



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

BIOTRANSFORMACION DE ACIDO FERULICO Y EUGENOL CON CULTIVOS DE CELULAS VEGETALES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA



MEXICO, D. F.

2001

297705



LIBRERIA FACULTAD DE QUIMICA



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.

Jurado Asignado:

Presidente: Prof. Rafael Castillo Bocanegra
Vocal: Prof. Agustín López-Munguía Canales
Secretario: Prof. Arturo Navarro Ocaña
1er. Suplente: Profa. Amanda Gálvez Mariscal
2do. Suplente: Prof. Francisco Ruíz Terán

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorios 314 y 321 del departamento de Biotecnología y Alimentos, conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

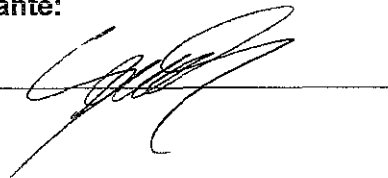
Nombre completo y firma del asesor del tema:

Dr. Arturo Navarro Ocaña

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Arturo Navarro Ocaña', written over a horizontal line.

Nombre completo y firma del sustentante:

C. Sergio Andrés Alatorre Santamaría

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sergio Andrés Alatorre Santamaría', written over a horizontal line.

Agradecimientos

A Paola, por todo el tiempo vivido y el espacio compartido. Por ser ese gran apoyo que siempre necesité.

A Arturo, por guiarme en el sendero de la investigación, pero más por su amistad y su paciencia.

A Pancho, por las risas, las bromas y el debate. Por aguantar la música y las horas de computadora.

A todos y todas con los que conviví en la facultad y en los laboratorios 314, 321 y ("El Escuadrón") 201 de Orgánica.

A OHMS, porque a pesar de todo fuimos los hermanos que nunca tuvimos.

A mis "hermanos de sangre": Pedro, Emiliano, Bonome, Saúl y Cintia.

A LOGOS, por ser una parte esencial de mi vida y ayudar a forjar a la persona que soy ahora.

A la fac, porque en ella aprendí a estudiar y a conocer la vida.

A la mejor universidad que hay en el país, la U.N.A.M. Una goya por tí...

...Y a todas y todos los que no mencioné, también.

Agradecimientos especiales

A Sandra y a Julieta, por el apoyo y el soporte técnico.

Al Dr. Eduardo Bärzana, por permitirme trabajar en su laboratorio.

Al laboratorio de Cultivos de tejidos Vegetales por proporcionarnos los biocatalizadores.

A la DGAPA por el apoyo brindado a la realización de este trabajo, mediante el proyecto PAPIIT-IN209300.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios para la corrección del texto.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	6
Biotransformaciones	
Biotransformaciones con CCV	
Monoterpenos	
Ácido ferúlico	
Eugenol	
Peroxidasas	
Objetivos	24
Objetivo general	
Objetivos particulares	
Materiales y Métodos	25
Equipos	
Plan de trabajo	
Sustratos	
Biocatalizadores	
Medios de cultivo	
Mantenimiento de las líneas celulares	
Homogenizado de CCV	
Biotransformación	
Extracción de productos	
Purificación de productos	
Testigos	
Espectroscopía	
Sustratos	
Productos	
Resultados	36
Biotransformación del ácido ferúlico	
Biotransformación del eugenol	
Elaboración de testigos	
Perspectivas	

RESUMEN

Las biotransformaciones con cultivos de células vegetales (CCV) para producir compuestos de interés industrial se han presentado como una alternativa a los métodos tradicionales de síntesis de diversos compuestos. En el campo de los aditivos alimentarios representa una forma "natural" de sintetizarlos.

Existen diversos métodos para realizar ensayos de biotransformación con CCV, siendo uno de los más importantes la adición de un compuesto (ya sea de origen natural o sintético) que pueda servir de sustrato a las enzimas contenidas en los CCV.

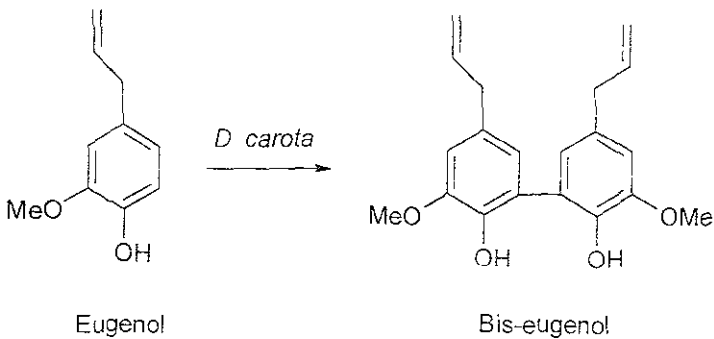
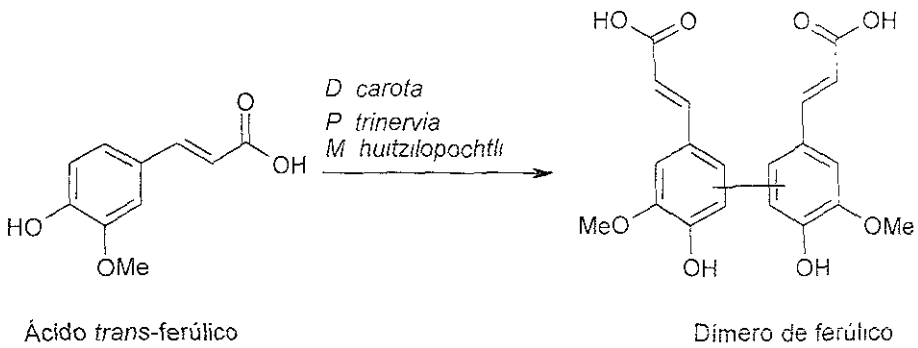
Dentro del campo de los aditivos (tanto alimentarios como farmacéuticos, principalmente como conservadores) destacan los antioxidantes. Dentro de este grupo tenemos al ácido ferúlico y al eugenol, que de entre sus diversas propiedades (Onihara et al, 1992, Rosazza et al, 1995, Madhavi et al., 1997, Couteau y Mathaly, 1998) se destaca su utilización como antioxidantes naturales. Así mismo, estudios recientes (Ogata et al, 2000; Williamson et al, 1999) muestran que los dímeros específicos que forman estos compuestos poseen una mayor capacidad antioxidante que los monómeros.

En el presente estudio, se evaluaron distintos CCV (*Daucus carota L.*, *Piqueria trinervia Cav.*, *Mammillaria huitzilopochtli* y *Nicotiana tabacum*) para la biotransformación de ácido ferúlico y eugenol a sus dímeros, con mayor potencial antioxidante que estos.

Se trabajó con cultivos en callo (homogenizados) de *Piqueria trinervia Cav.*, *Mammillaria huitzilopochtli*, *Nicotiana tabacum*, y con cultivos en suspensión (homogenizados y sin homogenizar) de *Daucus carota L.* y *Piqueria trinervia Cav.* El medio de cultivo estándar fue el medio MS (Murashige-Skoog), adicionado con diferentes hormonas (ANA, BAP, 2,4-D), la única diferencia entre el medio líquido y el sólido fue la adición de un agente gelificante, como el agar.

Se lograron obtener, aislar y purificar los dímeros producto de la biotransformación. En el caso del diferulato, los CCV que dieron mejor resultado fueron los cultivos en callo (homogenados) de *Piqueria trinervia* Cav. y *Mammillaria huitzilopochtli*. En el caso del bis-eugenol, el cultivo en suspensión de *Daucus carota* L. resultó ser el de mejor rendimiento.

En ambos casos se les realizaron pruebas de actividad antioxidante a los productos para comprobar que la presentaban.



INTRODUCCIÓN

Los derivados químicos producidos por los organismos vivos (desde los microorganismos hasta organismos superiores, como las plantas), han sido de gran importancia para la humanidad. Productos tan diversos como medicamentos, insecticidas, saborizantes, colorantes, fragancias y alimentos, son obtenidos a partir de ellos. Además de ser fuente de los compuestos mencionados, las características intrínsecas que los organismos presentan brindan la oportunidad de utilizarlos como catalizadores en la síntesis de otros compuestos que no estén presentes en ellos. Los productos derivados de las plantas, por ejemplo, han sido objeto de diversos estudios, ya que diversos factores, como lo son, climáticos, ecológicos, socio-económicos y de disponibilidad, afectan la obtención de los compuestos que resultan de interés. Es aquí donde surgen como opción las biotransformaciones; buscando las rutas sintéticas adecuadas y aprovechando la maquinaria enzimática de las células, para mejorar los rendimientos y eliminar la dependencia de la fuente natural. Otro factor a considerar es la conveniencia de trabajar con condiciones de temperatura y pH fisiológicos, lo cual representa una ventaja con respecto a las técnicas tradicionales de síntesis química. Una característica de la técnica de las biotransformaciones que se ha aprovechado es la capacidad catalítica de las enzimas para sintetizar compuestos que no se encuentren normalmente en las células o compuestos nuevos.

El uso de métodos biocatalíticos para la producción de compuestos utilizados en la industria de la química y en particular, en la producción de aditivos para alimentos (saborizantes, antioxidantes y colorantes) ha logrado grandes avances en épocas recientes. Desarrollados inicialmente para producir compuestos quirales para la industria farmacéutica, los procesos biocatalíticos o biotransformaciones se han convertido en una herramienta dentro de la química sintética, principalmente debido a que se realizan transformaciones químicas de manera regio, químic y estereoselectiva y, por lo regular, se llevan a cabo a

temperatura y pH fisiológicos. Así, el uso coordinado de la química sintética con material biológico es un área de gran impacto dentro de la química orgánica y la biotecnología, ya que involucra los complejos enzimáticos como reactivos en una reacción dejando una amplia gama de opciones para producir nuevos compuestos.

A pesar de que aún no se ha logrado desarrollar al nivel de la fermentación industrial (la cual requiere de un menor tiempo de trabajo, ya que el crecimiento de bacterias y hongos es más rápido), la tecnología que resulta de combinar cultivos de células vegetales (CCV) con la síntesis química puede producir las rutas sintéticas que provean estos compuestos. Además de las ventajas de trabajo ya mencionadas (pH y temperaturas fisiológicas), la biotransformación con CCV provee el control de parámetros que afectan el rendimiento y la calidad de los productos, haciéndolos homogéneos. Tampoco se puede dejar a un lado los datos que indican que en los últimos años ha habido un incremento en las preferencias de los consumidores hacia productos de origen natural (Sahai, 1994).

El aumento en el consumo de productos de origen natural (esencias, saborizantes, antioxidantes) ha traído como consecuencia una sobreexplotación de recursos naturales. Es aquí donde surge la alternativa de las biotransformaciones con CCV: adicionando sustratos, ya sean naturales o sintéticos, y aprovechando los sistemas enzimáticos intrínsecos de los vegetales para producir los compuestos de interés. Una ventaja que presentan estas biotransformaciones es que se pueden obtener compuestos que no se encuentren de manera natural en las plantas, gracias a los diversos grupos de enzimas presentes en ellos.

Un grupo de enzimas que se ha estudiado en los últimos años dentro del campo de las biotransformaciones con CCV son las peroxidasas, ya que se utilizan en la síntesis de compuestos con actividad antioxidante, los cuales están presentes en nutracéuticos y medicamentos que sirven para controlar procesos asociados al envejecimiento, los cuales han tenido un gran auge en los últimos años.

Dentro de su uso en la biosíntesis de compuestos con actividad antioxidante, es aprovechada una de las características más importantes que posee este grupo de enzimas: catalizar el acoplamiento orto-oxidativo (dimerización) de compuestos fenólicos entre los que están los flavonoides y los fenilpropanoides, los cuales son conocidos antioxidantes naturales. Aunado a esto, estudios recientes (Ogata et al, 2000, Williamson et al, 1999) muestran que los dímeros del ácido ferúlico y del eugenol poseen un poder antioxidante mayor que el de los monómeros, por lo que, en este estudio se presentan los resultados de la biotransformación de 2 fenilpropanoides (conocidos antioxidantes naturales): ácido ferúlico y eugenol, con 4 diferentes CCV: *Daucus carota* L., *Piqueria trinervia* Cav., *Mammillaria huitzilpochtli* y *Nicotiana tabacum*.

ANTECEDENTES

BIOTRANSFORMACIONES

Por muchos años, la química sintética ha intentado producir diversos compuestos de origen natural con importancia a nivel industrial, a pesar de la complejidad estructural inherente (a la cual deben sus propiedades únicas y actividad biológica) y es debido a esto que la síntesis química de estas sustancias no es posible o requiere de procesos complicados y costosos, lo cual no resulta conveniente en la industria. Lo que origina el interés por aprovechar a los organismos vivos, y a su "maquinaria" enzimática, en procesos de síntesis industriales.

La técnica que conjuga la síntesis química con el uso de organismos vivos se le conoce como biotransformación. Ya sea que se empleen los materiales celulares completos o que se aislen las enzimas, estos catalizadores naturales ofrecen grandes ventajas para la producción de sustancias tradicionales o nuevas. Algunas de las características que hacen optar por la biocatálisis sobre la catálisis química tradicional, son, las enzimas poseen una alta especificidad (en términos de regio, quimio y estereoespecificidad) con respecto a los sustratos sobre los que actúan, los procesos en los que son empleadas suelen ser más rápidos, trabajan en condiciones fisiológicas, por lo que no demandan condiciones extremas de reacción; pueden dar altos rendimientos en productos enantioméricamente puros; debido a su especificidad sobre el sustrato, no forman subproductos, y son capaces de producir compuestos nuevos a partir de sustratos distintos a los que suelen transformar a nivel celular.

Dadas las características de la catálisis enzimática, el impacto ambiental de los procesos en los que se ven involucrados es bajo (no se requieren condiciones extremas de reacción); además de que son considerados como compuestos naturales en el mercado, ya que fueron sintetizados por sistemas biológicos.

Una gran gama de reacciones han sido estudiadas siguiendo esta técnica, utilizando células como catalizadores. A continuación se mencionan algunas de las reacciones más representativas (figura 1):

En primer instancia, la hidrólisis de sustratos para obtener compuestos con actividad óptica para la industria farmacéutica, como lo representa la formación de una dihidropiridina ópticamente activa a partir de la hidrólisis de un éster, catalizada con una esterasa de hígado de cerdo **(A)**; formación de enlaces C-C y C-O, en el primer caso la formación de un enlace C-C con una aldolasa de conejo que se utiliza como catalizador en la síntesis de diversos compuestos naturales **(B)** y en la formación del enlace C-O se ha reportado la utilización de una enzima (subtilisina) como catalizador en la transesterificación entre ésteres vinílicos y alcoholes primarios **(C)**; otra reacción que ha tenido diversos reportes es la glicosidación, por ejemplo la glicosidación de un diol que da como resultado un compuesto con actividad óptica **(D)**, y por último, otro grupo de reacciones (hidroxilaciones) que sirven principalmente en la preparación de precursores útiles en la síntesis de compuestos naturales, como lo es la bioconversión del benceno a ciclohexadiendiol, mediante cepas de *P. putida* (que además es capaz de biotransformar otros derivados simples del benceno a sus correspondientes ciclohexadiendioles quirales **(E)**).

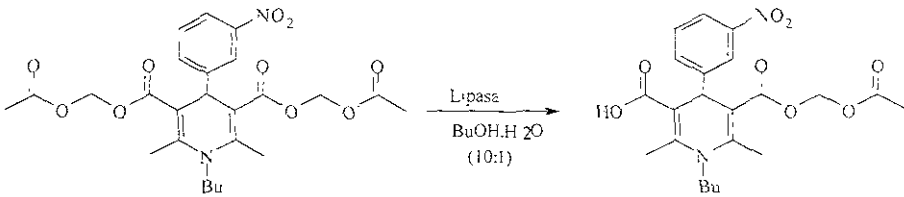
Diversas revisiones se han realizado en los últimos años (Loughlin, 2000; Roberts, 1999; Turner, 1994) enumerando los avances que se han dado en el campo de la biocatálisis.

