



**Universidad Nacional Autónoma
de México.**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.



Q.F.B (Farmacia industrial).

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

Biotransformación de dos derivados acetilados del pusillatriol — *ent-* beyereno— con hongos filamentosos.

Jiménez Galán David Iván.

No. Cuenta: 30311966-1.

Área específica del proyecto: Química de productos naturales (Química orgánica).

Opción de titulación: Tesis experimental.

Director de tesis:

M. en C. Arturo Eduardo Cano Flores.



México, D.F.

Agosto 2012





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.

Agradecimientos.

A mi madre por el gran amor y la devoción que le tienes a tus hijos, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me has dado, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar obstáculos, por haberme formado como un hombre de bien, y por ser la mujer que me dio la vida y me enseñó a vivirla, siempre con la mayor gratitud por los esfuerzos realizados para que yo lograra terminar mi carrera profesional, siendo para mí la mejor herencia

A mi madre que es el ser más maravilloso de todo el mundo. Gracias por el apoyo moral, tu cariño y comprensión que desde niño me has brindado, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles. Espero algún día te sientas orgullosa de mí...

A mis hermanos Pamela y Mishel les agradezco su cariño y sus consejos, ya que a pesar de que en ocasiones no fui el mejor hermano, saben que siempre contarán conmigo y yo siempre cuidaré de ustedes, porque no importa el tiempo ni la distancia, un hermano cuando se necesita, siempre estará junto a nosotros, los quiero y saben que este logro no es solo mío, es de mi madre y ustedes.

A mi Abuelita Rosa y mi Tía Silvia, sabiendo que no existirá forma alguna de agradecer una vida de sacrificios, esfuerzos y amor, quiero que sientan que el objetivo alcanzado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudó a conseguirlos fue su gran cariño.

A mi primo Alan, quien llegó en un momento que más necesitaba, gracias por cambiar mi mentalidad y sobre todo por hacerme comprender que no importa cuán grandes sean los obstáculos a los que nos enfrentemos, siempre estará junto a nosotros la familia para apoyarnos, porque no hay nada más importante en esta vida que el amor y el soporte que recibas de tu familia.

A mi novia Claudia a quien jamás encontraré la forma de agradecer su apoyo, cariño, comprensión y confianza; esperando que comprendas que mis logros son también tuyos e inspirados en ti, hago de este un triunfo y quiero compartirlo por siempre contigo.



A mis compañeros de la carrera y del laboratorio, a los cuales les agradezco su paciencia y su tiempo, porque en ocasiones cuando necesite un consejo, lo encontraba en ustedes, sin duda todas las anécdotas que compartimos las llevaré siempre conmigo.

A mi Director de tesis y Profesor Arturo Cano Gracias por todos sus consejos, por transmitir sus experiencias y sus enseñanzas, por enseñarme los valores que nos identifican como universitarios, ya que “Tan solo por la educación puede el hombre llegar a ser hombre. El hombre no es más que lo que la educación hace de él”. Sé que su labor ha sido ardua, y estoy consciente de que nada fácil, pero debe saber que cada uno de mis compañeros de laboratorio lo llevaremos en la memoria siempre, porque a pesar de que en ocasiones no lo valoramos lo suficiente, posteriormente nos hemos dado cuenta que su único objetivo es volvernos grandes profesionistas, grandes personas y grandes universitarios. De verdad muchas gracias, y con gran respeto le digo que “El objeto más noble que puede ocupar el hombre, es ilustrar a sus semejantes”.

A la DGAPA a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por el apoyo otorgado al proyecto IN216012-3.

A la DGAPA a través del Programa de Apoyo a Proyectos por la Innovación Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), por el apoyo otorgado al proyecto PE205910.

A la DGAPA a través del Programa de Apoyo a Proyectos por la Innovación Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), por el apoyo otorgado al proyecto PE203712.

A la Carrera de Biología de la FES Zaragoza.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas.

Al Personal Técnico Académico del Instituto de Química.



El presente trabajo fue presentado en el 46° Congreso Mexicano de Química y 30° Congreso Nacional de Educación Química.

México, 2011.



INDICE

Abreviaturas	viii
1.- Introducción.	1
2.- Marco Teórico.	5
2.1.- Generalidades de los Diterpenos.	6
2.1.1.- Clasificación de los terpenos.	7
2.1.2.- Biosíntesis de los diterpenos.	9
2.2.- Generalidades de las biotransformaciones.	16
2.4.- Diferencias entre una biotransformación y una fermentación.	20
2.5.- Características generales de una transformación microbiológica y de una transformación química.	21
2.6.- Biotransformaciones de diterpenos.	22
2.6.1.- Generalidades.	22
2.6.2.- Biotransformación de <i>ent</i> -beyerenos	26
3.- Planteamiento del Problema.	30
4.- Justificación.	32
5.- Hipótesis.	34
6.- Objetivos.	36
6.1.- Objetivo general.	37
6.2.- Objetivos particulares.	37
7.- Material y Método.	39
7.1.- Material y sustancias utilizadas.	40
7.1.1.- Disolventes, sustancias y reactivos.	40
7.1.2.- Medios de cultivo.	40
7.1.3.- Material y equipo utilizado.	40
7.1.4.- Microorganismos.	40
7.2.- Diagramas de flujo.	41
7.2.1.- Resiembra de hongos	41
7.2.2.- Preparación de la solución densa de esporas.	41
7.2.3.- Preparación del medio de cultivo.	41
7.2.4.- Factibilidad y biotransformación cuantitativa.	42
7.2.5.- Separación, purificación y caracterización del 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (31).	43
7.3.- Obtención de los derivados acetilados del 7β,14α,18-trihidroxi-<i>ent</i>-beyer-15-eno (29) y del 3β,7β,14α,18-tetrahidroxi-<i>ent</i>-beyer-15-eno. (30).	44



7.4.- Obtención del 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (31).-----	46
7.5.- Obtención del epóxido del 7 β -acetil-14 α ,18-dihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (23).-----	47
7.6.- Obtención del 7 β ,14 α ,18-triacetoxi-15,16-epoxi- <i>ent</i> -beyereno (32).-----	48
7.7.- Obtención del 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetraacetil-15,16-epoxi- <i>ent</i> -beyereno (33).-----	49
7.8.- Obtención del 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-15,16-epoxi- <i>ent</i> -beyereno (31).-----	51
7.9.- Biotransformaciones.-----	52
7.9.1.- Resiembra de los hongos-----	52
7.9.2.- Preparación de la solución densa de esporas-----	52
7.9.3.- Preparación del medio de cultivo.-----	52
7.9.4.- Factibilidad de la biotransformación del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (29) y el 7 β -acetil-14 α ,18-dihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (23).-----	53
7.9.5.- Biotransformación cuantitativa del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (29) con <i>Aspergillus niger</i> .-----	54
7.9.6.- Extracción y purificación de las mezclas de biotransformación-----	55
7.9.7.- Separación y purificación de la mezcla de productos de biotransformación.-----	55
7.9.8.- Biotransformación cualitativa del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (29) con <i>C. gloesporioides</i> .-----	57
7.9.9.- Determinación de la cinética de la biotransformación de(29).-----	57
8.- Resultados y Análisis.-----	62
8.1.- Obtención de los derivados acetilados del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (29) y del 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetrahidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno. (30).-----	63
8.2.- Purificación del 7 β -acetil-14 α , 18-dihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (23).-----	69
8.3.- Obtención del 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (31).-----	71
8.4.- Obtención del epóxido del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (29).- 74	
8.5.- Obtención del epóxido del tetraacetato del 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetrahidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (34). 76	
8.6.- Caracterización e identificación del producto de la Biotransformación de TAPT (29) con <i>A. niger</i> en medio YEPGA.-----	77
9.- Conclusiones.-----	77
10.- Sugerencias.-----	77
11.- Espectros.-----	77
Espectro 1. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) Triacetato 7 β ,14 α ,18-trihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (29).-----	77
Espectro 2. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , TMS) Triacetato 7 β ,14 α ,18-trihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (29).-----	77



Espectro 3. COSY (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) Triacetato 7β,14α,18-trihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (29).-----	77
Espectro 4. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ , TMS) Tetraacetato de 7β,14α,18-tetrahidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (30).-----	77
Espectro 5. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ , TMS) Tetraacetato de 7β,14α,18-tetrahidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (30).-----	77
Espectro 6. COSY (500 MHz, CDCl ₃ , TMS) Tetraacetato de 7β,14α,18-tetrahidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (30).-----	77
Espectro 7. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) <i>ent</i> -7β-acetil-14α,18-dihidroxi-beyer-15-eno (23). 77	
Espectro 8. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , TMS) 7β-acetil-14α, 18-dihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (23). 77	
Espectro 9. COSY (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) 7β-acetil-14α, 18-dihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (23) 77	
Espectro 10. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ , TMS) 7β,14α-diacetil-18-hidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (31). 77	
Espectro 11. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ , TMS) 7β,14α-diacetil-18-hidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (31). 77	
Espectro 12. COSY (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) 7β,14α-diacetil-18-hidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (31). 77	
Espectro 13. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ , TMS) 7β,14α,18-triacetoxi-15,16-epoxi- <i>ent</i> -beyereno (32).-----	77
Espectro 14. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ , TMS) 7β,14α,18-triacetil-15,16-epoxi- <i>ent</i> -beyereno (32).-----	77
Espectro 15. COSY (500 MHz, CDCl ₃ , TMS) 7β,14α,18-triacetoxi-15,16-epoxi- <i>ent</i> -beyereno (32). 77	
Espectro 16. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ , TMS) 3β,7β,14α,18-tetraacetil-15,16-epoxi- <i>ent</i> -beyereno (33).-----	77
Espectro 17. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ , TMS) 3β,7β,14α,18-tetraacetil-15,16-epoxi- <i>ent</i> -beyereno (33).-----	77
Espectro 18. COSY (500 MHz, CDCl ₃ , TMS) 3β,7β,14α,18-tetraacetil-15,16-epoxi- <i>ent</i> -beyereno (33).-----	77
12.- Bibliografía. -----	77



Abreviaturas

Ac₂O	Anhídrido acético.
AcOEt	Acetato de etilo.
ACN	Acetonitrilo.
7-ACEPT	7β-acetil-14α,18-dihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (23).
AMCPB	ácido m-cloroperbenzoico
APD	Agar papa dextrosa.
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Presión.
CCF	Cromatografía en Capa Fina.
CCV	Cromatografía en Columna a Vacío.
CDCl₃	Cloroformo Deuterado.
COSY	Espectroscopía Homonuclear de Hidrógeno en dos Dimensiones.
DEPT	Aumento sin Distorsión por Transferencia de Polarización.
EM	Espectrometría de Masas.
HMBC	Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces.
HMG-CoA	(3S)-3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.
HSQC	Correlación Heteronuclear Cuántica Sencilla.
IE	Impacto Electrónico.
IR	Infrarrojo.
Hex	hexano.
NADPH	Fosfato Dinucleotido de Nicotidamina Adenina
Py	Piridina.
RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno.
RMN-¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de C-13.
TAPT	Triacetato de 7β,14α,18-trihidroxi- <i>ent</i> -beyer-15-eno (29).
TMS	Tetrametilsilano.
YEPGA	Extracto de levadura, peptona, glucosa y extracto de carne.



1. Introducción



Una biotransformación se define como la conversión de una entidad química a otra por la acción de un sistema biológico, el cual puede ser un microorganismo, un cultivo celular o una enzima aislada de un ente biológico. La aplicación de los procesos biotecnológicos¹ es conocido por la humanidad desde hace miles de años. Los primeros informes de los procesos de fermentación por las civilizaciones antiguas se refieren a la fermentación de los granos de cereales para la producción de bebidas alcohólicas por los sumerios y babilonios (6000 años a. C.). Historias sobre la elaboración de vino están presentes en el libro del Génesis, mientras la levadura para la elaboración del pan ya se utilizaba en el antiguo Egipto (2000 a. C.). Por otro lado, la producción de queso y yogur ha sido realizada por los seres humanos durante miles de años (800 a. C), aunque los agentes responsables de estos procesos eran aún desconocidos.

Actualmente se emplean enzimas libres o inmovilizadas en muchos de los procesos biotecnológicos. Los cuales inician con los trabajos de Luis Pasteur —químico francés, 1822-1895—, quien fue el primero en demostrar que todo proceso de fermentación se debe a la acción de organismos vivos. En 1907, Eduard Büchner —químico alemán, 1860-1917— recibió el premio Nobel de Química por su descubrimiento sobre el proceso de la fermentación, demostrando que la fermentación alcohólica se debe a la acción de unas enzimas llamadas "zimasa", y no a la acción fisiológica de las células de la levadura (en concreto sobre la fermentación alcohólica).

A mediados del siglo pasado, los antibióticos como la penicilina² pasaron a ser obtenidos por procesos fermentativos. Actualmente antibióticos como la estreptomycinina (*Streptomyces griseus*), cloranfenicol (*Streptomyces venezuelae*), neomicina (*Streptomyces fradiae*) y céfalosporina (*Cephalosporium acremonium*) son producidos utilizando cepas de bacterias y hongos. Hasta la fecha, las principales herramientas para la producción industrial de antibióticos es mediante un proceso de fermentación; y sólo algunos pasos se realizan mediante una transformación química para los pequeños cambios estructurales en

¹ El vocablo biotecnología fue usado por primera vez en 1919 por el ingeniero húngaro Karl Ereky. En 1992 fue establecida y definida en la "Convención sobre Diversidad Biológica", como cualquier aplicación tecnológica que usa sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados, para crear o modificar productos o procesos para usos específicos

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



el producto de origen natural [1]. Con el descubrimiento de la estructura tridimensional del ADN por Rosalind Elsie Franklin las técnicas de manipulación genética, basadas en la tecnología del ADN recombinante, ha permitido la obtención de diferentes productos, donde sobresale la producción de insulina recombinante.

Por otro lado, en la literatura especializada se ha reseñado el uso de hongos, bacterias, cultivos de tejidos, enzimas libres o inmovilizadas en la industria de la transformación para la obtención de sustancias con interés farmacéutico, agroquímico, de química fina, en la industria de los alimentos, entre otros procesos. Cabe resaltar que dichos procesos son “amigables” con el medio ambiente. Se considera que de los 134 procesos industriales reconocidos que utilizan, más de la mitad aparecieron en los últimos diez años y la tendencia aumenta notablemente. De estos procesos la mayor parte corresponde al sector farmacéutico, con un 55% y tiene como finalidad obtener fármacos quirales enantioméricamente puros. En esta industria la modificación estructural de los compuestos esteroidales también es una prioridad.

En los últimos años se ha prestado bastante atención a la utilización de microorganismos en síntesis orgánica. Este interés radica en la *regio* y *estéreo*-selectividad de los sistemas enzimáticos, los cuales permiten que determinados tipos de compuestos puedan sintetizarse con buen rendimiento y alto grado de pureza, no existiendo alternativas químicas paralelas para su obtención. Algunas enzimas presentan especificidad casi absoluta por un determinado substrato y no actúan sobre moléculas con estructura incluso similar. Otras, sin embargo, no poseen esa especificidad y son capaces de actuar sobre un gran número de moléculas que poseen características comunes.

Por otro lado, desde el punto de vista de los procesos semisintéticos de productos naturales, la introducción de un grupo hidroxilo es muy útil, pues es un grupo funcional muy versátil que abre una serie de posibilidades de reacción en el carbono sobre el que está situado y sobre la zona vecina de la molécula. En este caso los sistemas enzimáticos involucrados son monooxigenasas, particularmente el citocromo P-450. Estos procesos han sido revisados por Kieslich [2] y Mikami [3].



Además, es importante destacar que las biotransformaciones son el principio de la biorremediación, lo que constituye una contribución a la generación de procesos industriales de bajo impacto ambiental, ya que los organismos eucariontes tienen un sistema de defensa en contra de agentes químicos externos (agentes xenobióticos) que le pudieran causar algún daño total o parcial, esto se logra por diferentes transformaciones químicas, en condiciones fisiológicas, para posteriormente eliminarlas por medio de un sistema enzimático, que actúa como biocatalizador.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se describen los resultados de la biotransformación de dos derivados acetilados del pusillatriol³— el triacetato de 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) y el 7 β -acetil-14 α ,18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**)— diterpenos tetracíclicos derivados del *ent*-beyereno, con hongos filamentosos.

³Pusillatriol es el 7 β ,15 β ,18-trihidroxi-*ent*-beyereno, uno de los derivados diterpénicos aislados de género *Sideritis* el cual es endémico de España. A partir de *Sideritis arborescences ssp arborescences* se han aislado los derivados del pusillatriol (7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno).



2. Marco Teórico



2.1.-Generalidades de los Diterpenos.

Los diterpenos pertenecen al conjunto de compuestos conocidos como terpenoides, los cuales constituyen la clase más grande de productos naturales debido a la gran diversidad estructural que éstos representan. Los diterpenos (aproximadamente 2500 informados en la literatura) están constituidos por 20 átomos de carbono que implican cuatro unidades de isopreno (C_5), ver figura 1; dichas moléculas son comunes en hongos, plantas superiores y algas marinas. Interesante es el hecho de que gran parte de las fragancias vegetales se deben a esta clase de compuestos; por ejemplo el olor de un bosque de coníferas en un día de verano se debe principalmente a los diterpenos presentes en los pinos.

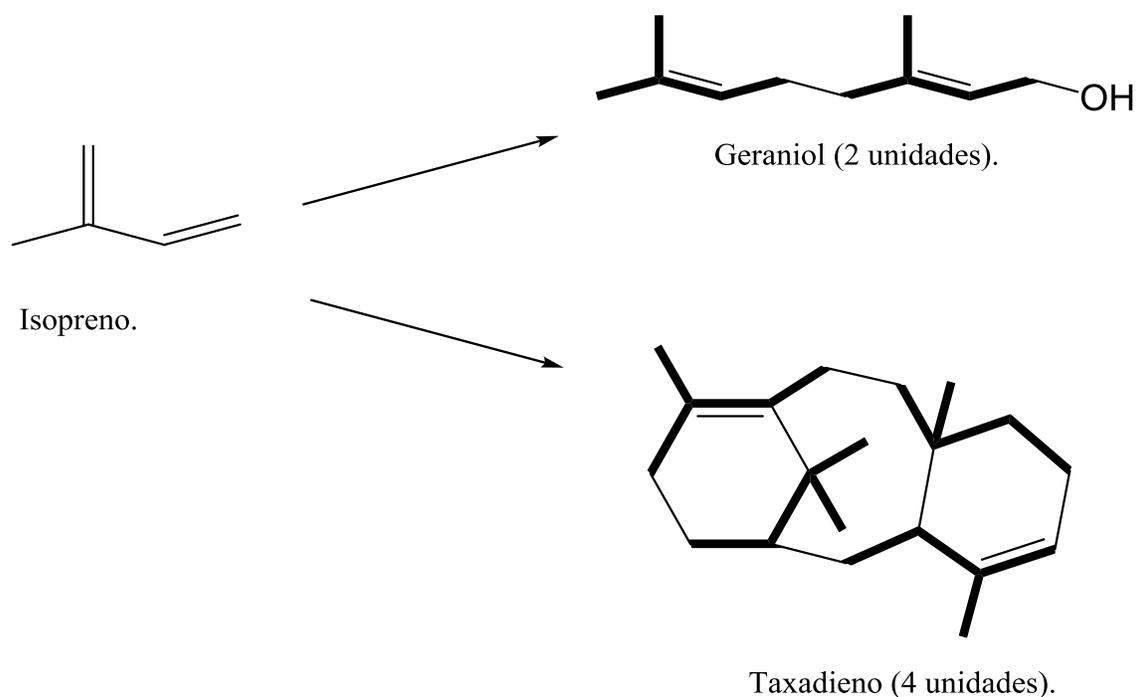


Figura 1. Ejemplos de productos naturales donde se muestra la unidad del isopreno (2-metil-1,3,-butadieno).

Otras entidades diterpénicas son de interés, tanto por su comportamiento químico como por sus propiedades biológicas, entre las que destacan algunos antibióticos, la

actividad reguladora de las giberrelinas^{4,5} encargadas del crecimiento de las plantas, la actividad anti-alimentaria para los insectos que tienen algunos diterpenos derivados del *ent*-kaurano; así como las propiedades citotóxicas que presentan los diterpenos con estructura de *taxano*⁶ y algunos otros diterpenos usado en la perfumería [4].

2.1.1.-Clasificación de los terpenos.

Los terpenos pueden ser clasificados de acuerdo al número de unidades de isopreno que se encuentren incorporadas en su estructura, como se describe en la esquema 1[5].

El aislamiento de nuevos terpenos ha traído como consecuencia una mayor complejidad en la separación y con ello el desarrollo de las técnicas analíticas. Por ejemplo, el uso de las técnicas de RMN bidimensional, las cuales han ayudado a la elucidación estructural inequívoca de nuevos metabolitos secundarios —triterpenos, lactonas sesquiterpénicas, alcaloides, entre otros—.

La actividad biológica de los glicósidos está bien establecida; muchos han sido encontrados en las plantas utilizados en la medicina tradicional [5]. Con el aumento del aislamiento de terpenos en las plantas, el contenido de estos es usado como una herramienta de valor taxonómico. Como ya se mencionó anteriormente, los terpenos se derivan de unidades de isopreno —hemiterpeno, C₅ — [6].

⁴ En el reino vegetal se han encontrado aproximadamente 120 diferentes tipos de giberelinas, las cuales se han ido identificando conforme se van descubriendo. Las diferencias entre ellas están en ligeros cambios en el número de carbonos, grupos hidroxilo, entre otros. En las plantas se han identificado cerca de 65 giberelinas, mientras que 12 están exclusivamente en el hongo *Gibberella sp.*; y en las semillas del manzano se han encontrado 24 distintas giberelinas.

⁵ En condiciones de estrés para la planta, algunas giberelinas se asocian con azúcares y con ello pierden actividad. De las distintas giberelinas, la número 3 (Ácido Giberélico) ha sido la más estudiada por su alta actividad y presencia en los tejidos vegetales; sin embargo, la número 1 es reconocida como la más activa de todas.

⁶ Los taxanos son terpenos producidos por plantas del género *Taxus*, como el tejo (*Taxus brevifolia*). Fueron identificados por primera vez en fuentes naturales, pero algunos de ellos han sido sintetizados artificialmente. Son taxanos el paclitaxel y el docetaxel. El paclitaxel se encontró por primera vez en el tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*).



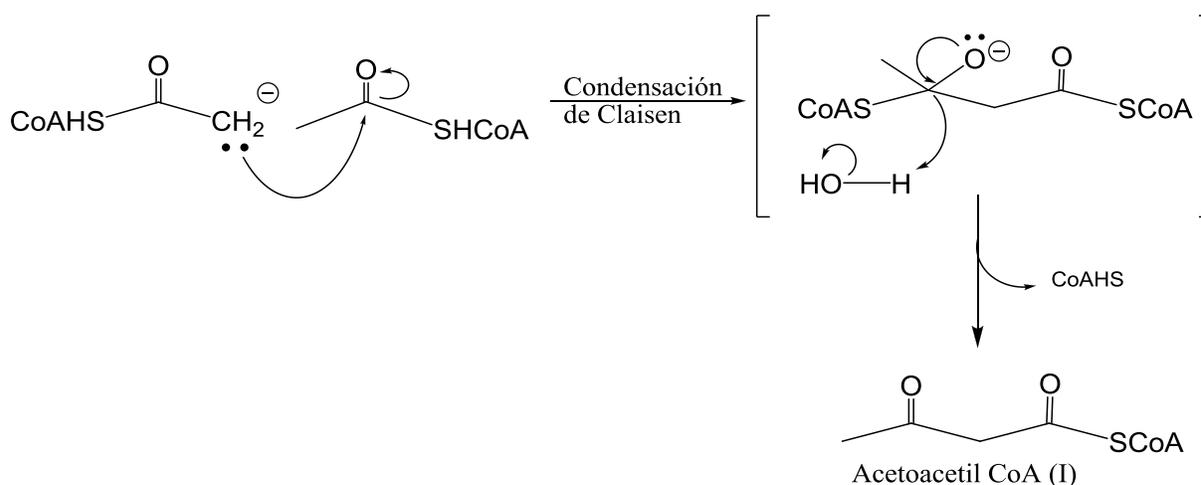
Los diterpenos provienen del pirofosfato de geranil geranilo C_{10} (GGPP), el cual es formado por la adición de una molécula de IPP (pirofosfato de isopentenilo) al pirofosfato de farnesilo (C_{20}). La formación de los diterpenos (C_{20}), se da mediante el mecanismo de intermediario catiónico [7].

2.1.2.-Biosíntesis de los diterpenos.

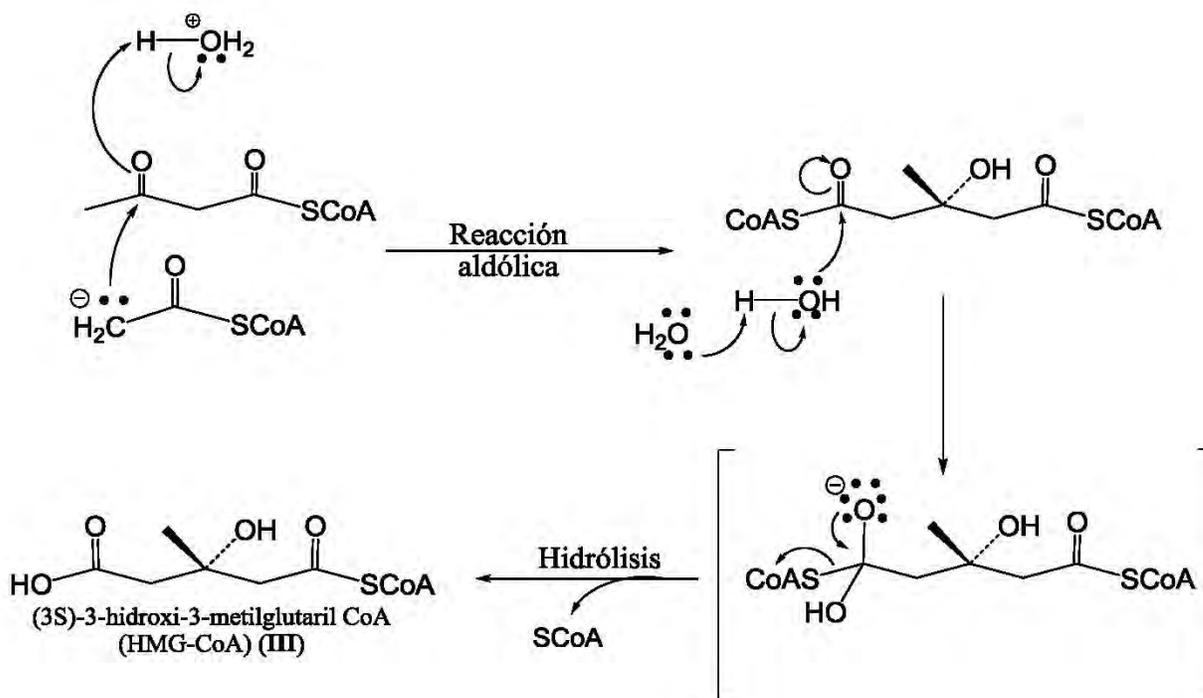
La biosíntesis de los diterpenos se encuentra bien documentada en la literatura [7]. A continuación se describirá la biosíntesis de los diterpenos policíclicos, la cual se ilustra en el esquema 2.

El primer paso es la biosíntesis del mevalonato mediante la condensación de dos moléculas de Acetil-CoA (condensación de Claisen, mediante una reacción de sustitución nucleofílica en C_{sp^2}), para producir Acetoacetil-CoA (**I**), una reacción catalizada por la Acetoacetil-CoA acetiltransferasa, ver esquema 2.

Posteriormente, la Acetoacetil-CoA (**I**) experimenta una adición tipo aldólica de un ión enolato proveniente de la Acetil-CoA, en una reacción catalizada por la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa, y la hidrólisis (pérdida HSCoA) de **II** produce (3S)-3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (**III**, HMG-CoA) como se ilustra en el esquema 3.



Esquema 2. Obtención de la Acetoacetil CoA (I).

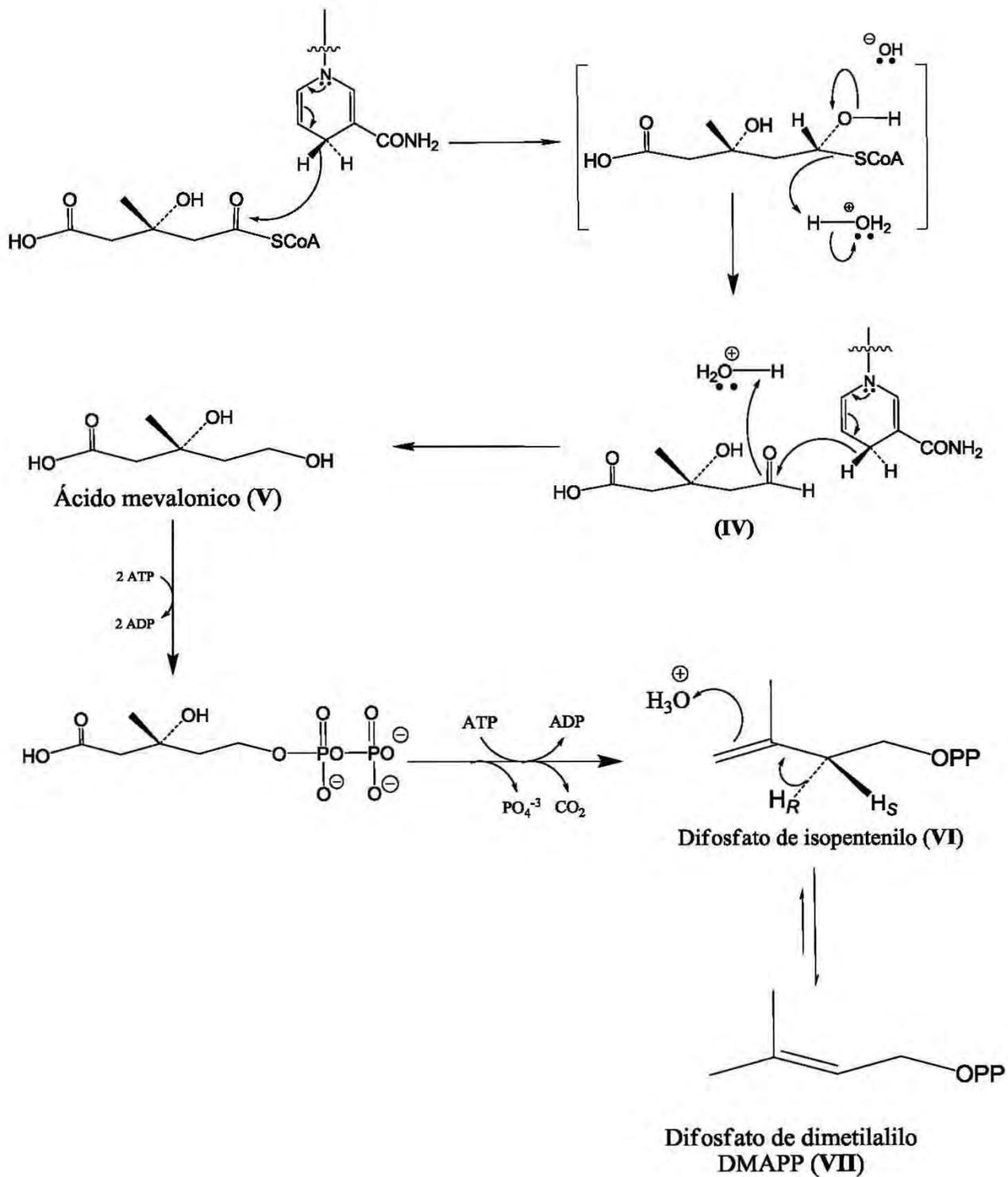


Esquema 3. Obtención de la (3S)-3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (III).

La reducción de la HMG-CoA (III) para producir ácido mevalónico (V) es catalizada por la 3-hidroxi-3-metilglutaril reductasa y requiere de dos equivalentes del NADPH. El primer paso es una reacción de sustitución nucleofílica en el grupo acilo que involucra la transferencia del hidruro del NADPH al grupo carbonilo del tioéster de la HMG-CoA; seguida de la eliminación de la HSCoA, el aldehído resultante (IV) experimenta una segunda adición de hidruro para producir el ácido (3R)-mevalónico (V), ver esquema 4.

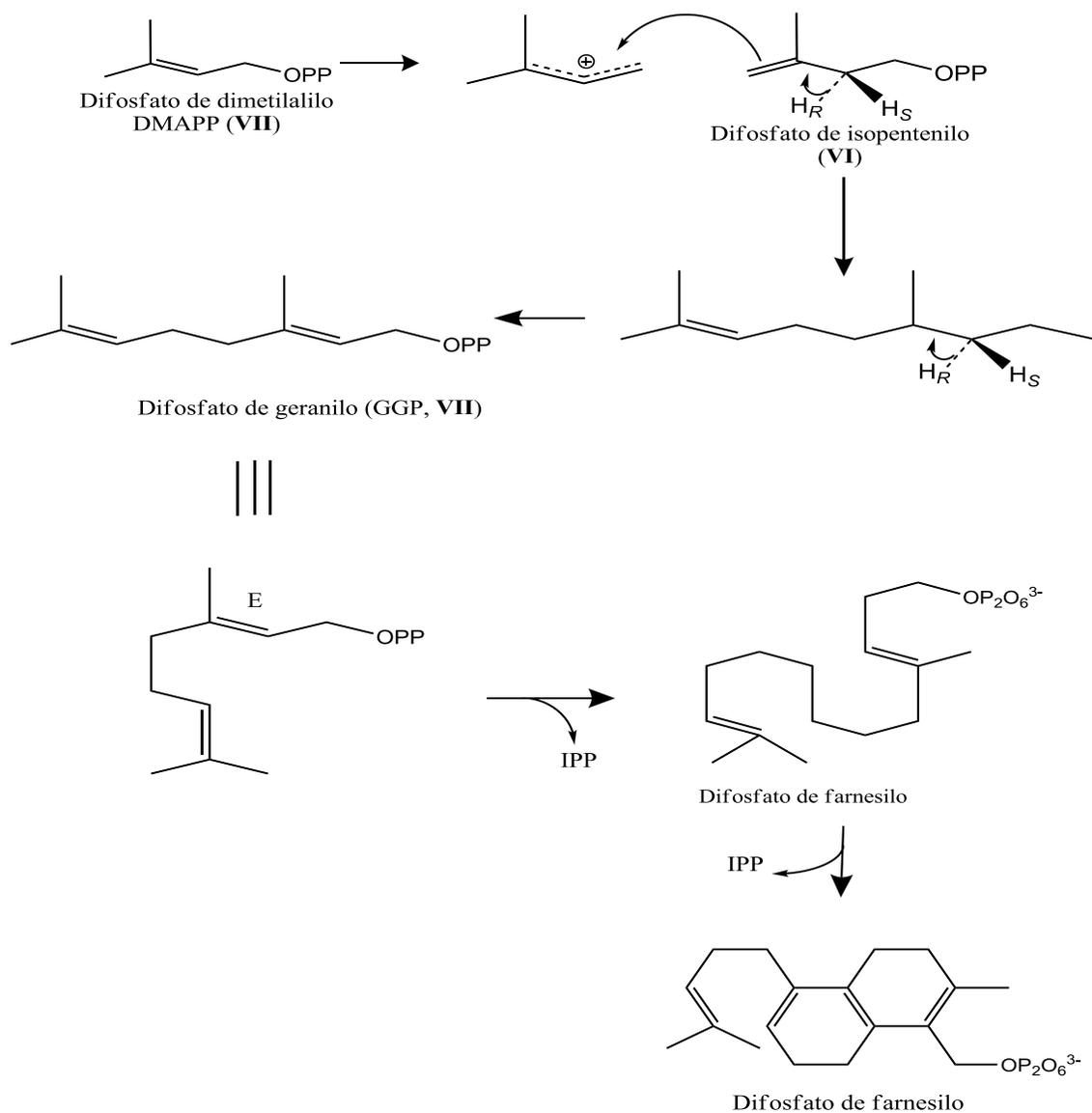
El difosfato de isopentenilo (VI, IPP) se condensa con una molécula de difosfato de dimetilalilo (VII, DMAPP) para obtener el difosfato de geranilo (VIII, GPP), el cual a su vez se condensa con VI para producir el difosfato de geranil-geranilo (X, GGPP), como se ilustra en el esquema 5. Estas condensaciones no son directas, sino que pasan a través del difosfato de farnesilo (IX, FPP).





