

**BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS SUSTRATOS CINAMALDEHÍDO Y ÁCIDO (±)-2,4-
ISOBUTILFENILPROPANÓICO MEDIANTE EL HONGO FITOPATÓGENO
*Colletotrichum acutatum***

**TESIS DE MAESTRÍA
YANED MILENA CORREA NAVARRO**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE QUÍMICA
MEDELLÍN
JUNIO DE 2009**

**BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS SUSTRATOS CINAMALDEHÍDO Y ÁCIDO (±)-2,4-
ISOBUTILFENILPROPANÓICO MEDIANTE EL HONGO FITOPATÓGENO
*Colletotrichum acutatum***

**TESIS DE MAESTRÍA
YANED MILENA CORREA NAVARRO**

DIRECTOR: CARLOS MARIO GARCÍA PAJÓN, QUÍMICO, M.SC., PH.D.

ASESOR: DIEGO LUÍS DURANGO RESTREPO, QUÍMICO, M.SC.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE QUÍMICA

MEDELLÍN

JUNIO DE 2009

AGRADECIMIENTOS

A Carlos Mario y Diego, por permitirme ser parte del grupo y por entregarme su conocimiento facilitando el desarrollo de esta investigación.

Al profesor Jair por su paciencia y apoyo para la culminación de este trabajo.

A Nancy por hacer mas divertido el día a día en el laboratorio.

A la Dirección Nacional de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, por el apoyo económico (proyecto de investigación 20101007068a).

A Jaime y Oscar porque me dieron a conocer el mundo apasionante de los productos naturales, por su contribución permanente y por creer en mí. A ellos toda mi admiración por su inconmensurable interés por el conocimiento y su generosa colaboración.

A mi familia, porque aun sin saber que es lo que hago, me creen “lo máximo”, puesto que ninguno de ellos trabajan en Ciencias.

A mi madre porque construyó lo que soy, porque me ha apoyado y animado siempre a dar un paso mas, millardos de gracias, mami.

Finalmente, no se puede saber que va ha ser lo mejor de los cambios y en estos dos años la vida me ha dado la dicha de “crecer” al lado de personas maravillosas. Gracias a Pili y a Lady por ESTAR siempre a mi lado, por soportarme, por enseñarme, por mantenerse firmes y hacer mí transitar en esta ciudad mucho más fácil, a ellas, el número de Avogrado en GRACIAS. Ah!! Y en contra de muchos pronósticos, gracias Lady por aguantarme las 24 horas del día, no se puede creer que haya tenido tan inmejorable compañía, y lo mejor, no solo fue cantidad sino calidad. Que maravilloso es saberse inscrito en el corazón de otro.

CONTENIDO

	Pág
CONTENIDO	4
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ANEXOS	12
ABREVIATURAS	14
RESUMEN GRÁFICO	15
GRAPHICAL ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GENERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
3. MARCO CONCEPTUAL	22
3.1 ASPECTOS GENERALES DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN	22
3.2 GENERALIDADES DEL <i>trans</i> -CINAMALDEHÍDO	24
3.3 GENERALIDADES DEL ÁCIDO (±)-2,4-ISOBUTILFENILPROPANÓICO (IBUPROFENO)	29
3.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ESPECIES DE <i>Colletotrichum</i>	31
3.5 BIOTRANSFORMACIONES CON ESPECIES DEL HONGO FILAMENTOSO FITOPATÓGENO <i>Colletotrichum</i>	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS	45
4.1 ESPECIFICACIONES GENERALES DE LOS MATERIALES Y LOS EQUIPOS	45
4.2 MICROORGANISMO	46

4.3	PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	46
4.4	CRECIMIENTO DEL HONGO EN PDA	46
4.5	BIOENSAYO DE TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS <i>trans</i> -CINAMALDEHÍDO E IBUPROFENO FRENTE AL HONGO FILAMENTOSO FITOPATÓGENO <i>C. acutatum</i>	47
4.6	PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN	48
4.6.1	Obtención del inóculo	48
4.6.2	Biotransformación	49
4.7	OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS	49
4.8	PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS MAYORITARIOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN	50
4.9	IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS	50
4.10	SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN	51
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
5.1	ASPECTOS GENERALES	53
5.2	EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS SUSTRATOS	53
5.3	BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS SUSTRATOS <i>trans</i> -CINAMALDEHÍDO (A) E IBUPROFENO (F)	57
5.4	EXTRACCIÓN DE METABOLITOS PRODUCTO DE LA BIOTRANSFORMACIÓN	58
5.5	PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS MAYORITARIOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL <i>trans</i> -CINAMALDEHÍDO (A)	58
5.6	ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS METABOLITOS OBTENIDOS EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL <i>trans</i> -CINAMALDEHÍDO (A)	59
	Compuesto C-E-2-2	59
	Compuesto C-E-5-2-1	61
	Compuesto C-E-6-3-2-1	63

5.7 SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN DEL <i>trans</i> -CINAMALDEHÍDO (A)	66
5.8 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS MAYORITARIOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL IBUPROFENO	72
5.9 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS DEL METABOLITO OBTENIDO EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL IBUPROFENO (F)	73
5.10 AVANCE DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL IBUPROFENO (F)	76
6. CONCLUSIONES	80
8. ANEXOS	97

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Biotransformaciones de arilpropanoides con diferentes organismos	26
Tabla 2. Peso de los extractos obtenidos en las biotransformaciones	58
Tabla 3. Desplazamiento químico (δ ppm) multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento (j Hz) de RMN ^1H y ^{13}C del producto de la biotransformación C-E-2-2	60
Tabla 4. Desplazamiento químico (δ ppm) multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento (j Hz) de RMN ^1H y ^{13}C del producto de la biotransformación C-E-5-2-1	62
Tabla 5. Desplazamiento químico (δ ppm) multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento (j Hz) de RMN ^1H y ^{13}C del producto de la biotransformación C-E-6-3-2-1	64
Tabla 6. Desplazamiento químico (δ ppm) multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento (j Hz) de RMN ^1H y ^{13}C del producto de la biotransformación 1I-2-3-3	74

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Estructura del cinamaldehído	24
Figura 2. Enolización del (<i>R</i>)-ibuprofeno y obtención del (<i>S</i>)-ibuprofeno (Clayden <i>et al.</i> , 2001)	29
Figura 3. Ibuprofeno y los metabolitos aislados productos de la biotransformación con <i>Nocardia</i> sp (Chen and Rosazza, 1994)	30
Figura 4. Resolución de una mezcla racémica de ibuprofeno mediante el empleo de lipasas (Cárdenas <i>et al.</i> , 2001)	31
Fig. 5. Fotografía de cultivos de <i>C. acutatum sensu</i> Simmonds (Peres <i>et al.</i> , 2005)	33
Figura 6. Hidroxilaciones de 3 β -hidroxi-5-androsteno-17-ona (1) y 15 β ,16 β -metilen-deidroepiandrosterona (2) por <i>C. lini</i> (Romano <i>et al.</i> , 2006)	35
Figura 7. Biotransformación de el ácido betulínico (6) y el ácido betulínico (7) por <i>G. gloeosporioides</i> (Bastos <i>et al.</i> , 2007)	36
Figura 8. Biotransformación de cicloartenol (10), 24-metilencicloartanol (11), y cicloartenona (12) por <i>G. fusarioides</i> (Akihisa <i>et al.</i> , 2006)	37
Figura 9. Biotransformación de (\pm)-1-(4'-clorofenil)-2-feniletanol (24) por <i>G. gloeosporioides</i> (Bustillo <i>et al.</i> , 2003)	39

Figura 10. Biotransformación de widrol por <i>C. gloeosporioides</i> (Ortiz <i>et al.</i> , 2006)	39
Figura 11. Biotransformación de isosteviol (37) por <i>G.cingulata</i> (Akihisa <i>et al.</i> , 2004)	40
Figura 12. Biotransformación de (+)-cicloisolongifolol (39) por <i>G. cingulata</i> (Miyazawa y Sakata 2007)	40
Figura 13. Biotransformación de ditigolato de daidzeina (41) por <i>G.cingulata</i> (Miyazawa <i>et al.</i> , 2006)	41
Figura 14. Biotransformación de (+)- α -Bulnesena (43) por <i>G.cingulata</i> (Miyazawa y Sugawara, 2005)	41
Figura 15. Biotransformación de la cumarina (45) y la 6-metilcumarina (46) por <i>C. capsici</i> (Krishna <i>et al.</i> , 2004)	42
Figura 16. Biotransformación del 2-feniletanol (49) con <i>C. acutatum</i>	42
Figura 17. Biotransformación de la acetofenona (53) <i>C. acutatum</i> (Aristizábal <i>et al.</i> , 2008)	43
Figura 18. Biotransformación de THD (57) por <i>G. cingulata</i> (Borges <i>et al.</i> , 2008)	44
Figura 19. a) Fotografía de una colonia de <i>C. acutatum</i> en crecimiento sobre PDA y b) sub-cultivo del hongo en el medio líquido Czapeck-Dox	53
Figura 20. Diagrama de actividad antifúngica <i>in-vitro</i> del ibuprofeno (F) sobre el crecimiento de <i>C. acutatum</i>	54
Figura 21. Diagrama de actividad antifúngica <i>in-vitro</i> del <i>trans</i> -cinamaldehído sobre el crecimiento de <i>C. acutatum</i>	54

Figura 22. Porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio de <i>C. acutatum</i> causado por el ibuprofeno (F)	56
Figura 23. Porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio de <i>C. acutatum</i>	57
Figura 24. Diagrama de purificación del extracto C-AcOEt-1 para la obtención de los productos de la biotransformación del <i>trans</i> -cinamaldehído (A)	59
Figura 25. Estructura del 3-fenilpropanol (C)	61
Figura 26. Estructura del alcohol cinámico (B)	63
Figura 27. Estructura del 3-fenil-1,3-propanodiol (E)	65
Figura 28. Cromatograma de los muestreos de la biotransformación del <i>trans</i> -cinamaldehído (A), con <i>C. acutatum</i> . Visualizada con a) luz U.V 365 nm y b) H ₂ SO ₄ /EtOH	67
Figura 29. Cromatograma de los metabolitos aislados de la biotransformación con <i>C. acutatum</i> del <i>trans</i> -cinamaldehído (A). Visualizada con a) luz U.V 365 nm y b) revelador universal	68
Figura 30. Cromatograma de gases (CG) del muestreo del segundo día de la biotransformación del <i>trans</i> -cinamaldehído (A) con <i>C. acutatum</i>	62
Figura 31. Cromatograma de gases (CG) del muestreo del décimo día de la biotransformación del <i>trans</i> -cinamaldehído (A) con <i>C. acutatum</i>	69
Figura 32. Avance de la biotransformación del <i>trans</i> -cinamaldehído (A) por <i>C. acutatum</i> en el tiempo	70
Figura 33. Ruta metabólica hipotética planteada para la biotransformación del <i>trans</i> -cinamaldehído (A) por <i>C. acutatum</i>	71

Figura 34. Diagrama de purificación de los productos de la biotransformación del ibuprofeno (F)	73
Figura 35. Metabolito aislado en la biotransformación del ibuprofeno (F)	76
Figura 36. cromatograma de los muestreos de la biotransformación del ibuprofeno (F) con <i>C. acutatum</i> . Revelada con a) luz U.V 310 nm y b) revelador universal	77
Figura 37. Cromatograma de gases del muestreo del día 2 de la biotransformación del ibuprofeno (F) con <i>C. acutatum</i>	77
Figura 38. Cromatograma de gases del muestreo del día 16 de la biotransformación del ibuprofeno (F) con <i>C. acutatum</i>	78
Figura 39. Avance de la biotransformación del ibuprofeno (F) por <i>C. acutatum</i> en el tiempo	79
Figura 40. Productos obtenidos en la biotransformación del <i>trans</i> -cinamaldehído (A) con <i>C. acutatum</i>	80
Figura 40. Productos obtenidos en la biotransformación del ibuprofeno (F) con <i>C. acutatum</i>	81

LISTA DE ANEXOS

	Pág
Espectro de infrarrojo del 3-fenilpropanol	98
Espectro de RMN ¹ H del 3-fenilpropanol (CDCl ₃ -200MHz)	98
Espectro J-mod RMN del 3-fenilpropanol (CDCl ₃ -200MHz)	99
Espectro de masas del 3-fenilpropanol	99
Espectro de infrarrojo del alcohol cinamílico	100
Espectro RMN ¹ H del alcohol cinamílico (CDCl ₃ -200MHz)	100
Espectro J-mod RMN del alcohol cinamílico (CDCl ₃ -200MHz)	101
Espectro de masas del alcohol cinamílico	101
Espectro de infrarrojo del 3-fenil-1,3-propanodiol	102
Espectro RMN ¹ H del 3-fenil-1,3-propanodiol (CDCl ₃ -200MHz)	102
Espectro J-mod RMN del 3-fenil-1,3-propanodiol (CDCl ₃ -200MHz)	103
Espectro de masas del 3-fenil-1,3-propanodiol	103
Espectro de infrarrojo del ácido-(2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico	104
Espectro RMN ¹ H del ácido-(2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico (CDCl ₃ -200MHz)	104
Espectro J-mod del ácido-(2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico(CDCl ₃ -200MHz)	105
Espectro de masas del ácido-(2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico sililado	105
Tabla de resultados del bioensayo de toxicidad del <i>trans</i> -cinamaldehído	106

frente al hongo filamentoso fitopatógeno *C. acutatum*

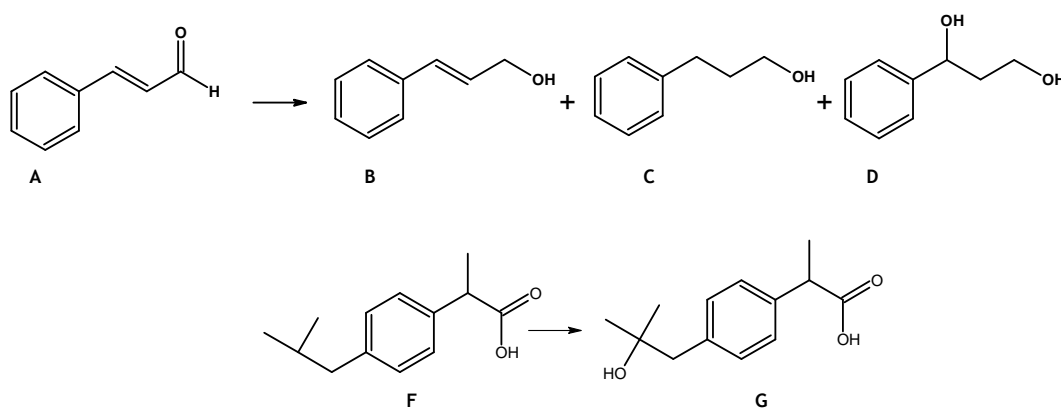
Tabla de resultados del bioensayo de toxicidad del ibuprofeno frente al hongo filamentoso fitopatógeno *C. acutatum* 109

ABREVIATURAS

AcOEt= Acetato de etilo
CH₂Cl₂= Diclorometano
CHCl₃= Cloroformo
CC= Cromatografía de columna
CCF= Cromatografía en capa fina
CCFP= Cromatografía de capa fina preparativa
CG-EM= Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de Masas
EP= Eter de petróleo 40-60 °C
HPLC= Cromatografía líquida de alta eficiencia
Hz= Hertz
IEI Impacto electrónico
IR= Espectroscopia de infrarrojo
J-mod= J-modulación
MeOH= Metanol
Me₂CO = Acetona
PDA= Agar papa dextrosa
RMN ¹H= Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³C= Resonancia magnética nuclear de carbono 13
δ ppm= desplazamiento químico en partes por millón

RESUMEN GRÁFICO

La biotransformación de los sustratos orgánicos aromáticos alquil sustituidos, *trans*-cinamaldehído y el ácido (\pm)-2,4-isobutilfenilpropanóico (ibuprofeno), mediante el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*, se realizó empleando la concentración mínima a la cual estos compuestos presentan una inhibición en el crecimiento micelar del 50% (MIC₅₀); los valores obtenidos corresponden a 200 mg/L para el *trans*-cinamaldehído y 250 mg/L para el ibuprofeno. A partir del *trans*-cinamaldehído (A) se obtuvieron los metabolitos alcohol cinámico (B), 3-fenil-1-propanol (C), y el 3-fenil-1,3-propanodiol (D) y desde el ibuprofeno (F) el ácido-2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico (G).



Productos obtenidos en la biotransformación del *trans*-cinamaldehído (A) y el ibuprofeno (F) con *C. acutatum*

El seguimiento del proceso de biotransformación se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas CG-EM; con la información obtenida se construyeron las correspondientes curvas del progreso de la reacción. Se estableció que el ibuprofeno fue metabolizado mayoritariamente hasta el ácido-2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico y para el *trans*-cinamaldehído se determinó que el metabolito mayoritario fue el 3-

fenil-1-propanol; en este trabajo se propone una posible ruta metabólica para la formación de este compuesto.

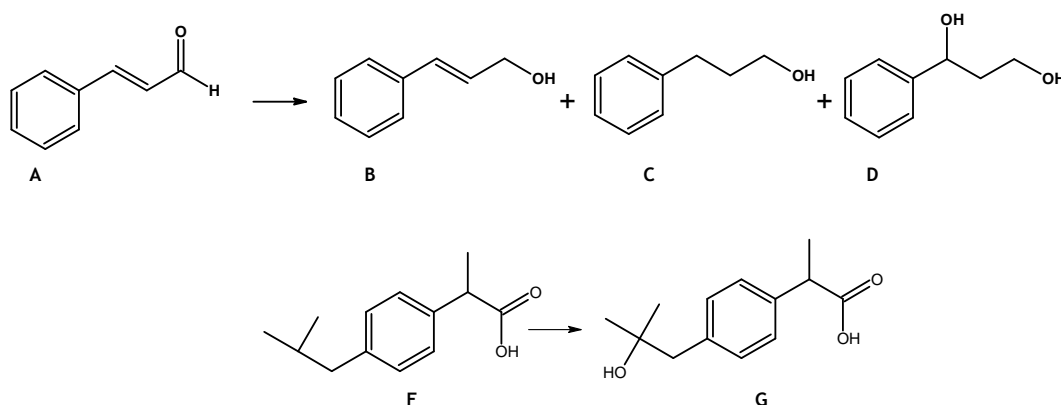
Con este estudio se determinó la capacidad del hongo fitopatógeno para reducir el grupo carbonilo y el doble enlace así como también para realizar hidroxilaciones sobre el sustituyente alquílico unido al anillo aromático.

PALABRAS CLAVE

Arilpropanoides, aceites esenciales, ácido 2-fenilpropiónico, biotecnología, productos naturales.

GRAPHICAL ABSTRACT

The biotransformation of alkyl substituted aromatic substrates, such as *trans*-cinnamaldehyde and (\pm)-2,4-isobutylphenylpropanoic acid (ibuprofen) by the phytopathogen fungus *Colletotrichum acutatum* was performed by using the minimum concentration at which these compounds inhibit the mycelial growth on 50% (MIC_{50}); the values obtained were 200 mg/L for *trans*-cinnamaldehyde and 250 mg/L for ibuprofen. From *trans*-cinnamaldehyde (A) were obtained after biotransformation cinnamyl alcohol (B), 3-phenyl-1-propanol (C) and 3-phenyl-1,3-propanediol (D); while, from ibuprofen (F) was isolated 2-[4-(2-hydroxy-2-methyl propyl)phenyl] propanoic acid (G).



Products obtained by the biotransformation of the *trans*-cinnamaldehyde (A) and the ibuprofen (F) with *C. acutatum*

The biotransformation process was monitored by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and with the data obtained were constructed curves to followed the progress of these reactions. It was found that *trans*-cinnamaldehyde and ibuprofen were mainly biotransformed to 3-phenyl-1-propanol and 2-[4-(hydroxy-2-methyl propyl)phenyl] propanoic acid, respectively. In addition, in this paper it was hypothesized a possible metabolic route for the biotransformation of this compound.

With this study we determined the capability of this phytopathogenic fungus to reduce the carbonyl group and the double bond C=C, as well as the hydroxylation of the alkyl substituent attached to the aromatic ring.

KEY WORDS: Arylpropanoids, bioconversion, essentials oils, 2-phenylpropionic acid, natural products.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las biotransformaciones se han estudiado extensivamente porque son consideradas importantes para modificar compuestos orgánicos de bajo costo y obtener productos con alto valor agregado, los cuales en muchos casos son difíciles de obtener de fuentes naturales o por medios sintéticos. Mediante el empleo de esta técnica, se ha logrado introducir y optimizar un gran número de reacciones para ser empleadas en la síntesis de moléculas quirales de importancia en la industria farmacéutica (Luna, 2004; Sharma *et al.*, 2005), de cosméticos (Veit, 2004), agroquímicos y de materiales especializados, entre otras (Liu *et al.*, 2004).

Las biotransformaciones se caracterizan por la versatilidad, la eficiencia, la regioselectividad, la quimioselectividad y la enantioselectividad de los procesos enzimáticos implicados (Shaw *et al.*, 2003); además, el metabolismo de los sustratos sometidos a biotransformación, ocurre bajo condiciones suaves y con bajo consumo de energía; los reactivos y solventes 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 (Davies, 2007).

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. A nivel internacional se han utilizado pocas especies del género *Colletotrichum* (hongo causante de la antracnosis) para realizar biotransformaciones, estos estudios indican que las reacciones metabólicas más frecuentes de estos hongos son las reducciones de dobles enlaces C-C, de compuestos carbonílos, así como las

hidroxilaciones; estos procesos son en la gran mayoría de los casos estereoselectivos (García *et al.*, 2003).

En Colombia las especies de estos patógenos se han estudiado desde el punto de vista fitosanitario en la búsqueda de estrategias de control en los cultivos donde ellos son hospederos; desconociendo su potencialidad para efectuar biotransformaciones.

Estudios preliminares llevados a cabo por el Grupo de Productos Naturales y los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, han demostrado que *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloesporioides* poseen capacidad alta para modificar sistemas aromáticos y/o sus sustituyentes alquílicos (Aristizábal *et al.*, 2008). Estas reacciones pueden ser aprovechadas con el fin de obtener productos con actividad biológica potenciada o precursores sintéticos con alto valor agregado.

Los sustratos orgánicos aromáticos *trans*-cinamaldehído (A) y el ácido (±)-2,4-isobutilfenilpropanóico (ibuprofeno) (F) (figura 1), son compuestos de bajo costo comercial, con alta disponibilidad y con similitud estructural (moléculas alquil sustituidas), las cuales no son entidades importantes desde el punto de vista sintético, con las cuales se logró ampliar el conocimiento de las modificaciones estructurales llevadas a cabo por *C. acutatum* sobre compuestos del tipo arenos, permitiendo acumular información del poder biotransformador de este fitopatógeno, que ayudará en la mejor implementación de este sistema para la búsqueda de productos con potencial comercial en diferentes campos de la industria.

Los compuestos mayoritarios se aislaron mediante técnicas cromatográficas y se caracterizaron mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos (IR, RMN ¹H y ¹³C, MS), en este estudio también se determinó la variación porcentual de los sustratos y los productos formados mayoritariamente en el tiempo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Realizar las biotransformaciones de los sustratos *trans*-cinamaldehído y del ácido (\pm)-2,4-isobutilfenilpropanóico (ibuprofeno) mediante el hongo filamentoso *Colletotrichum acutatum*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Aislar y purificar mediante el empleo de diferentes técnicas cromatográficas, los productos mayoritarios de las biotransformaciones de los sustratos ácido (\pm)-2,4-isobutilfenilpropanóico (ibuprofeno) y *trans*-cinamaldehído.
- ❖ Identificar los productos de las biotransformaciones de los sustratos ibuprofeno y *trans*-cinamaldehído realizadas por el hongo filamentoso fitopatógeno *C. acutatum*, utilizando las técnicas modernas de espectroscopia y espectrometría.
- ❖ Realizar un acercamiento al estudio de la cinética del proceso de biotransformación de los sustratos *trans*-cinamaldehído e ibuprofeno empleando las técnicas de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o de gases-espectrometría de masas (GC-EM).

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1 ASPECTOS GENERALES DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN

La dinámica enzimática de los sistemas biológicos ha sido explotada por los seres humanos desde épocas muy remotas para la obtención de compuestos o materiales importantes, la Biblia hace alusión a la elaboración del vino y el vinagre y aunque no describe detalladamente el proceso de su obtención, si hace referencia tácita a las metodologías de su elaboración; igualmente la aplicación de levaduras para la elaboración de pan y quesos fermentados provienen de épocas muy antiguas. En las últimas décadas los desarrollos industriales y la necesidad de nuevos materiales con aplicaciones novedosas han potencializado el resurgimiento de algunas técnicas biotecnológicas ya conocidas y el desarrollo de otras mas elaboradas que son consideradas como alternativas importantes de investigación, ya que posibilitan la obtención de un gran numero de materiales especializados (Davies, 2007; Serra *et al.*, 2005; Boaventura *et al.*, 2004).

Los procesos de biotransformación se definen como la utilización de sistemas biológicos completos (organismos superiores, microorganismos, plantas, algas etc.) o sus partes (órganos, enzimas o células) para realizar modificaciones estructurales sobre compuestos exógenos (Borges *et al.*, 2008). En todos los casos, las reacciones son llevadas a cabo por enzimas (Bastos, 2005); sin embargo, las enzimas puras son escasas y tienen un alto valor económico, por lo 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 (Borges *et al.*, 2008).

Según Hanson (1995), los procesos de biotransformación al ser comparados con los métodos clásicos de la química presentan varias ventajas frente 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 moderadas.
- ❖ 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 mas directa que en los procesos químicos análogos.
- ❖ Las reacciones generalmente ocurren bajo condiciones menos contaminantes para el ambiente.

La aplicación mas 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 (Schmid *et al.*, 2001; Burton *et al.*, 2002; Schoemaker *et al.*, 2003).

La principal desventaja de las biotransformaciones que utilizan sistemas completos radica en que el proceso puede ser impredecible debido a la participación simultanea de la mezcla heterogénea de enzimas que pueden encontrarse, además muchos procesos de biotransformación no están completamente esclarecidos (Verrall y Warr, 1998) y aunque en los últimos 15 años se ha acumulado una gran cantidad de información respecto a las posibilidades tecnológicas que ofrecen muchos organismos no se ha logrado

racionalizar adecuadamente el comportamiento a nivel del género. Adicionalmente, existen muchas reacciones químicas para las cuales no existe, o se desconoce una biotransformación equivalente. Sin embargo, con el conocimiento de las modificaciones generales que un organismo puede realizar frente a un sustrato determinado, es posible predecir el tipo de reacción que se llevará a cabo en compuestos que posean similitud estructural (Verrall y Warr, 1998).

3.2 GENERALIDADES DEL *trans*-CINAMALDEHÍDO

El cinamaldehído (figura 1) es el mayor constituyente del aceite esencial de la canela obtenida de la corteza de los árboles del género *Cinnamomun*, familia Lauraceae (Cheng *et al.*, 2008; Yen and Chang, 2008). Este aldehído es un compuesto aromático clasificado dentro de los arilpropanoides, ampliamente usado en perfumería, en las industrias alimenticia y farmacéutica (Singh *et al.*, 2007).