A continuación se procederá a mencionar algunos de los aspectos más relevantes en lo que se refiere a las biotransformaciones con CCV

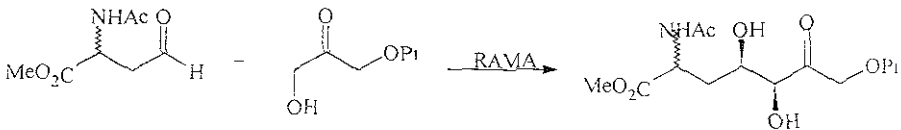
BIOTRANSFORMACIONES CON CCV

Las plantas son fuente de diversos compuestos que se utilizan en la industria alimentaria. Sirven como fuente de saborizantes, antioxidantes, colorantes y aromatizantes, entre otros. A pesar de que se han logrado grandes avances en la

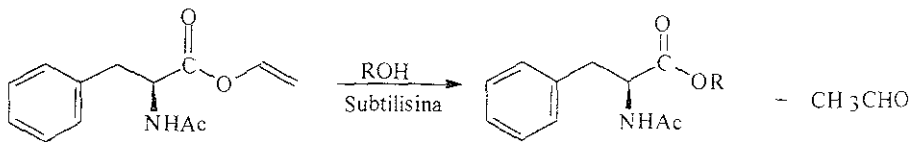
A) Formación de un compuesto con actividad óptica, mediante la hidrólisis de un éster catalizada por una lipasa (Turner, 1994)



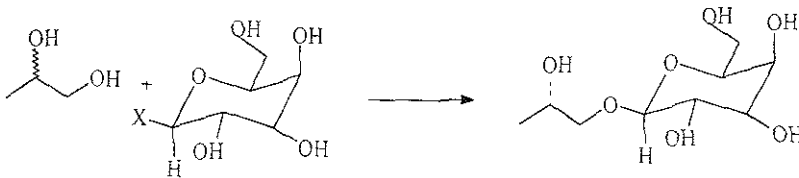
B) Formación de un enlace C-C mediante una aldolasa de músculo de conejo (RAMA) (Bednarski et al, 1989)



C) Formación de un enlace C-O mediante la subtilisina de *Bacillus lentus* (Lloyd et al, 1998)



D) Formación de un enlace glicosídico con β -galactosidasa de *Escherichia coli* (Crout et al, 1990)



E) Dihidroxilación del benceno empleando cepas de *Pseudomonas putida* (Jonhson et al, 1992)



Figura 1 Reacciones sobresalientes en el estudio de las biotransformaciones A) Formación de un compuesto con actividad óptica, B) formación de un enlace C-C, C) Formación de un enlace C-O D) formación de un enlace glicosídico, E) hidroxilación de un compuesto aromático

producción de muchos de estos aditivos a partir de fermentaciones microbianas (Scragg, 1994), no se puede dejar a un lado el incremento en la demanda de productos de origen natural (Sahai, 1994, Scragg, 1994)

La mayoría de los aditivos que imparten sabor y aroma a un producto están constituidos por una gran variedad de compuestos y no solo al componente principal, por lo que es difícil obtener el sabor idéntico a nivel sintético y la extracción directa de la planta sigue siendo una opción redituable. Una desventaja del uso de plantas nativas radica en que los rendimientos de los extractos están a expensas de factores ajenos al control humano, como lo son variaciones de planta a planta, cambios climáticos, pestes, enfermedades, etc

Todos estos factores que alteran la calidad de los aditivos se pueden evitar mediante la utilización de los cultivos de células vegetales.

Los cultivos de células vegetales (CCV) actualmente constituyen una alternativa para sintetizar sustancias cuya producción comercial se ve limitada por factores externos (problemas con la disponibilidad de las plantas), o porque la síntesis convencional resulta económicamente inviable.

La técnica de los CCV puede ser definida como aquella que "consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica cualquier componente de la fisiología de una planta" (Navarro y Vera; 1994)

El desarrollo de la técnica de CCV se basó en la teoría expuesta por Schleiden (1838) y seguida por Schwann (1839), en la que afirmaban que una célula derivada de una planta tiene el potencial de crecer y diferenciarse hasta regenerar la planta entera. A este fenómeno se le conoce como "totipotencialidad de las células" (Sahai, 1994) Basándose en estos conocimientos, Haberlandt estableció los principios biológicos del cultivo de órganos y tejidos vegetales en 1902 (Murashige, 1997).

En un inicio esta técnica fue utilizada como una herramienta para estudiar la bioquímica y la fisiología de las plantas, siendo su primer uso comercial la micropropagación de plantas ornamentales.

Recientemente distintos autores han propuesto (Kutney, 1993, Wilhelm y Reinhard, 1980) la utilización de los CCV como una alternativa para obtener productos de interés para la industria química, que tengan una buena calidad y rendimientos estables (Scragg, 1994).

De acuerdo con la figura 2, se explica ahora de manera general como se establece una línea de CCV:

Se selecciona la planta (planta madre) y se segmenta. Posteriormente se toma la sección apropiada para sembrar o explante (p. ej.: raíces, hojas, brotes, tallos, o semillas) y se le hace una esterilización superficial, esta consiste en sumergir el explante en una solución esterilizadora por algunos minutos (p. ej. HClO_3 ac), sacarlo y realizar 2 ó 3 lavados con agua destilada. Posteriormente la sección esterilizada se coloca en un medio de cultivo sólido, el cual contiene distintos nutrientes: una fuente de carbono y energía, normalmente sacarosa; una fuente de nitrógeno; micro y macro nutrientes (sales); vitaminas; así como reguladores de crecimiento (hormonas): auxinas y citoquininas. Estas hormonas afectan directamente la diferenciación y elongación de las células, y a una proporción adecuada, provocan un crecimiento rápido con células no diferenciadas.

En el medio sólido crece por lo regular una masa amorfa no diferenciada que es llamada "callo", el cual es usado principalmente para iniciar y subcultivar un CCV. Aunque dependiendo de la proporción de hormonas que se utilice, el crecimiento puede estar bien diferenciado. En este punto también se debe de dar un subcultivo o resiembra (mantenimiento de la línea celular), ya que conforme va creciendo el callo se van agotando los nutrientes. Este subcultivo se realiza segmentando el callo y resembrándolo en un medio de cultivo nuevo.

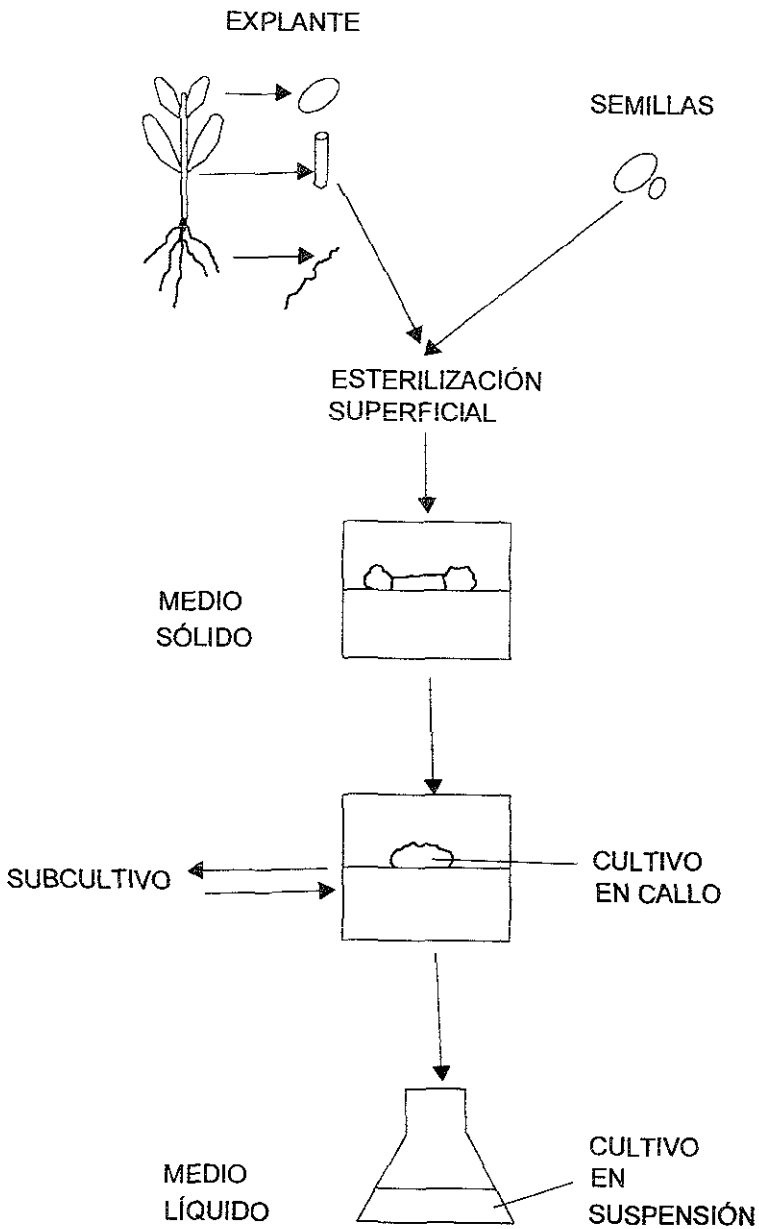


Fig 2. Desarrollo de cultivo de células vegetales

Un problema que representa para su uso industrial este "callo" es su lento crecimiento, por lo que si éste se disgrega y se coloca en un medio líquido (con los mismos nutrientes, pero sin el agente gelificante), es obtenido un cultivo en suspensión. En esta clase de cultivos, el crecimiento es más rápido y el material celular es más homogéneo (que en el caso de algunas biotransformaciones es más conveniente; ya que, en general, los CCV no diferenciados no son capaces de producir terpenoides (Wilhelm y Reinhard. 1980), o en el caso de los metabolitos secundarios, se requiere cierta organización celular para que se acumulen en organelos especializados). Además de que a nivel industrial representa una ventaja ya que las suspensiones pueden ser colocadas en biorreactores de gran volumen, facilitando así el desarrollo a gran escala. Esto es en analogía a los biorreactores microbianos.

Cabe mencionar que tanto los "callos" como los cultivos en suspensión no son las únicas opciones para producir cultivos. Alterando el balance regulador del crecimiento, es posible desarrollar raíces y brotes independientemente.

Una vez establecida la línea celular de CCV, se realiza la biotransformación. De manera general, esta puede ser de dos formas: adicionando un metabolito secundario, que se encuentre en pequeñas cantidades en la ruta biosintética, beneficiando la sobreproducción de algún compuesto conocido de la planta (p. ej. Aceites esenciales), adicionando un compuesto llamado "elicitador", el cual produce una respuesta de las células y en donde por lo regular se aumenta la concentración del metabolito; o adicionando un sustrato que mediante la maquinaria enzimática de las células produzca un compuesto que no esté presente o se presente en concentraciones bajas de manera normal en la naturaleza. Esto gracias a que las enzimas presentes en las células de las planta son capaces de catalizar reacciones de tipo regio y estereoespecíficas (Villa, et al., 1998). En la figura 3, se plantea el método general para la biotransformación con CCV adicionando un sustrato

Nada de lo descrito anteriormente es nuevo, ya que durante los últimos 20 años se han utilizado CCV para la biotransformación de compuestos tales como terpenoides, fenilpropanoides y alcaloides; los cuales, en algunas ocasiones han dado como resultado compuestos de interés biológico que no se encuentran en la naturaleza (Stepan-Sarkissian, 1991; Suga e Hirita, 1990). Se debe resaltar que la simple adición de un precursor no es sinónimo de que la biotransformación sea realizada. Diversos factores deben ser tomados en cuenta, por ejemplo: la capacidad del precursor (en caso de que sea un compuesto químico sintético) de penetrar la célula, los efectos tóxicos o de retroalimentación en la acumulación del producto, la disponibilidad de las enzimas de entrar en contacto con el precursor (ya sea porque las enzimas no están siendo producidas, o tanto las enzimas como el precursor se encuentran en compartimientos distintos) (Chin y Pederson, 1992). Este último punto puede ser salvado homogenizando las células (esto es realizar una lisis mecánica, preferentemente con un aparato con cuchillas de acero inoxidable), dejando así los complejos enzimáticos libres en el medio de reacción para que entre en contacto con el precursor.

Numerosas reacciones se han estudiado utilizando esta técnica, aprovechando ya sea material celular vegetal o las enzimas aisladas de ellas.

Dentro de estas se pueden destacar las siguientes reacciones:

A) La reducción de los dobles enlaces entre C-C y C-O, como lo representa la formación de alcoholes a partir de compuestos como las cetonas aromáticas (por ejemplo, la reducción de la acetofenona a 1-feniletanol, mediante CCV inmobilizadas de *Gardenia jasminoides*) (Akakabe y Naoshima, 1994), principalmente para la formación de compuestos con actividad biológica que no son encontrados con facilidad en la naturaleza (Villa et al, 1998).



A) Reducción de la acetofenona a 1-feniletanol

DIAGRAMA GENERAL

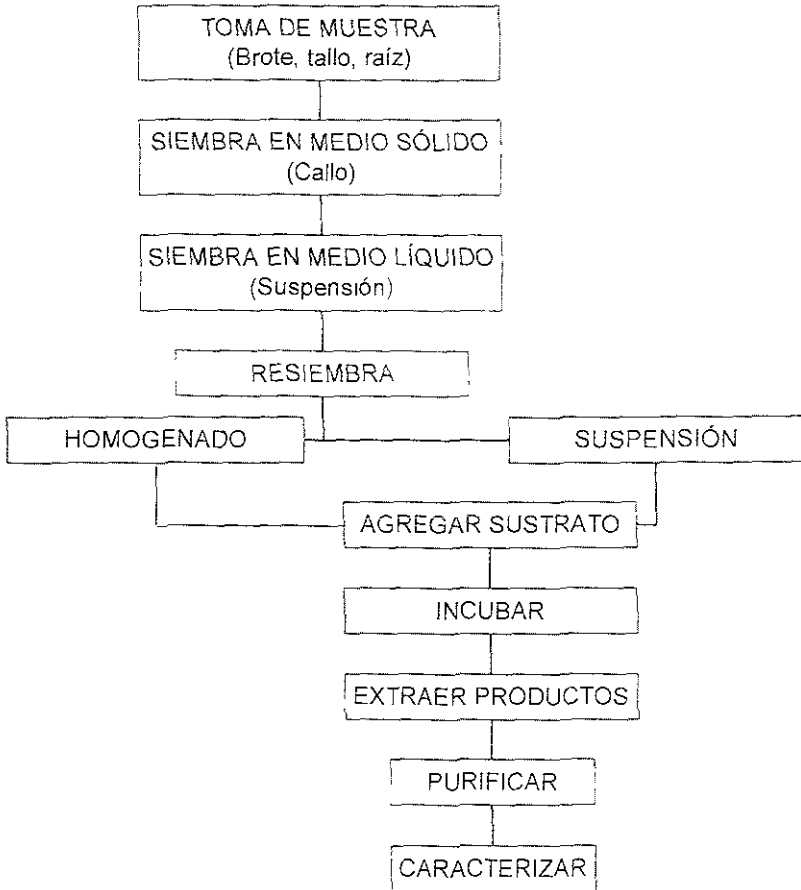
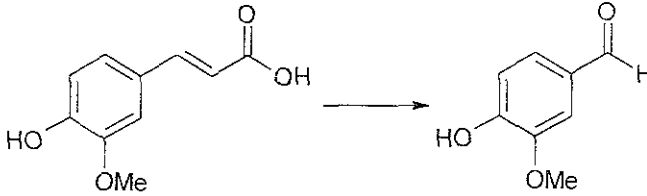


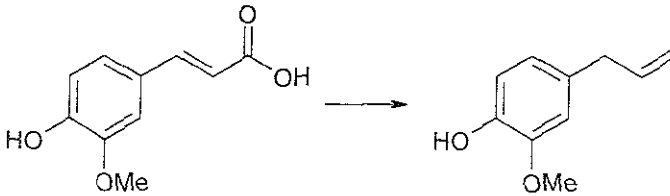
Figura 3. Diagrama de flujo que muestra la metodología general para la biotransformación de un sustrato con CCV

B) Las β -oxidaciones, como lo representa la biotransformación del ácido ferúlico a vainillina (el cual ha sido ampliamente estudiado con diversos microorganismos) mediante cultivos en suspensión de *D. carota* y la cual es precedida por una descarboxilación, técnica desarrollada a partir de la síntesis de estirenos utilizando como precursores diversos ácidos cinámicos (Takemoto y Achiwa, 1999). Esta reacción ha sido ampliamente estudiada debido al alto valor comercial de la vainilla (Ramachandra y Ravishankar, 2000).



