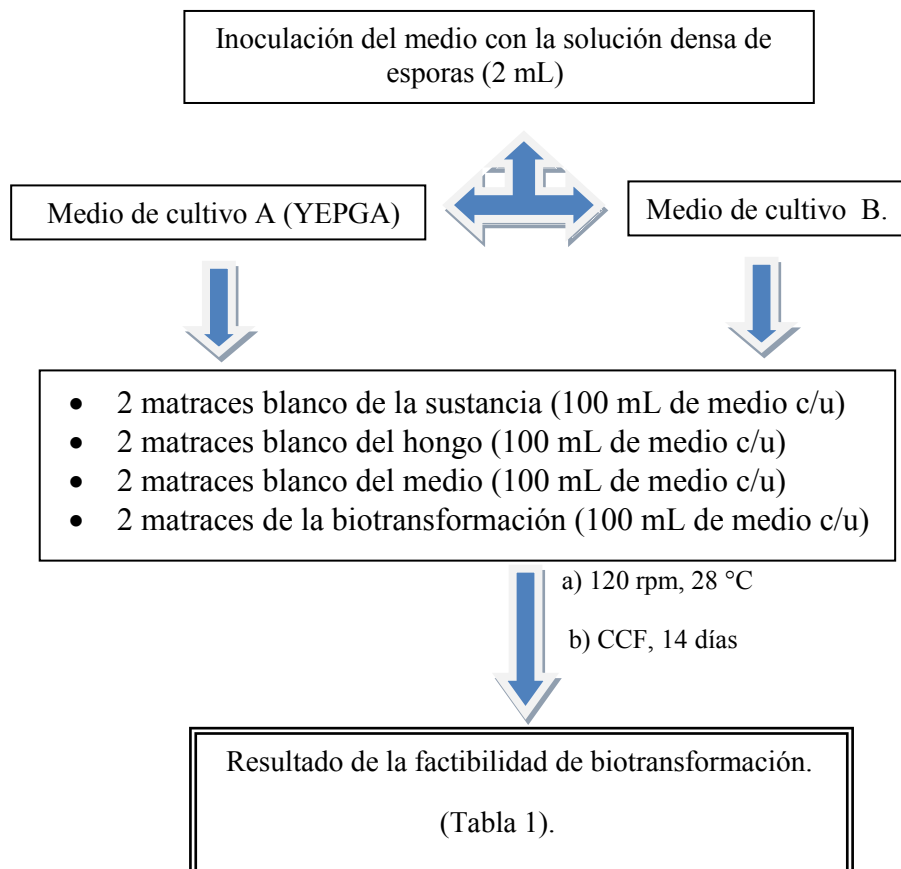
Entonces, es posible realizar la biotransformación de la ludovicina A (**1**), arglanina (**2**) y ridentina (**3**), lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Artemisia ludoviciana* ssp mexicana, con la finalidad de poder determinar la acción química —modificación química— que puede resultar de una reacción de epoxidación, oxidación, reducción, entre otras; por parte de los diferentes hongos filamentosos —Complejo Enzimático Citocromo P450— sobre dichos tipos de sustratos (**1-3**). Para obtener sustancias químicamente novedosas de mayor solubilidad en agua, para su mejor evaluación biológica

VI. PARTE EXPERIMENTAL.

6.1) Metodología.



A) Factibilidad de la biotransformación.

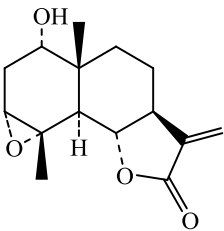


6.1.2) Estudio químico de la *Artemisia ludoviciana ssp mexicana* (Willd) Keck colectada en San Pedro Actopan, Milpa Alta, México D. F.

A partir del extracto CH₂Cl₂ (229 g) de las partes aéreas (hojas y tallo) de *Artemisia ludoviciana ssp mexicana* [MEXU 481869], se aislaron, purificaron e identificaron 13 productos naturales —11 lactonas sesquiterpénicas y dos flavonoides— por medio del empleo de diversas técnicas cromatográficas —CCV, CC, CCP, CCF— y la técnica de recristalización por par de disolventes. La identificación de dichas sustancias se logró con base en sus datos espectroscópicos de RMN-¹H y por la determinación de su punto de fusión. En el esquema 11, se describe la separación cromatográfica diferenciada de dicho extracto, de donde se obtuvieron las siguientes sustancias: ludovicina A (**1**, 42 mg, 0.018%⁹), arglanina (**2**, 52 mg 0.023%), ridentina (**3**, 310 mg) estafiatina (**5**, 25.7mg), achillina (**6**, 52.5mg), acetato de douglanina (**7**, 7mg), 1 α ,3 α -dihidroxiarbusculina (**8**, 42mg), santamarina (**9**, 112 mg), 3 α -hidroxireynosina (**10**, 32 mg), artemorina (**11**, 52 mg), armefolina (**12**, 310 mg), y los flavonoides: eupatilina y jaceosidina.

A continuación se enuncian los puntos de fusión y sus constantes espectroscópicas de RMN-¹H, para las sustancias de la **1** a la **3** y de la **5** a la **12**.

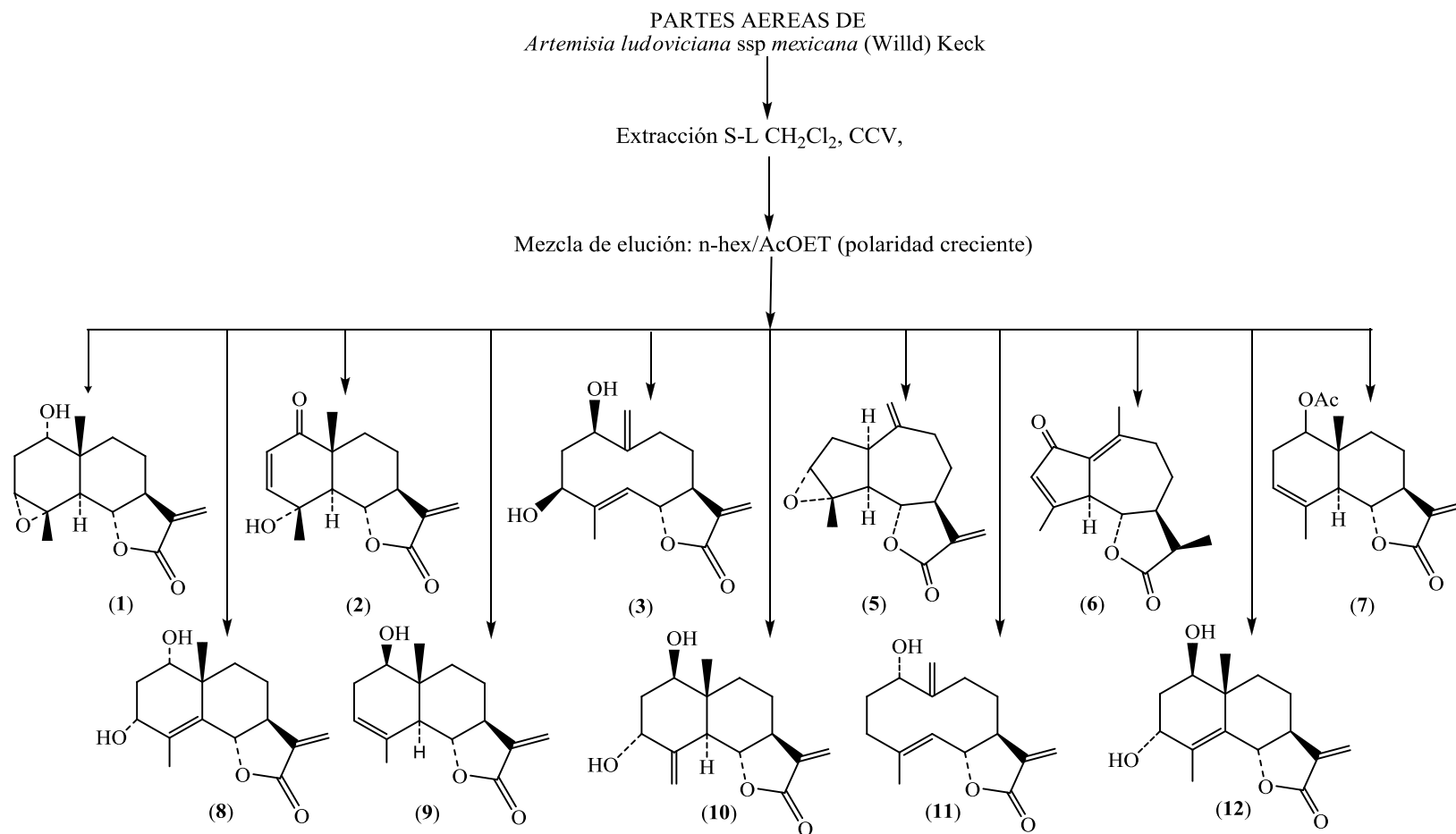
Ludovicina A (1): pf.: 189 -192 °C

	<p>RMN-¹H (CDCl₃): δ3.21 (<i>t</i>, $W_{1/2}$= 4 Hz, 1H, H-1), 3.04 (<i>s</i>, $W_{1/2}$= 4 Hz, 1H, H-3), 2.45 (<i>d</i>, J= 12 Hz, 1H, H-5), 3.86 (<i>dd</i>, J= 12 Hz, 1H, H-6), 5.38 (<i>d</i>, J= 3 Hz, 1H, H-13a), 6.07 (<i>d</i>, J= 3 Hz, 1H, H-13b), 0.87 (<i>s</i>, 3H, CH₃-14), 1.50 (<i>s</i>, 3H, CH₃-15).</p>
---	---

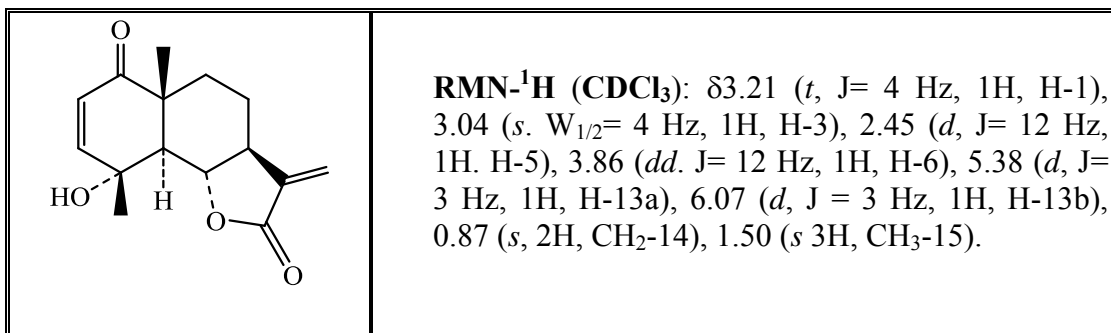
⁹ Rendimiento obtenido a partir del total de extracto crudo

Esquema 11: Separación Cromatográfica del extracto CH₂Cl₂ de la *Artemisia ludoviciana ssp mexicana* (Willd) Keck, colectada en

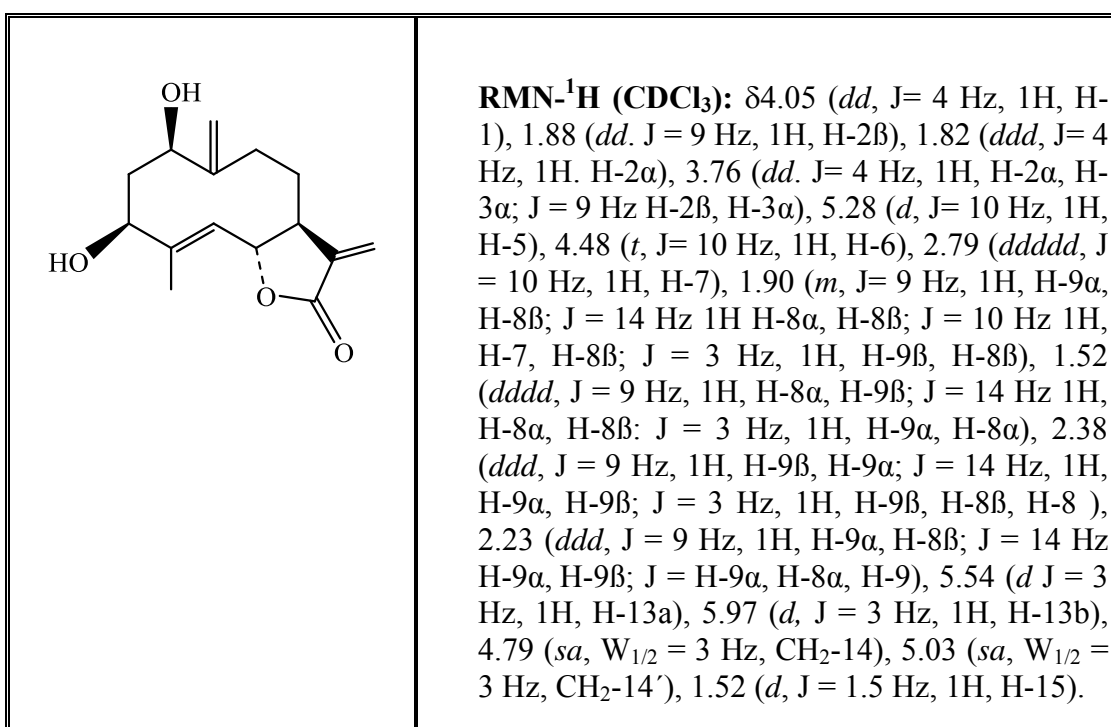
San Pedro Actopan, Milpa Alta, México D. F.



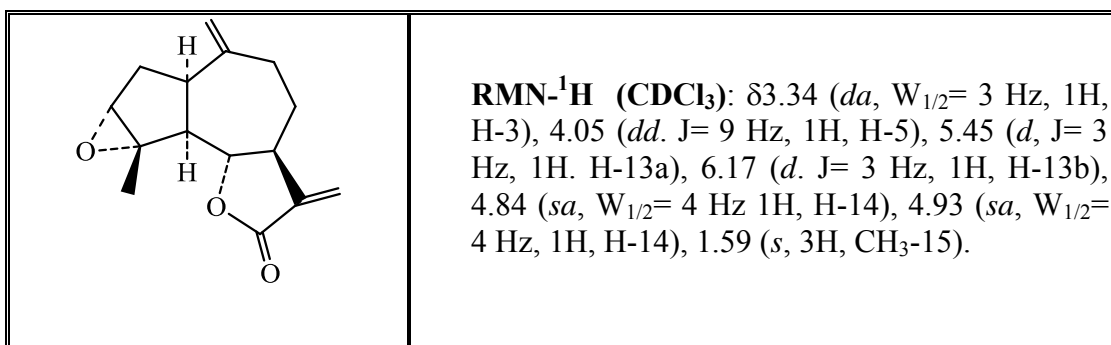
Arglanina (2): pf.: 191-193 °C



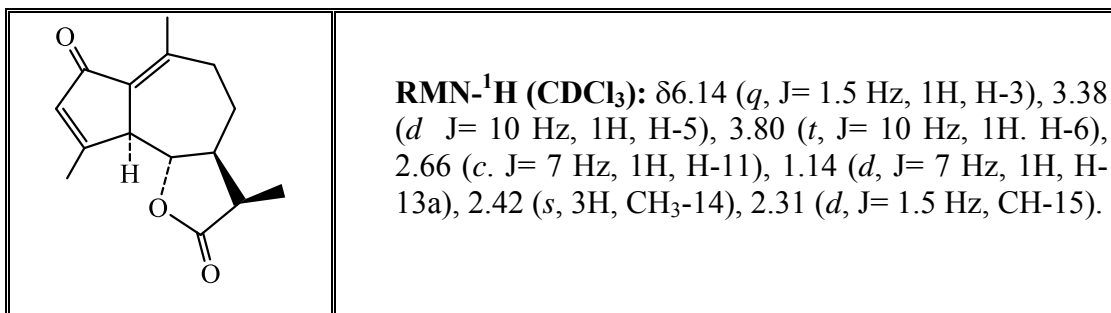
Ridentina (3): pf.: 202-203 °C.



Estafiatina (5): pf.: 84-86 °C

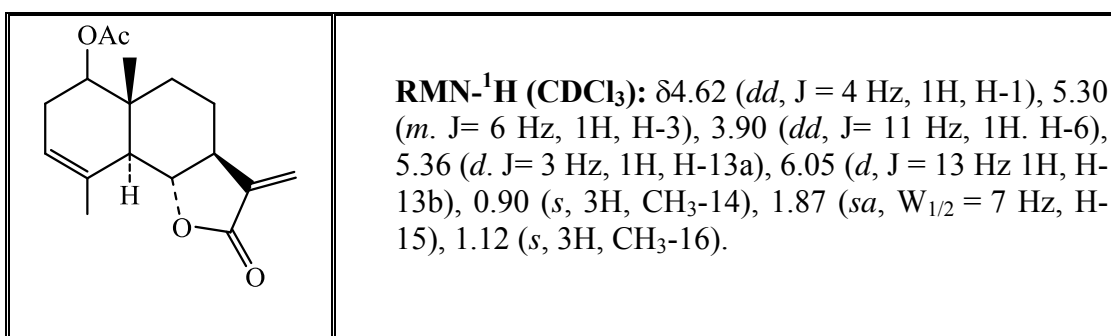


Achillina (6): pf.: 142-145 °C

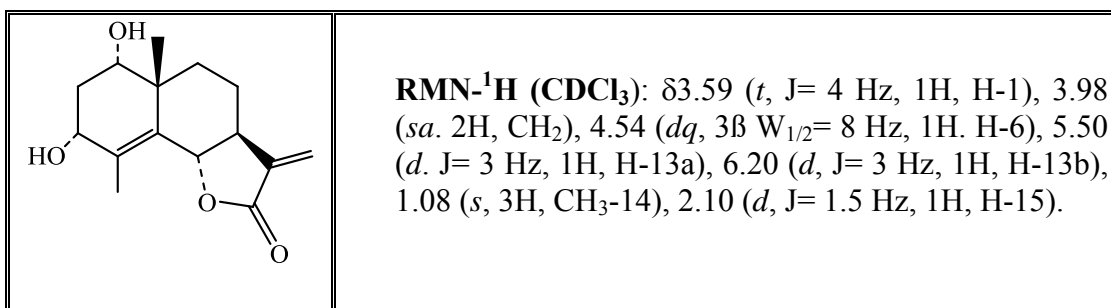


Acetato de douglanina. (7):

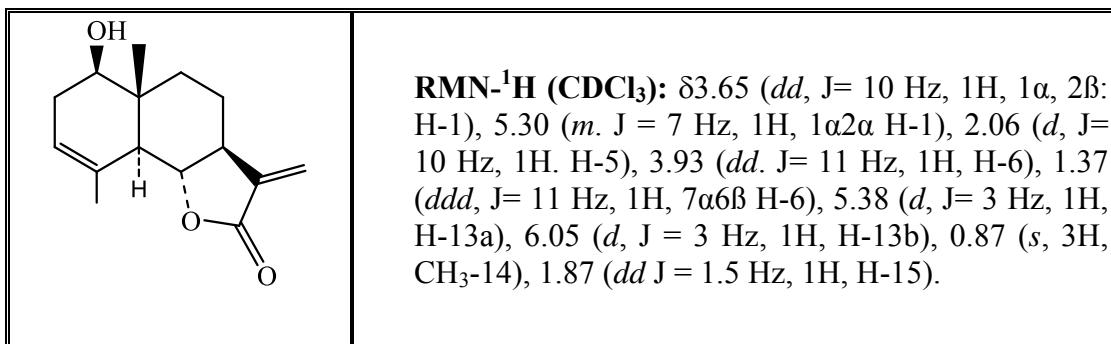
De los eluatos obtenidos con n-hexano:AcOEt (85:15), se aislaron 2.35 g de un aceite sabor amargo, que en su CCF en varios sistemas de elución mostraba evidencia de una mezcla de sustancias difícil de separar. Procediéndose a la formación del derivado acetilado (Ac₂O/Py), de la cual se obtuvo una sustancia que presenta un pf: 144 °C.



