



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Informe de Laboratorio de Investigación Formativa VII y VIII

**Biotransformación del óxido de cariofileno con
tres diferentes microorganismos –*Saccharomyces
cerevisiae*, *Cunninghamella echinulata* y *Beauveria
bassiana*–.**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA

Erandy Villegas Salvador

Director: M. en C. Arturo Eduardo Cano Flores

Laboratorio de Biotransformaciones y Química de Productos Naturales

L-314

Fecha: 1 de Junio de 2016

Ciudad de México





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 la DGAPA, por su apoyo al proyecto IN216012

- Al Dr. Guillermo Delgado Lamas del Instituto de Química de la UNAM.

- A la Dra. Laura Álvarez del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM.

- Al Dr. Benjamín Velazco de la Comisión Nacional del Deporte.

- Al Personal Técnico Académico del Instituto de Química de la UNAM.

- A la M. en C. Mayra Yaneth Antúnez Mojica del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM.

- A la Carrera de Biología de Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

DEDICATORIAS

A mi familia como si dijera agua de vida cada vez que pronuncio alguno de sus nombres.

A mis amigos quienes siempre tienen una sonrisa de apoyo para mí.

Gracias por todo, que es tanto, nunca acabaría de agradecerles.

El presente trabajo se presentó en el 34° Congreso Nacional de Educación Química y el 50° Congreso Mexicano de Química, en la Ciudad de Querétaro, Querétaro, México 2015.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Generalidades de las biotransformaciones.....	2
2.2. Óxido de cariofileno (1).....	3
2.2.1. Aplicaciones del óxido de cariofileno (1).....	3
2.2.2. Fuentes naturales del óxido de cariofileno (1).....	4
2.3. Biotransformaciones del óxido de cariofileno (1).....	5
2.4. Los hongos como biocatalizadores.....	8
2.5. Generalidades y aplicaciones de <i>Cunninghamella echinulata</i>	9
2.5.1. Ejemplo de biotransformación con <i>Cunninghamella echinulata</i>	10
2.6. Generalidades y aplicaciones de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.6.1. Ejemplo de biotransformación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.7. Generalidades y aplicaciones de <i>Beauveria bassiana</i>	12
2.7.1. Ejemplos de biotransformaciones con <i>Beauveria bassiana</i>	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4. JUSTIFICACIÓN.....	16
5. HIPÓTESIS.....	17
6. OBJETIVOS.....	18
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
7. MÉTODO.....	19
7.1. Proceso de purificación cromatográfica y determinación de las propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	19
7.1.1. Purificación por Cromatografía en Capa Preparativa (CCP) del óxido de cariofileno (1).....	19
7.1.2. Purificación por Cromatografía en Columna Flash del óxido de cariofileno (1).....	20
7.2. Resiembra de los microorganismos para la técnica de evaluación de toxicidad.....	21
7.2.1. Preparación de la solución densa de esporas y solución celular.....	21

7.3. Determinación de CMI del óxido de cariofileno (1).....	22
7.3.1. Preparación de disoluciones de óxido de cariofileno (1).	22
7.3.2. Determinación de CMI del óxido de cariofileno (1) frente a <i>Cunninghamella echinullata</i> por el método de dilución en agar.	22
7.3.3. Determinación de CMI del óxido de cariofileno (1) frente a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por el método de halo de inhibición.....	23
7.3.4. Determinación de CMI del óxido de cariofileno (1) frente a <i>Beauveria bassiana</i> por el método de picadura.	23
7.4. Preparación de los medios de cultivo.....	24
7.5. Biotransformación del óxido de cariofileno (1).....	24
7.5.1. Resiembra de los tres microorganismos.....	24
7.5.2. Preparación de la solución densa de esporas y solución celular.	25
7.5.3. Factibilidad de biotransformación.....	25
7.5.4. Biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (1) con <i>Cunninghamella echinulata</i>	27
7.5.5. Biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (1) con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
7.5.6. Biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (1) con <i>Beauveria bassiana</i>	31
7.6. Reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (1) con AMCPB.....	32
7.7. Reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (1) en medio ácido.	33
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
8.1. Purificación e identificación del óxido de cariofileno (1).	35
8.2. Determinación de CMI del óxido de cariofileno (1) frente a <i>Cunninghamella echinulata</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Beauveria bassiana</i>	36
8.3. Determinación de la factibilidad de biotransformación del óxido de cariofileno (1) con diferentes microorganismos.	37
8.4. Biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (1) con <i>Cunninghamella echinullata</i>	38
8.5. Biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (1) con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
8.6. Biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (1) con <i>Beauveria bassiana</i>	51
8. 7. Reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (1) con AMCPB.....	56

9. CONCLUSIONES	58
10. SUGERENCIAS.....	59
11. BIBLIOGRAFÍA	60
12. ESPECTROS.....	68

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TABLAS

Tabla 1. Especies de plantas que contienen óxido de cariofileno (1).....	4
Tabla 2. Hongos utilizados en la biotransformación del óxido de cariofileno (1).....	5
Tabla 3. Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C (100 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) para el óxido de cariofileno (1).....	36
Tabla 4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar del óxido de cariofileno (1) con <i>Cunninghamella echinulata</i>	36
Tabla 5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de picadura del óxido de cariofileno (1) con <i>Beauveria bassiana</i>	37
Tabla 6. Factibilidad de biotransformación del óxido de cariofileno (1) con diferentes microorganismos.....	38
Tabla 7. Datos de desplazamientos químicos en RMN ¹³ C para los epímeros del diepóxido de cariofileno (35 y 36) [43].	42
Tabla 8. Desplazamientos químicos RMN ¹ H y RMN ¹³ C para el 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-15-ol (2)	49
Tabla 9. Desplazamientos químicos RMN ¹ H y RMN ¹³ C para el compuesto 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (19).....	54
Tabla 10. Rendimiento de los productos de biotransformación y de reacción del óxido de cariofileno (1).....	57

FIGURAS

Figura 1. Productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1).....	6
Figura 2. <i>Cunninghamella echinulata</i>	9
Figura 3. Productos de biotransformación del ácido ilícico (53) con <i>Cunninghamella echinulata</i>	10
Figura 4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Figura 5. Productos de biotransformación del geraniol (56) con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
Figura 6. <i>Beauveria bassiana</i>	12

Figura 7. Biotransformación de tsugicolina A con <i>Beauveria bassiana</i> (63).....	13
Figura 8. Biotransformación de cadina-4,10(15)-dien-3-ona (65) con <i>Beauveria bassiana</i>	14
Figura 9. Biotransformación de 1,4,4-trimetiltriciclo[5.4.0.0(3.5)]undec-7-en-9-ona (76) con <i>Beauveria bassiana</i>	14
Figura 10. Purificación del óxido de cariofileno (1) por CC-Flash	20
Figura 11. Modelo empleado en la caja Petri para evaluar el método de halo de inhibición.	23
Figura 12. CCF de los productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1) con <i>Cunninghamella echinulata</i>	26
Figura 13. CCF de los productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1) con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
Figura 14. CCF de los los productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1) con <i>Beauveria bassiana</i>	27
Figura 15. Reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (1) con AMCPB.	33
Figura 16. CCF de los diferentes productos obtenidos de las biotransformaciones y de la reacción química del óxido de cariofileno (1)	34
Figura 17. Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y ¹³ C de óxido de cariofileno (1).....	35
Figura 18. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de halo de inhibición del óxido de cariofileno (1) con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
Figura 19. CCF de los productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1) con <i>Cunninghamella echinulata</i>	38
Figura 20. CCF de los productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1) con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Figura 21. CCF de los productos de biotransforamción del óxido de cariofileno (1) con <i>Beauveria bassiana</i>	39
Figura 22. Espectros de RMN ¹³ C (desacoplamiento total) del óxido de cariofileno (1) y el 8β-diepóxido de cariofileno (35)..	40
Figura 23. Espectros de RMN ¹³ C (DEPT 135) del óxido de cariofileno (1) y del 8β- diepóxido de cariofileno (35).....	41
Figura 24. Experimento HSQC del 8β-diepóxido de cariofileno (35).....	42

Figura 25. Experimento de NOESY para el 8 β -diepóxido de cariofileno (35).	43
Figura 26. Interacciones espaciales en los epímeros del diepóxido de cariofileno (35 y 36)	44
Figura 27. Espectros de RMN ¹³ C (DEPT 90) del óxido de cariofileno (1) y del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (16).	44
Figura 28. Espectros de RMN ¹³ C (DEPT 135) del óxido de cariofileno (1) y del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (16)	45
Figura 29. Experimento HSQC del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (16).	46
Figura 30. Experimento NOESY del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (16).....	47
Figura 31. Orientación relativa del H-7 en los compuestos (7 <i>R</i>)-4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-7-ol (16) y (7 <i>S</i>)-4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-7-ol (77).....	47
Figura 32. Espectros de RMN ¹³ C (DEPT 135) del óxido de cariofileno (1) y el 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-15-ol (2).	48
Figura 33. Experimento HSQC del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-15-ol (2).	49
Figura 34. Experimento NOESY del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-15-ol (2).....	50
Figura 35. Orientación relativa del C-15 en el 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (2) y 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-14-ol (37).....	50
Figura 36. Desplazamientos químicos RMN ¹³ C y RMN ¹ H para H-15 y C-15 para el óxido de cariofileno (1) y las sustancia 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (2)..	51
Figura 37. Espectros de RMN ¹³ C (desacoplamiento total) del óxido de cariofileno (1) y 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (19)	52
Figura 38. Experimento HSQC del 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (19).....	53
Figura 39. Propuesta biosintética de los compuestos 17 y 18 a partir de 19	54
Figura 40. Experimento NOESY de la sustancia en discusión 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (19)	55
Figura 41. Orientación relativa en el C-8 para el compuesto 19	55
Figura 42. Reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (1) con AMCPB.	56
Figura 43. Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C para el diepóxido del cariofileno (mezcla de epímeros)	56
Figura 44. Conformaciones para el diepóxido del cariofileno (35 y 36)..	57

DIAGRAMAS

Diagrama 1. Purificación del óxido de cariofileno (1) por CCP.....	20
Diagrama 2. Proceso de la evaluación de toxicidad (CMI) por el método de dilución en agar.....	22
Diagrama 3. Proceso de la evaluación de toxicidad (CMI) por el método de picadura. ..	24
Diagrama 4. Proceso general para la biotransformación cualitativa.....	26
Diagrama 5. Proceso general para la biotransformación cuantitativa.....	28

ESPECTROS

1. Espectro de IR (CHCl ₃) del óxido de cariofileno (1).....	68
2. Espectro de RMN ¹³ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) del óxido de cariofileno (1)	69
3. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) del óxido de cariofileno (1)	70
4. Espectro de IR (CHCl ₃) del 8β-diepóxido del cariofileno (35)	71
5. Espectro de RMN ¹³ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) del 8β-diepóxido del cariofileno (35)	72
6. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) del 8β-diepóxido del cariofileno (35)	73
7. Espectro de IR (CHCl ₃) del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (16).....	74
8. Espectro de RMN ¹³ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (16)	75
9. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (16).....	76
10. Espectro de IR (CHCl ₃) del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (2)	77
11. Espectro de RMN ¹³ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15- ol (2)	78
12. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15- ol (2).....	79
13. Espectro de IR (CHCl ₃) del la mezcla de compuestos derivados de la biotransformación con <i>S. cerevisiae</i>	80
14. Espectro de IR (CHCl ₃) del 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (19)	81
15. Espectro de RMN ¹³ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) del 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil- 8(13)-eno (19)	82

16. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) del 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (19)	83
17. Espectro de IR (CHCl ₃) de la mezcla de diepóxido de cariofileno (35 y 36)	84
18. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) de la mezcla de diepóxidos del cariofileno (35 , 36)	85
19. Espectro de RMN ¹³ C (400 MHz, C ₅ D ₅ N, TMS) de la mezcla diepóxidos del cariofileno (35 , 36)	86

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

[α]	Rotación óptica
AcOEt	Acetato de etilo
AMCPB	Ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzoico
APD	Agar Papa Dextrosa (Medio de cultivo)
ATCC	American Type Culture Collection
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CG/EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CCV	Cromatografía en Columna a Vacío
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CC-Flash	Cromatografía en Columna Flash
CCP	Cromatografía en Capa Preparativa
CDBB	Colección de Cultivos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV
CYP 450	Isoforma del Citocromo P450
CDCl₃	Cloroformo deuterado
C₅D₅N	Piridina deuterada
CH₂Cl₂	Diclorometano
COSY	Correlación homonuclear de hidrógeno en dos dimensiones
<i>d</i>	doblete
DEPT	RMN ¹³ C desacoplamiento parcial de C-13
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometría de Masas
HSQC	Correlación Heteronuclear a un enlace C-H
IR	Infrarrojo
IE	Impacto Electrónico
J	Contante de acoplamiento (Hz)
<i>m</i>	multiplete
n-hex	n-hexano
NOESY	Efecto Nuclear Overhauser
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
R_f	Factor de retención
rpm	Revoluciones por minuto
<i>s</i>	singulete
δ	Desplazamiento químico
uma	Unidad de masa atómica
<i>t</i>	triplete
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultra Violeta
$\nu_{máx}$	Longitud de onda máxima
YEPGA	Medio (peptona, extracto de levadura, extracto de carne, glucosa).

RESUMEN

El óxido de cariofileno (**1**) es un sesquiterpeno tricíclico presente en diversas especies de plantas, el cual posee diferentes actividades biológicas y una alta reactividad química. Su estructura base permite obtener diferentes esqueletos químicos, los cuales se encuentran restringidos en la naturaleza y pueden ser obtenidos por medio de diferentes transformaciones químicas y biológicas.

En el presente proyecto se dan a conocer los resultados de la evaluación de la toxicidad de **1** contra tres microorganismos –*Saccharomyces cerevisiae*, *Cunninghamella echinulata* y *Beauveria bassiana*– por el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) evaluado por las técnicas de dilución en agar, halo de inhibición y picadura respectivamente. Así como los productos mayoritarios de la biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (**1**) con *C. echinulata* y *B. bassiana*; y derivados de la reacción de epoxidación de **1** con AMCPB.

Los productos obtenidos de la biotransformación con *C. echinulata* fueron el 8 β -diepóxido del cariofileno (**35**), (7*R*)-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (**16**) y el 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-15-ol (**2**), mientras que con *B. bassiana* se obtuvieron el compuesto **2** y el 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (**19**). De la reacción de epoxidación de **1** con AMCPB, se obtuvo el diepóxido del cariofileno como mezcla de diastereoisómeros (**35** y **36**).

1. INTRODUCCIÓN

En la biotecnología un componente importante es el bioproceso, el cual surgió hace miles de años (6000 a.C.), con el uso de microorganismos para la producción de alimentos y bebidas, desde entonces varios eventos históricos han impulsado el desarrollo de esta tecnología. Cabe citar los descubrimientos científicos de Louis Pasteur, la primera guerra mundial y la estructura del ADN por Watson y Crick [1, 2]. Además la hidroxilación del C-11 de la progesterona por *Rhizopus arrhizus* en 1957, marcaron el desarrollo de las biotransformaciones mediante su incorporación a los procesos de síntesis de varios esteroides, trayendo como consecuencia el desarrollo de la industria farmacéutica de los esteroides [3]. A partir de la década de los años noventa, la importancia de las biotransformaciones ha ido en aumento tanto en el campo científico, como en el industrial; debido a la posibilidad de obtener sustancias con un alto valor agregado, ya sea como precursores sintéticos o moléculas bioactivas, las cuales se derivan de sustratos económicos y abundantes; como es el caso de muchos monoterpenos, sustancias que tiene una gran aplicación en la industria de los alimentos y saborizantes. Además, las condiciones en las que se lleva a cabo una biotransformación resulta ser muy compatible con el ambiente, ya que se realizan principalmente en medios acuosos y los subproductos son biodegradables. En la actualidad se realizan estudios con objeto de conocer las rutas metabólicas que conducen a nuevos productos importantes por su uso [4], al aislamiento y mejoras de las enzimas involucradas [5], a la predicción de modelos en el metabolismo de los xenobióticos [6, 7] y finalmente, la determinación de las actividades biológicas de los productos. Estas características hacen de las biotransformaciones un área de gran desarrollo en donde convergen varias ciencias, como: la Química, Biotecnología, Genética, Ingeniería Metabólica, Microbiología, entre otras.

En el presente informe se dan a conocer los resultados obtenidos de la biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con tres diferentes microorganismos –*Saccharomyces cerevisiae*, *Cunninghamella echinulata* y *Beauveria bassiana*–, para determinar la posibilidad de obtención de nuevos productos de bioconversión

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES DE LAS BIOTRANSFORMACIONES.

Para la biotecnología blanca (biotecnología industrial) el uso de biocatalizadores (enzimas y microorganismos), son claves en la industria de la transformación —farmacéutica, alimenticia, agroalimentaria, aromatizantes, saborizantes, química fina, entre otras— [8].

La biotecnología blanca y la química orgánica se ocupan del desarrollo de nuevos procesos para la obtención de compuestos ópticamente puros, cuya demanda es cada vez más importante [9]. En este campo, las biotransformaciones han adquirido una mayor importancia en la producción de bloques quirales de construcción para la síntesis de fármacos y compuestos biológicamente activos [10]; los cuales se obtienen debido a que dichas transformaciones químicas se ven favorecidas por la alta *quimio, regio* y *enantioselectividad* con que actúan los diferentes catalizadores biológicos. De esta manera se ha evitado la necesidad de etapas de activación de una materia prima, de la protección y desprotección de los diferentes grupos funcionales presentes en la materia prima, metodologías muy presentes en la síntesis química convencional [9]. Una biotransformación generalmente se realiza en condiciones “suaves” de reacción —temperatura ambiente, presión atmosférica, pH fisiológico y H₂O— evitando el uso de condiciones más extremas que podrían causar problemas como la isomerización, racemización, epimerización y reordenamiento [11]. Por lo tanto, dos características importantes de los procesos de bioconversión son su sostenibilidad y bajo impacto ambiental [9, 12].

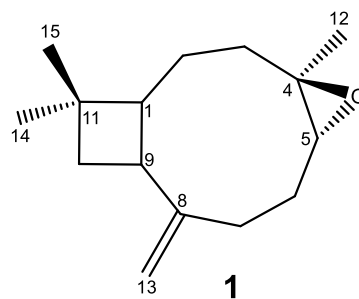
En los últimos años la industria química ha estado bajo una creciente presión para que la producción química sea más ecológica e independiente de los recursos fósiles; el desarrollo de los procesos industriales basados en microorganismos puede ayudar a disminuir el uso o generación de sustancias peligrosas y apoyar a la transición de la dependencia de los recursos fósiles hacia procesos industriales sostenibles basados en la química verde [13].

Se estima que alrededor de 150 procesos biocatalíticos se aplican actualmente en la industria química [14]. Por supuesto, mover un proceso de laboratorio a escala industrial es sumamente complicado y debe ser perfectamente optimizado; además, se requiere de un conocimiento de las interacciones entre el biocatalizador, el sustrato y el medio físico en el reactor [9, 15].

De acuerdo a lo anterior una biotransformación se define como: la modificación química de un sustrato orgánico exógeno por medio de microorganismos o enzimas aisladas, para obtener productos químicamente diferentes, los cuales están determinados por la naturaleza del sustrato, el microorganismo y las interacciones con el medio.

2.2. ÓXIDO DE CARIOFILENO (1).

El óxido de cariofileno (1) es un sesquiterpeno tricíclico, del grupo con esqueleto de cariofileno, mismo que se forma a partir de la condensación de tres unidades de isopreno para dar el difosfato de farnesilo (PPF), el cual sufre dos ciclaciones posteriores para dar el ion cariofileno [16], este compuesto finalmente sufre una reacción de epoxidación de



la ligadura *endocíclica* para dar **1**. Las características estructurales de **1** lo hacen sumamente interesantes y reactivo; debido a un anillo muy tensionado de cuatro átomos de carbono, un anillo muy oblongo de nueve miembros, un grupo epóxido y un doble enlace *exocíclico*. Se conocen alrededor de 50 sesquiterpenos con el esqueleto de cariofileno, el cual es considerado como precursor de algunos sesquiterpenos tricíclicos biológicamente activos cuya síntesis orgánica de laboratorio es sumamente difícil, por lo que se busca su producción a partir de transformaciones biológicas.

2.2.1. APLICACIONES DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (1).

El óxido de cariofileno (1) es usado como fragancia no tóxica [17], se ha descrito que posee múltiples actividades biológicas donde se incluyen; antiinflamatorio y analgésico [18], insecticida [19, 20], antibacteriana [21], antifúngica [22] contra importantes hongos fitopatógenos –*Fusarium oxiporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pestalotiopsis funerea*,

Colletotrichum gloeosporioides y *Ganoderma australe*– y actividad anticancerígena contra cáncer de mama y próstata [23].

2.2.2. FUENTES NATURALES DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (1).

El óxido de cariofileno se puede obtener de manera natural en el aceite esencial de una gran diversidad de plantas de las familias Lauraceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Piperaceae, Cannabaceae, Zinziberaceae, Rutaceae, Asteraceae, entre otras, las cuales son reconocidas por ser plantas medicinales y aromáticas, ver **tabla 1**.

Tabla 1. Especies de plantas que contienen óxido de cariofileno (1).

Familia	Especie	Referencia	
Lauraceae	<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	[19]	
Lamiaceae	<i>Origanum vulgare</i>	[24]	
	<i>Salvia elegans</i> <i>S. leucantha</i> <i>S. officinalis</i>	[25]	
	<i>Lavandula bipinnata</i>	[26]	
	<i>Eugenia dysenterica</i>	[27]	
	<i>Eugenia calycina</i>	[21]	
	<i>Thymus vulgaris</i>	[28]	
	Piperaceae	<i>Piper aleyreanum</i> <i>P. anonifolium</i> <i>P. hispidum</i>	[29]
Cannabaceae		<i>Cannabis sativa</i>	[30]
Sapindaceae		<i>Serjania yucatanensis</i>	[31]
Zinziberaceae	<i>Zingiber nimmonii</i>	[32]	
	<i>Alpinia zerumbert</i>	[33]	
	<i>Zingiber officinale</i> var. <i>rubrum</i>	[34]	
Rutaceae	<i>Ruta montana</i>	[35]	
	<i>Zanthoxylum heitzii</i>	[20]	
Asteraceae	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	[36]	
	<i>Senecio salignus</i>	[37]	
	<i>Artemisia indica</i>	[38]	
Annonacea	<i>Annona squamosa</i>	[18]	
Araucariaceae	<i>Araucaria cunninghamii</i> <i>Araucaria heterophylla</i>	[39]	

2.3. BIOTRANSFORMACIONES DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (1).

En la literatura se han descrito diversas biotransformaciones del óxido de cariofileno (1) con diferentes hongos, principalmente fitopatógenos, de las cuales se han obtenido diferentes derivados (aproximadamente 51), estos hongos producen un amplio rearrreglo de los anillos, resultado de ataques intramoleculares al doble enlace, apertura del epóxido, epoxidaciones *estereoespecíficas* del C-8 y C-13, oxidaciones e hidroxilaciones especialmente del C-7 y C-15, entre otras. Los productos obtenidos tienen la característica de ser novedosos y se enlistan en la **tabla 2**. Otros son precursores de compuestos bioactivos como el 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-14-ol (37), sustancia que demostró una importante actividad en el tratamiento del Alzheimer, ver **figura 1** [40].

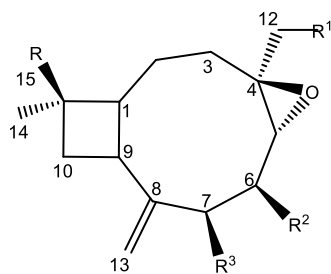
Tabla 2. Hongos utilizados en la biotransformación del óxido de cariofileno (1).

Microorganismo	Productos	Referencia
<i>Diplodia gossypina</i>	2-14	[41]
<i>Chaetomium cochliodes</i>	2, 6, 10, 11, 15-34	[42]
<i>Botrytis cinerea</i>	2, 16, 18, 20, 21, 35-45	[43]
<i>Macrophomina phaseolina</i>	2, 37	[40]
<i>Cephalosporium aphidicola</i>	30, 46	[40]
<i>Aspergillus niger</i> ¹	47	[40]
<i>Fusarium lini</i>	48	[40]
<i>Rhizopus stoloniferum</i>	44, 49	[40]
<i>Gibberella fujikuroi</i>	50	[40]
<i>A. niger</i> ²	2, 51, 52	[44]
<i>Colletotrichum gloesporoides</i>	2, 19	[45]

¹ La cepa de *A. niger* no está especificada en esta referencia [40].

² La cepa de *A. niger* es TBUYN-2 en esta referencia [44].

Figura 1. Productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1)



- 2) $R=CH_2OH$, $R^1=R^2=R^3=H$
 3) $R=CH_2COOH$, $R^1=R^2=R^3=H$
 4) $R=OH$, $R^1=R^2=R^3=H$
 5) $R=CH_2OH$, $R^2=OH$, $R^1=R^3=H$
 6) $R=CH_2OH$, $R^3=OH$, $R^1=R^2=H$
 7) $R=CH_2OH$, $R^1=OH$, $R^2=R^3=H$
 41) $R=H$, $R^3=OH$, $R^1=R^2=H$

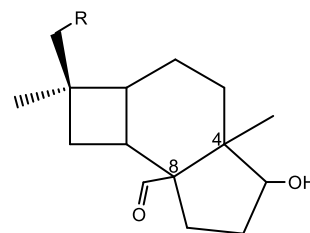
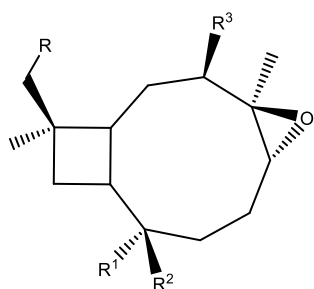
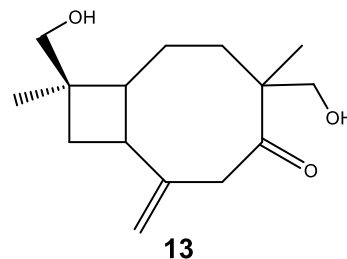
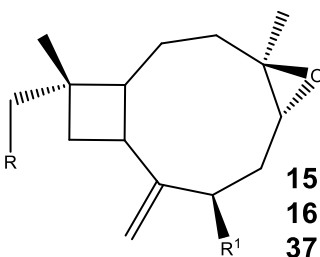
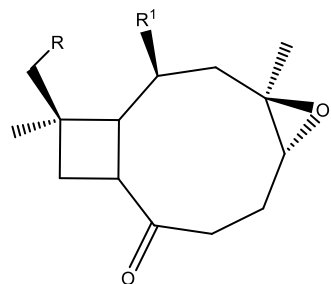
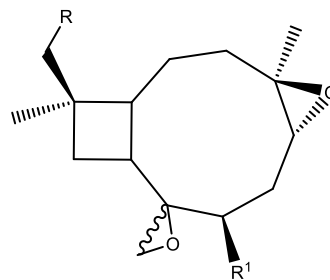
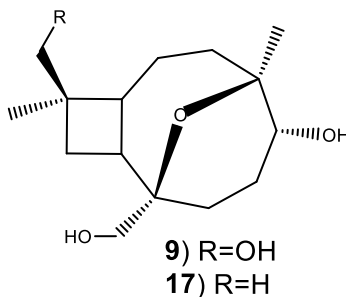
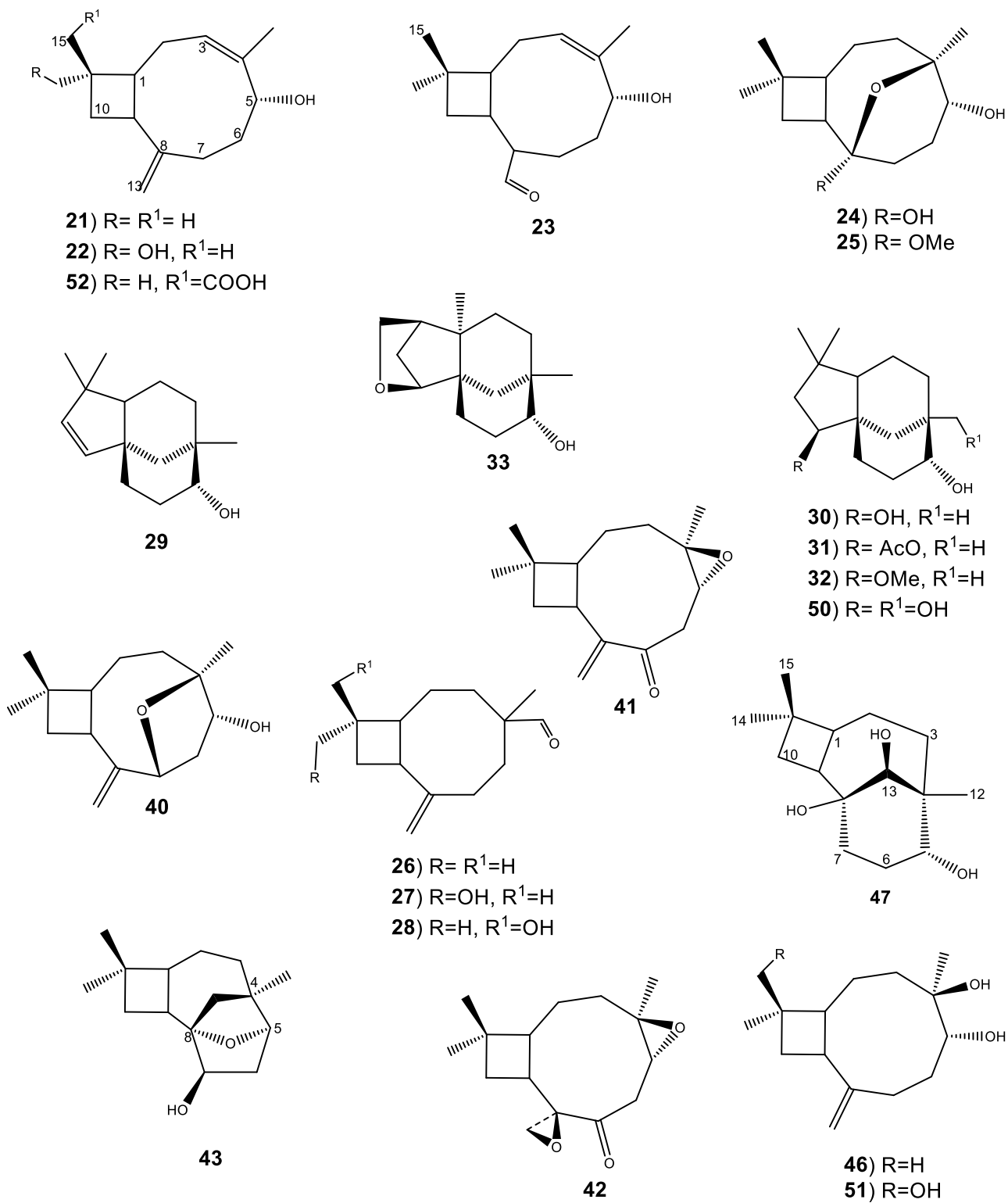


Figura 1. Productos de biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) (*continuación*).



2.4. LOS HONGOS COMO BIOCATALIZADORES.

La bioconversión de un sustrato puede lograrse mediante la acción de microorganismos, hongos, plantas, animales, cultivos de tejidos, enzimas libres o enzimas inmovilizadas, dentro de los biocatalizadores, los hongos son más promisorios, ya que varios géneros de hongos fitopatógenos son reconocidos por su habilidad para modificar compuestos orgánicos de origen exógeno [46].

Para la aplicación eficiente de los biocatalizadores se requiere de la disponibilidad de enzimas adecuadas con alta actividad y estabilidad bajo las condiciones del proceso, selectividad sobre el sustrato y alta *enantioselectividad* [47]. Así, las enzimas tienen características que las hacen moléculas vitales, de hecho, la alta especificidad del sustrato asociado a la disposición óptima del sitio catalítico es el resultado de siglos de evolución [13].

El uso de enzimas libres como biocatalizadores es una herramienta química, ampliamente reconocida y validada en la preparación de compuestos quirales. Por otro lado, el uso de células completas de los organismos se ha limitado a aplicaciones comerciales, donde el biocatalizador se utiliza en una etapa determinada del proceso, debido principalmente al sistema enzimático tan complejo que poseen, mientras que en las fermentaciones, la célula es un productor natural de compuestos químicos, por ejemplo el etanol o algún producto natural complejo [12]. En la actualidad en algunos procesos industriales se emplean células enteras como biocatalizadores, gracias a los grandes avances en la ingeniería metabólica, genómica, metabolómica, proteómica, evolución dirigida, entre otros, que en los últimos años ha abierto la posibilidad de crear organismos y enzimas “a la medida” para cada proceso industrial [11, 12, 14, 48].

En algunos casos es preferible utilizar células microbianas enteras en lugar de enzimas aisladas como biocatalizadores, principalmente en biotransformaciones óxido/reducción (redox), donde la regeneración del cofactor está ligada a la membrana celular o la enzima no es estable fuera de la célula. Las células enteras también se utilizan cuando se prevén

reacciones de varios pasos, dada la presencia de un conjunto multi-enzimático junto a los mecanismos celulares para la regeneración del cofactor [49].

