

Universidad Nacional de Córdoba – Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de San Juan – Facultad de Filosofía,

Humanidades y Artes

Trabajo de Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas

***FUNCIONALIZACIÓN DE SESQUITERPENOS NATURALES POR
BIOCATÁLISIS CON CÉLULAS ENTERAS DE
HONGOS FITOPATÓGENOS***

Daniela Bustos Crescentino

Córdoba, 2015

El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el marco del Doctorado Cooperativo, en el Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Filosofía, Humanidades y Artes, de la Universidad Nacional de San Juan y en el Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET) de la Universidad Nacional de Córdoba, a través de las becas de posgrado Tipo I y Tipo II otorgadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Virginia E. Sosa
U.N.C.

Dr. Daniel A. Bustos
U.N.S.J.

COMISIÓN DE TESIS

Dra. A. Mariel Agnese
U.N.C.

Dra. Laura Cervi
U.N.C.

Dr. Omar Baudino
U.N.S.J.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por las becas concedidas para llevar adelante el plan de trabajo.

A mis directores Dra. Virginia E. Sosa y Dr. Daniel A. Bustos por la orientación y el cariño que me brindaron durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Delia Pappano, Directora del Instituto de Ciencias Básicas de la FFHA de la UNSJ.

Al Dr. Rodolfo Lara y Dra. Ivana Orozco del Instituto de Investigaciones Mineras de la Facultad de Ingeniería de la UNSJ, por el asesoramiento técnico en las determinaciones por espectrometría UV visible.

Al Prof. Jorge Allendes, Prof. Mónica Morvillo, Lic. Marta Gaido, Dr. Eduardo Sanabria y Dra. Adriana Pacciaroni, por el apoyo y enriquecedoras discusiones académicas brindadas durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeras Patricia y Alejandra por todos los momentos compartidos, por su ayuda y por haberme brindado su amistad.

A mi mamá y mis hermanos por su amor y por haberme animado siempre a dar un paso más.

A mi papá por ser mi ejemplo a seguir sus pasos en el mundo de la ciencia.

A mis tres amores, mi esposo Rubén por apoyarme y acompañarme, y mis hijos Anita y Nico, quienes a pesar de su corta edad, siempre fueron fuente de inspiración para seguir adelante.

A Dios por iluminarme y guiarme cada día.

Y a todos aquellos que de alguna manera han colaborado para llevar a cabo este trabajo.

*Después de escalar una
montaña muy alta,
descubrimos que hay
muchas otras montañas
por escalar.*

Nelson Mandela

A mi esposo e hijos

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------------|--|
| AcOEt | Acetato de etilo |
| BHA | Butilhidroxianisol |
| BHT | Butilhidroxitolueno |
| CC | Cromatografía en columna |
| CCD | Cromatografía en capa delgada |
| CCDP | Cromatografía en capa delgada preparativa |
| CH₂Cl₂ | Diclorometano |
| CPR | Citocromo P450 reductasas |
| CYP | Citocromo P450 |
| DMF | N,N-dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPH | Difenilpicrilhidrazilo |
| EP | Eter de petróleo |
| EROs | Especies reactivas de oxígeno |
| EtOH | Etanol |
| GGPP | 2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,geranilgeranilpirofosfato |
| HMBC | Heteronuclear Multiple-Bond Correlation |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Correlation |
| Hz | Hertz |
| IR | Espectroscopía Infrarroja |
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento expresada en Hz |
| <i>m/z</i> | Relación masa/carga |
| M⁺ | Ión molecular |
| Me₂CO | Acetona |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |

RESUMEN

El siguiente trabajo de tesis describe la transformación microbiana de tres sesquiterpenos naturales: (-)-ambroxido (**1.1**), (-)- α -santonina (**1.2**) y (-)-achalensolido (**1.3**). Estos sustratos se sometieron a biotransformaciones utilizando enzimas presentes en células enteras de hongos fitopatógenos. Además, se comparó la bioactividad de los compuestos de partida con la de los productos obtenidos.

La metodología general del trabajo fue una técnica estándar de dos etapas con células enteras de hongos fitopatógenos. En la primera se produjo la activación del microorganismo seleccionado y en la segunda la biotransformación del sustrato.

De la biotransformación de **1.1** con *Fusarium verticillioides* en medio de cultivo papa glucosado se obtuvieron tres metabolitos 3 β -hidroxiambroxido (**4.1**), 6 β -hidroxiambroxido (**4.2**) y 1 β -hidroxiambroxido (**4.10**).

El sustrato **1.2** fue incubado en medio Sabouraud con *Cunninghamella* spp. obteniendo el compuesto 8 β -hidroxi- α -santonina (**6.1**).

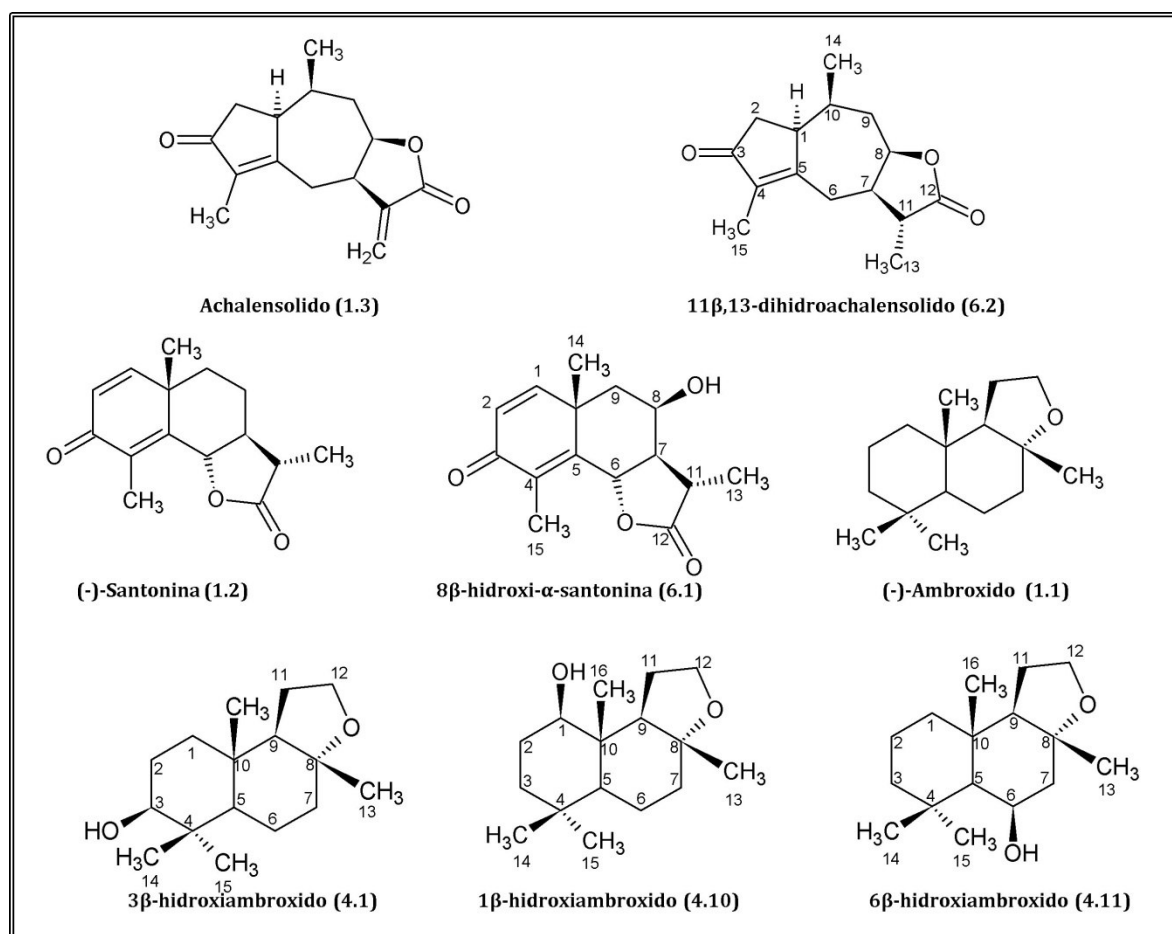
El compuesto **1.3** se incubó en medio Papa Glucosado con *Penicillium* spp. y *Rhizopus* spp. lo que condujo, en ambos casos, al metabolito 11 α -metilachalensolido (**6.2**).

En todos los casos se lograron reacciones de funcionalización o modificación estructural regio y estereoselectivas.

En cuanto a los bioensayos, todos los metabolitos mostraron una citotoxicidad menor que la de los sustratos de partida frente al organismo *Artemia persimilis*.

Para el ensayo de capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH, los compuestos obtenidos **6.1** y **4.10** demostraron ser más activos que los compuestos de partida.

En cuanto a la actividad antibacteriana determinada, *Staphylococcus aureus* presentó una sensibilidad intermedia frente a los compuestos **1.2** y **6.2**; mientras que *Pseudomonas aeruginosa* mostró una sensibilidad levemente mayor frente al compuesto **6.2**.



INDICE

| | |
|--|------------|
| I.INTRODUCCIÓN..... | 11 |
| II.OBJETIVOS..... | 17 |
| III.1. MARCO CONCEPTUAL..... | 18 |
| III.1.1. Aspectos generales de las biotransformaciones..... | 18 |
| III.1.2. Sustratos..... | 23 |
| III.1.2.1. Generalidades de los sustratos para ser biotransformados..... | 23 |
| III.1.2.2. Características de los sustratos utilizados en este trabajo..... | 26 |
| III.1.3. Microorganismos..... | 33 |
| III.1.3.1. Características generales..... | 33 |
| III.1.3.2. Clasificación de los hongos..... | 34 |
| III.1.3.3. Hidroxilación Microbiana..... | 37 |
| III.1.4. Bioensayos..... | 39 |
| III.1.4.1. Capacidad antioxidante..... | 40 |
| III.1.4.2. Actividad citotóxica..... | 43 |
| III.1.4.3. Actividad antimicrobiana..... | 44 |
| III.2. FUNDAMENTOS DEL TRABAJO..... | 46 |
| IV. ANTECEDENTES..... | 56 |
| IV.1. Antecedentes de biotransformaciones de los sustratos..... | 56 |
| IV.2. Antecedentes de actividades biológicas..... | 61 |
| IV.3. Antecedentes de biotransformaciones con los hongos utilizados en este trabajo..... | 64 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 77 |
| IV.1. Sustratos y Disolventes..... | 77 |
| IV.2. Microorganismos..... | 77 |
| IV.3. Preparación de los medios de cultivo..... | 77 |
| IV.4. Técnicas de Biotransformaciones..... | 78 |
| IV.4.1 Screening preliminar con células en crecimiento con tres medios de cultivo..... | 78 |
| IV.4.2. Biotransformación en escala preparativa..... | 81 |
| IV.4.3. Seguimiento de la biotransformación..... | 82 |
| IV.4.4. Obtención de los metabolitos..... | 82 |
| IV.4.5. Purificación de los metabolitos..... | 83 |
| IV.5. Bioensayos..... | 83 |
| IV.5.1 Capacidad antioxidante..... | 83 |
| IV.5.2. Actividad citotóxica..... | 85 |
| IV.5.3. Actividad antibacteriana..... | 88 |
| VI. RESULTADOS y DISCUSIONES..... | 90 |
| VI.1. Escaneo preliminar de las biotransformaciones..... | 90 |
| VI.2. Biotransformación en escala preparativa de (-)-α-Santonina (1.2) con el hongo <i>Cunninghamella</i> spp..... | 92 |
| VI.2.1. Obtención y purificación del metabolito obtenido..... | 92 |
| VI.2.2. Análisis espectroscópico del metabolito obtenido..... | 93 |
| VI.3. Biotransformación en escala preparativa de (-)-Achalensolido (1.3) con los hongos <i>Penicillium</i> spp y <i>Rhizopus</i> spp..... | 96 |
| VI.3.1. Obtención y purificación del metabolito obtenido..... | 96 |
| VI.3.2. Análisis espectroscópico del metabolito obtenido..... | 97 |
| VI.4. Biotransformación en escala preparativa de (-)-Ambroxixo (1.1) con el hongo <i>Fusarium verticillioides</i>..... | 100 |
| VI.4.1. Obtención y purificación del metabolito obtenido..... | 100 |

| | |
|--|------------|
| VI.4.2. Análisis espectroscópico de metabolitos obtenidos..... | 102 |
| <i>VI.5. Resultados de la determinación de actividades biológicas.....</i> | <i>108</i> |
| VI.5.1. Determinación de citotoxicidad..... | 108 |
| VI.5.2. Determinación de actividad antioxidante..... | 110 |
| VI.5.3. Determinación de actividad antibacteriana..... | 123 |
| VII. CONCLUSIONES FINALES..... | 127 |
| PROYECCIONES..... | 133 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 134 |

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la humanidad, los microorganismos han sido de enorme importancia social y económica. Sin siquiera darse cuenta de su existencia, desde muy temprano en la historia el hombre los estaba utilizando en la producción de alimentos y bebidas. Los Sumerios y Babilonios practicaban la fabricación de cerveza antes de 6000 a.C., las referencias a la elaboración del vino se puede encontrar en el libro del Génesis y los egipcios utilizaban la levadura para fabricar el pan (Liese y col., 2006).

La historia de biotransformaciones microbianas está estrechamente asociada con la producción de vinagre que data de alrededor del año 2000 a.C. La producción de vinagre es quizás el ejemplo más antiguo y más conocido de la oxidación microbiana, que puede ilustrar algunos de los acontecimientos más importantes en el campo de biotransformaciones por células vivas (Liese y col., 2006).

En 1858, Pasteur fue el primero en demostrar la resolución microbiana del ácido tartárico. Realizó la biotransformación de la sal de amonio del ácido tartárico racémico, mediada por el hongo *Penicillium glaucum*. La misma dio ácido (-)-tartárico (**Figura I.1**). Ésta fue también la primera vez que se utilizó un método donde los microorganismos degradaron un enantiómero de un racemato, dejando intacto el otro (Liese y col., 2006).

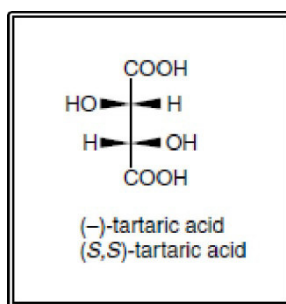


Figura I.1: Producto obtenido por Pasteur de la primera reacción de resolución.

En 1886, Brown, confirmó los hallazgos de Pasteur y le dio el nombre de *Bacterium xylinum* al agente causal de la producción de vinagre. También descubrió que podía oxidar propanol a ácido propiónico y manitol a fructosa (**Figura I.2**) (Liese y col., 2006).

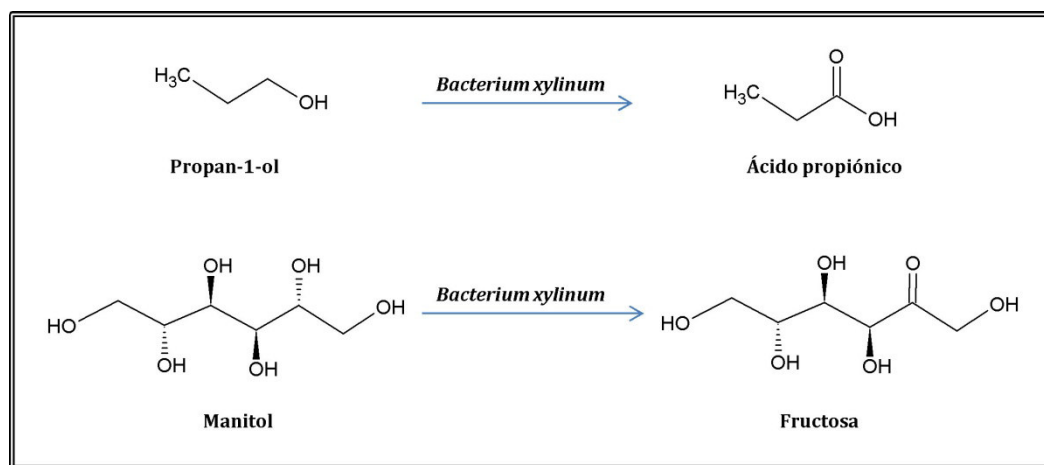


Figura I.2: Reacciones catalizadas por *Bacterium xylinum*, microorganismo productor del vinagre.

En 1897 Buchner informó que extractos libres de células preparados a partir de células de levadura mezcladas con arena podían llevar a cabo reacciones de fermentación alcohólica (degradación de la glucosa en etanol y dióxido de carbono). Esto inició el uso de células en reposo para las biotransformaciones (Liese y col., 2006).

Durante la última parte del siglo diecinueve Bertrand inició un enfoque sistemático de las transformaciones microbianas y a la vuelta del siglo se habían encontrado las siguientes reacciones: *Oxidación*: etanol a acético, glucosa a ácido glucónico; *Reducción*: ácido málico a ácido succínico, fructosa a manitol; *Hidrólisis*: taninos a ácido gálico, di- y tri-sacáridos a los monosacáridos constituyentes; *Resolución de mezclas racémicas* de: ácido tartárico (los famosos experimentos de Pasteur), ácidos láctico, mandélico y glicérico (Bu'Lock & Kristiansen, 1991).

En 1953, Peterson y col. informaron que *Rhizopus arrhizus* podía convertir progesterona en 11 α -hidroxiprogesterona (**Figura I.3**), que se usó como un intermediario en la síntesis de la cortisona. (Liese y col., 2006).

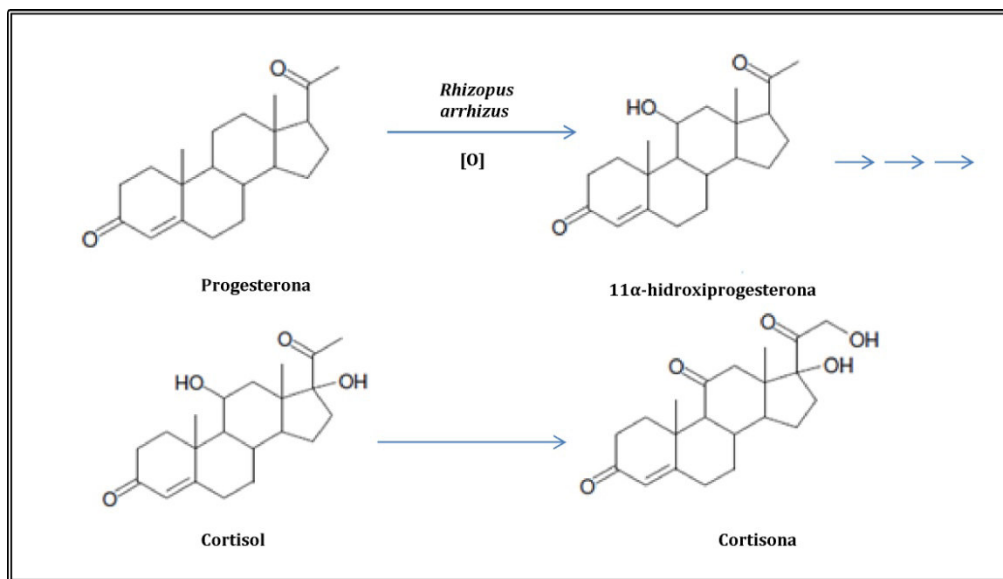


Figura I.3: 11 α -hidroxilación microbiana de la progesterona.

En la última década, las biotransformaciones han recibido un interés creciente y actualmente, se ha constituido en una de las áreas más promisorias de investigación científica, debido a su posible aplicación en la obtención de materias primas y productos útiles en diferentes procesos industriales y en

sectores tan trascendentes como el farmacéutico, el químico, el de los alimentos y el agrícola; de ahí que en el mundo se destinen importantes inversiones para su desarrollo (Velasco y col., 2009).

Es necesario, ahora detenerse por un momento en el concepto de biotransformación. Los procesos de biotransformación se definen como la utilización de sistemas biológicos completos (organismos superiores, microorganismos, plantas, algas, etc.) o sus partes (órganos, células o enzimas) para realizar modificaciones estructurales sobre compuestos exógenos. (Correa Navarro, 2009)

La diferencia esencial entre fermentación y biotransformación, es que en una fermentación hay varios pasos catalíticos entre el sustrato y el producto, mientras que hay sólo una o dos en una biotransformación. La distinción está dada también, en el hecho de que las estructuras químicas del sustrato y el producto se parecen entre sí en una biotransformación, pero no necesariamente en una fermentación (Liese y col., 2006).

Las biotransformaciones se caracterizan por la versatilidad, eficiencia, regioselectividad, quimioselectividad y enantioselectividad de los procesos enzimáticos implicados; además, el metabolismo de los sustratos sometidos a biotransformación, ocurre bajo condiciones moderadas y con bajo consumo de energía; los reactivos y disolventes que se utilizan regularmente en estos procesos poseen baja toxicidad y, por ello, son considerados amigables con el ambiente y se pueden ubicar en el campo de la Biotecnología Blanca o la Química Verde (Correa Navarro, 2009).

Los productos obtenidos mediante procesos de biotransformación se consideran naturales lo que les aporta un valor agregado con respecto a sus contrapartes sintéticas, especialmente cuando son agregados como materias primas para la alimentación o cuidados de la salud (Castellanos, 2007).

Además, por biotransformación se pueden obtener en un único proceso uno o varios productos, que de otra manera requiere varias etapas si se utilizan las metodologías de síntesis clásicas (Castellanos, 2007).

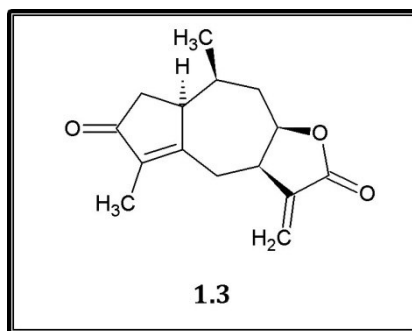
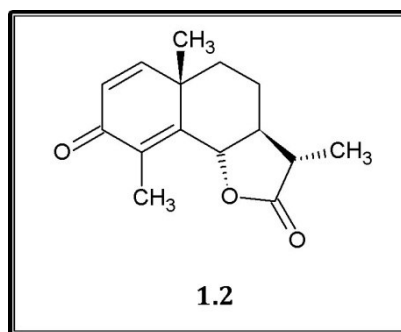
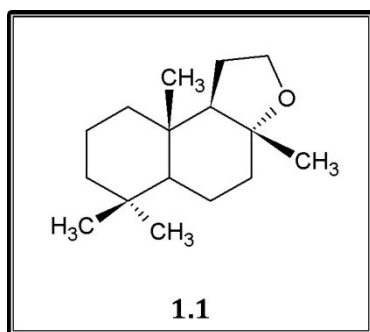
La aprobación y el uso de drogas en seres humanos requieren rigurosos estudios para establecer su seguridad y eficacia. La evaluación de la seguridad y la eficacia de cualquier fármaco necesita del conocimiento sobre el metabolismo de drogas. La comprensión del metabolismo de fármacos desempeña un papel importante en el desarrollo de nuevas drogas que se pueden evaluar posteriormente, para determinar sus actividades biológicas, farmacológicas y toxicológicas. El metabolismo comprende una serie de transformaciones enzimáticas que conduce a la alteración química de un compuesto que es, la conversión del mismo en compuestos útiles para el organismo (anabolismo) o a metabolitos más polares e hidrófilos para poder ser excretados fácilmente del cuerpo en comparación a las sustancias lipofílicas (catabolismo). El uso de microorganismos como modelos del metabolismo de los mamíferos está bien documentado. Por lo tanto, los microorganismos se pueden utilizar como fábricas metabólicas para producir compuestos, que por medios sintéticos resulta en procesos tediosos y costosos (Swathi y col., 2012).

Los microorganismos son capaces de transformar una amplia variedad de compuestos orgánicos, tales como terpenos, hidrocarburos, alcaloides, esteroides, antibióticos y aminoácidos en sus metabolitos. Muchos compuestos con propiedades terapéuticas de interés industrial se han obtenido mediante transformación microbiana (Choudhary y col., 2006).

Entre la gran diversidad de organismos que son empleados en biotransformaciones, los hongos fitopatógenos constituyen una agrupación interesante debido al gran número de géneros y especies que la conforman y a

la variedad de procesos enzimáticos que es posible alcanzar en ellos. (Correa Navarro, 2009).

Los compuestos (-)-ambroxido (**1.1**) (Shen y col., 2007), (-)- α -santonina (**1.2**) y achalensolido (**1.3**) (Oberti y col., 1983) son sesquiterpenos de origen natural, en general relativamente abundantes y de fácil obtención por métodos fitoquímicos y sintéticos.



Las lactonas sesquiterpénicas son una clase de sesquiterpenos encontradas fundamentalmente en las familias *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Lauraceae* y *Magnoliaceae* (Emerenciano y col., 1985).

Aún cuando estos sesquiterpenos naturales parecen no compartir un nicho en la naturaleza con hongos fitopatógenos, la transformación de **1.1**, **1.2** y **1.3** por la acción del potencial enzimático de estos hongos podría resultar en compuestos nuevos no presentes en la naturaleza y bioactivos.

Hay pocas investigaciones realizadas sobre actividades biológicas de estos compuestos y sus metabolitos derivados, por lo que la evaluación comparativa de bioensayos podría ser una contribución en la búsqueda de nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico e industrial, a partir de una fuente económica y no contaminante como son las biotransformaciones.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo General

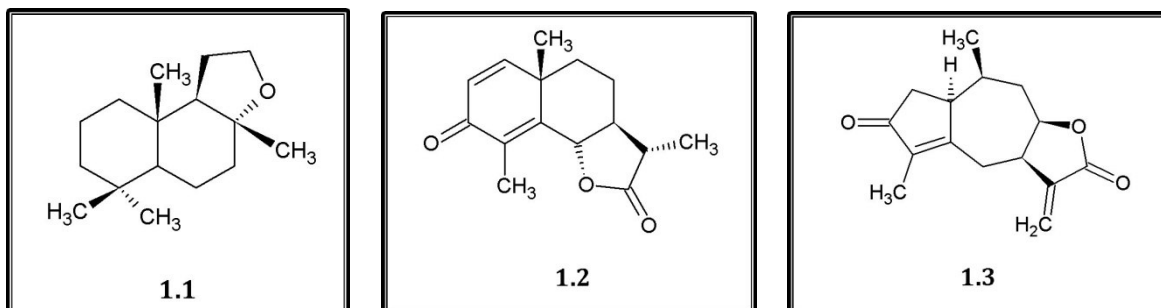
En el marco de lo expresado previamente, en este trabajo de tesis de doctorado se planteó acudir a la capacidad catalítica de las enzimas de hongos fitopatógenos, para funcionalizar o modificar estructuralmente sustratos orgánicos de origen natural y comprobar si las bioreacciones produjeron cambios en la actividad biológica de los compuestos de partida.

II.1. Objetivos Específicos

- Obtener metabolitos derivados, de estructura novedosa o conocida, a partir de la transformación de los sesquiterpenos naturales (-)-ambroxido (**1.1**), (-)- α -santonina (**1.2**) y achalensolido (**1.3**) por medio de las enzimas presentes en células enteras de hongos fitopatógenos
- Separar y purificar los metabolitos obtenidos mediante el empleo de distintos métodos cromatográficos y determinar sus estructuras por métodos espectroscópicos.
- Evaluar comparativamente las actividades antioxidante, citotóxica y antimicrobiana de los metabolitos obtenidos y de los compuestos de

partida, relacionándolos a los compuestos control seleccionados para cada ensayo en particular.

- Establecer las posibles relaciones entre estructura y actividad biológica para los productos ensayados.



III.1. MARCO CONCEPTUAL

III.1. 1. Aspectos generales de las biotransformaciones

Las biotransformaciones se están convirtiendo cada vez más en una herramienta importante en la modificación estructural y en el estudio del metabolismo de compuestos orgánicos naturales o sintéticos (Li y col., 2006).

Según Hanson y Truneh (1996), los procesos de biotransformación al ser comparados con los métodos clásicos de la química presentan varias ventajas, entre las que se destacan:

- ✚ Las reacciones no solo son regio y estereoespecíficas, sino que también se pueden obtener productos quirales enantioespecíficos a partir de mezclas racémicas.
- ✚ Las condiciones de trabajo en los procesos de biotransformación son en condiciones ambientales biológicas.

- ✚ En la mayoría de los casos no se requiere la protección de grupos funcionales específicos del sustrato.
- ✚ Las razones que gobiernan la regiospecificidad difieren de las que controlan los procesos químicos, por ello, se pueden obtener biotransformaciones sobre centros químicamente no reactivos.
- ✚ Algunos procesos son más económicos y los productos se obtienen de manera más directa que en los procesos químicos análogos.
- ✚ Las reacciones generalmente ocurren bajo condiciones menos contaminantes para el ambiente.
- ✚ Pueden evitarse también, reacciones secundarias y productos secundarios indeseables (Carballeira y col., 2009).

La aplicación más inmediata de las biotrasformaciones radica en la obtención de compuestos quirales y sintones aplicables a la síntesis asimétrica de moléculas de interés comercial tales como: medicamentos, intermediarios farmacéuticos, aditivos para alimentos, agroquímicos, entre otros (Correa Navarro, 2009).

Las células microbianas, de plantas o de animales pueden suministrar las enzimas para la transformación, pero los microorganismos superan a las células de las plantas y de los animales en varios aspectos. Su alta relación superficie-volumen les confiere un crecimiento rápido y altas velocidades de metabolismo, que conducen a la eficiente transformación de los sustratos que se les añaden (Bu'Lock y Kristiansen, 1991)

Otra gran ventaja es que, las células microbianas son más fáciles de desarrollar en un medio de cultivo. Esto es en parte el reflejo de la combinación de una pared celular delgada y resistente, dándole a las células microbianas

una gran fuerza mecánica. Esto las hace más resistentes que las células de animales y plantas a las diferentes técnicas de cultivo rigurosas. Además, el rango de sustratos que pueden ser metabolizados por células microbianas, es más extenso (Roberts y col., 1995).

Las enzimas son biocatalizadores que aceleran la reacción de la misma forma que un catalizador químico. La propiedad sobresaliente por la que los biocatalizadores son distinguidos favorablemente de los catalizadores químicos comunes (heteropoliácidos, metales como platino, níquel, cadmio, etc.) es su alta especificidad, no sólo respecto a la reacción que catalizan sino también respecto a la estructura e incluso la estereoquímica del sustrato que aceptan y el producto que forman. Además, se obtienen altas tasas de reacción bajo condiciones de reacción biológicas, debido a un descenso significativo de la energía de activación de las reacciones químicas en el complejo enzima-sustrato (Leuenberger, 1990).

La selectividad es un requisito esencial en la síntesis química orgánica. Por lo que la regioselectividad de las enzimas es un aspecto fundamental en biocatálisis, sin necesidad de grupos protectores. La biocatálisis es una poderosa herramienta no sólo para la síntesis regioselectiva y enantioselectiva de compuestos bioactivos, sino también para la generación de nuevos productos derivados, con mayor bioactividad y menos tóxicos (Li y col., 2007).

Existen básicamente dos estrategias para llevar a cabo biotransformaciones, o bien usando enzimas puras o parcialmente puras aisladas por el investigador o adquiridas de un distribuidor comercial, o utilizando células enteras (Leuenberger, 1990).

Lo desventajoso de trabajar con enzimas aisladas es que, la preparación de enzimas intracelulares aisladas puede ser costosa en términos, tanto de tiempo como de recursos, porque los pasos necesarios en la extracción y

purificación de enzimas de las células a menudo son trabajosos y resultan en producciones globales pequeñas de preparaciones de enzimas activas. Además, muchas enzimas potencialmente útiles son relativamente inestables fuera del ambiente celular en el que normalmente operan, debido a que estas enzimas son mantenidas en conformaciones restringidas pero altamente activas por una membrana específica que define un ambiente intracelular, y dicho conjunto multimacromolecular puede ser modificado o destruido por los procedimientos para su extracción. Consecuentemente, las mismas poseen poco valor como agentes para biotransformaciones si se extraen de las células fuente (Roberts y col., 1995).

Las enzimas puras son escasas y tienen un alto valor económico, razón por la cual se presenta una gran preferencia por los sistemas biológicos completos con lo que se favorece el crecimiento rápido y la formación de sistemas multienzimáticos (Correa Navarro, 2009).

Los microorganismos sirven también, como fuente de enzimas para uso en sistemas analíticos y las transformaciones microbianas juegan un papel importante en los estudios del metabolismo que deben acompañar a las evaluaciones clínicas de las drogas. Los “modelos microbianos” son útiles para predecir, y a veces necesarios para preparar, los metabolitos derivados de las drogas administradas a los animales y al hombre (Bu'Lock y Kristiansen, 1991).

Es decir entonces, que los “modelos microbianos del metabolismo de mamíferos” pueden ser definidos como el uso de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) para facilitar el estudio de biotransformaciones de xenobióticos en mamíferos, incluyendo el hombre (Kouzi, 1991).

En 1974, Smith y Rosazza introdujeron primero el concepto de utilizar microorganismos como “modelos microbianos del metabolismo de mamíferos”. Mientras llevaban a cabo la hidroxilación microbiana de sustratos aromáticos,

notaron similitud entre metabolitos microbianos y aquellos obtenidos de sistemas de mamíferos. Ferris y col. (1973) utilizaron el hongo *Cunninghamella bainieri* para metabolizar compuestos aromáticos y para obtener un número de metabolitos similares a aquellos detectados en sistemas de mamíferos. Ellos sugirieron que los hongos exhibían “monooxigenasas” con actividad similar a la de los microsomas del hígado. Por lo tanto, la suposición detrás del concepto de modelo microbiano, introducido por Smith y Rosazza es el hecho que hongos y mamíferos son ambos organismos eucariotas y que probablemente comparten una maquinaria enzimática muy similar para la mayoría de las funciones fisiológicas. Por lo tanto, se espera que el resultado del metabolismo xenobiótico, entre muchos otros procesos bioquímicos sea muy similar tanto en sistemas fúngicos como de mamíferos (Abourashed y col., 1999).

Los metabolismos microbianos muestran distintas ventajas que los hacen atractivos en caso de ser utilizados como modelos predictivos *in vitro* para estudios de metabolismo inicial. Las mayores ventajas son: a) de fácil diseño experimental, b) pueden producir cantidades significativas de metabolitos por bioconversiones a gran escala para determinar la estructura y realizar pruebas biológicas, c) la habilidad de los sistemas microbianos de ofrecer pasos de bioconversión simples y d) reducen costos sobre sistemas de mamíferos. Además, el número de animales de investigación necesarios para la evaluación de perfiles metabólicos de xenobióticos pueden ser significativamente reducidos cuando los microorganismos son usados como modelos predictivos. Una disminución en el número de animales usados será beneficiosa tanto para los puntos de vista económicos como humanitarios (Kouzi, 1991).

Otra faceta de las transformaciones microbianas abarca la degradación de los fungicidas, insecticidas y herbicidas. Aquí el objetivo no es preparar productos útiles, recuperables, sino sembrar áreas contaminadas con

microorganismos capaces de convertir sustancias contaminantes en compuestos inocuos, a veces anhídrido carbónico y agua, en un intento de mejorar el ambiente (Bu'Lock y Kristiansen, 1991). Este proceso es más comúnmente conocido como biorremediación.

Como hemos destacado, en la bibliografía se han reportado innumerables biotransformaciones. Varias de ellas han sido aplicadas exitosamente en una escala preparativa e incluso industrial como alternativa a métodos químicos puros o incluso como el único acceso a determinados productos útiles. La tecnología de biotransformación ha probado ser una herramienta útil adicional en síntesis orgánica (Leuenberger, 1990).

III.1.2. Sustratos

III.1.2.1. Generalidades de los sustratos para ser biotransformados

Las células de todos los organismos vivos, incluyendo microorganismos, representan ambientes acuosos, microambientes cerrados que han evolucionado para crecer exitosamente explotando los recursos naturales disponibles de la biosfera, que es por sí misma un macroambiente predominantemente acuoso. En la mayoría de los casos un buen crecimiento requiere que los microorganismos sean cultivados en medios líquidos acuosos. Consecuentemente, en cultivos con células enteras, a menos que se tomen medidas apropiadas, pueden haber dificultades en llevar a cabo biotransformaciones con sustratos altamente lipofílicos. Además, algunos compuestos xenobióticos, pueden ser tóxicos para la célula por encima de niveles de concentración relativamente bajos (Roberts y col., 1995).

Un compuesto orgánico es susceptible de biotransformación sólo si tiene acceso a la enzima relevante de un biocatalizador de célula entera. Esto no presenta problema para aquellas biotransformaciones catalizadas por enzimas secretadas fuera de la pared limitante por las células de los microorganismos. Sin embargo, para la mayoría de las biotransformaciones por células enteras, las enzimas relevantes están retenidas dentro de las células (Roberts y col., 1995).

Un prerrequisito para una biotransformación exitosa es el contacto entre el sustrato y la enzima. El sustrato ideal debe ser soluble en un medio acuoso y capaz de atravesar la membrana celular sin ejercer un efecto tóxico en el biocatalizador. Usualmente el sustrato se agrega al cultivo puro de un microorganismo como una solución concentrada estéril. La fase de crecimiento óptima para la alimentación y la concentración óptima del sustrato tienen que ser ambas determinadas experimentalmente (Leuenberger, 1990). Sin embargo, por razones prácticas y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en distintas publicaciones, en este trabajo se han seguido los antecedentes encontrados en la bibliografía, respetando un protocolo preestablecido (Abourashed y col., 1999).

Los compuestos para las biotransformaciones que son solubles en agua, con grupos funcionales ionizables o hidrofílicos, son relativamente fáciles de manejar y pueden ser agregados directamente a varios tipos de preparaciones de células enteras, dado que se encuentran en ambientes acuosos. Algunos problemas pueden surgir por encima de una concentración umbral con compuestos hidrofílicos, resultando en la toxicidad de algunos microorganismos a ciertos compuestos o a los cambios iónicos y de pH que acompañan dichas adiciones. Altos niveles de soluto también pueden disminuir la disponibilidad de oxígeno para los cultivos en crecimiento. Los sustratos que son tóxicos pueden

agregarse gradualmente durante el período en que la concentración de la enzima relevante es máxima en la célula (Roberts y col., 1995).

Los compuestos hidrofóbicos pueden presentar problemas similares para las biotransformaciones, los que pueden ser resueltos incrementando la alimentación al cultivo del microorganismo de forma gradual. Sin embargo, el mayor problema con dichos sustratos a menudo es la accesibilidad al biocatalizador. El método más común de agregar sustratos hidrofóbicos es una solución en el volumen mínimo posible de un solvente orgánico miscible en agua. Dicho solvente orgánico debe tener preferentemente baja toxicidad para el biocatalizador microbiano elegido. Esto es particularmente importante cuando se utilizan cultivos en crecimiento. Los solventes que más a menudo muestran ser apropiados incluyen, N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol y acetona. También es posible, en algunos casos, usar surfactantes como Tween 80, Triton x-100 y Nonidet P40 como sistemas alternativos (en lugar de solventes orgánicos) para agregar sustratos hidrofóbicos, pero tienen la desventaja que son menos efectivos para llevar a cabo biotransformaciones equivalentes. Los solventes orgánicos y detergentes sirven para incrementar la permeabilidad de las células microbianas (Roberts y col., 1995).