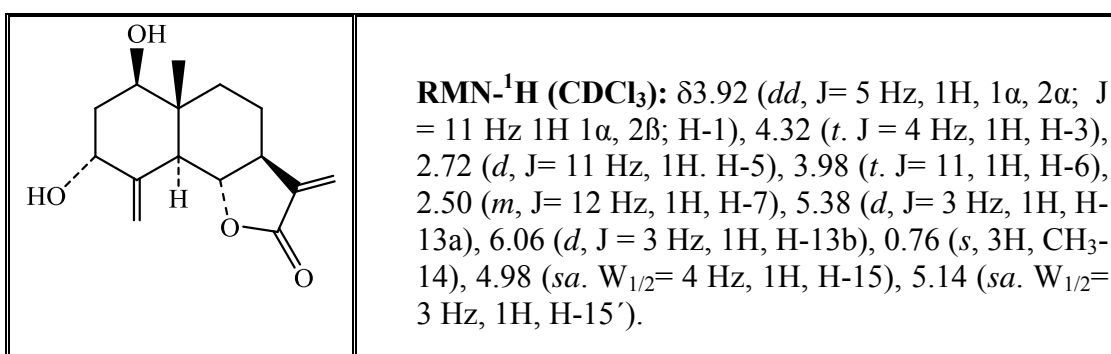
1α, 3α-dihidroxi-arbusculina (8): pf. : 142-145 °C



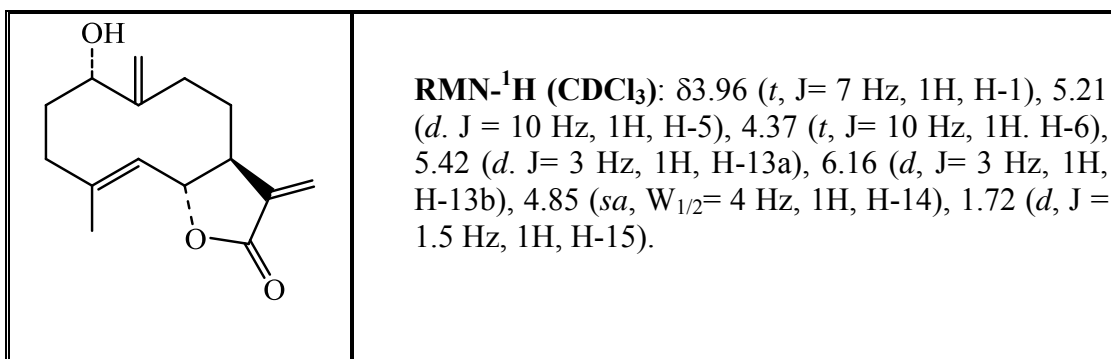
Santamarina (9): pf.: 139-141 °C



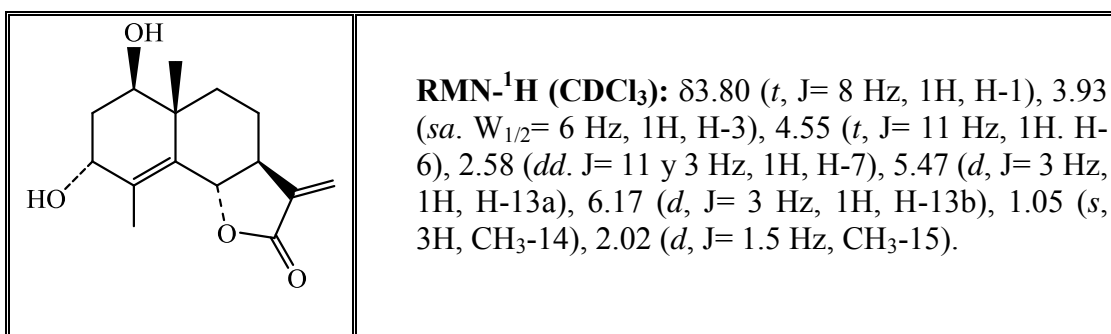
3α-hidroxi-reynosina (10): pf.: 242 °C



Artemorina (11): pf.: 126 °C



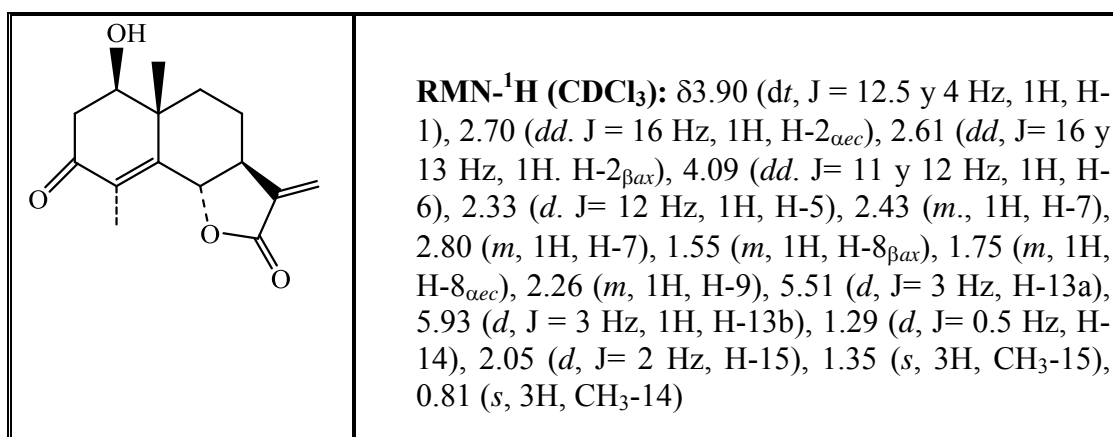
Armefolina (12): pf. : 188 °C



6.1.3) Estudio químico de la *Artemisia ludoviciana ssp mexicana* (Willd) Keck colectada en San Rafael Tlalmanalco, Estado de México.

Del extracto con CH_2Cl_2 (346g) de las partes aéreas (hojas y tallo) del estafiate recolectado en San Rafael Tlalmanalco, Edo. De México, se obtuvieron las siguientes lactonas sesquiterpénicas: ludovicina A (**1**, 114.7mg), arglanina (**2**, 853.4mg), armefolina (**12**, 10.3mg), armexifolina (**4**, 8.6mg) y los flavonoides eupatilina y jaceosidina, estas últimas fueron identificadas con una muestra simple. En el esquema 12, se describe el aislamiento y separación de las sustancias ya mencionadas.

Armexifolina (**4**) **pf.: 206-208 °C**

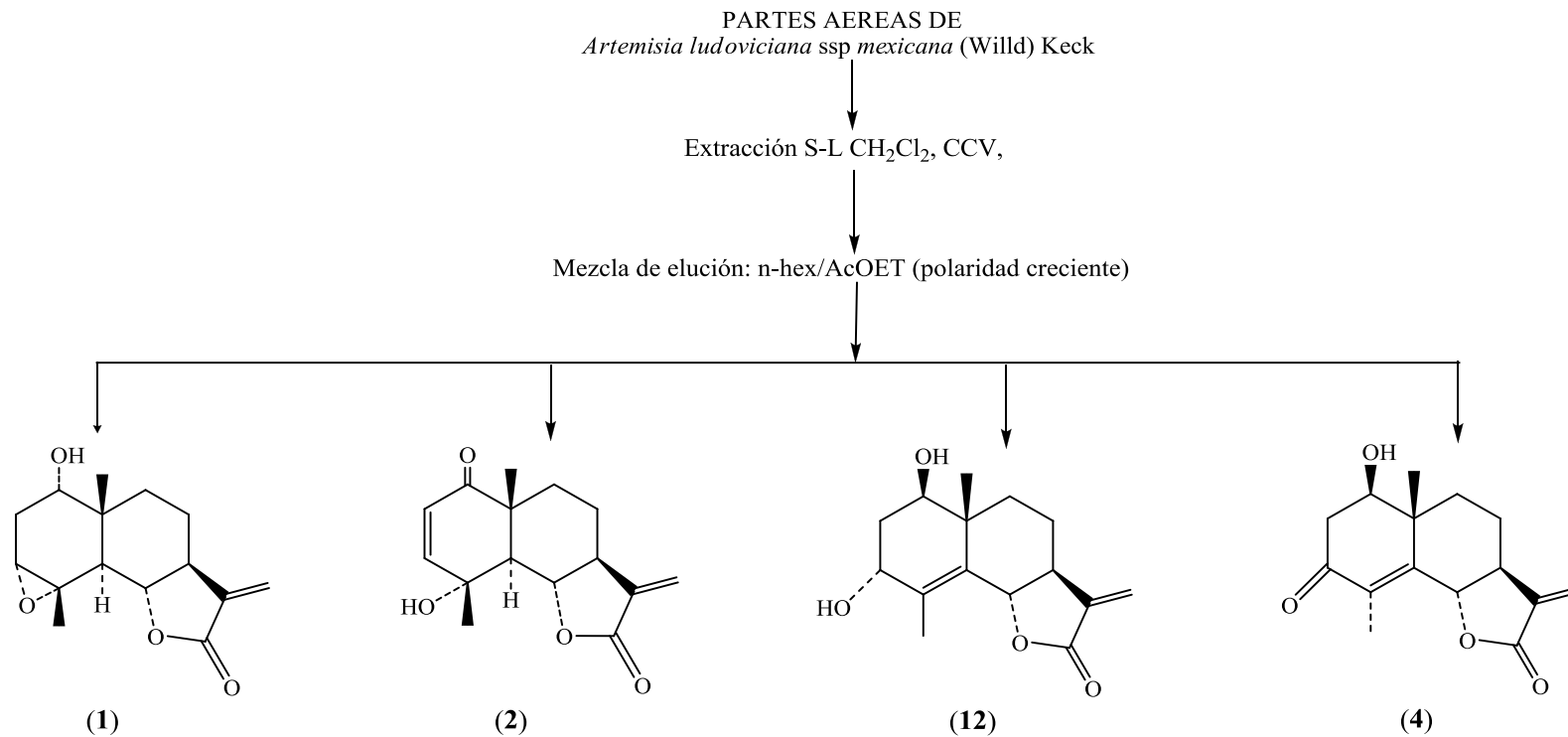


6.2) Biotransformaciones de lactonas sesquiterpénicas.

6.2.1) Hongos: *A. niger* (ATCC 16404), *B. bassiana*, (ATCC 13144), *C. blackesleeana* (ATCC 8688a), *C. lunata* (ATCC 13432), *F. moliniforme* (ATCC 102091), *M. miehei* (ATCC 16457), *R. oligosporus* (ATCC 22959), *R. nigricans* (ATCC 6227b), fueron proporcionadas por el Instituto de Biotecnología (ATCC), de la UNAM, México y se mantuvieron latentes bajo refrigeración en un medio de cultivo de agar papa-dextrosa (APD) a 4° C.

6.2.2) Resiembra de los hongos: Se realizó la resiembra de los diferentes hongos en tubos de ensayo con 15 mL de medio APD.

Esquema 12: Separación Cromatográfica del extracto CH₂Cl₂ de la *Artemisia ludoviciana ssp mexicana* (Willd) Keck, colectada en San Rafael Tlalmanalco, Estado de México.



6.2.3) Preparación de la solución densa de esporas. Para la preparación de 150 mL de APD, se pesaron 5.85 g de APD y se disolvieron en 150 mL de agua destilada hasta disolución total por medio de calentamiento. El medio fue esterilizado a 1.5 lb de presión, 120 °C durante 15 min. Se agregaron 15 mL de medio APD estéril en matraces Erlenmeyer de 50 mL, los cuales se incubaron a temperatura ambiente hasta esporulación (de 4-5 días). Posteriormente se agregaron 10 mL de agua destilada estéril para obtener una solución densa de esporas de cada uno de los hongos a ensayar.

6.2.4) Preparación de los medios de cultivo para la biotransformación.

6.2.4.a) Medio A (YEPGA): Peptona (10 g), extracto de levaduras (10 g), extracto de carne (10 g) y glucosa (50 g), el pH se ajustó a 7.

6.2.4.b) Medio B. Glucosa (10 g), glicerol (10 g), peptona (5 g), extracto de levaduras (5 g), KH_2PO_4 , (fosfato di ácido de potasio) (5 g) y NaCl (5 g) a pH 7, para los casos específicos de *A. niger*, *C. blackesleeana*, *C. lunata*, el pH se ajustó a 6.

Posteriormente, los medios se esterilizaron a 120 °C y 1.5 lb de presión durante 15 minutos. Una vez esterilizado el medio se distribuyeron en 40 matraces Erlenmeyer de 250 mL, los cuales contenían 150 mL de medio.

6.2.5) Factibilidad de las biotransformaciones de las lactonas sesquiterpénicas por medio de hongos filamentosos.

Para determinar la factibilidad de biotransformación de las sustancias por los diferentes hongos. A 50 mL (3 matraces Erlenmeyer de 125 mL) de medio previamente esterilizado (120 °C, 1.5 lb, 15 minutos), se le adicionaron 2 mL de una solución densa de esporas. Y se dejó incubar a 28 °C y 150 rpm de 48 a 72 horas, de acuerdo con la cantidad de biomasa obtenida por los diferentes hongos. Posteriormente se pesaron 10 mg aproximadamente del sustrato, el cual se disolvió en 5 mL de acetona y se distribuyó en tres matraces Erlenmeyer de 150 mL (50 mL de medio). En la tabla (1), se muestran los resultados de la factibilidad de biotransformación de los hongos ensayados sobre las lactonas sesquiterpénicas propuestas, después de catorce días de reacción, 150 rpm a 28 °C.

Tabla 1. Factibilidad de biotransformación de las lactonas sesquiterpénicas **1-3**, con ocho hongos filamentosos

	Lactonas sesquiterpénicas		
	Ludovicina A (1)	Arglanina (2)	Ridentina (3)
Hongo			
<i>A. niger</i>	++ ^a	++++ ^a	---- ^a
<i>B. bassiana</i>	++ ^a	++++ ^a	---- ^a
<i>C. blackesleeana</i>	++ ^a	++++ ^a	---- ^a
<i>C. lunata</i>	++++ ^b	++++ ^a	++++ ^b
<i>F. moliniforme</i>	++ ^a	++++ ^a	---- ^a
<i>M. miehei</i>	++ ^a	++++ ^a	---- ^a
<i>R. oligosporus</i>	++ ^a	++++ ^a	---- ^a
<i>R. nigricans</i>	++ ^a	++++ ^a	---- ^a

^a Biotransformación realizada en el medio A (medio YEPGA): Extracto de levadura, extracto de carne, peptona, glucosa

^b Biotransformación realizada en el medio B: Glucosa, glicerol, peptona, extracto de levadura, KH₂PO₄ y NaCl

++) Biotransformación poco cuantitativa determinada por la presencia de los compuestos en CCF.

El curso de la biotransformación fue monitoreada por CCF, incluyendo tres controles: blanco del medio, blanco del hongo y blanco de la sustancia, para asegurarse que la mezcla de biotransformación estaba compuesta de productos de la biotransformación de los sustratos empleados (**1-3**) por la acción de los diferentes hongos ensayados.

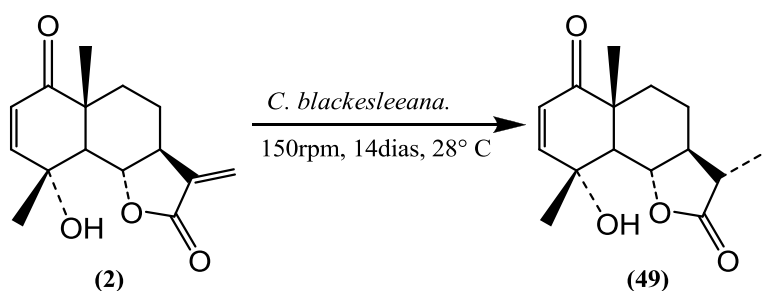
6.2.6) Biotransformación cuantitativa de las lactonas sesquiterpénicas (1-3).

De acuerdo con los resultados de la factibilidad se procedió a realizar la biotransformación cualitativa de la arglanina (**2**), ridentina (**3**) y la ludovicina A (**1**). Para ello, a 150 mL (20 matraces Erlenmeyer de 250 mL) de medio previamente esterilizados se inocularon con 2 mL de una solución densa de esporas de los diferentes hongos a ensayar, y se incubaron a 28 °C, 150 rpm.

6.2.7) Aislamiento y purificación de los productos de bioconversión. Los medios de cultivo fueron filtrados a vacío para separar la fase líquida de la biomasa. Se determinó

el pH y el volumen total de la fase líquida obtenida. La fase acuosa fue saturada con NaCl y posteriormente extraída con CH₂Cl₂ (extracción líq-líq). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró por medio del rotavapor. Por otro lado, a los pellets se les realizó una extracción sól-líq., y se filtró a gravedad sobre Na₂SO₄ anhidro para posteriormente obtener la mezcla de bioconversión por medio de la eliminación del disolvente con el rotavapor.

6.3) Biotransformación de la arglanina (2) con *C. blackesleeana*.



Esquema 13. Biotransformación de la arglanina (2) con *C. blackesleeana*

Se disolvieron 200 mg de arglanina (2) en 20 mL de acetona grado analítico y se distribuyeron en 20 matraces Erlenmeyer con 150 mL de medio YEPGA, con 72 horas de inoculación con *C. blackesleeana*. Después de 14 días de incubación y monitoreando la reacción por CCF, se procedió a la separación del medio líquido y de los pellets por medio de filtración a vacío, la recuperación de la mezcla de bioconversión presente en el medio líquido y en la biomasa se realizó como se indicó anteriormente. El residuo (193.4 mg) obtenido de la fase líquida fue purificado por medio de CCV y CCF preparativa, para producir 162.2 mg (76.9%) de un sólido blanco de pf. 175-177 °C que corresponde a la vulgarenina (49) [CH₂Cl₂/*i*-Pr₂O], ver esquema 13.

Cabe señalar que en los ensayos de factibilidad de la biotransformación de 2 con *A. niger*, *M. miehei*, *R. nigricans*, *R. oligosporus*, *F. moliniforme*, se identificó por medio de CCF a 49 como producto principal.

$$[\alpha]_D^{20} = + 31.58. (\text{MeOH}, c 0.3).$$

$$\text{IR } \nu_{\text{max}}(\text{CHCl}_3): 3571, 2977, 2937, 1789, 1683, 1344, 1235, 1173, 1115, 995 \text{ cm}^{-1}$$

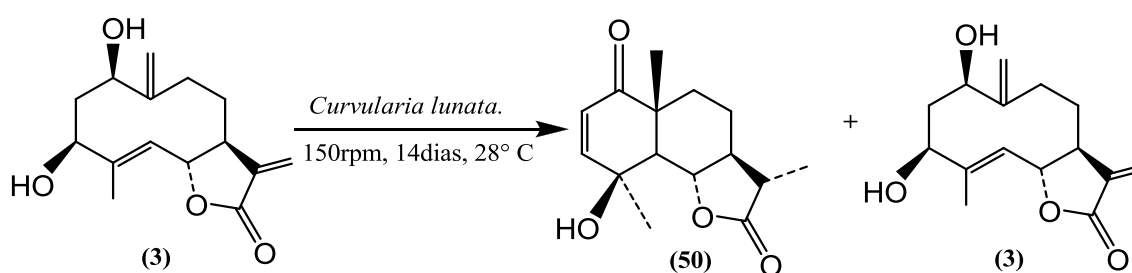
$$\text{RMN-}^1\text{H} (\text{CDCl}_3). \delta 5.90 (d, J= 10.5 \text{ Hz}, 1\text{H}, \text{H-2}), 6.61 (d, J= 10.5 \text{ Hz}, 1\text{H}, \text{H-3}), 2.44 (d, J= 11.5 \text{ Hz}, 1\text{H}, \text{H-5}), 4.17 (dd, J= 11.5 \text{ y } 10.5 \text{ Hz}, 1\text{H}, \text{H-6}), 1.73 (m, 1\text{H}, \text{H-7}),$$

1.66 (*m*, 1H, H-7), 2.01 (*ddd*, 1H, H-9), 2.35 (*dq*, *J* = 13 y 6.5 Hz, 1H, H-11), 1.27 (*d*, *J* = 7 Hz, 1H, H-13), 1.22 (*s*, 1H, H-14), 1.56 (*s*, 1H, H-15).

