



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**BÚSQUEDA DE NUEVOS AGENTES CON  
POTENCIAL ANTITUBERCULOSO MEDIANTE LA  
BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOIDES**

Tesis que presenta

**STEPHANIE GUADALUPE HERRERA CANCHÉ**

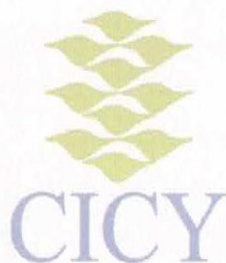
En opción al título de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México  
2018

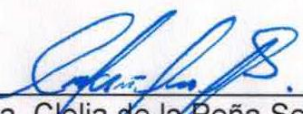




## RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **STEPHANIE GUADALUPE HERRERA CANCHÉ** titulado “**Búsqueda de nuevos agentes con potencial antituberculoso mediante la biotransformación de terpenoides**”, fue realizado dentro de la línea de Biotecnología de Productos Naturales en las instalaciones del Laboratorio de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del **Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez**, y en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química, UADY, bajo la dirección de la **Dra. Mónica Noel Sánchez González**, dentro de la opción Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:


  
\_\_\_\_\_  
Dra. Celia de la Peña Seaman  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 6 de diciembre de 2018.



## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:   
Q. Stephanie Guadalupe Herrera Canché



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán y en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química, UADY, y forma parte del proyecto titulado “Búsqueda de nuevos agentes con potencial antituberculoso mediante la biotransformación de terpenoides” en el que participé bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y de la Dra. Mónica Noel Sánchez González.





## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero a través de la beca mensual número 612330.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), por las facilidades prestadas para la realización de este proyecto, especialmente a la Unidad de Biotecnología.

A la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), Facultad de Ingeniería Química (FIQ), por las instalaciones y facilidades prestadas, así como a los responsables del Laboratorio de Biotecnología, QFB. Karla Kú Durán e IB. Erik Ic Caamal, por su amable atención para llevar a cabo el proceso de biotransformación.

Al Dr. Luis A. Loyola Morales y Dr. Jorge Bórquez Ramírez de la Universidad de Antofagasta, Chile, por la proporción del extracto hexánico de *Azorella compacta* para el aislamiento de los terpenoides utilizados como sustrato en el proceso de biotransformación.

Al Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales, Cinvestav-IPN a cargo de la Dra. Gloria Ivonne Hernández Bolio, por los análisis de RMN realizados.

Al Prof. Dr. Pascal Richomme Peniguel del Laboratorio SONAS de la Universidad de Angers (Francia), por los análisis de HPLC-MS.

A los miembros de mi comité tutorial y comité revisor, Dra. Cecilia M. Rodríguez García, Dr. Luis F. Barahona Pérez y Dr. Rodrigo A. Rivera Solís, por sus aportaciones para el desarrollo de este trabajo, dedicación para mi formación académica y por enriquecer este trabajo con sus acertadas observaciones.

A los técnicos M. en E. Fabiola Escalante Erosa y QBB. Karlina García Sosa, por su apoyo amable para la realización del trabajo en el laboratorio y análisis cromatográficos.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Orgánica (CICY): Mickel, Mercedes, Martha, Alejandrina, Augusto, Radamés, Landy, Julia, Majo, Ismael, Mónica, Luis, Jimmy, Javier, JJ, Carlos y Elia, por hacer ameno el trabajo en el laboratorio, así como por sus aportaciones y consejos.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología (FIQ): Maritza, Martín, Germán y Manuel, por su colaboración y hacer agradable mi estancia en el laboratorio.

Por último, agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y la Dra. Mónica Noel Sánchez González, por haberme aceptado como su estudiante, darme consejos para mejorar el trabajo, palabras de ánimo y críticas constructivas que, hicieron posible mi formación académica y personal.



## **DEDICATORIAS**

*A mis padres Jorge Herrera Arjona y Marbella Canché Palomo; y hermanos Jorge, Miguel y Diego.*

*A Ananías Ek Ucan.*



---

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I .....	3
ANTECEDENTES .....	3
1.1. PRODUCTOS NATURALES EMPLEADOS COMO FÁRMACOS .....	3
1.2. PRODUCTOS NATURALES CON POTENCIAL ANTITUBERCULOSO .....	5
1.2 BIOTRANSFORMACIÓN .....	12
1.3 BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOIDES.....	13
JUSTIFICACIÓN .....	19
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVO GENERAL .....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	20
CAPÍTULO II .....	23
BIOTRANSFORMACIÓN DE DITERPENOIDES TIPO MULINANO* .....	23
2.1 RESUMEN .....	23
2.2 INTRODUCTION.....	25
2.3 EXPERIMENTAL .....	26
2.4 RESULTS AND DISCUSSION.....	28
CAPÍTULO III .....	33

---

<b>3.1 DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>40</b>

---

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Fármacos provenientes de productos naturales (PN's).....	4
<b>Figura 1.2</b> Fármacos provenientes de derivados de productos naturales (DPN's).....	5
<b>Figura 1.3</b> Productos naturales (PN's) y derivados de productos naturales (DPN's) actualmente empleados como fármacos para el tratamiento de la tuberculosis.....	6
<b>Figura 1.4</b> Productos naturales (PN's) con potencial antituberculoso.....	7
<b>Figura 1.5</b> Terpenoides con actividad antituberculosa.....	8
<b>Figura 1.6</b> Esqueleto de los diterpenoides mulinano y azorellano.....	9
<b>Figura 1.7</b> Actividad antituberculosa de diterpenoides mulinano y azorellano. <b>a.</b> <i>M. tuberculosis sensible</i> (ATCC 27294). <b>b.</b> <i>M. tuberculosis resistente</i> (CIBIN/UMF15:99). <b>10</b>	
<b>Figura 1.8</b> Actividad antituberculosa de derivados semisintéticos de diterpenoides mulinano. <b>a.</b> <i>M. tuberculosis sensible</i> (ATCC 27294). <b>b.</b> <i>M. tuberculosis resistente</i> (CIBIN/UMF15:99)......	11
<b>Figura 1.9</b> Organismos utilizados para la biotransformación (Bhatti y Khera, 2014)......	14
<b>Figura 1.10</b> Terpenoides biotransformados y sus derivados.....	15
<b>Figura 1.11</b> Esqueletos de diterpenoides empleados para la biotransformación.....	16
<b>Figura 1.12</b> Productos de biotransformación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico por <i>M. plumbeus</i> ......	18
<b>Figura 1.13</b> Diagrama de la estrategia experimental para la obtención de los productos de biotransformación.....	21
<b>Figura 3.1</b> Estructura química de los sustratos <b>1, 2 y 6</b> .....	33
<b>Figura 3.2</b> Estructuras químicas de los productos de biotransformación ( <b>3, 4 y 5</b> ) de <b>2</b> ..	36
<b>Figura 3.3</b> Estructura química del ácido 7 $\alpha$ ,16-dihidroxi-mulin-11,13-dien-20-oico.....	36