Esquema 4. Obtención del difosfato de dimetilalilo (DMAPP, VII).





Esquema 5. Biosíntesis del difosfato de geranil-geranilo (GGPP, X).

En términos generales se ha sugerido que la primera etapa de ciclización involucra el ataque electrofílico de un ión H^+ en el doble enlace terminal en el C-14 del difosfato de geranil-geranilo (X), como se ilustra en el esquema 6, seguido de una serie de desplazamientos electrónicos de los dobles enlaces en el C-6 y C-10 para formar dos anillos fusionados de seis miembros, y posteriormente la eliminación de un protón del grupo

metilo del C-7, para generar un grupo metileno *exocíclico* y así formar un intermediario cíclico estable, conocido como pirofosfato de copalilo (**XI**), el cual sirve como sustrato en varias ciclizaciones adicionales para formar diferentes tipos de diterpenos. El ataque nucleofílico en el C-13 (*nótese el cambio en el sistema de numeración*) por el metileno *exocíclico* acoplado con la eliminación del grupo pirofosfato, produce, de acuerdo al arreglo espacial de la cadena de pirofosfato, dos carbocationes epiméricos⁷ (**XII** y **XIII**), ver esquema 6.

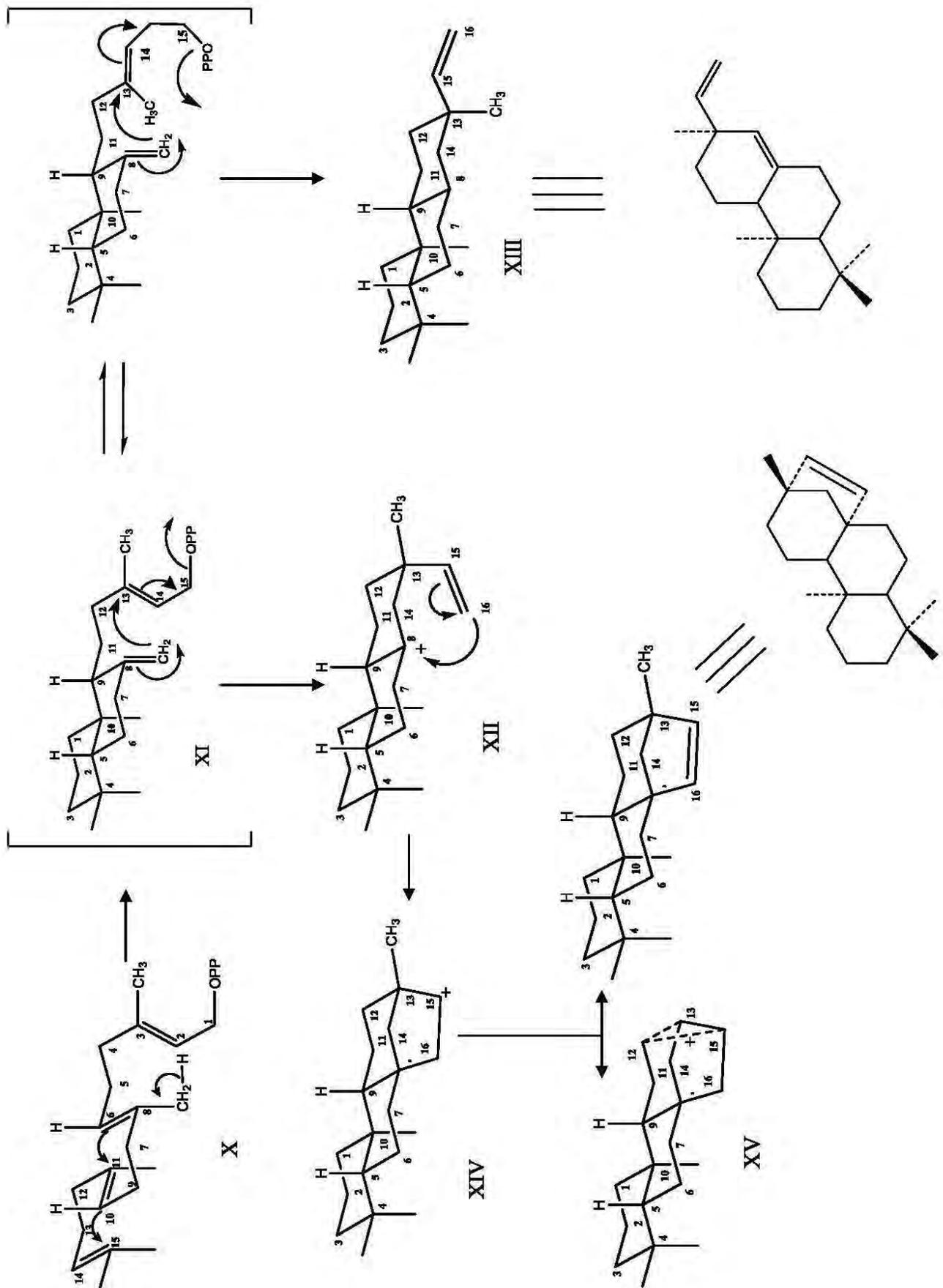
El ataque nucleofílico del doble enlace $\Delta^{15,16}$ al C-8 genera una ciclización adicional para formar un carbocatión en C-16 (**XIV**).

El intermediario **XIII** puede eliminar un protón del C-15 y formar un doble enlace C(15)-C(16), generándose así el esqueleto del *ent*-beyereno (s). Por otro lado, la ruptura parcial del enlace C(12)-C(13) y la formación parcial del C(12)-C(16) genera un carbocatión no clásico⁸ (**XV**), el cual es un intermediario importante en la formación del *ent*-kaureno, se origina mediante la formación del enlace C(12)-C(16) del intermediario (**XV**), para generar un carbocatión terciario (**XVI**) (*nótese el cambio en el sistema de numeración*), el cual se estabiliza por pérdida de un protón del C-17 para formar el metileno *exocíclico* (**XVIII**). Alternativamente, a partir del intermediario (**XV**), se genera la formación del esqueleto del traquilobano (**XVIII**), mediante la pérdida del protón en C-12 y la formación del enlace C(12)-C(16), ver esquema 7 [8-10].

⁷ Son compuesto que sólo difieren en la configuración absoluta de uno de sus centros estereogénicos.

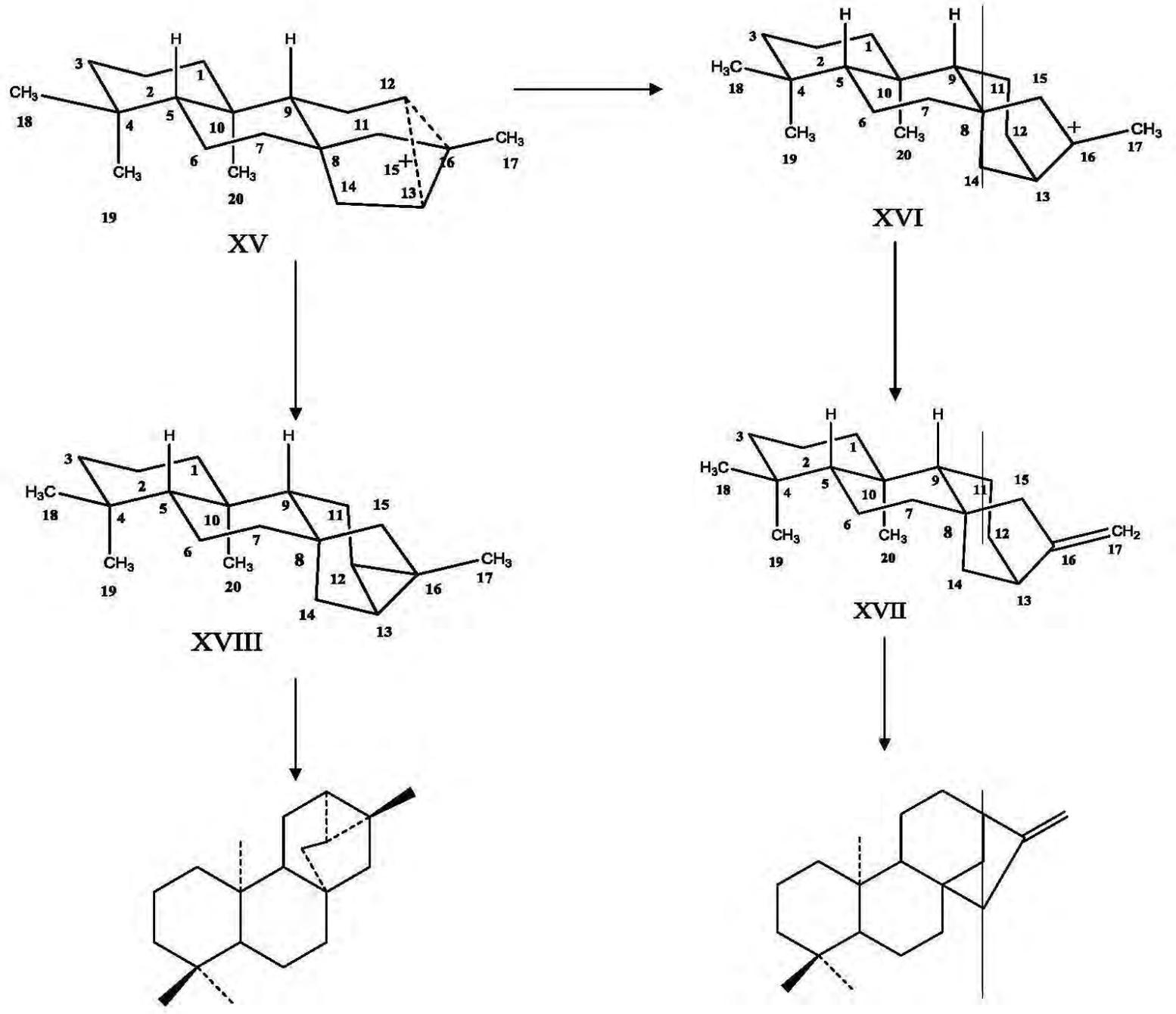
⁸ En 1949 Saul Winstein proponía que un carbón saturado podía actuar como grupo vecino empleando electrones sigma para prestar ayuda anquimérica en la expulsión de un grupo saliente y formar un catión puente intermediario con carbono pentavalente, este tipo de iones puente con electrones enlazantes sigma (σ) deslocalizados ha llegado a esclarecerse como carbocationes no clásicos.





Esquema 6.-Biosíntesis de los diterpenos tetracíclicos.





Esquema 7. Biosíntesis de los diterpenos tetracíclicos.



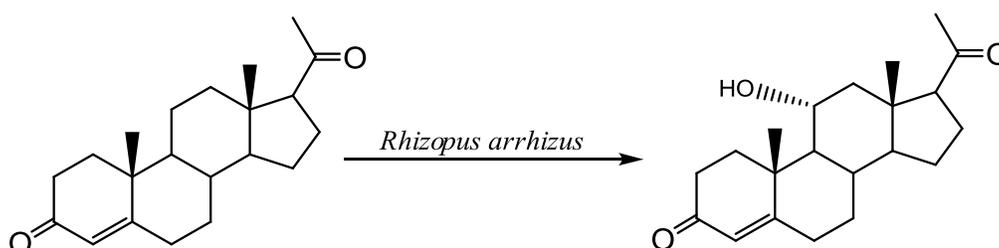
2.2.- Generalidades de las biotransformaciones.

Las transformaciones biológicas por medio de microorganismos y/o enzimas, se ha incrementado en los últimos años en la industria y en los laboratorios de síntesis orgánica, con la finalidad de investigar nuevas rutas de producción para la obtención de compuestos en química fina, farmacéutica, agroquímica, entre otros [11-14].

De manera que actualmente son consideradas como herramientas de uso frecuente, económica y ecológicamente competitivas por los químicos enfocados en la síntesis orgánica.

Desde el punto de vista de los procesos semisintéticos de productos naturales, la introducción de un grupo hidroxilo es muy útil, ya que es un grupo funcional muy versátil que abre una serie de posibilidades de reacción en el carbono sobre el que está situado y sobre la zona vecina de la molécula. En este caso los sistemas enzimáticos involucrados son monooxigenasas, particularmente el Citocromo P450. La “*biohidroxilación*” ha tenido un gran desarrollo principalmente en el campo de los esteroides y terpenoides debido a la gran demanda industrial de sus productos finales [15-16].

Un ejemplo clásico de la hidroxilación de un metileno no activado con un hongo, es la hidroxilación del C-11 de la progesterona por *Rhizopus arrhizus* publicado en 1952, la cual transcurrió con una alta *regio* y *estéreo*-selectividad [17].



Esquema 8. Biotransformación de la progesterona por *R. arrhizus*.

Algunas enzimas presentan especificidad casi absoluta por un determinado sustrato y no actúan sobre moléculas con estructura similar. Otras, sin embargo, no poseen esa

especificidad y son capaces de actuar sobre una gran variedad de moléculas que poseen características comunes [18].

2.3.- Biohidroxilación por medio del complejo Citocromo P450⁹.

Desde el punto de vista de los procesos semisintéticos de productos naturales, la introducción de un grupo hidroxilo (-OH) es muy útil, pues es un grupo funcional muy versátil que abre una serie de posibilidades de reacción en el carbono sobre el que está situado y sobre la zona vecina de la molécula. En este caso, los sistemas enzimáticos involucrados son las monooxigenasas, particularmente el citocromo P450 [19].

El Citocromo P450 constituye una larga familia de enzimas hemo-cisteinato, que están presentes en todas las formas de la vida (plantas, bacterias y animales) y desempeña un papel clave en la transformación oxidativa de moléculas endógenas y exógenas.

El grupo hemo se sintetiza a partir del aminoácido glicina y de la succinil coenzima A; un compuesto precursor es la protoporfirina IX a la que se une el hierro (Fe^{3+}). Dicho grupo forma parte de varias proteínas que participan en el transporte de oxígeno (hemoglobina y mioglobina), en la reducción y catálisis de peróxidos inorgánicos (catalasas y peroxidases) y en la oxidación de sustratos (citocromos), ver figura 2.

El complejo P450 son proteínas transportadoras de electrones que catalizan diversas reacciones de óxido-reducción (ver figura 3). Estas proteínas contienen un grupo prostético hemo que reversiblemente alterna entre los estados de oxidación ferroso y férrico [$Fe(II)$ y $Fe(III)$], durante el transporte de electrones en la respiración y en la fotosíntesis. Los citocromos se dividen en cuatro grupos: a, b, c y d, dependiendo de la naturaleza de las cadenas laterales del grupo prostético hemo.

⁹ La función del citocromo P450 fue establecida por Estabrook y col. (1963), quienes mostraron que la hidroxilación en el C-21 de la 17-hidroxiprogesterona podía inhibirse con CO, mientras que la irradiación con luz liberaba el efecto inhibitor del CO.



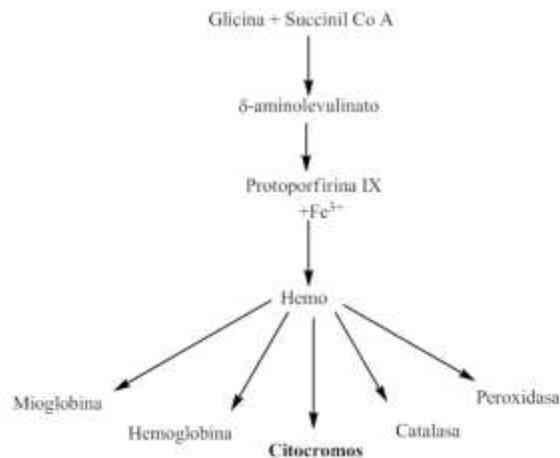


Figura 2. Biosíntesis del grupo hemo y su participación en diversas proteínas.

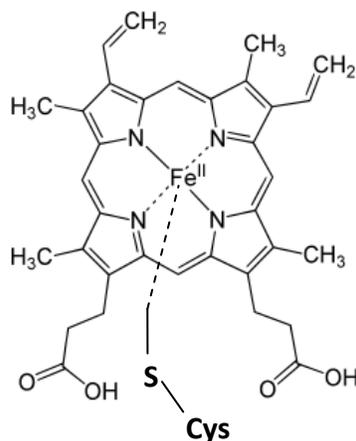


Figura 3. Estructura del grupo Hemo de los CP450.

En contadas reacciones el complejo P450 requiere de oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato, se trata de reacciones de monooxigenación en las que sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado en la molécula del sustrato, mientras que el otro es reducido hasta H₂O. A las enzimas que catalizan este tipo de oxidaciones se les conoce como monooxigenasas u oxidasas de función mixta, de acuerdo en la reacción general I¹⁰.



¹⁰ Los experimentos en los cuales se marcó al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) con el isótopo ¹⁸O₂ demostraron que el oxígeno que se introduce en la hidroxilación de algunos sustratos proviene del oxígeno molecular y no del agua [20].

Estas reacciones difieren de las catalizadas por las oxidasas del metabolismo intermediario, con formación de H₂O₂ y de las reacciones de peroxidación, en las cuales el átomo de oxígeno introducido en el sustrato procede del peróxido y no del oxígeno molecular; como se sugiere en la ecuación general II.



Las biotransformaciones son el proceso mediante el cual un sustrato exógeno (compuesto xenobiótico), esencialmente poco soluble en agua, se convierte en un metabolito más hidrosoluble y más fácilmente excretable.

La biotransformación de sustancias exógenas o endógenas se puede dividir en dos fases:

- Fase 1: Funcionalización. Son aquellas reacciones en donde se introducen grupos funcionales que confieren cierta reactividad química específica a las moléculas que los contienen. Estas transformaciones metabólicas incluyen diversas reacciones químicas, como la hidrólisis, la oxidación y la reducción. Esta fase es catalizada principalmente por el sistema enzimático de los citocromos P450.
- Fase 2: Conjugación. Es la unión de los metabolitos generados en la fase 1 con aminoácidos, ácido glutámico o glutatión, facilitan el transporte y eliminación de los metabolitos, fase que es caracterizada por la glutatión transferasa. En la tabla 1 se muestran las diferentes reacciones que pueden ocurrir en cada etapa y el tipo de enzima involucrada.

Reacción	Enzimas	Sustratos
<i>Fase I.- Funcionalización</i>		
Oxidación	Oxidasas de función mixta	Alcanos, alquenos, arenos, aminas.
Oxidación	Alcohol deshidrogenasas	Alcoholes
Reducción	Oxidasas de función mixta	Grupos Azo y nitro
Hidrólisis	Esterasas	Ésteres
<i>Fase II.- Conjugación</i>		
Agua	Epóxido-hidrolasa	Epóxidos
Glutatión	Glutatión-transferasas	Electrofilicos
Ácido glucurónico	Glucoronil-transferasas	Fenoles, tioles, aminas
Ácido acético (acetil-CoA)	N-acetiltransferasas	Aminas

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



2.4.- Diferencias entre una biotransformación y una fermentación.

Hay dos vías que usan los microorganismos en la producción de compuestos útiles, una se refiere a la fermentación¹¹ y otra a la biotransformación^{12,13} de un sustrato exógeno. En la siguiente tabla, se muestran las diferencias que existen entre ambos procesos [21].

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

Tabla 2. Diferencias entre un proceso fermentativo y un proceso de biotransformación.

¹¹ Fermentación alcohólica, ácidos orgánicos, disolventes, antibióticos, aminoácidos, ácidos nucleicos y compuestos relacionados.

¹² El proceso vital de un microorganismo requiere de la producción de enzimas y el microorganismo mismo es capaz de usar una serie de enzimas como catalizadores. Por ejemplo la síntesis de la pregnolona por *Rhizopus arrhizus*.

¹³ En 1952 el grupo de investigación de la compañía Upjohn dirigido por Piterson y Murray, encontró que el hongo *Rhizopus arrhizus*, aislado al exponer una placa de agar en una ventana de modo fortuito transforma la progesterona en la 11 α -hidroxiprogestero en buenos rendimientos.



2.5.-Características generales de una transformación microbiológica y de una transformación química.

Una reacción química llevada a cabo por un microorganismo o catalizada por una enzima¹⁴ es la misma que puede ser llevada a cabo de manera convencional en la síntesis química. En el tabla 3 se enlistan las características generales de una reacción enzimática y una reacción química [21].

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

Tabla 3. Características generales de una reacción enzimática y una reacción química.

¹⁴ La unión internacional de bioquímica lista más de 2000 enzimas. Las cuales han sido clasificadas por la reacción que catalizan, más de 800 enzimas purificadas se encuentran comercialmente disponibles.

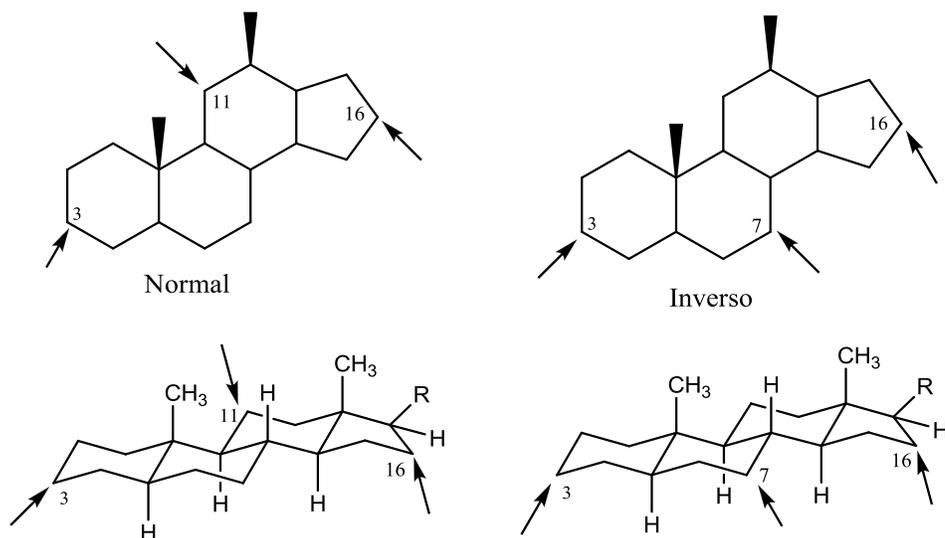


Ocasionalmente las transformaciones microbianas son una alternativa, para activar algunas funciones químicas dentro de sitios inaccesibles de la molécula. Así un gran número de transformaciones microbiológicas de esteroides han sido realizadas por este proceso. Cuando las transformaciones son hechas en sustratos naturales, la introducción de funciones dentro de sitios biogénicamente favorables es un fenómeno frecuente. [15-16]

2.6.- Biotransformaciones de diterpenos.

2.6.1.- Modelos predictivos en la hidroxilación de sistemas esteroidales.

En los sistemas esteroidales, los cuales han sido objeto de innumerables estudios se ha encontrado que la acción de diferentes hongos sobre dicho esqueleto es de manera triangular; es decir, tres puntos activos con capacidad de fijación o de acción, existiendo la denominada acción “normal” y acción “inversa”. En el esquema 9 se ilustran los sitios de acción para dichos compuestos. [19]



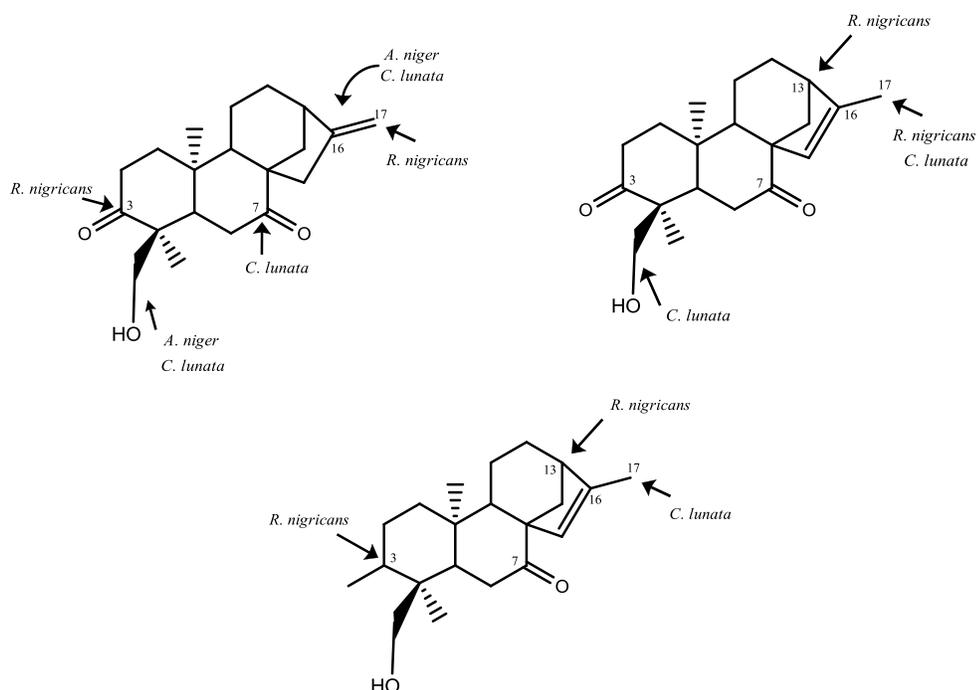
Esquema 9. Centros activos de los sistemas esteroidales reportados en la literatura.

En la literatura especializada se han informado sobre la biotransformación de diterpenos derivados del *ent*-kaureno principalmente, deduciendo que los posibles lugares de acción son las posiciones C-3, C-13 y C-17 que corresponde a la acción tricéntrica

“inversa”, las cuales están separadas por una distancia muy similar a las posiciones encontradas entre C-3 y C-17 de los sistemas esteroidales y fijando la posición C-7, como una posición poco reactiva.

Lo anterior se comprobó al realizar la biotransformación de derivados del *ent*-kaurano con *Curvularia lunata*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus nigricans* como se muestra en el esquema 10. Observándose que *C. lunata* tiene un modo de acción similar al de *A. niger* salvo que *C. lunata* afecta a los grupos carbonilos en C-7, en derivados del *ent*-kaur-16-eno.

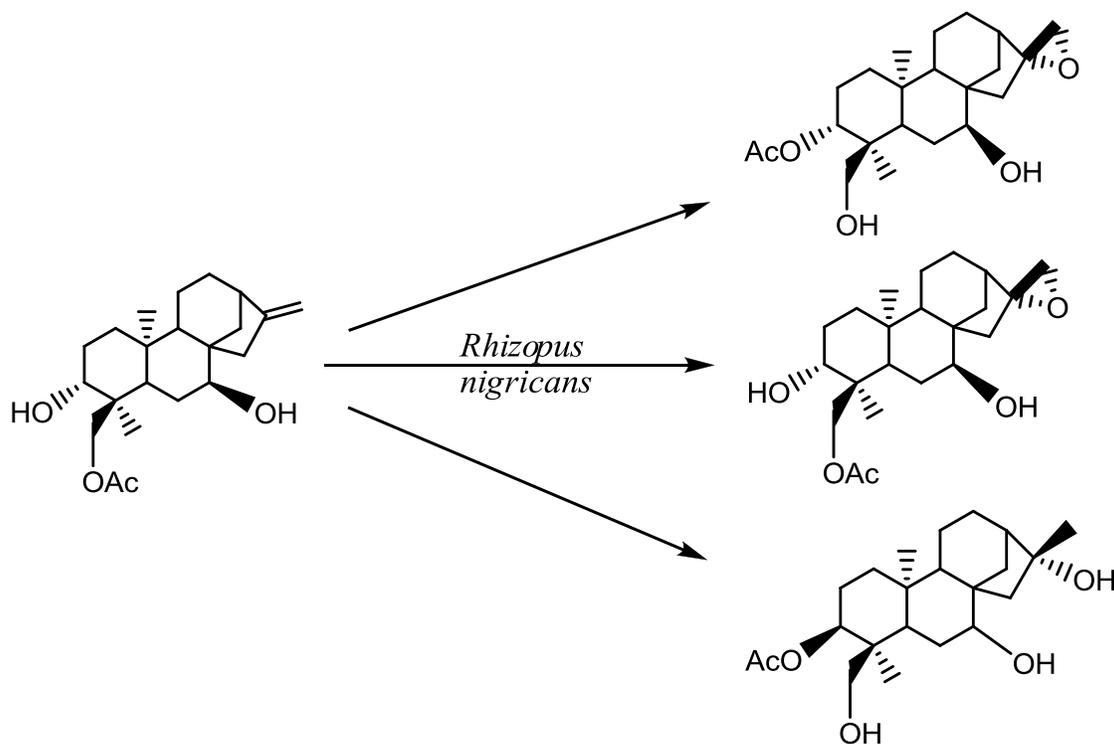
Por otro lado, en derivados del *ent*-kaur-15-eno *C. lunata* modifica las posiciones C-17 y C-18, mientras *R. nigricans* las posiciones C-13 y C-17, cuando la posición C-3 se encuentra ocupada. En derivados del *ent*-kaur-15-eno no sustituido en la posición del C-3 favorece la acción de *R. nigricans* en los C-3 y C-13 mientras que *C. lunata* actúa únicamente sobre C-17. Sin embargo *A. niger* no modifica los derivados del *ent*-kaur-15-eno con o sin sustituyente en C-3.



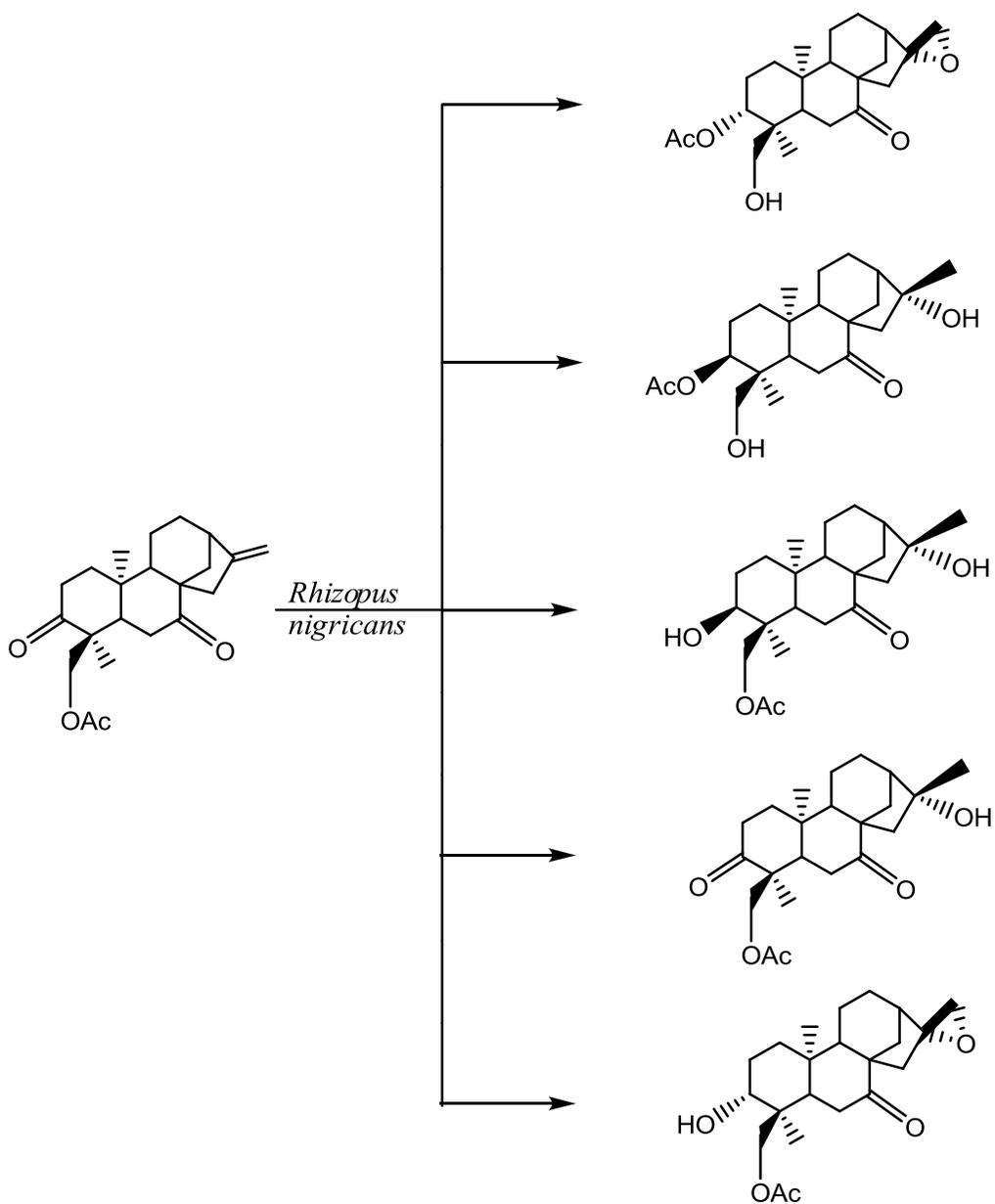
Esquema 10. Principales sitios de acción de diferentes hongos filamentosos derivados del *ent*-kaurano.