RMN-¹³C (CDCl₃): 205.6 (C-1), 151.7 (C-2), 170.1 (C-3), 70.1 (C-4), 54.6 (C-5), 79.6 (C-6), 52.4 (C-7), 22-7 (C-8), 34.2(C-9), 46.2 (C-10), 40.5 (C-11), 179.9 (C-12), 12.5 (C-13), 23.8 (C-14) y 19.8 (C-15).

EM (IE) m/z: 264 (15.8), 231 (12.3), 203 (19.2), 132 (36.3), 133 (100), 121 (10.9), 98 (31.5), 93 (28.1), 55 (15.0).

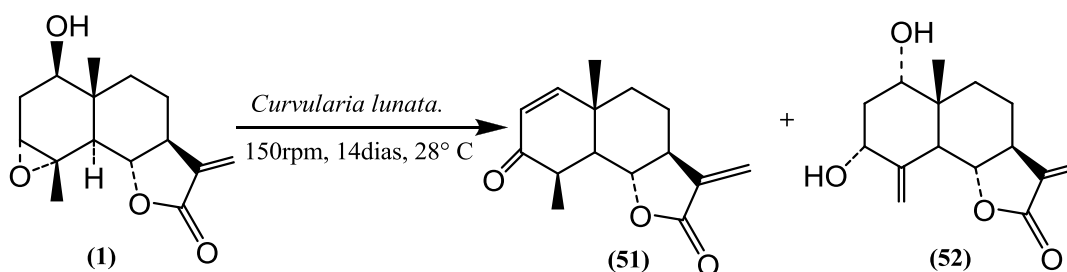
6.4) Biotransformación de la ridentina (3) con *C. lunata*.



Esquema 14. Biotransformación de la ridentina (3) con *C. lunata*.

La ridentina (3, 109.1 mg) se disolvió en 10 mL de acetona, y se distribuyó en 20 matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 125 mL de medio B. La biotransformación se detuvo después de 16 días, debido al bajo rendimiento que se observó por medio de CCF durante el curso de la biotransformación. Después de la purificación y extracción de la mezcla de bioconversión, se logró identificar a epímero de la vulgarina (50, 7.6 mg, 13%) y se recuperaron 76.1 mg (70%) de la materia prima, ver esquema 14.

6.5) Biotransformación de la ludovicina A (1) con *C. lunata*.



Esquema 15. Biotransformación de la ludovicina A (1) con *C. lunata*.

La ludovicina A (1, 202.4 mg) se disolvió en 10 mL de acetona, y se distribuyó en 20 matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 125 mL del medio B a pH=7. La

biotransformación se detuvo después de 14 días. El curso de la reacción fue monitoreado por CCF. La mezcla de bioconversión fue purificada por medio de CCV usando mezclas de n-hexano-AcOEt de polaridad creciente, produjo **1** (24.3 mg, 12%), **51** (62.7 mg, 31%) y **52** (105.3 mg, 52%), (ver esquema 15).

Tuberiferina (**51**): Sólido blanco (62.7 mg, 31%), pf. 145-147°C.

IR ν_{\max} (CHCl_3): 1768, 1675, 1457, 1408, 1308, 1246, 1136, 1045, 996 cm^{-1} ;

RMN-¹H (CDCl_3): δ 6.71 (*d*, *J* = 9 Hz, 1H, H-1), 6.12 (*d*, *J* = 3 Hz, 1H, H-13a), 5.91 (*d*, *J* = 9 Hz, 1H, H-2), 5.43 (*d*, *J* = 3 Hz, 1H, H-13b), 2.62 (*dc*, *J* = 7, 4 Hz, 1H, H-4), 2.1 (*dd*, *J* = 10, 7 Hz, 1H, H-5), 3.98 (*t*, *J* = 10 Hz, 1H, H-6), 2.58 (*sc*, 1H, H-7), 2.13 (*sc*, 1H, H-8_{αec}), 1.79 (*ddd*, *J* = 10, 3 Hz, 1H, H-8_{βax}), 1.75 (*sc*, 1H, H-9_{βec}), 1.68 (*dd*, *J* = 10, 3 Hz, 1H, H-9_{αax}), 1.40 (*d*, *J* = 4 Hz, 3H, H-15), 1.17 (*s*, 3H, H-14).

RMN-¹³C (CDCl_3): δ 157.8 (C-1), 126.8 (C-2), 200.4 (C-3), 42.1 (C-4), 52.3 (C-5), 82.0 (C-6), 50.2 (C-7), 21.2 (C-8), 37.2 (C-9), 38.5 (C-10), 138.3 (C-11), 170.1 (C-12), 117.5 (C-13), 19.3 (C-14), 14.8 (C-15).

EM (IE) m/z: 248 [M^+ , 1.2], 232 (2.1), 218 (2.1), 189 (48.0), 148 (32.5), 108 (18.0) 93 (31.0), 76 (76.0), 51 (26.0), 40 (15.0).

Ludovicina B (**52**): Sólido blanco (105.3 mg, 52%). pf. 148-150 °C.

IR ν_{\max} (CHCl_3): 3597, 3569, 1768, 1675, 1460, 1409, 1381, 1136, 1044, 996, 965, 919 cm^{-1} .

RMN-¹H (CDCl_3): δ 3.40 (*t*, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-1), 1.98 (*ddd*, *J* = 15 Hz, 1H, H-2_{βax}), 2.11 (*m*, 1H, H-2_{αec}), 4.42 (*t*, *J* = 3 Hz, 1H, H-3), 3.15 (*dt*, *J* = 12, 1.5 Hz, 1H, H-5), 4.04 (*t*, *J* = 12 Hz, 1H, H-6), 2.63 (*dddd*, *J* = 12, 3 Hz, 1H, H-7), 2.16 (*m*, 1H, H-8_{αec}), 1.58 (*ddd*, *J* = 12, 3 Hz, 1H, H-8_{βax}), 1.37 (*m*, 1H, H-9_{βec}), 2.24 (*dd*, *J* = 15, 3 Hz, 1H, H-9_{αax}), 6.1 (*d*, *J* = 3 Hz, 1H, H-13a), 5.47 (*d*, *J* = 3 Hz, 1H, H-13b), 0.78 (*s*, 1H, H-14), 5.20 (*s. a*; $W_{1/2}$ = 1.5 Hz H-15), 5.08 (*s. a*; $W_{1/2}$ = 1.5 Hz, H-15')

RMN-¹³C (CDCl_3): δ 74.34 (C-1), 32.61 (C-2), 75.46 (C-3), 145.26 (C-4), 42.82 (C-5), 79.96 (C-6), 49.57 (C-7), 21.25 (C-8), 33.93 (C-9), 43.50 (C-10), 139.03 (C-11), 170.79 (C-12), 117.19 (C-13), 17.65 (C-14), 113.02 (C-15).

6.6) Reacción de epoxidación de la santamarina.

La santamarina (61.1 mg) se disolvió en CH₂Cl₂ (15 mL) y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL bajo agitación, a la solución resultante se le adicionó lentamente 114.5 mg de ácido m-cloro perbenzoico (AMCPB) a 0 °C. Una vez concluida la reacción, (2.5 h); se procedió a su detención agregando 1 g de hielo a la solución. Posteriormente se realizó la separación del producto de la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ (5 mL x 5). La fase orgánica obtenida se lavó con una solución saturada de NaHSO₃ (5 mL x 5), seguido del tratamiento con una solución saturada de NaHCO₃ (5 mL x 5) y finalmente se lavó con agua (5 mL x 5). La fase orgánica fue tratada con Na₂SO₄ anhidro y concentrada en rotavapor. El producto de la epoxidación se cristalizó por par de disolventes [CHCl₃/n-hex]. Obteniéndose un sólido blanco cristalino de pf. 207-209 °C (26.6 mg, 43.5%) que fue identificado como el epóxido de la santamarina (**53**).

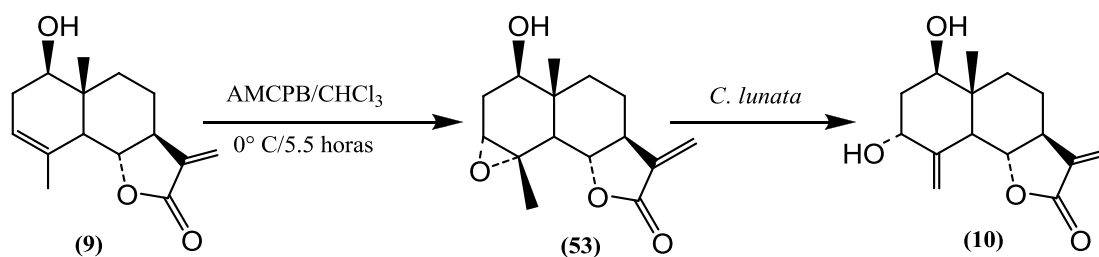
Epóxido de la santamarina (**53**): Sólido blanco (26.6 mg, 43.5%). Pf.207-209 °C.

IR_{vmax} (CHCl₃): 3618, 1767, 1460, 1408, 1385, 1240, 1133, 1088, 1043, 1002 cm⁻¹.

RMN⁻¹H (CDCl₃): δ 3.46 (*dd*, J = 12, 3 Hz, 1H, H-1), 3.04 (*d*, J = 3 Hz, 1H, H-3), 1.92 (*d*, J = 12 Hz 1H, H-5), 3.93 (*dd*, J = 12 Hz, 1H, H-6), 2.50 (*obs* H-7), 1.64 (*ddd*, J= 12, 3 Hz, 1H, H-8_{βax}), 2.08 (*m*, 1H, H-9_{βec}), 1.26 (*m*, 1H, H-9_{αax}), 6.10 (*d*, J = 3 Hz 1H, H-13a), 5.44 (*d*, J = 3 Hz, 1H, H-13b), 0.92 (*s*, 1H, H-14), 1.50 (*s*, 1H, H-15)

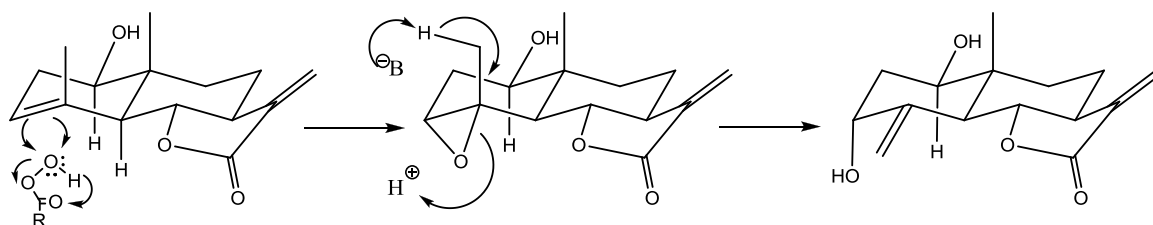
RMN⁻¹³C (CDCl₃): δ 73.68 (C-1), 31.02 (C-2), 60.80 (C-3), 57.36 (C-4), 52.27 (C-5), 80.68 (C-6), 50.48 (C-7), 21.06 (C-8), 34.21 (C-9), 40.23 (C-10), 138.52 (C-11), 170.26 (C-12), 117.34 (C-13), 11.77 (C-14), 21.61 (C-15).

6.7) Biotransformación del epóxido de la santamarina (**53**) con *C. lunata*.



Esquema 16. Obtención del epóxido de la santamarina (**53**) y apertura por medio de *C. lunata*.

Para determinar que las condiciones del medio (pH) no influían en la apertura del epóxido en la ludovicina A, se procedió a realizar la biotransformación cualitativa del epóxido de la santamarina (ver esquema 16). Para lo cual, en el medio B previamente esterilizado e inoculado con *C. lunata* (2 matraces Erlenmeyer con 125 mL de medio), se adicionó el epóxido de la santamarina (13 mg) previamente disuelto en 5 mL de acetona. El curso de la biotransformación se siguió por medio de CCF, utilizando: blanco del medio de cultivo, blanco del epóxido de la santamarina, blanco del hongo, una alícuota por cada matraz; y como referencia una muestra auténtica de la 3 α -hidroxireynosina; sustancia previamente aislada de una población de *Artemisia ludoviciana* ssp mexicana, colectada en la delegación Milpa Alta de la Cd de México. En esquema (17) se indica la transformación química del epóxido de santamarina por la acción de *C. lunata*.



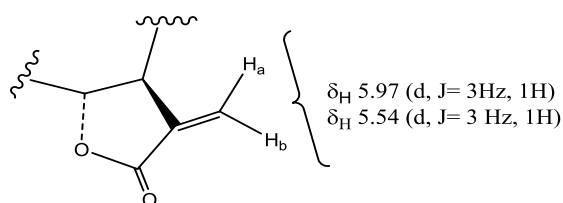
Esquema 17. Propuesta de un mecanismo de reacción de la 3 α -hidroxireynosina a partir de la apertura estereodiferenciada del epóxido de santamarina.

VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

7.1) Caracterización e identificación de la ridentina (3).

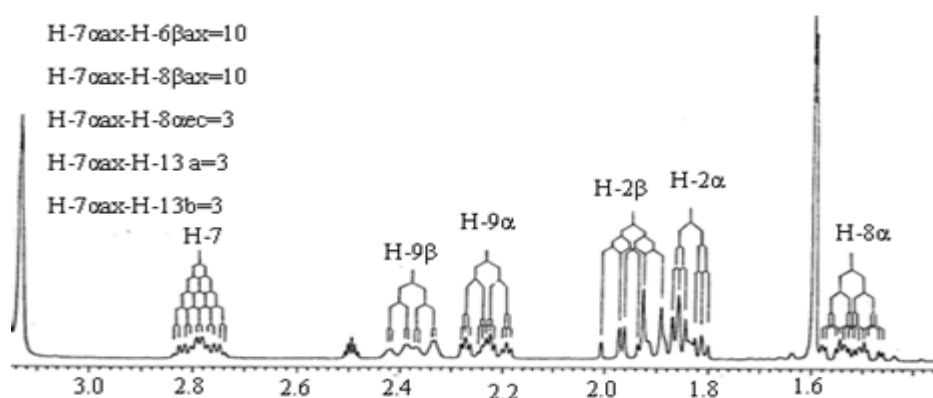
Del extracto CH_2Cl_2 de *A ludoviciana* ssp *mexicana* se obtuvo la ridentina (3), sustancia que en su espectro de IR (espectro 1) muestra las absorciones características para el grupo hidroxilo en 3334 cm^{-1} y el grupo α -metileno- γ -lactona en 1763 cm^{-1} .

Por otro lado, en su espectro de masas por impacto electrónico, presenta un ion molecular de m/z 264 (1 %) que corresponde a una fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ ($\Omega=6$). En su espectro de RMN- ^1H (espectro 2), se observa un par de dobletes en δ 5.97 (*d*, $J=3\text{ Hz}$, 1H) y δ 5.54 (*d*, $J=3\text{ Hz}$, 1H) que corresponde al metileno *exocíclico* conjugado con la γ -lactona, fórmula parcial A, ver esquema 18.



Esquema 18. Fórmula parcial A.

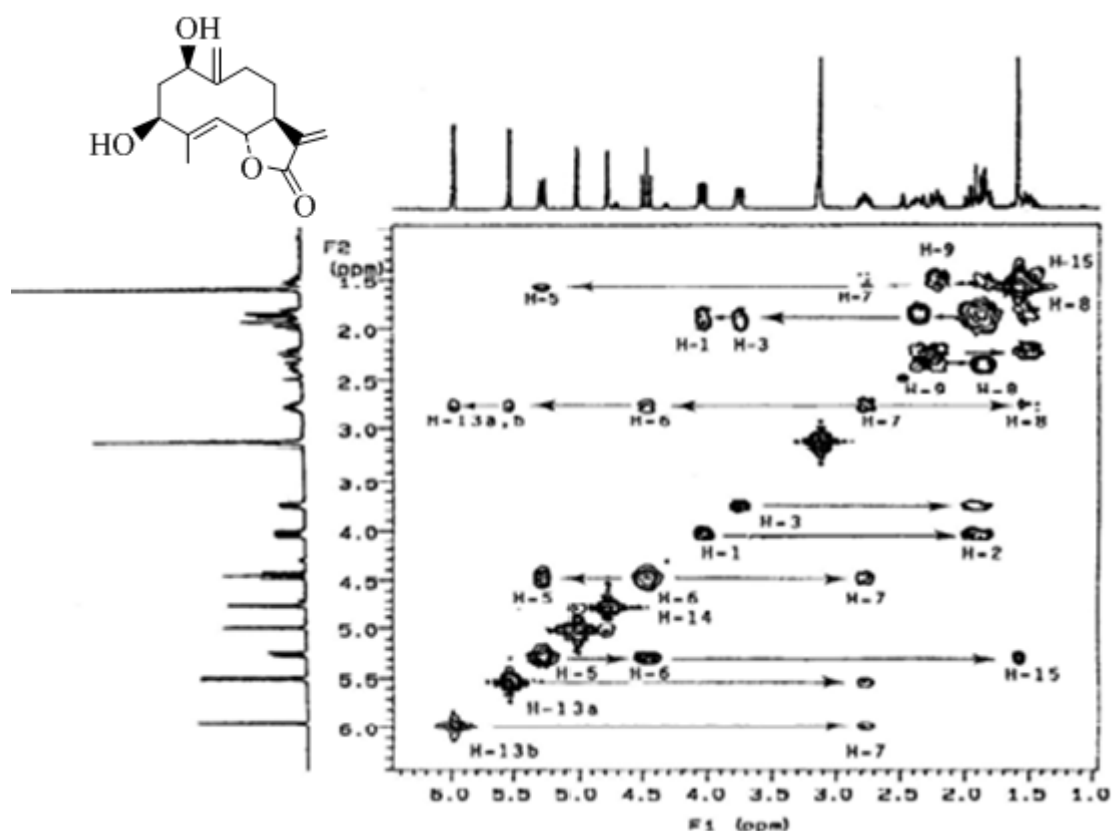
Además de una señal triple en δ_{H} 4.48 (*t*, $J=10\text{ Hz}$, 1H) característico del H-6, debido al cierre de la lactona en C-6 del esqueleto de germacrano, el cual muestra acoplamiento con H-5 (δ_{H} 5.28, $J=10\text{ Hz}$), H-7 (δ_{H} 2.79, *dddd*, $J=10\text{ Hz}$), fórmula parcial B, ver esquema 19.



Esquema 19. Patrón de multiplicidad observada para H₇, H₉ y H₈ en RMN- ^1H .

En el espectro COSY, se observan las interacciones de H-7(δ_H 2.79) con H-6 (δ_H 4.48) y H-5 (δ_H 5.28). Además de las interacciones de H-1 $_{\alpha ax}$ (δ_H 4.05) con H-2 $_{\beta ax}$ (δ_H 1.89). De H-3 (δ_H 3.76) con H-2 $_{\beta ax}$ (δ_H 1.89), y finalmente H-5 (δ_H 5.28) con H-6 (δ_H 4.48) y H-15 (δ_H 1.58).

