

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**Análisis del Potencial del Género *Aspergillus*
en la Transformación de Flavonoides**

Por

JUDITH CAROLINA CLARK GARZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en
Farmacia

Marzo, 2008

ANÁLISIS DEL POTENCIAL DEL GÉNERO *Aspergillus*
EN LA TRANSFORMACIÓN DE FLAVONOIDES

Aprobación de la tesis:

Dra. Mónica Noel Sánchez González
Directora de Tesis

-Nombre-
Evaluador de la Tesis

-Nombre-
Evaluador de la Tesis

Dra. Maria Teresa Garza González
Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Judith Carolina Clark Garza

Fecha de Graduación: Marzo, 2008

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: ANÁLISIS DEL POTENCIAL DEL GÉNERO
Aspergillus EN LA TRANSFORMACIÓN DE
FLAVONOIDES

Número de páginas: 39

Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias con orientación en Farmacia

Área de Estudio: Biotecnología Farmacéutica

Propósito y Método del Estudio: Los flavonoides forman parte del metabolismo secundario de plantas. Son responsables de la pigmentación de los pétalos en las flores de tonos amarillos, rojos y naranjas, atrayendo así a los polinizadores. También tienen la capacidad de proteger a las plantas del daño de los rayos UV, además de resguardarlos del ataque de insectos y patógenos. Pueden funcionar como antibióticos y antioxidantes, siendo estas dos propiedades las más estudiadas en plantas y en humanos. Los microorganismos tienen la capacidad de mimetizar el metabolismo de mamíferos, plantas e insectos. El género *Aspergillus* ha demostrado poseer cualidades excepcionales en la transformación de flavonoides, pudiendo sintetizar estructuras distintas y complejas a partir de sus precursores más sencillos, las chalconas. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se planteó estudiar las transformaciones realizadas por otras especies del género *Aspergillus* hasta el momento no estudiadas. En este estudio se realizaron cinéticas de transformación de una chalcona sintética metoxilada por *A. niger*, evaluando el poder antioxidante y la actividad antibiótica del extracto obtenido, para el posterior análisis de los metabolitos presentes en el extracto.

Contribuciones y Conclusiones:

- El género *Aspergillus* tiene vías metabólicas capaces de imitar el metabolismo de plantas en la transformación de flavonoides.
- *Aspergillus niger* fue capaz de transformar a DMC con alta reproducibilidad y alto rendimiento.
- El extracto biotransformado por *A. niger* presentó poca sensibilidad antibiótica contra *E. coli*; sin embargo en los ensayos con *S. typhimurium* se observó una inhibición de crecimiento de éste patógeno en presencia del extracto.
- Los compuestos que conforman el extracto biotransformado por *A. niger* poseen mayor actividad antioxidante que el sustrato, probablemente debido al aumento de polaridad consecuencia de la biotransformación por *A. niger*.
- Estos resultados, además de los que ya se han reportado en literatura, perfilan a los compuestos del extracto biotransformado por *A. niger* ATCC 9142 como agentes de alto valor e importancia en el campo farmacéutico.

FIRMA DEL ASESOR: _____

AGRADECIMIENTOS

Vea cómo para mantener la numeración solamente introducimos saltos de página

DEDICATORIA

(opcional)

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades de los Flavonoides.....	1
1.2 Usos y Funciones de los Flavonoides.....	4
1.3 Generalidades del Género <i>Aspergillus</i>	5
1.4 Antecedentes	6
1.4.1. Recuperación de Productos Biotransformados.....	9
1.5 Justificación	10
2. Hipótesis y Objetivos.....	12
2.1 Hipótesis	12
2.2 Objetivo General.....	12
2.3 Objetivos Específicos.....	13
3. Materiales y Métodos	14
3.1 Reactivos	14
3.2 Ensayos Preliminares. Cinéticas de Transformación.....	15
3.2.1. Condiciones de Crecimiento de Microorganismos	15
3.2.2. Biotransformación de la 2,3-dimetoxi-2'-hidroxichalcona	15
3.2.3. Análisis de la biotransformación por Cromatografía en capa fina	16
3.3 Biotransformación a Escala Semipreparativa	17
3.3.1. Recuperación de metabolitos en XAD-16	17
3.3.2. Ensayo de Actividad Antioxidante	18
3.3.3. Ensayo de Actividad Antibiótica	18

Capítulo	Página
3.4	Análisis de la Presencia de Metabolitos Producidos Durante la Transformación de DMC por <i>A. niger</i> 20
3.4.1.	Cromatografía en Columna..... 20
3.4.2.	Cromatografía en Capa Fina Semipreparativa..... 20
3.5	Análisis Estructural de los Compuestos Aislados por Resonancia Magnética Nuclear..... 21
4.	Resultados 22
4.1	Ensayos Preliminares. Cinéticas de Transformación..... 22
4.2	Biotransformación a Escala Semipreparativa 23
4.2.1.	Recuperación de metabolitos en XAD-16 24
4.2.2.	Ensayo de Actividad Antioxidante 25
4.2.3.	Ensayo de Actividad Antibiótica 26
4.3	Análisis de la Presencia de Metabolitos Producidos Durante la Transformación de DMC por <i>A. niger</i> 27
4.4	Análisis Estructural de los Compuestos Aislados por Resonancia Magnética Nuclear..... 28
5.	Discusión..... 32
6.	Conclusiones..... 35

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Microorganismos reportados para la síntesis y transformación de flavonoides.....	8
Tabla 2. Porcentaje de Actividad Secuestrante de DPPH'	25

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Esqueleto de los Flavonoides	2
Figura 2. Biosíntesis de Flavonoides	3
Figura 3. Clasificación de los Flavonoides.....	4
Figura 4. Estructura de la Amberlita XAD-16	9
Figura 5. Estructura de la 2,3-dimetoxi-2'-hidroxichalcona (DMC).....	16
Figura 6. Evaluación Comparativa de los Mejores Tiempos de Producción de Metabolitos por <i>A.flavus</i> 24741, <i>A. niger</i> 9142 y <i>A. nidulans</i> 24528.	23
Figura 7. Comparación de sustancias biotransformadas recuperadas por solventes orgánicos y por XAD16.....	24
Figura 8. Cromatoplasmas Ensayo Actividad Antioxidante del Extracto	26
Figura 9. Bioautografía Extracto <i>Salmonella thyphimurium</i> ATCC 14028.....	27
Figura 10. Cromatoplasma Purificación del Extracto de <i>A. niger</i> ATCC 9142	28
Figura 11. ¹ HRMN de la fracción 5c.....	30
Figura 12. ¹ HRMN de la fracción 6	31

NOMENCLATURA

ATCC	American Type Culture Collection
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₃ CH ₂ OH	Etanol
CHI	Chalcona isomerasa
CHS	Chalcona sintasa
DMC	Dimetil chalcona
DMF	Dimetilformamida
DPPH	1,1-difenil-2-picrazil hidrazilo
EtOAc	Acetato de etilo
HCl	Ácido clorhídrico
HOAc	Ácido acético glacial
NaNO ₂	Nitrito de sodio
PAL	Fenilalanina amonioliasa
PCS	Policétido sintasa
<i>R_f</i>	Factor de retención
λ	Longitud de onda (nm)
δ	Desplazamiento químico (ppm)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento (Hz)

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los Flavonoides

El metabolismo primario de plantas comprende una serie de procesos químicos esenciales para el mantenimiento celular. Por el contrario, los compuestos finales del metabolismo secundario no son esenciales y varían dependiendo de las especies. Entre los productos del metabolismo secundario se encuentran los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, glicósidos, quinonas, taninos y terpenoides.¹

Los flavonoides son un grupo diverso de productos naturales de plantas sintetizados por precursores fenilpropanoides y derivados de acetatos. Usualmente, se encuentran como derivados glicosilados.