---

---

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1</b> Principales sustratos y tipos de biomodificaciones realizadas por los microorganismos utilizados en el presente estudio. ....	<b>17</b>
---	-----------

---

---

## ABREVIATURAS

PDA	Agar papa dextrosa
PDB	Caldo papa dextrosa
CMI	Concentración mínima inhibitoria
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
HMBC	Correlación de enlaces múltiples heteronucleares
CG-EM	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
TLC	Cromatografía en capa delgada
CCG	Cromatografía en columna de gravedad
CCF	Cromatografía en columna flash
VLC	Cromatografía líquida al vacío
DPN's	Derivado (s) de productos naturales
$\delta_C$	Desplazamiento químico de carbono
$\delta_H$	Desplazamiento químico de protón
d	Doblete
dd	Doblete de doblete
ESIMS	Espectrometría de masas por ionización en electrospray
MLE	Medio líquido de esporulación
MSE	Medio sólido de esporulación
m	Multiplete
N	Normalidad
ppm	Partes por millón
e.g.	Por ejemplo
PN's	Productos naturales
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
<i>t<sub>R</sub></i>	Tiempo de retención
TB	Tuberculosis

---

TB-MR      Tuberculosis multirresistente  
TB-XR      Tuberculosis ultrarresistente

---

## RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las diez principales enfermedades causante de miles de muertes al año. Para el tratamiento de la tuberculosis, se administran fármacos de primera y segunda línea; sin embargo, además de los efectos secundarios que éstos generan, el problema principal radica en la aparición de cepas farmacorresistentes de *M. tuberculosis*. Por esta razón, la búsqueda de nuevos productos con potencial actividad antimicobacteriana es de vital importancia. Recientemente se ha demostrado que algunos diterpenoides naturales y semisintéticos de tipo mulinano y azorellano inhiben el crecimiento de cepas de *M. tuberculosis* sensibles y farmacorresistentes. Con base en lo anterior en este trabajo se llevó a cabo la preparación de derivados de mulinanos y azorellanos, mediante su biotransformación utilizando cultivos fúngicos (*Aspergillus alliaceus* UI 315, *Cunninghamella echinulata* ATCC 3655, *Curvularia lunata* ATCC 2178, *Mucor circinelloides* ATCC 7941) y bacterianos (*Nocardia iowensis* NRRL 5646). Los estudios de biotransformación de los diterpenoides 13 $\beta$ -hidroximulinano (**1**), ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**2**) y 13 $\beta$ -hidroxiazorellano (**6**), mostraron que ninguno de los microorganismos tuvo la capacidad de biotransformar **1**, en tanto que **2** fue modificado por *A. alliaceus*, produciendo el metabolito conocido como ácido 16-hidroximulin-11,13-dien-20-oico (**3**) con un rendimiento del 19.5%, rendimiento considerablemente por encima de lo reportado en la literatura (0.8%). Los cultivos de *M. circinelloides* conteniendo **2**, produjeron dos nuevos derivados identificados de acuerdo a sus datos espectroscópicos como ácido mulin-11,13-dien-16,20-dioico (**4**) y ácido 7 $\alpha$ ,13 $\beta$ -dihidroximulin-11-en-20-oico (**5**), con un rendimiento de 4% y 0.9%, respectivamente. Por otro lado, **6** fue biotransformado por *C. lunata*, *M. circinelloides* y *N. iowensis*, generando en los tres productos de mayor polaridad. Con estos resultados se propone a la biotransformación como una alternativa futura para la obtención de nuevos derivados de los diterpenoides mulinano y azorellano, que puedan ser utilizados como cabeza de serie para la preparación de nuevos derivados con potencial antituberculoso.

---

---

---

---

## ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious-contagious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, considered by the World Health Organization (WHO) as one of the top ten diseases, causing thousands of deaths per year. For the treatment of tuberculosis, first and second line drugs are administered; in addition to the side effects that these generate, the main problem lies in the emergence of drug-resistant strains of *M. tuberculosis*. For this reason, the search for new products with potential antimycobacterial activity is very important. It has recently been shown that some natural and semisynthetic diterpenoids with mulinane and azorellane skeleton inhibit the growth of sensitive and drug-resistant of *M. tuberculosis* strains. In this work, mulinane derivatives were prepared by biotransformation using fungal (*Aspergillus alliaceus* UI 315, *Cunninghamella echinulata* ATCC 3566, *Curvularia lunata* ATCC 2178, *Mucor circinelloides* ATCC 7941) and bacterial (*Nocardia iowensis* NRRL 5646) cultures. The biotransformation studies of diterpenoids 13 $\beta$ -hydroxymulinane (**1**), mulin-11,13-dien-20-oico acid (**2**) and 13 $\beta$ -hidroxiazorellane (**6**) showed that none of the microorganisms was able to biotransform **1**, while **2** was biotransformed by *A. alliaceus*, producing the known metabolite 16-hydroxymulin-11,13-dien-20-oico acid (**3**) with 19.5% yield, higher than that reported in the literature (0.8%). Cultures of *M. circinelloides* containing **2**, produced two new derivatives, identified according to their spectroscopic data, as mulin-11,13-dien-16,20-dioic acid (**4**) and 7 $\alpha$ ,13 $\beta$ -dihydroxymulin-11-en-20-oic acid (**5**), with 4% and 0.9% yields, respectively. On the other hand, **6** was biotransformed by *C. lunata*, *M. circinelloides* and *N. iowensis*, generating, in the three cases, more polar products. With these results biotransformation is proposed as a future alternative for obtaining new derivatives mulinane and azorellane diterpenoids which may be used as starting material for the preparation of new derivatives with antitubercular potential.

---



---

---

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*, bacteria que afecta principalmente a los pulmones, de gran importancia a nivel mundial (Chinsembu, 2016). Esta enfermedad contagiosa es más riesgosa para las personas cuyo sistema inmune es deficiente, afectando a personas que padecen VIH, diabetes, desnutrición, o a quienes consumen tabaco (OMS, 2018). Asimismo, es considerada una de las principales causas de muerte en el mundo (Chinsembu, 2016).