Con base en el espectro COSY (esquema 20) y por el desplazamiento químico a campo bajo de H-5 (δ_H 5.28), sugiere que existe un doble enlace entre los C-4 y C-5; siendo el C-4, donde se localiza el grupo CH₃-15 (δ_H 1.52, *d*, J= 1.5 Hz, 1H). En δ 5.03 y 4.79 se observan dos señales anchas, que corresponden al metileno *exocíclico* que se encuentra en C-10, lo cual confirma que se trata de una lactona sesquiterpénica con esqueleto germacrano, y dos dobles ligaduras entre los $\Delta^{4(5)}$ y $\Delta^{10(14)}$.

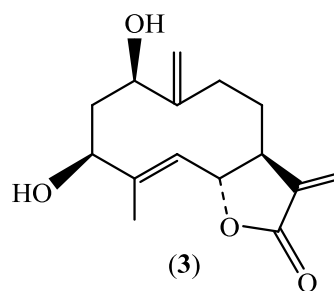


Esquema 20. RMN-¹H (COSY) para la ridentina (3)

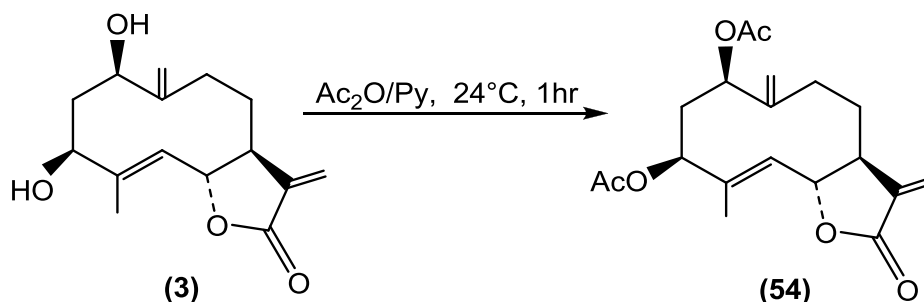
Otras señales adicionales que se observan en el espectro de RMN-¹H de esta molécula, son los hidrógenos geminales a grupos hidroxilo, los cuales corresponden por su desplazamiento químico y con base en su espectro COSY (esquema 20) a los H-1 (δ_H 4.04) y H-3 (δ_H 3.76).

Los hidrógenos correspondientes a C-8, aparecen en 1.90 (*s.m.*) y en 1.52 (*s.m.*) que corresponden a H-8_{βax} y H-8_{αec} respectivamente; los cuales muestran una interacción con los hidrógenos del C-9, H-9_{βec} (δ_H 2.38) y H-9_{αax} (δ_H 2.27).

Con base en el análisis descrito, se propuso que la sustancia aislada corresponde a la ridentina (**3**), germacranólida aislada de otras especies de *Artemisia* [38]. Los desplazamientos químicos y multiplicidad de RMN-¹³C (DEPT) se observan en su espectro 3.



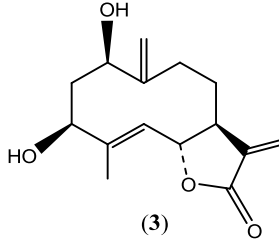
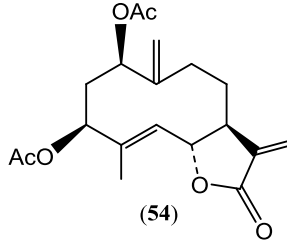
7.2) Obtención del derivado diacetilado de la ridentina (**54**).



Esquema 21. Reacción de acetilación de (**3**) con Ac₂O/Py a T. ambiente.

Para corroborar la estructura propuesta, se procedió a la obtención de su derivado diacetilado, ver esquema 21; como se describe en la parte experimental. En la tabla 2, se muestran las variaciones en desplazamientos químicos de RMN-¹³C de **3** y su derivado diacetilado **54**. De donde se puede observar que la mayor diferencia debido a la presencia del grupo acetato, son los C-1 (Δδ= -1.8) y C-3 (Δδ= -1.8), el cual ejerce un efecto electroattractor sobre dichos átomos de carbono; mientras que para el C-2 hay un efecto de protección (Δδ= 5.7). Así como, en los C-14 (Δδ= -4.7) y C-15 (Δδ= -1.2).

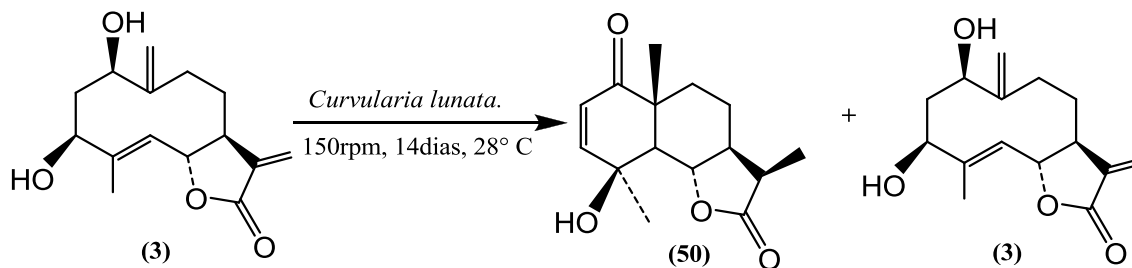
Tabla 2. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C para **3** y **54**.

 (3)		 (54)	
Carbono	δ (3)	δ (54)	$\Delta\delta = \delta$ (3) - δ (54)
C-1	73.6	75.4*	-1.8
C-2	41.5	35.8	5.7
C-3	73.8	75.6*	-1.8
C-4	147.3	142.8	4.5
C-5	120.5	124.2	-3.7
C-6	79.6	79.5	0.1
C-7	43.0	48.5	-5.5
C-8	25.8	26.1	-0.3
C-9	30.5	29.7	0.8
C-10	144.2	145.9	-1.7
C-11	140.1	139.4	0.7
C-12	169.3	169.5	-0.2
C-13	117.6	110.9	6.7
C-14	109.6	114.3	-4.7
C-15	11.2	12.4	-1.2
CH ₃ -CO	-----	21.2	-----
CH ₃ -CO	-----	21.0	-----

Al comparar el espectro de RMN-¹H de la ridentina (**3**) con su derivado diacetilado (**54**), se observan dos señales simples características del grupo acetilo en δ_H 2.60 y δ_H 1.99. Además se observan las señales correspondientes a H-1 y H-3, los cuales han

sufrido desplazamiento a campo bajo debido al cambio del grupo funcional (grupo hidroxilo al grupo acetato).

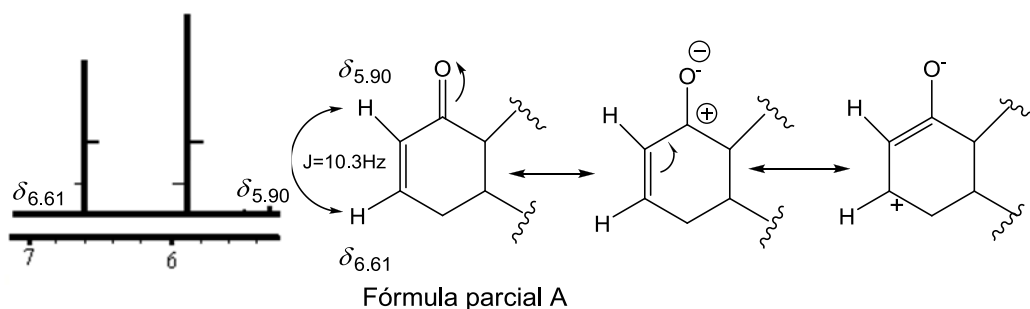
7.3) Biotransformación de la ridentina (3) con *Curvularia lunata*.



Esquema 22. Biotransformación de la (3) con *C. lunata*.

El producto obtenido de la biotransformación de **3** con *C. lunata* (ver esquema 22) muestra en su espectro de IR, las adsorciones características para una lactona sesquiterpénica 1775 y 1665 cm^{-1} , que corresponden a la ν (C=O) y (C=C) respectivamente. Además de la ν (O-H) en 3520 cm^{-1} , sugiriendo la presencia de un grupo hidroxilo.

En su espectro de RMN- ^1H (espectro 4), se observa un sistema AB en δ 6.61 (d, $J=10.5$ Hz, 1H) y 5.90 (d, $J=10.5$ Hz, 1H), conjugado a un grupo carbonilo, que por su desplazamiento químico y constantes de acoplamiento no corresponden al metileno *exocíclico* de la γ -lactona, —fórmula parcial A—, ubicándose a dicho fragmento en el anillo A del esqueleto de eudesmano como se observa en el esquema 23, y que corresponden a H-3 y H-2 respectivamente, con base en las estructuras resonantes mostradas en dicho esquema.

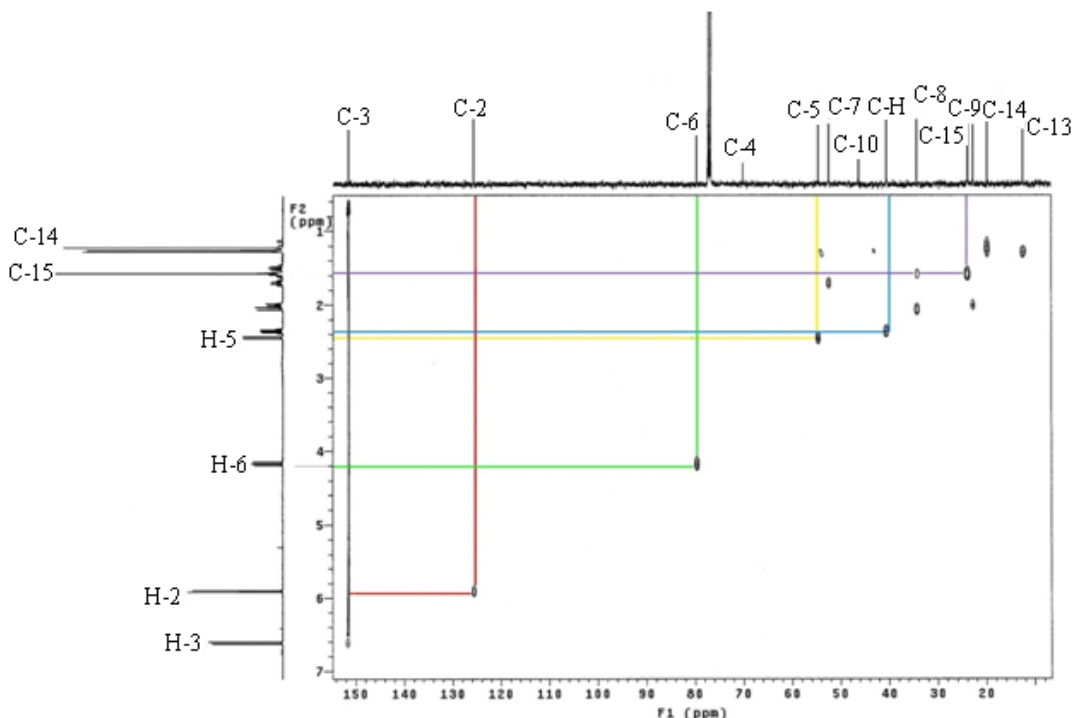


Esquema 23. Estructuras resonantes para H-2 y H-3 en el anillo A.

Asimismo, se puede observar que el compuesto **3** fue hidrógeno en estas condiciones de reacción —28°C, 150 rpm, 14 días—, ya que en su espectro (espectro 4) no se observan las señales características del metileno exocíclico de la γ -lactona, y se observa una señal *doble* (*d*, $J=7.1$ Hz) en $\delta_{13} 1.24$ que corresponde al CH₃-13, que por el valor de su constante de acoplamiento sugiere que el metilo presenta una orientación α .

La hidrogenación del doble enlace Δ^{11-13} parece ser un proceso común en las transformaciones microbiológicas de lactonas sesquiterpénicas por hongos filamentosos. La regioselectividad del Δ^{11-13} puede ser un mecanismo de defensa del microorganismo contra la actividad antifúngica de algunas lactonas. La presencia de la α -metileno- γ -lactona es responsable en muchos casos de la actividad biológica de este tipo de sustancias [10, 20, 22].

Por otro lado, en el esquema 24 se muestra el espectro HSQC, para el producto en discusión, donde se observa la correlación de cada átomo de carbono con los hidrógenos presentes en la molécula; como por ejemplo, se pueden situar: C₃-H (δ_{H} 6.61, *d*), C₂-H (δ_{H} 5.90, *d*), C₆-H (δ_{H} 4.17, *dd*), C₅-H (δ_{H} 2.44, *dd*) y C₁₁-H (δ_{H} 2.35, *dq*)



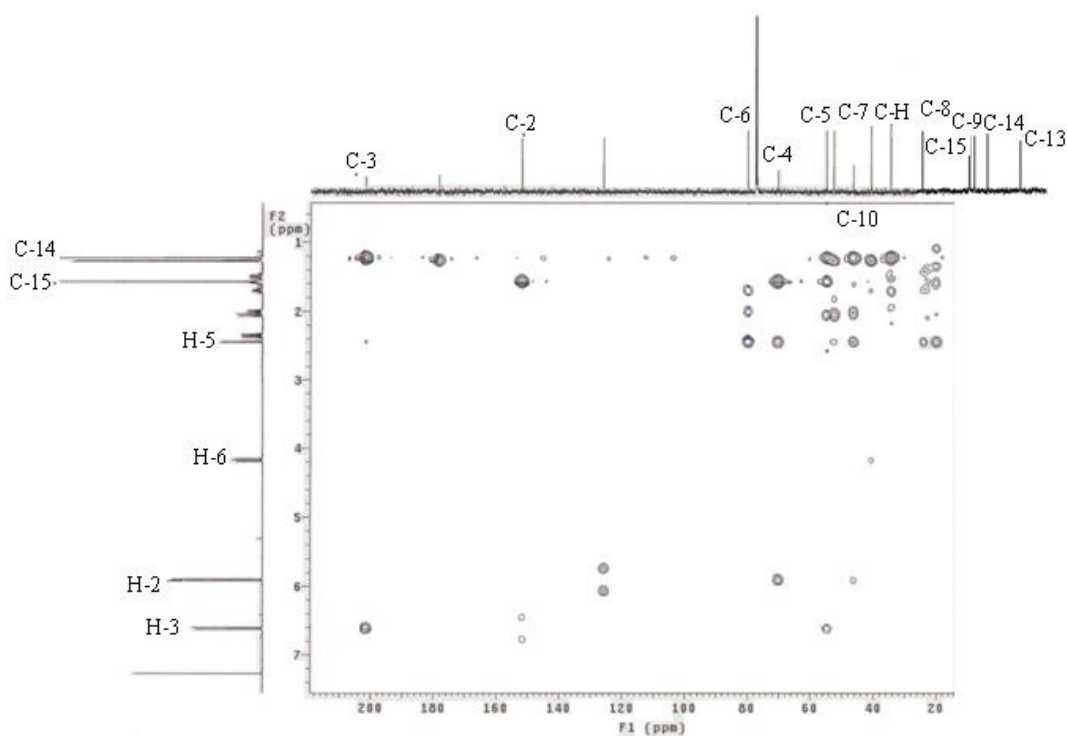
Esquema 24. Correlaciones C-H (HSQC) para el epímero de la vulgarina (**50**).

En el esquema 25 se muestra su espectro HMBC, donde se observan las interacciones de los diferentes carbonos con los hidrógenos a dos (C-C-H) y tres (C-C-C-H) enlaces.

La señal simple de δ 4.37 ($J = 11.2$, 1H) corresponde $H_{\beta ax}$ del C-6, donde se encuentra cerrada la lactona, dicho hidrógeno muestra un acoplamiento *trans*-diaxial con H-5 (δ 2.48, *d*, $J=11.2$ Hz) y el H-7, la señal simple en δ 1.4 corresponde CH_3 - 14.

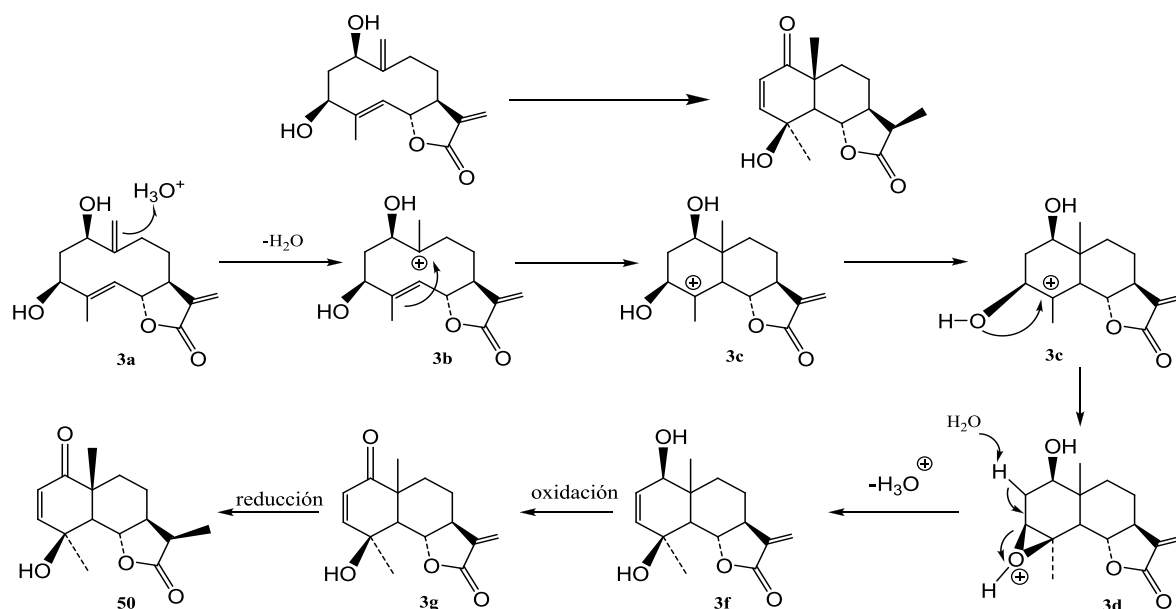
La orientación del grupo CH_3 - en el C-13 se estableció por el valor de la constante de acoplamiento entre H-7 y H-11 ($J=7.1$ Hz), este valor de constante de acoplamiento (J) está de acuerdo para una disposición *trans* de los hidrógenos mencionados y por tanto el CH_3 -13 presenta una orientación β , dicha posición es confirmada por el efecto γ -gauche, efecto de protección que ejerce el CH_3 -13 en los C-8 y C-6, como se ilustra en el esquema 25.

La estereoquímica del C-4, se dedujo con base en los desplazamientos químicos en $RMN^{13}C$, debido al efecto γ -gauche en los C-10 y C-6 donde la orientación β del grupo hidróxilo, genera un efecto de protección sobre dicho átomo de carbono, mientras que si el grupo OH, fuera α -pseudo ecuatorial, el único C protegido sería el C-6.



Esquema 25. HMBC para el epímero de la vulgarina (50)

Aunado a la discusión anterior en el esquema 26, se muestra una posible propuesta en la formación del compuesto en discusión, la cual inicia con la protonación del doble enlace Δ^{10-14} para generar un carbocatión terciario (**3b**) seguido de la formación del anillo (6-6) de eudesmano y la generación del carbocatión terciario respectivo (**3c**), el carbocatión en C-4 (**3d**) es estabilizado por el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo β -pseudoequatorial del C-3 para generar la estructura **3e**. La sustracción del H-2 y la apertura del epóxido hacia el C-4 (carbono más impedido) para formar un doble enlace C-2 y C-3 (**3f**). Finalmente la oxidación del C-1 conlleva a la formación del grupo carbonilo- α,β -insaturado y la hidrogenación Δ^{11-13} para la formación del epímero¹⁰ de la α -vulgarina (**50**).



Esquema 26. Propuesta de mecanismo para la bioconversión de la ridentina (**3**) al epímero de la vulgarina (**50**).

