



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-ZARAGOZA.

CARRERA DE BIOLOGÍA

Obtención, identificación y biotransformación de los complejos de inclusión del ácido 3α -hidroximasticadienónico y del β acetato de colesterilo con dos ciclodextrinas diferentes β -CD y HP- β -CD con hongos filamentosos.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO EN:
LICENCIADO EN BIOLÓGÍA

P R E S E N T A:

Jacobo Daniel Baltazar Blanco

JURADO DE EXAMEN

DIRECTOR: DR. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

ASESORA: DRA. ROSALVA GARCÍA SÁNCHEZ

ASESOR: DR. JORGE ANTONIO VALDIVIA ANISTRO

SINODAL: DRA. CATALINA SORIANO CORREA

SINODAL: MTRO. JOSÉ RIGOBERTO RAMOS VELÁZQUEZ



**FES
ZARAGOZA**

MÉXICO,

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 CARRERA DE BIOLOGÍA
 FORMATO F-5



OFICIO DE FECHA DE EXAMEN

QFB GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 Presente

Le comunico que al alumno: **BALTAZAR BLANCO JACOBO DANIEL** con número de cuenta **417003087** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **14 de Agosto de 2023** a las **13:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DRA. GARCIA SANCHEZ ROSALVA	
VOCAL	DR. CANO FLORES ARTURO EDUARDO	
SECRETARIO	DRA. SORIANO CORREA CATALINA	
SUPLENTE	DR. VALDIVIA ANISTRO JORGE ANTONIO	
SUPLENTE	MTRO. RAMOS VELAZQUEZ JOSE RIGOBERTO	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

Obtención, identificación y biotransformación de los complejos de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadiénónico y β acetato de colesterilo con dos ciclodextrinas diferentes- β -CD y HP β -CD

En la modalidad de: **TESIS**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 CDMX, a 12 de Junio de 2023

DR. VICENTE JESUS HERNÁNDEZ ABAD
 DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES ZARAGOZA

AGRADECIMIENTOS

M. en C. Roció Patiño. Laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría.
Instituto de Química, UNAM.

M. en C. Damaris Cabrero Palomino. Laboratorio de análisis térmico.
Instituto de Investigaciones en Materiales, (IMM). UNAM.

Dr. Guillermo Delgado Lamas.
Instituto de Química, UNAM.

Carrera de Biología. FES-Zaragoza. UNAM.

DEDICATORIO

Queridos amigos,

Hoy, con el corazón lleno de emoción y gratitud, me dirijo a cada uno de ustedes para expresar mi más sincero agradecimiento por el invaluable apoyo que me brindaron en el desarrollo de mi proyecto.

Al Dr. Arturo Cano Flores, mi querido asesor de tesis, quiero dedicarle palabras de admiración y agradecimiento por su guía experta y su constante estímulo. Su sabiduría y paciencia fueron fundamentales para el éxito de este trabajo, y me siento bendecido de haber contado con su valioso conocimiento y experiencia a lo largo de este proceso.

A mi amado padre, Jacobo Baltazar Quiroz, quiero expresarle mi profundo agradecimiento. Tu apoyo incondicional y tu amor inquebrantable fueron mi mayor fortaleza en momentos de duda y desafío. Gracias por ser mi pilar, mi consejero y mi fuente de inspiración. Sin ti, este logro no sería posible.

A todos los miembros del comité de sinodales y al grupo de personas que me acompañaron en el proceso de asesoría, quiero agradecerles de corazón por su tiempo, su dedicación y su valiosa retroalimentación. Sus comentarios constructivos y su compromiso con mi crecimiento académico y profesional fueron esenciales para pulir cada aspecto de este proyecto y llevarlo a su máximo potencial.

Este proyecto representa el fruto del trabajo arduo y la colaboración de cada uno de ustedes, y quiero que sepan que su apoyo no ha pasado desapercibido. Cada consejo, cada palabra de aliento y cada gesto de apoyo dejaron una huella profunda en mi camino hacia la realización de este sueño. Agradezco a la vida por haberme permitido cruzar caminos con personas tan especiales y generosas como ustedes. Sin duda, este logro es un testimonio del poder que tiene la unión y el trabajo en equipo para alcanzar metas significativas.

Me siento honrado y afortunado de tenerlos en mi vida, y espero que este no sea el fin de nuestros lazos, sino el inicio de nuevas oportunidades para seguir creciendo juntos y aportando nuestro talento al mundo.

Nuevamente, muchas gracias por su apoyo incondicional y por ser parte esencial de mi trayectoria académica. Que la vida les recompense con abundantes bendiciones y éxitos en todos sus proyectos.

Con un cálido abrazo de gratitud,

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Acetato de colesisterilo (1).....	3
2.2. Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2).....	3
2.3. Biosíntesis general de esteroides y triterpenos.....	4
2.4. Ciclodextrina (CD).....	5
2.4.1. Derivados de las Ciclodextrinas (CD).....	6
2.5. Complejo de Inclusión (CI).....	7
2.5.1. Métodos de obtención de los Complejos de inclusión (CI).....	10
2.5.2. Técnicas de espectroscópica para la caracterización de Complejos de inclusión (CI).....	10
2.6. Biotransformación.....	11
2.6.1. Biotransformación de esteroides con hongos filamentosos.....	12
2.6.2. Antecedentes de cepas empleadas en la biotransformación.....	13
2.6.3. Biotransformación de complejos de inclusión de esteroides con hongos filamentosos.....	15
2.7. Acoplamiento molecular.....	18
III. JUSTIFICACIÓN.....	19
IV. HIPÓTESIS.....	20
V. OBJETIVOS.....	21
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
5.2. Objetivos particulares.....	21
VI. MATERIAL Y MÉTODO.....	22
6.1. Método de separación y purificación de productos de la biotransformación.....	22
6.2. Obtención del Acetato de colesisterilo (1).....	22
6.3. Biotransformación.....	22
6.3.1. Resiembra de los hongos.....	22
6.3.2. Preparación del medio YEPGA.....	23
6.3.3. Preparación de la solución densa de esporas.....	23
6.3.4. Inoculación del medio YEPGA con hongos.....	23
6.3.5. Biotransformación cualitativa/cuantitativa del Acetato de colesisterilo (1) con diferentes hongos.....	24
6.3.6. Obtención de los residuos de biotransformación de Acetato de colesisterilo (1) de los hongos filamentosos.....	24
6.4. Obtención de los complejos de inclusión.....	25
6.4.1. Obtención de los complejos de inclusión de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y 2/HP- β -CD mediante el método de mezcla física.....	25

6.4.2.	Obtención de los complejos de inclusión (CI) de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y 2/HP- β -CD mediante el método de Co-evaporación.....	25
6.4.3.	Caracterización de los complejos de inclusión (CI) por espectroscopía de infrarrojo (IR).	26
6.4.4.	Caracterización de los complejos de inclusión de 2/ β -CD y 2/HP- β -CD mediante la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB).....	34
6.5.	Acoplamiento molecular.....	34
6.5.1.	Construcción computacional de estructuras moleculares para el acoplamiento molecular.....	34
6.5.2.	Evaluación del programa de docking.....	35
6.5.3.	Parámetros del acoplamiento molecular.....	35
6.5.4.	Selección de las estructuras más estables.....	36
6.5.5.	Análisis del acoplamiento.....	36
VII.	DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO.....	37
7.1.	Biotransformación del Acetato de colesterilo (1).	37
7.1.1.	Biotransformación cualitativa de Acetato de colesterilo (1) con diferentes hongos filamentosos.....	37
7.1.2.	Biotransformación cuantitativa de Acetato de colesterilo (1) con <i>Alternaria sp.</i>	37
7.2.	Complejos de inclusión (CI) con ciclodextrinas (CD).	38
7.2.1.	Rendimiento en la obtención de los CI de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y 2/HP- β -CD por el método de mezcla física y Co-evaporación.....	38
7.2.2.	Caracterización por análisis de espectroscopía de IR del complejo de inclusión (CI) de 1/ β -CD por método de Co-evaporación.....	39
7.2.3.	Caracterización por análisis de espectroscopía de IR del complejo de inclusión (CI) de 1/HP- β -CD por método de Co-evaporación.....	39
7.2.4.	Caracterización por espectroscopía de IR de los complejos de inclusión de 2/ β -CD y 2/HP- β -CD por el método de Co-evaporación y mezcla física.	42
7.2.5.	Caracterización por análisis calorimetría diferencial de barrido (CDB) y espectroscopía de IR de los complejos de inclusión de 2/ β -CD y 2/HP- β -CD por el método de Co-evaporación y mezcla física.....	45
7.3.	Acoplamiento molecular del acetato de colesterilo (1) y del ácido 3 α hidroximasticadienónico (2) con β -CD y HP β -CD.	48
7.3.1.	Datos de la conformación.	48
7.3.2.	Estructura de acoplamiento.	48
7.4.	Análisis de acoplamiento molecular.	49
7.4.1.	Acoplamiento molecular de 1/ β -CD.....	49
7.4.2.	Acoplamiento molecular de 1/HP- β -CD.....	50
7.4.3.	Acoplamiento molecular de 2/ β -CD.....	51
7.4.4.	Acoplamiento molecular de 2/HP- β -CD.....	52
VIII.	CONCLUSIONES.....	53
IX.	BIBLIOGRAFIA.....	54

ABREVIATURAS

Ac₂O: Anhídrido acético

AcOEt: Acetato de etilo

APD: Agar Papa Dextrosa

ATCC: Colección de Cultivos Tipo Americanos

β-CD: β-Ciclodextrina

CC: Cromatografía en Columna

CCF: Cromatografía en Capa Fina

CC-Flash: Cromatografía en Columna Flash

CD(s): Ciclodextrina(s)

CDB: Calorimetría Difracción de Barrido

CI: Complejo de inclusión

CGTasa: Glucosiltransferasa

CYP450: Citocromo P450

GLU: α-D-glucosa

HP-β-CD: (2-hidroxipropil)-β-ciclodextrina

IR: Infrarrojo

LGA: Algoritmo genético Lamarckiano

Me-β-CD: Metil-β-ciclodextrina

Me₂CO: Acetona

MeOH: Metanol

n-hex: *n*-hexano

PH: Puente de hidrógeno

pf.: Punto de fusión

PDB: Protein Data Bank

SiO₂: Sílica gel

YEPGA: Medio de cultivo

$\nu(\text{cm}^{-1})$: Vibración en IR.

RESUMEN.

En el presente trabajo se dan a conocer los resultados obtenidos de la biotransformación del Acetato de colestero (1) con diferentes hongos filamentosos —*Alternaria sp.*, *Aspergillus brasiliensis*, *A. niger*, y *Beauveria bassiana*—. Además, de la obtención, caracterización y estudio molecular de los complejos de inclusión de 1 y del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2) con β -ciclodextrina (1/ β -CD, 2/ β -CD) y de 2-hidroxipropil β -ciclodextrina (1/HP β -CD, 2/HP β -CD). La obtención se realizó por métodos de mezcla física y de Co-evaporación, mientras que la caracterización por técnicas de espectroscopía de infrarrojo (IR), Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) y acoplamiento molecular (Docking), utilizando diversos programas de química computacional (PyRx, Discovery Studio Visualizer y Ligpplot+).

I. INTRODUCCIÓN.

Los esteroides o triterpenos como el acetato de colesterilo (**1**) y el ácido 3 α hidroximasticadienónico (**2**), representan una clase específica de terpenoides de naturaleza lipídica, los cuales tienen como base estructural el esqueleto de un esteroide —ciclopentanoperhidrofenantreno—[7-8]. Su importancia reside en la disponibilidad de los compuestos afines de gran valor farmacéutico e industrial [7]. Uno de los métodos químicos biológicos descritos en la literatura para funcionalizar los carbonos poco activados de un esteroide o triterpeno es por medio de una biotransformación, la cual permite realizar transformaciones químicas de manera más “amigable” [8].

Una biotransformación se puede definir como un método químico biológico donde un organismo o enzima puede efectuar una reacción de manera *regio-*, *estereo-* y *quimio-*selectiva en un sustrato determinado [9]. Las reacciones químicas que se pueden observar son: hidroxilaciones, metoxilaciones, reacciones de esterificación, acilación, halogenación, isomerización, deshidrogenación, reducción, entre otras [9]. Sin embargo, los compuestos **1** y **2** presentan baja solubilidad en H₂O, el cual limita su rendimiento en el proceso de biotransformación. Razón por la cual, se procedió a la preparación, caracterización y estudio computacional de los complejos de inclusión (CI) de **1** y **2** utilizando dos ciclodextrinas diferentes (β -CD y HP- β -CD). Las cuales son polisacáridos cíclicos que permiten “hospedar” moléculas lipofílicas dentro de su cavidad [7]. Los métodos seguidos en el presente trabajo para la preparación de los CI de **1**/ β -CD, **1**/HP- β -CD, **2**/ β -CD y **2**/HP- β -CD fue mediante mezcla física y de Co-evaporación. La caracterización de los CI se realizó por Infrarrojo (IR) y Calorimetría diferencial de Barrido (CDB). Además, se exploró el estudio computacional de los cuatro CI obtenidos para poder determinar la estequiometría y el tipo de interacción entre los compuestos **1** y **2** en la cavidad interna de las CD.

II. MARCO TEÓRICO.

2.1. Acetato de colesterilo (1).

El acetato de colesterilo (1) es un éster de esterol [1]. Obtenido de la acetilación del colesterol (3) [2]. Posee con un peso molecular de 428.7g/mol ($C_{29}H_{48}O_2$), con una baja polaridad y solubilidad en H_2O ($0.1\mu g/mL$) y pf. $108^\circ C$ [1]. Está formado por un grupo acetilo unido al C-3 β -axial y un grupo isooctilo en el C-17, además de una doble ligadura $\Delta^{5(6)}$ unidos al esqueleto del ciclopentanoperhidrofenantreno, Figura 1 [2]. Los compuestos como 1 representan una clase específica de lípidos, los cuales desempeñan funciones estructurales (membranas), señalización y fisiológicas (hormonas de crecimiento) [3,4].

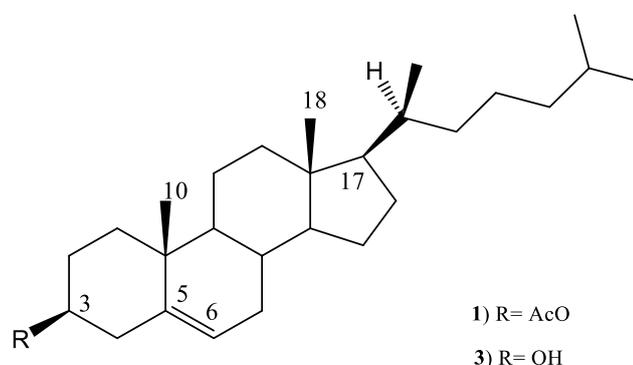


Figura 1. Acetato de colesterilo (1) y colesterol (3).

2.2. Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2).

El ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2) es un triterpeno del tipo tirucalano (compuesto de 30 átomos de carbono, y presentan un esqueleto de esterol), de fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ [5]. Además, presenta un grupo hidroxilo en C-3 con orientación α -axial, una doble ligadura *endocíclica* $\Delta^{7(8)}$ y una cadena alifática de ocho átomos de carbono funcionalizada con un ácido carboxílico α, β -insaturado en el C-25, Figura 2 [5]. Obtenido de los extractos menos polares (*n*-hex y AcOEt) de la corteza del cuachalalate, aislado junto con el ácido masticadienónico (4) [5].

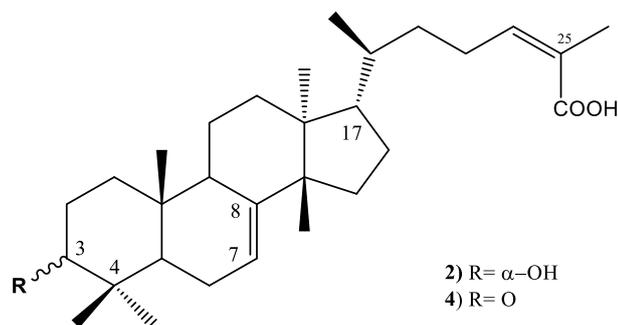


Figura 2. Estructuras del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2) y ácido masticadienónico (4) [5].

2.3. Biosíntesis general de esteroides y triterpenos.

Los esteroides y los triterpenos son poli isoprenoides (escualeno **I**) que se sintetizan a través de la vía del mevalonato. Teniendo como precursor al 2,3-óxidoescualeno (**II**). En la biosíntesis de los esteroides, **II** se cicliza a lanosterol (**III**) —hongos y animales—, cicloartenol (**IV**), cucurbitadienol (**V**) —en plantas—, a través de la conformación —silla-bote-silla, CBC—. En cambio, en la biosíntesis de los triterpenos, se pliega en una conformación diferente, —silla-silla-silla, CCC—, por medio de una serie de reacciones en cascada que conllevan a ciclización de **II** para dar una serie de diversos esqueletos, como la β -amirina (**VI**), Figura 3 [6].

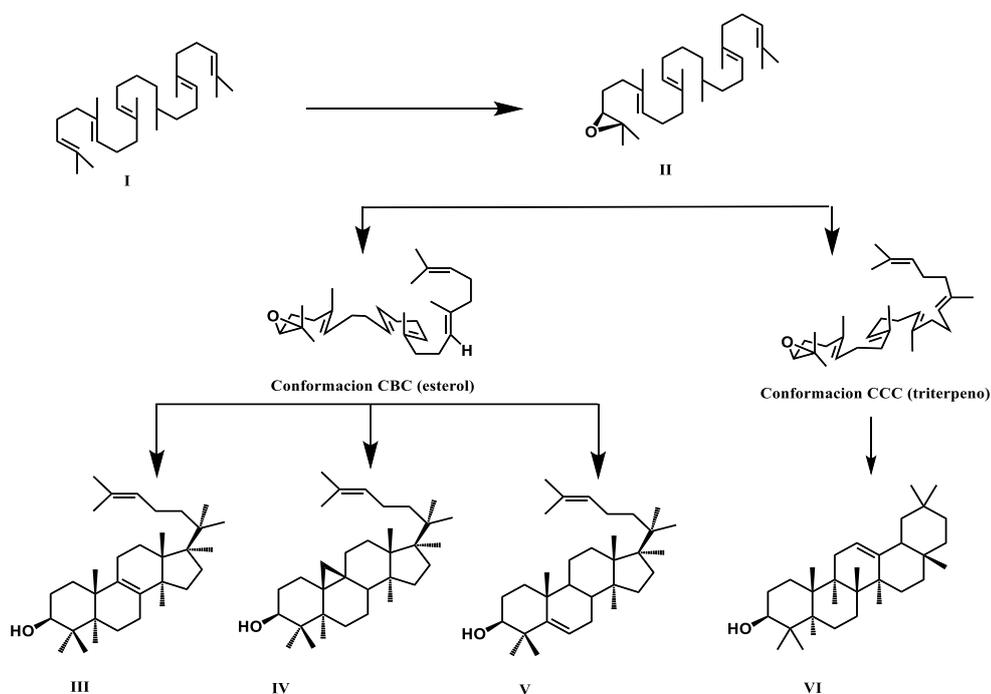


Figura 3. La ruta biosintética de los esteroides y triterpenos [6].

2.4. Ciclodextrina (CD).

Las ciclodextrinas (CD) son una familia conformada de oligosacáridos cíclicos, de unidades D-glucopiranososa (GLU), unidas mediante enlaces α -(1,4)-D-glucosídicos. Las CD se clasifican con una nomenclatura respecto al número de unidades de glucosa en su estructura, como: α -, β - o γ -CD, ciclohexa, ciclohepta y cicloocta- amilosa, respectivamente, Figura 4 [7]. Son sustancias cristalinas, homogéneas, no higroscópicas, con forma de macro anillo toroidal, a partir de unidades α 1,4-glucopiranososa. Se conoce que forman complejos de inclusión por su cavidad hidrofóbica intermolecular, la cual puede hospedar moléculas no polares. Y una superficie externa altamente hidrofílica, por la cual le confiere alta solubilidad en H₂O [7].

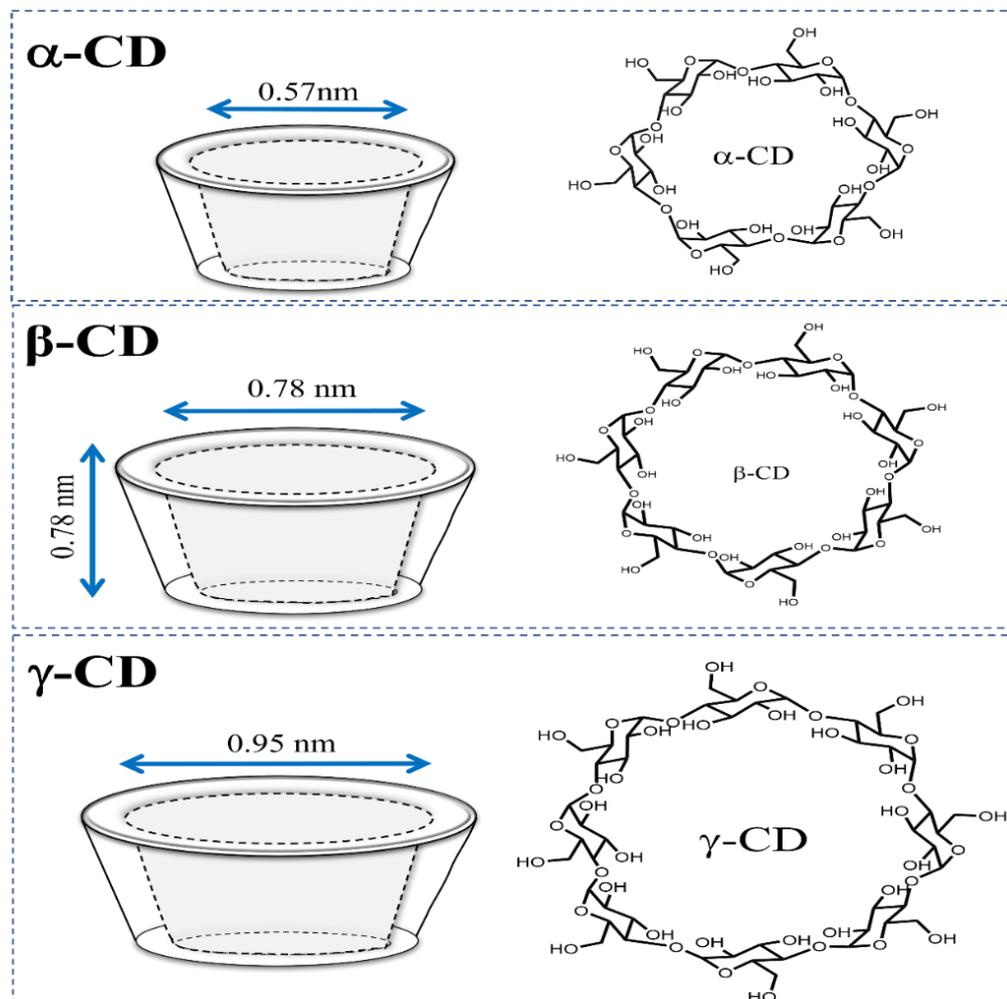


Figura 4. Ciclodextrinas (α -CD, β -CD y γ -CD) [7].