En el 2016, se reportaron 10.4 millones de nuevos casos de TB; sin embargo, se estima que la cuarta parte de la población mundial padece TB latente, es decir, las personas están infectadas por el bacilo pero no presentan síntomas, ni transmiten la infección (OMS, 2018). En este mismo año se registraron en Asia y África los mayores porcentajes de casos nuevos de TB (61% y 26%, respectivamente), siendo países como China, India, Indonesia, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica los registrados con mayor número de incidencias (OMS, 2018). En México los casos de TB en la población han ido en aumento; cada año se detectan alrededor de 15 mil casos nuevos de TB pulmonar y cerca de dos mil defunciones por esta causa (SSA, 2016). Las entidades federativas con mayor número de casos y muertes por TB son Baja California, Veracruz, Guerrero, Sonora, Tamaulipas, Chiapas, Nuevo León y Tabasco (SSA, 2016). En Yucatán se reportaron 202 casos de TB en el 2015 y para el 2016 esta cifra aumentó a 215 (CENAPRECE, 2018).

Actualmente el tratamiento de la TB consiste en la administración de fármacos de primera línea (isoniazida, rifampicina, pirazinamida, estreptomina y etambutol), a pacientes que presentan por primera vez la enfermedad (Gupta y Gupta, 2012). Sin embargo, la bacteria *M. tuberculosis* ha desarrollado farmacorresistencia, dando lugar a la tuberculosis multirresistente (TB-MR), la cual no responde al tratamiento con isoniazida y rifampicina, los dos fármacos más potentes para combatir la enfermedad. En algunos casos se ha desarrollado una forma más resistente de TB, conocida como tuberculosis ultrarresistente (TB-XR), que responde a un número aún menor de fármacos disponibles (OMS, 2018). Para el tratamiento de la TB farmacorresistente se emplean medicamentos de segunda línea (kanamicina, amikacina, capreomicina, ciprofloxacino, ofloxacino, entre otros), los cuales son administrados a pacientes que han respondido ineficientemente al tratamiento

(Gupta y Gupta, 2012); estos fármacos se aplican en conjunto con otros medicamentos de primera línea (OMS, 2018; SSA, 2014). Debido a los diversos efectos secundarios causados por los fármacos de primera y segunda línea, y a la aparición de nuevos casos de TB, se ha optado por buscar nuevos productos con actividad antituberculosa (García *et al.*, 2012). En las últimas dos décadas, se han encontrado productos naturales, con actividad inhibitoria prometedora contra *M. tuberculosis* y en algunos casos se ha logrado determinar su mecanismo de acción (García *et al.*, 2012). Entre las estrategias para obtener nuevas moléculas con actividad biológica, se ha recurrido a métodos de transformación química y biológica de productos naturales. Entre los métodos biológicos se encuentra la biotransformación, que se basa en la modificación química de una molécula mediante el uso de microorganismos como hongos y bacterias (Rico-Martínez *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se exploró la biotransformación de terpenoides de tipo mulinano y azorellano utilizando cultivos fúngicos (*Aspergillus alliaceus* UI 315, *Cunninghamella echinulata* ATCC 3655, *Curvularia lunata* ATCC 2178 y *Mucor circinelloides* ATCC 7941) y bacterianos (*Nocardia iowensis* NRRL 5646) como estrategia para la obtención de nuevos derivados con potencial actividad antituberculosa o cabezas de serie para el desarrollo de los mismos.

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

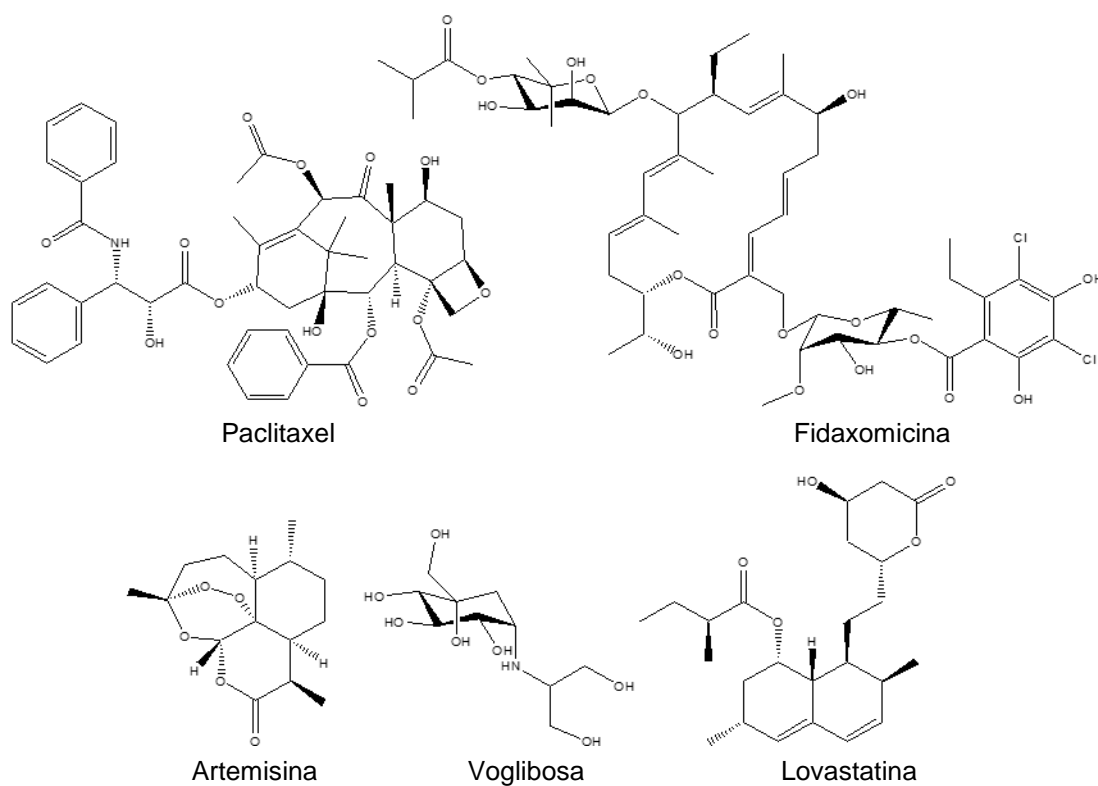
#### 1.1. PRODUCTOS NATURALES EMPLEADOS COMO FÁRMACOS

En la búsqueda continua de compuestos para el tratamiento de diferentes enfermedades, se ha propuesto en las últimas décadas a los productos naturales (PN's) como una alternativa para la obtención y desarrollo de nuevos fármacos (Pandey y Doerksen, 2016). Los PN's, son metabolitos secundarios, sintetizados como respuesta de supervivencia o adaptación de un organismo mediante procesos metabólicos secundarios (Claramunt *et al.*, 2013). El metabolismo secundario es activado durante las etapas de crecimiento, desarrollo o por las condiciones de estrés, generadas por el ataque microbiano o escasez de nutrientes (Claramunt *et al.*, 2013). De acuerdo a su origen biosintético, los PN's se agrupan en policétidos, productos fenólicos, alcaloides y terpenoides (Dewick, 2009).