Estos lugares de acción se confirmaron plenamente cuando se trabajó sobre los correspondientes sistemas *ent*-kaurénicos. Por ejemplo, el 18-acetil-3 α ,7 β -dihidroxi-*ent*-kaur-16-eno fue biotransformado por *R. nigricans* mediante la epoxidación de Δ^{16-17} , la *trans*-esterificación del grupo acetato de C-18 a C-3 y la hidroxilación del C-16.

Por otro lado, la oxidación del 18-acetil-3 α ,7 β -dihidroxi-*ent*-kaur-16-eno, seguido de la biotransformación con *R. nigricans* produjo los compuestos que muestran la epoxidación de Δ^{16-17} , la *trans*-esterificación del C-18 al C-3, la hidroxilación del C-16 y la reducción del grupo carbonilo en C-3 con una orientación β , como se muestra en el esquema 11.



Esquema 11. Productos de biotransformación del 18-acetil-3 α ,7 β -dihidroxi-*ent*-kaur-16-eno con *R. nigricans*.

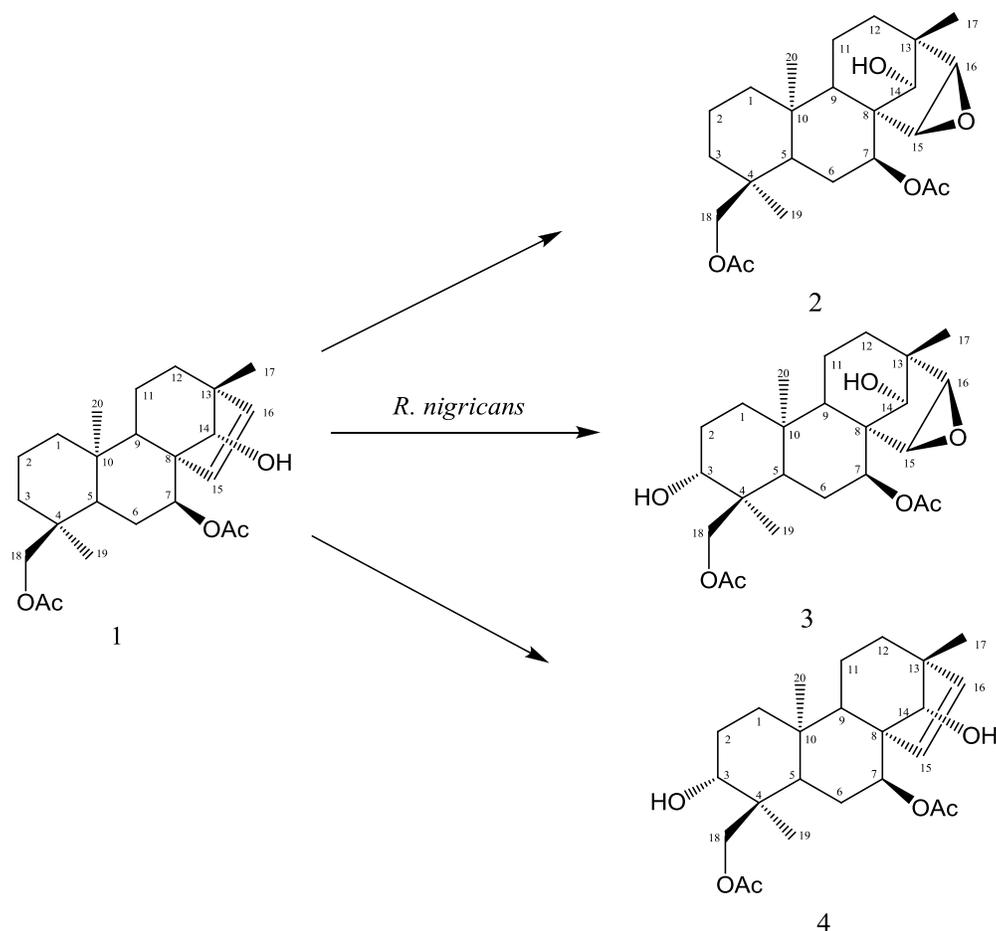


Esquema 11. Productos de biotransformación del 18-acetil-3 α ,7 β -dihidroxi-*ent*-kaur-16-eno con *R. nigricans*.

A pesar del gran auge que han tenido las biotransformaciones como una herramienta sintética, actualmente se plantea la falta de modelos que expliquen el comportamiento de los sistemas enzimáticos de un determinado microorganismo en función de la estructura del sustrato o bien de diferentes sustratos con respecto a un microorganismo. Un ejemplo de lo anterior, son los diterpenos tetracyclicos derivados del *ent*-beyereno. [19]

2.6.2.- Biotransformación de *ent*-beyerenos

La incubación del 7 β ,18-diacetoxi-14 α -hidroxi-*ent*-beyerer-15-eno (**1**) con *R. nigricans*, permitió el aislamiento del metabolito **2** (44 mg), **3** (20 mg), **4** (15 mg) y 30 mg del sustrato **1**. En el esquema 12, se muestran los productos de la transformación microbológica [22]. La acción de *R. nigricans* sobre el sustrato (**1**), se centra en la epoxidación del doble enlace de las posiciones Δ^{15-16} y en la hidroxilación del C-3 para dar el alcohol β -ecuatorial. La hidroxilación por la cara α en el C-3, sugiere que la acción enzimática ocurrió por la misma cara, lo cual está de acuerdo con las observaciones hechas para los 3-cetoderivados de *ent*-beyerenos.



Esquema 12. Transformación microbológica del *ent*-beyerenos con *R. nigricans*.

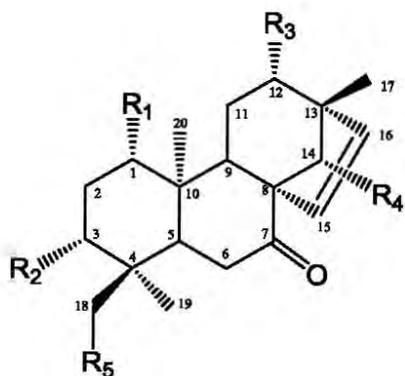
La utilización de otros microorganismos tales como *A. niger* no varía en gran medida las posiciones de acción, ya que se dirigen hacia el Δ^{15-16} , y a la formación de los derivados mono y dihidroxilados con diferente estereoquímica, en contrapartida a la acción de *Rhizopus nigricans* que favorece la formación del epóxido. [22]

Existen pocas publicaciones de las transformaciones de *ent*-beyerenos para obtener derivados hidroxilados por medio de hongos filamentosos. Por ejemplo, *A. ochraceus* reduce el grupo carbonilo en C-3 del ácido 3-ceto-*ent*-beyer-15-en-17-ico, para dar un alcohol con orientación α axial; mientras *Calonectria decora* hidroxila el C-6 con una orientación β ecuatorial; sin embargo no se observó ninguna transformación utilizando cultivos de *Rhizopus nigricans*.

De la incubación de un 19-norderivado de estos sustratos con cultivos de *C. decora*, se produjo la hidroxilación en el C-6 con una orientación β ecuatorial, mientras que la incubación de este sustrato con *A. ochraceus* y *R. nigricans* no se aisló ningún producto de biotransformación. [22]

Para determinar la influencia de un grupo carbonilo de cetona en sustratos derivados del *ent*-beyereno se incubó el producto del 14 β ,18-diacetoxi-*ent*-beyer-15-en-7-ona (**5**) con *R. nigricans* por siete días, y produjo los metabolitos **6** (22%), **7** (6%), **8** (21%) y **9** (5%); así como una mezcla de sustancias muy polares, las cuales fueron acetiladas para obtener las sustancias **10** (3%) y **11** (5%). De esto se deduce que *R. nigricans* funcionaliza el sustrato **5** principalmente mediante la hidroxilación en el C-3 con configuración absoluta (*S*), y en otros casos hidroxila el C-1 para generar el 14 β ,18-diacetoxi-1 β -hidroxi-*ent*-beyer-15-en-7-ona (**9**), o bien en el C-12 para dar 14 β , 18-diacetoxi-12 β -hidroxi-*ent*-beyer-15-en-7-ona (**10**), ver esquema 13 [23].

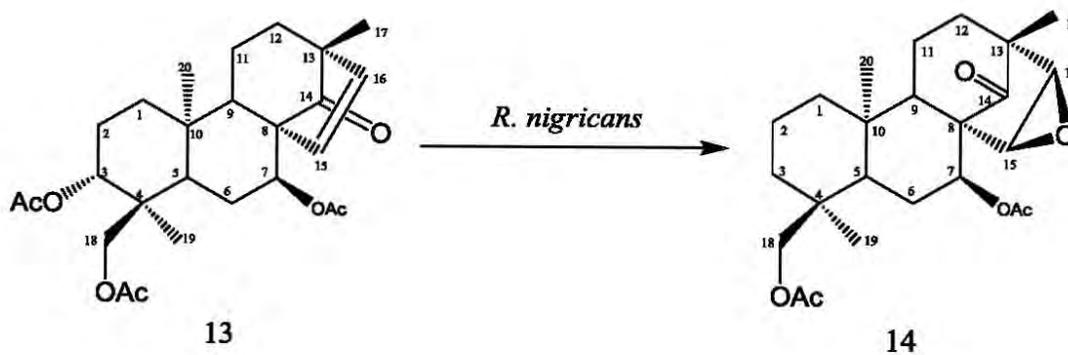




	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
6)	H	OH	H	OAc	OAc
7)	H	OAc	H	OAc	OH
8)	H	OH	H	OAc	OH
9)	OH	H	H	OAc	OAc
10)	H	H	OH	OAc	OAc
11)	H	OAc	OAc	OAc	OAc
12)	H	H	H	OAc	OAc

Esquema 13. Biotransformación del ent-14 β , 18-diacetoxibeyer-15-en-7-ona (**5**) con *R. nigricans*

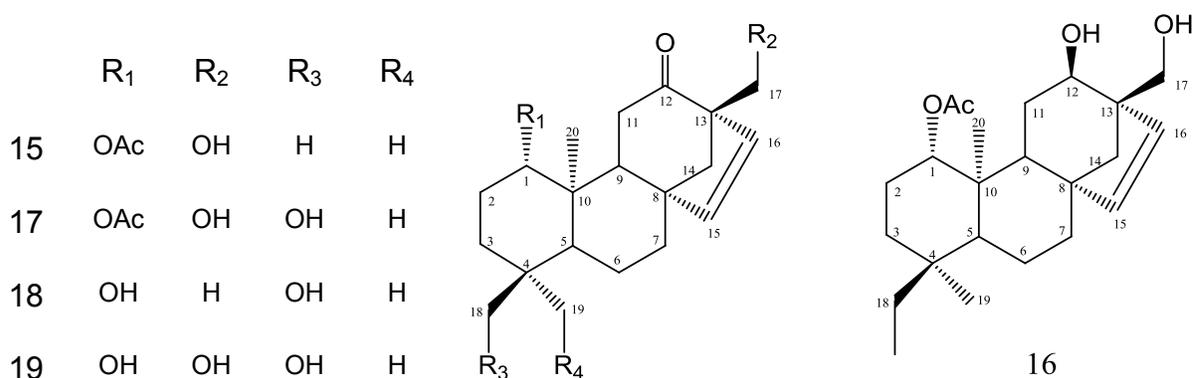
Para examinar la influencia del grupo ceto en el sustrato, el compuesto 7 α ,18-diacetoxi-*ent*-beyer-15-en-14-ona (**13**), fue incubado por siete días con *R. nigricans*, recuperándose una cantidad considerable del sustrato (55%) y 25 mg de una mezcla polar, la cual fue acetilada obteniéndose 4 mg (1%) del 3 α , 7 β , 18-triacetoxi-15, 16-epoxi-*ent*-beyer-14-ona (**14**). Este compuesto es formado a partir de la hidroxilación del C-3 y la epoxidación del doble enlace Δ^{15-16} como se ilustra en el esquema 14.



Esquema 14. Biotransformación de *ent*-beyerenos (**13**) con *R. nigricans*

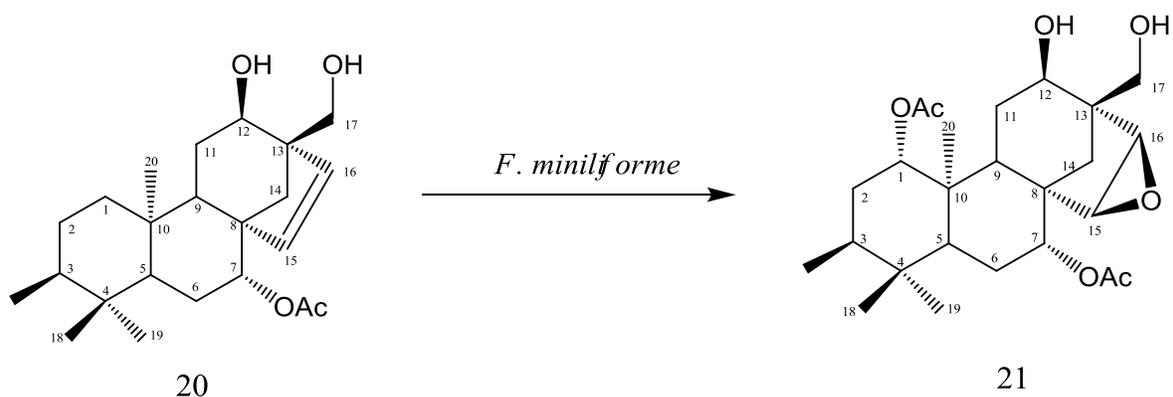


La biotransformación del compuesto **15** por *C. lunata* por siete días permitió aislar las sustancias, **16** (3%), **17** (5%), **18** (7%) y **19** (3%), recuperando **15** (65%) de donde se pudo concluir que *C. lunata* hidroxila la posición del C-18 en los compuestos **17** y **18**, y desacetila el C-1 en **18** y **19**, además se observó el producto **16**, (3%) que se genera por la reducción del grupo carbonilo en el C-12 [23].



Esquema 15. Biotransformaciones con *C. lunata* de *ent-beyerenos*

Cuando **20** fue incubado con *F. moniliforme* por 17 días, solamente se obtuvo **21** en bajo rendimiento, el cual muestra la epoxidación en los C₁₅-C₁₆. La estructura de **21** fue confirmada por medio de una correlación química, cuando **20** fue tratado con ácido m-cloroperbenzoico para dar el mismo epóxido [24].



Esquema 16. Biotransformación de **20** con *F. moniliforme*.

3. Planteamiento del Problema



Los procesos de biotransformación han adquirido importancia creciente a nivel mundial debido a las posibilidades y ventajas que ofrecen en la obtención e investigación de compuestos químicos biológicamente activos, y los cuales pueden tener diferentes aplicaciones en la industria: agroquímica, farmacéutica, alimenticia, entre otras. Además, las biotransformaciones se han convertido en una herramienta importante dentro de la síntesis orgánica por su bajo costo e impacto ambiental.

De las diferentes transformaciones catalizadas por sistemas enzimáticos, la *biohidroxilación* selectiva de carbonos no activados es de suma importancia, debido a que este tipo de transformaciones es difícil de realizar por los métodos químicos clásicos. Este tipo de transformaciones químico-biológicas se han desarrollado principalmente en la obtención de los esteroides y terpenoides, debido a la gran demanda industrial que tienen sus productos terminales.

En particular, la biotransformación de productos naturales constituye un área de gran interés farmacéutico, debido a que es posible potenciar su actividad biológica a través de reacciones biocatalíticas altamente *regio* y *enantio* selectivas. En especial la biotransformación de terpenos es muy estudiada porque permite la producción de compuestos enantioméricamente puros bajo condiciones suaves de reacción que pueden ser utilizados en diferentes procesos industriales. Los diterpenos en particular representan un grupo de productos naturales que pueden ser transformados en compuestos bioactivos de gran valor, como pueden ser: antivirales, edulcorantes, como promotores del desarrollo vegetal, entre otros.

Con base en lo anterior en el presente proyecto se realizaron las biotransformaciones de dos derivados acetilados del pusillatriol — triacetato de $7\beta,14\alpha,18$ -trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) y 7β -acetil- $14\alpha,18$ -dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**)— por medio de hongos filamentosos, para aislar, caracterizar e identificar los productos mayoritarios de bioconversión y poder proponer una correlación química a partir de **29** y los derivados químicos.



4. Justificación



Los procesos de biotransformación se definen como la utilización de sistemas biológicos completos (microorganismos, plantas, algas, tejidos, entre otros), para realizar modificaciones estructurales sobre sustratos exógenos. En todos los caso las reacciones son llevada a cabo por enzimas; sin embargo las enzimas puras son escasas y tienen un alto valor económico, por lo cual se tiene una gran preferencia por los sistemas biológicos completos, además de que presentan un crecimiento rápido y diversos sistemas multienzimáticos.

Por otro lado, las biotransformaciones se caracterizan por su versatilidad, eficiencia, *regio*, *químico* y *enantio* selectividad en los procesos enzimáticos involucrados. Además el metabolismo de los sustratos sometidos a biotransformación, ocurre bajo condiciones suaves y con bajo consumo de energía; los reactivos y disolventes que se utilizan poseen baja toxicidad, y por ello son considerados de bajo impacto ambiental y se pueden ubicar en el campo de la biotecnología blanca o de la química verde.

Sin embargo, una de las desventajas de las biotransformaciones que utilizan sistemas enzimáticos complejos radica en que el proceso puede ser impredecible con respecto: i) al tipo de sustrato y ii) al sitio de acción sobre el mismo. Cabe señalar que la mayoría de los procesos de biotransformación no se encuentran bien elucidados, aunque en los últimos 15 años se ha acumulado una gran cantidad de información respecto a las posibilidades tecnológicas que ofrecen muchos microorganismos; de los cuales no se ha logrado racionalizar adecuadamente su comportamiento como biocatalizadores a nivel de género, o bien sobre un determinado sustrato.

Con base en lo anterior en el presente proyecto se realizaron las biotransformaciones de dos derivados acetilados del pusillatriol — triacetato de $7\beta,14\alpha,18$ -trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) y 7β -acetil- $14\alpha, 18$ -dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**)— por medio de hongos filamentosos, para aislar, caracterizar e identificar los productos mayoritarios de bioconversión, y poder correlacionar la estructura del sustrato con las acción de los diferentes hongos sobre el esqueleto del *ent*-beyereno.



5. Hipótesis



Las biotransformaciones por medio de hongos son una herramienta alternativa para la funcionalización de diferentes sustratos exógenos por medio de diferentes reacciones químicas —oxidación, reducción, hidroxilación, hidrólisis, entre otras—, las cuales utilizan sistemas enzimáticos complejos que presentan una alta *regio*, *quimio* y *enantio* selectividad, además de su bajo costo e impacto ambiental.

Entonces, por medio de la biotransformación de dos derivados acetilados del pusillatriol — triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) y 7 β -acetil-14 α ,18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**)— con esqueleto del *ent*-beyereno por medio de hongos filamentosos, se podrá determinar la acción de dicho microorganismo —posición y tipos de reacción— en el esqueleto del *ent*-beyereno, por medio del aislamiento, caracterización e identificación de los productos mayoritarios obtenidos del proceso de bioconversión. Así como realizar la correlación química que pueda existir entre los diversos productos de bioconversión a partir de la materia prima.



6. Objetivos



6.1.- Objetivo general.

Realizar las biotransformaciones de dos derivados acetilados del pusillatriol —triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) y 7 β -acetil-14 α ,18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**)— por medio de hongos filamentosos, para aislar, caracterizar e identificar los productos mayoritarios de bioconversión.

6.2.-Objetivos particulares.

6.2.1. Realizar la investigación bibliográfica sobre la biotransformación de diterpenos tetraciclicos con microorganismos; específicamente en los diterpenos: *ent*-kaurano, *ent*-atisano, *ent*-traquilobano y *ent*-beyereno.

6.2.2. Obtener el triacetato de 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) mediante la acetilación (Ac₂O/Py) de una mezcla de pusillatrioles, obtenido de *Sideritis arborescenses ssp arborescense* Salzm.

6.2.3. Purificar por métodos cromatográficos al triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) y del 7 β -acetil-14 α , 18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**)

6.2.4. Identificar al triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) y del 7 β -acetil-14 α , 18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**).

6.2.5. Determinar la factibilidad de biotransformación del triacetato de 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) y 7 β -acetil-14 α , 18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**), con *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus nigricans*, *Colletotricum gloeosporioides* y *Nocardia brazillencis*.

6.2.6. Realizar la biotransformación del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) y del 7 β -acetil-14 α , 18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**) de manera cuantitativa, de acuerdo a los resultados de factibilidad 6.2.5.

6.2.7. Aislar y purificar los productos mayoritarios de la biotransformación del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) y del 7 β -acetil-14 α , 18-dihidroxi-



ent-beyer-15-eno (**23**), de acuerdo al objetivo 6.2.6. por medio del empleo de las técnicas de cromatografía y cristalización.

6.2.8. Caracterizar —RMN-¹H, RMN-¹³C, IR, EM(IE), las propiedades ópticas ([α], rotación óptica)— e identificar —pf., R_f, solubilidad— los productos mayoritarios obtenidos de la biotransformación cuantitativa de **23** y **29**.

6.2.9. Realizar la cinética de la biotransformación empleando como técnica de cuantificación la CLAR.

6.2.10. Análisis de resultados y proponer alternativas y/o sugerencias.



7. Material y Método



7.1.- Material y sustancias utilizadas.

7.1.1.- Disolventes, sustancias y reactivos.

- Anhídrido acético (Ac_2O).
- Acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$).
- Acetonitrilo (CH_3CN).
- Ácido clorhídrico (HCl) al 10%.
- Ácido *m*-cloroperbenzoico. ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3\text{Cl}$)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3).
- Bisulfito de sodio (NaHSO_3).
- Cloruro de metileno (CH_2Cl_2).
- Hidróxido de potasio (KOH) al 5%.
- Metanol (CH_3OH).
- hexano ($n\text{-C}_6\text{H}_{12}$).
- Cloruro de sodio (NaCl).
- Piridina (Py).
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).

7.1.2.- Medios de cultivo.

- Agar Papa Dextrosa.
- YEPGA (extracto de levadura, extracto de carne, peptona, glucosa).

7.1.3.- Material y equipo utilizado.

- Autoclave.
- HPLC.
- Incubadora, marca Vichi de México, modelo INO-650V-7.
- Material básico de laboratorio.

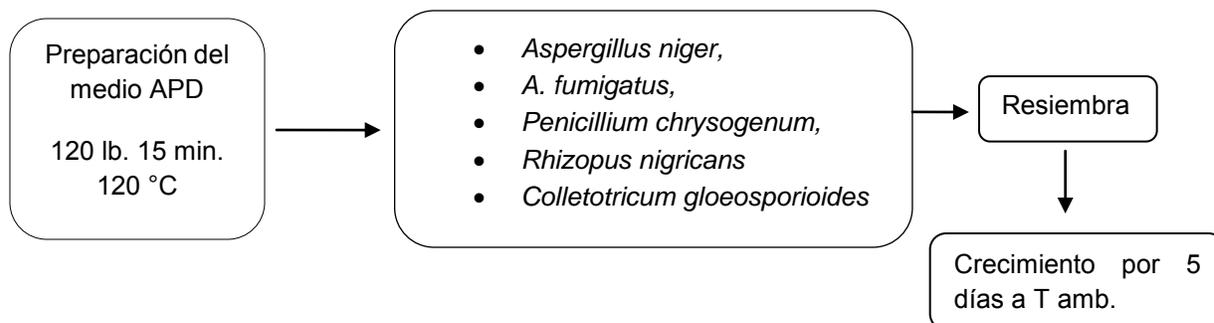
7.1.4.- Microorganismos.

- *Aspergillus niger*, (ATCC 16604).
- *Aspergillus fumigatus*.
- *Colletotricum gloeosporioides*.
- *Penicillium chrysogenum*, (ATCC1255).
- *Rhizopus nigricans*, (ATCC 6227B).

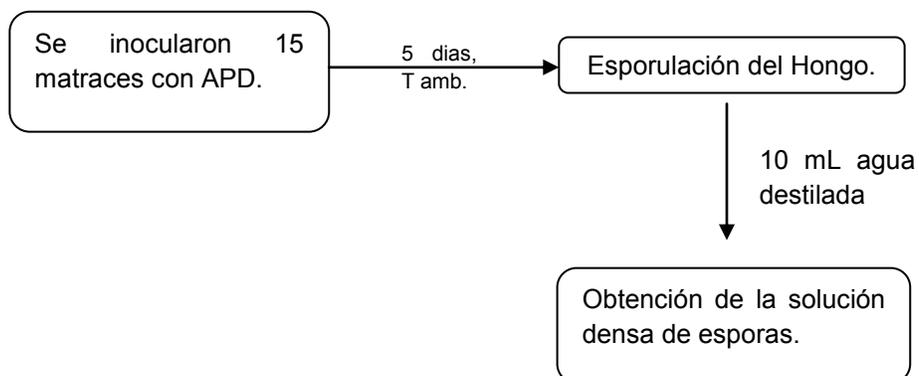


7.2.- Diagramas de flujo.

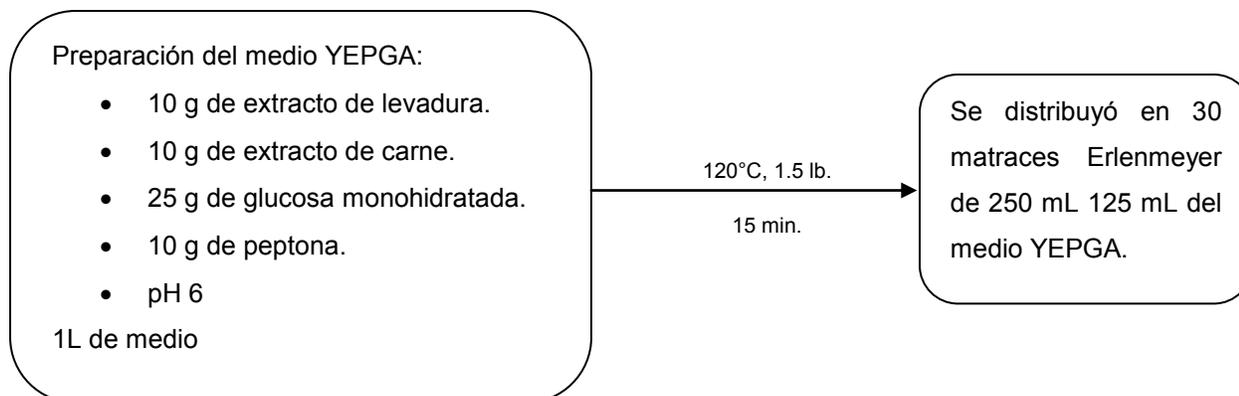
7.2.1.- Resiembra de hongos



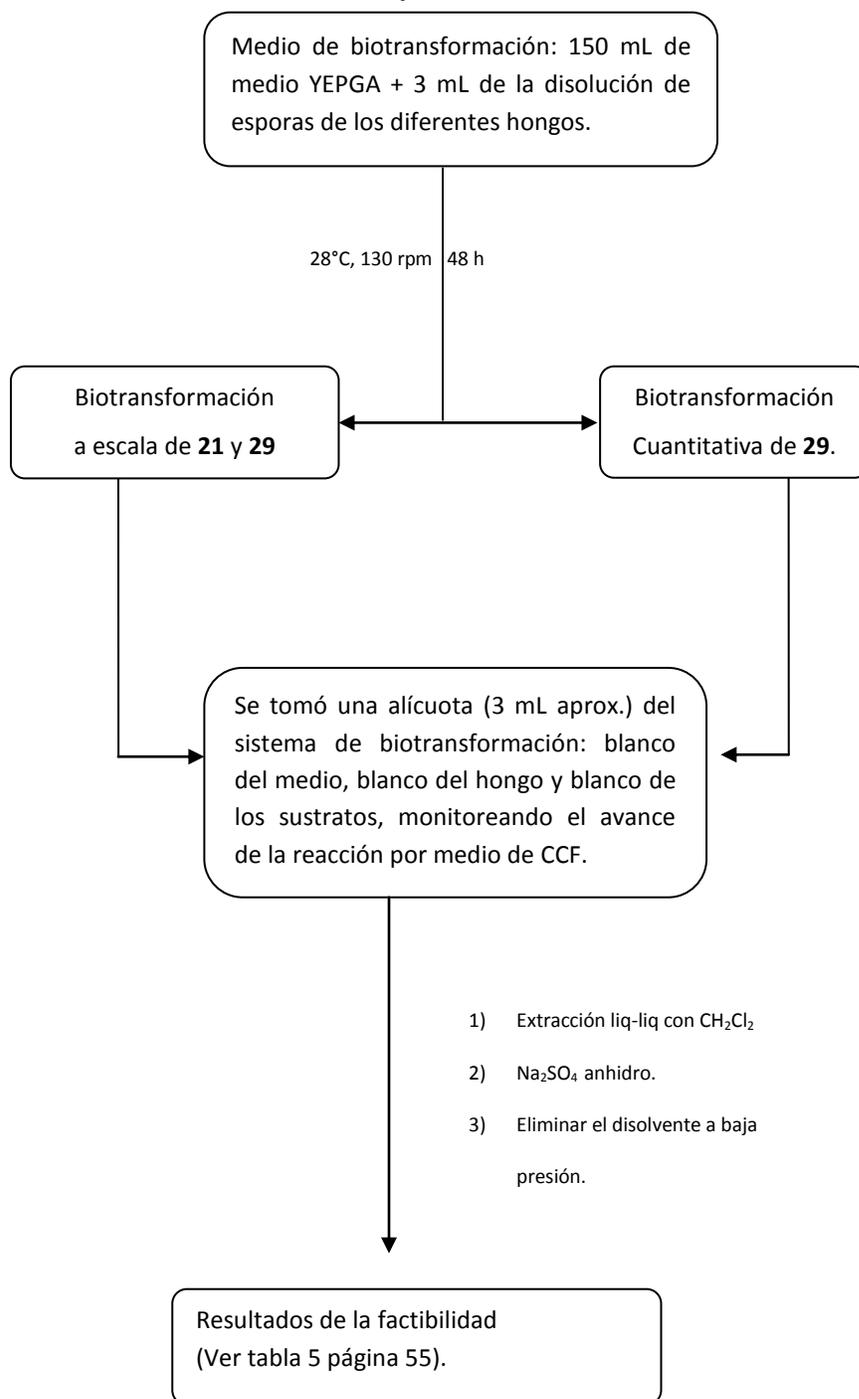
7.2.2.- Preparación de la solución densa de esporas.



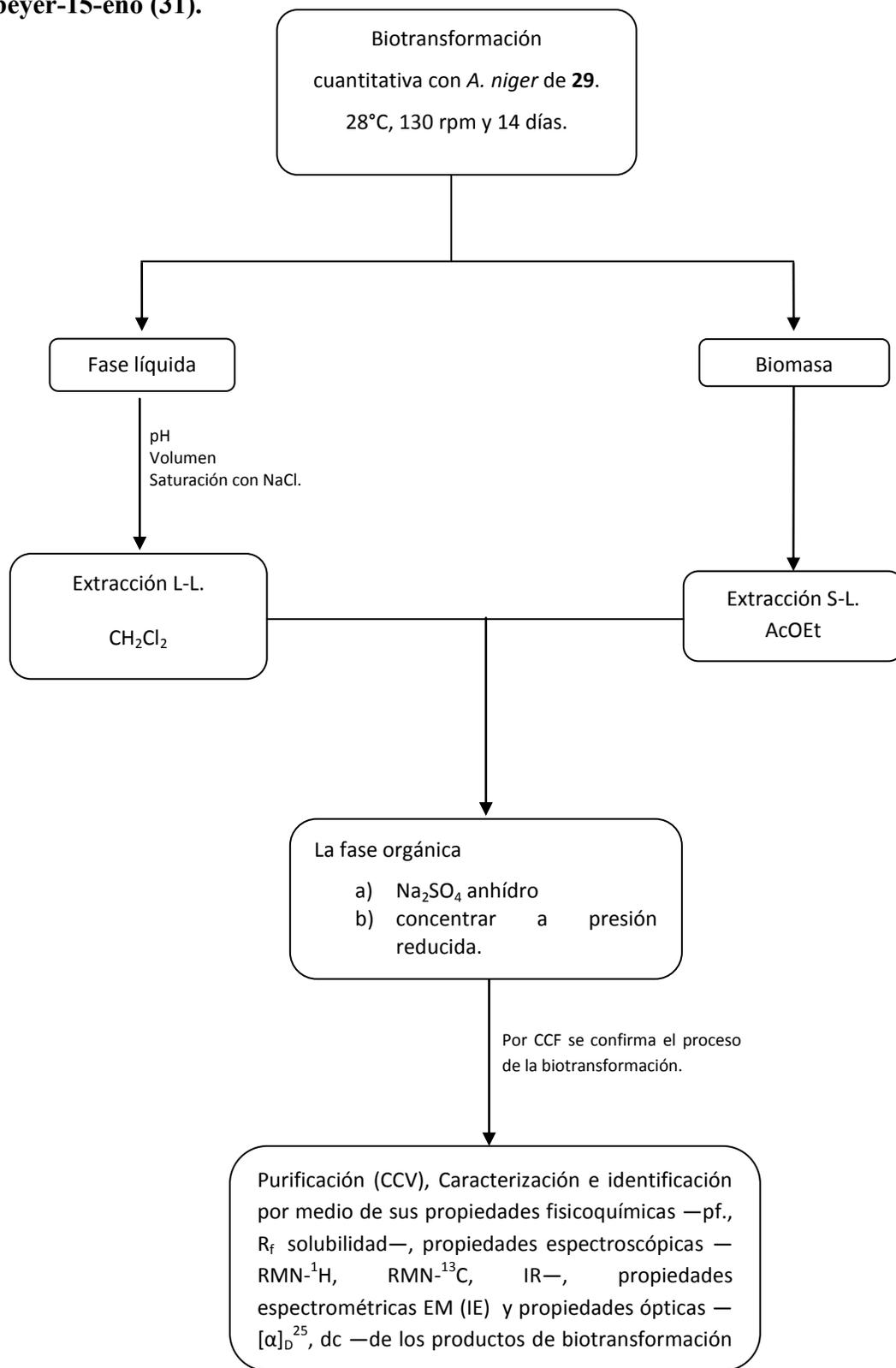
7.2.3.- Preparación del medio YEPGA.



7.2.4.- Factibilidad de la biotransformación y biotransformación cuantitativa.