Una ventaja particular de los hongos como biocatalizadores, es su alta tasa de crecimiento, además de ser generalmente más aptos industrialmente y menos susceptibles a la contaminación con otros organismos (en comparación con cultivos de células vegetales). Por otro lado, también son capaces de expresar complejos enzimáticos como el citocromo P450, cuya importancia en los mecanismos de biotransformación es bien conocida, mismos que no pueden ser expresados por organismos procariontes [50]. Actualmente, cientos de enzimas se utilizan industrialmente, más de la mitad son derivadas de hongos, más de un tercio son de las bacterias, y el resto procedente de animales y de plantas [47].

Por otra parte, las bioconversiones con células enteras presentan algunos inconvenientes, como son: la permeabilidad del sustrato o del producto, tiempos de incubación largos, inhibición del crecimiento celular por el sustrato y/o producto, degradación del sustrato y/o producto por el metabolismo celular, dificultades de aislamiento y purificación a partir de la mezcla de reacción [49].

2.5. GENERALIDADES Y APLICACIONES DE *Cunninghamella echinulata*.

Clasificación taxonómica

Reino: Fungi
Filo: Zygomycota
Orden: Mucorales
Familia: Cunninghamellaceae
Género: *Cunninghamella*
Especie: *Cunninghamella echinulata*
(Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee.

Cunninghamella es un hongo filamentoso que se encuentra en el material del suelo y como parásito de algunas plantas, especialmente en zonas mediterráneas y subtropicales. Tiene un crecimiento rápido (4 días) en forma algodonosa blanquecina.

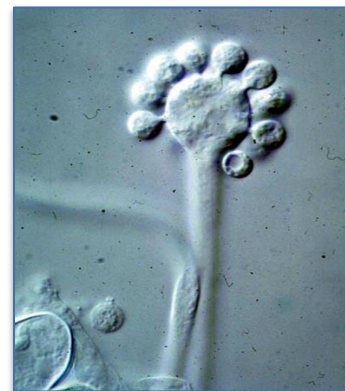
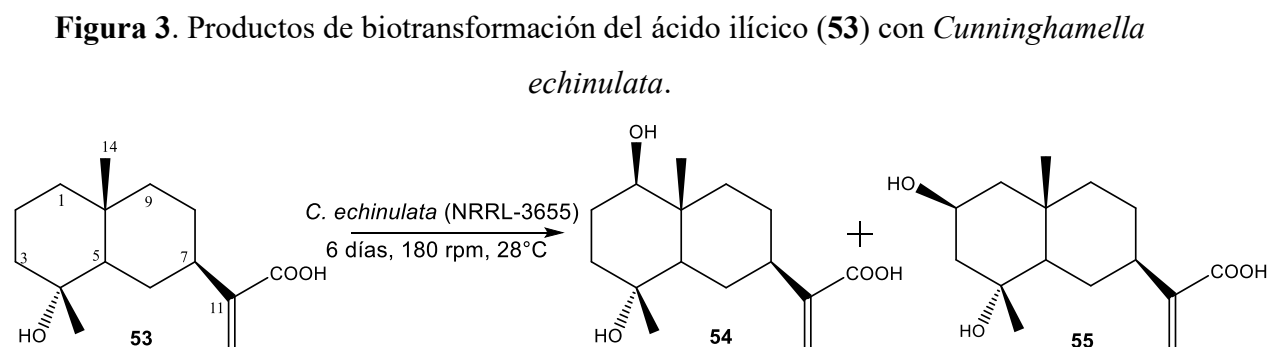


Figura 2. *Cunninghamella echinulata*

Recientemente se ha corroborado el potencial de *C. echinulata* para la producción de biodiesel a partir de melaza de caña, donde contribuye a la acumulación de altas cantidades de lípidos aprovechables [51]. Además, especies del género *Cunninghamella* tienen la capacidad para imitar el metabolismo de los mamíferos, ya que pueden expresar la mayoría de las enzimas del CYP P450 del hígado humano, por lo que *Cunninghamella* puede ser utilizado como un sistema *in vitro* fiable para los modelos de predicción del metabolismo de fármacos [52]. Finalmente *C. echinulata*, es reconocida por su habilidad de hidroxilar muchos esteroides [53] y modificar muchas otras sustancias relacionadas [54, 55].

2.5.1. EJEMPLO DE BIOTRANSFORMACIÓN CON *Cunninghamella echinulata*.

El ácido ilícico (sesquiterpeno, **53**) fue hidroxilado por *C. echinulata* (NRRL 3655) para dar dos productos el ácido 2-hidroxi-ilícico (**54**) y ácido 3-hidroxi-ilícico (**55**) [56], como se ilustra en la **figura 3**.



2.6. GENERALIDADES Y APLICACIONES DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Clasificación taxonómica

Reino: Fungi
 Filo: Ascomycota
 Clase: Hemiascomycetes
 Orden: Saccharomycetales
 Familia: Saccharomycetaceae
 Género: Saccharomyces
 Especie: *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E. C. Hansen)

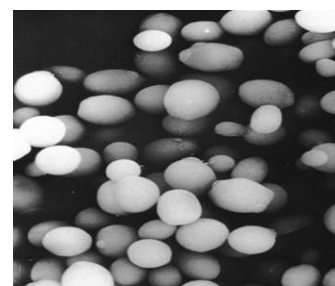


Figura 4. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae comúnmente conocido como "hongo panadero" o "levadura de cerveza" se utiliza en la industria alimentaria en la producción de diversos productos; vinos, cervezas y pan, gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación. Desde el punto de vista científico, este microorganismo se ha empleado como modelo simple de la célula eucariota, proporcionando un punto de partida para el análisis de organismos eucariotas más complejos. Esto se debe a una serie de ventajas como su facilidad de cultivo, su velocidad de división celular y actualmente se conoce la secuencia completa de su genoma. Por estas razones, se ha convertido en una importante herramienta de análisis de genómico.

Entre otras aplicaciones de *S. cerevisiae* se encuentra la producción de biodiesel a gran escala [57], el estudio del mecanismo de acción y resistencia a fúngicos, su uso para la síntesis de intermediarios quirales de sesquiterpenos [58] y para la síntesis de productos naturales de alto valor a partir de la modificación de su genoma [50].

2.6.1. EJEMPLO DE BIOTRANSFORMACIÓN CON *Saccharomyces cerevisiae*.

En la literatura química se han descrito diversas biotransformaciones utilizando *S. cerevisiae* como biocatalizador de mono- y sesquiterpenos [59, 60]. Un ejemplo es la biotransformación del geraniol (**56**), cuyos productos son derivados de reacciones de isomerización, oxidación, ciclación e hidroxilación, dichos productos son ácido geránico (**57**) citronelol (**58**), ácido citronélico (**59**), linalol (**60**), nerol (**61**), α -terpineol (**62**) [61], ver **figura 5**.

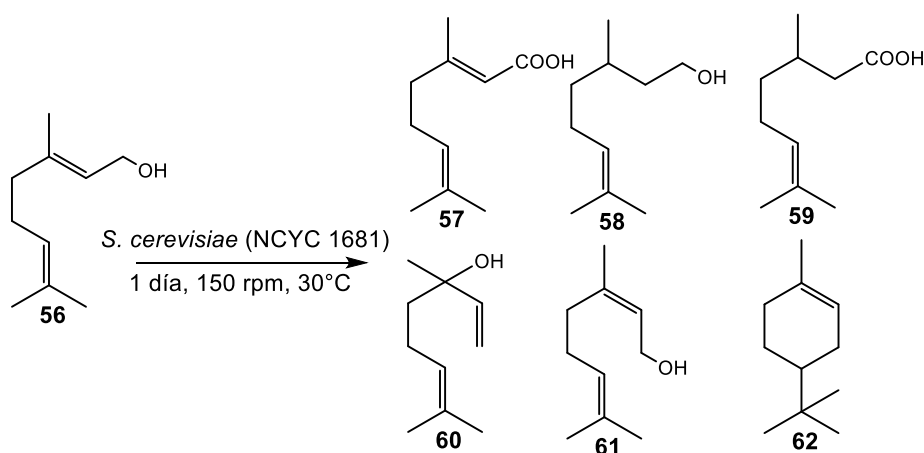


Figura 5. Productos de biotransformación del geraniol (**56**) con *Saccharomyces cerevisiae*.

2.7. GENERALIDADES Y APLICACIONES DE *Beauveria bassiana*.

Clasificación taxonómica

Reino: Fungi
Filo: Ascomycota
Clase: Eueascomycetes
Orden: Clavicipitales
Familia: Clavicipitaceae
Género: *Beauveria*
Especie: *Beauveria bassiana* Vuillemin.

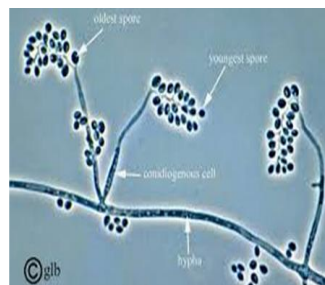


Figura 6. *Beauveria bassiana*

Hongo filamentoso hialino reconocido por ser un organismo entomopatógeno¹. Es ampliamente utilizado como bioregulador de plagas² alrededor del mundo; así como en el sector salud³ [62].

Dentro de los biocatalizadores más empleados en los procesos de biotransformación se encuentran *A. niger* y *B. bassiana*, los cuales han sido ampliamente usados en la biotransformación de diversas sustancias, por medio de reacciones de hidroxilación en Csp³ y Csp² con gran especificidad; además de reacciones de sulfoxidación, *O* y *N*-desalquilaciones, glucosidaciones, *N*-acetilaciones, apertura de epóxido, oxidaciones de Baeyer–Villiger, reducción de dobles enlaces conjugados e hidrólisis de ésteres [63].

2.7.1. EJEMPLOS DE BIOTRANSFORMACIONES CON *Beauveria bassiana*.

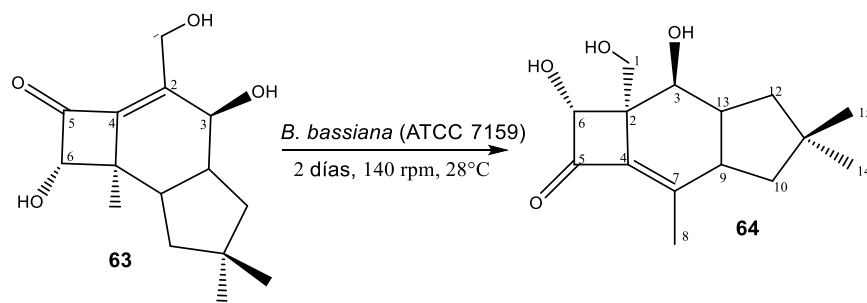
La tsugicolina A (**63**, sesquiterpeno) con *Beauveria bassiana* (ATCC 7159) sufrió un rearrreglo de anillos para generar esterpurano (**64**, 45%) [64], ver **figura 7**.

¹ Contra insectos de los órdenes Coleóptera, Lepidótera, Homóptera y Arthropoda.

² Insectos herbívoros como la cucaracha de la papa, termitas, hormigas, broca del maíz, entre muchos otros.

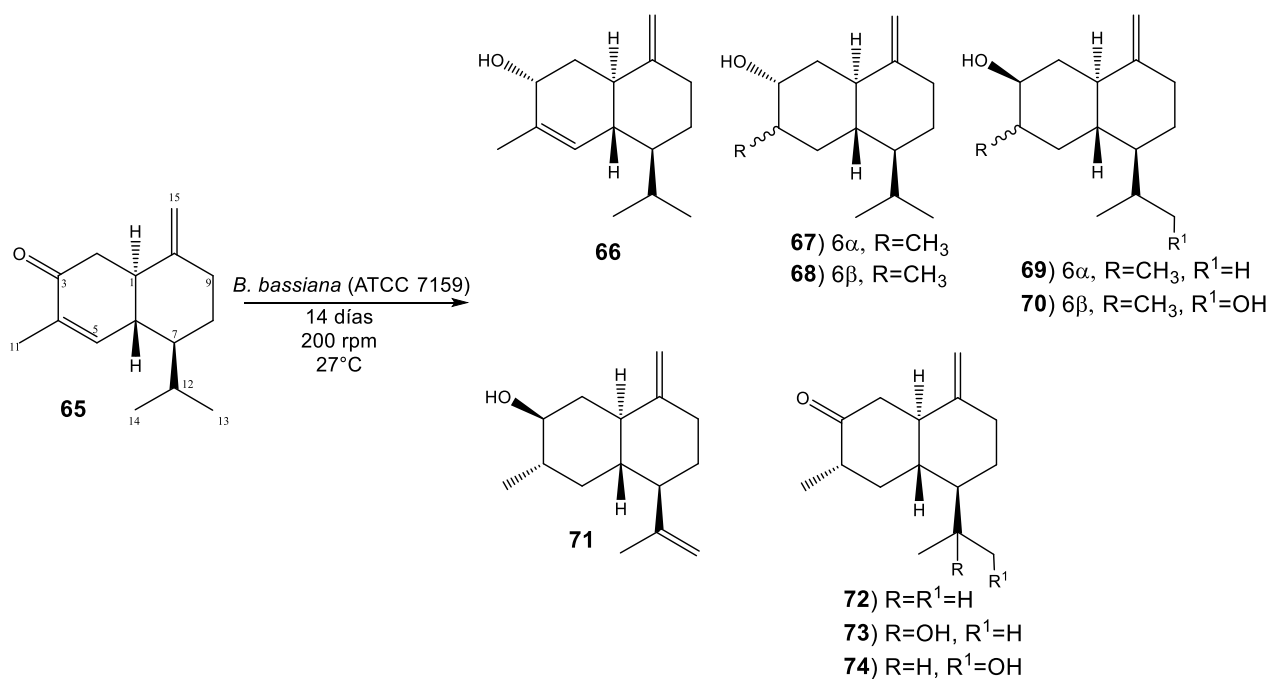
³ En contra de vectores de transmisión de enfermedades como: Leishmaniasis, Chagas, y Malaria.

Figura 7. Biotransformación de tsugicolina A con *Beauveria bassiana* (**63**)



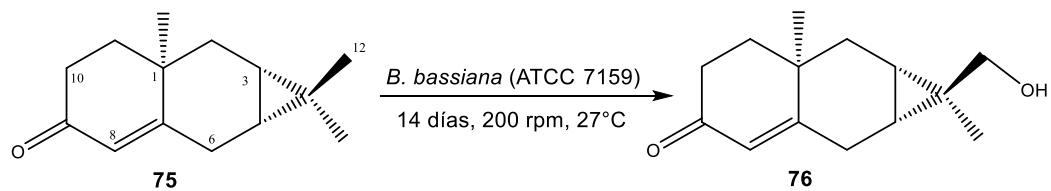
Por otro lado, la biotransformación del sesquiterpeno **65** (cadina-4,10(15)-dien-3-ona) con *B. bassiana* (ATCC 7159) produjo la reducción específica del doble enlace *endo*-cíclico; además de las hidroxilaciones en C-12 y C-13 y la reducción del C-3 para dar los productos **66-74** [65], como se muestra en la **figura 8**.

Figura 8. Biotransformación de cadina-4,10(15)-dien-3-ona (**65**) con *Beauveria bassiana*.



De la biotransformación de la cetona sesquiterpénica (1S)-1,4,4-trimetiltriciclo[5.4.0.0^{3,5}]undec-7-en-9-ona (**75**) con *B. bassiana* (ATCC 7159) se obtuvo **76** (80%), la acción de dicho hongo fue la hidroxilación en C-12 [63], ver **figura 9**.

Figura 9. Biotransformación de 1,4,4-trimetiltriciclo[5.4.0.0^{3.5}]undec-7-en-9-ona (**75**) con *Beauveria bassiana*.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existe en la literatura química especializada una descripción muy limitada acerca del comportamiento de los sistemas biológicos –microorganismos, enzimas y cultivos celulares de tejidos– en función de la estructura del sustrato. Además, el conocimiento que se tiene sobre las transformaciones biológicas en sesquiterpenos, su aislamiento y elucidación estructural es muy escaso, a pesar de existir una vasta cantidad de información de sus importantes y muy variadas actividades farmacológicas –antihelmíntica, antibiótica, antiepiléptica, antiinflamatoria, anticancerígena, organoléptica, sedante y espasmódica–.

Con base en lo anterior, el presente proyecto tiene como finalidad la obtención de derivados químicos novedosos a partir del óxido de cariofileno (**1**), por medio de su bioconversión con tres diferentes microorganismos –*Saccharomyces cerevisiae*, *Cunninghamella echinulata* y *Beauveria bassiana*–.

4. JUSTIFICACIÓN

Los procesos de biotransformación son una herramienta química, que han tenido una importante relevancia en la síntesis de diversos productos dentro de la industria farmacéutica (esteroides) y de transformación (agroquímicos, fragancias, saborizantes, entre otras), por su bajo costo e impacto ambiental.

En particular la biotransformación de productos naturales constituye un área de gran interés debido a que es posible potencializar la actividad biológica de una sustancia en condiciones suaves de reacción, con alta *regio*, *quimio* y *estero*-selectividad.

Por otra parte el óxido de cariofileno (**1**) es un sustrato abundante en la naturaleza que presenta características estructurales sumamente interesantes, como es un anillo de cuatro miembros muy tensionado, un anillo de nueve miembros muy oblongo y grupo epóxido que en suma le otorgan una alta reactividad, lo que permite obtener diferentes tipos de esqueletos, los cuales se encuentran muy restringidos en la naturaleza. Por tanto **1** es precursor de nuevos esqueletos químicos.

Con base en lo anterior resulta importante realizar la biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con diferentes microorganismos, para la obtención de sustancias químicamente novedosas, las cuales dependerán de la naturaleza de cada biocatalizador, composición y pH del medio.

Además la información obtenida puede ser utilizada para generar modelos predictivos que permitan concluir acerca de la quimio-selectividad en el óxido de cariofileno (**1**).

5. HIPÓTESIS

La biotransformación por medio de hongos es una herramienta química para funcionalizar sustratos exógenos por medio de diferentes transformaciones químicas –hidroxilación, oxidación, apertura del oxirano, reducción, epoxidación, entre otras–, las cuales utilizan sistemas enzimáticos que presentan una alta *regio*, *quimio* y *estereo*–selectividad con respecto al sustrato.

Entonces por medio de la acción *Saccharomyces cerevisiae*, *Cunninghamella echinulata* y *Beauveria bassiana* sobre el óxido de cariofileno (**1**), se esperan obtener derivados químicos de **1**, los cuales podrían ser similares a los ya descritos en la literatura, o bien sustancias estructuralmente novedosas determinadas por la naturaleza del microorganismo, la composición y el pH del medio de cultivo.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar la biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con tres diferentes microorganismos –*Saccharomyces cerevisiae*, *Cunninghamella echinulata* y *Beauveria bassiana*–, para determinar la posibilidad de obtención de nuevos productos de bioconversión.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 6.2.1. Purificar al óxido de cariofileno (**1**) empleando diferentes técnicas cromatográficas – CCF, CCP, y C-Flash–.
- 6.2.2. Identificar al óxido de cariofileno (**1**) con base en sus propiedades físicas y espectroscópicas –IR, RMN¹H y RMN¹³C–.
- 6.2.3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del óxido de cariofileno (**1**) frente a los microorganismos propuestos –*S. cerevisiae*, *C. echinulata* y *B. bassiana*– por el método de dilución en agar, halo de inhibición y picadura respectivamente.
- 6.2.4. Realizar la factibilidad de la biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con los diferentes biocatalizadores –*S. cerevisiae*, *B. bassiana* y *C. echinulata*– en el medio de cultivo YEPGA o Medio B según corresponda.
- 6.2.5. Realizar la biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (**1**) con los diferentes biocatalizadores –*S. cerevisiae*, *B. bassiana* y *C. echinulata*– en el medio de cultivo YEPGA o Medio B según corresponda.
- 6.2.6. Realizar la reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (**1**) con ácido *m*-cloroperoxibenzoico (AMCPB).
- 6.2.7. Realizar la reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (**1**) con AMCPB/HCl.
- 6.2.8. Aislar, caracterizar e identificar los productos de bioconversión mayoritarios de las diferentes biotransformaciones cuantitativas del óxido de cariofileno (**1**), con los tres microorganismos, así como los productos de reacción mayoritarios.

7. MÉTODOS

7.1. PROCESO DE PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA Y DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS.

La separación y purificación de las materias primas y productos de biotransformación se realizó mediante técnicas cromatográficas usuales: cromatografía en columna flash (CC-Flash) y cromatografía en capa preparativa (CCP). En los procesos de purificación cromatográfica se empleó como fase estacionaria sílica gel (SiO_2), marca Macherey-Nager[®] con tamaño de malla 70/230 y 230/400 ASTM. Los disolventes utilizados como fase móvil fueron: éter de petróleo, CH_2Cl_2 , AcOEt, acetona y MeOH en diferentes proporciones. El análisis por CCP, se efectuó en cromatofolios de sílica gel de marca Merck[®] (20 x 20 cm y 2 mm de espesor, UV₂₅₄), y como revelador: Sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)\text{Ce}(\text{SO}_4)_4]$ al 1% en H_2SO_4 2N. Las cromatografías en capa fina se realizaron en cromatoplacas de la marca Merck[®]. Los puntos de fusión se determinaron con un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros de IR se obtuvieron en un equipo *FT-IR Broker tensor 750*. Los espectros UV fueron obtenidos en un espectrofotómetro *Shimadzu UV160U*. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrofotómetro de *Jeol JMS-AX102A* para la técnica de bombardeo rápido de átomos (FAB⁺). Los espectros de RMN¹H y ¹³C fueron realizados en los espectrofotómetros *Varian Inova 500* (500/125 MHz), *Bruker* (400/100 MHz), *Varian xr-300* (300/75 MHz) y *Bruker ARX300* (300/75 MHz). Los espectros fueron obtenidos en CDCl_3 y $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ como disolvente, utilizando TMS como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico se encuentran en ppm.

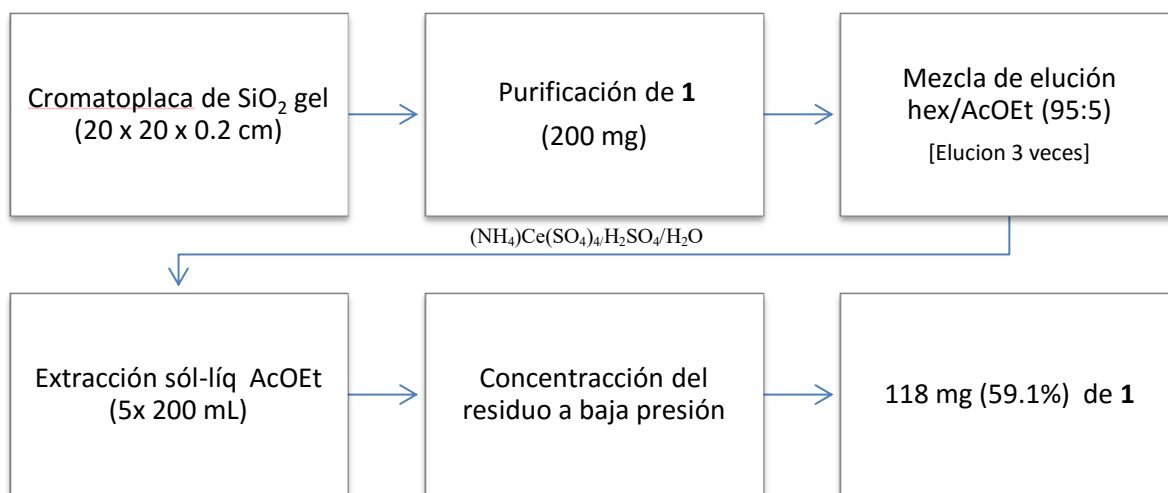
7.1.1. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA PREPARATIVA (CCP) DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO⁴ (1).

Para la purificación de **1** (200 mg) por CCP, se utilizaron 200 mL de una mezcla de elución: n-hex/AcOEt (95:5), tres veces. El producto de interés se obtuvo mediante

⁴ Óxido de cariofileno obtenido de los laboratorios Sigma-Aldrich, con una pureza del 90%.

extracciones con AcOEt (5 x 200 mL) y se concentró a baja presión, obteniéndose 118.2 mg de **1** (59.1 %), como se describe en el **diagrama 1**.

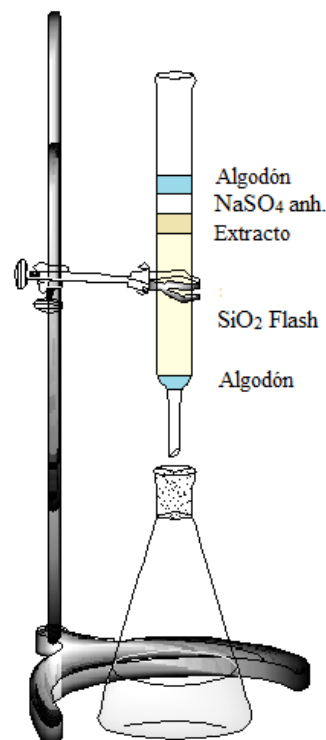
Diagrama 1. Purificación del óxido de cariofileno (**1**) por CCP.



7.1.2. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRFÍA EN COLUMNA FLASH DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (**1**).

Para la purificación de **1** (1.953 g) se utilizó una columna con SiO₂ para CC-Flash⁵, utilizando éter de petróleo (100%) como eluyente [66], donde se obtuvieron 1.643 g (84.1%) del óxido de cariofileno (**1**), como se ilustra la **figura 10**. Las propiedades físicas de **1** fueron: pf: de 59°C y R_f 0.32 [n-hex/CH₂Cl₂ (4:6)] y 0.34 [n-hex/AcOEt (95:5)].

Figura 10. Purificación del óxido de cariofileno (**1**) por CC-Flash.



⁵ Columna de vidrio de (d=0.6 cm, h=6 cm).

IR ν_{max} (espectro 1): 3069, 3013, 2964, 2935, 2862, 1629, 1455, 1369, 1279 y 1232 cm^{-1} .

RMN¹H (espectro 2, 400 MHz, C₅ND₅): δ 4.97 (1H, *d*, J=1.5 Hz, 1H, H-13_a), 4.86 (1H, *d*, J=1.5 Hz, 1H, H-13_b), 2.86 (1H, *dd*, J=12, 4 Hz, H-5), 2.58 (1H, *m*, H-9), 2.21 (1H, *m*, H-6_a), 2.02 (1H, *m*, H-3), 1.75 (1H, *m*, H-1), 1.62 (1H, *m*, H-10), 1.49 (1H, *ddd*, J=16, 8, 4, Hz, H-2), 1.33 (1H, *m*, H-6_b), 1.20 (3H, *s*, CH₃-12), 0.94 (3H, *s*, CH₃-14), 0.94 (3H, *s*, CH₃-15).

RMN¹³C (espectro 3, 100 MHz, C₅ND₅): δ 49.7 (C-1), 27.8 (C-2), 39.9 (C-3), 59.7 (C-4), 63.7 (C-5), 31.2 (C-6), 30.4 (C-7), 152.7 (C-8), 51.3 (C-9), 40.3 (C-10), 34.4 (C-11), 17.7 (C-12), 113.2 (C-13), 22.1 (C-14) y 30.2 (C-15).

7.2. RESIEMBRA DE LOS MICROORGANISMOS PARA LA TÉCNICA DE EVALUACIÓN DE TOXICIDAD –*Cunninghamella echinulata*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Beauveria bassiana*⁶–.

Para cada microorganismo se disolvieron 1.17 g de medio APD en 30 mL de H₂O destilada, los cuales se distribuyeron en 3 matraces Erlenmeyer (50 mL) y se esterilizaron a 120 °C/ 1.5 lb, 15 min. Una vez solidificado el medio se procedió a la inoculación con los tres microorganismos.

7.2.1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DENSA DE ESPORAS Y SOLUCIÓN CELULAR.

Para la obtención de la solución de esporas se agregaron 10 mL de H₂O destilada estéril a los diferentes matraces (3 matraces con medio APD) inoculados con *C. echinulata* (72 h de esporulación) y *B. bassiana* (120 h) y se agitaron. Para la preparación de la solución celular de *S. cerevisiae*, se adicionaron 10 mL de H₂O destilada estéril a los cultivos previos con 96 h de crecimiento en APD.

⁶ Las cepas de referencias fueron adquiridas en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares.

7.3. DETERMINACIÓN DE LA CMI DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (1).

7.3.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE ÓXIDO DE CARIOFILENO (1).

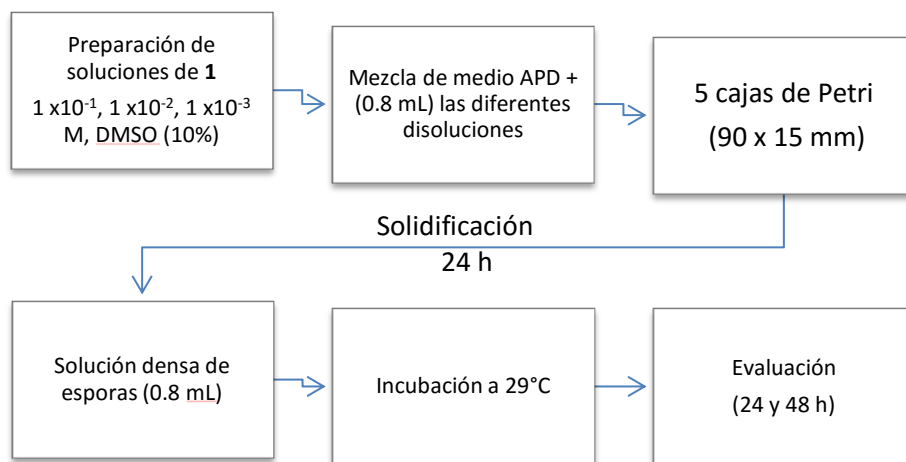
Se disolvió **1** (44.2 mg) en 2 mL de disolvente⁷ para obtener una disolución de concentración 1×10^{-1} M. Las soluciones 1×10^{-2} y 1×10^{-3} M se prepararon por dilución a partir de la solución 1×10^{-1} M, se agregó un blanco del disolvente al 10% en H₂O destilada.

7.3.2. DETERMINACIÓN DE CMI DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (1) FRENTE A *Cunninghamella echinulata* POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR.

Para la determinación del CMI por el método de dilución en agar se usaron cinco cajas Petri (90 x 15 mm). A partir de la solución 1×10^{-1} M de **1**, se tomaron 0.8 mL y se colocaron en una caja Petri y posteriormente se adicionaron 15 mL de APD. El procedimiento descrito se repitió para las concentraciones 1×10^{-2} M, 1×10^{-3} M y el blanco del disolvente.

Una vez solidificado se procedió a inocular las diferentes cajas con 0.8 mL de la solución densa de esporas y se incubaron a 29°C. El crecimiento fúngico se comprobó, después de 24 y 48 horas. Los experimentos se realizaron por triplicado, ver **diagrama 2**, [67].

Diagrama 2. Proceso de la evaluación de toxicidad (CMI) por el método de dilución en agar.



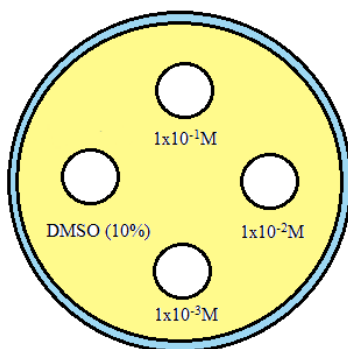
⁷ Disolvente vehículo: DMSO (dimetilsulfóxido) para *C. echinulata* y *S. cerevisiae*. Acetona para *B. bassiana*.

7.3.3. DETERMINACIÓN DE CMI DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (1) FRENTE A *Saccharomyces cerevisiae* POR EL MÉTODO DE HALO DE INHIBICIÓN.

Tres cajas Petri con APD se inocularon con 0.8 mL de solución celular. Una vez sedimentada la solución se colocaron cuatro círculos equidistantes de papel filtro (d = 7 mm) impregnados con las diferentes soluciones de **1** y el blanco del disolvente, como lo sugiere la **figura 11**.

El crecimiento fúngico se comprobó después de 24, 48 y 72 horas, se midió el halo de inhibición por medio de un vernier por cuatro costados diferentes del círculo de papel para obtener valores numéricos. El experimento se realizó por triplicado [68-69].