La CD son obtenidas a partir de la degradación del almidón o celulosa por acción de la enzima glucosiltransferasas o ciclodextrinasas (CGTasa) [8]. La división de la cadena de amilopectina, se presentará una reordenación intramolecular de forma cíclica. Figura 5. [9].

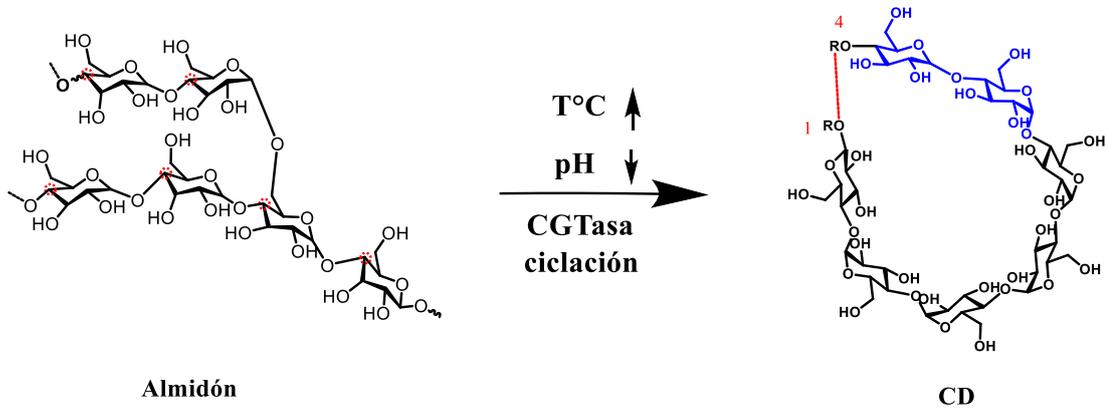


Figura 5. Formación de CD por acción enzimática de glucosiltransferasa (CGTasa) en amilosa.

2.4.1. Derivados de las Ciclodextrinas (CD).

Existe formas de modificar las CD para mejorar su capacidad de inclusión, mediante la funcionalización de los grupos hidroxilos (OH), entre las más utilizados están: 2-hidroxiopropil- β -CD (HP- β -CD), Me- β -CD y SBE- β -CD. Los derivados de las CD presentan mayor solubilidad y disponibilidad en aplicaciones biológicas (biodisponibilidad), Figura 6 [8,10].

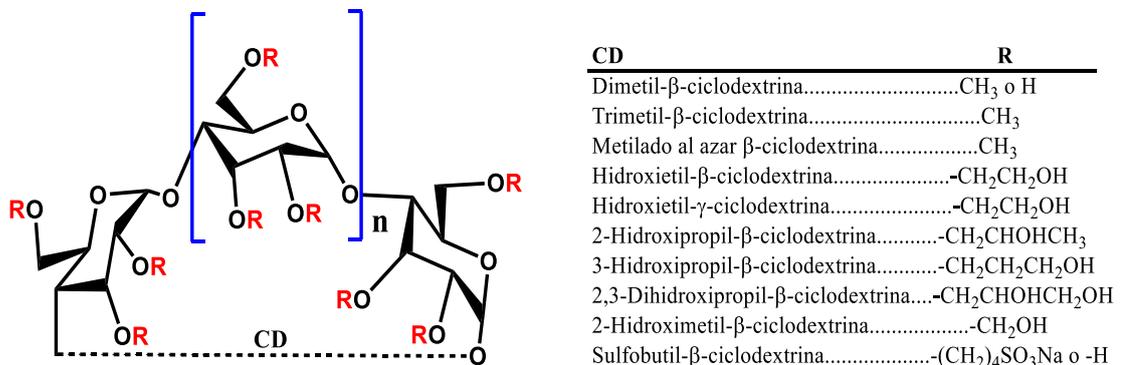


Figura 6. Representación estructural de derivados de ciclodextrinas [10, 11].

2.5. Complejo de Inclusión (CI).

Los complejos de inclusión (CI) son una conformación de una macromolécula conocida como hospedero (CD) y un huésped (sustrato). El huésped se aloja dentro de la cavidad de la CD por sustitución de moléculas de agua. Figura 7 [12, 13].

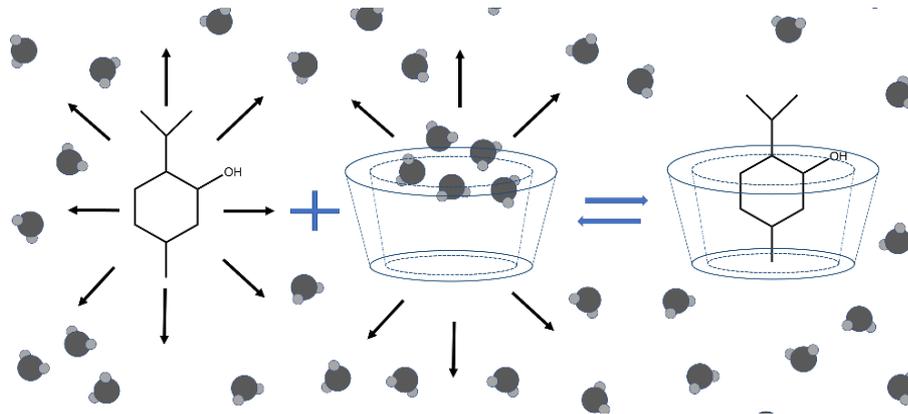


Figura 7. Formación del complejo de inclusión con CD y huésped, así como las fuerzas impulsoras que empujan al huésped hacia la cavidad de CD.

Estableciendo una interacción en su formación de enlace conforme a sus propiedades fisicoquímicas, su tamaño y forma, Figura 8. Esto permite al huésped tener interacciones de tipo: polar, no covalente, Van der Waals, efecto hidrofóbico, puente de hidrógeno (PH), interacciones dipolo-dipolo, transferencias de cargas o efectos estéricos [12]. La proporción estequiométrica molar de unión dependerá de la concentración del huésped con respecto a la CD [12]. El CI permiten el transporte, inhibición y disponibilidad del sustrato. [9].

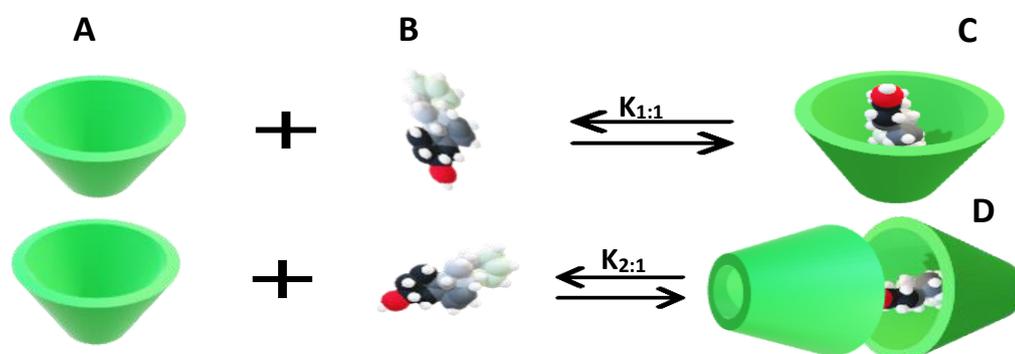


Figura 8. Formación de los complejos de inclusión. A) Hospedero, B) Huésped C) CI con relación molar (1:1), D) CI con relación molar (2:1).

En la Figura 9, se muestra algunos ejemplos de CI informados en la literatura, colesterol (3), progesterona (5), hidrocortisona (6), estrona (7) con β -CD respectivamente, indicando la orientación y estequiometria de los diferentes CI [14-16].

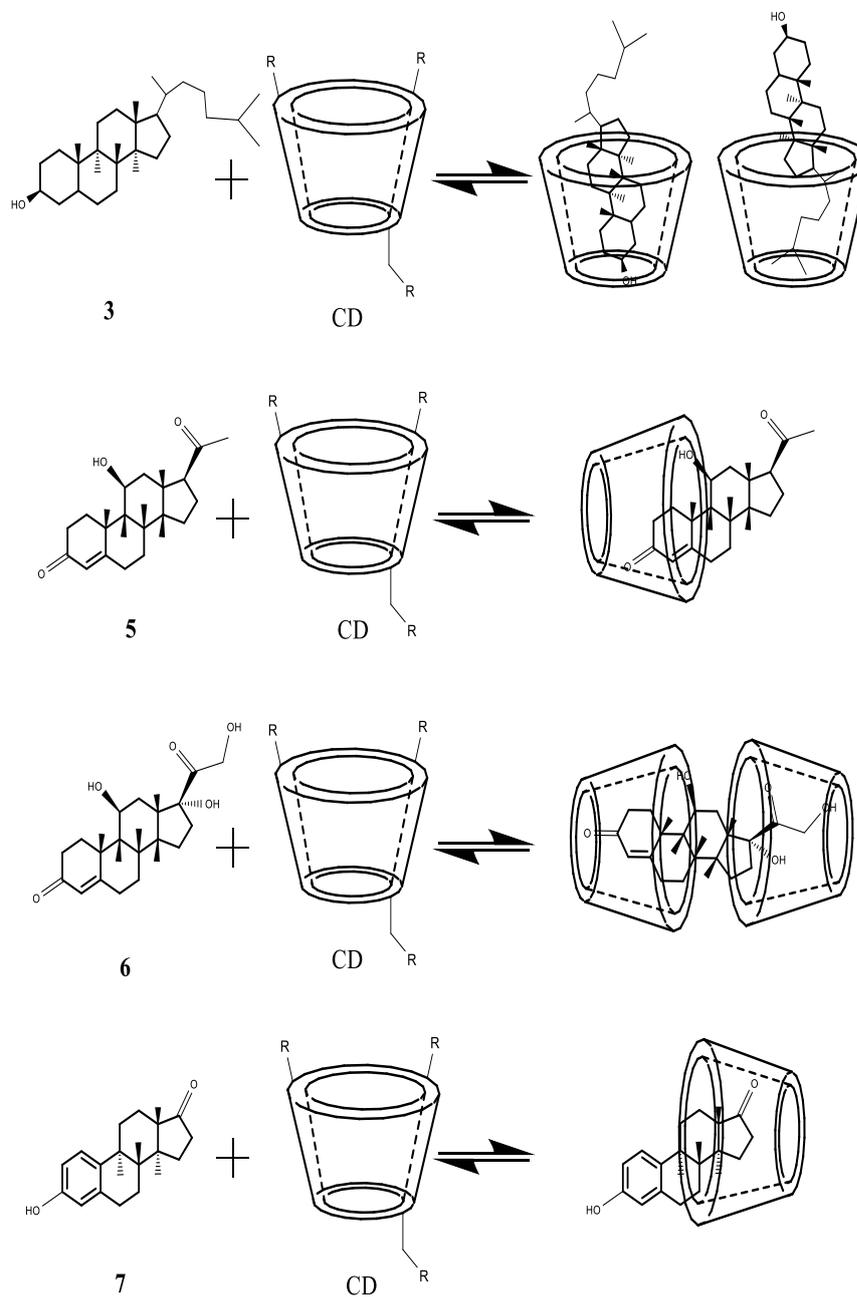
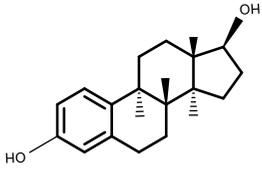
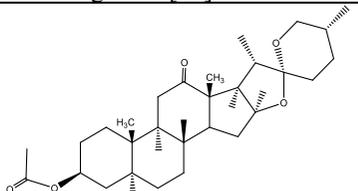
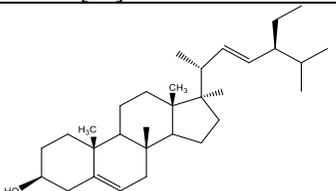
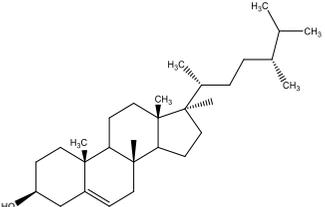
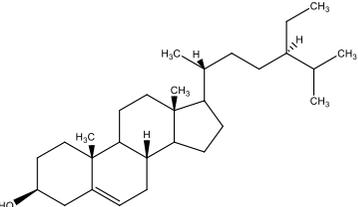
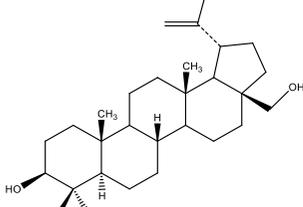
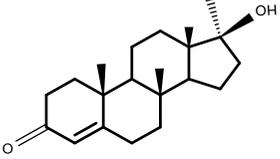
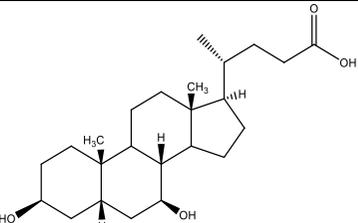
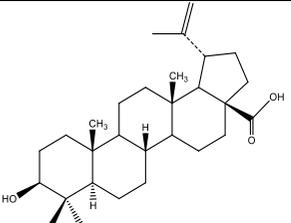


Figura 9. Formación de complejos de inclusión de colesterol (3), progesterona (5), hidrocortisona (6), estrona (7) con β -CD [14-16].

En la siguiente Tabla 1, se enlista algunos CI descritos en la literatura especializada durante los últimos siete años [16-23].

Tabla 1. Formación de complejos de inclusión de esteroides con diferentes ciclodextrinas.

Sustancia:	Estradiol [16]	Acetato de hecogenina [17]			Estigmasterol [18]		
Estructura química							
CD	β -CD	β -CD			β -CD		
Estequiometría	1:1	1:1			1:1		
Sustancia	Campesterol [18]	β -sitosterol [18-19]			Bétulina [20-21]		
Estructura química							
CD	β -CD	α -CD	β -CD	γ -CD	β -CD	HP- β -CD	
Estequiometría	1:1	1:2	1:2	1:3	1:1,1:2	1:1	
Sustancias	Metiltestosterina [22]	Ácido ursodesoxicólico [19]			Ácido bétunílico [22-23]		
Estructura química							
CD	Dimetil- β -CD	β -CD			β -CD	HP- β -CD	HP- γ -CD
Estequiometría	1:2	1:2			1:1	1:1	1:1

2.5.1. Métodos de obtención de los Complejos de inclusión (CI).

La preparación para obtener los CI es de gran importancia, ya que, afecta el rendimiento y las características estequiométricas o de inclusión de los sustratos. Algunos de los diferentes métodos para preparar complejos hospedero- huésped, son: Co-precipitación, amasado, dióxido de carbono supercrítico , molienda, irradiación con microondas y secado por aspersión, Tabla 2 [7].

Tabla 2. Métodos en la elaboración de complejos de inclusión con CD

Co-precipitación	Consiste en mezclar una solución etanol (EtOH) del huésped y una solución de la CD en H ₂ O, posteriormente se concentra y el precipitado se lleva a liofilización.
Mezcla física	cuando el huésped y la CD se someten por acción mecánica.
Amasado	La CD y el huésped, se pesan y rigurosamente se mezclan con una pequeña cantidad de H ₂ O hasta obtener una pasta.
CO ₂ supercrítico	La CD y el huésped se introducen en una autoclave presurizada con CO ₂ a una presión y temperatura específica.
Secado por aspersión	Se caracteriza por una secuencia de tres pasos: la atomización de la alimentación líquida, el secado de las gotas finas utilizando una corriente de aire caliente y un paso final donde las partículas secas se separan de la corriente de aire.
Microondas	El huésped y la CD se mezclan en una cantidad mínima de EtOH/H ₂ O y luego se irradia en horno de microondas para obtener finalmente el complejo

[7].

2.5.2. Técnicas de espectroscópica para la caracterización de Complejos de inclusión (CI).

Para caracterizar los CI se han utilizado diferentes técnicas basadas en cualquier variación de las propiedades físicas o químicas de la molécula huésped y de la CD. En la Tabla 3, se muestra algunas de las principales técnicas analíticas empleadas identificar y caracterizar la formación de los CI [24].

Tabla 3. Métodos para caracterizar los complejos de inclusión de CD.

Técnica	Identificación
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Confirmar las variaciones morfológicas que pueden estar relacionadas con las interacciones de los componentes y la existencia de un solo componente.
Espectroscopía infrarroja (IR)	Su fácil sensibilidad y razonamiento para obtener datos de los grupos funcionales en la formación del complejo.
Difracción de Rayos X en polvo (DRX)	Permite identificar los compuestos por su estructura cristalina
Espectroscopía Raman	Mediante un haz de luz se favorece el movimiento molecular y se interpreta sus interacciones posteriores.
Análisis termogravimétrico (TG) y calorimetría diferencial de barrido (CDB)	Lo hace mediante la medición del cambio de calor con función del tiempo asociado con la deshidratación térmica de la molécula.
Espectroscopía ultravioleta (UV)	Técnica caracterizada para CI que presenten un huésped con grupos cromóforos.
Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹ H y ¹³ C)	Técnicas que estudiar las interacciones entre huésped y hospedero. Proporcionar información sobre la estructura del complejo, y su orientación del huésped dentro de la cavidad del CD.
Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	Técnica para estudiar estequiometría y las constantes de asociación de los CI.

[7]

El uso de agentes solubilizantes como las CD en medios de reacciones microbianas para la transformación de esteroides, por su baja polaridad, y con ello se emplea técnicas que permitan mejorar el rendimiento de producción, como la biotransformación [3].

2.6. Biotransformación.

Las biotransformaciones son reacciones químicas realizadas por un biocatalizador (células y/o enzimas) [25]. La transformación biológica abre la posibilidad de realizar modificaciones en compuestos naturales de manera selectiva como; hidroxilación, metoxilación, esterificación, acilación, halogenación, isomerización, deshidrogenación, reducción, hidroxilación y escisión de la cadena lateral unido al C-17, y crear nuevos centros de quiralidad. Figura 10 [25-28]. Además, el empleo de diferentes medios de cultivos, se asegura el requerimiento y nutricional necesario para presentar una baja toxicidad [26-27].

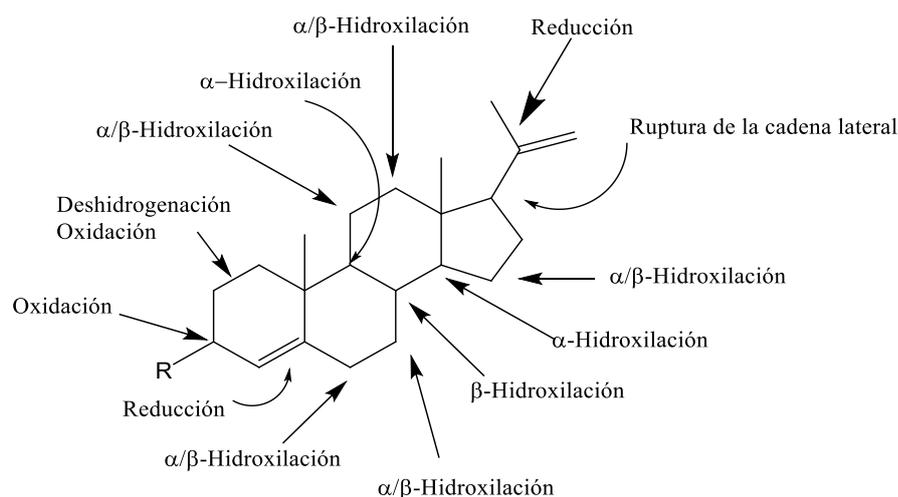


Figura 10. Sitios específicos funcionalizados por diferentes microorganismos en la biotransformación de diversos esteroides [28].

2.6.1. Biotransformación de esteroides con hongos filamentosos.

Las biotransformaciones microbiológicas con hongos desempeñan un papel importante en la industria farmacéutica de los esteroides, desde su descubrimiento a principios de la década de 1950, por Murray y Peterson en la empresa Upjohn al patentar el proceso de la hidroxilación de la progesterona (**5**) por una especie de *Rhizopus sp.* Figura 11 [25-26].