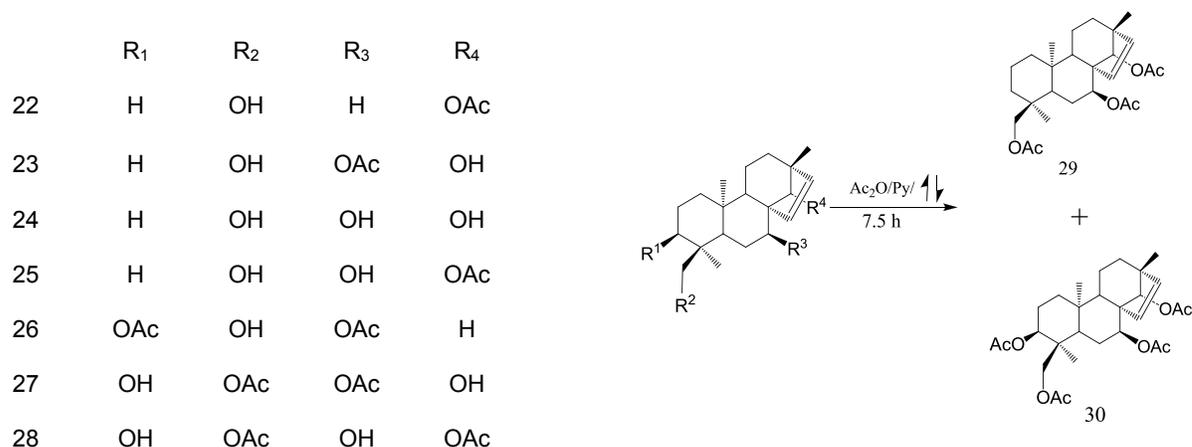
7.2.5.- Separación, purificación y caracterización del 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-ent-beyer-15-eno (31).



7.3.- Obtención de los derivados acetilados del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (29) y del 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetrahidroxi-*ent*-beyer-15-eno. (30).

Una mezcla de derivados del pusillatriol (2.5203 g), obtenido de *Sideritis pusilla* sp *flavovirens*, fue acetilado con 40 mL de anhídrido acético (Ac₂O) y 80 mL de piridina (Py) por 7.5 h a reflujo, siguiendo el curso de la reacción por CCF. Concluida la transformación química, se adicionó hielo a la mezcla de reacción para posteriormente llevar a cabo la extracción de la mezcla de productos, lo cual se logró por medio de extracciones sucesivas con CH₂Cl₂. La fase orgánica obtenida se lavó con (5 x 20 mL) de una solución de HCl (25%), para eliminar la piridina en forma de clorhidrato de piridinio (pH aproximado de 0); el exceso de ácido en el medio fue eliminado con una solución saturada de NaHCO₃ (5 x 20 mL) y el exceso de reactivo presente en el medio, se eliminó al lavarlo con salmuera (5 x 20 mL); para posteriormente secar la fase orgánica (Na₂SO₄ anhidro) y eliminar el exceso de disolvente a baja presión.

La purificación por cromatografía en columna flash de la mezcla del producto, permitió obtener el compuesto triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno. (2.1233 g, 84.25%) y del tetraacetato del 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetrahidroxi-*ent*-beyer-15-eno (170.9 mg, 6.7%), ver esquema 17.



Esquema 17. Reacción de acetilación de una mezcla de pusillatrioles.

La identificación de ambos compuestos se logró con base en sus datos de RMN ^1H y RMN ^{13}C .

Triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**)

pf: 205 °C.

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , TMS): 5.10 (dd, $J= 3, 1.8$ Hz, 1H, H-7); 4.71 (t, $J= 1.2$ Hz, 1H, H-14); 5.52 (dd, $J= 6, 1$ Hz, 1H, H-15); 5.57 (dd, $J= 6, 1$ Hz, 1H, H-16); 0.94 (s, 1H, CH_3 -17); 3.72 (d, $J= 11$ Hz, 1H, CH_3 -18 $_A$); 3.66 (d, $J= 11$ Hz, 1H, CH_3 -18 $_B$); 0.83 (s, 1H, CH_3 -19); 0.82 (s, 1H, CH_3 -20), 2.05(s, 3H, 7-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 1.97 (s, 3H, 18-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 1.98 (s, 3H, 14-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 38.2 (C-1), 18.9 (C-2), 35.4 (C-3), 36.0 (C-4), 41.5 (C-5), 24.5 (C-6), 70.7 (C-7), 56.1 (C-8), 47.9 (C-9), 37.1 (C-10), 31.6 (C-12), 90.5 (C-14), 129.9 (C-15), 131.1 (C-16), 17.6 (C-17), 72.2 (C-18), 15.2 (C-19), 17.7 (C-20).

Tetraacetato del 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetrahidroxi-*ent*-beyer-15-eno. (**30**).

pf. 238 °C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS): 5.55 (d, $J= 6.5$ Hz, 1H, H-16); 5.53 (d, $J= 6.5$ Hz, 1H, H-15); 5.12 (t, $J= 2.8$ Hz, 1H, H-7); 4.74 (dd, $J=8, 4$ Hz, 1H, H-3); 4.72 (t, $J= 1.5$ Hz, 1H, H-14); 3.93 (d, $J= 12$ Hz, 1H, CH_3 -18 $_B$); 3.04 (d, $J= 12$ Hz, 1H, CH_3 -18 $_A$); 0.95 (s, 3H, CH_3 -17); 0.84 (s, 1H, CH_3 -20); 0.83 (s, 1H, CH_3 -19); 1.69 (s, 3H, 18-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 2.03(s, 3H, 7-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 2.01 (s, 3H, 14-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 1.99 (s, 3H, 3-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , TMS): 38.2 (C-1), 18.9 (C-2), 73.3 (C-3), 36.0 (C-4), 41.5 (C-5), 24.5 (C-6), 70.8 (C-7), 56.1 (C-8), 47.9 (C-9), 37.1 (C-10), 31.6 (C-12), 90.4 (C-14), 135.4 (C-15), 129.6 (C-16), 18.9 (C-17), 65.2 (C-18), 13.9 (C-19), 15.5 (C-20), 169.9 (7-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 170.5 (18-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 171.0 (14-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21.1 (7-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21.1 (14-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.1 (18-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

EM (IE) m/z : 504 [M^+ 7.0], 324 (100), 253 (85.9), 384 (91.3), 402 (57.0), 264 (47.4), 282 (47.4), 342 (41.3), 183 (36.8), 105 (35.1), 145 (34.2).



7.4.- Obtención del 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-*ent*-beyer-15-eno (31).

El compuesto **29** (100 mg; 0.224 mmol) se disolvió en 2 mL de CH₂Cl₂ y 4 mL de MeOH, a la solución resultante se le adicionaron 7 mL de una solución de KOH (5%) en MeOH-H₂O (30:70) a temperatura ambiente y agitación constante, durante 3 h. El curso de la reacción fue seguida por medio de CCF.

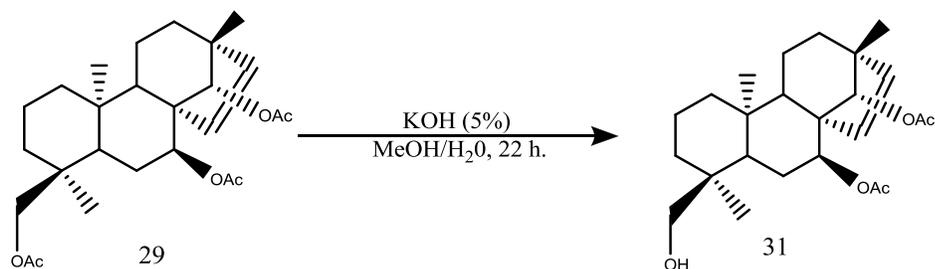
La mezcla de reacción fue neutralizada con una solución de HCl (50%), seguido de extracciones sucesivas (6X15 mL) con CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con salmuera (3X10 mL) y finalmente se secó con Na₂SO₄ anhidro. El exceso de disolvente se eliminó a presión reducida, ver esquema 18. Obteniéndose 71.8 mg (0.177mmol) de un sólido blanco de pf. 226°C.

R_f: 0.48 [hex/AcOEt (6:4)]

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS): 5.06 (t, J= 3, 1.5 Hz, 1H, H-7); 4.71 (t, J= 1.2 Hz, 1H, H-14); 5.57 (dd, J= 6, 1 Hz, 1H, H-15); 5.52 (dd, J= 6, 1 Hz, 1H, H-16); 3.03 (d, J= 11 Hz, 1H, CH₃-18_A); 3.31 (d, J= 11 Hz, 1H, CH₃-18_B); 0.95 (s, 1H, CH₃-17); 0.77 (s, 1H, CH₃-19); 0.82 (s, 1H, CH₃-20), 1.96 (s, 3H, 7-OOCCH₃), 1.99 (s, 3H, 14-OOCCH₃).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS): 38.2 (C-1), 18.9 (C-2), 35.4 (C-3), 36.0 (C-4), 41.5 (C-5), 24.5 (C-6), 71.1 (C-7), 56.1 (C-8), 47.9 (C-9), 37.1 (C-10), 31.6 (C-12), 90.5 (C-14), 129.9 (C-15), 135.1 (C-16), 19.1 (C-17), 71.3 (C-18), 17.7 (C-19), 15.4 (C-20), 20.9 (7-OOCCH₃), 21.2 (14-OOCCH₃).





- 1) Mezcla de Reacción.
- 2) Referencia **29**.
- 3) Producto de biotransformación obtenido con *A. niger*



Esquema 18. Reacción de hidrólisis de **29** con KOH (5%).

7.5.- Obtención del epóxido del 7 β -acetil-14 α ,18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**).

Se pesaron 100.1 mg (0.276 mmol) de 7 β -acetil-14 α ,18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**) y se disolvió en 30 ml de CH₂Cl₂, colocados en un baño de hielo con agitación constante; bajo estas condiciones se agregaron en poco a poco un total de 300 mg de AMCPB y se dejó la reacción durante 24 h, ver figura 5. Posteriormente, y al no observar ningún cambio en el producto de reacción, se colocó a temperatura ambiente durante 2 h y se agregaron 100 mg más de AMCPB para tener una proporción de reacción de 1:4 respecto de **23** con el AMCPB. No se observó ningún cambio, así que se regresó a las condiciones iniciales solo por 1 h.

Después de 28 h de no observarse la transformación química de **23**, se colocó a reflujo durante 15 h; después de 72 h se procedió a detener la reacción al no observar ningún cambio en el medio de la reacción, ver figura 6.



- 1) Medio de reacción.
- 2) Referencia de **23**.



Figura 5. Tiempo 0 de reacción.

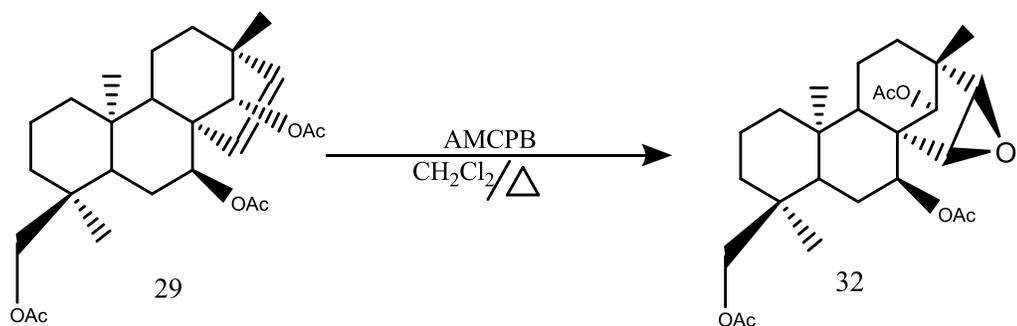
Figura 6. Placa después de 72 h.

Después de detener la reacción, se agregaron 10 ml de agua fría; posteriormente se realizaron extracciones con CH_2Cl_2 (5 x 20 mL), a continuación, a la fase orgánica se lavó con una solución saturada de bisulfito de sodio (3 x 15 mL) y finalmente se lavó a la fase orgánica con una solución al 10% de NaHCO_3 (5 x 15 mL).

7.6.- Obtención del 7 β ,14 α ,18-triacetoxi-15,16-epoxi-ent-beyereno (32).

En 10 mL CH_2Cl_2 se disolvieron 318.8mg (0.714 mmol) de **29**, la mezcla resultante se colocó a reflujo con agitación constante. Lentamente se fueron adicionando 362.2 mg de AMCPB. El curso de la reacción fue seguido por medio de CCF, después de 39.5 h, se procedió a detener la reacción por medio de la adición de 10 mL de agua fría. Posteriormente para recuperar los productos de la reacción, se procedió de la siguiente manera: la fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaHSO_3 (5 x 10 mL), seguida de extracciones con una solución de NaHCO_3 sobresaturada (4 x 10 mL), finalmente para eliminar el exceso de cualquier reactivo se realizaron lavados con agua (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro.

El exceso de disolvente fue eliminado por medio de un rotavapor para obtener un sólido cristalino de pf. 168° C., ver esquema 19.



Esquema 19. Reacción de epoxidación del compuesto **29**.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS): 5.32 (dd, J= 4, 2 Hz, 1H, H-7); 4.60 (s, 1H, H-14); 3.76 (d, J= 11 Hz, 1H, CH₂-18_A); 3.64 (d, J= 11 Hz, 1H, CH₂-18_B); 3.52 (dd, J= 3, 1 Hz, 1H, H-15); 3.14 (dd, J= 3, 1 Hz, 1H, H-16); 1.01 (s, 1H, CH₃-17); 1.0 (s, 1H, CH₃-20); 0.85 (s, 1H, CH₃-19); 1.95 (s, 3H, 7-OOCCH₃); 2.04 (s, 3H, 14-OOCCH₃); 1.98 (s, 3H, 18-OOCCH₃).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃, TMS): 38.2 (C-1), 18.9 (C-2), 35.4 (C-3), 36.0 (C-4), 41.5 (C-5), 24.5 (C-6), 71.1 (C-7), 56.1 (C-8), 47.9 (C-9), 37.1 (C-10), 31.6 (C-12), 81 (C-14), 53.9 (C-15), 58.9 (C-16), 16.1 (C-17), 72.6 (C-18), 17.6 (C-19), 15.8 (C-20), 169.9 (7-OOCCH₃), 171.4(14-OOCCH₃), 170.8 (18-OOCCH₃), 21.0 (7-OOCCH₃), 21.0 (14-OOCCH₃), 21.2 (18-OOCCH₃)

7.7.- Obtención del 3β,7β,14α,18-tetraacetil-15,16-epoxi-ent-beyereno (33).

En 10 mL CH₂Cl₂ se disolvieron 30.1 mg (0.0059 mmol) de **30**, la mezcla resultante se colocó a reflujo con agitación constante. Posteriormente se adicionaron 60 mg de AMCPB (1:2). El curso de la reacción fue seguido por medio de CCF (ver esquema 20), después de 24 h se procedió a detener la reacción adicionando 10 mL de agua fría; posteriormente se extrajo con CH₂Cl₂ (5 x 10 mL). A continuación la fase orgánica resultante se lavó con la solución saturada de NaHSO₃ (3 x 15 mL), para asegurar la transformación del AMCPB a ácido *m*-clorobenzoico.

La fase orgánica (CH₂Cl₂) se trató con una solución de NaHCO₃ al 10% (3X15mL) para eliminar el ácido *m*-clorobenzoico en forma *m*-clorobenzoato de sodio, la fase CH₂Cl₂ se lavó con agua (3 x 15 mL) y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El exceso de disolvente se



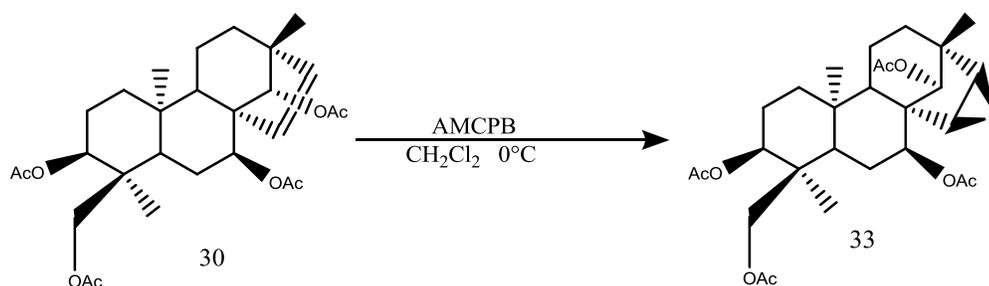
eliminó por una destilación a presión reducida, obteniéndose 26 mg (0.0497 mmol) de un sólido blanco de mp de 193 °C.

IR ν_{\max} cm^{-1} : 3692.02, 3030.53, 2957.43, 1730.85, 1603.06, 1462.04, 1233.92, 1156.98, 1037.99, 983.72.

RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3 , TMS): 5.32 (d, $J=3, 4$ Hz, 1H, H-7); 4.2 (dd, $J=11.6$ y 4.8Hz, 1H, H-3); 4.72 4.61 (dd, $J=5, 2$ Hz, 1H, H-3); (t, $J=1.4$ Hz, 1H, H-14); 4.01 (d, $J=12$ Hz, 1H, CH_3 -18_A); 3.50 (m, $J=11$ Hz, 1H, CH_3 -18_B); 3.50 (m, $J=3, 1$ Hz, 1H, H-15); 3.16 (dd, $J=3$ y 1.5 Hz, 1H, H-16); 1.03 (s, 1H, CH_3 -17); 1.03 (s, 1H, CH_3 -20); 0.85 (s, 1H, CH_3 -19); 2.03 (s, 3H, 7-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 2.01 (s, 3H, 14-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 1.99 (s, 3H, 18-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , TMS): 38.2 (C-1), 18.9 (C-2), 73.3 (C-3), 36.0 (C-4), 41.5 (C-5), 24.5 (C-6), 69.3 (C-7), 56.1 (C-8), 47.9 (C-9), 37.1 (C-10), 31.6 (C-12), 80.9 (C-14), 53.8 (C-15), 58.9 (C-16), 16.4 (C-17), 64.6 (C-18), 13.1 (C-19), 15.9 (C-20), 171.3 (14-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 170.5 (18-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21.1 (7-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21.1 (14-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 19.0 (18-OOC $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

EM (IE) m/z : 504 [M^+ 7.0], 340 (100), 267 (50.3), 239 (43.9), 285 (33.3), 400 (32.6), 95 (31.2), 175 (29.1), 141 (28.3), 418 (23.4), 389 (17.1).



- 1) Sistema de reacción
- 2) Referencia **30**.

R_f : 0.48

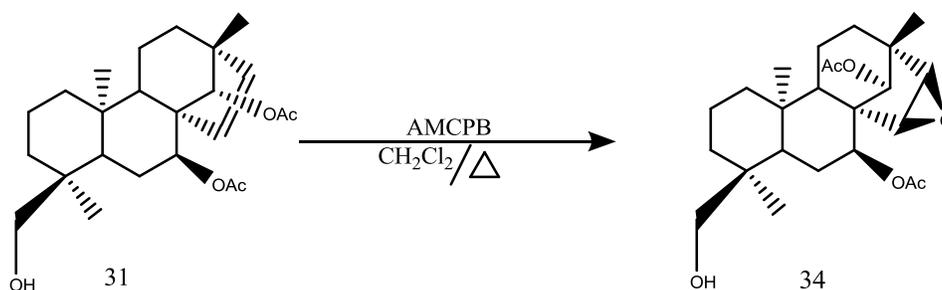
Placa eluida 6:4 n-hex/AcOEt

Esquema 20. Cromatopla en donde se observa el producto de la reacción.

7.8.- Obtención del 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (34).

En 10 mL CH₂Cl₂ se disolvieron 30.6 mg (0.0757 mmol) de **31**, la mezcla resultante se colocó a reflujo con agitación constante. Posteriormente se adicionaron poco a poco 120 mg de AMCPB (1:4). El curso de la reacción fue seguido por medio de CCF (ver esquema 21) después de 72 h se procedió a detener la reacción por medio de la adición de 15 mL de una solución saturada de NaHSO₃. Posteriormente la fase orgánica resultante se lavó con la solución de NaHSO₃ (2 x 15 mL), para asegurar la transformación del AMCPB a ácido *m*-clorobenzoico.

La fase orgánica (CH₂Cl₂) se trató con una solución de NaHCO₃ al 10% (3x15 mL) para eliminar el ácido *m*-clorobenzoico en forma *m*-clorobenzoato de sodio; la fase CH₂Cl₂ se lavó con agua (3 x 15 mL) y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El exceso de disolvente fue eliminado por medio del rotavapor para dar un sólido blanco de pf. 209° C.



- 1) Sistema de reacción
- 2) Referencia de **31**.

Esquema 21. Placa tomada a las 72 h de reacción.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS): 5.06 (t, J= 3, 1.5 Hz, 1H, H-7); 4.71 (t, J= 1.2 Hz, 1H, H-14); 5.57 (dd, J= 6, 1 Hz, 1H, H-15); 5.52 (dd, J= 6, 1 Hz, 1H, H-16); 0.95 (s, 1H, CH₃-17); 3.03 (d, J= 11 Hz, 1H, CH₃-18_A); 3.31 (d, J= 11 Hz, 1H, CH₃-18_B); 0.77 (s, 1H, CH₃-19); 0.82 (s, 1H, CH₃-20);

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃, TMS): 38.2 (C-1), 18.9 (C-2), 35.4 (C-3), 36.03 (C-4), 41.5 (C-5), 24.5 (C-6), 71.1 (C-7), 56.05 (C-8), 47.9 (C-9), 37.1 (C-10), C-11, 31.6 (C-12), C-13, 90.5 (C-14), 129.9 (C-15), 135.1 (C-16), 19.1 (C-17), 71.3 (C-18), 15.3 (C-19), 17.8 (C-20).

7.9.- Biotransformaciones.

7.9.1.- Resiembra de los hongos

Se realizó la resiembra de las diferentes cepas de microorganismos (*Aspergillus niger* (ATCC 16604), *Aspergillus fumigatus* (ATCC), *Penicillium chrysogenum* (ATCC1255), *Rhizopus nigricans* (ATCC 6227B), *Colletotricum gloeosporioides* y *Nocardia brazillencis*, cada uno en 5 tubos (18x150) con 15 mL de medio agar papa dextrosa (APD).

7.9.2.- Preparación de la solución densa de esporas

Para la preparación de 170 mL de medio APD, se pesaron 6.6 g de APD y se disolvieron en 170 mL de agua destilada. El medio se esterilizó a 1.5 lb. a 120 °C durante 15 min. Posteriormente se agregaron 10 mL de medio APD estéril en 15 matraces Erlenmeyer de 50 mL; los cuales fueron sembrados con los diferentes microorganismos y posteriormente incubados a temperatura ambiente durante 5 días. Finalmente, se agregaron 10 mL de agua destilada estéril para obtener una solución densa de esporas de los diferentes microorganismos.

7.9.3.- Preparación del medio para la biotransformación.

Medio YEPGA: 10 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 10 g de extracto de carne, 25 g de glucosa monohidratada, a pH 6 para la preparación de 1 L de medio.



Posteriormente se llevó a esterilizar a 120°C, 1.5 lb durante 15 minutos. Una vez esterilizado el medio, y bajo condiciones asépticas, se vertieron aproximadamente 125 mL de medio en 30 matraces Erlenmeyer de 250 mL.

7.9.4.- Factibilidad de la biotransformación del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (29) y el 7 β -acetil-14 α ,18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (23).

Para determinar la factibilidad de la biotransformación de los compuestos **23** y **29** se realizó el siguiente procedimiento:

A partir de una cantidad determinada de **23** y **29** (ver tabla 4), se disolvieron en 5 mL de acetona grado analítico y posteriormente se agregaron 2 mL de dicha solución a dos matraces Erlenmeyer de 250 mL (125 mL de medio YEPGA) cada uno, y los cuales habían sido inoculados con 48 h de anticipación con los diferentes microorganismos y utilizando como referencia los blancos correspondientes: blanco del medio, blanco del hongo y blanco de la sustancia.

Las condiciones de incubación fueron de 72 h, 28° C y 130 rpm para iniciar la determinación de la biotransformación de **23** y **29**.

Microorganismo	TAPT (29) Mg	7-ACEPT (23) Mg
<i>A. niger</i>	10.9	10.4
<i>A. fumigatus</i>	10.8	10.9
<i>P. chrysogenum</i>	10.9	-----
<i>C. gloesporioides</i>	9.4	-----
<i>N. brazillencis</i>	16.4	-----

Tabla 4. Cantidad de sustancias (mg) empleada en la biotransformación cualitativa de **23** y **29**.



Una vez transcurridos 15 días de incubación se procedió a la recuperación de la mezcla de biotransformación. A cada muestra se les realizaron una serie de extracciones líquido-líquido con CH₂Cl₂; la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se aplicó en CCF dando los resultados mostrados en el tabla 5, y en base a esto se tomo la decisión de realizar la biotransformación cuantitativa con *A. niger*, ya que el tiempo en que aparecen los productos es más rápido que con los otros microorganismos; a pesar de que con todos los microorganismos citados se lleva a cabo dicha bioconversión.

Microorganismo	TAPT (29)	7-acetilpusilliatriol (22)
<i>A. niger</i> ¹	+++++ ²	+++++ ²
<i>A. fumigatus</i> ¹	+++++ ²	+++++ ²
<i>P. chrysogenum</i> ¹	+++++ ²	n.d. ³
<i>R. nigricans</i>	+++++ ²	n.d. ³
<i>C. gloeosporioides</i> ¹	+++++ ²	n.d. ³
<i>N. brazillencis</i> ¹	+++++ ²	n.d. ³

Tabla 5. Factibilidad de biotransformación de 1 y 2 con diferentes microorganismos.

¹Medio YEPGA: 10 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 10 g de extracto de carne, 25 g de glucosa monohidratada, a pH 6.

²+++++: Biotransformación que al menos da dos productos de polaridad mayor a la materia prima.

³n.d.: No determinada.

7.9.5.- Biotransformación cuantitativa del triacetato del 7β,14α,18-trihidroxi-ent-beyer-15-eno (29) con *Aspergillus niger*.

A cada uno de los matraces que contenía 125 mL de medio YEPGA (15 matraces de 250 mL), se agregaron 3 mL de la solución densa de esporas de *A. niger* incluyendo al blanco del hongo (excepto para blanco del medio y blanco de la sustancia), para posteriormente llevar a incubación en un orbital rotatorio a 28 °C y 130 rpm. Después de 72 h de incubación, se disolvieron 200.7 mg de **29** en acetona grado analítico y se agregó dicha solución a cada matraz inoculado y al blanco de la sustancia.



Por otro lado, a cinco matraces erlenmeyer de 250 ml (125 mL de medio YEPGA), con 72 h previas de inoculación con una solución densa de esporas de *A. niger*, se les agregó una solución de **29** (100.7 mg disueltos en acetona).

El curso de la biotransformación se siguió por medio de CCF. Para lo cual, se tomó una alícuota (2-3 mL) a 5 h de incubación y posteriormente a intervalos de 24 h, de dos matraces del sistema de biotransformación, del blanco del medio, blanco de la sustancia y blanco del hongo durante 15 días.

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

7.9.6.- Extracción y purificación de las mezclas de biotransformación

Después de 15 días, el sistema de cultivo se filtró a vacío para separar la biomasa del medio líquido. A la fase acuosa se le determinó su pH, volumen y posteriormente se saturó con NaCl. A la fase líquida se le realizó una extracción líquido-líquido con CH_2Cl_2 (5 x 30 mL), la fase orgánica resultante se secó con Na_2SO_4 anhidro y finalmente se concentró por medio del rotavapor.

Por otro lado, a la biomasa se le realizó una extracción sólido-líquido con AcOEt (8 x 30 mL) y se agitó por un intervalo de tiempo determinado, para extraer los productos de biotransformación retenidos en la biomasa, la extracción se corroboró por medio de CCF.

7.9.7.- Separación y purificación de la mezcla de productos de biotransformación.

El residuo de la mezcla de productos de biotransformación (1.4864 g) fue adsorbida en 0.9587 g de sílica gel para CCF.

El residuo fue aplicado en una columna [1 cm de diámetro y una altura de 6.5 cm] para cromatografía a vacío (CCV), previamente empacada en gel de sílice para cromatografía flash. El desarrollo cromatográfico se realizó empleando como eluyente, hexano y mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente.



De las fracciones 87-112, [hexano/AcOEt (85:15)] se obtuvo un sólido que fue recristalizado por par de disolventes (AcOEt/ hexano), recuperándose 120 mg (60.2 %) de un sólido blanco cristalino de pf. 206-207° C, que por sus propiedades fisicoquímicas y constantes espectroscópicas fue identificado como 7 β ,14 α ,18-triacetilpusillatriol (**29**), ver figura 7.



- 1) Biotransformación de **29** con la biomasa de *A. niger*.
- 2) Referencia de compuesto **29**.

Fracciones 85-91

Rf: 0.48 (hex/AcOEt 7:3).

Figura 7. Placa en donde se observa el compuesto **29** de la biotransformación con *A. niger*.

De las fracciones 151-192, eluidas con hexano/AcOEt (8:2), se obtuvieron 12.8 mg (6.4 %) de un sólido blanco de punto de fusión 229° C, que por sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas fue identificado como el compuesto 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**31**).



- 1) Biotransformación del compuesto **29** con *A. niger*.
- 2) Referencia del compuesto **29**.

Fracciones 168-176

Rf: 0.46 (hex/AcOEt 6:4).

Figura 8. Placa en donde se observa la obtención del producto de biotransformación con *A. niger*.

7.9.8.- Biotransformación cualitativa del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno con *C. gloesporioides*.

Durante el seguimiento de la factibilidad de biotransformación del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno con *C. gloesporioides* y utilizando una muestra auténtica del 7 β ,14 α ,18-triacetil-15,16-epoxi-*ent*-beyereno como referencia se logró identificar por CCF a dicho compuesto como producto de biotransformación del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno con *C. gloesporioides* en medio YEPGA, dicho compuesto se formó a los 7 días de haber inoculado con **29**.

7.9.9.- Determinación de la cinética de la biotransformación de **29**.

A partir de la biotransformación del compuesto **29**, con diferentes microorganismos (ver tabla 6); se propuso determinar la cinética de la biotransformación de dicho compuesto bajo las condiciones ya descritas anteriormente.

Microorganismo	TAPT (29)
<i>A. niger</i> ¹	+++++ ²
<i>A. fumigatus</i> ¹	+++++ ²
<i>C. gloesporioides</i> ¹	+++++ ²

Tabla 6. Microorganismos utilizados para la cinética.

Para determinar la velocidad de biotransformación del compuesto **29** se inicio muestreando cada dos horas las primeras 3 muestras, a partir de la inoculación del medio con **29**; posteriormente se propuso muestrear cada 24 h, debido a que por CCF no se observaba una transformación apreciable de **29** con los diferentes hongos.

Posteriormente, dichas muestras se trataron de analizar por CLAR, colocando primero las referencias de las sustancias **23** y **29**, así como también, el producto **31** y **32**; ya



que son los productos que se esperaban encontrar en las muestras tomadas de los medios de biotransformación.

Las condiciones óptimas de separación en CLAR fueron las siguientes: columna C-18, tamaño de partícula 3 μm , dimensiones de 2.1 X 100 μL , fase móvil 70:30 ACN/H₂O, longitud de onda 208 nm, 3-10 mL volumen de inyección, con una presión del sistema de 773 psi, y una velocidad de flujo de 0.2 mL/min con un tiempo muerto de la columna de 1.2 min.