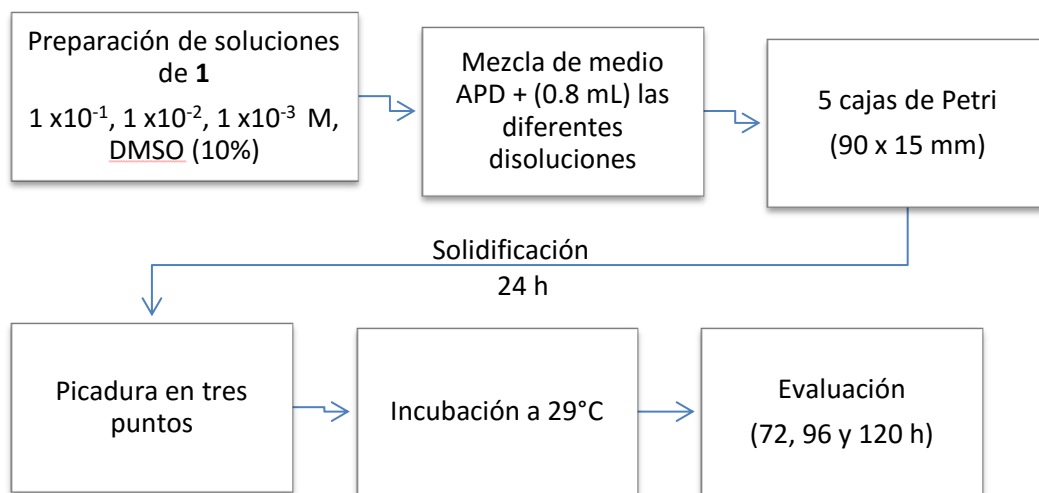
Figura 11. Modelo empleado en la caja Petri para evaluar el método de halo de inhibición.



7.3.4. DETERMINACIÓN DE CMI DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (1) FRENTE A *Beauveria bassiana* POR EL MÉTODO DE PICADURA.

El medio se preparó de acuerdo a lo descrito en el punto 6.3.2. Sin embargo, la inoculación consistió en una ligera picadura, por medio de un asa bacteriológica, en tres diferentes puntos equidistantes. El crecimiento fúngico se comprobó, después de 72, 96 y 120 h, se midió el diámetro de crecimiento por dos extremos diferentes para obtener el diámetro promedio. El experimento se realizó por triplicado [22], ver **diagrama 3**.

Diagrama 3. Proceso de la evaluación de toxicidad (CMI) por el método de picadura.



7.4. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Medio YEPGA: Se mezcló en un matraz Erlenmeyer (1 L), extracto de levadura (1 g), peptona (1 g), extracto de carne (1 g) y glucosa (5 g) por litro de H₂O destilada, el pH el pH registrado fue de 6.9. Posteriormente se esterilizó a 120°C/ 1.5 lb/ 15 min.

Medio de cultivo B: Se mezcló en un matraz Erlenmeyer (1 L), extracto de levadura (5 g), peptona (5 g), KH₂PO₄ (5 g), NaCl (5 g) y glucosa (10 g) por litro de H₂O destilada y se fijó el pH en 7 con 55 mL de una solución de KOH (1 M). Posteriormente se esterilizó a 120°C/ 1.5 lb/ 15 min.

7.5. BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (1).

7.5.1. *RESIEMBRA DE LOS TRES MICROORGANISMOS –Cunninghamella echinulata, Saccharomyces cerevisiae y Beauveria bassiana– EN APD.*

En los procesos de factibilidad de biotransformación la resiembra de los microorganismos se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en el punto 7.2. [45].

7.5.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DENSA DE ESPORAS Y SOLUCIÓN CELULAR.

Para *C. echinulata* y *B. bassiana* se siguió el procedimiento descrito en el punto 7.2.1. Por otra parte *S. cerevisiae* requirió de un cultivo previo de 120 h de crecimiento, del cual se obtuvieron diferentes porciones de agar (sacabocados) y se adicionaron a dos matraces Erlenmeyer (250 mL) con 150 mL de medio YEPGA estéril y se incubaron a 28°C y 130 rpm durante 72 horas.

7.5.3. FACTIBILIDAD DE BIOTRANSFORMACIÓN.

La factibilidad de biotransformación se planteó de acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación de la toxicidad de **1** sobre los diferentes microorganismos. Procediendo de la siguiente manera: cuatro matraces Erlenmeyer de 250 mL (100 mL del medio correspondiente⁸) se inocularon con el microorganismo y se incubaron en un orbital a 28°C/130 rpm. Después de 72 h de incubación se procedió a adicionar **1** (10 a 15 mg) a los cuatro matraces. Además, se incluyeron seis matraces como blancos –hongo (2), sustancia (2) y del medio (2)– con la finalidad de poder descartar aquellos productos que no corresponden a la biotransformación de **1**.

Para determinar la factibilidad de biotransformación se tomaron alícuotas de los diferentes matraces de biotransformación y de los diferentes blancos cada 72 h. A cada alícuota se le realizó una extracción líq-líq con CH₂Cl₂, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro. Los diferentes residuos obtenidos después de catorce días de biotransformación, se aplicaron en CCF para determinar el avance de la biotransformación, ver **figuras 12-14**. Al término del periodo de incubación se procedió a detener el proceso de biotransformación, mediante filtración a vacío. A la fase líquida se le realizaron extracciones líq-líq discontinuas con CH₂Cl₂ (5 x 30 mL), la biomasa fue extraída (sól-líq) con AcOEt. El proceso de biotransformación cualitativa se ilustra en el **diagrama 4**.

⁸ Medio YEPGA para *S. cerevisiae* y *B. bassiana*. Medio C para *C. echinulata*.

Diagrama 4. Proceso general para la biotransformación cualitativa.

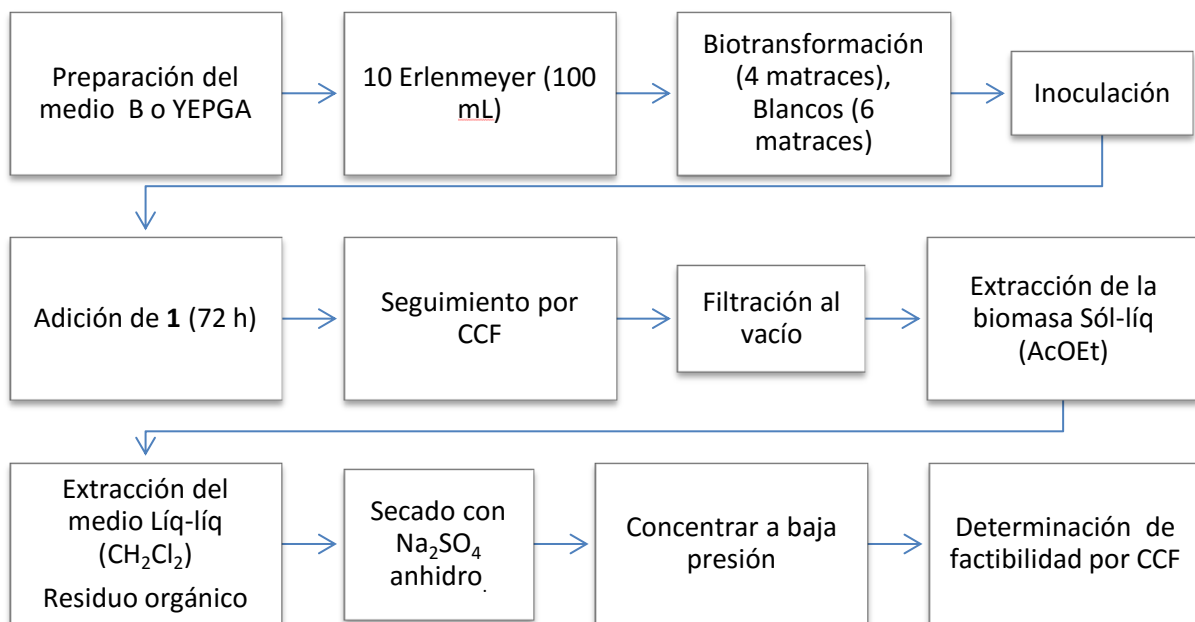
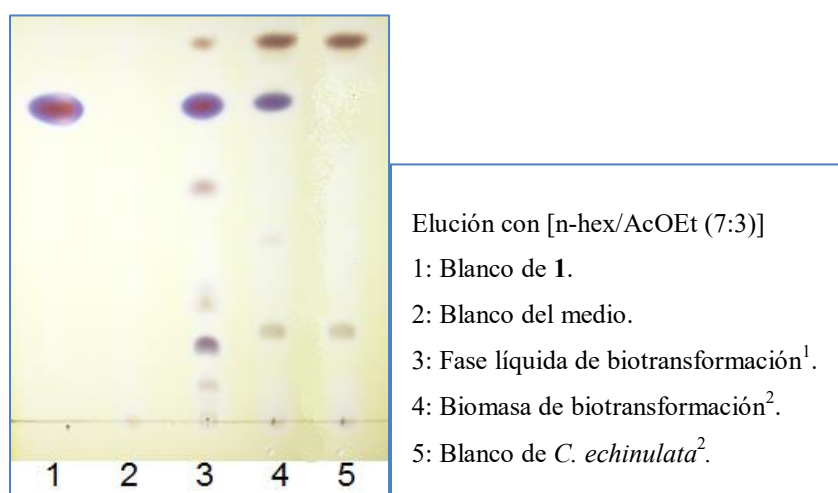


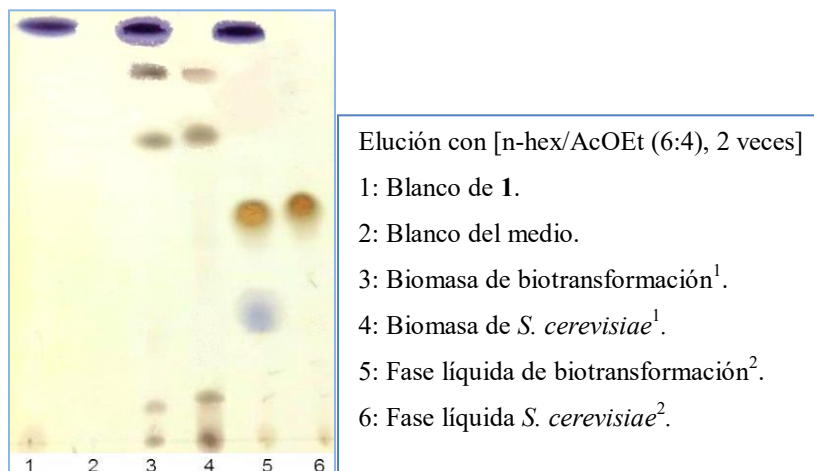
Figura 12. CCF de los productos de biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con *Cunninghamella echinulata*.



¹Residuo orgánico de la extracción del medio de cultivo o fase líquida.

²Residuo de la extracción de la biomasa del microorganismo.

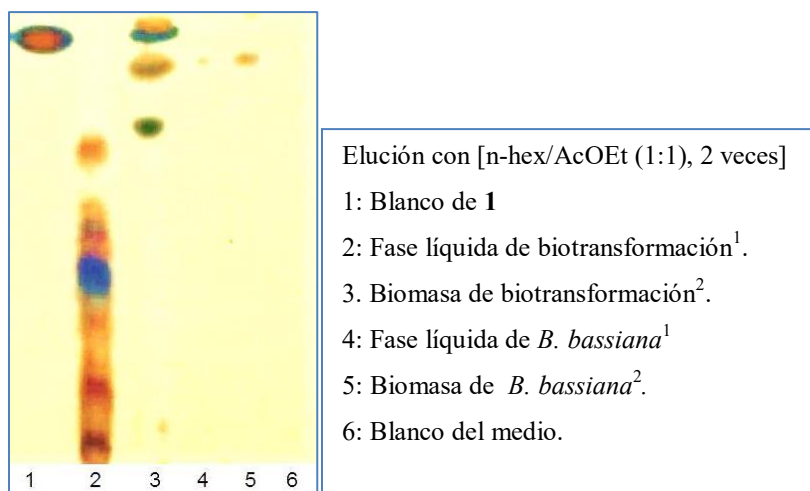
Figura 13. CCF de los productos de biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con *Saccharomyces cerevisiae*.



¹Residuo de la extracción de la biomasa del microorganismo.

²Residuo orgánico de la extracción del medio de cultivo o fase líquida.

Figura 14. CCF de los productos de biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con *Beauveria bassiana*.



¹ Residuo orgánico de la extracción del medio de cultivo o fase líquida.

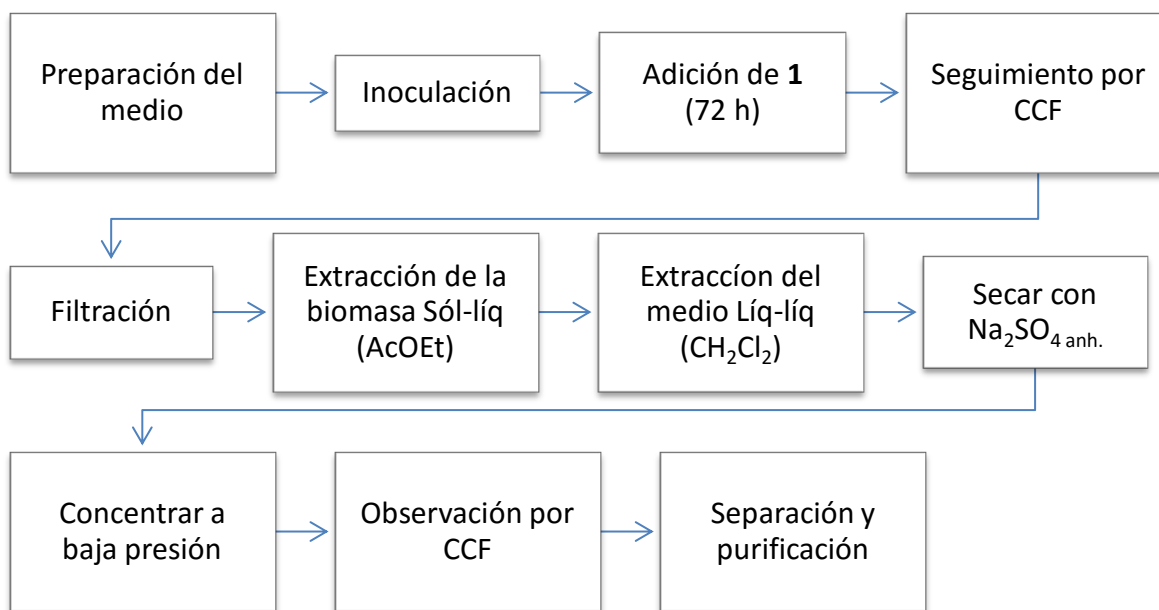
² Residuo de la extracción de la biomasa del microorganismo.

7.5.4. BIOTRANSFORMACIÓN CUANTITATIVA DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (**1**) CON *Cunninghamella echinulata*.

De acuerdo con los resultados de la biotransformación cualitativa de **1** con *C. echinulata*, se procedió de la siguiente manera. Para realizar la biotransformación cuantitativa de **1** se

utilizaron 38 matraces con 100 mL de medio B inoculados con 2 mL de una solución densa de esporas (2×10^6 esporas) de *C. echinulata*. Transcurridos 3 días de incubación se agregó el óxido de cariofileno (380 mg/38 mL de DMSO), el proceso de biotransformación se siguió durante 14 días por CCF [n-hex/AcOEt, (7:3)], Al término del proceso de biotransformación se realizó una filtración a vacío. A la fase líquida se le realizaron extracciones discontinuas líq-líq con CH_2Cl_2 (5 x 30 mL), obteniéndose un residuo café de consistencia aceitosa (1.321 g, 347 %). La biomasa se extrajo (sól-líq) con AcOEt, de donde se obtuvo un residuo café de consistencia aceitosa (402.5 mg, 105.9 %), ver **diagrama 5**.

Diagrama 5. Proceso general para la biotransformación cuantitativa.



De la separación cromatográfica del residuo de la fase líquida se aislaron tres compuestos mayoritarios.

De las fracciones 30-35 obtenidas con n-hex/AcOEt (95:5), se obtuvieron 14.4 mg (3.7 %) de una mezcla de compuestos de aspecto aceitoso, soluble en n-hex, AcOEt y CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. Con base en sus propiedades físicas y espectroscópicas se determinó que el producto mayoritario de dicha mezcla de epímeros es el 8β -diepóxido del cariofileno (35).

R_f 0.73 [CH₂Cl₂/AcOEt (95:5)] y 0.54 [n-hex/AcOEt (8:2)].

IR ν_{\max} (espectro 4): 3692, 3522, 3009, 2932, 2861, 1711, 1602, 1459, 1385, 1237, 1066 y 857 cm⁻¹.

RMN¹H (espectro 5, 400 MHz, C₅ND₅): δ 3.20 (1H, *dd*, J=12, 4 Hz, H-5), 2.62 (1H, *m*, H-13_a), 2.51 (1H, *m*, H-13_b), 2.04 (1H, *m*, H-3_a), 1.80 (1H, *t*, J=8, 8 Hz, H-1), 1.64 (1H, *m*, H-3_b), 1.26 (3H, *s*, CH₃-12), 0.88 (3H, *s*, CH₃-14), 0.84 (3H, *s*, CH₃-15).

RMN¹³C (espectro 6, 100 MHz, C₅ND₅): δ 47.1 (C-1), 27.8 (C-2), 40.4 (C-3), 59.6 (C-4), 62.2 (C-5), 26.0 (C-6), 30.8 (C-7), 58.9 (C-8), 48.3 (C-9), 35.7 (C-10), 33.9 (C-11), 16.9 (C-12), 56.7 (C-13), 22.0 (C-14) y 29.8 (C-15).

De las fracciones 70-81 obtenidas con n-hexano/AcOEt (90:10), se obtuvieron 21.6 mg (5.54%) de un sólido cristalino de pf. 69°C, soluble en n-hex, AcOEt y CH₂Cl₂ a temperatura ambiente. Con base en sus propiedades físicas y espectroscópicas se determinó que dicho compuesto es el (7*R*)-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (**16**).

R_f 0.28 [CH₂Cl₂/AcOEt (95:5)] y 0.26 [n-hex/AcOEt (8:2)].

IR ν_{\max} (espectro 7): 3692, 3604, 3512, 3009, 2931, 2863, 1712, 1460, 1237, 1197, 1106, y 1070 cm⁻¹.

RMN¹H (espectro 8, 400 MHz, C₅ND₅): δ 5.90 (1H, *dd*, J=8, 8 Hz, H-7), 4.35 (1H, *dd*, J=8, 4 Hz, H-5), 3.14 (1H, *m*, H-1), 2.83 (3H, *s*, CH₃-12), 2.49 (3H, *s*, CH₃-14), 2.43 (3H, *s*, CH₃-15).

RMN¹³C (espectro 9, 100 MHz, C₅ND₅): δ 57.8 (C-1), 29.7 (C-2), 40.7 (C-3), 60.9 (C-4), 61.7 (C-5), 42.2 (C-6), 75.1 (C-7), 161.3 (C-8), 47.1 (C-9), 41.6 (C-10), 34.7 (C-11), 18.7 (C-12), 113.0 (C-13), 24.5 (C-14) y 31.9 (C-15).

De las fracciones 83-101 obtenidas con n-hex/AcOEt (9:1), se obtuvieron 42 mg (10.8%) de un aceite, soluble en n-hex, AcOEt, acetona y CH₂Cl₂ a temperatura ambiente. Con base

en sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas se determinó que dicho compuesto es el 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**2**).

R_f 0.47 [n-hex/AcOEt (4:6)] y 0.48 [CH₂Cl₂/AcOEt (1:1)].

IR ν_{max} (espectro 10): 3692, 3626, 3515, 2933, 2864, 1714, 1237, 1197, 1129, 1039, 899 y 862 cm⁻¹.

RMN¹H (espectro 11, 400 MHz, C₅ND₅): δ 5.11 (1H, *dd*, J=1.8, 0.7 Hz, H-13_a), 4.87 (1H, *d*, J=8 Hz, H-13_b), 3.56 (2H, *d*, J=12 Hz, H-15), 2.92 (1H, *dd*, J=11, 4 Hz, H-5), 2.18 (1H, *m*, H-10_a), 2.08 (1H, *m*, H-1), 1.62 (1H, *ddd*, J=8.8, 8.4, 0.4 Hz, H-10_b), 1.21 (3H, *s*, CH₃-12), 1.07 (3H, *s*, CH₃-14).

RMN¹³C (espectro 12, 100 MHz, C₅ND₅): δ 45.1 (C-1), 27.8 (C-2), 30.9 (C-3), 59.7 (C-4), 63.7 (C-5), 30.1 (C-6), 31.1 (C-7), 151.7 (C-8), 48.2 (C-9), 34.9 (C-10), 38.6 (C-11), 17.0 (C-12), 113.1 (C-13), 17.8 (C-14) y 70.8 (C-15).

EM (IE) m/z (% rel.): 256 (1), 250 (9), 221 (4), 205 (11), 202 (10), 161 (20), 147 (29), 121 (38), 79 (84), 67 (40), 43 (41), 93 (100).

7.5.5. BIOTRANSFORMACIÓN CUANTITATIVA DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (**1**) CON *Saccharomyces cerevisiae*.

A veinticuatro matraces con 100 mL de medio YEPGA se les adicionaron 10 mL de una solución celular de *S. cerevisiae*, la cual se había hecho crecer durante 96 h en medio YEPGA. Después de 72 h de incubación se procedió a adicionar **1** (500.9 mg/ 24 mL de acetona). El curso de la biotransformación se siguió cada 72 h por CCF [n-hex/AcOEt (6:4)]. Transcurridos los 14 días de incubación, se procedió a detener el proceso de biotransformación, mediante filtración a vacío utilizando celita como coadyuvante de filtración. El residuo obtenido de la fase líquida fue de color café y consistencia aceitosa (127.2 mg, 25.4 %). De la biomasa se obtuvo un residuo café de consistencia aceitosa (350.6 mg, 70 %), ver **diagrama 5**.

De la separación cromatográfica del residuo obtenido de la fase líquida se aisló un compuesto mayoritario:

De las fracciones 92-99 obtenidas con n-hex/AcOEt (6:4) se obtuvieron 3.7 mg (0.7 %) de un aceite, soluble en AcOEt y acetona a temperatura ambiente. Con base en su análisis espectroscópico se pudo identificar que dicho compuesto no corresponde a un producto de biotransformación del óxido de cariofileno.

$R_f = 0.37$ [AcOEt (100%)] y 0.30 [CH_2Cl_2 /AcOEt/acetona (25:75:5)].

$\text{IR } \nu_{\text{max}}$ (espectro 13): 3614, 3524, 2955, 2933, 1719, 1462, 1367, 1229, 1069 y 1039 cm^{-1} .

7.5.6. BIOTRANSFORMACIÓN CUANTITATIVA DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (1) CON *Beauveria bassiana*.

A dieciocho matraces Erlenmeyer con 100 mL de medio YEPGA se adicionaron 2 mL de una solución densa de esporas (2×10^6 esporas) de *B. bassiana* para incubarse por 72 h a 120 rpm, después de las mismas se agregó **1** (400 mg) disuelto en acetona (20 mL) El proceso de biotransformación se siguió por medio de CCF durante 9 días, al final de los mismos se procedió a detener el proceso de biotransformación. Obteniéndose un residuo café de consistencia aceitosa (309.4 mg, 77.3%). De la biomasa se obtuvo un residuo café de consistencia aceitosa (380.4 mg, 95.1%), ver **diagrama 5**.

De la separación cromatográfica del residuo obtenido de la fase líquida se aislaron y purificaron dos compuestos mayoritarios.

De las fracciones 62-81 obtenidas con n-hex/AcOEt (9:1), se obtuvieron 6.3 mg (1.6 %) de un aceite, soluble en n-hex, AcOEt, acetona y CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. Con base en sus propiedades físicas, análisis espectroscópico y espectrométrico (espectros 10 al 12) se identificó a dicho compuesto como el 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**2**).

De las fracciones 89-90 obtenidas con n-hex/AcOEt (8:2), se obtuvieron 6.1 mg (1.5 %) de un sólido de pf $115-117^\circ\text{C}$, soluble en AcOEt, acetona y CH_2Cl_2 , a temperatura ambiente.

Con base en sus propiedades físicas y espectroscópicas se identificó que se trataba del compuesto 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (**19**).

R_f 0.48 [CH₂Cl₂/MeOH (9:1)] y 0.64 [AcOEt/acetona (8:2)].

IR ν_{\max} (espectro 14): 3557, 3481, 3449, 3381, 3286, 2927, 1455, 1383, 1034 y 854 cm⁻¹.

RMN¹H (espectro 15, 400 MHz, C₅ND₅): δ 3.76 (1H, *m*, H-5), 3.72 (1H, *d*, J=10 Hz, H-13_a), 3.64 (1H, *d*, J=10 Hz, H-13_b), 2.59 (1H, *m*, H-6_a), 2.59 (1H, *m*, H-7_a), 2.25 (1H, *m*, H-1), 2.26 (1H, *m*, H-9), 2.09 (1H, *m*, H-3_b), 2.09 (1H, *m*, H-10_a), 1.69 (1H, *m*, H-7_b), 1.69 (1H, *m*, H-10_b), 1.60 (1H, *m*, H-2_b), 1.47 (1H, *m*, H-2_a), 1.47 (1H, *m*, H-6_b), 1.35 (1H, *s*, CH₃-12), 1.16 (1H, *ddd*, J=12,0, 12.0, 4.0 Hz, H-3_a), 0.97 (1H, *m*, CH₃-14), 0.94 (1H, *s*, CH₃-15).

RMN¹³C (espectro 16, 100 MHz, C₅ND₅): δ 46.2 (C-1), 28.6 (C-2), 41.3 (C-3), 58.9 (C-4), 61.3 (C-5), 25.7 (C-6), 33.7 (C-7), 74.0 (C-8), 49.8 (C-9), 35.6 (C-10), 33.2 (C-11), 16.5 (C-12), 69.8 (C-13), 22.7 (C-14) y 29.5 (C-15).

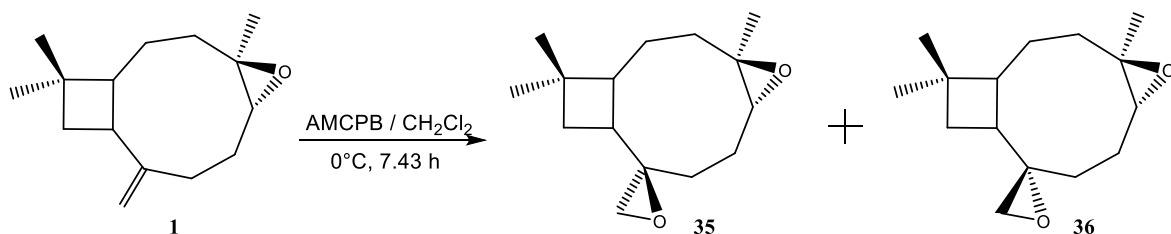
EM (IE) m/z (% rel.): 250 (2), 237 (7), 223 (69), 205 (37), 187 (32), 167 (26), 149 (59), 135 (81), 111 (64), 95 (93), 107 (100).

7.6. REACCIÓN DE EPOXIDACIÓN DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (**1**) CON AMCPB.

Se disolvieron 100.2 mg de óxido de cariofileno (**1**) en 15 mL de CH₂Cl₂ en agitación constante, la mezcla se introdujo en un baño de hielo para posteriormente adicionarle 150 mg de AMCPB lentamente. El curso de la reacción se siguió por CCF [n-hex/AcOEt (8:2)]. Transcurridas 7.43 h, se procedió a dar por concluida la reacción adicionando 5 mL de una solución saturada de Na₂SO₃ para transformar el exceso de AMCPB a ácido *m*-clorobenzoico. La fase orgánica se trató de manera selectiva con una solución saturada de Na₂SO₃ (5 x 5 mL), seguido de una solución sobresaturada de NaHCO₃ (5 x 5 mL), finalmente se lavó con H₂O (3 x 5 mL). La fase CH₂Cl₂ se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a baja presión, obteniéndose 107.7 mg de un residuo café. De la purificación del

producto de reacción por medio de CC-Flash se obtuvo 80.6 mg (74.8 %) de la mezcla de epímeros del diepóxido del cariofileno (**35** y **36**), ver **figura 15**.

Figura 15. Reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (**1**) con AMCPB.



IR ν_{max} (espectro 17): 2956, 2863, 1457, 1384, 1369, 1225, 1204, 1066, 947 y 893 cm^{-1} .

RMN¹H (espectro 18, 400 MHz, C₅ND₅): mezcla de epímeros.

RMN¹³C (espectro 19, 400 MHz, C₅ND₅): δ 47.1 (C-1), 27.8 (C-2), 40.4 (C-3), 58.9 (C-4), 62.6 (C-5), 25.9 (C-6), 30.8 (C-7), 59.2 (C-8), 47.6 (C-9), 35.7 (C-10), 33.9 (C-11), 16.8 (C-12), 49.9 (C-13), 22.0 (C-14) y 29.8 (C-15).

EM (IE) m/z (% rel.): 473 (17.9), 455 (23.6), 443 (10), 238 (15.7), 237 (100), 219 (63.7), 201 (25.7).

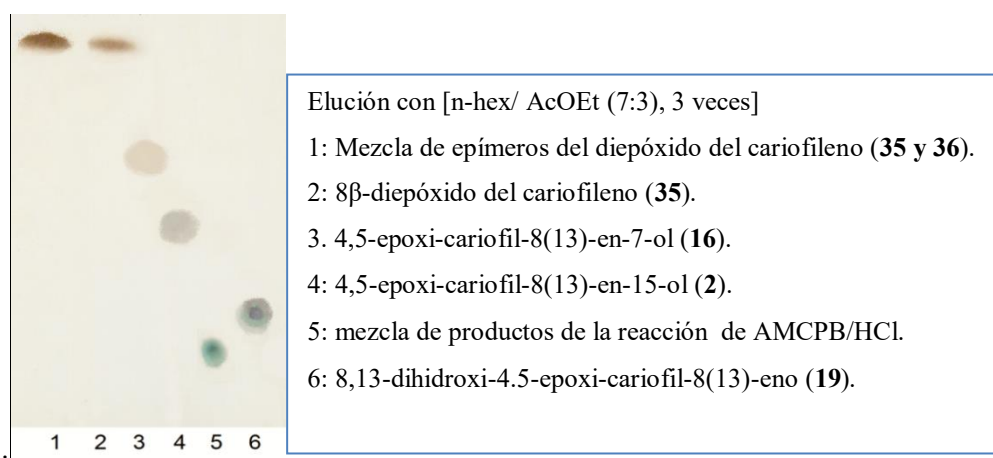
7.7. REACCIÓN DE EPOXIDACIÓN DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (**1**) EN MEDIO ÁCIDO.

Se disolvieron 150.6 mg de óxido de cariofileno (**1**) en 1 mL de CH₂Cl₂ en agitación constante, la mezcla se introdujo en un baño de hielo y se le adicionaron 2 ml de CH₂Cl₂ acidulado con dos gotas de HCl (conc.). Posteriormente, se agregó lentamente el AMCPB (253 mg) en la mínima cantidad de CH₂Cl₂. El curso de la reacción se siguió por CCF [n-hex/AcOEt (8:2)]. Transcurridas 3.10 h, se procedió a detener el curso de la reacción de acuerdo a lo descrito en el punto 7.6. Obteniéndose un residuo café de (104.5 mg, 69.6%).

De las fracciones 100-104 obtenidas con n-hex/AcOEt (8:2), de la separación cromatográfica del residuo de la reacción, se obtuvieron 7 mg (4.6 %) de una sustancia de consistencia aceitosa, soluble en AcOEt y acetona a temperatura ambiente. Con base en sus espectros de RMN¹H RMN¹³C se llegó a la conclusión que se trataba de una mezcla de productos, la cual por el rendimiento obtenido no pudo ser separada, ni purificada por las técnicas convencionales de laboratorio.

Finalmente, en la **figura 16** se muestran los diferentes derivados de biotransformación y productos de reacción del óxido de cariofileno (**1**).

Figura 16. CCF de los diferentes productos obtenidos de las biotransformaciones y de la reacción química del óxido de cariofileno (**1**)



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (1).

Se logró purificar 1.761 g (81.8 %) de óxido de cariofileno (1) por CC-Flash y CCP. La identificación de 1 se realizó por su punto de fusión 59°C y con valores de R_f 0.32 en [n-hex/ CH_2Cl_2 (4:6)] y 0.34 [n-hex/AcoEt (95:5)]. En su espectro de IR se observan las bandas características de los carbonos C_{sp^2} [$\nu(3069$ y $3013)$] y C_{sp^3} [$\nu(2954)$], ver espectro 1.

En su espectro de RMN^{13}C y por desacoplamiento total se observan 15 señales que corresponden a los diferentes carbonos presentes en el esqueleto de 1. En la **figura 17**, se dan a conocer los desplazamientos químicos de los carbonos funcionalizados en dicho esqueleto. La multiplicidad mostrada por los diferentes carbonos, se hizo con base en su espectro DEPT, ver espectro 2, donde se observan 3 CH_3 , 6 CH_2 y 3 CH . El δ_{C} 152.7 el de δ_{C} 59.7 y el δ_{C} 34.4 corresponden a los carbonos C-8, C-4 y C-11 respectivamente, ver **tabla 3**, la señal en δ_{C} 63.7 corresponde al C-5 y el δ_{C} 59.7 se asigna al C-4, los cuales forman parte del anillo del oxirano. Las señales en δ_{C} 30.2, δ_{C} 22.1 y δ_{C} 17.7, corresponden a los CH_3 -15, CH_3 -14 y CH_3 -12 respectivamente.

