



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Obtención de los complejos de inclusión del ácido
3 α -hidroximasticadienónico con ciclodextrinas y
su biotransformación con diferentes hongos**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

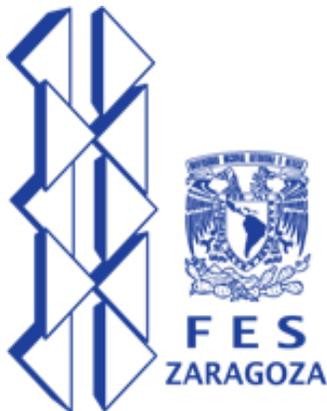
B I Ó L O G O

PRESENTA:

OMAR FERNANDO ADAME ROSAS

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES



CIUDAD DE MÉXICO, 2016.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **ADAME ROSAS OMAR FERNANDO**, con número de cuenta **307048709**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **08 de noviembre de 2016** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Q.F.I. MARÍA DEL CARMEN NIÑO DE RIVERA OYARZABAL

VOCAL M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

SECRETARIO Biól. MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ MUÑOZ

SUPLENTE Dra. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

Hortensia Rosas A

SUPLENTE Biól. JOSÉ RIGOBERTO RAMOS VELÁZQUEZ

El título de la tesis que presenta es: **Obtención de los complejos de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico con ciclodextrinas y su biotransformación con diferentes hongos.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE DE ESTUDIOS SUPERIORES
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 04 de octubre de 2016

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR DIRECCIÓN



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

AGRADECIMIENTOS

A la DGAPA por su apoyo al proyecto IN216012.

A la Dra. Ma. Elena Villafuerte Castrejón, Instituto de Investigaciones en Materiales (IMM), UNAM.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, Instituto de Química (IQ), UNAM.

A la Q.F.B Damaris Cabrero Palomino, Instituto de Investigaciones en Materiales (IMM), UNAM.

A la M. en C. Adriana Tejeda Cruz, Instituto de Investigaciones en Materiales (IMM), UNAM.

Al Personal Académico, Instituto de Química (IQ), UNAM.

A la Carrera de Biología, FES Zaragoza, UNAM.

DEDICATORIAS

A Silvia Rosas V., por haberme cuidado, educado e inculcado los valores que hoy en día me caracterizan. Porque en momentos malos, siempre tuviste un consejo que me ayudara a salir adelante; me apoyaste con palabras, con cariño, con aliento durante mis años vividos hasta ahora. Pero, sobre todo por haberme querido sin condición alguna, como solo una madre puede hacerlo, con defectos, virtudes, errores y aciertos; con las particularidades que hasta hoy, me distinguen como persona.

A Alberto Adame C., por haberme dado el mejor ejemplo de cómo ser un hombre caudal, responsable, afectivo, paciente y dedicado. Porque gracias a tu esfuerzo y trabajo jamás nos hizo falta nada. A tí, porque me enseñaste que, para aprender cosas nuevas solo hace falta tener la determinación de hacerlo. Por el cariño y consejos que, solo un padre puede brindar a un hijo en los momentos que más lo necesita.

A mis hermanos César y Eduardo, por ser la mejor compañía que pude tener en mi infancia. En momentos buenos y malos siempre estuvimos unidos como un equipo. Porque entre risas, peleas, bromas y juegos, aprendimos a disfrutar la vida; a competir y a compartir, a crecer y mejorar como personas.

A Elisa, por apoyarme en esta última etapa de mi formación universitaria. Porque en momentos en los que estaba a punto de darme por vencido, siempre tuviste palabras de aliento para que siguiera adelante.

Al profesor Arturo Cano, por creer siempre en mi capacidad como estudiante y haberme dado la confianza de trabajar en un proyecto de investigación de tales magnitudes. Porque los regaños, consejos y elogios me ayudaron a crecer como profesionalista.

A mis compañeros y amigos de la FES-Zaragoza, por regalarme momentos inolvidables a lo largo de este período de formación académica que, con el tiempo se han convertido en anécdotas inolvidables marcando de manera importante mi trayecto por la facultad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 314, por haber compartido siempre un pensamiento crítico de aprendizaje, sin dejar de lado un buen sentido del humor, haciendo de aquel espacio de trabajo, un ambiente sumamente agradable.

A mis prehistóricos camaradas del Colegio de Ciencias y Humanidades, por estar conmigo siempre en los momentos buenos y malos, unidos como una familia.

A todos ustedes, muchas gracias por formar parte de mi vida.

El presente trabajo fue presentado en el 34° Congreso Nacional de Educación
Química y 50° Congreso Mexicano de Química.

Cd. de Querétaro, Que., México.

2015

ÍNDICE.

ABREVIATURAS.....	I
RESÚMEN.....	III
INTRODUCCIÓN.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Características del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1).....	3
1.2. Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1): Biosíntesis Propuesta.....	4
1.3. Generalidades de los hongos.....	6
1.4. Ciclos de vida de los hongos.....	8
1.5. Clasificación taxonómica de las cepas empleadas.....	14
1.6. Generalidades de las Biotransformaciones.....	16
1.7. Biotransformaciones con hongos.....	17
1.8. Citocromo P450.....	17
1.9. Metabolismo de xenobióticos.....	19
1.10. Biotransformación de triterpenos.....	20
1.11. Uso de coadyuvantes de la solubilidad en las Biotransformaciones.....	24
1.12. Características de las ciclodextrinas.....	25
1.13. Complejos de inclusión.....	27
2. JUSTIFICACIÓN.....	30
3. HIPÓTESIS.....	31
4. OBJETIVO GENERAL.....	32
4.1. Objetivos Particulares.....	32
5. MATERIAL Y MÉTODO EXPERIMENTAL.....	33
5.1. Separación y purificación de los compuestos.....	33

5.2.	Obtención del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1).....	34
5.3.	Ciclodextrinas (CDs).	34
5.4.	Complejos de inclusión.....	34
5.4.1.	Obtención de los complejos de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) mediante una mezcla física.	34
5.4.2.	Obtención del complejo de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) mediante el método de co-evaporación.....	39
5.4.3.	Caracterización de los complejos de inclusión entre el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) mediante la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	39
5.4.4.	Caracterización de los complejos de inclusión entre el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) mediante la técnica de difracción de Rayos X.....	46
5.4.5.	Caracterización de los complejos de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) por espectroscopia de IR.....	46
5.5.	Biotransformación de 1 /HP- β -CD.	46
5.5.1.	Resiembra de los hongos.	46
5.5.2.	Preparación del medio YEPGA.....	47
5.5.3.	Preparación de la solución densa de esporas.....	47
5.5.4.	Inoculación del medio YEPGA con hongos.....	47
5.5.5.	Biotransformación cualitativa del complejo de inclusión 1 /HP- β -CD con cuatro hongos.....	48
5.5.6.	Biotransformación cuantitativa del complejo de inclusión de 1 /HP- β -CD <i>C. lunata</i> (CDBB-H-261).....	48

5.5.7.	Obtención de los residuos de biotransformación de 1 /HP- β -CD con <i>C. lunata</i> (CDBB-H-261).	49
5.5.8.	Aislamiento y purificación de los productos de biotransformación del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con <i>C. lunata</i> (CDBB-H-261) empleando las técnicas convencionales de separación y purificación.	50
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	51
6.1.	Aislamiento del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1).	51
6.2.	Obtención y comparación de los rendimientos observados en la preparación de los complejos de inclusión de 1 con β -CD y HP- β -CD mediante una mezcla física y el método de co-evaporación.	51
6.3.	Caracterización por análisis termogravimétrico (DSC) y espectroscopia de IR de los complejos de inclusión entre 1 con β -CD y HP- β -CD por el método de co-evaporación y mezcla física.	52
6.4.	Caracterización por difracción de Rayos X de los complejos de inclusión entre 1 con β -CD y HP- β -CD por el método de co-evaporación.	58
6.5.	Factibilidad de la biotransformación con <i>C. echinulata</i> (CDBB-H-255), <i>C. lunata</i> (CDBB-H-261), <i>T. atroviride</i> y <i>B. adusta</i>	64
6.6.	Biotransformación cuantitativa del complejo de inclusión 1 /HP- β -CD con <i>C. lunata</i> (CDBB-H-261).	65
6.7.	Aislamiento y purificación de los productos de bioconversión del complejo de inclusión 1 /HP- β -CD con <i>C. lunata</i> (CDBB-H-261).	66
7.	CONCLUSIONES.	68
8.	BIBLIOGRAFÍA.	69

ABREVIATURAS.

- AcOEt: Acetato de etilo
- APD: Agar Papa Dextrosa
- ATCC: American Type Culture Collection
- *c*: cuarteto
- CC: Cromatografía en Columna
- CCF: Cromatografía en Capa Fina
- CC-Flash: Cromatografía en Columna Flash
- CCV: Cromatografía en Columna a Presión Reducida.
- CDBB: Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares
- CD(s): Ciclodextrinas
- β -CD: β -Ciclodextrina
- CDCl₃: Cloroformo deuterado
- CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
- CYP450: Citocromo P450
- *d*: doblete
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido deuterado
- DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido
- EM (IE): Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico
- EMAR (FAB⁺): Espectrometría de Masas de Alta Resolución
- HP- β -CD: (2-hidroxipropil) - β -ciclodextrina
- IR: Infrarrojo
- *J*: Constante de acoplamiento (Hz)
- *m*: multiplete
- MeOH: Metanol
- *n*-hex: n-hexano
- NADH: Dinucleótido de Nicotinamida Adenina
- NADPH: Dinucleótido Fosfato de Nicotinamida Adenina

- pf.: Punto de fusión
- R_f.: Factor de retención
- RMN-¹³C: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
- RMN-¹H: Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
- *s*: singulete
- SiO₂: Sílica gel
- *t*: triplete
- YEPGA: Medio de cultivo: peptona, extracto de carne, extracto de levadura y glucosa

RESÚMEN

En el presente proyecto, se implementó un método alternativo para aumentar la solubilidad del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) en el medio de biotransformación, formando complejos de inclusión con dos ciclodextrinas — β -ciclodextrina y (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina—. Dichos complejos fueron caracterizados por análisis termogravimétrico (DSC), difracción de Rayos X y espectroscopia de IR. Con respecto a la factibilidad en el proceso de biotransformación, se utilizó el complejo de inclusión de **1**/HP- β -CD, el cual posteriormente fue evaluado con cuatro cepas de hongos diferentes. De la biotransformación cuantitativa de **1**/HP- β -CD con *Curvularia lunata* (CDBB-H-261) se logró aislar e identificar al ácido masticadienónico (**2**) como producto de bioconversión.

INTRODUCCIÓN.

El ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) es un triterpeno con esqueleto de esterol aislado en gran proporción de los extractos de la corteza del “cuachalalate” –*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht– árbol endémico de México perteneciente a la familia Anarcadiaceae [1]. Dentro de la medicina tradicional mexicana, la corteza de este árbol es utilizada en forma de decocción para el tratamiento de diversos problemas del aparato digestivo [2]. Sin embargo, en la literatura se han informado diferentes actividades biológicas para **1**, destacando por su acción hipocolesterolémica [3]; gastroprotectora [4-5], anti-protozoaria [6], anti-inflamatoria [7-8], citotóxica frente a líneas celulares de leucemia L-1210 [9], anti-fúngica [10], anti-tumoral [11], entre otras.

Los triterpenos son compuestos naturales que se construyen a partir de seis unidades de isopreno, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y desempeñan un papel importante en la naturaleza. Desde una perspectiva biológica, se asume que los esqueletos de oleanano, ursano y lupano son los más importantes dentro de este grupo, al igual que aquellas sustancias que presentan en su sistema de anillos al ciclopentanoperhidrofenantreno. Estos compuestos presentan una estructura similar a **1** y son utilizados como prototipos para la síntesis de fármacos en el tratamiento de diversos padecimientos y enfermedades en los seres humanos. También, pueden jugar un papel importante en el descubrimiento de medicamentos novedosos mediante modificaciones químicas sobre el esqueleto base de las sustancias [12]. Esta funcionalización química, ha sido uno de los mayores retos en síntesis orgánica, debido a que es casi imposible llevarla a cabo sobre carbonos inactivos utilizando reacciones convencionales [13]. Es por eso que, las biotransformaciones se han convertido en un recurso químico importante para funcionalizar sitios específicos de una molécula de interés [14]. Estos procesos bioquímicos, proceden con una alta *regio-* *quimio-* y *estereo-* especificidad. Además, su *enantio-*especificidad, ha permitido la producción de fármacos quirales a partir de mezclas racémicas con un alto valor económico dentro de la industria de los esteroides [15].

Los catalizadores biológicos utilizados en estos bioprocesos, pueden ser desde una enzima aislada, enzimas inmovilizadas o células completas. La técnica más empleada involucra el

uso de microorganismos en donde toda la maquinaria enzimática está disponible. Dentro de estos biocatalizadores, destaca el uso de hongos debido a que presentan la habilidad natural para realizar reacciones diferentes, incluyendo transformaciones oxidativas, reductivas e hidrolíticas en medios líquidos [16]. Sin embargo, biotransformar triterpenos aun representa un reto en síntesis orgánica debido a su baja solubilidad en agua y biodisponibilidad, por lo que los procesos de biotransformación proceden con rendimientos de bajos a moderados (menores a 50%) [17].

Es por lo anterior que, es importante encontrar alternativas que incorporen el uso de agentes coadyuvantes de la solubilidad como el uso de surfactantes, líquidos iónicos, liposomas, ciclodextrinas, entre otros, para lograr una mayor eficiencia en el bioproceso [18]. Las ciclodextrinas son compuestos formados por moléculas de azúcar dispuestas en forma de anillo, obtenidas de la degradación enzimática del almidón, la amilosa y otros polisacáridos con diferentes microorganismos [19]. Estas sustancias son conocidas por formar complejos de inclusión con muchos tipos de compuestos orgánicos, debido a su estructura característica que consiste en una cavidad interna hidrofóbica y una superficie externa hidrofílica. Dicha estructura particular, permite albergar moléculas de adecuadas dimensiones y polaridad dentro de la cavidad mediante interacciones intermoleculares, incrementando la solubilidad de la molécula huésped sin alterar su estabilidad química, propiedades físicas, ni el metabolismo del biocatalizador [20].

1. MARCO TEÓRICO.

1.1. Características del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1).

El ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) es un triterpeno del tipo tirucalano, de fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃ y con pf. de 142-148°C, de acuerdo con lo informado en la literatura [21]. De los extractos menos polares (*n*-hex y AcOEt) de la corteza del cuachalalate –*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht– se ha aislado como producto mayoritario a 1 y al ácido masticadienónico (2) [22-23]. Además, en estudios químicos similares, se ha obtenido al ácido 3 β -hidroximasticadienónico (3) [9]. El ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) posee diferentes actividades biológicas entre las cuales destacan: hipocolesterolémica [3]; gastroprotectora [4-5], anti-protozoaria [6], anti-inflamatoria [7-8], citotóxica frente a líneas celulares de leucemia L-1210 [9], anti-fúngica [10], anti-tumoral [11]. Su estructura presenta 17 átomos de carbono en un sistema de anillos tetracíclico conocido como ciclopentanoperhidrofenantreno. Además, presenta un grupo hidroxilo en C-3 con orientación α -axial, una doble ligadura *endocíclica* $\Delta^{7,8}$ y una cadena alifática de 8 carbonos funcionalizada con un ácido carboxílico α , β -insaturado en el C-25, ver figura 1 [9].

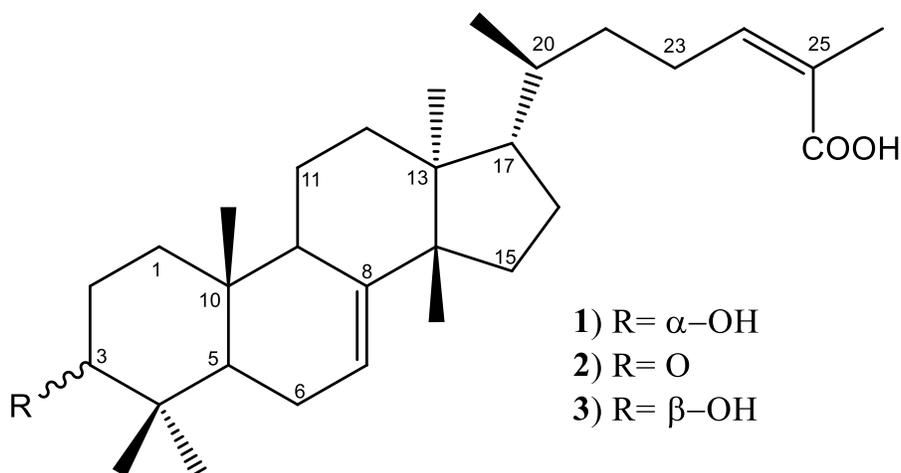


Figura 1. Estructuras del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1), ácido masticadienónico (2) y ácido 3 β -hidroximasticadienónico (3).

Las propiedades físicas y sus constantes espectroscópicas descritas en la literatura se enlistan a continuación [21]. Sólido blanco amorfo. pf. 142-148 °C. **IR** (KBr, cm^{-1}) 3436.9, 2950.4, 2886.6, 1695.2, 1237.0, 772.8. **EM (IE)** m/z (%) 456 (18) M^+ , 441 (55) $[M-\text{Me}]^+$, 423 (100) $[M-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 43(28). **RMN ^1H** ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ 5.89 (1H, *td*, $J=7.5$, 1.5, H-24); δ 5.24 (1H, *c*, $J=3.1$, H-7); δ 3.42 (1H, *d*, $J=2.7$, H-3); δ 1.90 (3H, *d*, $J=1.2$, Me-27); δ 1.64 (2H, *m*, H-2); δ 0.97 (3H, *s*, Me-28); δ 0.93 (3H, *s*, Me-30); δ 0.90 (3H, *s*, Me-18); δ 0.88 (3H, *d*, $J=6.0$, Me-21); δ 0.81 (3H, *s*, Me-29); δ 0.76 (3H, *s*, Me-19). **RMN ^{13}C** ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ 169.6 (C-26); 145.5 (C-8); 142.5 (C-24); 126.5 (C-25); 117.3 (C-7); 75.2 (C-3); 52.3 (C-17); 50.6 (C-14); 48.0 (C-9); 43.9 (C-5); 42.9 (C-13); 36.8 (C-4); 35.4 (C-20); 35.2 (C-22); 34.1 (C-10); 33.4 (C-15); 33.3 (C-12); 30.7 (C-1); 27.5 (C-16); 27.3 (C-30); 26.6 (C-28); 26.0 (C-23); 25.0 (C-2); 23.3 (C-6); 21.2 (C-18); 21.2 (C-29); 20.2 (C-27); 17.7 (C-21); 17.4 (C-11); 12.4 (C-19).

1.2. **Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1): Biosíntesis Propuesta [24].**

Los triterpenos del tipo tirucalano están compuestos por 30 átomos de carbono, presentan un esqueleto de esterol, son de naturaleza lipofílica y ya han sido descritas cientos de moléculas diferentes [9]. La biogénesis de estos triterpenos se ilustra en la figura 2, la cual involucra la unión de seis unidades de isopreno (C5), de acuerdo con la regla del isopreno, a través de reacciones de adición electrofílica hasta la formación del (3*S*)-2,3-óxido de escualeno (**I**). Posteriormente la activación de **I** mediante la protonación del epóxido, es seguida de una serie de ciclizaciones (secuencia de reacciones en cascada) que conducen a la formación del carbocatión 17 α o 17 β -damarenilo (**IV**), intermediarios en la ruta biogénica de los esqueletos de damarano, tirucalano y análogos. El compuesto **IX** (tirucalla-7,24-dien-3-ol), es el precursor del ácido 3 β -hidroximasticadienónico (**3**) que se deriva de cuatro consecutivas *transposiciones antiperiplanares* a partir de **IV**, de las cuales dos son transposiciones de hidruro (**IV-V**, **V-VI**) y dos transposiciones de metiluro (**VI-VII**, **VII-VIII**). La formación de **IX** ocurre debido a la eliminación del hidrógeno en C-7, originando un doble enlace *endocíclico* entre C-7 y C-8. Finalmente, una oxidación alílica en C-26 por medio del CYP450 genera el intermediario **X** y una segunda oxidación, al ácido carboxílico [24].

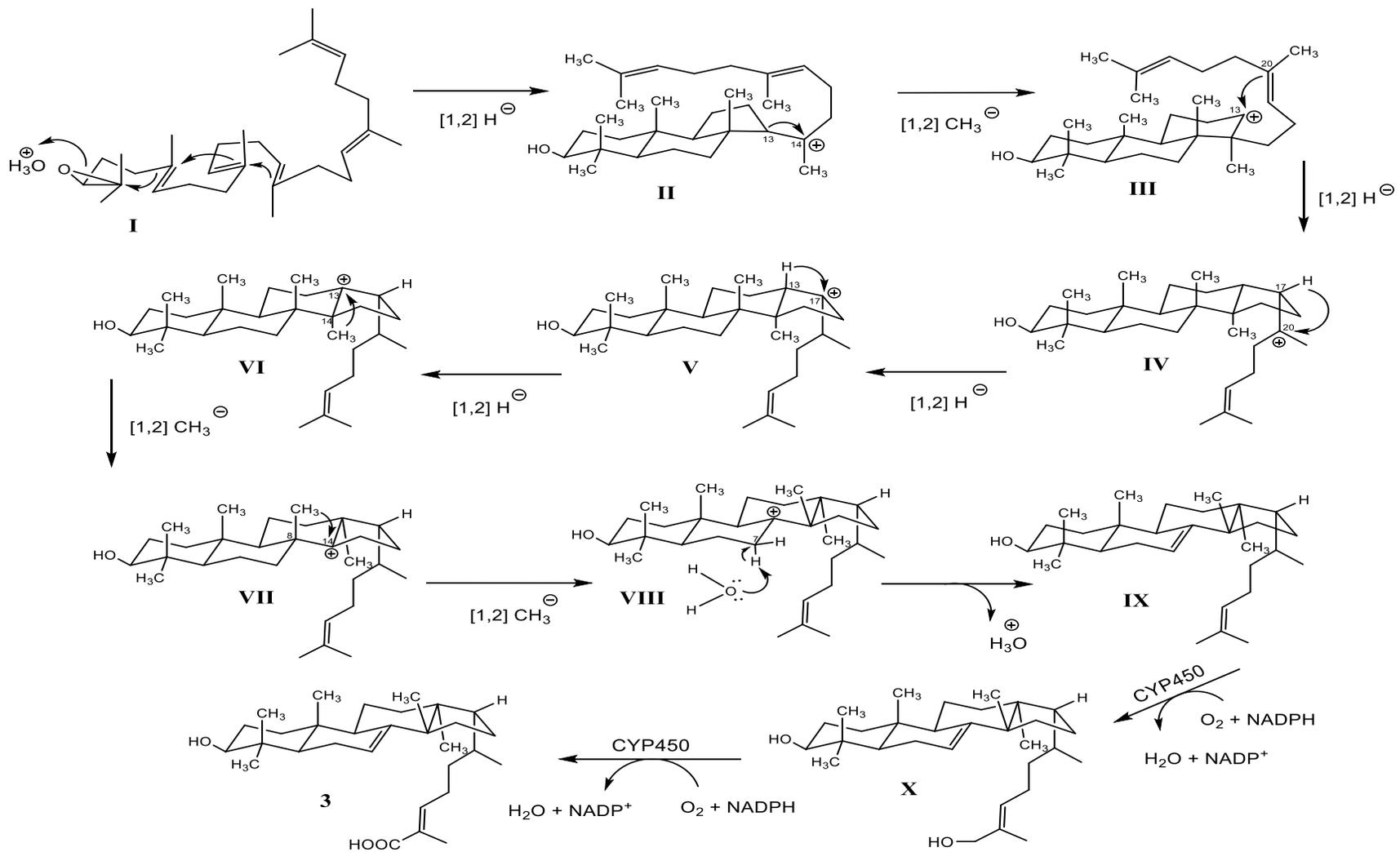


Figura 2. Biogénesis del ácido 3β-hidroximasticadienónico (3)

Es pertinente resaltar una ruta biogénica alterna a partir del (3*R*)-2,3-óxido de escualeno para la obtención de su epímero en C-3, lo cual puede explicar la formación de **1** como metabolito mayoritario presente en la corteza de *A. adstringens* [25]. No obstante, la orientación α -axial del grupo hidroxilo en C-3, corresponde a la conformación menos estable, debido a las interacciones 1,3-diaxiales presentes en el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**).

Además, existen triterpenos con esqueletos semejantes, ver figura 3, que son utilizados como precursores de moléculas esteroidales de alto valor agregado, como colesterol (**4**, C₂₇H₄₆O), β -sitosterol (**5**, C₂₉H₅₀O), estigmasterol (**6**, C₂₉H₄₈O) y ergosterol (**7**, C₂₈H₄₄O), los cuales son la materia prima para la obtención de diversos compuestos esteroidales –androstano, pregnano, corticosteroides, entre otros– en la industria farmacéutica, donde dichos procesos implican el uso de enzimas, enzimas inmovilizadas y algunos microorganismos –*Arthrobacter spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Curvularia spp.*– [26]. Las células completas de ciertas cepas de hongos, se emplean frecuentemente debido a su habilidad para mediar muchas reacciones diferentes, incluyendo transformaciones oxidativas, reductivas, e hidrolíticas sobre un amplio rango de sustratos [16].

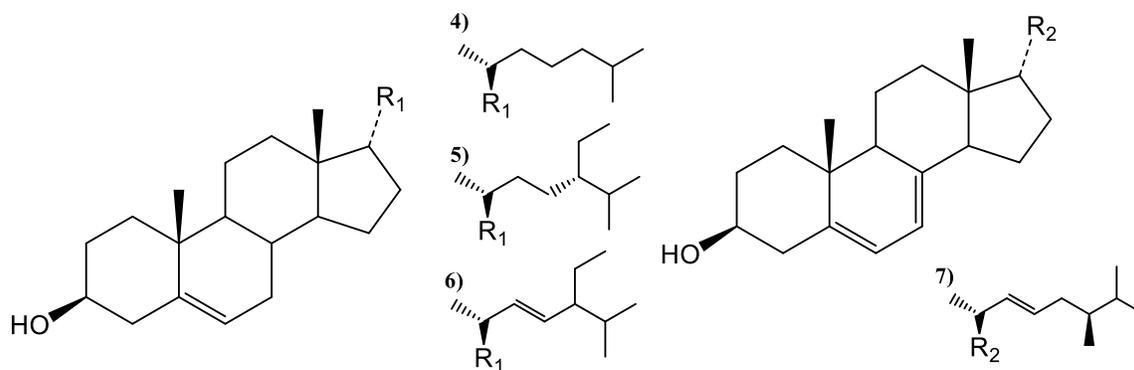


Figura 3. Esteroles utilizados como materia prima para la síntesis de fármacos esteroidales.