Bajo estas condiciones, se pudieron determinar los picos de absorción de los compuestos **23**, **29** y **31** (ver figura 9, 10 y 11). Una vez determinados los tiempos de retención de cada sustancia, se procedió a analizar las siguientes muestras:

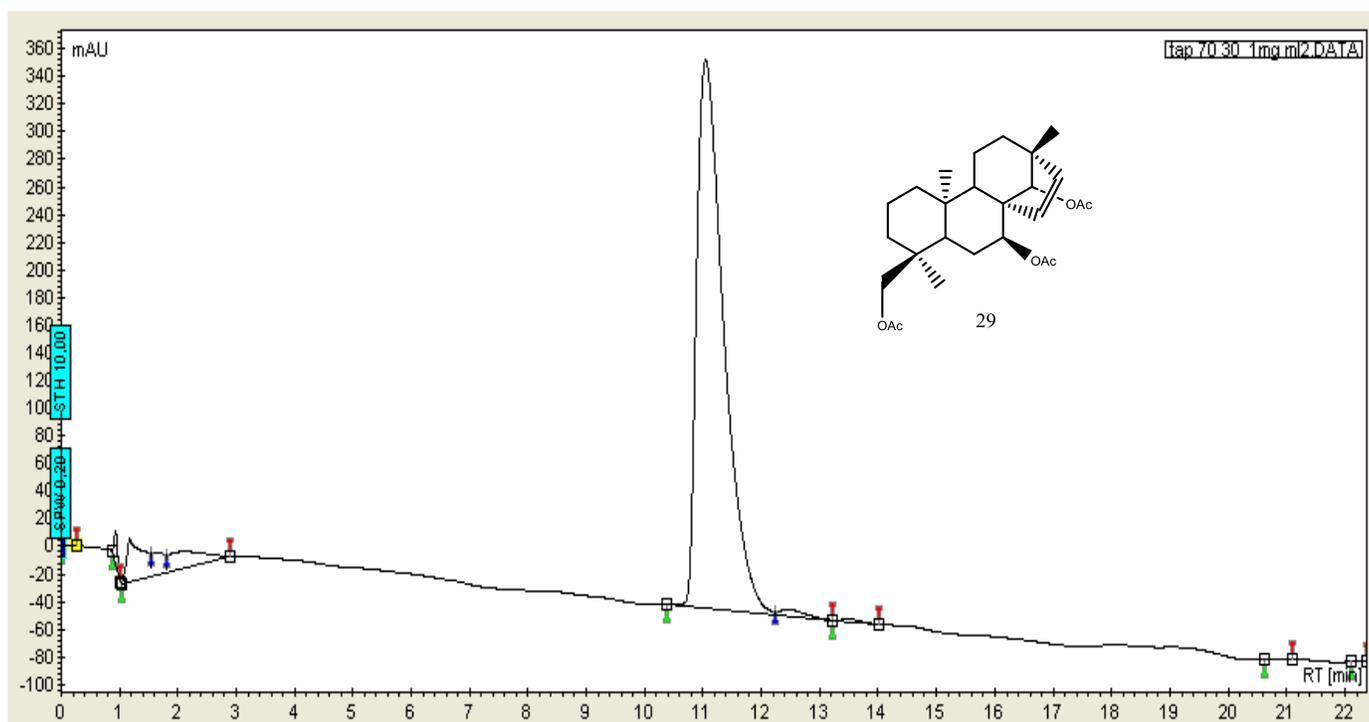


Figura 9. Cromatograma del triacetato de *ent*-7 β ,14 α ,18-trihidroxibeyer-15-eno (**29**)
[c= 1 mg/mL ACN/H₂O 70:30]

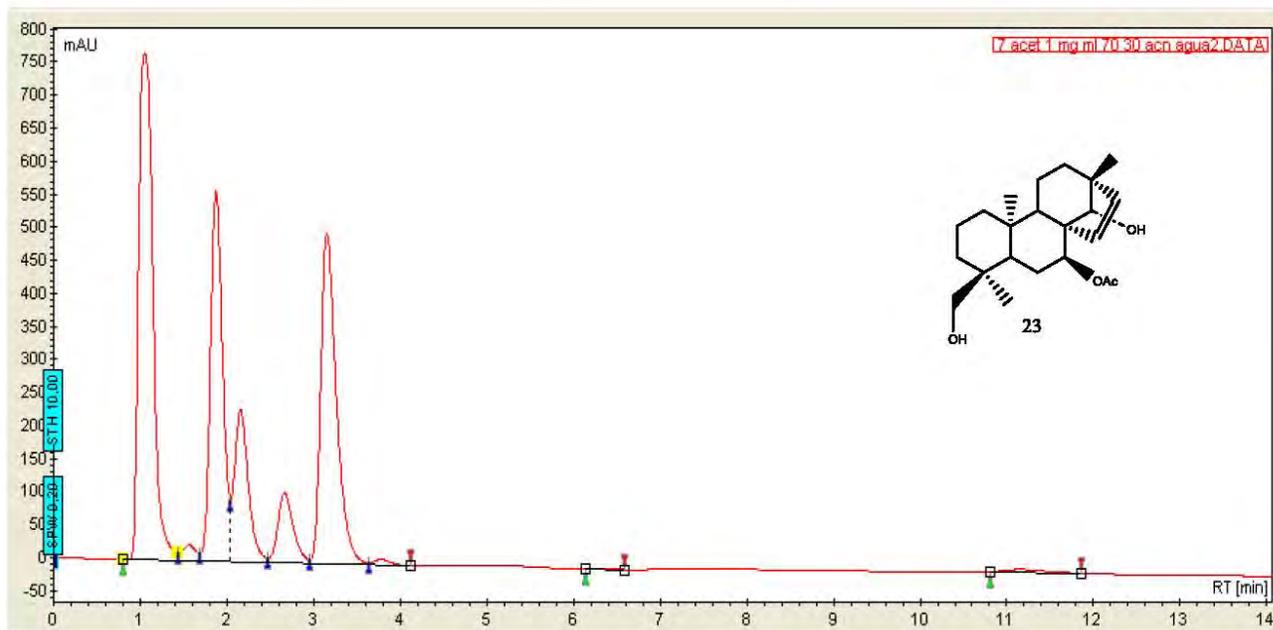


Figura 10. Cromatograma del ent-7 β -acetil-14 α , 18-dihidroxibeyer-15-eno [c= 1 mg/mL ACN/H₂O 70:30]

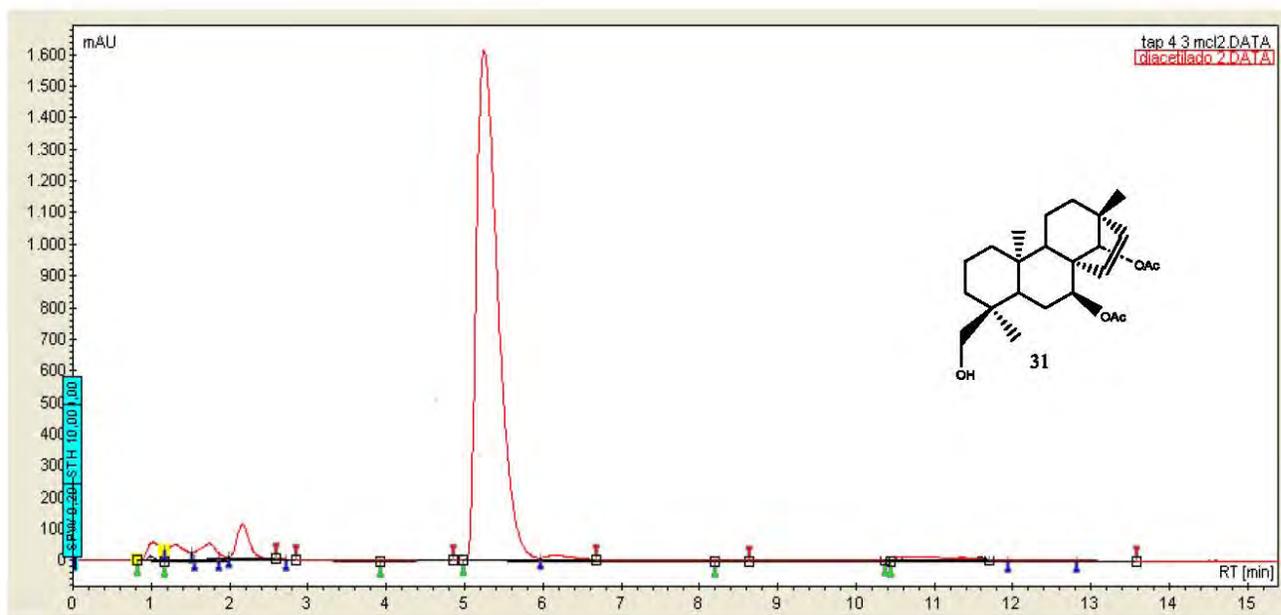


Figura 11. Cromatograma del ent-7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxibeyer-15-eno (31). [c= 4 mg/mL ACN/H₂O 70:30]



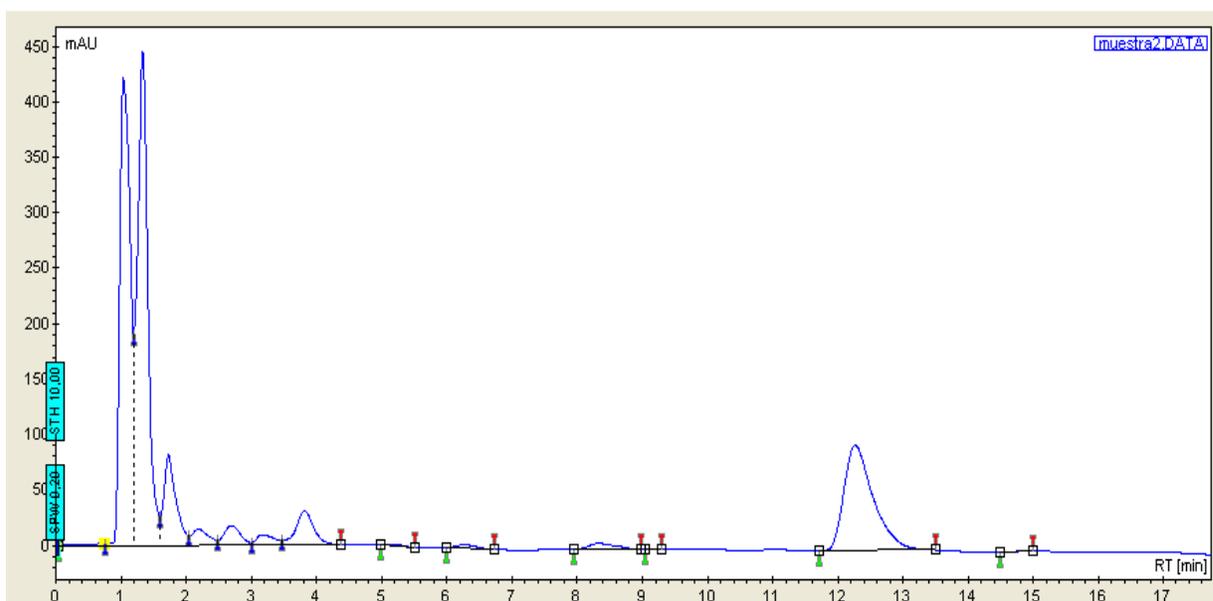


Figura 12. Muestra de **29** con *C. gloesporioides* a las 2 horas de incubación. Se puede observar que la concentración de los metabolitos del hongo son mayores a los productos que se podían esperar para dicho compuesto, por lo que la determinación de los compuestos **23**, **31**, **32** e incluso el **29**, no se pueden observar.

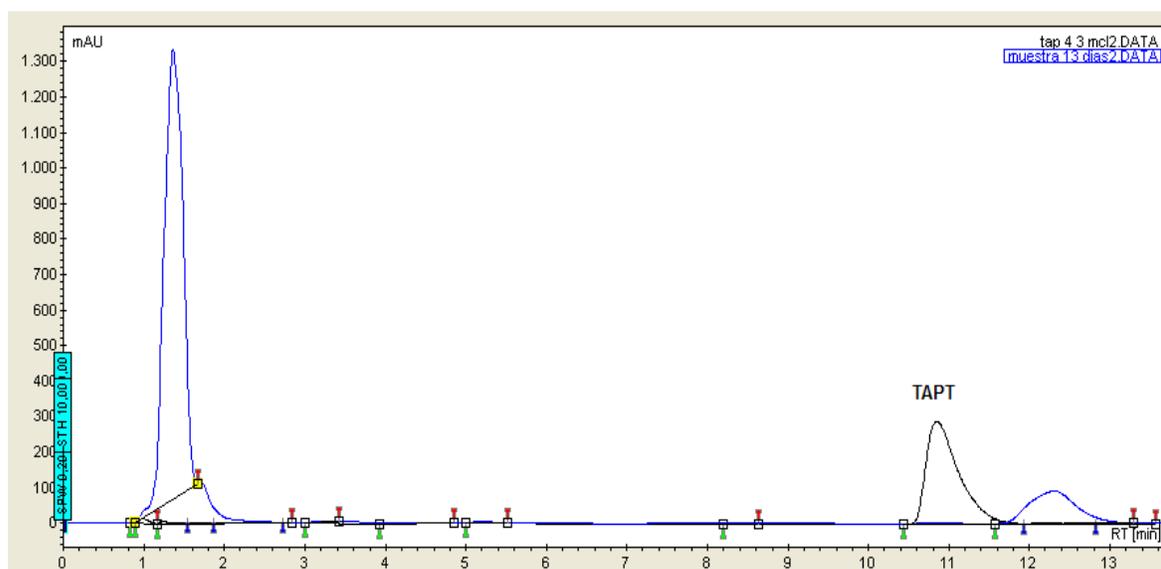


Figura 13. Comparación del cromatograma de **29** con el de la muestra de **29** con *A. niger* a los 13 días de incubación. Se puede observar que la concentración de los metabolitos del hongo son mayores a los productos que se podían esperar para dicho compuesto, por lo que la determinación de los compuestos **23**, **31**, **32** e incluso el **29**, no se pueden observar.

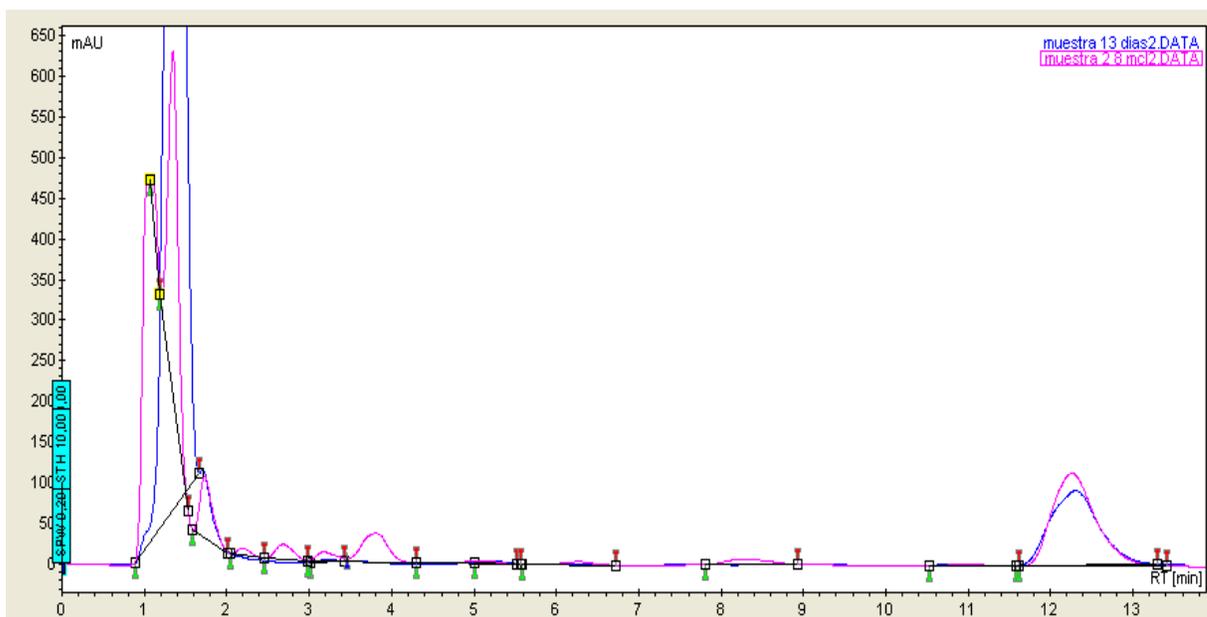


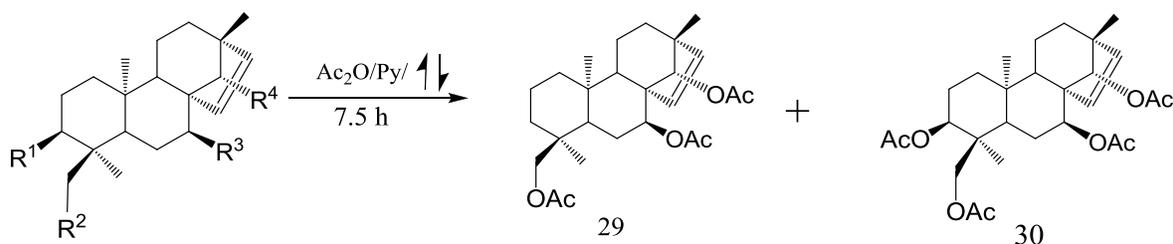
Figura 14. Comparación de los cromatogramas de las muestra de **29** con *A.niger* a las 2 horas y a los 13 días de incubación. Se puede observar que la concentración de los metabolitos del hongo son mayores a los productos que se podían esperar para dicho compuesto, por lo que la determinación de los compuestos **23**, **31**, **32** e incluso el compuesto **29**, no se pueden observar.

8. Resultados y Análisis



8.1.- Obtención de los derivados acetilados del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (29) y del 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetrahidroxi-*ent*-beyer-15-eno. (30).

A partir de un mezcla de pusillatrioles obtenidos de las partes aéreas de *Sideritis arborescenses ssp arborescense* Salzm, constituida principalmente del 7 β -acetil-14 α ,18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (23) fue acetilada, de donde se obtuvieron principalmente dos productos de reacción: el triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno como producto mayoritario y el tetraacetato del 3 β ,7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno es el constituyente minoritario de dicha mezcla; los productos de reacción se describen en la parte experimental, ver esquema 22.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
22	H	OH	H	OAc
23	H	OH	OAc	OH
24	H	OH	OH	OH
25	H	OH	OH	OAc
26	OAc	OH	OAc	H
27	OH	OAc	OAc	OH
28	OH	OAc	OH	OAc

Esquema 22. Reacción de acetilación de una mezcla de pusillatrioles.

Para confirmar la estructura del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (29) compuesto objeto de estudio, se procedió a analizar sus datos espectroscópicos y sus propiedades fisicoquímicas. El triacetato del 7 β , 14 α , 18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno, es un sólido cristalino de punto de fusión 206 °C, que en su espectro RMN-¹H (espectro 1)



muestra tres señales simples a campo alto que corresponde a tres grupos metilos, los cuales forman parte de un diterpeno tetra-cíclico (C_{20}), lo cual está de acuerdo con la biogénesis de dichos compuestos. El compuesto en discusión presenta una fórmula molecular $C_{26}H_{38}O_6$ (446 g/mol), derivado del *ent*-beyereno (ver figura 15).

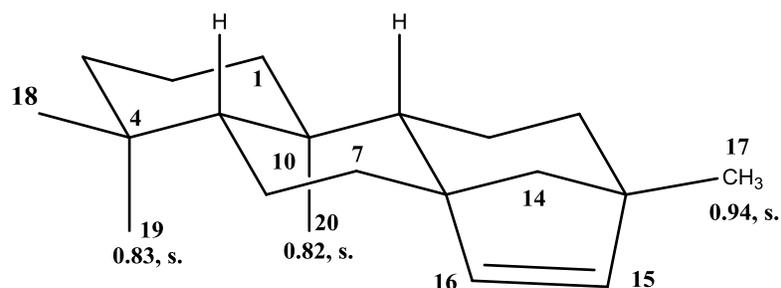


Figura 15. Fórmula parcial A, desplazamientos químicos de RMN- 1H para el esqueleto del *ent*-beyereno (**29**).

El número de átomos de carbono presente en la molécula fue confirmado con base en su espectro de RMN- ^{13}C , donde se observan cinco átomos de carbono con hibridación sp^2 y veintidós átomos de carbono sp^3 , de los cuales corresponden a seis metinos, siete metilenos y seis metilos, los cuales incluyen a los grupos acetato (CH_3COO^-) presentes en la molécula. Adicionalmente en su espectro de RMN- 1H se observan dos señales doble de doble (dd) a campo bajo, que por su desplazamiento químico corresponden a los hidrógenos vinílicos de la posición H-15 (δ_H 5.52) y H-16 (δ_H 5.57). La señal δ_H 4.71 (t, $J= 1.2$ Hz, 1H), fue asignada al H-14. En su espectro COSY, se pueden observar los acoplamientos de H-14 con H-15 y H-16 (ver figura 16).

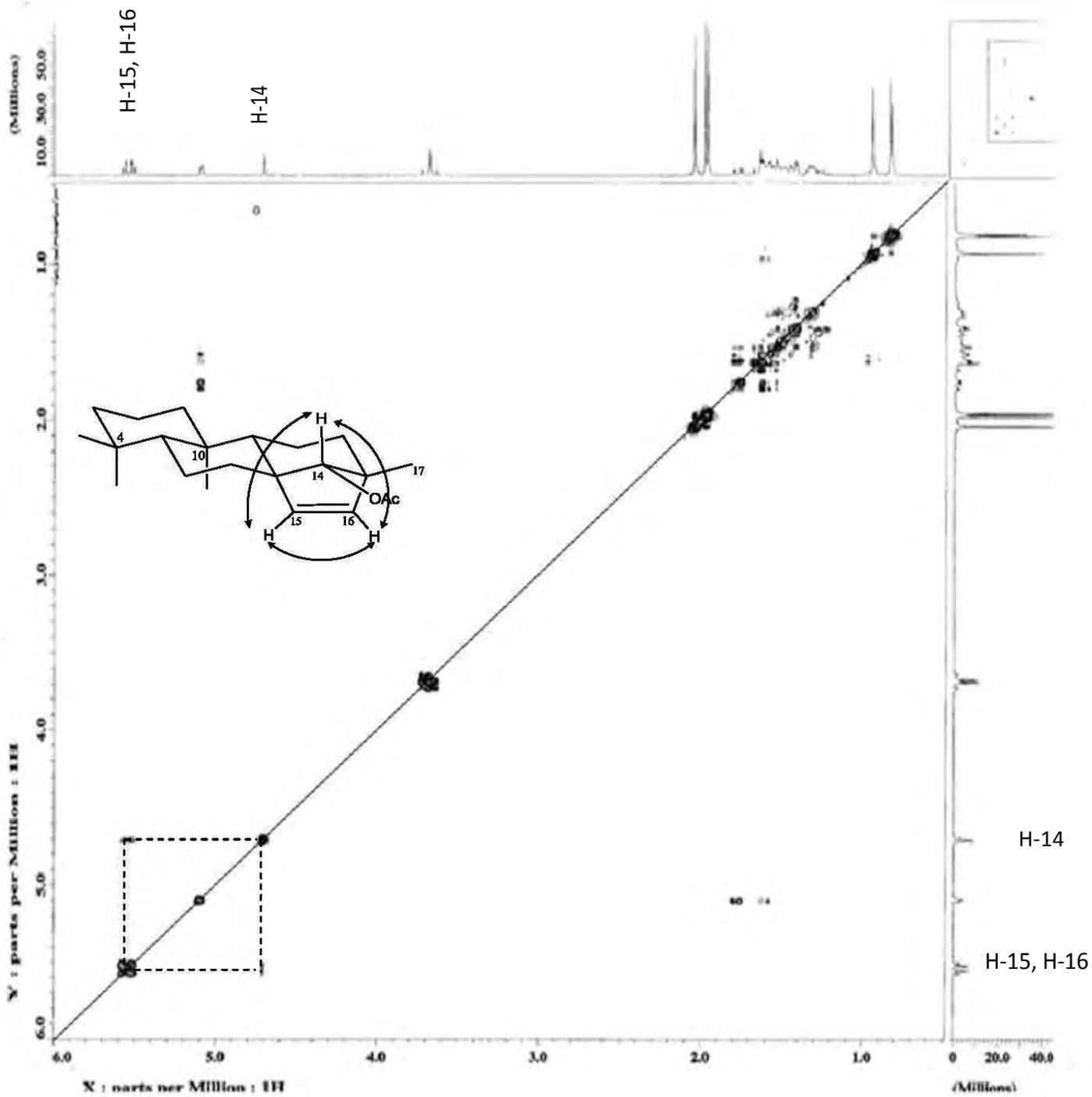


Figura 16. Espectro COSY de 29.



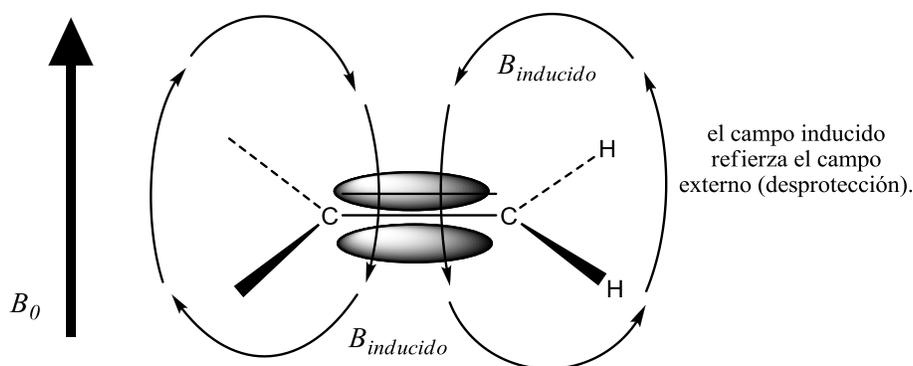
El desplazamiento químico de CH₃-17 (δ_H 0.94) a campo bajo es debido al efecto de anisotropía¹⁵ causado por Δ^{15-16} además del acoplamiento a través del espacio con el H-14.

La señal δ_H 5.10 (dd, J= 3, 1.8 Hz, 1H) se asignó al H-7. Por otro lado, se observa dos señales dobles (sistema AB) que corresponden a los hidrógenos diastereotópicos del metileno del C-18 (δ_C 72.2). Con base en lo anterior, se pueden ubicar los grupos acetato en los C-7(δ_C 70.7), C-14(δ_C 90.5) y C-18 (δ_C 72.2). De la discusión anterior se confirmó que la sustancia corresponde al triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno.

El producto minoritario aislado de la purificación de **29**, es un sólido blanco de pf. 238 °C, el cual presenta un ión molecular de *m/z* 504 en su espectro de masas por impacto electrónico, que corresponde a la fórmula molecular C₂₈H₄₀O₈.

Al comparar su espectro de RMN-¹H (espectro 4) de la sustancia **30** con el del compuesto **29**, se observa el sistema AB (δ_H 5.53 y δ_H 5.55) que corresponde a los hidrógenos vinílicos en los C-15 (δ_C 129.5) y C-16 (δ_C 135.4) respectivamente. Asimismo, observa una señal triple (δ_H 5.12, J= 2.8 Hz, 1H) que corresponde al H-7 (δ_C 70.8), mientras el δ_H 4.72 aparece la señal característica del hidrógeno en C-14 (δ_C 90.4). Además se observa el sistema AB (δ_H 3.93 y δ_H 3.54) correspondiente a los hidrógenos unidos al C-18 (δ_C 65.2); lo anterior indica que el esqueleto base es el mismo para ambos compuestos.

¹⁵ Anisotropía es generada por los orbitales π de los C-15 Y C-16, los cuales ejercen un efecto de desprotección y desplazan al CH₃-17 a un campo más bajo, a diferencia de los otros metilos.



Los protones vinílicos están situados en la periferia del campo magnético inducido de los electrones π . En esta posición, son desprotegidos por el campo magnético inducido.

Adicionalmente se observan las tres señales simples que corresponden a los CH₃-17 (δ_H 0.95), CH₃-19 (δ_H 0.83) y el CH₃-20 (δ_H 0.84), lo cual permite proponer la fórmula parcial B (ver figura 17), donde se indican los desplazamientos químicos de C-13 para algunos átomos de carbono claves en la caracterización de la sustancia en discusión.

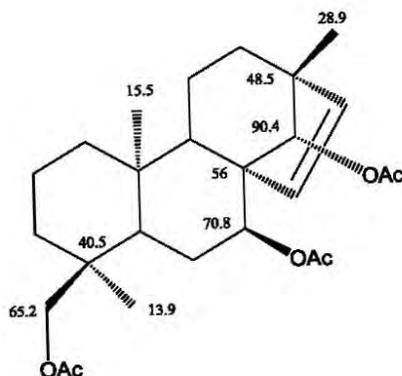
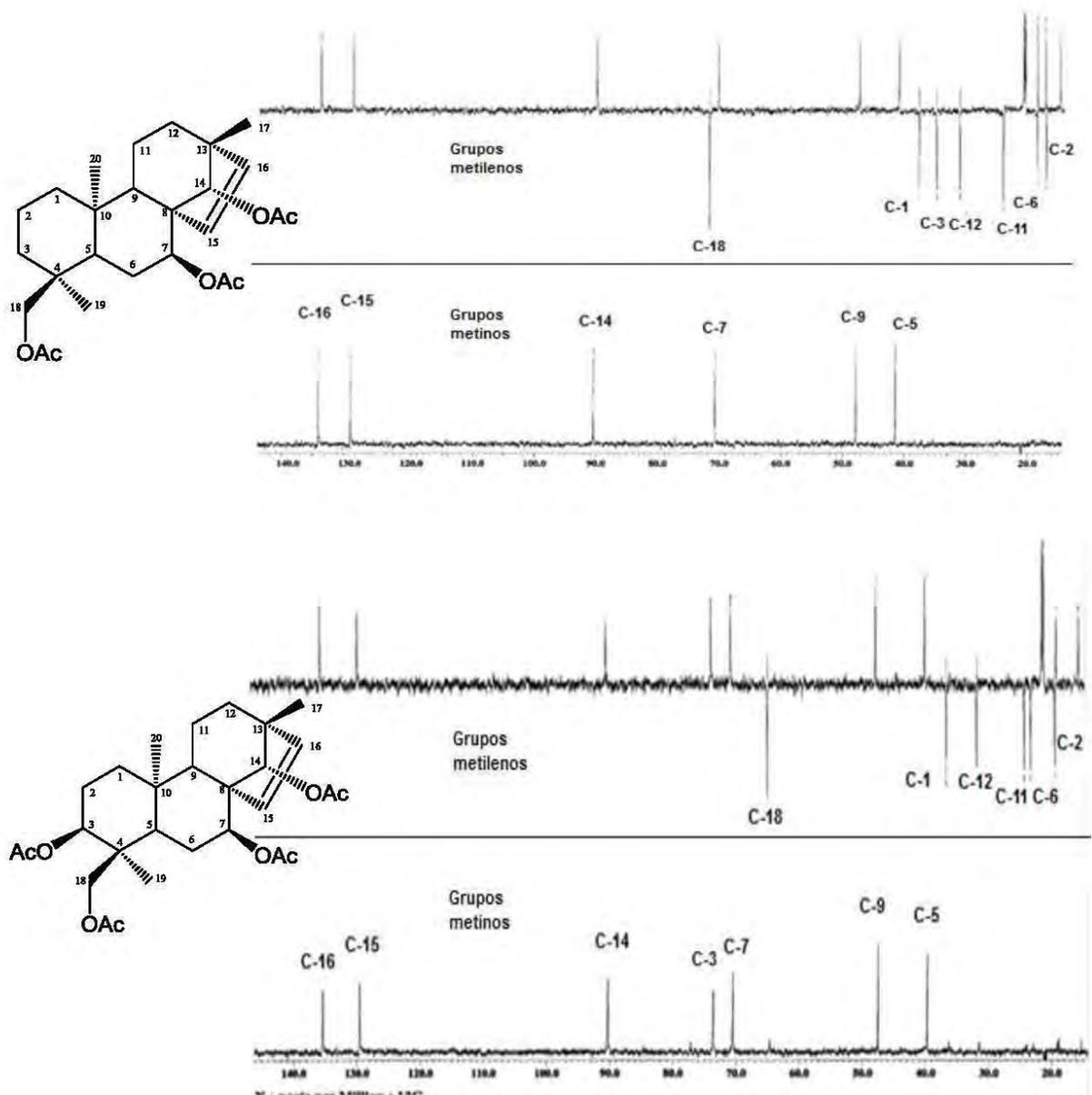


Figura 17. Fórmula Parcial B desplazamientos químicos de RMN-¹³C para algunos carbonos selectos de la estructura del *ent*-beyereno para el compuesto **30**.

Al analizar los espectros de RMN-¹³C en desacoplamiento total, se observan 28 átomos de carbono para la sustancia **30**, lo cual está de acuerdo a la fórmula molecular propuesta (C₂₈H₄₀O₈). Sin embargo, al comparar los espectros de RMN-¹³C aplicando la técnica del DEPT (ver esquema 23) para dichos compuestos, en el compuesto **29** se observan seis metinos, siete metilenos, seis metilos y siete carbonos cuaternarios. Por otro lado, para el compuesto **30** se observan siete metinos, seis metilenos, siete metilos y ocho carbonos cuaternarios. Dicho análisis, sugiere que un metileno en el compuesto **29** cambio a metino en el compuesto **30**, además de la incorporación de un grupo acetato, ya que aumenta el número metilos y carbonos cuaternarios. Con base en lo anterior la diferencia más notable en el espectro de RMN-¹³C es la aparición de una señal en 73.6 ppm que corresponde a un carbono base de oxígeno y la aparición de una señal en 64.7 ppm que corresponde a un metileno.





Esquema 23. Comparación de los espectros DEPT de los compuestos **29** y **30**.

Con base en el espectro HMBC de la sustancia **30** se observa una interacción del CH_2 -18 con el carbono que presenta un δ_C 73.6 a tres enlaces, lo anterior obliga a situar al grupo acetato en la posición C-3 (δ_C 73.6) con una orientación α -axial. Lo anterior está de



acuerdo con lo informado en la literatura por García-Granados y col. para el compuesto **30** el cual fue identificado como el tetraacetato del 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetrahidroxi-*ent*-beyer-15-eno **30** [25].

8.2.- Purificación del 7 β -acetil-14 α ,18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**).

Para la identificación del 7 β -acetil-14 α ,18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**), compuesto mayoritario encontrado en las partes aéreas de *Sideritis arborescens ssp arborescense* Salzm, se procedió al análisis de sus datos espectroscópicos RMN ^1H y RMN ^{13}C , y sus propiedades físicas. El compuesto **23** es un sólido blanco de pf. 131 °C, con una fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$ que corresponde a 362 g/mol. Además, en su espectro RMN- ^1H (espectro 7) se observa tres señales simples a campo alto que corresponden a los CH_3 -17 (δ_{H} 1.06), CH_3 -19 (δ_{H} 0.81) y CH_3 -20 (δ_{H} 0.74), y que a diferencia de **29** únicamente muestra una señal correspondiente al grupo acetato ($-\text{OCOCH}_3$) en δ_{H} 2.07.

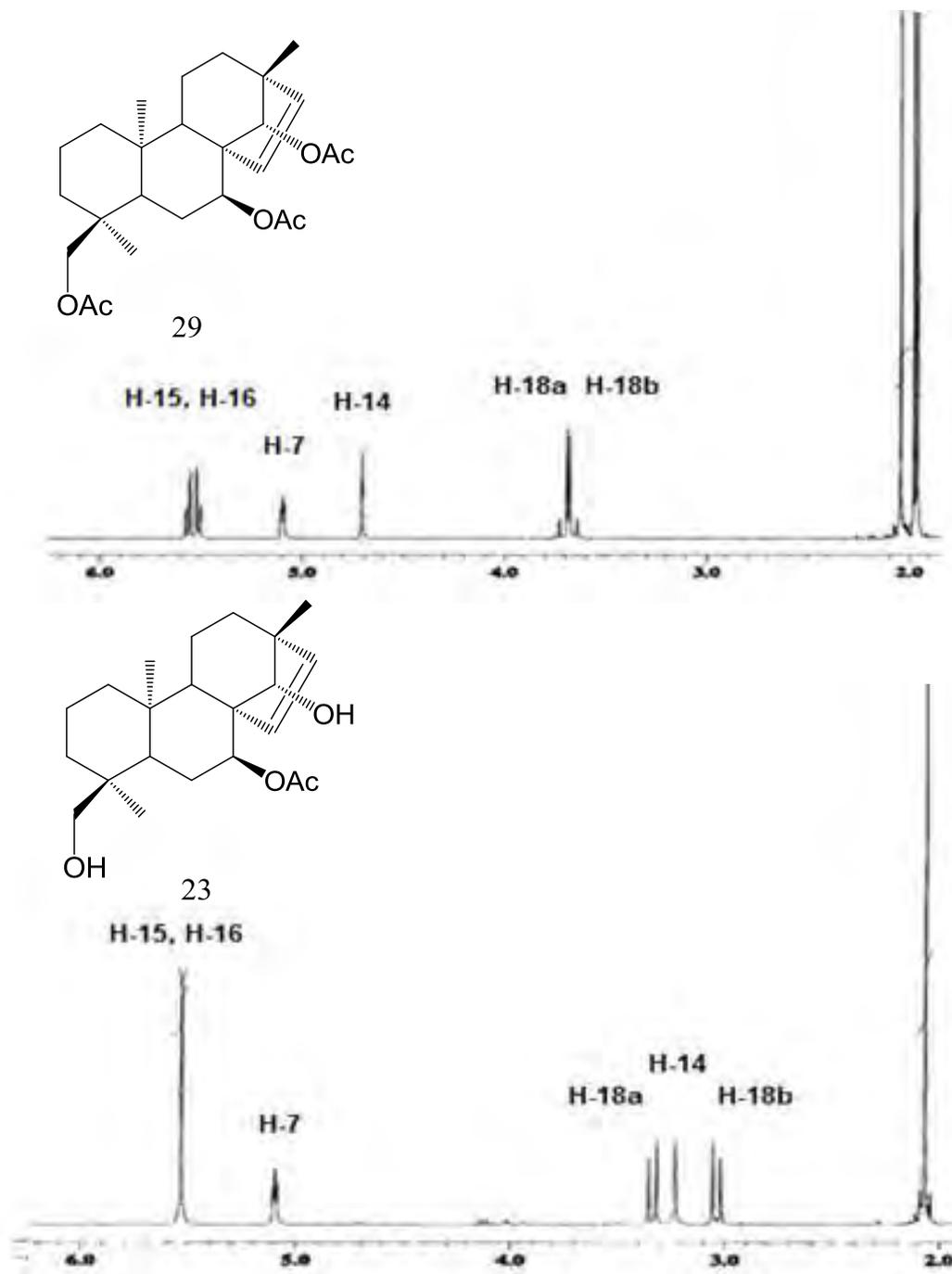
El número de átomos de carbono, fue confirmado por su espectro de RMN- ^{13}C , donde se observan 3 señales que corresponden a Csp^2 y 19 señales atribuidas a Csp^3 . El grado de hidrogenación para cada uno de los átomos de carbono fue determinado con base en su espectro DEPT, donde se observan seis metinos, siete metilenos y cuatro metilos, que de estos cuatro solo uno de ellos corresponde al grupo acetato ($\text{CH}_3\text{COO}-$).