Figura 17. Desplazamientos químicos de RMN^1H y ^{13}C de óxido de cariofileno (1).

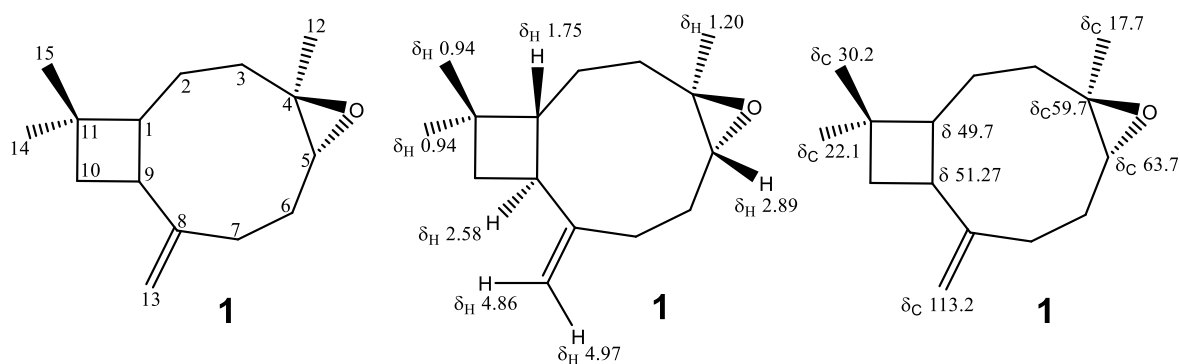







Tabla 3. Desplazamientos químicos (δ) de RMN¹³C (100 MHz, C₅D₅N, TMS) para el óxido de cariofileno (**1**).

C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
δ	49.7	27.8	39.9	59.7	63.7	31.15	30.4	152.7	51.27	40.29	34.4	17.7	113.2	22.1	30.2
DEPT	CH	CH ₂	CH ₂	C	CH	CH ₂	CH ₂	C	CH	CH ₂	C	CH ₃	CH ₂	CH ₃	CH ₃

8.2. DETERMINACIÓN DE CMI DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (**1**) FRENTE A *Cunninghamella echinulata*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Beauveria bassiana*.

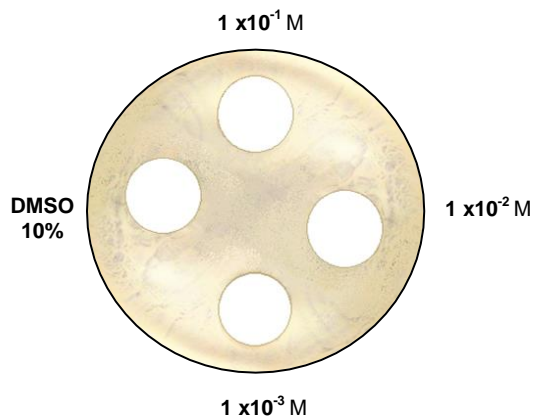
En la determinación de la CMI **1** frente a *C. echinulata*, el cual se estableció mediante el método de dilución en agar a 24 y 48 h, como se ilustra en la **tabla 4**, se observó que a partir de la concentración de 1×10^{-2} M, existe inhibición en el crecimiento de dicho hongo.

Tabla 4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar con *Cunninghamella echinulata*.

Concentración				
<i>C. echinulata</i> (Blanco)	1×10^{-1} M	1×10^{-2} M	1×10^{-3} M	DMSO (Blanco)
				

En la evaluación de la CMI con *S. cerevisiae* no se observó inhibición en el crecimiento de dicha levadura en ninguna de las concentraciones ensayadas (1×10^{-1} a 1×10^{-3} M) por el método de halo de inhibición, como se muestra en la **figura 18**.

Figura 18. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de halo de inhibición del óxido de cariofileno (**1**) para *Saccharomyces cerevisiae*.



Con respecto a la determinación del CMI de **1** en *B. bassiana*, se observó que a concentración de $1 \times 10^{-1} \text{M}$, hubo inhibición en el crecimiento de *B. bassiana* mediante el método de picadura a 120 h, como se ilustra en la **tabla 5**.

Tabla 5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de picadura con *Beauveria bassiana*.

Concentración				
<i>B. bassiana</i> (Blanco)	$1 \times 10^{-1} \text{ M}$	$1 \times 10^{-2} \text{ M}$	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	Acetona (Blanco)

8.3. DETERMINACIÓN DE LA FACTIBILIDAD DE BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (**1**) CON DIFERENTES MICRORGANISMOS.

Para determinar la factibilidad de biotransformación del compuesto **1** con los diferentes hongos ensayados, se emplearon de 10 a 15 mg de **1** disueltos en la mínima cantidad de DMSO o acetona, dicha solución se agregó después de haber alcanzado la máxima cantidad

de biomasa, la cual depende del microorganismo en particular. El curso de la reacción se siguió por CCF, empleando como mezcla de eluyentes n-hex/AcOEt de polaridad creciente. Asimismo se emplearon como referencia los blancos correspondientes – al medio de cultivo, al microorganismo y al óxido de cariofileno–.

En la **tabla 6** se muestran los resultados de factibilidad con los diferentes microorganismos, sugiriendo que la biotransformación de **1** es posible con todos los microorganismos ensayados. En la figuras 19 a 21, se muestran las CCF que indican de manera cualitativa que es posible la biotransformación de **1** con los tres microorganismos propuestos.

Tabla 6. Factibilidad de biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con diferentes microorganismos.

Microorganismo	Medio	Crecimiento (h)	Factibilidad
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 1604) ⁴	YEPGA ¹	48	+++ ³
<i>Curvularia lunata</i> (CDBB-H-261) ⁴	YEPGA ¹	72	+++ ³
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ⁴	YEPGA ¹	72	+++ ³
<i>Cunninghamella echinulata</i> (CDBB-H-255)	Medio B ²	72	+++ ³
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CDBB-L-838)	YEPGA ¹	72	+++ ³
<i>Beauveria bassiana</i> (CDBB-H-987)	YEPGA ¹	72	+++ ³

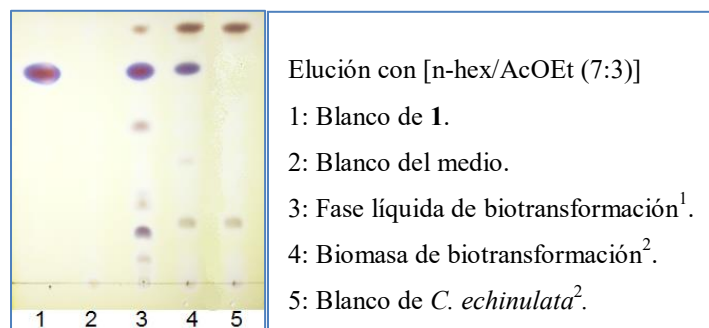
¹YEPGA: Extracto de levadura, extracto de carne, peptona, glucosa, en 1L de H₂O, pH= 6.9.

²Medio B: Extracto de levadura, peptona, KH₂PO₄, glucosa, NaCl, en 1L de H₂O, pH= 7.

³Biotransformación cualitativa, al menos dos productos diferentes al óxido de cariofileno se observaron.

⁴Los resultados de factibilidad de biotransformación se derivan de proyectos anteriores.

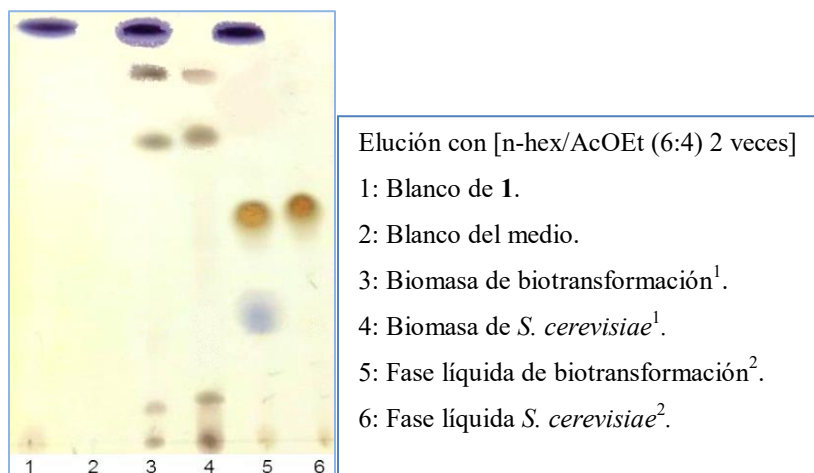
Figura 19. CCF de los productos de biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con *Cunninghamella echinulata*.



¹Residuo orgánico de la extracción del medio de cultivo o fase líquida.

²Residuo de la extracción de la biomasa del microorganismo.

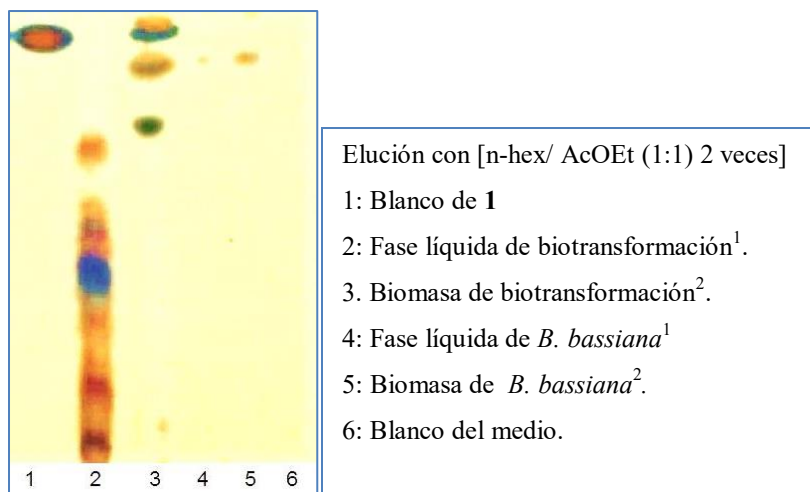
Figura 20. CCF de los productos de biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con *Saccharomyces cerevisiae*.



¹Residuo de la extracción de la biomasa del microorganismo.

²Residuo orgánico de la extracción del medio de cultivo o fase líquida.

Figura 21. CCF de los productos de biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con *Beauveria bassiana*.



¹ Residuo orgánico de la extracción del medio de cultivo o fase líquida.

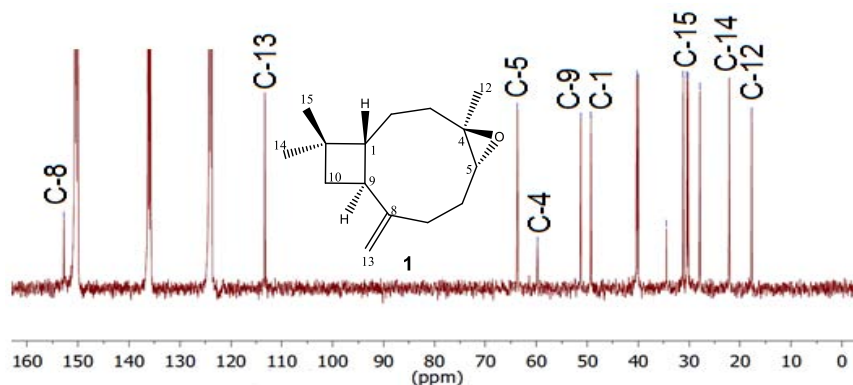
² Residuo de la extracción de la biomasa del microorganismo.

8.4. BIOTRANSFORMACIÓN CUANTITATIVA DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (**1**) CON *Cunninghamella echinulata*.

De la biotransformación de **1** con *C. echinulata* se aislaron tres productos de biotransformación.

De las fracciones 30-35 [n-hex/AcOEt (95:5)], se obtuvo una mezcla amarilla aceitosa conformada por dos compuestos. Al comparar los espectros de IR (espectro 4) de la mezcla en discusión con el espectro del óxido de cariofileno (**1**) se observa la ausencia de la banda correspondiente a la $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H})$. En su espectro de RMN¹³C en desacoplamiento total, ver **figura 22b**, se confirma que la doble ligadura *exocíclica* $\Delta^{8,13}$ fue funcionalizada en el proceso de biotransformación con *C. echinulata*. En su espectro DEPT-135 se observan 12 carbonos unidos a hidrógeno –3CH₃, 6CH₂ y 3CH– **figura 23b**, mientras que en el desacoplamiento total (espectro 6) se observan 15 átomos de carbono, los cuales corresponden a los carbonos cuaternarios restantes –C-4, C-11 y C-8–. Asimismo, se observan los cambios de hibridación –sp² a sp³– de los C-8 (δ_{C} 58.9) y C-13 (δ_{C} 56.7), ver **figura 22a y 22b y tabla 7**.

Figura 22. Espectro de RMN¹³C (desacoplamiento total) del óxido de cariofileno (**1**) y el 8 β -diepóxido de cariofileno (**35**).
a) RMN¹³C de **1**



b) RMN¹³C de **35**

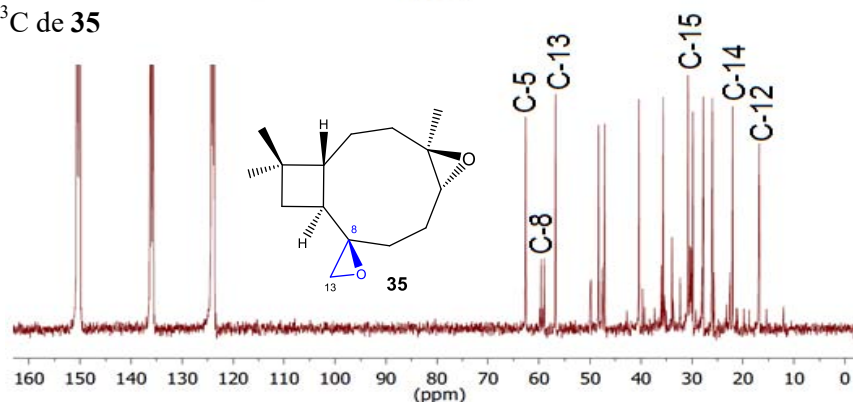
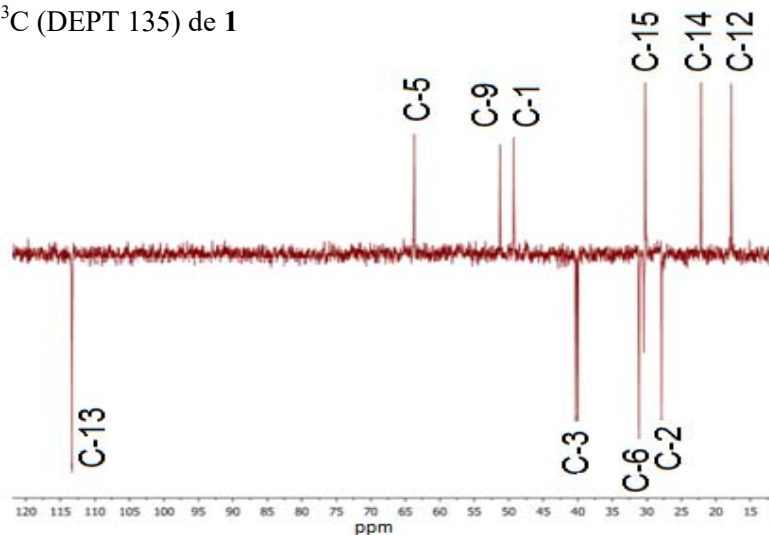
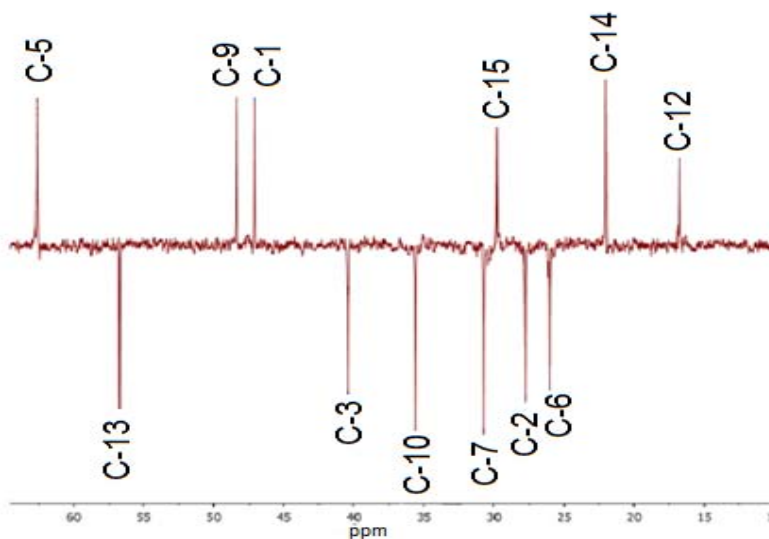


Figura 23. Espectros de RMN¹³C (DEPT 135) del óxido de cariofileno (**1**) y el 8β-diepóxido de cariofileno (**35**).

a) RMN¹³C (DEPT 135) de **1**



b) RMN¹³C (DEPT 135) de **35**



Con base en la técnica HSQC se correlacionaron los átomos de carbono e hidrógeno para el compuesto **35**: C-5 (δ_C 62.6) con H-5 (δ_H 3.20), C-13 (δ_C 56.7) con H-13_a (δ_H 2.62) y H-13_b (δ_H 2.51), C-1 (δ_C 47.1) con H-1 (δ_H 1.80), C-3 (δ_C 40.4) H-3_a (δ_H 2.05) y H-3_b (δ_H 1.05), C-14 (δ_C 29.8) con H-14 (δ_H 0.86), C-15 (δ_C 22.0) con H-15 (δ_H 0.88), C-12 (δ_C 16.8) con H-12 (δ_H 1.26), como se observa en la **figura 24**. Con base en lo anterior y de acuerdo a los desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN¹³C en desacoplamiento total, se sugirió la epoxidación en la doble ligadura *exocíclica* de **1** con *C. echinulata*.

Figura 24. Experimento HSQC del 8 β -diepóxido del cariofileno (**35**).

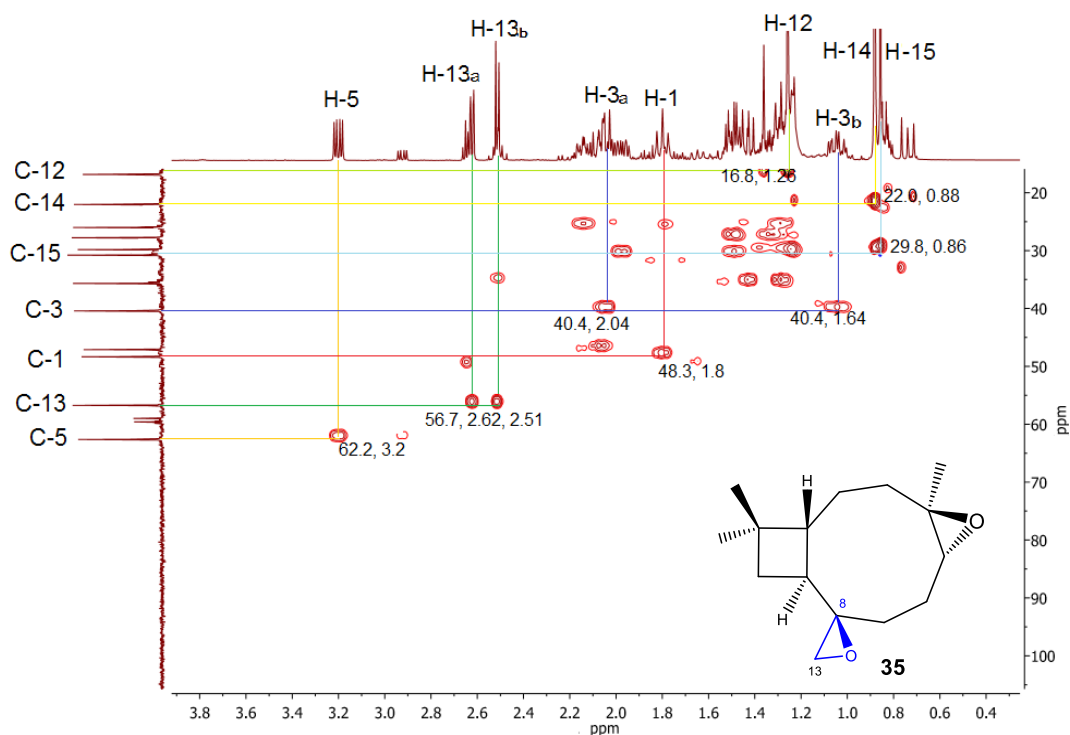
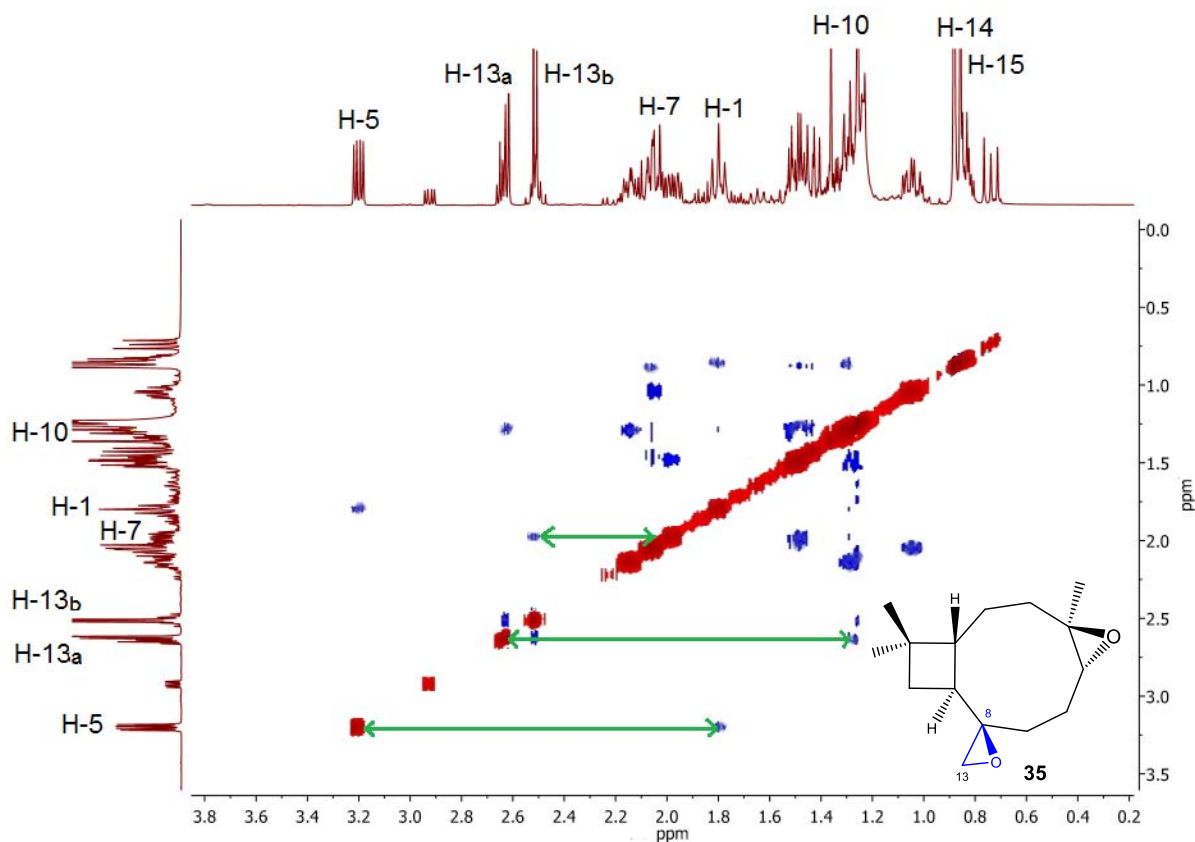


Tabla 7. Datos de desplazamientos químicos en RMN¹³C para los epímeros del diepóxido de cariofileno (**35** y **36**) [43].

C	Compuesto					
	β -35 (CDCl ₃)		α -36 (CDCl ₃)		β -35 (C ₅ D ₅ N)	
	δ_c	DEPT	δ_c	DEPT	δ_c	DEPT
1	47.9	CH	49.3	CH	48.3	CH
2	27.5	CH ₂	27.3	CH ₂	27.8	CH ₂
3	40.3	CH ₂	39.5	CH ₂	40.4	CH ₂
4	58.4	C	58.9	C	59.6	C
5	61.8	CH	62.6	CH	62.6	CH
6	25.5	CH ₂	24.8	CH ₂	26.0	CH ₂
7	30.4	CH ₂	31.3	CH ₂	30.8	CH ₂
8	57.9	C	59.8	C	58.9	C
9	46.8	CH	47.1	CH	47.1	CH
10	35.1	CH ₂	35.5	CH ₂	35.7	CH ₂
11	33.3	C	33.4	C	33.9	C
12	16.4	CH ₃	16.2	CH ₃	16.8	CH ₃
13	56.0	CH ₂	50.1	CH ₂	56.7	CH ₂
14	21.6	CH ₃	21.9	CH ₃	22.0	CH ₃
15	29.4	CH ₃	29.9	CH ₃	29.8	CH ₃

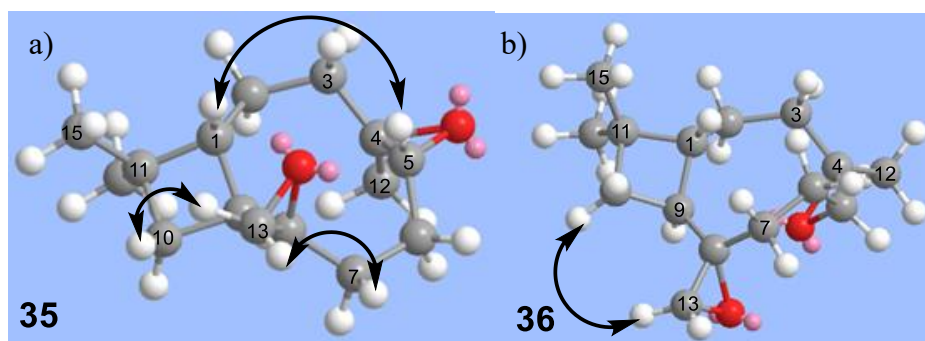
De acuerdo a lo anterior se llegó a la conclusión que la mezcla obtenida estaba conformada por la mezcla de epímeros el β -diepóxido de cariofileno (**35**) y del α -diepóxido de cariofileno (**36**) en una proporción 6:1, indicando una selectividad hacia el epímero β . En el espectro de RMN¹H, aplicando la técnica del NOESY, se observan las interacciones espaciales del H-13_a (δ_H 2.62) con el H $_{\beta}$ -10 (δ_H 1.43), del H-13_b (δ_H 2.51) con el H $_{\beta}$ -7 (δ_H 1.98) y la interacción de H-1 (δ_H 1.80) y el H-5 (δ_H 3.20), ver **figura 25**. Al determinar los conformeros de menor energía para el epímero β (136.45 kcal/mol)⁹, ver **figura 26a**, y el α (136.45 kcal/mol), ver **figura 26b**. Se observan en ambos conformeros las interacciones del H-13_a con H-10, mientras que la interacción de H-13_b con H $_{\beta}$ -7 y la interacción de H-1 con H-5 sólo se observa en el epímero β , lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por la técnica del NOESY. La ausencia de tales interacciones en epímero α , es debido al alejamiento que hay entre dichos protones como consecuencia de la conformación adoptada por el conformero α .

Figura 25. Experimento de NOESY para el 8 β -diepóxido de cariofileno (**35**).



⁹ ChemDraw (Perkin Elmer). MM2. Minimize energy.

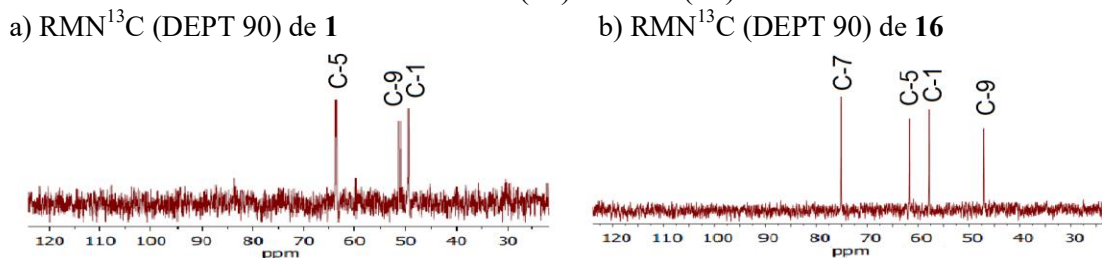
Figura 26. Interacciones espaciales en los epímeros del diepóxido de cariofileno (**35** y **36**).



De las fracciones 70-81 [n-hexano/AcOEt (90:10)], se aisló un sólido cristalino de pf. 69°C. En su espectro de IR (espectro 7) se observan las bandas correspondientes a la $\nu(\text{OH})$ 3512 cm^{-1} y la $\nu(\text{C-H})$ en 3009 y 2931, las cuales pueden asociarse con las vibraciones $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ y $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ respectivamente. Con base en su espectro de RMN^{13}C (espectro 9) por desacoplamiento total se observa que el sólido aislado de la biotransformación de **1** con *C. echinulata* es una mezcla de compuestos en proporción 4:1. El componente mayoritario fue identificado como el (7*R*)-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (**16**), a dicho compuesto le corresponde una fórmula molecular de $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ con un peso molecular de 236.18 g/mol.

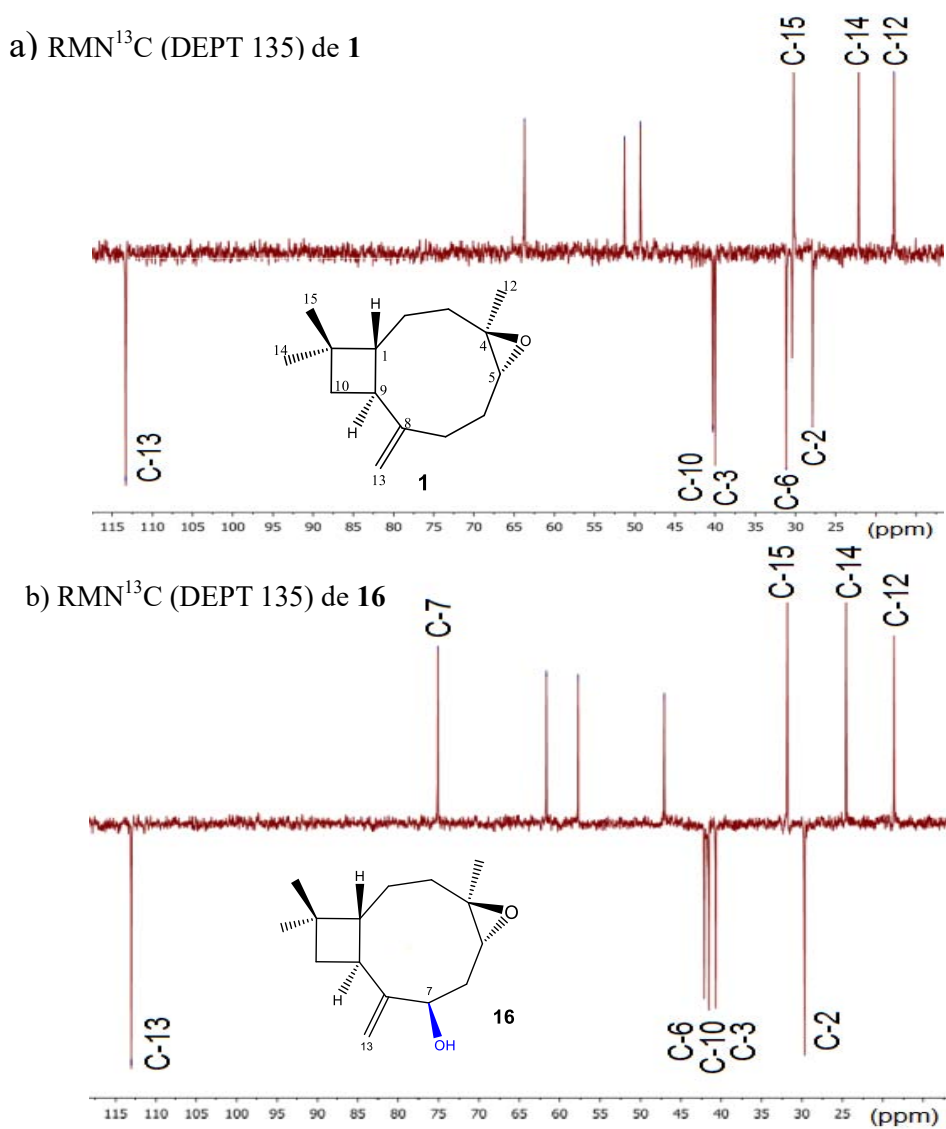
En su espectro de RMN^{13}C (espectro 9) por desacoplamiento total se observan las señales de los átomos de carbono del óxido de cariofileno (**1**): C-8 (δ_{C} 161.3), C-13 (δ_{C} 113.0), C-5 (δ_{C} 61.7), C-4 (δ_{C} 60.9), C-15 (δ_{C} 31.9), C-14 (δ_{C} 24.5), C-12 (δ_{C} 18.7). Al comparar los espectros de RMN^{13}C por la técnica del DEPT 90, para la sustancia **1** y **16**, se observa que un metileno (CH_2) se transformó a un metino (CH), como se muestra en la **figura 27a** y **27b**, lo cual sugiere que probablemente uno de los átomos de carbono de las posiciones: C-2, C-3, C-6 o C-7 fue funcionalizado por *C. echinulata*.