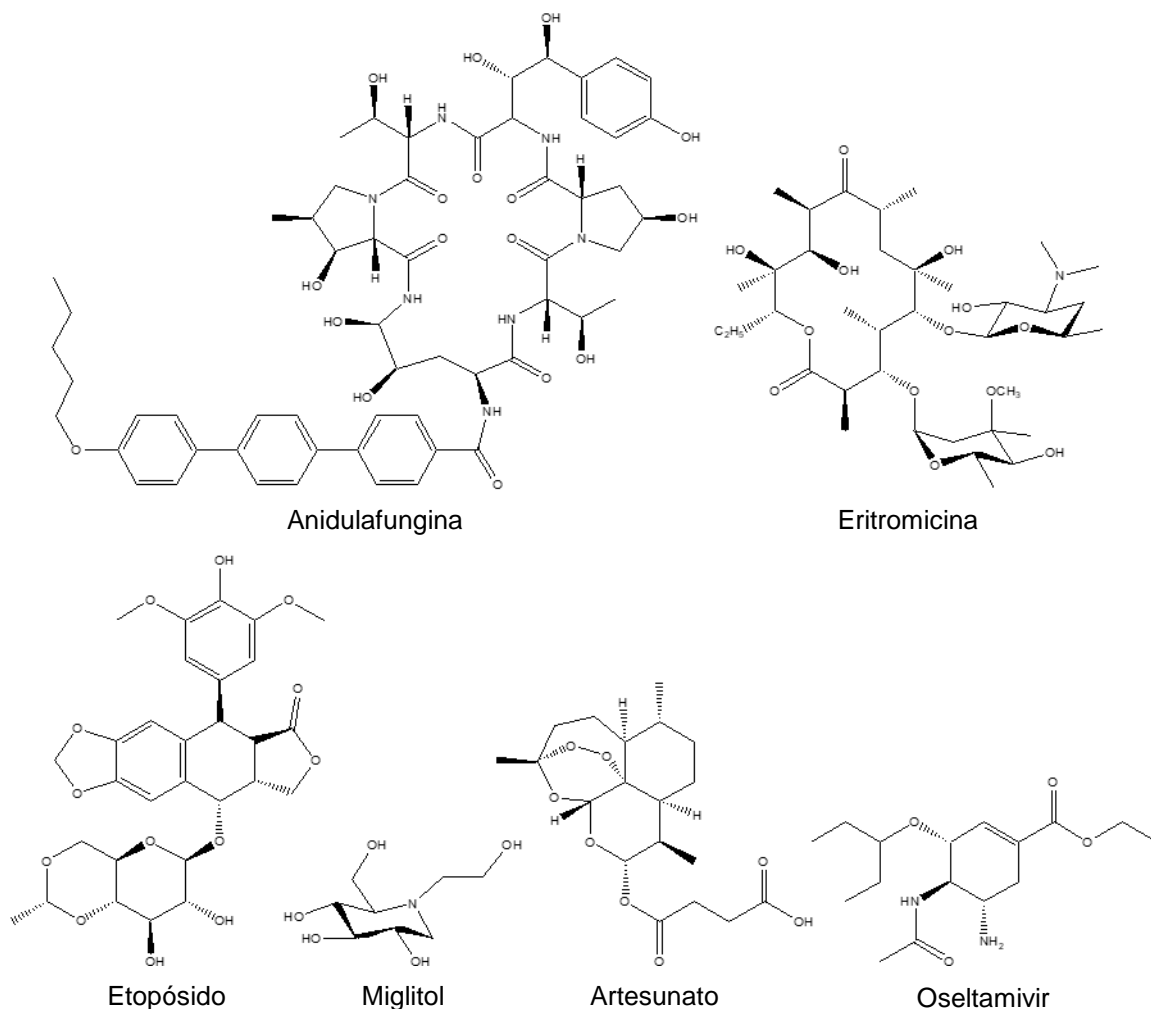
La gran diversidad y complejidad estructural de algunos PN's, ha resultado un reto para su obtención mediante síntesis química y generado mayor interés por descubrir su potencial como fármaco (Shen, 2015). El 4.31% de los fármacos encontrados en el mercado son PN's como el paclitaxel (1993), empleado para el tratamiento del cáncer, la artemisinina (1987), usada para el tratamiento de la malaria, el antidiabético voglibosa (1994), el antibacteriano fidaxomicina (2001), y el fármaco lovastatina (1970), empleado para el tratamiento de problemas cardíacos y reducción del colesterol (Newman y Cragg, 2016; Kumar *et al.*, 2014) (Figura 1.1). Las plantas, microorganismos y organismos marinos son algunas de las fuentes naturales de donde se han aislado los PN's utilizados como fármacos hoy en día (Kumar *et al.*, 2014).

Por otro lado, los PN's han sido empleados como base para la obtención de nuevas moléculas mediante derivatización semisintética y con ello explorar su potencial como posible fármaco o para incrementar alguna actividad biológica (Khan, 2018; Guo, 2016; Newman y Cragg, 2016). Hasta el 2014, el 20.48% de los fármacos administrados para el tratamiento o prevención de un gran número de padecimientos eran de derivados de productos naturales (DPN's), siendo un número mayor en comparación de lo calculado para los PN's (4.31%). Entre los DPN's con aplicación farmacéutica se encuentran la

anidulafungina (2006), utilizada como antifúngico, la eritromicina, empleada como antibacteriano (1988), el fármaco anticancerígeno etopósido (1980), el antidiabético miglitol (1998), el antiparasitario artesunato (1987) y el antiviral oseltamivir (1999), empleado para el tratamiento de la influenza (Newman y Cragg, 2016) (Figura 1.2). Además de estos DPN's utilizados como fármacos, un gran número de ellos se encuentran en etapas clínicas para la aprobación como nuevos fármacos, por lo que los PN's y DPN's siguen representando una fuente importante para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Mishra y Tiwari, 2011).