Respecto a su estructura química, poseen un esqueleto de quince carbonos (C6-C3-C6) formado por dos anillos aromáticos (Anillos A y B), conectados por un puente de tres carbonos, como se muestra en la Figura 1.

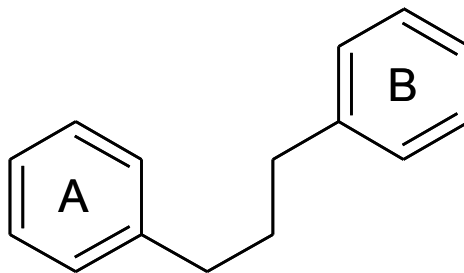


Figura 1. Esqueleto de los Flavonoides

La vía biosintética de los flavonoides comienza cuando la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL), se transforma en ácido cinámico que luego es transformado en ácido *p*-cumarínico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático. Finalmente la acción de una coenzima-A ligasa sobre el ácido *p*-cumarínico lo transforma en cumaril-SCoA, el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal entre los que se encuentran los flavonoides. Las chalconas (1,3-difenil-1-propen-3-ona), son la estructura más sencilla de flavonoides y sirven como precursor para otras estructuras flavonoides. Las chalconas son sintetizadas por la enzima chalcona sintasa (CHS) a partir de la molécula de cumaril-SCoA y 3 moléculas de malonil-SCoA.^{2, 3}

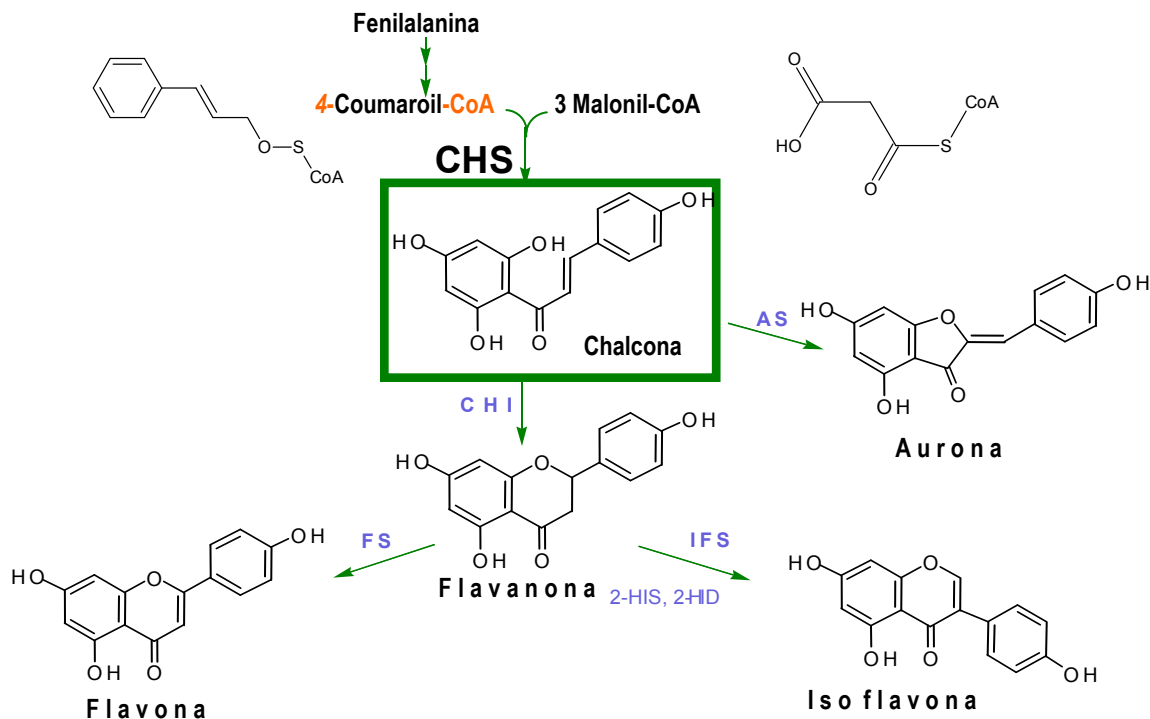


Figura 2. Biosíntesis de Flavonoides

De acuerdo a la configuración de la cadena lineal que une a los dos anillos aromáticos, los flavonoides se pueden clasificar como chalcona, flavona, flavonol, flavanona, flavanonol, aurona, isoflavona e isoflavanona.^{4,5}

Dentro de cada subclase existen diferentes sustituciones en los anillos aromáticos y/o en los heterociclos, de tal manera que se pueden encontrar grupos metilo, metoxi, hidroxilo, glicosilo e isoprenoide entre otros.

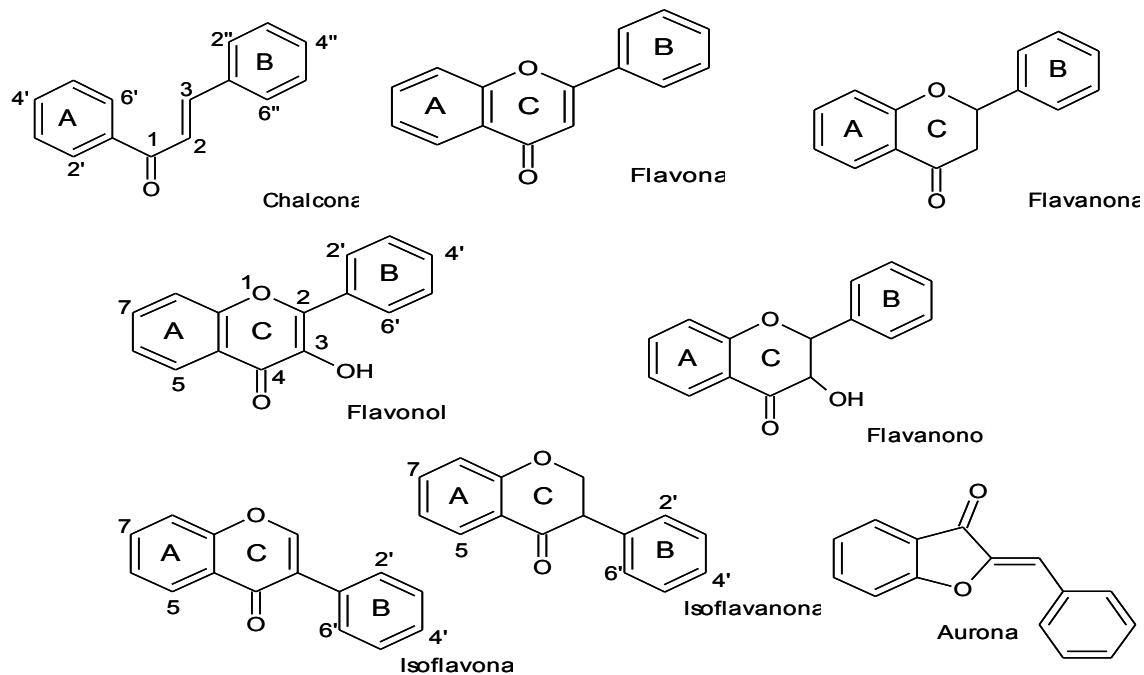


Figura 3. Clasificación de los Flavonoides

1.2 Usos y Funciones de los Flavonoides

Como parte del metabolismo secundario de plantas, los flavonoides no son indispensables para mantenimiento nutricional. Estos metabolitos tienen variadas funciones como es la de auxiliares para la polinización. Lo anterior es debido a que estos compuestos confieren una coloración atractiva para los insectos. Por otra parte protegen a las plantas de la radiación ultravioleta, impidiendo los efectos nocivos de estas radiaciones a los tejidos internos. Finalmente los flavonoides resguardan a las plantas del ataque de los herbívoros generando sabores o texturas desagradables.³