1.3. Generalidades de los hongos.

Los hongos se originaron como un grupo de eucariotas unicelulares. Estimaciones recientes del origen de este reino basadas en análisis moleculares, informan que aparecieron por

primera vez hace alrededor de 760 a 1060 millones de años atrás. Actualmente son clasificados en seis Phyla.

- Phylum Basidiomycota
- Phylum Ascomycota
- Phylum Glomeromycota
- Phylum Blastocladiomycota
- Phylum Chytridiomycota
- Phylum Neocallimastigomycota

Es importante mencionar el término Dikarya, que ha sido propuesto para designar un subreino que comprende organismos de los Phyla Basidiomycota y Ascomycota. Estos organismos anteriormente eran considerados hongos imperfectos o deuteromicetos. El término, hace referencia a la formación de las células que contienen dos núcleos durante su proceso de reproducción sexual (considerada parasexualidad).

Por otro lado, existe información genética que indica que algunos hongos no reúnen las características para ser incluidos en estos seis Phyla, ni tampoco se cuenta con la evidencia necesaria para proponer un Phylum adicional. Se trata de alrededor de 900 o más especies de hongos denominados anteriormente zigomicetos. Estos organismos eran identificados como el Phylum Zygomycota, pero debido a que estos hongos parecen no tener estrechas relaciones filogenéticas, no son considerados en la clasificación más reciente¹ [27].

En la actualidad, los caracteres más utilizados para clasificar a los hongos se basan en datos moleculares. Sin embargo, las estructuras celulares u observables a simple vista han sido de suma importancia para llevar a cabo esta tarea a lo largo de los años. Además, todos los hongos comparten ciertas características que los distinguen como un grupo: [28].

1. Tipo de nutrición. Son organismos heterótrofos que se alimentan por absorción.

¹ Aún no existe un consenso para una clasificación general de este reino. La información que se presenta se origina a partir de datos moleculares muy recientes. Sin embargo, existe información basada en morfología que se considera vigente para la mayoría de los autores y especialistas del tema por lo cual, para fines prácticos del presente estudio, se consideran a los zigomicetos como un grupo real de organismos dentro del reino Fungi.

2. Estado vegetativo. Generalmente se encuentran sobre o debajo del sustrato como micelio o hifas; también pueden ser levaduriformes o celulares.
3. Pared celular. Principalmente presentan glucános y quitina.
4. Tipo de célula. Eucariótica, *uni* o *multi* nucleada; el talo puede ser haploide o diploide, este último generalmente de vida más corta.
5. Ciclo de vida. Puede ser simple o complejo.
6. Reproducción. Presentan reproducción sexual (fusión de núcleos y meiosis), parasexual (fusión de núcleos seguido de división mitótica) o asexual (división mitótica).
7. Propágulos. Son típicamente micro esporas solamente visibles al microscopio producidas en grandes cantidades.
8. Esporomas. Microscópicos o macroscópicos que muestran formas características.
9. Hábitat. Generalmente terrestres o dulciacuícolas; se encuentran con menos frecuencia en ambientes marinos.
10. Ecología. Juegan un papel importante como organismos saprofitos, en asociación simbiótica o como parásitos.
11. Distribución. Cosmopolita

La mayoría de los hongos presentan un rápido crecimiento exponencial y pueden colonizar casi cualquier hábitat. Tienen la capacidad de generar grandes cantidades de biomasa y han jugado un papel importante en la industria de los alimentos, bebidas y antibióticos, principalmente por su capacidad de producir metabolitos en los procesos de fermentación [29]. Aunado a esto, los hongos, al igual que la mayoría de los eucariotas, realizan metabolismo de xenobióticos, siendo útiles como herramienta biotecnológica para la modificación de la estructura química de algunas sustancias, debido a la capacidad de producir una amplia variedad de enzimas en los procesos de detoxificación [30].

1.4. Ciclos de vida de los hongos.

La mayoría de los hongos se reproducen mediante esporas, ya sea sexual o asexualmente. Alrededor del 95% de los hongos identificados hasta el momento, incluyendo los utilizados

en el presente proyecto (a excepción de los zigomicetos), se asignan a los filos Ascomycota y Basidiomycota. Los organismos de estos Phyla, comparten la característica de tener hifas septadas y una etapa dicariótica durante la parte sexual de su ciclo de vida [31]. Sin embargo, aún existen algunos hongos (anteriormente denominados deuteromicetos) que no presentan reproducción sexual típica, sino que manifiestan fenómenos de parasexualidad que incluyen plasmogamia, cariogamia y mitosis [32].

En el ciclo de vida de un ascomiceto, ver figura 4, las esporas asexuales se forman en el ápice de una hifa especializada denominada conidio. La reproducción sexual de estos hongos, siempre implica la formación de ascos. Dependiendo de la especie, la formación ascos viene seguida de la fusión de estos con gametangios (hifas no especializadas) de cepas de apareamiento diferente (plasmogamia). Los núcleos se disponen en pares y continúan dividiéndose a medida que crece la hifa. Finalmente, algunos núcleos se fusionan (cariogamia) y, de manera casi inmediata, ocurre un proceso de meiosis generando cuatro núcleos haploides que, mediante mitosis, originan ocho núcleos haploides. Cada una de estas células con ocho núcleos, es rodeada por una pared rígida y en conjunto, es denominada ascospora [29].

La reproducción asexual no es muy común en basidiomicetos, ver figura 5. Su ciclo comienza cuando dos micelios primarios compatibles, se encuentran durante el crecimiento de las hifas. Al igual que en ascomicetos, estas hifas se fusionan (plasmogamia). Los dos núcleos haploides se mantienen separados dentro de cada célula. De esta forma se produce un micelio secundario con hifas dicarióticas. Las hifas del micelio secundario pueden desarrollarse indefinidamente. Cuando existen condiciones ambientales adecuadas, se desarrolla el basidiocarpo o esporoma. Cada basidiocarpo está compuesto de hifas apareadas entremezcladas. Subsecuente a esto, algunos núcleos se fusionan para dar núcleos diploides (cariogamia) que, de inmediato, sufren meiosis para formar basidiosporas. Esta fusión se lleva a cabo en una estructura denominada basidio [31].

En los zigomicetos, la reproducción sexual en general, se caracteriza por la formación de zigosporas a partir de la fusión de dos gametangios.

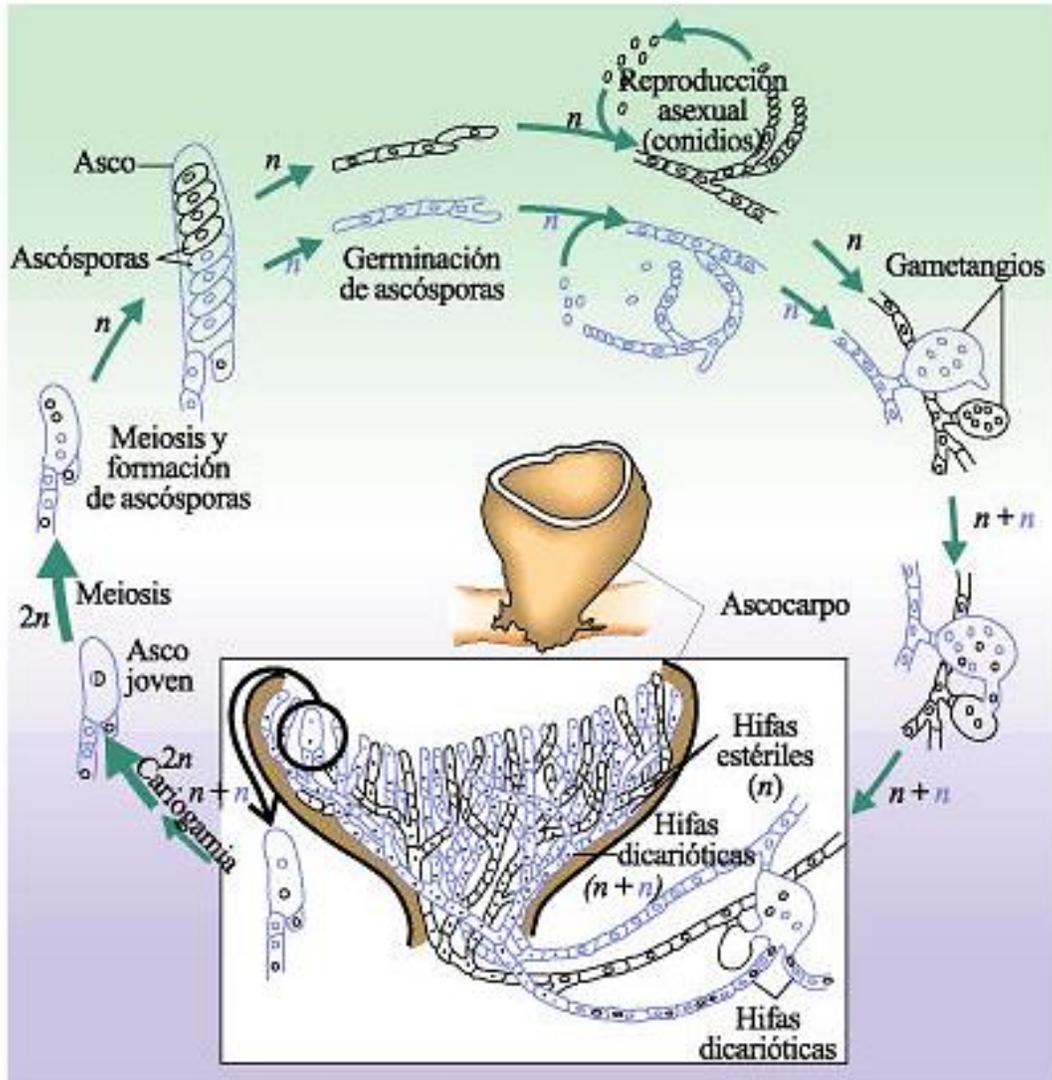


Figura 4. Ciclo de vida de un Ascomiceto [29].

Para ilustrar el ciclo de vida de un zigomiceto, se toma como modelo a el moho negro del pan *Rhizopus stolonifer*, ver figura 6. Las hifas en los zigomicetos son cenocíticas. Existen muchas cepas de hongos que presentan hifas heterotálicas; esto significa que una hifa individual (+) solo puede conjugarse con una hifa de apareamiento diferente (-). Por tanto, la reproducción sexual solo puede darse entre una cepa (+) y una cepa (-), pero no entre dos miembros de una misma cepa. Cuando hifas de tipos opuestos crecen cercanamente, se señalan con feromonas.

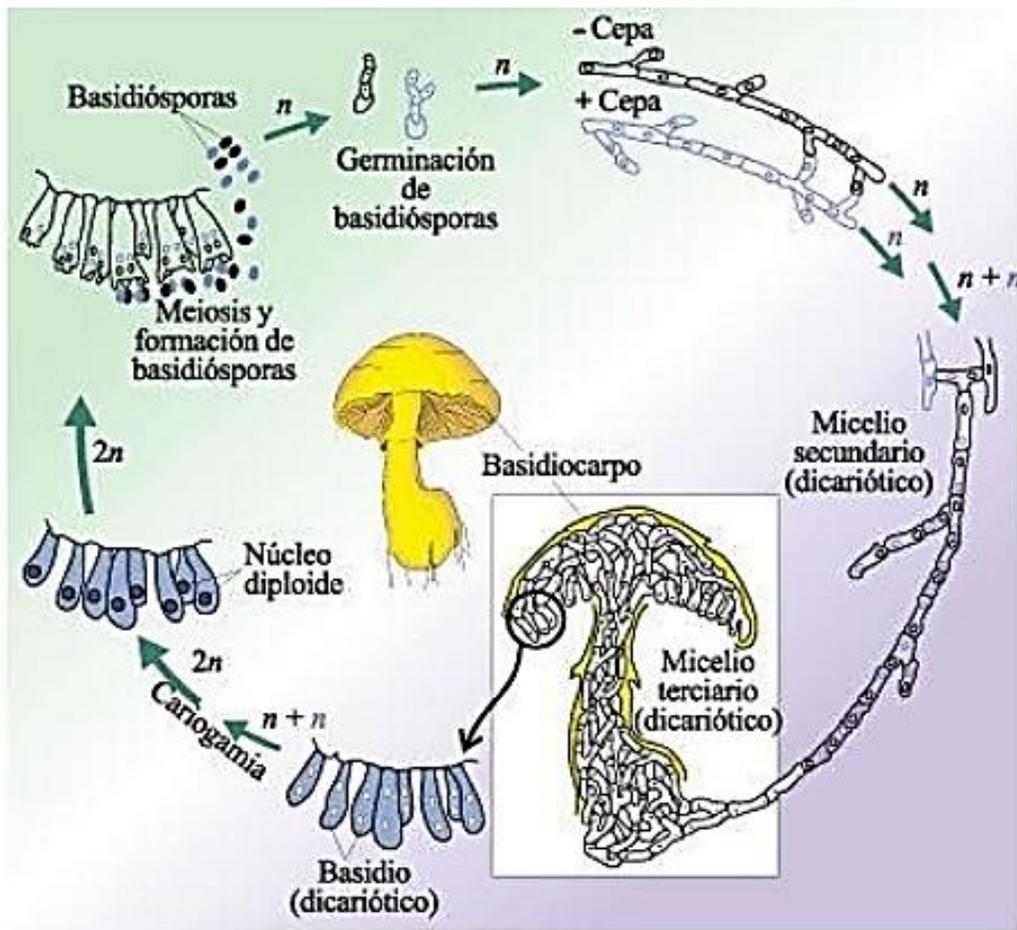


Figura 5. Ciclo de vida de un Basidiomiceto [29].

En respuesta a estas señales químicas, las puntas de las hifas se acercan y forman gametangios. La plasmogamia ocurre a la vez que se fusionan los gametangios. Posterior a esto, ocurre cariogamia conforme los núcleos (+) y (-) se fusionan para formar el núcleo cigoto diploide. El cigoto se desarrolla hasta ser una zigospora. Las zigosporas están encerradas en un zigosporangio protector. La meiosis probablemente ocurre en o justo antes de la germinación de la zigospora. Cuando la zigospora germina, una hifa aérea se desarrolla con un esporangio en la punta. La mitosis dentro del esporangio produce esporas haploides. Estas esporas pueden ser todas (+), todas (-) o una mezcla de ambas. Cuando se liberan, las esporas germinan para formar nuevas hifas. Solo el cigoto y la zigospora son diploides; todas las hifas y las esporas asexuales son haploides [31]

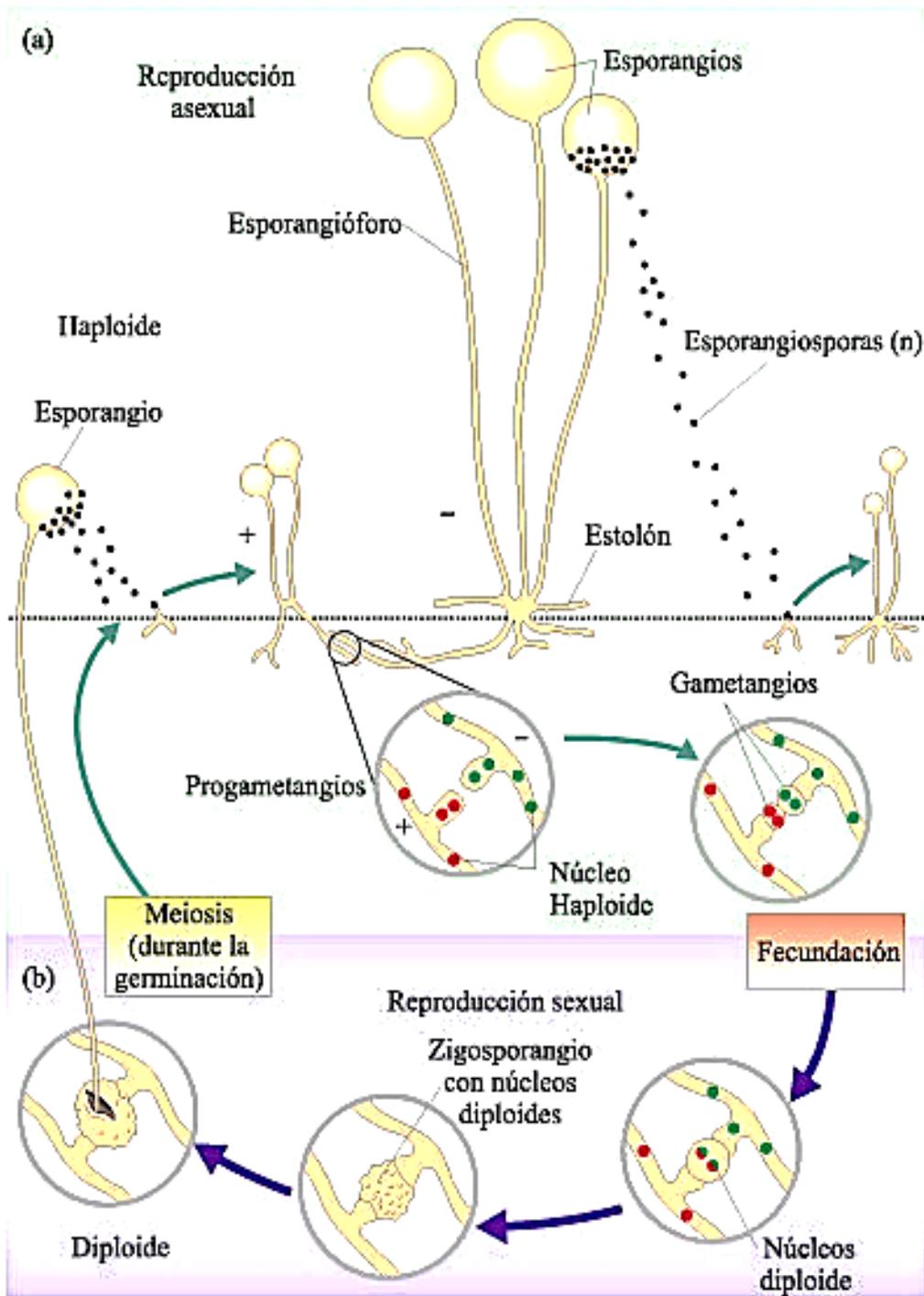


Figura 6. Ciclo de vida de *Rhizopus stolonifer* [31].

Si bien, la mayoría de los denominados “hongos imperfectos” ya han sido incluidos dentro de la clasificación actual y presentan alguno de los ciclos de vida ilustrados anteriormente, aún existen organismos cuya reproducción sexual se desconoce. Frecuentemente, cuando en una determinada especie, se descubre una fase sexual (teleomorfo) antes desconocida, el hongo deja de considerarse imperfecto y pasa a formar parte dentro de la clasificación [29].

Sin embargo, aún existen anamorfos que emplean la parasexualidad como principal fuente de variabilidad genética. Este proceso también les permite a las cepas adaptarse a diversas condiciones confiriéndoles una mayor resistencia.

El ciclo parasexual implica plasmogamia, cariogamia y haploidización de núcleos en un tiempo y lugar (estructuras sexuales) indeterminado. La secuencia de eventos, ver figura 7, inicia en la formación de un micelio heterocariótico cuando se encuentran las hifas. Una fusión de núcleos haploides comienza a llevarse a cabo para formar distintos núcleos diploides, ya sea con igual o diferente genotipo. Para este punto, el micelio puede contener al menos cinco tipos de núcleos (dos tipos de haploides, dos tipos de diploides homocigóticos y un tipo de diploide heterocigótico). Todos los núcleos se multiplican a la misma velocidad, pero la proporción de haploides es mucho mayor. Eventualmente, durante la multiplicación de núcleos diploides, se lleva a cabo un entrecruzamiento mitótico. Esto genera nuevas combinaciones genéticas, siendo la fase más importante del ciclo. Finalmente, la separación de núcleos diploides se lleva a cabo. Esta haploidización en algunos hongos que producen conidios uninucleados, al germinar producen micelios haploides con genotipo totalmente diferente a los núcleos originales.

Al cabo de cierto periodo de tiempo que este tipo de reproducción ha operado, un micelio puede contener núcleos haploides con variaciones genéticas y núcleos diploides heterocigóticos de varios tipos. Los conidios derivados de este micelio generarán cepas de la misma especie, pero con características distintas. Estas cepas pueden presentar diferente capacidad patógena, de producción de enzimas, de ácidos orgánicos, entre muchas otras sustancias, por lo cual es de suma importancia la selección del microorganismo adecuado para los procesos biotecnológicos, como lo son las biotransformaciones [32].

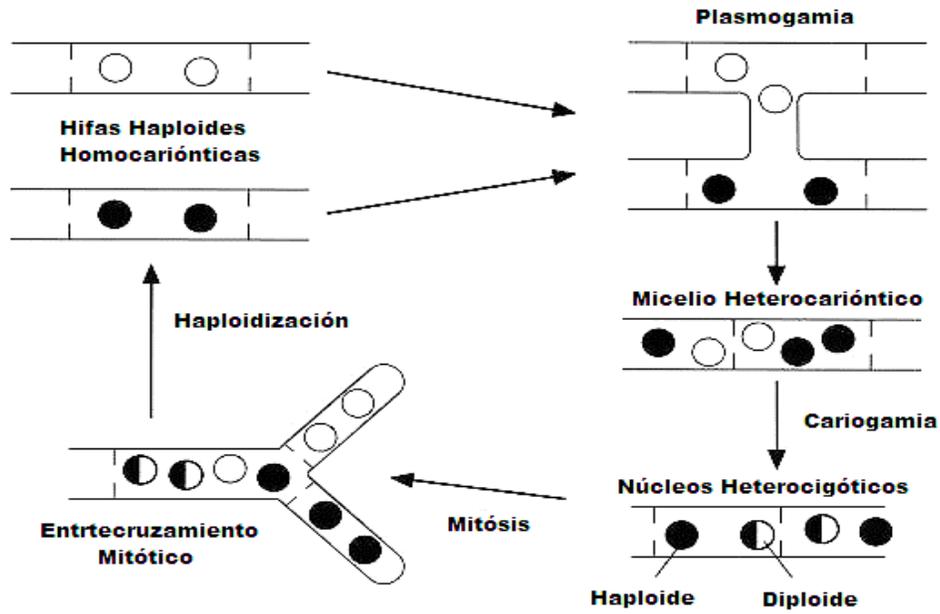


Figura 7. Parasexualidad en Hongos.

1.5. Clasificación taxonómica de las cepas empleadas.

- *Bjerkandera adusta*.

Fue descrito científicamente por primera vez como *Boletus adustus* por Carl Ludwig Willdenow in 1787 [33].

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Polyporales

Familia: Meruliaceae

Género: *Bjerkandera*

Especie: *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst. (1879).



Figura 8. *Bjerkandera adusta*.

<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr =100902>

- *Cunninghamella echinulata*.

También conocido como *Oedocephalum echinulatum* [33].

Reino: Fungi

Phylum: Zygomycota

Clase: *Incertae sedis*

Orden: Mucorales

Familia: Cunninghamellaceae

Género: *Cunninghamella*

Especie: *Cunninghamella echinulata* (Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee (1905).

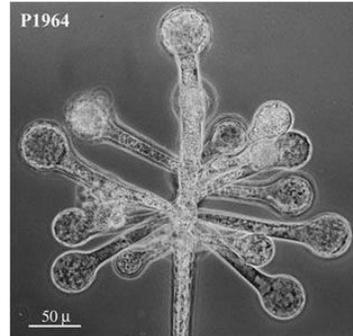


Figura 9. *Cunninghamella echinulata*.

<http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?Table=MycoBank&Rec=104756&Fields=All>

- *Curvularia lunata*.

Su forma asexual (anamorfo) es conocida como *C. lunata*, mientras que *Cochliobolus lunatus* se refiere a su estado sexual (teleomorfo) [33].

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Curvularia*

Especie: *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn (1933).

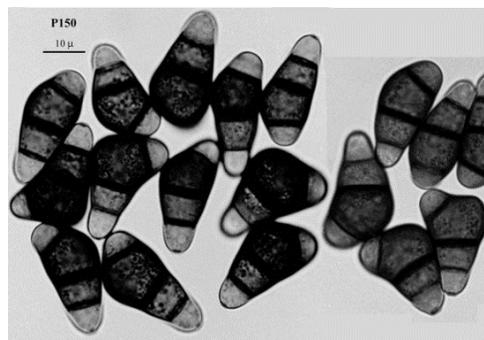


Figura 10. *Curvularia lunata*.

<http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?TableKey=1468261600000067&Rec=46537&Fields=All>

- *Trichoderma atroviride*.

También conocido como *Hypocrea atroviridis* [33].

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Especie: *Trichoderma atroviride* (Willd.) P. Karst. (1892).



Figura 11. *Trichoderma atroviride*.

<http://www.mycologia.org/content/95/1/27/F3.expansion.html>

1.6. Generalidades de las Biotransformaciones.

Una biotransformación consiste en el uso de catalizadores biológicos que modifican un sustrato en un producto con un número limitado de etapas enzimáticas [34]. Estos procesos son llevados a cabo por microorganismos, enzimas inmovilizadas, enzimas libres, entre otros, los cuales se encargan de catalizar reacciones específicas para generar nuevos compuestos o precursores en las rutas sintéticas de diferentes biomoléculas [35]. Los sistemas enzimáticos aislados, generalmente son estables y fáciles de usar conduciendo a la obtención de productos únicos y con un alto grado de pureza [36]. Existen ventajas asociadas con este tipo de modificaciones, entre las cuales destacan una alta *regio-*, *quimio-* y *estéreo-* especificidad sobre los sustratos [37]. Además, las condiciones de reacción implican presión y temperatura moderada en comparación a una síntesis química. Este tipo de transformaciones biológicas pueden llegar a ser el único método para convertir un precursor en un producto en particular [38]. Algunas modificaciones llevadas a cabo en el esqueleto base de los sustratos de biotransformación, han logrado producir nuevos derivados con mejores propiedades farmacocinéticas, nuevos mecanismos de acción y menos efectos secundarios [18].