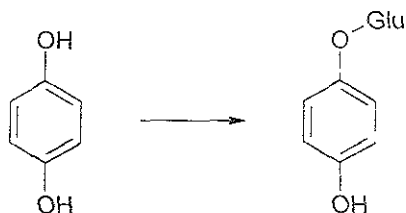
B) β -Oxidación del ácido ferúlico a Vainillina

C) Demetilaciones y descarboxilaciones, como en la formación de precursores para la formación de vainillina, por ejemplo, la descarboxilación del ácido ferúlico para obtener eugenol con CCV de *Nicotiana tabacum* (Takemoto y Achiwa, 1999).



C) Descarboxilación de ácido *trans*-ferúlico

D) Por último, una biotransformación que se ha visto principalmente con células de origen vegetal (Ornhara et al., 1992) y que es de importancia en la industria farmacéutica ya que ayuda a la solubilización de productos con baja solubilidad en agua (Wilhelm y Reinhard, 1980), la glicosidación de compuestos fenólicos, como lo representa la glicosidación de la hidroquinona a arbutina mediante CCV de *Digitalis purpurea* (Pilgrim, 1970).



D) Glicosidación de la hidroquinona

Una vez expuestos algunos puntos importantes dentro del campo de los CCV, se procederá a hablar de aspectos básicos concernientes a los sustratos utilizados en este proyecto de tesis.

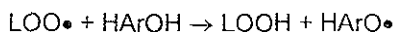
MONOTERPENOS

Los monoterpenos son compuestos volátiles que confieren a las plantas una gran parte de su fragancia. Han sido utilizados desde la antigüedad como medicinas y fragancias, parte fundamental de los aceites esenciales, poco solubles o insolubles en agua; la manera más común de obtenerlos es por una extracción directa de la planta. El nombre terpeno deriva de los compuestos aislados de la trementina, un líquido volátil obtenido de algunas coníferas.

Con una ocurrencia natural en la mayoría de las plantas, considerados por algunos autores como parte de los componentes fenólicos de la planta (Bowers, 1992), este tipo de compuestos también está asociado al color y al sabor de diversas frutas (p. ej. manzanas, cerezas y peras)

Los compuestos derivados de los monoterpenos, que poseen un grupo fenilo unido a una cadena alifática de 3 carbonos son conocidos como fenilpropanoides. Estos se encuentran ampliamente distribuidos dentro del reino vegetal y son utilizados, entre otras cosas, como aditivos alimentarios. Siendo la característica más importante de este tipo de compuestos el poder antioxidante

Se cree que los antioxidantes de tipo fenólico funcionan donando un hidrógeno del grupo hidroxilo a un radical peróxido, de acuerdo al siguiente esquema, evitando así que se inicie o propague la oxidación:



Donde LOO• representa un lípido en el proceso inicial de oxidación, mientras que HArOH es el compuesto fenólico

La efectividad de los diferentes antioxidantes fenólicos depende del tipo y posición de los grupos que estén asociados al anillo bencénico y a la factibilidad para donar el hidrógeno.

ÁCIDO FERÚLICO

El ácido ferúlico (ácido-3-fenil-(4-hidroxi-3-metoxi)-2-propenoico) (fig. 4A, pag 19) es un compuesto que se encuentra en la mayoría de las plantas (principalmente las monocotiledóneas), formando parte de la pared celular y constituyendo puente de unión entre polisacáridos (conjugados glicosídicos) y raramente se encuentra de manera libre (Rosazza, et al., 1995). Unido como éster a polisacáridos, el ácido ferúlico se presenta en forma monomérica o dimérica (Akin, et al., 1992). Desarrolla un papel muy importante en la defensa de la planta y es precursor de compuestos antimicrobianos y antimicóticos. A nivel industrial es usado como antioxidante natural en alimentos y es ingrediente activo en lociones y cremas para la radiación solar, ya que funciona como fotoprotector

También se le ha asociado con actividad antihepatóxica, antitumoral, antiestrogénica, antimicótica y colesterolémica; inhibidor de sabores amargos, en la tabla 2 (pag. 23) se resumen algunos de los usos más relevantes del ácido ferúlico y sus ésteres derivados que han sido aplicados en los últimos años.

En el área de la biocatálisis se ha encontrado que el ácido ferúlico, al ser biotransformado por algunos microorganismos, produce compuestos que son utilizados en la industria de la química y de los alimentos, como lo son la vainillina y el guaiacol (Ramachandra & Ravishankar, 2000). Algunos de estos ensayos de biotransformación del ácido ferúlico con microorganismos se pueden ver en la tabla 1 (pag. 22).

Este compuesto ha sido estudiado en ensayos de biotransformación como precursor de la vainillina (componente esencial de la vainilla, un aditivo ampliamente utilizado en la industria alimenticia), principalmente utilizando microorganismos (p.ej cepas diversas del hongo *Pseudomonas sp*) (fig 5). Solo se tienen conocimientos de la utilización de CCV para la biotransformación del ácido ferúlico de una sola fuente: Takemoto y Achiwa (1999)

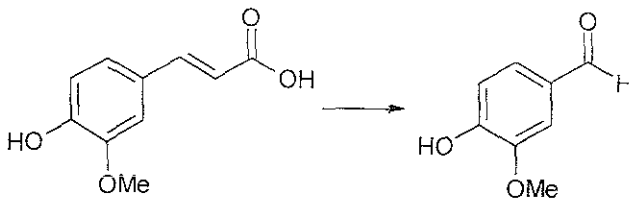


Figura 5 biotransformación del ácido *trans*-ferúlico a vainillina, mediante cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* (Andreoni et al, 1995)

Una reacción que hasta el momento ha sido poco estudiada es el acoplamiento oxidativo del ácido ferúlico por medio de CCV. Esta reacción es importante ya que la dimerización de compuestos del tipo del ácido ferúlico (p.ej. Diferulatos) afecta la capacidad antioxidante, siendo esta dependiente de la posición del enlace entre los monómeros. Distintos diferulatos se han identificado en la pared celular de diversas especies vegetales (especialmente cereales) y cada uno muestra diferente actividad (Williamson, 1999) (Tabla 2, pag. 23).

Así, la actividad antioxidante que se presenta al formarse el dímero dependerá de la terminación de la cadena alifática, el número total de grupos hidroxilo fenólicos y del número de sitios disponibles en los que se puede acomodar un electrón desapareado. Otro factor a considerar a favor del empleo de CCV para el acoplamiento orto-oxidativo del ácido ferúlico es que la síntesis química de este

tipo de compuestos, por ejemplo la formación del ácido-5,5'-diferúlico (fig. 6), comprende reacciones con condiciones difíciles y la utilización de reactivos peligrosos (Yamamoto et al, 1999)

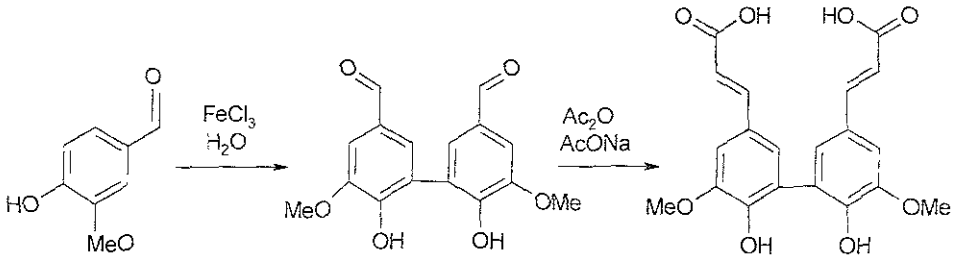


Figura 6: diagrama de preparación del ácido-5,5'-diferúlico, a partir de vainillina

EUGENOL

El eugenol (2-metoxi-4-(2)-propenilfenol) (fig. 4B), es el componente principal del aceite esencial de clavo (especia utilizada en cocina), en odontología es utilizado como antiséptico, desinfectante y anestésico local. A nivel industrial es utilizado en la manufactura sintética de vainilla (mediante una oxidación) (fig. 7) y en perfumería. Algunos estudios muestran que el eugenol puede ser biotransformado al componente esencial de la vainilla mediante el uso de algunos microorganismos como biocatalizadores, lo cual se resume en la tabla 1.

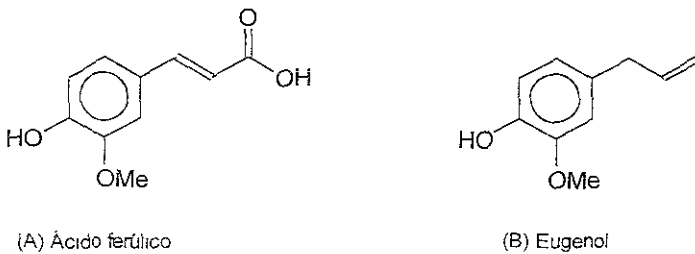


Figura 4: A) Estructura química del ácido ferúlico B) Estructura química del eugenol

El eugenol también es conocido por sus características de antioxidante natural y según algunos estudios (Ogata, et al., 2000), actúa al nivel de la iniciación en la autoxidación. En este mismo estudio se compara el poder antioxidante del monómero con el dímero, siendo mayor el de este último.

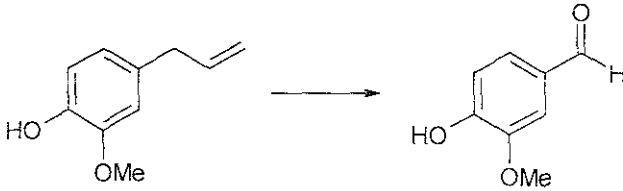


Figura 7. oxidación del eugenol a vainillina (compuesto principal del aceite esencial de vainilla)

Los ensayos de biotransformación con CCV que se han realizado utilizando el eugenol como precursor (figura 8), han sido orientados a glicosilarlo en el grupo hidroxilo (Orihara et al., 1992). Mientras que no se tiene conocimiento de estudios publicados acerca del acoplamiento oxidativo del este compuesto con CCV.



Figura 8. glicosilación del eugenol mediante cultivos celulares de *Eucalyptus perriana*

PEROXIDASAS

Las peroxidasas son enzimas ampliamente distribuidas en plantas y microorganismos (Gaspar et al., 1982). En las plantas, las peroxidasas participan en diversos procesos: regulación hormonal, mecanismos de defensa, control de la elongación, biosíntesis de lignina, entrecruzamiento de polisacáridos de la pared celular (Vitali et al., 1998). Debido a que estas enzimas tienen un rango amplio de *pI* (desde 3.5 hasta 9.5 (Pomar et al., 1997)), se pueden clasificar en dos grupos: ácidas y alcalinas. A pesar de su ocurrencia en diversos organismos, la única fuente comercial disponible de peroxidasa son las raíces de rábano.

Las enzimas peroxidadas catalizan reacciones de transferencia de iones de un donador al peróxido de hidrógeno, aunque se conocen enzimas que actúan como oxigenasas y monoxigenasas (Aburto, 1994) También catalizan la deshidrogenación de una gran cantidad de compuestos aromáticos (Aburto, 1994) y poseen una gran variedad de usos industriales (esterilización de leche; remoción de peróxido de hidrógeno en el blanqueado de textiles, conservación de trigo), en el campo de la bioquímica analítica, entre otros usos

Otra de las reacciones que catalizan es la oxidación de compuestos aromáticos (Williamson et al., 1999), la cual da la pauta para la dimerización de este tipo de compuestos y que es conocido como acoplamiento oxidativo

El acoplamiento orto-oxidativo es de gran importancia en la química de productos naturales (McDonald et al., 1973). Diversos compuestos heterocíclicos, como lo son: alcaloides, glicopéptidos o ciclo-péptidos (Dhingra et al., 1982); así como la dimerización de compuestos como flavonoides e hidroxycinamatos (aumentando así la actividad antioxidante de estos) (Williamson, 1999), son biosintetizados gracias a la formación de enlaces C-C o C-O que catalizan este tipo de enzimas. Diversos ensayos se han realizado en este campo utilizando CCV, por ejemplo la dimerización de la quercetina por medio de la enzima peroxidasa aislada de cultivos de células vegetales de *Senna angustifolia* (fig. 9).

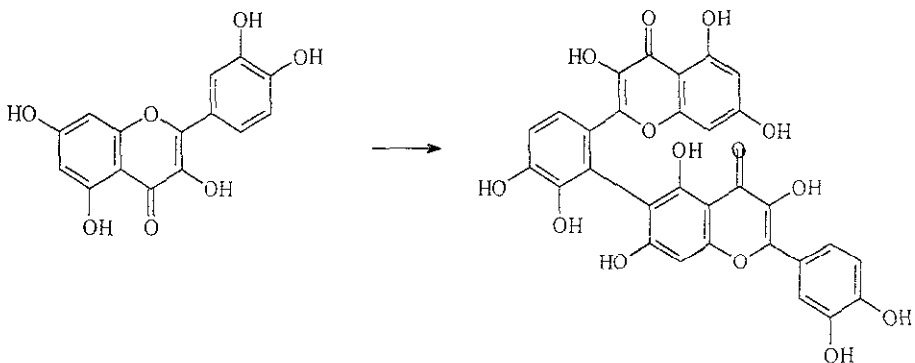


Figura 9: Dimerización de quercetina a 2' 6''-biquercetina, mediante una peroxidasa aislada de un CCV de *S. angustifolia* en presencia de H_2O_2

Debido a la importancia que ha comenzado a tener las reacciones que catalizan estas enzimas (principalmente el acoplamiento orto-oxidativo), en los últimos 10 años se ha discutido la posibilidad producir la peroxidasa a partir de CCV (Moreno et al , 1990), ya que algunos cultivos en suspensión y en callo han sido reportados como productores extracelulares de peroxidasa (entre los que están *D. carota* y *N. tabacum*, respectivamente). El que esta enzima se encuentre fuera de la célula la vuelve más atractiva para las biotransformaciones, ya que facilita el proceso al no tener que romper la célula (homogenizar) para liberar la enzima.

Tabla 1: Biotransformación del ácido ferúlico y del eugenol a compuestos presentes en la vainilla, por medio de microorganismos

SUSTRATO	MICROORGANISMO	PRODUCTO	REFERENCIA
Ácido ferúlico	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Vainillina	Falconnier et al, 1994
Ácido ferúlico	<i>Aspergillus niger</i>	Vainillina	Lesage-Meesen et al 1996
Ácido ferúlico	<i>Pseudomonas acidovarans</i>	Vainillina	Toms & Wood, 1970
Ácido ferúlico	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ácido vainíllico	Andreoni et al, 1995
Ácido ferúlico	<i>Escherichia coli</i>	Vainillina	Otuk, 1985
Ácido ferúlico	<i>Rhodotorula rubra</i>	Ácido vainíllico	Huang et al 1993
Eugenol	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Vainilla	Tadasa & Kayahara, 1983
Eugenol	<i>Pseudomonas spp</i>	Vainillina	Rabenhorst, 1996
Eugenol	<i>Arthobacter globiformis</i>	Vainillina	Cooper, 1987

Fuente. Ramachandra & Ravishankar, 2000

Tabla 2. Usos del ácido ferúlico y sus derivados.

COMPUESTO	USO/ACTIVIDAD	REFERENCIA
Ácido ferúlico	Fotoprotector	Graf, 1992
Ácido ferúlico	Antitumoral	Graf, 1992; Harborne & Baxter, 1993
Ácido ferúlico	Antimicótico	"
Ácido ferúlico	Antihepatóxico	"
Ácido ferúlico	Antiestrogénico	"
Ácido ferúlico	Antimicrobiano	Schnittger et al, 1997
Ácido ferúlico	Anti-irritante	Taniguchi et al, 1999
Ácido ferúlico	Antioxidante	Ronzio et al, 1998
Ácido ferúlico	Inhibidor de sabores amargos	Riemer, 1994
Éster de ferúlico	Colesterolémico	Imai et al, 1996
Éster de ferúlico	Antioxidante/Fotoprotector	Taniguchi et al, 1999

Fuente: elaboración propia

OBJETIVOS

Objetivo general

- Utilizar cultivos de células vegetales como biocatalizadores para obtener derivados del ácido ferúlico y el eugenol con distintas propiedades antioxidantes que las de los precursores.

Objetivos particulares

- Probar cultivos de células vegetales en suspensión y en medio sólido (callo) de *Daucus carota* L., *Piqueria trinervia* Cav., *Mammillaria huitzilopochtli* y *Nicotiana tabacum* como biocatalizadores para la biotransformación del ácido ferúlico y del eugenol, a compuestos con una diferente actividad antioxidante que estos
- De los biocatalizadores utilizados, obtener aquellos que resulten adecuados para la biotransformación del ácido ferúlico y del eugenol.
- Purificar y caracterizar los productos de la biotransformación.