**Figura 1.1** Fármacos provenientes de productos naturales (PN's).

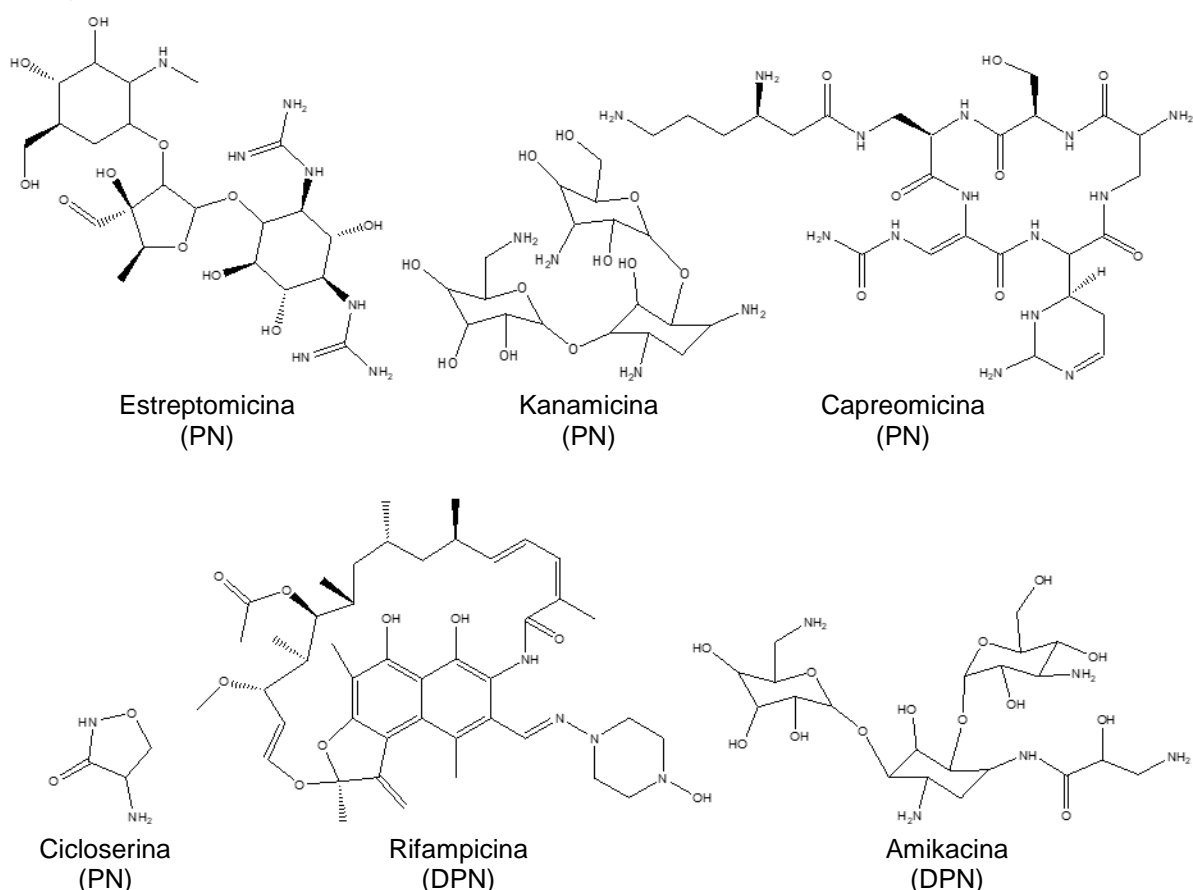


**Figura 1.2** Fármacos provenientes de derivados de productos naturales (DPN's).

## 1.2. PRODUCTOS NATURALES CON POTENCIAL ANTITUBERCULOSO

Actualmente el tratamiento de la tuberculosis consta de la administración de fármacos de primera y segunda línea, entre los que se encuentran PN's como la estreptomina, un fármaco de primera línea, y los fármacos de segunda línea kanamicina, capreomicina y cicloserina (Figura 1.3). Entre los fármacos DPN's para el tratamiento de la tuberculosis se incluyen la rifampicina, de primera línea y, la amikacina, de segunda línea (Guzmán *et al.*, 2013) (Figura 1.3). Lo anterior demuestra la importancia de los PN's y DPN's como

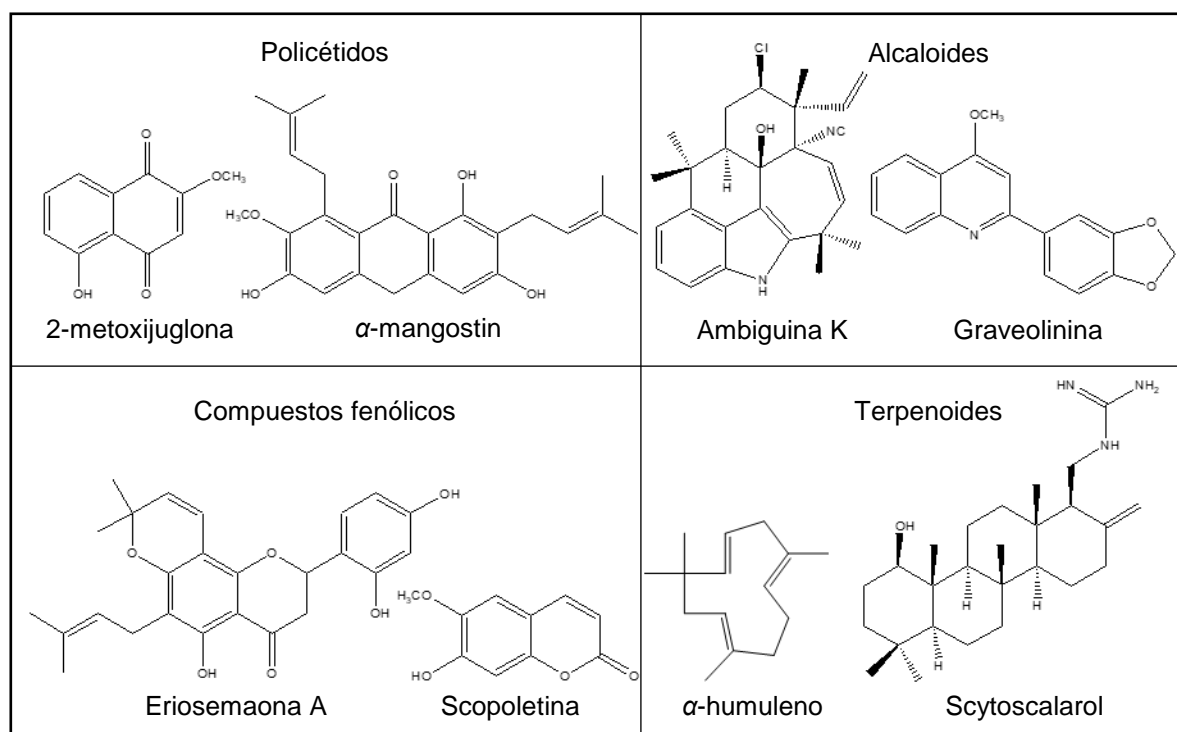
una alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos (García *et al.*, 2012).