1.7. Biotransformaciones con hongos.

El uso de hongos como biocatalizadores, ha despertado particular interés en gran medida por la habilidad que presentan para producir grandes cantidades de biomasa y crecer bajo condiciones y sustratos diferentes [16]. Esta flexibilidad metabólica, permite que los microorganismos tengan la capacidad de producir una amplia gama de enzimas que pueden biotransformar una serie de compuestos químicos mediante reacciones de hidrólisis, de óxido-reducción, formación de enlaces C-C, de adición-eliminación y glicosidación, entre otras [18]. Si bien, el uso de hongos en comparación con enzimas aisladas tiene ventajas, es principalmente por que los costos de aislamiento, purificación y estabilización de éstas suelen ser elevados [39]. Además, utilizar hongos en estos procesos tiene gran aplicación, debido a la eficiencia y a la habilidad natural que tienen para modificar compuestos presentes en las plantas durante su proceso de colonización e incluso, haciendo frente a los mecanismos de defensa del huésped. Sumado a esto, tienen la capacidad de metabolizar sustancias xenobióticas [40].

1.8. Citocromo P450.

Las reacciones catalizadas por el CYP450 han atraído especial atención desde mediados del siglo pasado. Estudios recientes han demostrado que no se trata de un único complejo enzimático. En realidad, es una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias a mamíferos, de las que ya se han identificado más de 2000 isoformas diferentes.

En todos los casos, el grupo prostético está constituido por un grupo hemo (Fe^{3+}) unido a la cadena polipeptídica de la apoproteína por medio de dos uniones, una de ellas por un átomo de azufre de un residuo de cisteína (unión covalente) y el otro con una molécula de H_2O , ver figura 12 [41]. Los CYP450 son proteínas catalíticas que se encuentran generalmente en el retículo endoplásmico liso [42].

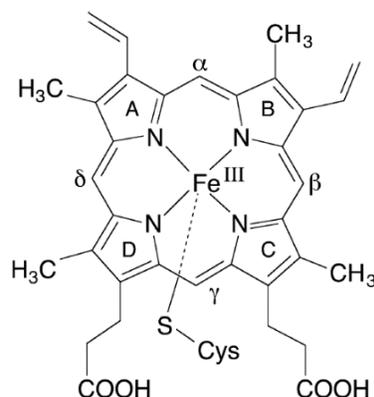
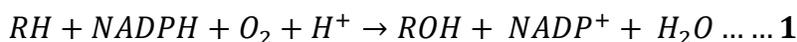


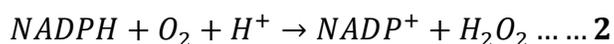
Figura 12. Grupo prostético característico del CYP450 [41].

Una de las reacciones interesantes catalizadas por el CYP450, es la reacción de monooxigenación dependiente de NADPH, para la que se utiliza oxígeno molecular dando como resultado, una molécula de H₂O (reacción 1) que, normalmente pasan al citocromo mediante una proteína ferro-sulfurada. Sin embargo, no es el único mecanismo por el que logra oxigenar una molécula, también presenta actividad como oxidasa (reaccion 2) y peroxidasa (reaccion 3) [43].

Monooxigenasa



Oxidasa



Peroxidasa



Entre las reacciones catalizadas por estos sistemas, además de las antes ya mencionadas, tenemos: hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S- oxidaciones, epoxidaciones, O-, N- y S- desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones. La actividad de los CYP450 ha jugado un papel crucial en la biotransformación de compuestos en la industria farmacéutica, debido a que es el principal responsable de dar como resultado mezclas *enantio*-específicas y derivados con propiedades químicas novedosas [44].

1.9. Metabolismo de xenobióticos.

Los xenobióticos, son sustancias que no forman parte de la composición habitual del organismo pero que son capaces de entrar en el interior de este. Además de contar con los sistemas metabólicos primarios, los organismos vivos han desarrollado sistemas metabólicos alternativos para acelerar la eliminación de estos compuestos. Su función es la de convertir los xenobióticos en moléculas más polares, hidrosolubles y, por tanto, fácilmente excretables. Al conjunto de procesos enzimáticos a los que se ven sometidos los xenobióticos en los organismos, se les conoce como reacciones de biotransformación o metabolización de xenobióticos [42]. Este proceso no implica simples modificaciones espontáneas, sino que responde a reacciones químicas de carácter muy diverso en las que intervienen distintos sistemas enzimáticos. Este metabolismo es de suma importancia dentro del fenómeno tóxico, ya que suele ser un factor determinante del efecto biológico final de un xenobiótico [45]

El metabolismo de xenobióticos se ha dividido en dos fases o etapas, en las cuales se llevan a cabo distintos tipos de reacciones, ver Tabla 1. En la fase 1, los xenobióticos son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis en productos más hidrosolubles, gracias a la aparición de nuevos grupos funcionales de carácter polar, asociados al complejo enzimático CYP450. En la fase 2, los xenobióticos o los productos generados por las reacciones de la fase 1, se combinan con moléculas endógenas de carácter polar para formar productos de conjugación que son rápidamente excretados [46].

Tabla 1. Reacciones que se llevan a cabo en las fases del metabolismo de xenobióticos [45].

Fase 1	Fase 2
<ul style="list-style-type: none">• Reacciones de oxidación: hidroxilaciones, epoxidaciones, desalquilaciones, entre otras, dependientes del CYP450• Reducción: Llevadas a cabo por agentes reductores como NADPH, NADH, FADH, entre otros.• Hidrólisis: Catalizadas por esterasas y amidasas.	Conjugación con: carbohidratos, sulfatos, aminoácidos. También pueden sufrir reacciones de acetilación o metilación.

1.10. Biotransformación de triterpenos.

La biotransformación de triterpenos se ha convertido en un área de estudio con potencial aplicación. Por citar casos de éxito en los procesos de biotransformación sobre moléculas con esqueletos similares a **1**, tenemos que el colesterol (**4**) y β -sitosterol (**5**) son microbiológicamente transformados en 17- cetoesteroides, principalmente en: 4-androsten-3,17-diona (**8**), 1,4-androstadien-3,17-diona (**9**) y 9α -hidroxi-4-androsten-3,17-diona (**10**) que son los intermediarios clave para la producción de los esteroides con más demanda industrial. Estos compuestos **8-10** pueden ser producidos en un solo paso biotecnológico por diferentes microorganismos, ver figura 13 [47].

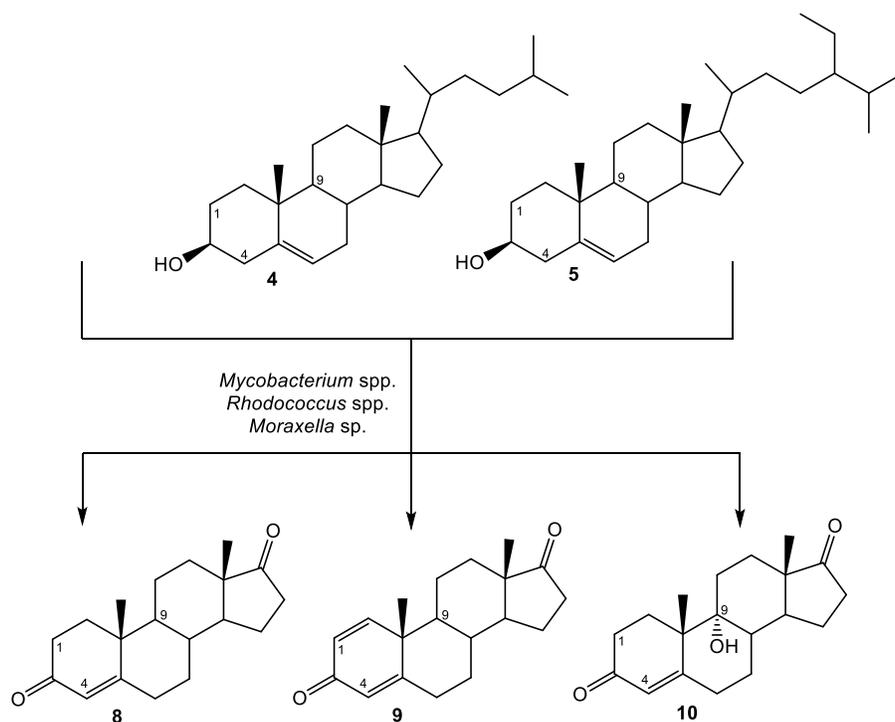


Figura 13. Biotransformación del Colesterol (**4**) y β -Sitosterol (**5**) con diferentes especies de microorganismos.

La bioconversión del ácido betulínico (**11**), es otro ejemplo de biotransformación de triterpenos. Especies del género *Cunninghamella*, se caracterizan por realizar hidroxilaciones en diferentes posiciones. Por ejemplo, *C. elegans* (ATCC 9244) biohidroxiló en C-1 y C-7 de **11** con una orientación β para generar **12**, ver figura 14 [48].

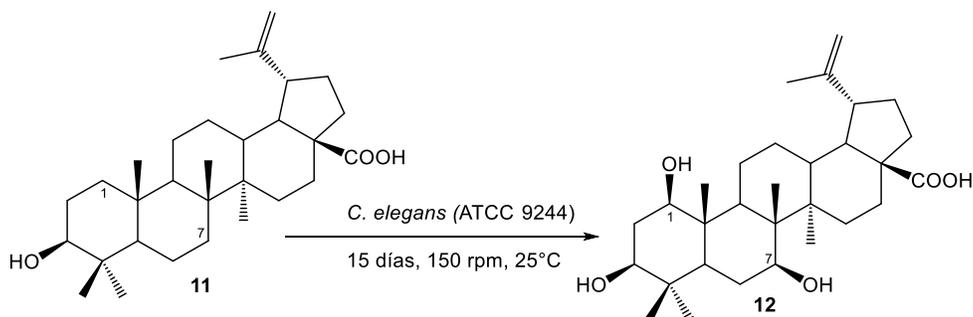


Figura 14. Biotransformación del ácido betulínico (**11**) con *C. elegans*.

Curvularia lunata, es un hongo ampliamente estudiado que se caracteriza por realizar 11β-hidroxiaciones sobre esteroides e hidroxiaciones en triterpenos. El producto mayoritario que se obtuvo de la transformación microbiológica del ácido glicirrético (**13**) fue el ácido 7β-hidroxiciclicirrético (**14**) utilizando a *C. lunata* (ATCC 13432) como biocatalizador, ver figura 15 [18].

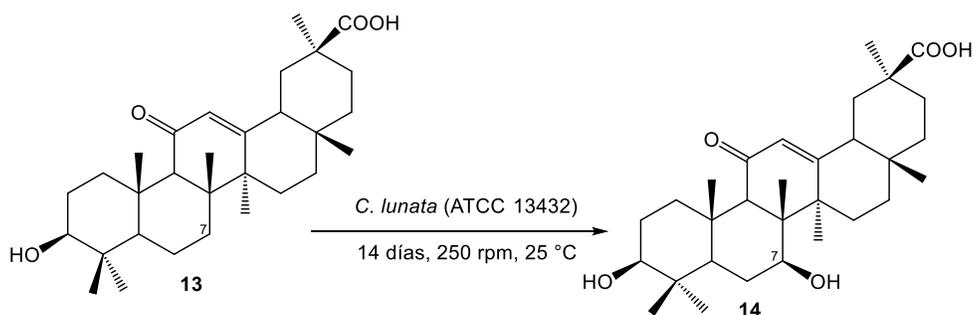


Figura 15. Biotransformación del ácido glicirrético (**13**) con *C. lunata*.

El ácido nigranóico (**15**), es el primer miembro de una clase de triterpenos del tipo 3,4-seco cicloartanos presentes en plantas de la familia Schisandraceae. Los 3,4-seco- esqueletos en triterpenos, han mostrado ser moléculas altamente reactivas y tener actividades biológicas interesantes. El compuesto **15** ha sido biotransformado con *Trichoderma sp.* JY-1, realizando principalmente Δ^1 -deshidrogenaciones e hidroxiaciones en diferentes posiciones de la molécula, obteniéndose a **16** y **17**, ver figura 16 [13]. Este tipo de 3,4-seco esqueletos suelen presentarse de manera natural en algunas familias de plantas. Sin embargo, existen

microorganismos que pueden realizar modificaciones sobre el esqueleto base de triterpenos pentacíclicos para obtener estos 3,4-seco derivados.

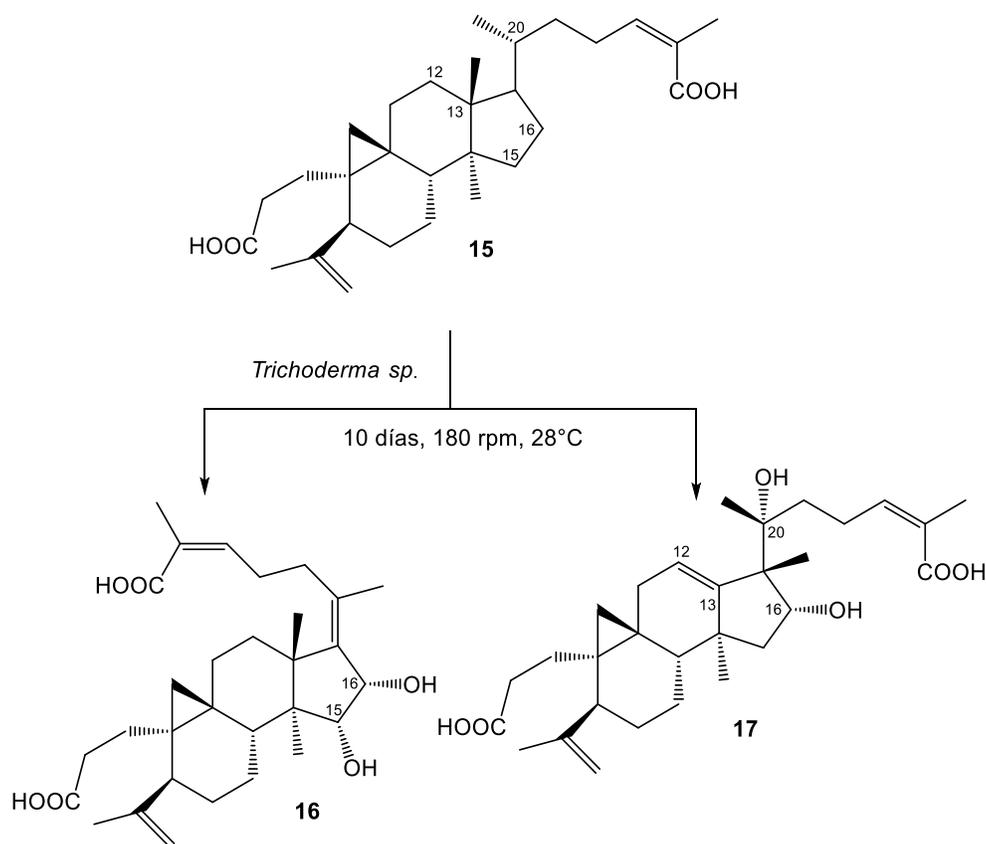


Figura 16. Biotransformación del ácido nigranoico (15) con *Trichoderma sp.*

En la biotransformación del ácido oleanólico (18) con *Chaetomium longirostre* (RF-1095) se observó la hidroxilación en C-21 con una orientación β y la apertura del anillo A de 18 para la obtención del ácido 3,4-seco-olean-12-en-4-ol-3,28-dioico (19) y posteriormente la biohidroxilación en C-21 para dar al ácido 3,4-seco-olean-12-en-4,21 β -diol-3,28-dioico (20). La identificación de una lactona de siete miembros dentro de los metabolitos derivados de la biotransformación, sugiere que 19 deriva de una oxidación de tipo Baeyer-Villiger del ácido 3-oxolean-12-en-28-oico para posteriormente, hidrolizar la lactona de siete miembros formada en el anillo A y finalmente la biohidroxilación en C-21 β , ver figura 17 [49].

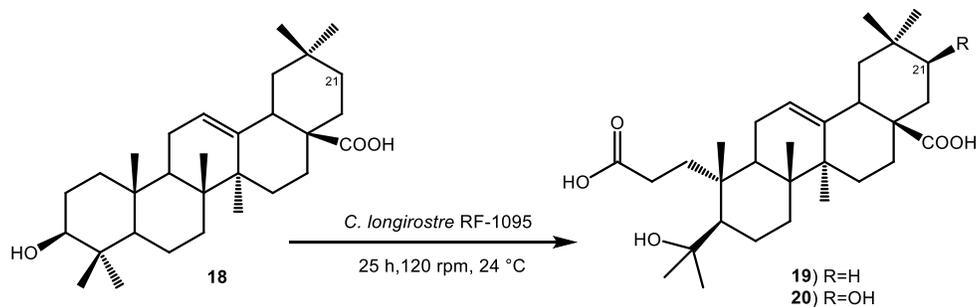


Figura 17. Obtención de los seco derivados del ácido oleanólico (**18**) con *C. longirostre*.

A pesar del gran número de estudios sobre la biotransformación de triterpenos que se han descrito en la literatura, es importante señalar que en general los rendimientos obtenidos van de moderados a bajos. Por ejemplo, de la biotransformación del oleanato de metilo (**21**) con *Rhizomucor miehei* (CECT 2749), se recuperó **21** (72%) y el compuesto **22** (15%), ver figura 18, en el cual se observan hidroxilaciones en C-7, C-30; además de una $\Delta^{9,11}$ deshidrogenación.

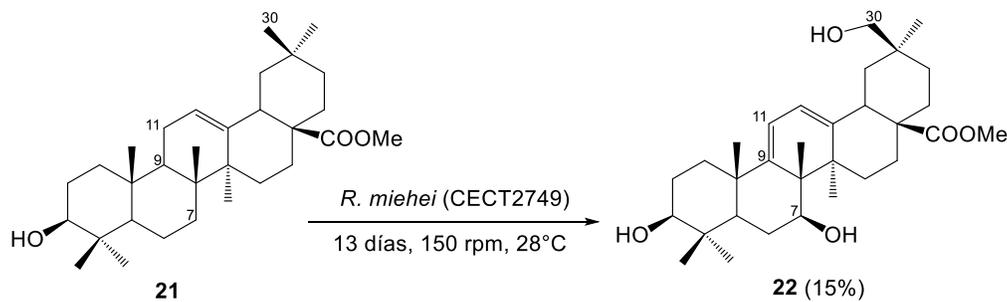


Figura 18. Biotransformación del oleanato de metilo (**21**) con *R. miehei*.

Durante este mismo estudio se realizó la bioconversión del maslinato de metilo (**23**) con el mismo microorganismo obteniendo un 63% del sustrato inicial y dos productos adicionales **24** (12%) y **25** (7%), ver figura 19 [12]. El compuesto **24** es el producto de la biohidroxilación en C-30 y el compuesto **25** corresponde a la biohidroxilación en C-30 seguido de deshidrogenación, para originar el doble enlace $\Delta^{9,11}$.

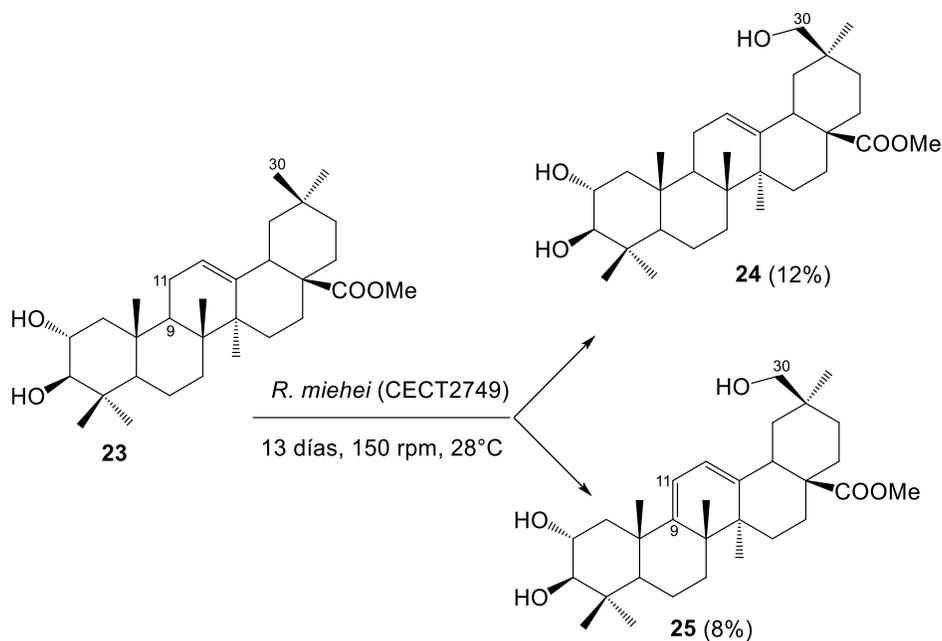


Figura 19. Biotransformación del maslinato de metilo (**23**) con *R. miehei*.

Como anteriormente se mencionó, la naturaleza lipídica de los triterpenos ocasiona que estos sean poco solubles en los medios de bioconversión, representando una desventaja si se quiere aplicar el proceso a mayor escala para la obtención de alguna molécula de interés. Por tanto, es necesaria la adición de un agente coadyuvante de la solubilidad para la optimización de los procesos de biotransformación.

1.11. Uso de coadyuvantes de la solubilidad en las Biotransformaciones.

La solubilidad de los esteroides y esterolés en medio acuoso es usualmente debajo de 0.1 mM y 1 μ M, respectivamente. Esto limita considerablemente los rendimientos de las biotransformaciones, donde la concentración de sustrato inicial difícilmente va más allá de los 10-20 mM. Además, los sustratos añadidos a los medios de bioconversión tienden a agruparse y esto dificulta su dispersión [26, 47]. Se ha informado el uso de algunas sustancias como agentes coadyuvantes de la solubilidad. Estos pueden ser disolventes miscibles en agua como el DMSO, acetona o incluso MeOH. La cantidad de disolvente que usualmente puede ser utilizado tiene que estar debajo de 1.5-5% (v/v), esto para evitar la desactivación del

biocatalizador. También, se ha implementado el uso de tensoactivos, como lo es el caso del Tween 80 y el Triton X-100, que actúan en la interface de dos sustancias que son insolubles una de otra. Esta cualidad de los tensoactivos, representa la principal desventaja de su uso en los procesos de bioconversión, ya que las sustancias no quedan completamente dispersas en el medio y no pueden ser atacadas por las enzimas de los microorganismos, por lo cual su uso se ha visto enfocado principalmente para la biorremediación de ecosistemas acuáticos [50]. Por otro lado, el uso de líquidos iónicos ha generado especial atención por sus usos como disolventes ambientalmente benignos y como posibles reemplazantes de los tradicionales disolventes orgánicos volátiles. Son definidos como fluidos formados solamente por iones con puntos de ebullición inferiores a 100°C a temperatura ambiente [51]. Uno de los inconvenientes que implica el uso de estos disolventes, viene determinado por su elevado costo de fabricación y el extenso examen de factores que se tienen que llevar a cabo para la selección de los iones adecuados. Recientemente, se han comenzado a utilizar ciclodextrinas con moléculas hidrofóbicas para formar complejos de inclusión y así, lograr aumentar la solubilidad de estas sustancias en medios acuosos [52-53].

1.12. Características de las ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas (CDs), son una familia de oligosacáridos macrocíclicos conocidos como α -, β -, γ - ciclodextrinas, las cuales están compuestas por seis, siete u ocho unidades de α -D-glucosa y α -(1-4) enlaces glicosídicos, respectivamente, ver figura 20 [54].

La β -ciclodextrina es la más comúnmente empleada comparada con sus análogos naturales, debido a que el tamaño de su cavidad se ajusta con un gran número de moléculas. Sin embargo, β -CD exhibe una solubilidad relativamente baja. Para mejorar esta característica desfavorable, se han realizado algunas modificaciones en β -CD para obtener derivados con mejores propiedades, como la (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD), que incrementa en mayor medida la solubilidad y habilidad para formar complejos de inclusión [55].

Las CDs tienen la capacidad de encapsular moléculas hidrofóbicas –huésped– en su interior debido a su estructura molecular característica que consiste en una cavidad interna hidrofóbica y una superficie externa hidrofílica, ver figura 21.

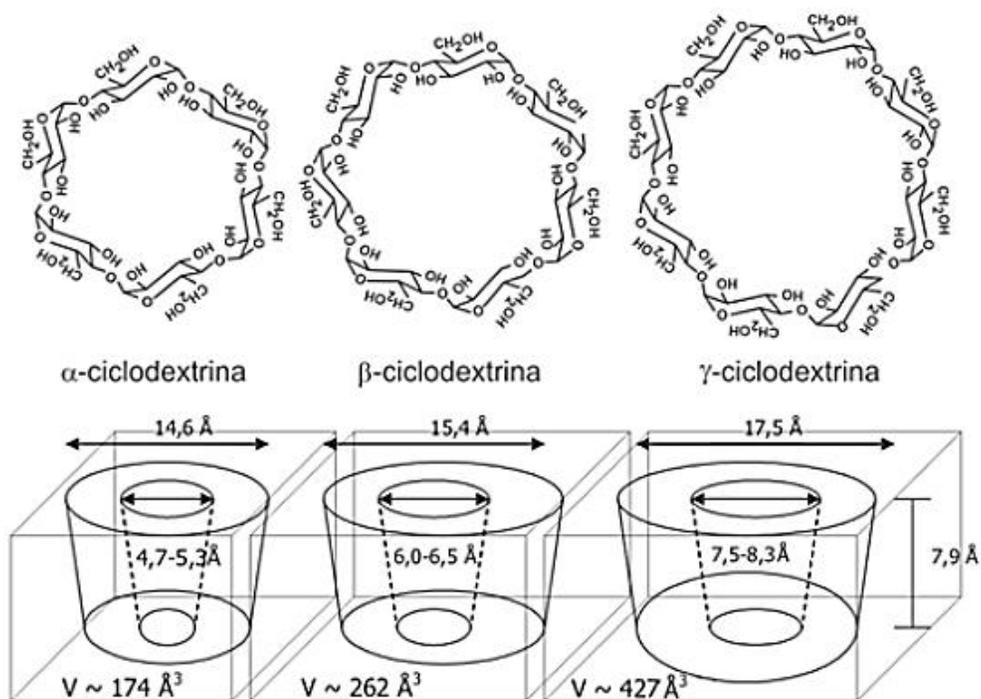


Figura 20. Estructura y propiedades de α -, β -, γ - ciclodextrinas [52].