Por las propiedades que les confieren a las plantas, los flavonoides han atraído la atención por su posible aplicación en el consumo humano. Reportes en la literatura indican que los flavonoides pueden presentar diversas actividades de tipo biológico como antialérgicos, antivirales, antiinflamatorios y antimicrobianos.⁶⁻⁹ Sin embargo, la propiedad más estudiada es su acción como antioxidante, definida como la capacidad para reducir la formación de radicales libres y secuestrar especies de oxígeno reactivas.¹⁰ Un radical libre es una molécula inestable, de naturaleza orgánica o inorgánica, esta inestabilidad la convierte en una molécula reactiva. Los radicales libres se pueden producir durante la respiración celular; sin embargo, la fuente más importante de éstos es la exposición excesiva a las radiaciones solares, el tabaquismo, las dietas ricas en grasas y la contaminación ambiental, entre otros. Los radicales libres pueden causar daños celulares que en muchos casos son irreparables.^{11,12}

1.3 Generalidades del Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* es un grupo de hongos filamentosos con un gran número de especies. Éstas son de fácil crecimiento, el color de las colonias es la principal característica macroscópica para la identificación de las especies de este género. Presentan distintas tonalidades de verde, amarillo, blanco, gris y negro.^{12,13}

La pared celular de los hongos está constituida por distintos compuestos químicos como polisacáridos, proteínas, lípidos, entre otros. Existen variaciones en la composición de la pared celular dependiendo de la especie, edad del hongo, composición del medio de crecimiento, pH y temperatura. La pared celular de los hongos del género *Aspergillus* esta compuesta en su mayoría por quitina y glucano.^{14,15}

1.4 Antecedentes

Los microorganismos han mostrado capacidad para mimetizar el metabolismo de plantas, mamíferos e insectos; pues poseen sistemas enzimáticos similares, es por esto que catalizan reacciones similares de importancia en metabolismo primario y secundario.¹⁶ En estudios previamente realizados se encontró que *Aspergillus alliaceus* UI 315 tiene cualidades excepcionales en la transformación de flavonoides, pudiendo biotransformar flavanonas y auronas a partir de chalconas.¹⁷ En estudios posteriores se encontraron cinco microorganismos: *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Aspergillus nidulans* ATCC 24578, *Aspergillus flavus* ATCC 24741, *Pseudomonas testosterone* ATCC 11996 y *Streptomyces griseus* ATCC 10137 los cuales han mostrado capacidad de transformar chalconas a productos no identificados hasta el momento. De este grupo cabe destacar al género *Aspergillus* que como se mencionó anteriormente, es una importante herramienta en la síntesis de

flavonoides y por lo tanto puede tener un potencial en la síntesis de productos de interés farmacéutico.

Se han realizado diversos estudios respecto al empleo de microorganismos con capacidad para catalizar la síntesis y biotransformación de flavonoides (Tabla 1). Como se podrá observar, los géneros *Streptomyces* y *Aspergillus* son de gran importancia en este ámbito. A pesar de que en nuestro grupo se encontró que *S. griseus* transformó una chalcona a diversos productos de identidad desconocida, se tiene especial interés en el estudio de las transformaciones realizadas por el género *Aspergillus* pues ha demostrado capacidad para imitar el metabolismo vegetal.^{12,18} Muestra de lo anterior constituye el trabajo realizado por Blanco, S. E. y coautores quienes reportaron que *A. niger* NRRL 3 era el microorganismo más eficaz para la transformación de flavanona mediante reacciones de hidroxilación y reducciones, obteniendo como resultado la producción de chalconas hidroxiladas, flavonol y flavanonas hidroxiladas.⁷ Por otra parte, Williamson y colaboradores utilizaron *Aspergillus alliaceus* UI 315 en la transformación de hormonas esteroidales, logrando buenos rendimientos de transformación, lo cual abre paso para la preparación de estrógenos de tipo catecol a gran escala.²⁵ Utilizando este mismo microorganismo, Sánchez-González y Rosazza reportaron la producción de buteína y sulfuretina a partir de chalconas. En reportes anteriores, este grupo de investigación aseveró que *A. alliaceus* UI315 es un microorganismo versátil que posee la capacidad de catalizar hidroxilaciones alifáticas y aromáticas, así como O-dealquilaciones.^{17, 18}

Microorganismos como *Aspergillus niger* NRRL 599 y *Aspergillus niger* X172 han mostrado la propiedad de biotransformar isoflavanonas en compuestos deshidrogenados e hidroxilados.^{19, 20}

Tabla 1. Microorganismos reportados para la síntesis y transformación de flavonoides

Sustrato	Microorganismo(s)	Transformación	Producto (s)	Referencia
5-hidroxi, 6-hidroxi y 7-hidroxi-Cromona y cromanona. 5-hidroxiflavona.	<i>Streptomyces fulvissimus</i> NRRL 1453B	Hidroxilación	Productos hidroxilados en 4' 5,3',4'-trihidroxiflavona	Ibrahim, A.R.; Abdul-Hajj, Y. J.; 1990
Isoflavanona	<i>Aspergillus niger</i> X-172	Hidroxilación	2-hidroxiisoflavona 3',4'-dihidroxiisoflavona	Ibrahim, A.R.; Abdul-Hajj, Y. J.; 1990
Flavanona	<i>Absidia</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Gliocladium</i> , <i>Gymnascella</i> , <i>Helicostylum</i> , <i>Manascus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Sepedorium</i> , <i>Thamnidium</i> , <i>Trichocladium</i> , <i>Trichoderma</i>	Hidroxilación Deshidrogenación Ciclación	3',4'-dihidroxiflavanona 3-hidroxiflavanona 4'-hidroxiflavan-4- α -ol 2'-hidroxidibenzoilmetano 2',5'-dihidroxi dihydrochalcona 2',3'',4''-trihidroxi dihydrochalcona 2'-hidroxidihidro chalcona 2',4''-dihidroxidihidro chalcona 4'-hidroxiflavanona 4'-hidroxidibenzoilmetano	Ibrahim, A.R.; Abdul-Hajj, Y. J.; 1990
3-(4''-Hidroxifenil)-1-(2',4'-dihidroxi fenil)-propenona (4,2',4'-trihidroxi chalcona, isoliquiritigeina)	<i>Aspergillus alliaceus</i> UI 315	Hidroxilación Ciclación	3-(3'',4''-dihidroxifenil)-1-(2',4'-dihidroxifenil)propenona (Buteina) 2-[(3,4-dihidroxifenil)-metilen]-6-hidroxi-3(2H)benzofuranona (7,3',4'-trihidroxiaurona, sulfuretina)	Sánchez-González, M.; Rosazza, J.P.N.; 2006
2'-hidroxi-2',3''-dimetoxi-chalcona	<i>Aspergillus alliaceus</i> UI 315	Ciclación Dealquilación Hidroxilación	Flavanonas Chalconas O-dealquiladas Chalconas O-hidroxiladas	Sánchez-González, M.; Rosazza, J.P.N.; 2004
Cromanona (Isoflavanona)	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 599	Deshidrogenación	Cromona (Isoflavona)	Ibrahim, A.R.; Abdul-Hajj, Y. J.; 1990

1.4.1. Recuperación de Productos Biotransformados

La recuperación tradicional de los productos biotransformados se realiza con solventes orgánicos, algunos de éstos con costo elevado, además de ser contaminantes ambientales. Una alternativa para la recuperación de estos productos es la utilización de resinas capaces de adsorber estos compuestos. La amberlita XAD-16 es un adsorbente en forma de perlas blancas insolubles. Es un polímero hidrofóbico, no-iónico, con una estructura macro reticular (una fase continua de polímero y una fase continua de poro). La distribución de poros de la amberlita XAD16, la convierte en un buen adsorbente de sustancias orgánicas de peso molecular bajo a medio. Su estructura se muestra en la Figura 4.²¹