**Figura 1.3** Productos naturales (PN's) y derivados de productos naturales (DPN's) actualmente empleados como fármacos para el tratamiento de la tuberculosis.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, policétidos como la quinona 2-metoxijuglona (Wu *et al.*, 2007) y la xantona  $\alpha$ -mangostin (Chien *et al.*, 2010); alcaloides como el indol ambigua K (Mo *et al.*, 2009a) y la quinolina graveolinina (Aguinaldo *et al.*, 2007); productos fenólicos como el flavonoide eriosemaona A (Sutthivaiyakit *et al.*, 2010) y la coumarina scopoletina (Chiang *et al.*, 2010); y terpenoides como el sesquiterpenoide  $\alpha$ -humuleno (Kanokmedhakul *et al.*, 2007) y el sesterterpenoide scytoscalarol (Mo *et al.*, 2009b) (Figura 1.4), han mostrado potencial antituberculoso en evaluaciones *in vitro*

contra *M. tuberculosis* y pueden considerarse como moléculas prototipo para el desarrollo de nuevos agentes antituberculosos (García *et al.*, 2012).

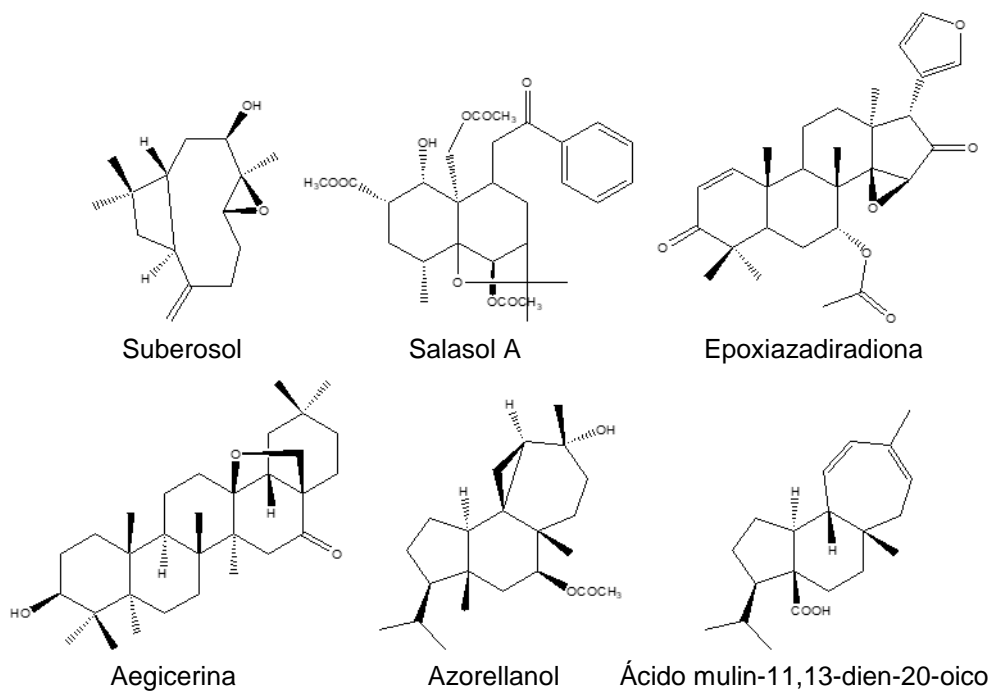


**Figura 1.4** Productos naturales (PN's) con potencial antituberculoso.

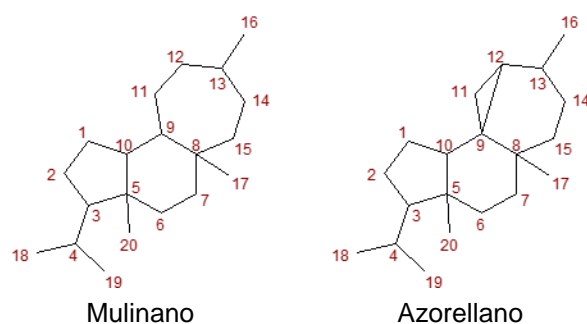
Los terpenoides representan la familia química de metabolitos secundarios de mayor abundancia en los seres vivos, hasta ahora se han identificado aproximadamente 55,000 terpenoides y aislados de plantas, bacterias, hongos, organismos marinos y algas (Rico-Martínez *et al.*, 2014; García *et al.*, 2012; Dewick, 2009). De acuerdo a las unidades de isopreno que forman el esqueleto carbonado, los terpenoides se clasifican en hemiterpenoides ( $C_5$ ), monoterpenoides ( $C_{10}$ ), sesquiterpenoides ( $C_{15}$ ), diterpenoides ( $C_{20}$ ), sesterterpenoides ( $C_{25}$ ), triterpenoides ( $C_{30}$ ) y tetraterpenoides ( $C_{40}$ ) (Dewick, 2009). Algunos terpenoides que han mostrado actividad biológica prometedora contra *M. tuberculosis* son los sesquiterpenoides suberosol B (Kanokmedhakul *et al.*, 2007) y salasol A (Chen *et al.*, 2007); los triterpenoides epoxiazadiradiona (Maneerat *et al.*, 2008)



y aegicerina (Rojas *et al.*, 2006), y los diterpenoides azorellanol y ácido mulin-11,13-dien-20-oico (Molina-Salinas *et al.*, 2010a) (Figura 1.5). Estos últimos, diterpenoides de tipo mulinano y azorellano son considerados de particular importancia para el desarrollo del presente trabajo, debido a la actividad antituberculosa reportada recientemente para PN's y DPN's con esqueletos de azorellano y mulinano (Molina-Salinas *et al.*, 2010a; Molina-Salinas *et al.*, 2010b; Molina-Salinas *et al.*, 2010c) (Figura 1.6).