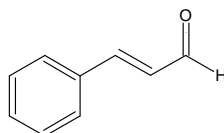


Figura 1. Estructura del cinamaldehído

Los aceites esenciales obtenidos de las especies del género *Cinnamomun* y los metabolitos puros presentan actividades biológicas; para el cinamaldehído se ha reportado actividad antibacteriana (Singh *et al.*, 2007), antifúngica (Yen and Chang, 2008; Singh *et al.*, 2007; Tung *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005), antioxidante (Singh *et al.*, 2007), y tiene efecto hipoglucémico e hipolipidémico (Babu *et al.*, 2007; Lee, 2002), entre otras.

La baja toxicidad relativa para los mamíferos y las propiedades múltiples de los aceites esenciales, han permitido que muchos de estos metabolitos sean

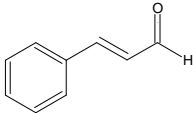
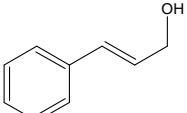
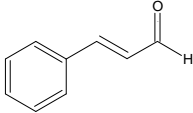
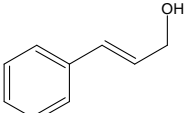
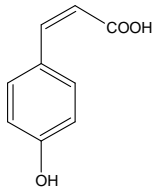
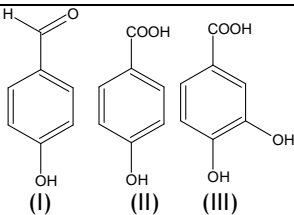
aceptados para su uso en comestibles; en Estados Unidos el cinamaldehído está aprobado por la Food Drug Administration (FDA) como un saborizante seguro. También está incluido en la lista Council Europa de sustancias que pueden ser empleadas como alimentos (Council of Europa, 2000) y la junta internacional FAO/WHO (Joint Expert Committee on Food Additives JECFA, 2000) reportaron que este material no tiene riesgos al ser consumido como saborizante en alimentos.

Rodríguez *et al.*, (2007), reportaron la potencialidad de este sustrato al ser impregnado sobre el papel utilizado en el empaquetamiento de frutos, para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias, que actúan como patógenos en los procesos de poscosecha de frutas; en los ensayos realizados se observó la inhibición completa del crecimiento de *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* y *Eurotium repens* y disminución de *Penicillium nalgiovense* y *Penicillium roqueforti*; también es activo frente a las bacterias Gram-negativas *Salmonella cholerasuis*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Pseudomonas aeruginosa*. En Sri Lanka fue sugerido como un compuesto que puede ser impregnado en el papel utilizado para empacar Rambutan, una fruta tropical de este país, y controlar el crecimiento de *Botryodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Gliocephalotrichum microchlamydosporum*, hongos que causan la pérdida en post-cosecha de este producto (Sivakumar *et al.*, 2002); también inhibió el crecimiento de *Pseudomonas putida* en camarones precocidos al ser usado en simultaneidad con rayos gamma (Ouattara *et al.*, 2001), y presentó una alta efectividad al ser fumigado en aire caliente a 50°C para el control de seis serotipos de *Salmonella* en semillas de alfafa (Weissinger *et al.*, 2001).

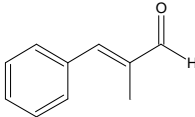
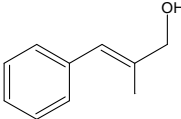
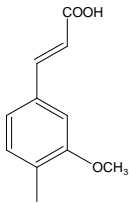
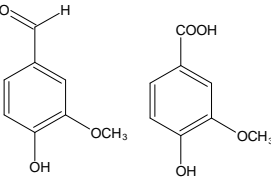
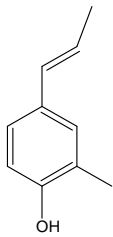
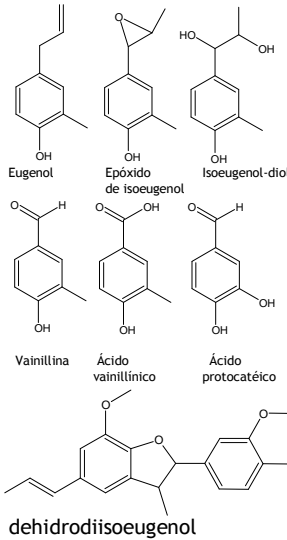
En términos generales, los arilpropanoides presentan una gran demanda industrial debido a sus comportamientos biológicos y a las posibilidades tecnológicas que ofrecen sus derivados obtenidos mediante modificaciones estructurales; en el contexto comercial los productos obtenidos mediante transformaciones microbiológicas son considerados naturales (Xu *et al.*, 2007) y

este calificativo es un factor importante en el caso de los arilpropanoides, debido a que pueden ser modificados por vía metabólica o enzimática sin perder dicha categoría, esto hace que esta tecnología biológica se presente como una ruta importante para la producción a gran escala de derivados de estas moléculas. En la tabla 1, se presentan algunas biotransformaciones de arilpropanoides, realizadas por microorganismos o cultivos celulares de plantas.

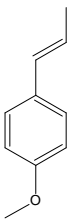
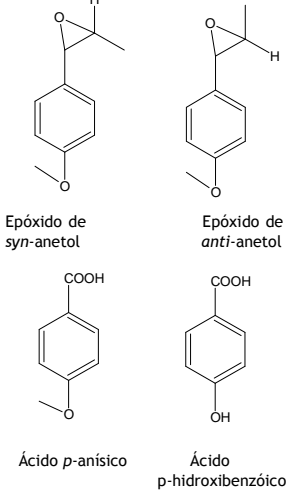
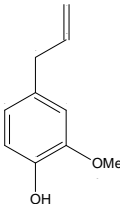
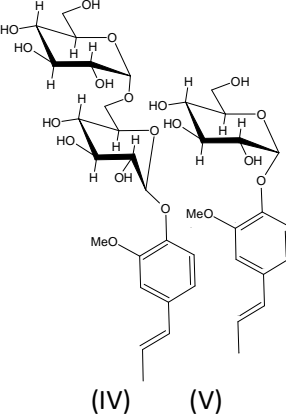
Tabla 1. Biotransformaciones de arilpropanoides con diferentes organismos

Sustrato	Organismo empleado	Productos de la biotransformación	Tipo de reacción	Referencia
 Cinaldehído	<i>Manihot esculenta</i> y <i>Manihot dulcis</i>	 Alcohol cinámico	Reducción	Machado <i>et al.</i> , (2006)
 Cinaldehído	<i>Peganum harmala</i>	 Alcohol cinámico	Reducción	Asghari <i>et al.</i> , (2004)
 Ácido <i>p</i> -cúmarico	<i>Paecilomyces variotii</i>	 <i>p</i> -hidroxibenzaldehído(I), ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico(II), y ácido protocatéico (III)	Oxidación, descarboxilación	Sachan <i>et al.</i> , (2006)

Continuación tabla 1.

Sustrato	Organismo empleado	Productos de la biotransformación	Tipo de reacción	Referencia
 3-fenil-2-metil-propenal	<i>Manihot esculenta</i> y <i>Manihot dulcis</i>	 3-fenil-2-metil-propenol	Reducción	Machado <i>et al.</i> , (2006)
 Ácido ferúlico	<i>Streptomyces sannanensis</i>	 Vainillina Ácido vainillínico	Descarboxilación oxidación	Ghosh <i>et al.</i> , (2007)
 Iso-eugenol	<i>Bacillus pumilus</i>	 Eugenol Epóxido de isoeugenol Isoeugenol-diol Vainillina Ácido vainillínico Ácido protocatéico dehidroisoeugenol	Oxidación, descarboxilación	Hua <i>et al.</i> , (2007)

Continuación tabla 1.

Sustrato	Organismo empleado	Productos de la biotransformación	Tipo de reacción	Referencia
 <p>Trans-anetol</p>	<p><i>Pseudomonas putida</i></p>	 <p>Epóxido de syn-anetol</p> <p>Epóxido de anti-anetol</p> <p>Ácido p-anísico</p> <p>Ácido p-hidroxibenzóico</p>	<p>Oxidación, descarboxilación, demetilación</p>	<p>Ryu <i>et al.</i>, (2005)</p>
 <p>Eugenol</p>	<p><i>Eucalyptus perriniana</i></p>	 <p>(IV) (V)</p> <p>2-metoxi-4-(2-propenil)fenil-6-O-(β-D-glucopiranosil)-β-D-glucopiranosido (IV) y</p> <p>2-metoxi-4-(2-propenil)fenil-β-D-glucopiranosido (V)</p>	<p>Glicosilación</p>	<p>Shimoda <i>et al.</i>, (2006)</p>

3.3 GENERALIDADES DEL ÁCIDO (±)-2,4-ISOBUTILFENILPROPANÓICO (IBUPROFENO)

Los ácidos 2-fenilpropiónicos (2-APAs) representan un subgrupo importante dentro de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, el ibuprofeno, (nombre IUPAC, ácido (±)-2,4-isobutilfenilpropanóico, (figura 3) es un derivado del ácido propiónico que posee un centro quiral, y si bien ambos enantiómeros son efectivos como analgésicos, solo el enantiómero (S) es el anti-inflamatorio (Clayden *et al.*, 2001).

Según Cann y Connelly, (2000), la compañía Boots PLC, patentó la síntesis de este compuesto en 1961 (U.S Patente 3.385.886), y fue empleada durante muchos años por la industria farmacéutica. Sin embargo, debido a que este proceso producía una alta cantidad de desechos y a la expiración de la patente, en 1991 se obtuvieron dos nuevos procesos patentados con mejores rendimientos y alta reducción en los desechos (U.S. Pat. 4.981.995 y U.S. Pat. 5.068.448).

El ibuprofeno se comercializa como medicamento bajo la forma de una mezcla racémica y es particularmente interesante la inversión metabólica que sufre el isomero (R) en los mamíferos y en los humanos, que conduce a la formación del enantiómero activo (S) (figura 2). El modo de acción de este medicamento se da como resultado de la inhibición de la síntesis de la prostaglandina sintetasa (Rhys-Williams *et al.*, 1998).

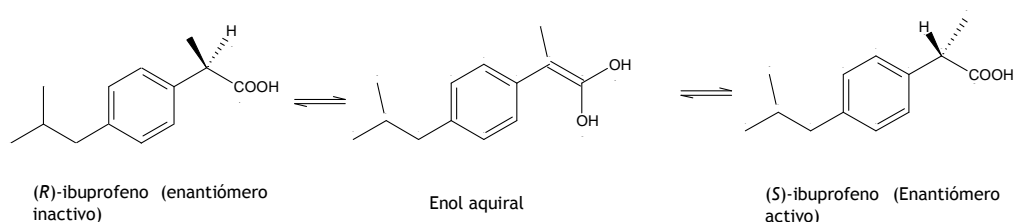


Figura 2. Enolización del (R)-ibuprofeno y obtención del (S)-ibuprofeno (Clayden *et al.*, 2001)

Chen and Rosazza (1994), reportaron la biotransformación del ibuprofeno con especies de *Nocardia* sp., el 50% del sustrato fue convertido en ibuprofenol y acetato de ibuprofenol (figura 3). El ibuprofeno recuperado fue el isómero S (+) con un exceso enantiomérico del 47.9%. Los investigadores sugirieron que la cepa de *Nocardia* sp. empleada, contiene la enzima ácido carboxílico reductasa la cual es R-(-)-selectiva y actúa sobre la mezcla racémica del (±)-ibuprofeno.

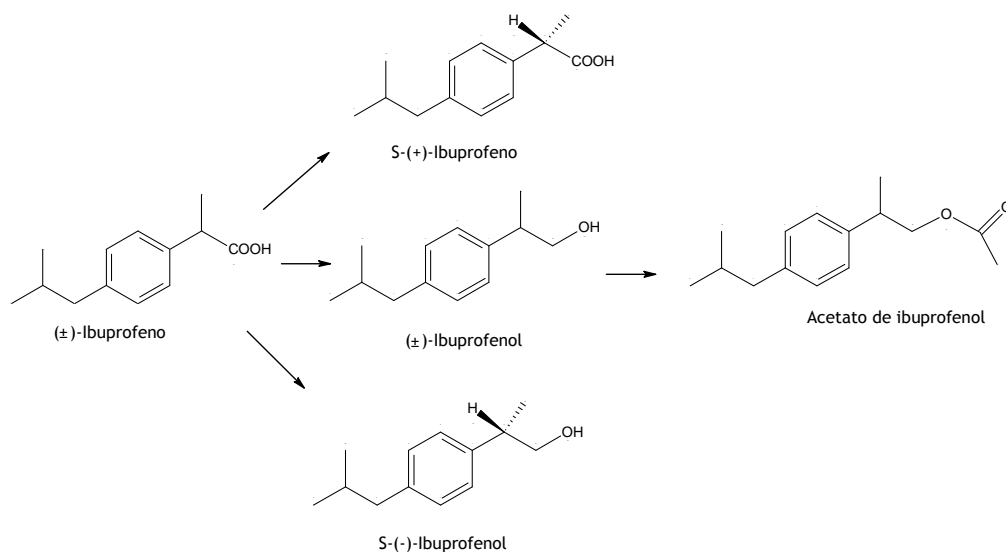


Figura 3. Ibuprofeno y los metabolitos aislados productos de la biotransformación con *Nocardia* sp (Chen and Rosazza, 1994)

Muchas investigaciones han sido desarrolladas con el fin de obtener el enantiómero activo del ibuprofeno. En este sentido, los procedimientos enzimáticos han surgido como tecnologías atractivas y prometedoras que presentan una excelente estereoselectividad bajo condiciones moderadas de reacción. Las lipasas obtenidas de diferentes microorganismos como *Candida* sp (Liu *et al.*, 2009), *Candida antártica* (Contesini *et al.*, 2006; Ducret *et al.*, 1998; Arroyo and Sinisterra, 1994), *Rhizomucor miehei* (Contesini *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2000; López-Belmonte *et al.*, 1997), *Candida rugosa* (Contesini *et al.*, 2006; Cárdenas *et al.*, 2001), *Thermomyces lanuginosa*, *Aspergillus niger* y

Aspergillus terreus (Contesini *et al.*, 2006), *Candida cylindracea* (Kim and Lee, 1996; Lee *et al.*, 1995), *Achremonium murorum*, *Monascus mucoroides*, *Monascus* sp., *Arthroderma ciferri*, *Fusarium poae*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Ovadendron sulphureo-ochraceum*, y *Rhodotorula araucariae* (Cárdenas *et al.*, 2001), entre otras, han sido empleadas con este fin y se ha encontrado que estas catalizan la esterificación del (R,S)-ibuprofeno con alcoholes lográndose obtener los esteres correspondientes, según el medio de reacción utilizado; en la figura 4 se presenta la reacción general empleando como solvente propanol.

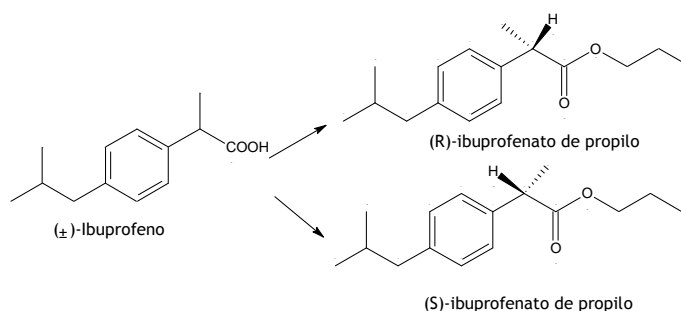


Figura 4. Resolución de una mezcla racémica de ibuprofeno mediante el empleo de lipasas (Cárdenas *et al.*, 2001)

3.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ESPECIES DE *Colletotrichum*

Los hongos filamentosos del género *Colletotrichum* y su teleomórfo *Glomerella* son los causantes de daños importantes en las cosechas de las regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo. Los cereales, las legumbres, los vegetales, las plantas ornamentales y los arboles frutales son seriamente afectados por este patógeno (Waller, 1992), igualmente las especies de *Colletotrichum* se encuentran atacando una variedad amplia de especies silvestres y maderables (García, 2001).

La enfermedad producida por *Colletotrichum* es conocida como antracnosis, y se observa tanto en plantas en desarrollo como en adultas; cuando la infección se presenta en los cultivos jóvenes las pérdidas pueden alcanzar hasta el 100% (Fernández *et al.*, 2000). Este fitopatógeno ataca preferencialmente las partes aéreas de las plantas; sin embargo, los tejidos inferiores, tales como, raíces y tubérculos también pueden ser afectados (Freeman *et al.*, 1998). El ataque se puede dar tanto a frutos en formación (pre-cosecha), como a los ya maduros almacenados (post-cosecha). La habilidad del hongo para causar infecciones latentes o quiescentes hacen de este hongo el patógeno mas importante en post-cosecha (Cannon *et al.*, 2000).

La diversidad genética de las especies de *Colletotrichum*, su alta variabilidad bajo condiciones de cultivo y la facilidad para adaptarse a un hospedero, hacen difícil la clasificación de los especímenes aislados; sin embargo, una sistematización satisfactoria se puede obtener si se tienen en cuenta criterios tales como: morfología, temperatura óptima de crecimiento, compatibilidad vegetativa, sensibilidad al benomil y descripción molecular (Freeman *et al.*, 1998, 2000).

De manera general, los micólogos y fitopatólogos aceptan que el gran número de especies pueden ser limitado a un numero racional de especies o especies mas complejas, dentro de las que se pueden incluir *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum dematium*, *Colletotrichum lindemuthianum* y *Colletotrichum acutatum*, las cuales se consideran especies acumulativas compuestas por diversas subpoblaciones (Freeman *et al.*, 1998; Vinnere *et al.*, 2002). En la figura 5 se presenta la variación en el color y la morfología en un cultivo de *C. acutatum sensu* Simmonds.

En Colombia las especies de *Colletotrichum* son muy diversas y se encuentran afectando a un gran numero de plantas; en algunos cultivos económicamente importantes el patógeno alcanza la categoría de limitante de la producción, para

lograr un mejor control de las poblaciones es de gran importancia la caracterización adecuada de las especies involucradas y los estudios se han extendido a los cultivos de guanábana (*Annona muricata*), tamarillo (*Solanum betacea* cav. Sendt), mango (*Mangifera indica*) y varias especies de passifloras. Los resultados mostraron que de los 54 aislamientos obtenidos de guanábana, el 89.3% correspondieron a la especie *C. gloeosporioides*, el 8.9% a *C. acutatum* y el 1.7% a una especie no identificada (Álvarez, *et al.*, 2004). Además, Afanador-Kafuri *et al.*, (2003) reportaron que la especie predominante en tamarillo fue *C. acutatum* mientras que en mango y passifloras fue *C. gloeosporioides*.

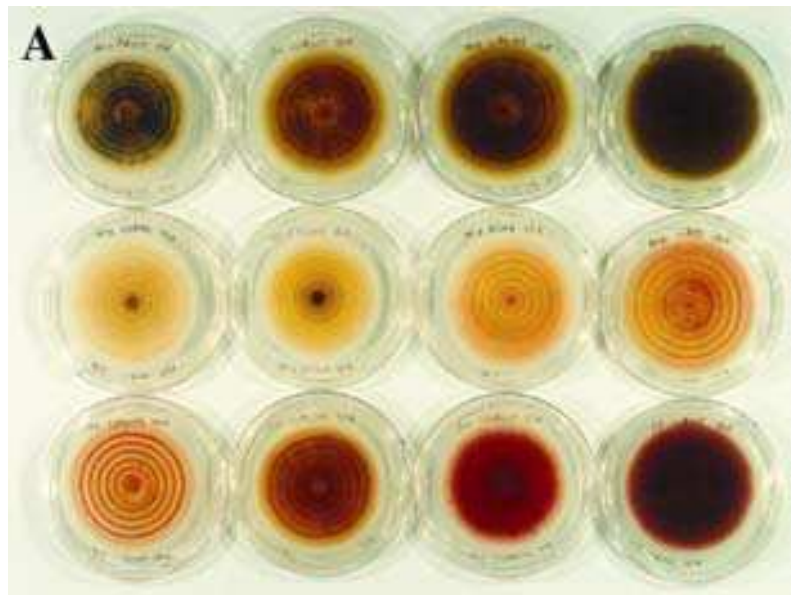


Fig. 5. Fotografía de cultivos de *C. acutatum sensu* Simmonds (Peres *et al.*, 2005)

A pesar de que las pérdidas económicas producidas por la actividad fúngica de estos patógenos a nivel mundial son enormes, el conocimiento adquirido sobre su especificidad y nivel de daño a especies vegetales particulares, ha permitido su utilización en el control de especies vegetales arbóreas, este es el caso de *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* (Penz.) Penz. & Sacc. utilizado como el primer micro-herbicida registrado en Canadá con el nombre de BioMal® (Makowski y

Mortensen,1992). En una forma paralela la exploración de sus posibilidades enzimáticas puede viabilizar el diseño de un control racional del patógeno u obtener las bases sobre su potencialidad en procesos de biotransformación de sustratos orgánicos; en este sentido actualmente, varias especies de *Colletotrichum* son empleadas en procesos de biotransformación.

3.5 BIOTRANSFORMACIONES CON ESPECIES DEL HONGO FILAMENTOSO FITOPATÓGENO *Colletotrichum*

En la literatura científica se encuentran publicados un buen número de trabajos de biotransformación desarrollados con hongos fitopatógenos que causan daños en cultivos de importancia comercial; en algunos casos, los sustratos utilizados son compuestos antifúngicos y en los estudios se pretende elucidar los mecanismos de detoxificación empleados por el patógeno, con el fin de esclarecer su dinamica enzimatica y fundamentados en ella desarrollar antimicóticos potencialmente más activos (Daoubi *et al.*, 2005a; 2005b; Bustillo *et al.*, 2003). En otras ocasiones, los compuestos utilizados como sustratos tienen alguna similitud estructural con los metabolitos producidos por el hongo; en muchos casos estos compuestos tienen importancia económica y se pretende aumentar su producción por parte del organismo (Ortíz *et al.*, 2006; Collado *et al.*, 1998). El mayor número de sustratos empleados en biotransformaciones no tienen ninguna relación con el patógeno y son evaluados por sus características estructurales con la finalidad de modificarlos y obtener productos con mayor valor agregado (Ghoumari *et al.*, 2006; García *et al.*, 2004; Boaventura *et al.*, 2004).

Varias especies del género *Colletotrichum* han sido utilizadas en procesos de biotransformación, con la finalidad de estudiar las características de las reacciones que estos microorganismos pueden realizar sobre diferentes sustratos, y sus posibles aplicaciones sintéticas e industriales. La especie *C. gloeosporioides*

(Penz.) Penz & Sacc. (teleomórfo *Glomerella cingulata*) ha sido la mas empleada (García *et al.*, 2003).

Las modificaciones microbiológicas de esteroides son un método ampliamente usado para la preparación de hidroxiesteroides importantes, empleados como intermediarios en química farmacéutica. Los compuestos 3 β -hidroxi-5-androsteno-17-ona (1) y 15 β -16 β -metilen-dehidroepiandrosterona (2), fueron biotransformados mediante *Colletotrichum lini* obteniéndose 3 β ,7 α -dihidroxi-5-androsten-17-ona (3), 3 β ,7 α ,15 α -trihidroxi-5-androsten-17-ona (4) y 7 α -hidroxi-15 β -16 β -metilen-dehidroepiandrosterona (5), como se observa en la figura 6. Los metabolitos obtenidos son intermediarios importantes utilizados en la síntesis de esteroides farmacológicamente activos (Romano *et al.*, 2006), igualmente estos autores reportan la modificación de varios parámetros del proceso hasta lograr las condiciones óptimas de la biotransformación de (1) y (2) las cuales fueron: 30 °C, concentración del micelio = 10 g/L, concentración del sustrato = 1g/L (en un buffer fosfato a pH 6.4), empleó de dimetilformamida (2%, v/v) como co-solvente y reutilización del micelio luego de estabilizarlo empleando glucosa como co-sustrato.

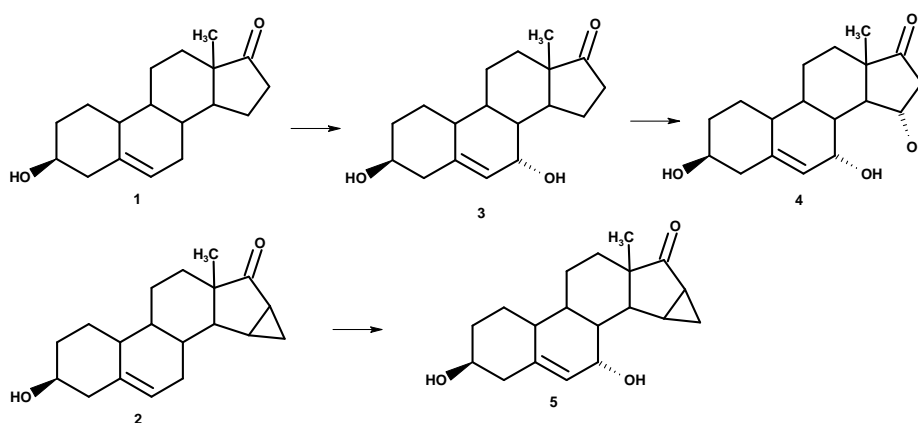


Figura 6. Hidroxilaciones de 3 β -hidroxi-5-androsteno-17-ona (1) y 15 β ,16 β -metilen-deidroepiandrosterona (2) por *C. lini* (Romano *et al.*, 2006)

El ácido betulínico (6) y el ácido betulónico (7) son triterpenos encontrados en varias especies de plantas, estos materiales tienen importancia farmacológica por sus propiedades biológicas tales como anti-cáncer y anti VIH. Estos dos metabolitos fueron biotransformados con *Colletotrichum* obteniéndose el ácido 3-oxo-15 α -hidroxilup-20 (29)-en-28-oico (8) a partir tanto de (6) como de (7); mientras que el ácido 3-oxo-7 β ,15 α -dihidroxilup-20(29)-en-28-oico (9) se obtuvo a partir de (6)(figura 7). Los derivados obtenidos provienen de oxidaciones enzimáticas muy similares a las que ocurren normalmente en el metabolismo de los mamíferos; lo cual le brinda a este proceso la potencialidad de ser utilizado en el estudio de la asimilación de estos compuestos por mamíferos (Bastos *et al.*, 2007).