Figura 27. Espectros de RMN^{13}C (DEPT 90) del óxido de cariofileno (**1**) y el 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (**16**).



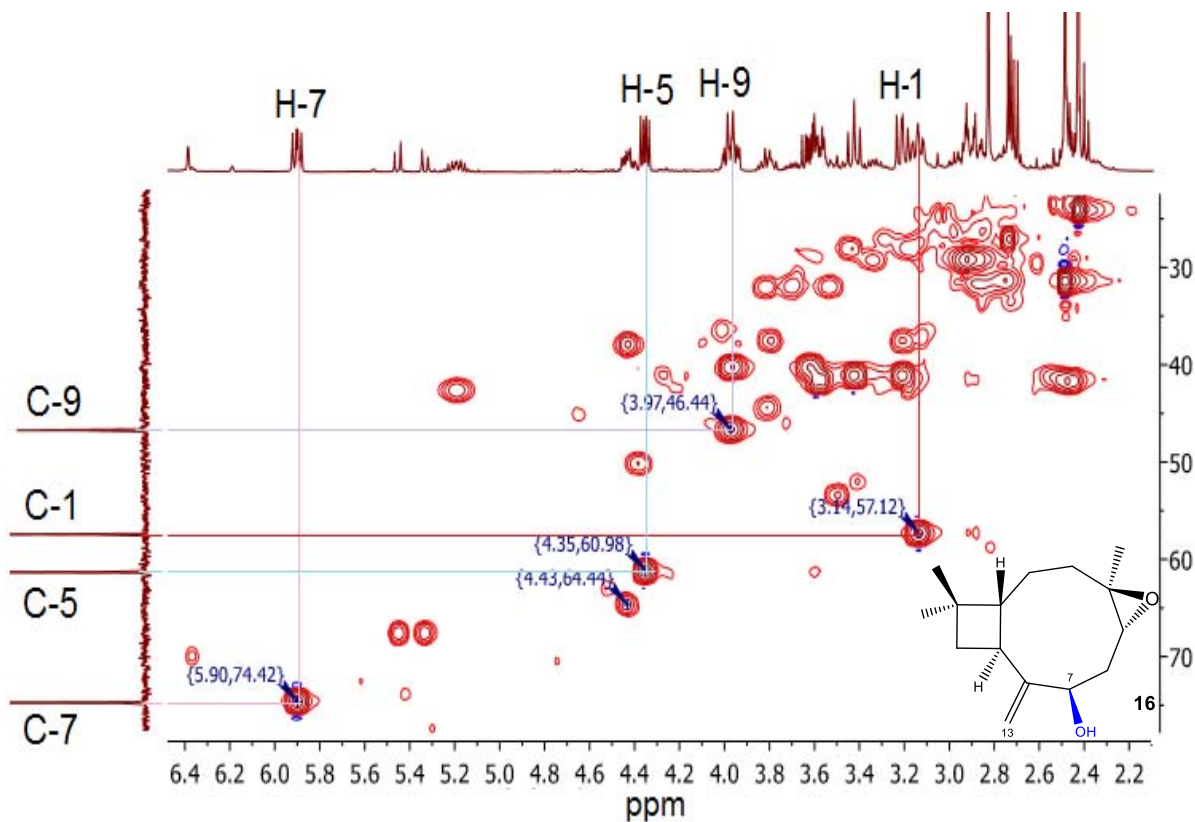
Posteriormente, comparando los espectros de RMN¹³C por la técnica del DEPT 135 para la sustancia **1** y **16**, como se muestra en la **figura 28a** y **28b**, donde los desplazamientos químicos para los C-6 y C-7 son los únicos afectados respecto a los desplazamientos del óxido de cariofileno, finalmente en el espectro de RMN¹H una señal con una multiplicidad de *dd* y un δ_H 5.90 (H-7), característico de hidrógenos vinílicos, se puede afirmar que *C. echinulata* realizó una hidroxilación en el C-7 (δ_C 74.4).

Figura 28. Espectros de RMN¹³C (DEPT 135) del óxido de cariofileno (**1**) y del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (**16**).



En la **figura 29** se muestra el experimento HSQC que sugiere la correlación inmediata C-H, donde el C-7 (δ_C 74.4) correlaciona con H-7 (δ_H 5.90), C-5 (δ_C 60.9) con H-5 (δ_H 4.35), C-1 (δ_C 57.1) con H-1 (δ_H 3.14) y C-9 (δ_C 46.4) con H-9 (δ_H 3.97).

Figura 29. Experimento HSQC del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (**16**).



Con base en lo anteriormente descrito, la literatura química especializada [42, 43] y de acuerdo a las correlaciones espaciales mostradas en el espectro del NOESY, ver **figura 30**, donde se observan las interacciones del H-7 (δ_H 5.90) con H-9 (δ_H 3.99) y el H-12 (δ_H 2.83); se puede afirmar que la sustancia aislada es el (7*R*)-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (**16**) cuya conformación más estable (86.9 kcal/mol) es la mostrada en la **figura 31**.

Figura 30. Experimento NOESY del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (**16**).

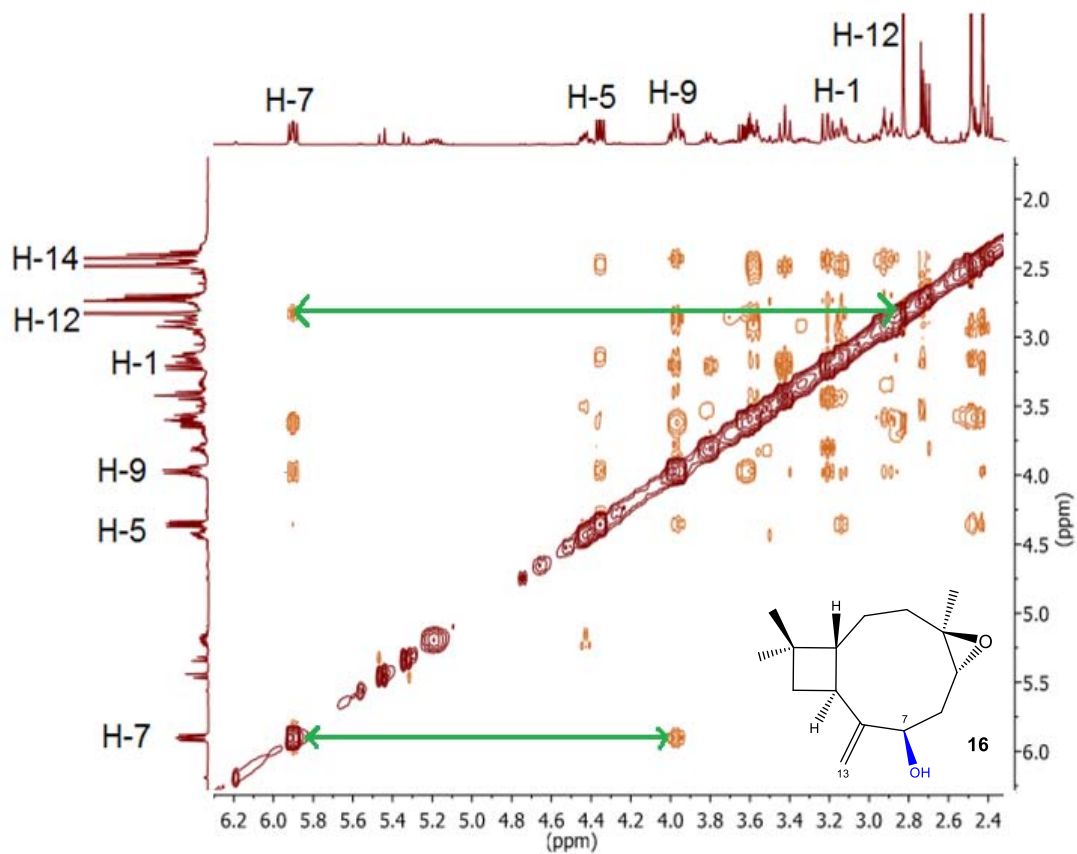
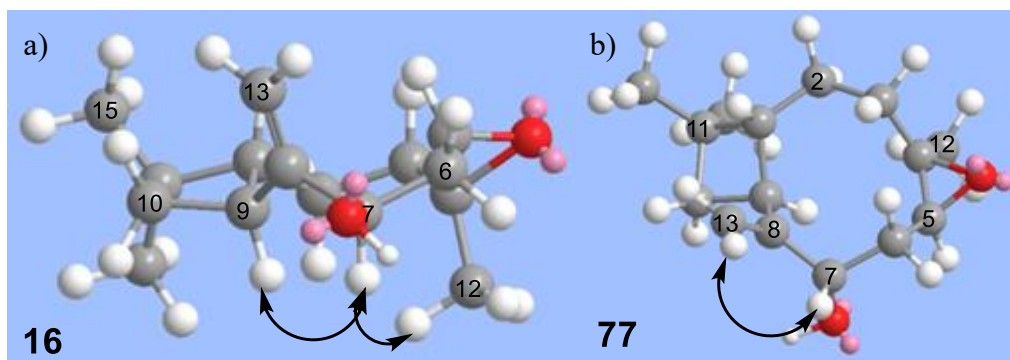


Figura 31. Orientación relativa del H-7 en los compuestos (*7R*)-4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-7-ol (**16**) y (*7S*)-4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-7-ol (**77**).



De las fracciones 83-101 [n-hex/AcOEt (9:1)], se aisló un aceite de color amarillo en cuyo espectro de IR (espectro 10) se observan las bandas correspondientes a la $\nu(\text{OH})$ 3515 cm^{-1} y las $\nu(\text{C-H})$ en 3067 y 2933 correspondientes a $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ y $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ respectivamente. En su espectro de RMN ^{13}C (espectro 12), se observan dos señales correspondientes a carbonos

con hibridación C_{sp^2} δ_C 153.3 (C-8) y 113.4 (C-13), lo cual sugiere que la doble ligadura exocíclica $\Delta^{8,13}$ presente en el compuesto **1** no fue funcionalizada por dicho hongo, ver **figura 32**. Por lo tanto, los desplazamientos químicos en δ_H 5.02 (1H, *m*) y δ_H 4.89 (1H, *dd*, $J=1.5, 0.7$ Hz) corresponden a los hidrógenos vinílico H-13_a y H-13_b respectivamente, los cuales correlacionan con la señal del C-13 (δ_C 113.4), de acuerdo a lo mostrado en su experimento de HSQC, ver **figura 33**. En la **tabla 8**, se enlistan los desplazamientos químicos de RMN¹H (espectro 11) y RMN¹³C para 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**2**).

Figura 32. Espectros de RMN¹³C (DEPT 135) del óxido de cariofileno (**1**) y el 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-15-ol (**2**).

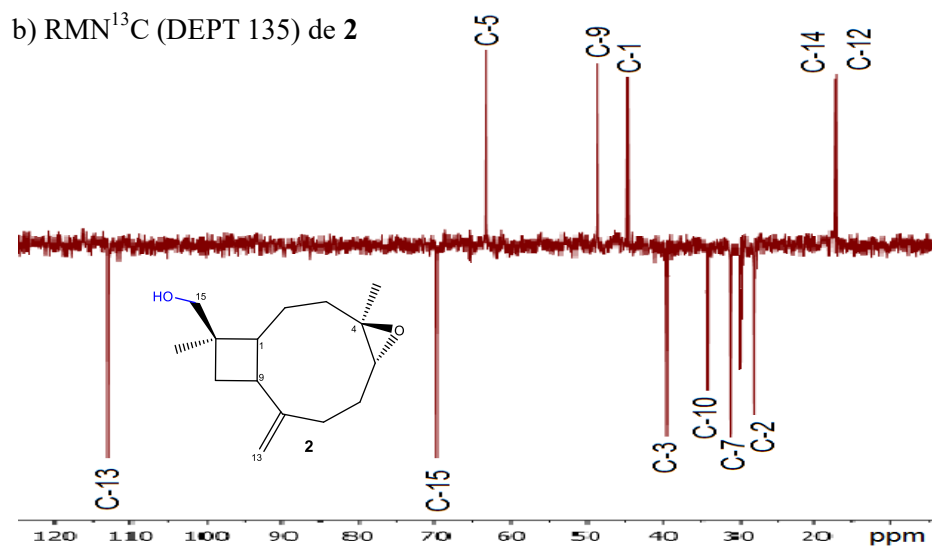
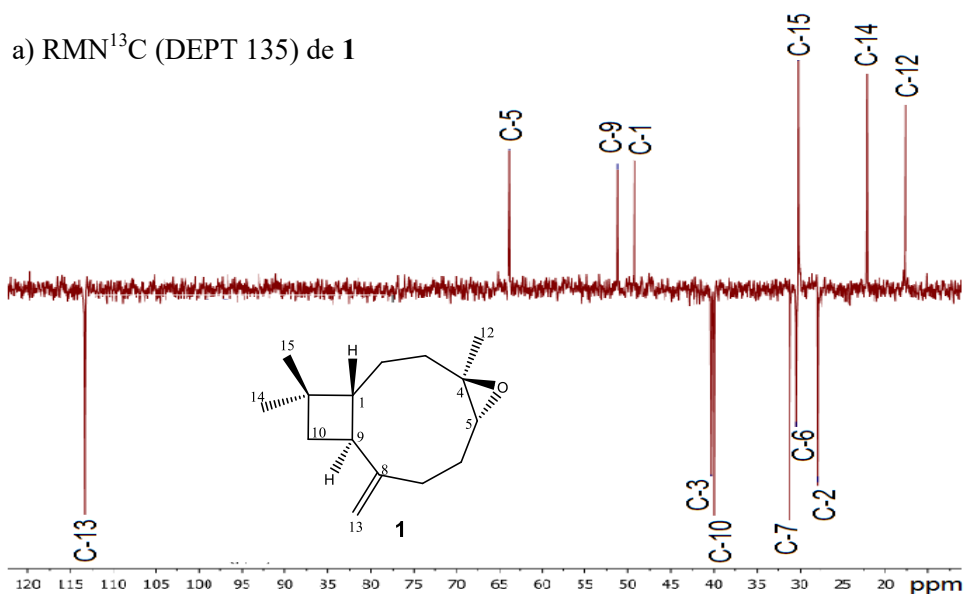


Figura 33. Experimento HSQC del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-15-ol (**2**).

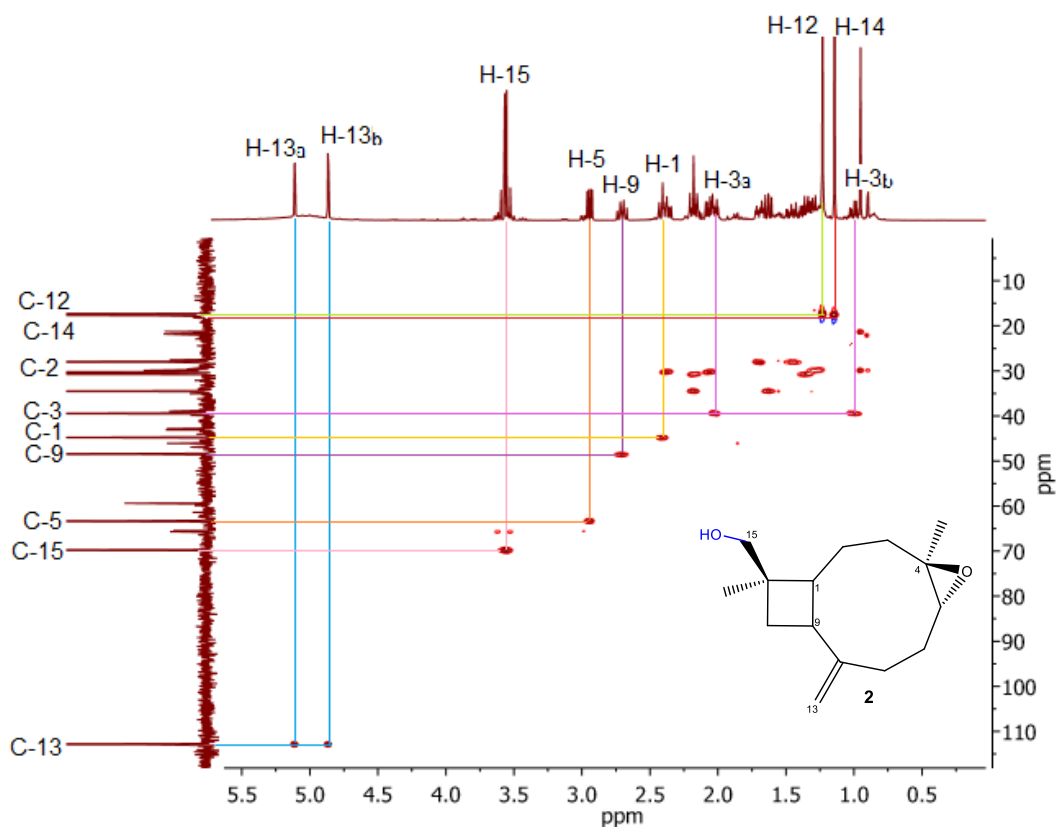


Tabla 8. Desplazamientos químicos RMN¹H y RMN¹³C para el 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**2**).

C	δ_H	<i>m</i>	J	δ_C	DEPT
1	2.08	<i>m</i>		45.1	CH
2				27.8	CH ₂
3				39.0	CH ₂
4				59.7	C
5	2.92	<i>dd</i>	11.0, 4.0	63.7	CH
6				30.1	CH ₂
7				31.1	CH ₂
8				151.7	C
9				48.2	CH
10	2.18 1.62	<i>m</i> <i>ddd</i>	10.6 8.8, 8.4, 0.4	34.1	CH ₂
11				38.6	C
12	1.21	<i>s</i>		17.0	CH ₃
13	5.11 4.87	<i>dd</i> <i>d</i>	1.8, 0.7 8	113.1	CH ₂
14	1.07	<i>s</i>		17.8	CH ₃
15	3.56	<i>d</i>	12.0	70.8	CH ₂

Con base en los desplazamientos químicos descritos en la literatura química especializada, se ha informado del aislamiento y caracterización del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-14-ol (**37**) [40, 43] y el 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**2**) [40-45]. La configuración relativa del C-11, para el compuesto en discusión, fue determinada con base en el espectro del NOESY del compuesto **2**, ver **figura 34**, donde se observa la interacción de H-1 (δ_H 2.08) con el metileno ubicado en C-15 (δ_H 3.35), como lo confirma su modelo de energía mínima calculada (88.7 kcal/mol), ver la **figura 35**.

Figura 34. Experimento NOESY del 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-15-ol (**2**).

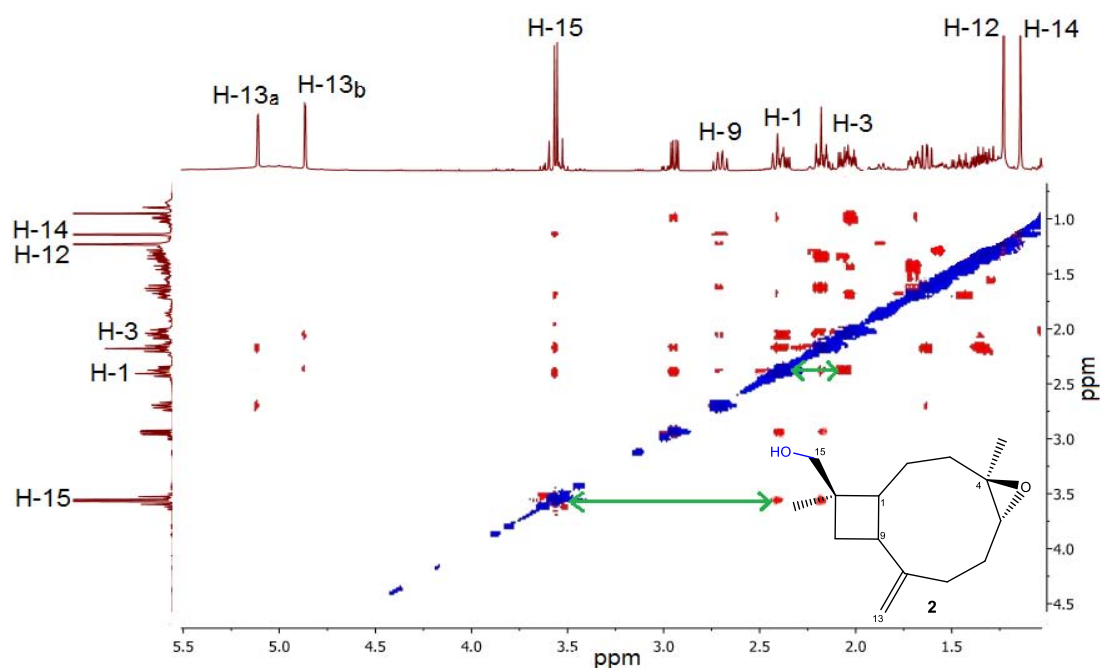
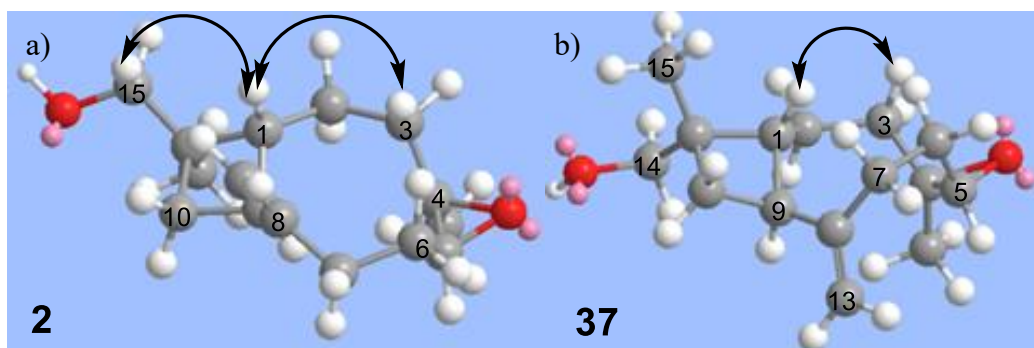
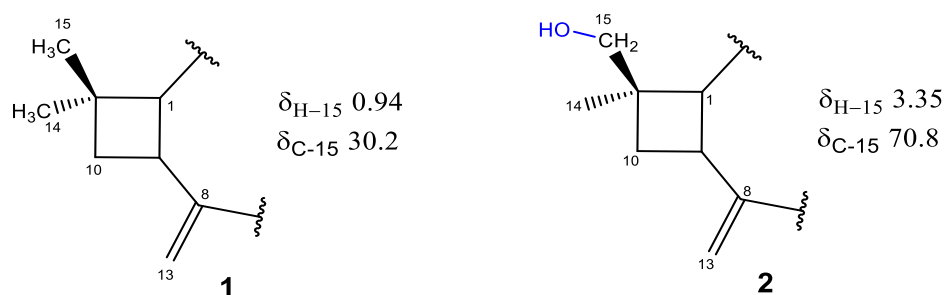


Figura 35. Orientación relativa del C-15 en el 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**2**) y 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-14-ol (**37**).



En la **figura 36** se observan las diferencias en el desplazamiento químico del C-15 para el óxido de cariofileno (**1**) y la molécula en discusión (**2**). Dicha diferencia se debe a la presencia del grupo hidroxilo, el cual ejerce un efecto de desprotección sobre C-15. Cabe señalar que el compuesto 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**2**) se identificó como producto de biotransformación de **1** con *Colletotrichum gloesporoides*, *Beauveria bassiana* y *C. echinulata*.

Figura 36. Desplazamientos químicos RMN¹³C y RMN¹H para H-15 para el óxido de cariofileno (**1**) y las sustancia 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**2**).



8.5. BIOTRANSFORMACIÓN CUANTITATIVA DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (**1**) CON *Saccharomyces cerevisiae*.

De la biotransformación de **1** con *S. cerevisiae* se obtuvieron mezclas complejas de productos, las cuales no fueron separadas por medio de las técnicas convencionales de laboratorio –CC-Flash y CCP–.

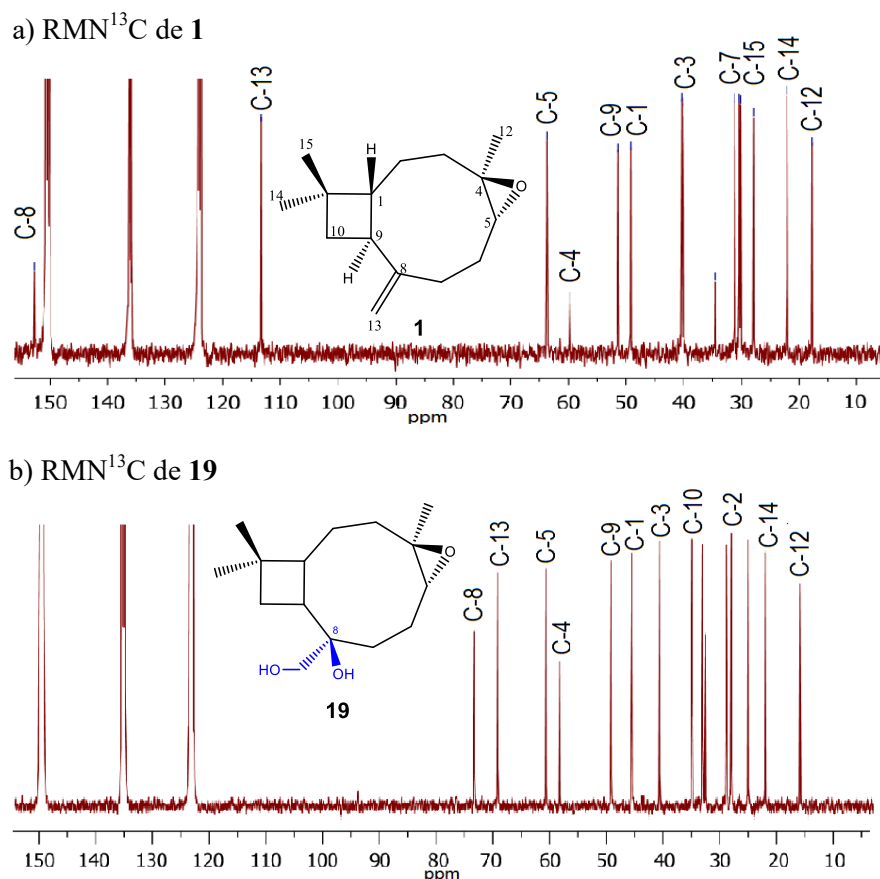
8.6. BIOTRANSFORMACIÓN CUANTITATIVA DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (**1**) CON *Beauveria bassiana*.

De la biotransformación de **1** con *B. bassiana* se aislaron dos productos de biotransformación que se describen a continuación.

De las fracciones 62-81 [n-hex/AcOEt (8:2)], se aisló un aceite de color amarillo con valores de R_f 0.47 [n-hex/AcOEt (4:6)] y 0.48 [CH₂Cl₂/AcOEt (1:1)], el cual corresponde al compuesto 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**2**) aislado en la biotransformación de **1** con *C. echinulata*.

El siguiente compuesto obtenido de las fracciones 89-90 [n-hex/AcOEt (8:2)], es un sólido blanco de pf 115-117°C. En su espectro de IR (espectro 14) se observan las bandas correspondientes a la $\nu(\text{OH})$ 3481-3449 cm^{-1} y la $\nu(\text{C-H})$ en 2927 para $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$. Al analizar el espectro de RMN^{13}C para las sustancias **1** y **19**, ver **figura 37**, se observa que las señales correspondientes a los carbonos con hibridación C_{sp^2} δ_{C} 152.7 (C-8) y δ_{C} 113.2 (C-13) del compuesto **1** no están presentes en el espectro de la sustancia en discusión (**19**), lo cual sugiere que la doble ligadura *exocíclica* $\Delta^{8,13}$ fue modificada durante el proceso de biotransformación. Con base en su espectro de RMN^{13}C por desacoplamiento total, se observan 15 señales entre 74.0-15.0 ppm; mientras que en su espectro DEPT se observan tres metilos (CH_3), seis metilenos (CH_2), tres metinos (CH) y tres carbonos cuaternarios (C). En su espectro de masas por impacto electrónico se observa un ion molecular de m/z de 254 uma que corresponde a una fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3$ ($\Omega=3$).

Figura 37. Espectros de RMN^{13}C (desacoplamiento total) del óxido de cariofileno (**1**) y 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (**19**).



En su espectro de RMN¹H (espectro 15) se observan tres señales simples en δ_H 0.94 (δ_C 29.4), δ_H 0.96 (δ_C 22.3) y δ_H 1.35 (δ_C 16.2) que corresponden a los metilos en C-14, C-15 y C-12 respectivamente, lo que sugiere que los metilos no han sido modificados con alguna hidroxilación. En la **tabla 9**, se enlistan los desplazamientos químicos de RMN¹H y RMN¹³C, mismos que fueron correlacionados en base a su espectro de HSQC, ver **figura 38**, para la sustancia en discusión que finalmente fue identificado como el 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (**19**).

Figura 38. Experimento HSQC del 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (**19**).

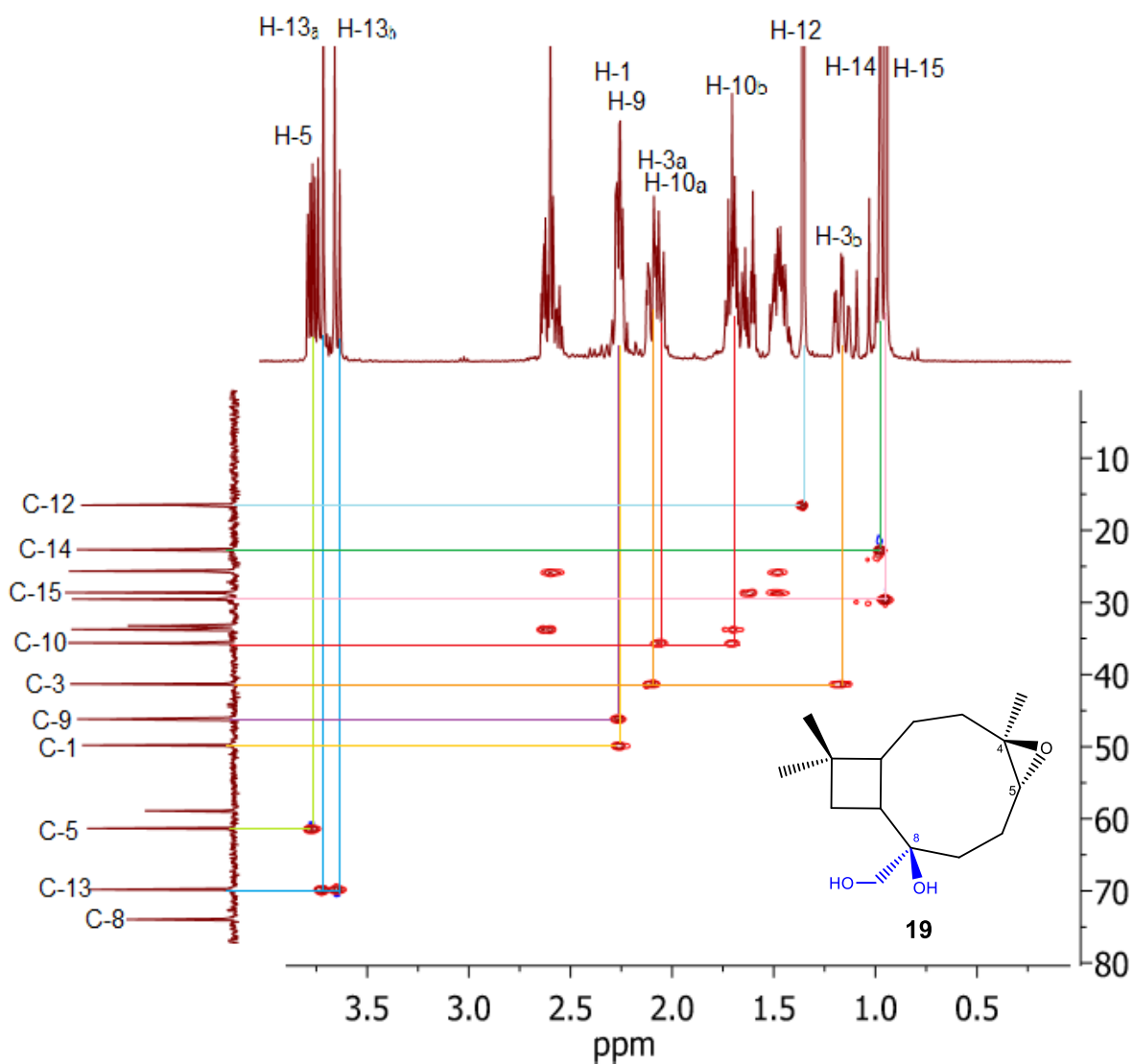


Tabla 9. Desplazamientos químicos de RMN¹H y RMN¹³C para el 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (**19**).