**Figura 1.5** Terpenoides con actividad antituberculosa.



**Figura 1.6** Esqueleto de los diterpenoides mulinano y azorellano.

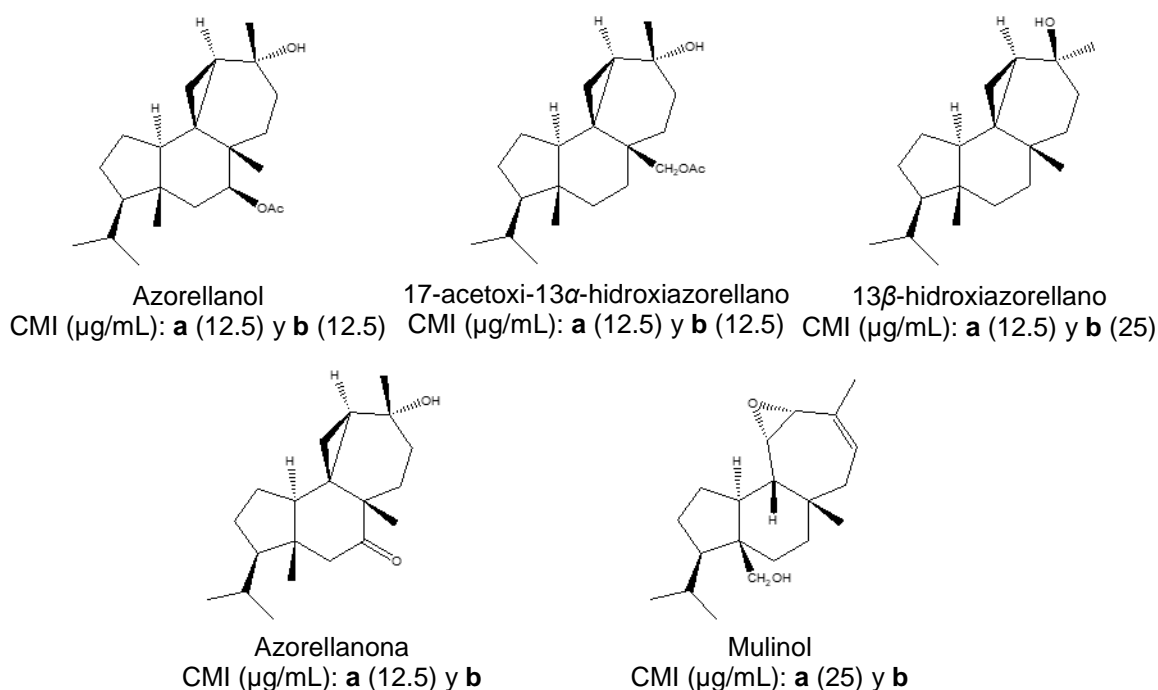
Los mulinanos y azorellanos son un grupo único de metabolitos secundarios producidos por plantas de la familia Apiacea, principalmente de los géneros *Azorella*, *Bolax*, *Laretia* y *Mulinum* (Liu *et al.*, 2017; Molina-Salinas *et al.*, 2010b), empleados en la medicina tradicional chilena para el tratamiento de la bronquitis, el asma, los resfriados, las contusiones, los dolores de hígado y algunos problemas del sistema digestivo (Delporte *et al.*, 2003; Loyola *et al.*, 1997a).

Los diterpenoides de tipo mulinano se caracterizan por tener un grupo carboxilo en el C-20 y un anillo de siete miembros funcionalizado con presencia de uno o dos dobles enlaces en la molécula y grupos oxigenados. Por otra parte, los diterpenoides de tipo azorellano se caracterizan por tener un grupo oxigenado en C-13 y la ausencia de un grupo carboxilo en C-20 (Marcos *et al.*, 2016).

A los diterpenoides mulinano y azorellano se les atribuyen diversas propiedades biológicas, incluyendo actividad analgésica (Delporte *et al.*, 2013), antibacteriana (Wächter *et al.*, 1998), antihiperlipidémica (Fuentes *et al.*, 2005), antiinflamatoria (Delporte *et al.*, 2013), antiprotozoaria (Neira *et al.*, 1998), antituberculosa (Molina-Salinas *et al.*, 2010a), antiviral (Abdel-Malek *et al.*, 1996), citotóxica (Mongelli *et al.*, 1997), espermicida (Morales *et al.*, 2003), gastroprotectora (Areche *et al.*, 2013), tricomonocida (Loyola *et al.*, 2002) y tripanocida (Araya *et al.*, 2003).

Los diterpenoides mulinano y azorellano han sido ampliamente estudiados por su actividad antituberculosa, y algunos han mostrado una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 12.5-100 µg/mL en ensayos *in vitro* al ser evaluados contra cepas sensibles (ATCC 27294 H37Rv) y resistentes (CIBIN/UMF 15:99) de *M. tuberculosis* (Molina-Salinas *et al.*, 2010a). De acuerdo a lo reportado en la literatura, los diterpenoides tipo azorellano han mostrado una mayor actividad antituberculosa en comparación con los diterpenoides tipo mulinano, siendo el azorellanol, el 17-acetoxi-13 $\alpha$ -hidroxiazorellano, el 13 $\beta$ -hidroxiazorellano y la azorellanona, los diterpenoides tipo azorellano que han mostrado la mayor actividad antituberculosa, en tanto que el mulinol, un diterpenoide tipo mulinano,