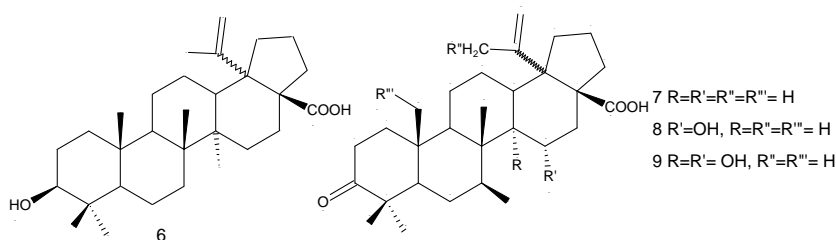


Figura 7. Biotransformación de el ácido betulínico (6) y el ácido betulónico (7) por *G. gloeosporioides* (Bastos *et al.*, 2007)

En la búsqueda de moléculas con potencial antitumoral, Akihisa *et al.*, (2006), biotransformaron los triterpenos, cicloartenol (10), 24-metilenecicloartanol (11) y cicloartenona (12) utilizando el hongo *Glomerella fusarioides*; en la bioconversión se obtuvo, a partir de (10), cicloartenona (12), cicloart-25-en-3 β ,24-diol (13), y cicloartano-3 β ,24,25-triol (14). A partir de (11) se obtuvo, cicloeucalenol (15), 24-metilcicloartano-3 β ,24,24¹-triol (16), y 24¹-metoxi-24-metilcicloartano-3 β ,24-diol (17) y a partir de (12) 4R,4 β ,14R-trimetil-9 β ,19-ciclopregnano-3,20-diona (18), cicloartano-3,24-diona (19), 24-hidroxicicloart-25-en-3-ona (20), (23E)-25-hidroxicicloart-23-en-3-ona (21), 24,25-

dihidroxicicloartan-3-ona (22), y 25-hidroxi-24-metoxicicloartan-3-ona (23) (figura 8).

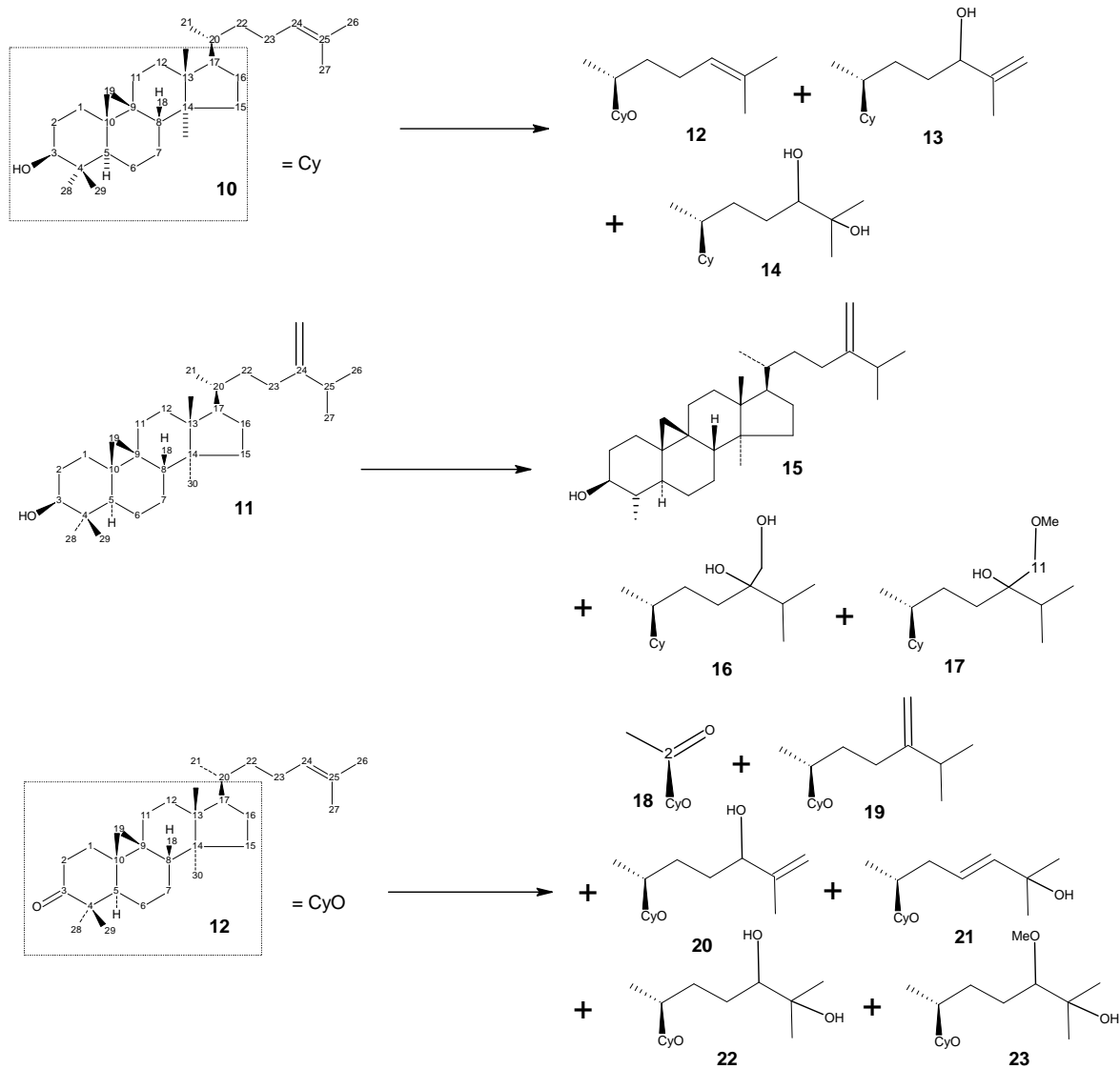


Figura 8. Biotransformación de cicloartenol (10), 24-metilencicloartanol (11), y cicloartenona (12) por *G. fusarioides* (Akihisa *et al.*, 2006)

Como se observa en la figura 8, en la biotransformación de los tres cicloartanos se formaron metabolitos con diversas modificaciones estructurales, tales como:

oxidación del grupo hidroxilo del carbono C-3 (12), hidroxilaciones de las cadenas laterales (13, 14, 16, 17, 20-23) y rompimiento de la cadena carbonada (18), demetilación en C-4 (15), hidroxilaciones en C-24 (13, 14, 16, 17, 20 y 22) y metoxilaciones en este mismo carbono (23). Los productos con modificaciones en C-24 están constituidos por mezclas de los esteroisómeros en igual proporción. La transformación de (12) en (23) constituyó el primer reporte de una modificación estructural de un compuesto tipo cicloartano, en uno con cadena lateral tipo pregnano (Akihisa *et al.*, 2006).

C. gloeosporioides también ha sido empleado en la biotransformación de (\pm)-1-(4'-clorofenil)-2-feniletanol (24), como productos de la reacción se obtuvieron cuatro compuestos: (1*RS*,2*SR*)-1-(4'-clorofenil)-2-feniletano-1,2-diol (25), (1*S*,2*S*)-1-(4'-clorofenil)-2-feniletano-1,2-diol (26), (*R*)-2-hidroxi-2-(4'-clorofenil) acetofenona (27) y bencil-4'-clorofenil cetona (28) (figura 9). Así mismo, la acetilación con anhídrido acético en piridina de la fracción polar permitió la obtención de tres compuestos adicionales: (1*R*)-2-(2'-acetoxifenil)-1-(4'-clorofenil) etil acetato (29), (1*R*)-2-(3'-acetoxifenil)-1-(4'-clorofenil) etil acetato (30) y (\pm)-2-(4'-acetoxifenil)-1-(4'-clorofenil) etil acetato (31). Además, los investigadores concluyeron que el hongo tuvo preferencia por el enantiómero (1*R*)-(+)-1-(4'-clorofenil)-2-feniletanol; adicionalmente, la hidroxilación en C-2 de 24 indica que la transformación muy seguramente es realizada por la acción de monooxigenasas, y que la biotransformación de 25 en 28, se debe a la presencia de dehidrogenasas, lo cual se confirma con el aislamiento de 27 (Bustillo *et al.*, 2003).

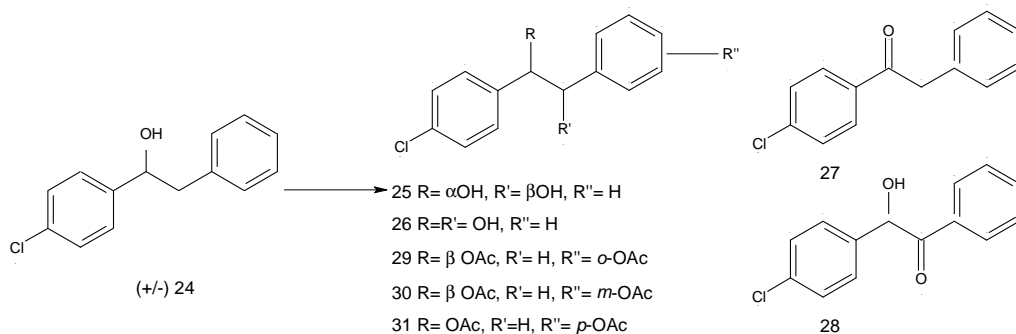


Figura 9. Biotransformación de (±)-1-(4'-clorofenil)-2-feniletanol (24) por *G. gloeosporioides* (Bustillo *et al.*, 2003)

Widrol (32) es un compuesto al cual se le ha reportado actividad antifúngica, fue biotransformado por *C. gloeosporioides* obteniéndose productos oxidados con alta regioselectividad en el carbono C-10 así: 10-oxowidrol (33), 10β-hidroxiwidrol (34), 10α-hidroxiwidrol (35), y 14α-hidroxiwidrol (36), (figura 10). Estos compuestos fueron inactivos a 100 mg/L contra *Botrytis cinerea* (Ortiz *et al.*, 2006).

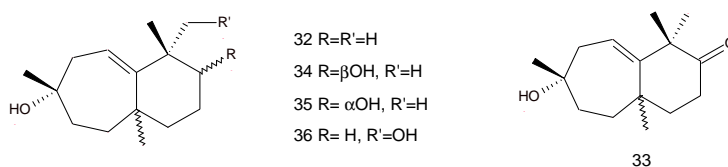


Figura 10. Biotransformación de widrol por *C. gloeosporioides* (Ortiz *et al.*, 2006)

El isosteviol (IUPAC: ácido *ent*-16-cetobeyerano-19-oico) (37), es un diterpeno tetracíclico que presenta actividades biológicas (Bracht *et al.*, 1985; Yamamoto, *et al.*, 1985; Ishii, *et al.*, 1987), ha sido biotransformado con el fin de potenciar su bioactividad. Como se observa en la figura 11, la transformación microbiológica con *G. cingulata* dio como único producto el 17-hidroxi-isosteviol (38; IUPAC: ácido *ent*-17-hidroxi-16-oxobeyerano-19-oico), el cual presentó actividad de inhibición significativa en un ensayo preliminar de quimiopreventivos (Akihisa *et al.*, 2004).

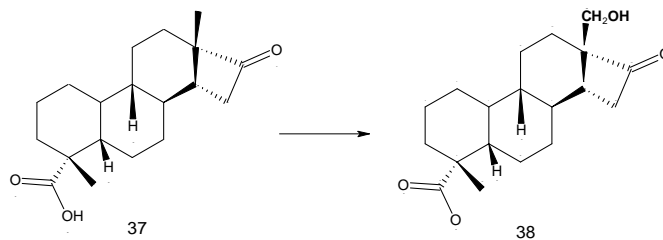


Figura 11. Biotransformación de isosteviol (37) por *G. cingulata* (Akihisa *et al.*, 2004)

Miyazawa y Sakata, (2007) biotransformaron con *G. cingulata* el alcohol sesquiterpénico (+)-cicloisolongifolol (39), obteniendo el producto mayoritario deshidratado (+)-dehidrocicloisolongifolena (40) y otros productos minoritarios (figura 12). El metabolito (40) también fue obtenido mediante síntesis a partir de (39) con un rendimiento del 34%; mientras que en la biotransformación el rendimiento alcanzado fue del 74%.

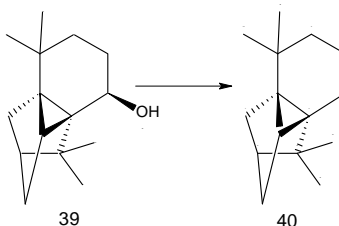


Figura 12. Biotransformación de (+)-cicloisolongifolol (39) por *G. cingulata* (Miyazawa y Sakata 2007)

Las isoflavonas son productos naturales a los que se les reportan múltiples actividades biológicas. Mediante la biotransformación de este tipo de moléculas se pueden obtener isoflavonas con mayor actividad biológica; igualmente en el estudio se logró elucidar la ruta metabólica del proceso. Así, el compuesto ditiglató de daidzeína (41) fue biotransformado con *G. cingulata* y se observó la hidrólisis de los carbonos 7 y 4 dando origen a daidzeína (42) la cual es una isoflavona con actividad antioxidante (figura 13), en el proceso la bioconversión

alcanzó el 50% de (41) y el mismo porcentaje de formación de (42) en siete días (Miyazawa *et al.*, 2006).

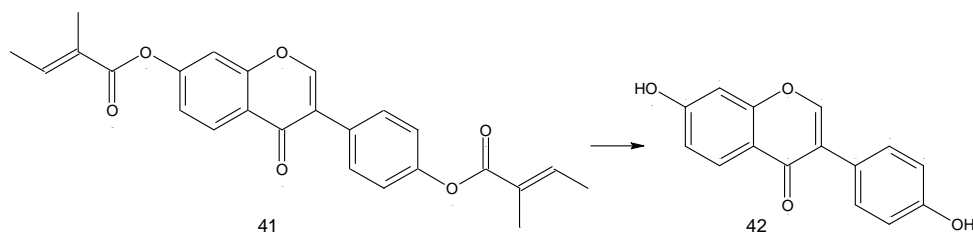


Figura 13. Biotransformación de ditiglatato de daidzeina (41) por *G.cingulata* (Miyazawa *et al.*, 2006)

El (+)- α -Bulnesena (43), es un sesquiterpeno con actividad insecticida, que fue bitransformado con *G. cingulata* obteniéndose mayoritariamente (4*S*,5*S*,7*R*)-1(10)-guaien-11,13,15-triol (44). En la figura 14 se observan las oxidaciones del grupo isoprenilo en los carbonos 11 y 13 y en el carbono metílico 15. El metabolito (44) tuvo una abundancia relativa del 25% después de 10 días de iniciado el proceso; mientras que el sustrato de partida se consumió en un 40% en el mismo periodo de tiempo (Miyazawa y Sugawara, 2005).

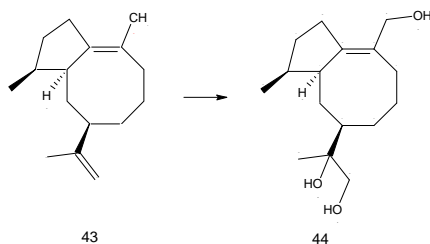


Figura 14. Biotransformación de (+)- α -Bulnesena (43) por *G.cingulata* (Miyazawa y Sugawara, 2005)

Krishna *et al.*, (2004) bitransformaron con *C. capsici* la cumarina (45) y la 6-metilcumarina (46), las cuales son sustancias ampliamente usadas como saborizantes y fragancias en la industria; en el proceso se obtuvieron los

productos metabólicos reducidos: 2-(3'-hidroxipropil)fenol (47) y 2-(3'-hidroxipropil)-4-metilfenol (48) (figura 15).

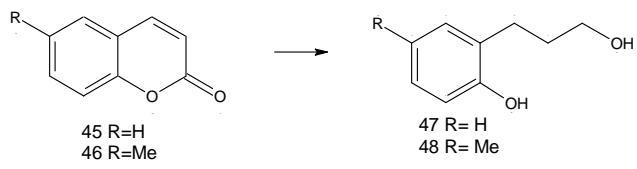


Figura 15. Biotransformación de la cumarina (45) y la 6-metilcumarina (46) por *C. capsici* (Krishna *et al.*, 2004)

En la biotransformación del 2-feniletanol (49) con *C. acutatum* se obtuvieron los productos: éter metílico del 2-feniletanol (50), 1-fenil-1,2-etanodiol (51), y el acetato de 2-feniletanol (52) (figura 16) (Aristizábal *et al.*, 2008).

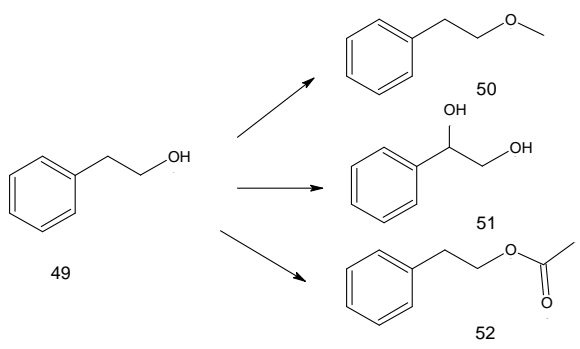


Figura 16. Biotransformación del 2-feniletanol (49) con *C. acutatum*

La biotransformación de la acetofenona (53) con esta especie produjo los compuestos 1-feniletanol (54), 2-feniletanol (55) y 1-fenil-1,2-etanodiol (56) (figura 17) (Aristizábal *et al.*, 2008).

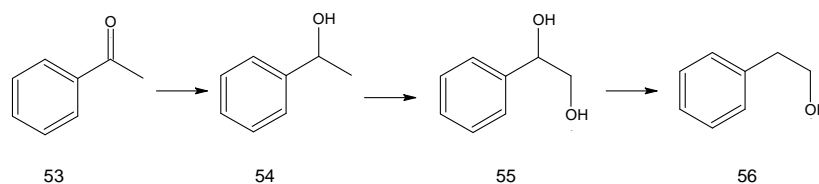


Figura 17. Biotransformación de la acetofenona (53) *C. acutatum* (Aristizábal *et al.*, 2008)

Los metabolitos obtenidos en la biotransformación del 2-feniletanol (49) y de la acetofenona (53), demuestran la capacidad que tiene *C. acutatum* para realizar oxidaciones y reducciones en el sustituyente alquílico del grupo aromático; así como también metilaciones y acetilaciones del hidroxilo (Aristizábal *et al.*, 2008).

Las biotransformaciones efectuadas por microorganismos son una alternativa muy atractiva para la evaluación *in vitro* de medicamentos, debido a que las conversiones se llevan a cabo de manera similar a las reacciones metabólicas de la fase I de los mamíferos (Eap *et al.*, 1995). El compuesto tioridazina (57) (THD, mezcla racémica) es un medicamento empleado para el tratamiento de desordenes psíquicos; fue biotransformado con *G. cingulata* obteniéndose los productos mayoritarios del metabolismo humano: tioridazina-2-sulfóxido (58) y tioridazina-5-sulfóxido (59) (figura 18); además, los investigadores reportaron que *G. cingulata* presentó preferencia por el isómeros (*R*)-THD (Borges *et al.*, 2008), lo cual tiene importancia si se tiene en cuenta que el efecto anti-psicótico esta asociado principalmente con este isómero (Eap *et al.*, 1995).

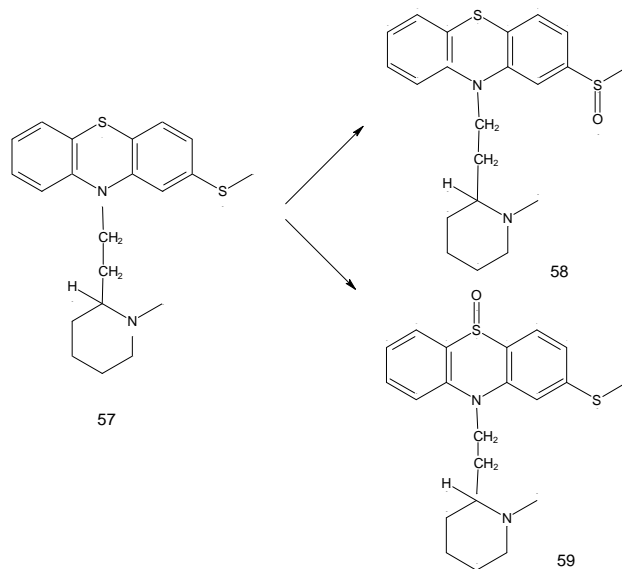


Figura 18. Biotransformación de THD (57) por *G. cingulata* (Borges *et al.*, 2008)

Por todo lo expuesto anteriormente, se puede concluir que las transformaciones microbiológicas de compuestos tienen un valor potencial en diferentes campos tanto de la industria, como en la química fina; además, se evidencia que las diferentes especies del género *Colletotrichum* pueden realizar diversas modificaciones estructurales tales como: oxidaciones, degradación de cadenas laterales, demetilaciones, hidroxilaciones y metoxilaciones en diferentes posiciones de los sustratos, lo que convierte a las diferentes especies de este microorganismo, en biocatalizadores potenciales con múltiples aplicaciones.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ESPECIFICACIONES GENERALES DE LOS MATERIALES Y LOS EQUIPOS

En los procesos de extracción, cromatografía de columna y de placa se emplearon solventes comerciales previamente bidestilados. La fase estacionaria utilizada para la cromatografía de columna fue sílica gel 60 (0.063-0.200 μm , Merck), y el seguimiento y detección de los metabolitos se realizó sobre cromatofolios de aluminio Kiesegel 60 F₂₅₄ (0.25 mm, Merck). Los medios de cultivo fueron preparados con sales comerciales y agar microbiológico (Oxoid).

El *trans*-cinamaldehído empleado en la biotransformación fue grado analítico (Sigma), y el ácido (\pm)-2,4-isobutilfenilpropanóico (ibuprofeno comercial) fue obtenido mediante extracción y purificación del principio activo contenido en las presentaciones farmacéuticas comerciales de 600 mg.

Todos los procesos que involucraron microorganismos se realizaron bajo condiciones asépticas y todos los materiales empleados con ellos (vidriería y medios de cultivo) se esterilizaron en un autoclave horizontal (All American), los procedimientos de repique e inoculación del patógeno se realizaron en una cabina de flujo laminar (Control de Contaminación) y las biotransformaciones fueron llevadas a cabo en un agitador orbital (Centricol-serie 0239), con cámara de incubación.

El análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) se realizó en un cromatógrafo de gases 6890 Agilent, con un detector selectivo de masas (MSD) 5973 Agilent, equipado con un sistema de datos HP-MS Chemstation (versión B 0100), los espectros de masas fueron comparados con la base de datos NIST 02 (National Institute of Standards and Technology).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron tomados en un espectrómetro Bruker AMX 300 de 7.4 Teslas.

Los espectros infrarrojo (IR) se realizaron en un equipo Perkin Elmer Paragon 1000 empleando como solvente cloroformo.

4.2 MICROORGANISMO

Se trabajó con una cepa de *C. acutatum* aislada de frutos de tamarillo (*Solanum betacea*) comerciales, los aislamientos fueron caracterizados morfológica y molecularmente (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003), por el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

4.3 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Se prepararon dos tipos de medios: agar-papa-dextrosa (PDA) y medio de cultivo líquido Czapeck-Dox.

La composición del medio sólido (PDA) fue la siguiente: sacarosa (20 g/L), extracto de papa (200 g/L) y agar (20 g/L). Posterior a su preparación, el medio fue esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y 15 psi. Para prevenir la solidificación y la contaminación, el medio se sirvió a una temperatura aproximada de 60°C en cajas Petri en una cabina de flujo laminar.

El medio de cultivo líquido estándar Czapeck-Dox, tuvo la siguiente composición: glucosa (5%), extracto de levadura (0.1%), K₂HPO₄ (0.5%), NaNO₃ (0.2%), MgSO₄.7H₂O (0.05%), FeSO₄.7H₂O (0.001%). El medio se esterilizó en autoclave y se sirvieron 500 mL en erlenmeyers de 1L, los cuales se taparon con tarugos de algodón esterilizados.

4.4 CRECIMIENTO DEL HONGO EN PDA

El hongo fue subcultivado ascépticamente a partir de cepas stock de *C. acutatum*

en cajas de Petri de 90 mm conteniendo 15 ml de PDA. Las cajas fueron selladas con vinipel® y mantenidas a una temperatura de 25 °C ± 3 y una humedad relativa de 50 - 60%.

4.5 BIOENSAYO DE TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS *trans*-CINAMALDEHÍDO E IBUPROFENO FRENTE AL HONGO FILAMENTOSO FITOPATÓGENO *C. acutatum*

Con la finalidad de conocer la cantidad máxima de sustrato que se debe suministrar en el proceso de biotransformación, sin afectar en mucha extensión el proceso normal del desarrollo del hongo (inhibición entre el 40 al 50 % del crecimiento del micelio), se construyeron las curvas de toxicidad de los sustratos siguiendo la metodología descrita por Ortíz *et al.*, (2006) y Daoubi, *et al.*, (2005a). Se preparó el agar PDA, y 15 mL de este se sirvieron mezclados con 30 µL de la solución del sustrato a evaluar en cajas Petri de 9 cm de diámetro. Después que el agar gelificó, se perforó un pozo de 7 mm en el centro del agar y se colocó en él un segmento cilíndrico del hongo obtenido con un sacabocados del mismo diámetro de la perforación, proveniente de un frotis realizado 48 horas previas al bioensayo. El *trans*-cinamaldehído fue evaluado a 1500, 1250, 1000, 750, 500, 400, 250, 200, 150 y 50 mg/L en etanol; mientras que se prepararon soluciones a 1500, 1250, 1000, 750, 500, 250 y 100 mg/L de ibuprofeno en acetato de etilo.

Como referencia para cada una de las evaluaciones se utilizaron los correspondientes testigos, consistentes en cajas que no tenían el compuesto evaluado y en su lugar se adicionó el solvente empleado para solubilizar el sustrato (blanco de solvente) y otras que solo tenían PDA (blanco absoluto); todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

El diámetro del crecimiento del micelio del hongo se midió con una regla milimetrada cada 24 horas; cada concentración fue evaluada por triplicado y se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación de las mediciones

obtenidas.

Con las medidas calculadas, se construyeron las curvas respectivas de crecimiento del hongo en el tiempo y se determinó el porcentaje de inhibición ocasionado por cada uno de los sustratos evaluados; para este fin, se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = (D_a - D_c / D_a) \times 100$$

Donde:

D_a = Promedio del diámetro del micelio del hongo en el blanco absoluto o en el blanco de solvente

D_c = Promedio del diámetro del micelio del hongo en cada una de las concentraciones evaluadas.

Finalmente se determinó el IC_{50} de los sustratos mediante la regresión lineal del porcentaje de inhibición del hongo frente al logaritmo de la concentración de los compuestos en estudio. El IC_{50} se reporta como el promedio de tres réplicas.

4.6 PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN

Las biotransformaciones se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento general descrito en la literatura por Ortíz *et al.*, (2006); Daoubi *et al.*, (2005b); Bustillo *et al.*, (2003); Miyazawa *et al.*, (1996), entre otros.

4.6.1 Obtención del inóculo

El inóculo necesario para la biotransformación, se obtuvo a partir de un precultivo del hongo; para ello se adicionó a cada erlenmeyer que contenía 500 mL de medio líquido Czapeck-Dox a temperatura ambiente, trozos pequeños de micelio (de aproximadamente 5 mm²) y medio de cultivo sólido procedentes de los cultivos esporulados de *C. acutatum* crecidos en PDA durante 20 días (Aristizabal *et al.*, 2008). El precultivo se colocó en un agitador orbital a una

velocidad de 150 rpm durante 10 días, tiempo suficiente para lograr aumentar significativamente la biomasa.

4.6.2 Biotransformación

La biomasa obtenida en el cultivo durante 10 días, se transfirió a un nuevo medio líquido fresco Czapeck-Dox que contenía el sustrato a evaluar a la concentración definida de acuerdo a las curvas de toxicidad. Los erlenmeyers se colocaron en un agitador orbital a una velocidad de 150 rpm durante el tiempo necesario para llevar a cabo la biotransformación.