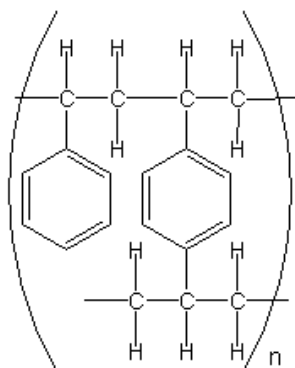


Figura 4. Estructura de la Amberlita XAD-16

La amberlita XAD-16 es utilizada para adsorber moléculas hidrofóbicas de solventes polares y compuestos orgánicos volátiles que provienen de corrientes de vapor. Algunas otras aplicaciones son la purificación y recuperación de: antibióticos, esteroides solubles en agua, enzimas, aminoácidos y proteínas. Otra aplicación es la remoción de compuestos no polares de solventes polares como por ejemplo la remoción de fenol de soluciones acuosas.²²

1.5 Justificación

Anteriormente se creía que las CHSs eran específicas de plantas, actualmente se sabe que *Streptomyces griseus* posee un gen *rppA* que codifica para una proteína de 372 aminoácidos la cual muestra similitud significativa con la CHS de plantas.²³ El descubrimiento de policétido sintasas (PCS) bacterianas pertenecientes a la superfamilia de enzimas de CHS de plantas correlaciona la capacidad biosintética de plantas y bacterias.²⁴ Este descubrimiento relaciona la capacidad catalítica de plantas y bacterias. Dichos hallazgos fueron fortalecidos con el hecho de que células microbianas han demostrado capacidad para modificar y sintetizar flavonoides, obteniendo como resultados moléculas nuevas o ya existentes.^{12,13,25} Lo anterior abre nuevas perspectivas en la síntesis de flavonoides pues los microorganismos requieren menor tiempo de crecimiento y condiciones de cultivo más sencillas y de menor costo.

Del análisis de la literatura realizado se puede recapitular que no existen reportes acerca de transformaciones de flavonoides por *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Aspergillus nidulans* ATCC 24578 y *Aspergillus flavus* ATCC 24741. El género *Aspergillus* tiene un gran potencial de reconocimiento y transformación de flavonoides sin contar hasta el momento con información acerca del origen de este fenómeno.^{12, 13}

En el presente trabajo se plantea analizar el potencial de estos tres microorganismos en la transformación de flavonoides.

CAPÍTULO 2

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Es posible generar productos de interés farmacéutico a través de la transformación de chalconas por *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Aspergillus nidulans* ATCC 24578 y *Aspergillus flavus* ATCC 24741.

2.2 Objetivo General

Analizar el potencial de microorganismos del género *Aspergillus* en la transformación de chalconas.

2.3 Objetivos Específicos

1. Realizar cinéticas de transformación de chalconas con *A. niger*, *A. nidulans* y *A. flavus*.
2. Ensayar la actividad antibiótica y antioxidante de los extractos obtenidos de la cinética de transformación de chalconas.
3. Purificar los productos de biotransformación por *A. niger*.
4. Elucidar estructuras de los compuestos obtenidos de la transformación de chalconas por *A. niger*.

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

1,1-difenil-2-picrazil hidrazilo (Sigma Aldrich), 2,3-dimetoxi-2'-hidroxichalcona (Indofine Chemicals), acetato de etilo (CTR Scientific), acetona (CTR Scientific), ácido acético glacial (Fisher Scientific), ácido clorhídrico (Fermont), ácido fórmico (Chemika Reagents), ácido Sulfanílico (Fermont), agar Sabouraud maltosa (BD Bioxon), agar nutritivo (Merck) agar soya tripticaseína (BD Bioxon), alcohol etílico (CTR Scientific), amberlita XAD-16 (Rohm & Haas), cloroformo (Chemika Reagents), cloruro de sodio (CTR Scientific), dextrosa (Spectrum), extracto de levadura (Becton Dickinson), fosfato monoácido de potasio (Chemika Reagents), harina de soya (Sigma Aldrich), hexano (CTR Scientific), hidróxido de sodio (Fermont), nitrito de sodio (Fermont), N,N-Dimetilformamida (Fisher Scientific).

3.2 Ensayos Preliminares. Cinéticas de Transformación.

3.2.1. Condiciones de Crecimiento de Microorganismos

Aspergillus niger ATCC 9142, *Aspergillus nidulans* ATCC 24528 y *Aspergillus flavus* ATCC 24741 se mantuvieron en agar Sabouraud maltosa en refrigeración a 4 °C hasta antes de su utilización.

Para el crecimiento de los microorganismos se utilizó el medio de cultivo IOWA compuesto por dextrosa (20 g), extracto de levadura (5 g), harina de soya (5 g), cloruro de sodio (5 g), fosfato monoácido de potasio (5 g) en un litro de agua desionizada, el pH se ajustó a 7 con HCl 6 N.

3.2.2. Biotransformación de la 2,3-dimetoxi-2'-hidroxichalcona

Aspergillus niger ATCC 9142, *Aspergillus nidulans* ATCC 24528 y *Aspergillus flavus* ATCC 24741 fueron cultivados en dos etapas en medio IOWA, anteriormente descrito. Los cultivos se crecieron en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad con 25 ml de medio a 28 °C y 250 rpm. La etapa I se inició inoculando 2 ml de una solución de raspado con agua estéril del microorganismo crecido en agar inclinado, utilizando pipetas estériles para la transferencia, después de 72 horas de crecimiento un inóculo de 10% (v/v) derivado de la primera etapa fue utilizado para el inicio de la etapa II, incubando bajo las mismas condiciones por 24 horas. Pasado este tiempo, se adicionó una solución de 2,3-dimetoxi-2'-hidroxichalcona (DMC, su estructura se muestra en la Figura 5) disuelta en N,N-dimetil formamida (DMF) con una concentración de 50 mg/ml para obtener una concentración final de 0.5 mg/ml en cada matraz.

El progreso de la biotransformación por *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Aspergillus nidulans* ATCC 24528 y *Aspergillus flavus* ATCC 24741 fue monitoreado mediante cromatografía en capa fina (CCF).

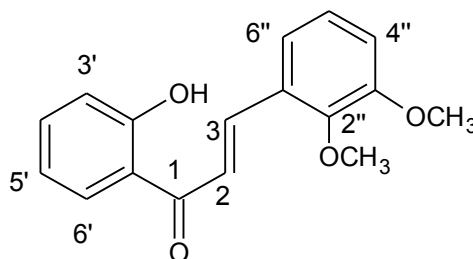


Figura 5. Estructura de la 2,3-dimetoxi-2'-hidroxichalcona (DMC)

3.2.3. Análisis de la biotransformación por Cromatografía en capa fina

Las muestras obtenidas del monitoreo de la biotransformación fueron procesadas para ser analizadas por CCF utilizando el siguiente procedimiento. Una muestra de 4 ml se acidificó con HCl 6 N hasta alcanzar un pH entre 1 y 2. Posteriormente la muestra fue extraída con 2 ml de acetato de etilo y 10 μ l del extracto fueron depositados en placas de cromatografía de gel de sílice (placas CCF silica gel, aluminio, 20x20cm Sigma-Aldrich®).

Las cromatoplasas fueron eluidas con una fase móvil compuesta por CHCl_3 :EtOAc:HOAc (30:10:0.2 v/v/v). Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta a 254 nm y 360 nm antes de ser teñidas con reactivo de Pauly para una mejor visualización de los flavonoides presentes en los extractos.