Otras técnicas que han probado ser exitosas para agregar algún sustrato hidrofóbico en preparaciones de célula entera incluyen sonicación, adsorción en polielectrolitos y, en el caso de algunos sustratos sólidos, molienda fina. La sonicación es una técnica capaz de producir micro-emulsiones que pueden ayudar significativamente a la dispersión del sustrato en ambientes acuosos. La sonicación, como solventes orgánicos y surfactantes, también pueden ser usados para permeabilizar cultivos en reposo. La molienda, es una técnica originalmente desarrollada para sustratos esteroides, y ha sido útil para varios

otros sustratos hidrofóbicos. El sustrato se disminuye a partículas de tamaño fino usando una técnica mecánica apropiada (Roberts y col., 1995).

III.1.2.2. Características de los sustratos utilizados en este trabajo

Los monoterpenos y sesquiterpenos son los constituyentes principales de los aceites esenciales (aquellos de frutas cítricas, hierbas y especias). Los aceites esenciales se encuentran, entre otros, en células glandulares especiales sobre la superficie de la hoja y tienen numerosas funciones ecológicas en el reino vegetal, tales como actuar como agentes alelopáticos, repelentes o atractores en interacciones planta-planta, o planta-patógeno/herbívoro. Otras funciones son en la defensa y cicatrización de heridas de algunas especies de pinos o incrementando la termotolerancia en plantas. Las familias de plantas particularmente ricas en aceites esenciales incluyen las Apiaceae, Asteraceae, Labiatae, Myrtaceae, Pinaceae, Rosaceae y Rutaceae (Harborne, 1998).

Los monoterpenos se forman por el acoplamiento de dos unidades de isopreno (**Figura III.1**).

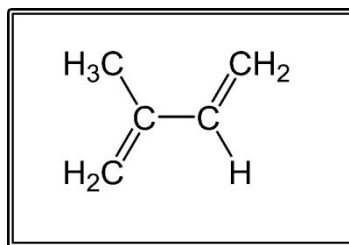


Figura III.1: Isopreno

Se conocen más de mil monoterpenos: los de estructura “regular” comunes en los aceites esenciales, y otros de estructura “irregular” que

participan en la formación de piretrinas y en la composición de ciertos aceites esenciales de Asteraceae (**Figura III.2**). Algunos de ellos conocidos como iridoides se encuentran excepcionalmente en el reino animal, raramente en hongos y como compuestos halogenados en algas.

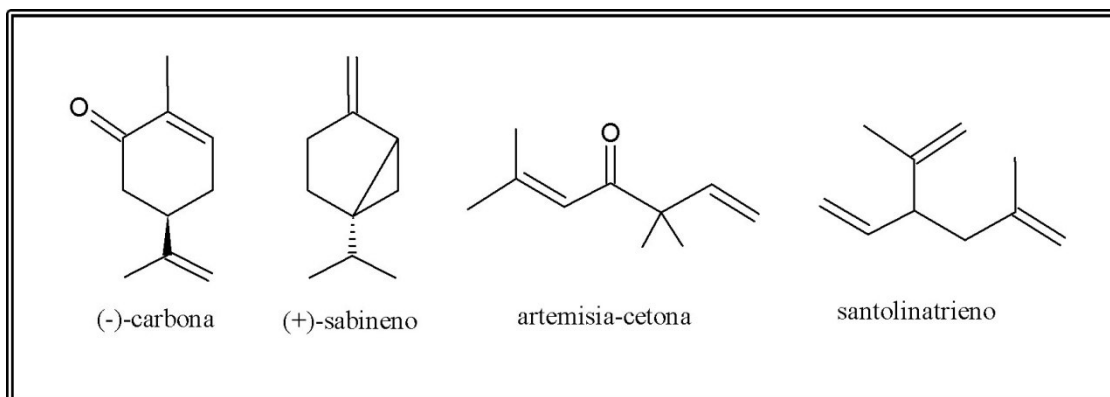


Figura III.2: Algunos ejemplos de monoterpenos “regulares” e “irregulares”.

Tal como los monoterpenos, los sesquiterpenos cuya estructura se basa en la unión de tres unidades de isopreno; se agrupan químicamente, en diferentes grupos de acuerdo al esqueleto carbonado básico. Entre los más comunes están los acíclicos como farnesol, monocíclicos como el γ -bisaboleno o bicíclicos como el β -selineno y el carotol (**Figura III.3**).

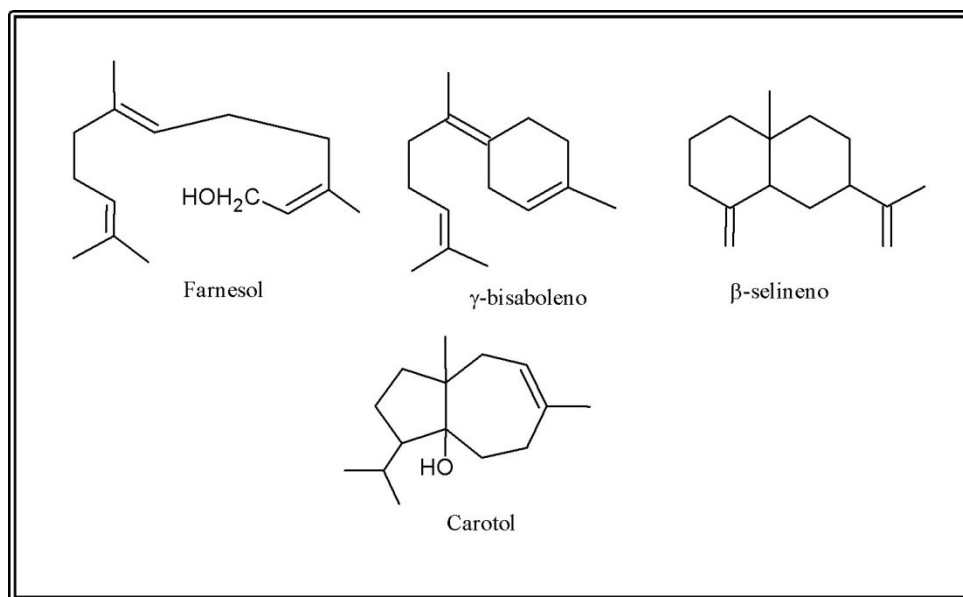


Figura III.3: Algunos ejemplos de compuestos sesquiterpénicos

Sin embargo dentro de cada grupo hay muchos compuestos conocidos diferentes; en efecto, de acuerdo a datos recientes hay varios miles de sesquiterpenoides con estructura bien definida perteneciendo a unos 200 tipos de esqueletos. Entre estos se pueden mencionar a la xantinina (**Figura III.4**), presente en el cadillo, *Xanthium pennsylvanicum*, que tiene un rol no claramente definido en la fisiología de las plantas como antagonista de auxinas. Esta representa un importante grupo de sesquiterpenos que tienen anillo lactónico, los cuales están ampliamente distribuidos en la familia Compositae (Harborne, 1998).

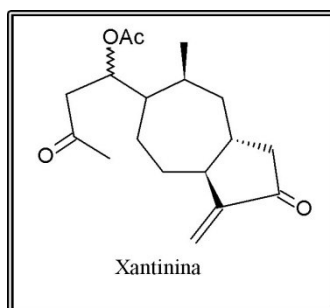


Figura III.4: Ejemplo de lactona sesquiterpénica

Por su parte los diterpenos constituyen un vasto grupo de compuestos con veinte átomos de carbono, originándose a partir del metabolismo del *2E,6E,10E-geranilgeranilpirofosfato* (GGPP). Se encuentran en algunos insectos y en varios organismos animales y están especialmente distribuidos en plantas. Algunos son más ubicuos como las giberelinas, mientras que otros tienen una distribución más limitada. Son particularmente abundantes en los órdenes Lamiales y Asterales y más dispersos en las Gentianales, Geraniales y Fabales (Fridovich, 1986).

Las estructuras de los diterpenos son muy variadas y dependen estrictamente de su biogénesis. Pueden ser acíclicos, aunque no son los más comunes. Probablemente el único distribuido universalmente es el fitol, que está presente como la unión éster en la molécula de clorofila y otro totalmente lineal es el capsianosido (**Figura III.5**). Los cíclicos resultan de la ciclación del precursor GGPP que conduce a un macrociclo inestable, el cual se puede estabilizar, por ejemplo por formación de una estructura policíclica, entre los que podemos mencionar el taxano, esqueleto fundamental del taxol, un compuesto encontrado en el tejo de pacífico (*Taxus brevifolia* Nutt.), usado para tratar el cáncer de cuello de útero. Entre los diterpenos bicíclicos se pueden encontrar distintos grados de oxidación lo que hace posible la existencia de alcoholes como el manool y esclareol (**Figura III.5**), o éteres cíclicos como la forskolina y también lactonas (Fridovich, 1986).

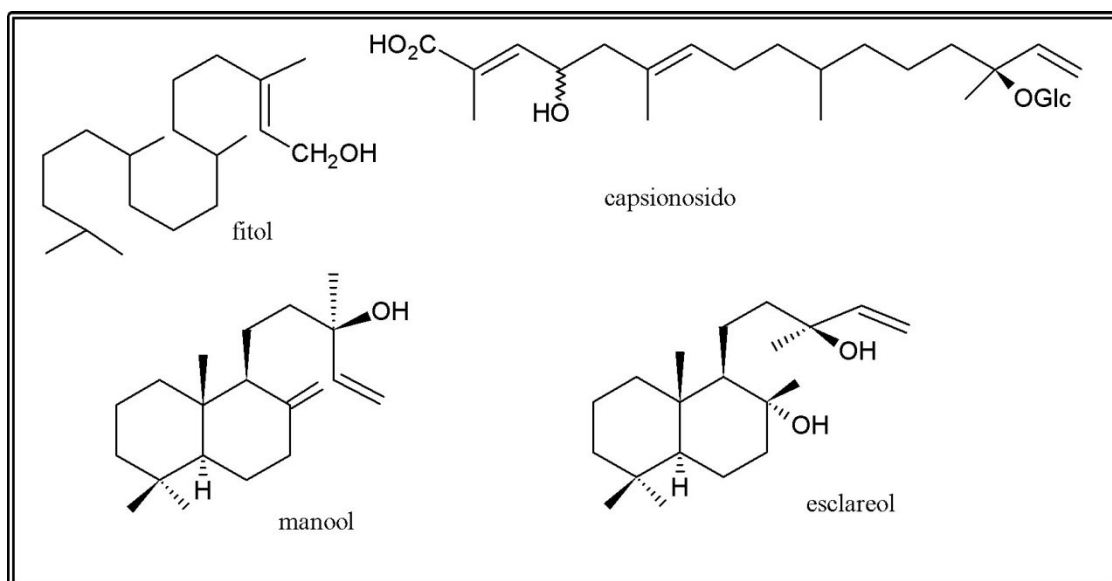


Figura III.5: Estructuras de algunos diterpenos acíclicos y bicíclicos

También hay diterpenos tóxicos como el grupo de las grayanotoxinas, un ejemplo de las cuales es la grayanotoxina-1 (**Figura III.6**), presente en muchas especies de *Rhododendron* y *Kalmia*. Otra clase importante de diterpenos son las gibberelinas, un grupo de hormonas que estimulan el crecimiento y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. El ácido gibberellico es un miembro de esta serie, pero más de cien de estos compuestos han sido encontrados hasta la actualidad (Fridovich, 1986).

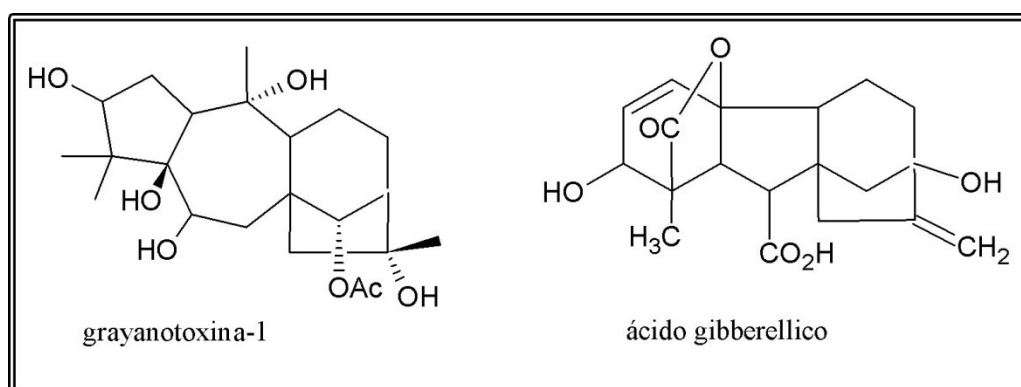


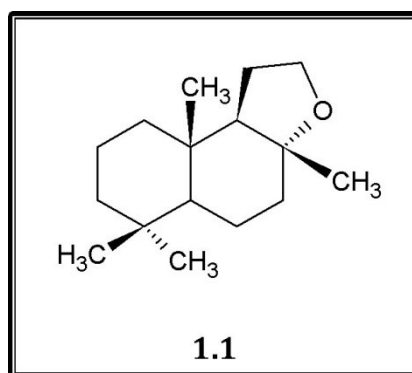
Figura III.6: Estructuras de diterpenos con actividad biológica

Las lactonas sesquiterpénicas forman un grupo muy numeroso de compuestos, con más de 1400 estructuras diferentes y son características en la familia de las Asteráceas, en la que se encuentran cerca del 90% de las estructuras conocidas. Fuera de ésta, se han aislado también en algunos géneros de Apiáceas, Magnoliáceas y Lauráceas, e incluso en algunas hepáticas y hongos (Llorens Molina y col., 2008).

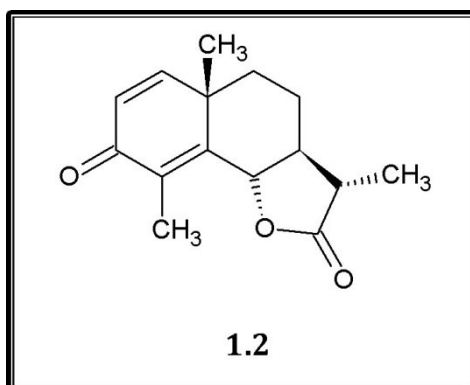
Teniendo en cuenta estas consideraciones previas, a continuación se describen los compuestos que han sido utilizados en este trabajo como material de partida para la biotransformación con hongos fitopatógenos.

(-)-Ambroxido (1.1) o Ambrox, si bien no es una lactona, tiene un heterociclo de cinco miembros, precursor por oxidación biológica de una estructura de lactona (Hanson y Truneh, 1996).

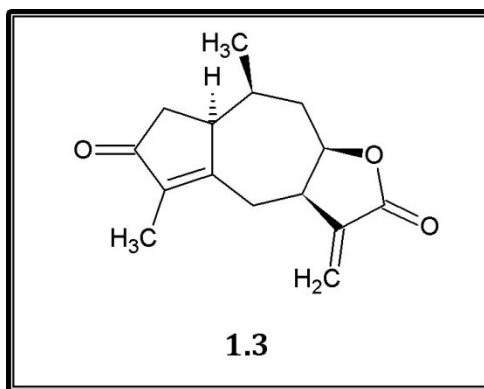
Tiene un carbono más que los sesquiterpenos, está relacionado estructuralmente a los diterpenos del labdano y, de hecho, ha sido sintetizado a partir de uno de ellos como es el esclareol (Barrero y col., 1993). (-)-Ambroxido (**1.1**) con un fuerte aroma similar al ámbar, es un compuesto de la oxidación de la ambreína, un componente del ambergris. El ambergris fue originalmente aislado del tracto gastrointestinal del cachalote y es uno de los perfumes más importantes de origen animal (Choudhary y col., 2004; Barton y col., 1994).



(-)- α -Santonina (1.2) es una lactona sesquiterpénica y se encuentra en varias especies del género *Artemisia*. Ha sido ampliamente utilizada como material de partida para obtener compuestos terpenoides bioactivos, conduciendo a la obtención de esqueletos de eudesmano y guaiano. Ha mostrado actividades biológicas tales como antihelmíntica, antiinflamatoria y antipiréticas (Ata y Nachtigall, 2004), citotóxica, antitumoral, inmunosupresora, insecticida y actividad anti-HIV (Yang y col., 2005).



El guaianolido **(-)-Achalensolido (1.3)** fue aislado de la especie *Stevia achalensis* y se obtiene con rendimientos del 0,79% de planta seca (Oberti y col., 1983). Hasta el momento no han sido informadas biotransformaciones con este compuesto. Todo lo que se reporta en este trabajo podría resultar novedoso cuando de este sustrato se trata.



III.1.3. Microorganismos

III.1.3.1. Características generales

El uso de hongos y bacterias como productores de biocatalizadores ha despertado un interés particular, en parte como consecuencia de su habilidad para producir grandes cantidades de biomasa y una amplia variedad de enzimas diferentes en corto tiempo (Velasco y col., 2009).

Los organismos que más se han explorado en las biotransformaciones por su capacidad transformadora, y por su eficiencia, son los hongos fitopatógenos, éstos, además de poseer la habilidad natural de modificar compuestos presentes en las plantas (por ejemplo, terpenos, coumarinas, estilbenos, fenilpropanos y flavonoides) en su proceso de colonización, y en algunas ocasiones para hacer frente a los mecanismos de defensa del huésped (desintoxicación de fitoalexinas); también pueden metabolizar algunas sustancias xenobióticas, tales como pesticidas y colorantes, entre otros. Los hongos en medio líquido pueden crecer, como micelio libre en una forma filamentosa, o permanecer en forma agregada como “bolitas” (pellets/floc). Estos patrones morfológicos regulan fuertemente la producción de metabolitos; sin embargo, los efectos que dichas variaciones morfológicas fúngicas pueden

tener sobre las biotransformaciones continúan siendo poco claras (Velasco y col., 2009).

Un reto importante para las transformaciones utilizando métodos biocatalíticos es determinar el microorganismo y las condiciones apropiadas, procediendo con el escaneo de varias cepas fúngicas (Cano y col., 2011).

Los avances en los escaneos, han abierto la puerta para crear a medida microorganismos para fines industriales. Estos avances están favoreciendo la introducción de los procesos biocatalizados por células enteras en la industria, denominada Biotecnología Blanca (Carballeira y col., 2009).

III.1.3.2. Clasificación de los hongos

A continuación se menciona la clasificación sistemática de los hongos fitopatógenos utilizados en este trabajo (**Tabla III.1**).

En las figuras III.7, III.8, III.9 y III.10 se muestran las características del micelio y conidióforos de los hongos seleccionados para las biotransformaciones a escala preparativa.

| DIVISION | SUBDIVISION | CLASE | SUBCLASE | ORDEN | FAMILIA | GÉNERO | ESPECIE |
|-----------------------|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--|-----------------------|--------------------|
| Zygomycota | Mucoromycotina | | | Mucorales | Mucoraceae | <i>Absidia</i> | spp |
| | | | | | | <i>Rhizopus</i> | |
| | | | | | Cunninghamellaceae | <i>Cunninghamella</i> | spp |
| Ascomycota | Pezizomycotina | Dothideomycetes | Pleosporomycetidae | Pleosporales | Pleosporaceae | <i>Alternaria</i> | <i>alternata</i> |
| | | | Dethideomycetidae | Capnodiales | Davidiellaceae | <i>Cladosporium</i> | spp |
| | | Eurotiomycetes | Eurotiomycetidae | Eurotiales | Trichocomaceae | <i>Aspergillus</i> | <i>flavus</i> |
| | | | | | | | <i>niger</i> |
| | | | | | | | <i>parasiticus</i> |
| | | | | | | | <i>terreus</i> |
| | | | | | | <i>Penicillium</i> | <i>citrinum</i> |
| | | | | | | | spp |
| | | Sordariomycetes | Sordariomycetidae | Sordiales | Chaetomiaceae | <i>Chaetomium</i> | spp |
| | | | | | | | |
| Hypocreomycetidae | Hypocreales | | Hypocreaceae | <i>Trichoderma</i> | spp | | |
| | | | Nectriaceae | <i>Fusarium</i> | <i>verticillioides</i> <i>oxysporum</i> | | |
| Saccharomycota | Saccharomycotina | Saccharomycetes | Saccharomycetidae | Saccharomycetales | Dipodascaceae | <i>Geotrichum</i> | spp |
| Basidiomycota | Pucciniomycotina | Pucciniomycetes | | Pucciniales | Melampsoraceae | <i>Melampsora</i> | <i>medusae</i> |

Tabla III.1: Clasificación sistemática de los hongos, tomada del material aportado por el curso de posgrado Biosíntesis y mecanismos de toxicidad de metabolitos fúngicos sobre células animales y vegetales, organizado por el Dr. Martín Theumer, Departamento de Bioquímica Clínica de la FCQ, UNC.

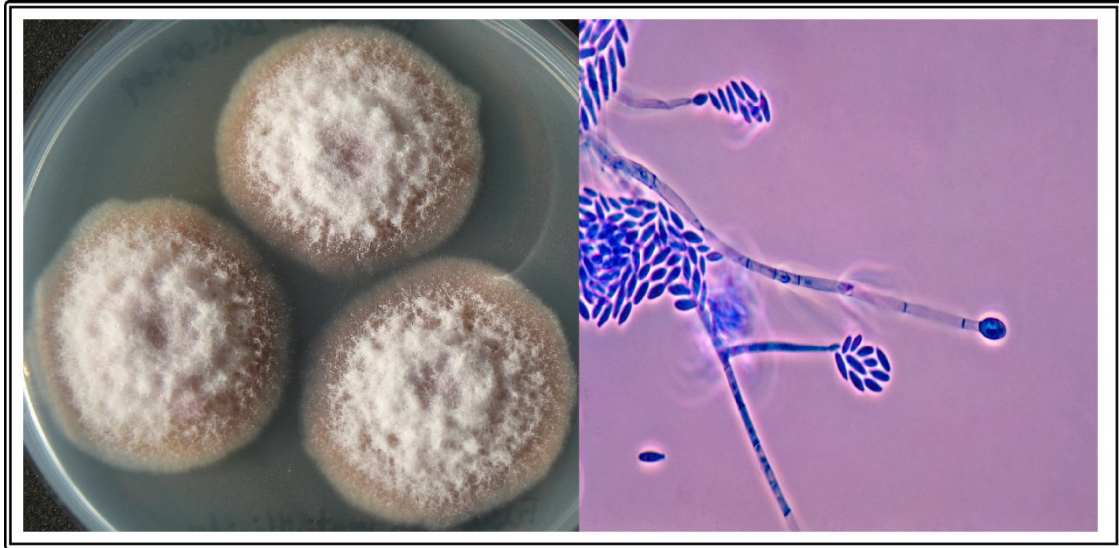


Figura III.7: Micelio y conidióforos de *Fusarium verticillioides*.

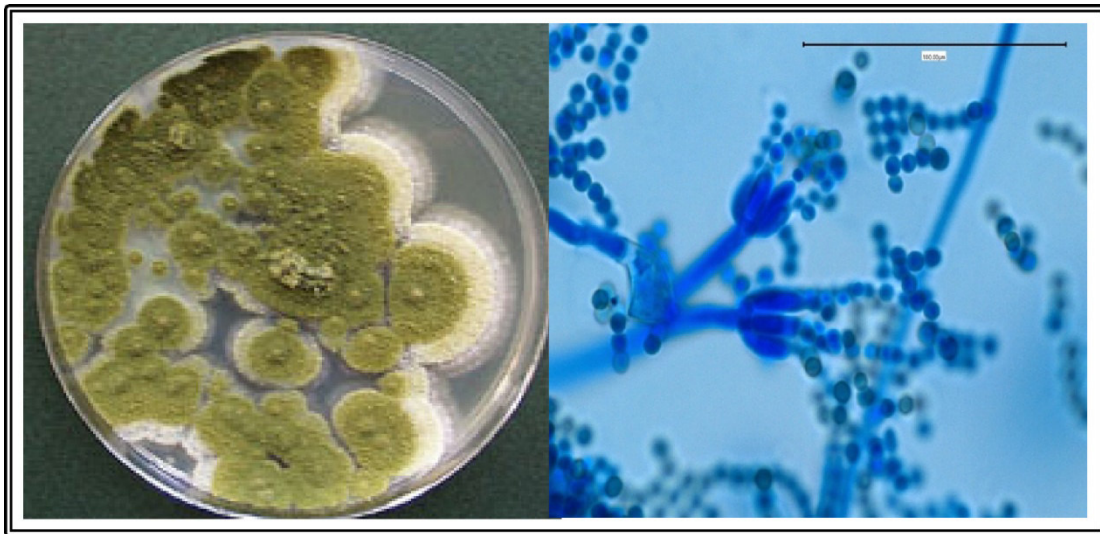


Figura III.8: Micelio y conidióforos de *Penicillium* spp.

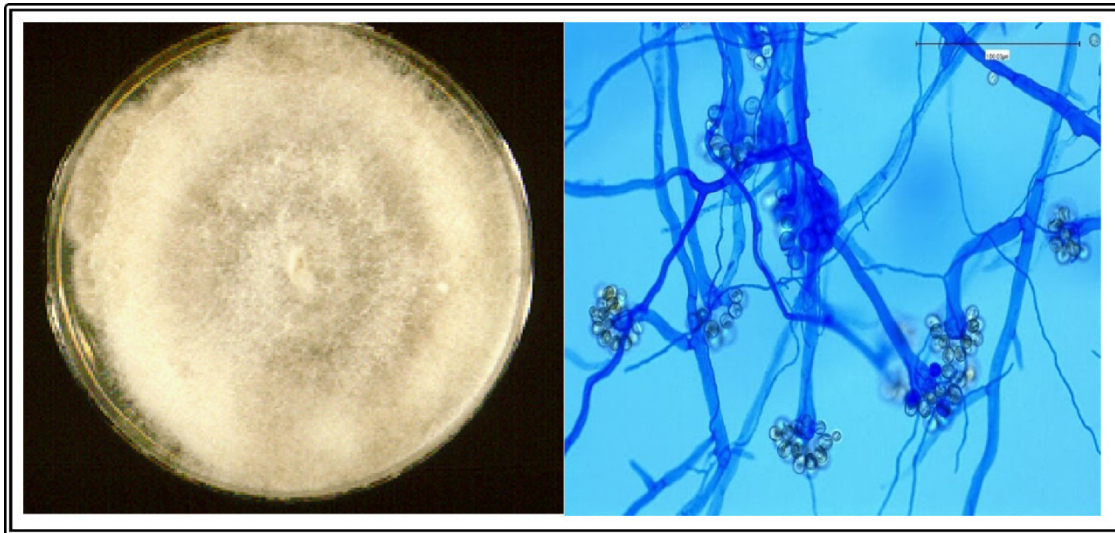


Figura III.9: Micelio y conidióforos de *Cunninghamella* spp.

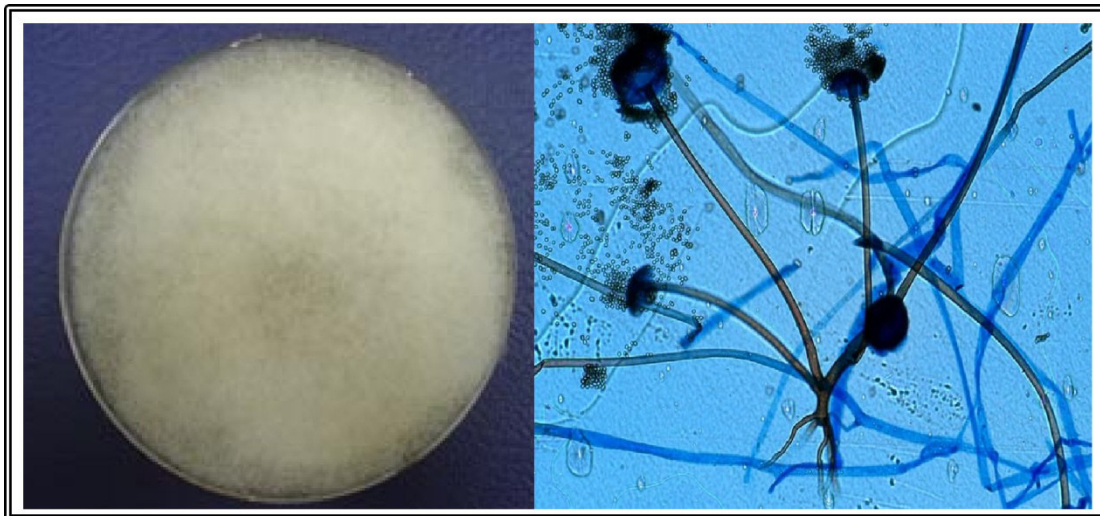


Figura III.10: Micelio y conidióforos de *Rhizopus* spp.

III.1.3.3. Hidroxilación Microbiana

Como se mencionó anteriormente una de las ventajas de la biocatálisis es la funcionalización de átomos de carbono no reactivos por vía química. La

funcionalización por oxidación de este tipo de átomos de carbonos no reactivos, lo cual es a menudo un paso clave en la síntesis orgánica, mediante el método tradicional está plagada de numerosos inconvenientes, tales como oxidantes a base de metales tóxicos, reacciones secundarias no deseadas, y numerosas dificultades para llevarlas a cabo de una manera regio-y estereoselectiva. Muchos de estos inconvenientes pueden evitarse mediante el uso de métodos biológicos, en particular en aquellos casos en que se requiere estereoselectividad (Dalton, 1980; Schewe y col., 2011).

Particularmente, la hidroxilación de hidrocarburos es una de las biotransformaciones más útiles, y en general, la reactividad relativa de átomos de carbono en la hidroxilación microbiana sigue el orden secundario > terciario > primario (Mansuy, 1990; Faber, 1997).

Prácticamente cualquier carbono no reactivo puede ser hidroxilado por un microorganismo (Abraham, 1994; Gouiric y col., 2004; Allendes y col., 2011).

Cuando un compuesto es incubado con ciertos microorganismos, puede ser insertado un grupo hidroxilo en un sitio que es inaccesible para otras funcionalidades. Esta habilidad de los microorganismos de hidroxilar compuestos en sitios “químicamente inactivos” es una herramienta sintética sumamente útil. Para estas transformaciones normalmente se usa el organismo intacto, porque muchos de los sistemas de enzimas involucrados están unidos a las membranas y son, consecuentemente, difíciles de obtener de forma aislada y estable. La hidroxilación microbiológica de un gran número de sustancias ha sido examinada usando una gran variedad de organismos. El valor de la hidroxilación microbiológica reside en el hecho de que los sitios de ataque son a menudo diferentes de aquellos en que las reacciones químicas ocurren y, por lo tanto, algunos pueden ser considerados como químicamente remotos (Musharraf, 2004).

La monooxigenasa es la enzima responsable de la hidroxilación microbiológica y transferencia de un átomo de oxígeno al sustrato orgánico (Musharraf, 2004).

Los sistemas de monooxigenasas no sólo utilizan citocromo P450, sino que además requieren una fuente de electrones que es usualmente NADPH (Musharraf, 2004). El uso de biotransformaciones con células enteras, representa una gran ventaja teniendo en cuenta el costo que implica la regeneración de co-factores (Goretti y col., 2009).

Esta funcionalización se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de hongos fitopatógenos debido a que su maquinaria enzimática implica enzimas similares a las monooxigenasas del citocromo P450, que también se encuentran en los seres humanos y otros mamíferos (Rojas y col., 2001; Leak y col., 2009).

III.1.4. Bioensayos

La tecnología para el desarrollo de nuevos productos de origen natural son los ensayos biológicos. En la última década, se han incorporado algunos ensayos de gran utilidad y eficacia que requieren pequeñas cantidades de muestras y permiten una evaluación rápida (Pino Perez y Lazo, 2010).

Con los bioensayos que a continuación se detallan, se pretendió proporcionar una primera línea de prueba para los sustratos y los metabolitos obtenidos de las biotransformaciones una vez aislados, purificados e identificados, pudiendo ser respaldada por posteriores ensayos biológicos más específicos.

III.1.4.1. Capacidad antioxidante

Los siguientes párrafos se refieren a capacidad antioxidante, para poder comprender este concepto y darle un marco teórico a la determinación de la misma a los productos obtenidos de la biotransformación de los sustratos **1.1**, **1.2** y **1.3**.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs), incluyendo oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$); peróxido de hidrógeno (H_2O_2); anión superóxido (O_2^-); radical hidroxilo (OH^\cdot) y varios radicales peroxilos y alcoxilos, son intermediarios en la reducción parcial del oxígeno, producidos por reacciones bioquímicas en organismos eucarióticos, durante los procesos de fotosíntesis o respiración mitocondrial. El desequilibrio entre la generación de EROs y los mecanismos de desintoxicación en el organismo, producen un incremento en la concentración de radicales libres en las células desencadenando un cuadro de estrés oxidativo (Ascoli y col., 2006).

Si la producción de estas especies de oxígeno reactivas no es controlada adecuadamente, se tornan altamente destructivas para estructuras biológicas. Las especies de oxígeno reactivas, se sabe, causan daño a macromoléculas biológicas, alterando sus propiedades, y por ende la estructura y función de las células. Los radicales libres participan en la patogénesis de un creciente número de desórdenes incluyendo las dos causas mayores de muerte: cáncer y arterosclerosis. Los radicales libres de oxígeno también se han reportado que están involucrados en el asma, artritis, inflamación, neurodegeneración, enfermedad de Parkinson, mongolismo y quizás también demencia. El paso de los años puede ser la suma de las reacciones de radicales libres nocivos que ocurren continuamente en todas las células y tejidos (Potterat, 1997).

Por lo tanto, los radicales libres parecen constituir un blanco prometedor para mejorar el tratamiento con drogas de varias condiciones patológicas. En

este contexto, los antioxidantes naturales están recibiendo una acrecentada atención. Ellos pueden servir como compuestos primarios para el desarrollo de nuevas drogas y representan también una alternativa en el uso de antioxidantes sintéticos como butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) y propilgalato en la tecnología alimenticia (Potterat, 1997).

Durante los 10 últimos años, han sido encontrados compuestos con propiedades antioxidantes dentro de la mayoría de las clases de sustancias naturales y el número de compuestos activos que están siendo aislados de plantas, organismos marinos o microorganismos aumenta continuamente (Potterat, 1997).

Los organismos naturales seguirán constituyendo en el futuro un importante reservorio de compuestos con estructuras originales que servirán como materia prima. Al mismo tiempo, queda un gran trabajo para caracterizar de forma más completa la actividad de las moléculas ya descritas tanto *in vitro* como *in vivo* y establecer su real potencial como antioxidante (Potterat, 1997).

Hay un incremento creciente en los antioxidantes, particularmente en aquellos que intentan prevenir los efectos dañinos de los radicales libres en el cuerpo humano, y los utilizados para prevenir la descomposición de las grasas de los constituyentes alimenticios. En ambos casos, hay preferencia por los antioxidantes obtenidos por fuentes naturales en lugar de los obtenidos por vías sintéticas (Molyneux, 2004).

La utilización de sustancias con capacidad antioxidante puede ser de gran relevancia en prevención y terapia de enfermedades relacionadas con el aumento del estrés oxidativo (Ascoli y col., 2006).

Como se mencionó anteriormente, la necesidad de contar con compuestos nuevos que tengan actividad antioxidante, lleva a que los investigadores recurran a diferentes metodologías para obtenerlos: a) por

aislamiento de fuentes naturales; b) por síntesis total o parcial a partir de precursores de estructura sencilla; c) por transformación química de compuestos relacionados, d) por biotransformación a partir de precursores naturales o no naturales.

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; el cambio de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. Uno de los métodos más aplicado es el DPPH (difenilpicrilhidrazilo) (Kuskoski y col., 2005).

La molécula de DPPH se caracteriza por ser un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón libre en la molécula como un todo, de modo que las moléculas no se dimerizan, como sería el caso con la mayoría de los radicales libres. La deslocalización también da lugar al color violeta profundo, caracterizado por una banda de absorción centrada en aproximadamente 520 nm.

Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno (RH), entonces esto da lugar a la forma reducida. Esto resulta en la pérdida del color violeta tornándose en un amarillo pálido (**Figura III.11**).

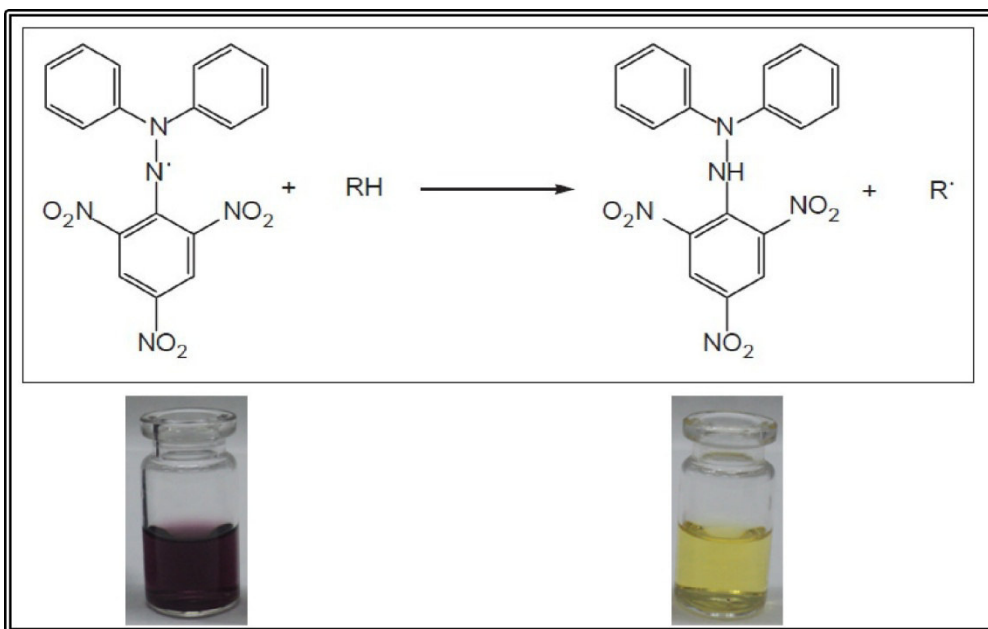


Figura III.11: Reducción del radical libre DPPH por efecto del compuesto evaluado.

III.1.4.2. Actividad citotóxica

Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizados lo ocupa el ensayo de letalidad con *Artemia* spp. Éste es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los compuestos analizados en larvas de *Artemia* spp. y, de esta manera, se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos (Pino Pérez y Lazo, 2010).

Artemia spp. son camarones minúsculos de cuerpo blando y transparentes a la luz. Pertenecen al Filo Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se conocen comúnmente como “monos de mar” o “brine shrimp”. Estos organismos se encuentran distribuidos en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias y son fuente de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados. Las hembras producen huevos, que en condiciones

externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1mm (Pino Pérez y Lazo, 2010).

Se puede agregar también, que *Artemia* es un crustáceo muy sensible a un amplio rango de compuestos químicos con actividad biológica (Gonzalez y col., 2003).

Las larvas de *Artemia* spp. se han utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos y se ha estudiado su biología y usos potenciales en diversos campos como un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales (Pino Pérez y Lazo, 2010).