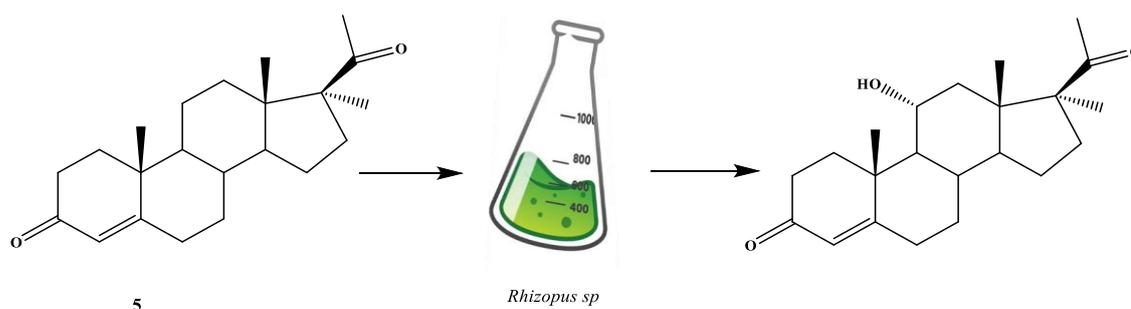


Figura 11. Biotransformación de progesterona (**5**) con *Rhizopus sp.*

La creciente demanda de productos farmacéuticos con esteroides estimula el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos rentables y ecológicos [3]. La aplicación de catalizadores fúngicos para la hidroxilación a menudo es preferible a las bacterias, porque preserva la integridad del núcleo de esteroides [28]. La hidroxilación de esteroides en hongos se puede realizar principalmente por las monooxigenasas del citocromo P450

(P450s, o CYPs), [29-30]. Algunos ejemplos demuestran la capacidad de modificaciones estructurales de los esteroides, las cuales incluyen la escisión de la cadena lateral, como varias hidroxilaciones, específicas en sitios: 6 β , 11 α , 11 β , 14 α , 15 β y 16 β , formando derivados hidroxilados correspondientes [29, 31]. Una alternativa en la aplicación prometedora a la síntesis química, como es la bioconversión por hongos, permite a carbonos poco activados en una estructura de anillo de esteroides, funcionalizar procedente de un alta regio- y estereo- específico, además, de ser ecológica y permite minimizar los riesgos de contaminación ambiental [29-30].

2.6.2. Antecedentes de cepas empleadas en la biotransformación.

Alternaria sp.

Se ha registrado en la literatura el proceso catalítico de oxidación e hidroxilación específica con el hongo *Alternaria alternata* [32]. De la biotransformación de la cinobufagina (**6**) con *A. alternata* se obtuvo la 12 β -hidroxil-cinobufagina (**6a**) y 3-oxo-12 β -hidroxil-cinobufagina (**6b**), Figura 12 [33].

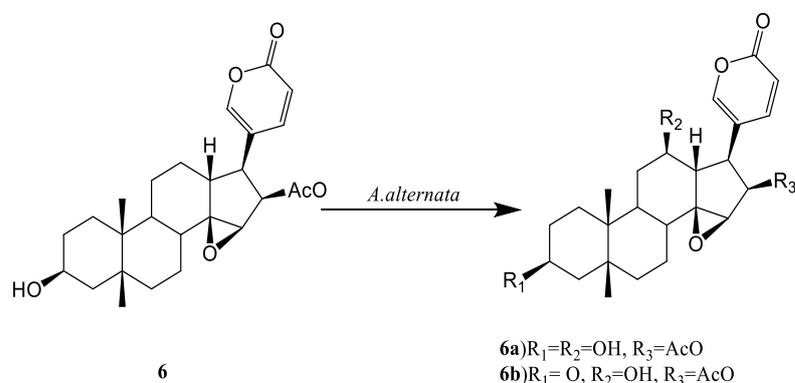


Figura 12. Biotransformación de cinobufagina (**6**) en *A. alternata*.

Aspergillus niger.

Se ha estudiado la transformación de dehidroepiandrosterona (**7**), en androst-4-en-3,17-diona (**7a**), 17 β -hidroxiandrost-4-en-3,16-diona (**7b**), 16 β ,17 β -dihidroxiandrost-4-en-3-ona (**7c**), y 16 β -hidroxiandrost-4-en-3,17-diona (**7d**) [34]. También la biotransformación del 3 β ,17 β -dihidroxiandrost-5-eno (**8**) por la misma cepa produce 3 β ,7 β ,17 β -trihidroxiandrost-5-eno (**8a**), 17 β -hidroxiandrost-4-en-3-ona (**8b**), y 17 β -hidroxiandrost-4-en-3,16-diona (**8c**), Figura 13 [35].

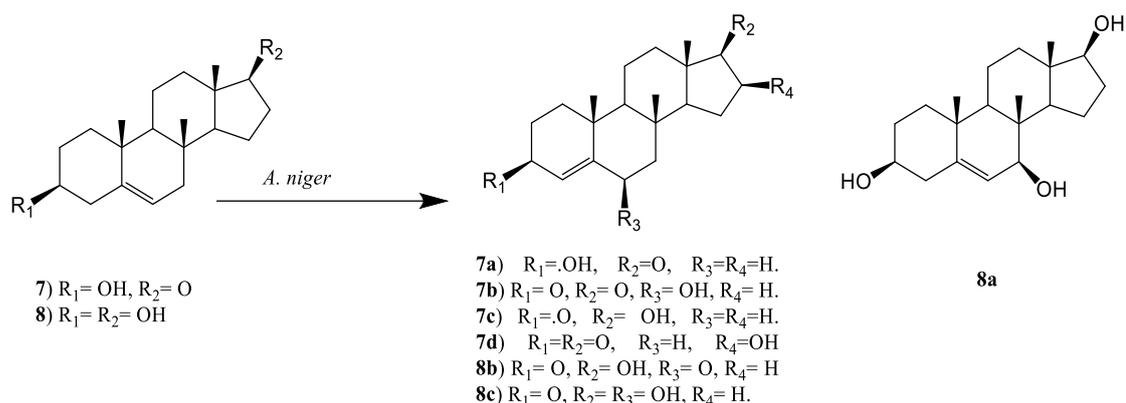


Figura 13. Bioconversión de dehidroepiandrosterona (7) y de Androstenediol (8) por *A. niger*

Aspergillus brasiliensis.

A. brasiliensis hidroxilo diferentes sitios de la progesterona (5), para producir 11α -hidroxi-progesterona (5a) como compuesto mayoritario, además, de la 14α -hidroxi-progesterona (5b) y la desoxicorticosterona (5c). Se presenta muy pocos informes sobre la biotransformación de esteroides por parte de *A. brasiliensis* en la literatura, Figura 14 [35].

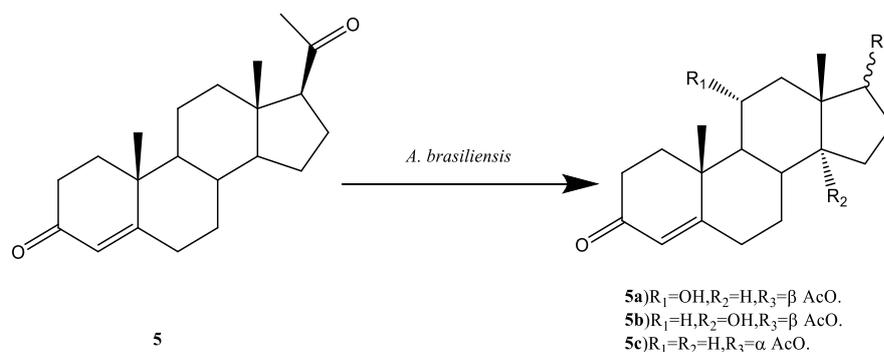


Figura 14. Biotransformación de Progesterona (5) en *A. brasiliensis*.

Beauveria bassiana.

Se informó que pueden catalizar reacciones que incluyen hidroxilación, reducción y oxidación [36]. En la metabolización de Androstediona (9) por *B. bassiana* se obtuvo a 11α -dihidroxiandrostediona (9a). También la transformación de la progesterona (5), tuvo

como resultado en dos rutas: a través de la 11 β -hidroxilación (**5d**) o la escisión de la cadena lateral 17 β que conduce a la 11 α -dihidroxitestosterona (**5e**), Figura 15 [37].

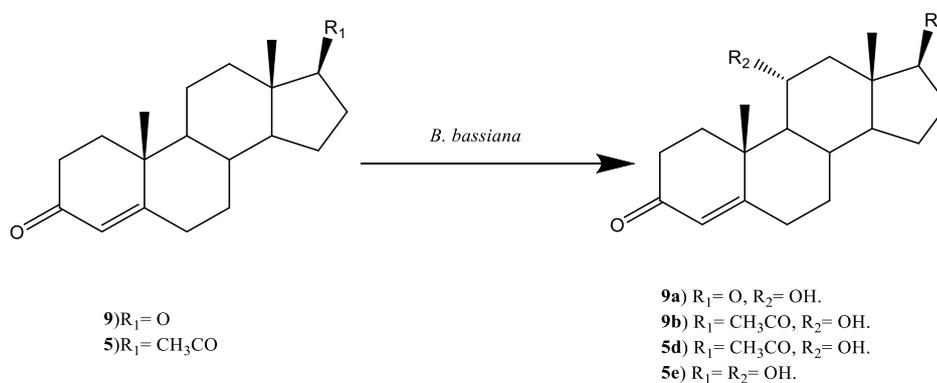


Figura 15. Biotransformación de Androstediona (**9**) y Progesterona (**5**) con *B. bassiana*

A continuación, en la Tabla 3, se recopilaron ejemplos de biotransformación de los esteroides con diferentes hongos filamentosos descrita en los últimos siete años.

2.6.3. Biotransformación de complejos de inclusión de esteroides con hongos filamentosos.

La biotransformación de complejos de inclusión de diferentes esteroides con hongos filamentosos se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Biotransformación de esteroidales con hongos filamentosos.

Sustancia	Microorganismo	Producto resultante (%)	Ref.
Ácido desoxicólico	<i>Fusarium culmorum</i> (VKM-1017)	7 β / α -dihidroxiprenolona (--)	[38]
Acetato de cortexolona	<i>Absidia coerulea</i> (VKMF-833)	7 β / α -OH Acetato de cortexolona (--)	[38]
Colesterol	<i>Trichoderma koningiposis</i>	7 β -hidroxicolesterol	[37]
Colesterol	<i>Mucor circinelloides</i>	5,6-epoxi-colesterol (5.6), 4-cholesten-3-one (2.5)	[37]
progesterona	<i>Fusarium solani</i>	1,4-androstadiene 3,17-dione (85)	[32]
Tibolona	<i>Rhizopus stolonifer</i>	3 β -hidroxitibolona (--), 15 β -hidroxitibolona (>50)	[37]
Acetato de prenolona	<i>Cunninghamella elegans</i>	androsta-1,4-diene-3,17-dione (--), 6 β ,15 β -dihydroxy-androst-4-diene-3,17-dione	[32]
Dehidroepiandrosterona	<i>Fusarium acumminatum</i> (Kch S1)	7 α -hidroxidehidroepiandrosterona (>50)	[33]
Dehidroepiandrosterona	<i>Penicillium commune</i> (KCh W7t)	androsterona y testolactona (--)	[33]
Dehidroepiandrosterona	<i>Apergillus tamarii</i> (KITA)	3 β -hidroxi-4-androsten-6,17 diona (--)	[33]
Pregnenolona	<i>Backusella lamprospora</i> (VKM-944)	7 α -hidroxidehidroepiandrosterona (>50)	[38]
Ácido ursólico	<i>Rhizopus chinensis</i> (CICC 40335)	7 β -hidroxi-glicirretínico (77.5)	[33, 34]
Ácido ursólico	<i>Mucor spinosus</i> (AS 3.3450)	Ácido 7 β -hidroxi-ursólico -butanona (5.04)	[34, 35]
Ácido oleanólico	<i>Rhizopus chinensis</i> (CICC 40335)	Ácido 7 β ,21 β -dihidroxi oleanólico (53.75)	[34, 36]

(--) Producto presente resultante de la biotransformación. Cantidad del producto no definido.

Tabla 5. Biotransformación de complejos de inclusión de esteroidales con hongos filamentosos.

Sustrato	CI con CD (mol:mol)	Microorganismo	Producto resultante (%)	Ref.
Pregnenolona	Me-β-CD 1:1	<i>A. niger a</i> (VKM-212)	11α-hidroxiprogesterona (60-65)	[40]
Pregnenolona	HP-β-CD 1:1	<i>A. niger a</i> (VKM-212)	11α-hidroxiprogesterona (25-35)	[40]
Dehidroepiandrosterona	Me-β-CD 1:1	<i>B. lamprospora</i> (VKM-944)	7α-hidroxi dehidroepiandrosterona (65)	[40]
Dehidroepiandrosterona	Me-β-CD 1:3	<i>S. cerevisias</i> recombinante la 7α-hidroxilasa (CYP7B1)	17α-hidroxi dehidroepiandrosterona (70)	[40]
Androstenediona	HP-β-CD 1:1	<i>P. pastoris GS115</i> recombinante con 17 β-HSD de <i>S. cerevisiae</i>	Androst-1,4-dien-17β-ol-3-one (73)	[42]
Androstenediona	HP-β-CD 1:1	<i>P. pastoris GS115</i> recombinante con 17 β-HSD de <i>S. cerevisiae</i>	Boldione (83)	[42]
Acetato 6α-fluoro,16α-metil-desoxicorticosterona	Me-β-CD 1:2	<i>C. lunata</i> (VKM F-644)	acetato 6α-fluoro,16α-metil corticosterona (54), 6α-fluoro,16α-metil corticosterona (11)	[43]
Acetato 6α-fluoro,16α-metil-desoxicorticosterona	Me-β-CD 1:2	<i>G. butleri</i> (VKM F-1033)	14βhidroxil acetato 6α-fluoro,16α-metil-desoxicorticosterona (40), 11βhidroxil acetato 6α-fluoro,16α-metil-desoxicorticosterona (60)	[43]

2.7. Acoplamiento molecular.

El acoplamiento molecular (docking) “proteína-ligado” o “proteína-proteína” es una tecnología de teoría funcional de la “química computacional”¹, adecuada para investigar la predicción y la interacción de moléculas en la orientación preferida en relación con una proteína o enzima. Proporciona información estructural y energética del proceso de interacción intermolecular, que se producen entre dos moléculas: proteína-ligando (sustrato) [44-45].

El concepto original de acoplamiento proviene del concepto de 'cerradura y llave' del diseño racional de fármacos. Algunos programas de acoplamiento más utilizados son Autodock —software de simulación de acoplamiento molecular—. En la mayoría de los casos, se puede elegir la mejor “afinidad de unión” para que sea el potente ligado para futuros experimentos y desarrollos bioquímicos [45].

¹La química computacional es una rama de la química que utiliza modelos computacionales para ayudar a estudiar y resolver problemas químicos a través de la aplicación de técnicas y simulaciones computacionales de sistemas moleculares [44]

III. JUSTIFICACIÓN.

Debido a la baja solubilidad del acetato de colesterilo (**1**) y ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**) en H₂O, y de haber ensayado la biotransformación de **1** y **2** con diferentes hongos filamentosos—*Alternaria sp.*, *Aspergillus brasiliensis*, *A. niger*, y *Beauveria bassiana*—, se encontró que los rendimientos obtenidos de dicho proceso fueron muy desfavorecidos. De acuerdo con la literatura especializada, se sugiere la preparación de los complejos de inclusión [huésped/hospedero], con la finalidad de facilitar la disponibilidad de **1** y **2** en medio acuoso.

Para lo cual, se procedió a la formación de los complejos de inclusión (CI), utilizando a la β -ciclodextrina (β -CD) y 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), mediante los métodos descritos en la literatura (mezcla física y Co-evaporación). Su identificación y caracterización, se basa en diferentes métodos espectroscópicos y termogravimétricos. Para conocer la relación estequiométrica se realizan los estudios de las interacciones sustrato/CD, por medio del acoplamiento molecular (docking).

IV. HIPÓTESIS.

El Acetato de colesterol (**1**) y el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**) presenta una baja solubilidad en H₂O, debido a sus propiedades lipídicas, limitando su rendimiento en los procesos de biotransformación. Entonces a través de la formación de los complejos de inclusión (**1**/ β -CD, **2**/ β -CD, **1**/HP- β -CD y **2**/HP- β -CD) se podrá favorecer dicho proceso. La obtención de los complejos de inclusión requiere de estudios sobre su formación, identificación, estabilidad y estequiometría.

V. OBJETIVOS.

5.1. OBJETIVO GENERAL.

Realizar la obtención e identificación de los complejos de inclusión (CI) del Acetato de colesterilo (**1**) y del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**) con β -ciclodextrina (β -CD) y 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), mediante los métodos de mezcla física y Co-evaporación. La formación de los complejos de inclusión se realizará con forme a los datos de infrarrojo (IR), Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) y acoplamiento molecular (docking). Para su posterior biotransformación con hongos filamentosos — *Alternaria sp.*, *Aspergillus brasiliensis*, *A. niger*, y *Beauveria bassiana*—.

5.2. Objetivos particulares.

- 5.2.1. Realizar revisión bibliográfica sobre los métodos en la obtención de los complejos de inclusión de triterpenos con diferentes CD.
- 5.2.2. Realizar la biotransformación cuantitativa y cualitativa de acetato de colesterilo (**1**) y del ácido 3 α hidroximasticadienónico (**2**) con hongos filamentosos.
- 5.2.3. Obtener los complejos de inclusión del **1** y **2** con β -CD y HP- β -CD por mezcla física y Co-evaporación.
- 5.2.4. Caracterizar los complejos de inclusión de **1**/ β -CD y **1**/HP- β -CD por mezcla física y Co-evaporación por IR.
- 5.2.5. Caracterizar los complejos de inclusión de **2**/ β -CD y **2**/HP- β -CD por mezcla física y Co-evaporación por IR y CDB.
- 5.2.6. Elaborar los modelos computacionales de las moléculas de **1**, **2**, β -CD y HP- β -CD.
- 5.2.7. Obtener los acoplamientos moleculares (Autodock y Ligplot+) de **1** y **2** con las diferentes CD (β -CD y HP- β -CD).
- 5.2.8. Determinar los acoplamientos moleculares de los CI de **1** y **2** y relacionar con base en sus espectros de IR

VI. MATERIAL Y MÉTODO.

6.1. Método de separación y purificación de productos de la biotransformación.

En la separación y purificación de los productos de biotransformación se realizó por técnicas cromatográficas: cromatografía en columna Flash (CC Flash) y cromatografía a vacío (CCV). En el proceso de purificación de CC Flash y CCV se utilizó como fase estacionaria Sílica gel (SiO₂) Marca Merck® con tamaño de malla 70/230 y 230/400 ASTM. El análisis por cromatografía en capa fina (cromatofolios) de la marca Merck® 60 F₂₅₄. Se preparó utilizando diferentes mezclas de disolventes y cómo reveladores químicos específicos, se utilizaron: [MnCl₂-H₂SO₄-MeOH-4H₂O (2 mg: 2 mL: 40 mL, 40 mL)] y [(NH₄)₄ Ce (SO₄)₄ al 1% en H₂SO₄ 2N]. La concentración de las fracciones se obtienen de las separaciones cromatografías y de las extracciones con disolventes orgánicos por medio en un rotavapor. Cromatofolios.

6.2. Obtención del Acetato de coleserilo (1).

El acetato de coleserilo (1) fue obtenido mediante la acetilación del coleserol (3) con Ac₂O (0.5 mL) y Py (0.2 mL) en CH₂Cl₂ con agitación constante durante 24hrs [46].

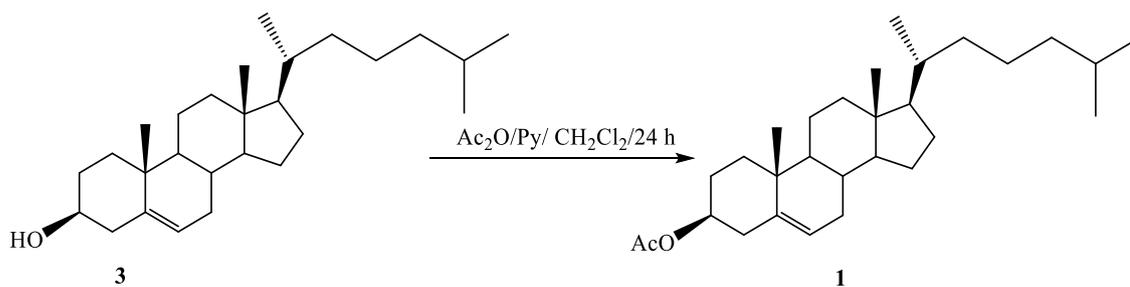


Figura 16. Obtención del Acetato de coleserilo (1).

6.3. Biotransformación.

6.3.1. 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 hongos² —*Alternaria sp.*, *Aspergillus niger*, *A. brasiliensis*, *Beauveria bassiana* — y se dejaron en crecimiento por 5 días a temperatura ambiente.

6.3.2. 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.

6.3.3. Preparación de la solución densa de esporas.

La solución densa de esporas de los hongos² *Alternaria sp.*, *A. niger*, *A. brasiliensis*, y *B. bassiana*. 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.

6.3.4. 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 *Alternaria sp.*, *A. niger*, *A. brasiliensis*, y *B. bassiana*. 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.

²Las cepas fúngicas empleadas para el trabajo fueron proporcionadas y clasificadas por el Laboratorio de Biotransformaciones y Química de Productos Naturales L-314, de la FES-Zaragoza, UNAM.

6.3.5. Biotransformación cualitativa/cuantitativa del Acetato de colesterilo (1) con diferentes 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 250 mg (cualitativa), 240mg (cuantitativa) de **1** disuelto en Me₂CO (50 mL) (aproximadamente 20 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 el blanco del hongo, del medio y de la sustancia.