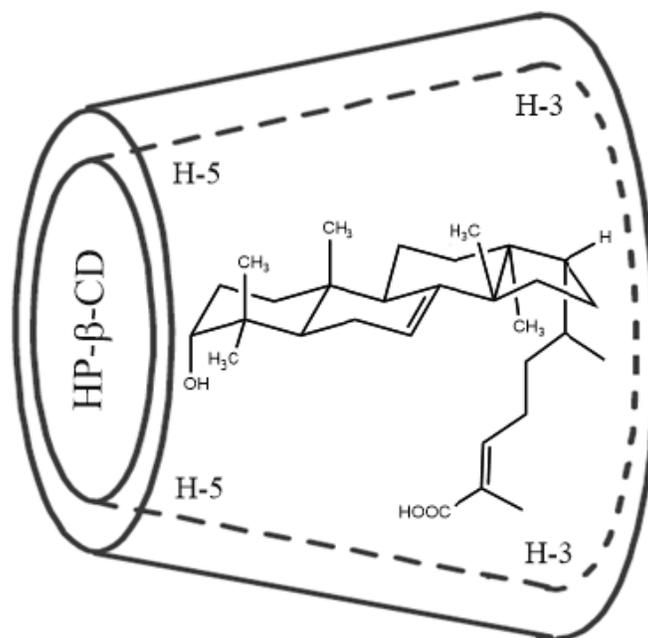


Figura 21. Posible vía en la formación del complejo de inclusión con el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**).

1.13. Complejos de inclusión.

Las ciclodextrinas forman complejos relativamente específicos con una gran variedad de sustratos hidrofóbicos. Debido a dicha habilidad, estas macromoléculas han sido utilizadas como prototipos de investigación de interacciones no covalentes envolviendo diferentes compuestos [56]. En cuanto a estequiometría se refiere, son considerados cuatro tipos más comunes de complejos de inclusión con CDs en diferentes proporciones (1:1, 1:2 y 2:1), dependiendo del tamaño y aspecto estructural del sustrato en relación a la cavidad de la ciclodextrina [57]. El reconocimiento molecular en el complejo de inclusión involucra interacciones no covalentes; se lleva a cabo mediante puentes de hidrógenos (PH), interacciones electrostáticas, fuerzas de Van del Waals, efecto hidrofóbico, interacciones dipolo-dipolo, transferencias de cargas y efectos estéricos [58].

La característica más importante que los sustratos deben cumplir en la formación de complejos de inclusión son las dimensiones espaciales de la sustancia huésped, donde una o más fuerzas intermoleculares pueden estar interactuando de manera simultánea en la formación y estabilización del complejo de inclusión. Lo anterior depende de las características de cada sustancia. Por ejemplo, moléculas que posean grupos funcionales con cargas formales (positiva o negativa), o grupos hidrofílicos como (-COOH, -NH₂, -OH), permanecen expuestos a solvatación en el medio todavía después de la inclusión en un ambiente lipofílico. Una excepción a esta regla es el grupo hidroxilo aromático, que puede ingresar en la cavidad de las CDs interactuando mediante PH con los grupos hidroxilo de la cavidad interna [53]. Las extremidades de la cavidad de las ciclodextrinas se encuentran abiertas de tal forma que el sustrato puede entrar por ambos extremos. En solución acuosa, la cavidad apolar está ocupada por algunas moléculas de agua, que son enérgicamente desfavorables dada la naturaleza de la interacción polar–no polar y, por tanto, pueden ser fácilmente sustituidas por un sustrato que sea menos polar que el agua [57].

Se han llevado a cabo numerosos estudios con una gran variedad de moléculas con la finalidad de aumentar la solubilidad de los sustratos de naturaleza lipofílica. Un ejemplo informado en la literatura [59], en donde se logró la formación del complejo de inclusión de la alpinetina (7-hidroxi-5-metoxiflavanona, **26**) con HP-β-CD. La formación del complejo

26/HP- β -CD, ver figura 22, se logró mediante el método de suspensión determinándose que la solubilidad del complejo **26**/HP- β -CD fue 3.3 mg/mL, mientras que la solubilidad de **26** puro fue de 220 μ g/mL. La caracterización del complejo de inclusión se llevó a cabo mediante métodos espectroscópicos (IR, RMN- 1 H)², difracción de rayos X de polvos³, calorimetría diferencial de barrido (DSC)⁴, entre otros.

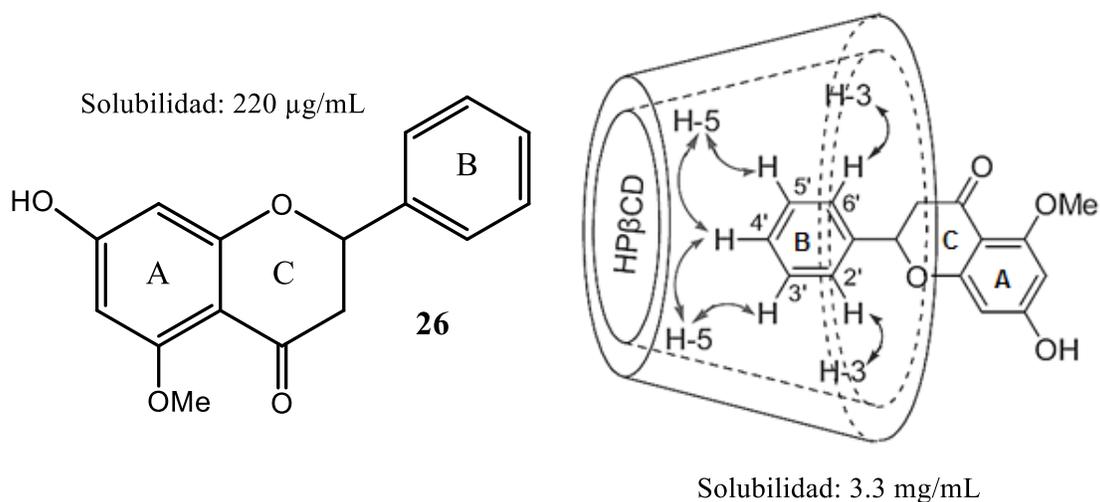


Figura 22. Formación del complejo de inclusión de la alpinetina (**26**) con HP- β -CD a través de la interacción con puentes de hidrógeno.

² La espectroscopía de infrarrojo (IR), sirve para identificar los grupos funcionales presentes en una molécula, mediante la interacción de la sustancia con la radiación electromagnética de 4000-400 cm^{-1} . La identificación del complejo de inclusión por este tipo de espectroscopia, se logra cuando las bandas observadas en el espectro de IR corresponden a las de la molécula hospedera.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN- 1 H), es utilizada para la determinación de las interacciones entre los hidrógenos de la cavidad de las ciclodextrinas y la sustancia huésped

³ La difracción de Rayos X de polvos, es una técnica eficaz para analizar los complejos de inclusión entre ciclodextrinas y moléculas huésped en estado microcristalino. Los ángulos de difracción de la molécula huésped deberían de desaparecer y el difractograma del complejo de inclusión no debe ser parecido a la superposición de difractogramas de ambas sustancias. En cambio, debe ser muy similar al difractograma de la molécula hospedera.

⁴ La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica analítica comúnmente utilizada para evaluar si se logran formar complejos de inclusión entre una molécula huésped y la cavidad de la ciclodextrina, mediante cambios *endo*- o *exo*- térmicos en los valores que corresponden al cambio de estado de las sustancias, principalmente por su pf.

De igual manera, existen estudios en los que se emplean complejos de inclusión para aumentar los rendimientos en los procesos de biotransformación con microorganismos; por ejemplo, para la síntesis de exemestano (**27**), que es reconocido como un potente fármaco esterooidal de naturaleza lipofílica. El método sintético para la obtención de **27** consistía en la deshidrogenación de 6-metilenandrosta-4-en-3,17-diona (**28**) con un rendimiento moderado (50%). La formación de complejos de inclusión de **28** con diversas CDs y su biotransformación microbiológica con *Arthrobacter simplex* (ATCC 6946) demostró mejorar la solubilidad del sustrato de manera considerable. La biotransformación del complejo **28**/HP- β -CD en una concentración de 2 mg/mL, después de 48 h resultó ser más eficiente en la obtención de **27** con un 93.71%, ver figura 23 [37].

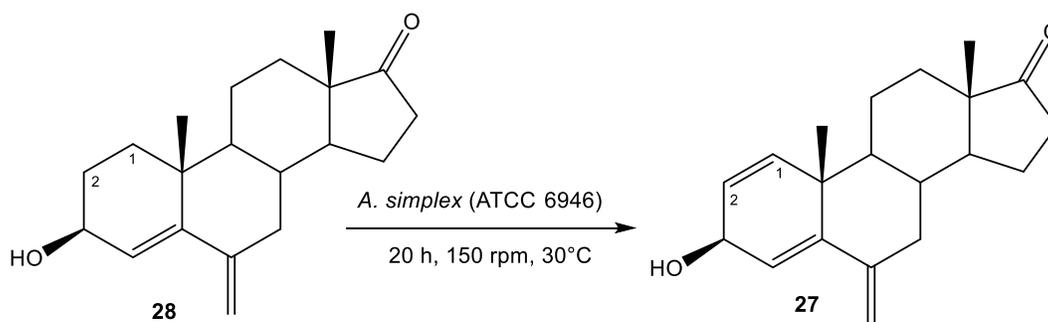


Figura 23. Biotransformación de 6-metilenandrosta-4-en-3,17-diona (**28**) con *A. simplex*.

2. JUSTIFICACIÓN.

El ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) es el componente mayoritario presente en la corteza del “cuachalalate” (árbol endémico de México) y es utilizado para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el aparato digestivo. Además de su abundancia y actividad biológica, su aislamiento y purificación resulta ser un proceso sencillo, lo que hace de **1**, una sustancia muy interesante para su estudio desde diferentes aspectos.

Cabe señalar que, en nuestro grupo de trabajo se han iniciado los estudios de biotransformación de **1** con diferentes hongos filamentosos, encontrando como factor determinante la baja solubilidad de la sustancia en agua, siendo los rendimientos obtenidos en las diferentes biotransformaciones, de bajos a nulos en general. Aunado a esto, en la literatura química especializada se han reseñado diferentes transformaciones microbiológicas en triterpenos con diferentes esqueletos, debido al interés que se tiene en la obtención de nuevos y útiles compuestos farmacológicamente activos. Es por lo anterior que, actualmente se desarrollan metodologías que permiten la incorporación de sustancias químicas — surfactantes, líquidos iónicos, ciclodextrinas, liposomas, entre otros— que coadyuven a mejorar la solubilidad de la materia prima en agua y los rendimientos en los proceso de biotransformación, sobre todo en los que se refiere a los fitoesteroides, que son considerados materia prima importante en la obtención de compuestos esteroidales, los cuales pueden ser precursores de muchas sustancias importantes en la industria farmacéutica.

Con base en lo anterior, en el presente proyecto, se pretende obtener los complejos de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) con dos ciclodextrinas diferentes — β -ciclodextrina y (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina— actuando como coadyuvantes de la solubilidad y, en consecuencia, mejorar los rendimientos de las biotransformaciones de **1** con diferentes hongos.

3. HIPÓTESIS.

La baja solubilidad del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) en medio acuoso radica en su naturaleza lipídica, lo cual ha limitado la posibilidad de ser biotransformado por diferentes biocatalizadores. Para aumentar la solubilidad de **1** (sustancia huésped) sin modificar sus propiedades químicas y biológicas, se requiere de sustancias (hospedero) que actúen como coadyuvantes de la solubilidad (sustancias de alta polaridad) formando complejos de inclusión, como las ciclodextrinas, las cuales por su naturaleza glucosídica y baja toxicidad, no inhiban el crecimiento del hongo. Entonces mediante la formación de diferentes complejos de inclusión con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) se determinará la factibilidad de formación y caracterización de dichos complejos de inclusión y el mejoramiento en los procesos de bioconversión de **1** con diferentes hongos.

4. OBJETIVO GENERAL.

Obtener los complejos de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) con dos ciclodextrinas – β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD)– para ser biotransformados con diferentes hongos –*Cunninghamella echinulata* (CDBB-H-255), *Curvularia lunata* (CDBB-H-261), *Trichoderma atroviride* y *Bjerkandera adusta*⁵–

4.1. Objetivos Particulares.

- 4.1.1. Aislar y purificar el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) de la corteza del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht).
- 4.1.2. Identificar al ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) con base en sus propiedades físicas –pf., solubilidad, R_f– y constantes espectroscópicas –RMN-¹H y RMN-¹³C–
- 4.1.3. Obtener el complejo de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) por medio del método de co-evaporación y mezcla física.
- 4.1.4. Caracterizar los complejos de inclusión **1**/ β -CD y **1**/HP- β -CD mediante análisis termogravimétrico (DSC), espectroscopia de IR y difracción de Rayos X.
- 4.1.5. Realizar la biotransformación cualitativa de los complejos de inclusión con cuatro hongos –*C. echinulata*, *C. lunata*, *T. atroviride* y *B. adusta*–.
- 4.1.6. Biotransformar de manera cuantitativa a **1**/HP- β -CD con *C. lunata*.
- 4.1.7. Aislar y purificar los productos de biotransformación del complejo de inclusión **1**/HP- β -CD, empleando las técnicas convencionales de separación y purificación.
- 4.1.8. Caracterizar e identificar los productos de bioconversión obtenidos de la transformación microbológica del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) por medio de técnicas espectroscópicas —IR, RMN-¹H, RMN-¹³C— y espectrométricas —EM (IE), FAB⁺—.

⁵ Las cepas de *T. atroviride* y *B. adusta* fueron donadas por el Dr. Jorge Luis Folch Mallol del Centro de Biotecnología de la UAEM

5. MATERIAL Y MÉTODO EXPERIMENTAL.

5.1. Separación y purificación de los compuestos.

La separación y purificación de las materias primas y productos de biotransformación se llevó a cabo mediante técnicas cromatográficas usuales: cromatografía en columna a presión reducida (CCV), cromatografía en placa preparativa (CCP). En los procesos de purificación cromatográfica en columna se utilizó como fase estacionaria Sílica gel (SiO_2), Marca Merck® con tamaño de malla 70/230 y 230/400 ASTM. Los análisis por CCF en cromatofolios de SiO_2 de la marca Merck® 60 F₂₅₄ (0.2. mm de espesor). La fase móvil estuvo constituida por diferentes disolventes (*n*-hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt, acetona y MeOH). Como reveladores químicos: sulfato cerico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4]$ al 1% en H_2SO_4 2N. Mezcla de H_2SO_4 /ácido acético [$\text{HAc}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$, 80:4:16].

La concentración de las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas y de las extracciones con disolventes orgánicos se concentraron en un rotavapor marca BUCHI® Waterbath modelo B-480.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Johns.

Los análisis espectroscópicos se realizaron en: un equipo *FT-IR Broker Tensor 750*.

La rotación óptica en un polarímetro *Perkin-Elmer 341*.

Los espectros de RMN-1H y 13C en los espectrofotómetros Bruner (400/100 MHz), Varian XR-300 (300/75 MHz) y Bruner ARX300 (300/75 MHz), utilizando TMS como referencia interna y como disolvente CDCl_3 (δ , ppm).

Los espectros de masa en un potencial de 70 Ev.

Los valores de pH, fueron medidos con un potenciómetro. marca HANNA® instruments modelo H198107, calibrándose con buffer HYCEL® de referencia pH 7.0±0.01 a 25°C y buffer HYCEL® de referencia pH 10.0±0.01 a 25°C

5.2. Obtención del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1).

El ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) fue obtenido durante la preparación de los extractos con *n*-hexano y AcOEt de la corteza del cuachalalate en trabajos previos realizados en el laboratorio [22]. El residuo del extracto “crudo” con AcOEt (142 g) fue adsorbido en 142 g de florisil y aplicados en una columna cromatográfica (d= 7 cm, h= 26 cm) utilizando como fase estacionaria florisil (210 g). Para lograr la separación y purificación de 1 se emplearon mezclas de *n*-hexano y AcOEt de polaridad creciente. Se obtuvieron 5.095 g (3.59 %) ⁶ de ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1), de pf. 146-148 °C, R_f= 0.4 [CH₂Cl₂ / MeOH (96:4)], R_f= 0.3 [n-hex/AcOEt (7:3)].

5.3. Ciclodextrinas (CDs).

La β -ciclodextrina (pureza \geq 97%) y (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina (pureza \geq 98%) fueron adquiridas de los laboratorios Sigma-Aldrich.

5.4. Complejos de inclusión.

5.4.1. Obtención de los complejos de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) mediante una mezcla física.

Los complejos de inclusión 1/ β -CD y 1/HP- β -CD se obtuvieron mezclando cantidades equivalentes de 1 con β -CD y HP- β -CD (1:1 mol) en un mortero con pistilo por 5 minutos hasta la obtención de una mezcla homogénea, de acuerdo a lo informado en la literatura [52, 55, 58-60]. La caracterización de las mezclas físicas de 1/ β -CD y 1/HP- β -CD se realizó por análisis termogravimétrico (figura 24-25) y por espectroscopia de IR (figura 26-27).

⁶ El rendimiento obtenido del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) se encuentra determinado por la cantidad de extracto crudo utilizado en la separación cromatográfica.

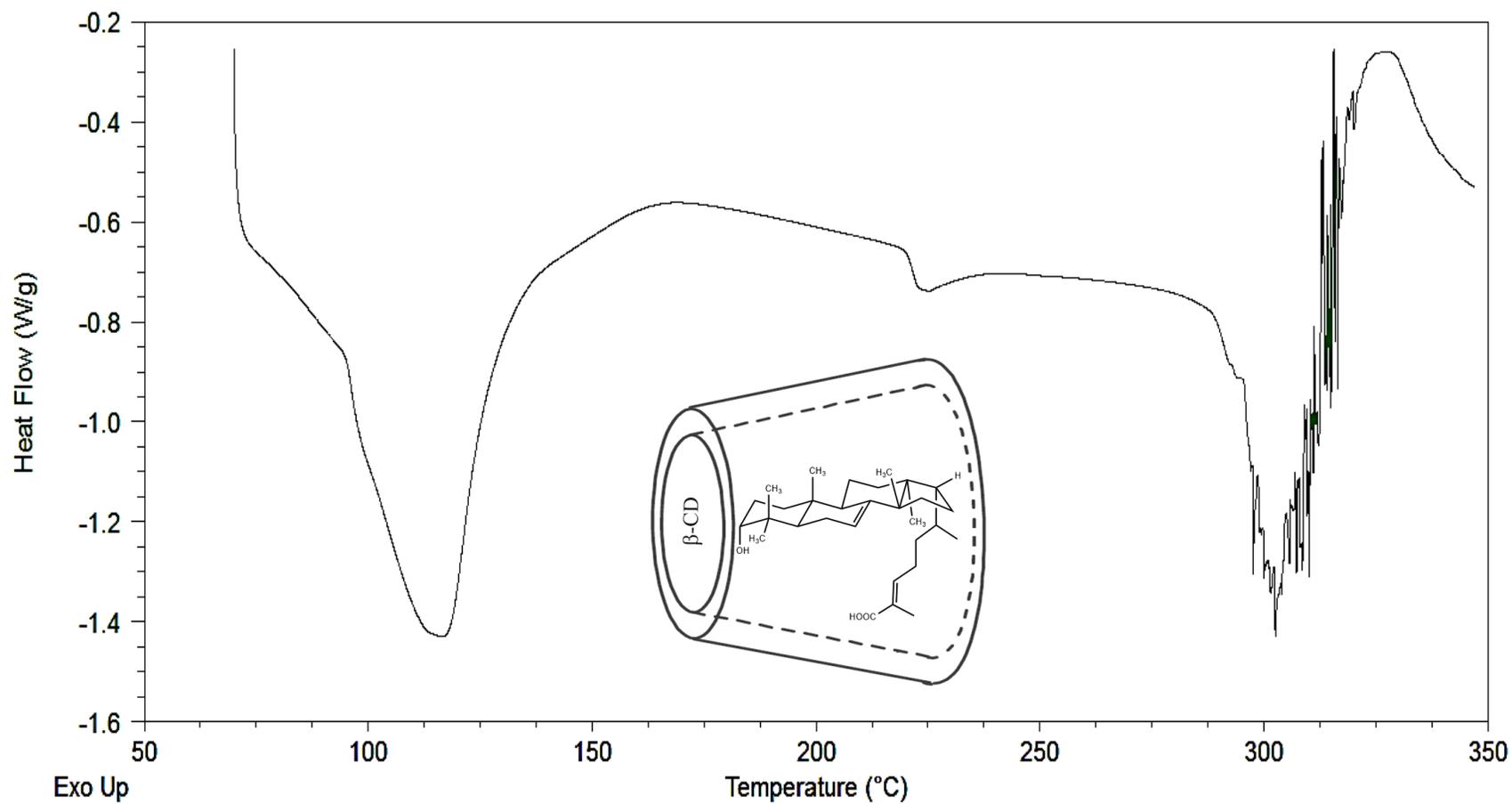


Figura 24. Termograma del complejo de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -CD obtenido por mezcla física.

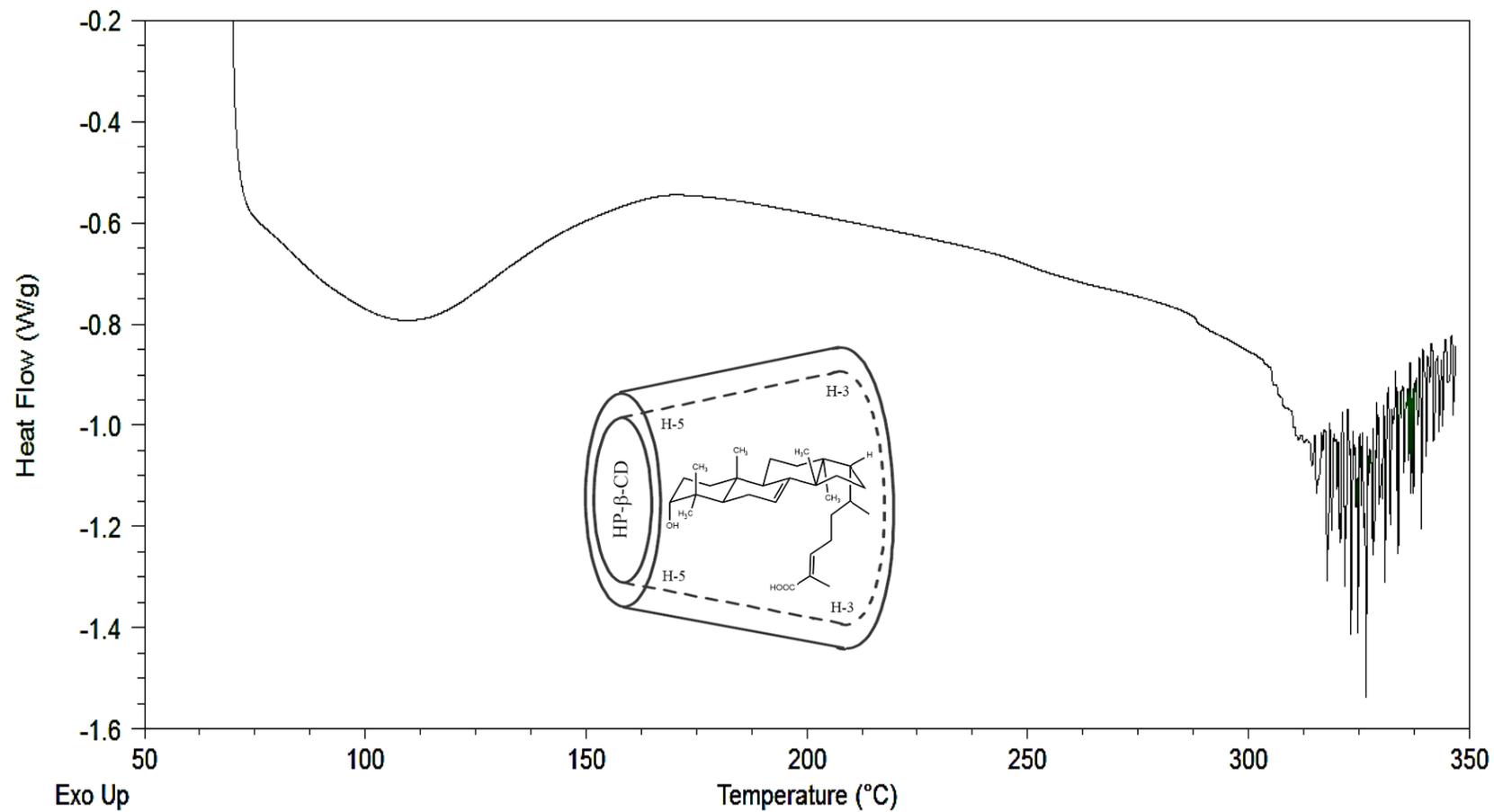


Figura 25. Termograma del complejo de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticdienónico (**1**) con HP- β -CD obtenido por mezcla física.