En grandes dosis los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos. Podríamos decir que la farmacología es simplemente toxicología en dosis menores, y que la toxicología es simplemente farmacología en dosis mayores. Por ello, la mortalidad *in vivo*, en un organismo simple de la escala zoológica, puede ser utilizado como un monitor conveniente en el descubrimiento de productos naturales biológicamente activos (Colman-Saizarbitoria y Anderson, 1995).

III.1.4.3. Actividad antimicrobiana

La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana, centrándose las investigaciones en los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas. El desarrollo de la ciencia farmacéutica se inicia con la identificación de principios activos, los análisis biológicos, la formulación de la dosis, seguida por estudios clínicos para

establecer la seguridad, eficacia y perfil farmacológico de las nuevas drogas (Ramírez y Castaño, 2009).

Los antimicrobianos son sustancias químicas que evitan el crecimiento o destruyen a los microorganismos invasores del cuerpo humano o animal, produciendo ninguna o muy baja toxicidad sobre estos. Pueden ser naturales, sintéticos o semisintéticos (Salomé, 2010).

Algunos de los mecanismos básicos de acción se fundamentan en la inhibición de la síntesis de proteínas celulares y de la síntesis de ácidos nucleicos; sin embargo, los microorganismos pueden generar resistencia a los antimicrobianos debido a mutación, recombinación o adquisición de plásmidos (Salomé, 2010).

Para evaluar la actividad antimicrobiana existen varios métodos estandarizados, siendo los más empleados los modelos *in vitro*; en los cuales se confrontan directamente sustancias activas contra cultivos de microorganismos, lo cual permite demostrar actividades biológicas (Salomé, 2010).

Entre los métodos más importantes está el de difusión en agar, el cual se ha utilizado en el presente trabajo. Es cualitativo, debido a que tiene en cuenta el halo de inhibición que aparece alrededor del disco (pozo); los microorganismos se clasifican como sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R), según sea la eficacia obtenida por el agente antimicrobiano frente al microorganismo. Tomando como referencia el halo de inhibición del antibiótico utilizado para cada caso.

El halo de inhibición es la zona alrededor de un disco (pozo) en un antibiograma en el que no se produce crecimiento microbiano en una placa de agar inoculada con el microorganismo. Es una medida de la potencia de la muestra frente al microorganismo (Salomé, 2010).

Para el presente trabajo, el ensayo de inhibición del crecimiento microbiano se llevó a cabo utilizando los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

III.2. FUNDAMENTOS DEL TRABAJO

Una de las mayores batallas libradas en la naturaleza es aquella observada entre las plantas y los hongos fitopatógenos; éstos constituyen un gran grupo de microbios que usualmente reside en la parte exterior de las plantas y son uno de los principales objetivos del sistema de defensa de las plantas. Para combatir estos hongos las plantas generan una gran cantidad de compuestos tales como terpenos, flavonoides y alcaloides, conocidos como fitoalexinas. Estos productos del metabolismo secundario de las plantas son, casi siempre, producidos en respuesta a una infección. Estos invaden la célula del microorganismo interrumpiendo su metabolismo, retardando así su crecimiento o aún matándolo (Gierman, 2001).

Es decir que, las fitoalexinas son antibióticos; metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por las plantas en respuesta al ataque microbiano. Algunos patógenos responden frente a estas sustancias de defensa para evitar su efecto dañino a través de reacciones bioquímicas denominadas como reacciones de desintoxicación (Farooq y Tahara, 1999).

La mayoría de las fitoalexinas y compuestos relacionados son hidrofóbicos, y ellos son metabolizados por los hongos fitopatógenos a compuestos hidrofílicos a través de la introducción de grupo/s hidroxilo, por oxigenación, hidratación, reducción o ruptura de grupo carbonilo. Los metabolitos hidrofílicos pueden, por lo tanto, ser almacenados en vacuolas y excretados; y este proceso es similar a la oxidación en mamíferos de

xenobióticos por la enzima citocromo P-450 monooxigenasa (Farooq y Tahara, 1999).

Los hongos filamentosos, han desarrollado una capacidad de adaptación extraordinaria a los cambios del entorno, en gran parte debido a los sistemas de defensa enzimáticos que los protegen de compuestos tóxicos exógenos-xenobióticos. En consecuencia, los hongos filamentosos desempeñan un papel crucial en la degradación y mineralización de una matriz diversa de contaminantes ambientales, así como en la catálisis de reacciones importantes para la producción biotecnológica (Črešnar y Petrič, 2011).

Los xenobióticos (compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano) no son utilizados como nutrientes, por lo que no se incorporan a las rutas bioquímicas del metabolismo intermediario y no son degradados a través de estas vías metabólicas. Se trata, en general, de compuestos de naturaleza lipofílica por lo que pueden atravesar con relativa facilidad las membranas biológicas, acceder al interior de las células y unirse a estructuras celulares de carácter lipofílico. Al mismo tiempo, su eliminación del organismo es dificultosa, dado que la excreción de compuestos no volátiles se realiza a través de fluidos de naturaleza acuosa, principalmente orina (Donato Martín, 2006).

Ante esta situación, los organismos vivos han desarrollado sistemas metabólicos alternativos para acelerar la eliminación de estos compuestos. Se trata de una serie de enzimas no integradas en las vías del metabolismo energético o intermediario del organismo y cuyos substratos son los xenobióticos. Su función es la de convertir los xenobióticos en moléculas más polares, más hidrosolubles y, por lo tanto, más fácilmente excretables (Donato Martín, 2006).

Al conjunto de procesos enzimáticos a los que se ven sometidos los xenobióticos en el organismo tendentes, en general, a su neutralización y eliminación se les conoce como reacciones de biotransformación o de metabolización de xenobióticos. Tradicionalmente estos procesos se han agrupado en dos fases o etapas. En la *fase 1* los xenobióticos son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y convertidos en productos más hidrosolubles gracias a la aparición de nuevos grupos funcionales de carácter polar (hidroxilo, amino, carboxilo). En la *fase 2* los xenobióticos, o los metabolitos generados por las reacciones de la *fase 1*, se combinan con moléculas endógenas de carácter polar para formar productos de conjugación que son rápidamente excretados (Donato Martín, 2006).

En general, las enzimas de *fase 1* son capaces de transformar múltiples sustratos y catalizar reacciones diferentes. Se trata de proteínas catalíticas de naturaleza muy diversa entre los que se incluyen enzimas con actividad monooxigenasa, como el citocromo P-450 o la flavin monooxigenasa, diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas, aromatasas), la epóxido hidrolasa o esterasas y amidasas hepáticas y plasmáticas (**Figura III.12**). El citocromo P-450 es, sin duda, el miembro más destacado de este grupo de enzimas y el que ha sido más ampliamente estudiado (Donato Martín, M.T., 2006).

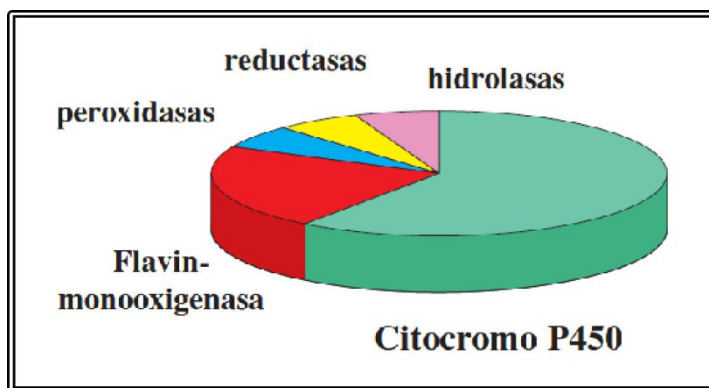


Figura III.12: Participación relativa de diferentes enzimas de fase 1 en el metabolismo xenobióticos

No se trata de una única enzima, sino que en realidad es una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias a mamíferos, y de las que ya se han identificado más de 2000 isoformas diferentes (Donato Martín, 2006).

Las familias I, II y III están constituidas por enzimas encargadas de la biotransformación de xenobióticos, mientras que el resto de familias incluyen P-450s que intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos. Una de las características más significativas de los P-450 que metabolizan xenobióticos es su baja especificidad, lo que permite que sean capaces de metabolizar un número casi ilimitado de sustratos, principalmente a través de reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis (Donato Martín, 2006).

El sistema P-450 presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar, como en el elevado número de sustratos que es capaz de metabolizar. Esta amplia especificidad de sustrato es debida a la existencia de múltiples formas del enzima, cada una de las cuales se ha adaptado para el metabolismo de grupos de compuestos relacionados estructuralmente (Donato Martín, 2006).

Las enzimas P-450 catalizan el ataque oxidativo a compuestos de naturaleza orgánica (hidrocarburos y sus derivados) no activados. Estas reacciones de oxidación son regio- y estero-específicas y tienen lugar a temperatura fisiológica. Si estas mismas transformaciones no estuvieran catalizadas no serían específicas y necesitarían temperaturas muy elevadas (Donato Martín, 2006).

Las P-450s y las NADPH-citocromo P-450 reductasas (CPR) no están asociadas y ambas están ancladas de forma independiente en la cara externa de la membrana del retículo endoplásmico mediante la región hidrofóbica del extremo amino-terminal (**Figura III.13**). La actividad de algunos P-450s se ve favorecida por la presencia de citocromo b5 que facilita la transferencia de electrones desde el NAD(P)H. Estos enzimas participan en múltiples funciones biosintéticas (Donato Martín, 2006).

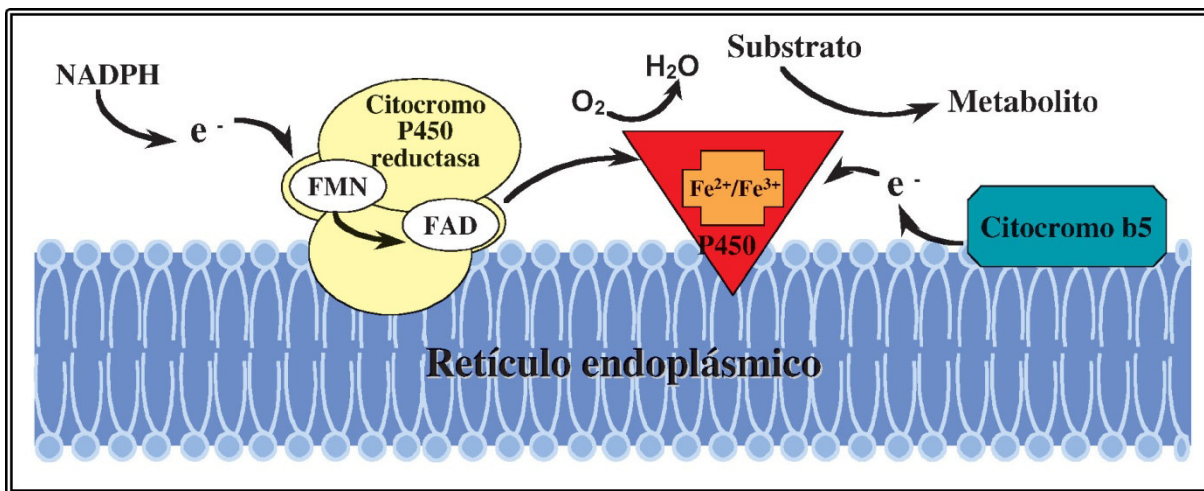
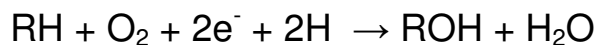


Figura III.13: Localización del sistema citocromo P-450 en la membrana del retículo endoplásmico.

Catalíticamente, las P450 unen y activan reduciendo el oxígeno molecular (O_2), dividiéndolo en sus átomos componentes e insertando uno de éstos en un sustrato que está enlazado en el sitio activo de la P450, adyacente al cofactor hemo. Las P450 monooxigenasas por lo tanto, usan un átomo de oxígeno para

formar el producto (a menudo la hidroxilación del sustrato) (**Figura III.13**) y reducen el segundo a agua de acuerdo con el siguiente esquema (Munro y col., 2013):



Teniendo en cuenta los antecedentes en la bibliografía, las P450s presentan una enorme versatilidad en su capacidad para reconocer sustratos de diferente tamaño y carácter, y en su capacidad para llevar a cabo una amplia gama de diferentes transformaciones químicas en estos sustratos (Munro y col., 2013).

Las P450s comparten un tipo de plegamiento que es común y único en esta clase de enzimas (**Figura III.14**). Las P450s son principalmente de estructura α -helicoidal, con el cofactor hemo insertado entre una hélice más grande de dominio α y una lámina más pequeña de dominio β . La estructura del núcleo alrededor del cofactor hemo ofrece el andamio que permite la activación de oxígeno por las P450s. El hierro hemo está ecuatorialmente coordinado con cuatro átomos del nitrógeno del pirrol del macrociclo hemo *b*, y coordinado axialmente por una cisteína conservada como ligando proximal y típicamente por una molécula de agua como el ligando distal (en el estado de reposo de la P450) (Munro y col., 2013).

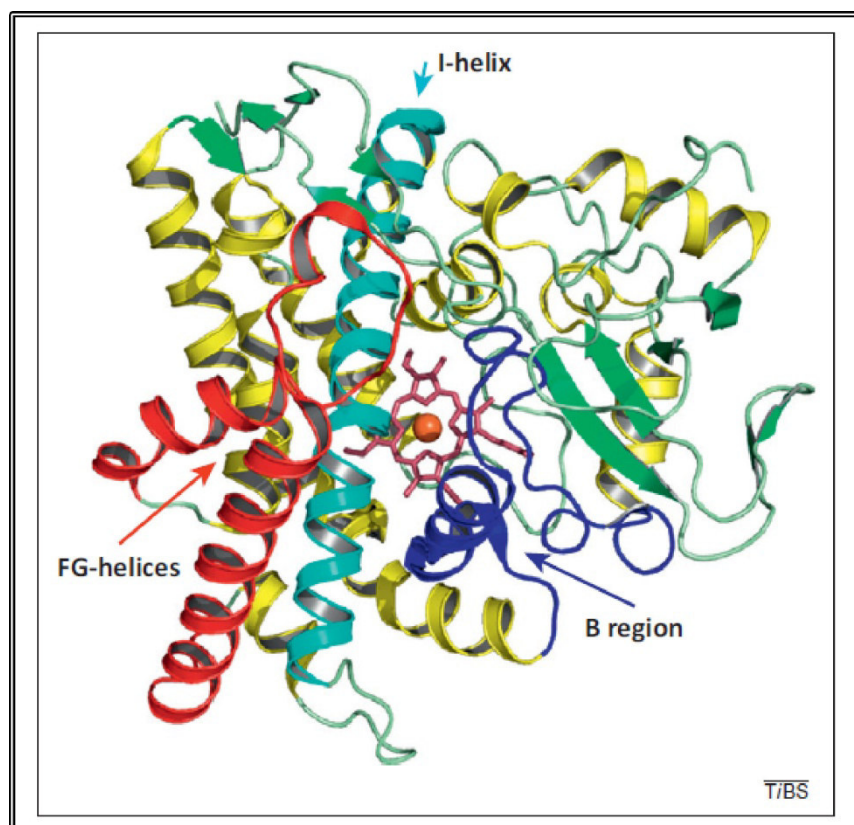


Figura III.14: Estructura del plegamiento de las P450 (Munro y col., 2013).

El ciclo de reacción que presentan las P450s tiene un funcionamiento semejante a un reloj, debido a que tiene varios pasos y una naturaleza cíclica (**Figura III.15**). Partiendo de una forma férrica con un ligando distal agua (**Figura III.15**, 12:00 h), la unión al sustrato inicia el ciclo y desplaza la molécula de agua como sexto ligando. Este evento está generalmente asociado con la reorganización de electrones en los orbitales d del hierro (un espín bajo cambia a un espín alto) lo que aumenta el potencial redox del hierro del grupo hemo y favorece su reducción.

Los “socios” redox proporcionan electrones individuales en pasos consecutivos para reducir el hierro del grupo hemo a un estado ferroso que entonces se une al oxígeno (forma superoxo férrica, 04:30 h, **Figura III.15**) y a

continuación, a una forma peroxo férrica (06:00 h, **Figura III.15**) que es luego protonada para formar primero la especie hidroperoxo férrica (Cdp 0: compuesto 0) (07:30 h, **Figura III.15**) y luego el compuesto I (Cdp I) con pérdida de H₂O (09:00 h, **Figura III.15**). El compuesto I es un radical catión oxo ferrilo porfirina [Fe(IV)=O] y el mecanismo predice que atrae un hidrógeno de un sustrato estrechamente unido (formando el compuesto II (Cdp II) y un radical sustrato) antes de la recuperación del oxígeno para oxidar el sustrato (mostrado como una hidroxilación en la **Figura III.15**) (Munro y col., 2013; Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000).

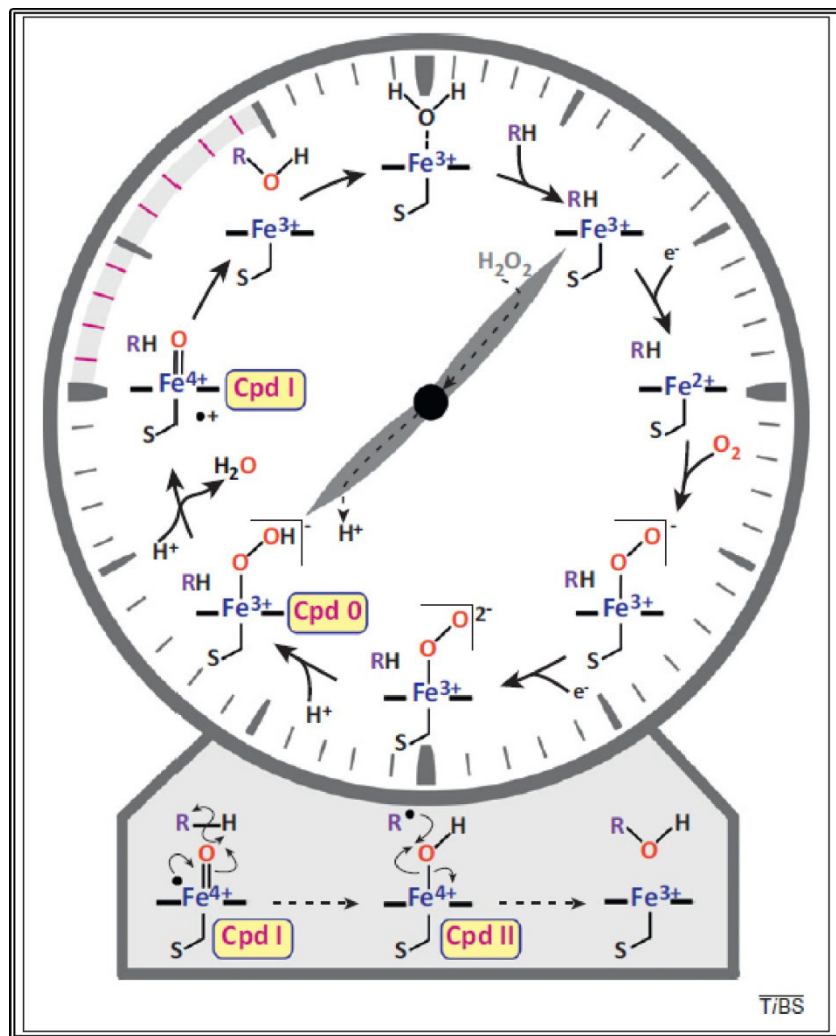


Figura III.15: Ciclo catalítico de la P450 (Munro y col., 2013).

La literatura actual da cuenta de una amplia gama de sustratos que pueden ser reducidos por enoato-reductasas (ERs) microbianas: aldehídos y cetonas α,β -insaturados simples, nitro-ésteres, nitro aromáticos, nitroacrilatos, y alquinos. Esta variabilidad de sustratos depende del tamaño y la forma del túnel del sitio activo. Curiosamente, la especificidad de enantiómeros de las ERs cambia entre las diferentes variantes de enzimas y está influenciada por la posición α o β del centro quiral potencial presente en el sustrato objetivo (Goretti y col., 2009).

Las enoato-reductasas también pueden reducir enlaces doble carbono-carbono, pero sólo aquellos que están “activados” por sustituyentes atractores de electrones, de modo que dobles y triples enlaces carbono-carbono aislados no son “aceptados” por estas enzimas. Entre los grupos funcionales que pueden servir como grupos “activantes” están (Faber, 1997):

- Ácidos carboxílicos α,β -insaturados
- Lactonas α,β -insaturadas
- Carboxaldehídos α,β -insaturados
- Cetonas α,β -insaturadas
- Nitrocompuestos α,β -insaturados y otros

El mecanismo de reacción de las deshidrogenasas dependientes de NAD(P)H se ha estudiado en detalle. Hay cuatro patrones estereoquímicos para la transferencia de un hidruro de la coenzima NAD(P)H al sustrato. El ataque de hidruros, se da ya sea por la cara-si o cara-re, de un grupo carbonilo por ejemplo, dependiendo de la orientación en la unión del sustrato a la enzima

(Matsuda y col., 2009). En la **Figura III.16** se muestra un esquema de cómo sería este mecanismo, adaptado a nuestro sustrato.

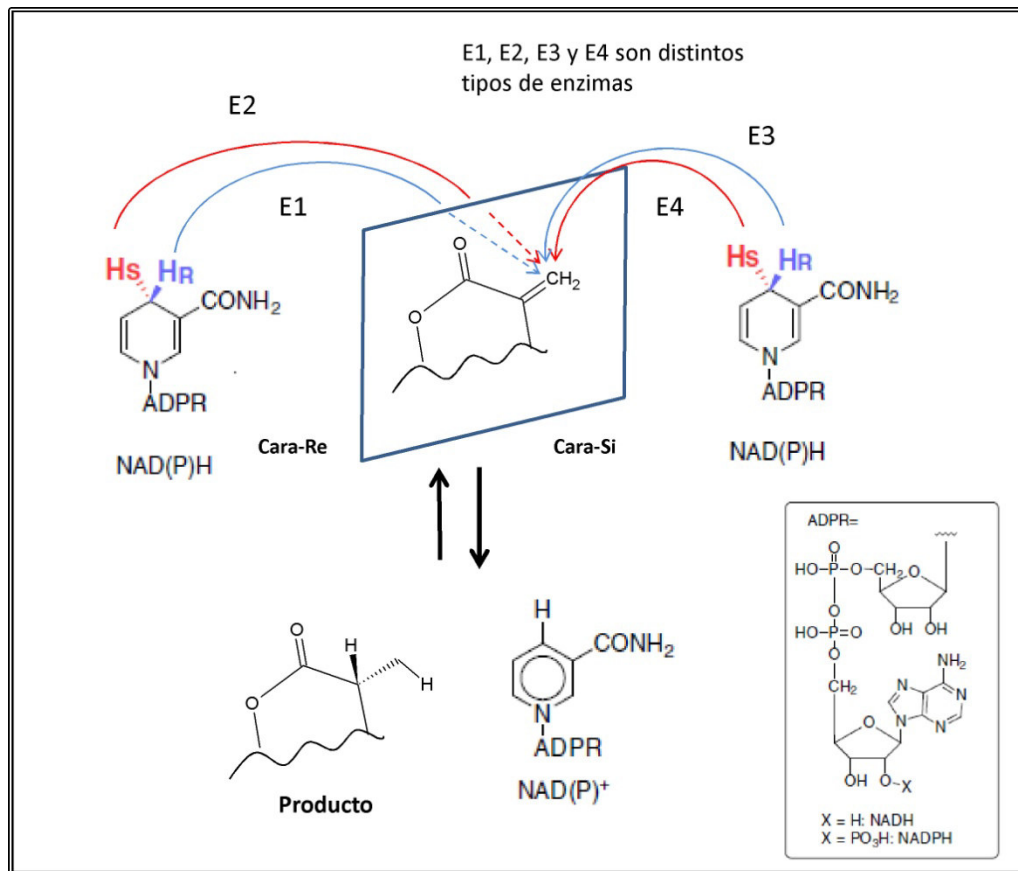


Figura III.16: Adaptado del mecanismo de transferencia de hidruros de la coenzima NAD(P)H, propuesto por Matsuda y col. (2009).

IV. ANTECEDENTES

IV.1. Antecedentes de biotransformaciones de los sustratos

✓ (-)-Ambroxido

(-)-Ambroxido (**1.1**) ha sido biotransformado por diferentes autores, reportando la obtención de numerosos productos. En 1996 Hanson y Truneh publicaron la transformación de este compuesto usando *Cephalosporium aphidicola* obteniendo, entre otros, el derivado 3 β -hidroxilado (**4.1**), el 3 β ,6 β -dihidroxilado (**4.2**) y aquél con la oxidación del heterociclo a lactona (**4.3**).

En 2004, Choudhary y col. realizaron la biotransformación de (-)-ambroxido (**1.1**) con *Fusarium lini* obteniendo cuatro metabolitos, todos hidroxilados con estereoquímica α en diferentes posiciones de los anillos, algunos de los cuales (**4.4**, **4.5**) se muestran en la Tabla IV.1.

Los mismos autores utilizando una cepa pura de *Rhizopus stolonifer* identificaron otros cuatro metabolitos, uno de ellos la cetona **4.6** y uno nuevo con apertura del heterociclo (**4.7**).

Más recientemente el grupo de trabajo de Choudhary (Nasib y col.,2006) transformó (-)-ambroxido (**1.1**) con *Actinidia deliciosa*, generándose, esta vez, seis metabolitos, dos de ellos novedosos (**4.8**, **4.9**).

En 2011 Allendes y col. llevaron a cabo la biotransformación de (-)-ambroxido (**1.1**) con *Alternaria alternata* y *Cunninghamella* sp. con lo que obtuvieron el metabolito **4.1**, ya conocido, y un nuevo producto de oxidación, **4.10**.

En 2012 Musharaff y col. realizaron la transformación microbiana con un cultivo del hongo *Macrophomina phaseolina* obteniendo los compuestos 3 β -hidroxiambroxido (**4.1**), 6 β -hidroxiambroxido (**4.11**), 1 α ,3 β -dihidroxiambroxido (**4.12**), entre otros.

✓ (-)- α -Santonina

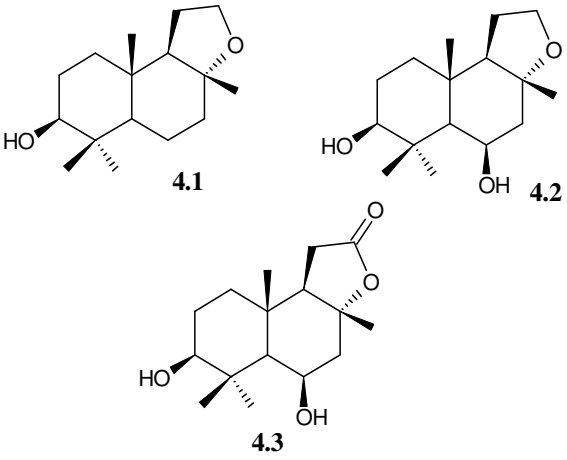
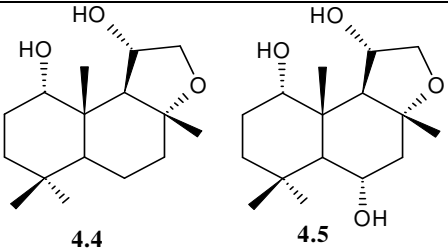
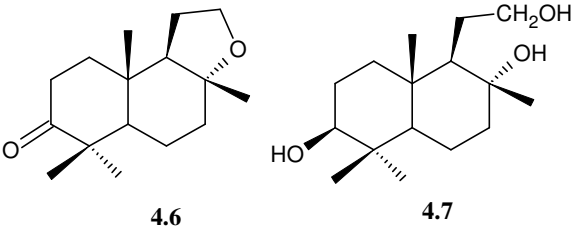
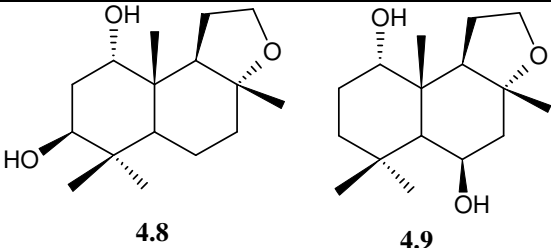
Farooq y Tahara (2000) realizaron la biotransformación de α -santonina (**1.2**) con el hongo *Botrytis cinerea*, obteniendo como producto de la reacción el metabolito hidroxilado 11 β -hidroxi- α -santonina (**4.12**).

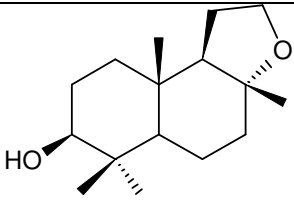
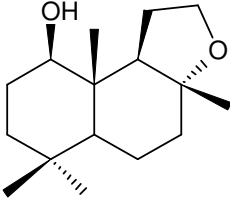
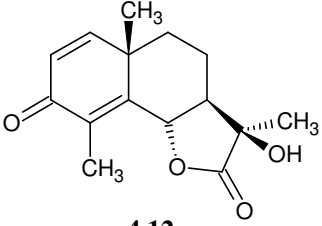
Por su parte, Ata y Nachtigall (2004) reportaron la transformación microbiana de este sustrato con los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Cunninghamella bainieri*. Con *R. stolonifer* obtuvieron los compuestos 3,4-epoxi- α -santonina (**4.13**) y 4,5-dihidro- α -santonina (**4.14**) mientras que con *C. bainieri*, el producto fue 1,2-dihidro- α -santonina (**4.15**).

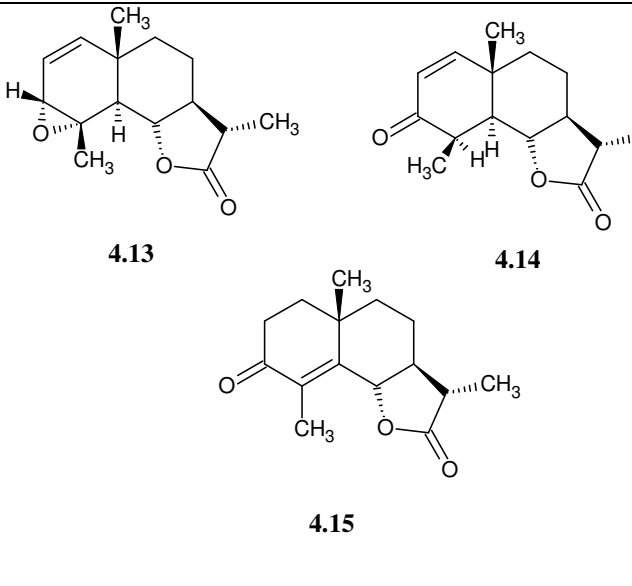
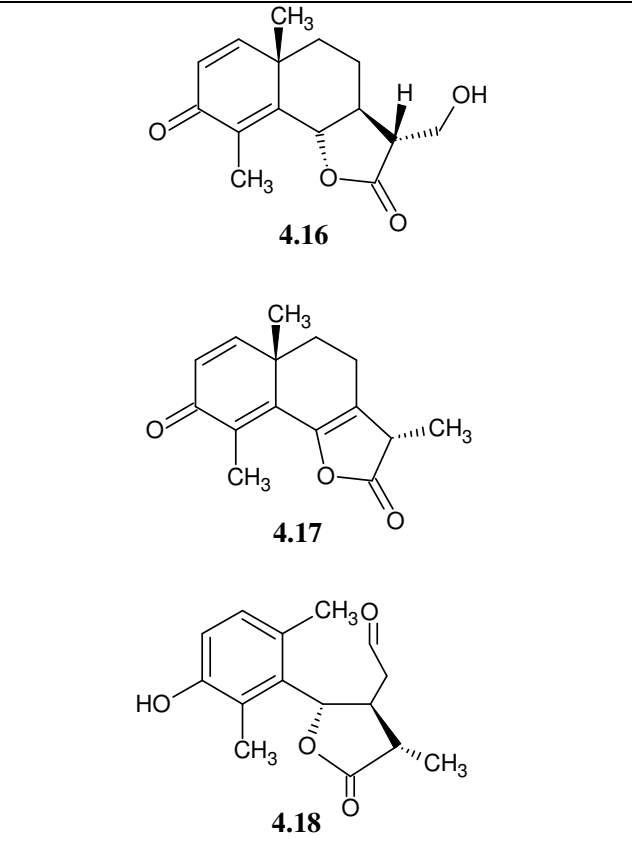
Lamm y col. (2009), trabajando con los hongos *Mucor plumbeus*, *Whetzelinia sclerotiorum* y *Aspergillus niger* obtuvieron tres derivados novedosos: 11 β ,13-dihidroxisantonina (**4.16**), 6,7-deshidrosantonina (**4.17**) y ácido 3,6-dihidroxi-9-ceto-9,10-seco-selina-1,3,5(10)-trien-12-oico-12,6-lactona (**4.18**), respectivamente, este último producto de la apertura del anillo de eudesmano.

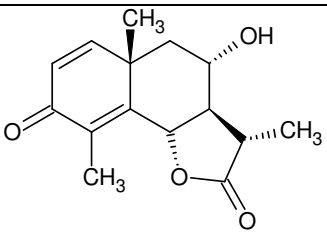
Yang y col., 2006, emplearon el hongo *Absidia coerulea* lo que les llevó a la obtención de 11 β -hidroxi- α -santonina (**4.12**) como producto mayoritario y otro en menor proporción, identificado como 8 α -hidroxi- α -santonina (**4.19**).

Tabla IV.1: Antecedentes de biotransformaciones de los sustratos 1.1, 1.2 y 1.3.

| SUSTRATO | MICROORGANISMO | METABOLITOS | REFERENCIA |
|---------------------|----------------------------------|---|------------------------|
| (-)-Ambroxido (1.1) | <i>Cephalosporium aphidicola</i> |  <p>4.1 4.2</p> <p>4.3</p> | Hanson y Truneh, 1996 |
| | <i>Fusarium lini</i> |  <p>4.4 4.5</p> | Choudhary y col., 2004 |
| | <i>Rhizopus stolonifer</i> |  <p>4.6 4.7</p> | |
| | <i>Actinidia deliciosa</i> |  <p>4.8 4.9</p> | Nasib y col., 2006 |

| | | | |
|---|------------------------------------|--|--|
| | <p><i>Alternaria alternata</i></p> |  <p>4.1</p> | <p>Allendes y col., 2011</p> |
| | <p><i>Cunninghamella</i> sp.</p> |  <p>4.10</p> | |
| <p>(-)-α-Santonina (1.2)</p> | <p><i>Botrytis cinerea</i></p> |  <p>4.12</p> | <p>Musharaff y col., 2012</p> <p>Farooq y Tahara, 2000</p> |

| | | | |
|--|---|---|-----------------------------------|
| | <p><i>Rhizopus stolonifer</i></p> <p><i>Cunninghamella bainieri</i></p> |  <p>4.13</p> <p>4.14</p> <p>4.15</p> | <p>Ata y Nachtigall, 2004</p> |
| | <p><i>Mucor plumbeus</i></p> <p><i>Whetzelinia sclerotiorum</i></p> <p><i>Aspergillus niger</i></p> |  <p>4.16</p> <p>4.17</p> <p>4.18</p> | <p>Lamm y col., 2009</p> |

| | | | |
|--|-------------------------|---|----------------------|
| | <i>Absidia coerulea</i> |  <p style="text-align: center;">4.19</p> | Yang y col., 2006 |
|--|-------------------------|---|----------------------|

✓ (-)-Achalensolido

Hasta el momento, no hay reacciones de biotransformaciones reportadas sobre el compuesto (-)-Achalensolido (**1.3**).

IV.2. Antecedentes de actividades biológicas

Resulta importante y evidente la gran variedad de actividades biológicas que presentan los terpenos (Harborne, 1998).

A nivel genérico, las lactonas sesquiterpénicas han podido correlacionarse en algunos casos con patrones de distribución geográfica o con aspectos evolutivos de la biología floral dentro del género *Artemisia*. Además de su utilidad quimiotaxonómica, muchas lactonas sesquiterpénicas tienen actividad biológica que las hacen interesantes para otros fines. Concretamente, varias de las lactonas sesquiterpénicas que producen las plantas del género *Artemisia* tienen propiedades fungicidas, herbicidas, antimicrobianas o insecticidas, y podrían ser una buena fuente de nuevos productos fitosanitarios (Llorens Molina y col., 2008).

A las lactonas sesquiterpénicas se les han asociado también actividades biológicas tales como: acción citotóxica, antiinflamatoria, antitumoral, antibacteriana, antidermatitis en humanos, e inhibidoras del crecimiento de plantas (Martinez, 2001).

Ambrein, un alcohol triterpénico, es el principal constituyente del ambergris, que se utiliza como un aditivo en perfumería por la persistencia de su olor, y se ha informado que posee actividad antiinflamatoria, anticonceptivo, y actividades afrodisíacas. Las propiedades antiinflamatorias de ambrein sugieren la posible interacción de este compuesto y prostaglandinas en la mediación del dolor. La degradación oxidativa de ambrein, como resultado de exposición de ambergris al aire y a la luz del sol, es la responsable de las propiedades organolépticas de este compuesto, ya que conduce a la formación del compuesto Ambrox con una amplia aplicación industrial en perfumería. Desde la antigüedad, el ambergris ha sido uno de los materiales de perfumería más valorado y también se utiliza en la medicina tradicional para tratar las migrañas, reumatismo y enfermedades nerviosas (Shen y col., 2007).

(-)-Ambroxido (1.1) (Ambrox), está estructuralmente relacionado con el sclareol. Sclareol (Labd-14-eno-8,13-diol) (**Figura IV.1**) es un diol terciario, un miembro de los diterpenos de núcleo labdano. Fue originalmente aislado de la planta *Salvia sclarea* (familia Lamiaceae) y también se encuentra en muchas coníferas. En estudios recientes realizados, sclareol exhibió actividad antimicrobiana, significativos efectos citostáticos y citotóxicos contra líneas de células leucémicas y se encontró además, que posee la capacidad de inducir la detención del ciclo celular y apoptosis (Hatziantoniou y col., 2006) y presenta actividad antioxidante (Kolak y col., 2009).

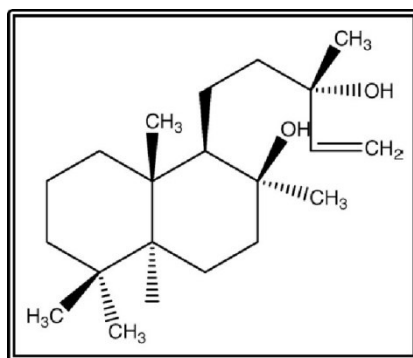


Figura IV.1: Sclareol

(-)-Santonina (1.2) es una lactona sesquiterpénica derivada de santonica (obtenida de las cabezuelas de *Artemisia maritima* var. *stechmanniana*) y ampliamente distribuida en el género *Artemisia*. Exhibe varias actividades biológicas como antihelmíntico, antiinflamatorio, antipirético, analgésico y anticancerígeno. Fue ampliamente utilizada en el pasado para la eliminación de parásitos, pero debido a efectos secundarios graves y al desarrollo de muchos otros medicamentos más seguros contra los parásitos, ha quedado en gran parte fuera de uso (Al-Harbi y col., 1994).