6.3.6. Obtención de los residuos de biotransformación de Acetato de colesterilo (1) de los hongos filamentosos.

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. 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 sólido-líquido 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

³La β-ciclodextrina (pureza ≥97%) y (2-hidroxiopropil)- β-ciclodextrina (pureza ≥ 98%) fueron adquiridas de los laboratorios Sigma-Aldrich.

6.4. Obtención de los complejos de inclusión.

6.4.1. Obtención de los complejos de inclusión de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y 2/HP- β -CD mediante el método de mezcla física.

Los complejos de inclusión de **1** con las CD³ (1/ β -CD y de 1/HP- β -CD), se obtuvieron mezclando cantidades equivalentes 1:1 de **1** con CD, señalados en la tabla 5. Se añadió **1** y la CD en un mortero y se molió durante 5 min, hasta la obtención de una mezcla homogénea, la cual se almacenó en atmósfera inerte (N₂) y ausencia de luz [47]. Para la preparación del complejo de 2/ β CD y de 2/HP β -CD, se realizó el mismo procedimiento anterior.

6.4.2. Obtención de los complejos de inclusión (CI) de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y 2/HP- β -CD mediante el método de Co-evaporación.

En la obtención de los CI de 1/ β -CD, por el método de Co-evaporación se adicionó lentamente en agitación continua durante 24hrs, una solución de **1** en MeOH por goteo a una disolución de la β -CD en H₂O, de acuerdo con la relación molar descrita en la tabla 5. Posteriormente, se evaporó la mezcla (MeOH/H₂O) por medio de rotavapor (BUCHI® Waterbath modelo B-480). El residuo obtenido se llevó a liofilización y posteriormente se almaceno a 4°C en N₂. La obtención de 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y de 2/HP- β -CD, se llevó a cabo por el mismo método descrito anteriormente. La caracterización de los CI por el método de Co-evaporación de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y 2/HP- β -CD, se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo (IR) [47].

Table 6. Medidas en la preparación de los complejos de inclusión de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD y 2/ β -CD 2/HP- β -CD.

Método	CI	Cantidad de sustrato (mg)	Cantidad de CD (mg)	Moles de sustrato (mol)	Moles de CD (mol)
Mezcla Física	1/β-CD	13.7	36.7	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}
	1/HP-β-CD	13.7	42.7	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}
Método Co-evaporación	2/β-CD	15.0	37.3	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}
	2/HP-β-CD	15.0	46.1	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}
	1/β-CD	200.0	529.0	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}
	1/HP-β-CD	200.0	719.0	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}
	2/β-CD	20.0	49.8	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}
	2/HP-β-CD	20.0	61.4	3.2×10^{-5}	3.2×10^{-5}

6.4.3. Caracterización de los complejos de inclusión (CI) por espectroscopía de infrarrojo (IR).

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo (IR)⁴ de las sustancias puras (**1**, β -CD y la HP- β -CD), ver Figuras 17-19. Posteriormente, se obtuvieron los espectros de IR del CI de 1/ β -CD por el método de Co-evaporación, Figura 20. En la Figura 21 se muestra el espectro de IR del CI de 1/HP- β -CD. La muestra se suspendió en Nujol en ventanas de NaCl, haciendo un barrido de 4000-400 cm^{-1} [40, 47]. Para la caracterización de los complejos de 2/ β -CD y de 2/HP- β -CD, por mezcla física y Co-evaporación, se realizó el mismo procedimiento anterior para la obtención de los espectros de IR. Obsérvese en las Figuras 22-23.

⁴Los espectros de IR de los complejos de inclusión y de las sustancias puras se realizaron en el laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría del Instituto de Química, UNAM. Por la M. C. Roció Patiño. Los análisis termogravimétricos se elaboraron en el Instituto de Investigaciones en Materiales, (IMM), UNAM. Por la M. C. Damaris Cabrero Palomino.

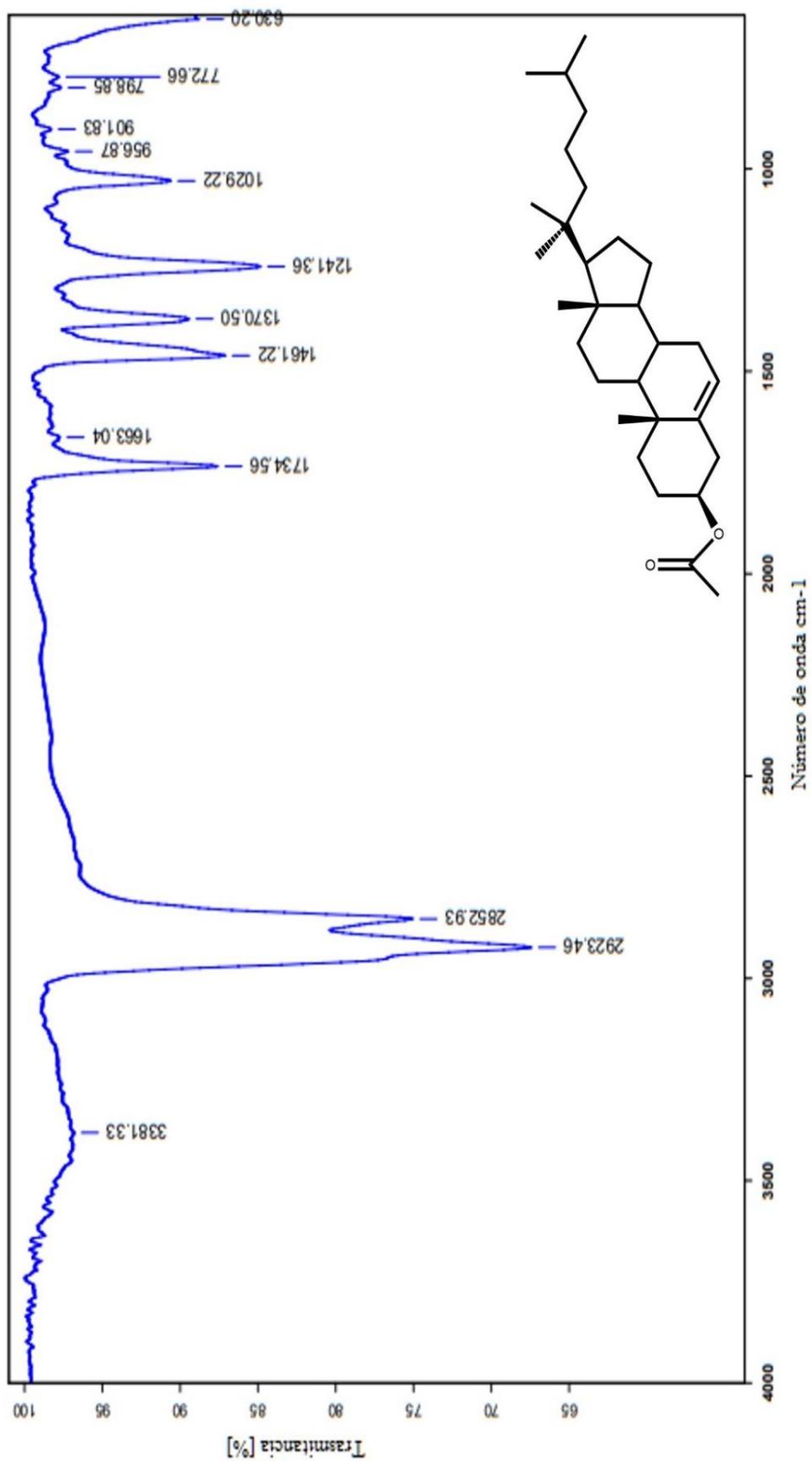


Figura 17. Espectros de IR del Acetato de colesterol (1).

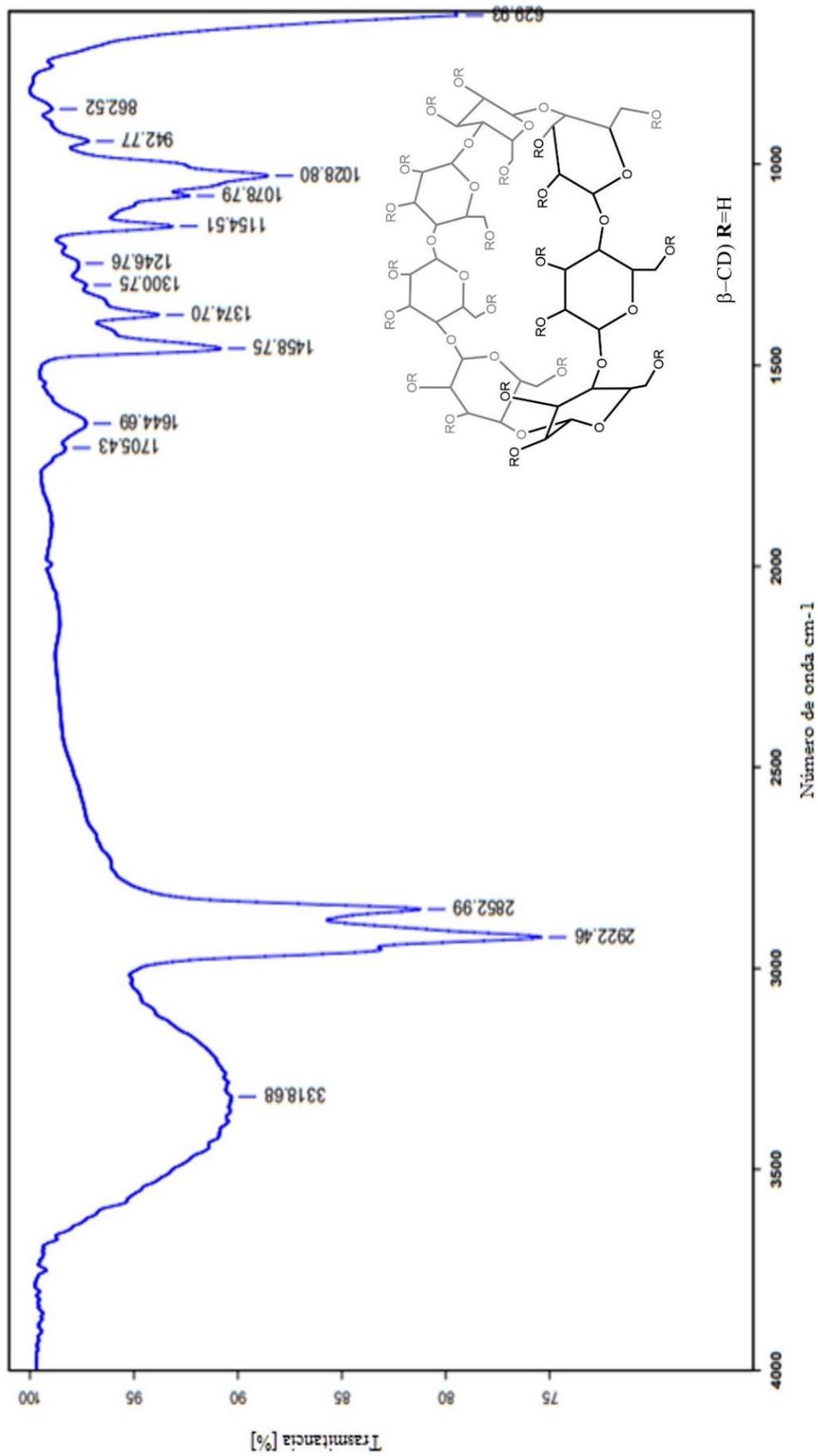


Figura 18. Espectros de IR de la β-ciclodextrina (β-CD) puro.

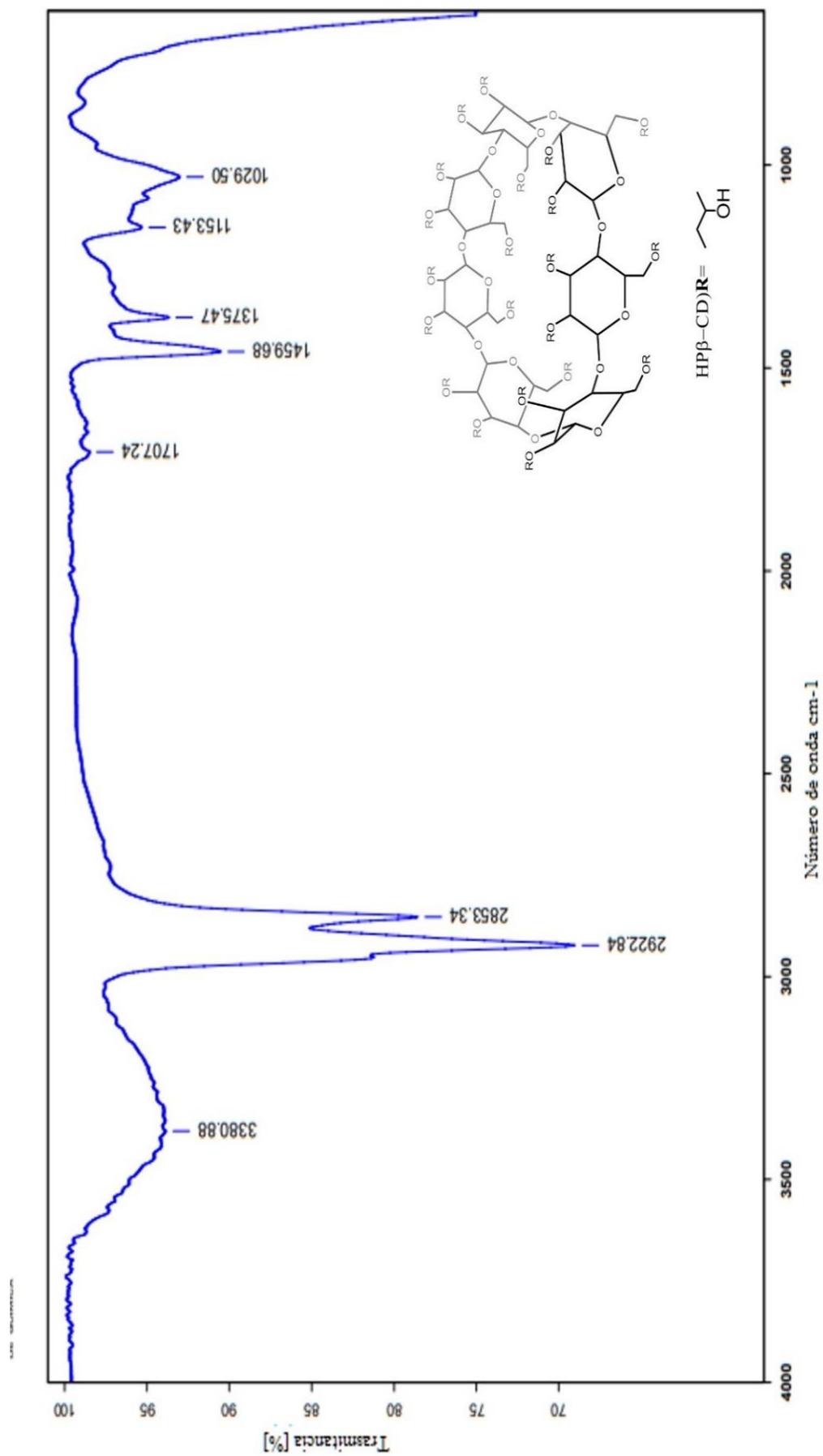


Figura 19. Espectros de IR de la 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) puro.

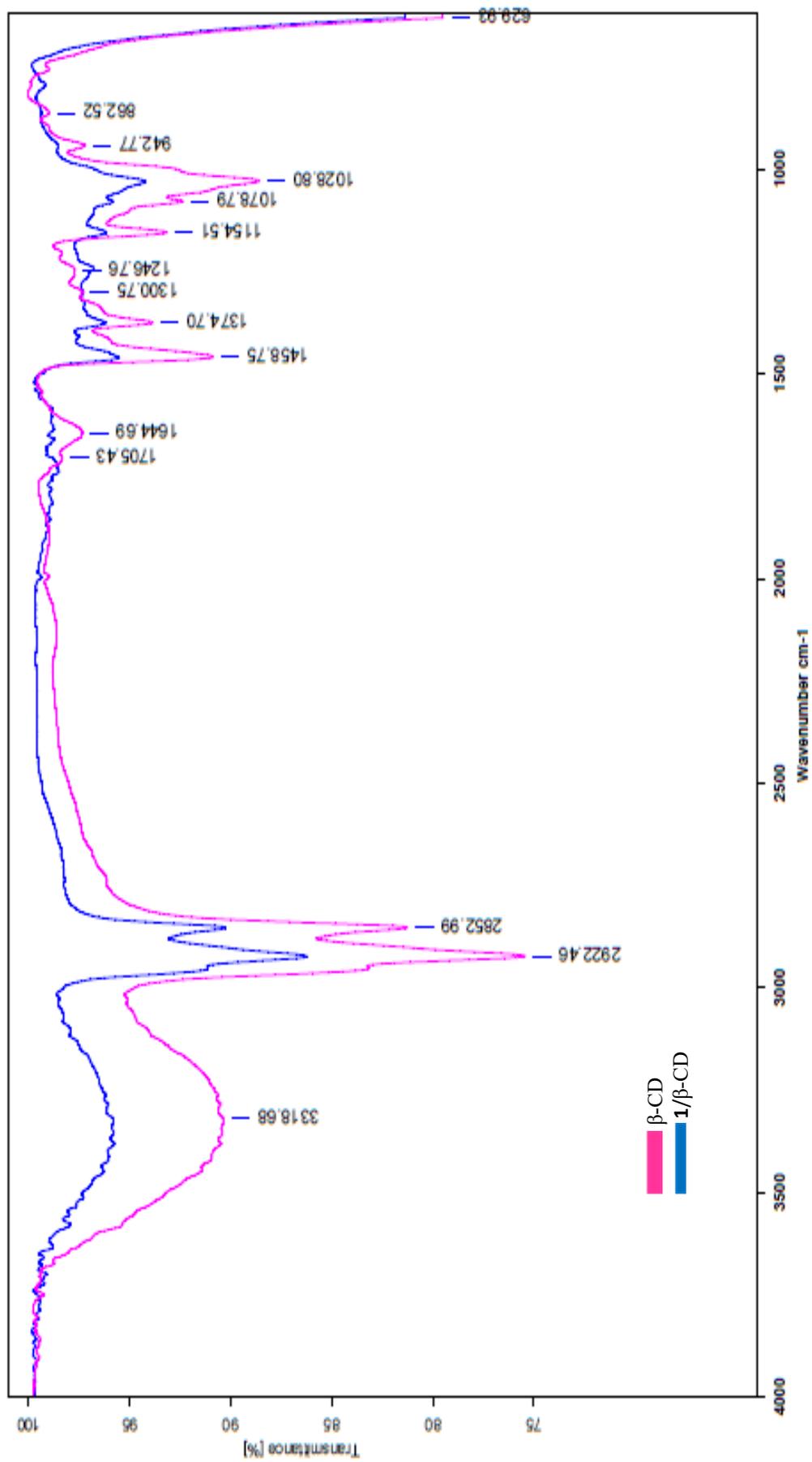


Figura 20. Espectros de IR del complejo del acetato de colesterolo (1) con β -ciclodextrina (β -CD).

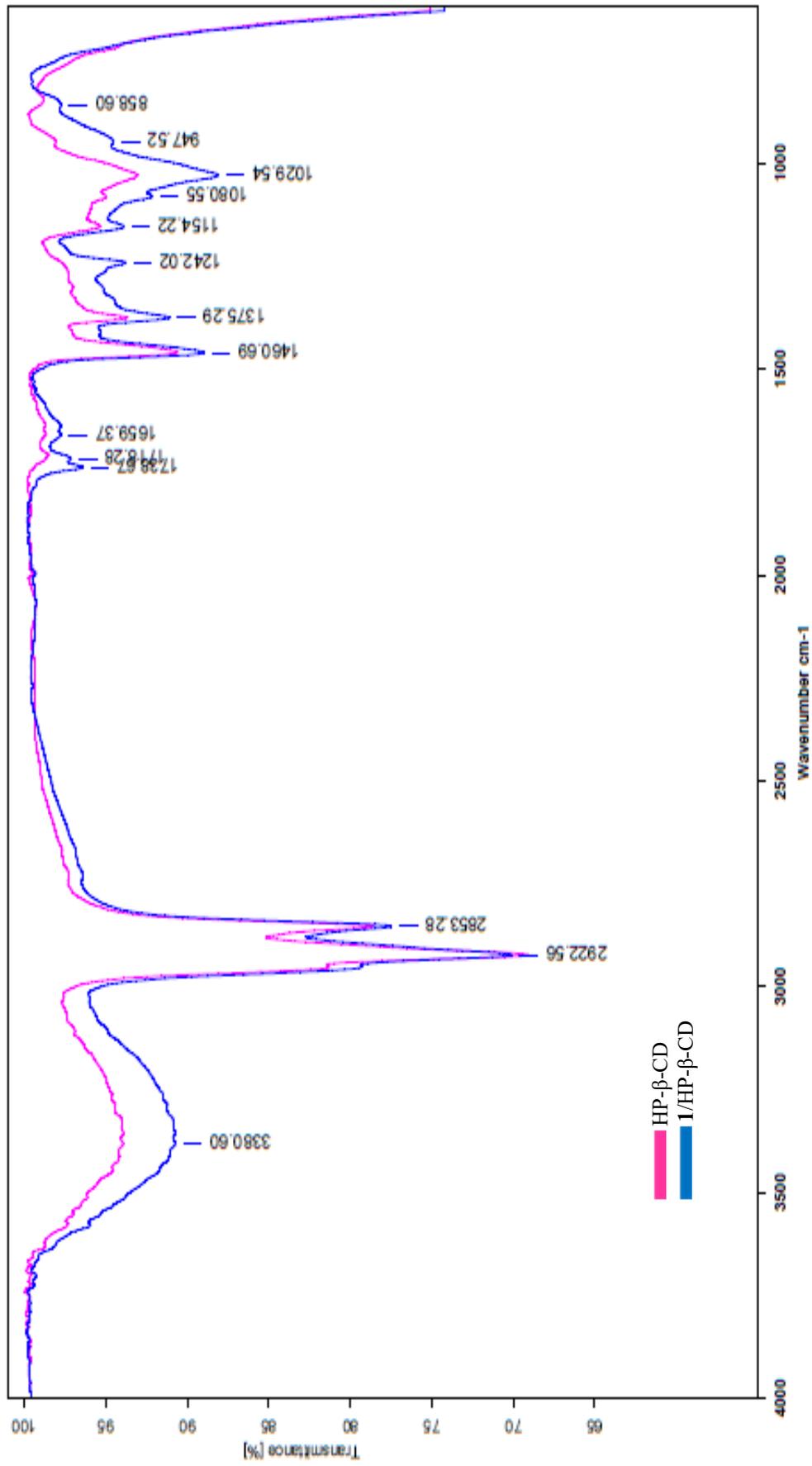


Figura 21. Espectros de IR del complejo del acetato de colesteroil (1) con la 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD).