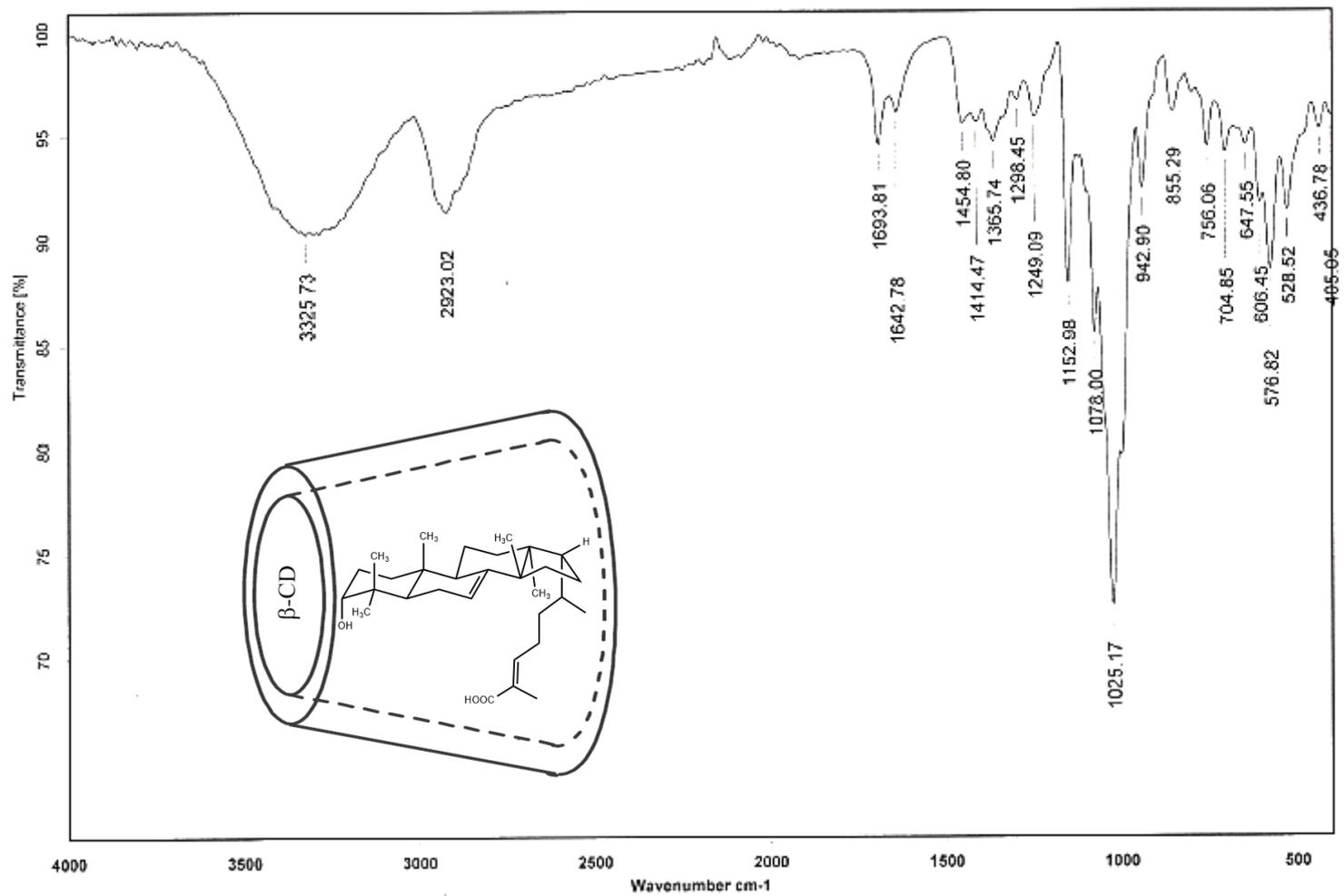


Figura 26. Espectro de IR del complejo de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) con β -CD obtenido por mezcla física.

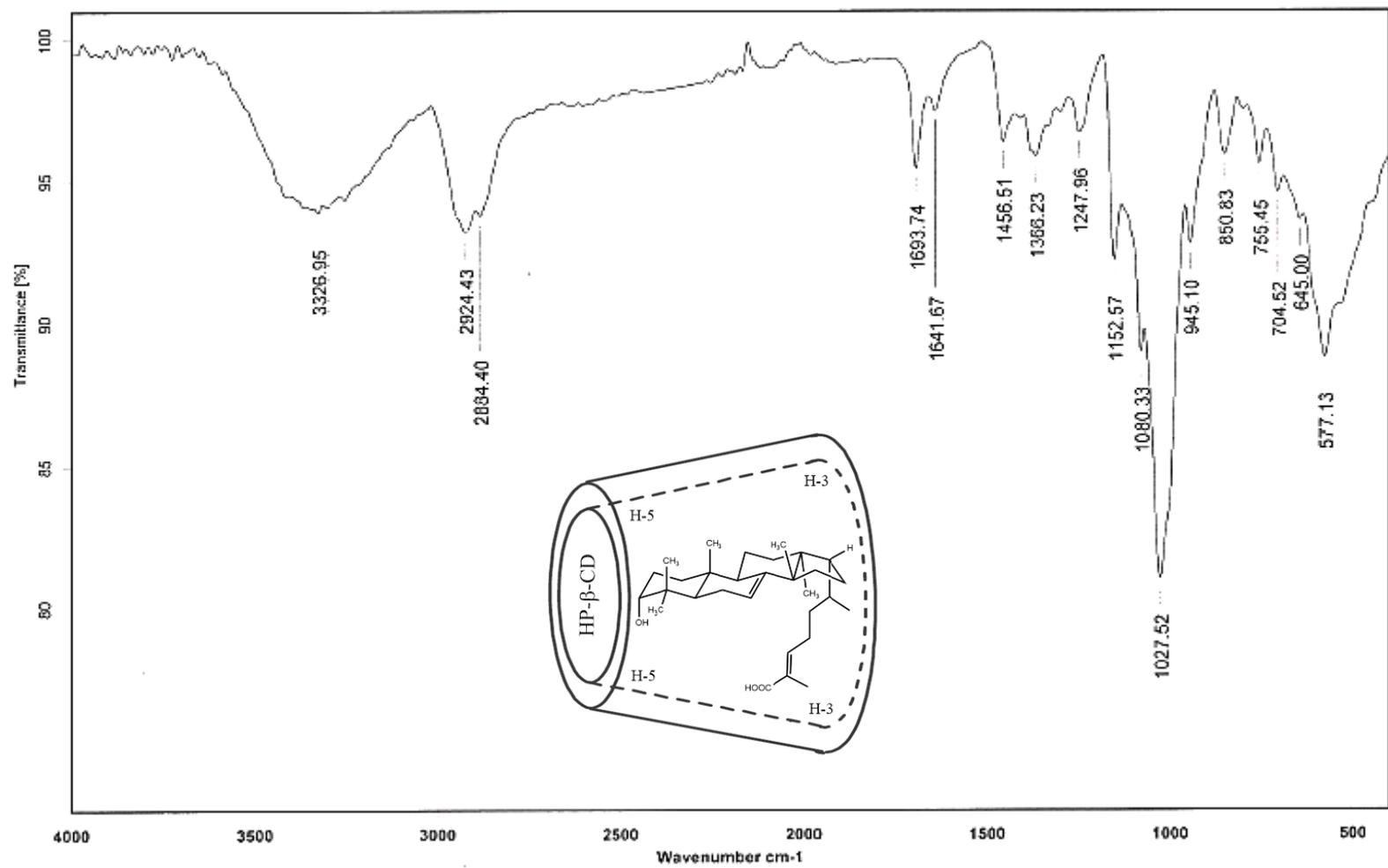


Figura 27. Espectro de IR del complejo de inclusión de ácido 3α-hidroxicasticadienónico (1) con HP-β-CD obtenido por mezcla física.

5.4.2. Obtención del complejo de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) mediante el método de co-evaporación.

El complejo de inclusión de 1/ β -CD fue obtenido de acuerdo al método descrito en la literatura [37, 53, 58, 60], utilizando cantidades proporcionales de **1** y β -CD (1:1 mol), las cuales fueron disueltas en MeOH y H₂O destilada respectivamente. Ambas disoluciones se mezclaron lentamente con agitación continua durante 24 h, adicionando por goteo la disolución β -CD/H₂O a la disolución de 1/MeOH. Transcurridas las 24 h, se procedió a la evaporación de la mezcla MeOH/H₂O a baja presión. El complejo obtenido en solución acuosa se congeló para su posterior liofilización. El complejo 1/ β -CD fue almacenado a 4°C. La obtención del complejo de 1/HP- β -CD se llevó a cabo por el mismo procedimiento. La caracterización de los complejos de inclusión por el método de co-evaporación de 1/ β -CD y 1/HP- β -CD, se realizó mediante DSC (figura 28-29), espectroscopia de IR (figura 30-31) y difracción de Rayos X (figura 32-33).

5.4.3. Caracterización de los complejos de inclusión entre el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) mediante la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La caracterización mediante análisis termogravimétrico (DSC) se llevó a cabo en una celda de Al en donde se colocó una cantidad aproximada (3-5 mg) de **1** a una velocidad de calentamiento de 10°C/min y un rango de temperatura de 50° a 350°C en una atmósfera de N₂. Las mismas condiciones experimentales fueron utilizadas para el análisis de β -CD, HP- β -CD; los complejos de inclusión por mezcla física de 1/ β -CD y 1/HP- β -CD; los complejos de inclusión por método de co-evaporación de 1/ β -CD y 1/HP- β -CD

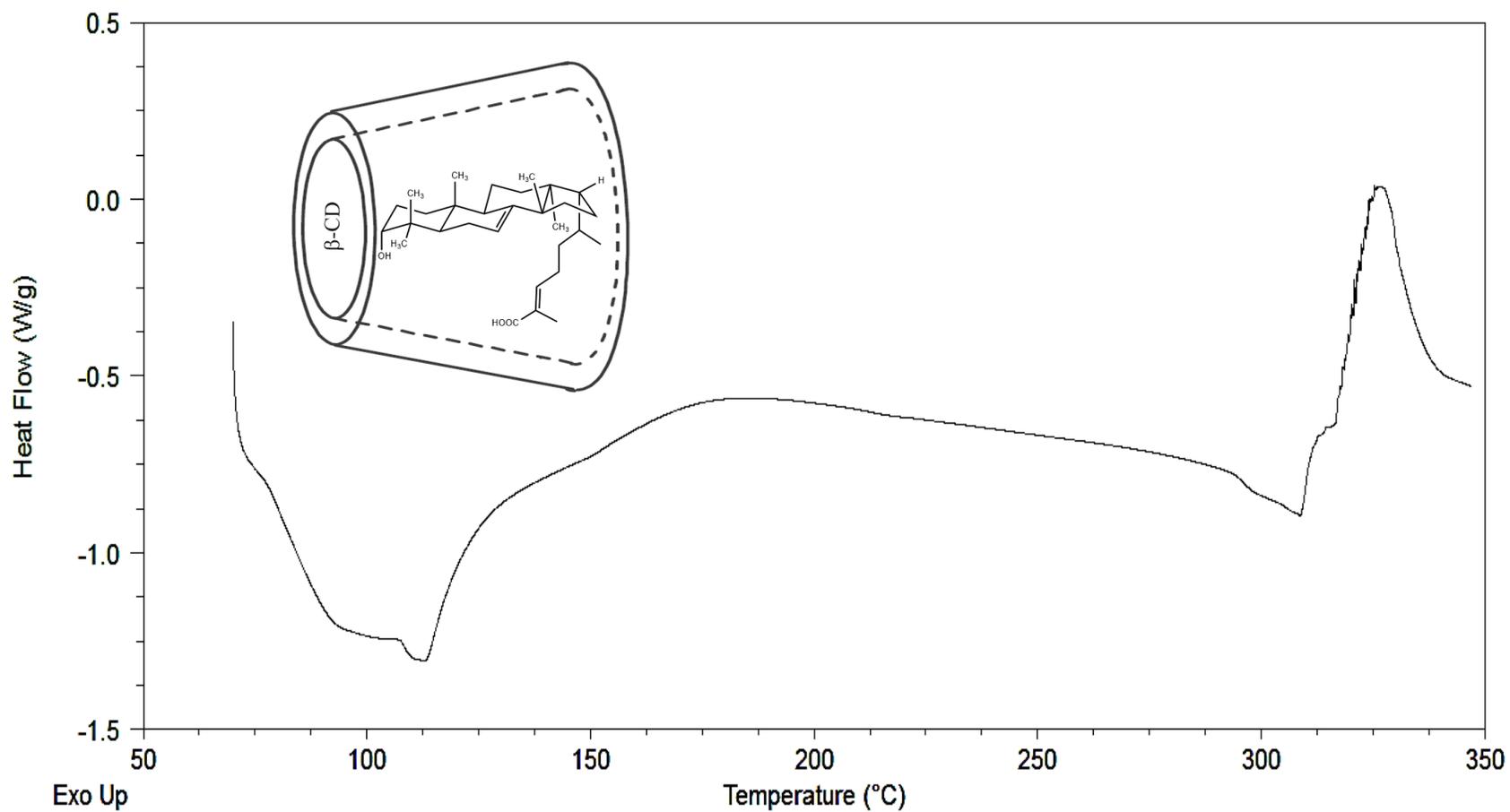


Figura 28. Termograma del complejo de inclusión de ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -CD obtenido por método de co-evaporación.

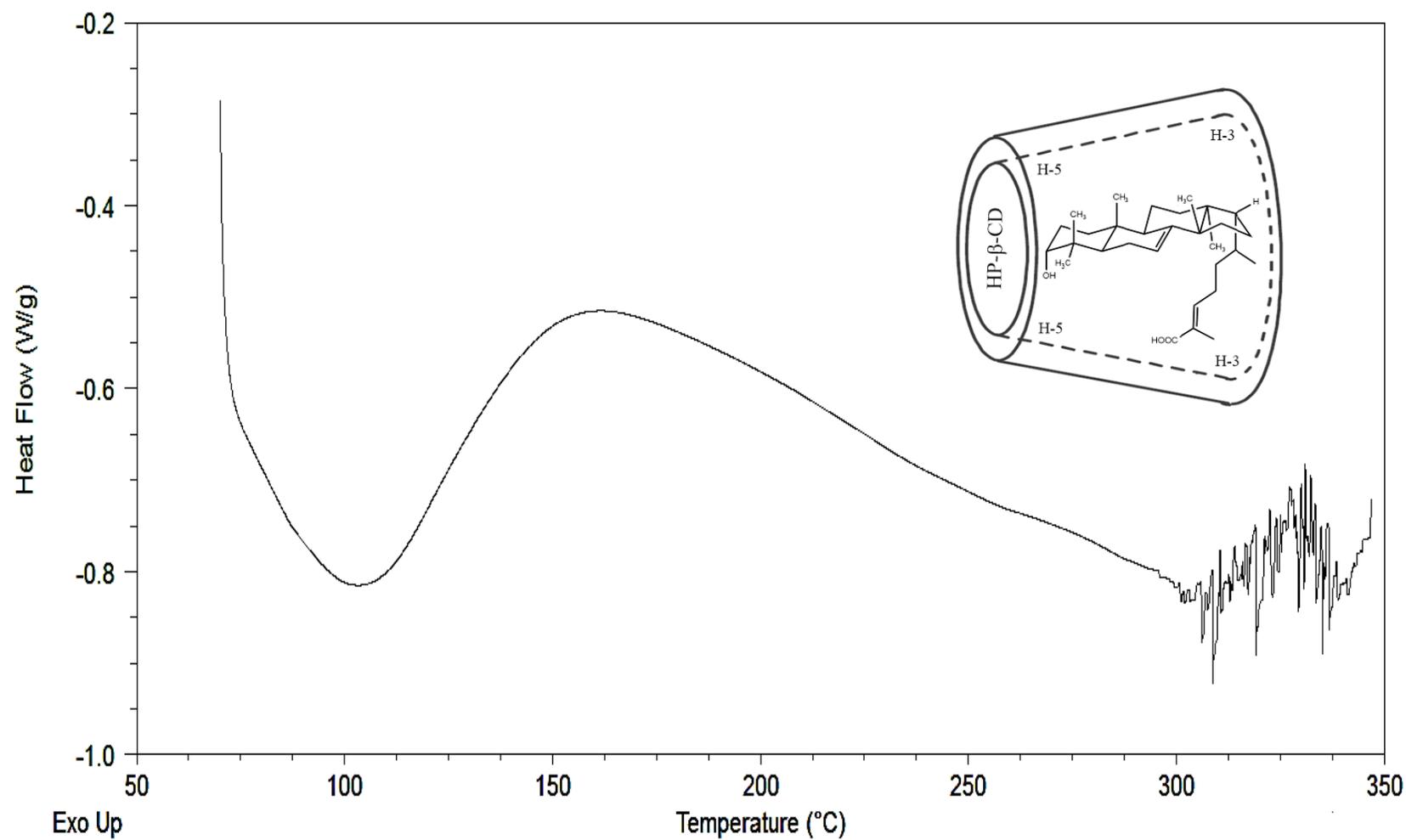


Figura 29. Termograma del complejo de inclusión de ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) con HP- β -CD obtenido por método de co-evaporación.

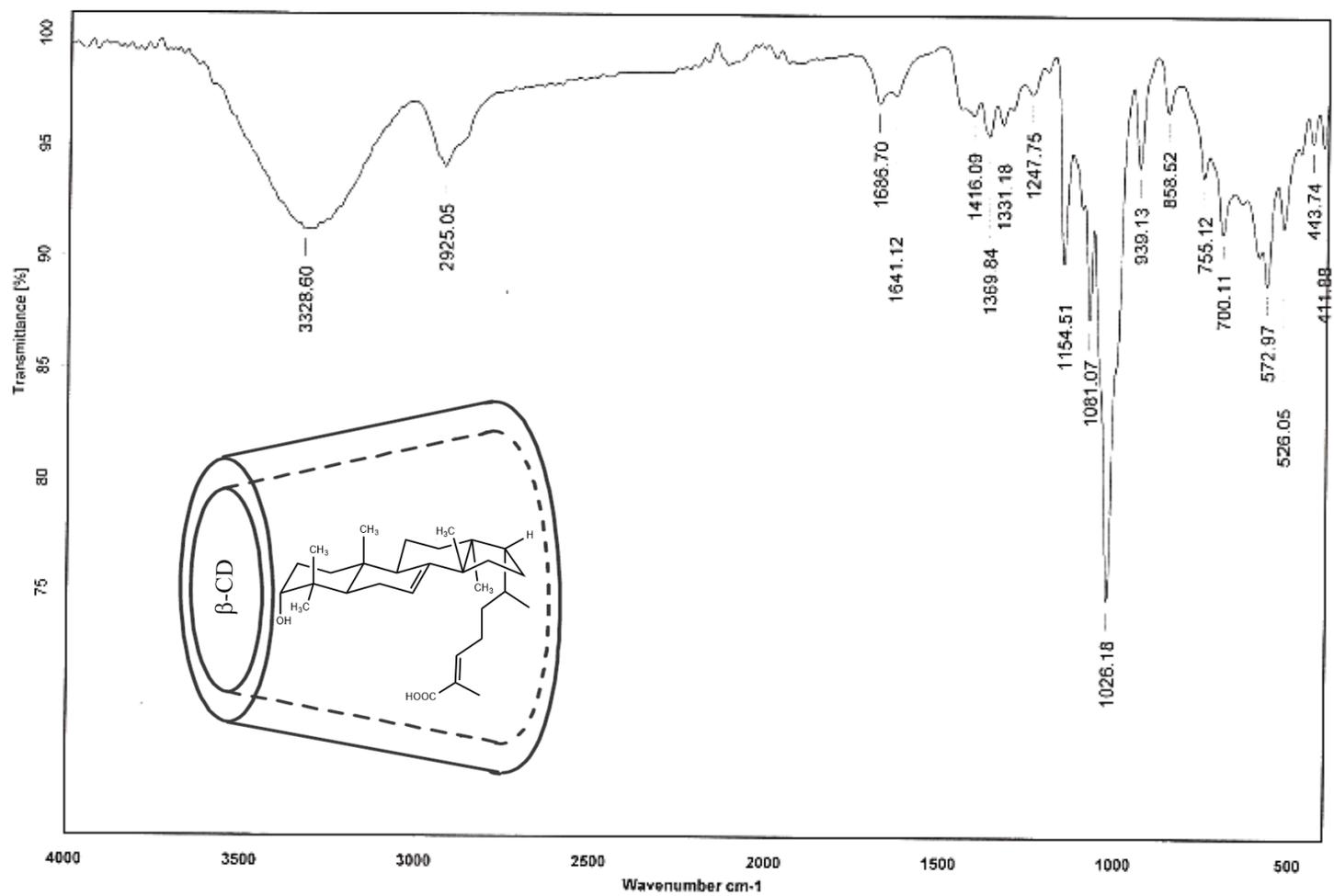


Figura 30. Espectro de IR del complejo de inclusión de ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -CD obtenido por método de co- evaporación.

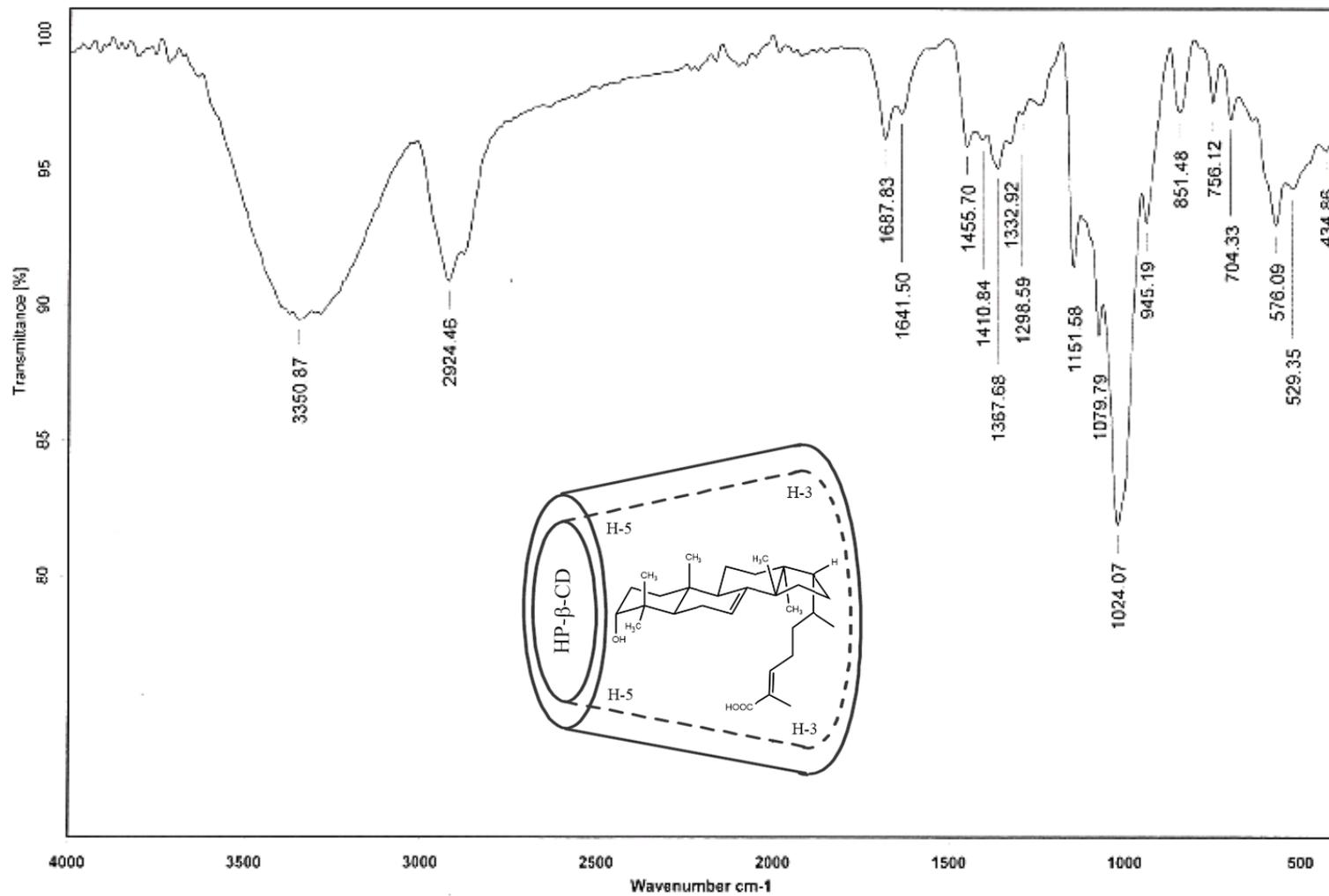


Figura 31. Espectro de IR del complejo de inclusión de ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) con HP- β -CD obtenido por método de co-evaporación.

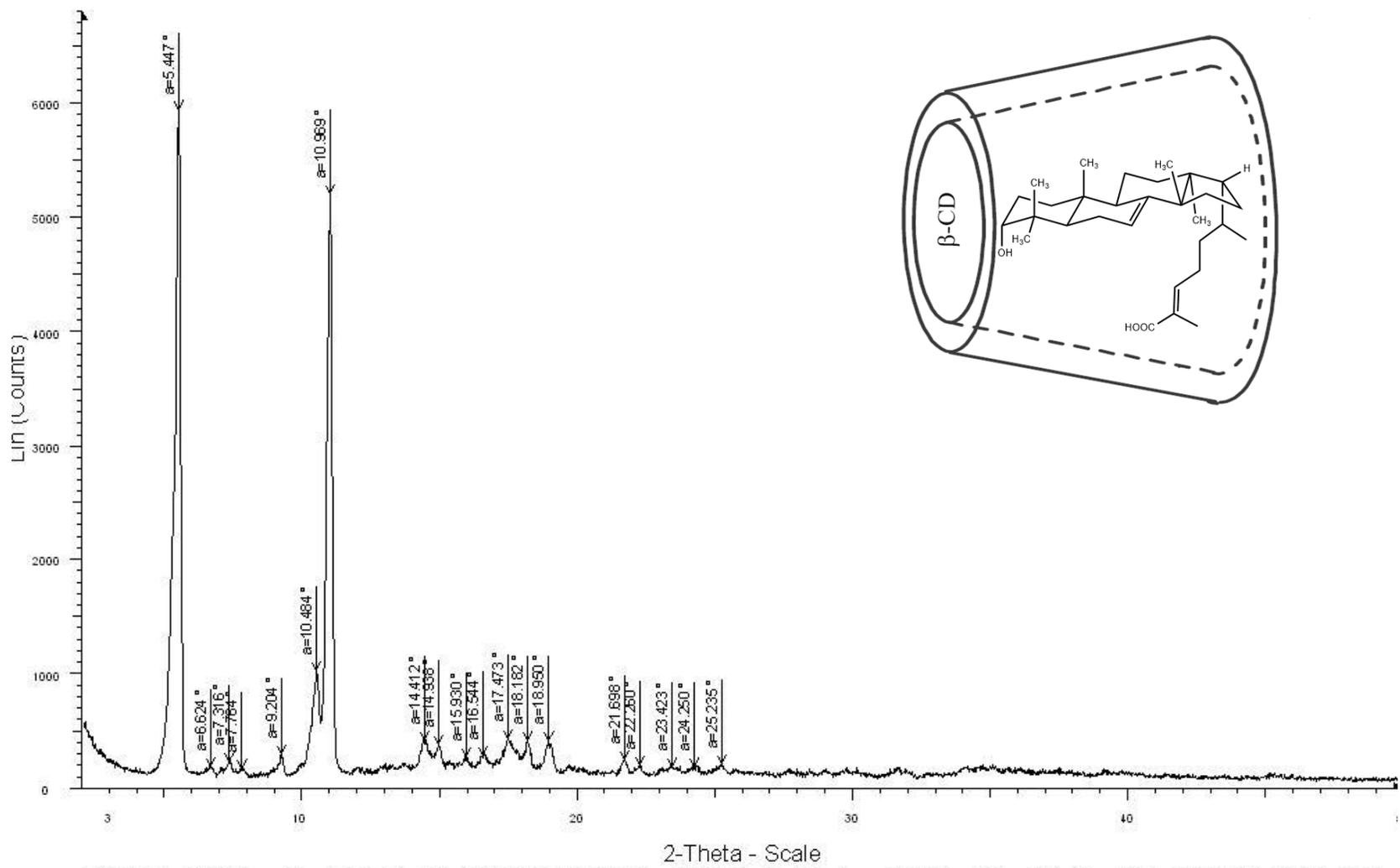


Figura 32. Difractograma del complejo de inclusión de ácido 3α-hidroxicasticadienónico (1) con β-CD obtenido por método de co-evaporación.