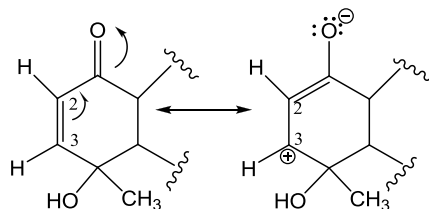
¹⁰ Un epímero es un estereoisómero que tiene una configuración diferente en un solo centro estereogénico. Cuando se incorpora un epímero a una estructura en anillo, es llamado anómero.

7.4) Caracterización e identificación de la arglanina (2).

De la purificación de las fracciones obtenidas con n-hexano/AcOEt (80:20) del extracto CH₂Cl₂ de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* ssp *mexicana*; se aisló un sólido blanco, el cual en su EM (IE) presenta un ion molecular de *m/z* 262, (16.4%) que corresponde a una fórmula molecular C₁₅H₁₈O₄.

En su espectro de IR se observa en 3574 cm⁻¹ una banda característica de ν (O-H), mientras en 1774 cm⁻¹ se observa la ν (C=O) de una α -metilen- γ -lactona. Además en 1683 cm⁻¹ y 1627 cm⁻¹ se observa la presencia de una cetona α - β insaturada, lo cual es confirmado en su espectro de RMN ¹H.

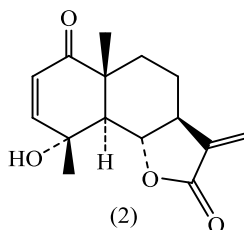
La información de su espectro RMN ¹H, establece la estructura parcial A (ver esquema 27), ya que se observa un sistema AB en δ 5.88 (*d*, J = 11 Hz, 1H) y δ 6.60 (*d*, J = 11 Hz, 1H), que se le asignan a H-2 y H-3 respectivamente, debido a que H-3 se encuentra más desprotegido con base en las formas resonantes indicadas en el esquema anterior. La señal en 1.57 (*s*, 3H) corresponde a un metilo geminal y a un grupo hidroxilo.



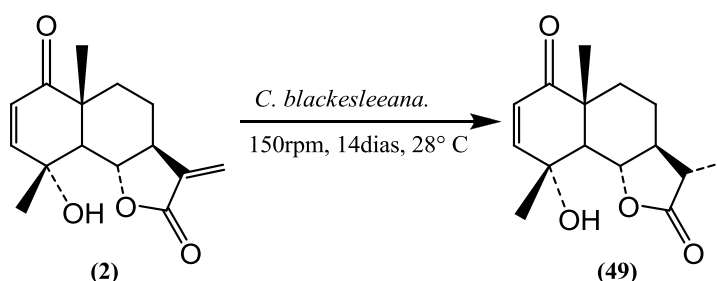
Esquema 27. Estructura parcial y formas resonantes para la arglanina (2).

Las señales correspondientes a los hidrógenos del doble enlace exocíclico de la γ lactona se observan en δ 6.15 (*d*, J = 3Hz, 1H) y δ 5.48 (*d*, J = 3Hz, 1H) para H-13b y H-13a. Asimismo se observa en δ 4.12 (*t*, J = 11Hz, 1H), la señal característica del H-6 con una orientación β -axial, se acopla con H-5 (δ 2.55, *d*, J = 11Hz, 1H), el cual tiene una orientación α -axial. Este análisis aunado a la presencia a una señal simple en δ 1.2 (*s*, 3H) que corresponde a CH₃-14, permite deducir que se trata de una lactona sesquiterpénica con esqueleto de eudesmano.

La comparación de los datos ya descritos con los informados en la literatura se pudo corroborar que la sustancia aislada del extracto diclorometánico de *A. ludoviciana* ssp *mexicana* es la arglanina (**2**) [23, 42, 44].



7.5) Biotransformación de la arglanina (**2**) con *C. blackesleeana*.

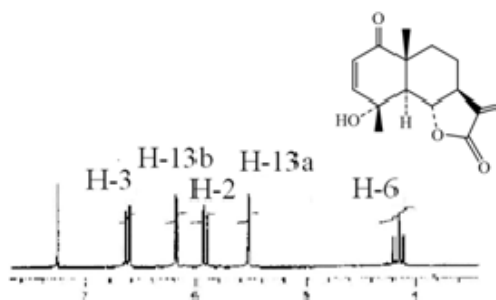
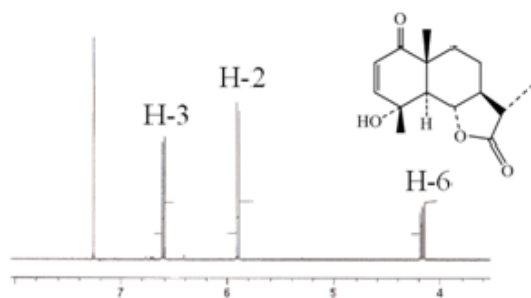


Esquema 28. Biotransformación de la arglanina (**2**) con *C. blackesleeana*

La adición de arglanina (**2**) al medio YEPGA con 72 h de inoculación con *C. blackesleeana*, y después de 14 días de biotransformación. Se procedió a la purificación de la mezcla de bioconversión por medio de CCV, empleando como eluyente mezclas de n-hexano/AcOEt de polaridad creciente; de donde se obtuvo un sólido cristalino de pf. 175-177 °C (ver esquema 28).

Al comparar los espectros de RMN-¹H de la sustancia **2** con **49**, se observa la desaparición de las señales correspondientes al doble enlace *exocíclico* de la γ -lactona (H-13a y H-13b) ver esquema (29), lo cual indica que la acción de *C. blackesleeana* fue la de hidrogenar el doble enlace Δ^{11-13} .

Desplazamientos químicos para H-2 y H-3 en la vulgarina (49)



Desplazamientos químicos para H-2 y H-3 en la arglanina (2)

Esquema 29. Desplazamientos químicos para H-2 y H-3 en la vulgarina (49) y arglanina (2).

Por otro lado, con base en sus espectros COSY, NOESY, HMBC y HSQC se puede concluir que la sustancia mayoritaria obtenida de dicha biotransformación es la vulgarina (49), sustancia aislada en especies de *Artemisia* europeas.

7.6) Caracterización e identificación de la ludovicina A (1).

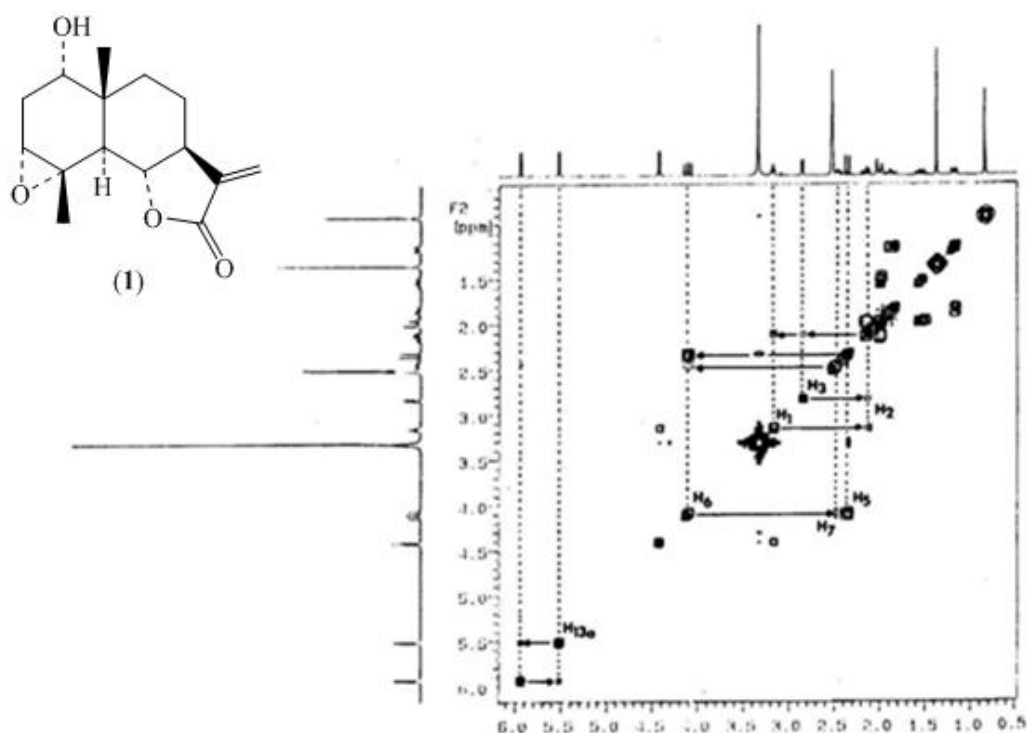
De la purificación de las fracciones obtenidas con n-hexano/AcOEt (80:20); se aisló un sólido cristalino transparente, el cual en su EM (IE) presenta un ión molecular de m/z 264, que corresponde a una fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_4$.

En su espectro de RMN 1H , se observan señales características de una lactona sesquiterpénica con esqueleto de eudesmano: a δ 4.09 (*dd*, $J = 12, 11$ Hz, 1H) señal que se le asigna a H-6, la cual de acuerdo con el espectro COSY, se acopla con H-5 y H-7; los cuales aparecen en δ 2.33 (*d*, $J = 11$ Hz, 1H) y δ 2.43 (*m*, 1H) respectivamente, asimismo las señales en δ 1.35 (*s*, 3H) y δ 0.81 (*s*, 3H) son asignadas a CH_3 -15 y CH_3 -14

respectivamente, mientras que en δ 5.93 (*d*, $J = 3$ Hz, 1H) y δ 5.51 (*d*, $J = 3$ Hz, 1H) se observan dos señales dobles correspondientes a H-13b y H13a del doble enlace exocíclico, las cuales confirman la hipótesis de la estructura propuesta.

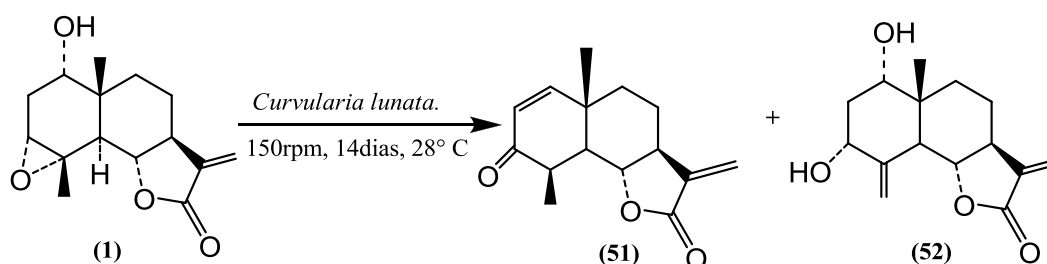
La señal que se observa en δ 4.41 corresponde al hidrógeno del grupo hidroxilo; esto se comprueba cuando se equilibra con D_2O , donde dicha señal desaparece.

La señal en δ 3.50 (*t*, $J = 5$ Hz, 1H) corresponde por su desplazamiento químico a un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo, la cual queda de manifiesto al observar el espectro COSY (esquema 30), donde se observa claramente la interacción del hidrógeno del grupo hidroxilo (δ 4.41) con el hidrógeno del C-1. Por otro lado se observa en δ 2.82 una señal doble ($J = 5$ Hz) que integra para 1H, que puede ser asignada a un hidrógeno base de epóxido, mientras que la señal múltiple en δ 2.14 fue asignada a los hidrógenos del C-2, lo que se puede observar en el esquema 30.



Esquema 30. Espectro COSY para la ludovicina A (1)

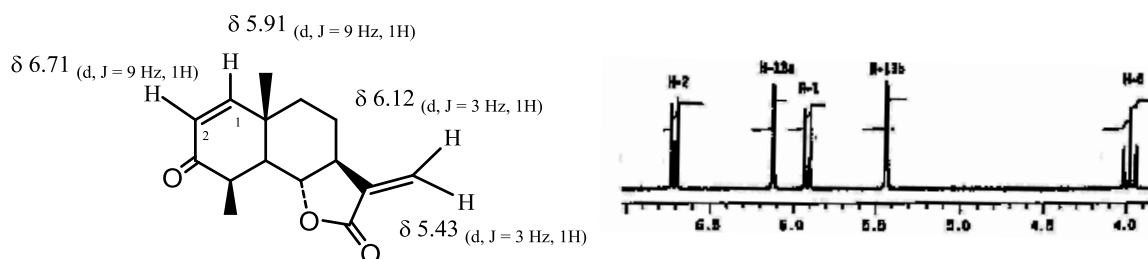
7.7) Biotransformación de la ludovicina A (**1**) con *Curvularia lunata*.



Esquema 31. Reacción de ludovicina A (**1**) con *C. lunata*.

La ludovicina A, con *Curvularia lunata* en el medio B produjo tuberiferina (**51**, 31%) y ludovicina B (**52**, 52%). En el espectro de masas por impacto electrónico se observa un ión molecular de m/z 248, el cual corresponde a una fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_3$. En su espectro de IR (espectro 8), muestra a 1768 cm^{-1} que corresponde a la γ -lactona y en 1675 cm^{-1} a un grupo carbonilo de cetona α,β -insaturada.

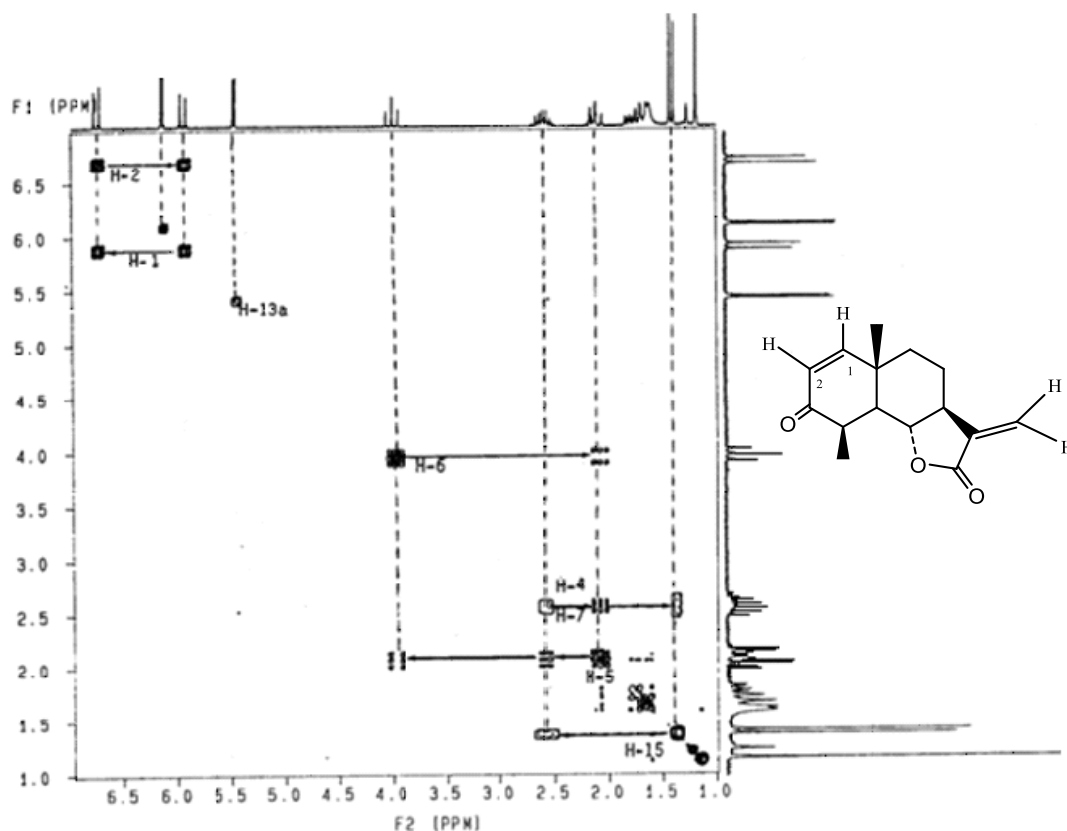
En su espectro de RMN- ^1H , se observa la presencia de un metileno exocíclico de la γ -lactona, δ_{H} 6.12 (d , $J = 3\text{ Hz}$, 1H, H-13_a) δ_{H} 5.43 (d , $J = 3\text{ Hz}$, 1H, H-13_b) y una cetona α,β -insaturada cuyos hidrógenos aparecen δ_{H} 6.71 (d , $J = 9\text{ Hz}$, 1H) y δ_{H} 5.91 (d , $J = 9\text{ Hz}$, 1H), los cuales corresponden a H-2 y H-1 respectivamente, como se muestra en el esquema 32.



Esquema 32. Desplazamientos químicos para el sistema carbonílico α - β insaturado presente en el producto (**51**) la tuberiferina.

Por otra parte, se observa una señal centrada δ_{H} 2.62 (dc , $J = 6\text{ Hz}$ y 4 Hz , 1H) se asignó a H-4, el cual muestra en su espectro COSY, una correlación con H-5 (δ_{H} 2.1, dd , $J = 7\text{ Hz}$) y CH_3 -15 (δ_{H} 1.4, d , $J = 4\text{ Hz}$, 3H) sugiriendo que el H-4 presenta una orientación β -axial. Adicionalmente en su espectro NOESY se observan las

interacciones entre H-4 con H-6 (δ_H 3.98) y CH₃-14, lo cual confirma la estereoquímica del C-4.

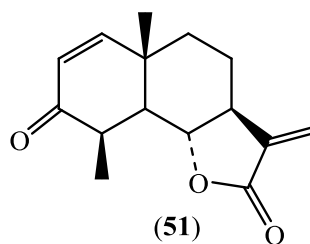


Esquema 33. COSY para la tuberiferina (**51**).

La formación del anillo de la γ -lactona en el C-6, se confirma por la señal triple en δ_H 3.98 (*t*, $J = 10$ Hz 1H), el cual muestra una interacción *trans*-diaxial con H-5 (δ_H 2.10) y H-7 (δ_H 2.60), lo cual se confirma con base en su espectro NOESY.

Por otro lado, la señal simple δ_H 1.18 (*s*, 3H), se asigna al CH₃-14. En δ_H 1.79, la señal *ddd* ($J = 10$ y 3 Hz), se asignó al H-8 con disposición β -axial acoplada de manera anti-periplanar con H-9 α_{ax} (δ_H 1.68, *dd*, $J = 10$ y 3 Hz) y con H-7 (δ_H 2.60). Las dos señales obscurecidas δ_H 2.13 y δ_H 1.75 corresponden a H-8 α_{ec} y H-9 β_{ec} respectivamente; la variación de los desplazamientos químicos en C-8 y C-9, es debido a que son adyacentes a centros estereogénicos, de ahí su naturaleza diastereotópica.

Los desplazamientos químicos anteriormente discutidos concuerdan con los informados en la literatura para la tuberiferina (**51**), sustancia previamente aislada de *Sonchus tuberifera* [38].