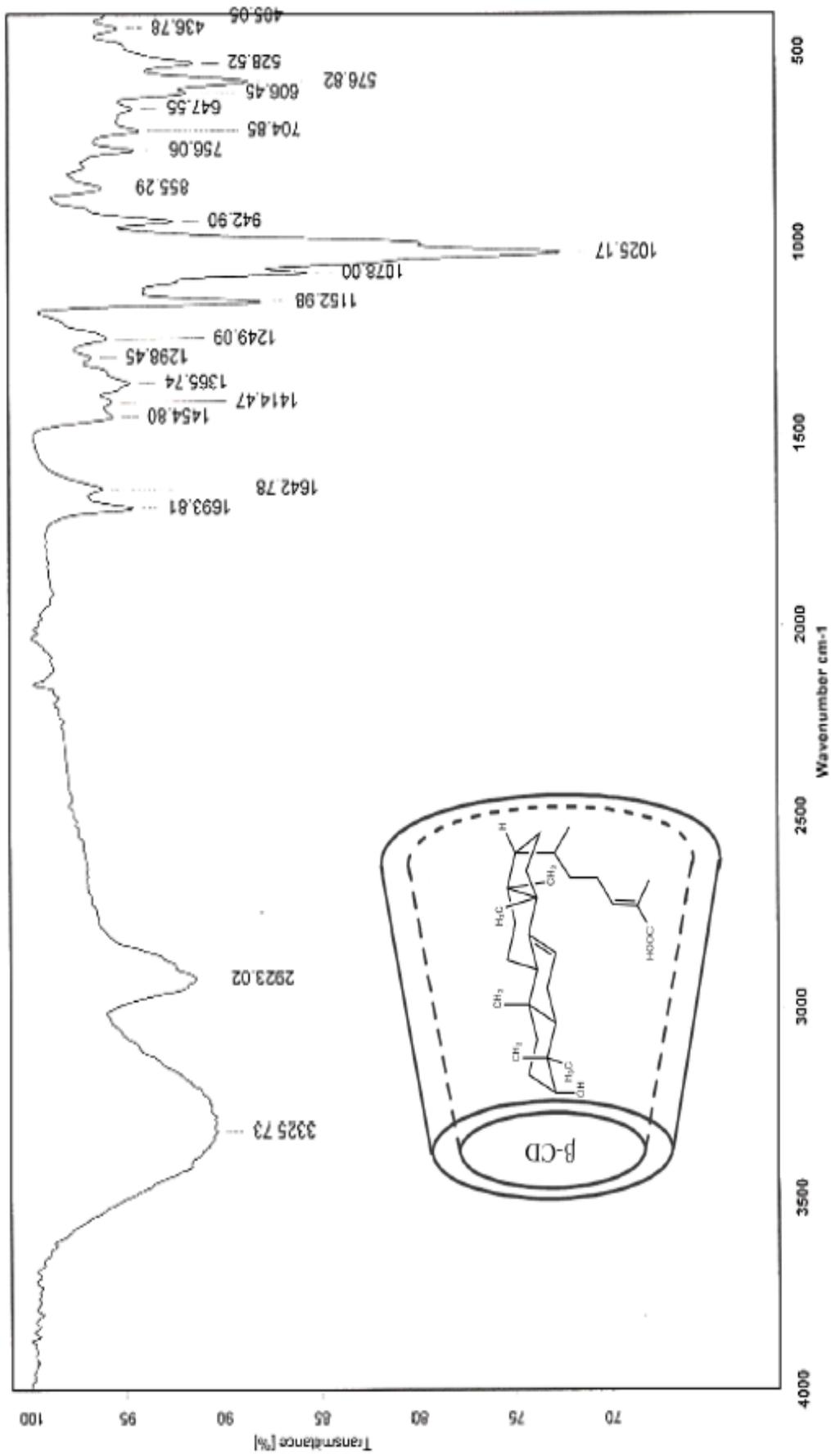


Figura 22. Espectros de IR del complejo de 2 con la β -ciclodextrina (β -CD) [5].

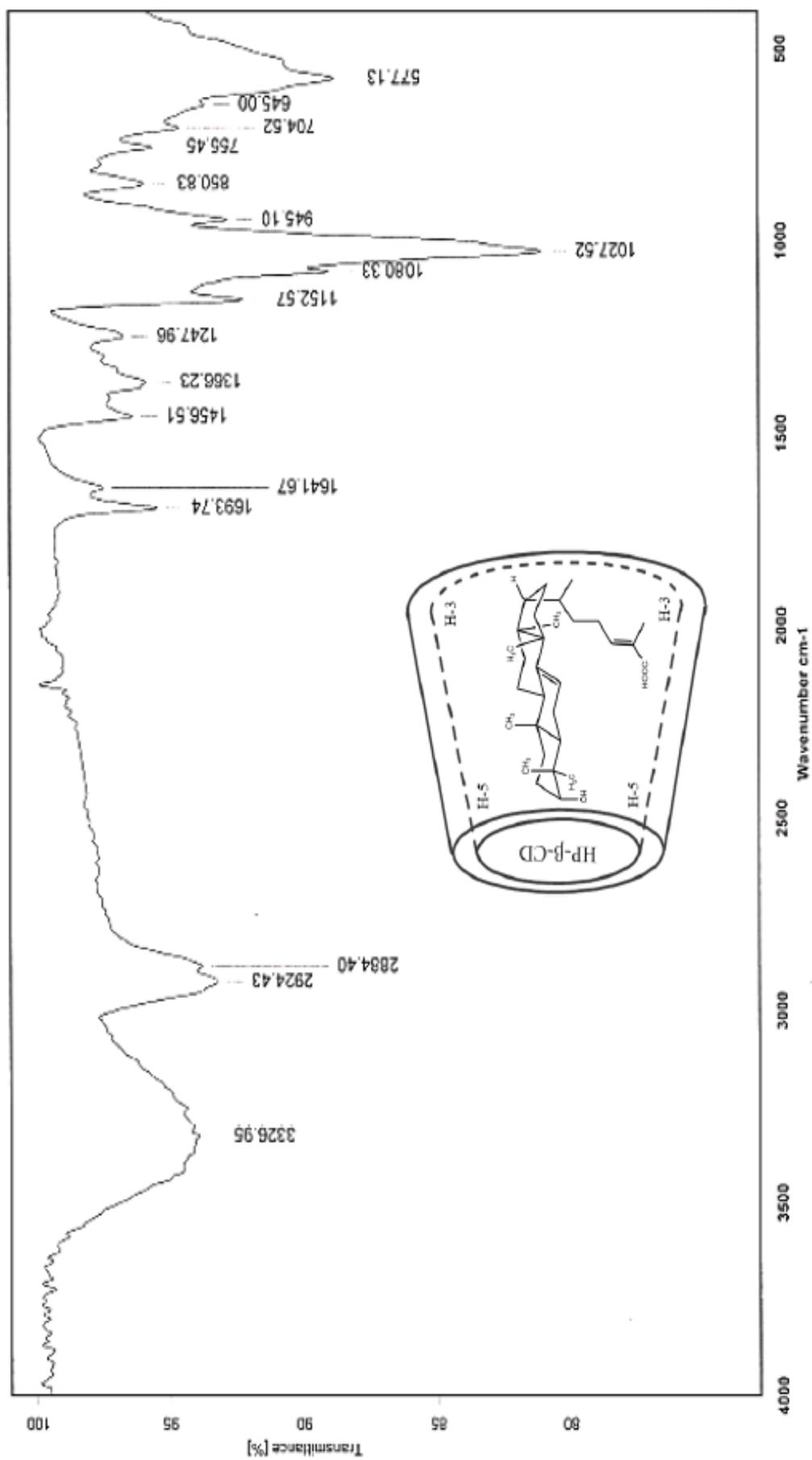


Figura 23. Espectros de IR del complejo de 2 con 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) [5]

6.4.4. Caracterización de los complejos de inclusión de 2/ β -CD y 2/HP- β -CD mediante la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB).

La caracterización mediante análisis termogravimétrico (CDB) se llevó a cabo en una celda de Al en donde se colocó una cantidad aproximada (3-5 mg) de **2** 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 y de los CI por mezcla física y de Co-evaporación de 2/ β -CD y 2/HP- β -CD. Los datos de la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) de 2/ β -CD y 2/HP- β -CD [5].

6.5. Acoplamiento molecular.

6.5.1. Construcción computacional de estructuras moleculares para el acoplamiento molecular.

Las estructuras geométricas computacionales del **1** se obtuvieron de la base de colesterol a partir de la página PubChem (la base de datos de química abierta en los Institutos Nacionales de Salud —NIH— del centro Nacional de Información Biotecnológica). Se sustituyó el grupo hidroxilo del C-3 del colesterol por un grupo acetato. Para la estructura de **2** se dibujó a partir del diseño 2D en ChemDraw Professional 16.0.

La obtención de la estructura cristalográfica de rayos X de la β -CD se recuperó del Banco de Datos de Proteínas (PDB) con el ID de PDB:2V8L. Se procedió a la eliminación de la proteína, moléculas de H₂O y cofactores con los cuales vienen resueltas sus estructuras cristalinas. Para la estructura de la HP- β -CD se añadieron grupos 2-hidroxipropilo a los grupos hidroxilos primarios y secundarios de la β -CD. La estructura resultante (HP- β -CD) fue minimizada y optimizada según el procedimiento de estandarización utilizando el software Avogadro y PyRx⁵-Python prescripción 0.8 [48].

Posteriormente se realizó el tratamiento de los ligandos basado en la revisión de las posiciones de sus átomos y de todos sus enlaces, tomando como referencia la estructura y visualizado en 3D con el programa Discovery Studio Visualizer⁶. En este punto también fueron adicionados los átomos de hidrógeno a las estructuras, ver Figura 24 [48].

⁵El programa de Autodoking fue obtenido de la página oficial de PyRx <https://pyrx.sourceforge.io/> Discovery Studio Visualizer fue obtenido de la página oficial <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download> versión gratuita bajo el correo institucional

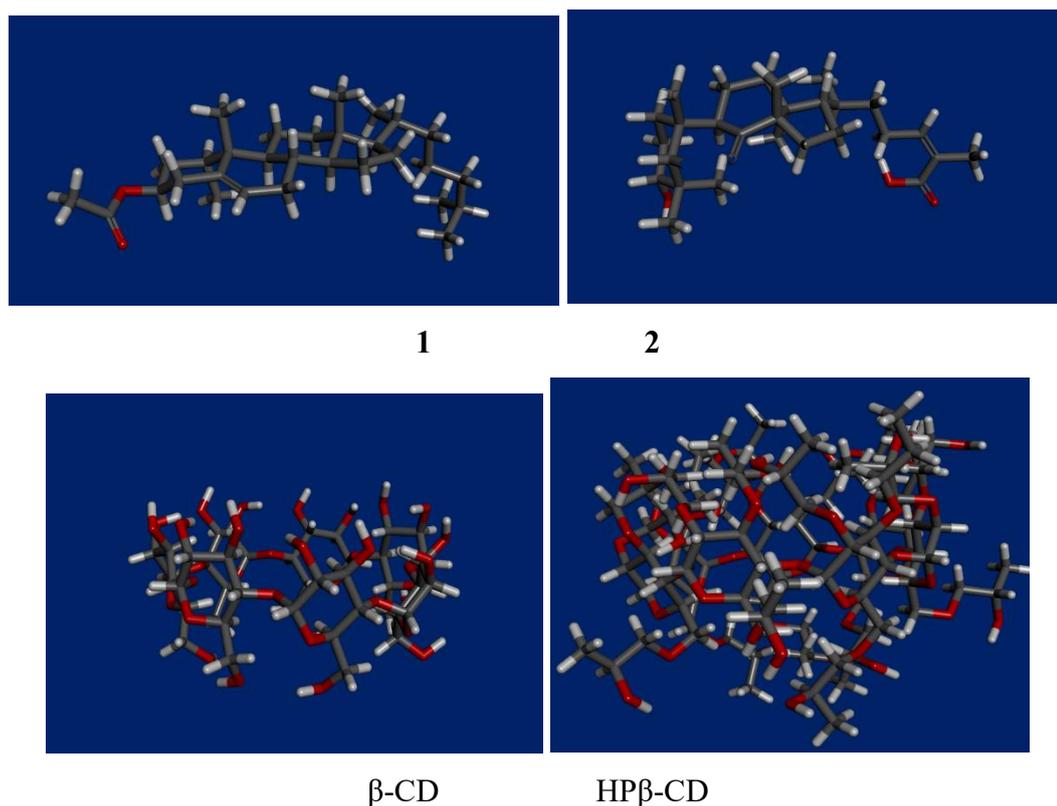


Figura 24. Estructuras 3D del Acetato de Colesterilo (1) y el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2), β -CD y HP β -CD.

6.5.2. Evaluación del programa de docking.

Para el acoplamiento se utilizó el programa AutoDock⁵ v 4.2. Se realizó un docking ciego entre cada uno de los dos complejos (CD), proteína–ligando y su respectivo receptor (sustrato), solicitándose para tal fin la generación de 100 poses en cada caso. Posteriormente, se realizó una inspección visual de los resultados en el programa AutoDockTools, a fin de observar el grado de similitud existente entre las poses generadas y las poses nativas [48-49]. Por su parte, el tratamiento de los ligandos se basó en la revisión de las posiciones de sus átomos y de todos sus enlaces, tomando como referencia la estructura 3D mostrada en la base de datos PDB y PubChem. En este punto también fueron adicionados los átomos de hidrógeno a las estructuras [48].

6.5.3. Parámetros del acoplamiento molecular.

El acoplamiento se realizó bajo los siguientes parámetros: libre rotación de todos los enlaces de los ligandos con libertad conformacional, adición de cargas de Gasteiger a la CD y al sustrato, adición de hidrógenos a la proteína, generación de 10 poses para cada ligando [48]. El mapa de rejilla (AutoGrid) con un punto de cuadrícula de X= 38, Y= 35,

Z= 36 para el sistema β -CD y X= 55, Y= 48, Z=49 para el sistema HP- β -CD con un intervalo entre puntos de cuadrícula de 0,375 Å, para garantizar el área de acoplamiento esté completamente rodeado. Para buscar las posibles conformaciones de los complejos de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD y 2/ β -CD 2/HP- β -CD, se ejecutó los tiempos del Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA). Este último se utilizó bajo las siguientes condiciones: 100 corridas del LGA, 150 tamaño de población, 2,500 000 máximo número de evaluaciones, 27 000 máximo número de generaciones. Por último, se adquirieron las conformaciones de los complejos con la menor energía libre incluida, basado en la metodología de la literatura. [48-49].

6.5.4. Selección de las estructuras más estables.

Para seleccionar la mejor estructura (pose) para cada ligando se utilizaron los siguientes criterios:

- Criterio 1. Energía de unión del complejo: se toma como mejor pose aquella que reporta la menor energía de unión entre todas las poses obtenidas.
- Criterio 2. Distribución de energía (clúster): se toma como mejor pose aquella que ocupa la primera posición dentro del clúster más poblado [49].

6.5.5. Análisis del acoplamiento.

En el análisis de acoplamiento, se cotejará mediante el programa LigPlot+⁷ con los elementos que ejecuten el programa, ver Figura 25, que permite examinar las interacciones intermoleculares entre los complejos ligando-proteína, en un diagrama 2D, con los resultados experimentales de espectroscopía de IR y CDB para reconocer la semejanza en la predicción del acoplamiento molecular y el CI.



Figura 25. Significado de los elementos que muestra el programa Ligplot+.

⁷Ligplot+ fue adquirido por la página del Instituto Europeo de Bioinformática del EMBL — <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/download2.html>— con licencia otorgada por 1 año a: Biología, UNAM el 3 septiembre, 2022.

VII. DISCUSIÓN Y ANALÍSIS DE RESULTADO.

7.1. Biotransformación del Acetato de colesterilo (1).

7.1.1. Biotransformación cualitativa de Acetato de colesterilo (1) con diferentes hongos filamentosos.

De la biotransformación cualitativa con los hongos filamentosos—*Alternaria sp.*, *A. brasiliensis*, *A. niger*, y *B. bassiana*— se obtuvo una recuperación del 235.7 mg de **1** (94.3%) a partir del residuo de la biomasa. A continuación, en la Figura 26, se observa los residuos obtenidos del bioensayo, observándose una gran similitud del proceso de biotransformación con los metabólicos secundarios producidos por los mismos hongos.

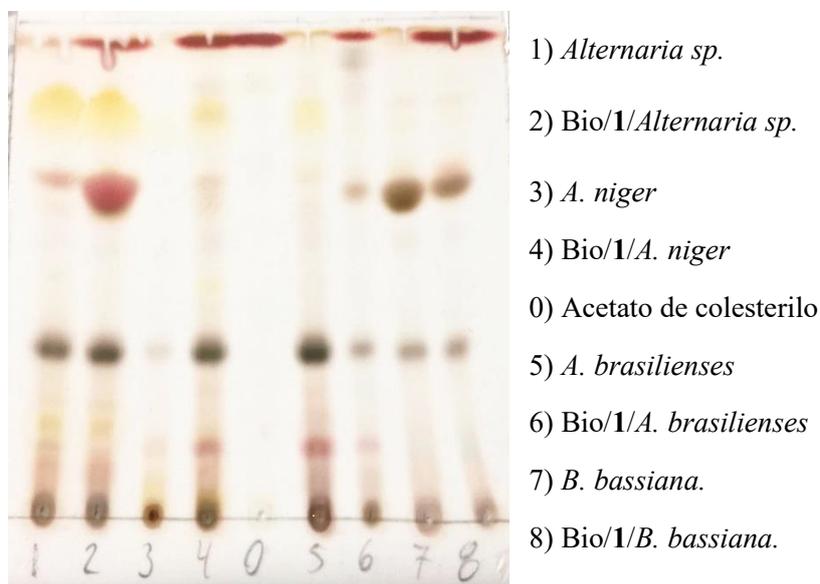


Figura 26. CCF en elución de *n*-hex/Et₂O (1:1) de los residuos de la biotransformación de **1** con diferentes hongos filamentosos.

7.1.2. Biotransformación cuantitativa de Acetato de colesterilo (1) con *Alternaria sp.*

En la biotransformación cuantitativa de **1** con *Alternaria sp.*, se recuperaron 110.7 mg (46.1 %) de **1** y 34 mg (31.4%) constituyeron a una mezcla de producto no identificados. En la Figura 27, se muestran los residuos obtenidos del seguimiento de la biotransformación cuantitativa de **1** *Alternaria sp.*, por medio de CCF.

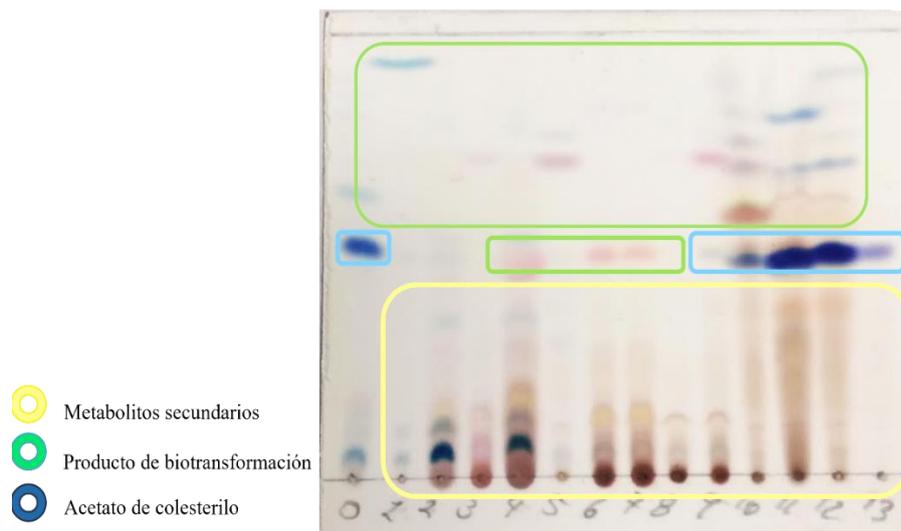


Figura 27. CCF en elución de *n*-hex/Et₂O (1:1) de biotransformación de **1** en *Alternaria* *sp.*

El bajo rendimiento en la biotransformación de **1** se cree que es la acumulación de **1** en la membrana lipídica del hongo, presentando un crecimiento anormal, lo cual está de acuerdo con el alto rendimiento obtenido de la recuperación de **1** [50-51].