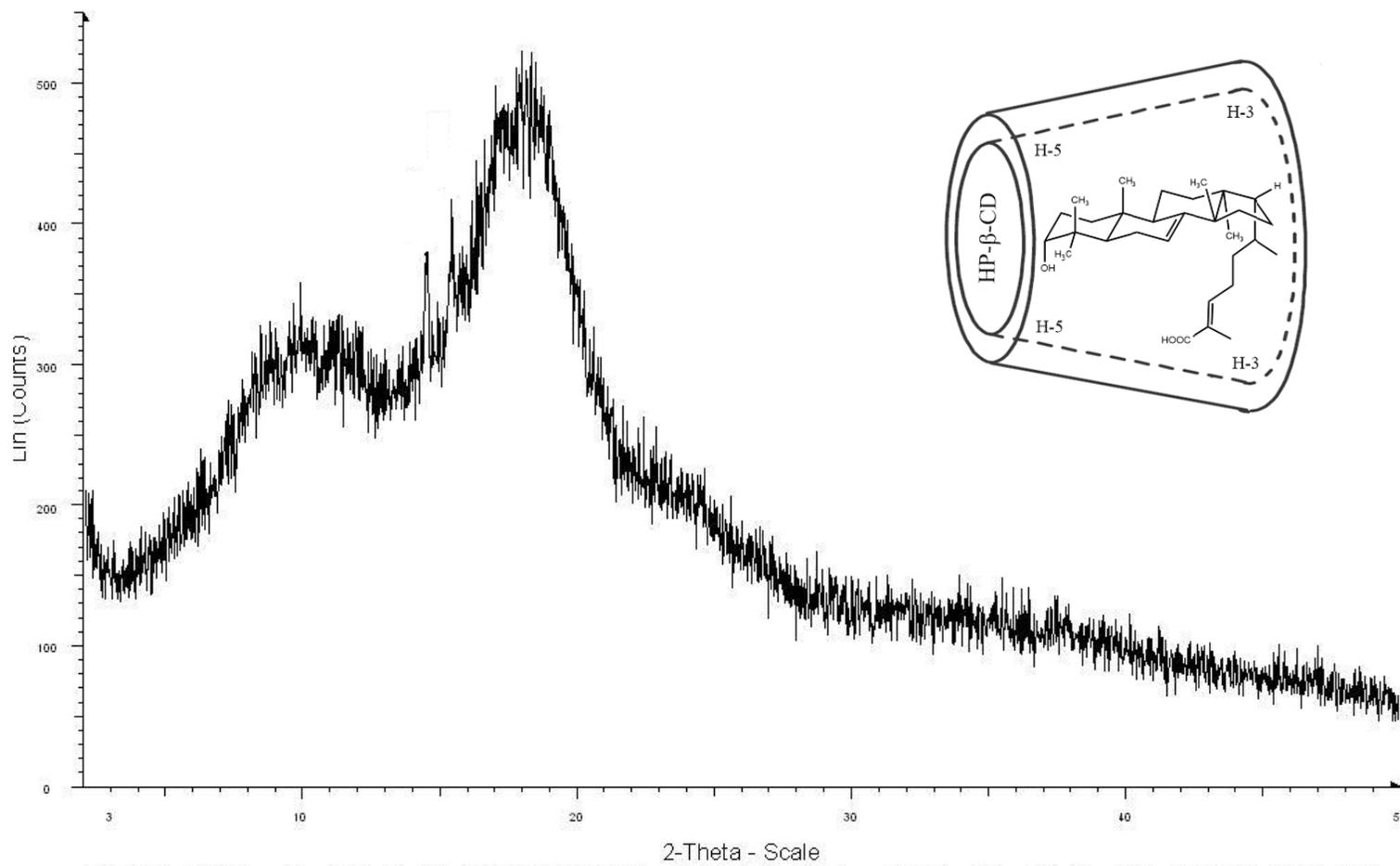


Figura 33. Difractograma del complejo de inclusión de ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) con HP- β -CD obtenido por método de co-evaporación.

5.4.4. Caracterización de los complejos de inclusión entre el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) mediante la técnica de difracción de Rayos X.

Para la caracterización por difracción de Rayos X de polvos, se colocó en una celda vítrea una cantidad aproximada (30-40 mg) de **1** en un difractómetro de rayos X. La muestra se irradió con Cu-K(α), a un voltaje de 40 kV y una corriente de 100 mA en un rango de barrido de 5°/min con un avance de $\theta = 0.01^\circ$, en un intervalo de $2\theta = 2.020^\circ$ -50.00°. Las mismas condiciones fueron utilizadas para obtener los difractogramas de β -CD, HP- β -CD y los complejos de inclusión obtenidos por el método de co-evaporación de **1**/ β -CD y **1**/HP- β -CD.

5.4.5. Caracterización de los complejos de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con β -ciclodextrina (β -CD) y (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD) por espectroscopia de IR.

Los complejos de inclusión obtenidos por los métodos de mezcla física y co-evaporación de **1**/ β -CD, fueron caracterizados por medio de espectroscopia de IR. La muestra se colocó en KBr (pastilla) y se trabajó en un barrido de longitud de onda 4000-400 cm^{-1} . Las mismas condiciones fueron utilizadas para obtener los espectros de **1**, β -CD, HP- β -CD y los complejos de inclusión de **1**/HP- β -CD obtenidos por mezcla física y co-evaporación.

5.5. Biotransformación de **1/HP- β -CD.**

5.5.1. Resiembra de los hongos.

Se pesaron 5.85 g de agar papa dextrosa (APD) y se disolvieron en 150 mL de H₂O destilada, hasta disolución total, la solución resultante se distribuyó en 10 matraces Erlenmeyer de 50 mL (aproximadamente 15 mL cada uno) los cuales fueron posteriormente esterilizados a 120°C/1 lb/15 min. Una vez solidificado el medio, se realizó la resiembra de cada uno los hongos —*C. echinulata* (CDBB-H-255), *C. lunata* (CDBB-H-261), *T. atroviride* y *B. adusta*— y se dejaron en crecimiento por 5 días.

5.5.2. Preparación del medio YEPGA.

El medio YEPGA se obtuvo disolviendo peptona (1 g), extracto de levadura (1 g), extracto de carne (1 g) y glucosa (5 g) en 1 L de H₂O destilada a pH 7. Una vez preparado el medio, se procedió a esterilizarlo a 120°C/1.5 lb/15 min. Posteriormente, fueron vertidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL, aproximadamente 100 mL de medio YEPGA.

Para el medio YEPGA de *B. adusta*, se adicionaron 5 mL por litro, de una solución de elementos traza, la cual se preparó con ácido cítrico (1.25 g), ZnSO₄ (1.25 g), Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ (0.25 g), CuSO₄ (62.5 mg), MnSO₄ (12.5 mg), H₃BO₃ (12.5 mg) y Na₂MoO₄ (12.5 mg) en 25 mL de H₂O destilada. Finalmente, se ajustó a pH neutro, mediante la adición de una solución de KOH (1M).

5.5.3. Preparación de la solución densa de esporas.

La solución densa de esporas de los hongos *C. echinulata*, *C. lunata* y *T. atroviride* se preparó adicionando 15 mL de H₂O destilada estéril a los diferentes matraces Erlenmeyer (50 mL), previamente resembrados con 5 días de incubación a temperatura ambiente.

5.5.4. Inoculación del medio YEPGA con hongos.

Los distintos matraces Erlenmeyer de 250 mL (100 mL de medio YEPGA) fueron inoculados con 2 mL de una solución densa de esporas (2×10^6) de *C. echinulata*, *C. lunata* y *T. atroviride*. Se incubaron durante 72 h a 120 rpm y 28 °C. Para el proceso de biotransformación, se utilizaron diferentes matraces de referencia (blanco del hongo, blanco del medio YEPGA, blanco de la sustancia) para descartar cualquier producto que pudiese haberse generado por la descomposición o metabolismo del hongo en las condiciones experimentales.

Para *B. adusta*, se adicionó el micelio (0.25 cm²) en matraces Erlenmeyer de 250 mL (100 mL de medio). Se incubaron por 7 días para lograr un óptimo crecimiento y adaptación al medio.

5.5.5. Biotransformación cualitativa del complejo de inclusión 1/HP-β-CD con cuatro hongos.

Para realizar la biotransformación cualitativa con los diferentes hongos filamentosos se utilizaron matraces de 250 mL (100 mL del medio YEPGA). Siete matraces fueron inoculados con 2 mL de la solución densa de esporas de cada hongo (tres matraces corresponden al blanco del hongo) los cuales fueron incubados a 28°C y 120 rpm. Después de 72 h de realizar la inoculación con la solución densa de esporas, se adicionaron aproximadamente 20 mg de 1/HP-β-CD disuelto en 1 mL de DMSO (aproximadamente 5 mg de **1** por matraz). El transcurso de la biotransformación se llevó a cabo cada 48 h, tomando una alícuota (1 mL de medio) durante 14 días. A cada fracción, se le realizó una extracción líq-líq (CH₂Cl₂, 1 mL) y la fase orgánica resultante fue secada con Na₂SO₄ anhidro. El seguimiento se realizó mediante CCF, utilizando como referencias los diferentes blancos (complejo de inclusión, del hongo y del medio).

Para *B. adusta*, siete matraces fueron inoculados con 0.25 cm² de micelio (tres matraces corresponden al blanco del hongo) los cuales fueron incubados a 28°C. Después de 120 h de realizar la inoculación, se adicionaron 20 mg de 1/HP-β-CD disuelto en 1 mL de DMSO (aproximadamente 5 mg de **1** por matraz). El seguimiento de la biotransformación se llevó a cabo de la misma manera que para hongos filamentosos durante 14 días.

5.5.6. Biotransformación cuantitativa del complejo de inclusión de 1/HP-β-CD *C. lunata* (CDBB-H-261).

Con base en los resultados obtenidos en la factibilidad de biotransformación, se realizó la biotransformación cuantitativa de 1/HP-β-CD con *C. lunata* (CDBB-H-261). Se inocularon 34 matraces Erlenmeyer de 250 mL (100 mL de medio YEPGA) con 2 mL de solución densa de esporas del hongo a 28°C y 120 rpm. Después de 72 h de haber realizado la inoculación, se adicionaron 20 mg del complejo de inclusión 1/HP-β-CD disueltos en 1 mL de DMSO (aproximadamente 5 mg de sustrato por matraz) a 29 matraces de biotransformación. Los 5 matraces restantes fueron destinados como control. El seguimiento se llevó a cabo cada 24h, tal como se describió en la biotransformación cualitativa durante 14 días.

5.5.7. Obtención de los residuos de biotransformación de 1/HP- β -CD con *C. lunata* (CDBB-H-261).

Después de 14 días de incubación, se dio por terminado el proceso de biotransformación mediante la separación de la fase líquida de la biomasa por filtración a vacío. Se determinó el pH de la fase líquida al término del proceso en 8.0. Posteriormente, se ajustó con una sol. de HCl (20%) a un valor 5.0. La fase líquida se saturó con NaCl y se procedió a realizar extracciones líq-líq con CH₂Cl₂ (10 x 50 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró el residuo en un rotavapor para eliminar el exceso de disolvente. Este proceso se realizó de la misma manera con el blanco del hongo.

Por otro lado, a la biomasa se le realizaron extracciones sól-líq con AcOEt (10 x 50 mL) hasta la extracción total de los productos derivados del proceso. La fase orgánica fue tratada con Na₂SO₄ anhidro y concentrada por medio del rotavapor. A continuación, se muestra la CCF con los residuos obtenidos (Figura 34).



- 1) Ác. masticadienónico (2)
- 2) Ác. 3 α -hidroximasticadienónico (1)
- 3) Residuo de la fase líquida de la biotransformación
- 4) Blanco de la fase líquida del hongo
- 5) Residuo de la biomasa de la biotransformación
- 6) Blanco de la biomasa del hongo
- 7) Blanco del medio

Mezcla de elución: *n*-hex/acetona (7:3)

Figura 34. CCF de los residuos obtenidos de la biotransformación cuantitativa de 1/HP- β -CD con *C. lunata*.

5.5.8. Aislamiento y purificación de los productos de biotransformación del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con *C. lunata* (CDBB-H-261) empleando las técnicas convencionales de separación y purificación.

El aislamiento y purificación de los productos de biotransformación se realizó mediante técnicas cromatográficas convencionales –Cromatografía en Columna a presión reducida (CCV), Cromatografía en Columna (CC), Cromatografía flash (CC-Flash) y Cromatografía en Capa Fina (CCF)–. En la biotransformación de **1**, se recuperaron 78.4 mg. Se identificó al ácido masticadienónico (**2**, 13.6 mg ,4.6%); además se purificaron cuatro sustancias que no fueron identificadas debido al bajo rendimiento obtenido [9.6 mg, 1.6 mg, 2.6 mg y 3.3 mg]. A continuación, se muestra la CCF de los compuestos aislados (Figura 35).



- 1) Ác. 3 α -hidroximasticadienónico (**1**)
- 2) Ác. masticadienónico (**2**)
- 3) C1 (9.6 mg)
- 4) C2 (1.6 mg)
- 5) C3 (2.6 mg)
- 6) C4 (3.3 mg)

Mezcla de elución: *n*-hex/acetona (6:4)

Figura 35. CCF de los compuestos obtenidos de la biotransformación cuantitativa de **1**/HP- β -CD con *C. lunata*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Aislamiento del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1).

Del extracto con AcOEt de la corteza del cuachalalate, fueron obtenidos 5.095 g (3.59 % del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1) con respecto a la cantidad de extracto “crudo”) de un sólido blanco, el cual fue identificado con base en sus propiedades físicas, pf. 146-148 °C y R_f = 0.4 [CH₂Cl₂ / MeOH (96:4)], R_f = 0.3 [n-hex/AcOEt (7:3)] y espectroscópicas como el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1).

6.2. Obtención y comparación de los rendimientos observados en la preparación de los complejos de inclusión de 1 con β -CD y HP- β -CD mediante una mezcla física y el método de co-evaporación.

Se realizó una comparación de los rendimientos obtenidos con los dos métodos utilizados —método de co-evaporación y mezcla física— al formar complejos de inclusión.

Tabla 2. Comparación de rendimientos de los métodos utilizados en la formación de complejos de inclusión.

Método utilizado	Cantidad de sustrato 1	Cantidad de ciclodextrina	Total en peso de la mezcla	Total en peso de la mezcla obtenida.	Rendimiento en %
Mezcla física entre 1 y B-CD	15 mg	37.33 mg	52.33 mg	41.7 mg	79.68 %
Mezcla física entre 1 y HP-B-CD	15 mg	46.05 mg	61.05 mg	51 mg	83.53 %
Método de co-evaporación entre 1 y B-CD	20 mg	49.77 mg	69.77 mg	61 mg	87.43%
Método de co-evaporación entre 1 y HP-B-CD	20 mg	61.40 mg	81.40 mg	72.7 mg	89.31%

Con base en el análisis realizado, se determinó que existe menos pérdida de materia prima por el método de co-evaporación en comparación con la mezcla física.

6.3. Caracterización por análisis termogravimétrico (DSC) y espectroscopia de IR de los complejos de inclusión entre **1** con β -CD y HP- β -CD por el método de co-evaporación y mezcla física.

Se caracterizaron por análisis termogravimétrico (DSC) y espectroscopia de IR las sustancias puras y los complejos de inclusión de **1** con dos ciclodextrinas — β -CD y HP- β -CD— obtenidos mediante mezcla física y método de co-evaporación de acuerdo a lo descrito en la literatura especializada, ver figura 36-39 [37, 52-53, 55-60]. Los Análisis Termogravimétricos de los complejos de inclusión y de las sustancias puras se realizaron en el Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, de los cuales se obtuvieron los respectivos termogramas. Los espectros de IR de los complejos de inclusión y de las sustancias puras se realizaron en el Instituto de Química, UNAM.

Con base en el termograma, ver figura 36, se puede observar un pico endotérmico alrededor de los 150 °C que corresponde al pf. de **1**; además de un pico endotérmico en aproximadamente 132°C el cual corresponde a la deshidratación de la β -CD (pf. de 300 °C). Para el complejo de inclusión por el método de co-evaporación (línea b) y mezcla física (línea c), se observa una gran similitud, el pico correspondiente a la deshidratación de la β -CD (132°C) y la ausencia del pico endotérmico de **1** en aproximadamente 150°C, indica que fue posible formar el complejo de **1** con la β -CD modificando las propiedades físicas de la sustancia huésped.

En el termograma correspondiente al complejo de inclusión de **1**/HP- β -CD (figura 37), se puede observar para **1** un pico endotérmico alrededor de 150°C, lo cual corresponde al punto de fusión de **1**. Para HP- β -CD (línea b) se observa un pico endotérmico entre los 90-120°C, debido a la deshidratación de la HP- β -CD, determinada por la pureza de la misma. Para la mezcla física (línea c), se observa el pico correspondiente a la deshidratación de HP- β -CD entre 90-120°C y la ausencia del pico endotérmico de **1** en 150°C, lo cual confirma la formación del complejo de inclusión de **1**/HP- β -CD. Finalmente, el termograma para el complejo de inclusión de **1**/HP- β -CD, por el método de co-evaporación es muy similar al anterior, por lo cual se puede afirmar que por ambos métodos se pudo preparar el complejo de inclusión de **1** con HP- β -CD

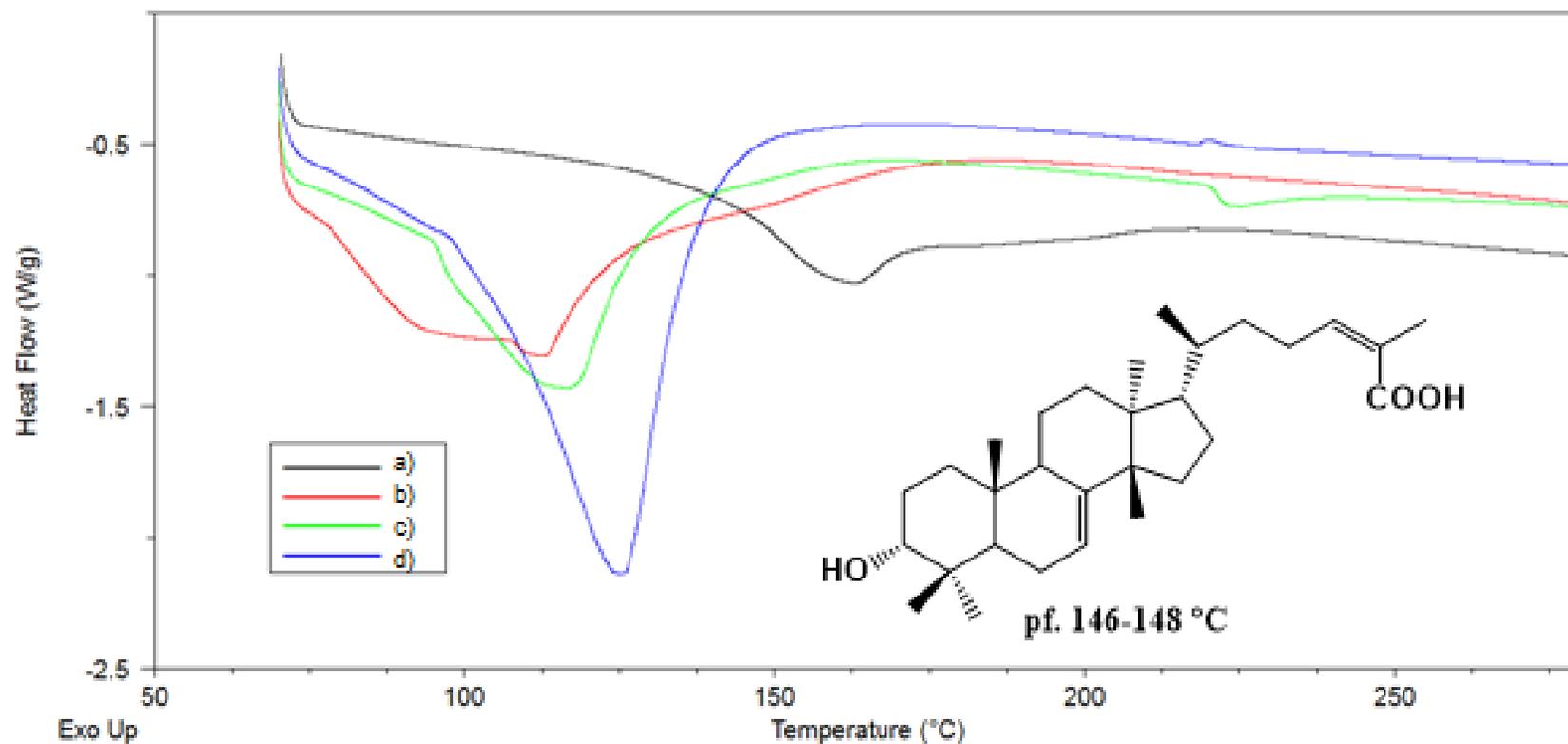


Figura 36. Termogramas: (a) Ácido 3 α -hidroximasticadienónico, (b) Complejo de inclusión por método de co- evaporación, (c) Complejo de inclusión por mezcla física y (d) β -CD

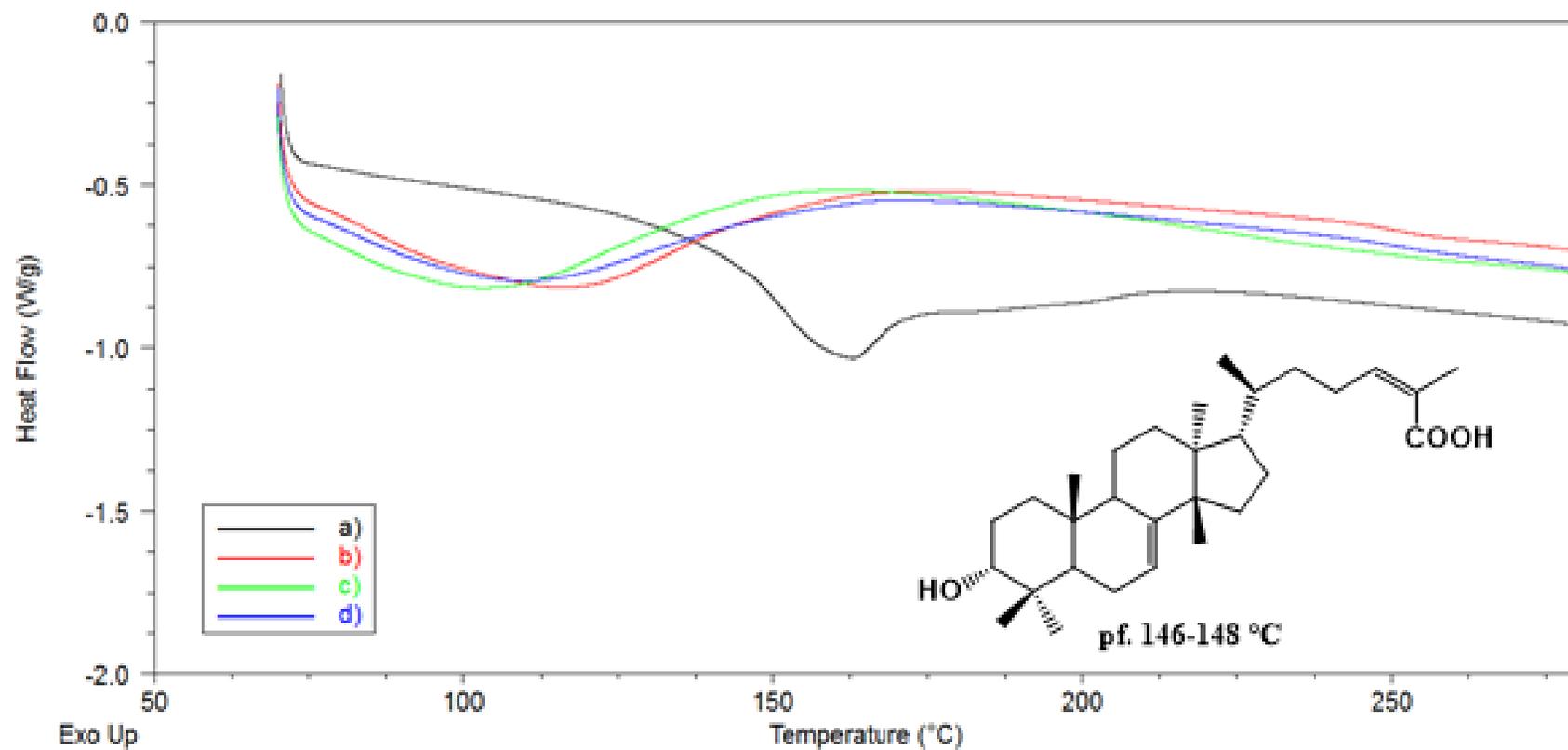


Figura 37. Termogramas de (a) Ácido 3 α -hidroximasticadienónico, (b) HP- β -CD, (c) Complejo de inclusión por mezcla física y (d) Complejo de inclusión por método de co-evaporación.