(-)-Santonina (1.2) ha sido elegida como material de partida para la síntesis de varias moléculas importantes, como por ejemplo algunas empleadas para el tratamiento del cáncer. Su conversión química se está llevando a cabo extensivamente. Se sabe que varios derivados de (-)-Santonin (1.2) presentan actividad anticancerígena significativa (Al-Harbi y col., 1994).

Por otra parte, los guaianolidos constituyen la clase más abundante de lactonas sesquiterpénicas, muchas de las cuales poseen una α -metilenbutirolactona, presente en el 10% de todos los productos naturales. Hay una gran cantidad de investigaciones de bioactividad sobre los guaianólidos; aquellos que poseen en su estructura una α -metilenbutirolactona, la ciclopentenona y éster acrílico dotan a estas moléculas no sólo de bioactividad,

sino también de selectividad. Recientemente, los guaianólidos han captado la atención de químicos medicinales por la importancia de poder controlar la modificación covalente específica como una opción terapéutica potencial (Grillet y col., 2011).

Hay pocos antecedentes sobre la determinación de actividades biológicas realizadas sobre el guaianolido **(-)-Achalensolide (1.3)**. Se han reportado ensayos de inhibición de actividad aromatasas con resultados negativos (Blanco y col., 1997) y ensayos de citotoxicidad sobre células cancerígenas humanas y actividad antiinflamatoria con resultados moderados (Ríos y col., 2014).

La biotransformación de lactonas sesquiterpénicas naturales utilizando hongos se ha intentado con el fin de obtener modificaciones regio y estereoselectivas para mejorar la actividad y para desarrollar modelos de estructura-actividad (Krishna Kumari y col., 2003).

IV. 3. Antecedentes de biotransformaciones con los hongos utilizados en este trabajo

Especies de *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Rhizopus*, se han utilizado para metabolizar una amplia gama de compuestos de una manera similar a la de los mamíferos; estos son, por lo tanto, utilizados como modelos microbianos del metabolismo de mamíferos para el estudio de fármacos. Por otra parte, estos hongos también son atractivos para los investigadores debido a su capacidad de transformar compuestos bioactivos (Omar y col., 2012).

Swathi y col. (2012) estudiaron el potencial de diversos hongos para biotransformar el flavonoide hesperidina, para conseguir su metabolito activo hesperitina (**Tabla IV.2**). Ocho hongos fueron seleccionados para probar la capacidad de metabolizar en hesperidina de una manera comparable a los seres humanos, con el fin de desarrollar sistemas alternativos para estudiar el

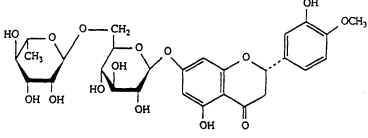
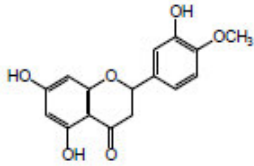
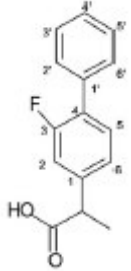
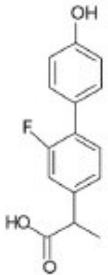
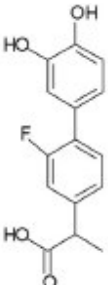
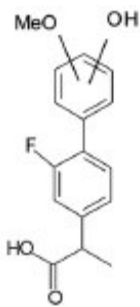
metabolismo de fármacos y también para producir compuestos activos en grandes cantidades. Se encontró que *Cunninghamella elegans* convierte hesperidina a hesperitina por hidrólisis, mostrando similitud con el metabolismo humano de ese flavonoide.

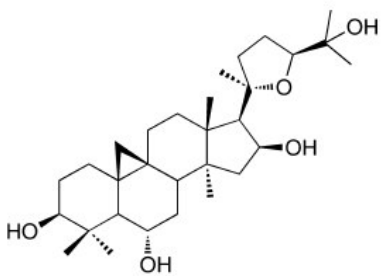
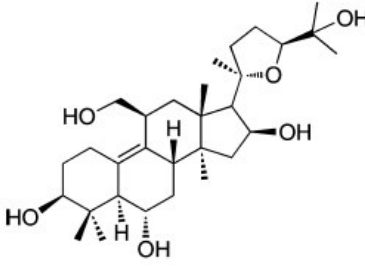
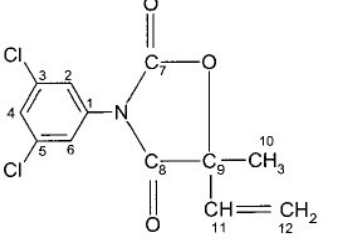
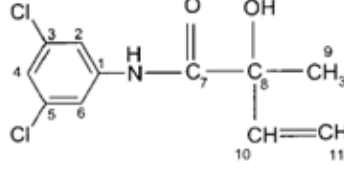
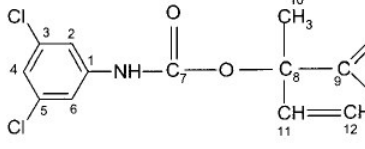
Amadio y col. (2010) realizaron la transformación microbiana del antiinflamatorio flurbiprofeno con *Cunninghamella elegans*, detectando metabolitos mono y dihidroxilados (**Tabla IV.2**).

La transformación microbiana de cicloastragenol por el hongo *Cunninghamella blakesleeana* fue investigada por Kuban y col. (2010). A diferencia del compuesto original, se encontró que el producto obtenido posee un esqueleto triterpénico interesante, derivado de una transformación que comprende la escisión del anillo de ciclopropano y migración del grupo metilo (**Tabla IV.2**).

Pothuluri y col. (2000) llevaron a cabo la biotransformación del fungicida vinclozolina [3(3,5-diclorofenil)-5-metil-5-vinil-1,3-oxazolidina-2,4-diona] por el hongo *Cunninghamella elegans*; en este caso la reacción ocurrió predominantemente en la porción oxazolidina-2,4-diona de la vinclozolina (**Tabla IV.2**).

Tabla IV.2: Antecedentes de biotransformaciones con el género *Cunninghamella*.

| MICROORGANISMO | COMPUESTO | METABOLITOS | REFERENCIA |
|-------------------|--|---|------------------------|
| <i>C. elegans</i> |  <p>Hesperidina</p> |  <p>Hesperitina</p> | Swathi y col., 2012 |
| <i>C. elegans</i> |  <p>Flurbiprofeno</p> |  <p>4-hidroxi-flurbiprofeno</p>  <p>3,4-dihidroxi-flurbiprofeno</p>  <p>3-hidroxi-4-metoxi-flurbiprofeno</p> | Amadio y col., 2010 |

| | | | |
|--------------------------------------|--|---|-----------------------------------|
| <p><i>C. blakesleeana</i></p> |  <p>Cicloastragenol</p> |  <p>Derivado 9,10-en-11-hidroximetil del cicloastragenol</p> | <p>Kuban y col., 2010</p> |
| <p><i>C. elegans</i></p> |  <p>Vinclozolina [3-(3,5-diclorofenil)-5-metil-5-vinil-1,3-oxazolidina-2,4-diona]</p> |  <p>3', 5'-dicloro-2-hidroxi-2-metilbut-3-enanilida</p>  <p>Ácido 2-[[[(3,5-diclorofenil)carbamoxil]oxi]2-metil-3-butenico</p> | <p>Pothuluri y col., 2000</p> |

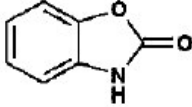
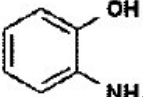
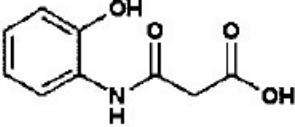
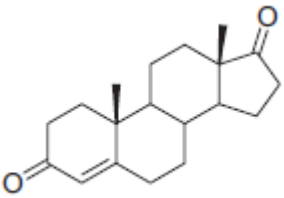
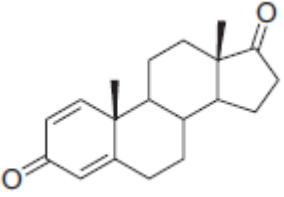
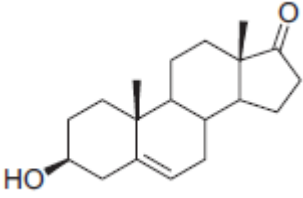
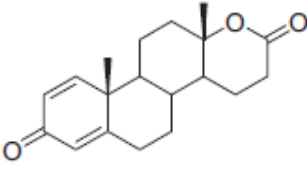
La desintoxicación del maíz (*Zea mays*) del compuesto antimicrobiano 2-benzoxazolinona por el hongo endófito *Fusarium verticillioides* resulta en la formación de ácido N-(2-hidroxifenil)malonámico. Glenn y col. (2003), propusieron que la transformación de BOA ocurre por la hidrólisis enzimática del anillo oxazolona de BOA con liberación de CO₂, formando el 2-aminofenol, que luego se modificó mediante la adición de un grupo malonilo para producir ácido N-(2-hidroxifenil) malonámico (HPMA) (**Tabla IV.3**).

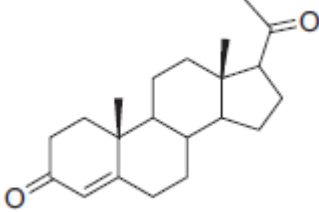
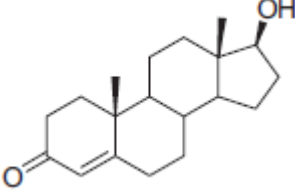
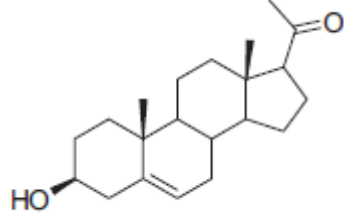
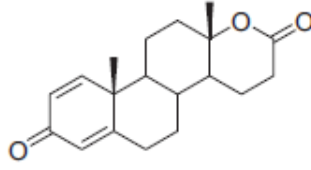
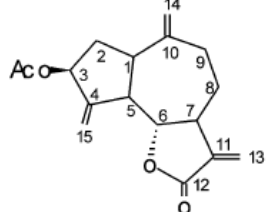
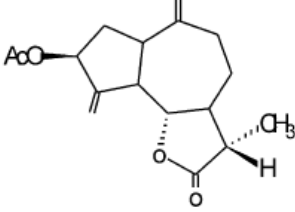
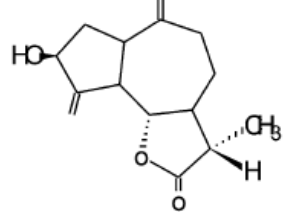
La diversidad de metabolitos de esteroides producidos por microorganismos ofrece una herramienta poderosa para la generación de nuevos fármacos esteroideos. La transformación microbiana de esteroides a menudo proporciona procesos eficientes y económicos para la producción de ingredientes esteroideos farmacéuticamente activos y productos intermedios claves. Zhang y col. (2013) utilizaron *Fusarium oxysporum* para biotransformar varios esteroides obteniendo la lactonización del anillo-D.

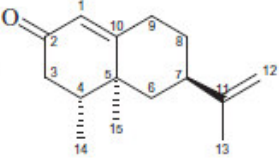
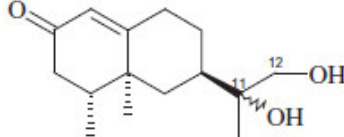
La lactona sesquiterpénica zaluzanina-D, compuesto bioactivo de esqueleto guaianolido dio lugar a 11,13-dihidrozaluzanina-D y 11,13-dihidrodeacetilatedzaluzanina-D cuando se realizó la transformación microbiana con las especies *F. equiseti* y *F. oxysporum* (Krishna Kumari y col., 2003) (**Tabla IV.3**).

El sesquiterpeno bicíclico (+)-nootkatona es un compuesto natural que fue aislado por primera vez del duramen del cedro amarillo de Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*). La nootkatona inhibe la formación de la úlcera gástrica en ratas, tiene poder insecticida contra larvas de *Drosophila melanogaster* y es un fuerte repelente de termitas (*Coptotermes formosanus*). Gliszczynska y col. (2011) biotransformaron este compuesto con *F. culmorum* con el objetivo de obtener derivados con actividades biológicas mejoradas. De este ensayo resultó un compuesto hidroxilado en C-11 y C-12 (**Tabla IV.3**).

Tabla IV.3: Antecedentes de biotransformaciones con el género *Fusarium*.

| MICROORGANISMO | COMPUESTO | METABOLITOS | REFERENCIA |
|---------------------------|---|---|---------------------------|
| <i>F. verticillioides</i> |  <p>2-benzoxazolinona (BOA)</p> |  <p>2-aminofenol</p> <p>↓</p>  <p>ácido N-(2-hidroxifenil) malonámico</p> | Glenn, A. y col., 2003 |
| <i>F. oxysporum</i> |  <p>Androst-4-ene-3,17-diona</p>  <p>Androst-1,4-diene-3,17-diona</p>  <p>Deshidroepiandrosterona</p> |  <p>Testolactona</p> | Zhang y col., 2013 |

| | | | |
|---------------------------|--|---|--|
| |  <p>Progesterona</p>  <p>Testosterona</p>  <p>Pregnenolona</p> |  <p>Testolactona</p> | |
| <p><i>F. equiseti</i></p> |  <p>zaluzanina-D</p> |  <p>11,13-dihidrozaluzanina-D</p>  <p>11,13-dihidrodeacetylatedzaluzanina-D</p> | <p>Krishna Kumari y col., 2003</p> |

| | | | |
|---------------------------|---|---|----------------------------------|
| <p><i>F. culmorum</i></p> |  <p>Nootkatona</p> |  <p>(+)-(4R,5S,7R)-11,12-dihidroxi-nootkatona</p> | <p>Gliszczynska y col., 2011</p> |
|---------------------------|---|---|----------------------------------|

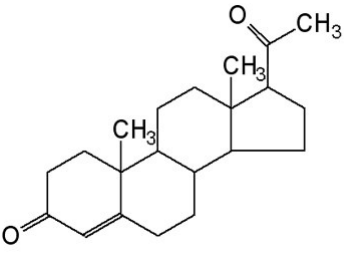
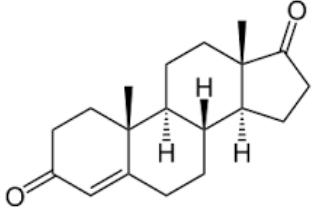
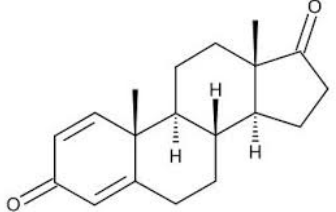
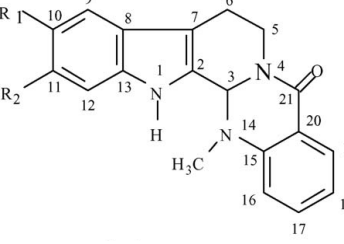
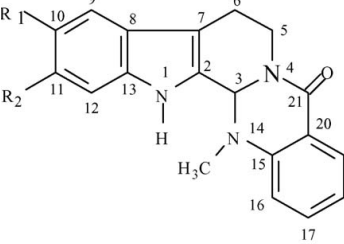
El género *Penicillium* ha sido utilizado, principalmente, para biotransformar compuestos terpenoides. Eshrat y Aroona (2011) reportaron la transformación de progesterona por *P. aurantiogriseum* microorganismo que produjo la escisión de la cadena sin degradar el núcleo esteroidal, rindiendo dos productos: androstenodiona y androst-1,4-dien-3,17-diona (**Tabla IV.4**).

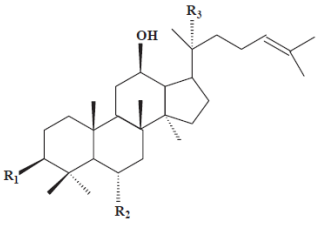
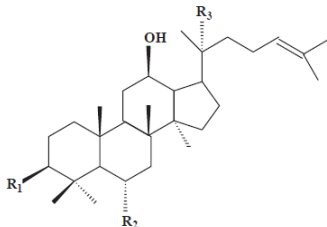
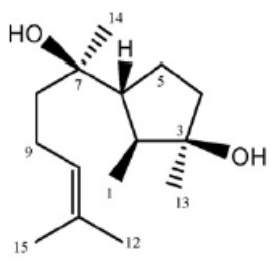
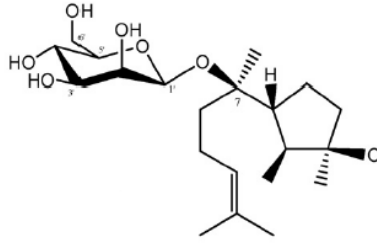
Li y col. (2006) describieron dos metabolitos *in vitro* de Evodiamina por un método de transformación microbiana con *P. janthinellum*. Identificaron un metabolito *in vivo* en orina de rata después de la administración oral de Evodiamina, usando el compuesto microbiano como estándar de referencia. Estos experimentos justifican, entonces, el uso de modelos microbianos para el metabolismo de mamíferos.

Los ginsenósidos con esteroides o triterpenos como agliconas son una importante clase de compuestos biológicamente activos en muchas plantas. En los últimos años, se encontraron que las cadenas de azúcar de los ginsenósidos están estrechamente asociadas con su actividad biológica y la modificación de estas cadenas glucídicas puede modificar notablemente su actividad biológica. Zhao y col. (2009) transformaron el ginsenósido Rg₁ empleando el hongo *P. sclerotiorum*, procedimiento que hidrolizó selectivamente uno de los glúcidos, dando origen al ginsenósido F₁ (**Tabla IV.4**),

Li. y col. (2007) estudiaron la transformación biológica del sesquiterpeno bioactivo ciclenerodiol, aislado del hongo *Myrothecium* sp. de origen marino. La fermentación a escala preparativa con *Penicillium* sp. dio como resultado el aislamiento de un nuevo metabolito glicosídico, 7-O-(β -D-manopiranosil)ciclenerodiol (**Tabla IV.4**).

Tabla IV.4: Antecedentes de biotransformaciones con el género *Penicillium*.

| MICROORGANISMO | COMPUESTO | METABOLITOS | REFERENCIA |
|---------------------------|---|---|-----------------------|
| <i>P. aurantiogriseum</i> |  <p>Progesterona</p> |  <p>Androstenodiona</p>  <p>Androst-1,4-dien-3,17-diona</p> | Eshrat y Aroona, 2011 |
| <i>P. janthinellum</i> |  <p>Evodiamina R₁=R₂=H</p> |  <p>10-hidroxi-evodiamina R₁=OH, R₂=H</p> <p>11-hidroxi-evodiamina R₁=H, R₂=OH</p> | Li y col., 2006 |

| | | | |
|--------------------------------------|---|--|------------------------------|
| <p><i>P. sclerotiorum</i></p> |  <p>ginsenosido Rg₁ R₁=-OH, R₂=-O-Glc, R₃=-O-Glc</p> |  <p>ginsenosido F₁ R₁=-OH, R₂=-OH, R₃=-O-Glc</p> | <p>Zhao y col., 2009</p> |
| <p><i>Penicillium sp.</i></p> |  <p>cyclonerodiol</p> |  <p>7-O-(β-D-manopiranosil) cyclonerodiol</p> | <p>Li y col., 2007</p> |

Al-Aboudi y col. (2008) reportaron las reacciones de bioconversión de testosterona realizadas por *R. stolonifer*, que produjeron la oxidación de un grupo hidroxilo en C-17, hidroxilación en la posición 11 α ecuatorial, la reducción del doble enlace en C-4 con la oxidación del grupo metileno C-6 al grupo ceto correspondiente y lactonización del anillo D (**Tabla IV.5**).

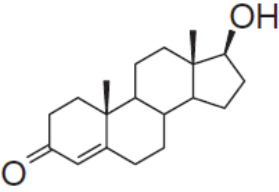
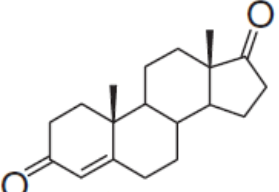
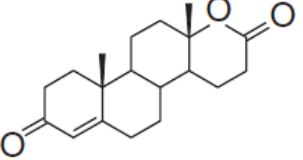
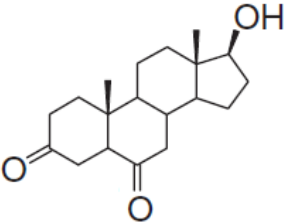
R. arrhizus metabolizó la micotoxina zearalenona a α -zearalenol en el trabajo realizado por El-Sharkawy y col. (1991) (**Tabla IV.5**), demostrando el hecho de que microorganismos pueden simular patrones metabólicos observados en sistemas de mamíferos y predecir las vías metabólicas y las propiedades toxicológicas y farmacológicas.

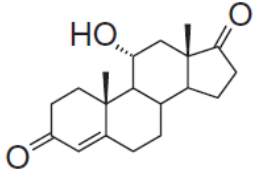
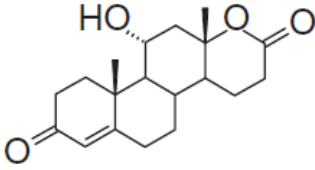
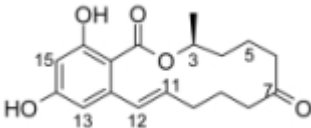
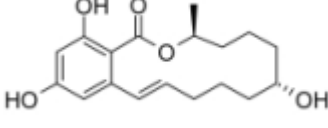
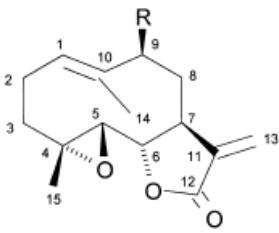
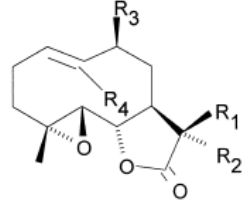
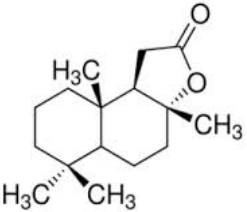
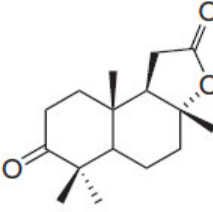
Galal y col (1999) estudiaron la biotransformación con *R. nigricans* de partenolido. Este compuesto es una lactona sesquiterpénica de núcleo germacranolido, con efectos biológicos de amplio espectro, los que incluyen actividades como citotóxico, antibacteriano y antifúngico. El resultado fue la

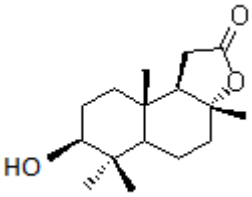
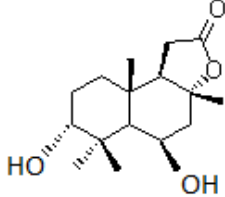
obtención de 11 β ,13-dihidropartenolido (**Tabla IV.5**). No se informaron estudios sobre el metabolismo de mamíferos o microbiano de este compuesto.

Cano y col. (2011), incubaron sclareolido con 8 especies de hongos filamentosos entre los que se encontraron las especies *R. oligosporus* y *R. nigricans*, obteniendo tres metabolitos, 3-cetosclareolide y 3 β -hidroxisclareolide con ambas especies de *Rhizopus* y, además, 3 α ,6 β -dihidroxisclareolide con *R. nigricans* (**Tabla IV.5**).

Tabla IV.5: Antecedentes de biotransformaciones con el género *Rhizopus*.

| MICROORGANISMO | COMPUESTO | METABOLITOS | REFERENCIA |
|----------------------|--|--|------------------------|
| <i>R. stolonifer</i> |  <p data-bbox="568 1071 722 1102">testosterona</p> |  <p data-bbox="901 1102 1193 1134">androst-4-en-3,17-diona</p> | Al-Aboudi y col., 2008 |
| | |  <p data-bbox="974 1396 1120 1428">testolactona</p> | |
| | |  <p data-bbox="868 1701 1218 1774">17β-hidroxi-5α-androstan-3,6-diona</p> | |

| | | | |
|--|---|--|--------------------------|
| | |  <p>11α-hidroxiandrost-4-en-3,17-diona</p> | |
| | |  <p>11α-hidroxitestolactona</p> | |
| <i>R. arrhizus</i> |  <p>Zearalenona</p> |  <p>α-Zearalenol</p> | El-Sharkawy y col., 1991 |
| <i>R. nigricans</i> |  <p>R=H artenolido</p> |  <p>R₁ = R₃ = H, R₂ = R₄ = CH₃ 11β,13-dihidropartenolido</p> | Galal y col., 1999 |
| <i>R. oligosporus</i> <i>R. nigricans</i> |  <p>Sclareolido</p> |  <p>3-cetosclareolido</p> | Cano y col., 2011 |

| | | | |
|----------------------------|--|--|--|
| <p><i>R. nigricans</i></p> | |  <p>3β-hidroxisclareolido</p> | |
| | |  <p>3α,6β-dihidroxisclareolido</p> | |

Se puede ver que en la mayoría de estos trabajos realizados en biotransformaciones de distintos compuestos, los dos objetivos principales son la de obtener derivados con un incremento en las actividades biológicas y por otro lado predecir el metabolismo de xenobióticos en mamíferos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Sustratos y Disolventes

- ✓ (-)-Ambroxido (**1.1**) fue marca Aldrich, CAS Number: 6790-58-5, 99%.
- ✓ (-)- α -Santonina (**1.2**) fue marca Aldrich, CAS Number: 481-06-1, 99%.
- ✓ (-)-Achalensolido (**1.3**) puro, fue proporcionado por la Dra Sosa, V., aislado a partir de la planta *Stevia achalensis* (Oberti y col., 1983).

V.2. Microorganismos

Las cepas originales de los microorganismos fueron provistas por la Cátedra de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Los microorganismos fueron mantenidos en picos de flauta de Sabouraud agarizado, almacenados a 4°C y transferidos cada 3-5 meses.

V.3. Preparación de los medios de cultivo

- a. Medio Sabouraud al 2 % caldo (Laboratorios Britania S.A.):** Se suspendieron 30 g de polvo en un litro de agua destilada. Se dejó reposar 5 minutos y se mezcló hasta homogeneidad. Se calentó con mechero y dejó hervir durante un minuto. Se repartió en erlenmeyers en iguales volúmenes y se llevó a autoclave durante 17 minutos a 121° C. La fórmula del medio en gr/L es la siguiente: tripteína 5 gr, peptona de carne 5 gr y glucosa 20 gr.
- b. Medio Czapek, Dox liquid medium, modified (Laboratorio Oxoid Ltd.):** Se disolvieron 33,4 gr del medio en polvo en un litro de agua destilada. Se mezcló bien hasta su completa disolución, se distribuyó en erlenmeyers

llevando luego a autoclave por 17 minutos a 121° C. La composición del medio en gr/L es: nitrato de sodio 2 gr, cloruro de potasio 0,5 gr, glicerofosfato de magnesio 0,5 gr, sulfato ferroso 0,01 gr, sulfato de potasio 0,35 gr y sacarosa 30 gr.

c. Medio Caldo Papa Glucosado: Se mezclaron 200 gr de papa blanca lavada y sin pelar con 1000mL de agua destilada, se dejó hervir durante 40 minutos y luego se filtró; posteriormente distribuyó en Erlenmeyers en iguales cantidades y se llevaron a autoclave durante 17 minutos a 121° C.

V.4. Técnicas de Biotransformaciones

V.4.1 Screening preliminar con células en crecimiento con tres medios de cultivo

En este trabajo se siguió el procedimiento general descrito en la bibliografía (Abourashed y col., 1999), el cual se resume en el siguiente esquema (**Figura V.1**). Los ensayos realizados se llevaron a cabo por duplicado.

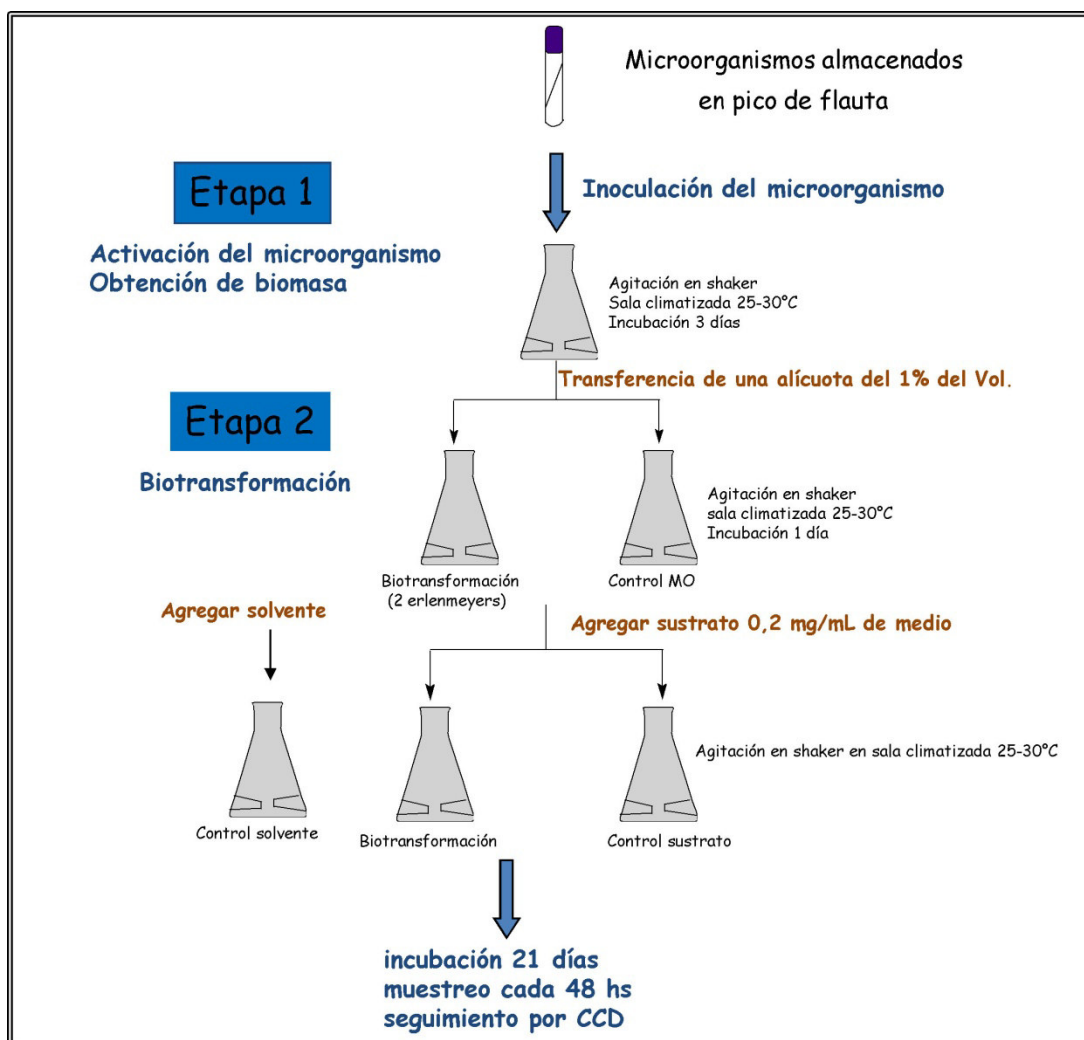


Figura V.1: Esquema de los pasos seguidos en la metodología utilizada.

Se prepararon dos erlenmeyers de 250 mL con 50 mL de cada medio, se taparon con algodón y se llevaron a autoclave durante 17 min. a 121°C. Una vez retirados del autoclave se dejaron enfriar, se inocularon asépticamente con esporas de la cepa pura del microorganismo seleccionado mantenido en pico de flauta en agar, dejando incubar 72 horas en shaker a 60 rpm en sala a 25-30° C (etapa I) (**Figura V.1**). Después de obtenida la biomasa, se transfirió una alícuota de 1 mL de medio de cultivo a cada uno de dos erlenmeyers de 250 mL seleccionados para llevar a cabo la biotransformación y a uno como control

microorganismo dejando un erlenmeyer sin inocular, uno como control sustrato, cada erlenmeyer contenía 50 mL de caldo de cultivo. Se dejaron incubar los tres erlenmeyers inoculados con el microorganismo durante 24 horas en las mismas condiciones descritas anteriormente (etapa II) (**Figura V.1**). Luego, todos excepto el que correspondía al control microorganismo, se agregó la solución del sustrato (1.33% p/v) en una mezcla de dimetilsulfóxido:etanol (DMSO:EtOH; 5:1) de manera de tener una concentración final de 0,2 mg/mL de caldo. Los cinco erlenmeyers se llevaron a agitación en las mismas condiciones antes mencionadas, durante un lapso de 21 días (**Figura V.2**).

Esta fue la metodología utilizada para la realizar la biotransformación de los sustratos **1.1**, **1.2** y **1.3** con cada uno de los hongos mencionados en la sección **III.1.3.2**. en la **Tabla III.1** en los tres medios de cultivo descriptos.

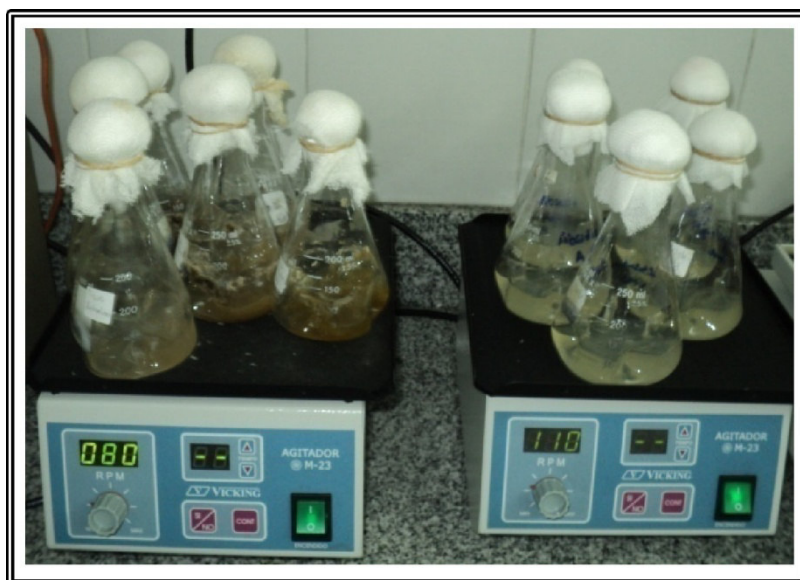


Figura V.2: Erlenmeyers en agitador en sala climatizada.

V.4.2. Biotransformación en escala preparativa

En dicha escala se siguieron los pasos generales de la biotransformación en pequeña escala. Una alícuota de 4 mL de medio de cultivo de la etapa I se transfirió asépticamente a cinco erlenmeyers de 1000 mL de capacidad, conteniendo cada uno 400 mL de medio de cultivo estéril. Se llevaron a agitación en *shaker* e incubación durante cuatro días (etapa II) en sala climatizada en las mismas condiciones que se señalaron en el punto V.3.1. Luego, la solución del sustrato preparado de la misma manera que para pequeña escala, se agregó al cultivo de la etapa II de manera de tener la misma concentración en relación al volumen de medio y se dejó incubar con agitación en *shaker* a 50 r.p.m por el período preestablecido en la pequeña escala para cada caso en particular (**Figura V.3**). Cumplido este tiempo se detuvo la biotransformación, se colocaron los erlenmeyers en sonicador para romper todas las células y de esa manera proceder a la extracción del/los productos.



Figura V.3: Erlenmeyers de escala preparativa en agitador en sala climatizada.

V.4.3. Seguimiento de la biotransformación

La evolución de la biotransformación se siguió mediante la toma de muestras cada 48 horas. Para ello se tomó una alícuota de 0,5 mL, se volcó en un tubo de ensayo y se agregó un pequeño volumen de AcOEt puro, agitando vigorosamente para realizar una extracción líquido-líquido. La fase orgánica se sembró en placa de silicagel y se corrió el cromatograma con una mezcla de solventes diclorometano: acetona (CH_2Cl_2 : Me_2CO ; 7:3). Para revelar los compuestos se expuso cada placa a la luz ultravioleta de 254 nm de longitud de onda. Sólo para los sustratos **1.1** y **1.2** seguidamente se pulverizó con una solución de p-anisaldehído y se calentó sobre plancha metálica hasta la aparición de manchas características en el cromatograma.

Los controles son los testigos y sin ellos no se puede determinar si una biotransformación real ha ocurrido con el sustrato (Abourashed y col., 1999). El control sustrato (C_{sust}) es el que permitió evaluar la estabilidad de éste en el medio y sin la influencia del microorganismo, el control caldo (C_c) permitió chequear los metabolitos naturales que produce el hongo bajo las condiciones de crecimiento establecidas.

V.4.4. Obtención de los metabolitos

El o los productos de la biotransformación contenidos en el medio de reacción se removieron del caldo de cultivo mediante la eliminación de la biomasa microbiana por filtración al vacío. Se realizó la filtración de un erlenmeyer por vez. El micelio se lavó con agua destilada y acetato de etilo al finalizar cada filtración. El caldo filtrado colectado en otro erlenmeyer se sometió a extracción líquido-líquido. Se colocó el caldo en una ampolla de decantación y se agregaron 100 mL de acetato de etilo (AcOEt); se tapó bien y se agitó vigorosamente. Cuando las fases estuvieron separadas, la fase acuosa

inferior y la interfase se colectaron juntas. Se realizaron cuatro extracciones con acetato de etilo (AcOEt) y los extractos orgánicos se juntaron.

La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Se agitó bien y se dejó reposar, procediendo luego a filtrarla y concentrarla en evaporador rotatorio a 150 r.p.m. y con un baño a 40° C para eliminar todo el solvente.

V.4.5. Purificación de los metabolitos

La separación y purificación de los metabolitos se realizó mediante cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) y cromatografía en columna (CC). Así mismo, se emplearon mezclas adecuadas de solventes dependiendo del tipo de fase estacionaria utilizada.

Las fracciones obtenidas en las CCDP y CC fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa delgada (CCD) empleando cromatofolios de silica gel 60 F254 con un espesor de 0,25 mm; la detección se realizó mediante fluorescencia utilizando lámpara UV con longitud de onda de 254 nm; posteriormente se sumergió en una solución de p-anisaldheído, se calentó sobre plancha calefactora hasta la aparición de las manchas características en el cromatograma.

V.5. Bioensayos

V.5.1 Capacidad antioxidante

La técnica analítica usada está basada en un ensayo espectrofotométrico en el que una solución metanólica del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH) de color violeta intenso se trata con soluciones de los metabolitos obtenidos de la biotransformación y sustratos de partida (**Figura V.4**).