MATERIALES Y MÉTODOS

EQUIPOS

Incubadora de agitación rotatoria Forma Scientific-4518; homogenizador celular Ultraturrax Hanke & Kunke. Para correr las placas de cromatografía en capa fina se utilizaron cromatofolios Alugramsilg-UV254 y para la cromatografía en columna se ocupó gel de sílice de capa fina Merck 60 (mallas 35-70 ASTM)

Los estudios de espectroscopía se realizaron en el Instituto de Química y en la USAI de la Facultad de Química de la UNAM y se utilizaron los siguientes aparatos:

- Espectroscopía de IR: Perkin-Elmer 283 y Nicolet FT-IR 55X.
- Espectrómetro de RMN-¹H Varian Gemini
- Espectrómetros de MS Hewlett-Packard 5945 A, JMS-SX102A Jeol y JMSAX505

PLAN DE TRABAJO

El trabajo fue desarrollado de acuerdo con el esquema de la figura 10, este procedimiento general fue aplicado en todos los ensayos de biotransformación realizados. De esta manera, se escogieron los biocatalizadores; se realizaron las biotransformaciones con los compuestos de interés, se obtuvieron, purificaron y caracterizaron los productos.

SUSTRATOS

Eugenol: fue utilizado de la marca Aldrich grado reactivo. Previo a su utilización se purificaron 2 g del sustrato por cromatografía en columna, con una mezcla eluyente de Hexano-Acetato de etilo (8:2). Mediante la colección de fracciones de 15mL, las cuales se monitorearon por CCF, se obtuvo el eugenol puro entre las fracciones 6 y 33.

Ácido ferúlico: fue utilizado de las marcas Aldrich y Sigma.

En ambos casos la pureza de los sustratos fue comprobada mediante espectrofotometría de masas (MS), infra-rojo (IR) y RMN-¹H

BIOCATALIZADORES

- *Daucus carota L.*: fue utilizado tanto callo como cultivo en suspensión
- *Piqueria trinervia Cav.*: se utilizó callo obtenido en un trabajo previo (Saad, 1996), así como cultivo en suspensión
- *Mammillaria huitzilopochtli*: fue empleado callo obtenido en un trabajo previo (Robies, 1999)
- *Nicotiana tabacum*: se empleó callo

Todos los cultivos fueron provistos por el laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales. del departamento de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Química.

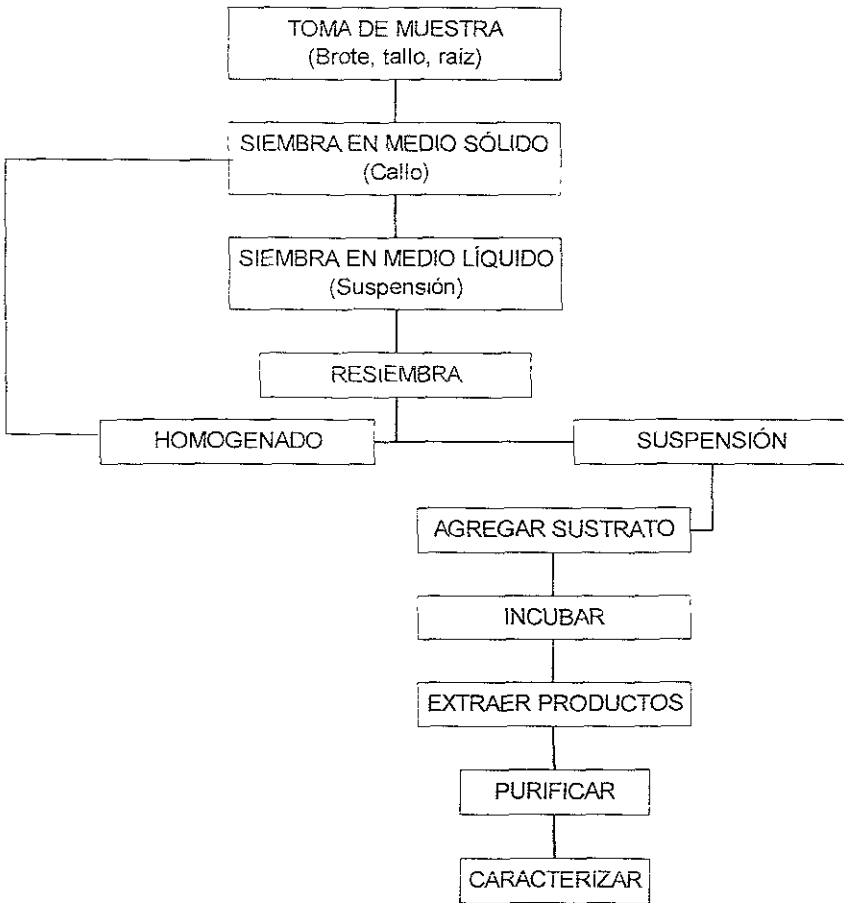


Figura 10. Diagrama de flujo que muestra la metodología seguida para los ensayos de biotransformación del ácido ferúlico y eugenol con CCV

MEDIOS DE CULTIVO

En todos los cultivos vegetales realizados se utilizó como base el medio MS, en el caso de los medios líquidos (en suspensión) no le fue adicionado agar

La composición del medio MS se detalla a continuación en la siguiente tabla:

COMPONENTES	CANTIDAD/L
Macronutrientes	
KNO ₃	1.9 g
NH ₄ NO ₃	1.65 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370 mg
KH ₂ PO ₄	170 mg
Calcio	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440 mg
Micronutrientes	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6 mg
H ₃ BO ₃	6.2 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	25 µg
KI	0.8 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	250 µg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	25 µg
Na ₂ EDTA·H ₂ O	37.6 mg
Fierro	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8 µg
Vitaminas	
Tiamina HCl	0.1 g
Acido nicotínico	0.5 g
Myo-Inositol	
Myo-Inositol	100 g
Hormonas*	
ANA	1 mg
BAP	1 mg
2,4-D	1 mg

*Las hormonas adicionadas no están comprendidas dentro de la composición del medio MS, las hormonas ANA (ácido naftalenacético) y BAP (bencilaminopurina) se adicionaron en un mismo medio, la 2,4-D se adicionó sola, según se indique

Para mantener el cultivo en suspensión de *D. carota* L., se empleó el medio B3 de Gamborg, el cual es igual que el MS además adicionado con 0.5mg clorhidrato de piridoxina y 2mg de L-glicina. La fuente de carbono es sacarosa, la que se adiciona a razón de 20g/L de medio.

El medio se preparó de la siguiente forma cada nutriente o grupo de nutrientes (señalizado con negritas) fue preparado por separado, tomando una alícuota de cada uno hasta aforar a 1L. Una vez aforado, se ajusta el pH a 5.7 y se esteriliza en autoclave a 121 °C/15 min/1.2 kg/cm². Wilhelm y Reinhard mencionan que el pH de un medio de cultivo debe de estar entre 5 y 6 antes de la esterilización, ya que como se sabe puede alterar el desarrollo de la biotransformación, a pesar de que las condiciones específicas de pH pueden variar según la especie con la que se trabaje. El mismo procedimiento de esterilización se siguió para los medios sólidos, solo que este se colocó en frascos de vidrio con tapa de plástico.

Mantenimiento de las líneas celulares.

En el caso de *D. carota L.*, el mantenimiento se realizó con un intervalo de tiempo de 7 a 15 días de la siguiente manera. era preparado 1L del medio B3, se ajustaba el pH a 5.7, se adicionaba el litro de medio de cultivo a 20 matraces Erlenmeyer de 250 mL (a razón de 50mL de medio cada matraz), se tapaban con papel aluminio y se esterilizaban. Los matraces con biomasa en suspensión y medio agotado, eran cuidadosamente adicionados a los matraces con medio nuevo en condiciones asépticas (por cada matraz de medio agotado se inocularon 2 matraces de medio nuevo); lo que es conocido como "cultivo cerrado".

Tomando como base lo anterior, los cultivos en suspensión de *P. trinervia Cav* eran mantenidos de la misma forma, solo variando la hormona que en este caso era 2,4-D.

En ambos casos se incubaban en una incubadora rotatoria a 150 rpm y 25 °C.

Para los cultivos en medio sólido o callos, el procedimiento general de mantenimiento se explica a continuación: cada 7 días se preparaba medio de cultivo, se seleccionaban los callos mas grandes y con la ayuda de un bisturí se fraccionaba. Las fracciones eran colocadas en el medio nuevo y se incubaban a 25° C en presencia de luz. Todos los cultivos en caño utilizados eran adicionados con la hormona 2,4-D.

HOMOGENIZADO DE CCV

Todos los cultivos en caldo y algunas pruebas con cultivo en suspensión de *Daucus carota L* fueron homogenizados siguiendo la siguiente metodología: se pesan 10 g de material celular (en el caso de los cultivos en suspensión, filtración previa); se adicionan 20 mL de una solución buffer de fosfatos con un pH = 6.4, se homogenizaron durante 5 minutos con una velocidad de 8000 rpm, excepto con *M. huitzilopochtli* y con *P. trinervia*, cuyo material celular es mas duro y requirió mas potencia para la homogenización (9500 rpm/ 5 min).

El rompimiento celular se llevó a cabo por el choque de las cuchillas de acero inoxidable del homogenizador con el material celular. El material homogenizado se colocó en matraces Erlenmeyer de 125 mL, con excepción de donde se indique lo contrario

BIOTRANSFORMACIÓN

Se pesaron 50 mg del sustrato dentro de frascos biales. Ahí se les adicionó 1 mL de acetona para disolverlos y facilitar su adición a los CCV (homogenizados y no homogenizados). En algunos casos se escaló al doble o al triple la técnica, es decir, guardando la misma proporción sustrato disolvente. Los casos donde ocurrieron estos cambios se encuentran indicados

Una vez adicionado el sustrato, los matraces fueron tapados con papel aluminio y colocados en incubación en una incubadora rotatoria, a 25° C por 5 días a una velocidad de 150 rpm, con excepción de donde se indique otra cosa

En cada caso, las biotransformaciones se llevaron a cabo en lotes de manera que se tuviera mayor cantidad de biomasa y, por consiguiente, mayor producto. En general los lotes eran de 5 matraces (10 g biomasa/ 50 mg sustrato), aunque en algunos casos se duplicó el volumen 2 o 3 veces.

En la figura 11 se muestra la metodología general que se siguió para la biotransformación, extracción, purificación y caracterización de los productos

EXTRACCIÓN DE PRODUCTOS

Una vez transcurrido el periodo de biotransformación, los matraces se retiraban de la incubación y se filtraban (juntando las diversas fracciones de un mismo CCV con un sustrato) con vacío en embudo Büchner con papel filtro de porosidad grande

El material celular se maceró dos veces: una primera vez con acetona (se filtró) y una segunda con dicloro metano (se filtró).

El filtrado (medio de reacción, macerado con acetona y macerado con dicloro metano) se agregó a un embudo de separación de 500 mL.

Se le adicionó CH_2Cl_2 para realizar la extracción por disolvente (a razón de 2 por $\frac{1}{2}$ del volumen del filtrado). Se separaron ambas fracciones. La fracción que se recuperó fue la orgánica, se secaba de humedad mediante Na_2SO_4 anhidro. Se concentró en rotavapor (35 °C), se trasvasó a un frasco bial y se confirmó la presencia del producto mediante cromatografía en capa fina (CCF). Esta se realizó con una mezcla de disolventes Hexano:Acetato de etilo (7:3) teniendo el sustrato original como referencia. La fracción acuosa, en un principio, se saturaba con NaCl y se extraía con acetato de etilo (con el mismo volumen que el CH_2Cl_2). Se seguía el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior. Al no observarse en CCF alguno de los compuestos que se esperaban, se decidió desechar la fracción acuosa después de la primera extracción.

Para confirmar que el compuesto fuera producido como resultado de la biotransformación del sustrato, se colocó un blanco. Este blanco consistía de un matraz con biocatalizador, sin sustrato, incubado a las mismas condiciones. El proceso de extracción y monitoreo fue el mismo que se le realizó a los demás.

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS

Según el tamaño del lote, y por consiguiente del rendimiento, se trabajaron dos procedimientos análogos. cromatografía en columna o cromatografía en placa preparativa. Esto dependía principalmente de la cantidad de producto esperada.

En los casos en que se esperaba poco producto, se utilizó la cromatografía en placa preparativa.

En el primer caso se purificaron los productos de la biotransformación del ácido ferúlico con *Piquena trinervia Cav.* A continuación se describe el proceso: al extracto concentrado se le agregó sílica gel para formar hasta formar una "pasta" para facilitar su adición a la columna. La columna se preparó adicionando sílica gel a razón de 20 partes de sílica por cada parte de sustrato, con una mezcla eluyente Hexano:Acetato de etilo (7:3); ya lista la columna, se agrega la "pasta"; las fracciones se colectaron en tubos de ensaye (10 mL por fracción). Las fracciones eran monitoreadas por CCF y en las que estaban contenidas el producto se juntaron y concentraron.

Para los productos purificados con placa preparativa (los productos de la biotransformación del eugenol con *Daucus carota L.* y *Mammillana huitzilopochtli*), el proceso fue el siguiente: en una cámara de elusión se agregó la mezcla de eluyentes (Hexano:Acetato de etilo (7:3)), tapando la cámara para permitir la saturación de disolventes de la misma; con ayuda de un tubo capilar se colocó toda la fracción concentrada en rotavapor en la superficie de la placa preparativa (de manera horizontal a como avanzaría el disolvente); se colocó la placa en la cámara de elusión y se dejó migrar hasta 1 cm antes del borde

Una vez que se evaporó la mezcla de disolventes, mediante una cámara de luz UV se observó la migración y se marcó la banda en donde se encontraba el producto (lo cual se sabía mediante la CCF); la banda se cortó y toda la sílica gel que contenía el producto se colocó en un matraz Erlenmeyer. Ahí, se extrajo el producto con CH_2Cl_2 y se concentró en rotavapor.

En ambos procedimientos de extracción se realizaron estudios de espectroscopía (MS, IR, RMN- ^1H) para la caracterización de los productos obtenidos.

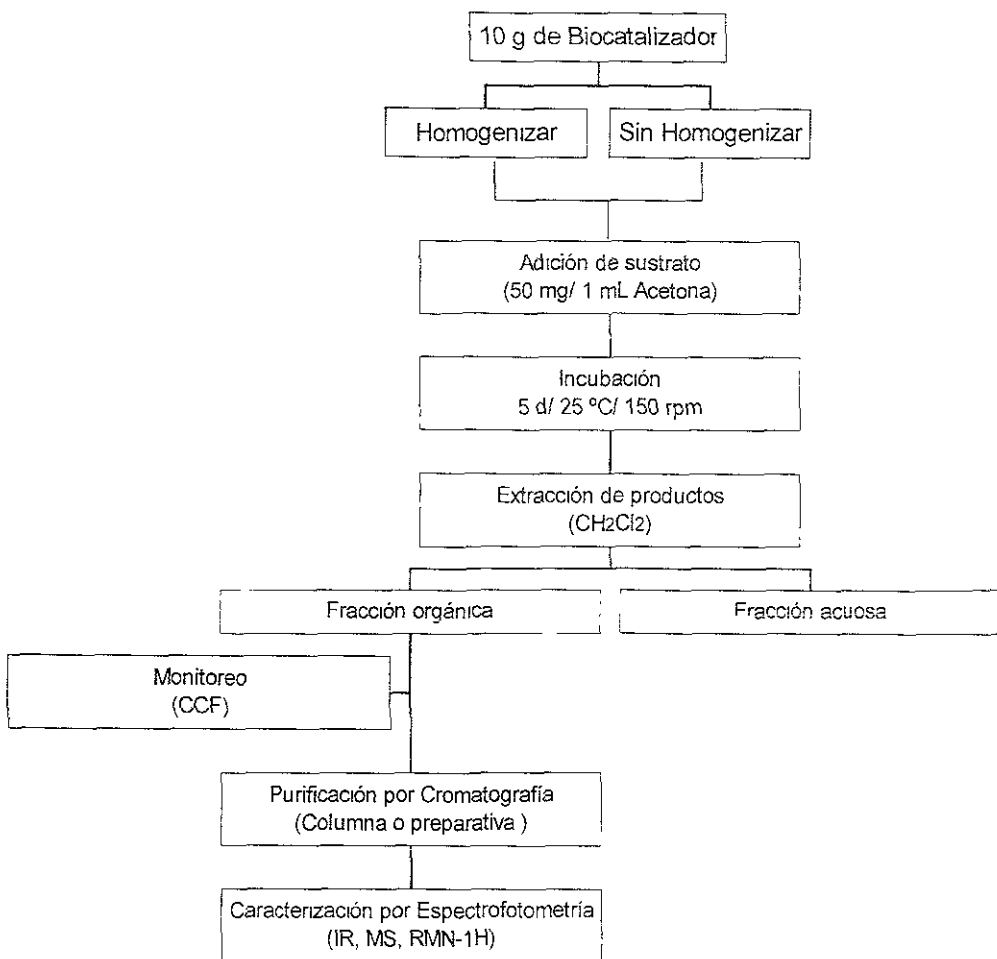


Figura 11 Diagrama de flujo que muestra la metodología seguida en los ensayos de biotransformación

Se elaboraron testigos para cada uno de los CCV utilizados. Según fuera el caso (homogenizado o sin homogenizar), al material celular se le daba el mismo tratamiento previo al ensayo de biotransformación. Posteriormente, se le colocaba a las mismas condiciones de incubación, pero sin agregar ningún sustrato. Una vez terminado el periodo de incubación se le realizaba el mismo procedimiento de extracción que al resto de los cultivos. Los extractos se monitorearon por CCF.