Los complejos de inclusión de **1**/ β -CD y **1**/HP- β -CD también fueron caracterizados por medio de espectroscopia de IR. En la figura 38, se observan las absorciones características de los grupos funcionales presentes en **1**. El grupo hidroxilo en C-3 puede formar puentes de hidrogeno de manera *intra* e *inter* molecular, así como la función ácido carboxílico en C-27. En 3430 cm^{-1} la $\nu(\text{O-H})$ corresponde a dicho grupo hidroxilo, mientras que la $\nu(\text{C=O})$ del grupo carbonilo del ácido es determinado por la absorción intensa alrededor de 1700 cm^{-1} . En 2940 cm^{-1} , se observa una banda ancha correspondiente a la $\nu(\text{C-H})$ de Csp^3 .

Para poder caracterizar los complejos de inclusión mediante este método, se compararon los espectros de IR de β -CD pura, con los obtenidos en la mezcla física y método de co-evaporación con **1**, observándose que los tres espectros son muy similares.

Cabe señalar que una característica importante en los espectros de infrarrojo de un ácido carboxílico y de un grupo carbonilo en general, es la gran intensidad y adsorción del grupo C=O en aproximadamente 1700 cm^{-1} . Con base en lo anterior, se puede resaltar que, al formar los complejos de inclusión, se observa la desaparición de la $\nu(\text{C=O})$ de la función ácido carboxílico de **1**, lo cual confirma que se formó el complejo de inclusión por los dos métodos descritos, sugiriendo que **1** se encuentra dentro de la cavidad de β -CD, modificando sus propiedades físicas y espectroscópicas.

Para caracterizar los complejos de inclusión **1**/HP- β -CD, se observa (al igual que con β -CD) el comportamiento de la HP- β -CD pura y la similitud que presentan los espectros de IR del complejo de inclusión mediante mezcla física y método de co-evaporación con **1**. En la superposición de espectros (figura 39), se observa la desaparición de algunas de las bandas de absorción características de **1**, sugiriendo que el ácido 3α -hidroximasticadienónico (**1**) se encuentra dentro de la cavidad de HP- β -CD, modificando sus propiedades espectroscópicas.

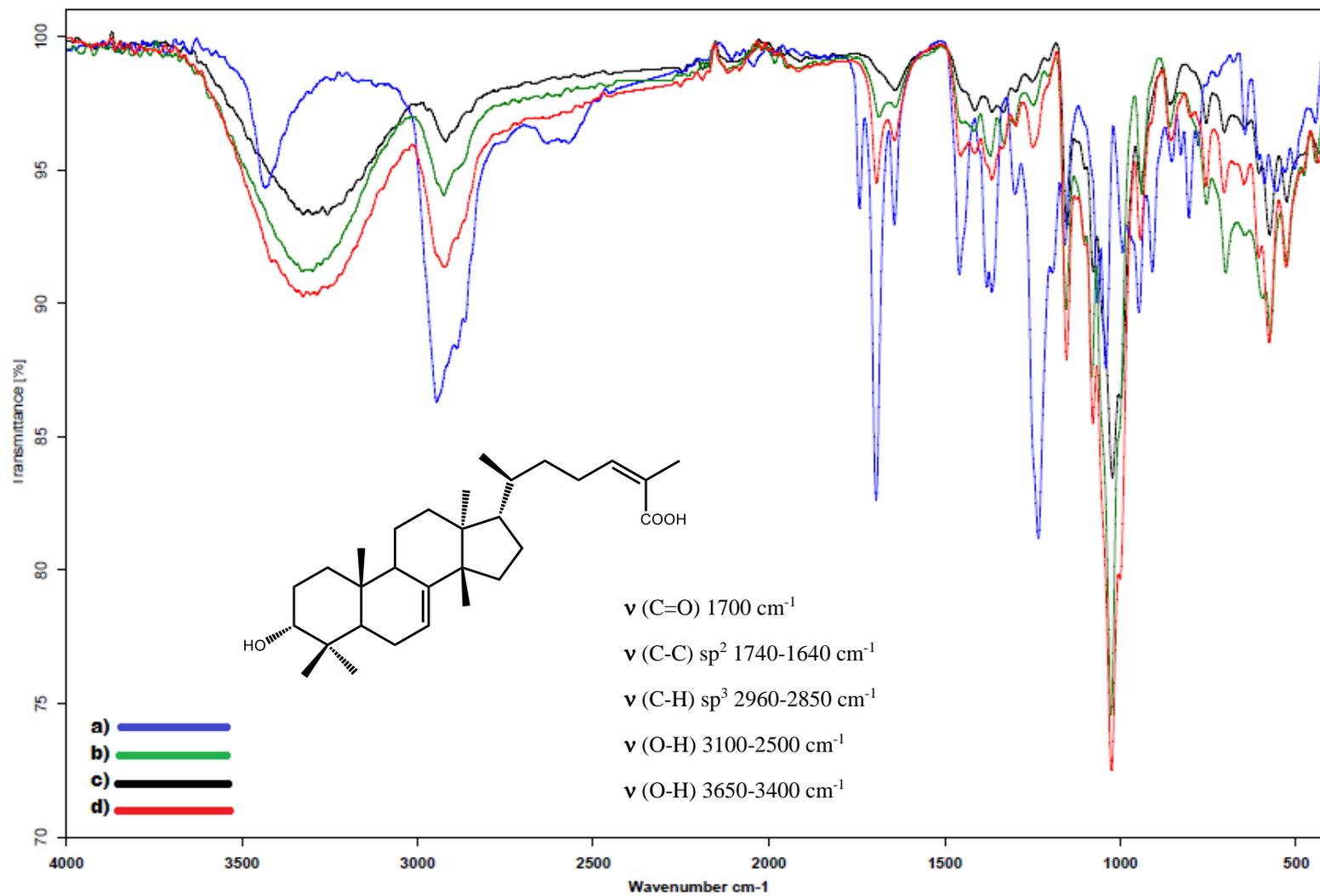


Figura 38. Espectros de IR: (a) Ácido 3 α -hidroximasticadienónico, (b) Complejo de inclusión obtenido mediante el método de co-evaporación de 1/ β -CD, (c) β -CD y (d) Complejo de inclusión obtenido por mezcla física de 1/ β -CD.

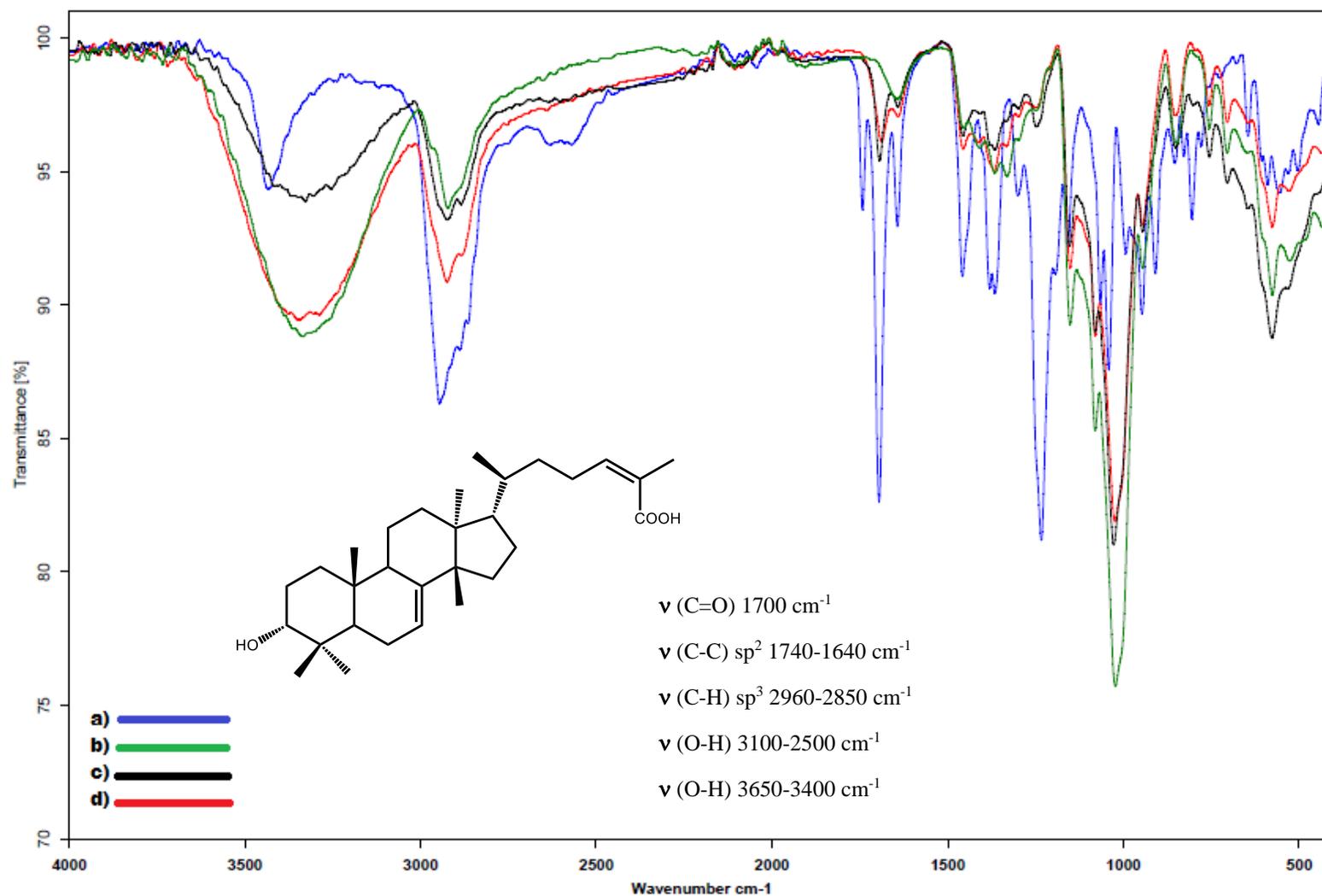


Figura 39. Espectros de IR: (a) Ácido 3 α -hidroximasticadienónico, (b) HP- β -CD, (c) Complejo de inclusión obtenido por mezcla física de **1**/ HP- β -CD y (d) Complejo de inclusión obtenido mediante el método de co-evaporación de **1**/ HP- β -CD.

Con base en la información obtenida a partir del análisis termogravimétrico y espectroscópico de IR, confirman la formación de los complejos de inclusión de **1** con β -CD y HP- β -CD. Sin embargo, una de las limitantes al formar el complejo de inclusión por mezcla física, fue el rendimiento obtenido. Por lo cual, se seleccionó al complejo de inclusión de **1**/HP- β -CD obtenido por el método de co-evaporación para su caracterización mediante difracción de Rayos X.

6.4. Caracterización por difracción de Rayos X de los complejos de inclusión entre **1 con β -CD y HP- β -CD por el método de co-evaporación.**

Se caracterizaron por difracción de Rayos X, las sustancias puras y los complejos de inclusión **1**/ β -CD y **1**/HP- β -CD obtenidos mediante el método de co-evaporación. Se obtuvieron los difractogramas de los complejos de inclusión y las sustancias puras, ver figura 40-44. Con base en los resultados obtenidos de la caracterización de los complejos de inclusión por difracción de Rayos X, se determinó que **1** tiene mayor afinidad por la cavidad de HP- β -CD; esto es evidente en el difractograma de **1**/ β -CD (figura 42), ya que se observan algunos picos que corresponden con los ángulos de difracción del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**). Por otro lado, en el difractograma de **1**/HP- β -CD (figura 44), el comportamiento del complejo de inclusión es prácticamente idéntico al de la HP- β -CD pura (figura 43), en donde los picos que corresponden a los ángulos de difracción de **1** están ausentes, sugiriendo que la molécula huésped se encuentra dentro de la cavidad de la ciclodextrina.

Con base en los rendimientos obtenidos en la preparación de los complejos de inclusión por los dos métodos utilizados —mezcla física y método de co-evaporación— y en su caracterización por diferentes técnicas —DSC, IR y difracción de Rayos X— se determinó que el complejo de inclusión entre **1** con HP- β -CD, es el más adecuado para realizar el proceso de biotransformación. Además, HP- β -CD ha demostrado aumentar en mayor medida la solubilidad de los sustratos que alberga, en comparación con la β -ciclodextrina de acuerdo con la literatura revisada [55].

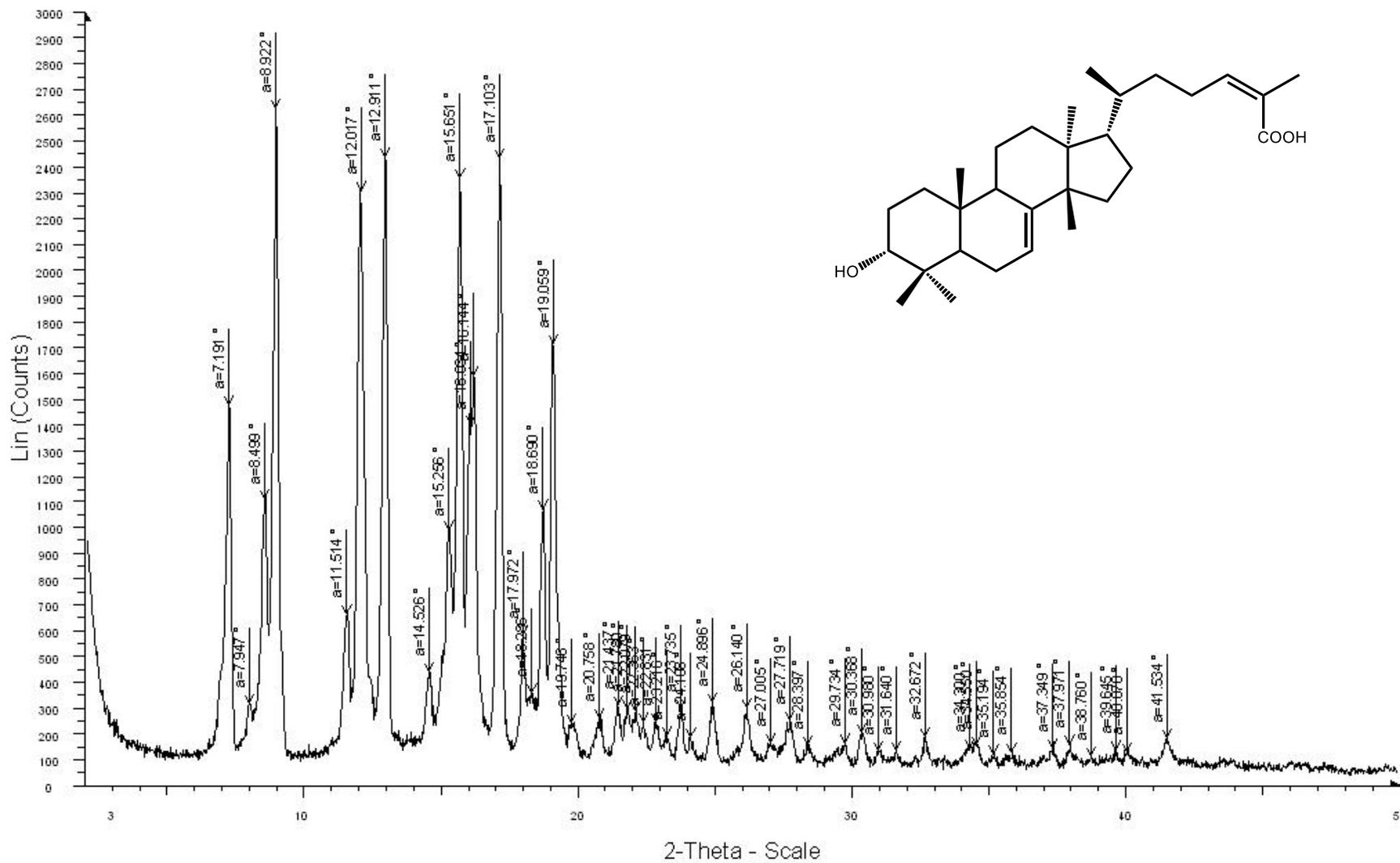


Figura 40. Difractograma del Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (1).

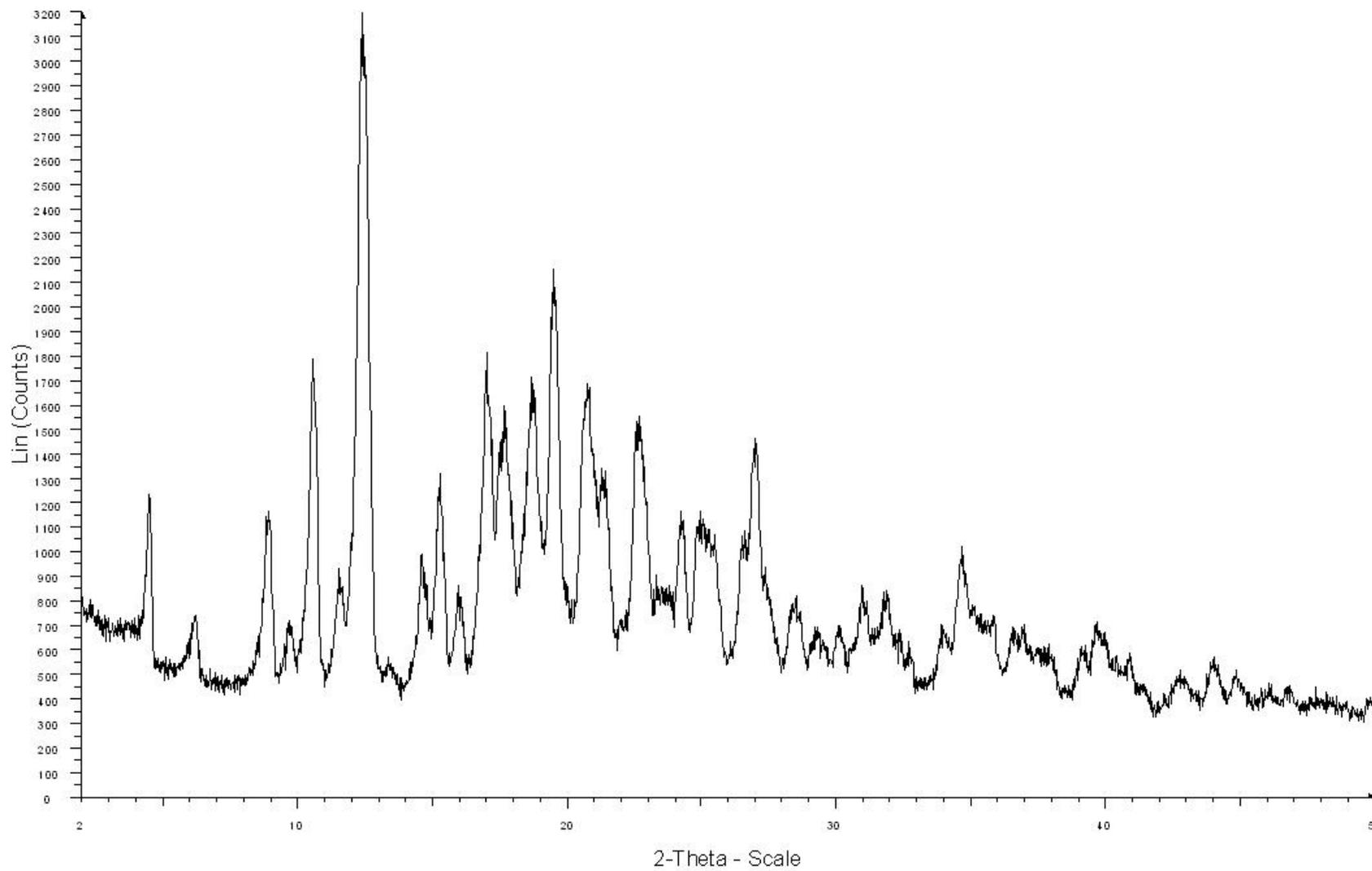


Figura 41. Difractograma de la β -ciclodextrina (β -CD)

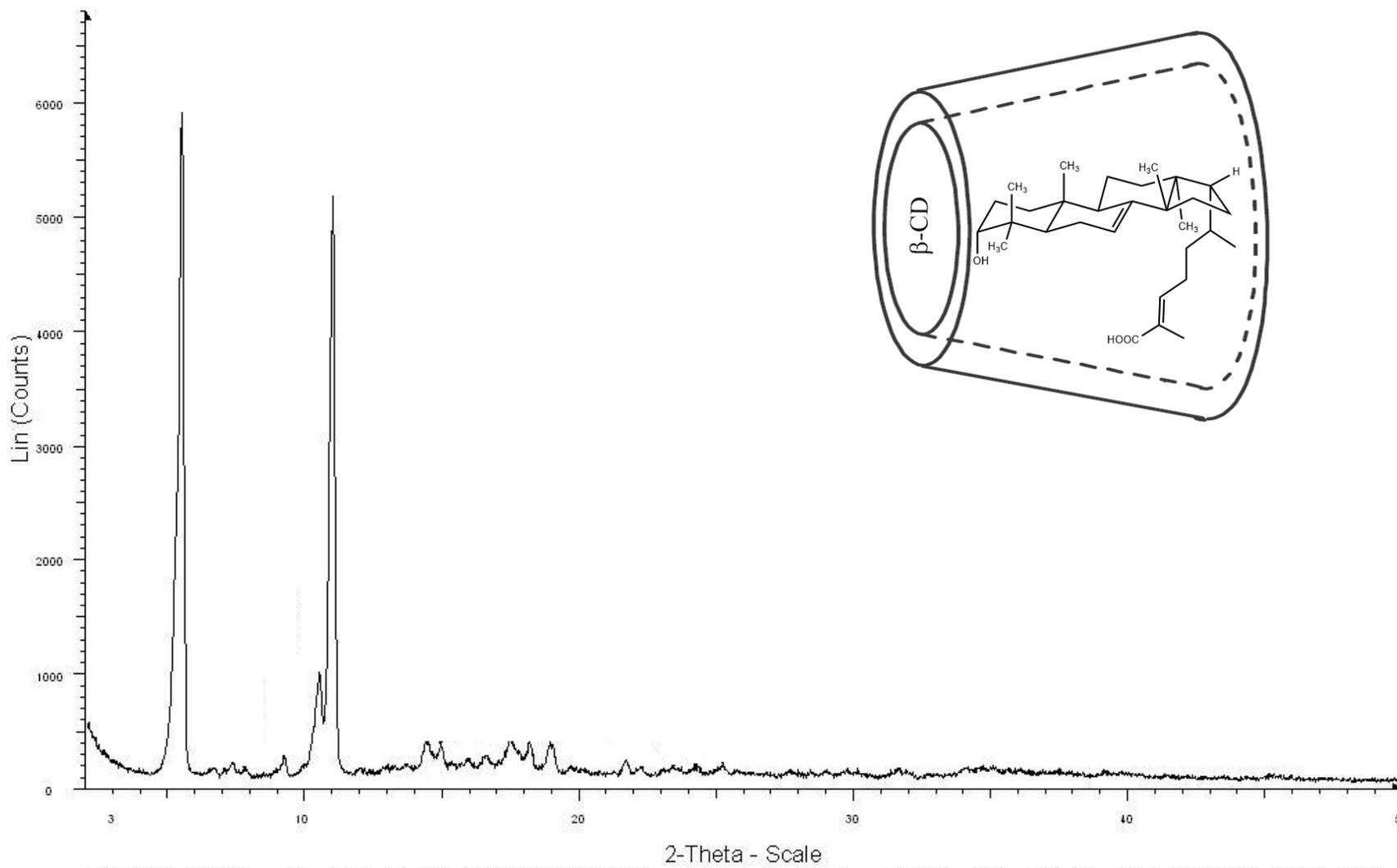


Figura 42. Difractograma del complejo de inclusión 1/β-CD.

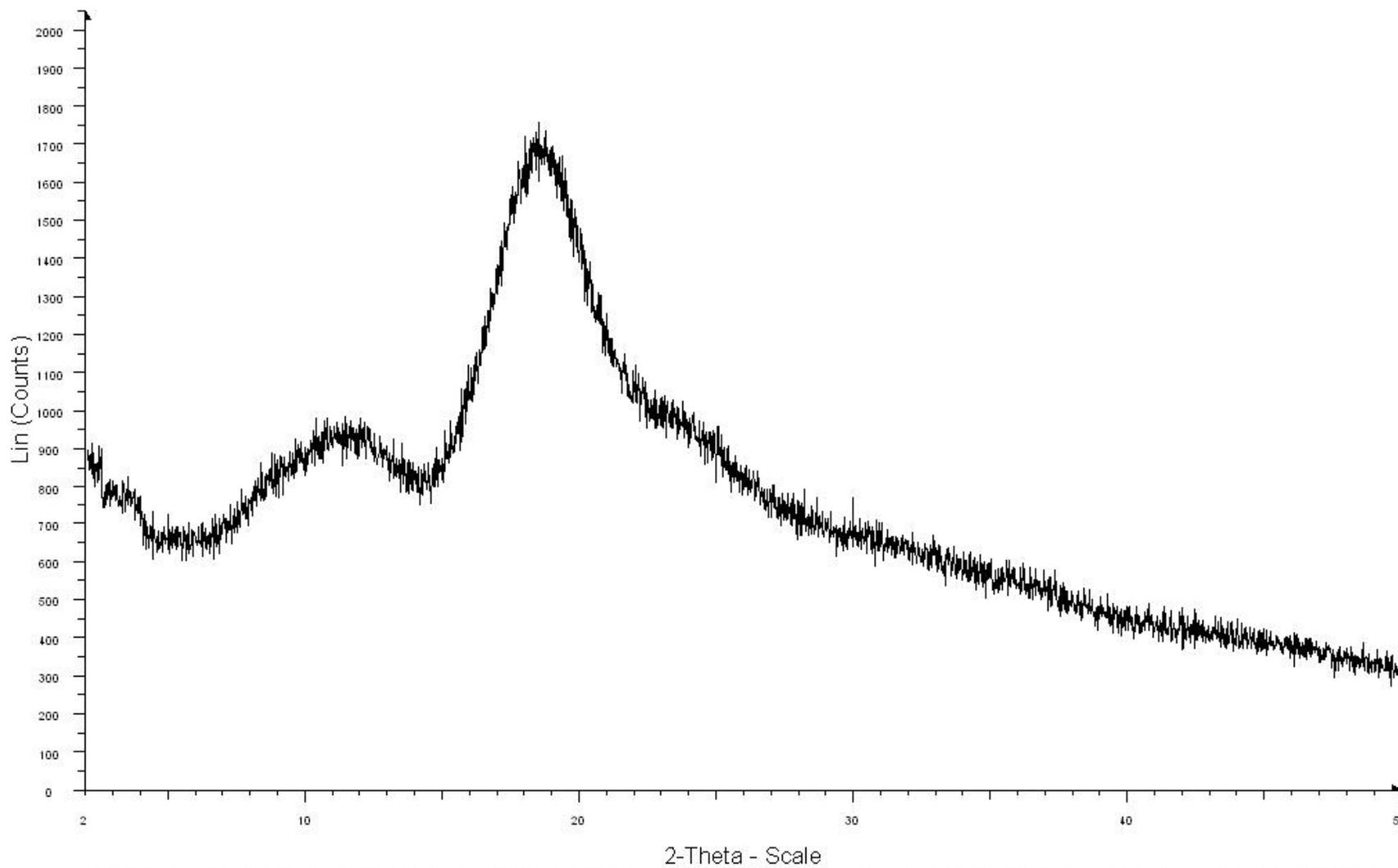


Figura 43. Difractograma de la (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD).