El reactivo de Pauly estuvo compuesto por tres soluciones, la solución A (Ácido Sulfanílico 0.5% en HCl 2%) y la solución B (NaNO_2 0.5% en H_2O) se mezclaron en proporción 1:1 y se rociaron las placas cromatográficas, se

dejaron secar al aire, después se roció la solución C (NaOH 1% en CH₃CH₂OH 50%), aplicando calor a la cromatoplaqa, los compuestos fenólicos adquieren una coloración naranja-amarillo.²⁶

3.3 Biotransformación a Escala Semipreparativa

Los cultivos de la etapa II de *Aspergillus niger* ATCC 9142 fueron crecidos en 500 ml de medio lowa dividido en diez matraces Erlenmeyer de capacidad de 250 ml con 50 ml de medio. Después de 24 horas del inicio de la etapa II a cada matraz se le agregaron 500 µl de una solución de sustrato de 50 mg/ml en DMF obteniendo una concentración final por matraz de 0.5 mg/ml. Los matraces se incubaron bajo las condiciones antes mencionadas por 24 horas. Los caldos de fermentación se combinaron y las células y otros sólidos fueron separados por filtración con gasa.

3.3.1. Recuperación de metabolitos en XAD-16

La recuperación de los productos de transformación del caldo de fermentación se ensayó con amberlita XAD-16 en una concentración final de 25 g/l y se mantuvo en agitación a 200 rpm durante 1 hora. Pasado este tiempo, las perlas de amberlita XAD-16 fueron lavadas con metanol para desorber los compuestos biotransformados.

3.3.2. Ensayo de Actividad Antioxidante

La actividad secuestrante del extracto se determinó siguiendo la técnica de Brand-Williams.²⁷ Se preparó una solución de 65 μ M de 1,1-difenil-2-picrazil hidrazilo (DPPH) en una mezcla metanol:agua 80:20. Se manejaron concentraciones de 6, 4.5, 3, 1.5, 0.3 y 0 mg/ml de ácido ascórbico o extracto; el procedimiento fue el siguiente: en celdas espectrofotométricas se agregaron 20 μ l de la concentración de extracto o ácido ascórbico a probar y 480 μ l de la solución DPPH 65 μ M. Se realizaron lecturas de absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro Genesys 5 modelo 336001 Spectronic®. Se realizaron mediciones a los 0 (A_0) y 30 (A_{30}) minutos de incubación a 23 °C.

Para determinar el efecto secuestrante de radicales libres de los componentes del extracto se utilizó la técnica reportada por Takamatsu y otros.²⁸ El extracto se aplicó a una placa de CCF y se eluyó con el sistema cromatográfico antes mencionado. Se empleó una solución de radical DPPH en metanol:agua 80:20 en una concentración de 2.0 mg/ml. Las placas fueron rociadas con esta solución y observadas 30 minutos después.

3.3.3. Ensayo de Actividad Antibiótica

Para determinar actividad antibiótica de los extractos contra *Escherichia coli* ATCC 25922, se desarrolló un ensayo de difusión en discos, utilizando una adecuación del método propuesto por Zhu y colaboradores.²⁹ Se prepararon cajas de Petri con medio de crecimiento soya tripticaseína en las cuales se

inoculó *E. coli* ATCC 25922 en una concentración de 1×10^6 UFC/ml. Por otra parte, se prepararon discos de papel filtro con un diámetro de 6 mm, los cuales fueron esterilizados e impregnados con diferentes concentraciones conocidas de extracto en metanol. Las soluciones de extracto fueron preparadas partiendo de una solución de extracto con una concentración de 10 mg/ml, para obtener de ésta después de diluir, aplicar y secar las siguientes cantidades de extracto, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1, 0.05 y 0 mg impregnados en los discos. Todas las placas fueron incubadas a 37 °C por 18-24 horas.

Para analizar la actividad antibiótica de los componentes del extracto contra *Salmonella thyphimurium* ATCC 14028 se utilizó la metodología descrita por Rios, JL y colaboradores denominada bioautografía.³⁰ Esta técnica conjuga la cromatografía en capa fina con los métodos de difusión y dilución en placa. Se realizó una cromatoplaaca con el extracto en tres distintas cantidades (0.13, 0.065 y 0.026 mg) y se dejó bajo luz UV a 265 nm durante una hora para su esterilización. Pasado este tiempo, se agregaron aproximadamente 15 ml de agar nutritivo inoculado con *S. thyphimurium* en una concentración de 1×10^6 UFC/ml, se incubó por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, las células viables se pusieron en evidencia al hacerlas reaccionar con 2 ml de solución de cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio 2.5 mg/ml, por 4 horas.

3.4 Análisis de la Presencia de Metabolitos Producidos Durante la Transformación de DMC por *A. niger*

3.4.1. Cromatografía en Columna

Para la purificación del extracto se emplearon técnicas cromatográficas, empezando con cromatografía en columna (CC), la columna fue empaquetada con gel de sílice (Silica gel 60 tamaño de partícula 0.040-0.063 nm para CC, EMD Chemicals Inc.). Se trabajó con sistemas de solventes cloroformo:acetato de etilo 3:1 y hexano:acetona 75:25.

3.4.2. Cromatografía en Capa Fina Semipreparativa

Para la purificación del extracto se emplearon placas cromatográficas preparativas de gel de sílice (silica gel GF preparative layer 254 nm, 20x20 100 microns Uniplate™) El extracto se disolvió con una pequeña cantidad de acetona. Para el sistema cromatográfico se empleo CHCl_3 :EtOAc:HOAc 30:10:0.2 v/v/v, preparándose 80 ml del sistema para el tanque. Al terminar de eluir, las placas se retiraron del tanque cromatográfico y se cubrieron con papel aluminio dejando al descubierto una pequeña sección para revelar con reactivo de Pauly. Una vez identificados los flavonoides del extracto en las placas, se procedió a hacer un raspado de la placa cromatográfica con un escalpelo y se transfirieron a viales con acetona. Por filtración a través de vidrio poroso, se separan los compuestos aislados de la sílice. Del extracto acetónico (compuesto-acetona) se evaporó el solvente a fin de obtener el compuesto aislado.

3.5 Análisis Estructural de los Compuestos Aislados por Resonancia Magnética Nuclear

Los compuestos purificados se enviaron a analizar al servicio de resonancia magnética nuclear de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco. Utilizando un espectrómetro Hewlett Packard de 400 MHz utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como solvente.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

Los cultivos al término de la transformación se filtraron, a fin de separar el micelio del filtrado. El micelio se trabajó en extracciones con acetona; el extracto acetónico obtenido del micelio presentó sólo una mínima concentración de metabolitos, por lo que se decidió continuar las determinaciones exclusivamente en el filtrado.

4.1 Ensayos Preliminares. Cinéticas de Transformación

Se realizaron cinéticas de transformación de DMC por *A. flavus* ATCC 24741, *A. nidulans* ATCC 24528 y *A. niger* ATCC 9142. Éste último microorganismo fue capaz de producir el mayor número de sus metabolitos en 24 horas, contrario a las 72 horas requeridas por *A. flavus* y *A. nidulans*, obteniendo así mayor cantidad de metabolitos en menor tiempo de la transformación de la chalcona original.

En la Figura 6 se muestra un cromatograma comparativo de los tres microorganismos en sus mejores tiempos de producción de metabolitos, visto bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm. Además de requerir menos tiempo para realizar la transformación de la DCM, *A. niger* consumió una mayor cantidad de sustrato, comparado con *A. nidulans* y *A. flavus*. Es por esto que se decidió utilizar a *A. niger* como modelo de la transformación de la DMC.

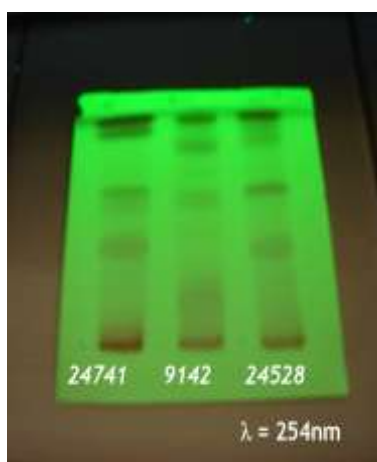


Figura 6. Evaluación Comparativa de los Mejores Tiempos de Producción de Metabolitos por *A.flavus* 24741, *A. niger* 9142 y *A. nidulans* 24528.