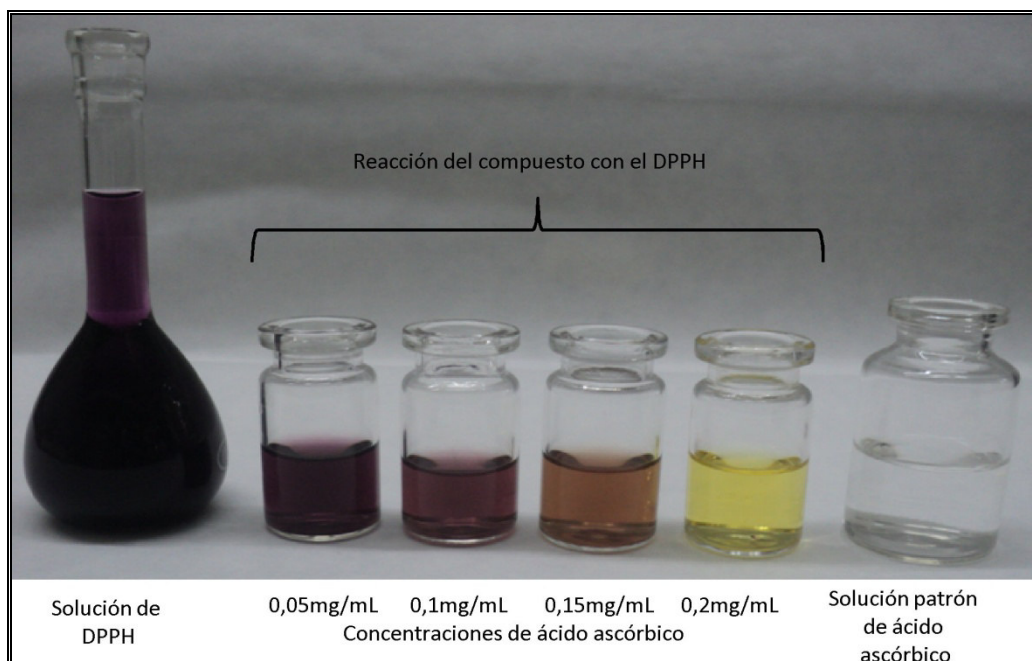


Figura V.4: Reacción del ácido ascórbico con el radical DPPH.

Para determinar la capacidad antioxidante, se prepararon 100 ml de una solución de DPPH con una concentración de 20 mg/L. La solución se preparó en el momento de realizarse el ensayo y se mantuvo protegida de la luz, dado la inestabilidad de la misma. Se prepararon soluciones metanólicas de cada compuesto con concentraciones de 0,2; 0,15; 0,1; 0,05 mg/mL. Se tomó como patrón de referencia al ácido ascórbico (vitamina C) y se procedió de la misma manera que para los compuestos analizados. 0,50 mL de cada muestra se mezclaron con 1 mL de la solución de DPPH. Además, se utilizó como blanco muestra cada compuesto disuelto en metanol sin DPPH y un blanco que constó de la solución de DPPH. Se dejaron reaccionar todas las muestras durante 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Para realizar la medición espectrofotométrica de cada muestra, se encendió el espectrofotómetro 15 minutos antes de su uso para que el mismo se estabilizara. Previamente a realizar las mediciones se ajustó a cero con

metanol. Una vez tomadas todas estas precauciones se procedió a la medición de la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 510 nm.

La determinación de capacidad antioxidante para cada compuesto a las distintas concentraciones propuestas en este estudio, se realizaron seis veces.

Los valores de absorbancia tomados en las distintas concentraciones mencionadas con anterioridad, fueron analizados de a pares con el test estadístico T, realizándose la corrección de Bonferroni con el fin de evitar la probabilidad de cometer error de tipo I (aceptar una hipótesis siendo falsa). Se utilizó el Software estadístico R versión 3.0.2, conocido también como GNUS.

V.5.2. Actividad citotóxica

Se preparó agua de mar, con 80 gramos de sal marina disuelta en 2 litros de agua destilada previamente esterilizada.

El agua se colocó en el tanque de tres litros de capacidad dividido por una placa delgada con poros de 2mm de diámetro aproximadamente, se sembraron 80 mg de huevos de *Artemia persimilis* en el lado oscurecido asegurándose que estuvieran protegidos de la luz. Se llevaron a estufa de cultivo a 25-30°C, colocando el lado descubierto hacia la luz para atraer las larvas. Luego de dos días las larvas naupilii eclosionaron y tomaron consistencia (**Figura V.5 y V.6**).

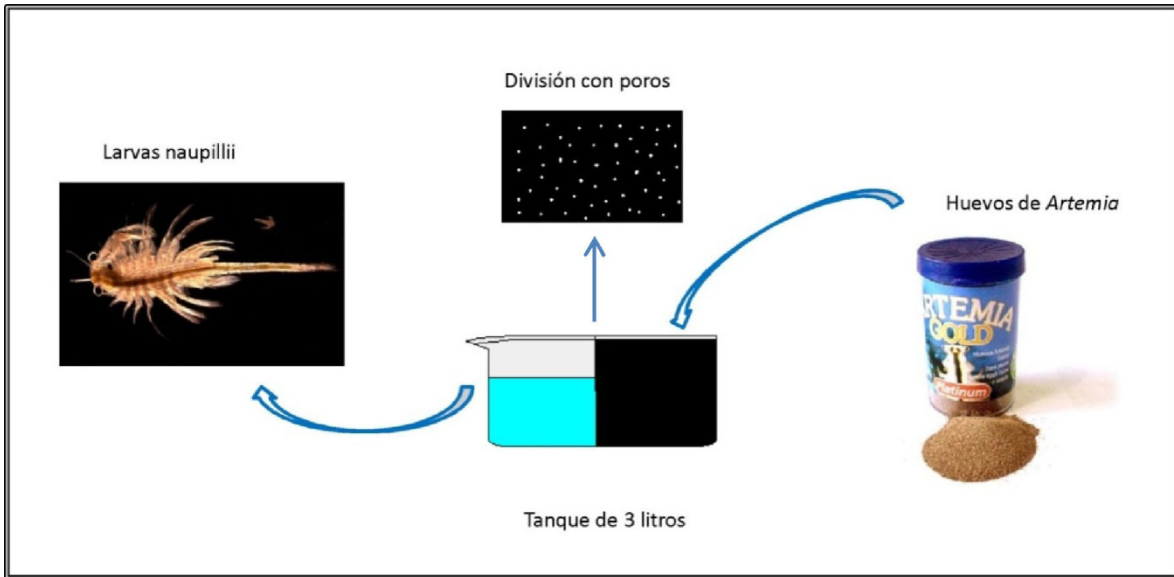


Figura V.5: Esquema del ensayo para la incubación de huevos de *Artemia*.

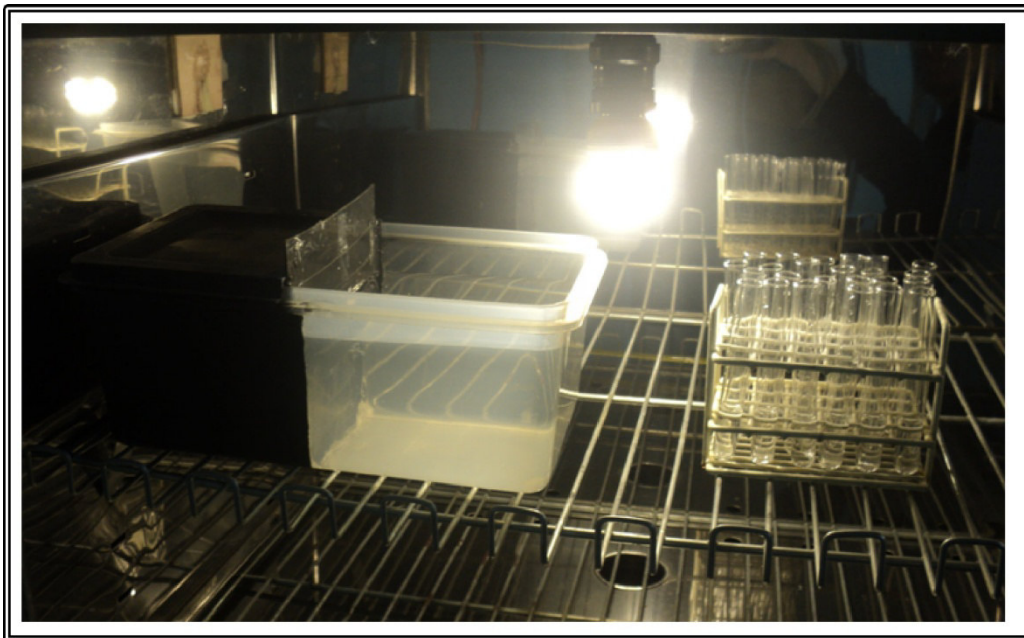


Figura V.6: Tanque con agua de mar y huevos de *Artemia* en estufa a 25-30°C.

Posteriormente se pesaron 2 mg de cada sustrato de partida y metabolitos obtenidos de las biotransformaciones y se añadieron 2 mL de una mezcla de solventes (EtOH:DMSO 5:1). A partir de esta solución madre (1000 ppm) se prepararon soluciones en las concentraciones de 100, 75, 50, 25 y 10 ppm. Se utilizaron tres frascos viales para cada concentración.

A cada uno de los tubos viales con las distintas concentraciones, realizando tres repeticiones, se les agregaron 10 larvas, enrasando luego a 2 mL con agua de mar. Se utilizaron, además, tres tubos viales con solo 2 ml de agua marina y larvas como control negativo. Como control positivo se utilizó cafeína en las mismas concentraciones anteriormente mencionadas (**Figura V.7**). Se colocaron los tubos viales en una gradilla en la estufa de cultivo entre 25-30°C, debajo de la lámpara, cuidando de que no estuvieran sobrecalentados. Al cabo de 24 h se contaron el número de larvas muertas (Colman-Saizarbitoria y Anderson, 1995).

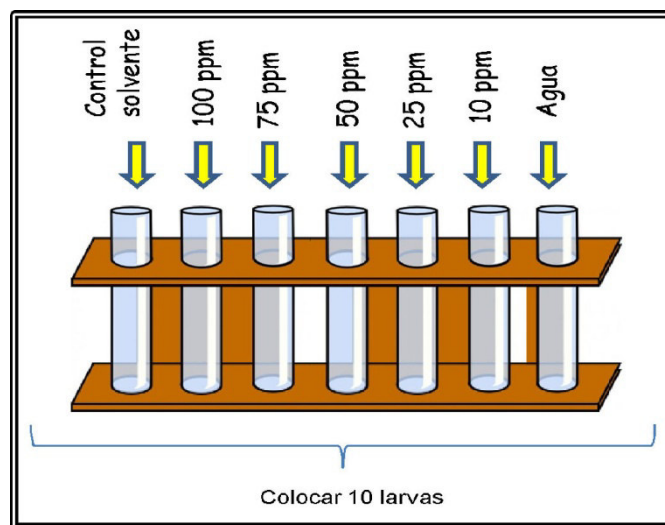


Figura V.7: Tubos viales con las distintas concentraciones de los compuestos a evaluar y los correspondientes correspondientes controles.

La ED50 (dosis efectiva que mata el 50 % de la larvas expresada en ppm) de todos los compuestos se realizó mediante el programa Finney. Se realizó la comparación de citotoxicidad entre los compuestos de partida y los metabolitos obtenidos mediante la prueba de Bondad de Ajuste (χ^2), utilizando el programa STATISTICA 7.

La determinación de capacidad citotóxica para cada compuesto a las distintas concentraciones propuestas en este estudio, se realizaron tres veces.

V.5.3. Actividad antibacteriana

Los microorganismos de ensayo seleccionados fueron una especie representativa de bacterias gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y una especie gram negativa: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los distintos sustratos de partida y de los metabolitos obtenidos de las biotransformaciones, se empleó la técnica de difusión en agar, basada en el Método de Kirby-Bauer modificado (Rangel y col., 2001).

Para la activación de las bacterias almacenadas, se prepararon suspensiones a partir de cada uno de ellas en caldo Triptosa-Soya y se incubaron a 35°C durante 24 h.

Para la preparación del inóculo se tomó el cultivo anterior y se diluyó en agua peptonada al 0,1% hasta lograr una turbidez comparable al patrón de turbidez 0,5 Mc Farland: Esta comparación se llevó a cabo visualmente utilizando un fondo blanco con líneas negras contrastantes y fuente de luz adecuada. De este inóculo, se tomaron alícuotas de 100µL lo que corresponde a 1×10^8 unidades formadoras de colonias/mL (ufc/mL) y se sembraron en placas estériles con medio de cultivo Müller-Hinton agarizado. Las placas se prepararon con 15 mL cada una de este medio.

Para la distribución uniforme del inóculo en las placas se utilizó la técnica de escobillado, para lo cual una vez aplicado el inóculo, con un asa de Digrafski se efectuó un barrido en por lo menos tres direcciones, girando la placa a 90º grados.

Seguidamente se procedió a realizar tres perforaciones de 7mm de diámetro en cada caja (**Figura V.8**). A continuación se aplicaron en una de las perforaciones la solución del compuesto (200 ppm, 100 ppm y 50 ppm), el solvente utilizado como diluyente una mezcla de dimetilsulfóxido:etanol (DMSO:EtOH 5:1) y el disco de antibiótico correspondiente para cada bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*: Ciprofloxacina 5µg, *Staphylococcus aureus*: Ampicilina-Sulbactam 10µg) con la ayuda de una pinza estéril y ejerciendo una ligera presión sobre la superficie del medio. Para cada concentración se realizaron tres repeticiones.

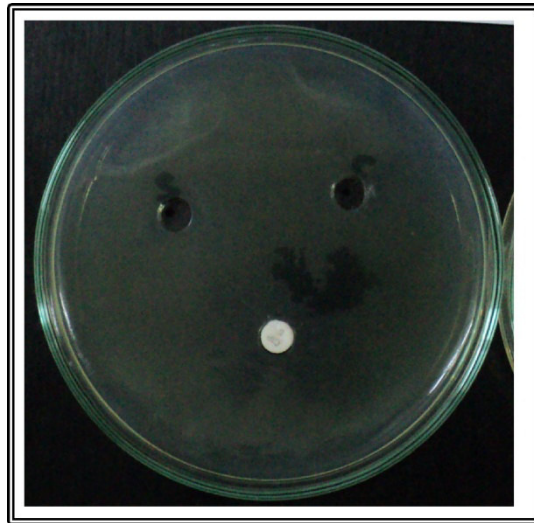


Figura V.8: Placa de Petri con perforaciones para el agregado de la solución del compuesto, solvente y disco de antibiótico.

Finalizado este procedimiento, se comenzó la incubación a 35°C durante 24 horas, al cabo de las cuales se leyeron los resultados. Se reportan los mismos, mediante el halo de inhibición medido en mm.

Para la interpretación de los resultados se consideraron dos categorías según Maguna y col., 2006:

- inhibición del crecimiento, halo translúcido detectado alrededor del disco, es decir que la bacteria es sensible al compuesto (I).
- no inhibición del crecimiento, es decir que no se forma halo y la bacteria no es sensible. Se presenta en la tabla como (NI).

VI. RESULTADOS y DISCUSIONES

VI.1. Escaneo preliminar de las biotransformaciones

El desarrollo de biocatalizadores como herramientas de síntesis para los químicos, se ha expandido rápidamente en las últimas décadas en especial debido al hecho de que reacciones catalizadas por enzimas reducen o eliminan el uso o generación de sustancias peligrosas en comparación con catalizadores químicos tradicionales (Carballeira y col., 2009).

De acuerdo con la reacción química deseada y la escala del proceso, los sistemas enzimáticos deben ser elegidos teniendo en cuenta el costo y la eficiencia de todo el proceso. En varios casos, los sustratos utilizados para las reacciones biocatalíticas son compuestos artificiales. Por lo tanto, la generalización de una reacción enzimática específica para una amplia gama de sustratos es todavía difícil de predecir. Por lo que, para el descubrimiento de nuevas enzimas con la actividad y especificidad deseada se necesitan realizar escaneos constantemente (Andrade y col., 2004).

Los escaneos de las biotransformaciones realizados en este trabajo, se llevaron a cabo según un protocolo general descrito en la sección V.3.1 utilizando medios de cultivo Sabouraud, Czapek y Medio Caldo Papa Glucosado. Los resultados de estos ensayos con las especies de hongos

mencionados en el apartado III.1.3.2 se pueden ver resumidos en la siguiente tabla.

Tabla VI.1: Biotransformaciones realizadas con (-)-Ambroxido (1.1), α -(-)-Santonina (1.2) y Achalensolido (1.3) en distintos medios de cultivo.

| MICROORGANISMO | (-)-AMBROXIDO (1.1) | (-)-SANTONINA (1.2) | ACHALENSOLIDO (1.3) |
|---------------------------------|---|---------------------------------|---------------------------|
| <i>Alternaria alternata</i> | Antecedente del Grupo MS (+) MC (+) | MP (-) MS (-) MC (-) | MP (+) |
| <i>Absidia</i> | MP (+) MS (+) | MP(-) MS (-) | MP (+) MS (+) |
| <i>Aspergillus terreus</i> | Antecedente del Grupo MC (+) MS (+) | MP(-) CR (-) MS(-) MC (-) | MP (-) MS(-) MC (-) |
| <i>Aspergillus niger</i> | Antecedente del Grupo MS (+) MC (+) | MP (-) MS (-) MC(-) | MP (+) |
| <i>Aspergillus flavus</i> | MP (-) | MP(-) MS (+) MC (-) | MP (-) |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> | | MP (-) MS (-) MC (-) | MP (+) MC (+) |
| <i>Chaetomium spp.</i> | MP(+) | MP (-) MS (-) MC (-) | MP (-) |
| <i>Cladosporium spp.</i> | MP(+) | MP(-) | MP (+) |
| <i>Cuunninghamella spp.</i> | Antecedente del Grupo MS (+) | MS (+) GE*1 MP (+) MC(-) | MP (-) |
| <i>Fusarium verticillioides</i> | MP (+) GE*3 | MP (-) | MP (-) |
| <i>Fusarium oxysporium</i> | MP (-) | MP (-) | MP (-) |
| <i>Geotrichum sp</i> | | MP (-) | MP (+) |
| <i>Penicillium spp.</i> | MP(-) | MP (-) MS (-) MC (-) | MP (+) GE *2 |
| <i>Penicillium citrinum</i> | | | MP (-) |
| <i>Rhizopus sp</i> | | | MP (+) GE*4 |
| <i>Melampsora medusae</i> | MP (+) | MP (-) MS (-) MC (-) | MP (+) |
| <i>Talaromyces flavus</i> | MP(+) | MP (-) | MP (+) |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | MP(+) | MP (-) | MP (+) |

Referencias: **MP:** Medio Caldo Papa Glucosado, **MS:** Medio Sabouraud, **MC:** Medio Czapek, **(+)** Hubo Biotransformación, **(-)** No Hubo Biotransformación, **GE:** Biotransformación llevada a escala preparativa.

Como criterio para llevar a cabo las reacciones de biotransformación a escala preparativa se tuvieron en cuenta tanto la pureza como la abundancia de compuestos obtenidos de los escaneos y monitoreados por CCD.

VI.2. Biotransformación en escala preparativa de (-)- α -Santonina (1.2) con el hongo *Cunninghamella* spp.

VI.2.1. Obtención y purificación del metabolito obtenido

Luego de revisar, mediante CCD, la transformación en pequeña escala del sustrato usando el hongo *Cunninghamella* spp. la reacción se llevó a escala preparativa en medio líquido Sabouraud.

El proceso de biotransformación se mantuvo durante 18 días a 25°C. Luego de detenida la transformación, se realizó la extracción líquido-líquido, descrita en la sección V.3.4., obteniendo un extracto de 487,4 mg de aspecto oleoso. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en columna usando como fase móvil éter de petróleo:acetona (EP:Me₂CO) (100:0 a 93:7 v/v), obteniéndose 44,6 mg de un compuesto impuro, pero, por CCD, de mayor polaridad que el sustrato de partida. Éste fue posteriormente purificado usando diclorometano:acetona (CH₂Cl₂:Me₂CO) (100:0 a 89:11 v/v) como fase móvil, para obtener finalmente 25,2 mg del compuesto 8 β -hidroxi- α -santonina (**6.1**) con un rendimiento del 6% (**Figura VI.1**).

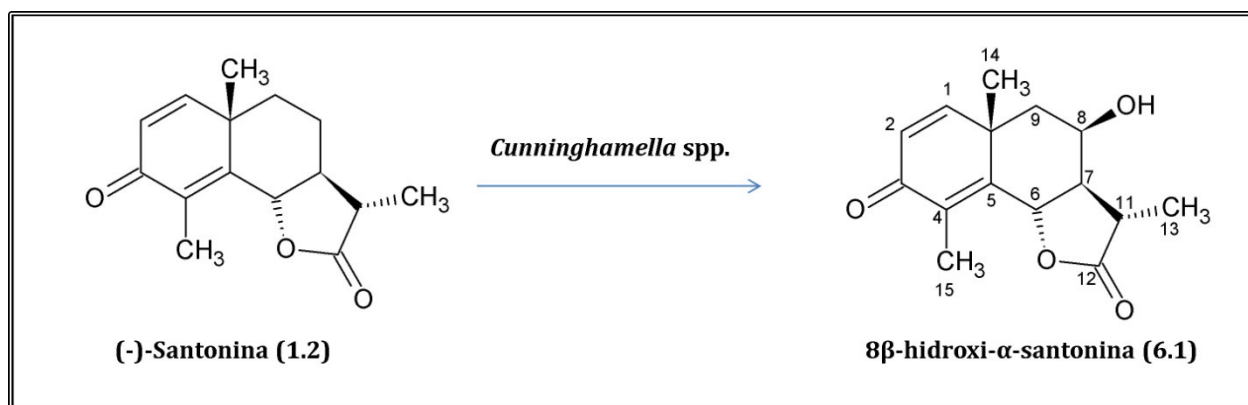


Figura VI.1: Reacción de la biotransformación de (-)-santonina (1.2) con *Cunninghamella spp.*

VI.2.2. Análisis espectroscópico del metabolito obtenido

El espectro de masas de alta resolución de ionización por electroespray, mostró un ión ($[M + Na]^+$) a m/z 285.10997 de acuerdo a la fórmula $C_{15}H_{18}NaO_4$, sugiriendo la incorporación de un grupo hidroxilo en el sustrato.

El espectro de RMN de H^1 de 8β-hidroxi-α-santonina (6.1), mostró una señal a $\delta = 4,36$ ppm como un singlete ancho atribuible a H-8, un doble cuarteto a $\delta = 2,84$ ppm ($J_{11-13} = 7,7$ Hz, $J_{11-7} = 12$ Hz) asignado a H-11; una señal como un triple doblete a $\delta 1,98$ ppm ($J_{7-11} = 12$ Hz, $J_{7-8a} = 2,6$ Hz) atribuido a H-7, luego un doblete a $\delta 5,35$ ppm ($J_{6-7} = 12$ Hz) asignado a H-6 y finalmente dos señales a $\delta 1,53$ y $2,16$ ppm que integran para 3H cada uno como singletes atribuidos a H-14 y H-15, respectivamente (**Tabla VI.2**).

El espectro de RMN de C^{13} mostró quince señales, de las cuales se destacan, una de metino a $\delta = 64.3$ ppm y una de metileno a $\delta = 44.6$ ppm para C-8 y C-9, respectivamente. Dos carbonos olefínicos cuaternarios dieron señales a $\delta = 152.1$ ppm para C-5 y $\delta = 128.7$ ppm para C-4 (**Tabla VI.2**).

Por HMBC (**Tabla VI.3**) se corroboró la unión de un grupo hidroxilo a C-8 debido a que mostró correlaciones importantes entre H-8 ($\delta = 4,36$ ppm) y C-10 ($\delta = 41,5$ ppm); H-11 ($\delta = 2,84$ ppm) y C-7 ($\delta = 57,3$ ppm), C-8 ($\delta = 64,3$ ppm), y

C-12 ($\delta = 179,4$ ppm), H-6 ($\delta = 5,35$ ppm) y C-11 ($\delta = 36,0$ ppm), C-13 ($\delta = 12,3$ ppm), C-4 ($\delta = 128,7$ ppm) y C-5 ($\delta = 152,1$ ppm). (**Tabla VI.2**) (**Figura VI.2**).

La multiplicidad de la señal del H-8, la correlación heteronuclear múltiple-ligando, la espectroscopía de correlación y la comparación con estudios previos (Yamakawa y col., 1986; Iida y col., 1993), han demostrado que la estereoquímica del grupo hidroxilo ha sido asignada inequívocamente al carbono-8 del compuesto 8 β -hidroxi- α -santonina (**6.1**).

Tabla VI.2: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de (-)-santonina (**1.2**) y 8 β -hidroxi- α -santonina (**6.1**).

| Carbono | δ C ppm | | δ H ppm (J) | |
|---------|----------------|-------|--------------------|--|
| | 1.2 | 6.1 | 1.2 | 6.1 |
| 1 | 155,7 | 154,7 | 6,69 d (10,0) | 6,69 d (10,0) |
| 2 | 126 | 125,1 | 6,25 d (10,0) | 6,29 d (10,0) |
| 3 | 186,4 | 185,9 | | |
| 4 | 128,3 | 128,7 | | |
| 5 | 150,9 | 152,1 | | |
| 6 | 81,5 | 76,1 | 4,79 dq (11,2) | 5,35 d (12,0) |
| 7 | 41,1 | 36,1 | 2,42 ddd (11,2) | 2,84 ddd (2,6; 12,0) |
| 8 | 23,1 | 64,3 | 1,69 m 2,04 m | 4,36 brs |
| 9 | 37,9 | 44,6 | 1,52 m 1,90 m | 1,67 dd (14,5;3,0) 2,09 dd (14,5;3,0) |
| 10 | 41,6 | 41,5 | | |
| 11 | 53,5 | 57,3 | 1,82 td (12,3) | 1,98 dq (7,7; 12,0) |
| 12 | 177,5 | 179,4 | | |
| 13 | 12,6 | 12,3 | 1,28 d (7,0) | 1,28 d (7,0) |
| 14 | 25,2 | 28,3 | 1,33 s | 1,53 s |
| 15 | 11,0 | 10,9 | 2,14 s | 2,16 s |

Referencias: d: doblete, dd: doble doblete, ddd: doble doble doblete, td: triple doblete, dq: doble cuarteto, s: singlete, brs: singlete ancho. El espectro de RMN de este metabolito, fue realizado en cloroformo deuterado (Cl₃CD).

Tabla VI.3: Correlaciones HMBC de 8β-hidroxi-α-santonina (6.1).

| Carbono | HSQC-DEPT | HMBC |
|---------|-----------------|--|
| 1 | CH | C-14, C-10, C-5, C-9, C-3 |
| 2 | CH | |
| 3 | C | |
| 4 | C | |
| 5 | C | |
| 6 | CH | C-11, C-13, C-4, C-5 |
| 7 | CH | C-11, C-4 |
| 8 | CH | C-10 |
| 9 | CH ₂ | C-14, C-10, C-1 C-14, C-10, C-7, C-1, C-8 |
| 10 | C | |
| 11 | CH | C-7, C-8, C-12 |
| 12 | C | |
| 13 | CH ₃ | |
| 14 | CH ₃ | |
| 15 | CH ₃ | |

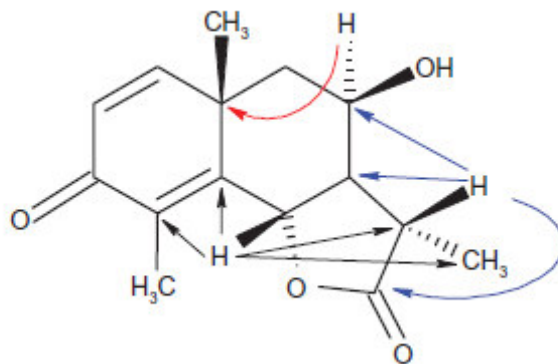


Figura VI.2: Correlaciones HMBC de 8β-hidroxi-α-santonina (6.1).

A partir de estos resultados, se puede observar que las enzimas presentes en la cepa del hongo *Cunninghamella* spp., en las condiciones experimentales descritas, son monooxigenasas lo que permitió que el sustrato

(-)-santonina se hidroxilara de una manera regio y estereoselectiva dando como producto mayoritario 8 β -hidroxi- α -santonina (**6.1**).

Estudios anteriores con varios xenobióticos utilizando el hongo fitopatógeno *Cunninghamella* han demostrado la participación de citocromo P450 monooxigenasa (Pothuluri y col., 2000).

La capacidad de *Cunninghamella* para imitar el metabolismo de mamíferos y para realizar nuevas biotransformaciones, demuestran claramente que los sistemas microbianos representan una alternativa atractiva frente al uso de sistemas de mamíferos o síntesis química de metabolitos (Moody y col., 1999).

VI.3. Biotransformación en escala preparativa de (-)-Achalensolido (1.3) con los hongos Penicillium spp. y Rhizopus spp.

VI.3.1. Obtención y purificación del metabolito obtenido

Luego de realizado el screening preliminar de la biotransformación, ésta se llevó a un aumento de escala en medio caldo papa glucosado durante 12 días a 25°C. El seguimiento de la biotransformación se realizó mediante CCD.

Luego de transcurrido el tiempo mencionado, se procedió a la extracción obteniendo un residuo oleoso de 429,7mg. La purificación se realizó mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil diclorometano:acetona (CH₂Cl₂:Me₂CO) (100:0 a 89:11v/v), obteniéndose 214,8mg de una mezcla tanto del material de partida como del producto de la bioreacción, 11 α -metilachalensolido (**6.2**). Una purificación posterior por CCDP (cromatografía en capa delgada preparativa) usando como fase móvil diclorometano:acetona (CH₂Cl₂:Me₂CO) (9:1; v/v), condujo a la obtención de 26,5mg del compuesto

6.2 con un rendimiento del 6,5%, como cristales blancos en forma de agujas (Figura VI.3).

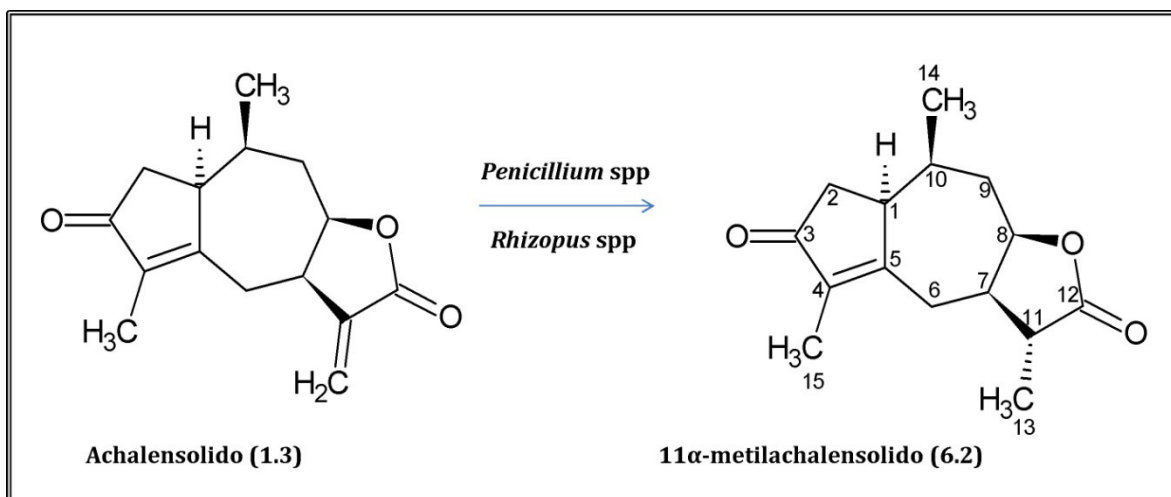


Figura VI.3: Reacción de la biotransformación de (-)-achalensolido (1.3) con *Penicillium* spp. y *Rhizopus* spp.

VI.3.2. Análisis espectroscópico del metabolito obtenido

El espectro de IR mostró una banda a 1680 cm^{-1} asignada al grupo carbonilo de la cetona α,β -insaturada. No se observó señal asociada a un grupo hidroxilo, demostrando que el anillo lactónico no fue hidrolizado.

El espectro de RMN de H^1 mostró un multiplete a $\delta = 2,15\text{ ppm}$ asignado a H-11 y un doblete a $\delta = 1,24\text{ ppm}$ ($J = 6,5\text{ Hz}$) atribuido al grupo metilo de C-13. Cuando se compara este espectro con el de (-)-achalensolido (1.3), en este último se aprecian dos dobletes pertenecientes al grupo metileno de C-13 a $\delta = 5,71$ y $6,39\text{ ppm}$ (Oberti y col., 1983), ausentes en el espectro del producto (Tabla VI.4), a partir de lo cual se pudo inferir que hubo una reducción en el doble enlace C-11,13.

Las señales de RMN de C^{13} se asignaron mediante el experimento HSQC (Tabla VI.4). Una señal a $\delta = 35,45\text{ ppm}$ se atribuyó a C-11 y el nuevo grupo

metilo de C-13 mostró una señal a $\delta = 13,6$ ppm. Comparando con los mismos grupos funcionales del sustrato de partida se pudo observar que la señal a $\delta = 207,5$ ppm del grupo carbonilo de la cetona cíclica no fue modificada y que tanto la señal a $\delta = 178,12$ ppm perteneciente al grupo carbonilo del anillo de lactona como las de 138,4 y 123,4 ppm del doble enlace exocíclico del compuesto de partida están ausentes. Todo esto contribuyó a confirmar la reducción en la posición C-7,13. La estereoquímica del nuevo C-11 quiral se determinó comparando el espectro de RMN de C^{13} del mismo compuesto (**6.2**) y de sus diastereómeros (Oberti y col., 1983). Considerando la señal a $\delta = 44,62$ ppm (C-7), 33,5 ppm (C-9), 27,4 ppm (C-10), 35,5 ppm (C-11) y básicamente la de 13,6 ppm (C-13), cercanas a aquellas del mismo estereoisómero ya publicado, se puede asegurar la presencia de un grupo metilo en C-11 con una configuración α (**Tabla VI.3**).

La presencia del nuevo grupo metilo C-13, finalmente, fue corroborada por el espectro de correlación heteronuclear múltiple-enlace (**Tabla VI.5**), debido a que estos protones ($\delta = 1,24$ ppm) mostraron correlaciones con C-7 ($\delta = 44,6$ ppm), C-11 ($\delta = 35,5$ ppm) y C-12 ($\delta = 178,1$ ppm) (**Figura VI.4**).

Tabla VI.4: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de (-)-achalensolido (**1.3**) y 11 α -metilachalensolido (**6.2**).

| Carbono | δC ppm | | δH ppm (J) | |
|---------|----------------|-------|--------------------|---|
| | 1.3 | 6.2 | 1.3 | 6.2 |
| 1 | 42,7 | 46,9 | 2,99 m | 2,91 brs |
| 2 | 38,0 | 37,1 | 2,40 dd 2,25 dd | 1,98 dd (4,0;18,1) 2,38 dd (6,0; 18,1) |
| 3 | 207,9 | 207,5 | | |
| 4 | 138,1 | 140,0 | | |
| 5 | 168,3 | 168,8 | | |
| 6 | 31,9 | 26,6 | 2,93 dd 2,68 dd | 2,5 dd (4,7; 14,0) 2,80 dd (4,7; 14,0) |
| 7 | 38,5 | 44,62 | 3,51 m | 2,14 m |
| 8 | 77,9 | 80,0 | 4,97 ddd | 4,53 ddd (4,5;7,5;12,1) |

| | | | | |
|-----------|-------|--------|--------------------|------------------|
| 9 | 36,6 | 33,4 | 2,25 m 1,48 ddd | 1,57 m 1,24 m |
| 10 | 30,1 | 27,4 | 2,25 m | 2,11 m |
| 11 | 138,4 | 35,45 | | 2,15 m |
| 12 | 168,9 | 178,12 | | |
| 13 | 123,5 | 13,6 | 6,39 d 5,71 d | 1,24 d (7,1) |
| 14 | 14,9 | 19,6 | 0,75 d | 0,97 d (7,1) |
| 15 | 8,2 | 8,5 | 1,73 t | 1,65 d (2,1) |

Referencias: ddd: doble doble dolete, dd: doble dolete, d: dolete, m: multiplete, brs: singlete ancho, t: triplete. El espectro de RMN de este metabolito, fue realizado en cloroformo deuterado (Cl₃CD).

Tabla VI.5: Correlaciones HMBC del compuesto 11 α -metilachalensolido (6.2).

| Carbono | HSQC-DEPT | HMBC |
|----------------|------------------|---|
| | C | C4-C5-C7-C8 |
| 1 | CH ₂ | C1-C5 |
| 2 | C | |
| 3 | C | |
| 4 | C | |
| 5 | CH ₂ | C13-C10-C9- C11- C7-C1 C7-C1-C11 |
| 6 | CH | |
| 7 | CH | C7-C10-C11-C12 |
| 8 | CH ₂ | C1-C7-C8-C10- C14 |
| 9 | CH | |
| 10 | CH | |
| 11 | C | |
| 12 | CH ₃ | C7-C11-C12 |
| 13 | CH ₃ | C1-C9-C10 |
| 14 | CH ₃ | C3-C4-C5 |
| 15 | | |

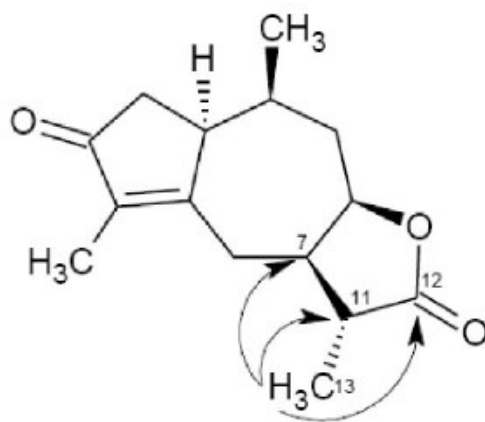


Figura VI.4: Correlaciones HMBC del compuesto 11 α -metilachalensolido (**6.2**).

Podemos concluir que los microorganismos *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp. reducen a (-)-achalensolido (**1.3**) de una manera regio y estereoselectiva, ya que sólo se hidrogenó el doble enlace exocíclico del anillo de lactona α,β -insaturada y únicamente se detectó el estereoisómero 11 α -metilachalensolido (**6.2**), idéntico al producto natural aislado a partir de *Stevia achalensis* (Oberti y col., 1983).

Este es el primer informe de la biotransformación de (-)-achalensolido (**1.3**) y la primera vez que un doble enlace carbono-carbono activado es reducido con cepas puras de estos géneros de hongos.

VI.4. Biotransformación en escala preparativa de (-)-Ambroxido (1.2) con el hongo *Fusarium verticillioides*

VI.4.1. Obtención y purificación de los metabolitos obtenidos

Luego de realizado el screening preliminar de la biotransformación, ésta se llevó a escala preparativa en medio CPG durante 25 días a 25°C. El seguimiento de la misma, se realizó mediante CCD.