C	δ_H	J	δ_C	DEPT
1	2.25	<i>m</i>	46.2	CH
2	1.60 1.47	<i>m</i> <i>m</i>	28.6	CH ₂
3	1.16 2.09	<i>ddd</i> <i>m</i>	12.0, 12.0 4.0	CH ₂
4			58.9	C
5	3.76	8.0, 4.0	61.3	CH
6	2.59 1.47	<i>m</i> <i>m</i>	25.7	CH ₂
7	2.59 1.69	<i>m</i> <i>m</i>	33.7	CH ₂
8			74.0	C
9	2.25	<i>m</i>	49.8	CH
10	2.09 1.69	<i>m</i> <i>m</i>	35.6	CH ₂
11			33.2	C
12	1.35	<i>s</i>	16.5	CH ₃
13	3.72 3.64	<i>d</i> <i>d</i>	10 10	CH ₂
14	0.97	<i>s</i>	22.7	CH ₃
15	0.94	<i>s</i>	29.5	CH ₃

La configuración relativa del grupo hidroxilo en el C-8 fue determinada con base en su espectro NOESY, donde se observan las interacciones de H-13a con H-9, ver **figura 40**, lo cual sugiere que el grupo hidroxilo tiene una orientación β , cuya mínima energía calculada es 93.5 kcal/mol, ver **figura 41**. Dicha sustancia ya había sido reportada por otros autores, quienes sugieren que dicho diol (**19**) es precursor de los compuestos **17** y **18**, aislados de las biotransformación del óxido de cariofileno con *Chaetomium cochlioides*, ver **figura 39** [42].

Figura 39. Propuesta biosintética de los compuestos **17** y **18** a partir de **19**.

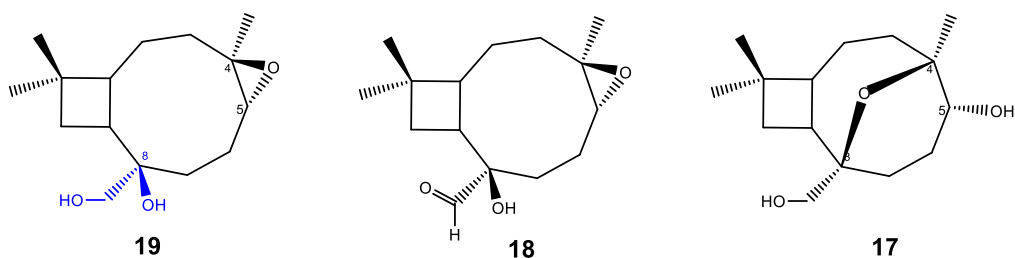


Figura 40. Experimento NOESY de la sustancia en discusión 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-
cariofil-8(13)-eno (**19**).

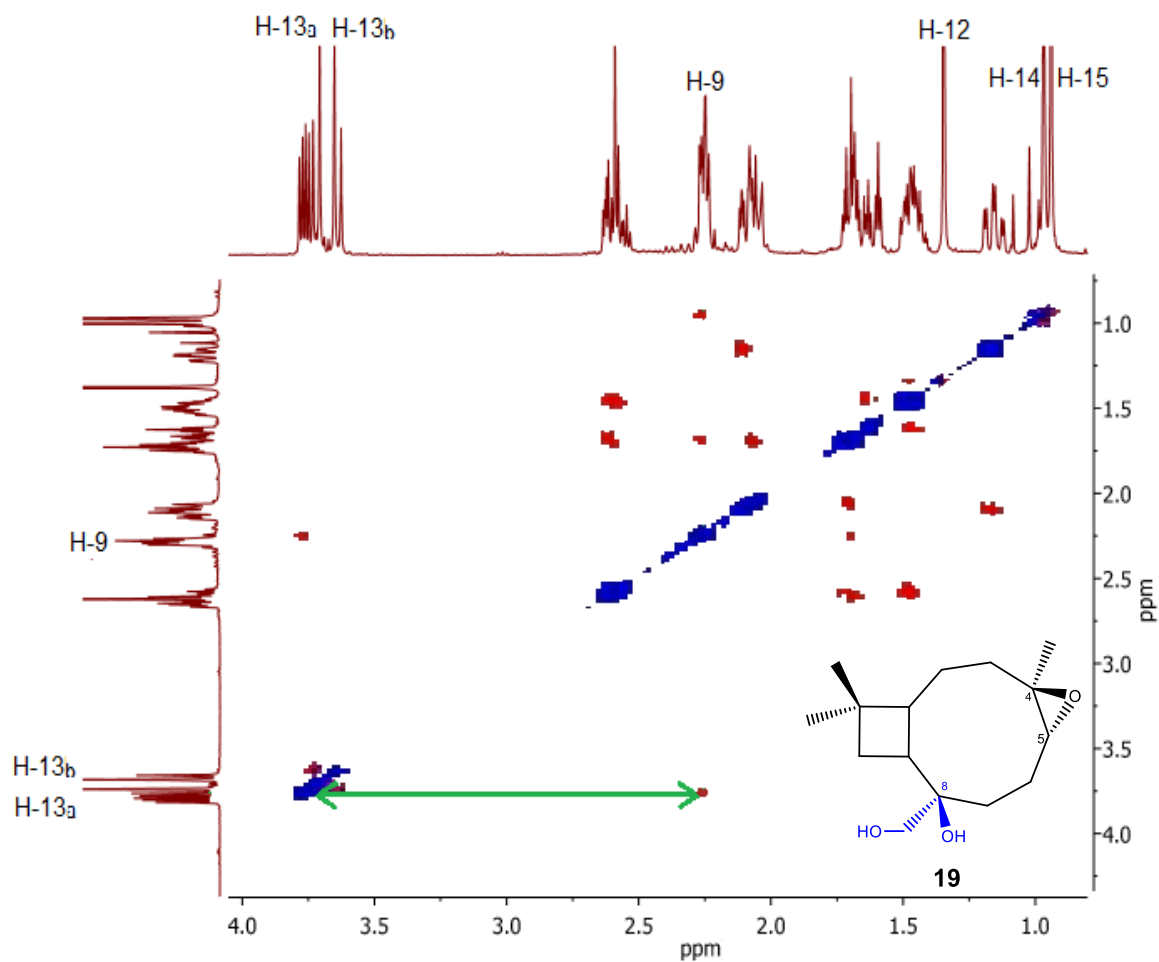
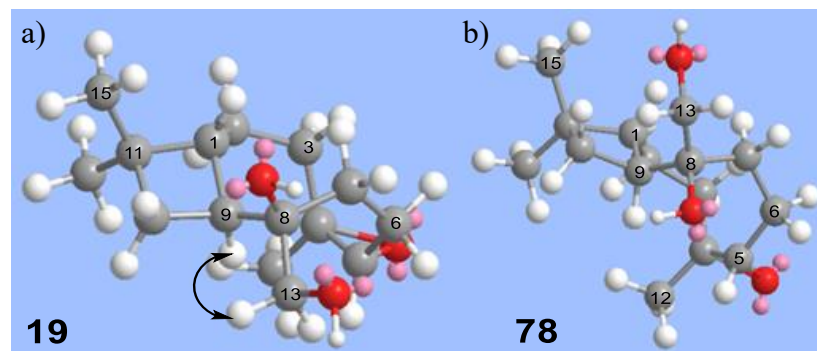


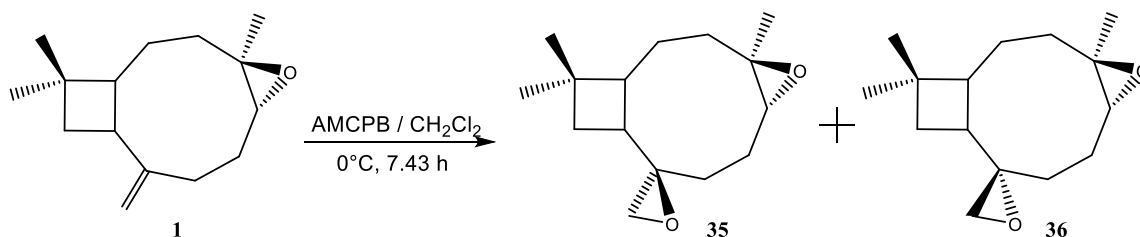
Figura 41. Orientación relativa en el C-8 para el compuesto **19**.



8. 7. REACCIÓN DE EPOXIDACIÓN DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (**1**) CON AMCPB.

A partir de la reacción de epoxidación de **1** con AMCPB, ver **figura 42**, se obtuvo una mezcla de productos que mostraron las mismas propiedades físicas –solubilidad y R_f –. Sin embargo, el análisis de sus datos espectroscópicos de RMN^{13}C en desacoplamiento total, muestra 30 átomos de carbono, lo cual sugiere que la mezcla está constituida por los epímeros del diepóxido de cariofileno (**35** y **36**), descritos previamente en la literatura [43].

Figura 42. Reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (**1**) con AMCPB.



Con base en el espectro de RMN^{13}C por desacoplamiento total (espectro 19), se comprueba la epoxidación de doble la ligadura *exocíclica*, al observar la ausencia de las señales correspondientes a los C-8 y C-13 con δ_{C} 152.7 y δ_{C} 113.2 respectivamente. En la **figura 43**, se muestran los desplazamientos químicos para dichos carbonos de la mezcla de epímeros. Los desplazamientos químicos observados para el β -diepóxido de cariofileno [C-8 (δ_{C} 59.2) y C-13 (δ_{C} 56.7)] y α -diepóxido de cariofileno [C-8 (δ_{C} 59.6) y C-13 (δ_{C} 49.9)], se indican en la figura 43. De acuerdo con reportes anteriores, las conformaciones más estables para **35** y **36**, corresponden a los conforméros $\alpha\alpha$ y $\beta\alpha$ respectivamente [70] como se muestra en la **figura 44**.

Figura 43. Desplazamientos químicos de RMN^{13}C para el diepóxido del cariofileno (mezcla de epímeros).

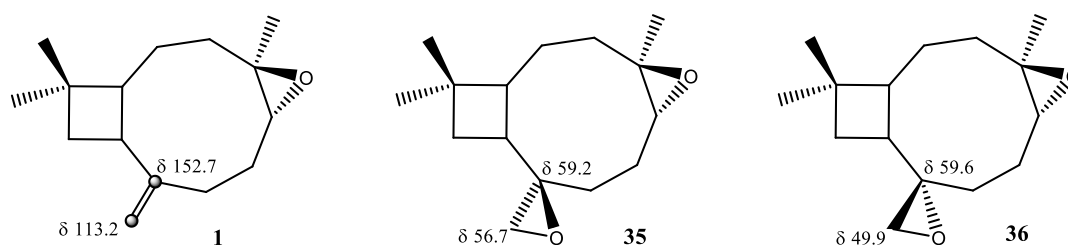
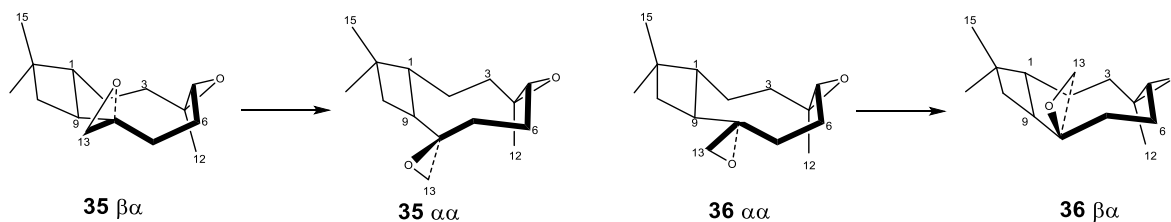


Figura 44. Conformaciones propuestas para el diepóxido de cariofileno (**35** y **36**).



Finalmente, en la **tabla 10** se muestra los rendimientos obtenidos de los productos de las diferentes biotransformaciones y de la reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (**1**).

Tabla 10. Porcentaje de los productos de biotransformación y de reacción del óxido de cariofileno (**1**).

Microorganismo	Productos				
	1	35 y 36	16	2	19
<i>C. echinulata</i> ²	18.2 % (69 mg)	3.7 % (14 mg)	5.5 % (22 mg)	10.8 % (42 mg)	
<i>S. cerevisiae</i> ¹	26.7 % (134 mg)				
<i>B. bassiana</i> ¹	33.6 % (131 mg)			1.6 % (6 mg)	1.5 % (6 mg)
R. de epoxidación		74.8 % (80.6 mg)			

9. CONCLUSIONES

- 9.1. Se purificó e identificó al óxido de cariofileno (**1**, 1.761 g), con base en sus propiedades físicas y constantes *espectroscópicas*.
- 9.2. Se determinó la CMI del óxido de cariofileno (**1**) sobre *Cunninghamella echinulata* (1×10^{-2} M) y *Beauveria bassiana* (1×10^{-1} M). *Saccharomyces cerevisiae* no fue inhibido por el óxido de cariofileno (**1**) a ninguna de las concentraciones ensayadas.
- 9.3. Se determinó que el óxido de cariofileno (**1**) es factible de ser biotransformado con los diferentes microorganismos ensayados –*Cunninghamella echinulata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus niger*, *Curvularia lunata* y *Colletotrichum gloeosporioides*–.
- 9.4. Se encontró que *C. echinulata* (CDBB-H-255) hidroxiló y epoxidó el esqueleto de **1** para producir los compuestos: (7*R*)-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-7-ol (**16**), 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-15-ol (**2**) y 8β-diepóxido del cariofileno (**35**).
- 9.5 De la biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con *B. bassiana* (CDBB-H-987) se obtuvieron los productos de “biohidroxilación”: 4,5-epoxi-cariofil-8(13)-en-15-ol (**2**) y el 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofil-8(13)-eno (**19**).
9. 6. Se logró obtener el diepóxido del cariofileno como mezcla de epímeros por medio de la reacción del óxido de cariofileno (**1**) con AMCPB.

10. SUGERENCIAS

Evaluación de la toxicidad.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de *Cunninghamella echinulata* se recomienda ensayar concentraciones en el intervalo de 1×10^{-3} M a 1×10^{-2} M, para especificar la concentración del óxido de cariofileno (**1**) que inhibe a dicho microorganismo.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de *Beauveria bassiana* se recomienda la evaluación en el intervalo de concentraciones de 1×10^{-2} M a 1×10^{-1} M, para especificar la concentración del óxido de cariofileno (**1**) que inhibe a dicho microorganismo.

Para la concentración mínima inhibitoria de *Saccharomyces cerevisiae* deben de evaluarse concentraciones mayores de 1×10^{-1} M del óxido de cariofileno (**1**).

Separación y purificación de los productos de biotransformación.

En la separación y purificación de las mezclas de productos de biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) se sugiere el uso de técnicas más precisas y rápidas –CLAR y CG/EM– para evitar la posible degradación y transformación química del óxido de cariofileno (**1**); así como de sus productos de biotransformación.

Se sugiere utilizar un detector de índice de refracción para la separación del óxido de cariofileno y de sus productos de biotransformación por medio de CLAR. Debido a la ausencia de grupos cromóforos en el óxido de cariofileno resulta inadecuado el uso de un detector de fotodiodos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Smith J. *Biotechnology*. 4^o ed. España. ACRIBIA, **2004**. 267, 49 p.
2. Gonzaga de Oliveira, L.; Mantovani, S. Biological transformations: contributions and perspectives. *Quím. Nova*, **2009**, *32*, 742–756.
3. Cano, A. Biotransformaciones de algunos productos naturales con diferentes microorganismos. *Bol. Soc. Quím. Méx.*, **2014**, *8*, 1–12.
4. Panke, S.; Held, M.; Wubbolts, M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2004**, *15*, 272–279.
5. Glieder, A.; Ruth, C. Perspectives on Synthetic Promoters for Biocatalysis and Biotransformation. *ChemBioChem.*, **2010**, *11*, 761–765.
6. Long, A. Drug metabolism *in sico* –the knowledge –based expert systems approach. Historical perspectives and current strategies. *Drug Discovery Today: Technol.*, **2013**, *10*, e-147–e-153.
7. Klopman, G.; Dimayuga, M.; Talafous, J. META. 1. A Program for the Evaluation of Metabolic Transformation of Chemicals. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1994**, *34*, 1320-1325.
8. Heux, S.; Meynial-Salles, I.; O'Donohue, M.; Dumon, C. White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. *Biotechnol. Adv.*, **2015**, *33*, 1653–1670.
9. Muñoz, D.; Hoyos, P.; Hernáiz, M.; Alcantara, A.; Sánchez-Montero, J. Industrial biotransformation in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresour. Technol.*, **2012**, *115*, 196–207.
10. De Carvalho, C.; Da Fonseca, M. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol., Adv.* **2006**, *24*, 134–142.

11. Patel, N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Chem. Rev.*, **2008**, *252*, 659–701.
12. Carballeira, J.; Fernandez-Lucas, J.; Quezada, M.; Hernaiz, M.; Alcantara, A.; Simeó, Y.; Sinisterra, J.; Schaechter, M. Encyclopedia of Microbiology, 3th Edition, England, Academic Press, **2009**, pp 212–251.
13. Saibi, W.; Abdeijalil, S.; Marmoudi, K.; Gargouri, A. Biocatalysts: Beautiful creatures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2012**, *426*, 289–293.
14. Zeng, G.; Xu, J, New opportunities for biocatalysis: driving the síntesis of chiral chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 784–792.
15. Bechtold, M.; Makart, S.; Heinemman, M.; Panke, S. Integrated operation of continuous chromatography and biotransformations for the generic high yield production of fine chemicals. *J. Biotechnol.*, **2006**, *124*. 146–162.
16. Dewick, P. Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach. England. WILEY. **1997**. pp 172–180.
17. Di Sotto, A.; Maffei, F.; Hrelia, P.; Castelli, F.; Sarpietro, G.; Mazzanti, G. Genotoxicity assessment of β -oxide. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **2013**, *66*, 264–268.
18. Chavan, M.; Wakte, S.; Shinde, D. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, **2010**, *17*, 149–151.
19. Cheng, S.; Liu, J.; Huang, C.; Hsui, Y.; Chen, W.; Chang, S. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. *Bioresour. Technol.*, **2009**, *100*, 457–464.
20. Moussavi, N.; Malterud, K.; Mikolo, B.; Dawes, D.; Chandre, F.; Vincent Corbel, V.; Massamba, D.; Overgaard, H.; Wangensteen, H. Identification of chemical constituents of *Zanthoxylum heitzii* stem bark and their insecticidal activity against the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Parasit. Vectors*, **2015**, *8*, 503–511.

21. Ferreira, R.; de Moraisa, A.; Vieira, R.; Napolitano, D.; Guzman, V.; Morais, S.; Cunha, L.; Martins, C.; Changa, R.; Aquino, F.; Nascimento, E.; de Oliveira, A. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess leaves against oral bacteria. *Ind. Crop. Prod.*, **2015**, *65*, 71–78.
22. Chang, H-T.; Cheng, Y-H; Wu, C-L.; Chang, S-T.; Chang, T-T; Su, Y-C. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresour Technol.*, **2008**, *99*, 6266–6270.
23. Park, K-R; Nam, D.; Yun, H-M; Lee, S-G; Jang, H-J; Sethi, G. β -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Lett.*, **2011**, *312*, 178–188.
24. Lukas, B.; Schmiderer, C.; Novak, J. Essential oil diversity of european *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry*, **2015**, *119*, 32–40.
25. Ali, A.; Tabanca, N.; Demirci, B.; Blythe, E.; Ali, Z.; Can, K.; Khan, I. Chemical Composition and Biological Activity of Four *Salvia* Essential Oils and Individual Compounds against Two Species of Mosquitoes. *J. Agr. Food Chem.*, **2015**, *63*, 447–456.
26. Hanamanthagouda, M.; Kakkalameeli, S.; Naik, P.; Nagella, P.; Seetharamareddy, H.; Murthy, H. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chem.*, **2010**, *118*, 836–839.
27. Costa, T.; Fernandes, O.; Santos, S.; Oliveira, C.; Lião, L.; Ferri, P.; Paula, J.; Ferreira, H.; Sales, B.; Silva, M. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *J. Ethnopharmacol.*, **2000**, *72*, 111–117.
28. Villanueva, D.; Angelov, L.; Vicente, G.; Stateva, R.; García-Risco, M.; Reglero, G.; Ibañez, E.; Fournari, T. Extraction of thymol from different varieties of *thyme* plants using Green solvents. *J. Sci. Food. Agr.*, **2015**, *95*, 2901–2907.

29. Da Silva, J.; Pinto, I.; Burbano, M.; Montenegro, R.; Guimarães, E.; Andrade, E.; Maia, J. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Ind. Crop. Prod.*, **2014**, *58*, 55–60.
30. Porto, C.; Decorti, D.; Natolino A. Separation of aroma compounds for industrial hemp inflorescences (*Cannabis sativa* L.) by supercritical CO₂ extraction and on-line fractionation. *Ind. Crop. Prod.*, **2014**, *58*, 99–103.
31. Polanco-Hernández, G.; Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Chan-Bacab, M.; Sagua-Franco, H.; Gonzáles, J.; Rosario-Rodríguez, L.; Peña-Rodríguez, L. Metabolites from the leaf extract of *Serjania yucatanensis* with trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*, **2012**, *111*, 451–455.
32. Sabulala, B.; Danb, M.; Ja, A.; Kurupa, R.; Pradeepc, N.; Valsammac, R.; Georgea, V. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochemistry*, **2006**, *67*, 2469–2473.
33. Nery, C.; Silva, R.; Barrete, P.; da Costa, D.; Carrea, L.; Costa, B. Histochemistry, content and chemical composition of essential oil in different organs of *Alpinia zerumbe*. *Ciência Rural*, **2013**, *43*, 1811–1816.
34. Sivasothy, Y.; Chong, W.; Hamid, A.; Eldeen, I.; Sulaiman, S.; Awang, K. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. *Food Chem.*, **2011**, *124*, 514–517.
35. Hammami, L.; Smaouis, S.; Hsouna, A.; Hamdi, N.; Triki, M. *Ruta montana* L. leaf essential oil and extracts: characterization of bioactive compounds and suppression of crown gall disease. *J. EXCLI*, **2015**, *14*, 83–94.
36. Johann. S.; Olivera, F.; Siqueira, E.; Cisalpino, P.; Rosa, C.; Alves, T.; Zani, C.; Cota, B. Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.*, **2012**, *50*, 843–851.

37. Sánchez-Muñoz, A.; Aguilar, M.; King-Díaz, B.; Rivero, J.; Lotina-Hennsen, B. The Sesquiterpenes β -Caryophyllene and Caryophyllene Oxide Isolated from *Senecio salignus* act as phyto-growth and photosynthesis Inhibitors. *Molecules*, **2012**, *17*, 1437–1447.
38. Tasdemir, D.; Tierney, M.; Sen, R.; Bergonzi, M.; Demirci, B.; Bilia, A.; Can, K.; Brun, R.; Chatterjee, M. Antiprotozoal Effect of *Artemisia indica* Extracts and Essential Oil. *Planta Med.*, **2015**, *81*, 1029–1031.
39. Verma, R.; Padalia, R.; Goswami, P.; Verma, S.; Chauhan, A.; Darokar, M. Chemical composition and antibacterial activity of foliage and resin essential oils of *Araucaria cunninghamii* Aiton ex D. Don and *Araucaria heterophylla* (Salisb.) Franco from India. *Ind. Crop. Prod.*, **2014**, *61*, 410–416.
40. Choudhary, M.; Siddiqui, Z.; Nawaz, S.; Atta-ur-Rahman. Microbial transformation and butyrylcholinesterase inhibitory activity of (-)-caryophyllene oxide and its derivatives. *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 1429–1434.
41. Abraham, W-R; Ludger, E.; Stumpf, B. Biotransformation of caryophyllene by *Diplodia gossypina*. *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 115–120.
42. Abraham, W-R; Ernst, L.; Arfmann, H-A. Rearranged caryophyllenes by biotransformation with *Chaetomium cochliodes*. *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 757–763.
43. Duran, R.; Corrales, E.; Hernandez-Galan, R.; Collado, I. Biotransformation of caryophyllene oxide by *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 41–44.
44. Noma, Y.; Hashimoto, T.; Uehara, S.; Asakawa, Y. Erratum: Microbial transformation of isopinocampheol and caryophyllene oxide. *J. Flavour. Fragr.*, **2010**, *25*, 257–266.
45. Almazán, C. (2013). Biotransformación de monoterpenos -óxido de cariofileno, isomentol y mentol- y aislamiento de la(s) fitoalexina(s) inducidas en una variedad de mango mexicano *Mangifera indica* L., por *Colletotrichum gloesporoides* Penz. Tesis de licenciatura, FES Zaragoza, UNAM, pp 36–39.

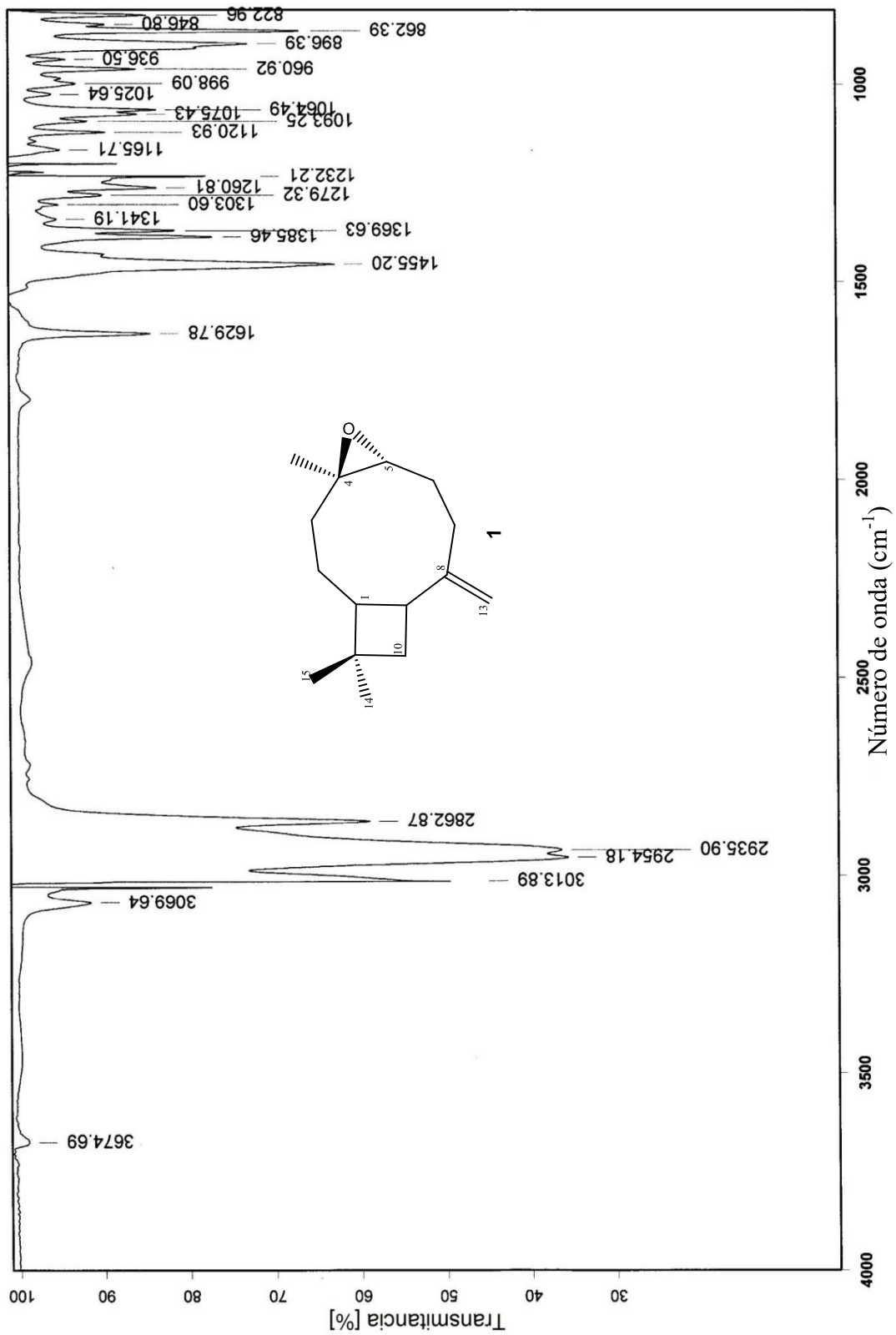
46. Correa, N.; Yaned, M.; Durango, R.; Diego, L.; García, P.; Carlos, M. Microbial transformation of arylpropanoid cinnamaldehyde by the phytopathogen fungus *Colletotrichum acutatum*. *Vitae*, **2009**, *16*, 83–91.
47. Illanes, A.; Cauerhff, A.; Wilson, L.; Castro, G. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour. Technol.*, **2011**, *115*, 48–57.
48. Binod, P.; Palkhiwala, P.; Gaicaiwari, R.; Nampoothiri, K.; Duggal, A.; Dey, K. y Pandey, A. Industrial Enzymes –Present status and future perspectives for India. *J. Sci. Ind. Res.*, **2013**, *72*, 271–286.
49. Alcantara, A.; Hernáiz, M.; Sinisterra, J., Biocatalyzed Production of Fine Chemicals, *in: Comprehensive Biotechnology*, Moo-Young, M., Ed. 2° ed. Academic Press, España, **2011**, 309–331.
50. Krivoruchko, A.; Nielsen, J. Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Biotech.*, **2015**, *35*, 7–15.
51. Abd-Alla, M.; Khalil, M.; Morsy, F.; Hassan, E. Enhancement of biodiesel, hydrogen and methane generation from molasses by *Cunninghamella echinulata* and anaerobic bacteria through sequential three-stage fermentation. *Energy*, **2014**, *78*, 543–554.
52. Asha, S.; Vidyavathi, M. *Cunninghamella* –A microbial model for drug metabolism studies– A review. *Biotechnol. Adv.*, **2009**, *27*, 16–29.
53. Baydoun, E.; Karam, M.; Wahab, A.; Khan, M.; Ahmad, M.; Smith, S.; Abdel-Massih, R.; Choudhary, M. Microbial transformation of nandrolone with *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella blakesleeana* and evaluation of leishmaniacidal activity of transformed products. *Steroids*, **2014**, *88*, 95–100.
54. Mafezoli, J.; Oliveira, C.; Paiva, J.; Sousa, A.; Lima, M.; Silva, J.; Barbosa, F.; Wijeratne, E.; Gunatilaka, A. Stereo and regioselective microbial reduction of the clerodane diterpene 3,12-dioxo-15,16-epoxy-4-hydroxycleroda-13(16),14-diene. *Nat. Prod. Commun.*, **2014**, *9*, 759–762.

55. Miyacoshi, S.; Azami, S.; Kuzuyama, T. Microbial glucosylation of flavonols by *Cunninghamella echinulata*. *J. Biosci. Bioeng.*, **2010**, *110*, 320–321.
56. Pous, L.; Carrizo, R.; Donadel, O.; Sanz, K.; Guerreiro, E. Hydroxylation of Ilicic Acid by Bioconversion with Cultures of *Cunninghamella echinulata*. *Nat. Prod. Lett.*, **1998**, *12*, 231–235.
57. Mathew, A.; Wang, J.; Luo, J.; Yau, S. Enhanced ethanol production via electrostatically accelerated fermentation of glucose using *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 15713.
58. Fuganti, C.; Serra, S. Baker's yeast-mediated enantioselective synthesis of the bisabolane sesquiterpenes (+)-curcuphenol, (+)-xanthorrhizol, (–)-curcuquinone and (+)-curcuhydroquinone. *J. Chem. Soc. Perkin*, **2000**, *22*, 3758–3764.
59. Khor, K.; Uzir, H. *Saccharomyces cerevisiae*: a potential stereospecific reduction tool for biotransformation of mono- and sesquiterpenoids. *Yeast*, **2011**, *28*, 93–107.
60. King, A.; Dickinson, R., Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Res.*, **2003**, *3*, 53–62.
61. Rojas, J.; Perea, J.; Ortiz, C., Compuestos con potencial aplicación farmacológica obtenidos por biotransformación de geraniol y pineno. *Salud UIS*, **2009**, *41*, 251–258.
62. Echeverría, B. (2006) Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo). Vuillemin. Tesis de bachillerato-tecnológico. Instituto Tecnológico de Costa Rica. pp 11–15.
63. Grogan, G.; Holland, L. The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2000**, *9*, 1–32.
64. Arnone, A.; Gregorio, D.; Nasini, G.; Pava, D. Secondary mould metabolites: Part 53. Transformation of the protoilludane sesquiterpene tsugicoline A into a sterpurane derivative and its microbiological reduction. *J. Chem. Soc. Perkin*, **1997**, *1*, 1523–1526.