ESPECTROSCOPIA

Los espectros de infrarrojo se corrieron en pastilla de KBr (ácido ferúlico y bis-eugenol) y en película (eugenol y dímero del ferúlico) y las bandas de absorción están reportadas en cm^{-1} . La espectroscopía de masas se realizó por impacto electrónico (IE) de baja resolución. La resonancia magnética nuclear de ^1H se corrió a 200 MHz en CDCl_3 . Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en hertz. Las siguientes abreviaturas fueron asignadas: s = singulete, d = doblete, dd = doble doblete, t = triplete y m = multiplete.

Sustratos

Ácido ferúlico: **RMN- ^1H** : δ 7.71 (d, J= 15.98, 1H, trans), 7.12 (d, J= 8.12, 1H, arom), 7.07 (dd, J= 4.36, 1H, arom), 6.93 (d, J= 1.92, 1H, arom), 6.29 (d, J= 15.88, 1H, trans), 3.94 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-R}$). **IR** ν 3432, 2968, 1665, 1598, 1514, 1273, 945. **MS** m/z 194 (M^+ , 10), 179 (100)

Eugenol: **RMN- ^1H** : δ 6.84 (d, J= 8.46, H, arom), 5.95 (m, H, arom), 5.1 (m, H, arom), 3.86 (s, 3H, O-CH_3), 3.31 (d, J= 6.64, Ar-CH). **IR** ν 3516, 2974, 1637, 1661, 1513, 1267, 914. **MS** m/z 164 (M^+ , 100), 149 (40).

Productos

Diferulato. **MS** . m/z 386 (M^+ , 2)

Bis-eugenol: **RMN-¹H**: δ 6.76 (d, J= 1.9, 1H, arom), 6.74 (d, J= 1.9, 1H, arom), 5.99 (m, H, arom), 5.2 (m, H, arom), 3.83 (s, OCH₃), 3.39 (d, J= 6.6, Ar-CH₂). **IR** v 3347, 2961, 1637, 1598, 1258, 908 **MS** m/z 326 (M^+ , 100), 297 (15), 253 (20)

RESULTADOS

BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO

Los ensayos de biotransformación del ácido ferúlico se probaron con tres diferentes materiales celulares: en suspensión, en suspensión-homogenizado y en callo-homogenizado

En el caso de los cultivos que fueron homogenados, la metodología general previa a la biotransformación fue como se describe a continuación se pesaban 10 g de biomasa y se agregaban a 20 mL de un buffer de fosfatos (pH = 6.4). se homogenizaban a 8000 rpm/ 5 min.

Así, para llevar a cabo la biotransformación, a los 10 g de biomasa (homogenizada o no homogenizada) se les adicionaba 50 mg de ácido ferúlico previamente disuelto en 1 mL de acetona (1 matraz; lotes de 5 matraces) Posteriormente se colocaban en incubación a 25 °C y 150 rpm durante 5 días. Una vez transcurrido el periodo de incubación, los bioproductos se recuperan mediante extracciones con diclorometano y acetato de etilo. En algunos casos se escaló la técnica a lotes del doble de volumen de biomasa y producto (*D. Carota* y *M. huitzilopochtli*), para tratar de tener una mayor cantidad de producto. Mediante CCF (con una mezcla eluyente de Hexano: Acetato de etilo [7:3]) se observan los posibles bioproductos y se purificaron mediante cromatografía en capa preparativa o en cromatografía en columna, y se caracterizaron por sus datos espectroscópicos (IR, MS y RMN-¹H) A continuación se mencionan los resultados obtenidos para cada cultivo utilizado

Con *D. carota L* se trabajaron cultivos en suspensión homogenados y no homogenados. En el caso de los ensayos con células en suspensión no se encontró la formación del diferulato, a pesar de que estudios previos (Chibbar et al., 1984), reportan que los cultivos en suspensión de *D. carota* si producen peroxidasas extracelulares. De tal forma, se comenzaron a homogenizar los

cultivos, los cuales si realizaron el acoplamiento del ácido ferúlico, aunque con un rendimiento ($p_{\text{prod}}/p_{\text{sust}}$) por debajo del 5 % (Tabla 3)

Al realizar el ensayo con *P. trinervia* Cav. solo se realizaron con cultivos homogenizados, tanto en callo como en suspensión. En ambos casos se obtuvo la formación del diferulato, el cual presentó un r_f similar el del bioproducto de la biotransformación anterior. 0.65 y 0.66, respectivamente. El rendimiento resultó mayor en el caso de los callos (Tabla 3), en el caso de los cultivos en suspensión no se presenta el rendimiento debido a la escasez de biomasa

En el caso de *M. huitziopochtli* se trabajó solo con callo homogenizado. En este ensayo también se obtuvo un producto con un $r_f = 0.66$, que representaba las mismas características de CCF que los bioproductos de los dos ensayos anteriores. una banda color guinda al revelar la placa. El rendimiento fue mejor, por arriba del 10% (Tabla 3).

La última prueba se realizó con cultivos en callo homogenizado de *N. tabacum*, los cuales arrojaron resultados similares a los ensayos anteriores (Tabla 3). En esta caso no se presentan los rendimientos debido a que el material celular era escaso.

A todos los productos obtenidos se les realizó un prueba con radical DPPH para determinar su actividad antioxidante, a la cual el producto principal dio positivo en todos los casos

También se realizó la síntesis química del ácido-5,5'-diferúlico según la describió Yamamoto et al (1998), el cual sirvió como apoyo para caracterizar el producto

Tabla 3. Ensayos de biotransformación del ácido ferúlico.

BIOCATALIZADOR	ESTADO	HOMOGENADO	PRODUCTO	R _f *	η (%)	m _{prod}
<i>D. carota</i> L.	Susp.	No	No	-	-	-
<i>D. carota</i> L.	Susp.	Sí	Sí	0.66	4	10
<i>P. trinervia</i> Cav.	Callo	Sí	Sí	0.65	12	30
<i>P. trinervia</i> Cav	Susp.	Sí	Sí	0.66	-	-
<i>M. huitzilopochtli</i>	Callo	Sí	Sí	0.66	12	30
<i>N. tabacum</i>	Callo	Sí	Sí	0.66	-	-
<i>C. sativa</i>	Callo	Sí	No	-	-	-
<i>C. sativa</i>	Susp	No	No	-	-	-

Abreviaciones:

Susp = Cultivo en suspensión

η = Rendimiento (peso producto/ peso sustrato)

M prod = masa de producto (en mg)

*El r_f reportado es de CCF con la mezcla de elusión Hexano Acetato de etilo (7:3)

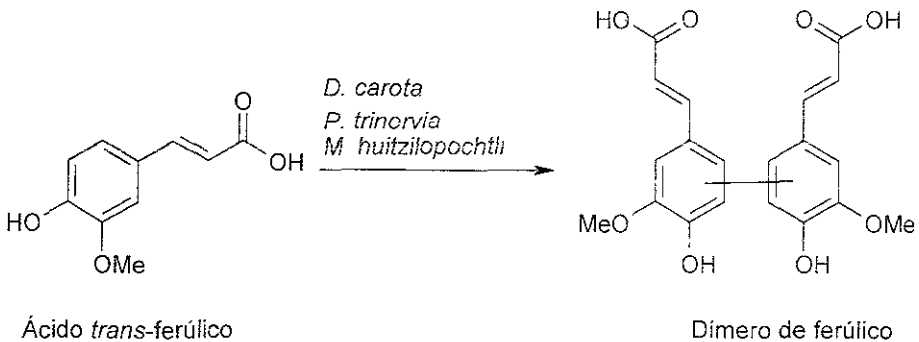


Figura 12 Diagrama de biotransformación por CCV del ácido ferúlico al dímero

BIOTRANSFORMACIÓN DEL EUGENOL

Debido a los resultados obtenidos en los ensayos del ácido ferúlico, los ensayos de biotransformación del eugenol se llevaron a cabo siguiendo la misma técnica

El primer ensayo que se realizó fue con cultivos en suspensión de *D. carota* L. los cuales mostraron la formación de un compuesto producto del acoplamiento del eugenol a bis-eugenol. Este mostró un r_f = 0.64 y un rendimiento del 9 % (tabla 4). Al mismo tiempo se probaron cultivos en suspensión homogenados, los cuáles

mostraron los mismos resultados. En este caso también se escalaron las cantidades de biomasa y sustrato para obtener mayor cantidad de producto.

Las pruebas con cultivos en callo homogenizados de *M. huitzilpochtli* y *N. tabacum* no presentaron la formación del bioproducto esperado (tabla 4). En el caso de *N. tabacum* ya se tenía reportado la producción de peroxidasa extracelulares en cultivos en callo (Bakardjieva et al., 1987).

Al igual que en el caso de los productos de biotransformación del ácido ferúlico, a los obtenidos en estos ensayos se les realizó la prueba del DPPH para determinar la actividad antioxidante, a la cual el producto principal en todos los casos mostró ser positiva.

Para ayudar en la caracterización del producto, se sintetizó el bis-eugenol según el método reportado por Ogata et al (2000), el cual se comparó por espectroscopia y en pruebas de CCF con el producto obtenido en este bioensayo

Tabla 4 Biotransformación del eugenol.

BIOCATALIZADOR	ESTADO	HOMOGENDO	PRODUCTO	Rf*	η (%)	m _{prod}
<i>D. carota L.</i>	Susp.	No	Sí	0.64	9	22.5
<i>D. carota L.</i>	Susp.	Sí	Sí	0.64	**	22.5
<i>M. huitzilpochtli</i>	Callo	Sí	No	-	-	-
<i>N. tabacum</i>	Callo	Sí	No	-	-	-
<i>C. sativa</i>	Callo	Sí	No	-	-	-

Abreviaciones:

Susp. = Cultivo en suspensión

η = Rendimiento (peso producto/ peso sustrato)

M_{prod} = masa de producto (en mg)

* El rF reportado es de CCF con la mezcla de elución Hexano, Acetato de etilo (7:3)

** En base a su rF se juntaron los productos de ambas biotransformaciones, siendo el rendimiento producto de ambos

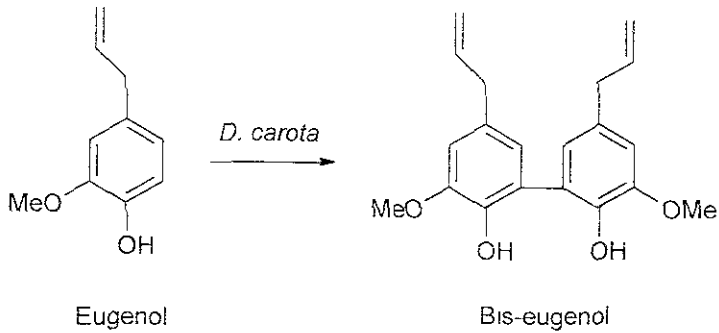
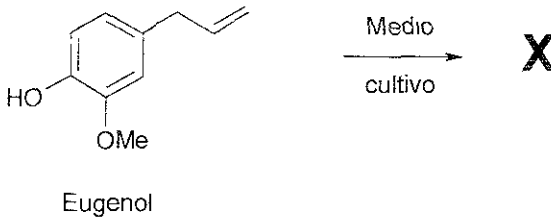
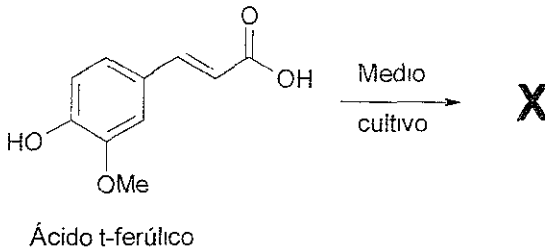


Figura 13 Diagrama de biotransformación del eugenol a bis-eugenol por CCF

ELABORACIÓN DE TESTIGOS



Para cada uno de los cultivos utilizados, con ambos sustratos, se realizaron “testigos” o “blancos”. El primero de ellos se hizo de la siguiente manera: A una porción conocida de biomasa, sin agregar sustrato, se le sometió al mismo tratamiento que a su contraparte con sustrato. Una vez terminado el periodo de biotransformación, por medio de CCF se observó que en ningún caso se formó un producto nuevo.

El segundo consistió en agregar el sustrato al medio de cultivo sin material celular, colocándose en las mismas condiciones de incubación. El igual que el otro testigo, por CCF se observó que no se formaba ningún producto y se recuperaba el sustrato. En todos los casos, estos blancos fueron utilizados como punto de referencia para observar la formación de los bioproductos.

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS

Los productos de biotransformación del ácido ferúlico y eugenol fueron purificados de acuerdo a los criterios de la CCF, por cromatografía en columna y por cromatografía en placa preparativa, según los criterios generales de estos procedimientos.

El producto de la biotransformación del ácido ferúlico se purificó por cromatografía en columna, con una mezcla eluyente de Hexano:Acetato de etilo (7.3), en las fracciones 8 a 15

El producto de biotransformación del eugenol se purificó por cromatografía en placa preparativa, con la misma mezcla eluyente.

Una vez realizada la purificación de los productos de biotransformación, se procedió a su caracterización:

El producto de la biotransformación del ácido ferúlico formó un aceite color ámbar, se envió a espectrofotometría de IR (en película), MS y RMN-¹H

El producto de la biotransformación del eugenol fue un sólido amarillo pálido, por lo que se envió a espectrofotometría de IR en pastilla de KBr, a MS y a RMN-¹H

Para ambos productos, la resonancia se corrió con CDC₃.

DISCUSIÓN

La peroxidación de los lípidos de la membrana celular da como resultado un cambio en las características de transporte de esta, lo que eventualmente lleva a la muerte de la célula. Además, diversos estudios (Reiss et al, 1976; Schultze-Osthoff et al, 1992; Urano et al, 1976; Sun, 1990) muestran que la peroxidación de los lípidos, causada por radicales libres, podría estar asociada con el envejecimiento y enfermedades como la arteriosclerosis, la diabetes o el cáncer. De tal forma, resulta importante desarrollar compuestos que ayuden en la prevención de la oxidación. Una posibilidad la representan los compuestos fenólicos, que están relacionados con actividad antioxidante. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran el ácido ferúlico y el eugenol, cuyos dímeros presentan una mayor actividad antioxidante que la de los monómeros (Ogata et al, 2000; Williamson et al, 1999).

Entre los distintos métodos que se encuentran en la literatura para obtener estos compuestos (Ogata et al, 2000; Yamamoto et al, 1998), la utilización de CCV proporciona condiciones de reacción más suaves que los métodos convencionales de síntesis química.

Otra fuente de los dímeros del ácido ferúlico (diferulatos) está en la cascarilla de cereales, pero estos son difíciles de extraer (p. ej., saponificación) y presentan bajos rendimientos (García-Conesa et al. 1999), por ejemplo el reportado por Andreasen et al para el centeno: 307 $\mu\text{g/g}$ de peso seco; lo que vuelve a la opción de la biosíntesis viable en la producción de este tipo de compuestos.

Además de los datos expuestos y de las ventajas que el trabajar con CCV representa en la formación de este tipo de compuestos, poco ha sido publicado al respecto, por lo que esta investigación pudiera ayudar en el desarrollo de esta metodología.

BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO

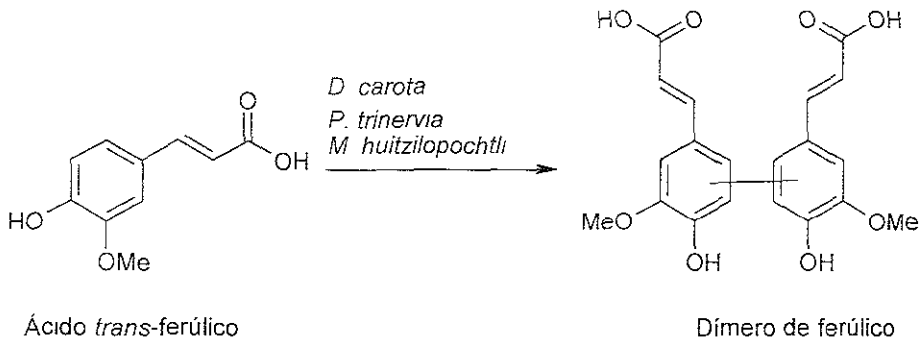


Figura 12 Biotransformación del ácido ferúlico a su dímero mediante CCV

La biotransformación del ácido ferúlico se llevó a cabo con CCV de *P. trinervia* Cav. (en suspensión y callo, homogenados), *M. huitzilopochtli* (en callo, homogenizado), *D. carota* L. (en suspensión, con y sin homogenizar) y *N. tabacum* (en callo, homogenizado)

En los casos de los cultivos en suspensión de *D. carota* L. y en callo de *N. tabacum* ya se tenían reportes de la presencia de peroxidasas en los medios de cultivo (Chibbar et al, 1984; Bakardjieva et al, 1987), mientras que en los casos de *P. trinervia* y *M. huitzilopochtli* no se tenían reporte de la presencia de peroxidasas. Todos estos CCV realizaron el acoplamiento oxidativo del ácido ferúlico y se puede destacar que en todos los casos los CCV fueron homogenizados. Para el caso de los cultivos que estaban en suspensión se podría sugerir que las peroxidasas que realizan la dimerización del ácido ferúlico presentes en los cultivos utilizados son endógenas, debido a que sin homogenizar el material celular no se observaba formación del mismo producto. En el caso de la *M. huitzilopochtli* no se podría concluir algo, ya que no se comprobó si se excretaban las enzimas al medio de cultivo sólido.

Tres de los cuatro cultivos dieron mejores resultados, *D. carota* L., *P. trinervia* y *M. huitzilopochtli*, ya que la presencia del producto en CCF era muy

con una muestra del testigo y del sustrato en CCF, con una mezcla eluyente de Hexano:Acetato de etilo (7:3) y revelado con una mezcla oxidante. También se realizaron pruebas con mezclas que revelan la presencia de un compuesto antioxidante (radical DPPH), dando positivo en todas ellas. En los casos en los que se obtuvo el producto deseado se observó la formación de una mancha color guinda y un $R_f = 0.66$.

De entre los tres cultivos mencionados, el que presenta mejores resultados es el CCV de *M. huitzilopochtli*, por dos razones. Se obtiene un mejor rendimiento (12 %) y por CCF se podía observar una menor recuperación de sustrato. El rendimiento de esta reacción se podría mejorar con una lisis mayor del material celular, ya que al ser este muy duro, resultó muy difícil de homogenizar.

A pesar de que los rendimientos presentados en el ensayo de *P. tinnervia* parecieran ser suficientes para su caracterización, la purificación se convirtió en un paso limitante, ya que los datos de espectrofotometría obtenidos con este compuesto no resultan muy claros. El único dato que corrobora la presencia del dímero lo presenta una señal de 386 m/z en el espectro de masas, siendo al momento difícil conocer con precisión el tipo de dímero del que se trate. El único dímero descartado es el 5,5', ya que se sintetizó en el laboratorio y después de comparar datos de espectrometría y de CCF se observó que no presentaban características similares (a excepción del PM).

Cabe señalar que también fueron sintetizados los dímeros 4-O-8' y 5-O-8' según el procedimiento de Larsen et al (2001), con los cuáles el compuesto que obtuvimos presenta características similares de actividad antioxidante y PM, por lo que se sugiere sean estos los candidatos más viables en la biotransformación del ácido ferúlico por los CCV utilizados.

Por otra parte, debido a que poca información se encuentra disponible acerca de la utilización de peroxidasas de origen vegetal en el acoplamiento oxidativo de compuestos fenólicos como el ácido ferúlico o el eugenol, pero

teniendo en cuenta la forma general en la que trabajan este tipo de enzimas, se propone el siguiente mecanismo de reacción (figura 13)

La enzima, o enzimas, forman un radical $O\cdot$ en el hidroxilo enlazado al C_4 del ácido ferúlico. Este electrón comienza a deslocalizarse, formando un enlace tipo carbonilo con el C_4 y creando un nuevo radical en la posición 5. De nueva cuenta, al deslocalizarse este electrón del radical, se forma un doble enlace y un nuevo radical en la posición 1, el cual es complicado para formar un acoplamiento debido al impedimento estérico. A diferencia de lo que ocurre con la deslocalización del electrón en el eugenol, en el ácido ferúlico la presencia de una cadena alifática insaturada lateral ocasiona que la deslocalización se dirija hacia la cadena, formando un radical en el C_8 .

Este mecanismo coincide con los dímeros del ácido ferúlico que han sido aislados de las paredes celulares de distintos cereales (Ralph et al., 1994), formando isómeros con enlaces en las posiciones en donde se han formado los radicales 5,8'-, 4,8'-, 4-O-5', 4-O-8', 8,8'-, entre otros. Si bien el único dímero que se ha preparado sintéticamente vía peroxidasa es el 5,5', además de que es en esta posición en la que se encuentra esterificado con los arabinoxilanos (Ralph et al., 1994)

Para el caso de la formación del ácido-5,5'-diferúlico, se sugiere que a partir del esquema B, los dos radicales formados en las posiciones 5 comparten sus electrones para formar un enlace y estabilizar ambas moléculas (figura 14).

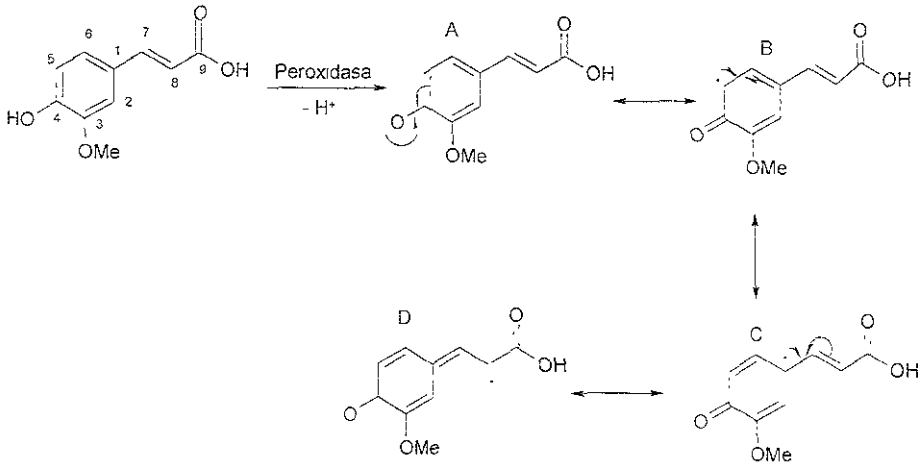


Figura 13 Esquema propuesto para la formación de un radical del ácido ferúlico por deslocalización electrónica

En comparación con un método de síntesis química del dímero 5,5' (Yamamoto et al, 1998) (figura 15), en el que se parte de un compuesto con mayor valor comercial (vainillina) que el del ácido ferúlico y se utilizan reactivos tóxicos como el FeCl₃, H₂SO₄ o NaOH. Además, esta técnica requiere de la acetilación del carbonilo para formar la cadena alifática lateral, previa formación de la di-vainillina. Esto es, con la utilización de la técnica propuesta en este trabajo se evitan la utilización de reactivos de difícil manejo y un paso de la reacción de la síntesis química convencional.

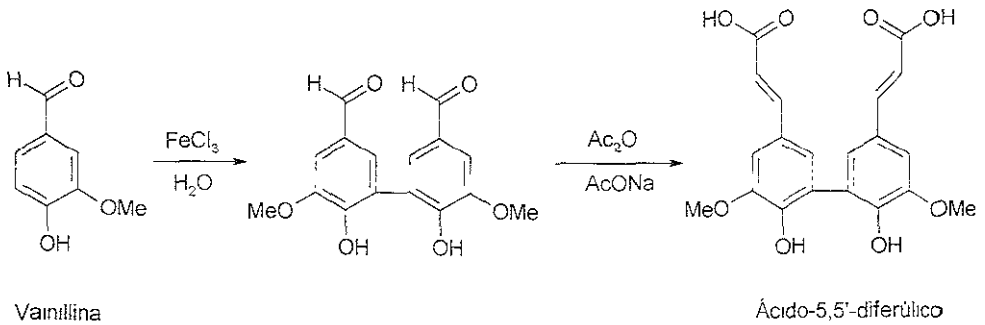


Figura 15 Esquema de reacción para la formación del ácido-5,5'-diferúlico (Yamamoto et al, 1998)

BIOTRANSFORMACIÓN DEL EUGENOL

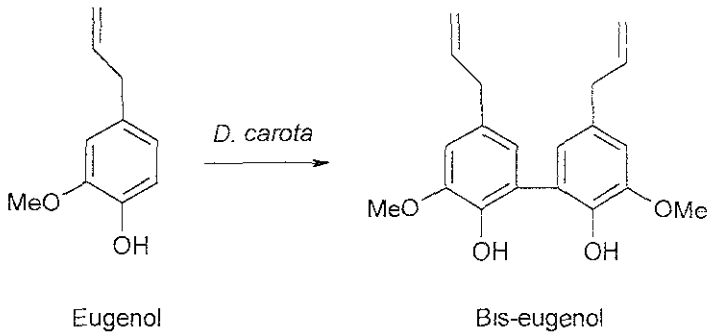


Figura 16 Biotransformación del eugenol a bis-eugenol mediante CCV

La biotransformación del eugenol se llevó a cabo con CCV de *D. carota* L. (en suspensión, con y sin homogenizar) y de *M. huitzilpochtli* y *N. tabacum* (en callo, homogenados). Solo en el caso de los cultivos en suspensión de *D. carota* L. se encontró la formación del bis-eugenol, con un bajo rendimiento (9 %). La presencia del producto se monitoreó inicialmente por CCF, tal y como se realizó con el ácido ferúlico. En este caso, se observó una banda roja con un $rF = 0.64$, menor al presentado por el eugenol (0.70). También se realizaron pruebas de actividad antioxidante (radical DPPH), a las cuales el producto presentó actividad positiva.

A pesar de tener reportado la presencia de peroxidasas en cultivos en suspensión de *D. carota* L. (Chibbar et al, 1994), no se tienen reportes de su utilización como fuente de peroxidasas para el acoplamiento oxidativo del eugenol. Así que suponemos que el pobre rendimiento de la formación del bis-eugenol pudiera deberse a una baja concentración de la enzima en el medio de cultivo, o bien a una relación de concentraciones muy diferente entre enzima y sustrato. Ahora se pasará a analizar el mecanismo de reacción seguido en la biotransformación.

El mecanismo por el cual ocurre el acoplamiento oxidativo del eugenol utilizando CCV es similar al descrito para el ácido ferúlico. Se sugiere un mecanismo de deslocalización electrónica (formación de un radical) (figura 17), comenzando con la formación del radical $O\bullet$ del grupo hidroxilo, a partir de la

acción de la peroxidasa. Esto ocasiona la dislocación electrónica que se “estabiliza” dentro del fenilo, provocando distintas estructuras de resonancia. Una de ellas (estructura B) posee un radical $C_5\bullet$ en el C_5 del anillo, el cual se puede estabilizar al compartir el electrón libre de otra estructura tipo B, con un radical en el C_5 , formando así el enlace 5,5' que da pie a la dimerización.

Posteriormente, por el efecto electroattractor de los átomos de O en posición orto al nuevo enlace, el par electrónico de enlace del C_5 es atraído hacia el anillo, formando de nueva cuenta un anillo bencénico. Los átomos de O enlazados al C_4 del anillo vuelven a formar un grupo hidroxilo al formar un enlace con los hidrógenos que habían quedado como protones dentro del medio de reacción (figura 18)

Ya que este trabajo presenta un objetivo principalmente cualitativo, es decir, observar si los CCV utilizados podían realizar el acoplamiento oxidativo de estos compuestos fenólicos, no es posible determinar con exactitud cual es el papel de la o las enzimas dentro del mecanismo de reacción, ya que no se trabajó en la identificación de estas.

La identificación de este compuesto se dio por espectrofotometría de IR, MS y RMN- 1H , en base a las siguientes observaciones:

En primera instancia, el espectro de IR presenta datos similares a los del sustrato, estos es bandas de absorción para grupos $-OH$ (3300 cm^{-1}) y $-OMe$ enlazado a un grupo aromático (1250 cm^{-1})

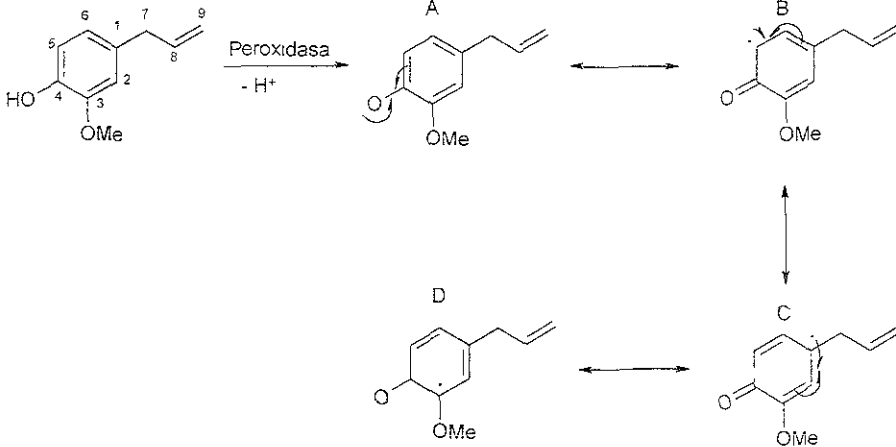


Figura 17 Mecanismo de formación del radical del eugenol (deslocalización electrónica) para la formación del bis-eugenol

El espectro de masas muestra claramente un ión M^+ de 326 (100), lo que refiere al peso molecular del dímero

En el caso de la resonancia se pueden apreciar claramente datos de la formación del dímero propuesto: a δ 6.76 y 6.74 ppm se observan un par de dobletes con una J igual (1.9 Hz) que integran para 2H en posición meta; además de que las señales de orto desaparecen, dando la posición en la que se dimerizó (5-5').

También se observa un singulete en 3.93, el cual integra para 6H, lo que nos indica 2 grupos CH_3 . Otra señal, un doblete con δ = 3.38 y que integra para 4H, nos muestra la presencia de dos grupos metilo en la cadena alifática

El que el bis-eugenol presente una mayor actividad antioxidante que el eugenol puede deberse a la presencia de dos átomos de O por mol, además de la presencia de dos anillos bencénicos, lo que vuelve a la molécula más estable en la dislocación del radical que genera la peroxidación. Estos resultados sugieren además, que la presencia de un grupo sustituyente grande en posición orto con respecto al grupo hidroxilo es importante en el mecanismo de acción como antioxidante de esta molécula (Ogata et al, 2000).