7.2. Complejos de inclusión (CI) con ciclodextrinas (CD).

7.2.1. Rendimiento en la obtención de los CI de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y 2/HP- β -CD por el método de mezcla física y Co-evaporación.

En la Tabla 6, se muestra los rendimientos obtenidos en la formación de los CI de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y 2/HP- β -CD por los métodos de mezcla física y de Co-evaporación [5].

Table 7. Obtención y comparación de los rendimientos en la preparación de los CI de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y 2/HP- β -CD.

Método	CI	Cantidad de sustrato (mg)	Cantidad de CD (mg)	Masa total (mg)	Rendimiento (%)
Mezcla Física	1/ β -CD	13.7	36.7	47.6	94.4
	1/HP- β -CD	13.7	42.7	47.8	84.7
	2/ β -CD	15.0	37.3	41.7	79.7
	2/HP- β -CD	15.0	46.1	51.0	83.5
Método Co-evaporación	1/ β -CD	200.0	529.0	707.1	98.3
	1/HP- β -CD	200.0	719.0	909.8	98.1
	2/ β -CD	20.0	49.8	61.0	87.4
	2/HP- β -CD	20.0	61.4	72.7	89.3

De acuerdo con la tabla 6, se observa mayor rendimiento en la formación de los complejos de **1** y **2** por el método de Co-evaporación con respecto a la mezcla física.

7.2.2. Caracterización por análisis de espectroscopía de IR del complejo de inclusión (CI) de 1/ β -CD por método de Co-evaporación.

En el espectro de IR del acetato de colesterilo (**1**) se observan las vibraciones correspondientes al grupo acetato en 1743 cm^{-1} , en aproximadamente $2923\text{-}2852\text{ cm}^{-1}$ la $\nu(\text{Csp}^3\text{-H})$ y abajo de 3000 cm^{-1} corresponde a la $\nu(\text{Csp}^2\text{-H})$ de la doble ligadura $\Delta^{5(6)}$, ver Figura 28a. En el espectro de la β -CD se observa la presencia del grupo hidroxilo $\nu(\text{OH})$ en $3800\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$, y de los enlaces carbono $\nu(\text{Csp}^3\text{-H})$ en la banda situada en los $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, ver Figura 28b. La formación de los CI se identificó por la desaparición de la banda correspondiente al grupo acetato de **1**, y a la disminución en la intensidad de la banda del grupo hidroxilo (OH) de la CD, ver Figura 28c [48].

La caracterización del CI de 1/ β -CD sugiere la formación de dicho complejo mediante la introducción del esqueleto esteroideal por el anillo A, la cual, se apoya por los estudios de docking, los cuales, se describen más adelante.

7.2.3. Caracterización por análisis de espectroscopía de IR del complejo de inclusión (CI) de 1/HP- β -CD por método de Co-evaporación.

En el espectro de la HP- β -CD se observa la presencia del grupo hidroxilo $\nu(\text{OH})$ en los $3800\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$, y de los enlaces carbono $\nu(\text{Csp}^3\text{-H})$ en la banda situada en los $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, ver Figura 29b. La formación del CI de **1** con HP- β -CD se basa en los datos de IR donde se observa la casi desaparición de la banda correspondiente al grupo acetato, ver Figura 29c.

La formación del CI de 1/HP- β -CD se sugiere por la introducción de la cadena alifática de **1** en la cavidad hidrofóbica de la CD, lo que se supone por la observación de la banda que puede corresponder al grupo carbonilo del acetato, debido a la baja intensidad de la misma. Por otro lado, se puede inferir que la formación del CI se da por la introducción del esqueleto esteroideal de **1** en la cavidad hidrofóbica de la HP- β -CD, ya que la banda del grupo acetato se reduce notablemente en la intensidad del grupo carbonilo del **1**. Lo anterior se puede explicar por la rapidez en la formación del CI en formación del producto cinético, mientras, que en la formación del CI donde se observa el pico del acetato de **1** puede corresponder al producto termodinámico, puede estar determinado por el tiempo en el que se deja la agitación en el método de la Co-evaporación, lo cual está de acuerdo con lo obtenido en el estudio de docking [48,51-52].

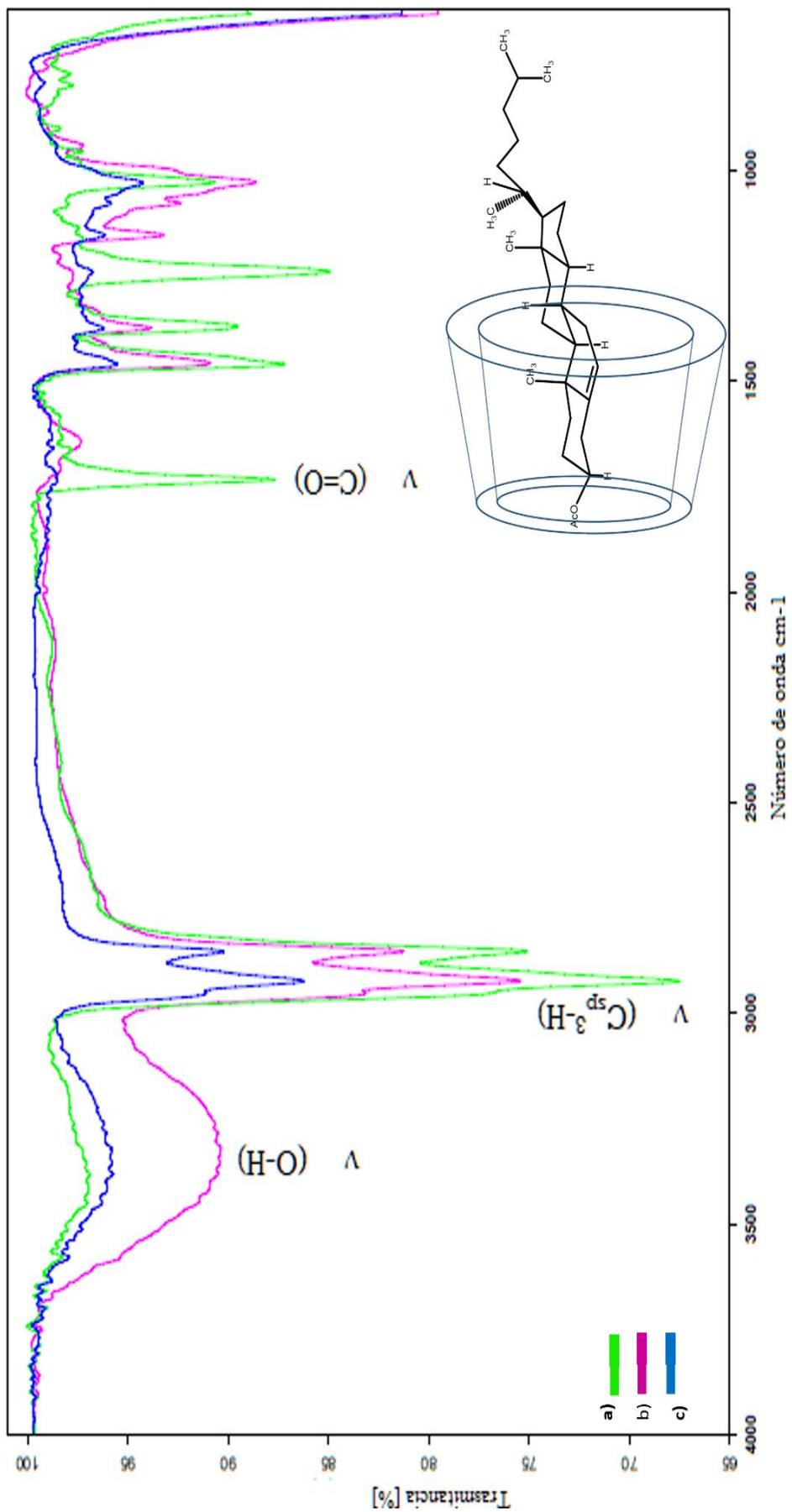


Figura 28. Espectros de IR: (a) Acetato de colesterol (1), (b) β-CD, (c) 1-β-CD obtenido por Co-evaporación.

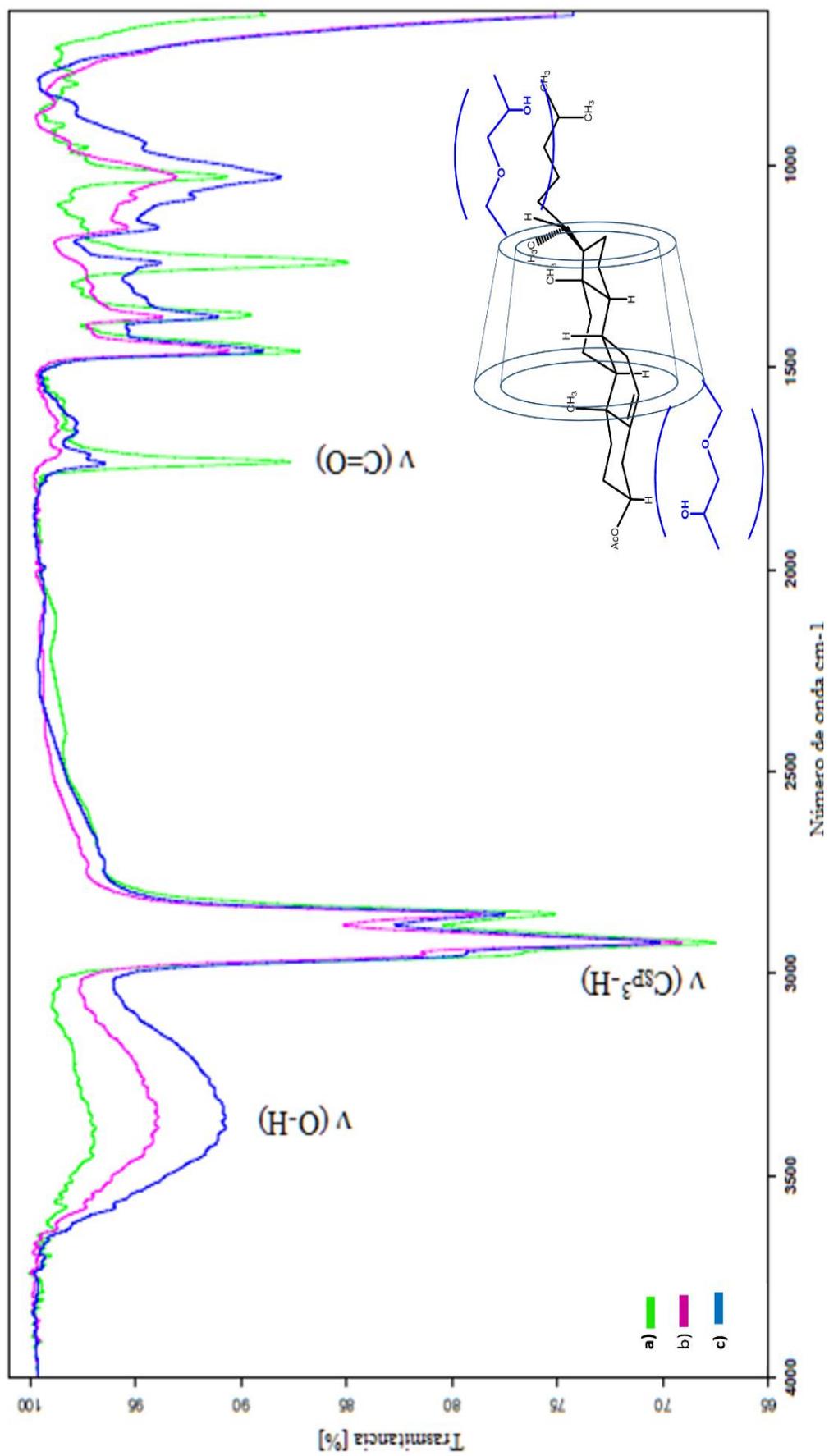


Figura 29. Espectros de IR: (a) Acetato de colesterol (1), (b) HP-β-CD, (c) Complejo de inclusión 1/HP β-CD obtenido por Co-evaporación

7.2.4. Caracterización por espectroscopía de IR de los complejos de inclusión de **2**/ β -CD y **2**/HP- β -CD por el método de Co-evaporación y mezcla física.

Los CI de **2**/ β -CD y **2**/HP- β -CD también fueron caracterizados por medio de espectroscopía de IR. Para **2** se observa las absorciones características de los grupos funcionales, como el grupo hidroxilo (OH) en C-3, el cual puede formar puentes de hidrógeno de manera intra e intermolecular; así como la función ácido carboxílico en C-27.

En 3430 cm^{-1} la $\nu(\text{OH})$ corresponde al grupo hidroxilo, mientras que la $\nu(\text{C}=\text{O})$ del grupo carbonilo del ácido es determinado por la absorción intensa alrededor de 1700 cm^{-1} . En 2940 cm^{-1} se observa la banda de la $\nu(\text{Csp}^3\text{-H})$. 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 **2**. Observándose que los espectros de IR de **2**/ β -CD y **2**/HP- β -CD son muy similares. Cabe señalar que una característica importante en los espectros del IR 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 CI, se observa la desaparición de la $\nu(\text{C}=\text{O})$ de la función ácido carboxílico de **2**, lo cual confirma que se formó el complejo de inclusión por los dos métodos descritos, sugiriendo que **2** se encuentra dentro de la cavidad de las CD, adentrando desde la cadena alifática, Figura 30-31 [5, 48, 51-52].

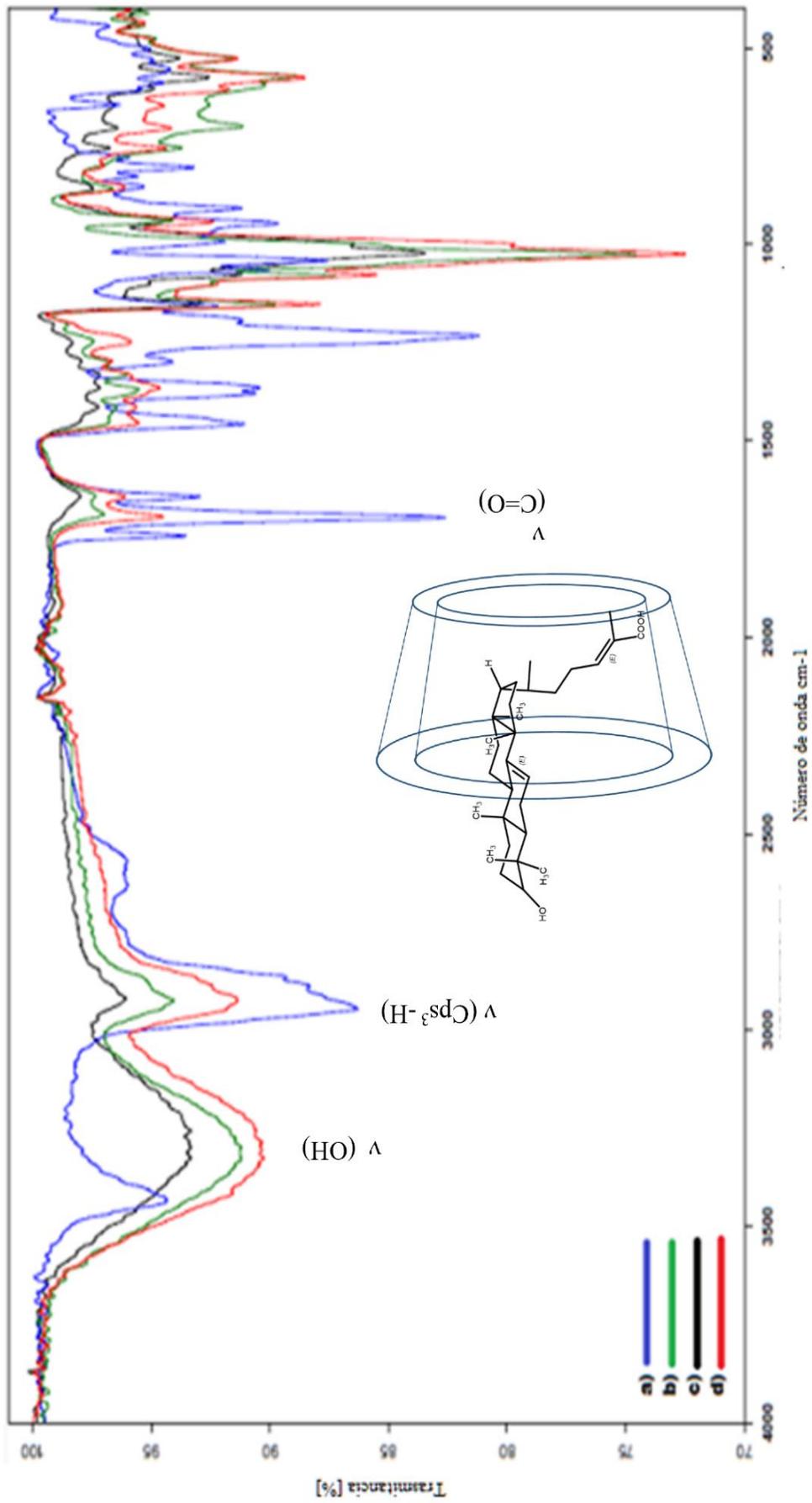


Figura 30. Espectros de IR: (a) Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2), (b) Complejo de inclusión obtenido mediante el método de Co-evaporación de 2/ β -CD, (c) β -CD y (d) Complejo de inclusión obtenido por mezcla física de 2/ β -CD [5].

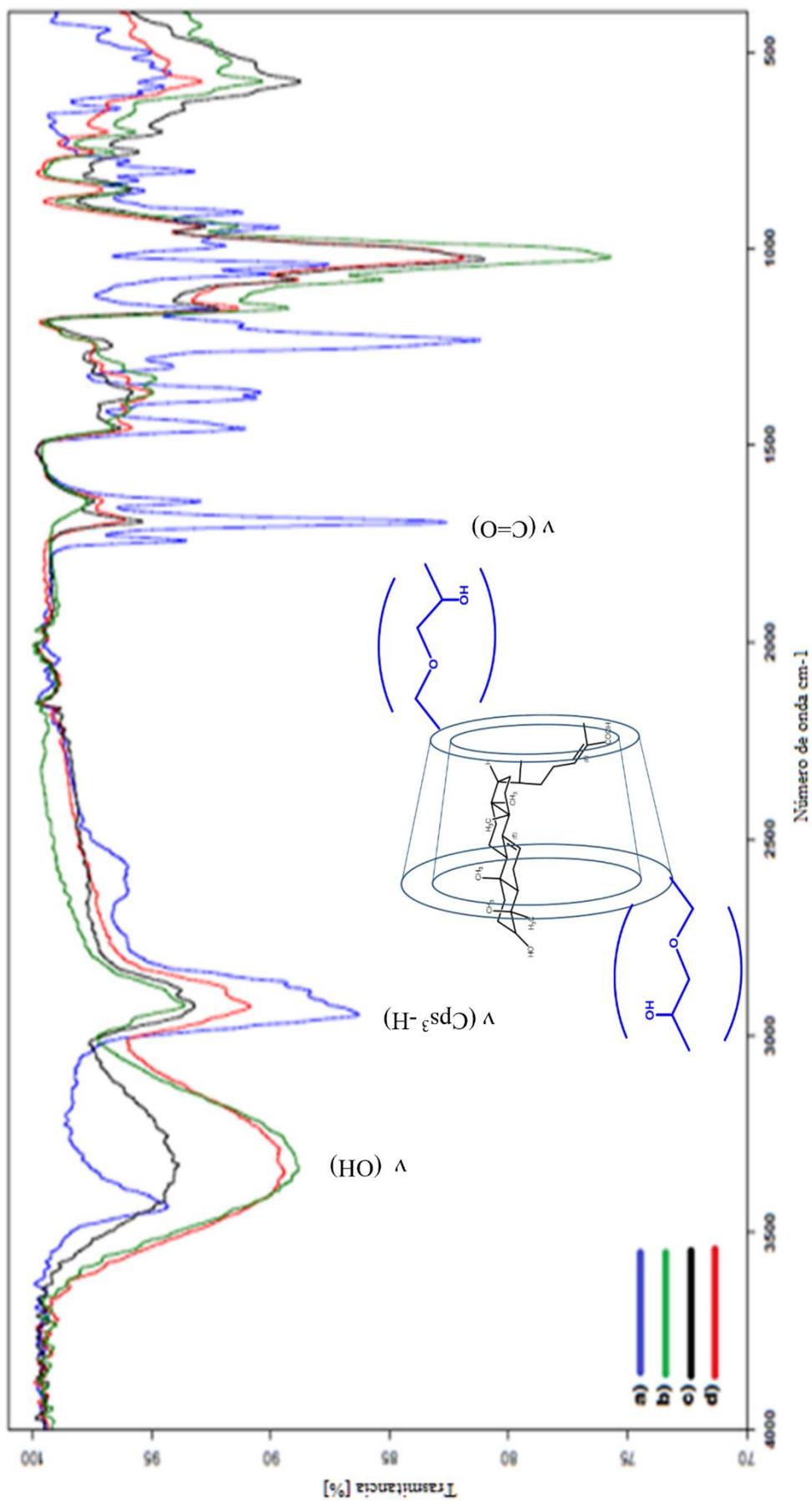


Figura 31. Espectros de IR: (a) Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2), (b) HP- β -CD, (c) Complejo de inclusión obtenido por mezcla física de 2/ HP- β -CD y (d) Complejo de inclusión obtenido mediante el método de Co-evaporación de 2/ HP- β -CD [5].

7.2.5. Caracterización por análisis calorimetría diferencial de barrido (CDB) y espectroscopía de IR de los complejos de inclusión de 2/ β -CD y 2/HP- β -CD por el método de Co-evaporación y mezcla física.