4.7 OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS

La extracción de los productos de la biotransformación se realizó siguiendo la metodología general descrita por Lamm *et al.*, (2006); García *et al.*, (2004); Miyazawa *et al.*, (2000), entre otros. Después de transcurrido el tiempo de fermentación, el micelio se separó del medio de cultivo mediante filtración con una malla de Nylon fina, la biomasa resultante se mezcló con cloruro de sodio y se extrajo cuatro veces con 50 mL de acetona; los extractos de acetona combinados se destilaron a presión reducida mediante un rotavapor hasta eliminar el solvente orgánico, la solución acuosa remanente se saturó con cloruro de sodio y se extrajo nuevamente por 3 veces con porciones de 50 mL de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron nuevamente en un rotavapor; el concentrado se transfirió a un vial adecuadamente marcado y se almacenó en el congelador a -20°C para su posterior procesamiento.

El filtrado obtenido se saturó con cloruro de sodio y acetato de etilo, se dejó con agitación magnética durante 10 minutos y se filtró sobre un lecho compacto de tierra de diatomeas (Celita 545 ®); posteriormente, el filtrado se extrajo 4 veces con 400 mL de acetato de etilo, el extracto orgánico obtenido se deshidrató con sulfato de sodio anhidro, se concentró a presión reducida en un rotavapor, se

transfirió a un vial marcado adecuadamente y se almacenó en el congelador a -20°C para su posterior purificación. La fase acuosa resultante se destiló a presión reducida mediante un rotavapor, obteniéndose un sólido constituido fundamentalmente por cloruro de sodio, este se extrajo con acetona, y el extracto resultante se deshidrató con sulfato de sodio anhidro, antes de rotaevaporarlo a presión reducida; finalmente se transfirió a un vial adecuadamente marcado y se almacenó en el congelador a -20°C para su posterior procesamiento.

4.8 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS MAYORITARIOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN

La separación y purificación de los metabolitos se realizó mediante cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) y cromatografía en columna (CC) empleando columnas de vidrio de diferentes diámetros y longitudes para trabajo a presión atmosférica y diferentes soportes tales como: sílica gel en fase normal y Sephadex LH-20. Así mismo, Se emplearon mezclas adecuadas de solventes dependiendo del tipo de fase estacionaria utilizada.

Las fracciones obtenidas en las CC fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa fina (CCF) empleando cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ con un espesor de 0.25 mm; la detección se realizó mediante fluorescencia utilizando lámparas UV con longitudes de onda de 254 y 360 nm; además, se utilizó H₂SO₄ al 10% en etanol como revelador químico universal.

4.9 IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS

La identificación estructural de los diferentes compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de las técnicas de Espectroscopía de Infrarrojo (IR), y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) mediante las técnicas mono y bidimensionales homo y hetero nucleares y de Cromatografía de Gases acoplado a un detector de Espectrometría de Masas (CG-EM).

Las condiciones experimentales empleadas en el CG-EM para el análisis de las muestras fueron las siguientes: columna capilar de sílica fundida, con fase estacionaria entrecruzada, HP-5 MS (Agilent Technologies) 30 m, 0.25 mm d.i., recubierta con 5% de fenilmetil siloxano (0.25 μm). Como gas de arrastre se empleó Helio grado 5 (AGA Fano S.A., UAP 99.999%). Se trabajó iniciando a 70 °C (2 min) y se finalizó a 250 °C (7 °C/min) (2 min). Se inyectó 1 μL de la muestra por el modo de splitless, a una temperatura de 150°C, una presión de 8.62 psi y un flujo de 1 mL/min.

La temperatura del detector fue 300 °C, la fragmentación se logró mediante IE a 70 eV. Los espectros de masas y las corrientes iónicas totales (cromatogramas reconstruidos), se registraron por medio del barrido automático de radiofrecuencia en el intervalo de masas m/z 30-700 u.m.a. El tiempo total del análisis fue de 30 minutos.

Las muestras analizadas por RMN fueron disueltas en cloroformo deuterado (CDCl_3). Los desplazamientos químicos están expresados en la escala delta (δ) en ppm y las constantes de acoplamiento (j) en Hertzios (Hz); los valores se referenciaron con respecto a la señales residuales del solvente no deuterado, presente en el disolvente deuterado; así: para el CDCl_3 se utilizaron los valores de 7.25 ppm en los espectros ^1H y de 77.0 ppm para los de ^{13}C .

4.10 SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN

El progreso de la biotransformación, (dinámica de la transformación del sustrato y de algunos de los productos en el proceso) se realizó haciendo muestreos cada 48 horas. Para este fin, se retiraron asépticamente 50 mL del medio de cultivo que incluía parte del micelio. Este material se mezcló con 50 mL de etanol al 95 % y se congeló a -10°C con la finalidad de inhibir el proceso enzimático y detener la biotransformación; posteriormente las muestras se destilaron a presión reducida en un rotavapor hasta eliminar todo el etanol; La fase acuosa

remanente se saturó con cloruro de sodio y se extrajo con tres porciones de 50 mL de acetato de etilo. Los extractos se combinaron y se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se destilaron a presión reducida en un rotoevaporador (Nankai *et al.*, 1998; Miyazawa *et al.*, 2000). Los extractos obtenidos se redisolviaron en una mezcla de cloroformo-metanol (8:2) grado analítico, se filtraron a través de un microfiltro Whatman (0.45 µm) y se analizaron por CCF y CG-EM. La composición relativa se determinó con base en el área de los picos en los cromatogramas.

Cuando las muestras lo requirieron fueron derivatizadas mediante silanización empleando el reactivo bis-trimetilsilil trifluoroacetamida (BSTFA) y trimetilclorosilano al 1% (TMCS) (Supelco), siguiendo la metodología propuesta por El Haj *et al.*, (1999). Para este efecto, se solubilizaron 5 mg de la muestra con 50 µL de metanol y se hicieron reaccionar con 100 µL de BSTFA + TMCS en un baño de aceite a 60°C durante 20 minutos. Al finalizar la reacción, se obtuvieron los productos sililados, los cuales se sometieron a CG-EM.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ASPECTOS GENERALES

La cepa de *C. acutatum* utilizada creció satisfactoriamente en el medio de cultivo sólido PDA a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 70%; así mismo, se observó el desarrollo adecuado del hongo en el medio líquido Czapeck-Dox, bajo agitación constante a una velocidad de 150 rpm en las condiciones de temperatura y humedad descritas anteriormente (figura 19).

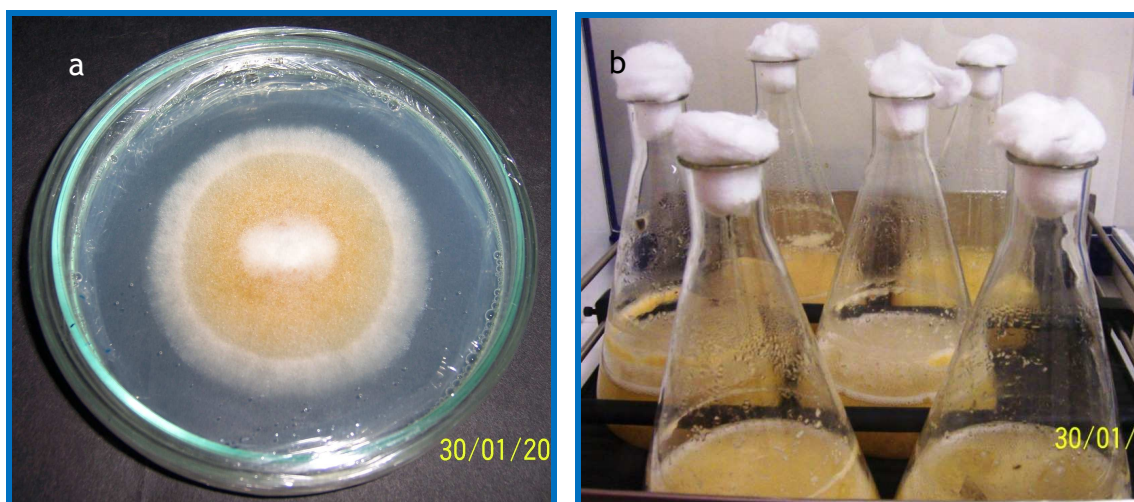


Figura 19. a) Fotografía de una colonia de *C. acutatum* en crecimiento sobre PDA y b) sub-cultivo del hongo en el medio líquido Czapeck-Dox

5.2 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS SUSTRATOS

En las figuras 20 y 21 se presentan los comportamientos de *C. acutatum* al ser sometido a las diferentes concentraciones de los sustratos, las barras de error graficadas en cada una de las curvas, evidencian que el ensayo tuvo valores de desviación estándar bajos en todos los casos, los cuales oscilan entre 0 y 3. Así mismo, dado que el coeficiente de variación fue inferior al 15% se puede decir que los ensayos fueron homogéneos (anexo).

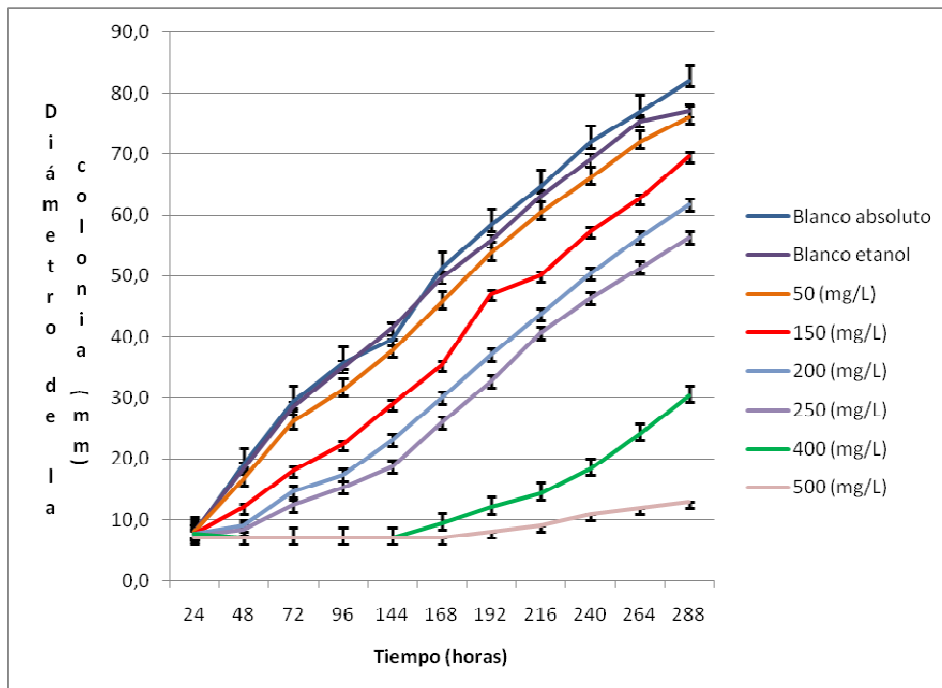


Figura 20. Diagrama de actividad antifúngica *in-vitro* del *trans*-cinamaldehído sobre el crecimiento de *C. acutatum*

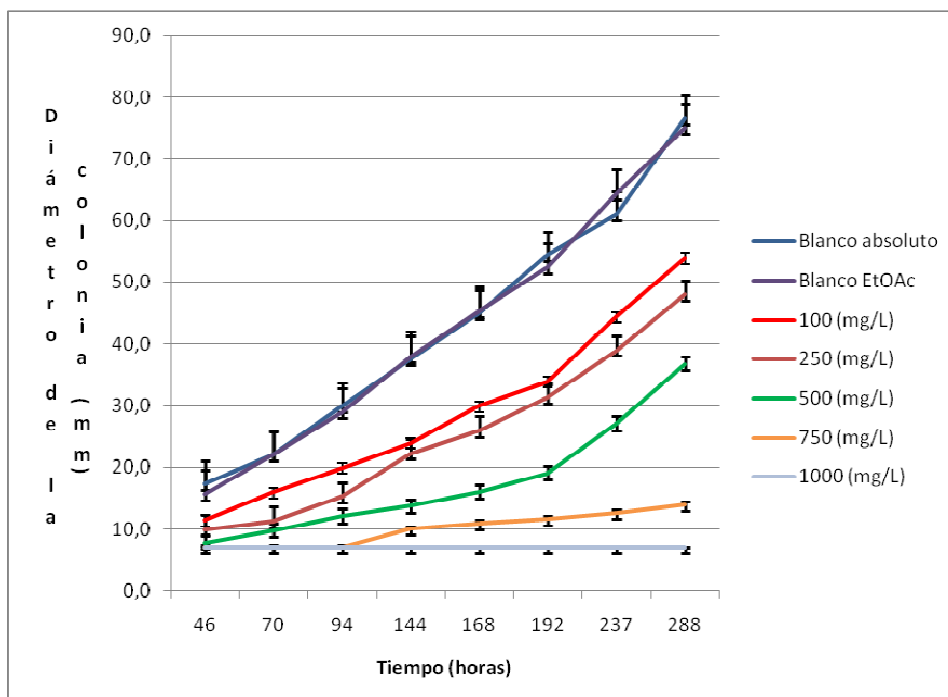


Figura 21. Diagrama de actividad antifúngica *in-vitro* del ibuprofeno (F) sobre el crecimiento de *C. acutatum*

Las figuras 20 y 21 permiten deducir que ni el etanol ni el acetato de etilo empleados para disolver los sustratos evaluados intervinieron en el crecimiento del hongo; esto confirma reportes previos de García, (2001) quien concluyó que el crecimiento de *C. gloeosporioides* no es afectado significativamente por concentraciones de etanol de 2 y 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ en el medio de cultivo. Por otra parte, Miyazawa *et al.*, (1997a, 1997b) reportaron que este solvente no inhibe el crecimiento de *G. cingulata* cuando se utiliza en proporciones similares a las utilizadas en este estudio. Así mismo, Meneses, (2006) determinó que el acetato de etilo no afectaba el crecimiento de *C. gloeosporioides* a concentraciones inferiores a 8mL/L. También, se pudo observar que el *trans*-cinamaldehído no permitió el crecimiento del hongo a concentraciones superiores a 500 mg/L, mientras que el ibuprofeno (F) presentó este mismo efecto por encima de 750 mg/L.

Estudios previos han demostrado que el *trans*-cinamaldehído es un buen antifúngico frente a varios hongos. Fue así como Sivakumar *et al.*, (2002), determinaron que este compuesto a 30 mg/L, inhibió completamente el crecimiento del micelio y previno la germinación de los conidios de *B. theobromae*, *C. gloeosporioides* y *G. microchlamydosporum*; Yen y Chang (2008), demostraron que el *trans*-cinamaldehído a 100 mg/L inhibió completamente el crecimiento de los hongos *Lenzites betulina* y *Laetiporus sulphureus* que intervienen en la pudrición de la madera; y Singh *et al.*, (2007) reportaron que el *trans*-cinamaldehído presentó una inhibición superior al 70% en el crecimiento del micelio de los hongos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium citrinum* y *Penicillium viridicatu*, entre otros.

Así mismo, Pina-Vaz *et al.*, (2000) reportaron que el ibuprofeno (F) presentó actividad contra 12 cepas diferente de la levadura *Candida*, en un intervalo de concentraciones entre 1000-3000 mg/mL; Sanyal *et al.*, (1993), reportaron

actividad de este medicamento contra los hongos dermatofitos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum fulva* y *Epiderrnophyton floccosum*, evaluado en un intervalo de concentración entre 5 - 40 mg/L.

En las figuras 22 y 23 se presentan los porcentajes de inhibición de cada uno de los sustratos en el tiempo. En la figura 22 se puede observar que la concentración máxima de *trans*-cinamaldehído que inhibió hasta un 50% del crecimiento del hongo fue 200 mg/L; mientras que en ibuprofeno (F) fue 250 mg/L. También se observó, que el porcentaje de inhibición de los compuestos disminuyó con el tiempo, por lo cual se puede considerar que el hongo posee un mecanismo de detoxificación.

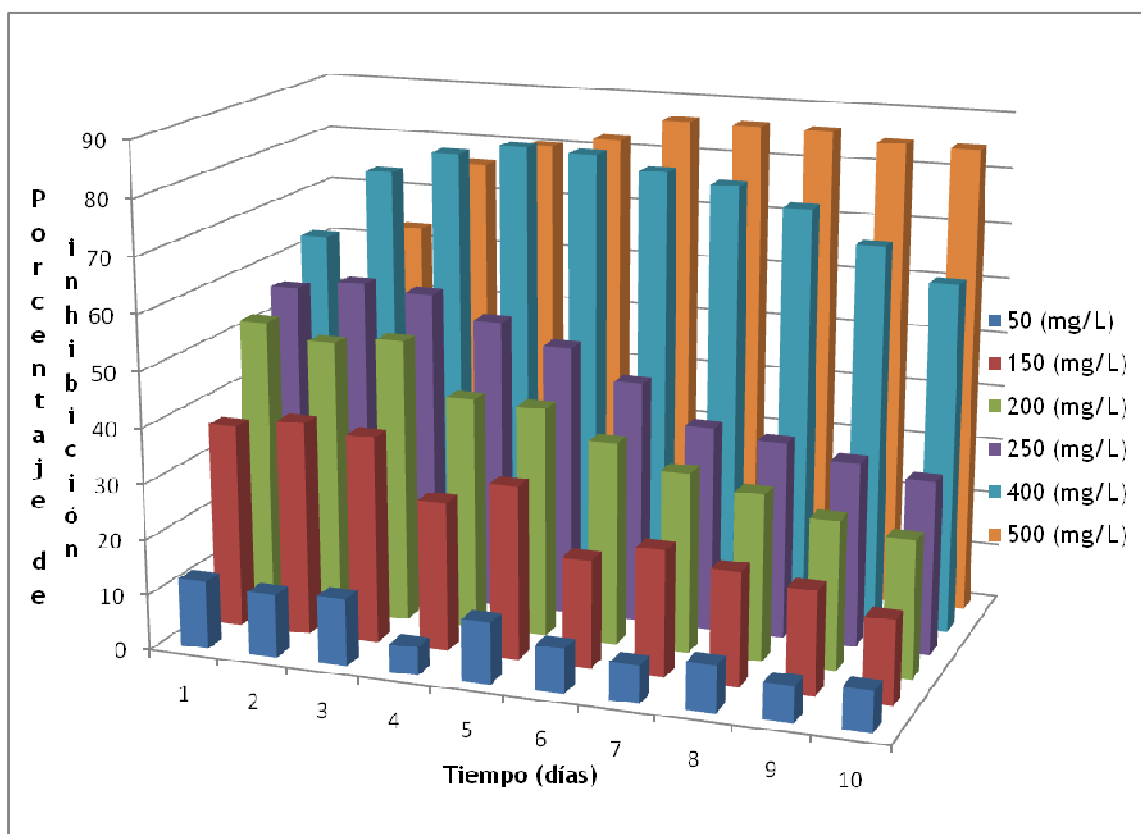


Figura 22. Porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio de *C. acutatum* causado por el *trans*-cinamaldehído

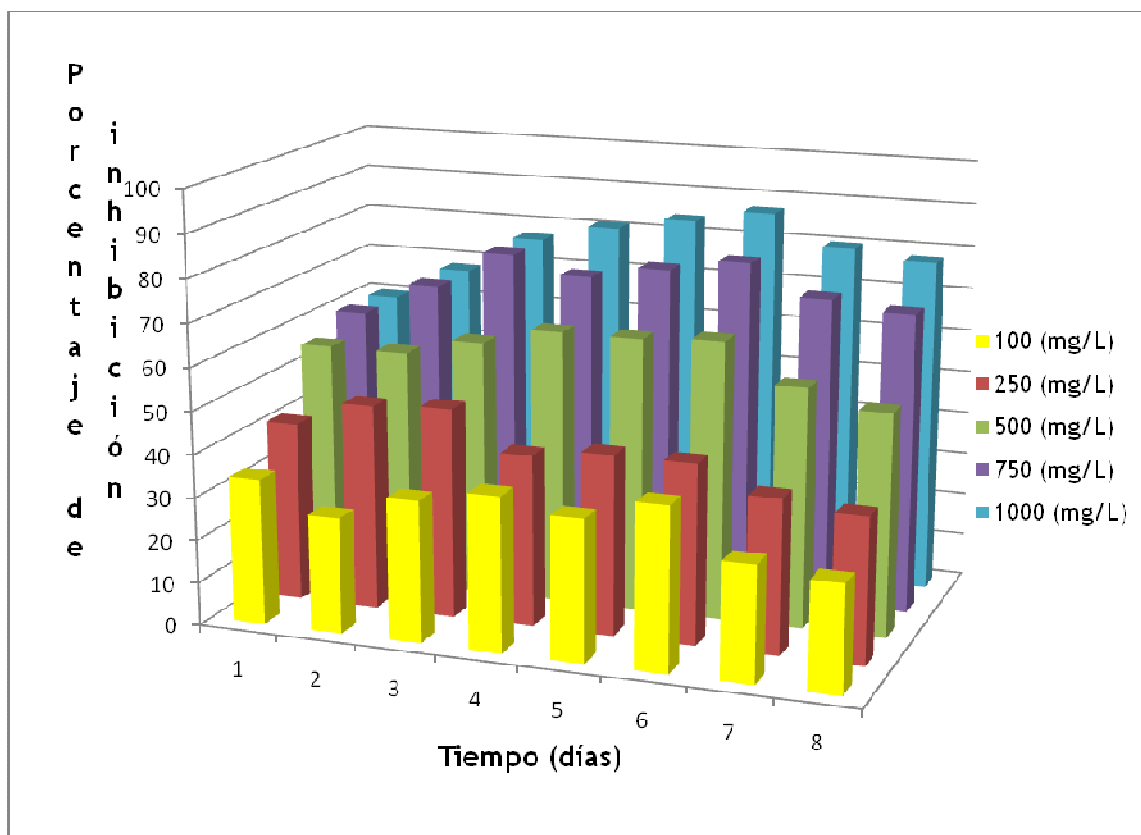


Figura 23. Porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio de *C. acutatum* causado por el ibuprofeno (F)

Así mismo, el promedio del IC₅₀ calculado para los días 3, 4 y 5 del bioensayo fue de 200 mg/L para el *trans*-cinamaldehído y de 250 mg/L para el ibuprofeno (F). Por tal razón, los procesos de biotransformación fueron desarrollados utilizando estas concentraciones.

5.3 BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS SUSTRATOS *trans*-CINAMALDEHÍDO (A) E IBUPROFENO (F)

El proceso de biotransformación se realizó en 6 erlenmeyers de 1L de capacidad, cada uno de los cuales contenía 500 mL de medio de cultivo líquido. El proceso de biotransformación con ibuprofeno (F) a 250 mg/L se mantuvo durante 16 días, mientras que con *trans*-cinamaldehído (A) a 200 mg/L se realizó por 14 días.

5.4 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS PRODUCTO DE LA BIOTRANSFORMACIÓN

En la tabla 2 se presenta la masa (mg) de los extractos obtenidos después de las extracciones líquido-líquido de las biotransformaciones realizadas.

Tabla 2. Peso de los extractos obtenidos en las biotransformaciones

Sustrato	Extracto ¹	Masa (mg)
<i>Trans</i> - cinamaldehído (A)	C-AcOEt-1	1400 (aceite)
	C-AcOEt-2	326
	C-Me ₂ CO	1624.7 (aceite)
Ibuprofeno (F)	AcOEt-1	943
	AcOEt-2	612
	Me ₂ CO	568

¹AcOEt-1=Extracto en acetato de etilo de la fase acuosa; AcOEt-2= Extracto en acetato de etilo del micelio; Me₂CO= Extracto en acetona de la fase acuosa.

5.5 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS MAYORITARIOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL *trans*-CINAMALDEHÍDO (A)

Se procesaron 1400 mg del extracto de C-AcOEt-1 los cuales fueron sometidos a separación a través de cromatografía de columna (CC) con sílica gel o cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) como se presenta en la figura 24.

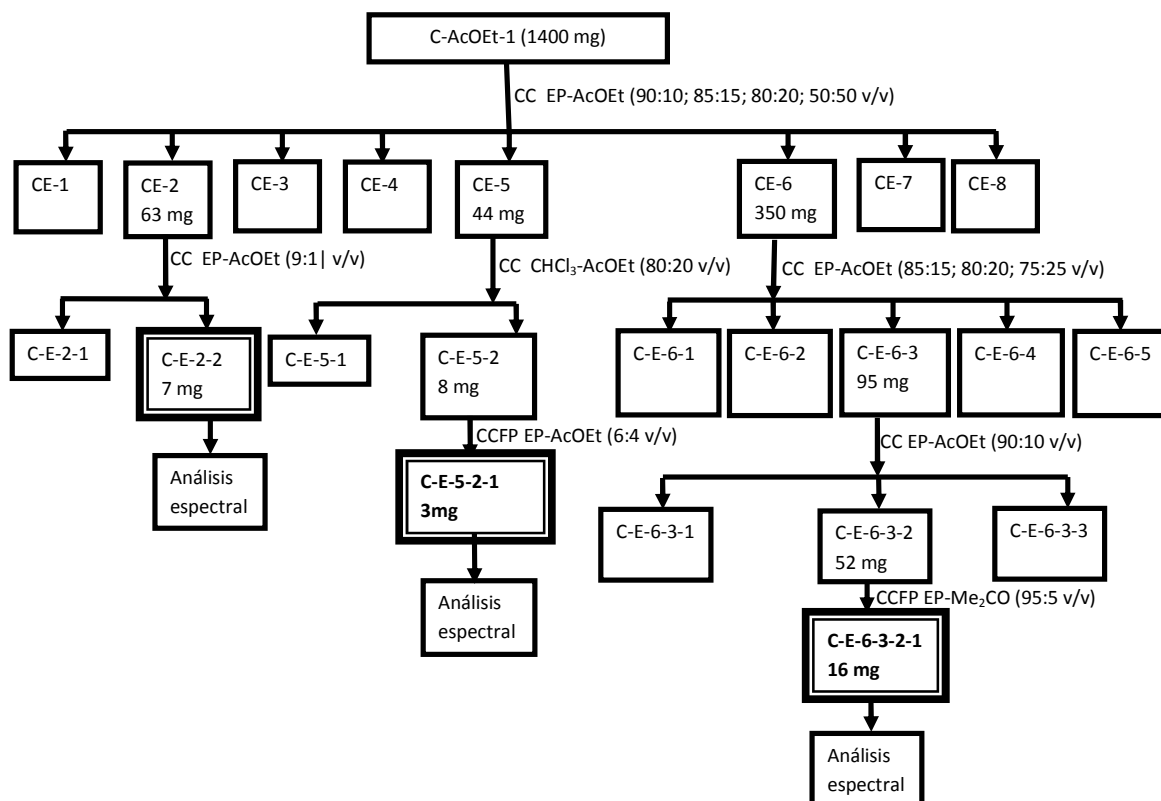


Figura 24. Diagrama de purificación del extracto C-AcOEt-1 para la obtención de los productos de la biotransformación del *trans*-cinamaldehído (A)

5.6 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS METABOLITOS OBTENIDOS EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL *trans*-CINAMALDEHÍDO (A)

Como se observa en la figura 24, se aislaron tres productos de la biotransformación: C-E-2-2, C-E-5-2-1 y C-E-6-3-2-1.