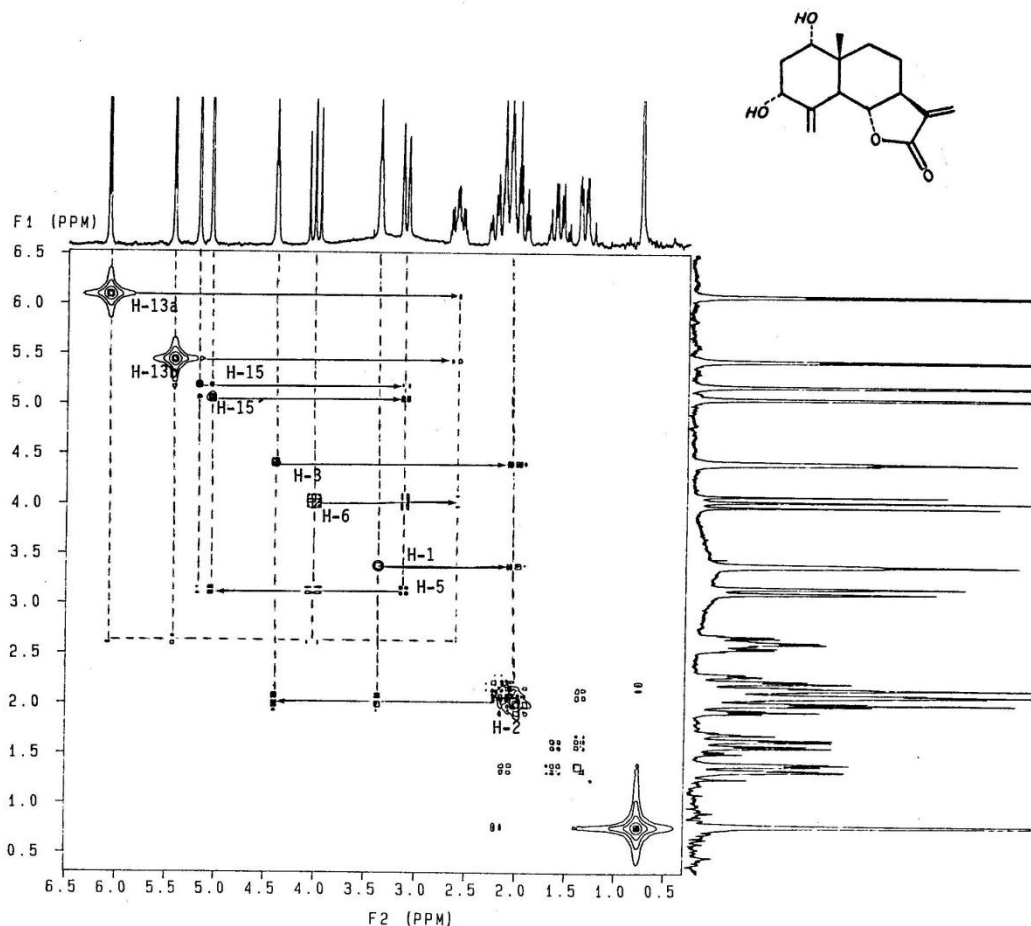


Por otro lado, el producto mayoritario de la biotransformación de **1** con *C. lunata*, corresponde a un sólido blanco que en su espectro de IR, se observan bandas características de $\nu(\text{O-H})$ en 3597 cm^{-1} y $\nu(\alpha\text{-metileno-}\gamma\text{-lactona})$ en 1768 cm^{-1} . En su espectro de masas por impacto electrónico presenta un ion molecular de m/z . 264 (15.3%), el cual se asocia a una fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$.

En el espectro de RMN- ^1H de **52** se observan las señales δ_{H} 6.10 (*d*, $J = 3\text{Hz}$, 1H) y δ_{H} 5.47 (*d*, $J = 3\text{Hz}$, 1H) que corresponden al doble enlace *exo*-cíclico de la γ -lactona. Las señales en δ_{H} 5.21 (*s.a.*) y δ_{H} 5.08 (*s.a.*) corresponde al metileno *exo*-cíclico entre los C-4 y C-15; la variación en el desplazamiento químico de H-15_a a campo bajo es generado por el efecto estérico del grupo hidroxilo localizado en C-3. La señal triple centrada en δ_{H} 4.04 (*t*, $J = 12\text{ Hz}$, 1H) corresponde al H-6, el cual tiene una orientación β_{ec} , lo cual sugiere que presenta un esqueleto de eudesmano.

Las señales de los hidrógenos en el C-15, se confirman por las señales de H-3 (δ_{H} 4.42, *t*, $J = 3\text{ Hz}$, 1H) y H-15 (δ_{H} 3.15, *dt*, $J = 12$ y 1.5 Hz , 1H), las cuales muestran acoplamiento alílico con el metileno en C-4. El desplazamiento químico en H-3 a campo bajo es debido a la presencia del grupo hidroxilo, cuya orientación en el C-3 es α -axial. Lo anterior se comprueba por la constante de acoplamiento del H-2 α_{ec} en δ_{H} 2.11 y el H-2 β_{ax} δ_{H} 1.98 (*ddd*, $J = 15$ y 3 Hz 1H), mientras el H-5 se desprotege por el efecto inductivo del metileno exocíclico entre los C-4 y C-15, presentando un acoplamiento alílico ($J = 1.5\text{ Hz}$) con el metileno del C-15; y una interacción *trans* axial con H-6 ($J = 12\text{ Hz}$).

Por otro lado, la señal triple en δ_{H} 3.40 ($J = 3\text{ Hz}$, 1H), se asignó a H-1 que se encuentra geminal a un grupo hidroxilo, de acuerdo con su espectro COSY, ver esquema 34, dicho hidrógeno muestra una interacción con H-2 α y H-2 β ; el valor de su constante de acoplamiento establece una disposición α_{ax} .

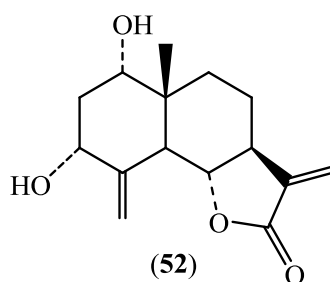


Esquema 34. COSY de la ludovicina B (**52**).

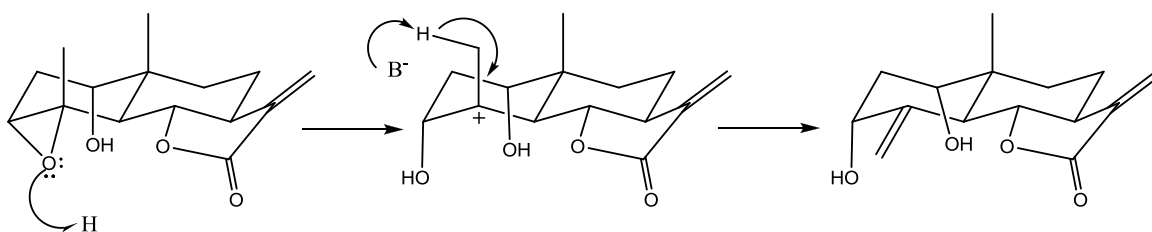
En δ_H 2.63 (*dddd*, $J = 12$ y 3 Hz, H-1) se observa un sistema ABX que se asignó a H-7, el cual se acopla de manera antiperiplanar con H-6 y H-8 β_{ax} , y con acoplamiento alílico con H-13.

Señales adicionales se localizan en δ_H 1.58 (*ddd*, $J = 12$ y 3 Hz, 1H) y δ_H 2.16 (*m*, 1H), las cuales corresponden a H-8 β_{ax} y H-8 β_{ec} respectivamente, y muestran acoplamientos con los H-9 β_{ec} (δ_H 1.37, *m*) y H-9 β_{ax} (δ_H 2.24, *dd*, $J = 15$ y 3 Hz).

Con base en lo anterior, se estableció que el producto mayoritario de la biotransformación corresponde a la ludovicina B (**52**) [24, 39].

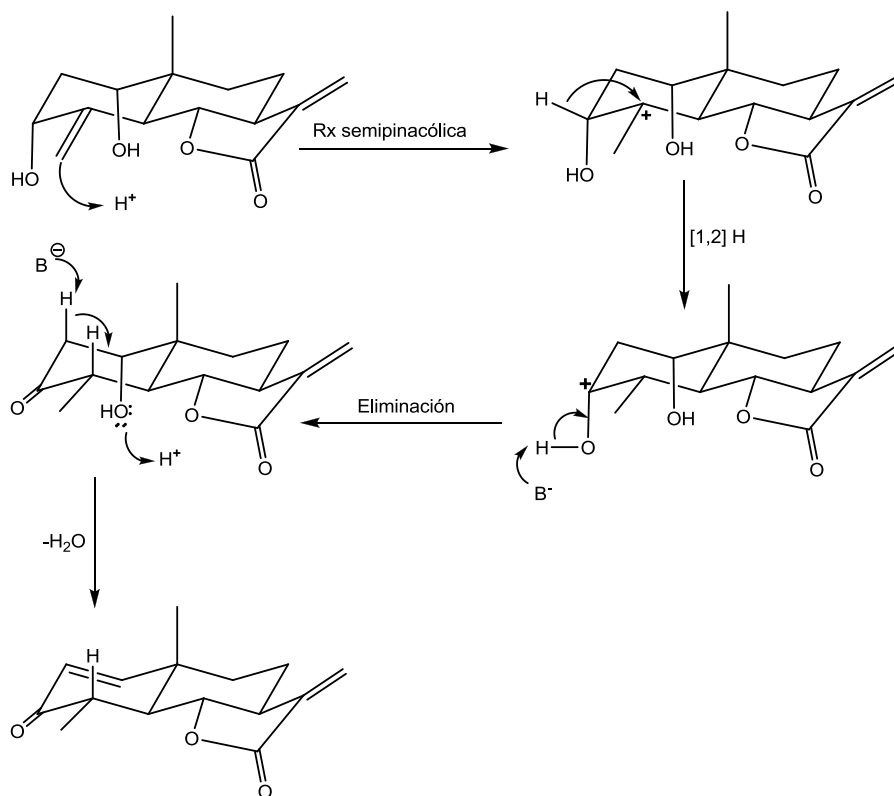


Los productos obtenidos de la bioconversión de **1** con *C. lunata* en el medio B, fueron **51** y **52**. La formación de dichos productos puede ser racionalizada mediante la apertura regioselectiva del oxirano para generar el carbocatión más estable sobre C-4, para posteriormente sustraer un protón del C-15 y generar el metileno *exocíclico* entre C₄-C₁₅ de **52**, ver esquema 35.



Esquema 35. Propuesta de mecanismo para la bioconversión de la ludovicina A (**1**) con *C. lunata* para dar ludovicina B (**52**).

Posteriormente, la formación de **51** se da a partir de la protonación del metileno *exocíclico* $\Delta^{4,15}$ para generar un carbocatión terciario en C₄, seguido de una reacción semipinacólica [40], como se describe en el esquema 36. El carbocatión terciario en C₄, es estabilizado por la transposición de un hidruro para generar un ion oxonio, el cual se estabiliza mediante la formación de la forma ceto. La sustracción de H-2 β y la salida de una molécula de agua favorecen la formación de la cetona α - β insaturada en **51**.



Esquema 36. Propuesta de mecanismo para la bioconversión de ludovicina A (**1**) con *C. lunata* para dar tuberiferina (**51**).

VIII. CONCLUSIONES.

8.1) A partir del extracto CH₂Cl₂ de *Artemisia ludoviciana* ssp mexicana, recolectada en San Pedro Actopan, Milpa Alta, se obtuvieron los compuestos: ludovicina A (**1**), arglanina (**2**) y ridentina (**3**).

8.2) A partir del extracto CH₂Cl₂ de *Artemisia ludoviciana* ssp mexicana, recolectada en San Rafael Tlalmanalco, Edo. De México, se obtuvieron los compuestos: ludovicina A (**1**), y arglanina (**2**).

8.3) Se identificó y caracterizó a la ridentina (**3**) y se obtuvo su derivado diacetilado (**54**) por medio del tratamiento ridentina (**3**) con anhídrido acético y piridina a temperatura ambiente.

8.4) De la biotransformación de la ridentina (**3**) con *C. lunata*, se obtuvo el epímero de la vulgarina (**50**) como producto mayoritario, en el medio B.

8.5) De la biotransformación de la ludovicina A (**1**) con *C. lunata* en el medio B, se obtuvieron ludovicina B (**52**) y tuberiferina (**51**).

8.6) De la biotransformación de la arglanina (**2**) con *C. blackesleena* en el medio A, se obtuvo a la vulgarina (**49**) como producto mayoritario.

La hidrogenación del doble enlace Δ^{11-13} , es un proceso común observado en la biotransformación microbiana de las lactonas sesquiterpénicas por hongos filamentosos. La hidrogenación regioselectiva Δ^{11-13} , puede ser un mecanismo de defensa de los hongos contra la actividad antifúngica de algunas lactonas. Como ya se ha mencionado el grupo funcional α -metileno- γ -lactona es responsable de esta actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas [10, 20, 22, 41-42]. Por otro lado, la bioconversión de **3** a **50** y de **1** a **51** y **52** se debe de enfatizar por su importancia biogénica [39, 43]. La formación del oxirano como intermediario, ha sido informada en la biotransformación de los sesquiterpenos [44], se conoce bien que son compuestos altamente reactivos por lo que en ocasiones son difíciles de obtener.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

1. Gonzaga de Oliveira, L. and Moraes, M. S., *Transformaciones biológicas: contribuciones y perspectivas. Quim. Nova* **2009**; 32, 742-756.
2. Giri, A.; Dhingra, V.; Giri, C. C.; Sing, A.; Ward, O. P.; Narasu, M. L., Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: Current trends and future prospects. *Biotechnology Advances* **2001**; 19, 175-199.
3. Aleu, J., Bustillo, A. J., Hernández-Galán, R., and I. G. Collado., *Biocatalysis Applied to the Synthesis of Agrochemicals. Current Organic Chemistry*, **2006**; 10, 2037-2054.
4. Urlacher, V., Schmid, R. D.; *Biotransformations using prokaryotic P450 monooxygenases. Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, 13, 557-564
5. Thomas, S. M., Di Cosimo, R., Nagarajan, V., Biocatalysis applications and potentials for the chemical industry. *Trends Biotechnol.* **2002**; 6, 238-42.
6. Straathof, A. J., Panke, S., Schmid, A., The production of fine chemicals by biotransformation. *Curr. Opin Biotechnol.* **2002**; 13, 548-556.
7. Beukers, R.; Marx, A. F.; and Zuidweg, M. H. J.: In drug design- Microbial Conversion as a tool in the preparation of drugs. Ariens, E. J.; Ed Academic Press New York. **1972**; vol. 3 pp 1-131.
8. Venissey, R. K. Ciddi, V., *Application of Microbial Biotransformation for the new Drug Discovery Using Natural Drugs as Substrates. Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2003**; 3; 153-167.
9. Malagón, F., Vazquez J., Delgado, G. and Ruíz, A.; Ethanollic Extract of *Artemisia ludoviciana*: Effect on *Plasmodium berghei* Infection in CDI mice. IV Congresso Internacional Sobre Malaria e Babesioses. **1991**; Rio de Janeiro, Brasil.
10. Zhang, S., Won, Y-K., Ong, C-N and Shen, H-M, *Anti-Cancer Potential of Sesquiterpene Lactones; Bioactivity and Molecular Mechanisms, Curr, Med, Chem—Anti-Cancer Agents.* **2005**; 5, 239-249.
11. Marco, J. A. and Barbera, O.; *Natural Products from the Genus Artemisia I. Studies in Natural Products Chemistry. Atta-ur-Rahman*, **1990**; 7, 201-264.
12. Hernández, F. In Historia Natural de la Nueva España. México D.F. *Ediciones UNAM.* **1959**.

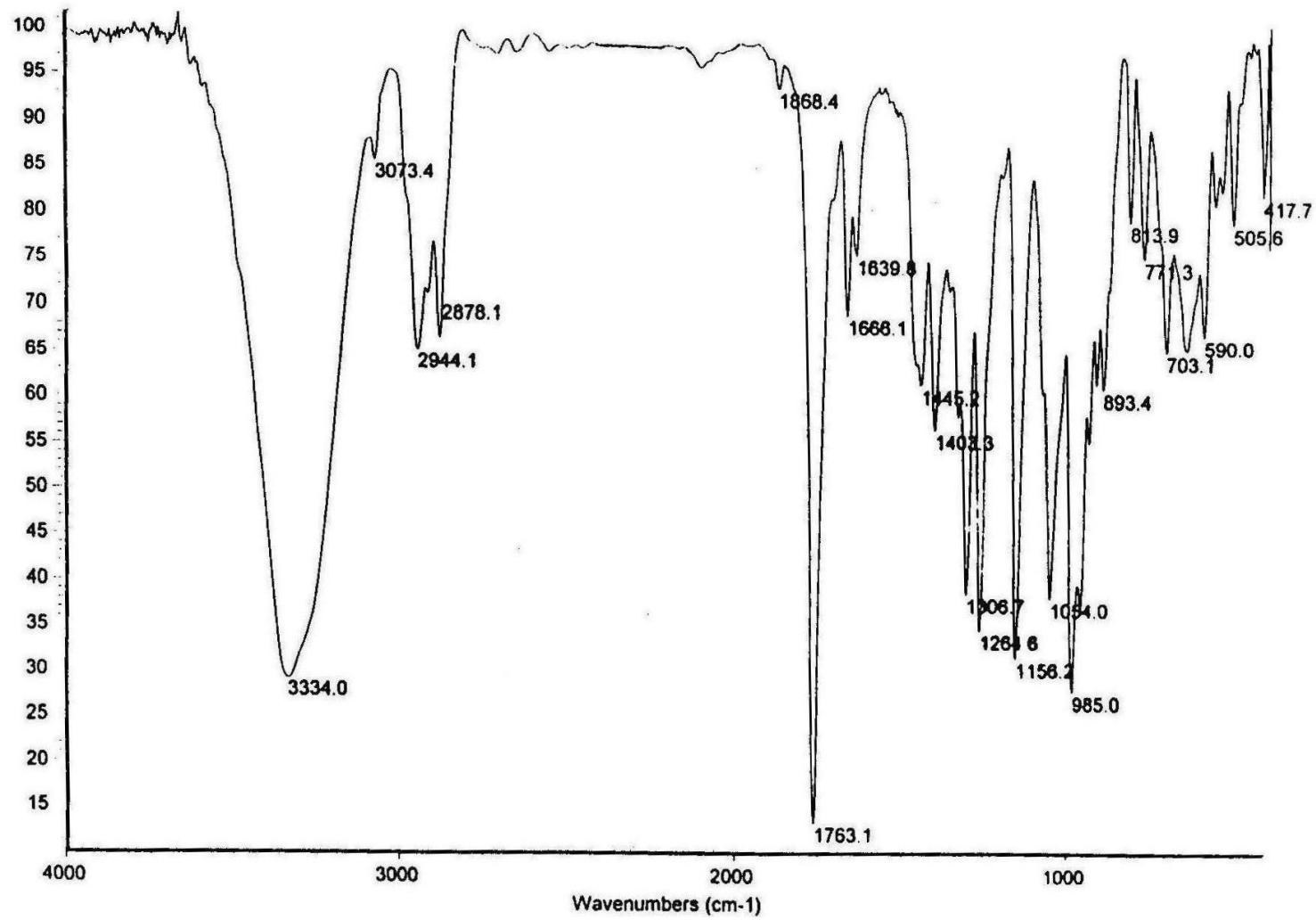
13. Martínez, M., *Las plantas medicinales de México*. México, D. F. Ed. Botas. **1969**.
14. Ruíz-Cancino, A., *Análisis fitoquímico de Artemisia ludoviciana en busca de sustancias con propiedades antimaláricas*. Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias Químicas e Industriales, UAEM **1991**. Cuernavaca (Mor.), México
15. Fraga, B. M. *Natural Sesquiterpenoids*. *Nat. Prod. Rep.* **1998**; *15*, 73-92.
16. Marco, J. A. and Barbera, O.; *In Studies in Natural Products Chemistry*. (Attar-Rahman de.), Elviesier Science Publisher B. V., Amsterdam, **1990**; *7*, 201-264
17. Fraga, B. M. *Natural Sesquiterpenoids*. *Nat. Prod. Rep.* **2000**; *17*, 483-504.
18. Rodríguez, E., Torres, G. H. N., Mitchell, J. C. *Biological activities of sesquiterpene lactones*. *Phytochemistry* **1976**; *15*, 1573-1580.
19. Picman, A. K. *Biological activities of sesquiterpene lactones*. *Biochem. Sys. Ecol.* **1986**; *14*, 255-281.
20. Robles, M., Aregullin, M., West, J., Rodríguez, E., *Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones*. *Planta Med.* **1995**; *61*, 199-203.
21. Fraga, B. M., *Natural sesquiterpenoids*. *Nat. Prod. Rep.* **1997**; *14*, 145-162.
22. Marles, R. J., Pazos-Sanou, L., Compadre, C. M., Pezzuto, J. M., Boszky, E., Arnason, J. T., Mata, R., Romeo, J. T., *Sesquiterpene lactones revisited: recent developments in the assessment of biological activities and structure relationships*. *Phytochem Med Plants*; **1995**; *29*, 333-336.
23. Ruíz-Cancino, A., Cano, A. E. and Delgado, G., *Sesquiterpene lactones of Artemisia ludoviciana ssp mexicana*. *Phytochemistry* **1993**; *33*, 1113-1115.
24. Lee, K. H. And Geissman, T. A., *Sesquiterpene lactones of Artemisia ludoviciana ssp mexicana*. *Phytochemistry* **1970**; *9*, 403-408.
25. Schmidt, T., J., *Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects*. *Curr. Org. Chem.* **1999**; *3*, 577-608.
26. Benkovic, S., Hammes-Schiffer, S., *A perspective on enzyme catalysis*, *Science* **2003**; *301*, 1196.