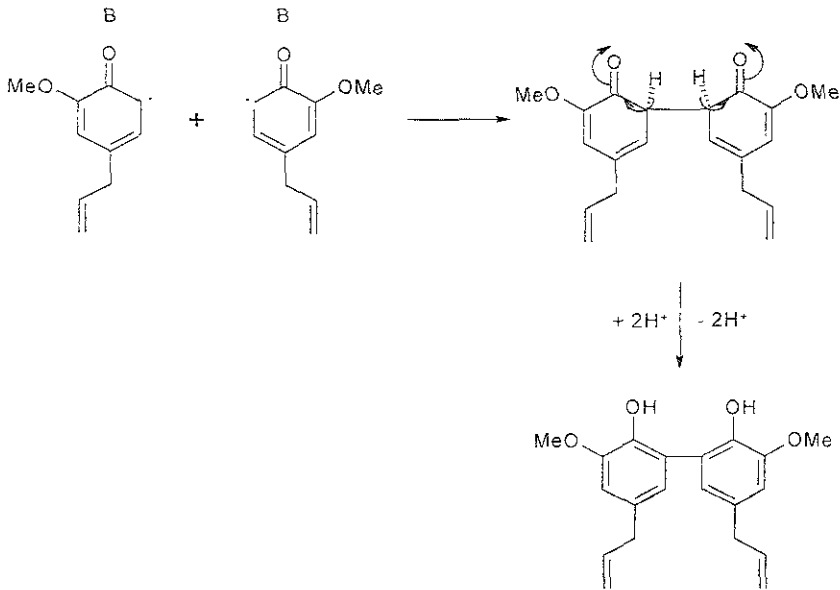


Figura 18 Formación del bis-eugenol a partir del enlace de dos radicales del eugenol.

Con respecto a las ventajas que representa este procedimiento en la formación del bis-eugenol a partir del eugenol sobre un método de síntesis química clásica

Un método de síntesis química tradicional (figura 19), es el propuesto por Ogata et al. (2000), y consiste en oxidar el eugenol (disuelto en piridina) con una mezcla de H_2O_2 y FeSO_4 , a una temperatura de $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h. El producto se extrae con AcOEt y se recristaliza de etanol. Como se puede observar este proceso requiere de más pasos en la formación del dimer que le mecanismo que se propone. Además, requiere de condiciones de reacción mucho más fuertes, como la utilización de reactivos químicos altamente tóxicos como el sulfato ferroso y la piridina. Mientras que en el método que se sugiere en este trabajo no es necesario utilizar reactivos químicos de esta naturaleza. El punto negativo del proceso propuesto es el bajo rendimiento ya que Ogata et al. reportan un rendimiento del 35.6 %, arriba de 10 veces mayor al reportado en este trabajo. Esto hace que se tenga la necesidad de optimizar el proceso para obtener un mejor rendimiento.

Una forma de optimizarlo sería aislar la enzima y desechar el material celular extra, para aumentar la relación enzima-sustrato

Cabe resaltar que esta síntesis se realizó en el transcurso de los bioensayos para comparar los resultados que se obtuvieron en ellos, resultando en concordancia los datos de espectrometría y de CCF entre ambos.

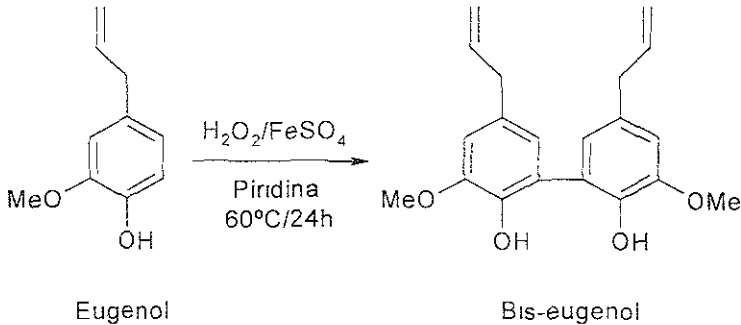


Figura 19 Síntesis química del bis-eugenol (Ogata et al 2000)

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos son alentadores por varios factores. En primer lugar la formación de compuestos con una alta actividad antioxidante, por un método menos agresivo para el medio ambiente. También se puede presumir la presencia de peroxidasas en dos CCV de los cuales no se tenía reporte alguno: *M. huitzilopochtli* y *P. trinervia*. Por último, la obtención de nuevas fuentes de peroxidasas, ya que sólo son conocidas comercialmente las de rábano o HRP (Moreno et al, 1990)

A la vez de alentadores, estos resultados promueven una mayor investigación al respecto. De inicio se deben aislar, purificar y caracterizar la o las enzimas presentes en cada cultivo, así como una cinética (tanto enzimática como de crecimiento celular) para saber el momento en que se producen más. También resultaría útil conocer la relación enzima-sustrato, para evitar una saturación o

inhibición de la enzima, como lo sería también conocer la regioselectividad de la enzima

Tomando en consideración la presencia de peroxidasas, a los cultivos de *D. carota* L. se le realizaron pruebas de actividad de peroxidasa, la cual resultó bastante alta. Así, sería conveniente , medir la actividad de peroxidasa en los CCV, principalmente extracelular.

En un trabajo más adelantado, desde un punto de vista de genética, se podría intentar sobreproducir la enzima para obtener rendimientos mayores. Otra forma de mejorar los rendimientos sería la de intentar aislar las estructuras de resonancia útiles para la formación de los dímeros, ya que no todos los dímeros poseen una mayor actividad antioxidante (Williamson et al, 1999)

De esta forma la investigación en torno al acoplamiento oxidativo de compuestos fenólicos mediante cultivos de células vegetales aparenta tener un amplio camino por recorrer, con diversas investigaciones que hacer al respecto.

CONCLUSIONES

- Se probaron 4 diferentes cultivos de células vegetales como biocatalizadores *Daucus carota L.* y *Piqueria trinervia Cav* en suspensión (con y sin homogenizar). *Piqueria trinervia Cav.*, *Mammillaria huitzilopochtli* y *Nicotiana tabacum* en medio sólido (homogenizados)
- *Piqueria trinervia Cav.* (callo) y *Mamillana huitzilopochtli* resultaron ser los adecuados para la biotransformación del ácido ferúlico a un compuesto con una diferente actividad antioxidante
- *Daucus carota L.* (suspensión y homogenizado) resultó ser el mejor biocatalizador, de los propuestos, para la biotransformación del eugenol a un compuesto con una diferente actividad antioxidante.
- Los productos obtenidos en ambos casos, purificados y caracterizados, resultaron ser dímeros de los sustratos originales.
- El producto de la biotransformación del eugenol es el bis-eugenol.
- El producto de la biotransformación del ácido ferúlico se sugiere sea el 4-O-5' o el 8-O-5'.
- Los productos obtenidos en este estudio presentaron actividad antioxidante, ya que dieron positiva a la prueba del DPPH

BIBLIOGRAFÍA

- Aburto, J. Producción de Ácido Glucónico por el Sistema Bienzimático Glucosa Oxidasa-Glucosa Deshidrogenasa. (1994). Tesis de licenciatura, Facultad de Química, U N.A.M.
- Akabe, Y.; Takahashi, M.; Kamezawa, M.; Kikuchi, K.; Tachibana, H.; Ohtani, T & Naoshima, Y. Biocatalytic Preparation of Chiral Alcohols by Enantioselective Reduction with Immobilized Cells of Carrot. (1995). *J. Chem. Soc.*, pp 1295-1298.
- Andreasen, M. F.; Christensen, L.P.; Meyer, A.S. & Hansen, A. Ferulic Acid Dehydrodimers in Rye (*Secale cereale L.*). (2000). *J. Cereal Sci.* 31, pp. 303-307
- Andreoni, V.; Bernasconi, S. & Bestetti, G. Biotransformation of Ferulic Acid and Related Compounds by Mutant strains of *Pseudomonas fluorescens*. (1995). *Appl. Microbiol Biotechnol.* 42, pp. 830-835.
- Bakarjieva et al. (1987); citado en Moreno, O. A. (1990).
- Bednarski et al (1989); citado en Turner (1994)
- Chadha, A.; Mahonar, M.; Soundararajan, T. & Lokeswari, T.S Assymmetric Reduction of 2-Oxo-4-Phenylbutanoic Acid Ethyl Ester By *Daucus carota* Cell Cultures. (1996). *Tetrahedron: Assymetry* 7 (6), pp. 1571-1572.
- Chibbar et al. (1984); citado en Moreno, O A (1990).
- Chin, C & Pederson, H. Production of Phenolic Compounds by Cultured Plant Cells. (1992). "Phenolic compounds in food and their effects on health", Vol. I. Chapter 3, pp. 51-56. American Chemical Society.
- Crout et al (1990); citado en Turner (1994)
- Couteau, D & Mathaly, P Fixed-Bed Purification of Ferulic Acid From Sugar-Beet Pulp Using Activated Carbon Optimization Studies (1998). *Bioresource Technology* 60, pp. 17-25
- Dhingra (1982); citado en Guo et al (1997)
- DiCosmo, F, Facchini, P.J. & Kraml, M M Cultured Plant Cells-The Chemical Factory Within. (1989). *Chemistry in Britain*.
- Falconnier et al, 1994, citado en Ramachandra & Ravishankar (2000).
- Fry, S C. Phenolic Components of the Primary Cell Wall. (1982). *Biochemistry Journal* 203, pp. 493-504. The Biochemical Society.

Fu, T. Safety Considerations for Food Ingredients Produced by Plant Cell and Tissue Culture. (1998). *Chemtech*, 28 (1), pp. 40-46. American Chemical Society.

Furuya, T.; Asada, Y.; Mizobata, S., Matura, Y. & Hamada, H. Biotransformation of p-Aminobenzoic Acid by Cultured Cells Of *Eucalyptus perriniana*. (1998) *Phytochemistry* 49 (1), pp. 109-111.

García-Conesa, M.T.; Wilson, P.D.; Plumb, G.W.; Ralph, J. & Williamson, G. Antioxidant Properties of 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy- β,β' -Bicinnamic Acid (8,8-Diferulic Acid, Non-cyclic Form). (1999). *J. Sci. Food Agric.* 79, pp 379-384

González, L. F.; Rojas, M. C. & Pérez, F. J. Diferulate and Lignin Formation is Related to Biochemical Differences of Wall-Bound Peroxidases (1999). *Phytochemistry* 50, pp. 711-717

Guo, Z.; Salamonczyk, G.M.; Han, K.; Machiya, K. & Sih, C.J. Enzymatic Oxidative Coupling. (1997). *J. Org. Chem* 62, pp. 6700-6701

Hartley, R. D. & Jones, E. C. Phenolic Components and Degradability of Cell Walls of Grass And Legume Species. (1977). *Phytochemistry* 16, pp. 1531-1534

Huang, Z.; Dostal, L. & Rosazza, J. P. N. Microbial Transformation of Ferulic Acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens* (1993) *Appl. Environmental Microbiology* 57 (7), pp. 2244-2250

Imai, Y. Ogawa, T.; Tsurumi, C.; Kitawa, M. & Tanaka, H. Food Additive and Use Thereof. (1996). US PAT. No. 5,514,398.

Jiménez-Estrada, M. et. al. La Fitoquímica y la Biotecnología en el Desarrollo de Productos De Interés Comercial o Bio-Activos. Artículo No Publicado.

Johnson et al (1982); citado en Turner (1994).

Kato, Y.; Yamanouchi, H.; Hinata, K.; Ohsumi, C. & Hayashi, T. Involvement of Phenolic Esters in Cell Aggregation of Suspension-Cultured Rice Cells. (1994). *Plant Physiology* 104, pp. 147-152

Kutney, J. P. Plant Cell Cultured Combined with Chemistry A Powerful Route To Complex Natural Products. (1993). *Acc. Chem. Res.* 26, pp 559-566.

Kutney, J. P. Plant Cell Cultured Combined with Chemistry. Routes to Clinically Important Compounds. (1997). *Pure Appl. Chem.*, 69 (3). pp 431-436

Lloyd et al (1998); citado en Loughlin (2000).

Loughlin, W. Biotransformations in Organic Chemistry (2000) *Bioresource Technology* 74, pp. 49-62.

Madhavi, D. L., Smith, M. A. L., Linas, A. C. & Mitiku, G. Accumulation of Ferulic Acid in Cell Cultures of *Ajuga pyramidalis Metallica Crispa*. (1997) *J Agric Food Chem.* 45, pp. 1506-1508

McDonald et al.(1973); citado en Guo et al (1997).

Moreno, O. A.; Vázquez-Duhalt, R. & Noiasco, H. Extracelular accumulation of High Specific-Activity preoxidase by Cell Suspensión Cultures of Cowpea. (1990). *Plant Cell Reports* 9, pp. 147-150.

Moreno, O. A.; Vázquez-Duhalt, R. & Ochoa, J. L. Peroxidase Activity in Calluses and Cell Suspensión Cultures of radish *Raphnaus sativus* var. Cherry Bell. (1989). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18, pp. 321-327.

Narbad, A. & Gasson, M. J. Metabolism of Ferulic Acid Via Vanillin Using a Novel CoA-Dependent Pathway in a Newly-Isolated Strain of *Pseudomonas fluorescens*. (1998) *Microbiology* 144, pp. 1397-1405.

Navarro, S. & Vera, R Historia del Cultivo de Tejidos Vegetales (1994) "Cultivo de Tejidos Vegetales". Editado por D Hurtado y M.E. Merino Capítulo 1, pp. 15-34

Ogata, M; Hoshi, M; Urano, S. & Endo, T. Antioxidant Activity of Eugenol and Related Monomeric and Dimeric Compounds. (2000). *Chemical Pharm. Bull* , 48 (10), pp. 1467-1469.

Pilgrim (1970); citado en Wilhelm & Reinhard (1980).

Pomar, F.; Bernal, M.; Diaz, J. & Merina, F. Purification, Characterization and Kinetic Properties of Pepper Fruit Acidic Peroxidase. (1997). *Phytochemistry* 46 (8), pp. 1313-1317.

Ralph, J.; Quideau, S.; Grabber, J.H. & Hatfield, R. Identification and Synthesis of New Ferulic Acid Dehydrodimers Present in Grass Cell Walls. (1994). *J Chem. Soc. Perkin Trans.*, pp. 3485-3498.

Ramachandra, S. & Ravishankar, G. A. Review. Vanilla Flavour: Production by Conventional and Biotechnological Routes. (2000). *J. Sci. Food Agric* 80 pp.289-304.

Riemer, J A. Bitternes inhibitors. (1994) US PAT. No 5,336,513

Roberts, S M Preparative Biotransformations (1999). *J Chem Soc.* 1, pp 1-21

Robles, R. Establecimiento del Cultivo in-vitro de *Mamillaria huitzilopochtli* Para la Obtención de Metabolitos Secundarios. (1999). Tesis de Maestría, Facultad de Química, U.N.A.M.

Ronzio, R.A., Muanza, D.N & Sparks, W.S. Antioxidants Derived From Lentil and its Preparation and uses. (1994). US PAT No. 5,762,936.

Rosazza, J.P ; Huang, Z.; Dostal, L.; Volm, T. & Rousseau, B. Review: Biocatalytic Transformations of Ferulic Acid: An Abundant Aromatic Natural Product. (1995). *J. Ind. Microbiology* 15, pp. 457-471.

Saad, M. I. Efecto de Elicitores Sobre la Producción de Metabolitos Secundarios en *Piqueria trinervia Cav.* (1996) Tesis de Maestría, Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del CCH, UNAM

Sahai, O M. Plant Tissue Culture. (1994) "Bioprocess Production of Flavour Fragrance and Color Ingredients" Editado por Alan Gabelman Capítulo 8, pp 239-275.

Schnittger, S.F & Declercq, L. Antimicrobial Cosmetic Composition. (1997) US PAT. No. 6,114,377.

Scragg, A. H. The Production of Aromas by Plant Cell Cultures. (1994). *Adv. Biochemical Engineering/Biotechnology* 55, pp. 240-263

Stepan-Sarkissian, G. Biotransformation by Plant Cell Cultures (1991). En "Plant Cell and Tissue Culture"; Stafford, A & Warren, G (eds.), pp 163-204

Suga, T. & Hirata, T. (1990). *Phytochemistry* 29, pp. 2393-2406

Szabados, L; Mroginski, L. A. & Roca, W. M. Suspensiones Celulares. Descripción, Manipulación y Aplicaciones. "Cultivo de Tejidos en la Agricultura". Capítulo 8, pp. 173-209

Takemoto, M. & Achiwa, K. Synthesis of Styrenes Through the Decarboxylation of Trans-Cinnamic Acids by Plant Cells Cultures. (1999). *Tetrahedron Lett.*, 40, pp. 6595-6598.

Taniguchi, H; Nomura, E.; Tsuno, T. & Minami, S. Ferulic Acid Ester Antioxidant/UV Absorbent (1999). US PAT. No 5,688,991.

Turner, N.J. Recent Advances in the Use of Enzymes-Catalysed Reactions in Organic Synthesis. (1994) *Nat. Prod. Rep.*, 11, pp. 1-15.