Compuesto C-E-2-2

Aspecto físico: Líquido amarillo.

IR ν_{\max} (CHCl₃) cm⁻¹: 3300 (O-H), 3100-3050 (C-H aromático), 2950 y 2800 (C-H, CH₂ o CH₃), 1800-1950 (sobretonos del benceno), 1620 y 1500 (C=C), 1450 (CH₂ o CH₃), 1200 (O-H), 1050 (C-O), 900 (benceno mono-sustituido) (anexo).

Los desplazamientos químicos de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de este compuesto se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Desplazamiento químico (δ ppm), multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento (J Hz) de RMN ^1H y ^{13}C del producto de la biotransformación C-E-2-2

Carbono*	Desplazamientos Químicos δ (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	3.60 (t, 2H, J = 6.13 Hz)	59.9
2	1.80 (dt, 2H, J = 6.66, 6.82 Hz)	32.1
3	2.62 (t, 2H, J = 7.57 Hz)	30.1
4		139.9
5	7.22-7.26 (m, 5H)	126.3
6	7.22-7.26 (m, 5H)	126.3
7	7.22-7.26 (m, 5H)	123.8
8	7.22-7.26 (m, 5H)	126.3
9	7.22-7.26 (m, 5H)	126.3

* Figura 25

Mediante análisis en CG-EM presentó un tiempo de retención (t_R)= 11.657 min. EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 136 [M^+] (20), 118 [$M-H_2O$] $^+$ (54), 117 [$M-H_2O-$

$H]^+$ (100), 103 $[C_8H_7]^+$ (20), 92 $[C_7H_8]^+$ (34), 91 $[C_7H_7]^+$ (90), 77 $[C_6H_5]^+$ (27), 65 $[C_5H_5]^+$ (20) (Anexo).

El espectro de J-mod mostró la presencia de tres grupos CH_2 de una cadena propilo a $\delta=32.30$, 34.50 y 62.40 ppm, dos señales de CH aromáticos a $\delta=123.8$ y 126.3 ppm y un carbono cuaternario a $\delta=139.9$ ppm. Los tres grupos CH_2 se observaron en el espectro de RMN 1H a $\delta=1.80$, 2.62 y 3.60 ppm, los protones aromáticos se observaron a $\delta=7.22-7.26$ ppm. En el espectro de IR se observó la banda característica del grupo hidroxilo y el espectro de masas mostró un pico a m/z 136.

Mediante comparación de los datos espectroscópicos (IR, RMN 1H Y ^{13}C) y espectrométricos (EM) experimentales, con los reportados en la literatura se sugiere que la estructura del compuesto C-E-2-2 es concordante con la del 3-fenilpropanol (C) (figura 25), lo cual también fue propuesto con la comparación del espectro de masas y la la base de datos NIST 0.2.

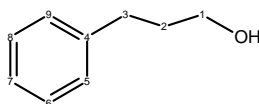


Figura 25. Estructura del 3-fenilpropanol (C)

Compuesto C-E-5-2-1

Aspecto físico: semi-sólido blanco.

IR ν_{max} ($CHCl_3$) cm^{-1} : 3300 (O-H), 3100-3000 (C-H aromático), 2850 (C-H, CH_2 o CH_3), 1950-1800 (sobretonos del benceno), 1500 (C=C), 1450 (CH_2 o CH_3), 1220 (O-H), 1100 y 1000 (C-O), 660 (C=C aromático), 750 (C-H aromático) (anexo).

Los desplazamientos químicos de los espectros de RMN 1H y ^{13}C de este compuesto se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Desplazamiento químico (δ ppm), multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento (J Hz) de RMN ^1H y ^{13}C del producto de biotransformación C-E-5-2-1

Carbono*	Desplazamientos Químicos δ (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	4.25 (d, 2H, J = 5.46 Hz);	61.6
2	6.25 dt, 1H, J = 5.69, 16.0 Hz)	125.6
3	6.50 (d, 1H, J = 15.91 Hz)	129.0
4		134.6
5	7.12-7.30 (m, 5H)	124.3
6	7.12-7.30 (m, 5H)	126.4
7	7.12-7.30 (m, 5H)	126.5
8	7.12-7.30 (m, 5H)	126.4
9	7.12-7.30 (m, 5H)	124.3

*Figura 26

Mediante análisis en CG-EM este compuesto presentó un tiempo de retención (t_R)= 13.462 min. EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 134 [M^+] (82), 115 [$M-H_2O-H$] $^+$ (85), 105 [C_7H_5O] $^+$ (83), 103 [C_8H_7] $^+$ (70), 92 [C_7H_8] $^+$ (100), 91 [C_7H_7] $^+$ (95), 79 [C_6H_7] $^+$ (81), 78 [C_6H_6] $^+$ (91), 77 [C_6H_5] $^+$ (90), 51 [C_4H_3] $^+$ (80) (anexo).

El espectro de ^1H RMN del compuesto C-E-5-2-1 (anexo), presenta dos señales a δ :6.25 y 6.50 ppm que indican la presencia de un grupo vinilo en la molécula y en el espectro J-mod se observan dos señales de CH correspondientes a carbonos de

doble enlace (δ :125.6 y 129.0 ppm). En la región aromática del espectro ^1H RMN se evidencian señales que integran para 5 protones aromáticos (δ :7.12-7.30 ppm), del mismo modo que en el espectro J-mod también se muestran señales correspondientes a 5 CH aromáticos (δ :124.3 y 126.4 ppm) y un carbono cuaternario δ :134.6 ppm. En el espectro de IR se observó la banda característica del grupo hidroxilo y el espectro de masas mostró un pico a m/z 134.

Mediante comparación de los datos espectroscópicos (IR, RMN ^1H Y ^{13}C) y espectrométricos (EM) experimentales con los reportados en la literatura, se sugiere que el compuesto C-E-5-2-1 es concordante con la estructura del alcohol cinamílico (**B**) (figura 26), lo cual también fue propuesto por la comparación del espectro de masas y la base de datos NIST 0.2.

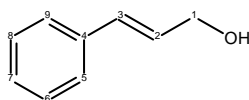


Figura 26. Estructura del alcohol cinamílico (**B**)

El alcohol cinamílico es un producto ampliamente usado en química fina, principalmente en la industria de perfumes, de saborizantes (Liu *et al.*, 1999; Bickers, *et al.*, 2005) y como intermediario farmacéutico (Li *et al.*, 2008). Bickers, *et al.*, (2005) reportaron que se usan de 100-1000 toneladas métricas de este alcohol por año, y debido a la baja toxicidad de este compuesto y algunos de sus esteres (Bickers *et al.*, 2005; Belsito *et al.*, 2008), estos metabolitos se usan cada vez mas en la industria.

Compuesto C-E-6-3-2-1

Aspecto físico: Líquido amarillo.

IR ν_{max} (CHCl_3) cm^{-1} : 3350 (O-H), 2990-2950 (C-H aromático), 2865, 2840 (C-H, CH_2 o CH_3), 1090 (O-H), 1050 (C-O) (anexo).

Los desplazamientos químicos de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de este compuesto se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Desplazamiento químico (δ ppm), multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento (J Hz) de RMN ^1H y ^{13}C del producto de biotransformación C-E-6-3-2-1

Carbono*	Desplazamientos Químicos δ (ppm)	
	^1H	^{13}C
1	3.82 (t, 2H, J = 6.0 Hz)	62.0
2	1.90-2.05 (m, 2H, J = 4.7, 4.98, 8.56 Hz)	41.1
3	4.95 (dd, 1H, J = 3.96, 7.89 Hz)	74.9
4		145.0
5	7.30-7.34 (m, 5H)	126.3
6	7.30-7.34 (m, 5H)	129.2
7	7.30-7.34 (m, 5H)	128.2
8	7.30-7.34 (m, 5H)	129.2
9	7.30-7.34 (m, 5H)	126.3

*Figura 27

Mediante análisis en CG-EM este compuesto presentó un tiempo de retención (t_R)= 16.683 min. EM-IE, m/z (intensidad relativa.) 152 [M^+] (43), 107 [$C_7H_7O^+$] (100), 105 [$C_7H_5O^+$] (38), 79 [$C_6H_7^+$] (92), 78 [$C_6H_6^+$] (24), 77 [$C_6H_5^+$] (68) (anexo).

El espectro de J-mod del compuesto C-E-6-3-2-1 (anexo), mostró la presencia de dos grupos CH_2 a $\delta=41.2$ y 74.9 ppm, cuatro CH, tres de los cuales están en la región aromática ($\delta:126.3, 128.2$ y 129.2 ppm) y el otro a 62.0 ppm, y un carbono cuaternario a $\delta:145.0$ ppm. Los dos grupos CH_2 se observaron en el espectro de RMN 1H a $\delta:1.90$ y 3.82 ppm, los protones aromáticos se presentaron a $\delta:7.30-7.34$ ppm y el otro protón del CH a 4.95 . En el espectro de IR se observó la banda característica del grupo hidroxilo y el espectro de masas mostró un pico a m/z 152.

Mediante comparación de los datos espectroscópicos (IR, RMN 1H Y ^{13}C) y espectrométricos (EM) experimentales con los reportados en la literatura, se sugiere que el compuesto C-E-6-3-2-1 es concordante con la estructura del 3-fenil-1,3-propanodiol (E) (figura 27), lo cual también fue propuesto por la comparación del espectro de masas y la base de datos NIST 0.2.

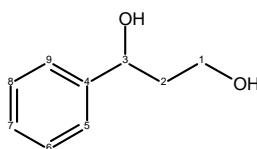


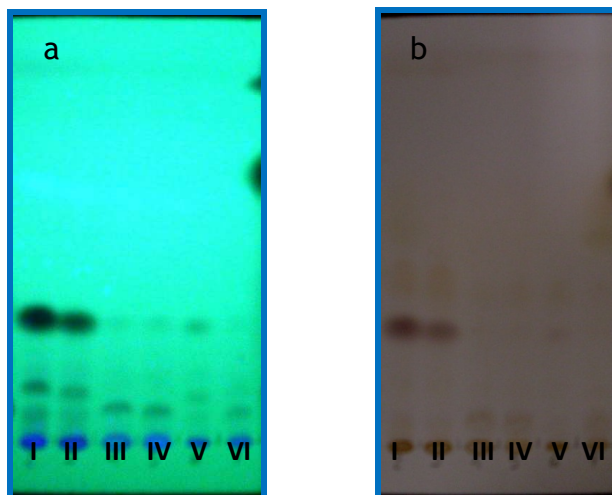
Figura 27. Estructura del 3-fenil-1,3-propanodiol (E)

Según Kira *et al.*, (2009), los alcoholes quirales son precursores importantes en la industria farmacéutica; entre este grupo de moléculas se encuentra el (S)-3-fenil-1,3-propanodiol, el cual es un intermediario usado en la síntesis de agentes terapéuticos tales como la fluoxetina (Prozac®), sustancia empleada en el tratamiento de desordenes siquiátricos y problemas metabólicos (Romeiro, *et al.*, 2003).

El (S)-3-fenil-1,3-propanodiol ha sido sintetizado empleando diversos agentes químicos (Fátima *et al.*, 2005; Roush *et al.*, 1999; Kiyooka *et al.*, 1991; Gao y Sharpless, 1988); sin embargo, dada la dificultad para la obtención de productos ópticamente puros por vías sintéticas y teniendo en cuenta las grandes ventajas que proporcionan los microorganismos en este campo, esta molécula también ha sido producida empleando estos biocatalizadores; Fronza *et al.*, (1991) obtuvieron el mismo diol, empleando levaduras; Kira *et al.*, (2009) evaluaron 321 bacterias, 233 levaduras y 274 hongos, quienes encontraron que 2 cepas de *Williopsis saturnus* var. *mrakii* y 5 cepas de *Cryptococcus albidus* produjeron esta molécula con porcentaje de rendimiento alto (90%) y elevada enantioselectividad (exceso enantiómero [e.e.] > 99%).

5.7 SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN DEL *trans*-CINAMALDEHÍDO (A)

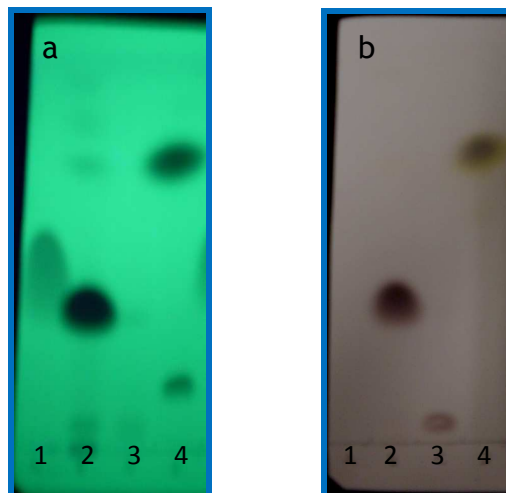
En la figura 28 se presenta la imagen de un cromatograma obtenido con los extractos de los muestreos de la biotransformación del *trans*-cinamaldehído (A). En esta se observa que al segundo día de iniciado el proceso (primer muestreo), ya hay evidencia de la formación de diferentes metabolitos. Así mismo, se puede deducir que durante los 14 días en los que se llevó a cabo el proceso de biotransformación la composición de los extractos no varió considerablemente.



Muestras de: I=2° día, II=4° día, III=6° día, IV=8° día, V=10° día, VI=12° día, VII=14° día

Figura 28. Cromatograma de los muestreos de la biotransformación del *trans*-cinamaldehído (A), con *C. acutatum*. Visualizada con a) luz U.V 365 nm y b) H₂SO₄/EtOH 10%

Al comparar los R_f de los productos obtenidos de la biotransformación de (A): 3-fenilpropanol (C), alcohol cinámico (B) y 3-fenil-1,3-fenilpropanol (E) (figura 29) con los de las manchas presentes en los cromatogramas de los muestreos, se puede deducir que B y C están presentes durante todo el proceso, mientras que E solo se observa a partir del sexto día de la biotransformación.



1= 3-Fenilpropanol (C), 2= Alcohol cinámico (B), 3= 3-Fenil-1,3-propanodiol (E), 4= *trans*-cinamaldehído (A)

Figura 29. Cromatograma de los metabolitos aislados de la biotransformación con *C. acutatum* del *trans*-cinamaldehído (A). Visualizada con a) luz U.V 365 nm y b) revelador universal

Mediante CG-EM y por comparación de los espectros de masas con la base de datos NIST 02; se pudo determinar que el sustrato (A) es transformado rápida y eficientemente por *C. acutatum*. Como se ilustra en la figura 30, a los dos días de iniciado el proceso se evidenciaron dos metabolitos mayoritarios productos de la biotransformación (B y C). Con el avance del proceso de biotransformación, al día décimo, también se observaron los productos minoritarios 3-feniloxirametanol (D) y el 3-fenil-1,3-propanodiol (E), (figura 31).

Los cromatogramas de gases (CG) de los 7 muestreos permitieron obtener la composición porcentual del *trans*-cinnamaldehído (A) y de los productos de la biotransformación (B, C, y E). En la figura 32 se presenta el gráfico que resume el avance del proceso al transcurrir el tiempo.

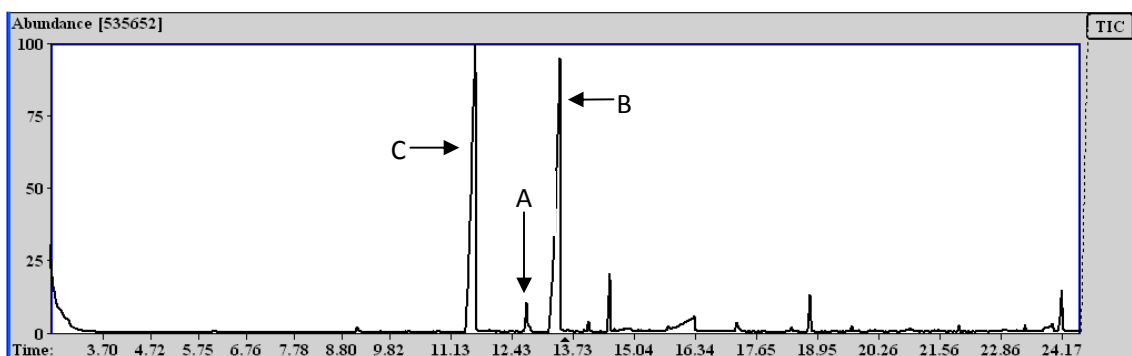


Figura 30. Cromatograma de gases (CG) del muestreo del segundo día de la biotransformación del *trans*-cinamaldehído (A) con *C. acutatum*

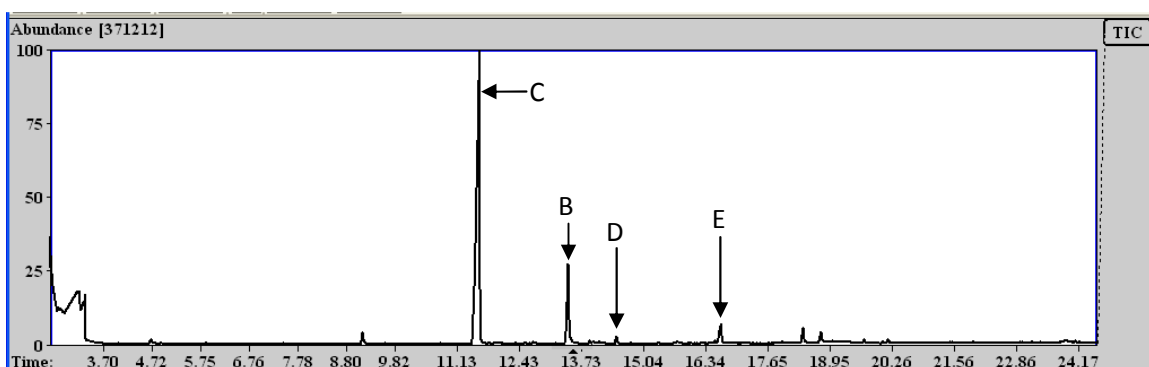


Figura 31. Cromatograma de gases (CG) del muestreo del décimo día de la biotransformación del *trans*-cinamaldehído (A) con *C. acutatum*

De la figura 32 se puede inferir que el *trans*-cinamaldehído (A) es modificado por *C. acutatum* dando origen a dos metabolitos mayoritarios (B) y (C) y uno minoritario (E). Además, debido a que el 90% del sustrato de partida (A) se consumió durante los tres primeros días del proceso, se puede deducir que la biotransformación fue rápida y eficiente. Así mismo, se observó que el metabolito (C) alcanzó su mayor producción nueve días después de iniciado el proceso, mientras que (B) aumentó su concentración a los cuatro días de iniciada la biotransformación, después decreció su abundancia relativa, posiblemente para dar origen al metabolito (E).

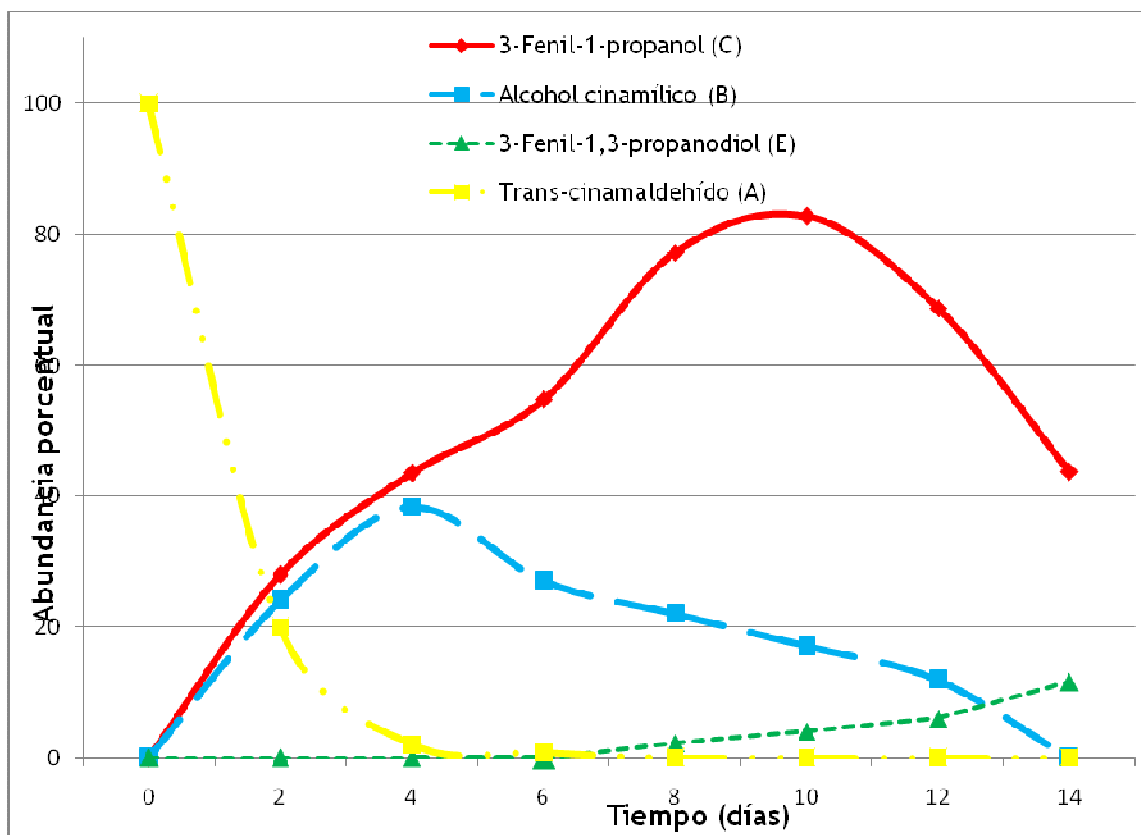


Figura 32. Avance de la biotransformación del *trans*-cinamaldehído (A) por *C. acutatum* en el tiempo

Con la información proporcionada por los experimentos en el curso del tiempo y teniendo en cuenta las estructuras de los productos obtenidos, se planteó una ruta metabólica hipotética para la biotransformación del *trans*-cinamaldehído (A) por el hongo fitopatogénico *C. acutatum* (figura 33).

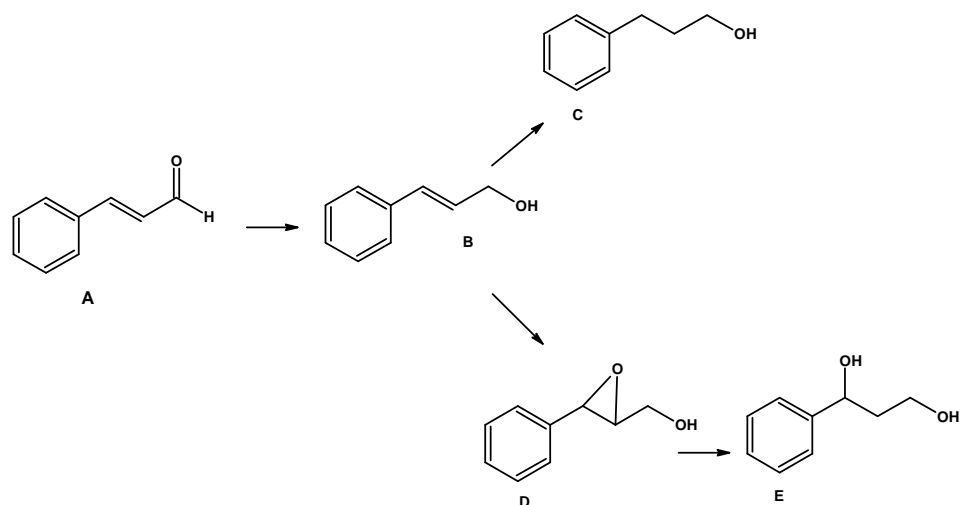


Figura 33. Ruta metabólica hipotética planteada para la biotransformación del *trans*-cinamaldehído (A) por *C. acutatum*

En la ruta metabólica propuesta se observa que para la formación de (B), el sustrato (A) debe sufrir la reducción del grupo carbonilo sin afectar el doble enlace C-C; esto se sugiere basados en la ausencia del compuesto 3-fenilpropanal; lo cual constituye un hallazgo de importancia dado que en síntesis química convencional la hidrogenación selectiva de aldehídos α - β -insaturados para la obtención de los respectivos alcoholes alílicos es de gran relevancia, tanto en el campo académico como en el industrial, debido a la posición destacada de estos compuestos en la química fina y en la industria farmacéutica (Mäki-Arvela *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1999; Gallezot and Richard, 1998).

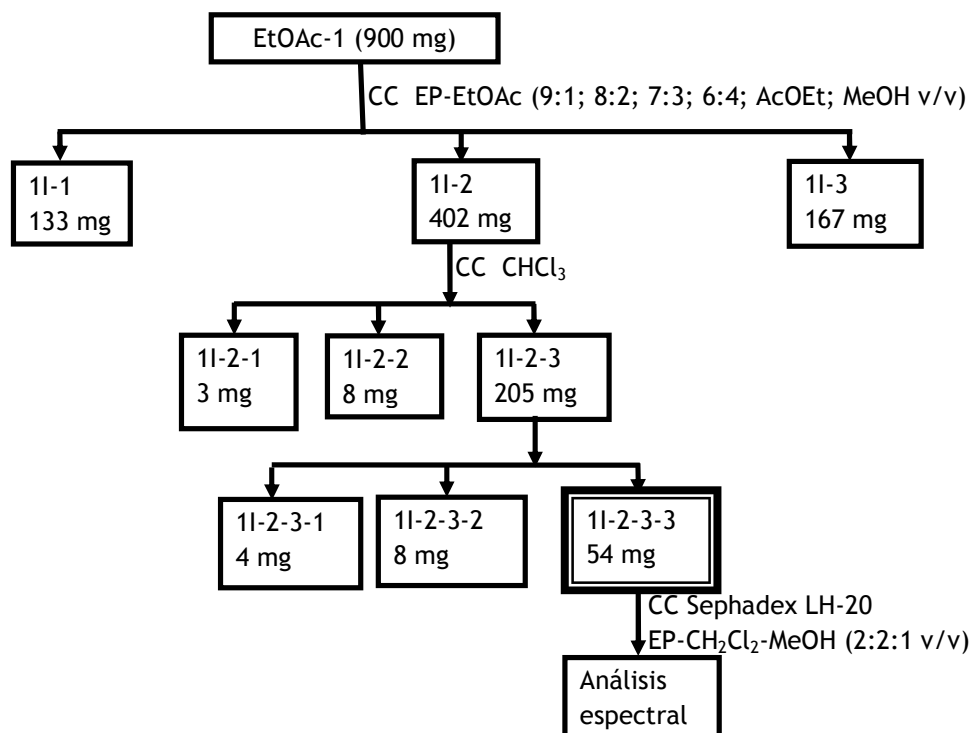
El 3-feniloxiranometano (D), al parecer se origina desde el metabolito (B) mediante una epoxidación; este compuesto se detectó en bajas concentraciones, con valores cercanos al (2%) por CG-EM (figura 12, $t_R=14.626\text{min}$). Se consideró que este compuesto es un intermediario metabólico que mediante la apertura reductiva del anillo oxirano da origen al 3-fenil-1,3-propanodiol (E). El diol formado proviene de la hidroxilación exclusiva de la posición bencílica, con lo cual se sugiere que esta reacción es estereoselectiva.