27. Roberts, S., M., Wiggins, K., Casy, G., *Preparative Biotransformations; Whole Cells and Isolated Enzymes*. **1993**. Wiley, Chichester.
28. Roberts, S., M., Turner, N. J., Willetts, A. J., Turner, M. K., *Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Micro-organisms*. **1995**. Cambridge University Press. Cambridge.
29. Zaks, A., *Industrial biocatalysis*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**; *5*, 130-136.
30. Huisman, G. W., Gray, D. *Towards novel processes for the fine chemical and pharmaceutical industries*. *Curr. Opin Biotechnol.* **2002**; *13*, 352-358.
31. Wainwright, M., *Introducción a la biotecnología de los hongos, Zaragoza, España*. Ed. Acribia, S.A., **1995**. 10-22
32. Elmarakby, S. A., El-Feraly, F. S., Elsohly, H. N., Croom, E., M., Hufford, C., D., Microbial transformation studies on *Arteannuin B*, *J. Nat. Prod.* **1987**; *50*, 903-909.
33. Lee, I-S, El-Sohly, H. N., Croom, E. and Hufford, Ch.,. Microbial metabolism studies of the antimalarial sesquiterpene artemisinin. *J. Nat. Prod.* **1989**; *52*, 337-341.
34. Atta-ur-Rhaman, A-U., Choudhary, M: L:, Ata, A., Alam, M., Farooq, A., Perveen, S., Shekhani, M: S., *Microbial transformation of 7 α -didroxifrullanolida*. *J. Nat. Prod.* **1994**; *57*; 1251-1255.
35. Barrero, A. F., Oltra, J. E., Raslan, D. S. and Saúde, D. A.,. Microbial transformation of sesquiterpene lactones by the fungi *Cunningamella echinulata* and *Rhizopus oryzae*. *J. Nat. Prod.* **1999**; *62*, 726-729.
36. Galal, A. M., Ibrahim, A-R. S., Mossa, J. S., El-Feraly, F. S., Microbial transformation of parthenolide. *Phytochemistry* **1999**; *51*, 761-765.
37. Galal, A. H., Microbial transformation of Pyrethrosin. *J. Nat. Prod.* **2001**; *64*, 1098-1099.

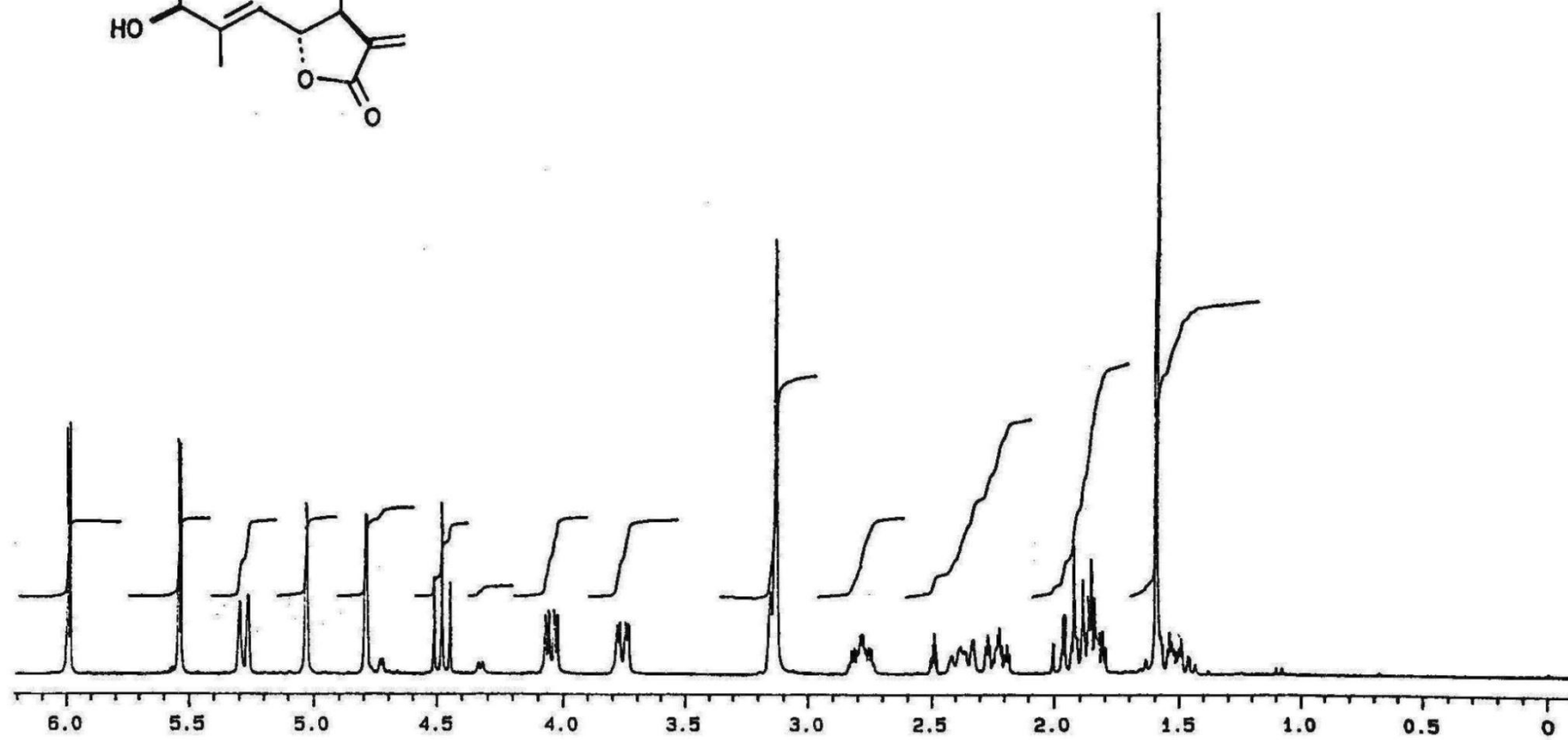
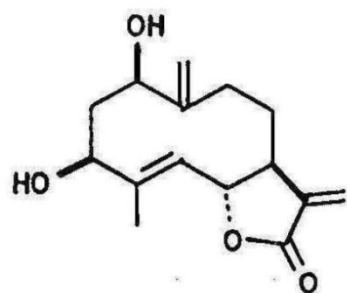
38. Bermejo, J. B., Bretón, J. L., Fajardo, M., González, A. G., Terpenoids from *Sonchus tuberosus* Swent. *Tetrahedron letters* **1967**; *36*, 3475-3476.
39. Mata, R., Delgado, G., Romo de Vivar, A., Sesquiterpene Lactones of *Artemisia ludoviciana* mexicana var. *Angustifolia*. *Phytochemistry*, **1984**; *23*, 1665-1668.
40. March J.; *Advanced Organic Chemistry*, **1992**; *4*, Wiley-Interscience, New York, 1132.
41. Wedge, D. E., Galindo, J. C. G., Macías, F. A., Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry*, **2000**; *53*, 747-757
42. Matsueda, S. Geismann, T. A., Sesquiterpene lactones of *Artemisia* species III. Arglanine from *Artemisia douglasiana* Bess. *Tetrahedron Letters*, **1967**; *21*, 2013-2015.
43. García-Granados, A., Gutiérrez, M. C., Parra, A., Rivas, F., Chemical-microbiological synthesis of cryptomeridiol derivatives by *Gliocladium roseum*; semisynthesis of 11-hydroxyeudesmanolides. *J. Nat. Prod.* **2002**; *65*, 1011
44. Yanakawa, K.; Tomonaga, T.; Nishitani, K., Chemical transformation of α -santonine into sesquiterpene α -methylene- γ -lactones, arglanine and santamarine. *Tetrahedron letters*, 4137 (**1975**).

X. ESPECTROS.

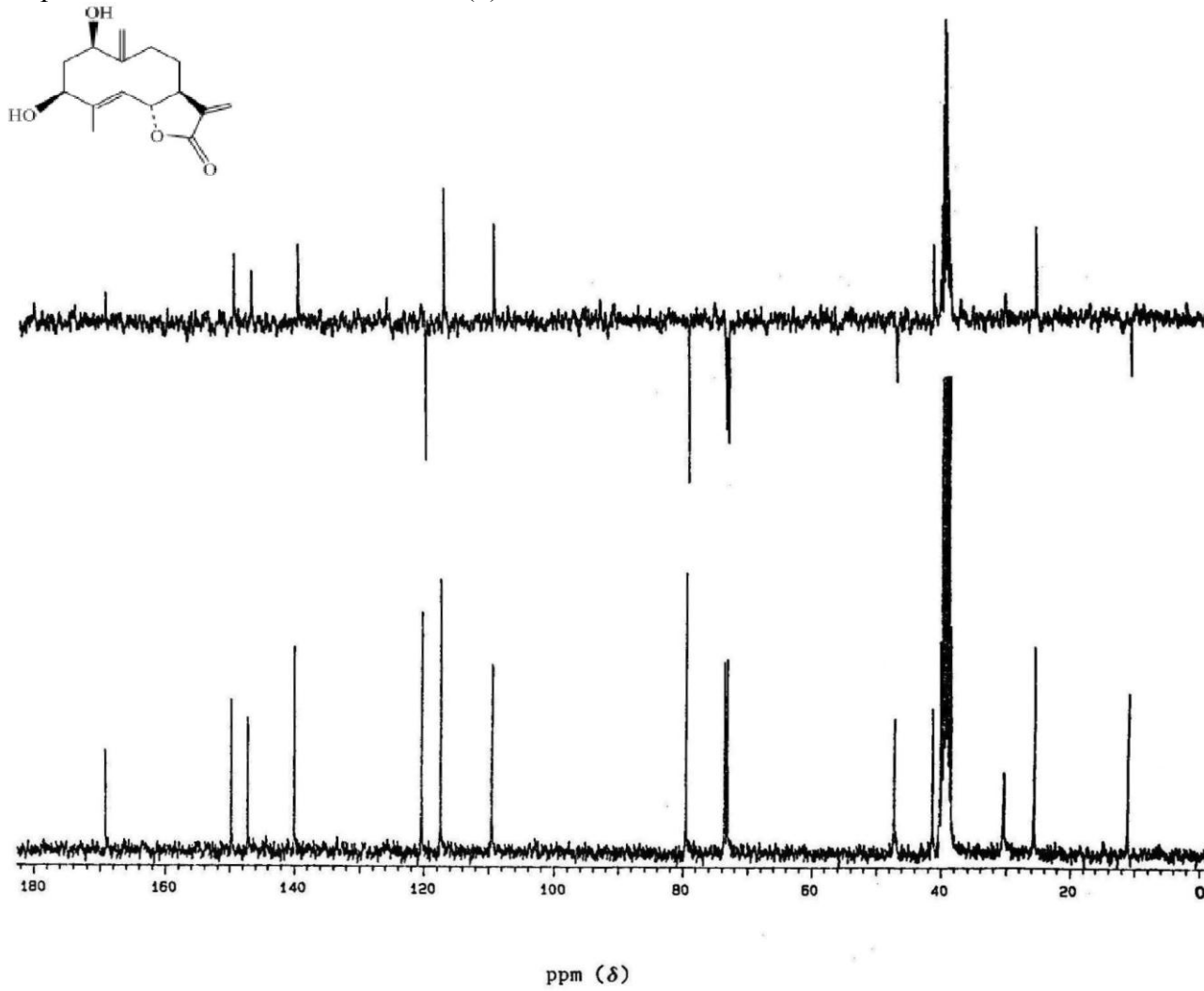
Espectro 1. IR de la ridentina (3)



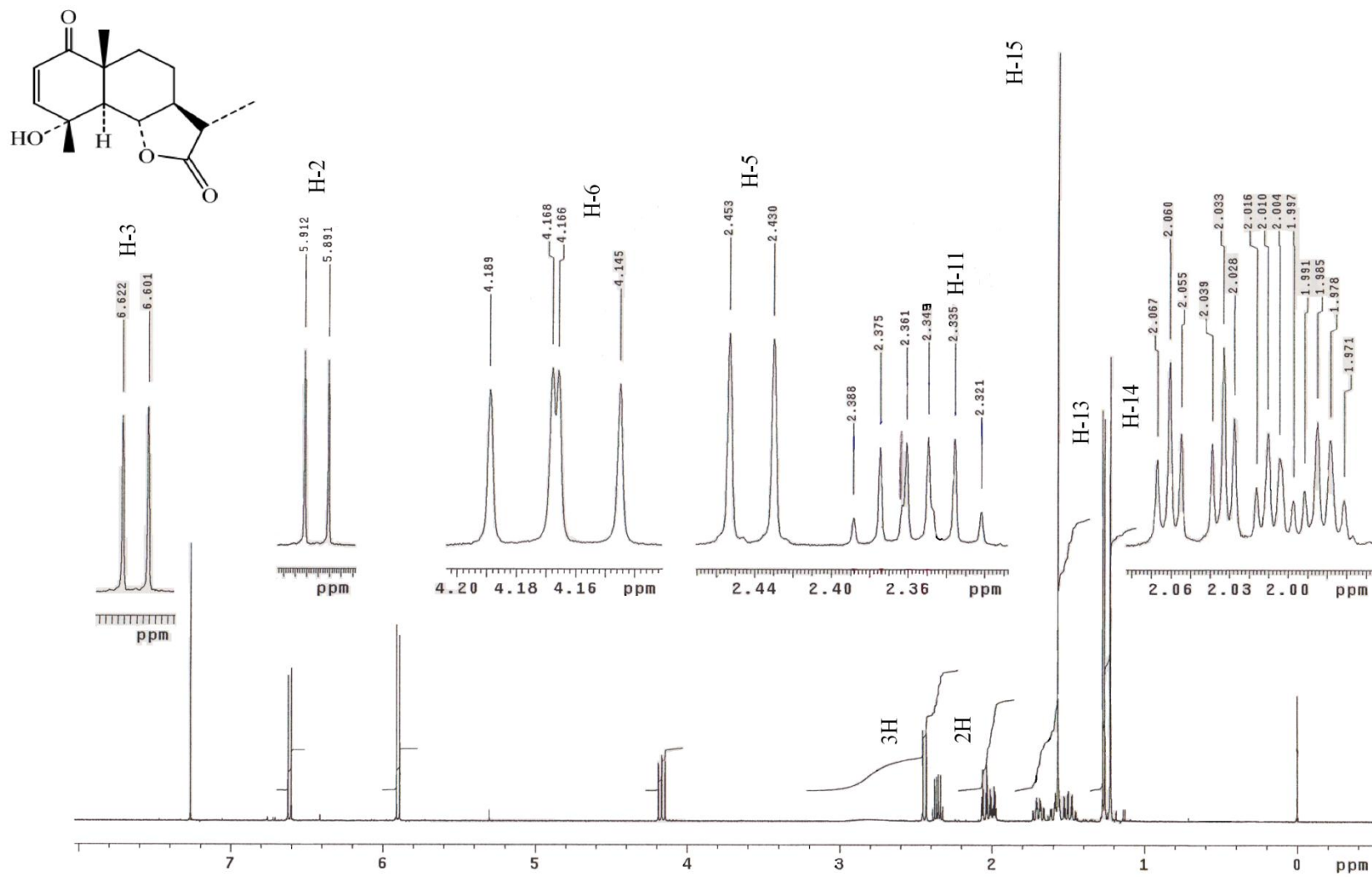
Espectro 2. RMN¹H de la ridentina (3)



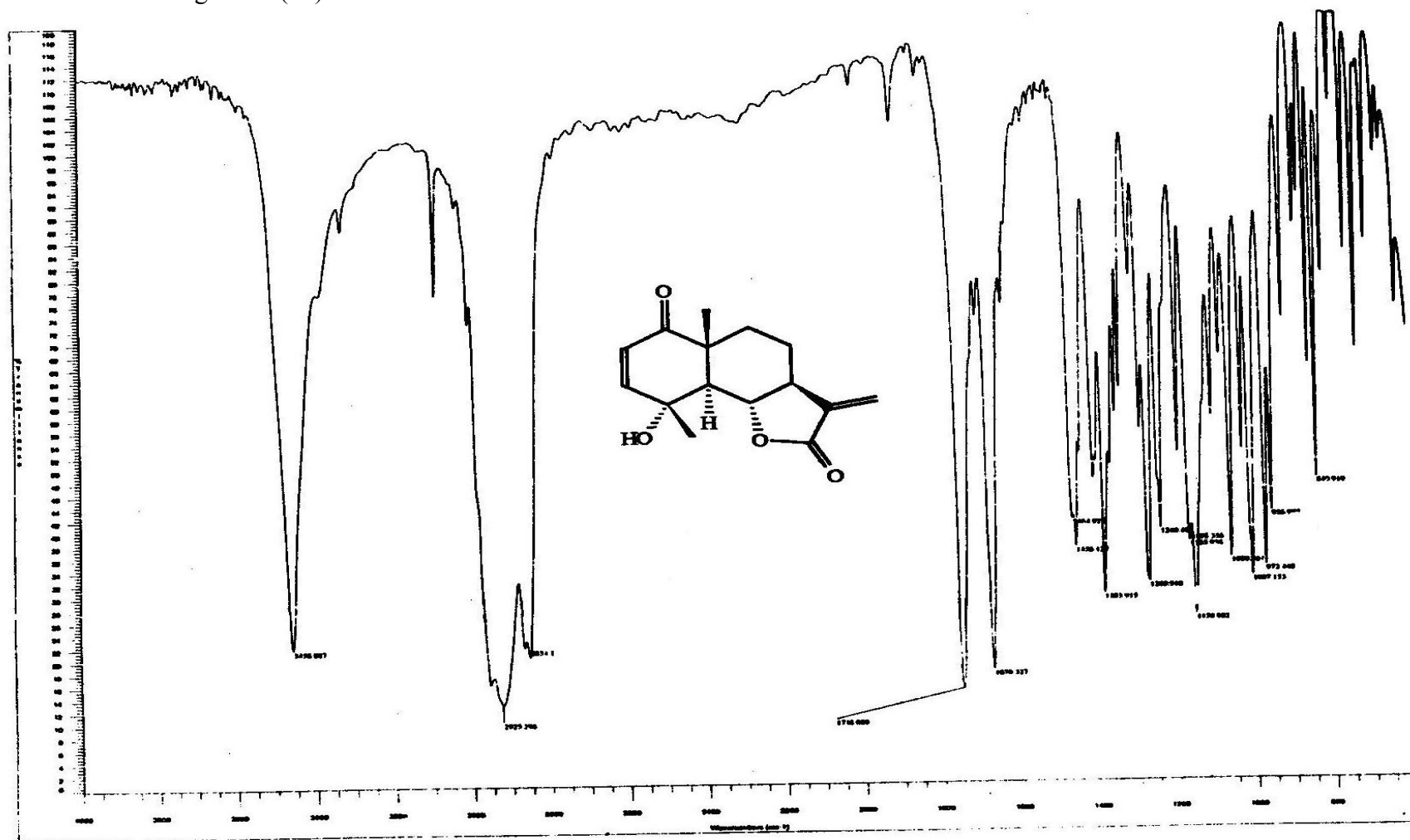
Espectro 3. RMN ^{13}C de la ridentina (3)