4.2 Biotransformación a Escala Semipreparativa

La extracción de los compuestos biotransformados por *Aspergillus niger* ATCC 9142 se realizó de manera semipreparativa, obteniéndose 246 mg de extracto a partir de 250 mg de sustrato, es decir se recuperó el 98% del total adicionado. A pesar de que no se cuantificó el sustrato residual aparentemente,

mediante inspección visual de placas cromatográficas en capa fina, se puede manifestar la transformación del 50% del sustrato.

4.2.1. Recuperación de metabolitos en XAD-16

Para la recuperación de los productos de la biotransformación se empleó amberlita XAD-16.³¹ Como se puede apreciar en la Figura 7, los extractos obtenidos con acetato de etilo (carril A de la cromatopla) y XAD-16 (carril B de la cromatopla) presentan el mismo perfil de compuestos orgánicos obtenidos de la biotransformación de *A. niger*.

En la Figura también se aprecia que el mejor rendimiento de adsorción fue obtenido al utilizar acetato de etilo. La posible adsorción de un compuesto rojizo, tal vez un polímero, podría explicar los bajos rendimientos obtenidos con XAD-16.

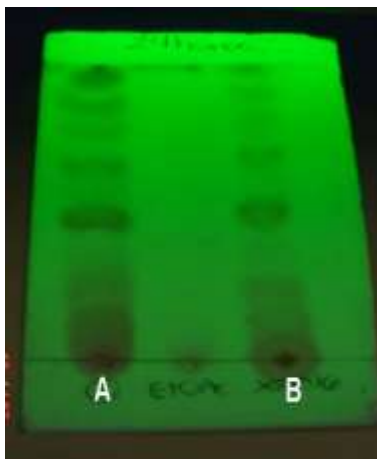


Figura 7. Comparación de sustancias biotransformadas recuperadas por solventes orgánicos y por XAD16.

A) Extracto en EtOAc; B) Extracto en XAD16

4.2.2. Ensayo de Actividad Antioxidante

Los resultados del ensayo de actividad secuestrante de DPPH[·] de los compuestos biotransformados por *A. niger* ATCC 9142 se muestran en la Tabla 2, expresados a manera de porcentaje.

Tabla 2. Porcentaje de Actividad Secuestrante de DPPH[·]

Ácido Ascórbico	71.9%
Extracto	21.6%
Sustrato	14.39%

Con fines comparativos, en la Tabla 2, se pretan los datos para el ácido ascórbico. Como se puede apreciar el extracto biotransformado presentó una mayor capacidad para secuestrar radicales DPPH[·] que el sustrato. Esto parece indicar que en el extracto biotransformado existen compuestos con alta capacidad antioxidante.

Por lo anterior se decidió combinar una técnica analítica con la determinación de la actividad antioxidante. En la Figura 8 se muestra una cromatoplaca del sustrato y el extracto rociados con DPPH[·], en donde los compuestos con actividad antioxidante se apreciaron como zonas incoloras contra un fondo de color púrpura.

Como se observa el extracto metabolizado por *A. niger* posee una gran cantidad de compuestos que presentan actividad antioxidante, sobre todo aquéllos con alta polaridad.



Figura 8. Cromatoplasmas Ensayo Actividad Antioxidante del Extracto

4.2.3. Ensayo de Actividad Antibiótica

La actividad antibiótica de los componentes del extracto se evaluó utilizando *E. coli* ATCC 25922 y *S. typhimurium* ATCC 14028.

En la determinación de la sensibilidad de *E. coli* (1×10^6 UFC/ml) ante el extracto obtenido de la transformación de DMC utilizando discos de difusión, se observó la presencia de crecimiento alrededor de éstos lo que indicó que *E. coli* es poco sensible al extracto.

Los resultados obtenidos en la técnica bioautográfica empleando *Salmonella typhimurium* como microorganismo a ensayar fueron los siguientes: las zonas de inhibición del crecimiento se apreciaron como incoloras sobre un fondo en color rosa obtenido después de la reacción con cloruro de 2,3, -trifeniltetrazolio. Como se puede observar en la Figura 10, se observan dos zonas de inhibición que aunque no fueron muy definidas fueron indicativas de un resultado positivo.



Figura 9. Bioautografía Extracto *Salmonella thyphimurium* ATCC 14028

4.3 Análisis de la Presencia de Metabolitos Producidos Durante la Transformación de DMC por *A. niger*

Inicialmente la purificación del extracto se realizó en cromatografía en columna, de esta manera se logró fraccionarlo. Las fracciones obtenidas en la columna se sometieron posteriormente a un proceso de purificación utilizando placas de CCF preparativa. Las fracciones obtenidas se muestran en la Figura 11, y como se aprecia no estaban puras por lo que se procedió a purificarlas utilizando placas de CCF analítica. Debido a la semejanza estructural de estos compuestos su aislamiento por este método presentó dificultades y después de 3 experimentos consecutivos de purificación aun se apreciaron ocho mezclas de compuestos. Las tres mezclas con mayor concentración de metabolitos se enviaron al servicio de resonancia magnética nuclear.

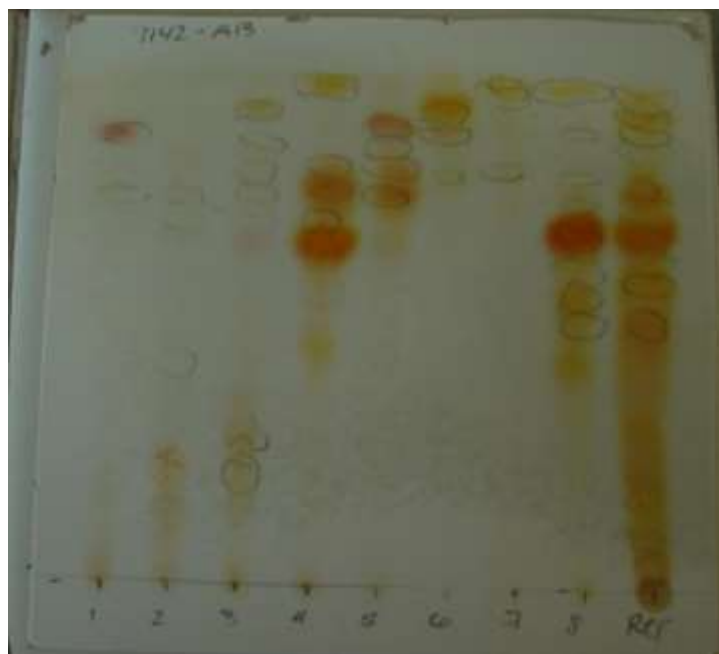


Figura 10. Cromatoplaqa Purificación del Extracto de *A. niger* ATCC 9142

4.4 Análisis Estructural de los Compuestos Aislados por Resonancia Magnética Nuclear

Se obtuvieron 3 compuestos etiquetados como **5c**, **6** y **8** que fueron enviados a resonancia magnética nuclear. Para el compuesto **8** se obtuvieron 2.6 mg, el espectro de $^1\text{HMRN}$ presenta dos dobles dobletes con una desplazamiento químico de 8.2 ppm y 7.7 ppm, con una $J= 15.6$ Hz, señales de protones de carbonos con dobles enlaces *trans*, característicos de chalconas. Este compuesto también presenta dos singuletes de grupos metoxilo a δ 3.6 ppm que integran para tres protones cada uno. En la región de aromáticos se encontraron 7 señales de protones, por lo que se infiere que es el sustrato inicial.¹⁸