De acuerdo con Mäki-Arvela *et al.*, (2005), las reducciones selectivas han sido extensamente estudiadas, empleando diversos agentes reductores. La reducción del doble enlace C-C es termodinámicamente mas favorable que la del grupo carbonilo (Liu *et al.*, 1999; Chatterjee *et al.*, 2002) y por este motivo no se facilita la reducción selectiva de aldehídos α - β -insaturados en condiciones de síntesis clásica. En este tipo de estudios el cinamaldehído ha sido ampliamente utilizado como molécula modelo, logrando la obtención del alcohol cinámico con porcentajes variados de selectividad y conversión (Hájek *et al.*, 2005; Lashdaf *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1999); de manera general y a pesar de las múltiples variables controlables y modificables en los procesos que emplean catalizadores inorgánicos, estas reacciones son poco amigables con el ambiente y son difíciles de llevar a cabo, por lo cual se continúan haciendo estudios en esta área.

Esta reducción selectiva no había sido obtenida previamente en biotransformaciones con *C. acutatum*, pero si había sido reportada en plantas. Machado *et al.*, (2006), obtuvieron el alcohol cinámico mediante la biotransformación del cinamaldehído en cultivos celulares de *Manihot esculenta* y *Manihot dulcis* con una bioconversión superior al 90% en tres días; además, Asghari *et al.*, (2004) obtuvieron en cultivos celulares de *Peganum harmala* (Nitrariaceae) el alcohol cinámico con un 80% de rendimiento en 12 horas.

5.8 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS MAYORITARIOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL IBUPROFENO

Se procesaron 900 mg del extracto de AcOEt-1 los cuales fueron sometidos a CC con sílica gel, Sephadex LH-20 como se presenta en la figura 34.



CH_2Cl_2 = Diclorometano; MeOH= Metanol

Figura 34. Diagrama de purificación de los productos de la biotransformación del ibuprofeno (F)

5.9 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS DEL METABOLITO OBTENIDO EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL IBUPROFENO (F)

A partir del extracto AcOEt-1 de este sustrato, se logró aislar el compuesto 11-2-3-3 el cual presentó las siguientes características:

Sólido blanco cuyo punto de fusión fue 124°C .

IR ν_{max} (CHCl_3) cm^{-1} : 3350 (O-H), 2975-2890 (C-H aromático, sobrepuestos con C-H, CH_2 o CH_3), 1675 (C=O), 1380 (CH_2 o CH_3), 1090 (C-O), 880 (C-H), 680 (C=C aromático) (anexo).

Para su análisis por CG-EM el compuesto aislado fue tratado con el reactivo BSTFA+TMCS (Supelco) para obtener el derivado sililado el cual mediante análisis en CG-EM presentó un tiempo de retención (t_R)= 21.707 min. EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 351 $[M-CH_3]^+$ (10), 308 $[(C_{17}H_{24}O_3Si)^+]$ (25), 159 $[C_{12}H_{15}]^+$ (15), 131 $[C_{10}H_{11}]^+$ (100), 117 $[C_9H_9]^+$ (12), 75 $[C_3H_7O_2]^+$ (34), 73 $[C_3H_5O_2]^+$ (96) (anexo).

Los desplazamientos químicos de las señales en los espectros de RMN 1H y ^{13}C de este compuesto se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Desplazamiento químico (δ ppm) multiplicidad (m) y constantes de acoplamiento (j Hz) de RMN 1H y ^{13}C del producto de biotransformación 11-2-3-3

Carbono	Desplazamientos Químicos δ (ppm)	
	1H	^{13}C
1		
2	3.6 (c, 1H, J = 7.17 Hz)	
3	1.35 (d, 3H, J = 7.17 Hz)	16.049
4		136.002
5	7.15 (m, 2H, J = 6.33 Hz)	125.197
6	7.05 (m, 2H, J = 8.08 Hz)	128.635
7		134.668
8	7.05 (m, 2H, J = 8.08 Hz)	128.635
9	7.15 (m, 2H, J = 6.33 Hz)	125.197
10	2.6 (s, 2H)	47.121

Carbono	Desplazamientos Químicos δ (ppm)	
11		68.780
12	1.1 (s, 6H)	27.013
13	1.1 (s, 6H)	27.013

* Figura 35

El compuesto 11-2-3-3, únicamente se diferencia del ibuprofeno por la desaparición del CH del isobutilo. Las señales a δ : 1,1 y 1,35 ppm en el espectro de RMN de ^1H , indican la existencia de tres grupos metilos geminales en la molécula, los cuales se evidencian en el espectro J-mod a δ 27,01 y 16,04 ppm. En la región aromática del espectro de RMN de ^1H aparecen señales que integran para 4 protones aromáticos (δ : 7,05 y 7,15 ppm), del mismo modo que en el espectro de RMN J-mod se muestran señales correspondientes a 4 CH aromáticos (δ : 125.197 y 128.635 ppm) y señales a δ : 136.002 y 134.668 ppm atribuidas a carbonos cuaternarios aromáticos. En el espectro de RMN de ^1H también se evidencia un grupo CH_2 a δ : 2.6 ppm y un CH a δ : 3.6 ppm. En el espectro de IR se evidenciaron señales características del grupo O-H y del grupo C=O.

Mediante comparación de los datos espectroscópicos (IR, RMN ^1H Y ^{13}C) y espectrométricos (EM) experimentales, con los reportados en la literatura, se sugiere que la estructura del compuesto 11-2-3-3 corresponde al ácido-2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico (G) (figura 35), lo cual fue reafirmado por comparación del espectro de masas (anexo) con el espectro reportado por Bennet *et al.*, (1992).

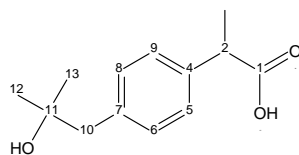
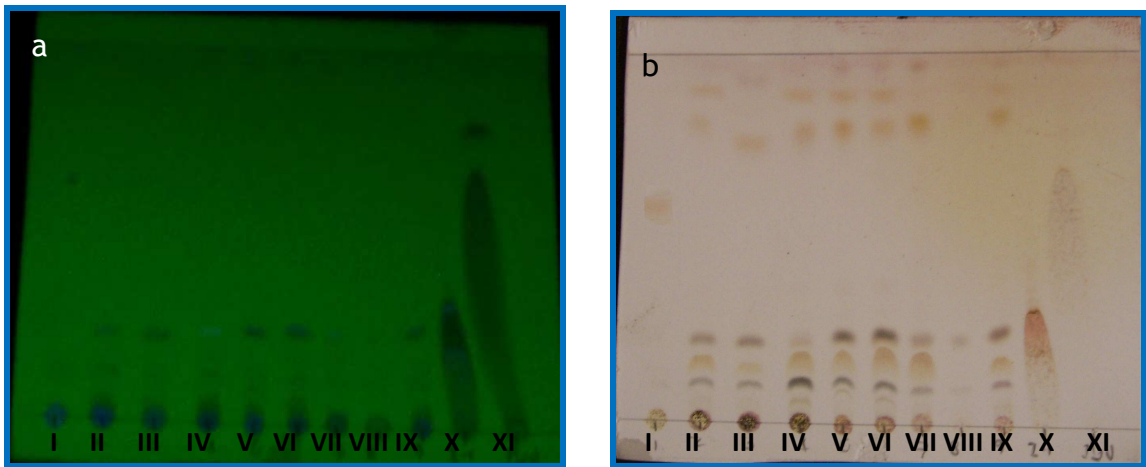


Figura 35. Estructura del ácido-2-[4-(2-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico (G)

5.10 AVANCE DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL IBUPROFENO (F)

En la figura 36 se muestra la imagen del cromatograma de los 8 muestreos obtenidos en la biotransformación del ibuprofeno (F), el metabolito aislado (G) y el sustrato biotransformado (F). En esta se observa que el ibuprofeno (F) no se detectó desde el cuarto día del proceso, y que los posibles metabolitos productos de la biotransformación se mantuvieron constantes a través el tiempo. Además, se observa que de todos los compuestos visualizados con el revelador universal tan solo dos ($R_f=0$ y $R_f=0.25$) presentaron la misma coloración a la del ibuprofeno (F) y del ácido-2-[4-(2-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico (G) a λ 365 nm (mancha roja).

Mediante CG-EM y por comparación con los espectros de masas con la base de datos NIST 02; se pudo apreciar que el sustrato (F) fue consumido en su totalidad antes del cuarto día de iniciado el proceso de biotransformación. Como se ilustra en las figuras 37 y 38, el ibuprofeno (F) esta presente en el muestreo del segundo día, pero en el del cuarto día solo se visualizó el metabolito producto de la biotransformación (G). Por lo tanto, se puede inferir que *C. acutatum* transformó rápida y eficientemente el ibuprofeno (F).



Muestras de: I=2° día, II=4° día, III=6° día, IV=8° día, V=10° día, VI=12° día, VII=14° día, VIII=16° día, IX=16° día, X= ácido-2-[4-(2-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico (G), XI=ibuprofeno (F)

Figura 36. Cromatograma de los muestreos de la biotransformación del ibuprofeno (F) con *C. acutatum*. Revelada con a) luz U.V 365 nm y b) revelador universal

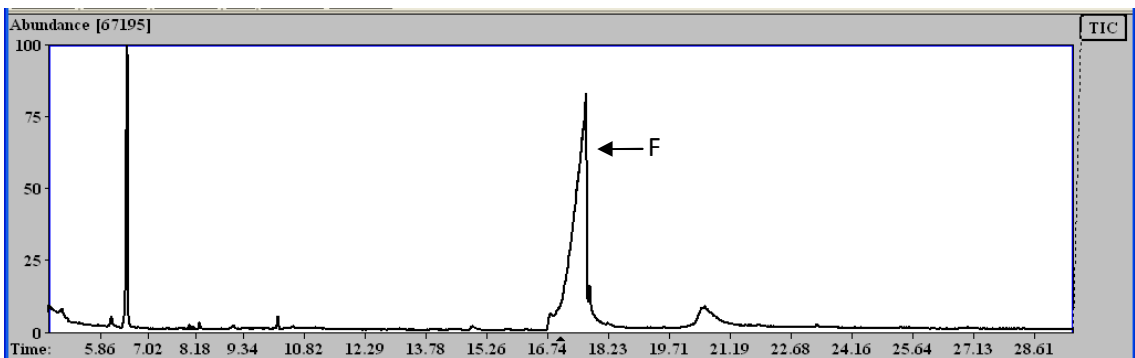


Figura 37. Cromatograma de gases del muestreo del día 2 de la biotransformación del ibuprofeno (F) con *C. acutatum*

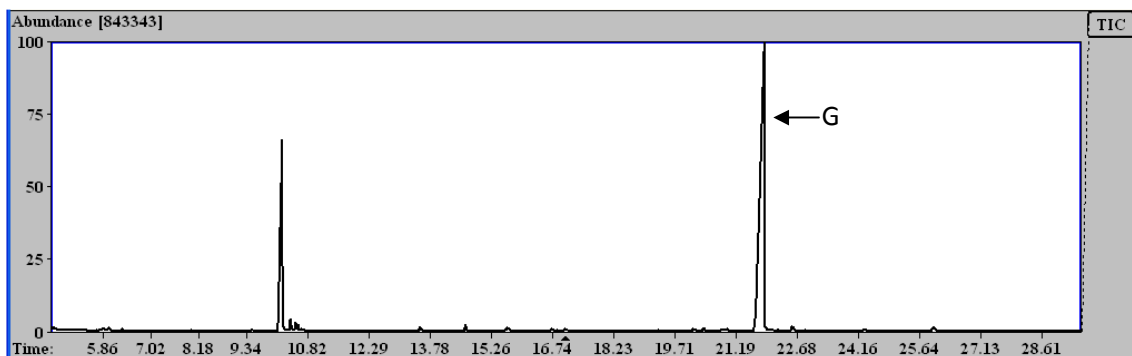


Figura 38. Cromatograma de gases del muestreo del día 16 de la biotransformación del ibuprofeno (F) con *C. acutatum*

Los CG de los 8 muestreos permitieron obtener la composición porcentual del ibuprofeno (F) y el ácido-2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico (G). En la figura 39 se presenta el gráfico que resume el avance del progreso de la biotransformación.

El ácido-2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico (G), único producto de la biotransformación del ibuprofeno (F) con *C. acutatum*, no había sido reportado previamente en trabajos con lipasas (Contesini *et al.*, 2006; Cárdenas *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2000; Ducret *et al.*, 1998; López-Belmonte *et al.*, 1997; Kim and Lee, 1996; Lee *et al.*, 1995; Arroyo and Sinisterra, 1994), ni en la biotransformación con *Nocardia* sp. (Chen and Rossana, 1994). Este metabolito ha sido obtenido como uno de los productos mayoritarios del metabolismo del ibuprofeno en humanos (Clayton *et al.*, 1998; Bennetta *et al.*, 1992; Rudy *et al.*, 1990; Chai, *et al.*, 1988; Nicoll-Griffith *et al.*, 1988).

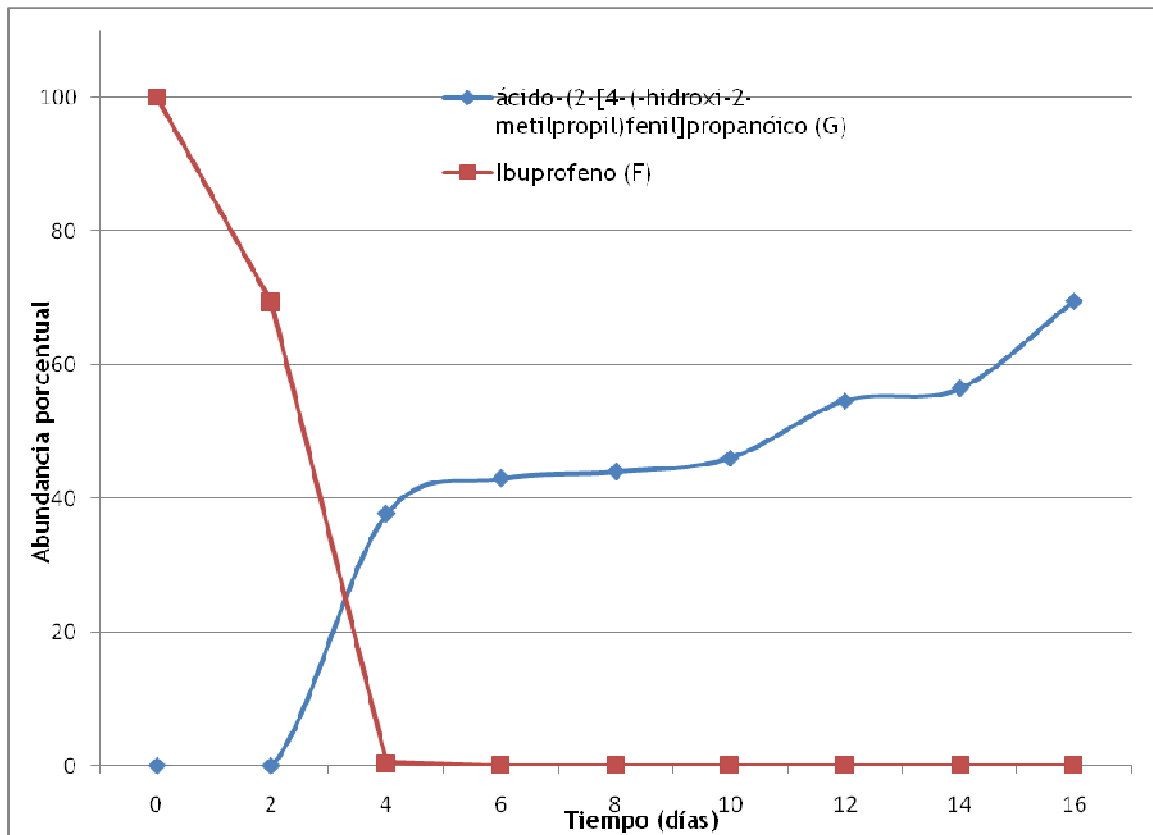


Figura 39. Avance de la biotransformación del ibuprofeno (F) por *C. acutatum* en el tiempo

Es conocido que mediante biotransformaciones con microorganismos se ponen a prueba medicamentos con el fin de obtener los metabolitos productos del metabolismo en cantidades apropiadas para facilitar la elucidación estructural y determinar la toxicología de ellos. Esto se logra dado que el sistema de biotransformación microbiano es muy similar a las reacciones metabólicas de la fase I en mamíferos (Borges *et al.*, 2008). El producto obtenido en la biotransformación de ibuprofeno con *C. acutatum* sugiere que este fitopatógeno podría tener un sistema metabólico similar al de mamíferos y por tal razón podría ser empleado en el estudio de medicamentos.

6. CONCLUSIONES

De la biotransformación del *trans*-cinamaldehído (A) con el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum* fueron obtenidos tres productos, las cuales fueron identificadas como: 3-fenilpropanol (C), alcohol cinámico (B) y 3-fenil-1,3-propanodiol (D), a partir de esta última molécula se puede deducir que la hidroxilación realizada por el hongo sobre el doble enlace C-C, se dio únicamente en la posición bencílica, con lo cual se propone que la reacción fue regioselectiva (figura 40). Además, con la obtención del alcohol cinámico, se puede concluir, que la maquinaria enzimática del hongo realizó la reducción selectiva del *trans*-cinamaldehído (figura 40), lo cual demuestra el potencial y la importancia de *C. acutatum* para realizar este tipo de reacciones, con las que se pueden obtener compuestos difíciles de producir mediante síntesis convencional y que pueden tener alto valor comercial.

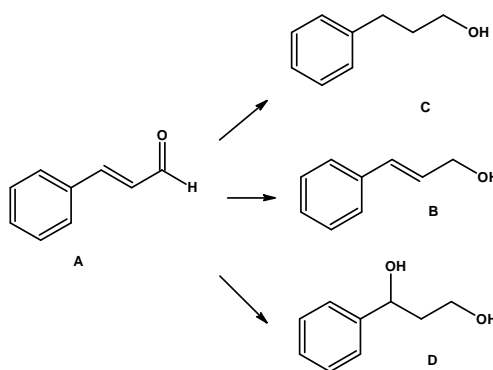


Figura 40. Productos obtenidos en la biotransformación del *trans*-cinamaldehído con *C. acutatum*

Así mismo, tanto el ácido-2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico, producto obtenido en la biotransformación del ibuprofeno, como los productos obtenidos de la biotransformación del *trans*-cinamaldehído, sugieren que el hongo fitopatógeno *C. acutatum* tiene la capacidad de hidroxilar cadenas alquílicas en

arenos y reducir tanto el grupo carbonilo como el doble enlace C-C, resultados que concuerdan con los reportes realizados por Aristizabal *et al.*, (2008), quienes con este mismo hongo fitopatógeno, obtuvieron moléculas modificadas en el sistema aromático y en los sustituyentes alquílicos.

A pesar de que las enzimas que catalizan la biotransformación del *trans*-cinamaldehído y del ibuprofeno, no están identificadas, se puede hipotizar que en estas bioconversiones podrían estar implicadas las monooxigenasas y las epóxido hidrolasas. Una epoxidación y una hidrólisis similar de un doble enlace C-C en la cadena lateral de un propenilbenceno, fue reportada en la transformación del isoegunol (Hua *et al.*, 2007) y en la del *trans*-anetol (Ryu *et al.*, 2005). Así mismo, es de resaltar que el producto obtenido en la biotransformación del ibuprofeno fue hidrolizado en la posición β de la cadena alquílica lateral del benceno, y no en la α (figura 41), la cual, según estudios llevados a cabo con monooxigenasas son oxidadas en mayor proporción (Adam *et al.*, 2000).

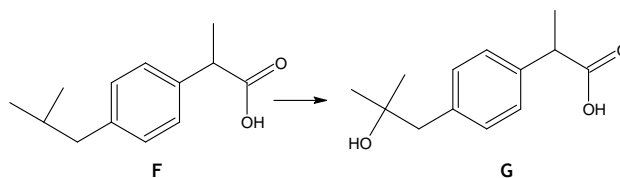


Figura 41. Productos obtenidos en la biotransformación del ibuprofeno con *C. acutatum*

7. BIBLIOGRAFIA

Adam, W., Lukacs, Z., Harmsen, D., Saha-Moller, C.R., and Schreier, P. Biocatalytic Asymmetric Hydroxylation of Hydrocarbons with the Topsoil-Microorganism *Bacillus megaterium*. 2000. *The Journal of Organic Chemistry*. 65, 878-882.

Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., and Freeman, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. 2003. *Phytopathology*. 93, 579-587.

Akihisa, T., Watanabe, K., Yoneima, R., Suzuki, T., and Kimura, Y. Biotransformation of cycloartane-type triterpenes by the fungus *Glomerella fusarioides*. 2006. *Journal of Natural Products*. 69, 604-607.

Akihisa, T., Hamasaki, Y., Tokuda, H., Ukiya, M., Kimura, Y., Nishino, H. Microbial transformation of isosteviol and inhibitory effects on epstein-barr virus activation of the transformation products. 2004. *Journal of Natural Products*. 67, 407-410.

Álvarez, E., Ospina, C.A., Mejía, J.F. y Llano, G.A. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanabana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. 2004. *Fitopatología Colombiana*, 28, 1-8.

Aristizábal, D.A., Lezcano, C.S., García, C.M. and Durango, D.L. Biotransformación de los sustratos 2-feniletanol y acetofenona con el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*. 2008. *Revista Colombiana de Química*. 37, 7-19.

Arroyo, M. and Sinisterra, J.V. High Enantioselective Esterification of 2-Arylpropionic Acids Catalyzed by Immobilized Lipase from *Candida antarctica*: A Mechanistic Approach. 1994. The Journal of Organic Chemistry. 59, 4410-4417.

Asghari, G., Saidfar, G. and Mahmudi, S. Biotransformation of Aromatic Aldehydes by Cell Cultures of *Peganum harmala* L. and *Silybum marianum* (L.) Gaertn. 2004. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2, 127-130.

Babu, P.S., Prabuseenivasan, S. and Ignacimuthu, S. Cinnamaldehyde—A potential antidiabetic agent. 2007. Phytomedicine 14, 15-22.

Bastos, D.Z.L., Pimentel, I.C., Jesús, D.A., Oliveira, B.H. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. 2007. Phytochemistry. 68, 834-839.

Bastos, D.Z.L. Biotransformação por fungus do ácido betulínico e derivados. Tesis de Doutor. Curitiba. 2005. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química. 117p

Belsito, D., Bickers, D., Bruze, M., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J.M., Rogers, A.E., Saurat, J.H., Sipes, I.G. and Tagami, H. A toxicologic and dermatologic assessment of related esters and alcohols of cinnamic acid and cinnamyl alcohol when used as fragrance ingredients. 2007. Food and Chemical Toxicology. 45, S1-S23.

Bennetta, M.J., Sherwood, W.G., Bhalab, A. and Haleb, D.E. Identification of urinary metabolites of (\pm)-2-(*p*-isobutylphenyl)propionic acid (Ibuprofen) by routine organic acid screening. 1992. Clinica Chimica Acta. 210, 55-62.

Bickers, D., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J.M., Rogers, A.E., Saurat, J.H., Sipes, I.G., Smith, R.L. and Tagami, H. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. 2005. Food and Chemical Toxicology. 43, 799-836.

Boaventura, M.A., Lopes, R. and Takahashi, J. Microorganisms as tools in modern chemistry: the biotransformation of 3-indolylacetonitrile and tryptamine by fungi. 2004. Brazilian Journal of Microbiology. 35, 345-347.

Borges, K.B., Borges, S.W., Pupo, M.T., Bonato, P.S. Thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of *rac*-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. 2008. Journal Pharmacology Biomedical Analysis. 46, 945-952.

Bracht, A. K., Alvarez, M., Bracht, A. Effects of *Stevia rebaudiana* natural products on rat liver mitochondria. 1985. Biochemical Pharmacology. 34, 873-882.

Burton, S.G., Cowan, D.A., Woodley, J.M. The search for the ideal biocatalyst. 2002. Nature Biotechnology. 20, 37-45.

Bustillo, A.J., García, C.M., Aleu, J., Hernández, R., Collado, I. Studies on biotransformation of (\pm)-1-(4-chlorophenyl)-2-phenylethanol. 2003. Tetrahedron: Asymmetry. 14, 3755-3760.

Verrall, M.S. and Warr, S.R. Scale-up of Natural Products Isolation. En: Cannell, R.J.P. Natural Products Isolation: Methods in Biotechnology. 1998. New Jersey: Glaxo Wellcome Research & Development, Stevenage, Herts, UK. p 409-424.

Cann, M.C. and Connelly, M.E. The BHC company synthesis of ibuprofen. A greener synthesis of ibuprofen which creates less Waste and fewer byproducts real world cases in green chemistry. 2000. American Chemical Society: Washington, DC. 19-24.

Cannon, P.F., Bridge, P.D. and Monte, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. En: Prusky, D., Freeman, S. and Dickman, M.B. *Colletotrichum*: host specificity, pathology and host-pathogen interaction. 2000. APS Press. St Paul, USA. p 1-20.

Cárdenas, F., Alvarez, E., de Castro-Alvarez, M.S., Sanchez, J.M., Valmaseda, M., Elson, S.W. and Sinisterra, J.V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. 2001. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 14, 111-123.

Chai, B., Minkler, P. E. and Hoppel, C.L. Determination of ibuprofen and its major metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography. 1988. *Journal of Chromatography*. 430, 93-101.

Chatterjee, M., Ikushima, Y. and Zhao, F-Y. Highly efficient hydrogenation of cinnamaldehyde catalized by Pt-MCM-48 in supercritical carbon dioxide. 2002. *Catalysis Letters*. 82, 141-144.

Chen, Y. and Rosazza, J.P. Microbial Transformation of Ibuprofen by a Nocardia Species. 1994. *Applied And Environmental Microbiology*, Apr., 1292-1296.

Cheng, S-S., Liu, J-Y., Chang, E-H. and Chang, S-T. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. 2008. *Bioresource Technology*. 99, 5145-5149.

Cheng, S.S., Liu, J.Y., Hsui, Y.R. and Chang, S.T. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). 2006. *Bioresour. Technol.* 97, 306-312.

Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. and Wothers, P. *Organic Chemistry*. En: Stereochemistry. 2001. New York: Oxford, University Press. 1512. p. p.402-403.

Clayton, E., Taylor, S., Wright, B. and Wilson, I.D. The Application of High Performance Liquid Chromatography, Coupled to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry (HPLC-NMR-MS), to the Characterisation of Ibuprofen Metabolites from Human Urine. 1998. *Chromatographia*. 47, 264-270.

Collado, I. G.; Hanson, J. R.; Macías, A. J. and Mobbs, D. The biotransformation of some clovanes by *Botrytis cinerea*. 1998. Journal of Natural Products. 61, 1348-1351.