Vázquez-Duhalt, R.; Alcaraz-Meléndez, L. & Greppin, H. Variation in Polar-Group Content in Lipids of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Cell Cultures as a Mechanism of Haloadaptation. (1991) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26, pp. 83-88

Vitali, A.; Monache, G.; Zappia, G., Misiti, D ; Gacs-Baitz, E. & Botta, B. β -Glucosyltransferase in Cell Cultures of *Verbesina caracasana*. (1999) *Heterocycles* 50 (2).

Wilhelm, A. & Reinhard, E. Biotransformation by Plant Cultures. (1980)
Bull Soc. Chim. Fr. 1-2, pp. 11-35 – 11-45.

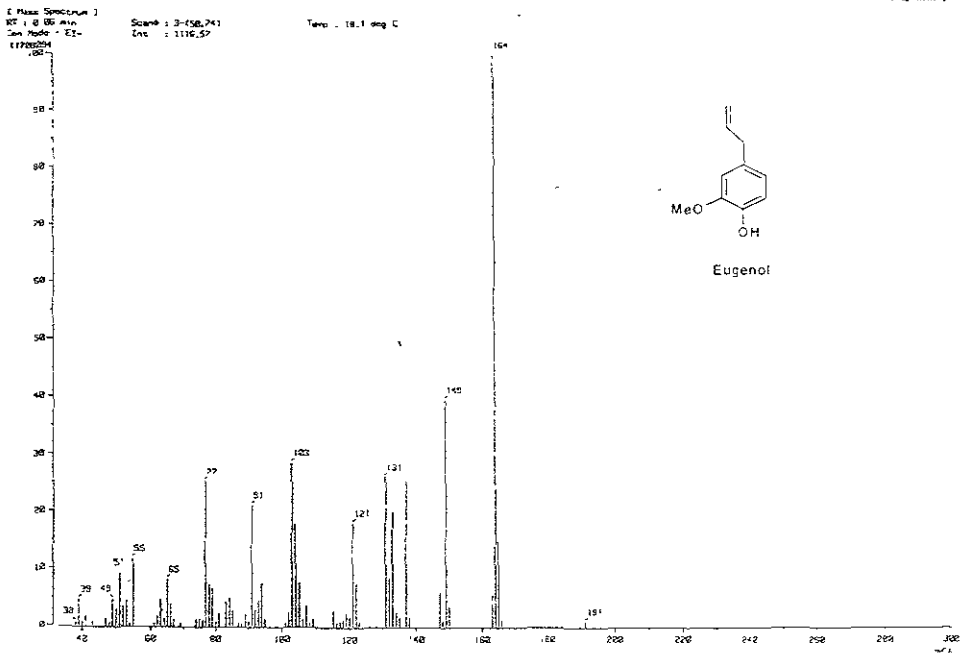
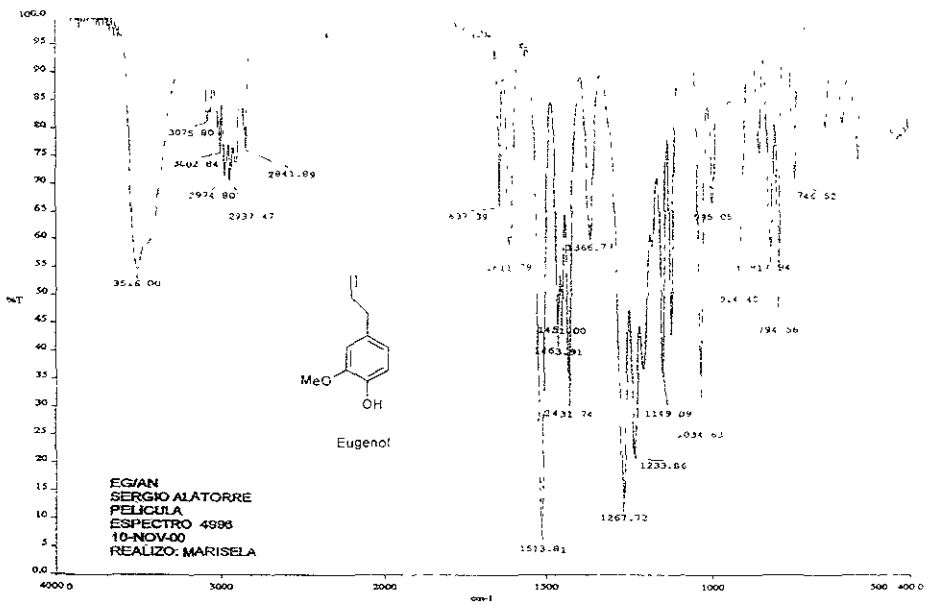
Williamson, G ; Plumb, G & Garcia-Conesa, M. Glycosylation, Esterification and Polymerization of Flavonoids And Hydroxycinnamates: Effects on Antioxidant Properties. (1999). En "Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology". Ed. por Gross, G. et al

Yamamoto, H.; Hoshino, T. & Uchiyama, T. Convienient Preparation and Quantification of 5,5'-Diferulic Acid. (1999). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, pp 390-394

Yamamoto, H. Katano, N. Ooi, A & Inoue, K. Transformation of Loganin and 7-Deoxyloganin into Secologanin By *Lonicera japonica* Cell Suspension Cultures. (1999). *Phytochemistry* 50, pp 417-422.

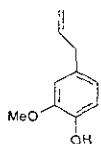
ESPECTROS SELECCIONADOS

ESPECTROS SELECCIONADOS

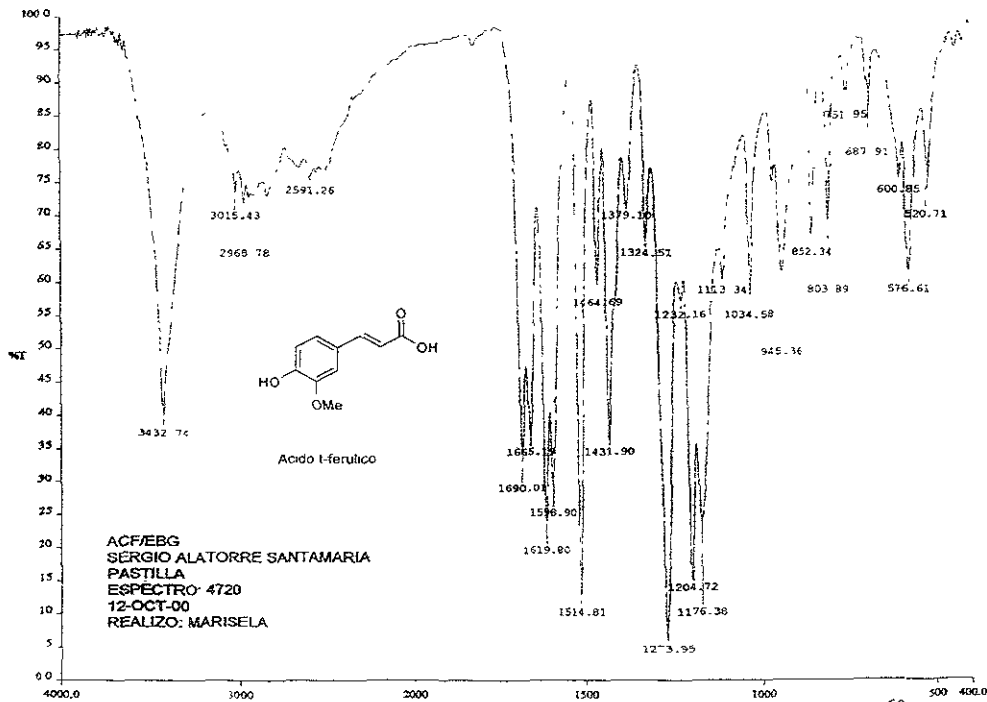
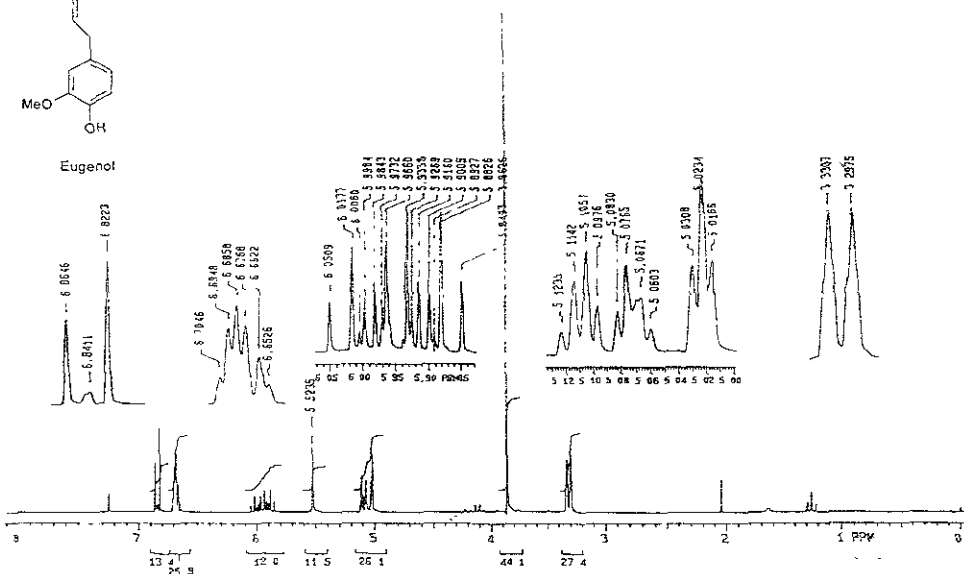


SECRETARIA DE SALUD
 DIRECCION GENERAL DE REGISTRO Y CONTROL DE MEDICAMENTOS

ESPECTROS SELECCIONADOS

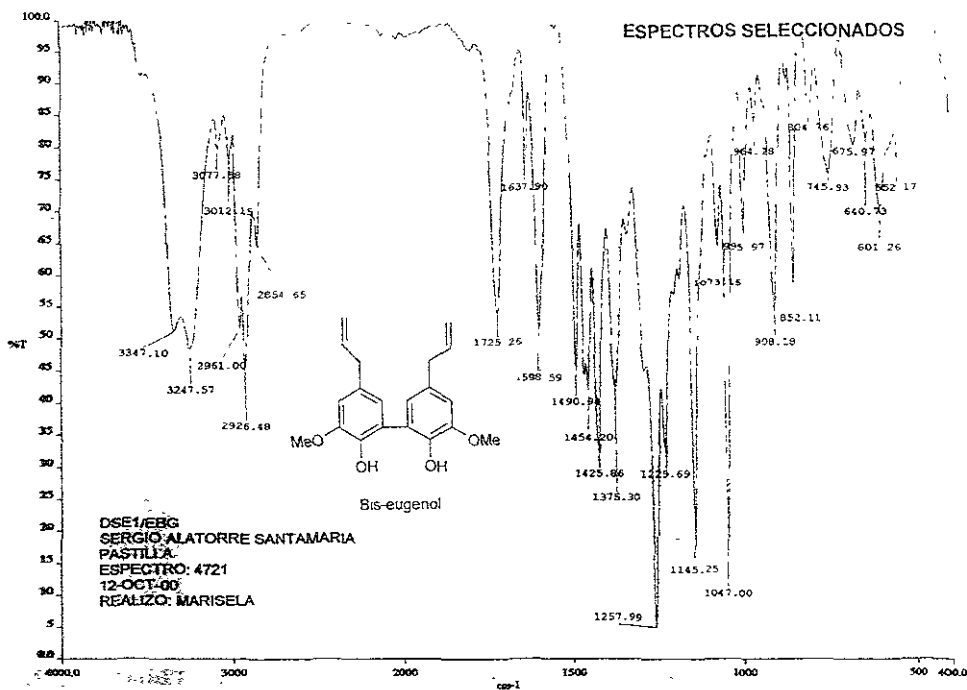


Eugenol

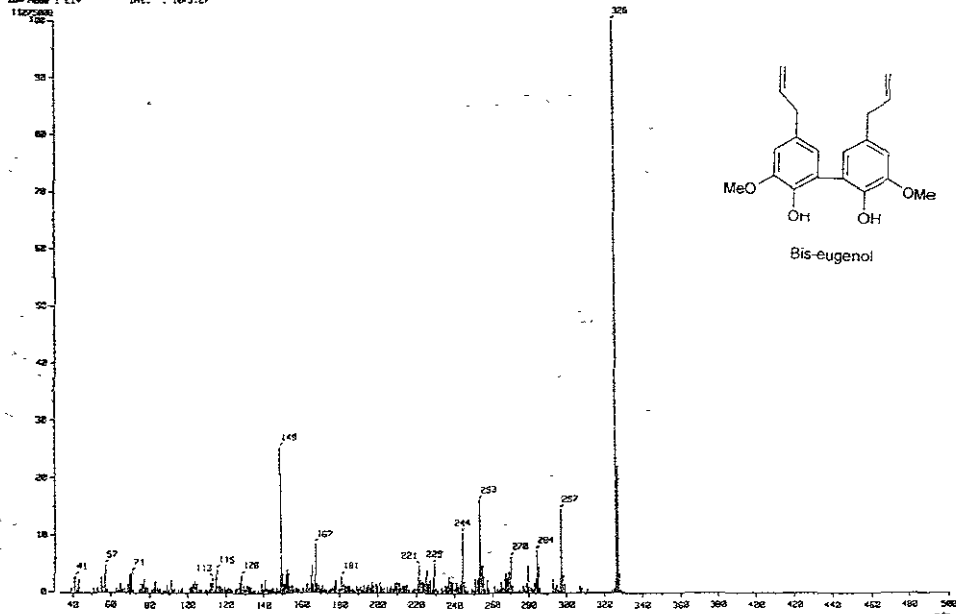


ACF/EBG
 SERGIO ALATORRE SANTAMARIA
 PASTILLA
 ESPECTRO: 4720
 12-OCT-00
 REALIZO: MARISELA

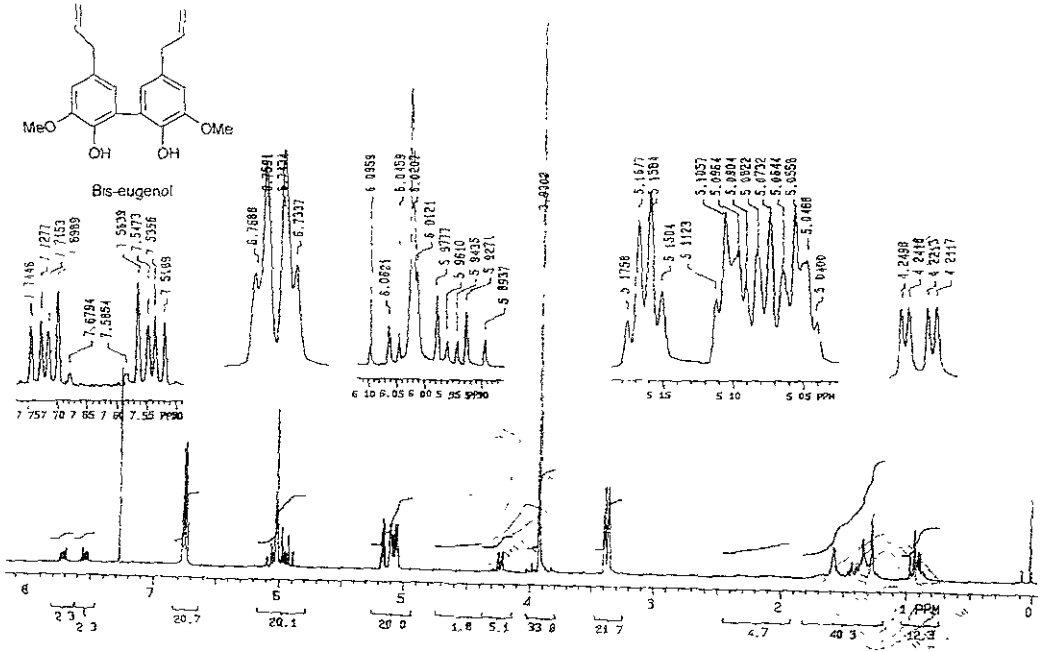
ESPECTROS SELECCIONADOS



F Mass Spectrum 7
 RT: 8.72 min Scan#: 28
 Ion Mode: EI+ Temp.: 20.3 deg.C
 Int.: 1875.27



ESPECTROS SELECCIONADOS



(Mass Spectrum)
 RT 4.33 min
 Scan# 13
 Ion Mode - EI+
 Int 189.08
 Temp 23.6 deg C