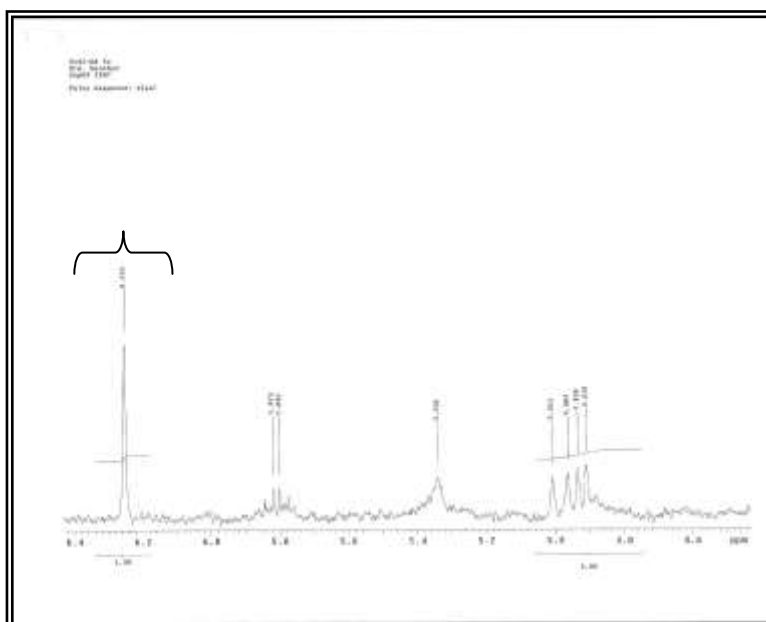
El resumen de las señales observadas se presenta a continuación:

δ 8.23 (1H, d, $J=15.6\text{Hz}$, H-3), 7.94 (1H, dd, $J=8/1.2\text{Hz}$, H-6'), 7.782 (1H, d, $J=15.6\text{Hz}$, H-2), 7.525 (1H, dt, $J=8/1.4\text{Hz}$, H-4'), 7.301 (1H, dd, $J=7.6\text{Hz}$, H-6''), 7.132 (1H, t, $J=8\text{Hz}$, H-5''), 6.946 (1H, dt, $J=8/1.4$, H-5').

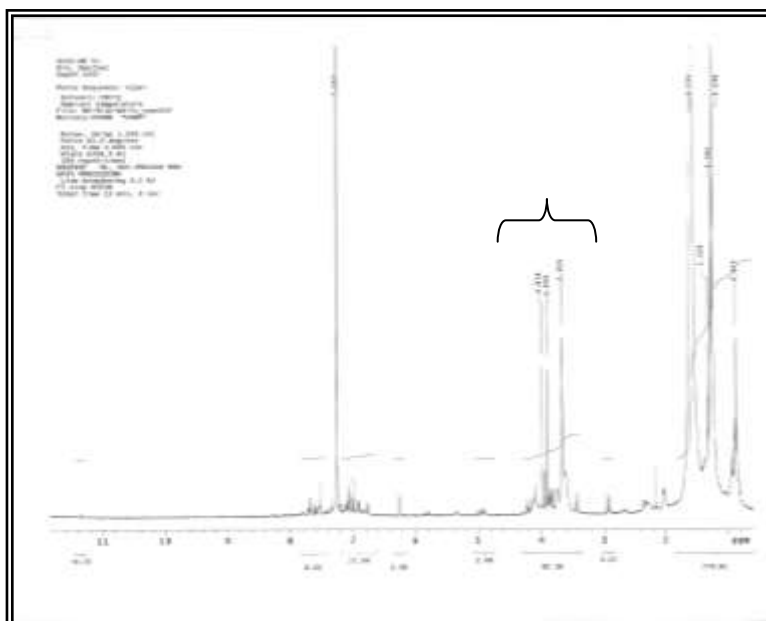
Se obtuvieron pequeñas cantidades de los compuestos **5c** y **6**, 0.6 mg y 4.4 mg, respectivamente. Además los compuestos no estaban puros por lo que se dificultó obtener un buen espectro de $^1\text{HRMN}$. Sin embargo, se pueden analizar algunas señales interesantes.

La Figura 12 muestra el espectro de $^1\text{HRMN}$ del compuesto **5c** mostró un singulete con un δ de 6.25 ppm característico de flavonas.¹⁹ En este espectro también se observan señales características de los grupos metoxilo, por lo que posiblemente se obtuvo una flavona metoxilada.

La fracción **6**, mostrada en la Figura 13, presentó un singulete en δ de 8.024 ppm, desplazamiento en el cual se obtiene señal de isoflavonas.³² En este compuesto también se obtuvieron señales de metoxilos por lo que se infiere que este es un producto de la chalcona original.



a) Singlete característico de flavonas



b) Señales características de grupos metoxilos

Figura 11. ¹HRMN de la fracción 5c

CAPÍTULO 5

5. DISCUSIÓN

Los microorganismos son capaces de imitar los procesos metabólicos de plantas, mamíferos e insectos gracias a la similitud en sus sistemas enzimáticos.¹⁶ El género *Aspergillus* ha mostrado características metabólicas que le confieren la capacidad de transformar flavonoides.

En este estudio se utilizaron tres especies de *Aspergillus* que anteriormente mostraron capacidad de transformar chalconas. De los microorganismos analizados *A. niger* mostró una alta capacidad de transformación de DMC en corto tiempo, por lo que fue seleccionado para realizar los estudios posteriores. Se produjeron en escala semipreparativa los metabolitos y se purificaron. La purificación y separación de los compuestos del extracto biotransformado por *A. niger* resultó un proceso complicado, posiblemente como consecuencia de una probable interacción entre el gel de sílice de las cromatoplacas y los compuestos del extracto, o bien por la degradación de éste a lo largo del proceso. Debido a que se tuvieron pequeñas cantidades de compuesto con bajo grado de pureza, la elucidación estructural fue complicada.

Los espectros de ¹HRMN indican que la fracción 8 contenía el sustrato original. Por lo que respecta a 5c y 6 se observó en las placas de cromatografía en capa fina que presentaban mayor polaridad que el sustrato original (*Rf* 0.42 y

0.74 de 5c y 6, respectivamente; la DMC tiene un *Rf* de 0.83). Por otra parte en la región de los aromáticos se aprecia en los dos espectros singuletes con diferentes desplazamientos. Estos singuletes indican la posible formación de flavonas e isoflavonas, a partir de DMC. No existen reportes acerca de este tipo de transformaciones microbianas. El género *Aspergillus* tiene la capacidad de sintetizar toxinas como las aflatoxinas y ocratoxinas, entre otras. En la síntesis de estos metabolitos participan complejos enzimáticos pertenecientes al grupo de las policétido sintasas. Estas enzimas catalizan la síntesis de la estructura básica de la toxina y posteriormente son hidroxiladas por una serie de monooxigenasas. Un mecanismo similar es el que siguen las plantas en la síntesis de flavonoides, por lo que probablemente los microorganismos reconozcan a los flavonoides como policétidos y los incorporen en sus vías metabólicas. Sin embargo es necesario proponer estudios para comprobar esta hipótesis.^{33,34}

Existen reportes en la literatura que indican que los flavonoides poseen actividad antibiótica.⁶⁻⁹ Nuestro extracto no logró inhibir el crecimiento de *E. coli* bajo las condiciones de experimentación utilizadas. En los ensayos de la bioautografía se obtuvieron mejores resultados, observando el efecto de inhibición del crecimiento de *S. typhimurium*. En general, los flavonoides son más reconocidos por su poder antioxidante que por su capacidad antibiótica. Posiblemente la naturaleza estructural de los compuestos del extracto no es la adecuada para una interacción con el microorganismo a fin de inhibir su crecimiento.