Contesini, F.J. and de Oliveira Carvalho, P. Esterification of (RS)-Ibuprofen by native and commercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. 2006. Tetrahedron: Asymmetry. 17, 2069-2073.

Council of Europe. Partial Agreement in the Social and Public Health Field. Chemically-defined Flavouring Substances. Groups: 2.2 aromatic alcohols, 5.2 aromatic aldehydes, 8.2 aromatic acids. 2000. Pages 74, 119, 205. Numbers, 22, 65, 102. Council of Europe Publishing, Strasbourg.

Daoubi, M., Deligeorgopoulou, A., Macías-Sánchez, A.J., Hernández-Galán, R. Hitchcock, P.B., Hanson, J.R., Collado, I.G. Antifungal activity and biotransformation of diisophorone by *Botrytis cinerea*. 2005a. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 53, 6035-6039.

Daoubi, M., Hernández, R., Benharref, A. and Collado, I. Screening Study of Lead Compounds for Natural Product-Based Fungicides: Antifungal Activity and Biotransformation of 6 α ,7 α -Dihydroxy- β -himachalene by *Botrytis cinerea*. 2005b. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 53, 6673-6677.

Davies, J. Small molecules: The lexicon of biodiversity. 2007. Journal of Biotechnology. 129, 3-5.

Ducret, A., Trani, M. and Lortie, R. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. 1998. Enzyme and Microbial Technology. 22, 212-216.

Eap, C.B., Koeb, L., Powell, K., Baumann, P. Determination of the enantiomers of thioridazine, thioridazine 2-sulfone, and of the isomeric pairs of thioridazine

2-sulfoxide and thioridazine 5-sulfoxide in human plasma. 1995. Journal of Chromatography B. 669, 271-279.

El Haj, B.M., Al Ainri, A.M., Hassan, M.H., Bin Khadem, R.K. and Marzouq, M.S. The GC/MS analysis of some commonly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical dosage forms and in urine. 1999. Forensic Science International. 105, 141-153.

Fátima de, A., Augusto, A., Lapis, M. and Pilli, R.A. A Concise Total Synthesis of (R)-Fluoxetine, a Potent and Selective Serotonin Reuptake Inhibitor. 2005. Journal of the Mexican Chemical Society. 49, 257-261.

FDA (Food and Drug Administration). Code of Federal Regulations, 21 CFR 172.515. Title 21-Food and Drugs, vol. 3, Chapter 172- Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Part 172-Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption. Subpart F-Flavoring Agents and Related Substances, 515-Synthetic Flavoring Substances and Adjuvants.

FDA (Food and Drug Administration). Code of Federal Regulations, 21 CFR 182.60. Title 21-Food and Drugs, vol. 3, Chapter I-Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Part 182-Substances Generally Recognized as Safe. Subpart A--General Provisions, 60-Synthetic Flavoring Substances and Adjuvants.

Fernández, M.T., Fernández, M., Casares, A., Rodríguez, R., Fueyo, M. Bean germplasm evaluation for anthracnose resistance and characterization of agronomic traits: A new physiological strain of *C. lindemuthianum* infecting *Phaseolus vulgaris* L in Spain. 2000. Euphytica. 114, 143-149.

Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., and Shabi, E. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. 2000. *Phytopathology*. 90, 608-614.

Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. Characterization of *colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. 1998. *Plant Disease*. 82, 596-605.

Fronza, G., Fuganti, C., Grasselli, P. and Mele, A. The mode of bakers' yeast transformation of 3-chloropropiophenone and related ketones. Synthesis of (2S)-[2-2H]propiofenone, (R)-fluoxetine, and (R)- and (S)-fenfluramine. 1991. *The Journal of Organic Chemistry*. 56, 6019-6023.

Gallezot, P. and Richard, D. Selective hydrogenation of α,β -unsaturated aldehydes. 1998. *Catalysis Reviews*. 40, 81-126.

Gao, Y. and Sharpless, K.B. Asymmetric synthesis of both enantiomers of tomoxetine and fluoxetine. Selective reduction of 2,3-epoxycinnamyl alcohol with Red-Al Y. *The Journal of Organic Chemistry*. 1988. 53, 4081-4084.

García, A., Fernández, A., Gutiérrez, M.C., Martínez, A., Quirós, R., Rivas, F. and Arias, J.M. Biotransformation of ent-13-epi-manoyl oxides difunctionalized at C-3 and C-12 by filamentous fungi. 2004. *Phytochemistry*. 65, 107-115.

García, C.M., Hernández, R., Collado, I. Biotransformations by *Colletotrichum* species. 2003. *Tetrahedron: Asymmetry*. 14, 1229-1239.

García, C.M. Aislamiento y determinación estructural de los metabolitos secundarios y de biotransformación del hongo fitopatógeno *colletotrichum gloeosporioides* (penz.) penz y sacc. 2001. Tesis doctoral. Cádiz: Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. 384p.

Ghosh, s., Sachan, A., Sen, S.K. and Mitra, A. Microbial transformation of ferulic acid to vanillic acid by *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637. 2007. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 34,131-138.

Ghoumari, H., Benajiba, M-H., García, A., Fernández, A., Martínez, A., Rivas, F. and Arias, J.M. Biotransformations of ent-18-acetoxy-6-ketomanoyl oxides epimers at C-13 with filamentous fungi. 2006. Phytochemistry. 67, 2294-2302.

Hájek, J., Kumar, N., Salmi, T. and Murzin, D.Y. Short overview on the application of metal-modified molecular sieves in selective hydrogenation of cinnamaldehyde. 2005. Catalysis Today. 100, 349-353.

Hanson, J.R. (1995). An introduction to biotransformations in organic chemistry. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, New York. 92 p.

Hua, D., Ma, C., Lin, S., Song, L., Deng, Z., Maomy, Z., Zhang, Z., Yu, B. and Xu,P. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: Identification of major metabolites. 2007. Journal of Biotechnology. 130, 463-470.

Ishii, E.L., Schwab, A.J., Bracht, A. Inhibition of monosaccharide transport in the intact rat-liver by stevioside. 1987. Biochemical Pharmacology. 36, 1417-1433.

JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives). Cinnamyl alcohol and related flavouring agents. WHO Food Additives Series: 46. Prepared by the Fifty-fifth meeting of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives, 2000. June 6-15, Geneva, Switzerland. World Health Organization.

Kim, M.G. and Lee, S.B. Enzymatic Resolution of Racemic Ibuprofen by Lipase-Catalyzed Esterification Reaction: Effects of Water Content and Solid Supports. 1996. Journal of Fermentation and Bioengineering. 81, 269-271.

Kira, I., Suzuki, T., Onishi, N., Watanabe, K. and Nakanishi, E. Microbial production of (S)-1-phenyl-1,3-propanediol by stereospecific reduction of 3-hydroxy-1-phenylpropane-1-one. 2009. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 56, 283-287.

Krishna, G.N., Ganesh, M.R., Anitha, R. and Aravind, S. Complete Reduction of 2H-Pyran-2-one moiety of coumarin and 6-methyl coumarin by *Colletotrichum capsici*. 2004. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 59c, 405-407.

Lamm, A.S., Reynolds, W.F. and Reese, P.B. Bioconversion of *Stemodia maritima* diterpenes and derivatives by *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* and *Phanerochaete chrysosporium*. 2006. *Phytochemistry*. 67, 1088-1093.

Lashdaf, M., Krause, A.O.I., Lindblad, M., Tiitta, M. and Venäläinen, T. Behaviour of palladium and ruthenium catalysts on alumina and silica prepared by gas and liquid phase deposition in cinnamaldehyde hydrogenation. 2003. *Applied Catalysis A: General*. 241, 65-75.

Lee, H.S. Inhibitory activity of *Cinnamomum casia* bark-derived component against rat liver aldose reductase. 2002. *Journal of Pharm Pharmacologic Science*. 5, 226-230.

Lee, W.H., Kim, K.J., Kim, M.G., and Lee, S.B. Enzymatic resolution of racemic ibuprofen esters: effect of organic cosolvents and temperature. 1995. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80, 613-615.

Li, Y., Zhu, P-F. and Zhou, R-X. Selective hydrogenation of cinnamaldehyde to cinnamyl alcohol with carbon nanotubes supported Pt-Co catalysts. 2008. *Applied Surface Science*. 254, 2609-2614.

Liu, Y., Wang, F. and Tan, T. Effects of alcohol and solvent on the performance of lipase from *Candida* sp. in enantioselective esterification of racemic ibuprofen. 2009. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 56, 126-130.

Liu, Z., Weis, R., Gleider, A. Enzymes from higher eukaryotes for industrial biocatalysis. 2004. Food Technology Biotechnology 42, 237-249.

Liu, B., Lu, L., Cai, T., and Iwatani, K. Selective hydrogenation of cinnamaldehyde over Raney cobalt catalysts modified with salts of heteropolyacids. 1999. Applied Catalysis A: General. 180, 105-111.

López-Belmonte, M.T., Alcántara, A.R. and Sinisterra, J.V. Enantioselective Esterification of 2-Arylpropionic Acids Catalyzed by Immobilized *Rhizomucor miehei* Lipase. 1997. The Journal of Organic Chemistry. 62, 1831-1840.

Luna, H. Biocatalysis application for preparing intermediates for drug synthesis. 2004. Revista de la Sociedad de Química Mexicana. 48, 211-219.

Mäki-Arvela, P., Hájek, J., Salmi, T. and Murzin, D.Y. Chemoselective hydrogenation of carbonyl compounds over heterogeneous catalysts. 1995. Applied Catalysis A: General. 292, 1-49.

Machado, L.L., Souza, J.S., de Mattos, M.C., Sakata, S.K., Cordell, G.A., and Lemos, T.L. Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species. 2006. Phytochemistry. 67, 1637-1643.

Makowski, R.M.D. and Mortensen, K. The first mycoherbicide in Canada: *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Malvae* for round-leaved mallow control. En: Richardson, R.G. Proceedings of the First International Weed Control. 1992. Congress. CAB International, Wallingford, UK. p 298-300.

Meneses, E.A. Caracterización química y evaluación de la actividad antifúngica del propóleo recolectado en el apiario de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. 2006. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Medellín: Facultad de Ciencias-Departamento de Biotecnología.

Miyazawa, M. and Sakata, K. Biotransformation of (1)-cycloisolongifolol by plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. 2007. Natural Product Research, 21, 455-460.

Miyazawa, M., and Sugawara, A. Biotransformation of α -bulnesene using a plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata* as a biocatalyst. 2005. Natural Product Research. 19, 111-115

Miyazawa, M., Takahashi, K. and Araki, H. Biotransformation of daidzein ditiglate by microorganisms. 2002. Natural Product Research. 20, 311-315.

Miyazawa, M., Akazawa, S-I., Sakai, H. and Nankai, H. Biotransformation of (-)-dihydromyrcenyl acetate using the plant parasitic fungus *Glomerella cingulata* as a biocatalyst. 2000. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 48, 4826-4829.

Miyazawa, M., Suzuki, Y. and Kameoka, H. Biotransformation of (-)- and (+)-isopinocampheol by three fungi. 1997a. Phytochemistry. 45, 945-950.

Miyazawa, M., Suzuki, Y. and Kameoka, H. Biotransformation of (-)-cis-myrtanol and (+)-z-ransmyrtanol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. 1997b. Phytochemistry. 45, 935-943.

Miyazawa, M., Nankai, H., and Kameoka, H. Biotransformations of acyclic terpenoids, (\pm)-*trans*-nerolidol and geranylacetone, by *Glomerella cingulata*. 1996. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 44, 1543-1547.

Nankai, H., Miyazawa, M., Akazawa, S. and Kameoka, H. Biotransformation of (\pm)-lavandulol by the plant pathogenic fungus *glomerella cingulata*. 1998. Journal of Agriculture Food and Chemistry. 46, 3858-3862.

Nicoll-Griffith, D.A., Inaba, T., Tang, B.K. and Kalow, W. Method to determine the enantiomers of ibuprofen from human urine by high-performance liquid chromatography. 1988. Journal of Chromatography. 428, 103-112.

Ortíz, Y., Spengler, I., Collado I., Hernández-Galán, R. The Antifungal activity of widdrol and its biotransformation by *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Penz. & Sacc. and *Botrytis cinerea*. 2006. Pers. Fr. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 54, 7517-7521.

Ouattara, B., Sabato, S.F. and Lacroix, M. Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.). 2001. International Journal of Food Microbiology. 68, 1- 9.

Peres, N.A., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E. and Correll, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. 2005. Plant Disease, 89, 784-796.

Pina-Vaz, C., Sansonetty, F., Rodrigues, A.G., Martinez-de-Oliveira, J., Fonseca, A.F., Mardh, P-A. Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination to fluconazole against *Candida* species. 2000. Journal of Medical Microbiology. 49, 831-840.

Rhys-Williams, W., McCarthy, F., Baker, J., Hung, Y-F., Thomason, M.J., Lloyd, A.W. and Hanlon, G.W. A mechanistic investigation into the microbial chiral inversion of 2-arylpropionic acids using deuterated derivatives of 2-phenylpropionic acid. 1998. Enzyme and Microbial Technology. 22, 281-287.

Rodríguez, A., Batlle, R. and Nerín, C. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. 2007. Part II Progress in Organic Coatings. 60, 33-38.

Romano, A., Romano, D., Ragg, E., Costantino, F., Lenna, R., Gandolfi, R., Molinaria, F. Steroid hydroxylations with *Botryodiplodia malorum* and *Colletotrichum lini*. 2006. Steroids. 71, 29-434.

Romeiro, L.A., Fraga, C.A. e Barreiro, E. Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da depressão: uma visão da química medicinal. 2003. Quimica Nova. 26, 347-358.

Roush, W.R., Hoong, L.K., Palmer, M. and Park, J.C. Asymmetric synthesis using tartrate ester modified allylboronates. 1. Factors influencing stereoselectivity The Journal of Organic Chemistry. 1990. 55, 4109-4117.

Rudy, A.C., Anliker, K.S. and Hall, S.D. High-performance liquid chromatographic determination of the stereoisomeric metabolites of ibuprofen. 1990. Journal of Chromatography. 528, 395-405.

Ryu, J., Seo, J., Lee, Y., Lim, Y., Ahn, J-H. and Hur, H-G. *Trans*-Anethole by the Newly Isolated Bacterium *Pseudomonas putida* JYR-1. 2005. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 53, 5954-5958.

Sachan, A., Ghosh, S. and Mitra, A. Biotransformation of p-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*. 2006. Letters in Applied Microbiology. 42, 35-41.

Sánchez, A., Valero, F., Lafuente, J. and Solà, C. Highly enantioselective esterification of racemic ibuprofen in a packed bed reactor using immobilised *Rhizomucor miehei* lipase. 2000. Enzyme and Microbial Technology. 27, 157-166.

Sanyal, A.K., Chowdhury D.R.B. and Banerjee, A.B. Ibuprofen, a unique anti-inflammatory compound with antifungal activity against dermatophytes. 1993. Letters in Applied Microbiology. 17, 109-111.

Serra, S., Fuganti, C. and Brenna, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. 2005. Trends in Biotechnology. 23, 193-198.

Sharma, S.K., Husain, M., Kumar, R., Samuelson, L.A., Kumar, J., Watterson, A.C., Virinder, S. Biocatalytic routes toward pharmaceutically important precursors and novel polymeric systems. 2005. Pure Applied Chemistry. 77, 209-226.

Shaw, N.M., Robins, K.T., Kiener, A. Lonza: 20 years of biotransformations. 2003. Adv. Synth. Catal. 345, 425-435.

Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. 2001. *Nature*. 409, 258-268.

Schoemaker, H.E., Mink, D., Wubbolts, M.G. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. 2003. *Science*. 299, 1694-1697.

Shimoda, K., Kondo, Y., Nishida, T., Hamada, H., Nakajima, N. and Hamada, H. Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. 2006. *Phytochemistry*. 67, 2256-2261.

Singh, G., Maurya, S., de Lampasona, M.P. and Catalan, C. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. 2007. *Food and Chemical Toxicology*. 45, 1650-1661.

Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R.S., Wijesundera, R.L.C. and Abeyesekere, M. Control of postharvest diseases of rambutan using cinnamaldehyde. 2002. *Crop Protection*. 21, 847-852.

Tung, S., Chollet, E., Chalier, P., Preziosi-Belloy, L. and Gontard, N. Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of *Penicillium notatum*. 2007. *International Journal of Food Microbiology*. 113, 263-270.

Veit, T. Biocatalysis for the production of cosmetic ingredients. 2004. *Eng. Life Science*. 4, 508-511.

Vinnere O, Fatehi J, Wright SAI and Gerhardson B. The causal agent of anthracnose of *Rhododendron* in Sweden and Latvia. 2002. *Mycological Research*. 106, 60-69.

Waller, J.M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. En: Bailey J.A. and Jeger, M.J. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. 1992. CAB International, Wallingford, UK. pp. 167-185.

Wang, S-Y., Chen, P-F. and Chang, S-T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. 2005. *Bioresource Technology*. 96, 813-818.

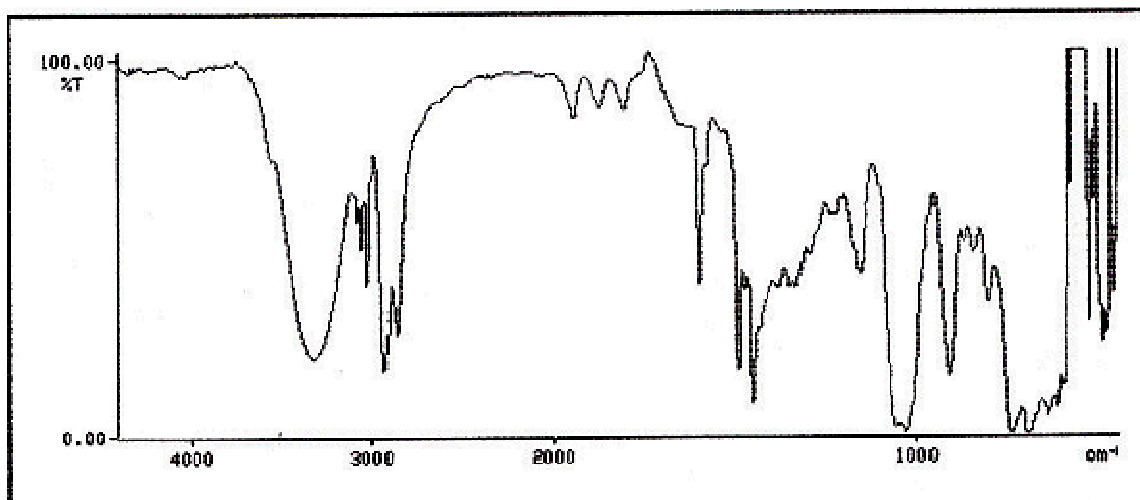
Weissinger, W.R., McWatters, K.H., Beuchat, L.R. Evaluation of volatile chemical treatments for lethality to *Salmonella* on alfalfa seeds and sprouts. 2001. *Journal of Food Protection*. 64, 442-450.

Xu, P., Hua, D. and Ma, C. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. 2007. *Trends in Biotechnology*. 25, 571-576.

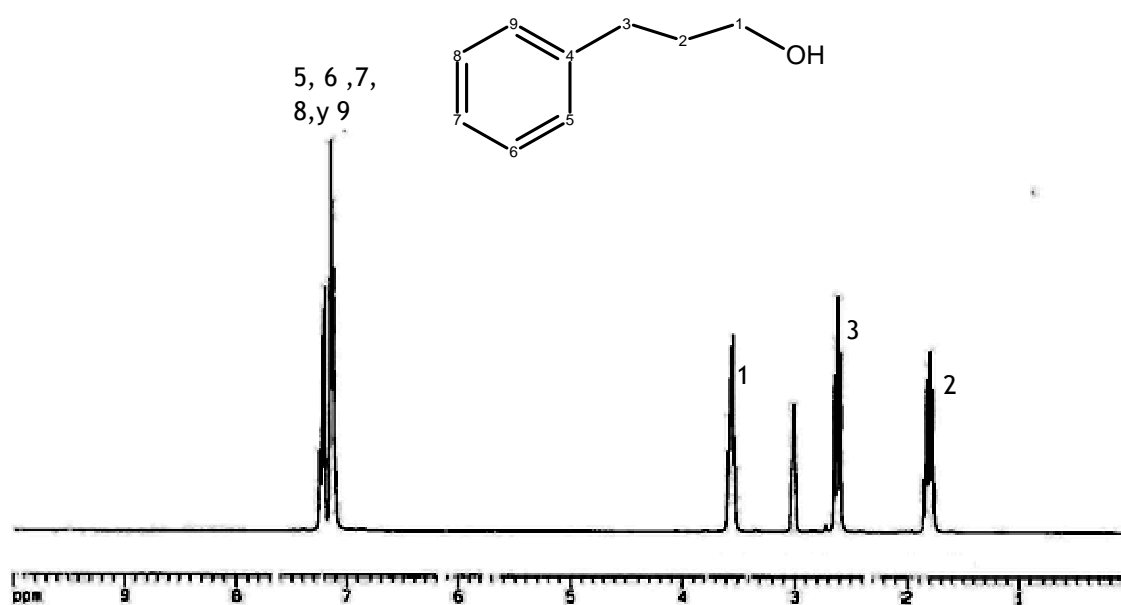
Yamamoto, N. S., Bracht, A.K., Ishii, E. L., Kimmelmeier, F. S., Alvarez, M., Bracht, A. Effect of steviol and its structural analogues on glucose production and oxygen uptake in rat renal tubules. 1985. *Experientia*. 41, 55-57.

Yen, T-B. and Chang, S-T. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. 2008. *Bioresource Technology*. 99, 232-236.

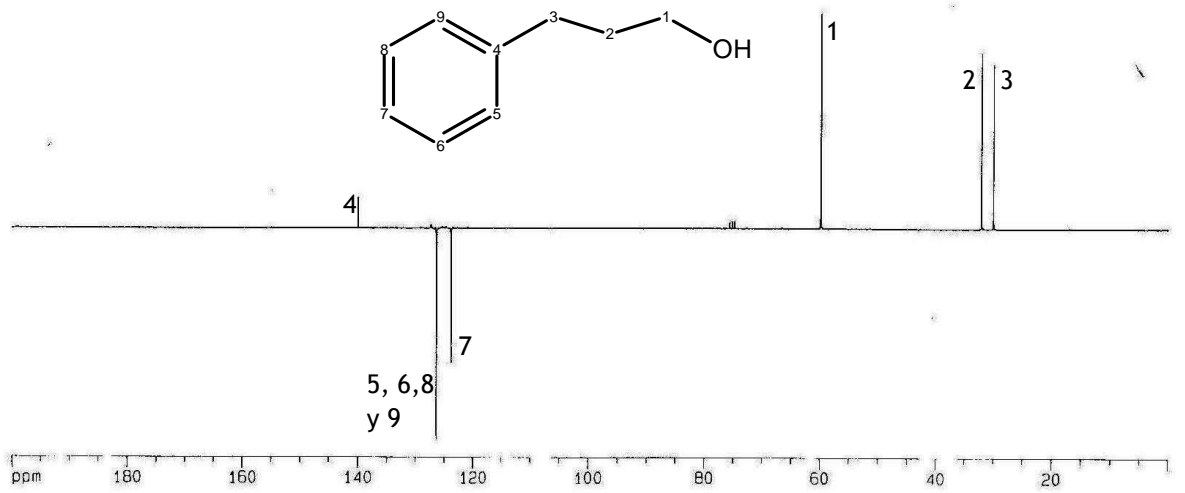
8. ANEXOS



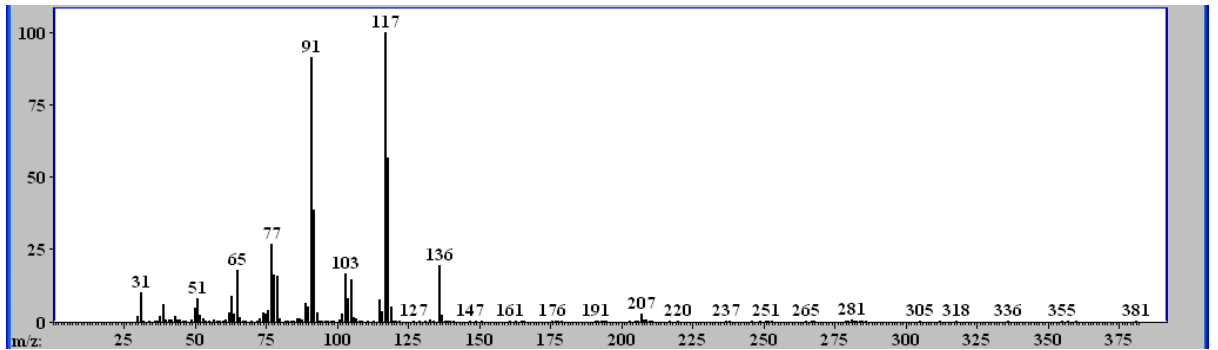
Espectro de infrarrojo del 3-fenilpropanol



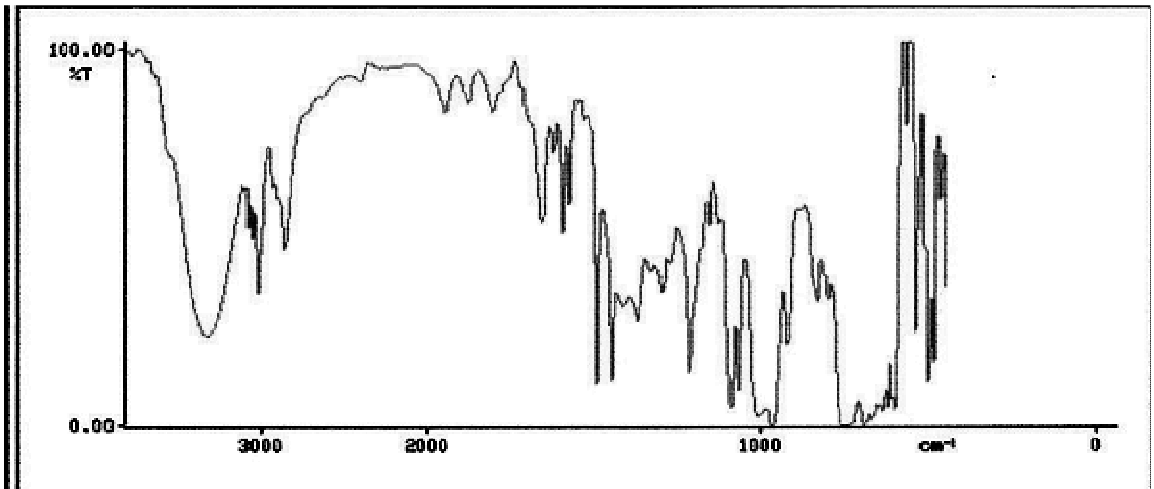
Espectro ^1H RMN del 3-fenilpropanol (CDCl_3 -200MHz)