Transcurrido el tiempo mencionado, se detuvo la biotransformación y se procedió a la extracción obteniendo un residuo de 256 mg. La purificación se

realizó mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil diclorometano:acetona ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Me}_2\text{CO}$) (100:0 a 4:1v/v), obteniéndose varias fracciones impuras. Posteriores purificaciones por CCDP usando como fase móvil diclorometano:acetona ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Me}_2\text{CO}$) (8:2; v/v), llevaron a la obtención de tres metabolitos: 3,7 mg de 1 β -hidroxiambroxido (**4.10**) (rendimiento del 0,9%) (Allendes y col., 2011), 2,7 mg de 3 β -hidroxiambroxido (**4.1**) (rendimiento del 0,6%) (Allendes y col., 2011), y 3,6 mg de 6 β -hidroxiambroxido (**4.2**) (rendimiento del 0,86%) (**Figura VI.5**). El orden de polaridad de los mismos es el siguiente: 6 β -hidroxiambroxido >1 β -hidroxiambroxido>3 β -hidroxiambroxido.

Esta biotransformación debió repetirse, para obtener mayor cantidad de estos compuestos para la determinación de las actividades biológicas.

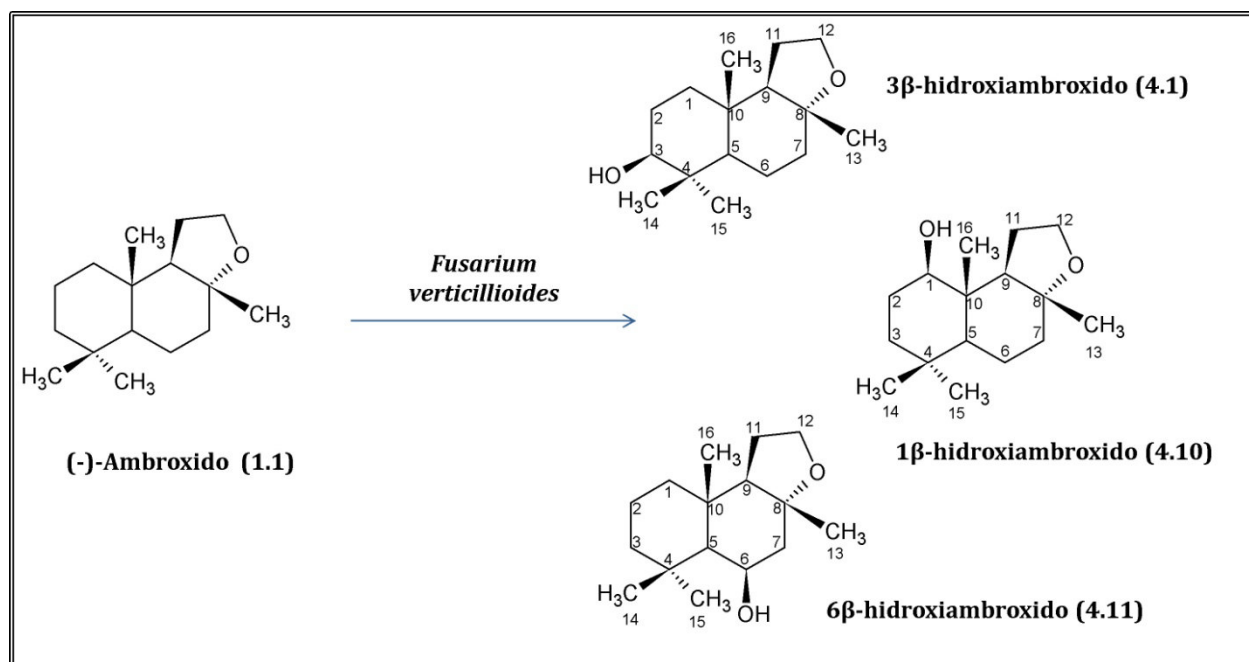


Figura VI.5: Reacción de la biotransformación de (-)-ambroxido (1.1) con *Fusarium verticillioides*.

VI.4.2. Análisis espectroscópico de los metabolitos obtenidos

✚ 1β-hidroxiambroxido (4.10)

El espectro ESI-MS de alta resolución de este compuesto oleoso mostró un ión $[M + Na]^+$ a $m/z = 253.21670$ de acuerdo a la fórmula $C_{16}H_{28}O_2$. En el espectro de IR se observó una ancha banda de absorción a 3424 cm^{-1} atribuible a la presencia de un grupo hidroxilo en la molécula.

El espectro de RMN de H^1 del compuesto mostró un doble doblete a $\delta = 3,36\text{ ppm}$ (1H, $J = 10,8$ y $4,9\text{ Hz}$) atribuible a H-1, una señal a $\delta = 0,93\text{ ppm}$ como un multiplete asignado a H-5. Otra señal a $1,33\text{ ppm}$ ($J = 13,4$ y $4,6\text{ Hz}$) como un doble doblete debido a H-9 y un quintuplete a $3,86\text{ ppm}$ ($J = 9,0$ y $1,0\text{ Hz}$) originado por el grupo metileno de C-12 (**Tabla VI.6**).

La multiplicidad y los valores de las constantes de acoplamiento de H-1 indicaron que el grupo hidroxilo se encuentra en orientación β ecuatorial, dado que la señal del protón carbinólico aparece como un doble doblete con valores de J de $10,8$ y $4,9\text{ Hz}$, lo que indica una relación anti y una oblicua con los protones de C-2. La unión del grupo hidroxilo se confirmó por correlación HMBC (**Tabla VI.7**) de H_3-16 ($\delta = 0,86\text{ ppm}$, s) con C-1 ($\delta = 79,9\text{ ppm}$), C-5 ($\delta = 55,9\text{ ppm}$), C-9 ($\delta = 58,9\text{ ppm}$) y C-10 ($\delta = 32,7\text{ ppm}$) (**Tabla VI.6**) (**Figura VI.6**). Los datos obtenidos de los experimentos mono y bidimensionales concuerdan con la estructura propuesta para el compuesto 1β-hidroxiambroxido (4.10).

Este compuesto fue anteriormente obtenido en nuestro laboratorio utilizando el hongo *Cunninghamella* spp (Allendes y col., 2011).

3β-hidroxiambroxido (4.1)

Del análisis del espectro de RMN ^1H de este metabolito (**Tabla VI.6**), se pudo ver que hay dos señales con un desplazamiento químico a 3,86 y 3,96 ppm, las cuales se pudieron atribuir a los protones del grupo metileno de C-12 vecino al oxígeno heteroatómico del anillo furanósico. La señal con desplazamiento químico a 39,5 ppm ($J = 1,96$ Hz) y que se presentó como un doble doblete, se atribuyó a los protones metilénicos de C-7, desprotegidos por la proximidad al oxígeno heteroatómico del anillo de cinco miembros. Dos señales como singletes con un desplazamiento químico a 0,80 y 0,85 ppm fueron asignadas a los protones de los grupos metilo de C-16 y C-15 respectivamente. Por su parte el singlete a $\delta = 0,86$ ppm (3H) pudo ser asignado a los protones del grupo metilo de C-14 y el singlete con un desplazamiento químico de 1,09 ppm se pudo, a su vez, asignar a los protones del grupo metilo de C-13. Finalmente, se observó una señal nueva a $\delta = 3,23$ ppm al comparar este espectro con el de RMN de ^1H de (-)-ambroxido (**1.1**) y se atribuyó, sin dudas, a un protón carbinólico. Este protón, característico de un alcohol secundario, fue identificado como aquel unido a C-3 y debido a que se presenta como un doble doblete ($J = 3,23$ Hz), necesariamente la estereoquímica de este nuevo centro quiral generado en la molécula debe ser tal que el grupo oxhidrilo se encuentre en posición β .

El espectro de RMN de C^{13} (**Tabla VI.6**) mostró una resonancia de metino a $\delta = 79,0$ ppm perteneciente a C-3, una resonancia de metileno a $\delta = 27,1$ ppm perteneciente a C-2 y una señal a $\delta = 38,7$ ppm de C-4.

La unión del grupo hidroxilo a C-3 se confirmó por HMBC (**Tabla VI.7**), mostrando correlaciones entre H-3 ($\delta = 3,41$ ppm) con C-2 (27,1 ppm) y C-4 (38,7 ppm) (**Figura VI.7**).

La asignación de las señales del espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H del metabolito obtenido, nos permitieron asegurar para este compuesto la estructura 3 β -hidroxiambroxido (**4.1**); y estas señales concuerdan claramente con las del mismo compuesto obtenido anteriormente en nuestro laboratorio con *Alternaria alternata* (Allendes y col., 2011), por Hanson y Truneh (1996) utilizando el hongo *Cephalosporium aphidicola* y por Farooq y Tahara (2000) con *Botrytis cinerea*.

6 β -hidroxiambroxido (4.11)

El espectro de RMN de H^1 de **4.11** mostró una señal a $\delta = 3,41$ ppm ($J = 2,2$ Hz) como un triplete atribuida a H-6. Un doblete a $\delta = 1,76$ ppm ($J = 2,0$ Hz) fue asignado a H-5, un multiplete a $\delta = 1,38$ ppm atribuido a H-9, dos multipletes a $\delta = 1,84$ y $1,87$ ppm asignados a los protones del grupo metileno de C-7 y dos multipletes con un desplazamiento químico a $3,79$ y $3,85$ ppm debido a los protones del grupo metileno de C-12, vecino al oxígeno heteroatómico del anillo furanósico (**Tabla VI.6**).

Dos señales como singletes con desplazamientos químicos de $\delta = 0,77$ y $0,78$ ppm fueron atribuidos a los protones de los grupos metilos de C-16 y C-14, respectivamente. Además, se observaron las señales de los protones de C-15 y C-13 con valores de $\delta = 1,02$ ppm y $1,03$ ppm ambas como singletes (**Tabla VI.6**).

El espectro de RMN de C^{13} (**Tabla VI.6**) mostró una resonancia de metino a $\delta = 73,1$ ppm y a $\delta = 52,8$ ppm para C-6 y C-5, respectivamente y una resonancia de metileno a $\delta = 25,6$ ppm para C-7 (**Tabla VI.5**).

La unión del grupo hidroxilo a C-6 se confirmó por HMBC (**Tabla VI.7**), mostrando correlaciones entre H-6 ($\delta = 3,41$ ppm) con C-5 (52,8 ppm), C-7 (25,6 ppm) y C-10 (39,5 ppm) (**Tabla VI.6**) (**Figura VI.8**).

Este compuesto fue obtenido anteriormente por Musharraf y col. (2012) mediante el uso del hongo *Macrophomina phaseolina*.

Se ha encontrado que las enzimas producidas por el hongo fitopatógeno *Fusarium verticillioides*, fueron presumiblemente monooxigenasas. Estas enzimas funcionalizaron los carbonos no reactivos C-1, C-3 y C-6 de (-)-ambroxido, lo que hace suponer que la monooxigenasa de este hongo no es demasiado específica y posee varios sitios activos para la biotransformación del sustrato **1.1**.

Las enzimas citocromo P450 se describen como flexibles, debido a que se amoldan para unirse al sustrato y favorecer la reacción catalítica (Werk-Reichhart y Feyereisen, 2000).

Tabla VI.6: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de (-)-ambroxido (**1.1**), 1 β -hidroxiambroxido (**4.10**), 3 β -hidroxiambroxido (**4.1**) y 6 β -hidroxiambroxido (**4.11**).

| Carbono | δ H ppm (J) | | | | δ C ppm | | | |
|---------|--------------------|---------------------|------------------|------------------|----------------|------|------|------|
| | 1.1 | 4.10 | 4.1 | 4.11 | 1.1 | 4.10 | 4.1 | 4.11 |
| 1 | 1,05 1,5 brs | 3,36 dd (4,9; 10,8) | 1,53 t 1,56 t | | 39,9 | 79,9 | 38,1 | 39,9 |
| 2 | 1,32 d 1,29 d | 2,02 m | 1,15 | 1,72 m | 18,4 | 25,7 | 27,1 | 20,4 |
| 3 | 1,22 d | 1,45 m | 3,23 dd | | 42,4 | 40,5 | 79,0 | 39,4 |
| 4 | 0,83 s | | | | 33,1 | 32,7 | 38,7 | 40,1 |
| 5 | 0,98 dd | 0,93 m | 0,94 | 1,76 d (2,0) | 57,2 | 55,9 | 55,9 | 52,8 |
| 6 | 0,65 t | 1,15 m | 1,75 1,40 | 3,41 t (2,2) | 20,6 | 20,6 | 20,4 | 73,1 |
| 7 | 1,94 t 1,97 t | 1,43 m 2,00 m | 1,96 dd | 1,84 m 1,87 m | 39,7 | 39,5 | 39,5 | 25,6 |
| 8 | 1,09 s | | | | 79,9 | 80,2 | 79,8 | 80,5 |
| 9 | 1,41 m | 1,33 dd (4,6; 13,4) | 1,37 t | 1,38 m | 60,1 | 58,9 | 60,1 | 48,7 |
| 10 | 0,84 s | | | | 36,2 | 32,7 | 35,9 | 39,5 |
| 11 | 1,76 m | 2,02 m | 1,75 | 1,70 m | 22,6 | 28,0 | 22,7 | 22,2 |
| 12 | 3,93 m 3,84 q | 3,86 q (1,0; 9,0) | 3,86 q 3,96 m | 3,79 m 3,85 m | 65,0 | 64,9 | 64,9 | 64,9 |
| 13 | 0,85 s | 0,83 s | 1,09 s | 1,03 s | 21,1 | 21,1 | 21,0 | 21,3 |
| 14 | 0,87 s | 0,89 s | 0,86 s | 0,78 s | 33,6 | 33,1 | 28,2 | 32,9 |
| 15 | 1,10 s | 1,11 s | 0,80 s | 1,02 s | 21,2 | 20,9 | 15,1 | 20,9 |
| 16 | 0,89 s | 0,86 s | 0,85 s | 0,77 s | 15,0 | 10,9 | 15,2 | 14,8 |

Referencias: d: doblete, dd: doble doblete, dt: doble triplete, td: triple doblete, t: triplete, m: multiplete, q: cuarteto, s: singlete. El espectro de RMN de este metabolito, fue realizado en cloroformo deuterado (Cl₃CD).

Tabla VI.7: Correlaciones HMBC de los compuestos 1 β -hidroxiambroxido (**4.10**), 3 β -hidroxiambroxido (**4.1**) y 6 β -hidroxiambroxido (**4.11**).

| Carbono | HSQC-DEPT | HMBC | HSQC-DEPT | HMBC | HSQC-DEPT | HMBC |
|---------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------|-----------------|----------|
| | 4.10 | | 4.11 | | 4.1 | |
| 1 | CH | | CH ₂ | | CH ₂ | |
| 2 | CH ₂ | | CH ₂ | | CH ₂ | |
| 3 | CH ₂ | | CH ₂ | | C | C2-C4 |
| 4 | C | | C | | C | |
| 5 | CH | | CH | | CH | |
| 6 | CH ₂ | | CH | C5-C7-C10 | CH ₂ | |
| 7 | CH ₂ | | CH ₂ | | CH ₂ | |
| 8 | C | | C | | C | |
| 9 | CH | | CH | | CH | |
| 10 | C | | C | | C | |
| 11 | CH ₂ | | CH ₂ | | CH ₂ | |
| 12 | CH ₂ | C-8, C-11 | CH ₂ | | CH ₂ | |
| 13 | CH ₃ | C-3, C-4, C-5 | CH ₃ | C7-C8-C9 | CH ₃ | C7-C8-C9 |
| 14 | CH ₃ | C-3, C-4, C-5, C-14 | CH ₃ | C3-C5 | CH ₃ | C3-C5 |
| 15 | CH ₃ | C-7, C-8, C-9 | CH ₃ | C2-C3-C5 | CH ₃ | C2-C3-C5 |
| 16 | CH ₃ | C-1, C-5, C-9, C-10 | CH ₃ | | CH ₃ | |

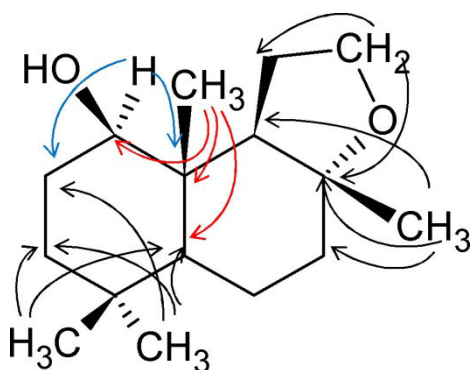


Figura VI.6: Correlaciones HMBC de 1 β -hidroxiambroxido (**4.10**).

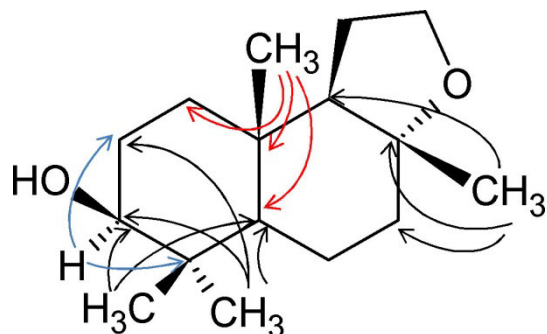


Figura VI.7: Correlaciones HMBC de 3β-hidroxiambroxido (4.1).

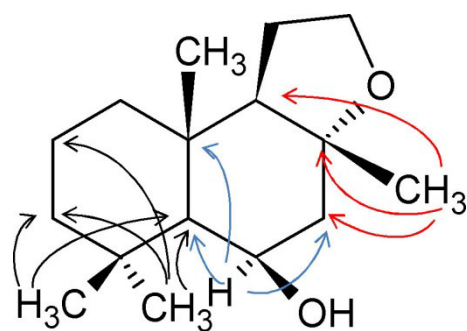


Figura VI.8: Correlaciones HMBC de 6β-hidroxiambroxido (4.11).

VI.5. Resultados de la determinación de actividades biológicas

VI.5.1. Determinación de citotoxicidad

Para el ensayo de **letalidad con *Artemia persimilis*** se pudo observar, que la dosis efectiva expresada en ppm (ED50, dosis que mata el 50% de las larvas), calculada mediante el programa Finney arrojó los siguientes resultados

tanto para los sustratos de partida como para los metabolitos obtenidos de las biotransformaciones (**Tabla VI.8**).

Tabla VI.8: Resultados del cálculo de ED50 para todos los compuestos.

| ED50 | | | |
|-------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| SUSTRATOS | | METABOLITOS | |
| (-)-Santonina (1.2) | 8β-hidroxi-α-santonina (6.1) | | |
| ED50=42,2096 ppm | ED50=52,7093 ppm | | |
| (-)-Achalensolido (1.3) | 11α-metilachalensolido (6.2) | | |
| ED50=22,6668 ppm | ED50=24,0629 ppm | | |
| (-)-Ambroxido (1.1) | 1β-hidroxiambroxido (4.10) | 3β-hidroxiambroxido (4.1) | 6β-hidroxiambroxido (4.11) |
| ED50=4,8729 ppm | ED50=73,9240 ppm | ED50= 99,7222 ppm | ED50=122,6044 ppm |

Se puede apreciar en los resultados obtenidos mediante este bioensayo que la citotoxicidad de los metabolitos obtenidos es menor que la de los sustratos, lo que está demostrado que los compuestos resultantes de las biotransformaciones de los sustratos (-)-ambroxido (**1.1**) y (-)-santonina (**1.2**) son productos del metabolismo de desintoxicación de los hongos.

Los tres metabolitos obtenidos de la transformación de **1.1** presentaron diferencias significativas en comparación al sustrato de partida (**1.1** y **4.10** X^2 : 190,3078; gl= 2; $p < 0,0000001$, **1.1** y **4.1** X^2 : 298,1602; gl= 2; $p < 0,0000001$, **1.1** y **4.11** X^2 : 355,1804; gl= 2; $p < 0,0000001$), de igual manera para el metabolito obtenido de biotransformar el compuesto **1.2** (X^2 : 8,0849; gl= 2; $p < 0,01755$).

El metabolito 11 α -metilachalensolido mostró una citotoxicidad levemente menor en comparación al sustrato de partida, no habiendo diferencia significativa entre ambos (X^2 : 1,5431; gl= 2; p<0,4623).

Como se ha mencionado anteriormente, las enzimas citocromo P450 participan en la catálisis de diversas reacciones y son enzimas clave en el metabolismo fúngico primario y secundario, y en la desintoxicación de xenobióticos (Lah y col., 2011).

VI.5.2. Determinación de actividad antioxidante

En este ensayo se determinó que las diferencias resultaron significativas para todas las concentraciones analizadas: de (-)-santonina (**1.2**) a 200ppm (Test t: t= -30,4527; gl= 4; p= 6,927e⁻⁰⁶), 150ppm (Test t: t= -31,9164; gl= 9; p= 1,429e⁻¹⁰), 100ppm (Test t: t= -24,8503; gl= 11; p= 5,146e⁻¹¹) y 50 (Test t, t= -48,3874; gl= 11; p= 3,603e⁻¹⁴) y 8 β -hidroxi- α -santonina (**6.1**) a 200ppm (Test t: t= -27,4745; gl= 4; p= 1,044e⁻⁰⁵), 150ppm (Test t: t= -25,5691; gl= 8; p= 5,868e⁻⁰⁹), 100ppm (Test t: t= -24,0432; gl= 12; p= 1,61e⁻¹¹) y 50ppm (Test t: t= -46,2175; gl= 12; p= 6,873e⁻¹⁵) con respecto al ácido ascórbico (compuesto de referencia), como así también las diferencias entre el metabolito obtenido y el sustrato de partida: 200ppm (Test t: t= 17,3182; gl= 4; p= 6,525e⁻⁰⁵), 150ppm (Test t: t= 38,6463; gl= 9; p= 2,584e⁻¹¹), 100ppm (Test t: t= 31,8712; gl= 11; p= 3,451e⁻¹²) y 50ppm (Test t: t= 44,5449; gl= 11; p= 8,914e⁻¹⁴).

Según se puede apreciar, el producto de biotransformación 8 β -hidroxi- α -santonina (**6.1**) posee mayor capacidad antioxidante que el sustrato de partida.

A continuación se muestran los gráficos de la capacidad antioxidante de los compuestos (-)-santonina, 8 β -hidroxi- α -santonina (**6.1**) y el sustrato de referencia a las distintas concentraciones analizadas (**Gráficos VI.1, VI.2, VI.3,**

VI.4). Se destaca la relación indirecta de que a menores valores de absorbancia a 510nm, mayor es la actividad antioxidante.

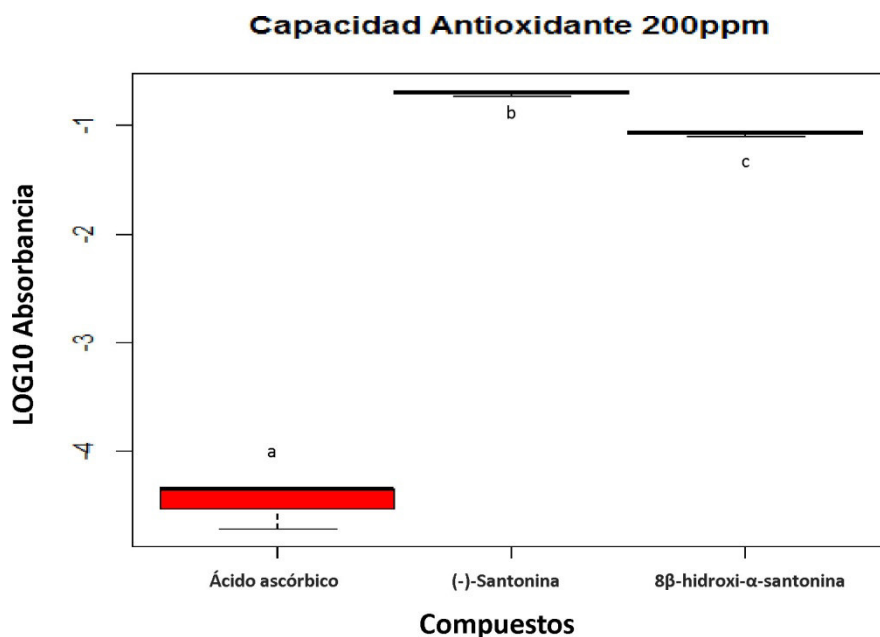


Grafico VI.1: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-santonina (**1.2**) y 8β-hidroxi-α-santonina (**6.1**) a 200ppm. Ácido ascórbico y **1.2**: $p= 6,927e^{-06}$, Ácido ascórbico y **6.1**: $p= 1,044e^{-05}$, **1.2** y **6.1**: $p= 6,525e^{-05}$.

Letras distintas significan diferencias significativas.

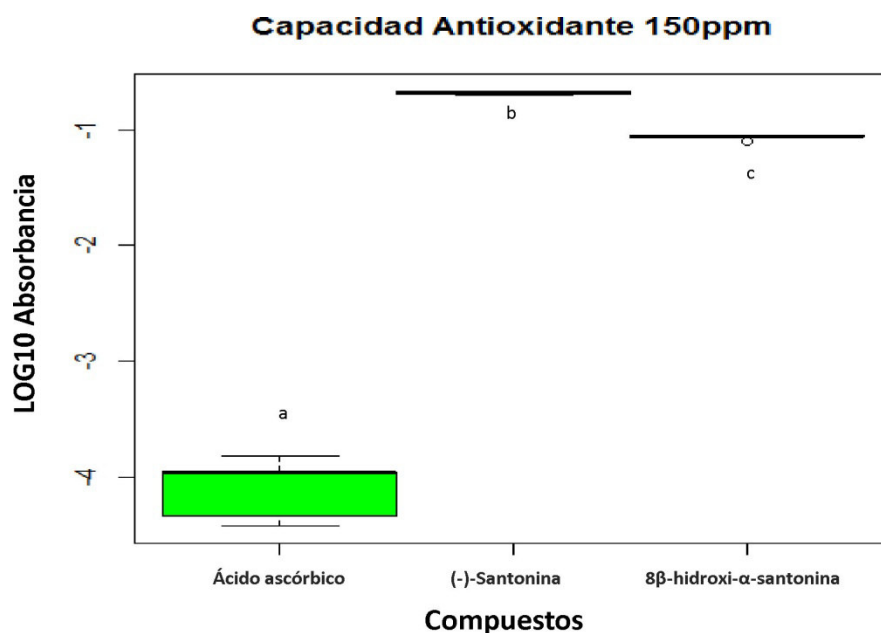


Grafico VI.2 Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-santonina (**1.2**) y 8β-hidroxi-α-santonina (**6.1**) a 150ppm. Ácido ascórbico y **1.2**: $p= 1,429e^{-10}$, Ácido ascórbico y **6.1**: $p= 5,868e^{-09}$, **1.2** y **6.1**: $p= 2,584e^{-11}$. Letras distintas significan diferencias significativas.

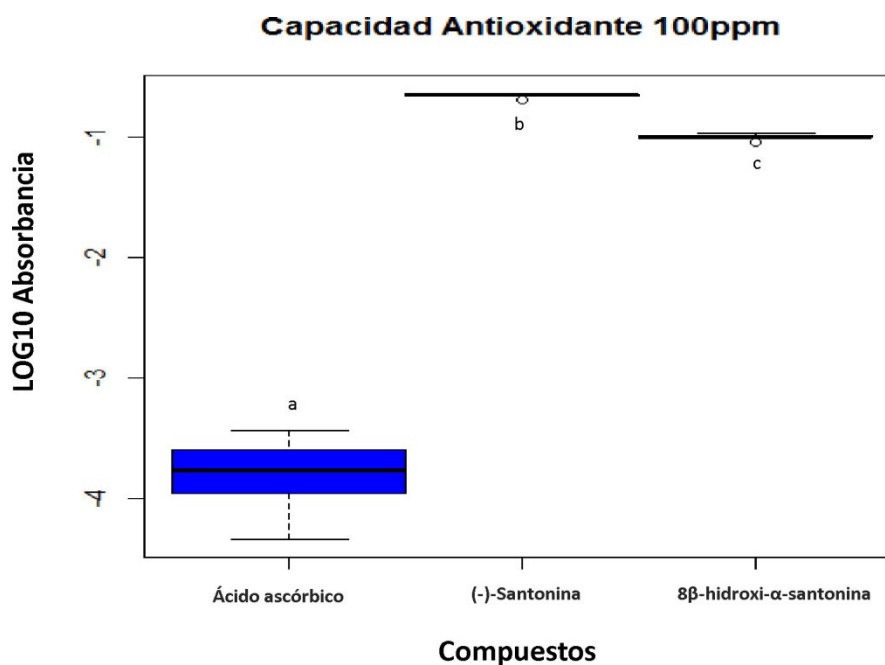


Grafico VI.3: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-santonina (**1.2**) y 8β-hidroxi-α-santonina (**6.1**) a 100ppm. Ácido ascórbico y **1.2**: $gl= p= 5,146e^{-11}$, Ácido ascórbico y **6.1**: $p= 1,61e^{-11}$, **1.2** y **6.1**: $p= 3,451e^{-12}$. Letras distintas significan diferencias significativas.

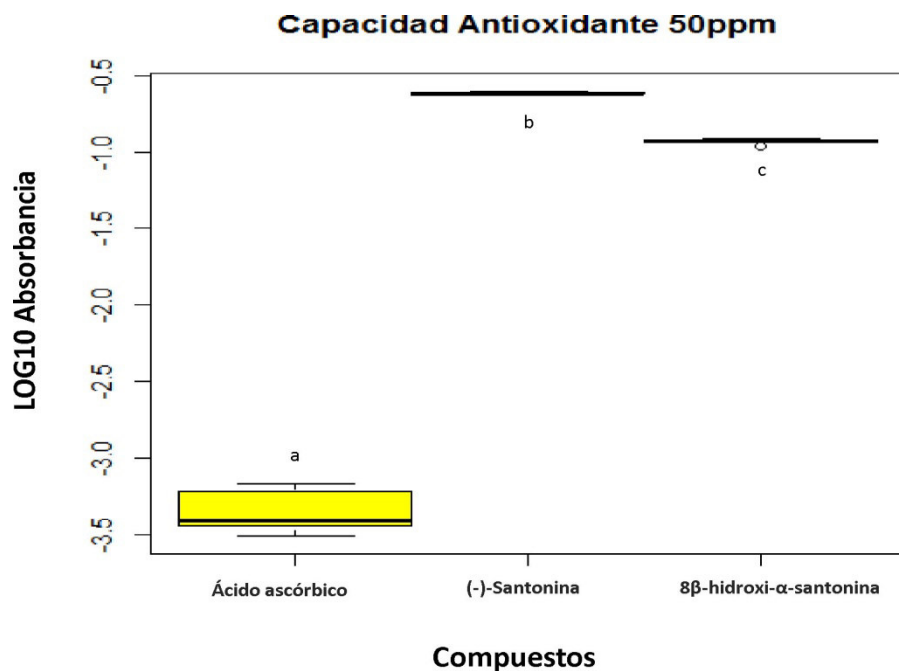


Grafico VI.4: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-santonina (**1.2**) y 8β-hidroxi-α-santonina (**6.1**) a 50ppm. Ácido ascórbico y **1.2**: $p = 3,603e^{-14}$, Ácido ascórbico y **6.1**: $p = 6,873e^{-15}$, **1.2** y **6.1**: $p = 8,914e^{-14}$.

Letras distintas significan diferencias significativas.

Para el ensayo de actividad antioxidante de (-)-achalensolido (**1.3**) y 11α-metilachalensolido (**6.2**), las diferencias resultaron significativas para todas las concentraciones tomando como referencia al ácido ascórbico, para el compuesto **1.3** a 200ppm (Test t: $t = -23,002$; $gl = 4$; $p = 2,117e^{-05}$), 150ppm (Test t: $t = -21,4005$; $gl = 9$; $p = 4,994e^{-09}$), 100ppm (Test t: $t = -18,8203$; $gl = 12$; $p = 2,833e^{-10}$), 50ppm (Test t: $t = -31,1715$; $gl = 11$; $p = 4,394e^{-12}$) y para **6.2** a 200ppm (Test t: $t = -29,3221$; $gl = 4$; $p = 8,054e^{-06}$), 150ppm (Test t: $t = -24,3443$; $gl = 7$; $p = 5,025e^{-08}$), 100ppm (Test t: $t = -25,409$; $gl = 12$; $p = 8,394e^{-12}$), 50ppm (Test t: $t = -48,3582$; $gl = 12$; $p = 4,003e^{-15}$). Como así también las diferencias entre el metabolito obtenido y el sustrato de partida a 200ppm (Test t: $t = -150,2203$; $gl = 4$; $p = 1,178$

e^{-08}), 150ppm (Test t: $t= -14,3322$; $gl= 8$; $p= 5,482e^{-07}$), 100ppm (Test t: $t= -103,4119$; $gl= 12$; $p< 2,2e^{-16}$) y 50ppm (Test t: $t= -120,3569$; $gl= 11$; $p< 2,2e^{-16}$).

Se pudo observar, a todas las concentraciones, que el producto de biotransformación **6.2** posee una menor actividad antioxidante en comparación con el sustrato de partida (**Gráficos VI.5, VI.6, VI.7, VI.8**).

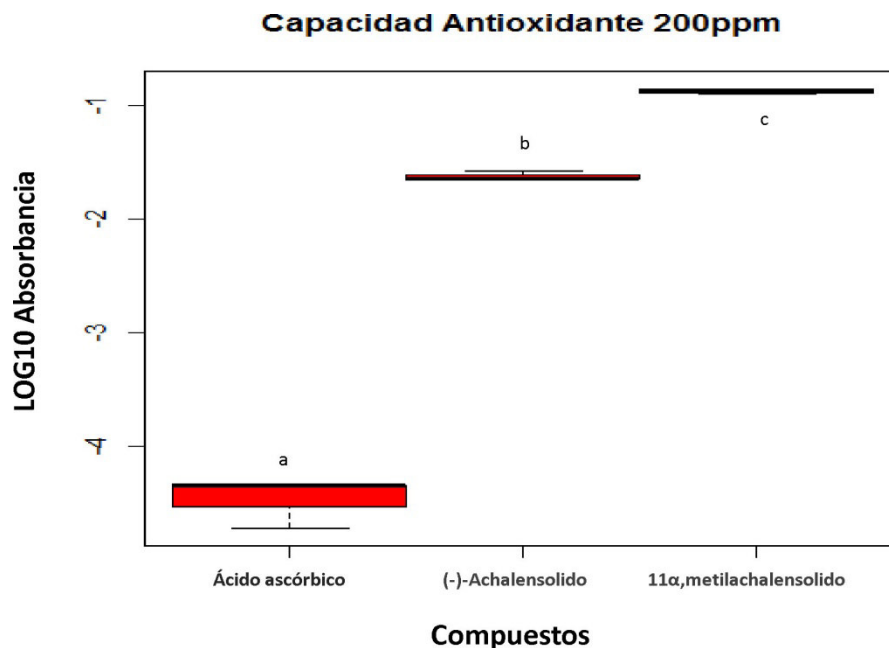


Grafico VI.5: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-achalensolido (**1.3**) y 11α-metilachalensolido (**6.2**) a 200ppm. Ácido ascórbico y **1.3**: $p= 2,117e^{-05}$, Ácido ascórbico y **6.2**: $p= 8,054e^{-06}$, **1.3** y **6.2**: $p= 1,178e^{-08}$.

Letras distintas significan diferencias significativas.

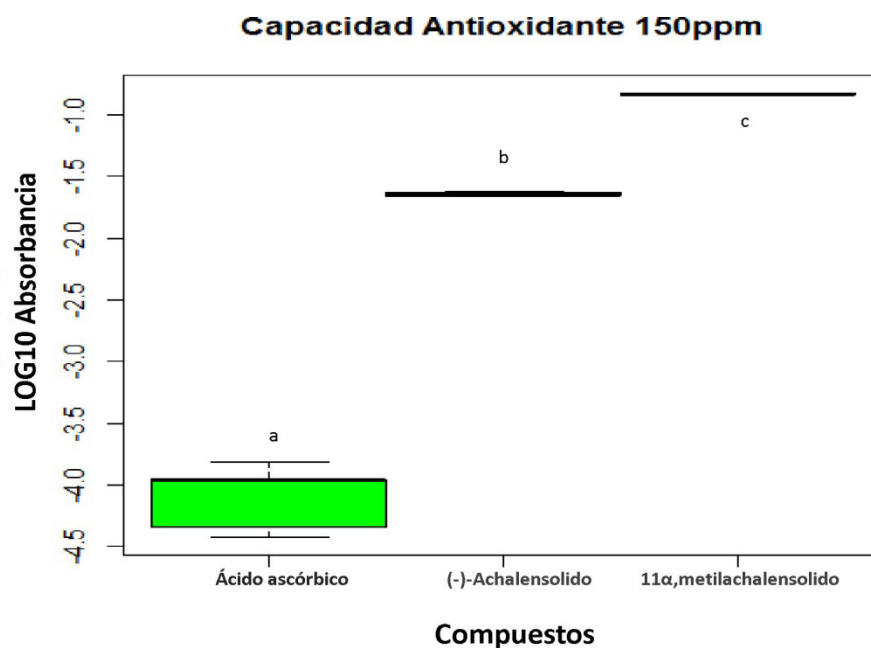


Grafico VI.6: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-achalensolido (**1.3**) y 11α-metilachalensolido (**6.2**) a 150ppm. Ácido ascórbico y **1.3**: $p= 4,994e^{-09}$, Ácido ascórbico y **6.2**: $p= 5,025e^{-08}$, **1.3** y **6.2**: $p= 5,482e^{-07}$. Letras distintas significan diferencias significativas.

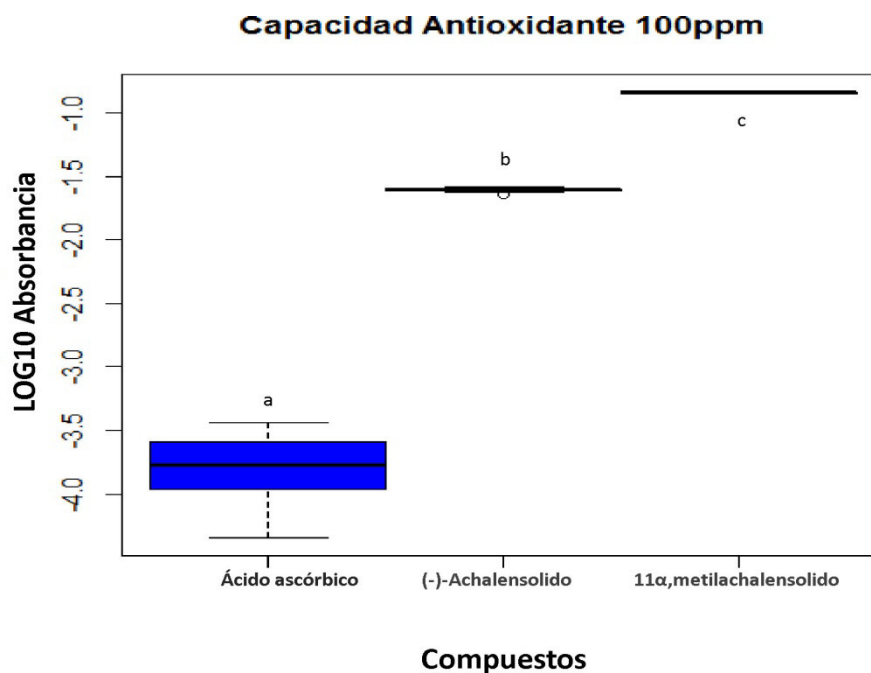


Grafico VI.7: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-achalensolido (**1.3**) y 11α-metilachalensolido (**6.2**) a 100ppm. Ácido ascórbico y **1.3**: $p= 2,833e^{-10}$, Ácido ascórbico y **6.2**: $p= 8,394e^{-12}$, **1.3** y **6.2**: $p < 2,2e^{-16}$. Letras distintas significan diferencias significativas.