Adicionalmente en su RMN- ^1H se observan dos señales doble de doble (dd) a campo bajo, que por su desplazamiento químico corresponden a los hidrógenos vinílicos de la posición H-15 (δ_{H} 5.53) y H-16 (δ_{H} 5.54). La señal δ_{H} 3.23 (s, 1H), fue asignada al H-14, la presencia y naturaleza del grupo hidroxilo en C-14 determina los desplazamientos químicos de CH_3 -17 (δ_{H} 0.94) a campo bajo y H-14 a campo alto, con respecto al desplazamiento mostrado por dichos hidrógenos en **29**, ver esquema 24. Por otro lado, el sistema AB que conforman los hidrógenos H-18 $_A$ (δ_{H} 3.34) y H-18 $_B$ (δ_{H} 3.04), también se ven modificados por la naturaleza electroattractora del grupo hidroxilo.

La señal con δ_{H} 5.10 (dd, $J= 2.7, 1.5$ Hz, 1H) se asignó al H-7, la cual es muy parecida al compuesto **29**. Con base a lo anterior, se ubicó al grupo acetato en C-7 (δ_{C} 70.7) y a los dos grupos hidroxilo en C-14 (δ_{C} 89.7) y C-18 (δ_{C} 71.6). De acuerdo con la

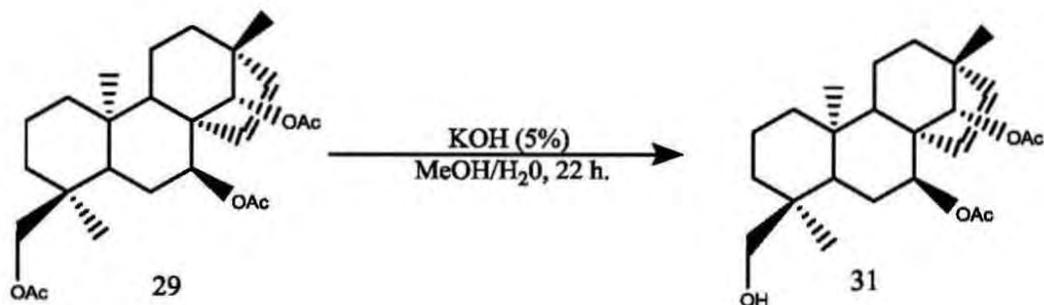


descripción anterior, se llegó a concluir que la sustancia purificada es el 7 β -acetil,14 α ,18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**).



Esquema 24. Espectros de RMN ¹H del compuesto **23** y **29**.

8.3.- Obtención del 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-*ent*-beyer-15-eno (31).

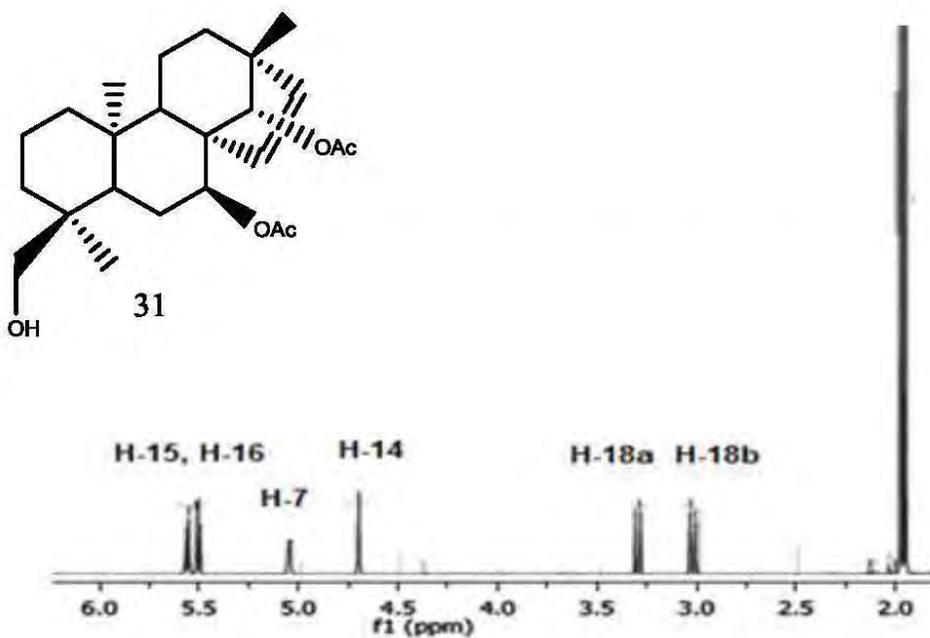
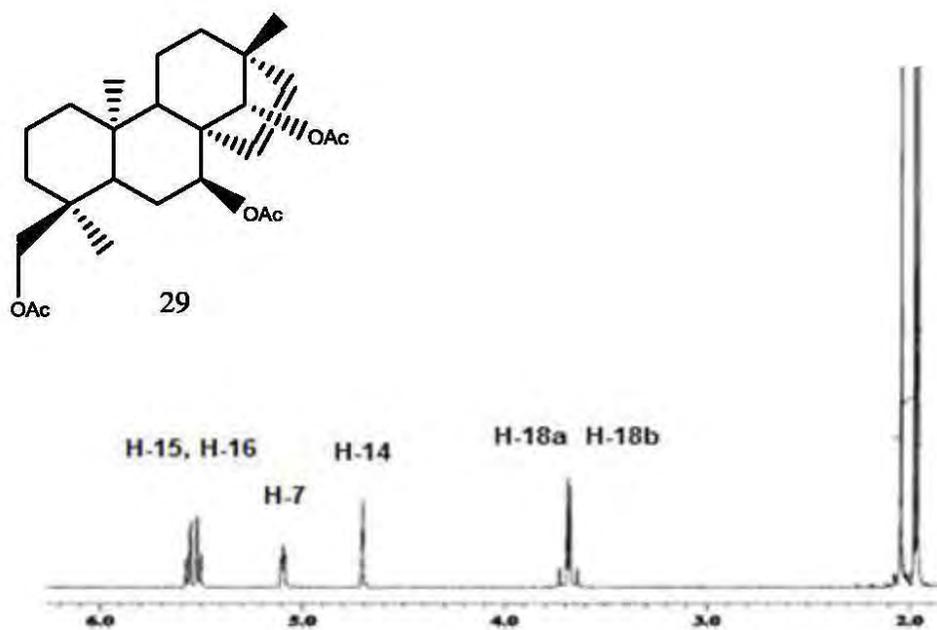


Esquema 25. Reacción de Hidrólisis del compuesto **29**.

En el esquema 25 se muestra la reacción de hidrólisis de **29** con KOH. La identificación del producto **31**, se realizó con base en el análisis de sus datos espectroscópicos RMN ¹H y RMN ¹³C y propiedades físicas. El compuesto 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**31**) es un sólido blanco cristalino de pf. 226 °C y fórmula molecular C₂₄H₃₆O₅ (404.26 g/mol), cabe señalar que se trata de una sustancia, que no se encuentra descrita en la literatura química. En su espectro RMN ¹H (espectro 10) muestra tres señales simples a campo alto que corresponden a los CH₃-17 (δ_H 0.95), CH₃-19 (δ_H 0.77) y CH₃-20 (δ_H 0.82); y dos señales correspondientes a los grupos acetatos en C-7 (δ_H 1.96) y C-14 (δ_H 1.99).

En su espectro de RMN-¹³C (espectro 11) se observan cuatro señales de carbono con hibridación sp² (por arriba de 100 ppm) y veinte con hibridación sp³. Adicionalmente en su RMN-¹H (espectro 10) se observan los hidrógenos vinílicos de la posición H-15 (δ_H 5.57) y H-16 (δ_H 5.52) como dos señales doble de doble (dd). La pérdida del grupo acetato ocurrió en C-18, ya que se observa el sistema AB conformado por H-18_A (δ_H 3.34) y H-18_B (δ_H 3.04) desplazado ligeramente a campo alto con respecto a los desplazamientos químicos para dichos hidrógenos en **29**, como se ilustra en el esquema 26.





Esquema 26. Espectros de RMN ^1H del compuesto 29 y 31.



En su espectro COSY, ver figura 18 se observan los acoplamientos químicos que existen entre los hidrógenos H-15 con H-16, además del acoplamiento entre H-18a y H-18b.

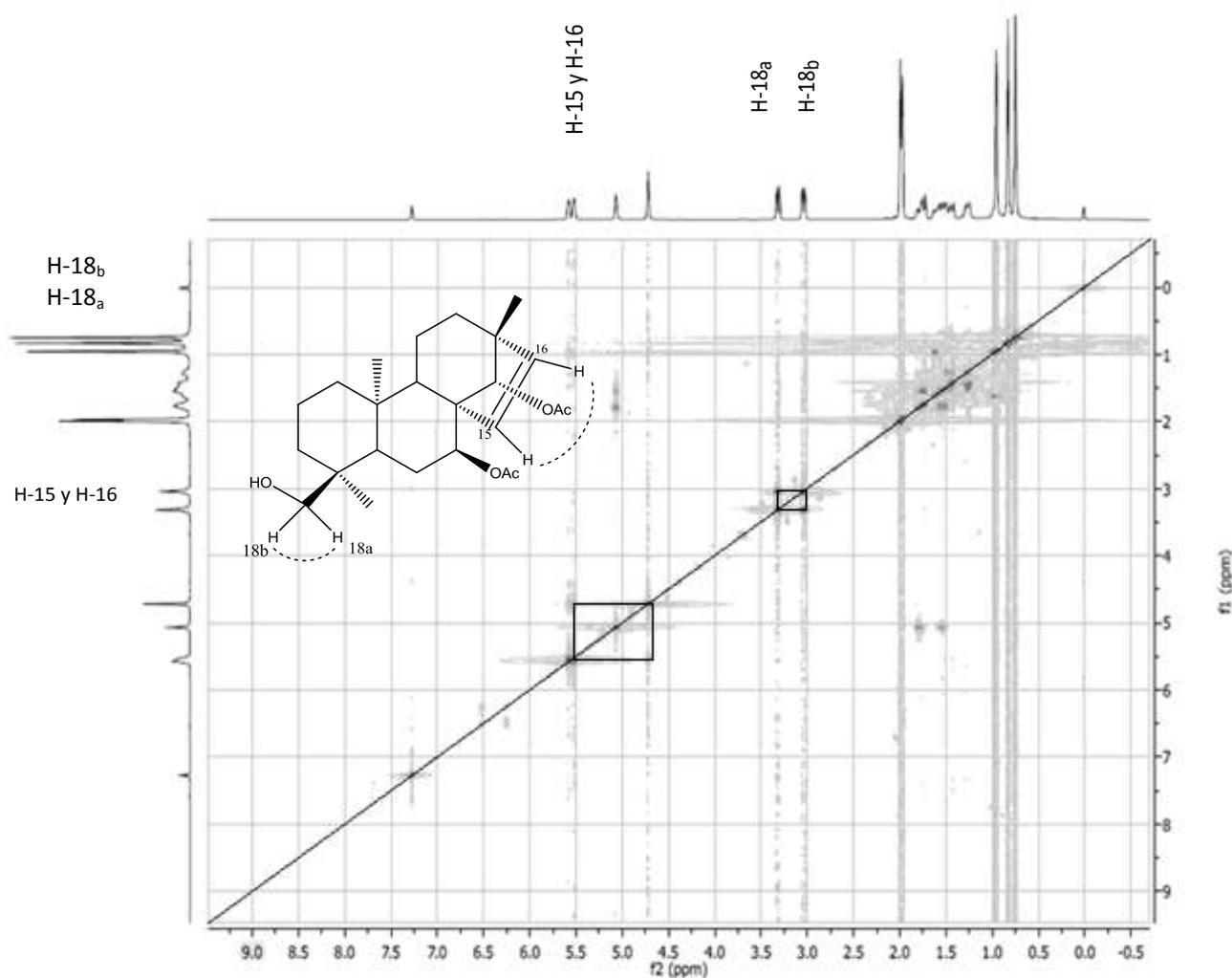
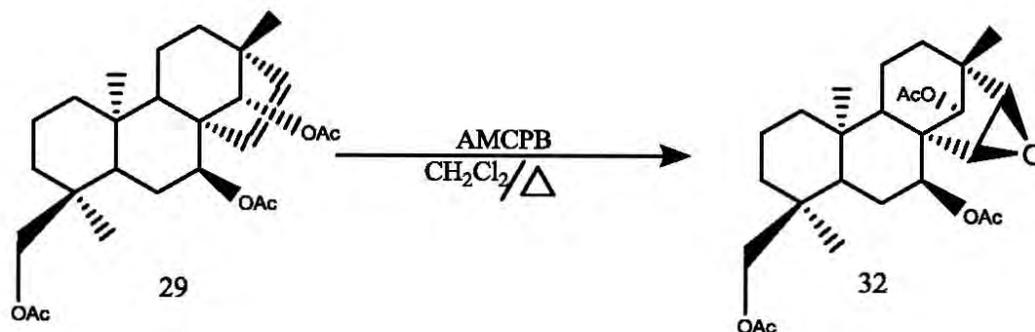


Figura 18. Espectros COSY del compuesto **31**.

La señal δ_{H} 5.06 (dd, $J= 3, 1.5$ Hz, 1H) corresponde al H-7 (δ_{C} 71.6). Al comparar los espectros de dicho compuesto, con los obtenidos del producto mayoritario en la biotransformación del **29** con *A. niger* se pudo concluir que se trata del mismo compuesto.

8.4.- Obtención del epóxido del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (29).

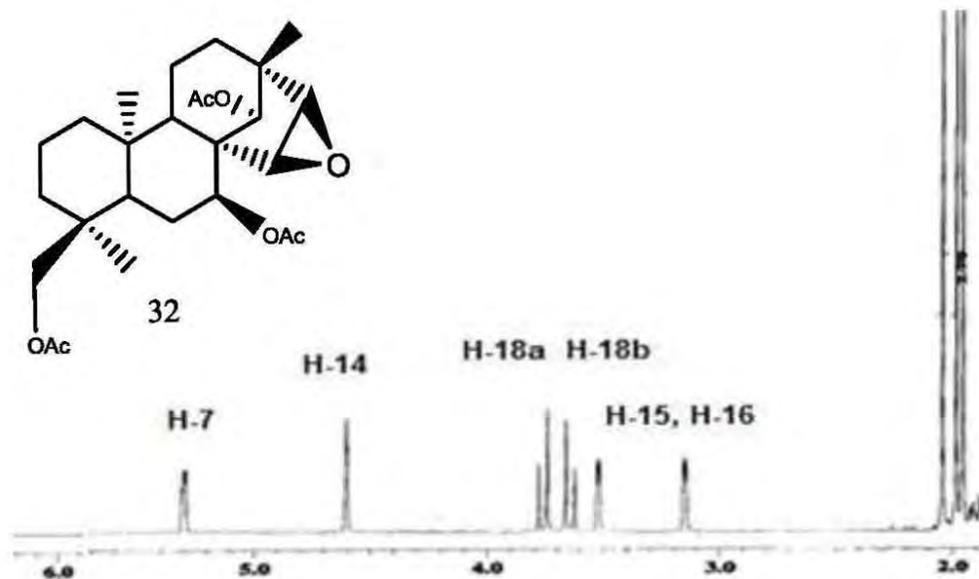
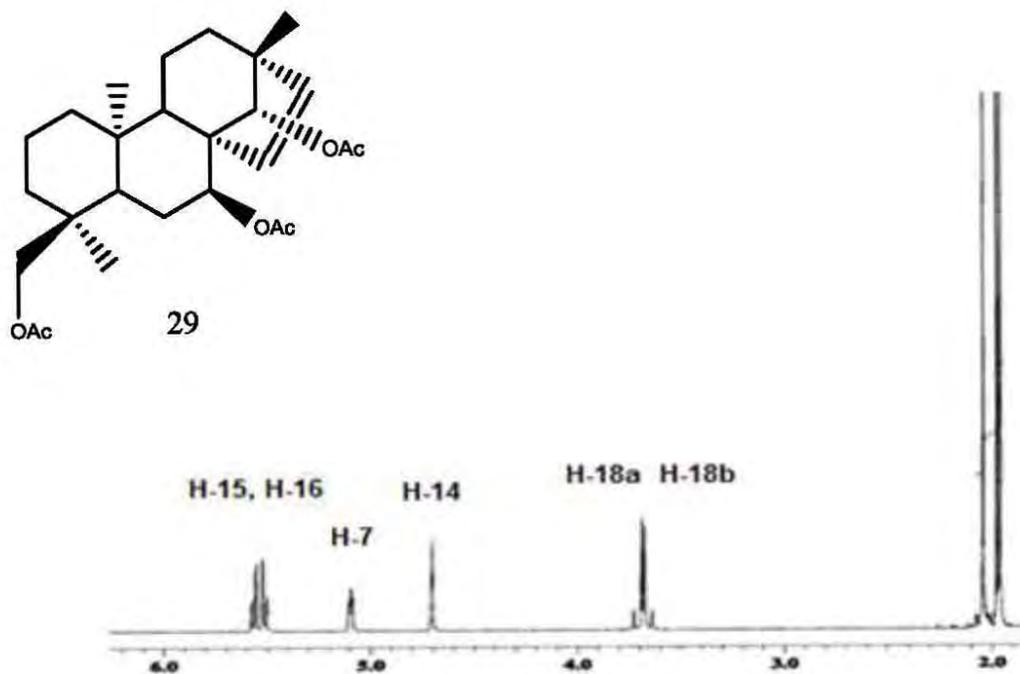


Esquema 27. Reacción de epoxidación del compuesto 29

De la reacción de epoxidación del compuesto **29** como se describió en la parte experimental y de acuerdo con el esquema 27, se obtuvo un sólido blanco cristalino de pf. 168 °C. El cual fue caracterizado e identificado con base en sus propiedades físicas, espectroscópicas (RMN ¹H y RMN ¹³C) y espectrométricas. Con base en lo anterior, se pudo concluir que se trata de un compuesto novedoso químicamente. A partir de su espectro RMN ¹H (espectro 13) se observan tres señales simples a campo alto que corresponden a los CH₃-17 (δ_{H} 1.01), CH₃-19 (δ_{H} 0.85) y CH₃-20 (δ_{H} 1); y tres señales correspondientes a los metilos de los grupos acetatos C-7 (δ_{H} 1.95), C-14 (δ_{H} 2.04) y C-18 (δ_{H} 1.98).

Comparando los espectros de RMN-¹H de **29** y de **32**, se observa que las señales doble de doble (dd) a campo bajo que corresponden a los hidrógenos vinílicos de la posición H-15 (δ_{H} 5.52) y H-16 (δ_{H} 5.57), para **29**, dichas señales desaparecen en **32** debido a la formación del anillo del oxirano, H-15 (δ_{H} 3.52) y H-16 (δ_{H} 3.14), ya que el cambio de hibridación en dichos átomos de carbono se manifiesta claramente en el espectro de RMN-¹³C, C-15(δ_{C} 53.9) y C-16 (δ_{C} 58.9).

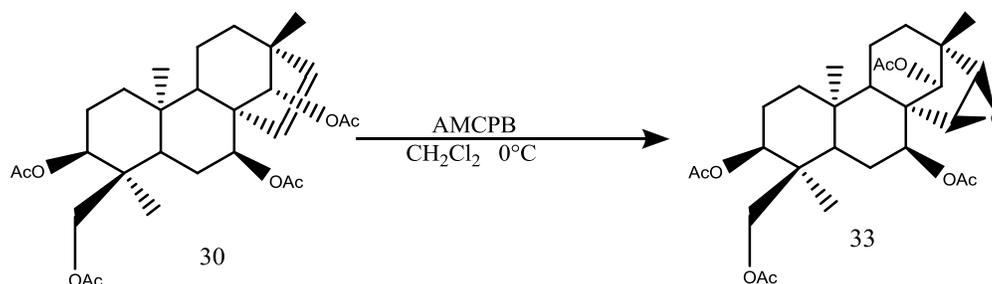




Esquema 28. Espectros de RMN ^1H del compuesto 29 y 32.



8.5.- Obtención del epóxido del tetraacetato del 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetrahidroxi-*ent*-beyer-15-eno (34).



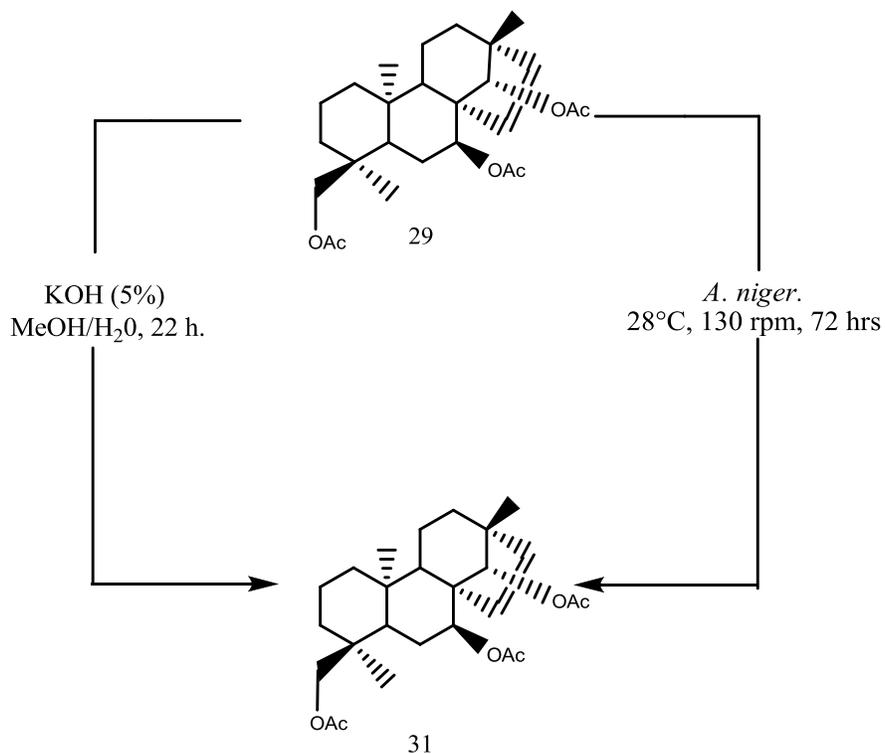
Esquema 29. Reacción de Epoxidación del compuesto 30.

De la reacción de epoxidación del compuesto **30** como se describió en la parte experimental y de acuerdo con el esquema 29, se obtuvo un sólido blanco cristalino de pf. 196 °C, el cual fue caracterizado e identificado con base en sus propiedades físicas, espectroscópicas (RMN ^1H y RMN ^{13}C) y espectrométricas [EM (IE)], con base en lo anterior, se pudo concluir que se trata de un compuesto novedoso químicamente. A partir de su espectro RMN ^1H (espectro 16) se observan tres señales simples a campo alto que corresponden a los CH_3 -17 (δ_{H} 1.02), CH_3 -19 (δ_{H} 0.85) y CH_3 -20 (δ_{H} 1.03); y cuatro señales correspondientes a los metilos de los grupos acetatos C-7 (δ_{H} 2.03), C-14 (δ_{H} 2.01) y C-18 (δ_{H} 1.99).

Comparando los espectros de RMN-1H de **30** y de **33**, se observa que las señales doble de doble (dd) a campo bajo que corresponden a los hidrógenos vinílicos de la posición H-15 (δ_{H} 5.53) y H-16 (δ_{H} 5.55) en el compuesto **30**, la formación del oxirano en dichos carbonos trae como consecuencia el desplazamiento de los H-15 (δ_{H} 3.57-3.04, *m*) y H-16 (δ_{H} 3.16) a campo alto del compuesto **33**, lo anterior está de acuerdo con el cambio de hibridación en dichos átomos de carbono los cuales aparecen en δ_{C} 53.8 y δ_{C} 58.9 respectivamente, lo cual se observa en su espectro 17. Concluyendo que se trata del tetraacetato del 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetraacetoxi-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (**33**).

8.6.- Caracterización e identificación del producto de la Biotransformación de TAPT (29) con *A. niger* en medio YEPGA.

Como se describió anteriormente el producto mayoritario de la biotransformación de **29** con *A. niger* es el compuesto 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxibeyer-15-eno (**31**). En el esquema 30 se muestra la correlación química a partir de **29** con KOH 5%(MeOH:H₂O).



Esquema 30. Biotransformación y reacción del compuesto **29** para dar el producto 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxibeyer-15-eno (**31**).

9. Conclusiones



- ✓ Se realizó la biotransformación preparativa del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) con *A. niger* en medio YEPGA, obteniendo como único producto el 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**31**).
- ✓ En el presente trabajo se describe la obtención de los epóxidos: 7 β ,14 α ,18-triacetoxi-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (**32**), 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetraacetoxi-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (**33**) y 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxiacetoxi-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (**34**); obtenidos a partir de los compuestos: triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**), tetraacetato del 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetrahidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**30**) y 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**31**).
- ✓ Se realizó la correlación química de 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**31**), producto de biotransformación del compuesto **29** con *A. niger* por medio de la reacción de hidrólisis con KOH al 5% en MeOH/H₂O.
- ✓ El rendimiento del producto **31** es mayor por medio de la transformación química de **29** con respecto al rendimiento obtenido de la biotransformación con *A. niger*.
- ✓ El compuesto **23**, no fue susceptible de ser biotransformado por ninguno de los hongos ensayados: *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus nigricans*, *Colletotricum gloeosporioides* y *Nocardia brazillencis*.
- ✓ El compuesto **23** no se logró epoxidar con AMCPB en diferentes condiciones de reacción.
- ✓ No se determinó la velocidad de consumo del sustrato **29** por *A. niger*, debido a la baja concentración de sustrato y por un exceso de metabolitos secundarios generados por el hongo empleado.



10. Sugerencias



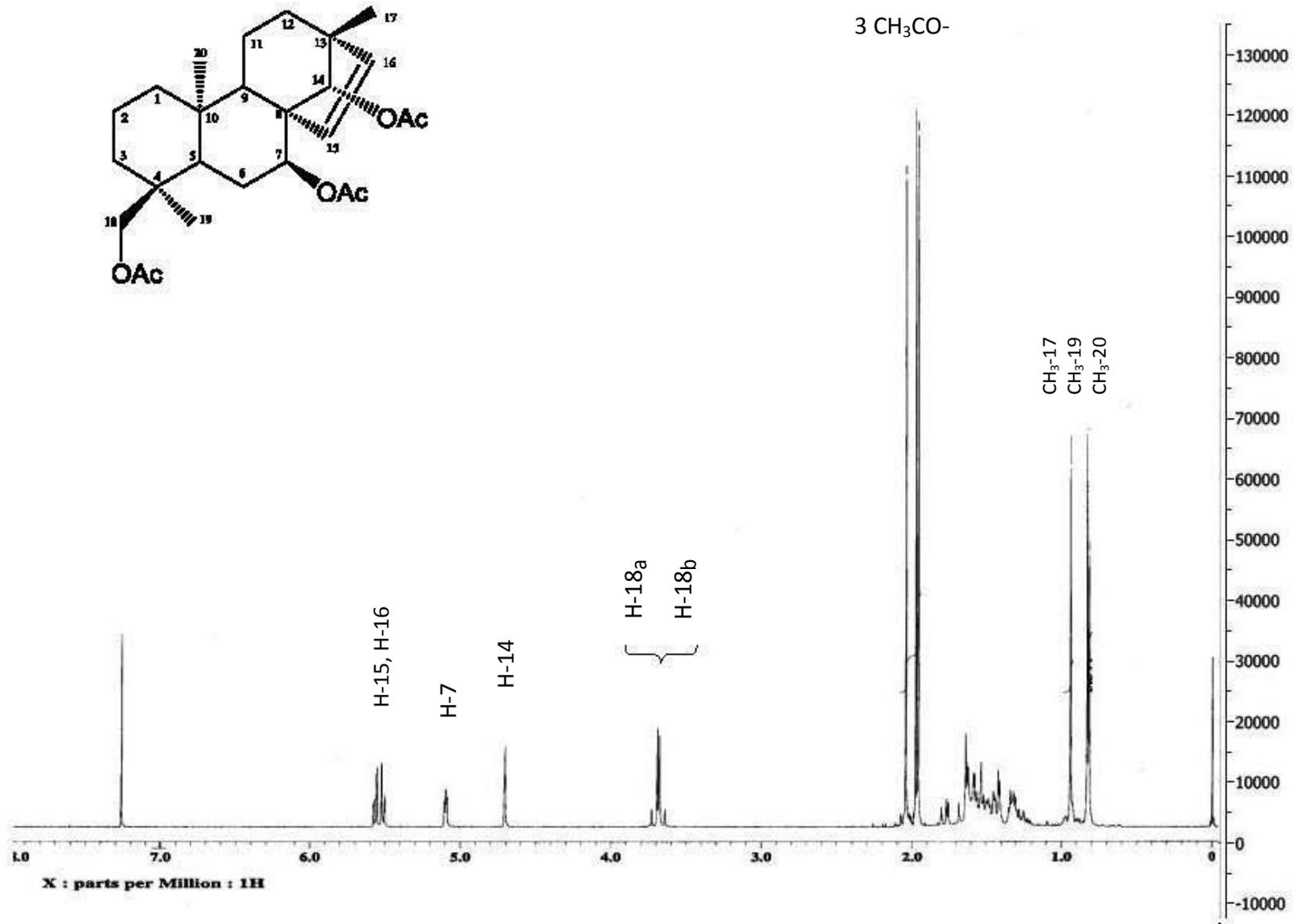
- Realizar la biotransformación a escala preparativa del triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**) con *C. gloesporioides* para determinar el rendimiento y las condiciones de reacción para la obtención del 7 β ,14 α ,18-triacetoxi-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (**33**).
- Realizar los estudios de estructura-actividad biológica de los compuestos: 7 β -acetil-14 α , 18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**), triacetato del 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**), tetraacetato del 3 β , 7 β ,14 α ,18-tetrahidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**30**), 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**31**), 7 β ,14 α ,18-triacetoxi-15,16-epoxi-*ent*-beyereno(**32**), 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetraacetoxi-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (**33**) y 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxiacetoxi-15,16-epoxi-*ent*-beyeren (**34**). Haciendo hincapié de los derivados epoxidados debido a la reactividad del anillo del oxirano, la cual depende del medio en el que se efectúa la reacción.
- Realizar la biotransformación del compuesto **29** en diferentes medios de cultivo utilizando *A.niger*, debido a que dicha biotransformación es muy específica para la obtención del producto **31**, la cual se generaba en menor tiempo de incubación con respecto a los otros hongos ensayados.
- Probar la reactividad del compuesto **29** utilizando como biocatalizadores un mayor número de microorganismos, ya que es una sustancia factible de ser biotransformada.
- Explorar con un mayor número de microorganismos la reactividad del 7 β -acetil-14 α , 18-dihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**23**).
- Para determinar la cinética de la biotransformación, es necesario agregar una mayor concentración del sustrato que se desea determinar, ya que los metabolitos generados por el hongo pueden enmascarar a los generados por la biotransformación y no hacer posible su determinación.
- Realizar la reacción de epoxidación del compuesto **23**, empleando un perácido más fuerte.