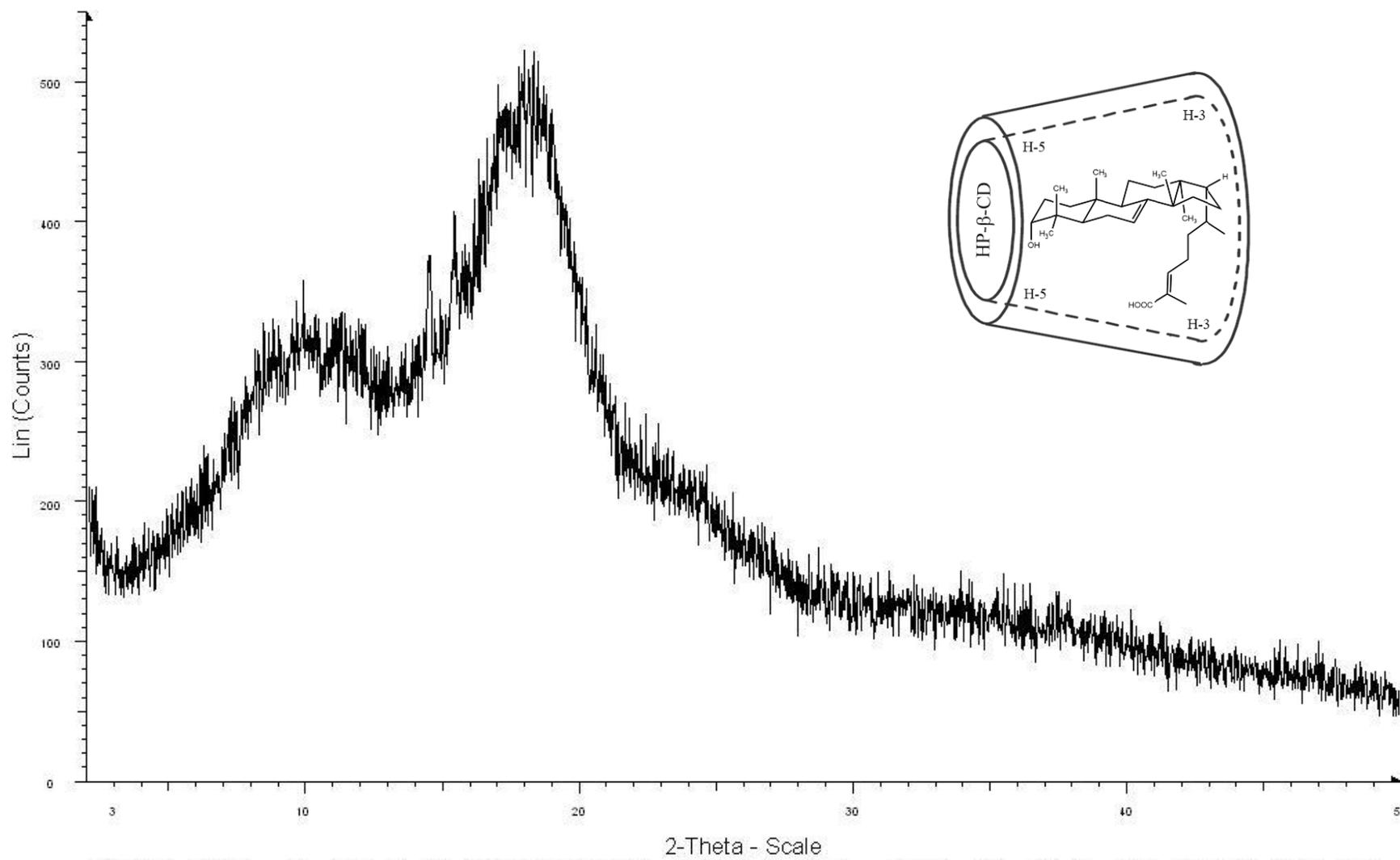
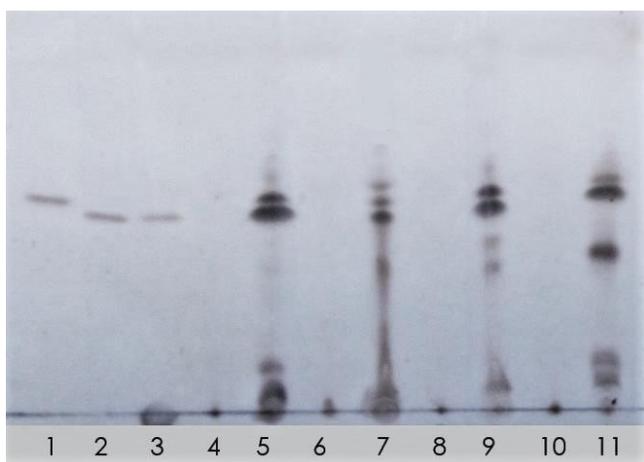


Figura 44. Difractograma del complejo de inclusión 1/HP-β-CD.

6.5. Factibilidad de la biotransformación con *C. echinulata* (CDBB-H-255), *C. lunata* (CDBB-H-261), *T. atroviride* y *B. adusta*.

De la biotransformación cualitativa realizada con *C. echinulata* (CDBB-H-255), *C. lunata* (CDBB-H-261), *T. atroviride* y *B. adusta*, se obtuvieron distintos compuestos derivados del proceso de bioconversión. A continuación, se muestra la CCF de los resultados obtenidos.



- 1) Ác. masticadienónico (2)
- 2) Ác. 3 α -hidroximasticadienónico (1)
- 3) Complejo de inclusión 1/HP- β -CD
- 4) Blanco *B. adusta*
- 5) Biotransformación *B. adusta*
- 6) Blanco *C. echinulata*
- 7) Biotransformación *C. echinulata*
- 8) Blanco *T. atroviride*
- 9) Biotransformación *T. atroviride*
- 10) Blanco *C. lunata*
- 11) Biotransformación *C. lunata*

Mezcla de elución: *n*-hex/Acetona (7:3)

Figura 45. CCF de los residuos obtenidos de la factibilidad de biotransformación de 1/HP- β -CD con diferentes hongos.

Con base en la CCF [*n*-hex/Acetona (7:3)], ver figura 45, de los diferentes residuos obtenidos de la biotransformación cualitativa de 1/HP- β -CD con diferentes hongos, se pudo identificar como producto de biotransformación con *B. adusta* (punto de aplicación 5 en CCF), *C. echinulata* (punto de aplicación 7), *T. atroviride* (punto de aplicación 9) y *C. lunata* (punto de aplicación 11), al ácido masticadienónico (2) $R_f = 0.40$ [*n*-hex/acetona (8:2)]. En la biotransformación de 1/HP- β -CD con *C. lunata* (punto de aplicación 11 en CCF) puede observarse que **1** ha sido totalmente modificado enzimáticamente a otros productos.

De acuerdo con lo anterior, se propuso realizar la biotransformación de 1/HP- β -CD con *C. lunata* de manera cuantitativa, para poder obtener y caracterizar los productos de biotransformación mayoritarios de **1** con este microorganismo.

6.6. Biotransformación cuantitativa del complejo de inclusión 1/HP- β -CD con *C. lunata* (CDBB-H-261).

De la biotransformación cuantitativa realizada con *C. lunata* (CDBB-H-261) se obtuvieron 286.5 mg del residuo proveniente de la fase líquida y 156 mg del residuo de la biomasa. A continuación, se muestra la CCF de los resultados obtenidos de este bioensayo.



- 1) Ác. masticadienónico (**2**)
- 2) Ác. 3 α -hidroximasticadienónico (**1**)
- 3) Residuo de la fase líquida de la biotransformación
- 4) Blanco de la fase líquida del hongo
- 5) Residuo de la biomasa de la biotransformación
- 6) Blanco de la biomasa del hongo
- 7) Blanco del medio

Mezcla de elución: *n*-hex/Acetona (7:3)

Figura 46. CCF de los residuos obtenidos de la biotransformación cuantitativa de 1/HP- β -CD con *C. lunata*.

Con base en la CCF [n-hex/Acetona (7:3)], ver figura 46, de los residuos obtenidos de la biotransformación cuantitativa de 1/HP- β -CD con *C. lunata*, se pudo identificar en el residuo de la fase líquida de la biotransformación (punto de aplicación 3) como producto de biotransformación (al igual que en el bioensayo de factibilidad) al ácido masticadienónico (**2**) [$R_f = 0.40$, n-hex/acetona (8:2)]. Además, se observaron seis productos más polares que **1** en este residuo, mientras que en los blancos correspondientes al medio y al hongo no se observó la presencia de metabolitos secundarios de *C. lunata* ni productos de descomposición del medio. Por otro lado, en el residuo de la biomasa de la biotransformación se observan tres productos menos polares y al menos dos más polares que **1**. Estos últimos, puede que coincidan con dos de los encontrados en la fase líquida. Por tanto, de manera cualitativa, se puede argumentar que la biotransformación de 1/HP- β -CD con *C. lunata* es factible. se pueden obtener productos derivados de la modificación enzimática del microorganismo, si

se emplean complejos de inclusión para aumentar la solubilidad. Esto es evidente si se comparan los resultados obtenidos en el presente estudio con estudios realizados anteriormente por nuestro equipo de trabajo [22], en donde no se obtienen productos derivados del proceso si se adiciona **1** sin formar complejos de inclusión al medio de biotransformación.

6.7. Aislamiento y purificación de los productos de bioconversión del complejo de inclusión **1**/HP- β -CD con *C. lunata* (CDBB-H-261).

De los residuos obtenidos de la biotransformación cuantitativa de **1**/HP- β -CD con *C. lunata*, se lograron aislar y purificar cinco compuestos por medio técnicas cromatográficas convencionales –CC, CCV, CCFlash–, ver figura 47, de donde se obtuvieron 13.6 mg (9.06 %) del ácido masticadienónico (**2**), (punto de aplicación 2) derivado oxidado de **1** (ver figura 48). De las fracciones 65-122, se recuperaron 52.26 % (78.4 mg) de **1**. Además, se obtuvieron 9.6 mg de un compuesto de mayor polaridad que **1** y **2** (punto de aplicación 3). Del residuo de la biomasa, se lograron aislar 2.6 mg (1.73 %) en las primeras fracciones (15-20 [*n*-hex/AcOEt (9:1)]) de un compuesto derivado del proceso (punto de aplicación 5). Además, se recuperó una mínima cantidad de **1** y, dos compuestos adicionales en bajo rendimiento 2.2 % y 1.06% (puntos de aplicaciones 4 y 6).



- 1) Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**)
- 2) Ácido masticadienónico (**2**)
- 3) C1 (9.6 mg)
- 4) C2 (1.6 mg)
- 5) C3 (2.6 mg)
- 6) C4 (3.3 mg)

Mezcla de elución: *n*-hex/AcOEt (1:1)

Figura 47. CCF de los compuestos obtenidos de la biotransformación cuantitativa de **1**/HP- β -CD con *C. lunata*.

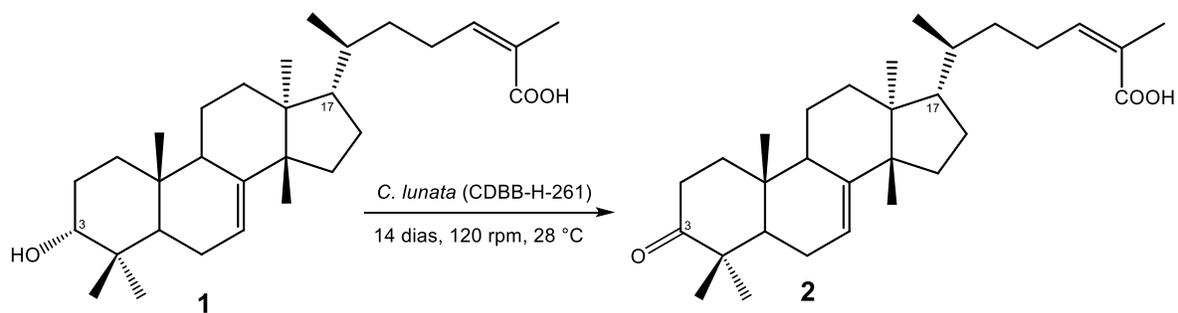


Figura 48. Reacción de oxidación catalizada por *C. lunata* en el proceso de biotransformación.

7. CONCLUSIONES.

- ✓ Se aisló, purificó e identificó al ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) a partir del extracto “crudo” de AcOEt de la corteza del cuachalalate.
- ✓ Los complejos de inclusión de **1** con β -CD y HP- β -CD fueron obtenidos por dos métodos diferentes —mezcla física y de coevaporación—.
- ✓ Se caracterizaron los complejos de inclusión **1**/ β -CD y **1**/HP- β -CD, por los métodos de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y espectroscopia de IR.
- ✓ El complejo de inclusión **1**/HP- β -CD fue caracterizado por difracción de Rayos X.
- ✓ Se realizó la biotransformación cualitativa de **1**/HP- β -CD con 4 diferentes hongos —*C. echinulata* (CDBB-H-255), *C. lunata* (CDBB-H-261), *T. atroviride* y *B. adusta*—
- ✓ El ácido masticadienónico (**2**) fue identificado como producto de biotransformación del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**1**) con los cuatro hongos ensayados.
- ✓ Se realizó la biotransformación cuantitativa de **1**/HP- β -CD con *C. lunata* (CDBB-H-261).
- ✓ Se aisló, purificó e identificó al ácido masticadienónico (**2**) del residuo de la biotransformación cuantitativa de **1** con *C. lunata* (CDBB-H-261).

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Dalla, V. L.; Braga, A.; García, A. A.; Martínez, V. M.; Toninello, A., 3 α -Hydroxymasticadienonic acid as an antiproliferative agent that impairs mitochondrial functions. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 557-562.
2. Pennington, T. D.; Sarukhán J. (2005). Arboles tropicales de México: Manual para la identificación de las principales especies. México: Fondo de Cultura Económica, 2^o Ed. pp. 322-323.
3. Mata, R.; Calzada, F.; Navarrete, A.; Del Río, F.; Delgado, G., Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* **1991**, *34*, 147-154.
4. Navarrete, A.; Martínez-Uribe, L. S.; Reyes, B., Gastroprotective activity of stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytother. Res.* **1998**, *12*, 1-4.
5. Arrieta, J.; Benítez, J.; Flores, E.; Castillo, C.; Navarrete, A., Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*, role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med.* **2003**, *69*, 905-909.
6. Del Rayo, C. M.; Mata, R.; Castañeda, P.; Kirby, G. C.; Warhurst, D. C.; Croft, S. L.; Phillipson, J. D., Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Med.* **2000**, *66*, 463-468.
7. Olivera, O. A.; Soto, H. M.; Martínez, V. M.; Terrazas, S. T.; Solares, A. F., Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J. Ethnopharm.* **1999**, *68*, 109-113.
8. Oviedo-Chávez, I.; Ramírez-Apan, T.; Soto-Hernández, M.; Martínez-Vazquez, M., Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* **2004**, *11*, 436-445.
9. Makino, M.; Motegi, T.; Fujimoto, Y., Tirucallane-type triterpenes from *Juliana adstringens*. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 891-896.
10. Johann, S.; Sá, N.; Lima, L.; Cisalpino, P.; Cota, B.; Alves, T.; Siqueira, E.; Zani, C., Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus*

- terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **2010**, *9*, 30-35.
11. Ramalho, S.; De Sousa, L.; Nebo, L.; Maganhi, S.; Caracelli, I.; Zukerman-Schpector, J.; Lima, L.; Alves, M.; Da Silva, F.; Fernandes, J.; Vieira, P, Triterpenoids as novel natural inhibitors of human Cathepsin L. *Chemistry & Biodiversity* **2014**, *11*, 1354-1363.
 12. Martinez, A.; Perojil, A.; Rivas, F.; Parra, A.; Garcia-Granados, A.; Fernandez-Vivas, A., Biotransformation of oleanolic and maslinic methyl esters by *Rhizomucor miehei* CECT 2749. *Phytochemistry* **2015**, *117*, 500-508.
 13. Yhang, Y. H.; Sun, R.; Song, H. C.; Xu, Y. B.; Yang, P.; Yang, D. Y.; Shen, Z. K.; Wang, A. R.; Chen, Y. G.; Dong, J. Y., Microbial transformation of the triterpene nigranoic acid in *Trichoderma* sp. *Phytochemistry Lett.* **2012**, *5*, 123-127.
 14. Huang, F. X.; Yang, W. Z.; Ye, F.; Tian, J. Y.; Hu, H. B.; Feng, L. M.; Guo, D. A.; Ye, M., Microbial transformation of ursolic acid by *Syncephalastrum racemosum* (Cohn) Schroter AS 3.264. *Phytochemistry* **2012**, *82*, 56-60.
 15. Mai, Z. P.; Xin, X. L.; Sun, Z.; Zhang, N.; Huang, S. S.; Wang, C.; Chen, L.; Li, Y.; Huo, X. K.; Fan, G. J., Biotransformation of alisol G by *Penicillium janthinellum* and the hCE2 inhibitory effects of its metabolites. *Phytochemistry Lett.* **2015**, *13*, 228-233.
 16. Velasco, B. R.; Montenegro, M. D. L.; Vélez, S. J. F.; García, P. C. M.; Durango, R. D. L., Biotransformación de compuestos aromáticos sustituidos mediante hongos filamentosos fitopatógenos de los géneros *Botryodiplodia* y *Colletotrichum*. *Rev. Soc. Quím. Perú* **2009**, *75*, 94-111.
 17. Zhang, L.; Wang, M.; Shen, Y.; Ma, Y.; Luo, J., Improvement of steroid biotransformation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin induced complexation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *159*, 642-654.
 18. Cano-Flores, A. E., Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **2013**, *44*, 7-16.
 19. Arellano-Carbajal, F.; Olmos-Soto, J., Enzimas amilolíticas microbianas. *Biotecnología.* **1999**, *4*, 115-121.

20. Ceborska, M.; Zimnicka, M.; Wszelaka-Rylik, M.; Troc A., Characterization of folic acid/native cyclodextrins host-guest complexes in solution. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1109*, 114-118.
21. Oviedo-Chavez, I. (2007). Obtención de agentes antiinflamatorios y citotóxicos a partir de modificaciones químicas a los ácidos masticadienólico y 3-epimasticadienólico. Tesis de Doctorado. Instituto de Química, UNAM, pp. 49-50.
22. Juárez, M. S. (2012). Biotransformación de los ácidos traquilobanoico —*Iostephane madrensis*— y 3 α -hidroximasticadienónico —*Amphipterygium adstringens*— por medio de hongos filamentosos, terpenos mayoritarios presentes en dos plantas medicinales mexicanas. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, pp. 50-53.
23. Olivera-Ortega, A. G.; Soto-Hernández, M.; Martínez-Vázquez, M.; Terrazas-Salgado, T.; Solares-Arenas, F., Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Shiede ex Schlecht. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *68*, 109-113.
24. Xu, R.; Fazio, G.; Matsuda, S., On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261-291.
25. Abe, I.; Rohmer, M.; Prestwich, G. D., Enzymatic Cyclization of Squalene and Oxidosqualene to Sterols and Triterpenes. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2189-2206.
26. Donova, M. V.; Egorova, O. V., Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1423-1447.
27. Money, N. P. in: The Fungi, Watkinson, S. C.; Boddy, L.; Money, N. P., Elsevier, **2016**, pp. 1-36.
28. Webster, J.; Weber, R. W. S. (2007) Introduction to Fungi, United Kingdom: Cambridge University Press, 3^o Ed. pp. 1-3.
29. Curtis, H.; Barnes, S.; Schnek, A.; Massarini, A. (2008). Curtis Biología. Buenos Aires: Edit. Médica Panamericana, 7^o Ed. pp. 516-530.
30. Chen, Y.; Nielsen, J., Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *37*, 165-172.
31. Solomon, E. P.; Berg, L. R.; Martin, D. W. (2013) Biología. Estados Unidos: CENGAGE Learning, 9^o Ed. pp. 603-609.

32. Herrera, T.; Ulloa M. (2013). El reino de los hongos: micología básica aplicada. México: Fondo de Cultura Económica, 2° Ed. pp. 204-205.
33. Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; Minter, D. W.; Stalpers, J. A. (2008) Dictionary of the Fungi. United Kingdom: CAB International, pp. 784.
34. Ratledge, C.; Kristiansen, B. (2006). Biotecnología básica. España: Edit. Acribia, pp. 531-539.
35. Gonzaga, O. L.; Moraes, M. S., Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. *Quim. Nova* 2009, 32, 742-756.
36. Bhatti, H., N.; Khera, R., A., Biotransformation of diterpenoids and triterpenoids: a review. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2014, 16, 70-104.
37. Li, G.; Li, F.; Deng, L.; Fang, X.; Zou, H.; Xu, K.; Li, T.; Tan, G., Increased yield of biotransformation of exemestane with β -cyclodextrin complexation technique. *Steroids* 2013, 78, 1148-1151.
38. Muffler, K.; Leipold, D.; Scheller, M. C.; Haas, C.; Steingroewer, J.; Bley, T.; Neuhaus, H. E.; Mirata, M. A.; Schrader, J.; Ulber, R., Biotransformation of triterpenes. *Process. Biochem.* 2011, 46, 1-15.
39. Rojas-Llanes, J. P.; Perea-Villamil, J. A.; Ortiz-López, C. C., Compuestos con potencial aplicación farmacológica obtenidos por biotransformación de geraniol y pineno. *Salud U.I.S.* 2009, 41, 251-258.
40. Mukherjee, G.; Lal Gupta, P.; Jayaram, B., Predicting the binding modes and sites of metabolism of xenobiotics. *Mol. Bio. Syst.* 2015, 11, 1914-1924.
41. Meunier, B.; Visser, S.; Shaik, S., Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* 2004, 104, 3947-3980.
42. Rodríguez, G. J.; Rodeiro, G. I., El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Rev. Cub. Farm.* 2014, 48, 495-507.
43. Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2009) Lehninger Principios de bioquímica. España: Ediciones Omega, 5° Ed. pp. 816-817.
44. McKinnon, R.; Sorich, M.; Ward, M., Cytochrome P450 Part 1: Multiplicity and function. *J. Pharm. Pract. Research* 2008, 38, 55-57.
45. Bello, J.; López de Cerain, A. (2001) Fundamentos de ciencia toxicológica. España. Ediciones Díaz de Santos, pp. 75-78.

46. Orellana, B. M.; Guajardo, T. V., Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev. Med. Chile* **2004**, *132*, 85-94.
47. Fernandes, P.; Cruz, A.; Angelova, B.; Pinheiro, H. M.; Cabral, J. M. S., Microbial conversión of steroid compounds: recent developments. *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, *32*, 688-705.
48. Kouzi, S.; Chatterjee, P.; Pezzuto, J.; Hamann, M., Microbial transformations of the antimelanoma agent betulinic acid. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1653-1657.
49. Shirane, N.; Hashimoto, Y.; Ueda, K.; Takenaka, H.; Katoh, K., Ring A cleavage of 3-oxo-olean-12-en-28-oic acid by the fungus *Chaetomium longirostre*. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 99-104.
50. Jiménez, I. D.; Medina, M. S.; Gracida, R. J., Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2010**, *2*, 65-84.
51. Valderrama, J. O.; Rojas, R. E., Avances en la predicción de propiedades físicas, físico-químicas y de transporte de líquidos iónicos. *Info. Tec.* **2009**, *20*, 149-160.
52. Williams III, R. O.; Mahaguna, V.; Sriwongjanya, M., Characterization of an inclusión complex of colesterol and hidroxipropil- β -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 355-360.
53. Manosroi, J.; Saowakhon, S.; Manosroi, A., Enhancement of 17 α -hydroxyprogesterone production from progesterone by biotransformation using hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation technique. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *112*, 201-204.
54. Garcia, V., C.; Nicolini, J.; Machado, C.; Gageiro, M., V., Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim. Nova* **2008**, *31*, 360-368.
55. Yao, Y.; Xie, Y.; Hong Ch; Li G; Shen, H.; Ji, G., Development of a myricetin/hidroxipropyl- β -cyclodextrin inclusión complex: Preparation, characterization, and evaluation. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *110*, 329- 337.
56. Forgo, P.; Vincze, I.; Kövér, K. E., Inclusion complexes of ketosteroids with β -cyclodextrin. *Steroids* **2003**, *68*, 321-327.
57. Pandit, V.; Gorantla, R.; Devi, K.; Pai, R.; Sarasija, S., Preparation and characterization of Pioglitazone cyclodextrin inclusion complexes. *J. Young. Pharmacists* **2011**, *3*, 267-274.

58. Xiao, D.; Yang, B.; Zhao, Y.; Liao, X.; Yang, X.; Wang, F.; Chen, Y.; Zhou, R., Inclusion complexes dyhydroartemisinin with cyclodextrin and its derivatives: characterization, solubilization and inclusion mode. *J Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2014**, *79*, 349-356.
59. Ma, S.X.; Chen, W.; Yang, X.D.; Zhang, N.; Wang, S.J.; Liu, L.; Yang, L. J., Alpinetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Preparation, Characterization, Inclusion mode, Solubilization and stability. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *67-68*, 193-200.
60. Petralito, S.; Zanardi, I.; Spera, R.; Memoli, A.; Travagli, V., Spectroscopic characterization of both aqueous solid-state diacerhein/hidroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Spectrochim. Acta. Part. A.* **2014**, *127*, 355-360.