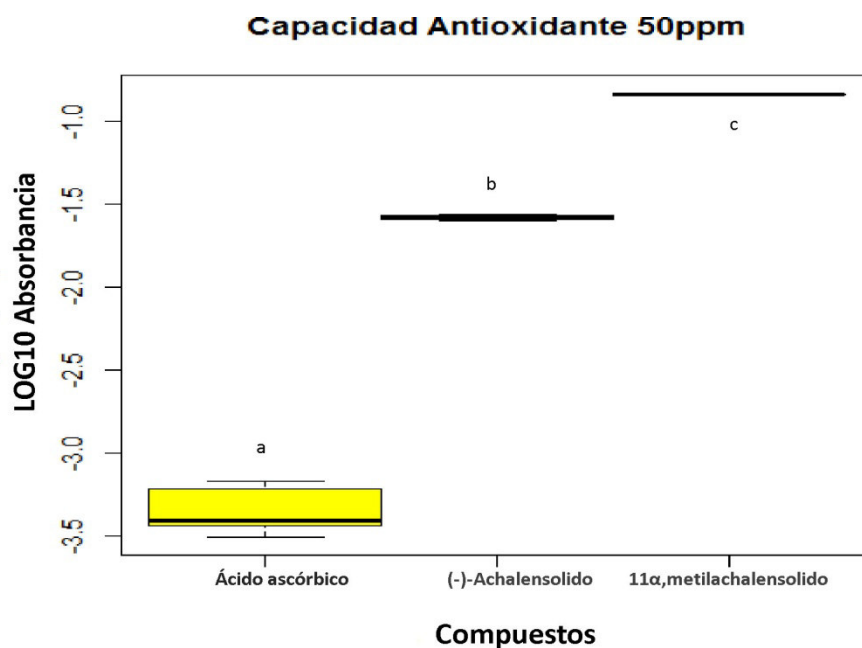


Grafico VI.8: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-achalensolido (**1.3**) y 11 α -metilachalensolido (**6.2**) a 50ppm. Ácido ascórbico y **1.3**: $p= 4,394e^{-12}$, Ácido ascórbico y **6.2**: $p= 4,003e^{-15}$, **1.3** y **6.2**: $p < 2,2e^{-16}$. Letras distintas significan diferencias significativas.

En el bioensayo de capacidad antioxidante midiendo absorbancia (510nm) por el método de DPPH, en las distintas concentraciones propuestas, de los metabolitos obtenidos a partir de (-)-ambroxido (**1.1**) se determinó que las diferencias resultaron significativas: para 6 β -hidroxiambroxido (**4.11**) a 200ppm (Test t: $t= -46,5449$; $gl= 4$; $p= 1,274e^{-06}$), 150ppm (Test t: $t= -22,2196$; $gl= 9$; $p= 3,582e^{-09}$), 100ppm (Test t: $t= -14,8634$; $gl= 11$; $p= 1,255e^{-08}$) y 50ppm (Test t: $t= -5,6146$; $gl= 11$; $p= 0,0001569$) y para 1 β -hidroxiambroxido (**4.10**) a 200ppm (Test t: $t= 17,1616$; $gl= 4$; $p= 6,763e^{-05}$), 150ppm (Test t: $t= 21,0785$; $gl= 7$; $p= 1,361e^{-07}$), 100ppm (Test t: $t= 31,2852$; $gl= 12$; $p= 7,159e^{-13}$) y 50ppm (Test t: $t= 16,8449$; $gl= 11$; $p= 3,342e^{-09}$), no habiendo diferencias significativas entre el sustrato y el metabolito 3 β -hidroxiambroxido (**4.1**) a 200ppm (Test t: $t= 0,9954$; $gl= 5$; $p= 0,3652$), 150ppm (Test t: $t= 0,2714$; $gl= 9$; $p= 0,7922$) y si se

observaron leves diferencias significativas a 100ppm (Test t: $t= 2,2713$; $gl= 11$; $p= 0,04421$) y 50ppm (Test t: $t= 4,6904$; $gl= 11$; $p= 0,0006604$).

Se observó además, que las diferencias resultaron significativas (menores a $p<0,05$), de todos los compuestos con respecto al ácido ascórbico.

El compuesto 1 β -hidroxiambroxido (4.10) (Gráficos VI.9, VI.10, VI.11, VI.12) mostró tener una capacidad antioxidante mayor que la del sustrato de partida, mientras que para 3 β -hidroxiambroxido (4.1) (Gráficos VI.13, VI.14, VI.15 y VI.16) se observó diferencia a las menores concentraciones de 100ppm y 50ppm. En cuanto el compuesto 6 β -hidroxiambroxido (4.11) (Gráficos VI.17, VI.18, VI.19, VI.20) la actividad fue menor a la del compuesto de partida.

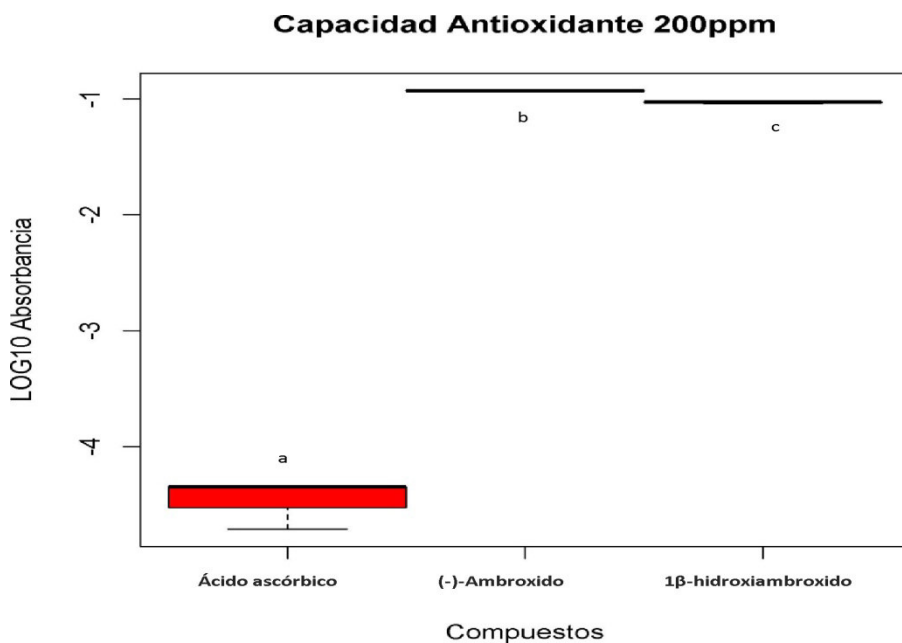


Gráfico VI.9: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (1.1) y 1 β -hidroxiambroxido (4.10) a 200ppm. Ácido ascórbico y 1.1: $p= 8,622e^{-06}$, Ácido ascórbico y 4.10: $p= 9,688e^{-06}$, 1.1 y 4.10: $p= 6,763e^{-05}$.

Letras distintas significan diferencias significativas.

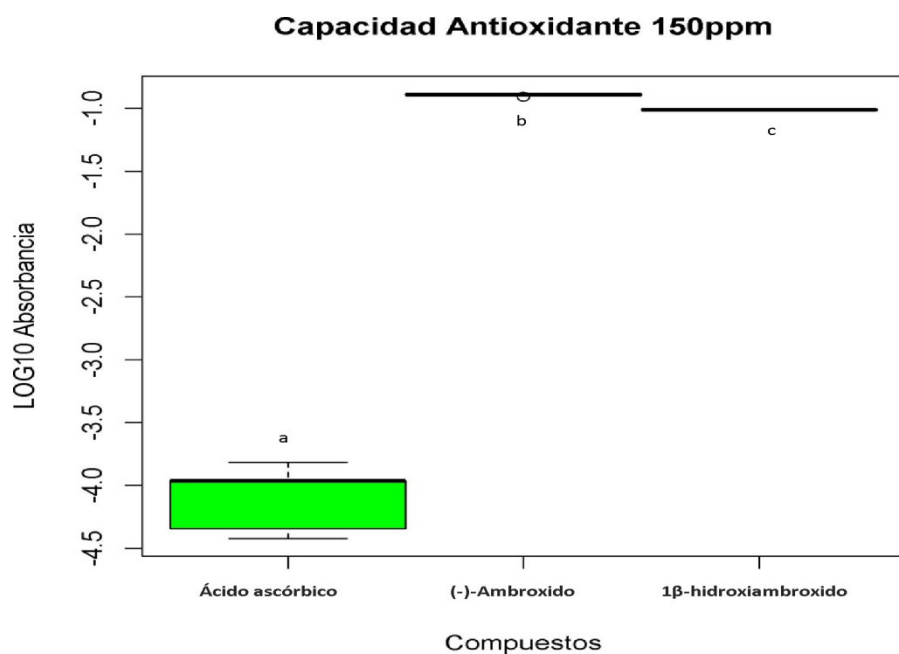


Grafico VI.10: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (**1.1**) y 1β-hidroxiambroxido (**4.10**) a 150ppm. Ácido ascórbico y **1.1**: $p= 3,735e^{-09}$, Ácido ascórbico y **4.10**: $p= 7,47e^{-08}$, **1.1** y **4.10**: $p= 1,361e^{-07}$.
Letras distintas significan diferencias significativas.

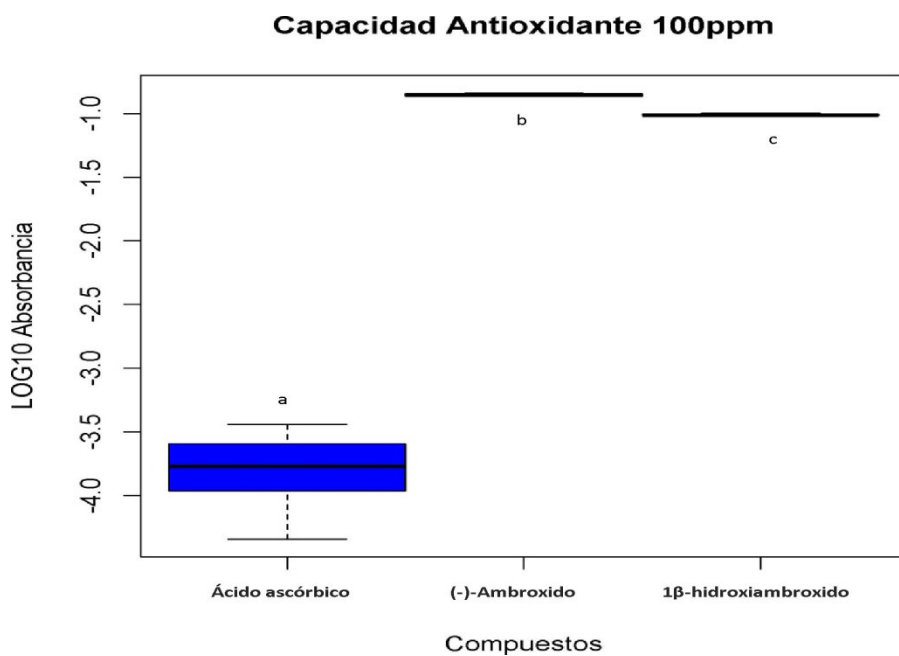


Grafico VI.11: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (**1.1**) y 1β-hidroxiambroxido (**4.10**) a 100ppm. Ácido ascórbico y **1.1**: $p= 8,806e^{-12}$, Ácido ascórbico y **4.10**: $p= 1,66e^{-11}$, **1.1** y **4.10**: $p= 7,159e^{-13}$.
Letras distintas significan diferencias significativas.

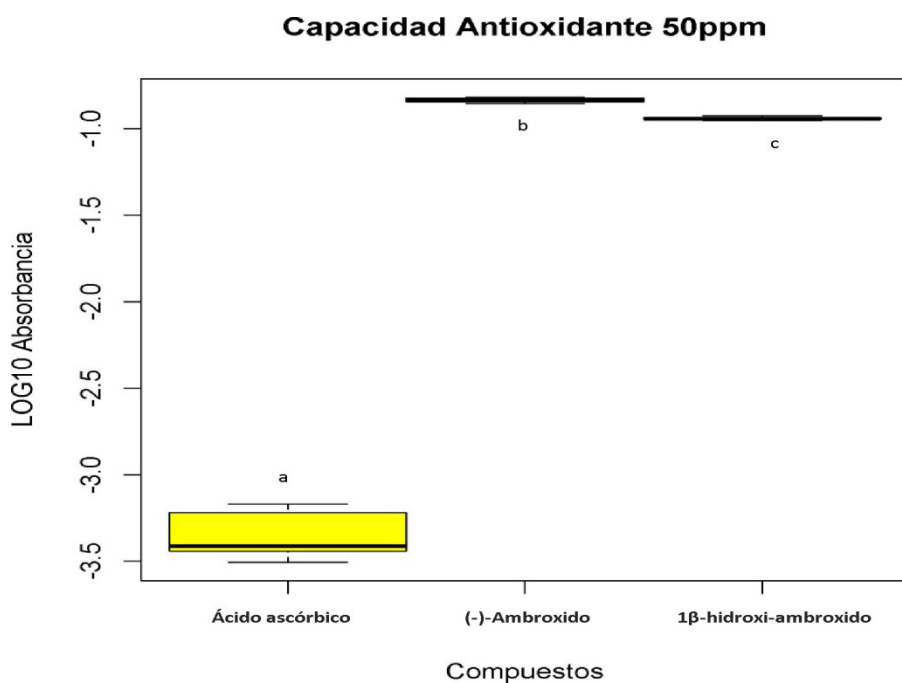


Grafico VI.12: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (**1.1**) y 1β-hidroxiambroxido (**4.10**) a 50ppm. Ácido ascórbico y **1.1**: $p= 9,401e^{-14}$, Ácido ascórbico y **4.10**: $p= 6,743e^{-15}$, **1.1** y **4.10**: $p= 3,342e^{-09}$.

Letras distintas significan diferencias significativas.

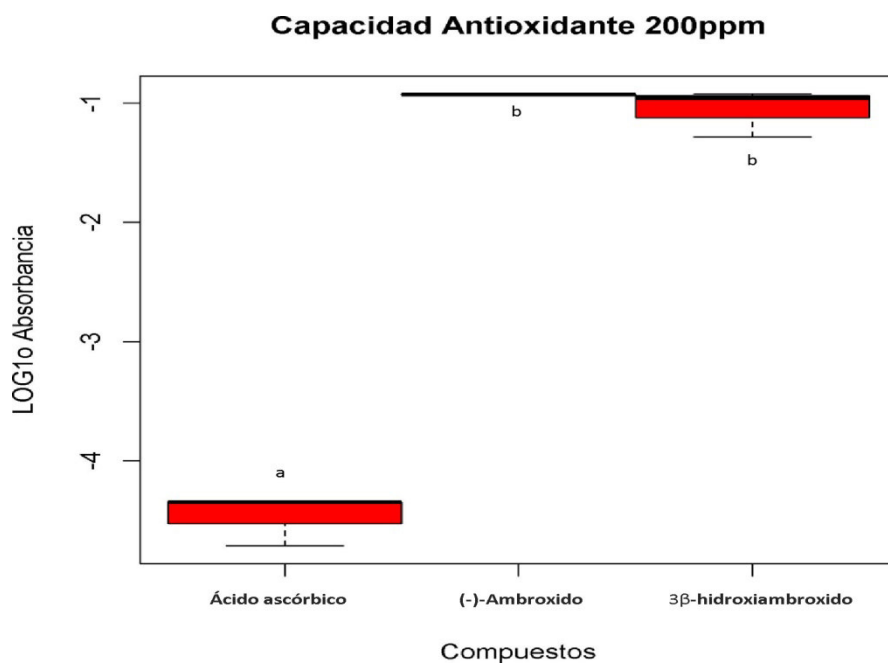


Grafico VI.13: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (**1.1**) y 3β-hidroxiambroxido (**4.1**) a 200ppm. Ácido ascórbico y **1.1**: $p= 8,622e^{-06}$, Ácido ascórbico y **4.1**: $p= 2,359e^{-06}$, **1.1** y **4.1**: $p= 0,3652$.

Letras distintas significan diferencias significativas.

Capacidad Antioxidante 150ppm

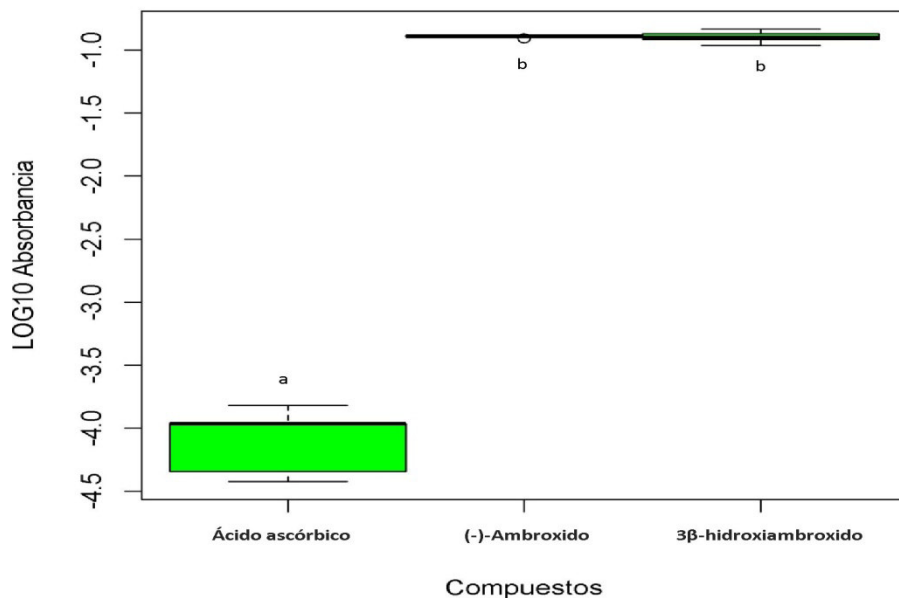


Grafico VI.14: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (1.1) y 3β-hidroxiambroxido (4.1) a 150ppm. Ácido ascórbico y 1.1: $p= 3,735e^{-09}$, Ácido ascórbico y 4.1: $p= 2,938e^{-10}$, 1.1 y 4.1: $p= 0,7922$.

Letras distintas significan diferencias significativas.

Capacidad Antioxidante 100ppm

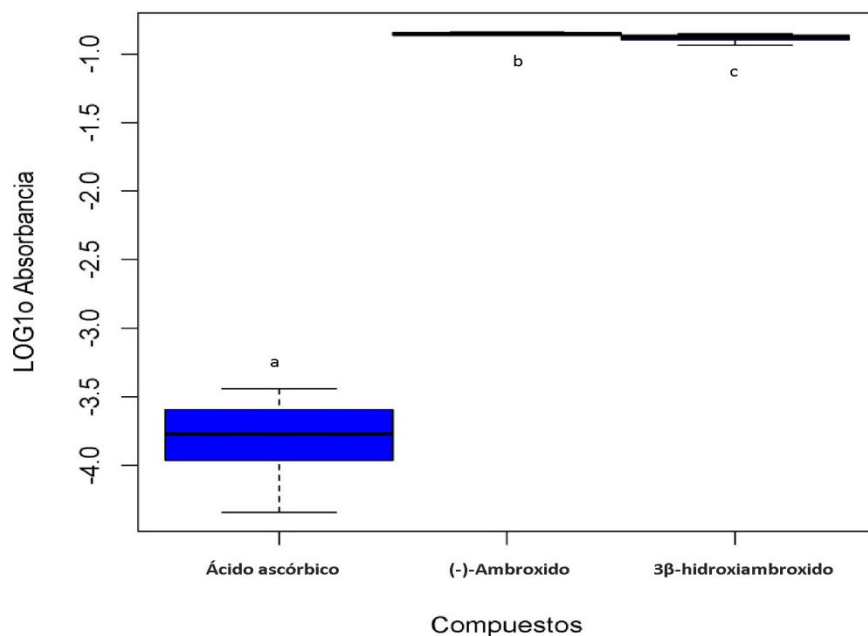


Grafico VI.15: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (1.1) y 3β-hidroxiambroxido (4.1) a 100ppm. Ácido ascórbico y 1.1: $p= 8,806e^{-12}$, Ácido ascórbico y 4.1: $p= 8,806e^{-12}$, 1.1 y 4.1: $p= 0,04421$.

Letras distintas significan diferencias significativas.

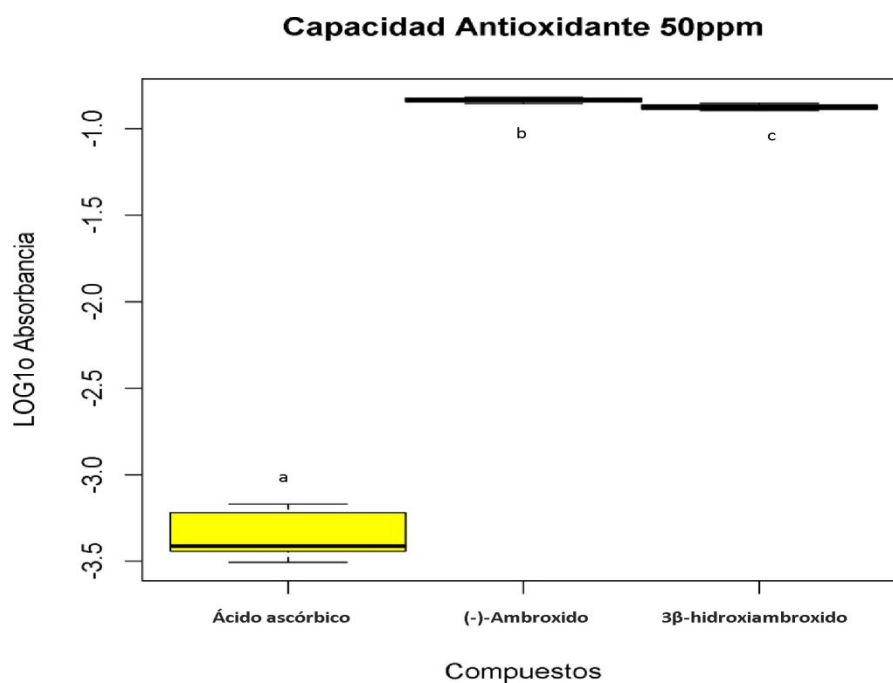


Grafico VI.16: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (**1.1**) y 3β-hidroxiambroxido (**4.1**) a 100ppm. Ácido ascórbico y **1.1**: $p= 9,401e^{-14}$, Ácido ascórbico y **4.1**: $p= 5,216e^{-15}$, **1.1** y **4.1**: $p= 0,0006604$.

Letras distintas significan diferencias significativas.

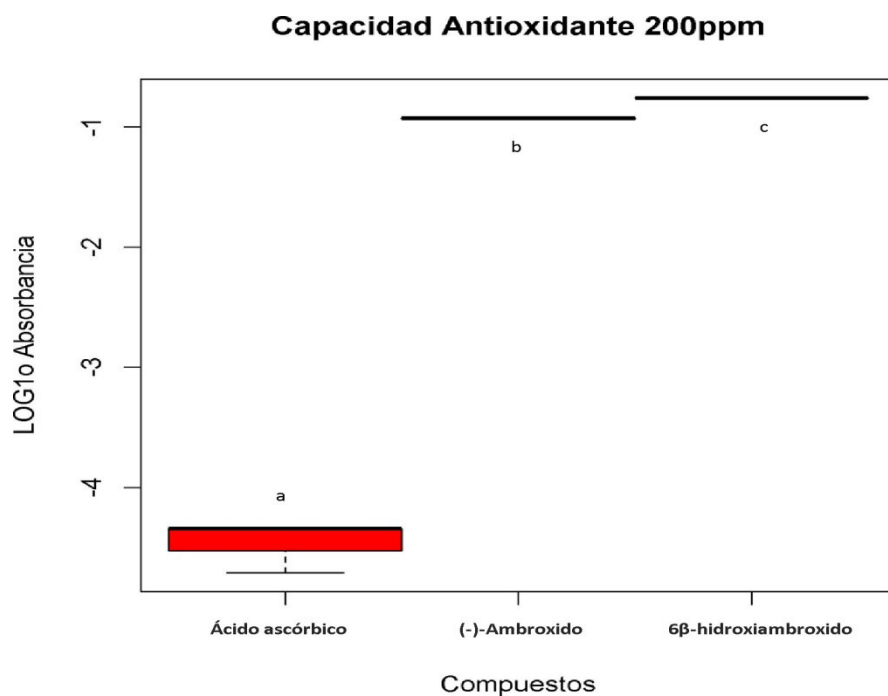


Grafico VI.17: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (**1.1**) y 6β-hidroxiambroxido (**4.11**) a 200ppm. Ácido ascórbico y **1.1**: $p= 8,622e^{-06}$, Ácido ascórbico y **4.11**: $p= 7,161e^{-06}$, **1.1** y **4.11**: $p= 1,274e^{-06}$.

Letras distintas significan diferencias significativas.

Capacidad Antioxidante 150ppm

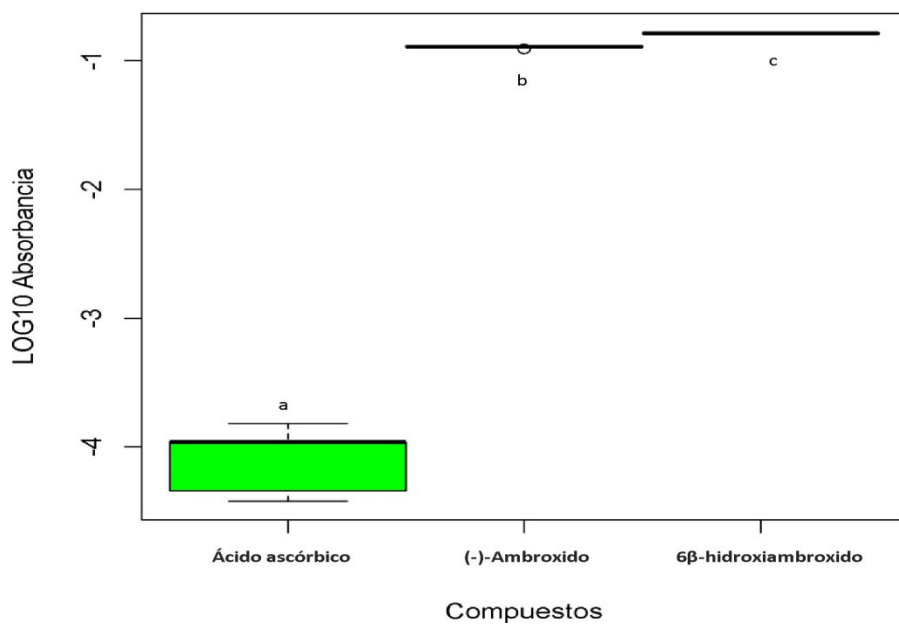


Grafico VI.18: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (**1.1**) y 6β-hidroxiambroxido (**4.11**) a 150ppm. Ácido ascórbico y **1.1**: $p= 3,735e^{-09}$, Ácido ascórbico y **4.11**: $p= 1,859e^{-10}$, **1.1** y **4.11**: $p= 3,582e^{-09}$. Letras distintas significan diferencias significativas.

Capacidad Antioxidante 100ppm

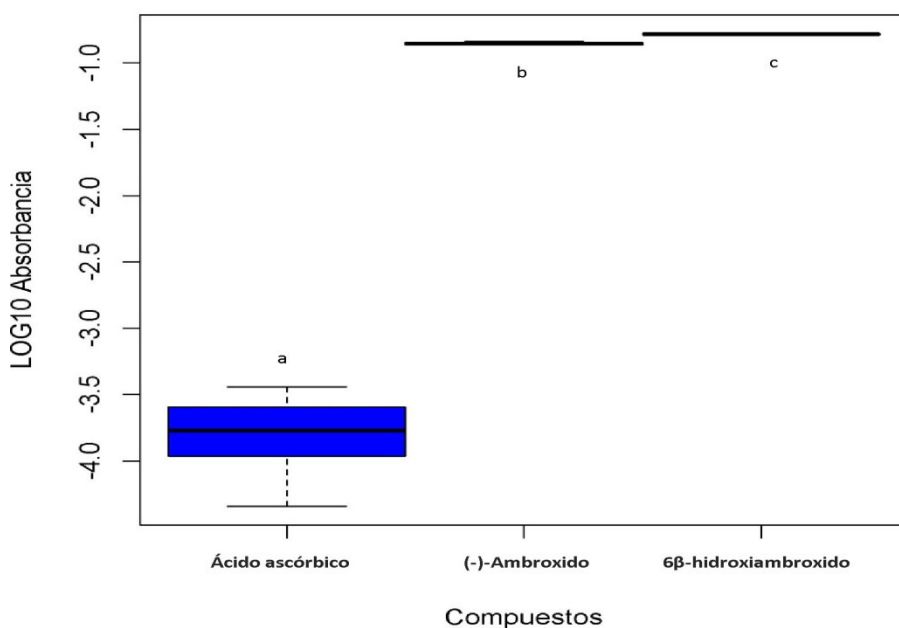


Grafico VI.19: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (**1.1**) y 6β-hidroxiambroxido (**4.11**) a 100ppm. Ácido ascórbico y **1.1**: $p= 8,806e^{-12}$, Ácido ascórbico y **4.11**: $p= 8,014e^{-11}$, **1.1** y **4.11**: $p= 1,255e^{-08}$. Letras distintas significan diferencias significativas.

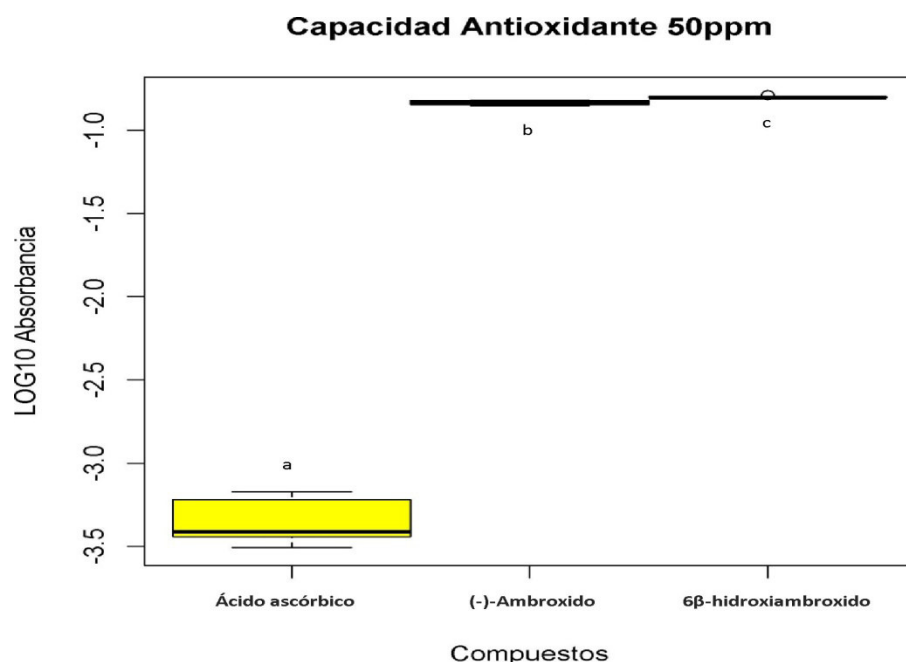


Grafico VI.20: Variación de la absorbancia a 510 nm de Ácido ascórbico, (-)-ambroxido (**1.1**) y 6β-hidroxiambroxido (**4.11**) a 50ppm. Ácido ascórbico y **1.1**: $p= 9,401e^{-14}$, Ácido ascórbico y **4.11**: $p= 3,434e^{-15}$, **1.1** y **4.11**: $p= 0,0001569$. Letras distintas significan diferencias significativas.

Estos resultados están indicando que la mayor capacidad antioxidante de los metabolitos 8β-hidroxi-α-santonina (**6.1**) y 1β-hidroxiambroxido (**4.10**) guarda una relación directa con la oxidación de los carbonos señalados en comparación a los compuestos de partida correspondientes. Esto abre la posibilidad de que la oxidación microbiana de compuestos naturales, pueda conducir a nuevos compuestos sustitutos de los oxidantes sintéticos.

VI.5.3. Determinación de actividad antibacteriana

En los resultados obtenidos de los ensayos de sensibilidad bacteriana, frente a los microorganismos empleados, sólo dos compuestos mostraron una leve actividad, comparados con los antibióticos correspondientes utilizados como control (**Tabla VI.9**).

Tabla VI.9: Resultados de la actividad antibacteriana para todos los compuestos.

| COMPUESTOS | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | | | | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | | | |
|---|---|-----------------|-----------------|------------------------|--|-----------------|-----------------|---------------------|
| | 50ppm | 100ppm | 200ppm | Ciprofloxacina 5ppm | 50ppm | 100ppm | 200ppm | Ampicilina 10ppm |
| (-)-Ambroxido (1.1) | NI | NI | NI | 40mm | NI | NI | NI | 35mm |
| (-)-Santonina (1.2) | NI | NI | NI | 40mm | I 10mm 28,6% | I 18mm 51,4% | I 19mm 54,3% | 35mm |
| Achalensolido (1.3) | NI | NI | NI | 40mm | NI | NI | NI | 35mm |
| 8 β -hidroxi- α -santonina (6.1) | NI | NI | NI | 40mm | NI | NI | NI | 35mm |
| 11 α -metilachalensolido (6.2) | I 13mm 32,5% | I 15mm 37,5% | I 19mm 47,5% | 40mm | I 10mm 28,6% | I 12mm 34,3% | I 15mm 42,9% | 35mm |
| 3 β -hidroxiambroxido (4.1) | NI | NI | NI | 40mm | NI | NI | NI | 35mm |
| 1 β -hidroxiambroxido (4.10) | NI | NI | NI | 40mm | NI | NI | NI | 35mm |
| 6 β -hidroxiambroxido (4.11) | NI | NI | NI | 40mm | NI | NI | NI | 35mm |

Referencias: NI: no inhibe, I: inhibe.

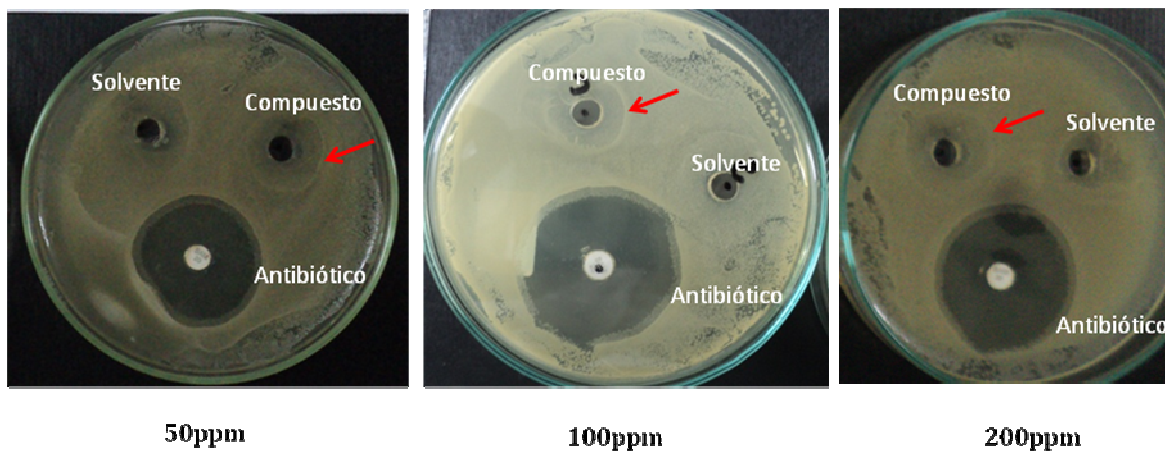


Figura VI.9: Actividad antibacteriana de (-)-santonina (1.2) frente a *Staphylococcus aureus* a las tres concentraciones evaluadas.

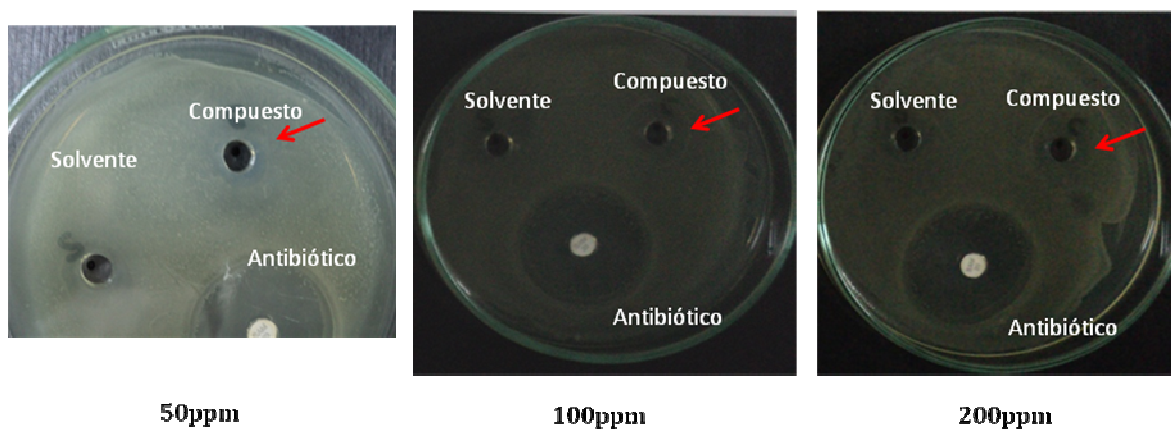


Figura VI.10: Actividad antibacteriana de 11 α -metilachalensolido (**6.2**) frente a *Staphylococcus aureus* a las tres concentraciones evaluadas.

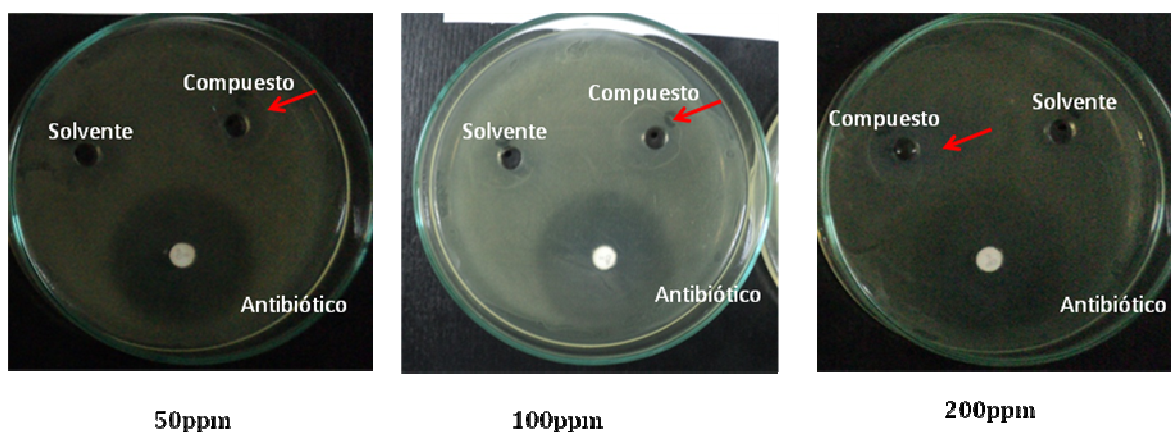


Figura VI.11: Actividad antibacteriana de 11 α -metilachalensolido (**6.2**) frente a *Pseudomonas aeruginosa* a las tres concentraciones evaluadas.