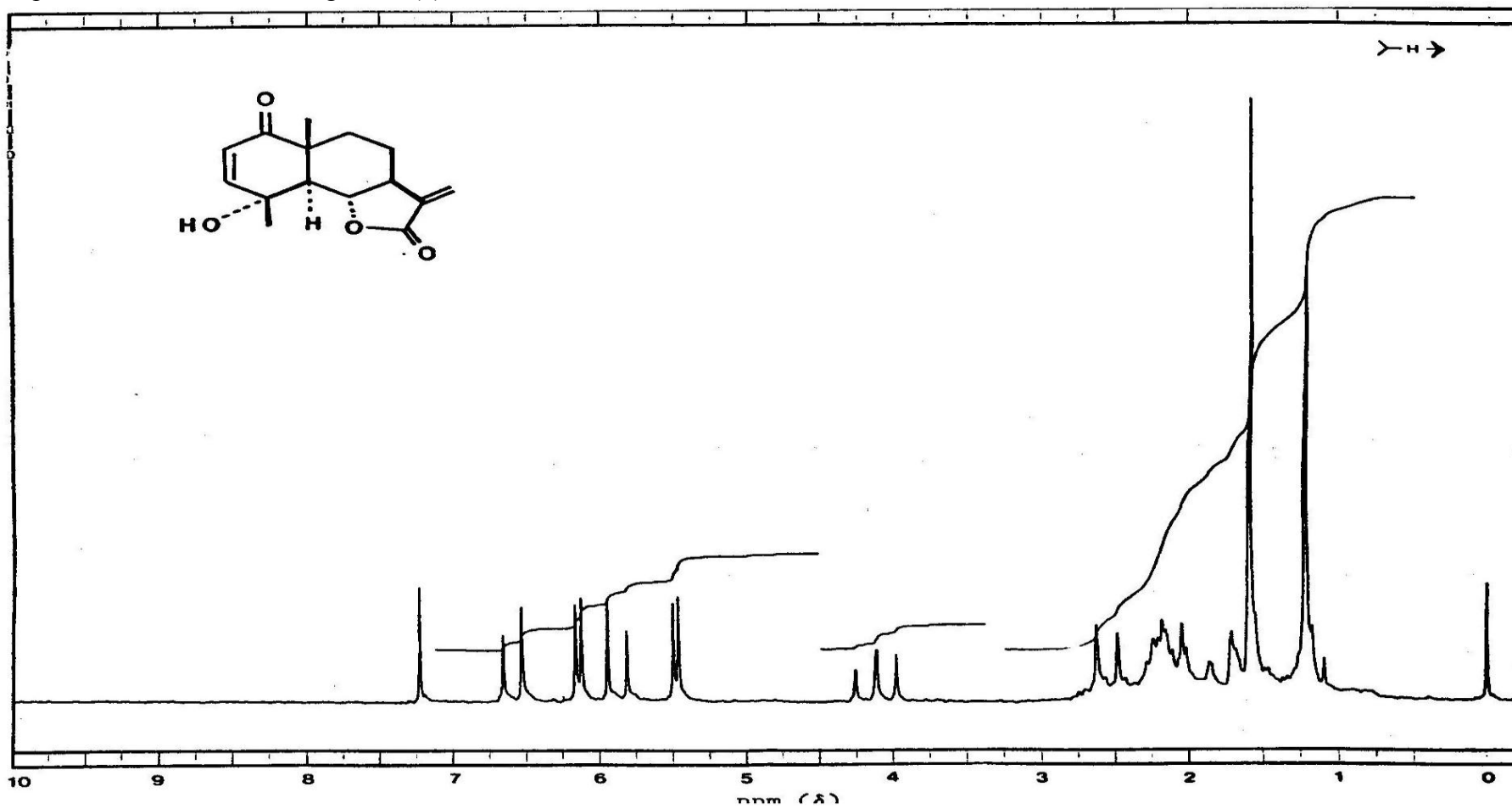
Espectro 4. RMN ^{-1}H de la vulgarina (49).



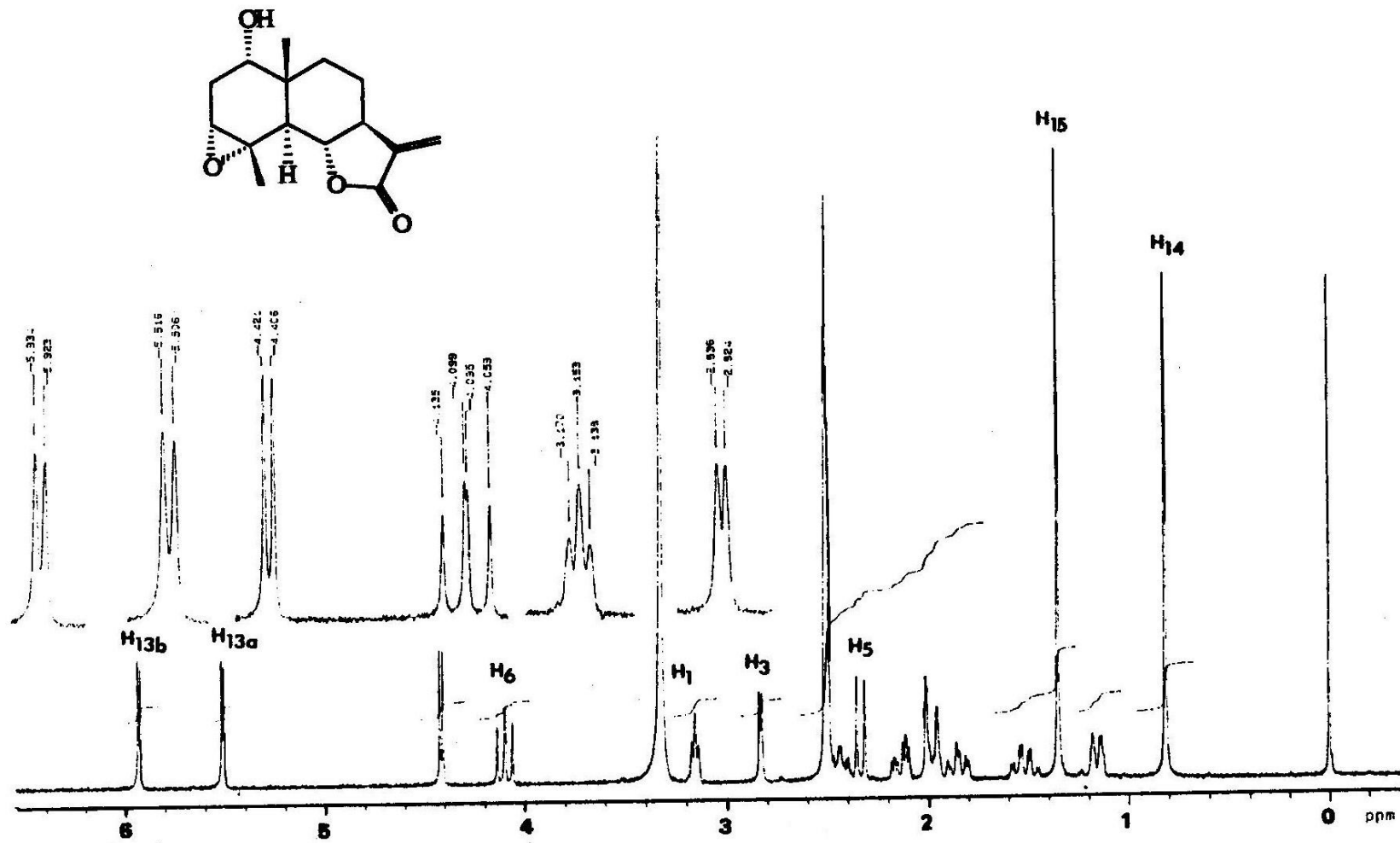
Espectro 5. IR de la arglanina (49).



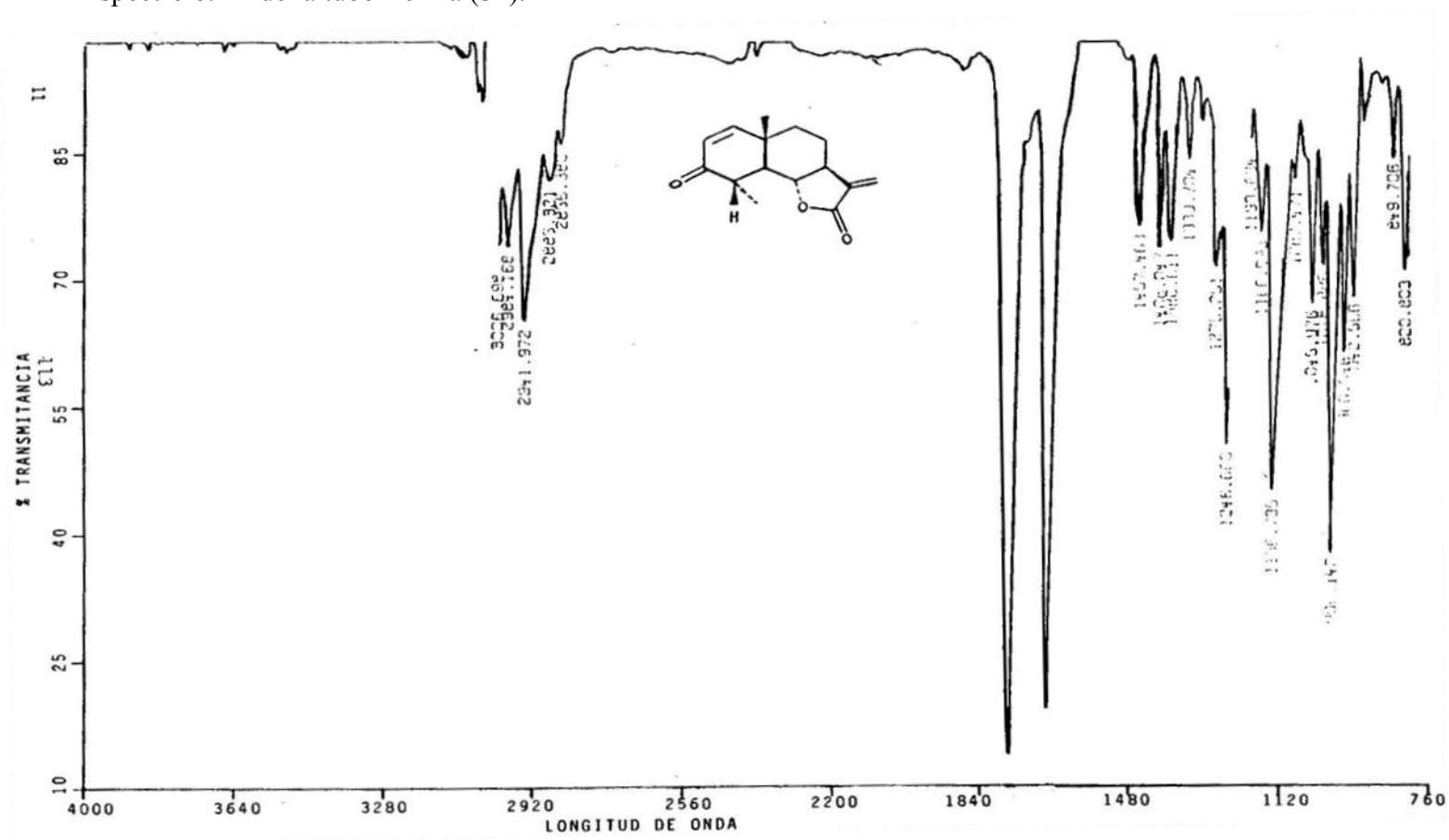
Espectro 6. RMN ^{-1}H de la arglanina (2).



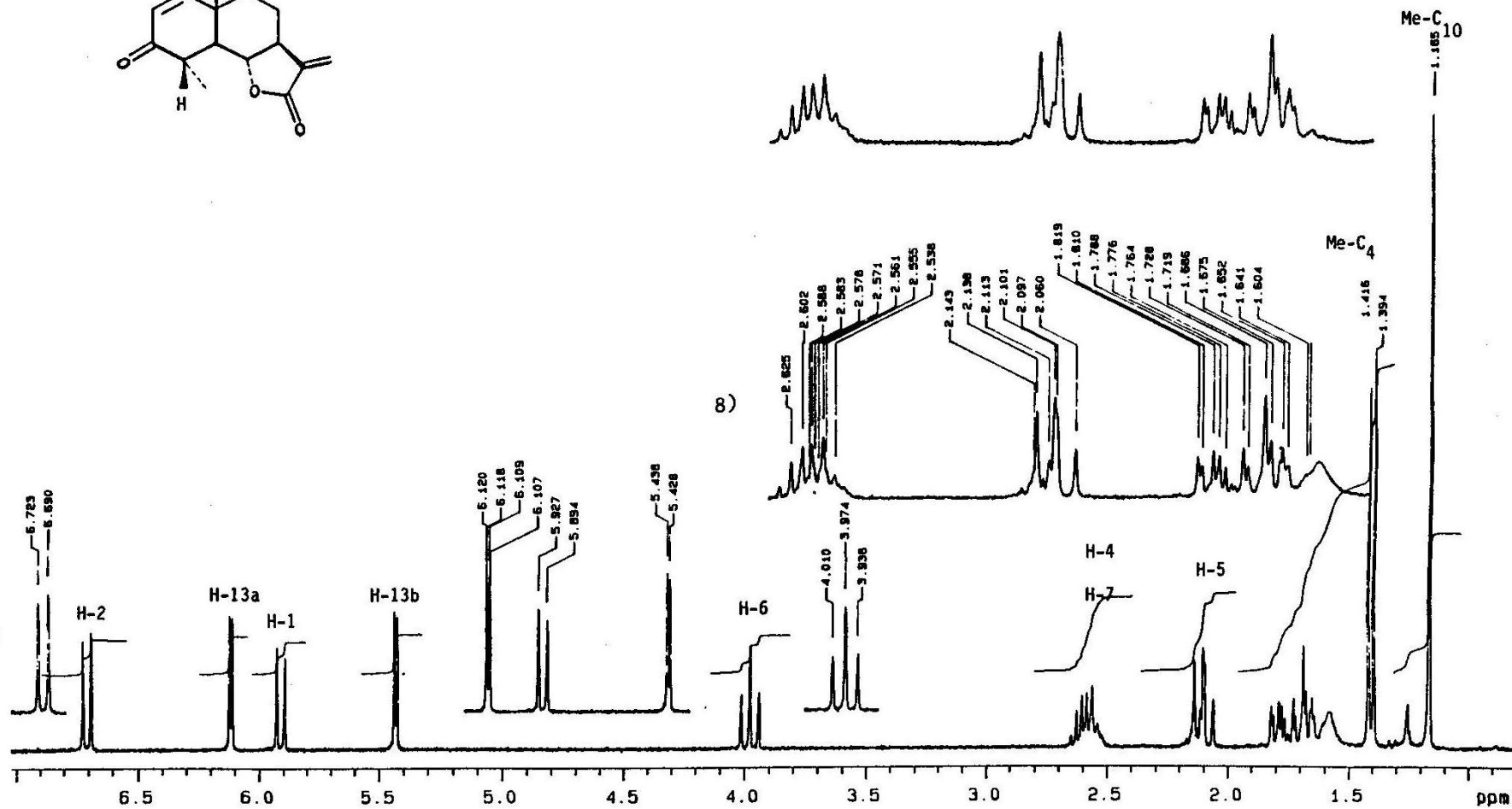
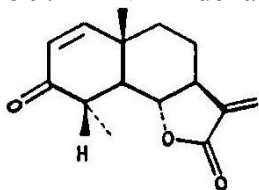
Espectro 7. RMN ^1H de la ludovicina A (1).



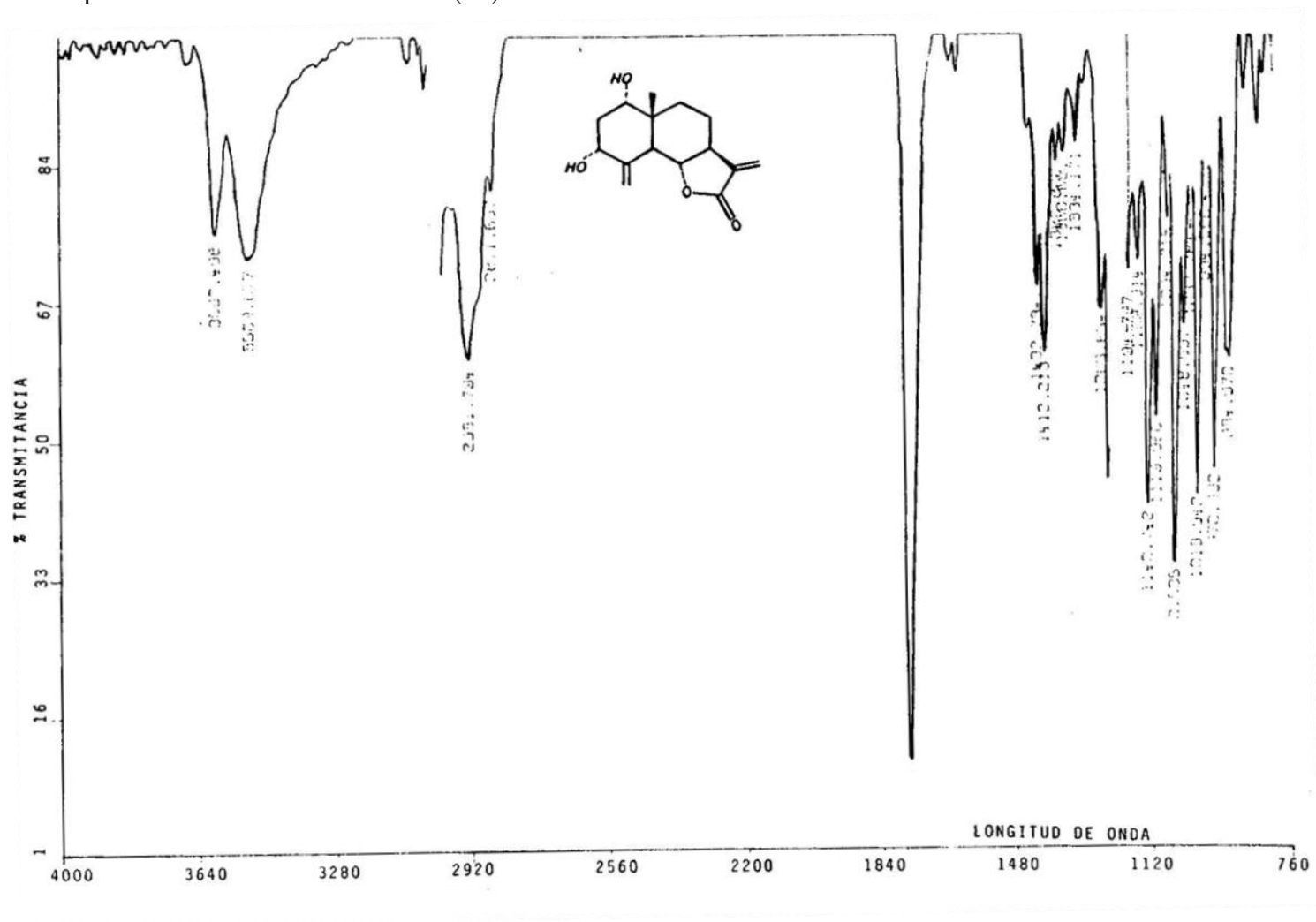
Espectro 8. IR de la tuberiferina (51).



Espectro 9. RMN-¹H de la tuberiferina (51).



Espectro 10. IR de la ludovicina B (52).



Espectro 11. RMN-¹H de la ludovicina B (52).