El análisis termogravimétrico (CDB) y espectroscopía de IR de las sustancias puras y los complejos de inclusión de **2** con dos ciclodextrinas — β -CD y HP- β -CD— obtenidas mediante método de molienda y de Co-evaporación de acuerdo con lo descrito en la literatura especializada [48,51-52]

Con base en el termogramas, se puede observar un pico endotérmico alrededor de los 150°C que corresponde al pf. de **2**; además de un pico endotérmico aproximadamente en 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 **2** en aproximadamente 150°C, indica que fue posible formar el complejo de **2** con la β -CD modificando las propiedades físicas de la sustancia huésped, Figura 32 [5].

En el termograma al cual pertenece al CI de **2**/HP- β -CD, se muestra para **2** un pico endotérmico alrededor de 150°C, donde se muestra el punto de fusión de **2**. Para HP- β -CD (línea b) se indica un pico endotérmico entre los 90-120°C, debido a la deshidratación de la HP- β -CD. Para la mezcla física (línea c), se observa el pico indicado a la deshidratación de HP- β -CD entre 90-120°C y la ausencia del pico endotérmico de **2** en 150°C, lo cual confirma la formación del complejo de inclusión de **2**/HP- β -CD, Figura 33 [5]. Finalmente, el termograma para el complejo de inclusión de **2**/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 **2** con HP- β -CD [5]

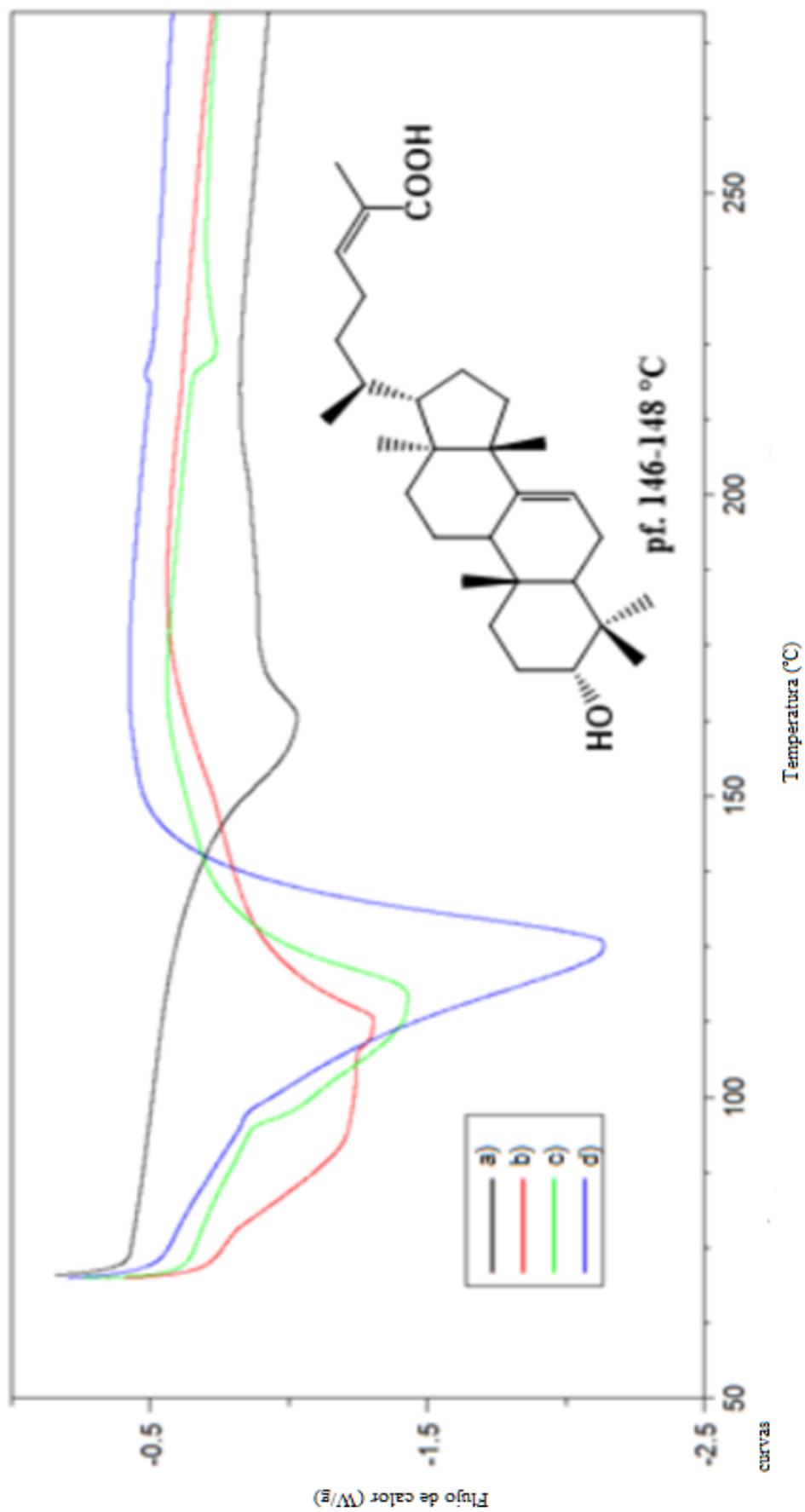


Figura 32. Termogramas: (a) Ácido 3 α -hidroximasticadienónico, (b) Complejo de inclusión por método de Co- evaporación, (c) Complejo de inclusión por mezcla física y (d) β -CD [5]

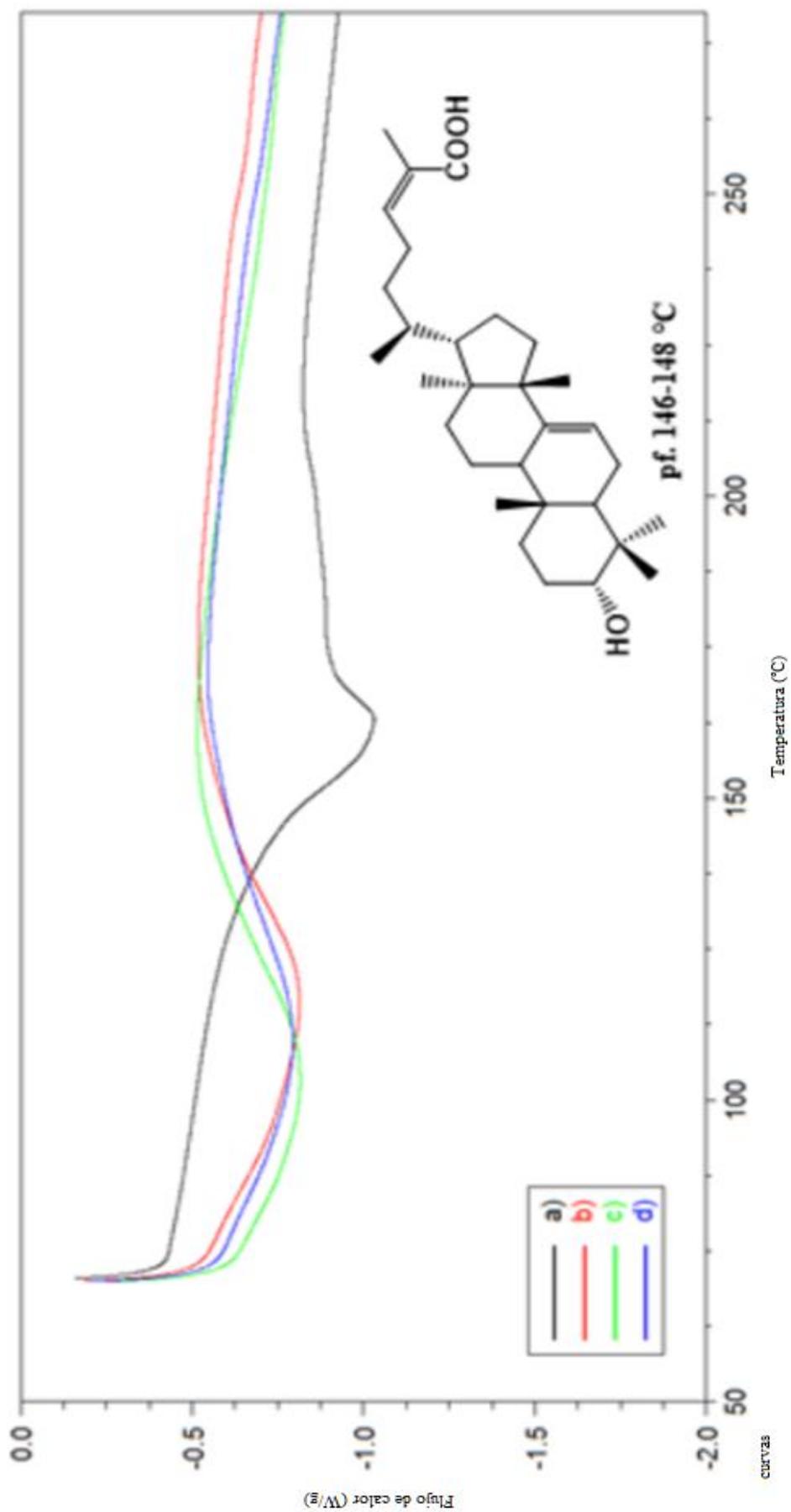


Figura 33. Termogramas de (a) Ácido 3 α -hidroximasticadienónico, (b) HP- β -CD, (c) Complejo de inclusión por mezcla física y (d) Complejo de inclusión por método de Co-evaporación [5].

7.3. Acoplamiento molecular del acetato de colesterilo (1) y del ácido 3 α hidroximasticadienónico (2) con β -CD y HP β -CD.

7.3.1. Datos de la conformación.

En la Tabla 7, se informa los valores de la energía de complejación, calculado por el proceso de acoplamiento molecular de **1** y **2** con respecto a las CD. Se encontró que todas las configuraciones optimizadas estaban asociadas con energía de unión del CI, lo que indica que ocurrió un proceso termodinámicamente favorable (valores negativos de Kcal/mol) [48].

Table 8. Energías de complejación (Kcal/mol) de 1/ β -CD, 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y 2/HP- β -CD.

Complejo de inclusión Proteína- ligando	Complejo de inclusión			CD	
	Energía de unión	Energía Intermolecular	Energía interna	Energía torsional	Energía de enlace
	(Kcal/mol)				
1/ β -CD	-6,68	-8,77	-1,04	2.09	-1,04
1/ β -CD	-6,33	-8,42	-1,05	2.09	-1,05
1/HP- β -C	-13.01	-15.1	-0.97	2.09	-0.97
1/HP- β -CD	-12.92	-15.0	-0.83	2.09	-0.83
2/ β -CD	-8.47	-10.55	-0.35	2.09	-0.35
2/ β -CD	-8.09	-10.18	-0.21	2.09	-0.21
2/HP- β -CD	-14.35	-16.43	-0.58	2.09	-0.58

7.3.2. Estructura de acoplamiento.

Basado en los datos de conformación, se seleccionaron las estructuras con base en las energías de unión e intermolecular más bajas. Los cuales corresponden a la conformación más estable. Sin embargo, la formación de los CI puede establecerse de manera termodinámica con una alta estabilidad, al igual que los criterios a evaluar del acoplamiento molecular, pero podría no aplicar para todo los CI ya que se forman los CI de manera cinética [48,50-52]. A continuación, se hace el análisis del acoplamiento molecular (1/ β -CD, 1/HP- β -CD, 2/ β -CD y 2/HP β -CD) de acuerdo con los datos obtenidos del análisis de espectroscopía de IR.

7.4. Análisis de acoplamiento molecular.

7.4.1. Acoplamiento molecular de 1/ β -CD.

El acoplamiento molecular sugiere la entrada de **1** (Figura 34a) a la cavidad hidrofóbica de la β -CD por el anillo A, ver Figura 34b. Observándose una torción de la cadena alifática a partir del C-18 de **1**, los cuales se pueden fundamentar por la interacción repulsiva entre la cadena con los grupos hidroxilos secundarios en las glucosa 2, 4 y 5. Se identificó las interacciones intermoleculares utilizando el programa Ligplot+ y Discovery Studio Visualizer, mostrando un interacción de puente de hidrógeno del metilen-hidroxi (-CH₂OH β_{ec}) de la glucosa 7 con el oxígeno carbonílico del grupo acetato de **1** —d=2.64 Å—, ver Figura 34c. Los parámetros de distancia y de interacción de enlace se agrupan en la Tabla 8.

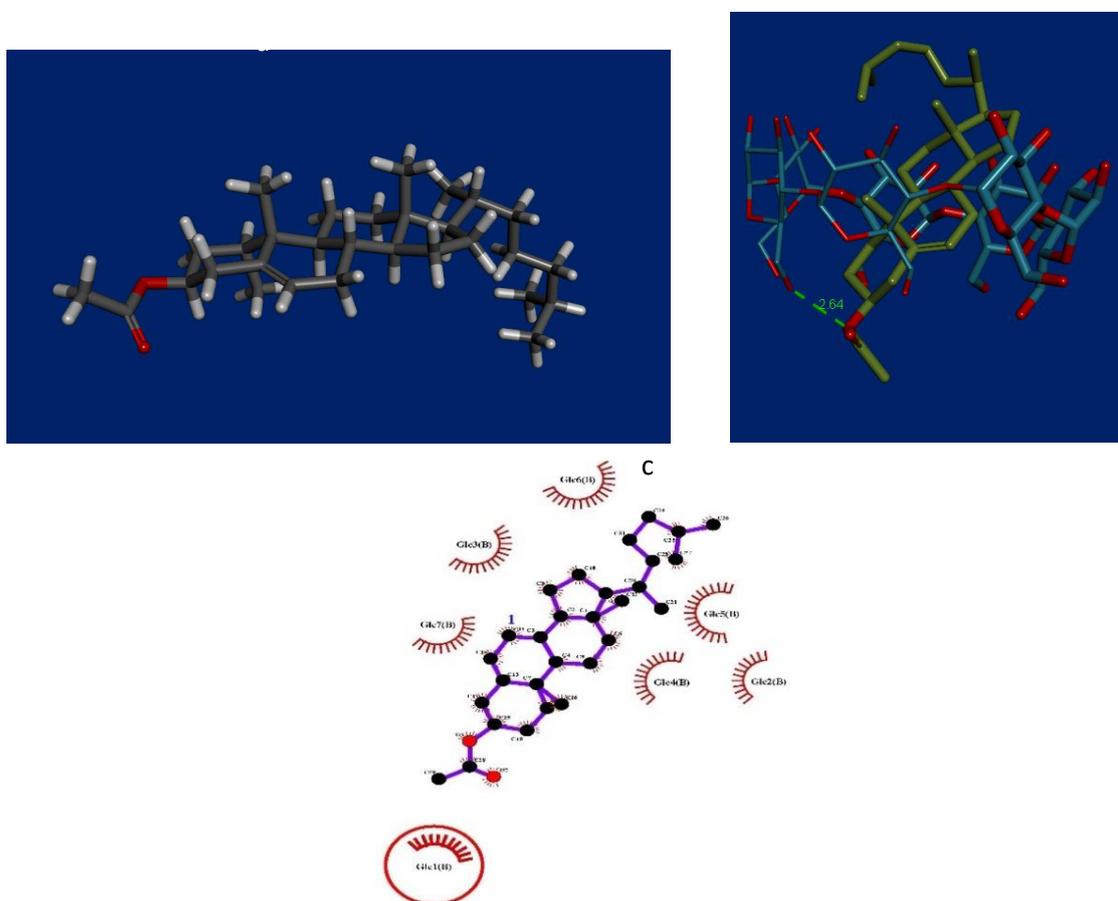


Figura 34. a) Acetato de colesterilo; b) Acoplamiento molecular de 1/ β -CD c) Diagrama 2D de interacción intermolecular de 1/ β -CD.

Table 9. Datos del complejo de inclusión y si interacciones de enlace y distancia en 1/ β -CD

Complejo	Tipo de enlace	Distancia (Å)	Átomo electronegativo
B ^b :GLC7:O6 - :UNK ^a 0:O	Enlace de hidrógeno	2,63804	H-aceptor

^aUnk:húésped; ^bB:GLC: β -D-glucopiranososa

7.4.2. Acoplamiento molecular de 1/HP-β-CD.

El acoplamiento molecular en la formación del CI de **1** se inserta desde la cadena alifática de **1** –de manera contraria a la formación de **1**/β-CD– en la cavidad hidrofóbica de la HP-β-CD, ver Figura 35a. En el análisis con el programa Ligplot+ y Discovery Studio Visualizer, se mostró la distancia entre el grupo carbonilo del acetato con los hidrógenos del metilo de la HP-β-CD –d= 3,02 Å y 3,05Å —, ver Figura 35b; además, sugiriendo interacciones no enlazantes entre la CD y **1** por parte de la cadena alifática, ver Figura 35c, conjunto de datos de interacción, ver Tabla 9.

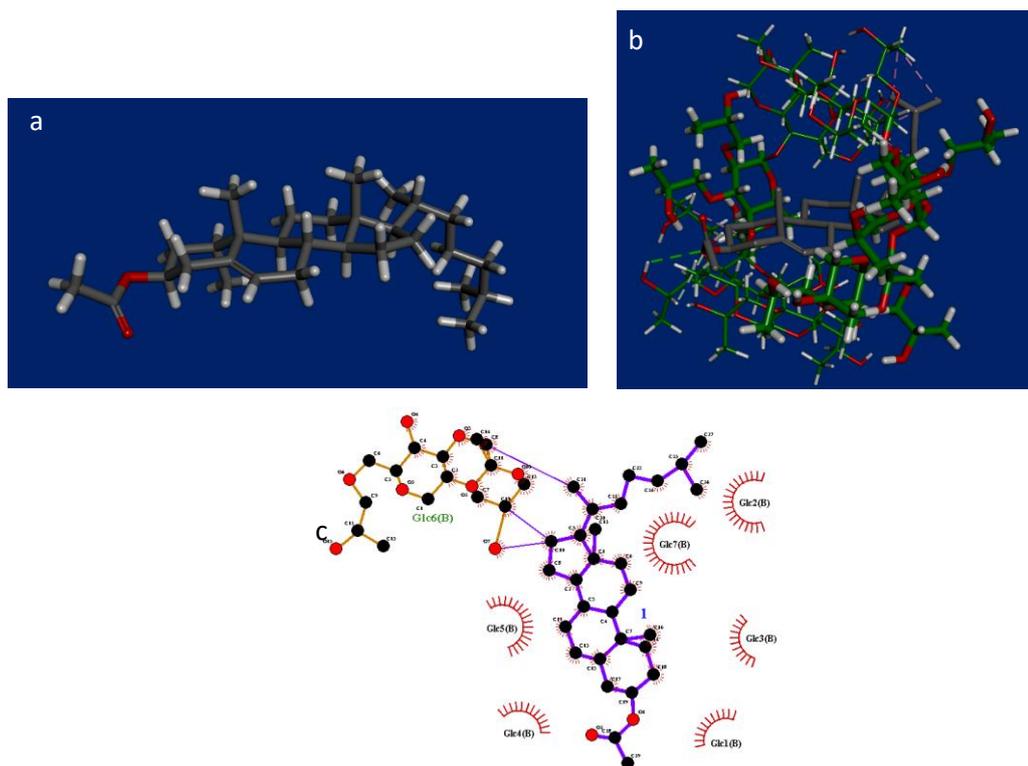


Figura 35. a) Acetato de colesterilo (**1**), b) Acoplamiento molecular de **1**/HP-β-CD, c) Diagrama 2D de interacción intermolecular de **1**/HP-β-CD.

Table 10. Datos del complejo de inclusión y si interacciones de enlace y distancia en **1**/HP-β-CD.

Complejo	Tipo de enlace	Distancia (Å)	Átomo electronegativo
B:GLC5:H27 - :UNK0:O	Enlace de hidrógeno	3,02699	H-donador
B:GLC5:H11 - :UNK0:O	Enlace de hidrógeno	3,05943	H-donador
:UNK0:C - B:GLC2:C14	Hidrofóbico	3,07621	Alquilo
:UNK0:C - B:GLC3:C15	Hidrofóbico	3,08103	Alquilo
:UNK0:C - B:GLC2:C14	Hidrofóbico	4,00206	Alquilo
:UNK0:C - B:GLC3:C15	Hidrofóbico	4,48194	Alquilo
B:GLC3:C15 - :UNK0	Hidrofóbico	3,81954	Alquilo
B:GLC5:C9 - :UNK0	Hidrofóbico	5,32641	Alquilo

^aUnk:húesped; ^bB:GLC: β-D-glucopiranososa.

7.4.3. Acoplamiento molecular de 2/ β -CD.

En la formación del acoplamiento molecular de **2** con β -CD muestra una introducción de la cadena alifática a la cavidad de la CD. En las interacciones intermoleculares que señala el programa Ligplot+ y Discovery Studio Visualizer, indica puentes de hidrógeno en el oxígeno de la glucopiranososa-1 con el hidroxilo del C-3 de **2** y una interacción del grupo carbonilo de la cadena alifática con el metilen-hidroxi (-CH₂OH β_{ec}) de las glucosas 7 y 1 de la β -CD —d= 3.67 y 2.76 Å—, ver Tabla 10. y una rotación de la cadena alifática, ver Figura 36.