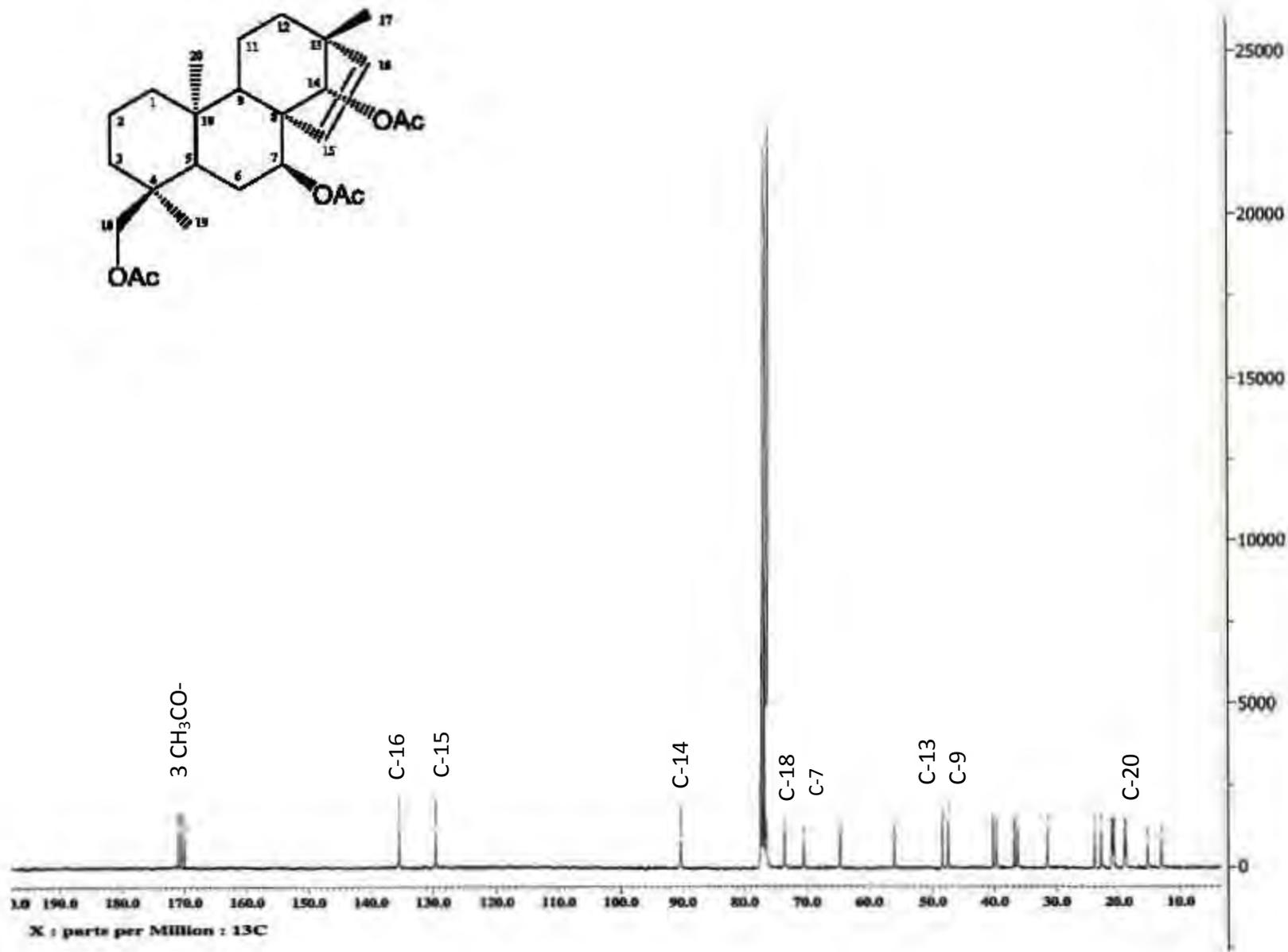
11. Espectros



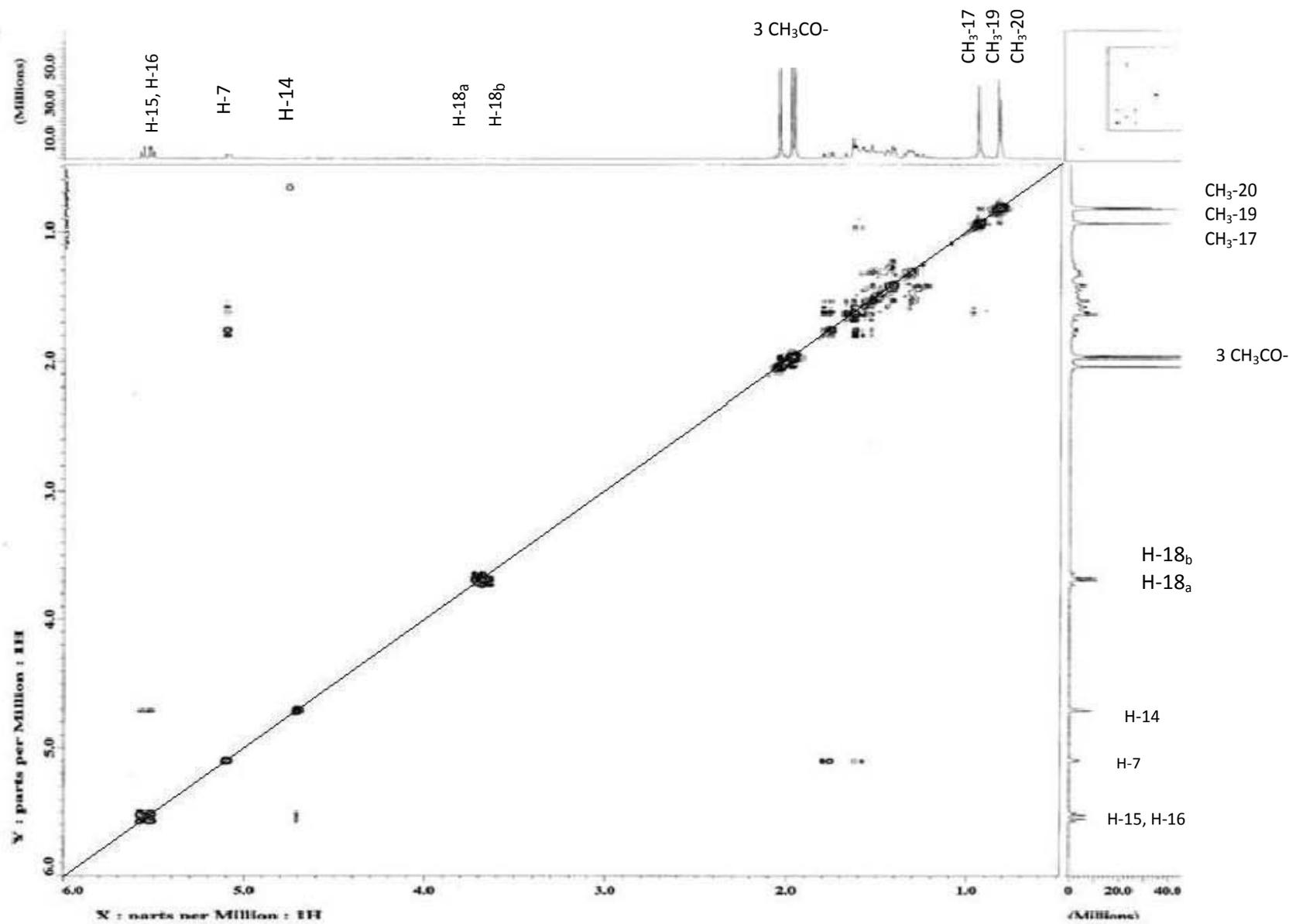
Espectro 1. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) Triacetato $7\beta,14\alpha,18$ -trihidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**29**).



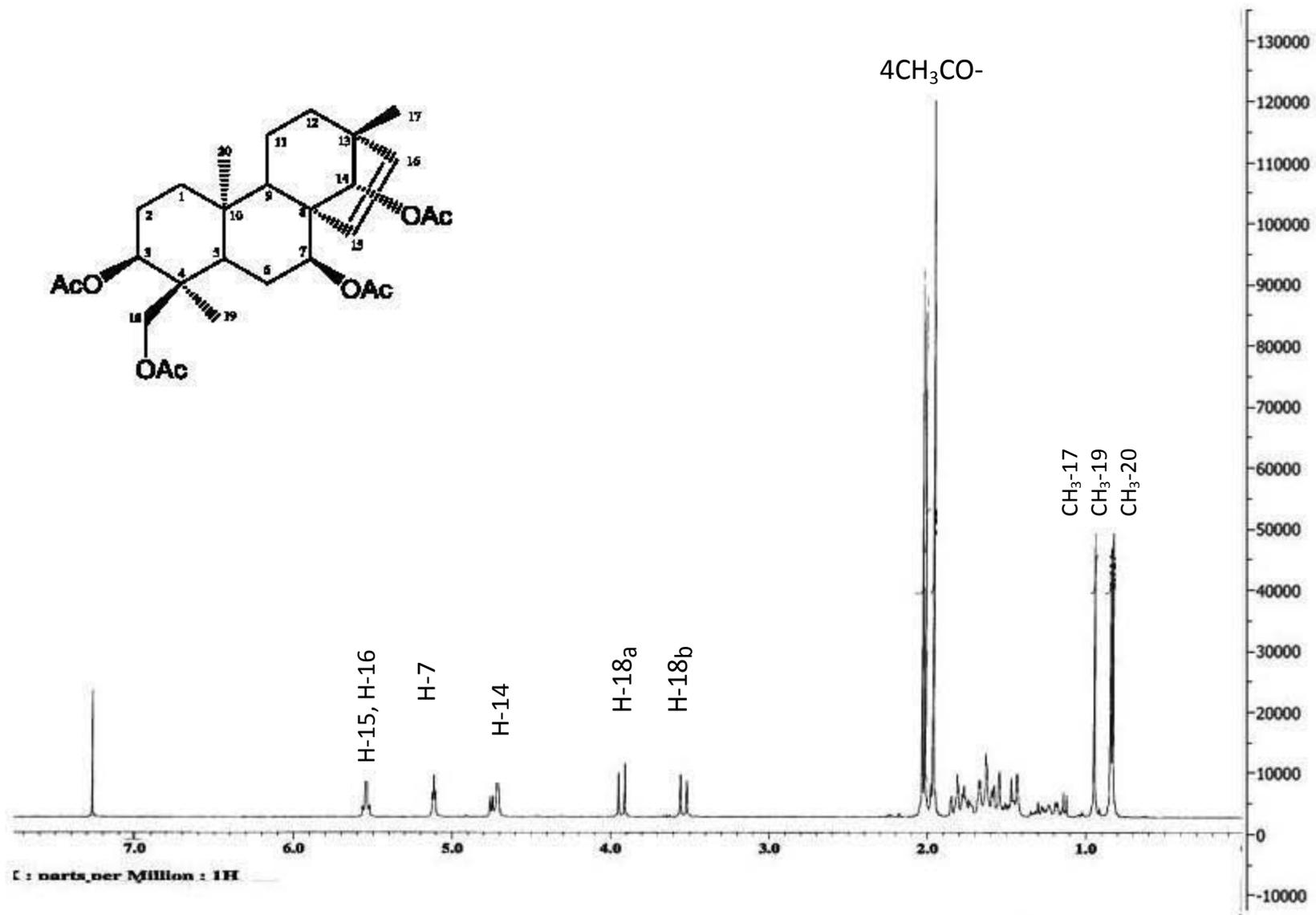
Espectro 2. RMN 13C (75 MHz, CDCl3, TMS) Triacetato 7 β ,14 α ,18-trihidroxi-ent-beyer-15-eno (**29**).



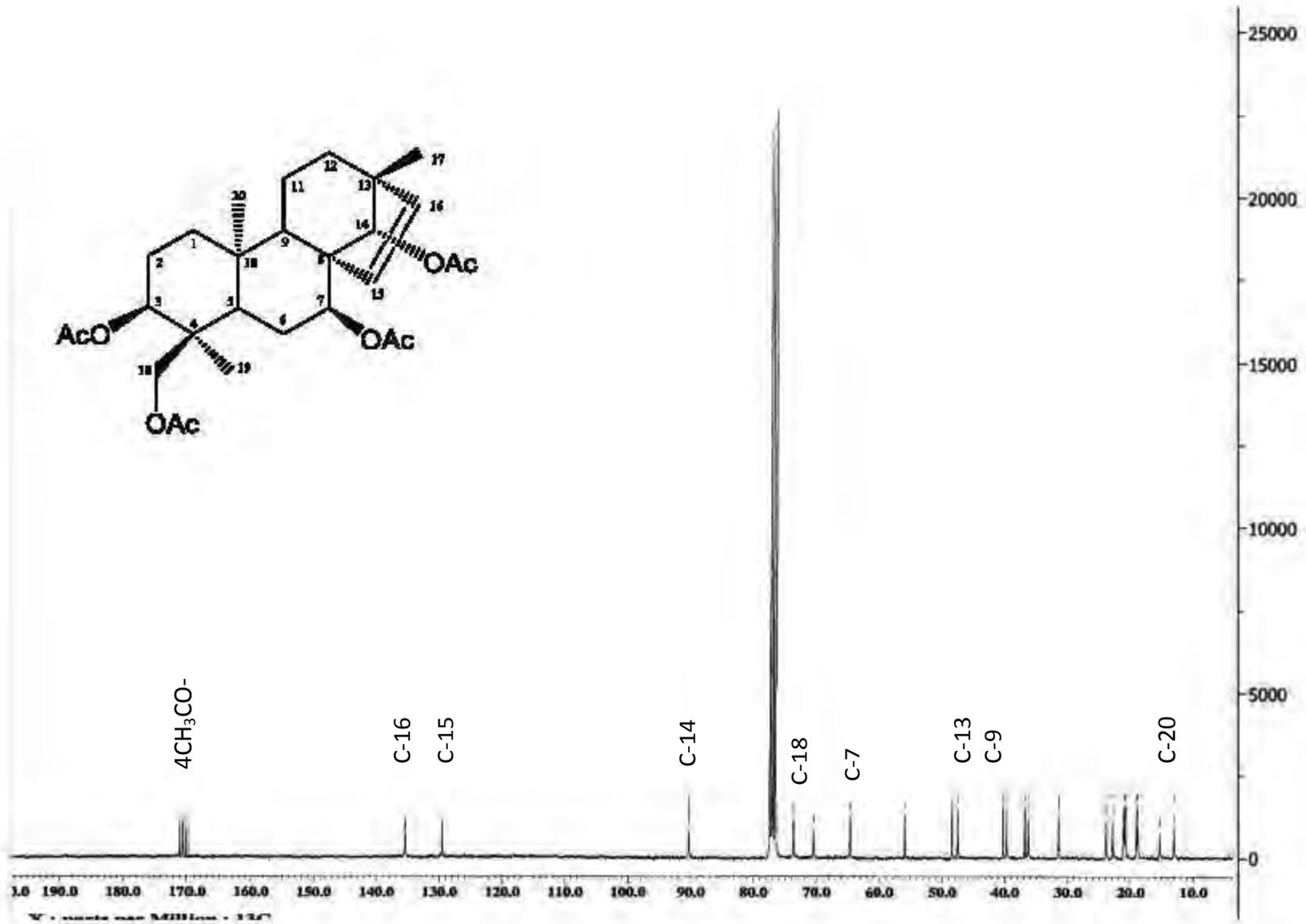
Espectro 3. COSY (300 MHz, CDCl₃, TMS) Triacetato 7β,14α,18-trihidroxi-ent-beyer-15-eno (**29**).



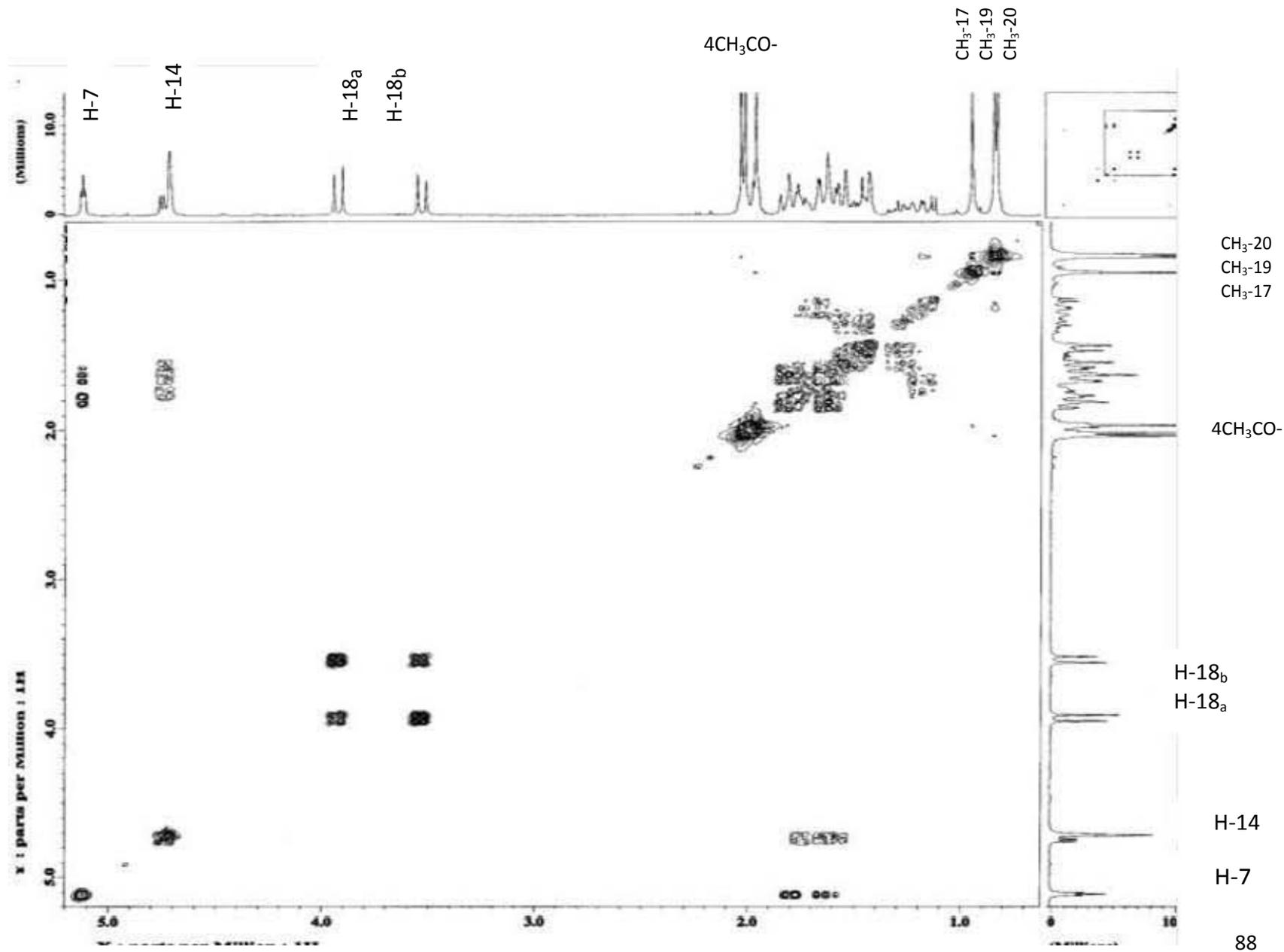
Espectro 4. RMN 1H (500 MHz, CDCl₃, TMS) Tetraacetato de 7β,14α,18-tetrahidroxi-ent-beyer-15-eno (30)



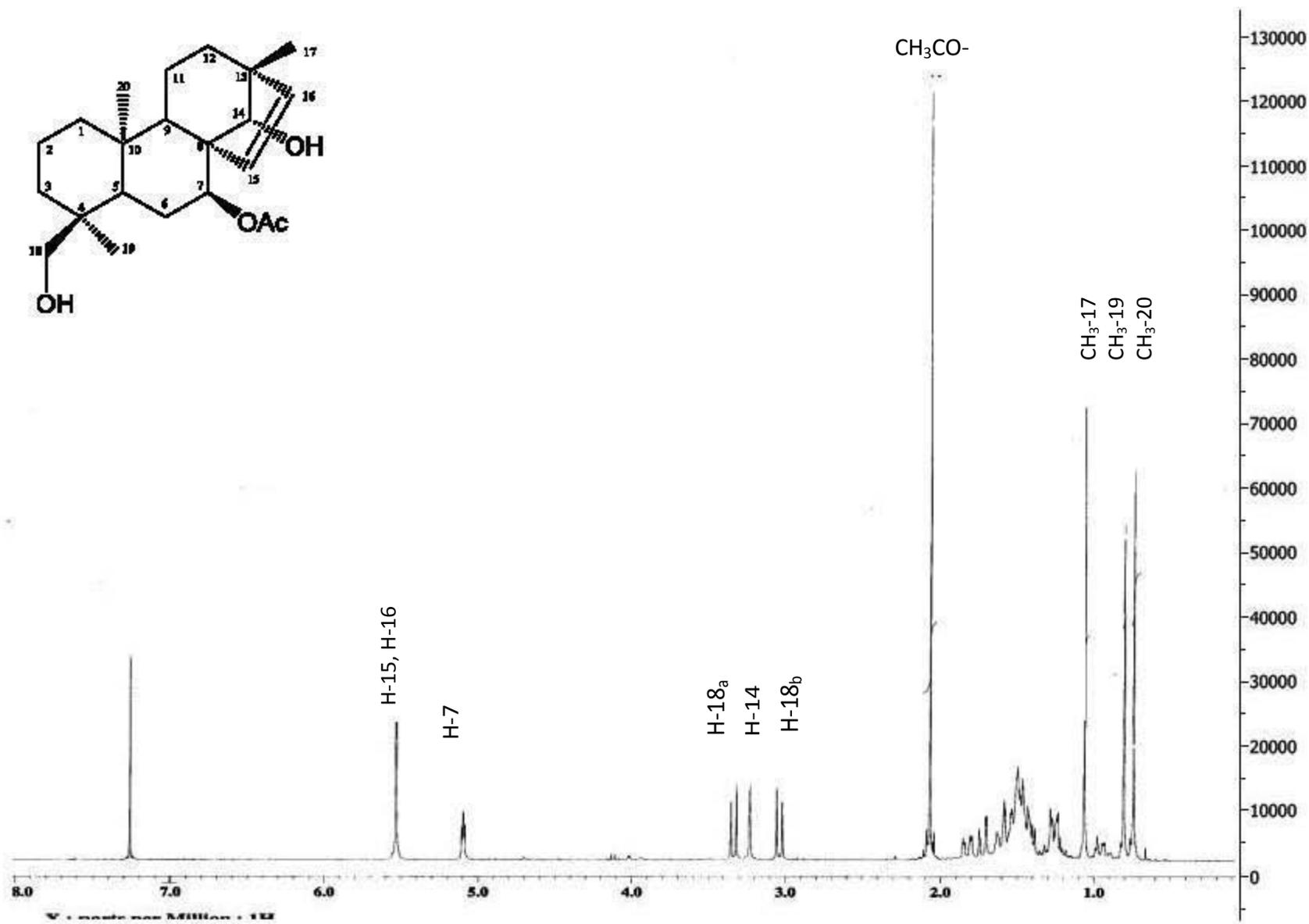
Espectro 5. RMN 13C (125 MHz, CDCl3, TMS) Tetraacetato de 7 β ,14 α ,18-tetrahydroxi-ent-beyer-15-eno (**30**).



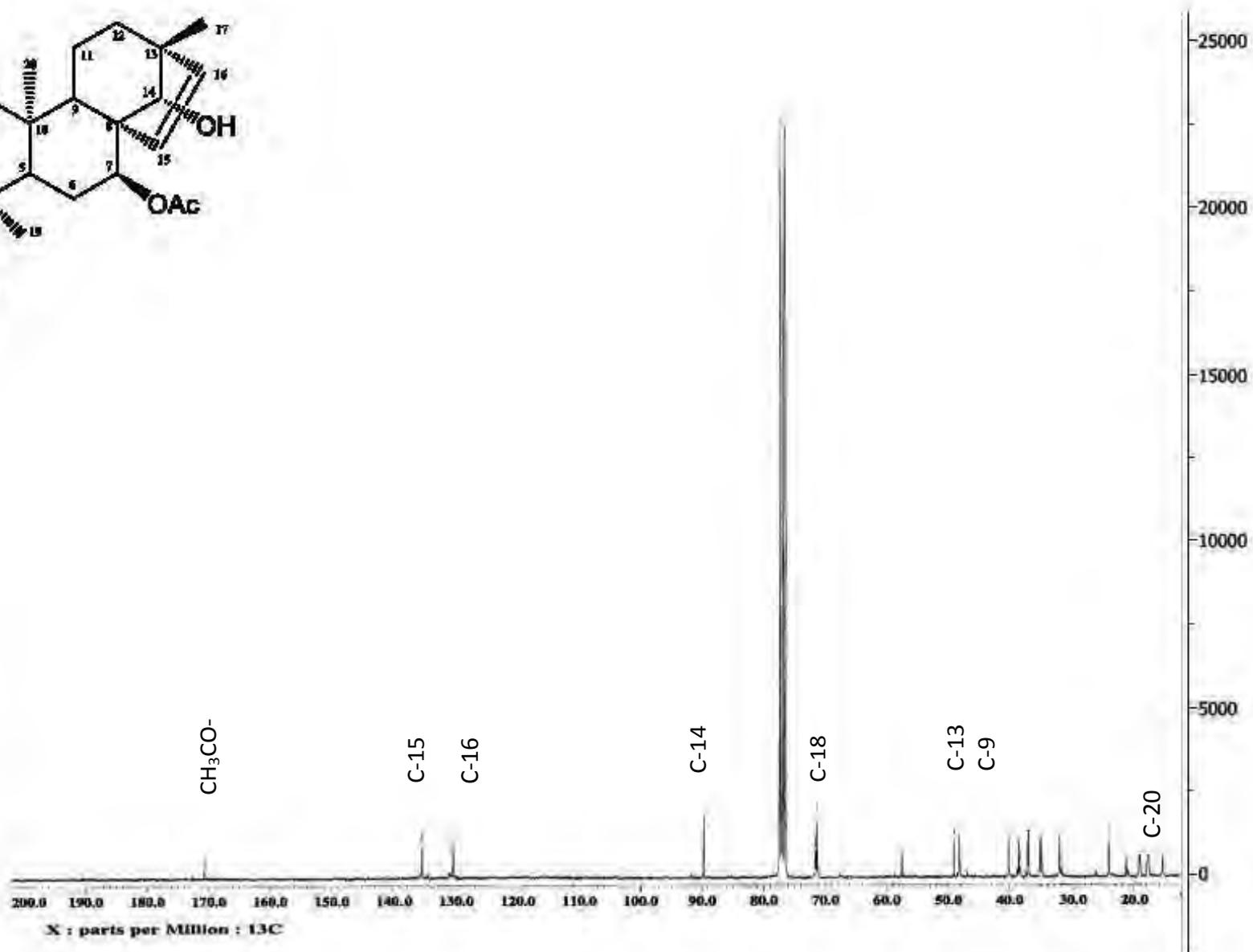
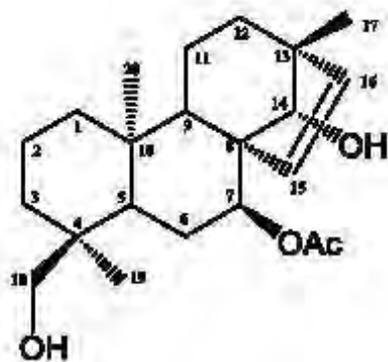
Espectro 6. COSY (500 MHz, CDCl₃, TMS) Tetraacetato de 7β,14α,18-tetrahydroxi-ent-beyer-15-eno (30).



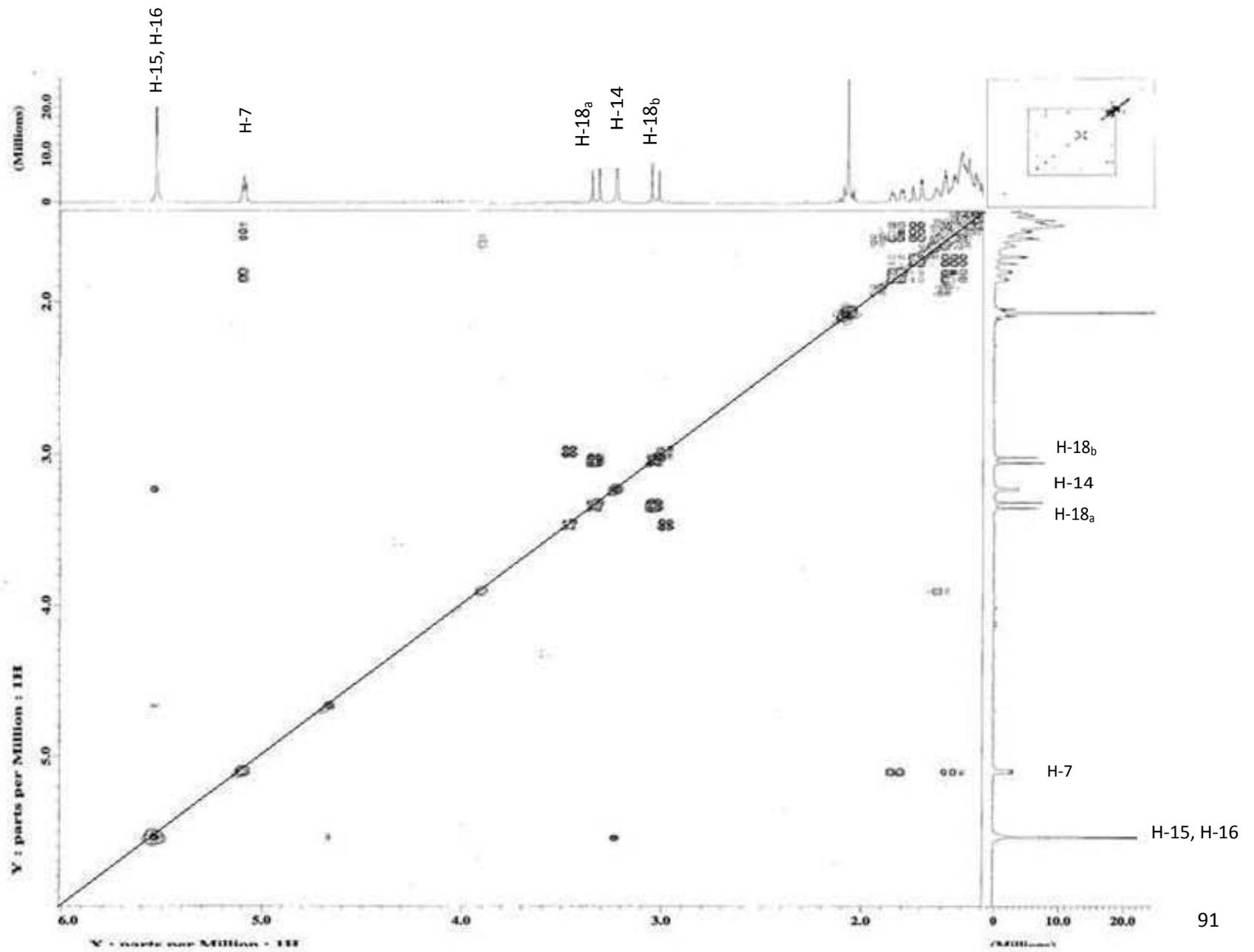
Espectro 7. RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, TMS) ent-7β-acetil-14α,18-dihidroxi-15-eno (**23**).



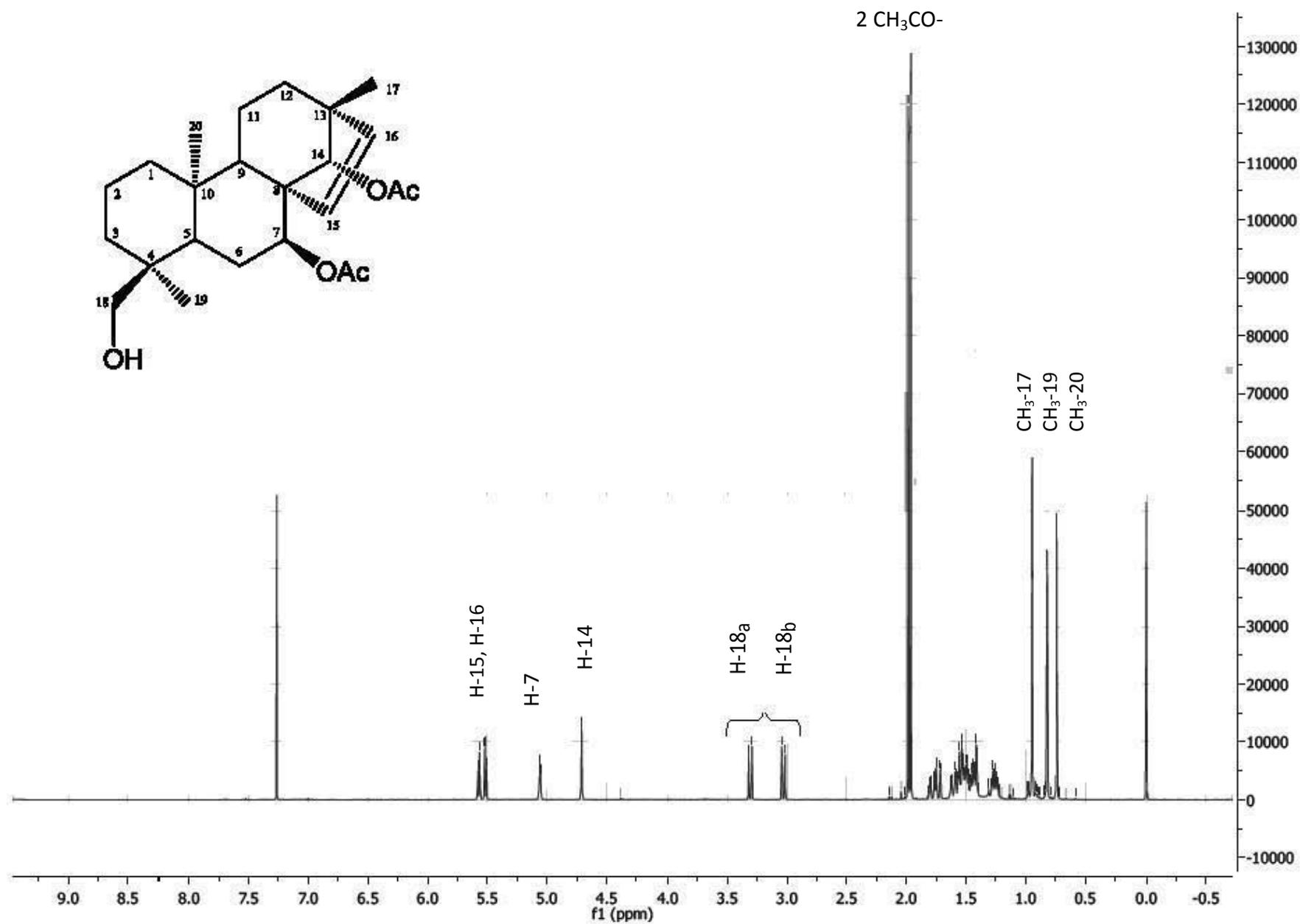
Espectro 8. RMN 13C (75 MHz, CDCl₃, TMS) 7β-acetil-14α, 18-dihidroxi-ent-beyer-15-eno (**23**).