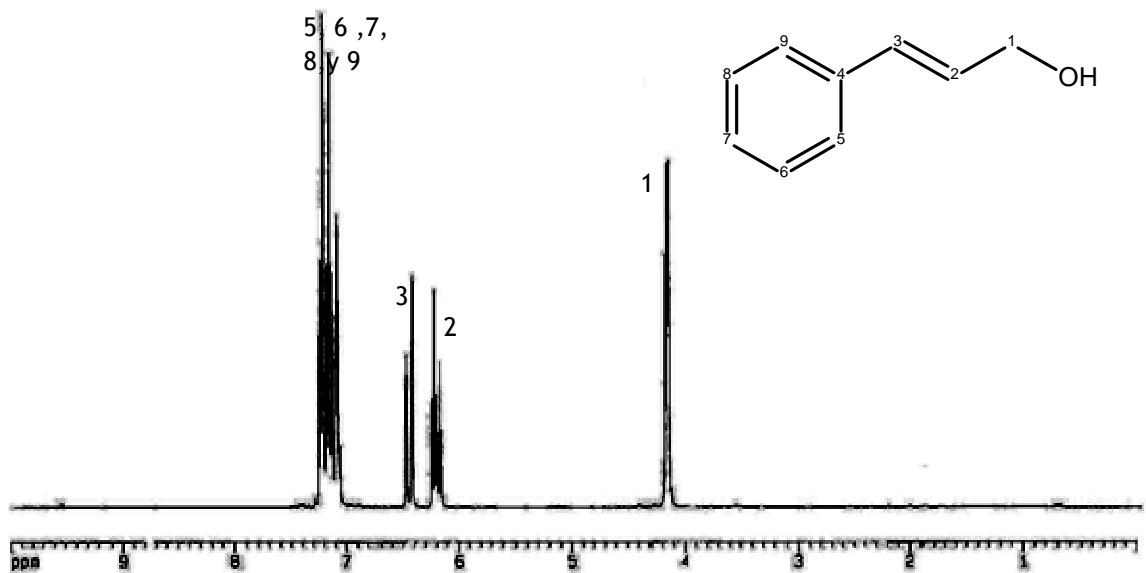
Espectro J-mod RMN del 3-fenilpropanol (CDCl₃-200MHz)



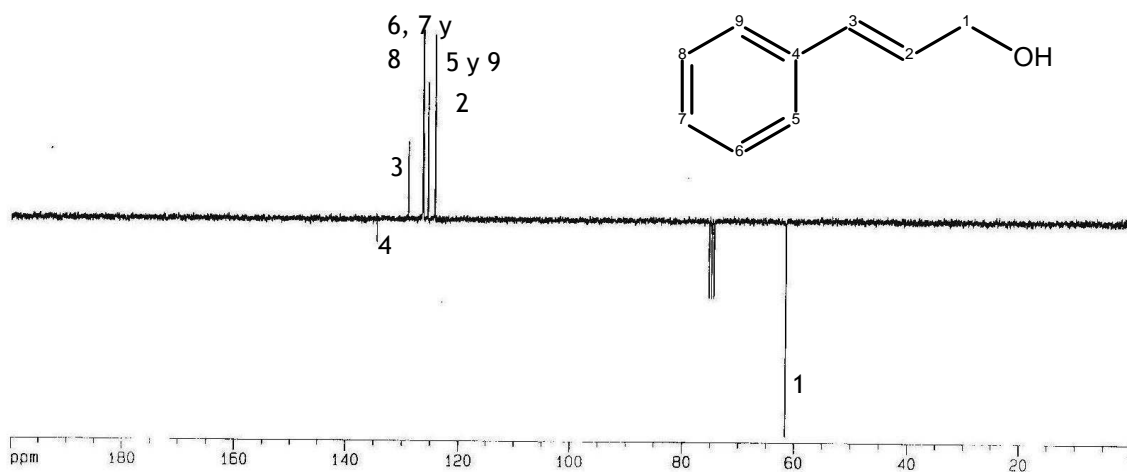
Espectro de masas del 3-fenilpropanol



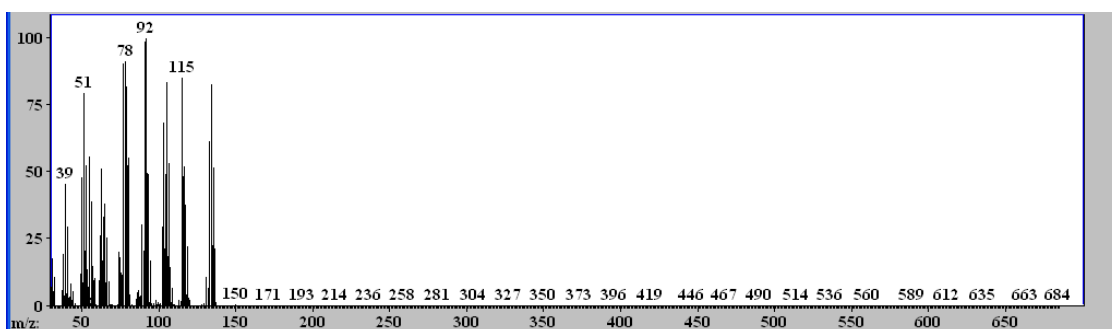
Espectro de infrarrojo del alcohol cinámico



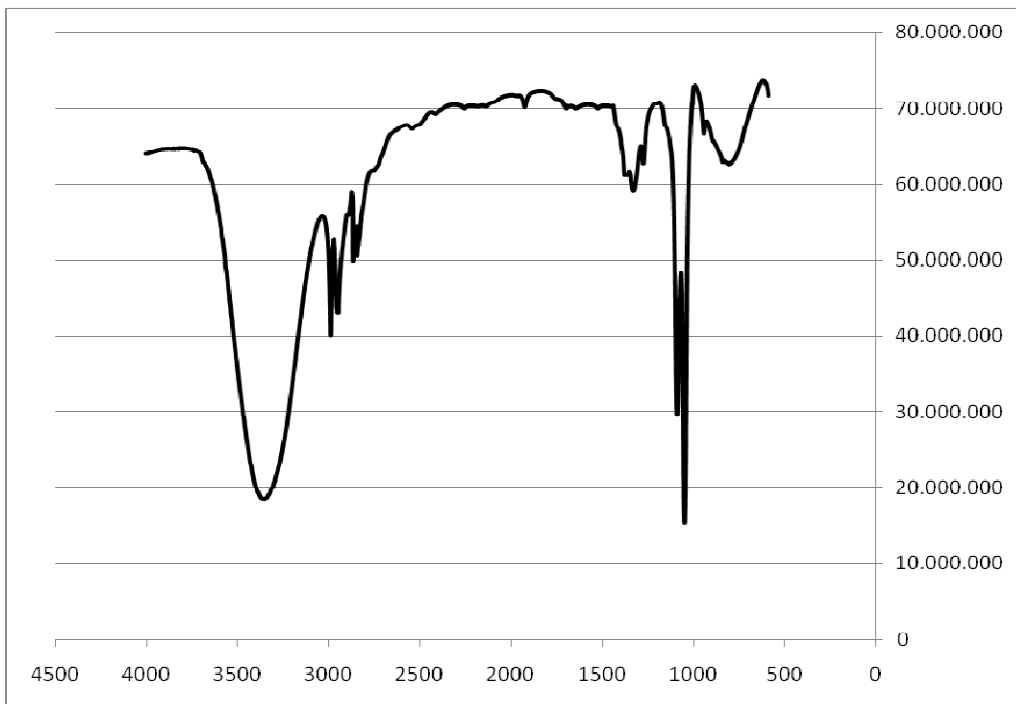
Espectro ^1H RMN del alcohol cinámico (CDCl_3 -200MHz)



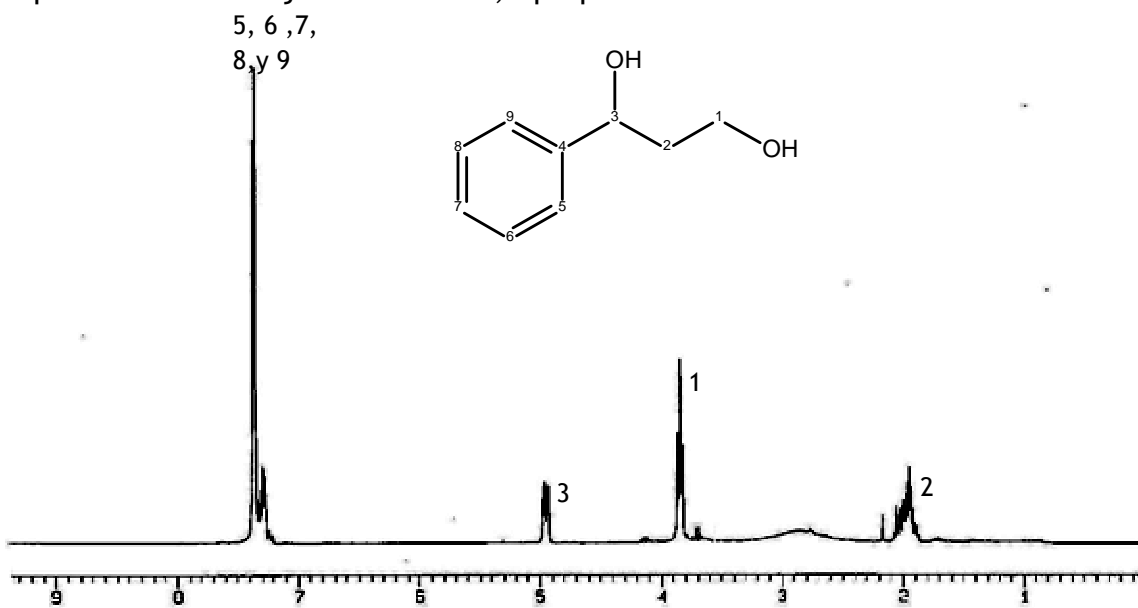
Espectro J-mod RMN del alcohol cinámico (CDCl₃-200MHz)



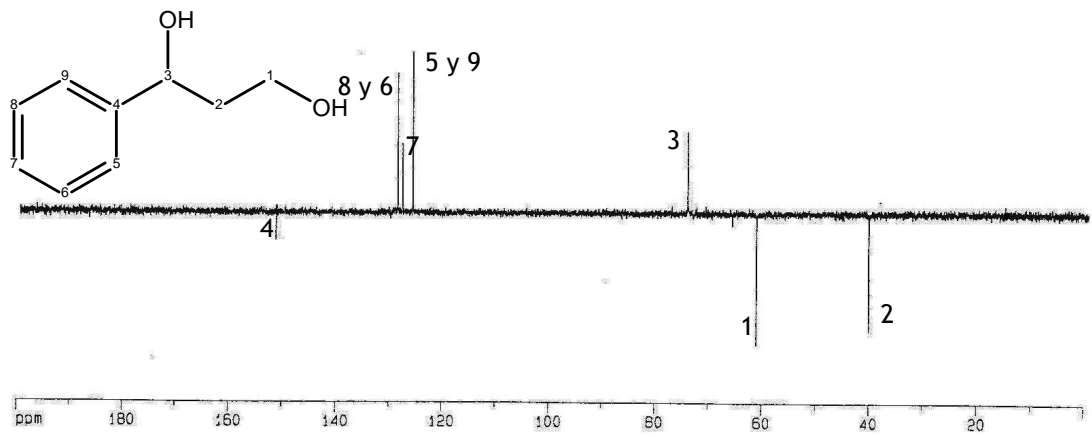
Espectro de masas del alcohol cinámico



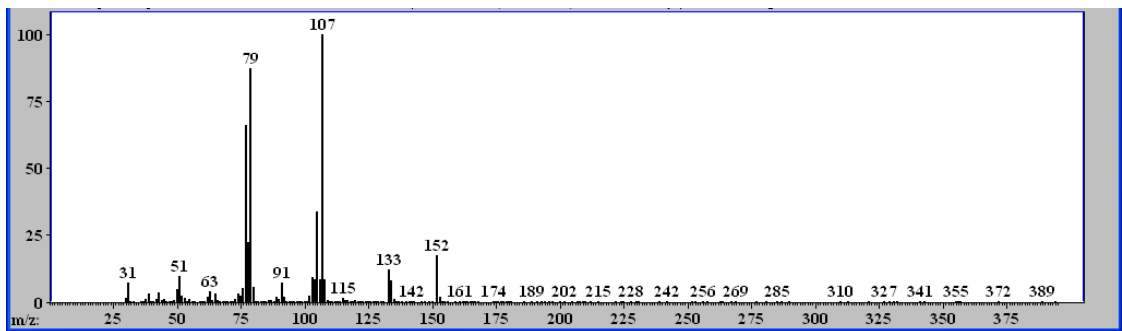
Espectro de infrarrojo del 3-fenil-1,3-propanodiol



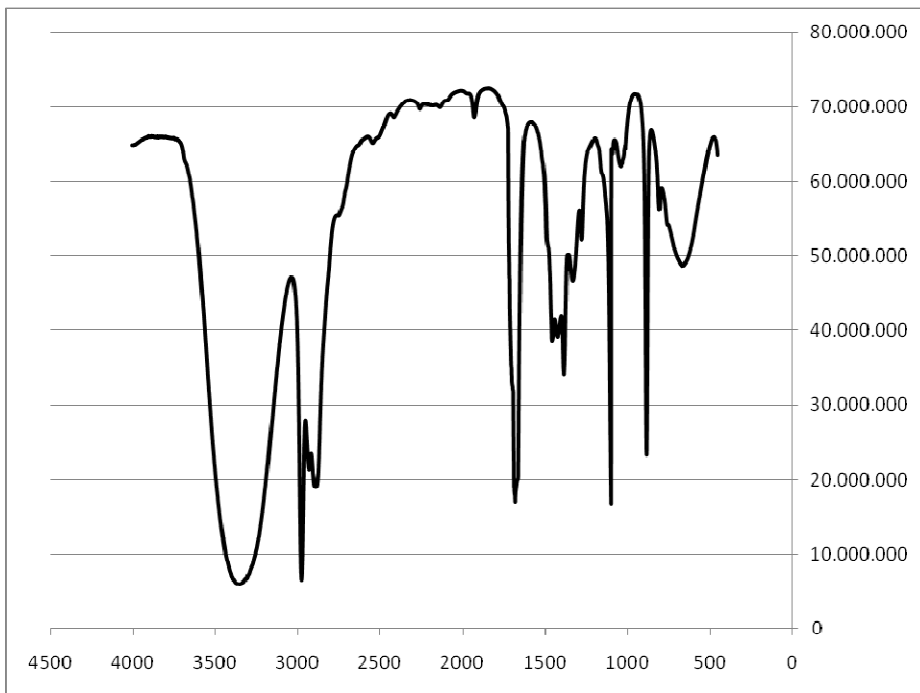
Espectro ^1H RMN del 3-fenil-1,3-propanodiol (CDCl_3 -200MHz)



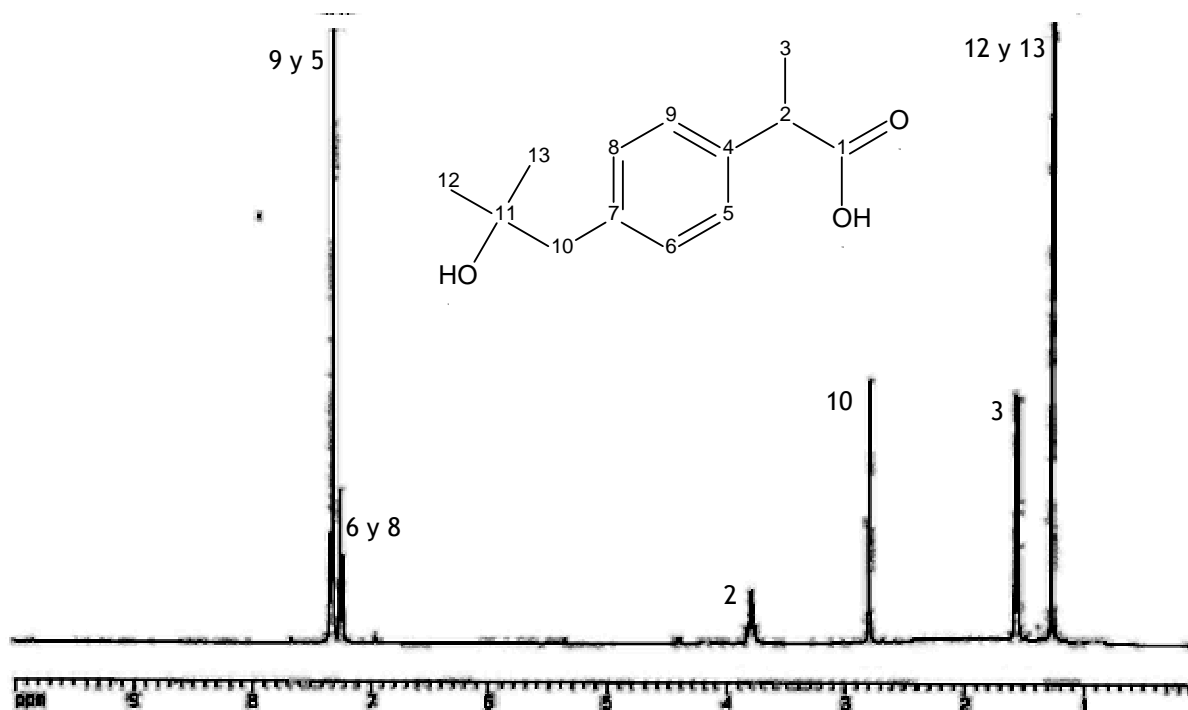
Espectro J-mod RMN del 3-fenil-1,3-propanodiol (CDCl_3 -200MHz)



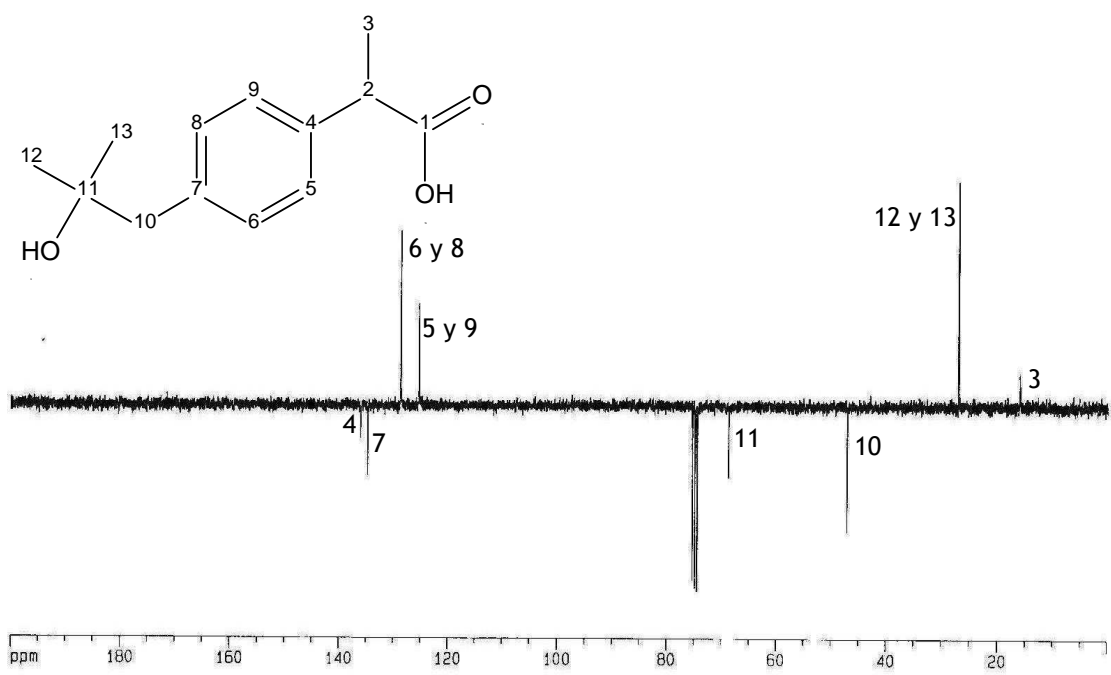
Espectro de masas del 3-fenil-1,3-propanodiol



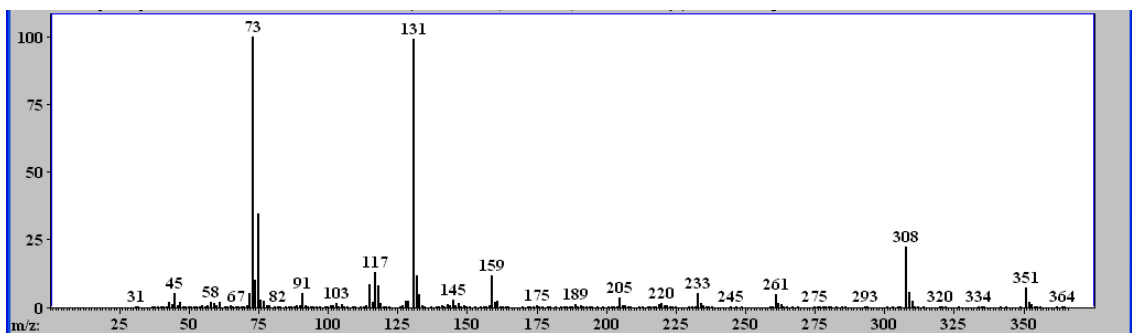
Espectro de infrarrojo del ácido-(2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico



Espectro ^1H RMN del ácido-(2-[4-(-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanóico



Espectro J-mod del ácido-(2-[4-(2-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanoico



Espectro de masas del ácido-(2-[4-(2-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanoico sililado

Tabla de resultados del bioensayo de toxicidad del *trans*-cinamaldehído frente al hongo filamentoso fitopatógeno *C. acutatum*

Tiempo de evaluación (h)	24			48			72			96			144		
Concentración	MD	DE	CV	MD	DE	CV	MD	DE	CV	MD	DE	CV	MD	DE	CV
Blanco absoluto	7,7	0,6	7,5	19,0	0,0	0,0	29,3	0,6	2,0	35,7	0,6	1,6	39,7	0,6	1,5
Blanco etanol	8,0	0,0	0,0	18,3	0,6	3,1	28,3	0,6	2,0	35,0	0,0	0,0	41,3	1,5	3,7
50 ppm	8,0	0,0	0,0	16,7	0,6	3,5	26,0	0,0	0,0	31,3	0,6	1,8	37,7	0,6	1,5
150 ppm	7,7	0,6	7,5	12,0	0,0	0,0	18,0	0,0	0,0	22,3	0,6	2,6	29,0	0,0	0,0
200 ppm	7,7	0,6	7,5	9,0	0,0	0,0	14,7	0,6	3,9	17,3	0,6	3,3	23,0	1,0	4,3
250 ppm	7,3	0,6	7,9	8,3	0,6	6,9	12,3	0,6	4,7	15,3	0,6	3,8	18,7	0,6	3,1
400 ppm	7,7	0,6	7,5	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
500 ppm	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0

MD= Media del diámetro de la colonia (mm)

DE= Desviación estándar

CV= Coeficiente de variación

Continuación

Tiempo de evaluación (h)	168			192			216			240		
Concentración	MD	DE	CV	MD	DE	CV	MD	DE	CV	MD	DE	CV
Blanco absoluto	51,3	3,5	6,8	58,3	4,0	6,9	64,7	4,0	6,2	72,0	5,2	7,2
Blanco etanol	49,7	1,5	3,1	55,7	0,6	1,0	63,0	1,0	1,6	69,0	1,0	1,4
50 ppm	45,7	0,6	1,3	53,7	1,5	2,8	60,3	2,1	3,5	66,0	3,5	5,2
150 ppm	35,3	0,6	1,6	47,0	2,6	5,6	50,0	1,0	2,0	57,3	0,6	1,0
200 ppm	30,0	1,0	3,3	37,0	1,0	2,7	43,7	0,6	1,3	50,3	0,6	1,1
250 ppm	26,0	0,0	0,0	32,7	0,6	1,8	40,7	2,1	5,1	46,3	0,6	1,2
400 ppm	9,3	1,2	12,4	12,0	1,0	8,3	14,3	2,3	16,1	18,3	3,2	17,5
500 ppm	7,0	0,0	0,0	8,0	0,0	0,0	9,0	0,0	0,0	11,0	0,0	0,0

MD= Media del diámetro de la colonia (mm)

DE= Desviación estándar

CV= Coeficiente de variación

Continuación

Tiempo de evaluación (h)	264			288		
Concentración	MD	DE	CV	MD	DE	CV
Blanco absoluto	77,0	5,2	6,7	82,0	5,2	6,3
Blanco etanol	75,3	0,6	0,8	77,0	3,6	4,7
50 ppm	72,0	4,4	6,1	76,0	6,9	9,1
150 ppm	62,7	0,6	0,9	69,7	0,6	0,8
200 ppm	56,3	1,5	2,7	61,7	3,5	5,7
250 ppm	51,3	2,1	4,1	56,3	4,7	8,4
400 ppm	24,0	5,3	22,0	30,3	5,8	19,0
500 ppm	12,0	0,0	0,0	13,0	0,0	0,0

MD= Media del diámetro de la colonia (mm)

DE= Desviación estándar

CV= Coeficiente de variación

Tabla de resultados del bioensayo de toxicidad del ibuprofeno frente al hongo filamentoso fitopatógeno *C. acutatum*

Tiempo de evaluación (h)	46			70			94			144			168		
Concentración	ME	DE	CV	ME	DE	CV	ME	DE	CV	ME	DE	CV	ME	DE	CV
Blanco absoluto	17,3	0,6	3,3	22,0	0,0	0,0	30,0	1,0	3,3	37,5	2,9	7,7	45,0	4,6	10,2
Blanco EtOAc	15,7	1,5	9,8	22,0	3,6	16,4	29,0	1,7	6,0	38,0	2,6	7,0	45,3	5,0	11,1
100 ppm	11,5	0,7	6,1	16,0	1,4	8,8	20,0	0,0	0,0	24,0	0,0	0,0	30,0	0,0	0,0
250 ppm	10,0	0,0	0,0	11,3	0,6	5,1	15,3	1,2	7,5	22,3	0,6	2,6	26,0	2,0	7,7
500 ppm	7,7	0,6	7,5	9,7	0,6	6,0	12,0	0,0	0,0	13,7	0,6	4,2	16,0	1,0	6,3
750 ppm	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	11,0	1,0	9,1
1000 ppm	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
1250 ppm	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
1500 ppm	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0

MD= Media del diámetro de la colonia (mm)

DE= Desviación estándar

CV= Coeficiente de variación

Continuación

Tiempo de evaluación (h)	192			237			288		
Concentración	ME	DE	CV	ME	DE	CV	ME	DE	CV
Blanco absoluto	54,5	8,2	15,0	61,0	7,5	12,3	76,5	4,9	6,5
Blanco EtOAc	52,3	4,7	9,0	64,3	4,7	7,3	75,0	7,1	9,4
100 ppm	34,0	0,0	0,0	44,5	0,7	1,6	54,0	2,8	5,2
250 ppm	31,3	3,8	12,1	39,0	4,4	11,2	48,0	5,3	11,0
500 ppm	19,0	0,0	0,0	27,0	2,0	7,4	36,7	5,0	13,7
750 ppm	11,7	0,6	4,9	12,7	0,6	4,6	14,0	1,0	7,1
1000 ppm	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
1250 ppm	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
1500 ppm	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0

MD= Media del diámetro de la colonia (mm)

DE= Desviación estándar

CV= Coeficiente de variación