Por lo que respecta a la capacidad antioxidante, el extracto mostró un mayor poder secuestrante de radicales libres que el sustrato original. Sin embargo, al igual que el caso anterior, era necesario determinar qué compuestos eran los que poseían esta actividad. Se utilizó una técnica en la que el extracto fue resuelto utilizando placas de CCF. Después de rociar la placa con DPPH \cdot se observó que los compuestos presentes en el extracto con una polaridad mayor al sustrato presentaron mayor actividad antioxidante. La polaridad y la actividad antioxidante parecen estar relacionadas pues es conocido que las biotransformaciones microbianas ocasionan comúnmente la hidroxilación de moléculas.¹⁸ Este fenómeno aumenta la polaridad de los metabolitos y su capacidad de estabilizar especies de oxígeno reactivas, siguiendo la siguiente ecuación:



El conjunto de resultados obtenidos confieren un buen pronóstico a estos flavonoides, posicionándolos como candidatos para un estudio posterior.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES

El género *Aspergillus* tiene vías metabólicas capaces de imitar el metabolismo de plantas en la transformación de flavonoides.

Aspergillus niger fue capaz de transformar a DMC con alta reproducibilidad y alto rendimiento.

El extracto biotransformado por *A. niger* no presentó actividad antibiótica contra *E. coli*; sin embargo en los ensayos con *S. typhimurium* se observó una inhibición de crecimiento de éste patógeno en presencia del extracto.

Los compuestos que conforman el extracto biotransformado por *A. niger* poseen mayor actividad antioxidante que el sustrato, probablemente debido al aumento de polaridad consecuencia de la biotransformación por *A. niger*.

Estos resultados, además de los que ya se han reportado en literatura, perfilan a los compuestos del extracto biotransformado por *A. niger* ATCC 9142 como agentes de alto valor e importancia en el campo farmacéutico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yan, Y.; Kohli A.; Koffas, MA; **Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae***. Appl. and Environ. Microbiol. (2005) 71; 5610–5613
2. Dixon, R.; Steele, C.; **Flavonoids and isoflavonoids: a gold mine for Metabolic Engineering**. Trends Plant Sci. (1999) 4; 394 – 400
3. Palazón, J.; Cusidó, RM.; Morales, C.; **Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino**, Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona; (2001)
4. Tsukasa I.; **The structure and distribution of flavonoids in plants**. J. of Plant Res. (2000) 113; 287 - 299
5. Das, S.; Rosazza, JPN; **Microbial and enzymatic transformations of flavonoids**. J. Nat. Prod. (2006) 69; 499 – 508
6. Batt, DG.; et-al.; **2'-Substituted chalcone derivatives as inhibitors of interleukin-1 biosynthesis**. J Med. Chem. (1993) 36; 1434-1442
7. Blanco, SE.; **Transformación microbiológica de flavonoides. I. Derivados de flavanona**. Rev. Lat-amer. Microbiol. (1988) 30; 369-374
8. Dimmock, JR.; et-al. **Bioactivities of chalcones**. Current Medicinal Chemistry (1999) 6; 1125-1149
9. Oomah, BD.; Mazza, G.; **Flavonoids and antioxidative activities in Buckwheat**. J. Agric. Food Chem. (1996) 44, 1746-1750
10. Pietta, PG.; **Flavonoids as antioxidants**. J. Nat. Prod. (2000) 63; 1035 – 1042
11. Davies, KJ.; **Free radicals and oxidative stress: environment, drugs and food additives**. Biochemical Society Symposia (1995) 61, 1-31.
12. De Vries, R.; Visser, J.; ***Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides**. Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2001) 65; 497-522

13. Carrillo, L.; **Los hongos de los alimentos y forrajes**. Universidad Nacional de Salta. Capítulo 4, pp. 44-60
14. Foster, JW. **Chemical activities of fungi**. (1949) Academic Press, Inc., New York.
15. Bartnicki-Garcia, S. **Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny**. Phytochemical phylogeny. Ed. J.B. Harborne. Academic, London. (1970) 81-103.
16. Smith RV, Rosazza JPN. **Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation**. Arch Biochem Biophys. (1974) Apr 2;161(2):551-558.
17. Sánchez-González, M.; Rosazza, JPN.; **Biocatalytic synthesis of butein and sulfurentin by *Aspergillus alliaceus***. J. Agric. Food Chem. (2006) Jun 28;54(13):4646-50.
18. Sánchez-González, M.; Rosazza, JPN.; **Microbial transformations of chalcones: hydroxylation, O-demethylation, and cyclization to flavanones**. J. Nat. Prod. (2004) 67; 553-558
19. Ibrahim, AR.; Abul-Hajj, YJ.; **Microbiological transformation of (\pm) flavanone and (\pm) isoflavanone**. J. Nat. Prod. (1990) 53; 644-656.
20. Ibrahim, AR.; Abul-Hajj, YJ.; **Microbiological transformation of chromone, chromanone, and ring A hydroxyflavones**. J. Nat. Prod. (1990) 53; 1471-1478.
21. http://www.advancedbiosciences.com/AmberliteXAD_download.htm
(visitada en Febrero 13, 2008)
22. Abburi K.; **Adsorption of phenol and p-chlorophenol from their single and bisolute aqueous solutions on Amberlite XAD-16 resin**. Journal of Hazardous Materials. (2003) B105: 143-156.
23. Funa, N.; et-al.; **A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms**. Nature (1999) 400; 897-899
24. Moore, BS.; et-al.; **Plant-like biosynthetic pathways in bacteria: from benzoic acid to chalcone**. J. Nat. Prod. (2002)65, 1956-1962
25. Williamson, J.; et-al.; **Microbiological hydroxylation of estradiol: formation of 2- and 4-hydroxyestradiol by *Aspergillus alliaceus***. Appl. Environ. Microbiol. (1985) 49; 563-567

26. Peter, H.; Jung, R.; Bolt, HM.; Oesch, F.; **Norethisterone-4 β ,5-oxide and laevonorgestrel-4 β ,5-oxide: formation in rat liver microsomal incubations and interference with microsomal epoxide hydrolase and cytoplasmic glutathione S-transferase.** Steroid Biochem. (1981) 14; 83-90
27. Brand-Williams, W.; Cuvelier, ME.; Berset, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** Lebensm.-Wiss.-Technol. (1995) 28, 25-30.
28. Takamatsu, S.; et-al. **Marine natural products as novel antioxidants prototypes.** J. Nat. Prod. (2003) 66, 605-608
29. Zhu, X.; Zhang, H.; Lo, R.; **Phenolic compounds from the Leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities.** J. Agric. Food Chem. (2004), 52; 72727-7278
30. Rios, JL; Recio, MC; Villar, A.; **Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature.** J. Ethnopharmacol.; (1988) 23, 127-149
31. Scordino, M.; et-al; **Adsorption of Flavonoids on Resins: Hesperidin,** J. Agric. Food Chem. (2003) 51, 6998-7004
32. Abdel- Rahim, S.; Ibrahim y Yusuf J. AH; **Microbial transformation of flavone and isoflavone.** Xenobiotica, (1990) 20, 363-373.
33. Feng, GH; Leonard, TJ; **Characterization of the polyketide synthase gene (*pksL1*) required for aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*.** Journal of Bacteriology (1995) 117: 21, 6246-6254
34. Varga, J.; et-al; **Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus species*.** Research in Microbiology (2003) 154:8, 593-600.
35. Korkina LG, Afanas'ev IB. **Antioxidant and chelating properties of flavonoids.** Adv Pharmacol (1997) 38, 151-63.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Judith Carolina Clark Garza

Candidata para el Grado de
Maestra en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: ANÁLISIS DEL POTENCIAL DEL GÉNERO *Aspergillus* EN LA
TRANSFORMACIÓN DE FLAVONOIDES

Campo de estudios: Biotecnología Farmacéutica.

Biografía: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 6 de mayo de 1982, hija de
Gustavo Carlos Clark Gómez e Hilda Graciela Garza Villarreal.

Educación: Egresada de Químico Farmacéutico Biólogo en diciembre del 2004,
de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.