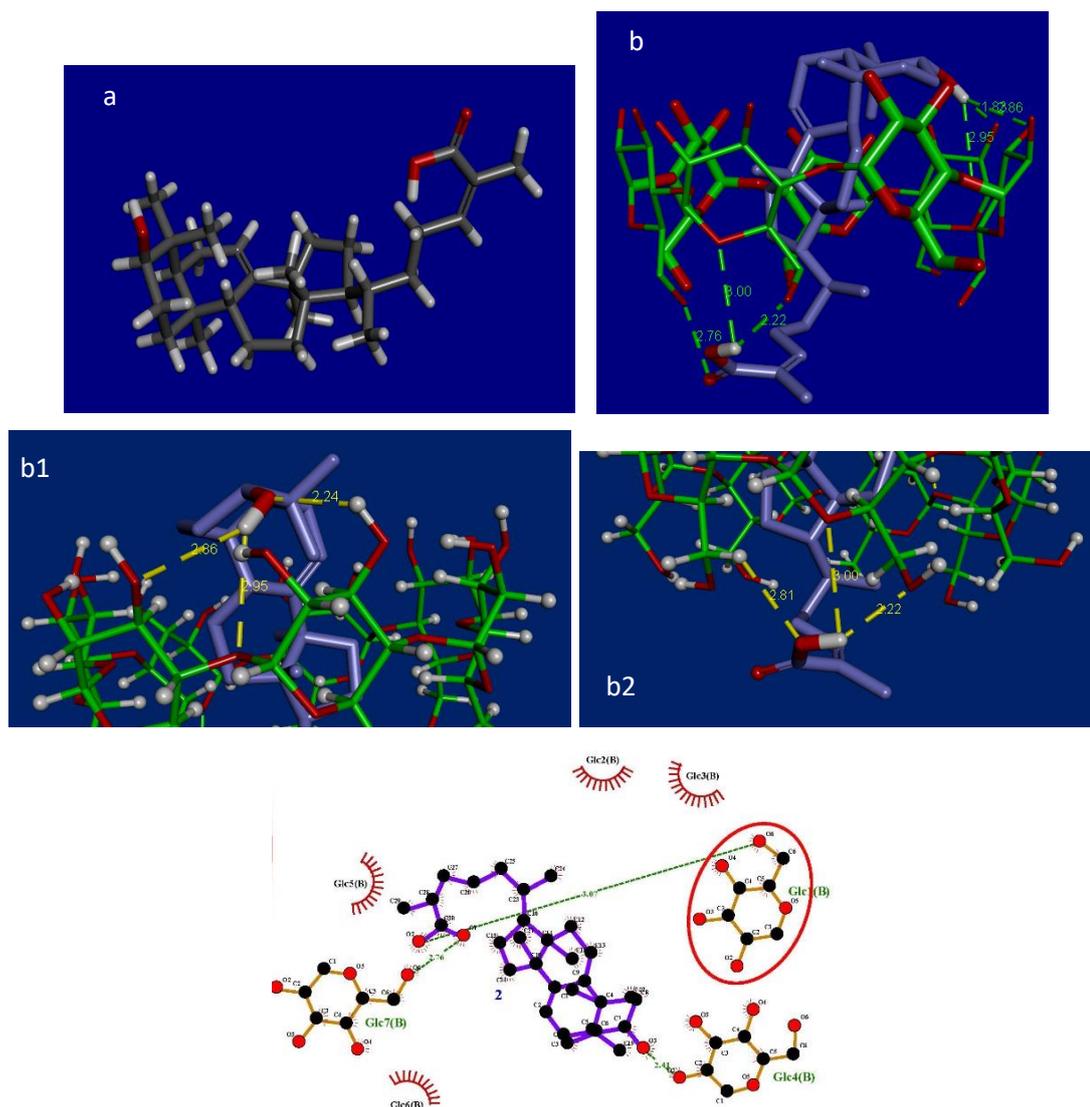


Figura 36 . a) ácido 3 α hidroximasticadienónico (**2**), b) Acoplamiento molecular de **2**/ β -CD b) Diagrama 2D de interacción intermolecular de **2**/ β -CD.

Table 11. Datos del complejo de inclusión y si interacciones de enlace y distancia en **2**/ β -CD.

Complejo	Tipo de enlace	Distancia (Å)	Átomo electronegativo
UNK1 ^a :H04 - B:GLC1 ^b :O5	Enlace de hidrógeno	:UNK1:H04	H-Donor
UNK1:H04 - B:GLC1:O6	Enlace de hidrógeno	:UNK1:H04	H-Donor
UNK1:H - B:GLC3:O3	Enlace de hidrógeno	:UNK1:H	H-Donor
UNK1:H - B:GLC3:O4	Enlace de hidrógeno	:UNK1:H	H-Donor

^aUnk:húésped; ^bB:GLC: β -D-glucopiranososa.

7.4.4. Acoplamiento molecular de **2**/HP- β -CD.

En el acoplamiento molecular de **2** con HP- β -CD, se muestra que se inserta a la CD a partir de la cadena alifática de **2**, ver Figura 37b. Se indica interacciones de efecto estérico al grupo hidroxilo del C-3 de **2** con el H del C-1 del grupo 2-hidroxipropil y el H del C-3 la glucopiranososa 2—d= 2.02 y 1.5 Å—, ver Tabla 11. Mientras en el programa Ligplot presenta interacciones no enlazantes tipo hidrofóbico, ver Figura 35c.

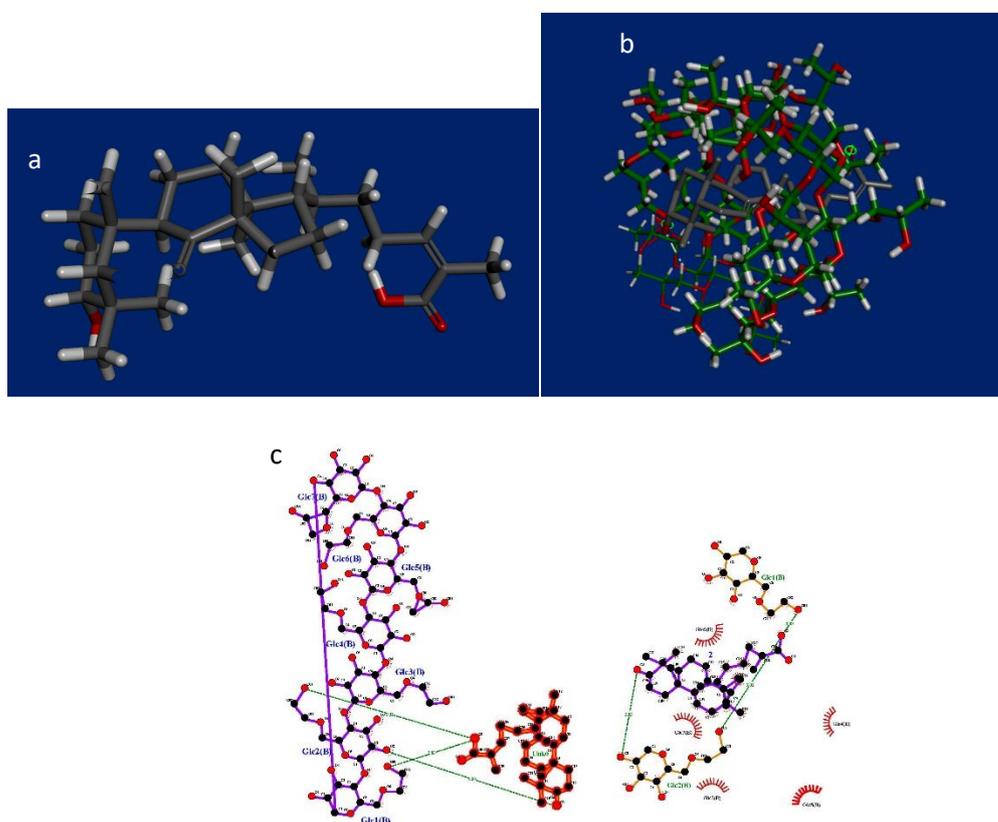


Figura 37. a) ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**), b) Acoplamiento molecular de **2**/HP- β -CD c) Diagrama 2D de interacción intermolecular de **2**/HP- β -CD.

Table 12. Datos del complejo de inclusión y si interacciones de enlace y distancia en **2**/HP- β -CD.

Complejo	Tipo de enlace	Distancia (Å)	Interacción intermolecular
:UNK1:O - B:GLC2:C1	No enlace no favorable	2,02377	Estético
:UNK1:H - B:GLC2:C1	No enlace no favorable	1,5013	Estético

^aUnk:húésped; ^bB:GLC: β -D-glucopiranososa; ^cN/E: No especificado.

VIII. CONCLUSIONES.

- La biotransformación del acetato de colesterilo (**1**) y ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**) procedieron con bajos rendimientos, razón por la cual se implementó la obtención de los complejos de inclusión (CI) de ambas sustancias con dos ciclodextrinas diferentes (β -CD y HP- β -CD).
- Dichos complejos se obtuvieron mediante los métodos de mezcla física y Co-evaporación (**1**/ β -CD, **1**-HP- β CD, **2**/ β -CD y **2**/HP- β -CD).
- De los métodos ensayados se sugiere el método de Co-evaporación, debido a que se obtiene mejores rendimientos.
- La identificación en la formación de los CI se logró por medio de espectroscopía de IR y métodos termogravimétricos CDB.
- La relación estequiométrica sustrato (**1** y **2**) con CD (β -CD y HP- β -CD), se determinó por medio del docking molecular, sugiriendo que la relación es 1:1.
- Como primera aproximación la formación de los CI para **1**/ β -CD, sugiere, que el acetato de colesterilo se aloja en la cavidad de la β -CD por medio del anillo A; mientras la formación del **1**/HP- β -CD se da por la entrada de la cadena alquílica.
- Para los CI de **2** con β -CD y HP- β -CD, se sugiere, que **2** se aloja en la cavidad de ambas CD por la cadena alquílica localizada en el C-17.

8.1. Sugerencia

- Se debe continuar con la biotransformación de los complejos de inclusión (CI) obtenidos.
- Para apoyar la formación de los CI, se requieren de la obtención de la Difracción de Rayos X de los CI del acetato de colesterilo (**1**).
- Para apoyar los resultados obtenidos del docking molecular, se sugiere realizar los estudios de los análisis espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H y ^{13}C). Centrándose en los datos que se deriven de la técnica ROESY.
- Determinar la constante de estabilidad de los CI, por métodos de Análisis Termogravimétrico.

IX. BIBLIOGRAFIA.

1. Reguig, F. H.; Bouyacoub, A.; Krallafa, A.; Bormann, D.; Bresson, S.; Khelifa, B., Proton transfer mechanisms and structural changes in the cholesteryl acetate. *Comput. Mater. Sci.*, **1999**, *15*, 113-117.
2. Sjöström, B.; Bergenstahl, B., Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int. J. Pharm.*, **1992**, *88*, 53-62.
3. Donova, M., Microbiotechnologies for steroid production. *Microbiol. Aust.*, **2018**, *39*, 126-129.
4. Baker, M., Origin and diversification of steroids: Co-evolution of enzymes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2011**, *334*, 14–20.
5. Adame Rosas Omar Fernando. Obtención de los complejos de inclusión del ácido 3 α -hidroximasticadienónico con ciclodextrinas y su biotransformación con diferentes hongos. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM, **2016**, 1-86.
6. Thimmappa, R.; Geisler, K.; Louveau, T.; O'Maille, P.; Osbourn, A., Triterpene biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2014**, *65*, 225-257.
7. Cid-Samamed, A.; Rakmai, J.; Mejuto, J. C.; Simal-Gandara, J.; Astray, G., Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques, and food industry applications. *Food Chem.*, **2022**, 132467.
8. Budwar, V., Cyclodextrin complexes: An approach to improve the physicochemical properties of drugs and applications of cyclodextrin complexes. *Asian J. Pharm.*, **2018**, *12*, S394-S409.
9. Roglič, U.; Žnidaršič-Plazl, P.; Plazl, I., The influence of β -cyclodextrin on the kinetics of progesterone transformation by *Rhizopus nigricans*. *Biocatal. Biotransformation*, **2005**, *23*, 299-305.
10. Davis, M. E.; Brewster, M. E., Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present, and future. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2004**, *3*, 1023-1035.
11. Do Thi, T.; Nauwelaerts, K.; Froeyen, M.; Baudemprez, L.; Van Speybroeck, M.; Augustijns, P.; Van Den Mooter, G., Comparison of the Complexation between Methylprednisolone and Different Cyclodextrins in Solution by ¹H-NMR and Molecular Modeling Studies. *J. Pharm. Sci.*, **2010**, *99*, 3863–3873.
12. Carneiro, S. B.; Costa Duarte, F. Í.; Heimfarth, L.; Siqueira Quintans, J. D. S.; Quintans-Júnior, L. J.; Veiga Júnior, V. F. D.; Neves de Lima, Á. A., Cyclodextrin–drug inclusion complexes: In vivo and in vitro approaches. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, *20*, 642.
13. Pinho, E.; Grootveld, M.; Soares, G.; Henriques, M., Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.*, **2014**, *101*, 121-135.

14. Christoforides, E.; Papaioannou, A.; Bethanis, K., Crystal structure of the inclusion complex of cholesterol in β -cyclodextrin and molecular dynamics studies. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2018**, *14*, 838-848.
15. Forgo, P.; Göndös, G., A study of β -cyclodextrin inclusion complexes with progesterone and hydrocortisone using rotating frame Overhauser spectroscopy. *Monatsh. fur Chem*, **2002**, *133*, 101-106.
16. Yáñez, C.; Basualdo, J.; Jara-Ulloa, P.; Squella, J.A., Inclusion complexes of estrone and estradiol with β -cyclodextrin: Voltammetric and HPLC studies. *J. Phys. Org. Chem.*, **2007**, *20*, 499-505.
17. Quintans, J. S.; Pereira, E. W.; Carvalho, Y. M.; Menezes, P. P.; Serafini, M. R.; Batista, M. V.; Quintans-Júnior, L. J., Host-guest inclusion complexation of β -cyclodextrin and hecogenin acetate to enhance anti-hyperalgesic effect in an animal model of musculoskeletal pain. *Process Biochem.*, **2017**, *59*, 123-131.
18. Rossi, A. L.; Rosso, A. M.; Rustoy, E. M.; Cases, G., Preparation and physicochemical characterization of inclusion complexes derived from phytosterols and β -cyclodextrin. *Lett. Org. Chem.*, **2019**, *16*, 145-159.
19. Rinaldi, L.; Binello, A.; Stolle, A.; Curini, M.; Cravotto, G., Efficient mechanochemical complexation of various steroid compounds with α -, β - and γ -cyclodextrin. *Steroids*, **2015**, *98*, 58-62.
20. Buko, V.; Zavodnik, I.; Palecz, B.; Stepniak, A.; Kirko, S.; Shlyahtun, A.; Rakhmadiyeva, S., Betulin/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Physicochemical characterization and hepatoprotective activity. *J. Mol. Liq.*, **2020**, *309*, 113118.
21. Sursyakova, V. V.; Levdansky, V. A.; Rubaylo, A. I., Determination of binding constants for strong complexation by affinity capillary electrophoresis: the example of complexes of ester betulin derivatives with (2-hydroxypropyl)- γ -cyclodextrin. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2020**, *412*, 5615-5625.
22. de Carvalho, L. B.; Burusco, K. K.; Jaime, C.; Venâncio, T.; de Carvalho, A. F. S.; Murgas, L. D. S.; Pinto, L. D. M. A.; Bragança, L., Complexes between methyltestosterone and β -cyclodextrin for application in aquaculture production. *Carbohydr. Polym.*, **2018**, *179*, 386-393
23. Häkkinen, S.; Nygren, H.; Maiorova, N.; Haavikko, R.; Alakurtti, S.; Yli-Kauhaluoma, J.; Rischer, H.; Oksman-Caldentey, Kirsi-Marja., Biotransformation of cyclodextrine-complexed semisynthetic betulin derivatives by plant cells. *Planta Med.*, **2018**, *84*, 743-748.

24. dos Santos, C.; Buera, P.; Mazzobre, F., Novel trends in cyclodextrins encapsulation, Applications in food science. *Curr. Opin. Food Sci.*, **2017**, *16*, 106-113.
25. Sambyal, K.; Singh, R. V., Production aspects of testosterone by microbial biotransformation and future prospects. *Steroids*, **2020**, *159*, 108651.
26. Tong, W. Y.; Dong, X., Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. *Recent. Pat. Biotechnol.*, **2009**, *3*, 141-153.
27. Sedlacek, L.; Smith, LL., Biotransformations of steroids. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **1988**, *7*, 187-236.
28. Nassiri-Koopaei, N.; Faramarzi, M. A., Recent developments in the fungal transformation of steroids. *Biocatal. Biotransformation*, **2015**, *33*, 1-28.
29. Durairaj, P., Hur, J. S., & Yun, H. Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microb. Cell Factories*, **2016**, *15*, 1-16.
30. Urlacher, V. B., Eiben, S., Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.*, **2006**, *24*, 324-330.
31. Bennett, J. W., Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.*, **1998**, *66*, 101-107.
32. Ye, M. y Guo, D. Substrate specificity for the 12 β -hydroxylation of bufadienolides by *Alternaria alternata*. *J. Biotechnol.*, **2005**, *117*, 253-262
33. Ye, M.; Qu, G.; Guo, H.; Guo, D., Specific 12 β -hydroxylation of cinobufagin by filamentous fungi. *Appl Environ Microbiol.*, **2004**, *70*, 3521-3527.
34. Parshikov, I. A.; Sutherland, J. B., Biotransformation of steroids and flavonoids by cultures of *Aspergillus niger*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2015**, *176*, 903-923.
35. Hosseinabadi, T.; Vahidi, H.; Nickavar, B.; Kobarfard, F., Biotransformation of progesterone by whole cells of filamentous fungi *Aspergillus brasiliensis*. *Iran. J. Pharm. Sci.*, **2015**, *14*, 919.
36. Świzdor, A.; Kołek, T.; Panek, A.; Białońska, A., Microbial Baeyer–Villiger oxidation of steroidal ketones using *Beauveria bassiana*: presence of an 11 α -hydroxyl group essential to generation of D-homo lactones. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.*, **2011**, *1811*, 253-262.
37. Huszcza, E.; Dmochowska-Gładysz, J.; Bartmańska, A., Transformations of steroids by *Beauveria bassiana*. *Zeitschrift für Naturforschung C.*, **2005**, *60*, 103-108.
38. Varga, J., Kocsube, S., Toth, B., Frisvad, J. C., Perrone, G., Susca, A.; Samson, R. A., *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *Int. J. Syst. Evol.*, **2007**, *57*, 1925-1932.
39. Kollerov, V. V.; Shutov, A. A.; Kazantsev, A. V.; Donova, M. V., Biocatalytic modifications of pregnenolone by selected filamentous fungi. *Biocatal. Biotransformation*, **2019**, *37*, 319-330.

40. Cid-Samamed, A.; Rakmai, J.; Mejuto, J. C.; Simal-Gandara, J.; Astray, G., Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques, and food industry applications. *Food Chem.*, **2022**, 132467.
41. Kollerov, V.; Shutov, A.; Kazantsev, A.; Donova, M., Hydroxylation of pregnenolone and dehydroepiandrosterone by zygomycete *Backusella lamprospora* VKM F-944: selective production of 7 α -OH-DHEA. *Appl. Microbiol Biotechnol*, **2022**, *106*, 535-548.
42. Tang, R.; Shen, Y.; Wang, M.; Zhou, H.; Zhao, Y., Highly efficient synthesis of boldenone from androst-4-ene-3, 17-dione by *Arthrobacter simplex* and *Pichia pastoris* ordered biotransformation. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2019**, *42*, 933-940.
43. Kollerov, V. V.; Fokina, V. V.; Sukhodolskaya, G. V.; Shutov, A. A.; Donova, M. V., 11 β -Hydroxylation of 6 α -fluoro-16 α -methyl-deoxycorticosterone 21-acetate by filamentous fungi. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **2015**, *51*, 169-179.
44. Suvarna, V.; Kajwe, A.; Murahari, M.; Pujar, G. V.; Inturi, B. K.; Sherje, A. P., Inclusion complexes of nateglinide with HP- β -CD and L-arginine for solubility and dissolution enhancement: preparation, characterization, and molecular docking study. *J. Pharm. Innov.*, **2017**, *12*, 168-181.
45. Chen, Y. C., Beware of docking. *Trends Pharmacol Sci*, **2015**, *36*, 78-95
46. Yu, Y. L.; Du, H. Y.; Zhang, J. H., Self-assembly of novel cholesterol derivative based on hydrogen bond. *J. Mol. Struct.*, **2011**, *1005*, 107-112.
47. Rudrangi, S. R. S.; Bhomia, R.; Trivedi, V.; Vine, G. J.; Mitchell, J. C.; Alexander, B. D.; Wicks, S. R., Influence of the preparation method on the physicochemical properties of indomethacin and methyl- β -cyclodextrin complexes. *Int. J. Pharm.*, **2015**, *479*, 381-390.
48. Lin, Z. Y.; Liu, Y. X.; Kou, S. B.; Wang, B. L.; Shi, J. H., Characterization of the inclusion interaction of ethinyloestradiol with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Multi-spectroscopic and molecular modeling methods. *J. Mol. Liq.*, **2020**, *311*, 113290.
49. Velásquez, M.; Drosos, J.; Gueto, C.; Márquez, J.; Vivas-Reyes, R., Autodock-PM6 method to choose the better pose in molecular docking studies. *Rev. Colomb. Quim.*, **2013**, *42*, 101-124.
50. Goheen, S. C.; Lis, L. J.; Kauffman, J. W., Structural studies of cholesteryl acetate-phosphatidylcholine complexes. *Chem. Phys. Lipids*, **1977**, *20*, 253-262.
51. Ailincal, D.; Marin, L., Eco-friendly PDLC composites based on chitosan and cholesteryl acetate. *J. Mol. Liq.*, **2021**, *321*, 114466.
52. Williams III, R. O.; Mahaguna, V.; Sriwongjanya, M., Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Eur J Phram Biopharm*, **1998**, *46*, 355-360.