Se observó que sólo uno de los sustratos de partida, (-)-santonina (**1.2**), posee actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (**Figura VI.9**). Mostró una inhibición del 28,6%, 51,4% y 54,3% a las concentraciones de 50, 100 y 200ppm, respectivamente. Teniendo en cuenta estos porcentajes, se podría clasificar a este microorganismo como de sensibilidad intermedia frente a dicho compuesto.

En cuanto a los metabolitos obtenidos de las biotransformaciones, sólo 11 α -metilachalensolido (**6.2**) mostró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* con porcentajes de inhibición del 28,6%, 34,3% y 42,9% y levemente mayor contra *Pseudomonas aeruginosa* con 32,5%, 37,5% y 47,5% a las concentraciones mencionadas anteriormente (**Figuras VI.10 y VI.11**). Estos microorganismos muestran una sensibilidad intermedia frente a este metabolito ensayado.

VII. CONCLUSIONES FINALES

Las biotransformaciones usando células enteras de microorganismos, en este caso hongos fitopatógenos, son un método sencillo, económico y limpio que permiten modificar estructuralmente compuestos orgánicos.

El potencial enzimático de los hongos filamentosos de los géneros *Fusarium verticillioides* y *Cunninghamella* spp. para la biotransformación de los sesquiterpenos (-)-ambroxido (1.1) y (-)- α -santonina (1.2) respectivamente, permitieron obtener derivados hidroxilados con estereoquímica β , hecho que pone en evidencia que las oxidaciones fueron regio y estereoselectivas.

Para los sustratos (-)-ambroxido (1.1) y (-)- α -santonina (1.2), se pudo observar que todas las hidroxilaciones se obtuvieron sobre una de las caras de los mismos, lo que necesariamente lleva a suponer que estos compuestos han sido anclados por la enzima, dejando oculta la cara α y, consecuentemente, expuesta la cara β sobre la que, de manera regioselectiva, se oxidaron los átomos de carbono no reactivos C-1; C-3 y C-6 de (-)-ambroxido (1.1) y C-8 de (-)- α -santonina (1.2).

Estos resultados experimentales obtenidos en esta investigación llevan a aseverar que las enzimas responsables de la oxidación de los átomos de carbono no reactivos de los sustratos empleados son las citocromo P450. Por ejemplo, en los últimos años se ha descrito la participación de las enzimas citocromo P450 en muchos procesos complejos de bioconversiones fúngicas (van den Brink y van Gorcom, 1998).

A pesar de que existen otras enzimas capaces de realizar transformaciones oxidativas similares a las P450, tales como la monooxigenasas dependientes de flavina y oxigenasas con hierro no hemo; sin embargo, lo que hace que las P450s sean especiales es su versatilidad en la gama de sustratos y tipo de reacción que catalizan, así como su exquisita

capacidad de realizar reacciones de oxidación regio y estereoselectivas en numerosas moléculas fisiológicamente y biotecnológicamente importantes (Munro y col., 2013).

En la siguiente figura (**Figura VII.1**) se muestra cómo se ancla un sustrato, en este caso indazol al grupo hemo de la enzima P450. Esto nos permitiría tener una idea de cómo se podrían haber anclado los sustratos utilizados en este trabajo para ser biotransformados.

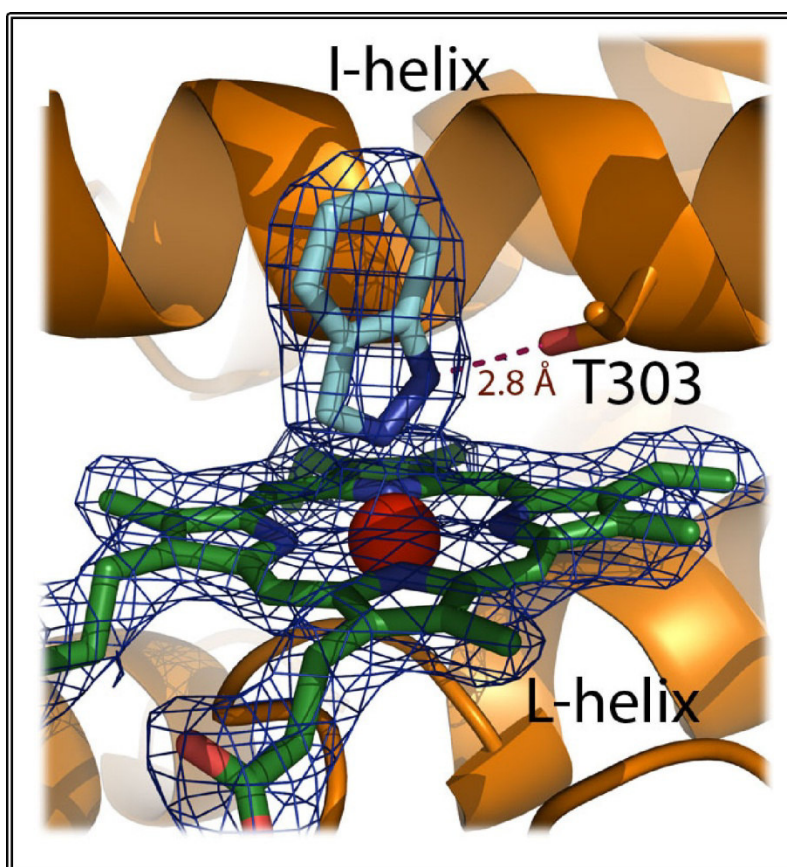
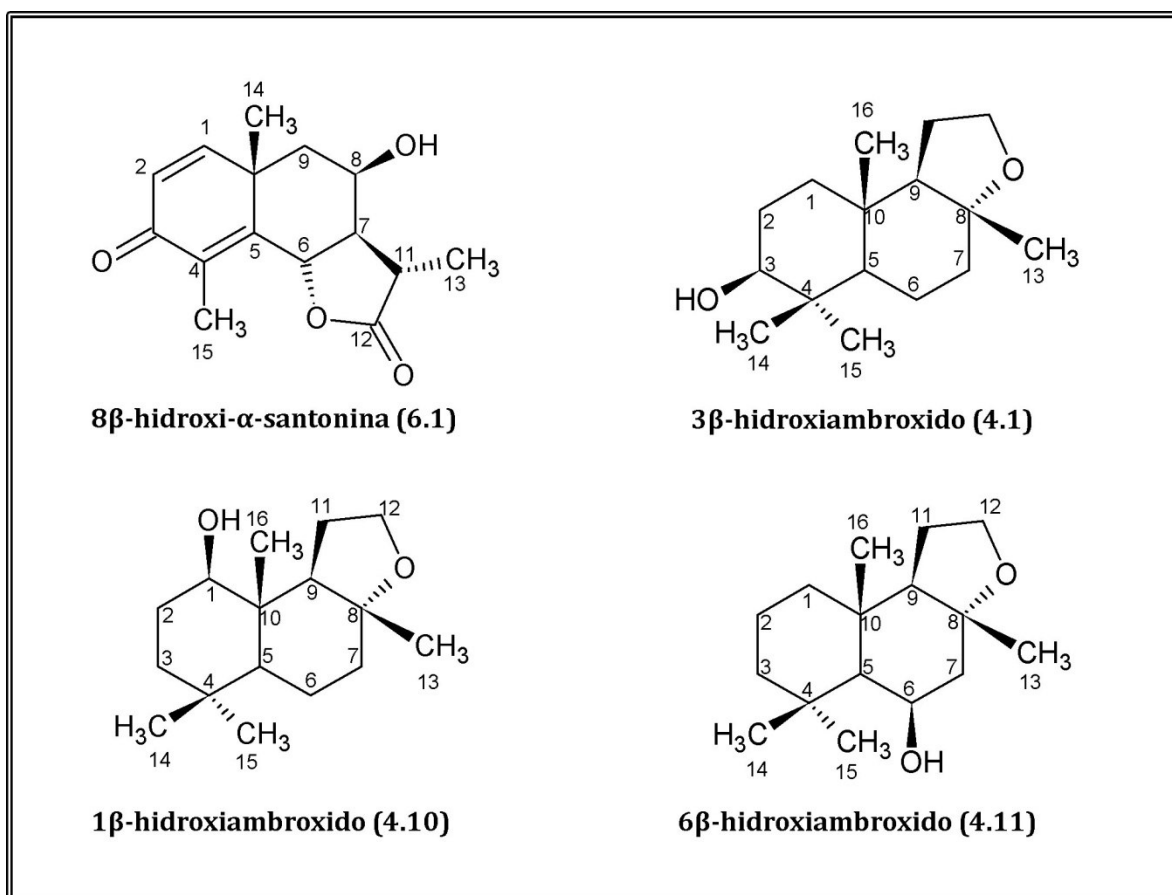


Figura VII.1: Ejemplo del anclaje de un sustrato (indazol) al grupo hemo de la enzima. Imagen extraída de la página web de la Universidad de Kansas, Departamento de Química Médica.

De la misma manera cabría suponer que nuestros sustratos fueron anclados permitiendo obtener los derivados hidroxilados **6.1**; **4.1**; **4.10** y **4.11**.



La capacidad enzimática de los géneros de hongos *Rhizopus* spp. y *Penicillium* spp., condujeron a la reducción regio y estereoselectiva de la lactona sesquiterpénica achalensolido (**1.3**).

El resultado de la biotransformación de achalensolido, el cual fue reducido al compuesto **6.2**, resulta evidente a partir de los antecedentes encontrados en la bibliografía (Stuermer y col., 2007; Goretti y col., 2009; Matsuda y col., 2009), por lo que las enzimas responsables de tal reducción son enoato-reductasas.

Es importante señalar que la reducción enzimática de **1.3** ocurrió exclusivamente por el lado β, mientras que la reducción catalítica se produjo por el lado opuesto α (Oberti y col., 1983). Entonces se podría suponer que la enzima que catalizó la reacción de anclaje permitió enmascarar al sustrato por

la cara α , por lo que sólo el lado β estuvo expuesto a la transferencia de hidruro (Matsuda y col., 2009) (**Figura VII.2**).

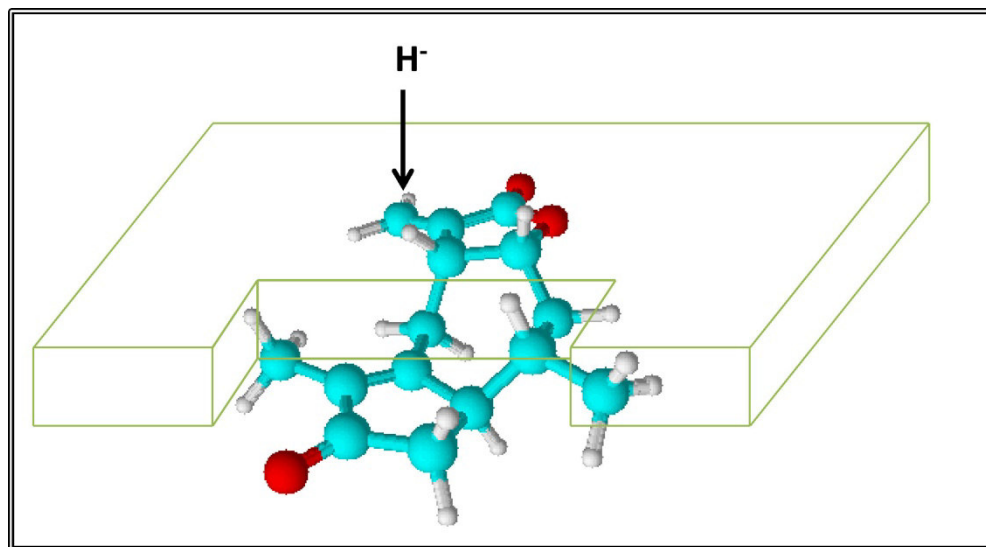


Figura VII.2: Anclaje del sustrato a la enzima por la cara α , quedando el lado β expuesto a la transferencia de hidruro.

La reducción catalizada por enzimas enantio-caras-selectivas de dobles enlaces C=C proquirales “activados” (transformación que es difícil de llevar a cabo con métodos convencionales) ha demostrado proceder con altas especificidades, pudiendo ser aplicable a un amplio rango de sustratos. Como se mencionó anteriormente, las enzimas responsables de estas reacciones son enoato-reductasas dependientes de NADH, que pueden ser encontradas en muchos microorganismos. La mayoría de las transformaciones con enoato reductasas desarrolladas a escala preparativa han sido realizadas mediante el uso de células microbianas enteras (Faber, 1997).

(-)-Achalensolido (**1.3**) presenta en su estructura dos sistemas de enlaces conjugados con oxígeno, una lactona α,β -insaturada y una cetona α,β -insaturada. Las enzimas enoato-reductasas podrían haber reducido estos

grupos funcionales o haber producido la apertura del anillo lactónico. Sin embargo, éstas redujeron de una manera regio y estereoselectiva el doble enlace C=C exocíclico, dejando intactos los otros grupos funcionales en la molécula (**Figura VII.3**). Esto pone en evidencia que, si bien en la molécula existen dos dobles enlaces carbono-carbono activados por grupos atractores de electrones, sólo el doble enlace exocíclico fue reducido, lo que haría suponer que por esa condición, espacialmente está más expuesto a la transferencia de hidruro.

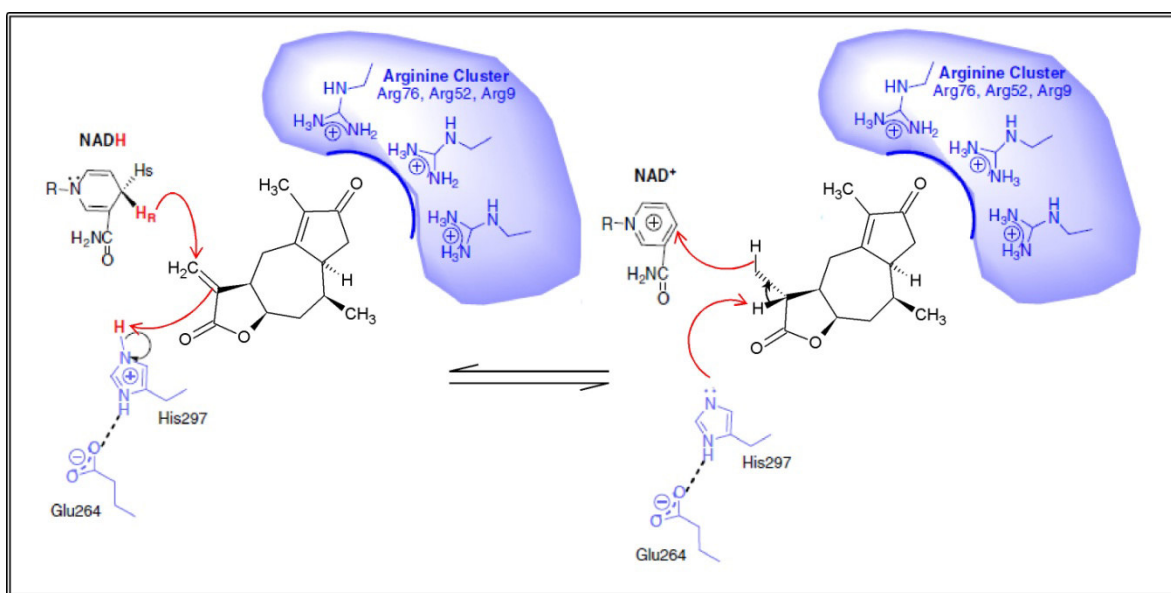


Figura VII.3: Sustrato **1.3** unido a la enzima y transferencia de hidruros desde NADH. Adaptado de Matsuda y col. (2009).

Finalmente se puede agregar, que a pesar de que muchas reacciones de reducción han sido llevadas a cabo con bacterias y levaduras (Faber, 1997), la estructura del sustrato podría favorecer que se expresen este tipo de enzimas en los hongos fitopatógenos utilizados para la biotransformación de **1.3**.

Los resultados obtenidos de capacidad antioxidante demostraron que los compuestos obtenidos de las biotransformaciones 8 β -hidroxi- α -santonina (**6.1**) y 1 β -hidroxiambroxido (**4.10**) presentaron mayor capacidad antioxidante que los

sustratos de partida, pudiéndose deber esto a la posición y estereoquímica del grupo hidroxilo en cada compuesto.

Muchos antioxidantes presentes en la naturaleza se encuentran en alimentos. Estos incluyen las catequinas del té verde, el resveratrol del vino tinto, la curcumina del condimento curry, ácido ascórbico (vitamina C) de los cítricos, así como los sintéticos ya mencionados, butilhidroxitolueno y butilhidroxianisol. Lo que todos ellos tienen en común es que presentan, entre otros, uno o más grupos hidroxilos unidos a carbonos alifáticos o aromáticos. En consecuencia, es razonable pensar que los metabolitos obtenidos en este trabajo, que fueron oxidados en carbonos no reactivos, podían presentar capacidad atrapadora de radicales libres, por lo que fueron sometidos al ensayo ya descrito.

Por lo tanto, la obtención de compuestos hidroxilados pueden constituir una fuente potencial de nuevos compuestos sustitutos de algunos de los antioxidantes sintéticos utilizados en las industrias farmacéuticas y alimenticias.

En cuanto al bioensayo de citotoxicidad sobre *Artemia persimillis*, todos los metabolitos hidroxilados mostraron una citotoxicidad menor que la del sustrato de partida, excepto en el metabolito obtenido de la biotransformación de achalensolido (**1.3**) en donde la diferencia no resultó significativa en comparación al sustrato de partida.

Esto demuestra que la formación de compuestos hidroxilados, han demostrado ser productos de desintoxicación, debido a que estos tipos de compuestos son generalmente más solubles en agua y por lo tanto más susceptibles para ser eliminados por los organismos (Pothuluri y col., 2000).

Los compuestos evaluados en cuanto a actividad antibacteriana no demostraron una alta eficiencia frente a los microorganismos y concentraciones ensayados. Sólo los compuestos (-)-santonina (**1.2**) y 11 α -metilachalensolido

(6.2) mostraron una actividad intermedia. Pudiéndose agregar, que la transformación microbiana del compuesto **1.2** conlleva una disminución de la actividad del compuesto, contrariamente a lo ocurrido con la transformación de achalensolido (**1.3**) en la cual el metabolito obtenido presentó una actividad mayor. Poniendo en evidencia la relación entre cambio de estructura y actividad biológica.

PROYECCIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis sientan bases para desarrollar las siguientes propuestas:

- ✓ Se podría profundizar y ampliar el estudio de las biotransformaciones de los sustratos **1.1**, **1.2** y **1.3**, utilizando otros biocatalizadores como bacterias, células vegetales, esporas de hongos en suspensión, entre otros.
- ✓ Realizar un escalado de las biotransformaciones, optimizando las condiciones de las mismas, para la obtención de mayores cantidades de compuestos y poder profundizar en la actividad biológica de los metabolitos obtenidos mediante bioensayos más específicos.
- ✓ Obtener derivados de los compuestos que mostraron actividad biológica, con el propósito de acrecentar la actividad de los mismos.
- ✓ Trabajar en la biotransformación de otros sustratos de origen natural que son biológicamente activos, con el fin de incrementar sus propiedades en la búsqueda de nuevas actividades.

BIBLIOGRAFÍA

- Abourashed, E.A., A.M. Clark & C.D. Hufford. (1999): Microbial Models of Mammalian Metabolism of Xenobiotics: An Updated Review, *Current Medicinal Chemistry*, **6**, 359-374.
- Abraham, W.R. (1994): Microbial hydroxylation of Sclareol. *Phytochemistry*, **36** (6), pags. 1421-1424.
- Al-Aboudi, A., Mohammad, M., Musharraf, G., Choudhary, M., Atta-ur-Rahman. (2008): Microbial transformation of testosterone by *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium lini*. *Natural Product Research*, Vol. 22, No. 17, pags. 1498–1509.
- Alarcón, J., Águila, S., Cornejo, F., Alderete, J. (2007): Biotransformation of 5 α -hydroxy-14-eudesm-11-en-3-one by *Rhizopus nigricans*, *Cunninghamella elegans* and *Mucor plumbeus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **48**, pags. 23–27.
- Al-Harbi, M., Qureshi, S., Ahmed, M., Raza, M., Miana, G., Shah, A. (1994): Studies on the Antiinflammatory, Antipyretic and Analgesic Activities of Santonin. *Japnese Journal of Pharmacology*, **54**, pags. 135-139.
- Allendes, J.A., Bustos, D.A., Pacciaroni, A., Sosa, V.E. - Bustos, D.A. (2011): Microbial functionalization of (-)-ambroxide by filamentous fungi. *Biocatalysis and Biotransformation*, **29** (2-3), pags. 83-86.

- Amadio, J., Gordon, K., Murphy, C. (2010): Biotransformation of Flurbiprofen by *Cunninghamella* Species. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, pags. 6299–6303.
- Andrade, L., Keppler, A., Schoenlein-Crusius, I., Porto, A., Comasseto, J. (2004): Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31, pags. 129–135.
- Ascoli, B., Machado Bernardi, A. P., Lino von Poser, G., Lissi, E. & Bridi, R. (2006): Estudo do potencial antioxidante de *Hypericum polyanthemum* a través do método DPPH. XIV Jornadas de Jovens Pesquisadores da AUGM, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Ata, A., Nachtigall, J. A. (2004): Microbial transformations of α -santonin. *Z Naturforsch C.*, 59(3–4) pags. 209–214.
- Barrero, A. F.; Enrique, J. E.; Manzaneda, A.; J., A.; Salido, S.; Ramos, J. M. (1993): Synthesis of Ambrox® from (-)-sclareol and (+)-cis-abienol. *Tetrahedron*, 49, 10405.
- Barton, D. H., Parekh, S. I., Taylor, D. K., Tse, C. (1994): An efficient synthesis of (-)-dodecahydro-3a,6,6,9a-tetramethylnaphtho[2,1-b]furan from (-)-sclareol. *Tetrahedron Letters*, 35 (32) pags. 5801-5804.

- Blanco, J., Gil, R., Alvarez, C., Patrino, L, Genti-Raimondi, S., Flury, A. (1997): A novel activity for a group of sesquiterpene lactones : inhibition of aromatase. *FEBS Letters*, 409, pags. 396-400.
- Bu'Lock, J. & Kristiansen, B. (1991): *Biología Básica*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España, pp 463-481.
- Bustos, D.A. (2007): *Estudio de la biotransformación de (-)-Ambroxide por Alternaria alternata*. Tesis de grado. Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina.
- Bustos D., Pacciaroni, A., Sosa, V., Bustos, D.A. (2012): Fungal hydroxylation of (-)- α -santonin. *Reports in Organic Chemistry*, 2, pags. 1–6.
- Bustos, D. A., Salem, R., Varela, P., Pacciaroni, A., Sosa, v., Daniel Bustos, D. (2014): Bioreduction of (-)-achalensolide using pure strains of *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. *Organic Chemistry An Indian Journal*, 10(4), pags. 140-144.
- Cano, A., Ramirez, M.T., Delgado, G. (2011): Biotransformation of Sclareolide by Filamentous Fungi: Cytotoxic Evaluations of the Derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22 (6) pags. 1177-1182.
- Carballeira, J.D., Quezada, M.A., Hoyos, P., Simeó, Y., Hernaiz, M.J., Alcántara, A.R., Sinisterra, J.V. (2009): Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnology Advances*, 27, pags. 686–714.

- Castellanos, F. (2007): Biotransformación de Limoneno, α pineno y aceites esenciales de naranja y mandarina empleando *Aspergillus niger*. Universidad Industrial de Santander Facultad de Ciencias Químicas Escuela de Química. Bucaramanga.
- Choudhary, M. I., Musharraf, S. G., Sami, A., Atta-ur-Rahman, A. (2004): Microbial Transformation of (-)-Ambrox and Sclareolide. *Helvetica Chimica Acta*, 87, pags. 2685- 2694.
- Colman-Saizarbitoria, T., Anderson, J. (1995): Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, 18, 4, pags. 13-18.
- Correa Navarro, Y. M. (2009): *Biotransformación de los sustratos Cinamaldehído y Ácido (\pm)-2,4-isobutilfenilpropanoico mediante el hongo fitopatógeno Colletotrichum acutatum*. Universidad de Colombia Sede Medellín, Medellín.
- Črešnar, B. y Petrič, Š. (2011): Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta* 1814, pags. 29–35.
- Dalton, H. (1980): Oxidation of Hydrocarbons by Methane Monooxygenases from a Variety of Microbes. *Advances in Applied Microbiology*, 26, pags. 71-87.

- Donato Martín, M.T. (2006): Citocromo P450. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? En: Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XIV. Artículo 1, pags. 29-62.
- El-Sharkawy, S., Selim, M., Afifi, M., Halaweish, F. (1991): Microbial Transformation of Zearalenone to a Zearalenone Sulfate. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol. 57, No. 2, pags. 549-552.
- Emerenciano V.P, Kaplan M.A.C., Gottlieb O.R. (1985): Evolution of sesquiterpene lactones in Angiosperms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 13, pp.145-166.
- Eshrat, G., Aroona, C. (2011): Biotransformation of Progesterone by *Penicillium aurantiogriseum*. *Research Journal of Microbiology*, 6, pags. 98-104.
- Faber, K. (1997): *Biotransformations in Organic Chemistry*. A text book 3rd. Ed. Berlin: Springer, pags. 160-194, 210-214.
- Farooq A, Tahara S. (2000): Biotransformation of two cytotoxic terpenes, α -santonin and sclareol by *Botrytis cinerea*. *Z Naturforsch C.*, 55(9–10) pags. 713–717.
- Farooq A. and Tahara S., (1999): Fungal metabolism of flavonoids and related phytoalexins, *Currents Topics in Phytochemistry*, 2, pags 1-33.

- Ferris, J. P., Fasco, M. J., Stylianopoulou, F. L. (1973): Monooxygenase Activity in *Cunninghamella bainieri*: evidence for a fungal system similar to liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 156, pags. 97-103.
- Fridovich I. (1986): Superoxide dismutases. *Methods in Enzymology*, 58, pags. 61-97.
- Galal, A., Ibrahim, A., Mossa, J., El-Feraly, F. (1999): Microbial transformation of parthenolide. *Phytochemistry*, 51, pags. 761-765.
- Gierman, Hincó J. (2001): Biotransformation of (-)-Ambroxide by *Wilsonomyces carpophilus*. Practical Time Organic Chemistry, Laboratorio de Química, Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Noviembre 2001.
- Glenn, A., Meredith, F., Morrison III, W., Bacon, C. (2003): Identification of Intermediate and Branch Metabolites Resulting from Biotransformation of 2-Benzoxazolinone by *Fusarium verticillioides*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, pags. 3165–3169.
- Gliszczynska, A., Łysek, A., Tomasz Janeczko, T., Switalska, M., Wietrzyk, J., Wawrzenczyk, C. (2011): Microbial transformation of (+)-nootkatone and the antiproliferative activity of its metabolites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, pags. 2464–2469.

- Gonzalez, A.M., Presa, M.F., Lurá, M.C. (2003): Ensayo de toxicidad de Artemia salina: Puesta a punto y aplicación a micotoxinas. *Revista FABICIB*, Vol. 7, pags. 117-122.
- Goretti, M., Ponzoni, C., Caselli, E., Marchigiani, E., Cramarossa, M., Turchetti, B., Buzzini, P., Forti, L. (2009): Biotransformation of electron-poor alkenes by yeasts: Asymmetric reduction of (4S)-(+)-carvone by yeast enoate reductases. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, pags. 463–468.
- Gouiric, S.C., Feresin, G.E., Tapia, A., Rossomando, P.C., Schmeda-Hirschman, G. and Bustos, D.A. (2004): 1 β ,7 β -Dihydroxydehydroabiatic acid, a new biotransformation product of dehydroabiatic acid by *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 (3): 281-284.
- Grillet, F., Huang, C., Brummond, K. (2011): An Allenic Pauson–Khand Approach to 6,12-Guaianolides. *Organic Letters*, 13(23), pags. 6304–6307.
- Hanson, J.R. and A. Truneh. (1996): The biotransformation of ambrox® and sclareolide by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 42: 1021-1023.
- Harborne, J.B. (1998): *Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. Third Edition. Chapman & Hall, London, UK.
- Hatziantoniou, S., Dimas, K., Georgopoulos, A., Sotiriadou, N., Demetzos, C. (2006): Cytotoxic and antitumor activity of liposome-incorporated sclareol against cancer cell lines and human colon cancer xenografts. *Pharmacological Research*, 53, pags. 80–87.

- Iida M, Wakuri S, Mineki S, Nishitani K, Yamakawa K. (1993): Microbial hydroxylation of 11,13-dehydrosantonin by *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(4):296–299.
- Kolak, U., Hacibekiroglu, I., Öztürk, M., Özgökce, F., Topcu, G., Ulubelen, A. (2009): Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*. *Turkish Journal of Chemistry*, 33, pags. 813 – 823.
- Kouzi, Samir A. (1991): Metabolism Studies of the Diterpene Sclareol. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, The University of Mississippi, Mississippi, USA.
- Krishna Kumari, G.N., Masilamani, S., Ganesh, M.R., Aravind, S. (2003): Microbial transformation of zaluzanin-D. *Phytochemistry*, 62, pags. 1101–1104.
- Kuban, M., Öngen, G., Bedir, E. (2010): Biotransformation of Cycloastragenol by *Cunninghamella blakesleeana* NRRL 1369 Resulting in a Novel Framework. *ORGANIC LETTERS*, 12, pags. 4252-4255.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A. , J., Fett, R. (2005): Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, pags. 726-732.

- Lah, L., Podobnik, B., Novak, M., Korošec, B., Berne, S., Vogelsang, M., Kraševc, N., Zupanec, N., Stojan, J., Bohlmann, J., Komel, R. (2011): The versatility of the fungal cytochrome P450 monooxygenase system is instrumental in xenobiotic detoxification. *Molecular Microbiology*, 81(5), pags. 1374–1389.
- Lamm, A.S., Chen, A.R.M., Reynolds, W.F., Reese, P.B. (2009): Fungal hydroxylation of (-)-santonin and its analogues. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(4), pags. 292–296.
- Leak, D.J., Sheldon, R.A., Woodley, J.M. and Adlercreutz, P. (2009): Biocatalysts for selective introduction of oxygen. *Journal of Biocatalysis and Biotransformation*, 27 (1):1-26.
- Leuenberger, H.G.W. (1990): Biotransformation- A useful tool in organic chemistry, *Pure & Applied Chemistry*, 62, 753-768.
- Li, L., Liu, R., Ye, M., Hu, X., Wang, Q., Bi, K., Guo, D. (2006): Microbial metabolism of evodiamine by *Penicillium janthinellum* and its application for metabolite identification in rat urine. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, pags. 561–567.
- Li, X., Kim, Y., Jung, J., Kang, J., Kim, D., Choi, H., Son, B. (2007): Microbial transformation of the bioactive sesquiterpene, cyclonerodiol, by the ascomycete *Penicillium* sp. and the actinomycete *Streptomyces* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, pags. 1188–1192.

- Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (2006): *Industrial Biotransformations*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Llorens Molina, J. A., Castell Zeising, V., Pascual Ramirez, R. (2008): Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). *Xiloca*, 36, pag. 68.
- Maguna, F., Romero, A., Garro, O., Okulik, N. (2006): Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: E-057, 1-4.
- Mansuy, D. (1990): Biomimetic catalysts for selective oxidation in organic chemistry. *Pure & Applied Chemistry*, 62 (4):741-746.
- Martinez, A. (2001): *Sesquiterpenlactonas*. Universidad de Antioquía. Medellín.
- Matsuda, T., Yamanaka, R., Nakamura, K. (2009): Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, pags. 513–557.
- Molyneux, P. (2004): The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **26** (2), pags 211-219.
- Moody, J., Freeman, J., Cerniglia, C. (1999): Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. *Drug Metabolism and Disposition*, Vol. 27, No. 10, pags 1157-1164.

Mosquera, O. M., Niño, J., Correa, Y., Buitrago, D. (2005): estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia et Technica* Año XI, No 27. UTP. ISSN 0122-1701, pags 231-234.

Munro, A., Girvan, H., Mason, A., Dunford, A., McLean, K. (2013): What makes a P450 tick? *Trends in Biochemical Sciences*, 38, 3, pags. 140-150.

Musharraf, S. G. (2004): *Microbial Transformation of Bioactive Cyclic Natural Products*. University of Karachi, Pakistan.

Musharraf, S., Naz, S., Najeeb, A., Khan, S., Choudhary, M. (2012): Biotransformation of perfumery terpenoids, (-)-ambrox by a fungal culture *Macrophomina phaseolina* and a plant cell suspension culture of *Peganum harmala*. *Chemistry Central Journal*, 6:82, pags. 1-6.

Nasib, A., Musharraf, S. G., Hussain, S., Khan, S., Anjum, S., Ali, S., Atta-ur-Rahman, Choudhary, M. I. (2006): Biotransformation of (-)-ambrox by cell suspension cultures of *Actinidia deliciosa*. *Natural Products Reports*, 69, pags. 957-959.

Oberti, J.C., V.E. Sosa, W. Herz, J. Siva Prasad, V.L. Goedken (1983): Crystal Structure and Stereochemistry of Achalensolide, a New Guaianolide from *Stevia achalensis*. *Journal of Organic Chemistry*, 48, pags. 4038-4043.

- Omar, M., Khan, N., Hasali, N., Moin, S., Alfarra, H. (2012): Microbial Transformations of Artemisinin – Anti-malaria Drug. *Advances in Bioresearch*, 3, pags. 27 – 31.
- Pino Pérez, O., Jorge Lazo, F. (2010): Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 22, 1, pags. 34-43.
- Pothuluri, J., Freeman, J., Heinze, T., Beger, R., Cerniglia, C. (2000): Biotransformation of Vinclozolin by the Fungus *Cunninghamella elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pags. 6138-6148.
- Potterat, O. (1997): Antioxidants and Free Radical Scavengers of Natural Origin. *Current Organic Chemistry*, 1, pags 415-440.
- Qin, Y., Feng, B., Song, X., Zhou, W., Yu, H., Zhao, L., Yu, L., Ma, B. (2010): Biotransformation of Glycyrrhetic Acid by *Cunninghamella blakesleeana*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 8, pags. 0373–0381.
- Ramirez, L.E., Castaño, D.M. (2009): Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, No 42, 263-268.
- Rangel, D., Garcia, I., Velasco, J., Buitrago, D. y Velazco, E. (2001): Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nítida*. *Revista de la Facultad de Farmacia*, Vol. 42, 43-46.

- Reddy, D. (2013): *Isolation design and synthesis of anticancer compounds based on natural products and peptides*. Cap.2, Sección C. pags. 178-196. Guru Nanak Dev University.
- Ríos V. E., León, A., Chávez, M., Torres, Y., Ramírez-Apan, M., Toscano, R., Bravo-Monzón, A., Espinosa-García, F., Delgado, G. (2014): Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha* and *Mikania cordifolia* and their cytotoxic and anti-inflammatory evaluation. *Fitoterapia*, 94, pags. 155–163.
- Roberts, S.M., Turner N.J., Willetts A.J. & Turner M.K. (1995): Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms. © Cambridge University Press, ISBN 0-521-43070-4.
- Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Tudzynski, B. (2001): The P450-1 gene of *Gibberellafujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellines synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 98, pags. 5838-5843.
- Salomé, T. (2010): Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Acmella repens*, *Urtica dioica* y *Sonchus oleraceus*. Escuela Politécnica del Ejército, Tesis de grado, Ingeniería en Biotecnología, Sangolquí.
- Schewe, H., Mirata, M.A., Holtmann, D., Schrader, J. (2011): Biooxidation of monoterpenes with bacterial monooxygenases. *Process Biochemistry*, 46 (10) pags. 1885–1899.

- Schmeda-Hirschmann, G., Aranda, C., Kurina, M., Rodríguez, J.A., Theoduloz, C. (2007): Biotransformations of imbricatolic acid by *Aspergillus niger* and *Rhizopus nigricans* cultures. *Molecules*, 12, pags. 1092–1100.
- Shen, Y., Cheng, S., Kuo, Y., Hwang, T., Chiang, M., Khalil, A. (2007): Chemical Transformation and Biological Activities of Ambrein, a Major Product of Ambergris from *Physeter macrocephalus* (Sperm Whale). *Journal of Natural Products*, 70, pags. 147-153.
- Stuermer, R., Hauer, B., Hall, M., Faber K. (2007): Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, pags. 203–213.
- Swathi, D., Bandlapalli, S., Vidyavathi, M. (2012): Biotransformation of hesperidine to hesperitine by *Cunninghamella elegans*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5, pags. 174-178.
- van den Brink, H. y van Gorcom, R. (1998): Cytochrome P450 Enzyme Systems in Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 23, pags. 1–17.
- Velasco, R.B., D.L. Montenegro., J.F. Vélez., C.M. García., D. L. Durango (2009): Biotransformación de compuestos aromáticos sustituidos mediante hongos filamentosos fitopatógenos de los géneros *Botryodiplodia* y *Collectotrichum*. *Revista de la Sociedad de Química Perú*. **75**, 95-110.
- Werk-Reichhart, D. y Feyereisen, R. (2000): Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1(6), pags. 1-9.

- Yamakawa K, Nishitani K, Iida M, Mikami A. (1986): Studies on the terpenoids and related alicyclic compounds: chemical and microbiological transformations of 1- α -santonin into 8-epiartemisin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 34(3), pages. 1319–1322.
- Yang L, Dai J, Sakai J, Ando M. (2005): Biotransformation of α -santonin by cell suspension cultures of five plants. *Biotechnology Letters*, 27(11) pages. 793–797.
- Yang L., Dai J., Sakai J., Ando M. (2006): Biotransformation of α -santonin and 6 β -santonin by fungus and plant cell cultures. *Journal of Asian Natural Products, Res.* 8, pages. 317-326.
- Zhang, H., Ren, J., Wang, Y., Sheng, C., Wu, Q., Diao, A., Zhu, D. (2013): Effective multi-step functional biotransformations of steroids by a newly isolated *Fusarium oxysporum* SC1301. *Tetrahedron*, 69, pages. 184-189.
- Zhao, W., Wu, X., Wang, Y., Zhang, Y. (2009): Isolation and identification of a fungal strain with the ability to transform ginsenoside Rg1. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 4, pages. 19-26.
- Zhu, Z., Den, S., Wang, Y., Zhao, Y., Wang, L., Chen, H., Liu, D. 2013 Novel microbial transformation of desacetylcinobufagin by *Fusarium avenaceum* AS 3.4594. *Journal of Asian Natural Products Research*, Vol. 15, No. 3, pages. 294–299.