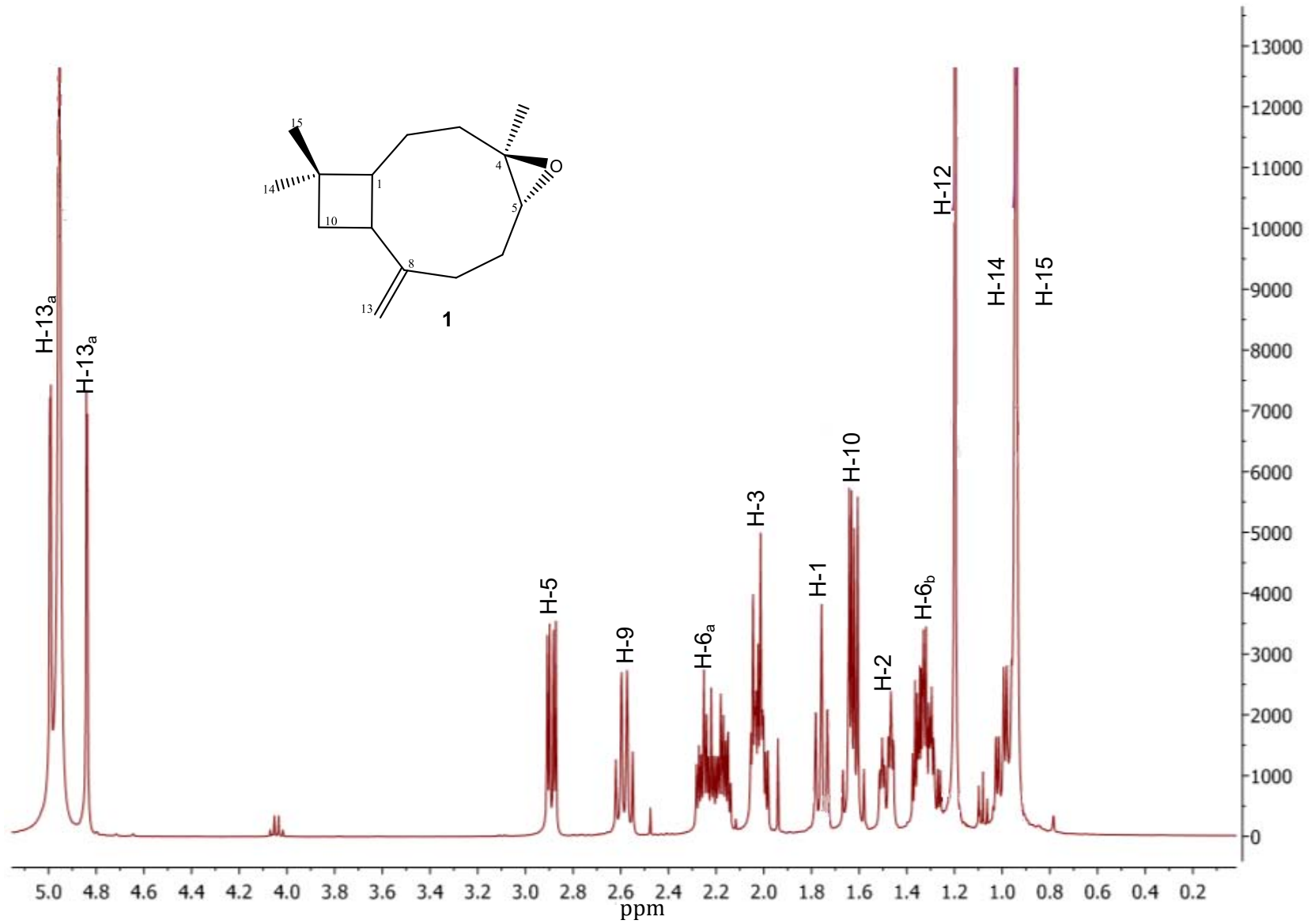
65. Buchanan, G. O.; Williams, L. A.; Reese, P. B. Biotransformation of cadinane sesquiterpenes by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *Phytochemistry*, **2000**, *54*, 39–45.
66. Coll, C.; Bowden, F. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J. Nat. Prod.*, **1986**, *49*, 936–939.
67. Navarro, V.; Gonzalez, A.; Fuentes, M.; Aviles, M.; Rios, M.; Zepeda, G.; Rojas, M. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, **2003**, *87*, 85–88.
68. Ríos, N.; Medina, G.; Jiménez, J.; Yáñez, C.; García, M.; Di Bernardo, M.; Gualtieri, M. Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Rev. Perú. Biol.*, **2009**, *16*, 97–100.
69. Lizcano, M. (2007). Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Tymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, pp. 39.
70. Salomatina, O.; Korchagina, D.; Gatilov, Y.; Polovinka, M.; Barkhash, V., Transformations of Caryophyllene Diepoxides in Various Acidic Media. *Russ. J. Org. Chem.*, **2004**, *40*, 1441–1449.

10. ESPECTROS.

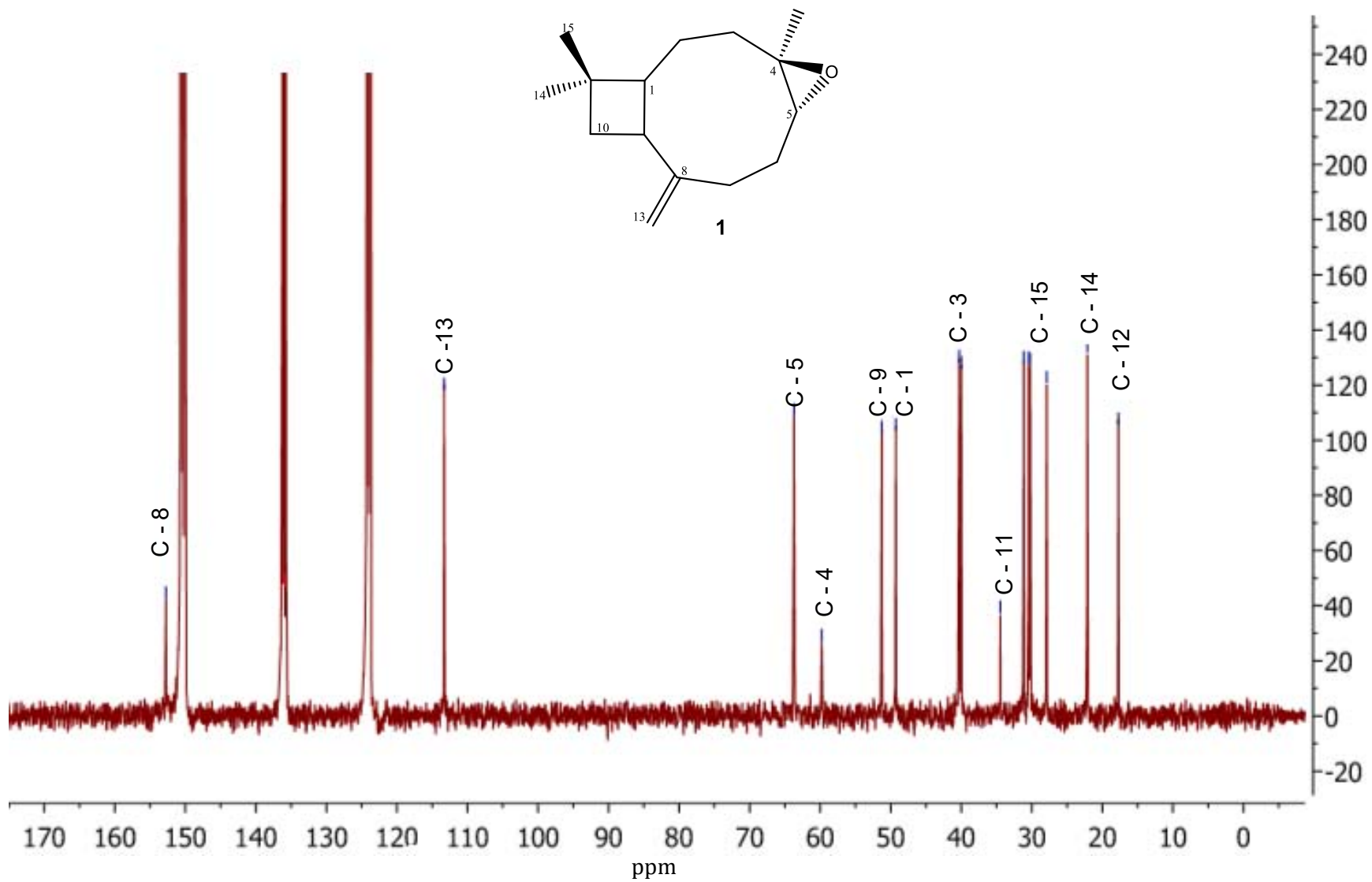
Espectro 1. IR (CHCl₃) del óxido de cariofileno (**1**)



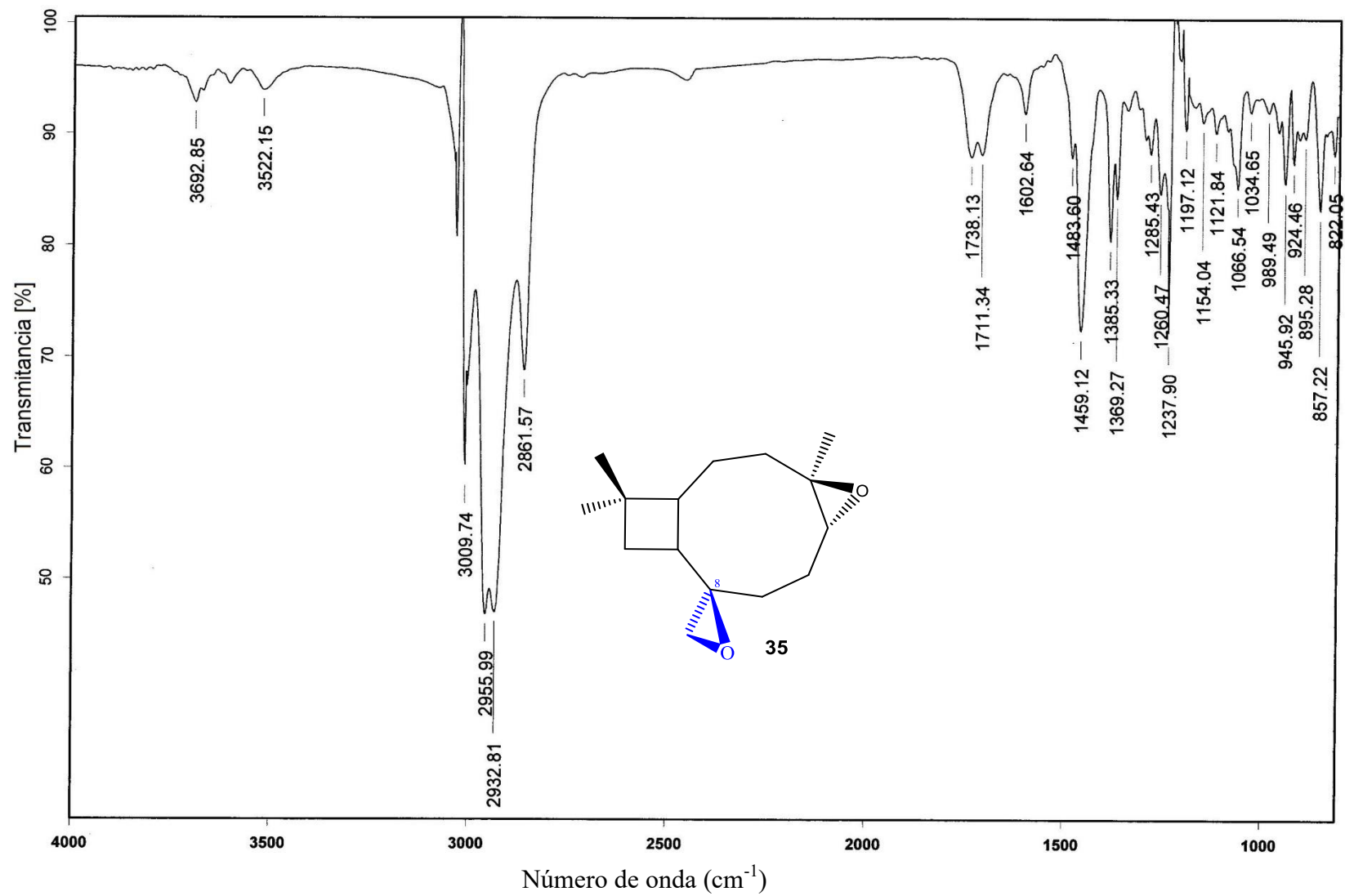
Espectro 2. RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) del óxido de cariofileno (**1**).



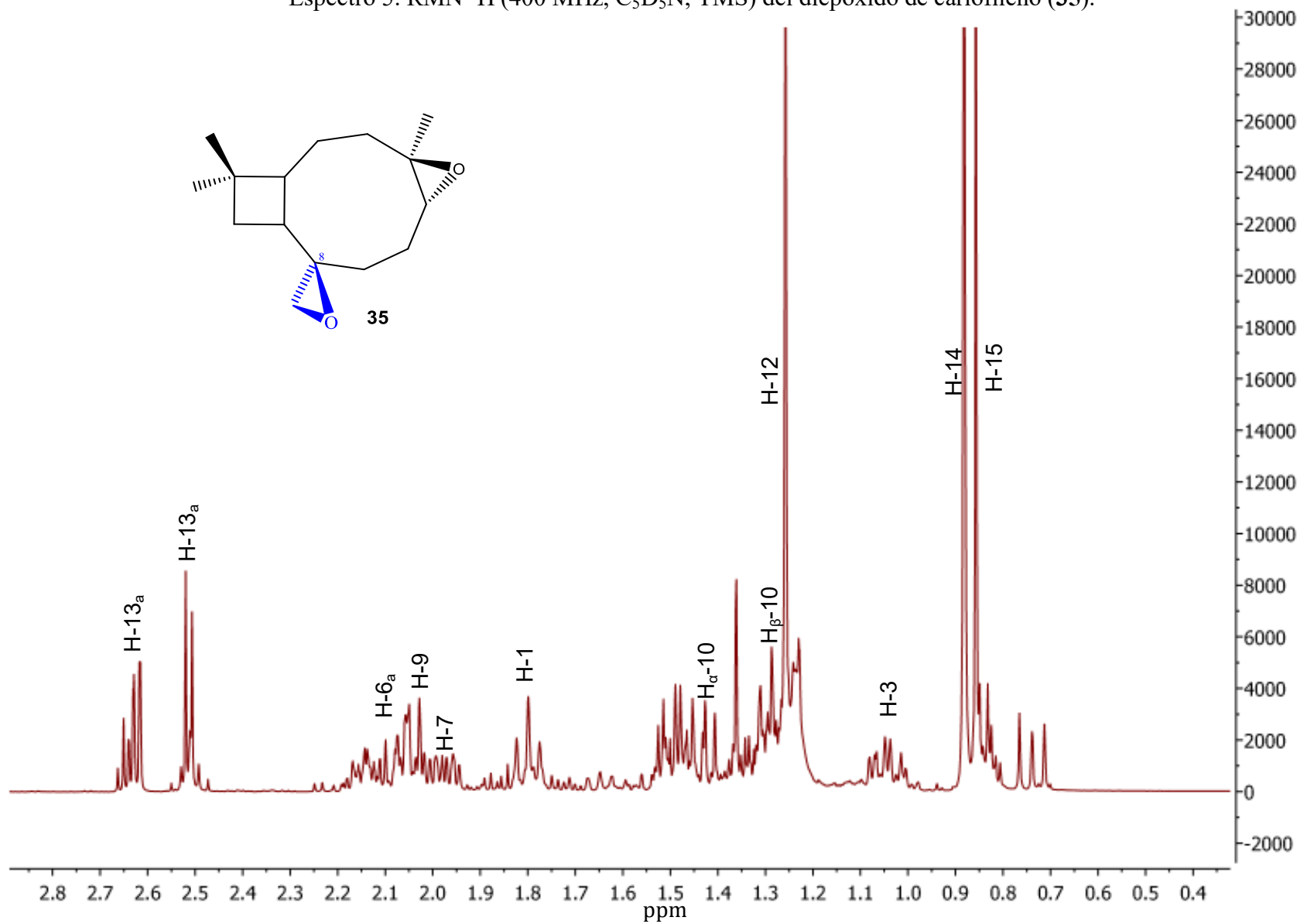
Espectro 3. RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) del óxido de cariofileno (**1**)



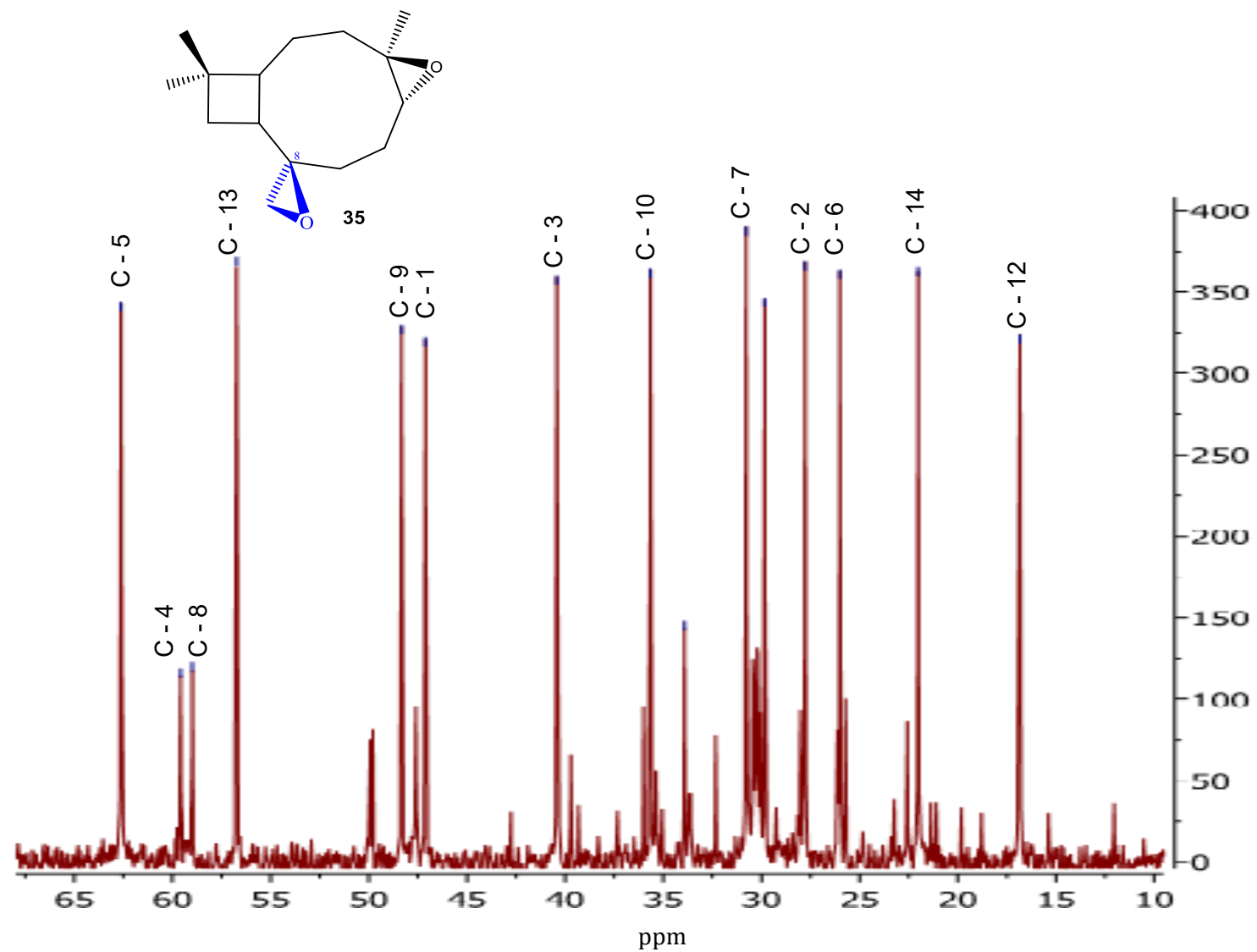
Espectro 4. IR (CHCl₃) del diepóxido de cariofileno (**35**)



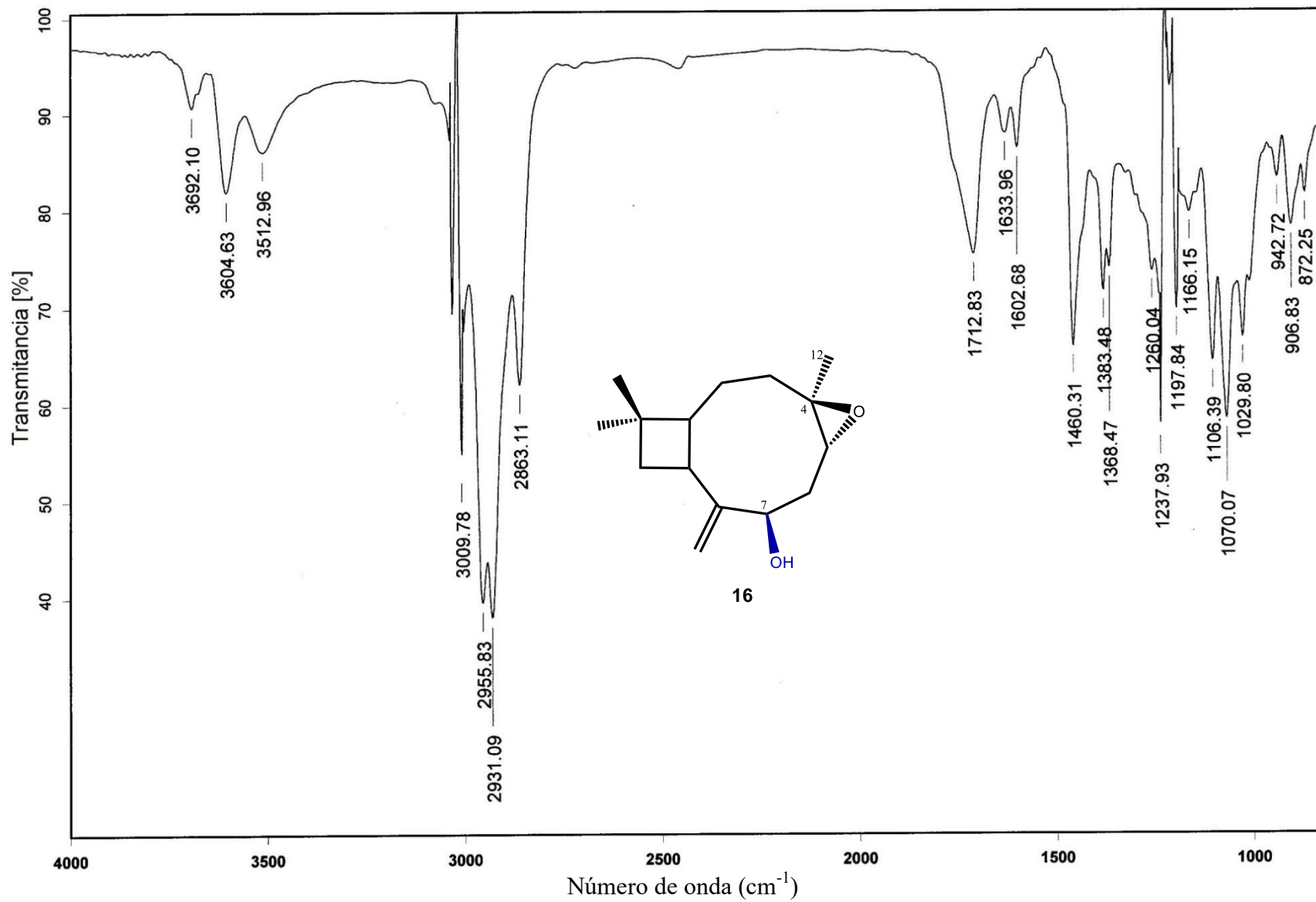
Espectro 5. RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) del diepóxido de cariofileno (**35**).



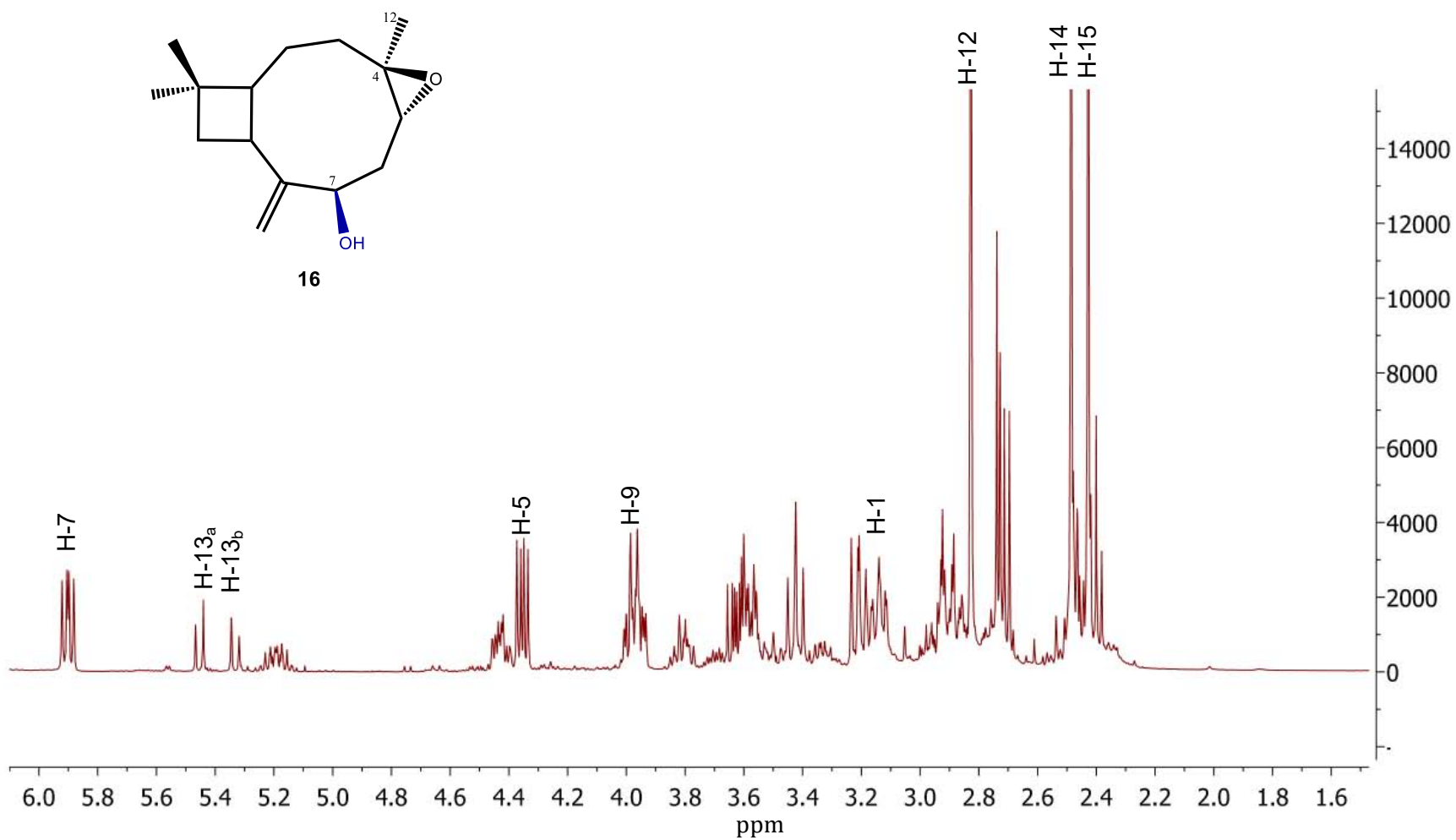
Espectro 6. RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) del diepóxido de cariofileno (35).



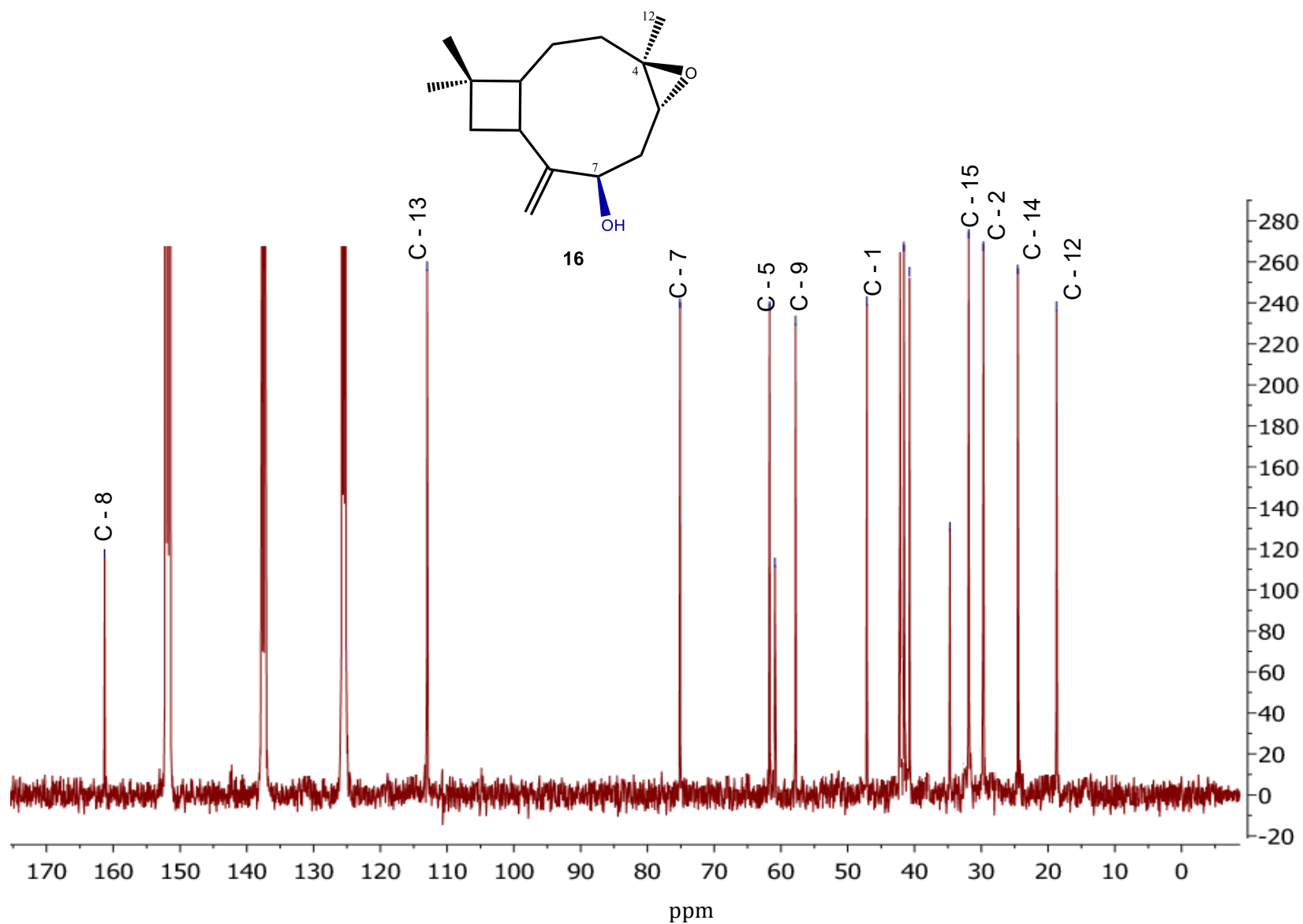
Espectro 7. IR (CHCl₃) del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-7-ol (**10**).