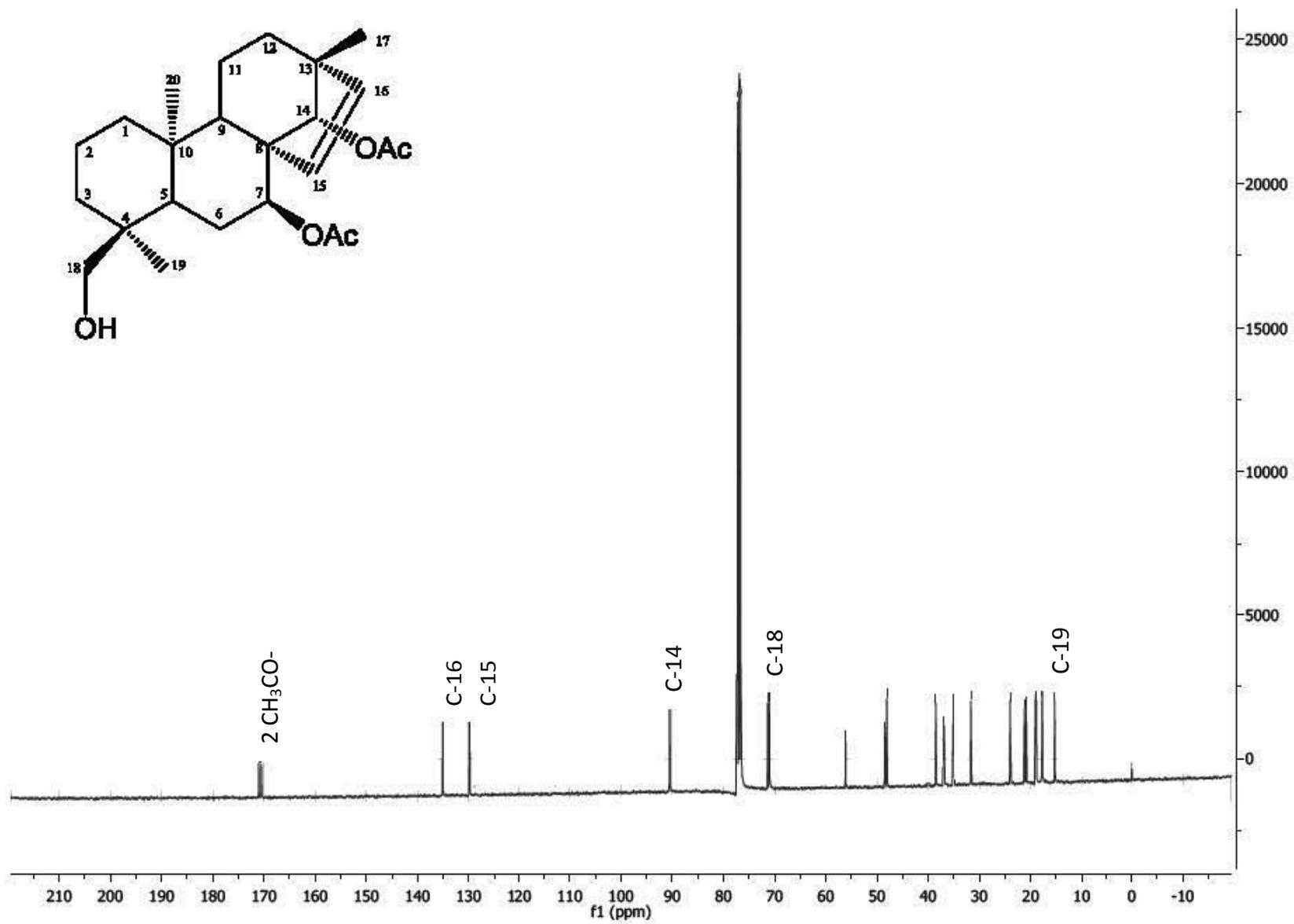
Espectro 9. COSY (300 MHz, CDCl₃, TMS) 7 β -acetil-14 α , 18-dihidroxi-ent-beyer-15-eno (**23**).



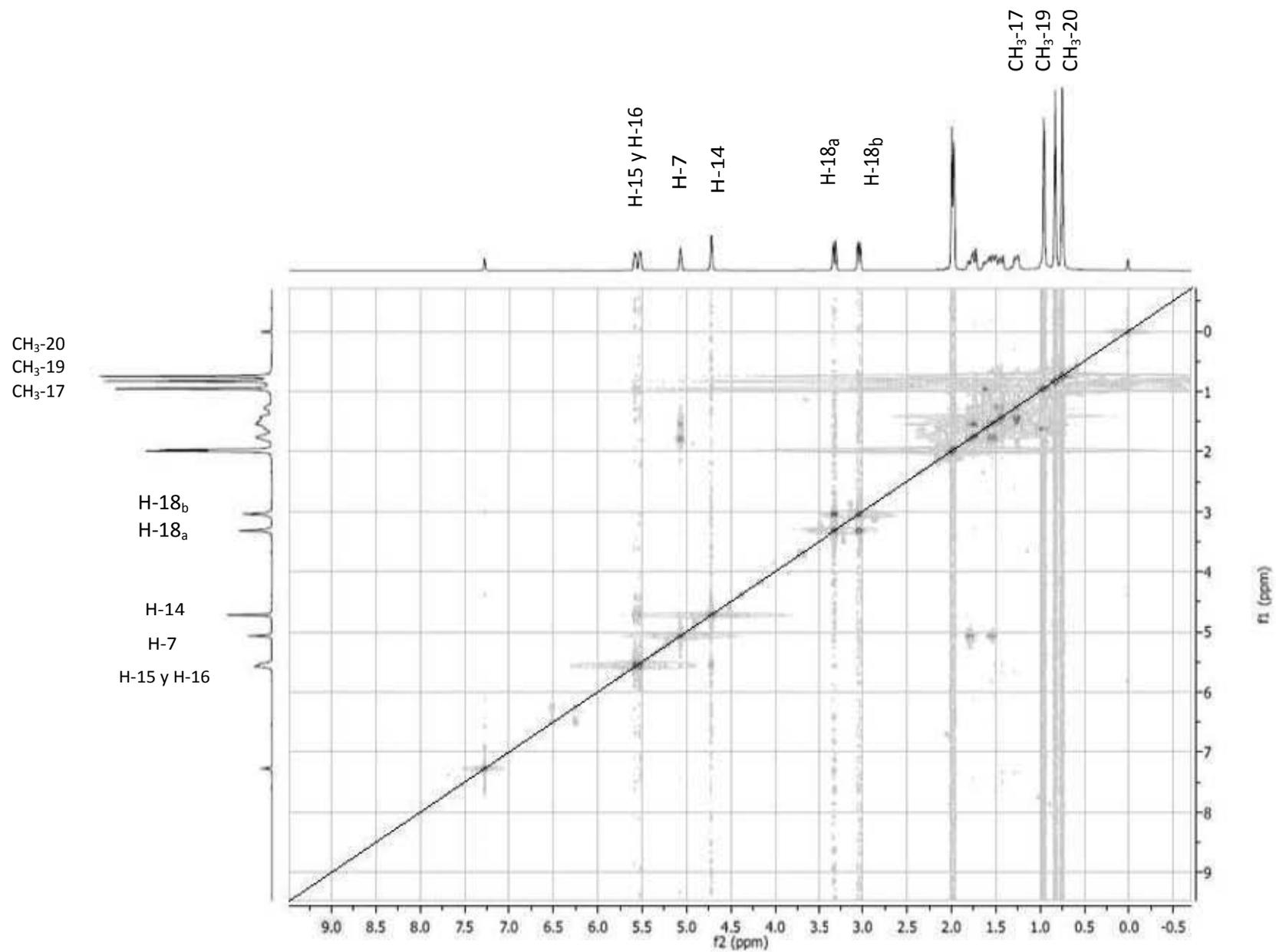
Espectro 10. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) $7\beta,14\alpha$ -diacetil-18-hidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**31**).



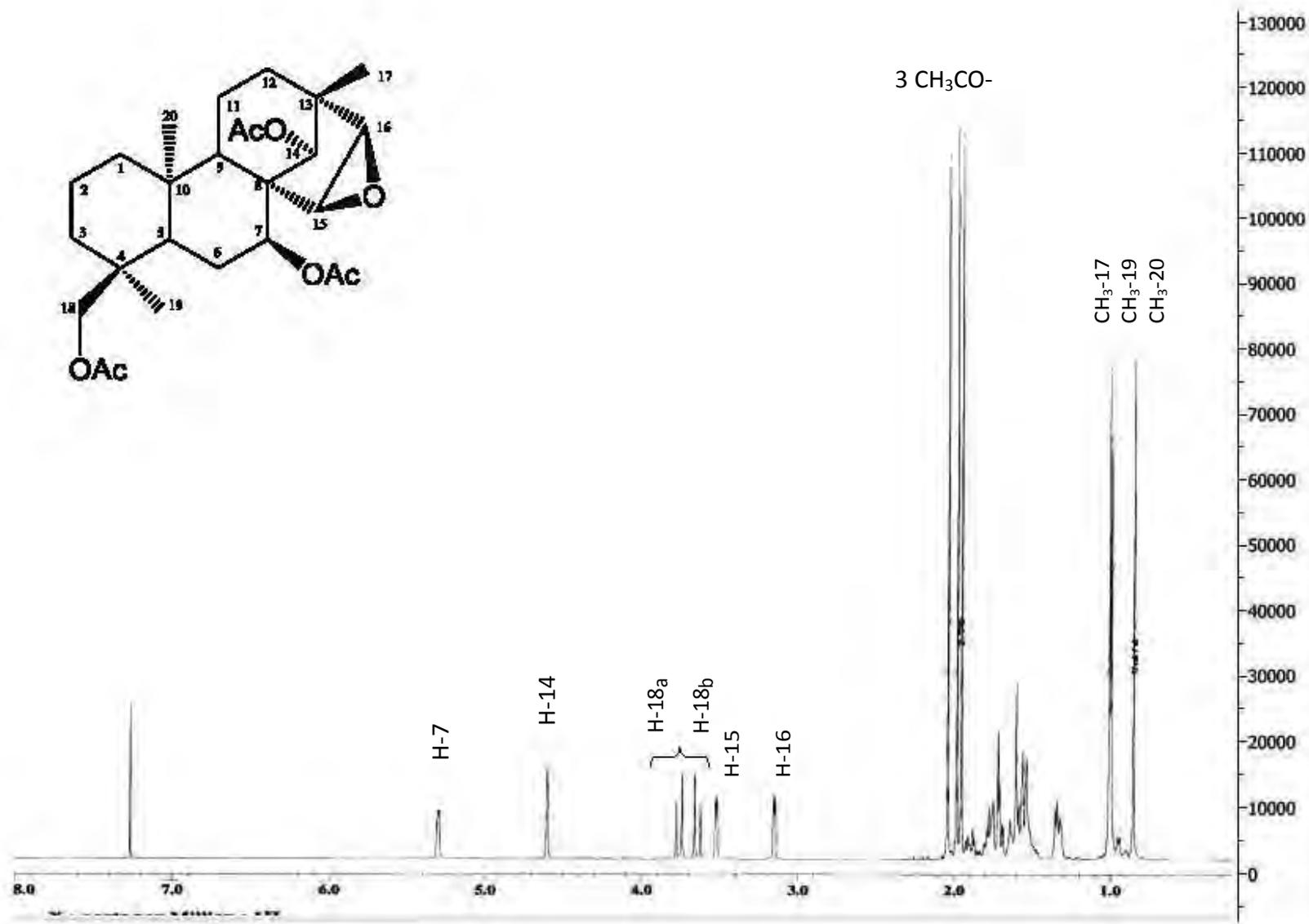
Espectro 11. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , TMS) $7\beta,14\alpha$ -diacetil-18-hidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**31**).



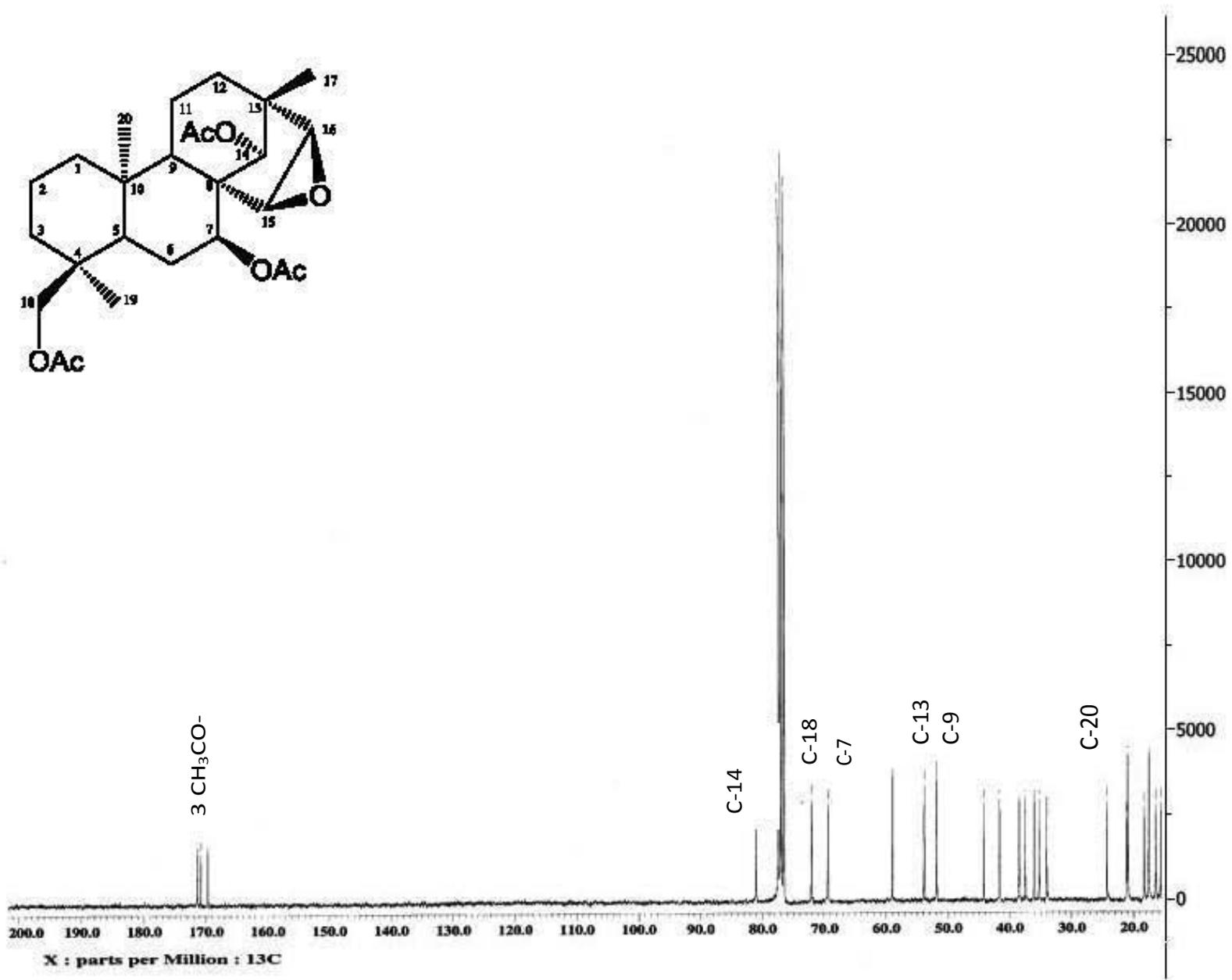
Espectro 12. COSY (300 MHz, CDCl₃, TMS) 7 β ,14 α -diacetil-18-hidroxi-*ent*-beyer-15-eno (**31**).



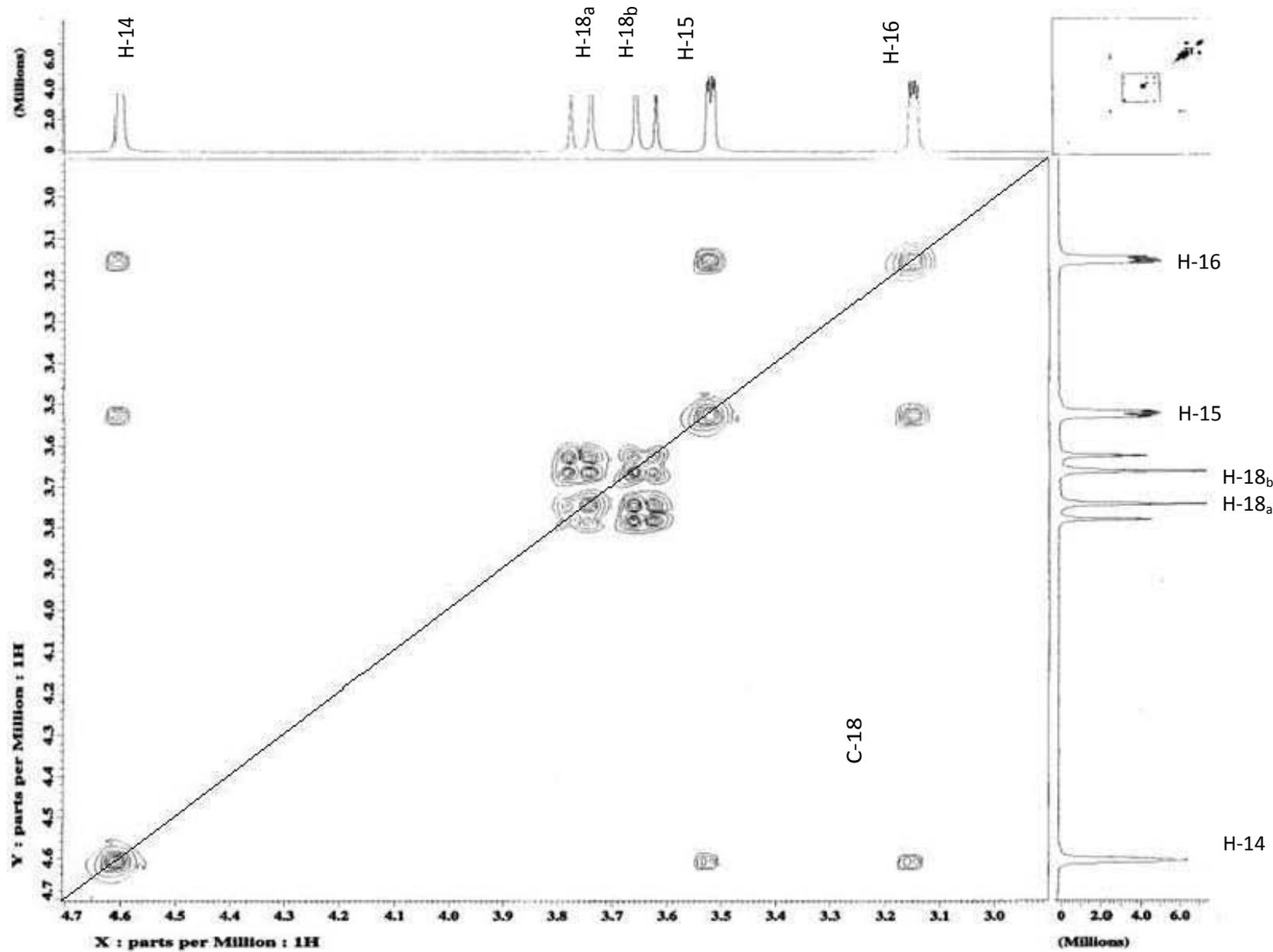
Espectro 13. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) 7 β ,14 α ,18-triacetoxi-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (**32**).



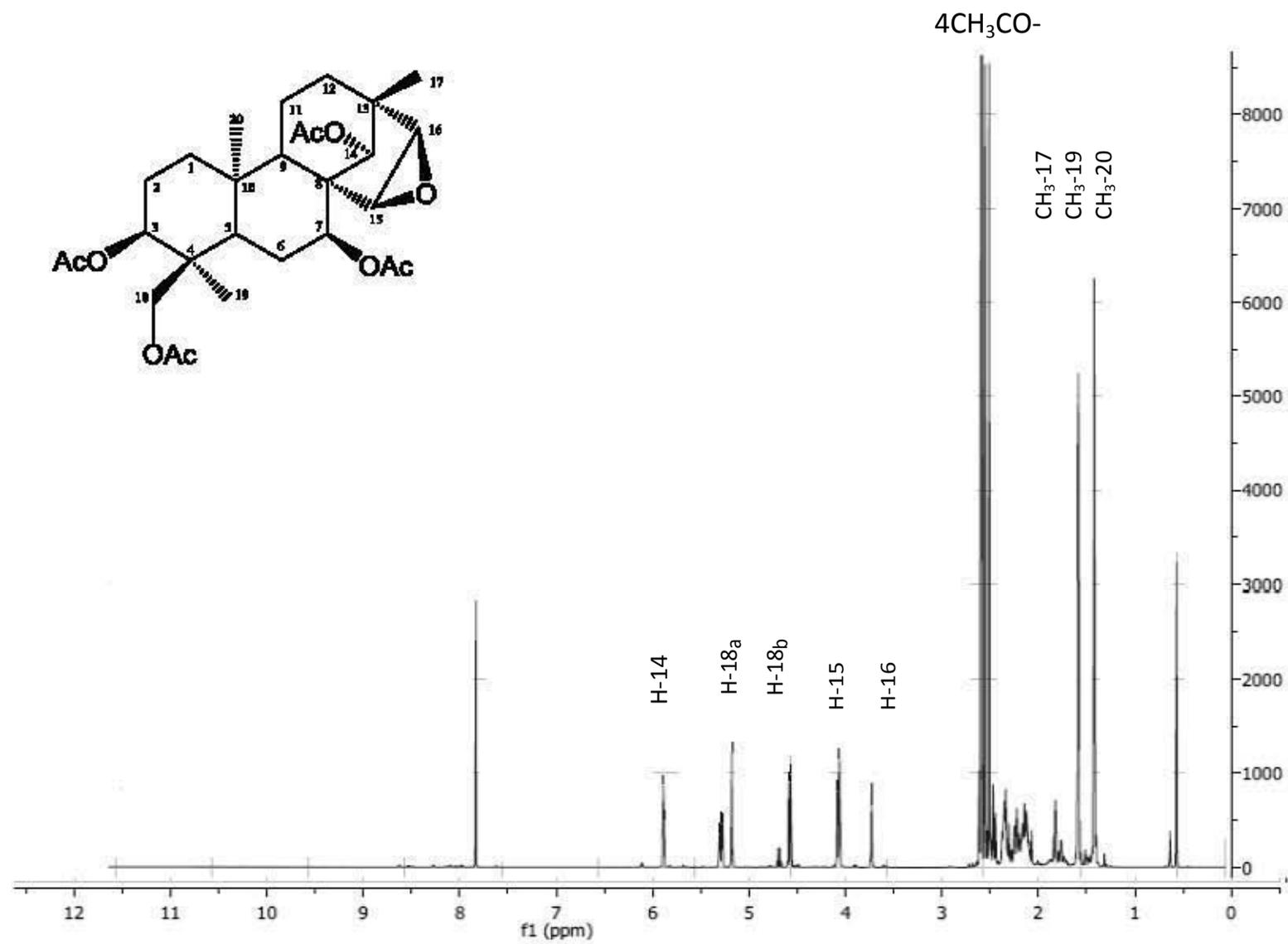
Espectro 14. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , TMS) $7\beta,14\alpha,18$ -triacetil-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (**32**).



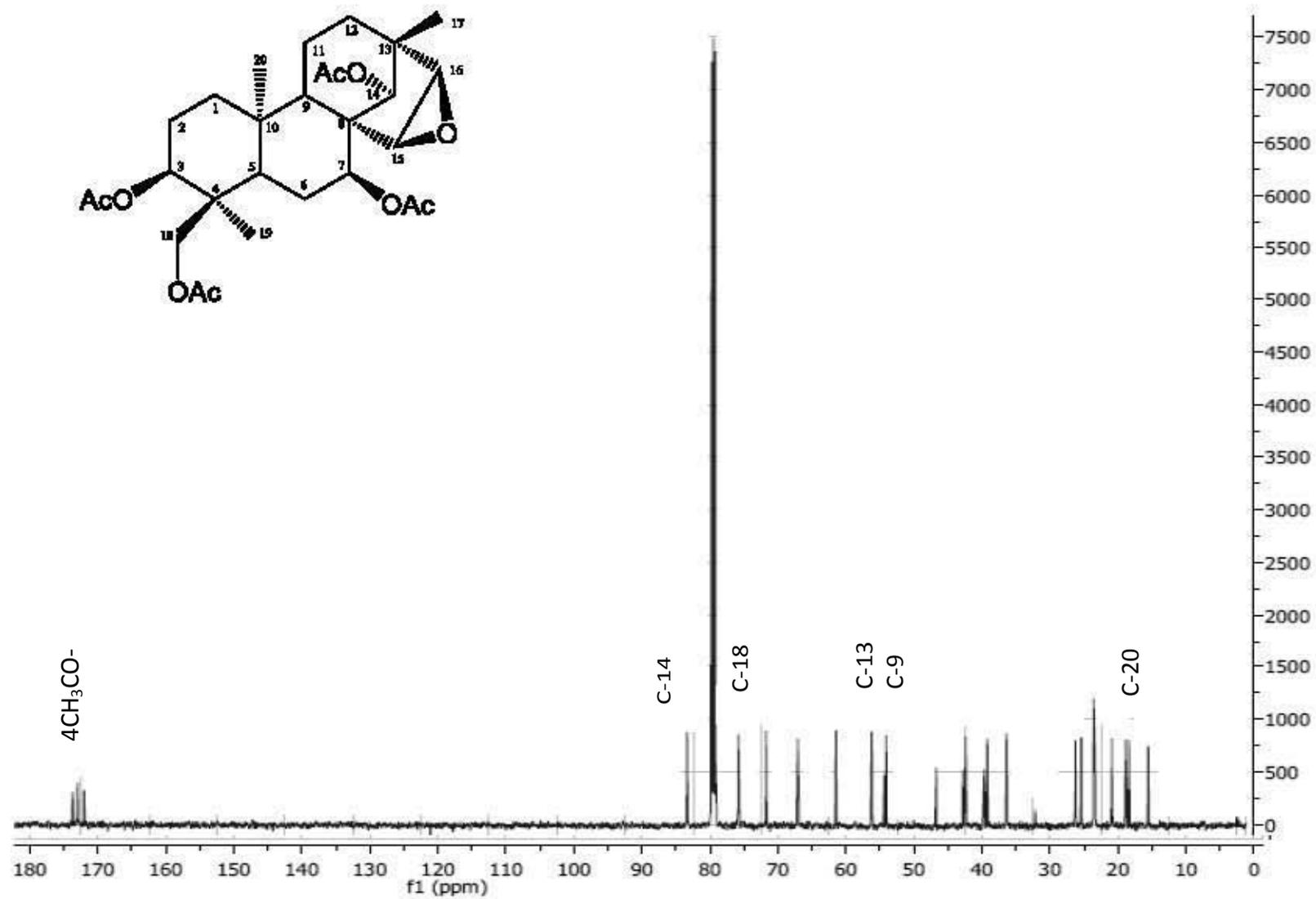
Espectro 15. COSY (500 MHz, CDCl₃, TMS) 7 β ,14 α ,18-triacetoxi-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (32).



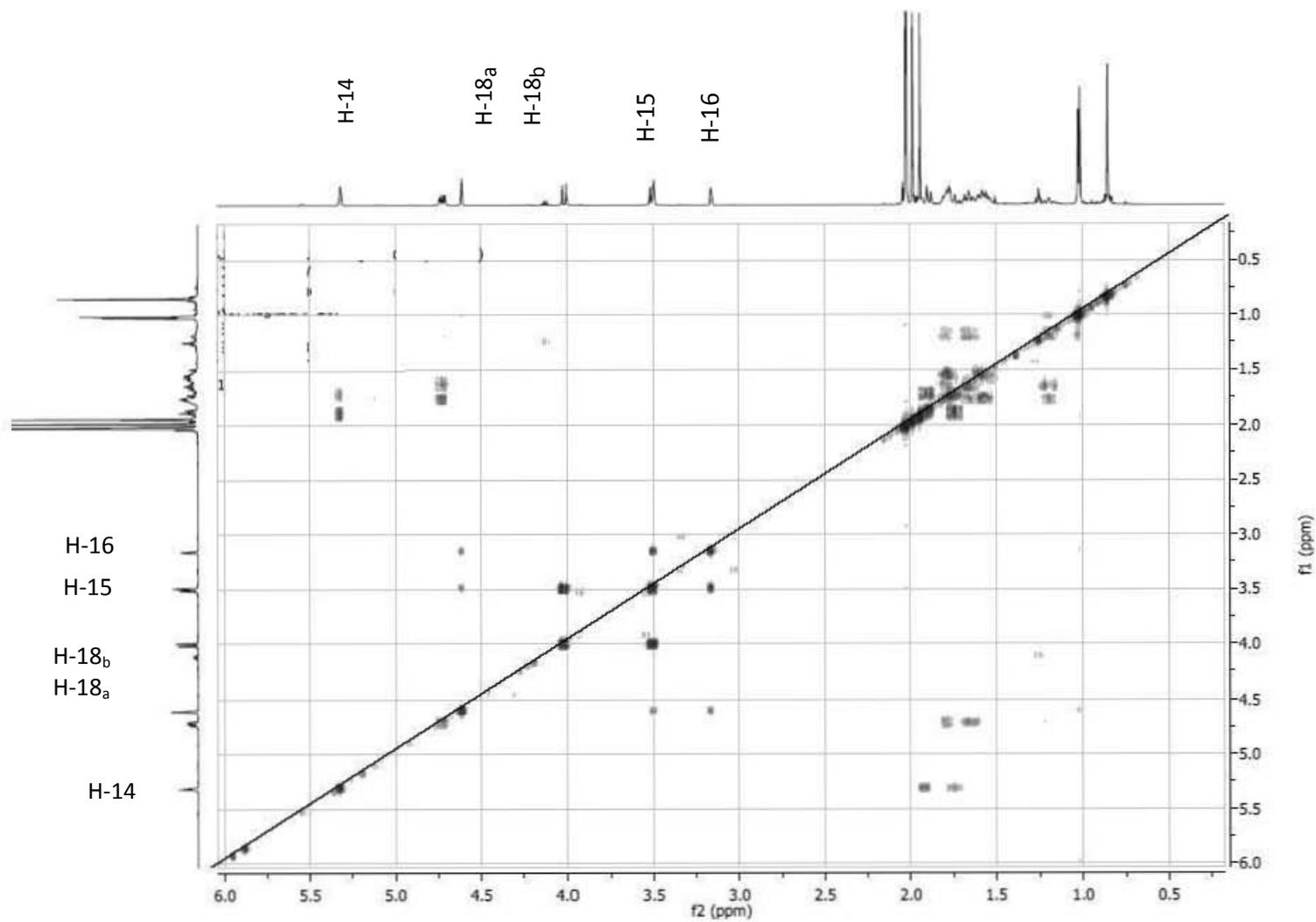
Espectro 16. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) $3\beta,7\beta,14\alpha,18$ -tetraacetil-15,16-epoxi-ent-beyereno (**33**).



Espectro 17. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , TMS) $3\beta,7\beta,14\alpha,18$ -tetraacetil-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (**33**).



Espectro 18. COSY (500 MHz, CDCl₃, TMS) 3 β ,7 β ,14 α ,18-tetraacetil-15,16-epoxi-*ent*-beyereno (**33**).



12. Bibliografía

1. Oliveira, L. G., Mantovani, S. M., Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. *Quim. Nova*, **2009**, *32*, 742-756.
2. Kieslich, K., Terpenoids en microbial transformation of Non-steroid cyclic compounds, **1976**, *31*, 56-54.
3. Mikami, Y., Biotechnol., Microbial conversion of terpenoids. *Biotechnol Genet. Eng.*, **1988**, *6*, 271-320.
4. Newman, A. A., Chemistry of terpenes and terpenoids, London-England, **1972**, 155-205.
5. Dewick, P. M., Medicinal natural products a biosynthetic approach, 3^a ed., **2009**, 187-223.
6. Thomson, R. H., The chemistry of natural products. 2^a ed., Edit. *Blackie Academic and Professional* **1993**, 117-135.
7. Young, J. H.; Dean J. T., Formation of Beyerene, Kaurene, Trachylobane, and Atiserene Diterpenes by Rearrangements That Avoid Secondary Carbocations. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 5375-5386.
8. Upper, C. D.; West, C. A., Biosynthesis of gibberellins. Enzimic cyclization of gernylgeranyl-pyrophosphate to kaurene. *J. Biol. Chem.*, **1967**, *242*, 3285-3292.
9. Shechter, I.; West, Ch. A., Biosynthesis of cyclic diterpenes from trans-geranylgeranyl-pyrophosphate. *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*, 3200-3209.
10. Goodwin, T. W.; Mercer, E.I., Introduction to plant biochemistry. Pergamon press, 2^a ed., Great Britain., **1983**, *1*, 420-433.
11. Straathof, A. J., Panke, S., Schmid, A., The production of fine chemical by biotransformation. *Curr. Opin Biotechnol.*, **2002**, *13*, 548-546.

12. Thomas, S. M.; Di Cosimo, R.; Nagarajan, V., Biocatalysis application and potential for the chemical industry. *Trends Biotechnol.*, **2002**, *6*, 238-242.
13. Zaks, A., Industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, *5*, 130-136.
14. Huisman, G. W.; Gray, D., Towards novel processes for the fine chemical and pharmaceutical industries. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, *13*, 352-358.
15. Lehman, L. R.; Stewart, J. D., Filamentous fungi: potentially useful catalyst for the biohydroxylations of non-activated carbon centers. *Curr. Org. Chem.*, **2001**, *5*, 439-470.
16. Urlacher, V., Schmid, R. D., Biotransformation using prokaryotic P450 monooxygenases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 557-564.
17. Peterson, D. H.; H. C. Murray., Microbial oxygenation of steroids at carbon 11. *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, *74*, 1871-1872.
18. Loughlin, W. A.; Biotransformations in Organic Synthesis. *Bioresource Technology*, **2000**, *74*, 49-62.
19. García-Granados, A., Biotransformación microbiológica de sesquiterpenos y diterpenos: una herramienta para la semisíntesis de productos naturales., *Rev. Latinoamer. Quím.*, **1994**, *23*, 50-51
20. Rodríguez., A. R., Metabolismo de las toxinas ambientales. La ciencia desde México, Edit. *FCE, SEP, CONACYT.*, México **2004**, 11-28.
21. Hideaki, Y.; Sakayu, S., Microbial and enzymatic processes for the production of biologically and chemically useful compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1998**, *2*, 622-642.

22. García-Granados, A.; Martínez, A.; Onorato, M., E.; Arias, J. M. J. Microbial transformation of tetracyclic of *ent*-beyerenes by *Rhizopus nigricans* cultures. *J. Nat. Prod.*, **1985**, *48*, 371-373.
23. García-Granados, A.; Guerrero, A.; Martínez, A., Parra, A., Arias, J. M., Biotransformation of tetracyclic of *ent*-beyerenones by *Rhizopus nigricans* and *Curvularia lunata* cultures. *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 657-663.
24. García-Granados, A., Parra, M., E.; Arias. Biotransformation of *ent*-Atisenes and *ent*-Beyerenes by *Rhizopus nigricans* and *Fusarium moniliforme* cultures. *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 86–92.
25. García-Granados, A.; Martínez, A.; Onorato, M. E., Socorro, O., Diterpenoids from *Sideritis pusilla subsp. flavovirens.*, *Phytochemistry.*, **1984**, *23*, 607-610.