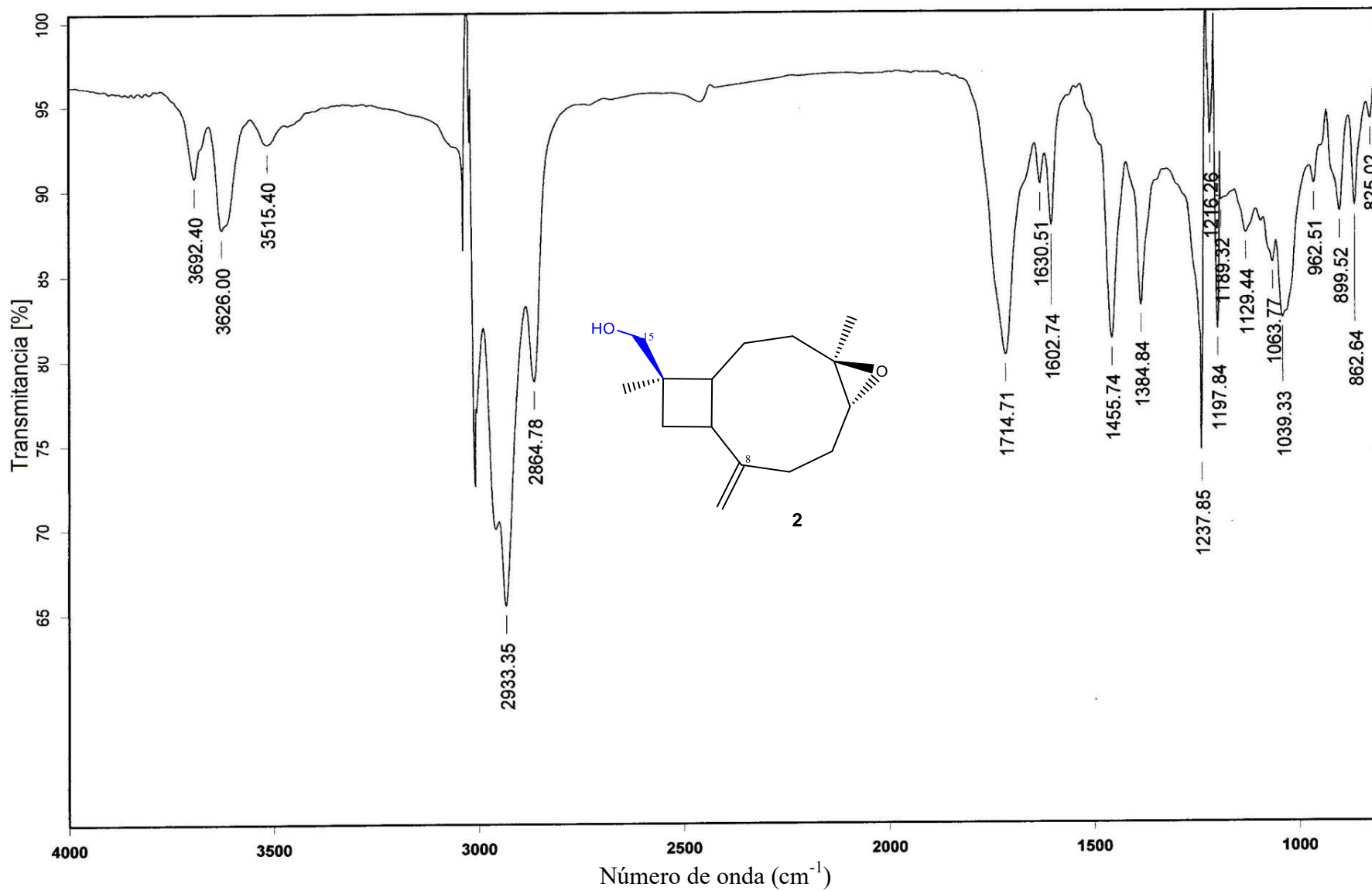
Espectro 8. RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-7-ol (**10**).



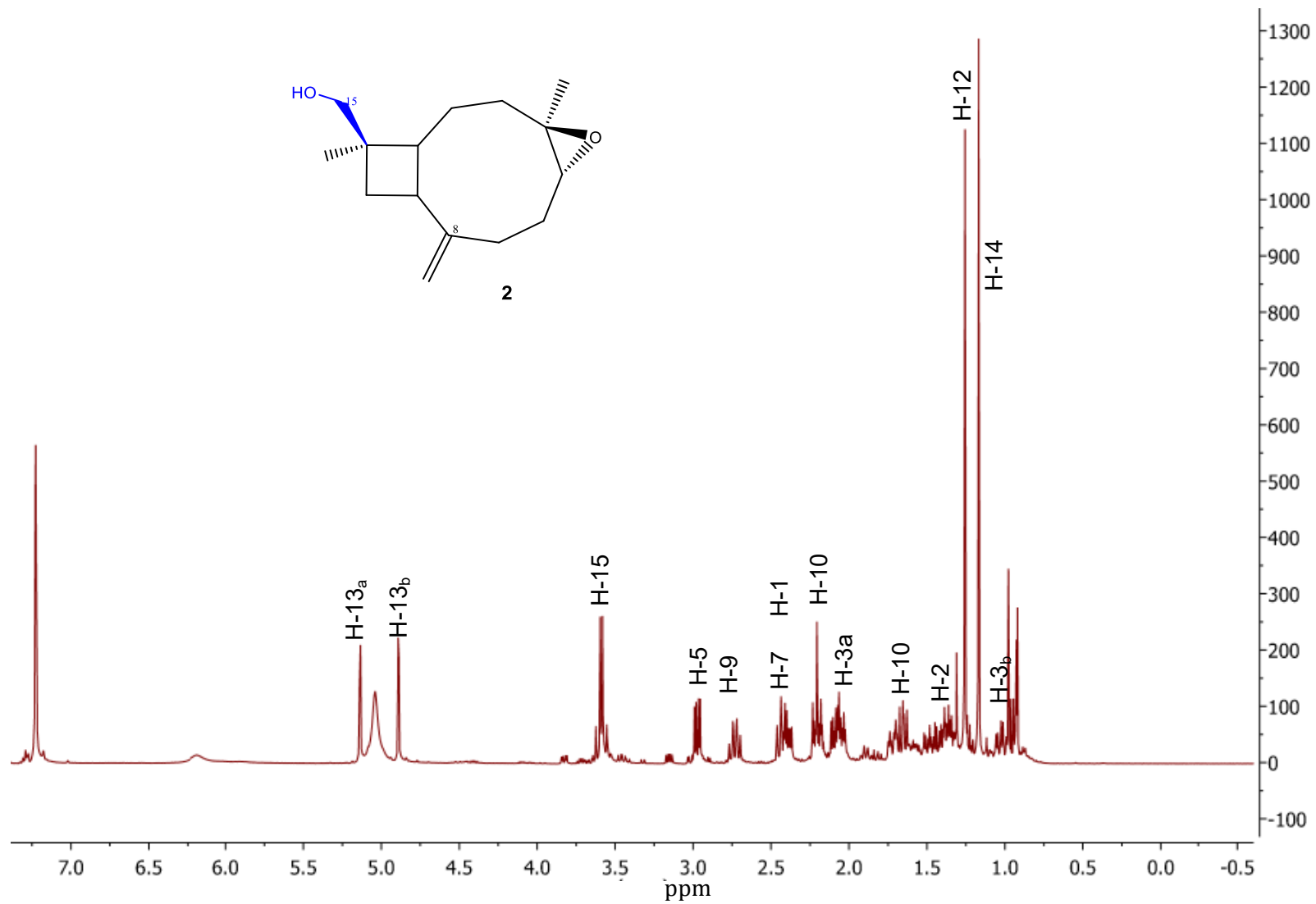
Espectro 9. RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**10**).



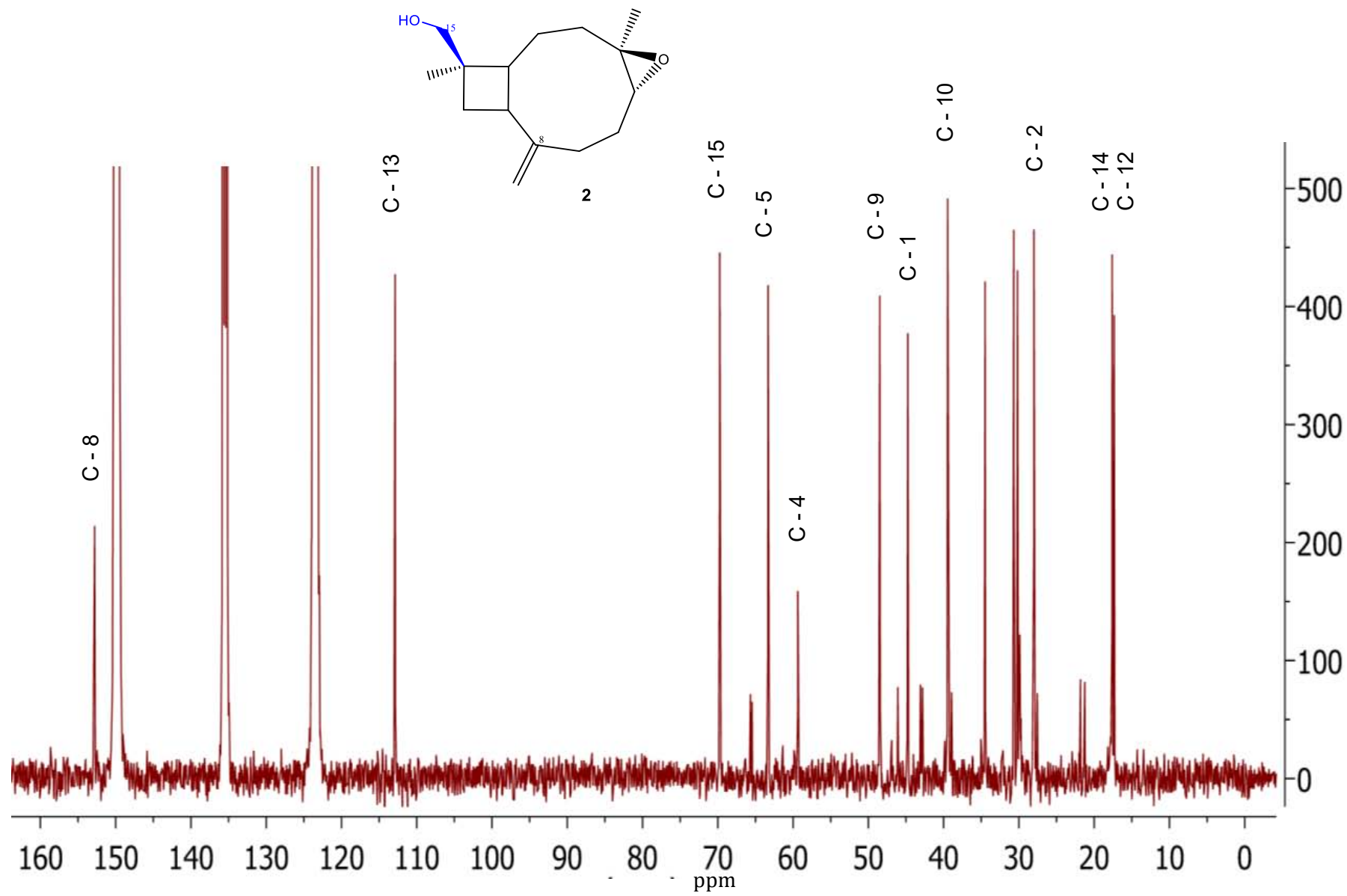
Espectro 10. IR (CHCl₃) del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (2).



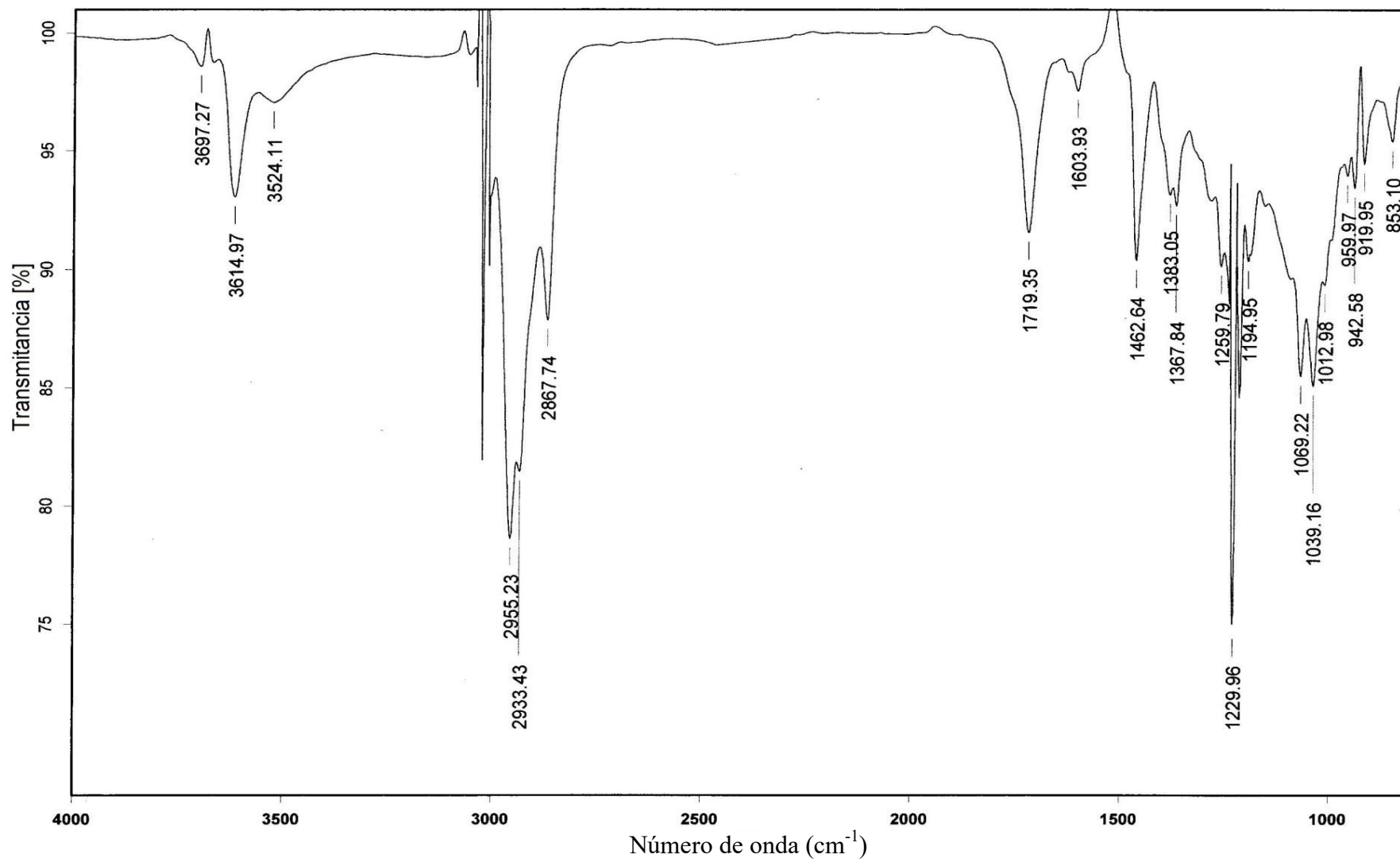
Espectro 11. RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**2**).



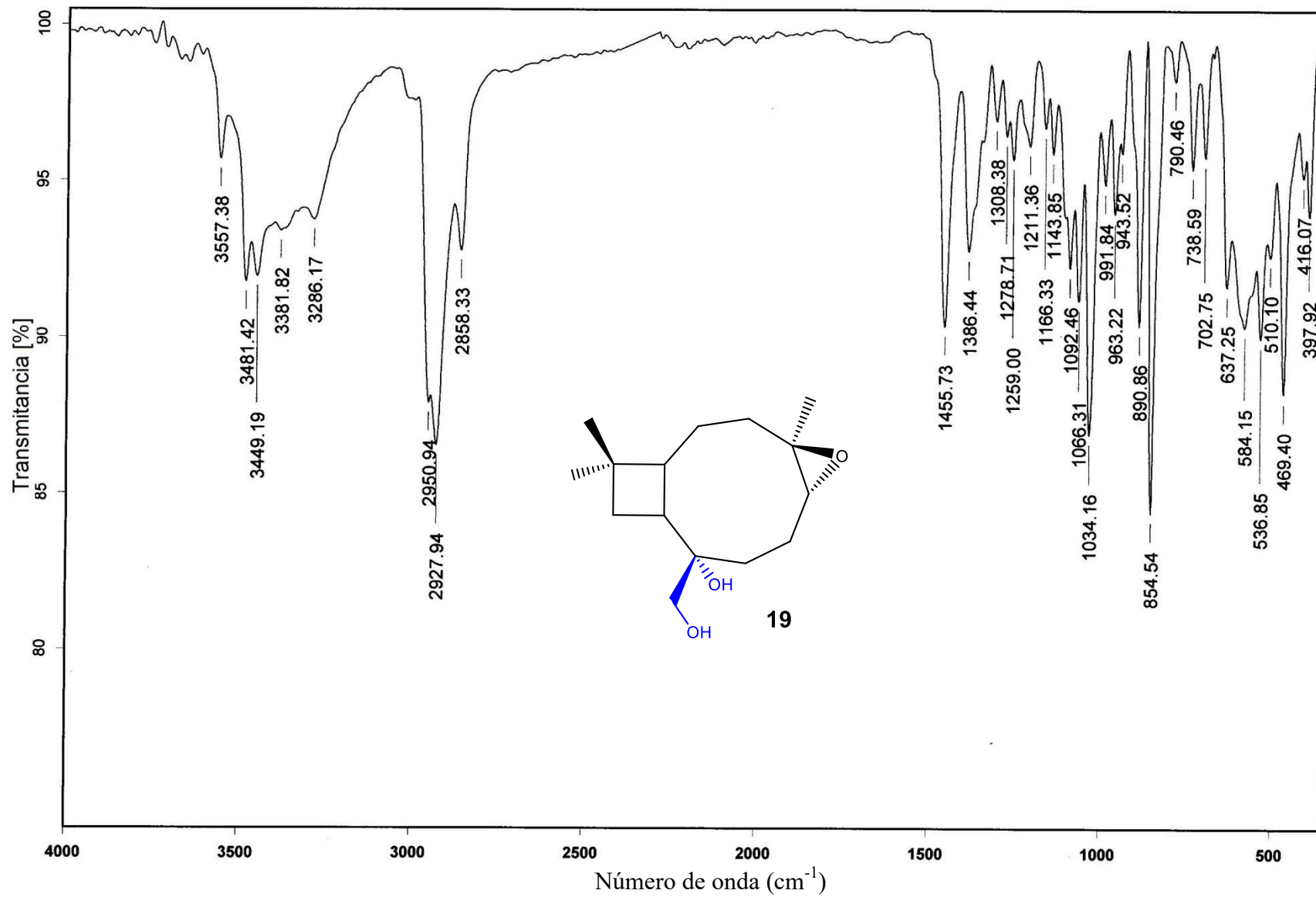
Espectro 12. RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-15-ol (**2**).



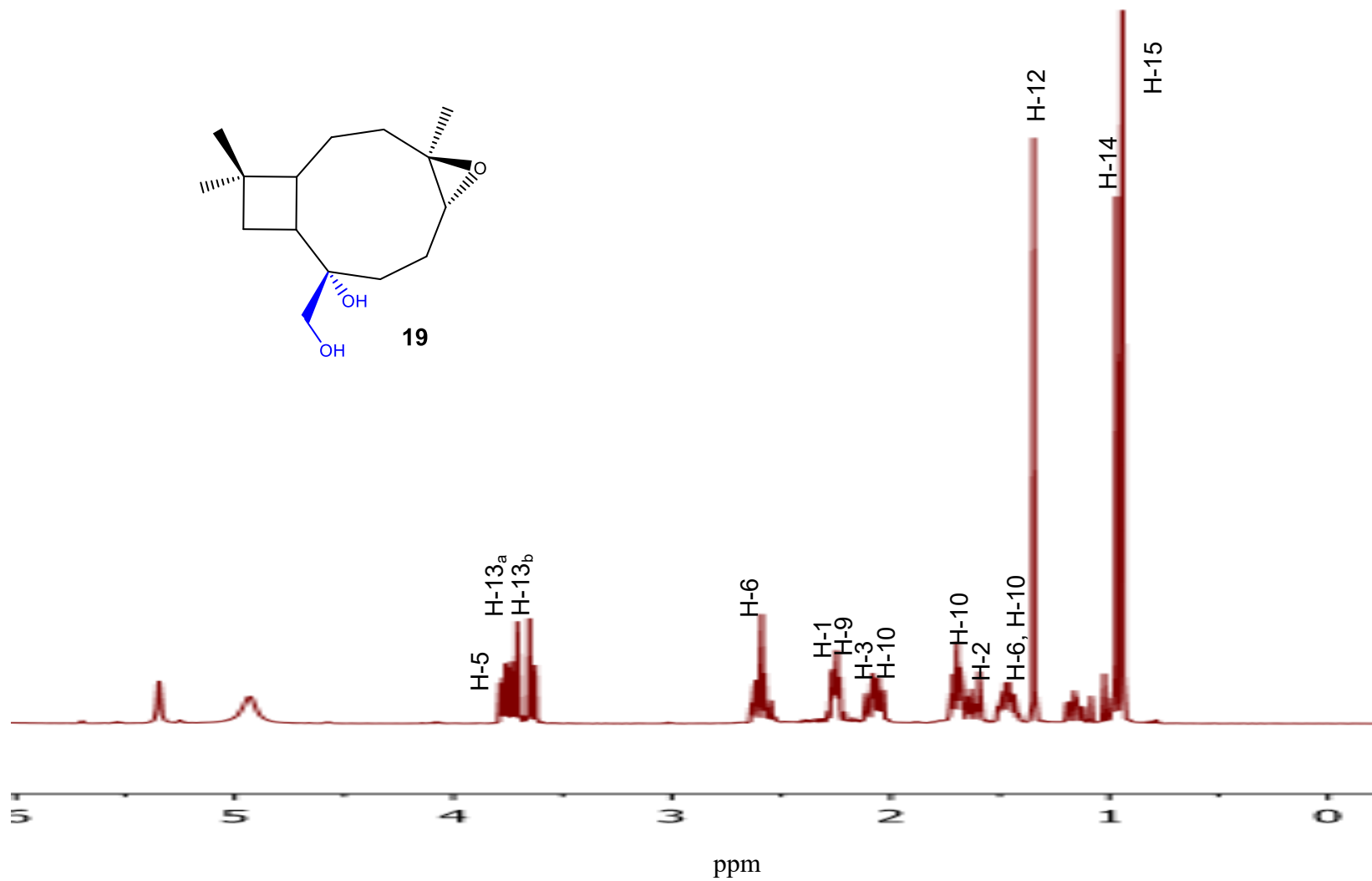
Espectro 13. IR (CHCl₃) de la mezcla de compuestos derivados de la biotransformación con *S. cerevisiae*



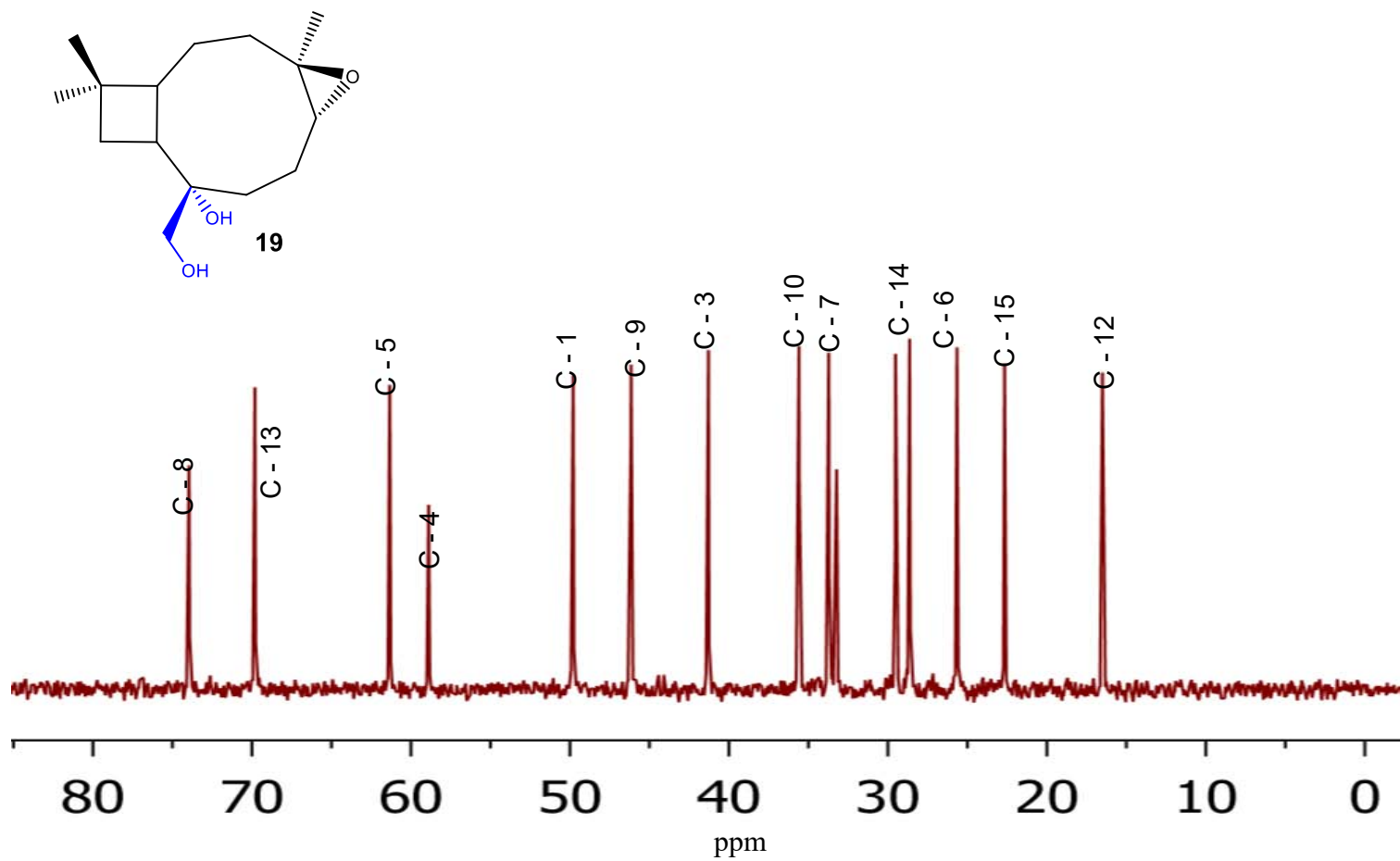
Espectro 14. IR (CHCl₃) del 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofileno (**19**).



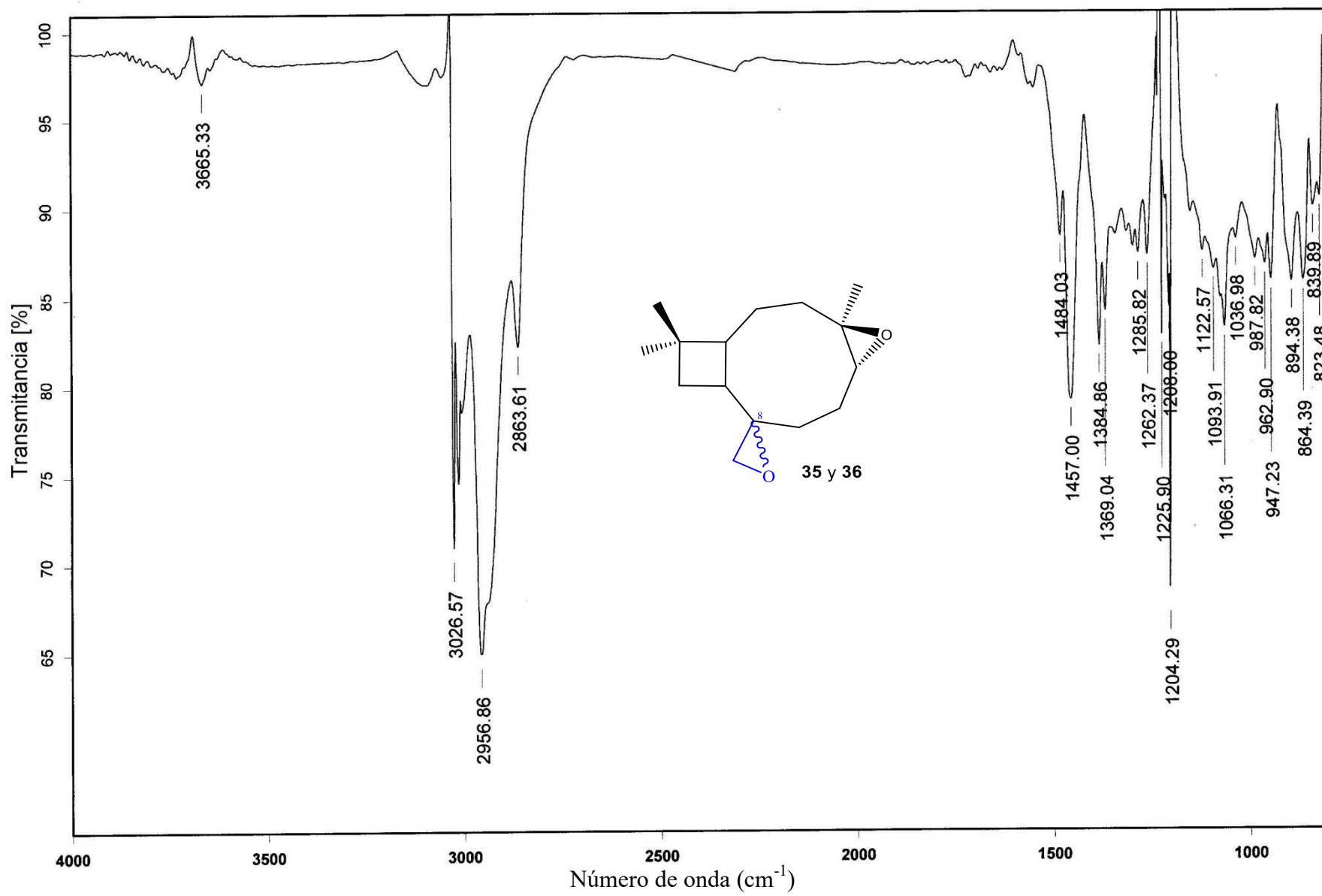
Espectro 15. RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) del 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofileno (**19**).



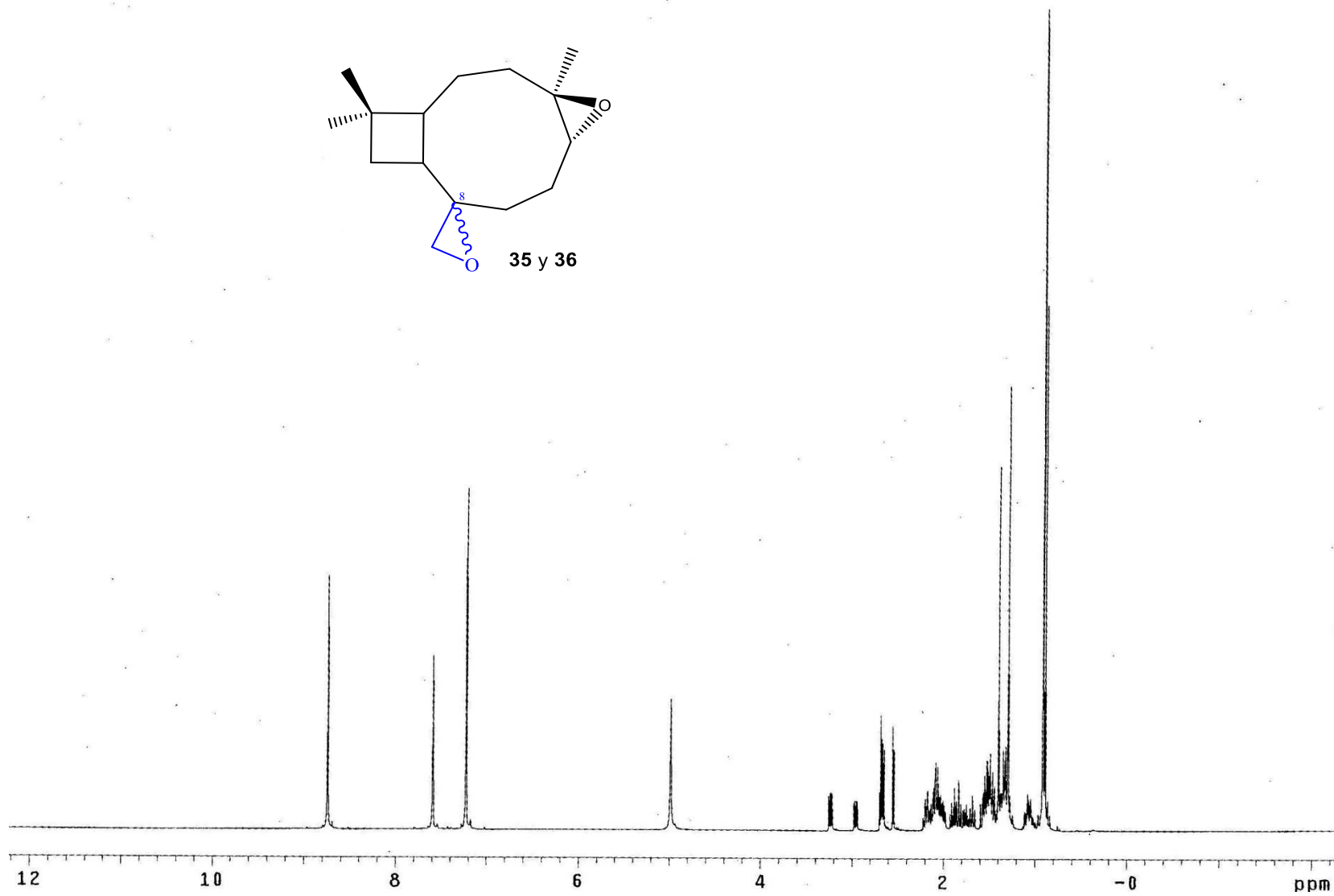
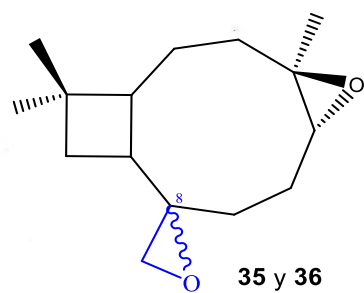
Espectro 16. RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) del 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofileno (**19**).



Espectro 17. IR (CHCl₃) de la mezcla de diepóxidos (**35**, **36**) de cariofileno.



Espectro 18. RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) de la mezcla de diepóxidos (**35**, **36**) del cariofileno.



Espectro 19. RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) de la mezcla de diepóxidos (**35**, **36**) del cariofileno.