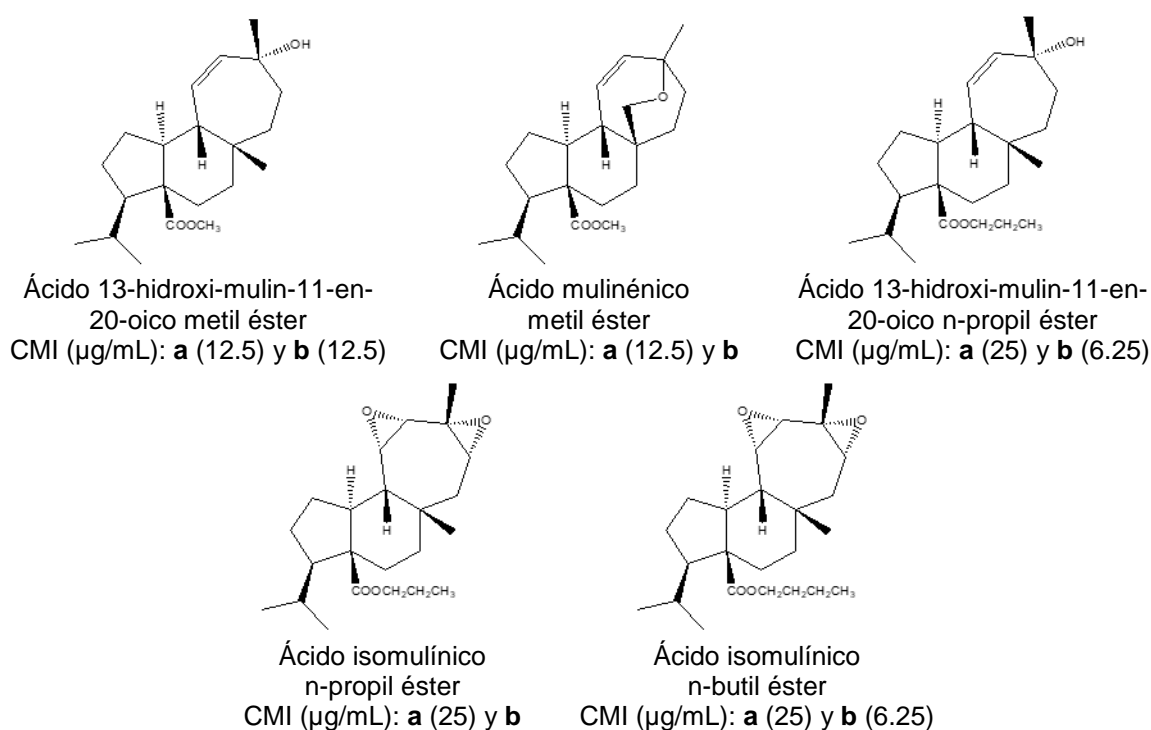
presentó actividad antituberculosa moderada contra la cepa sensible y una mayor actividad contra la cepa resistente (Molina-Salinas *et al.*, 2010a) (Figura 1.7).



**Figura 1.7** Actividad antituberculosa de diterpenoides mulinano y azorellano. **a.** *M. tuberculosis* sensible (ATCC 27294). **b.** *M. tuberculosis* resistente (CIBIN/UMF15:99).

Recientemente se reportó el uso de reacciones de alquilación, deshidratación, oxidación, reducción e hidrogenación para la preparación de diferentes derivados semisintéticos de diferentes mulinanos y azorellanos (Molina-Salinas *et al.*, 2010b; Molina-Salinas *et al.*, 2010c). Los resultados obtenidos mostraron que los derivados semisintéticos de diterpenoides tipo mulinano, principalmente los derivados alquilados, entre ellos los ésteres metílicos, etílicos, propílicos y butílicos, mostraron una mayor actividad que el diterpenoide natural, siendo el ácido 13 $\alpha$ -hidroximulin-11-en-20-oico metil éster y ácido mulinénico metil éster, los más activos contra la cepa sensible de *M. tuberculosis* (Molina-Salinas *et al.*, 2010b). Por otro lado, los ácidos 13 $\alpha$ -hidroximulin-11-en-20-oico n-propil éster, isomulínico n-propil éster e isomulínico butil éster mostraron la mayor actividad

antituberculosa frente a la cepa resistente de *M. tuberculosis* (Molina-Salinas *et al.*, 2010c) (Figura 1.8).



**Figura 1.8** Actividad antituberculosa de derivados semisintéticos de diterpenoides mulinano. **a.** *M. tuberculosis* sensible (ATCC 27294). **b.** *M. tuberculosis* resistente (CIBIN/UMF15:99).

La modificación de la mayoría de los derivados diterpenoides tipo mulinano se ha realizado en el grupo carboxilo de la posición C-20 en la estructura. Mediante la transformación química de este grupo funcional se obtuvieron diferentes derivados alquilados cuya actividad antituberculosa aumentó al incrementar el tamaño de la cadena alquilada (Molina-Salinas *et al.*, 2010c). Recientemente se llevó a cabo la preparación de diferentes DPN's utilizando los ésteres metílicos del ácido mulin-11,13-dien-20-oico, 13 $\alpha$ -hidroximulin-11-en-20-oico y ácido mulinénico como materias primas para la generación de nuevos grupos funcionales (acetato, aldehído y alcohol) en C-20. Sin embargo,

diferentes intentos para obtener derivados nitrogenados, e.g. amidas, aminas e iminas en C-20 utilizando el ácido carboxílico o su éster metílico como materias primas, no pudieron llevarse a cabo debido a la baja electrofilicidad del grupo carbonilo (Martínez, 2017). Tomando en cuenta lo anterior, y sabiendo que, además de la derivatización de PN's existen otros métodos para la obtención de derivados, se decidió explorar la biotransformación de este tipo de diterpenoides con el fin de obtener nuevos DPN's. En algunos casos de biotransformación los microorganismos han mostrado la capacidad para funcionalizar sitios en las moléculas, que no son viables o son difíciles de obtener utilizando reacciones químicas (Rico-Martínez *et al.*, 2014).

## 1.2 BIOTRANSFORMACIÓN

La biotransformación, también se conoce como transformación biocatalítica o transformación microbiana y se puede definir como la modificación de un sustrato definido para la obtención de un producto, con similaridad estructural, mediante el uso de células microbianas o enzimas aisladas a partir de ellas (Hegazy *et al.*, 2015; Pervaiz *et al.*, 2013). Debido a la capacidad de adaptación de los microorganismos a los cambios generados en su medio ambiente y la producción de una gran variedad de enzimas diferentes en corto tiempo, la biotransformación representa una alternativa para la obtención de derivados a partir de diversas moléculas, entre ellas los PN's (Smitha *et al.*, 2017).

El proceso de biotransformación es atractivo, ya que se realiza a pH neutro, así como a temperatura y presión atmosférica ambiental, evitando las condiciones extremas que ha menudo requiere la derivatización semisintética. Además, el uso de células microbianas resulta ideal debido a su crecimiento acelerado, reduciendo el tiempo de biotransformación. Asimismo, las condiciones de esterilidad son relativamente fáciles de mantener (Smitha *et al.*, 2017).

La ventaja más importante de la biotransformación es la capacidad de los microorganismos para realizar reacciones estereo o regio específicas sobre los sustratos, dando como resultado la obtención de derivados que, para su formación por semisíntesis,

podría requerir varias reacciones químicas y un costo mayor (Mutafova *et al.*, 2016; Hegazy *et al.*, 2015). Las principales biotransformaciones realizadas por los microorganismos se clasifican de acuerdo al tipo de reacción, e.g. oxidación, reducción, hidrólisis, isomerización y formación de nuevos enlaces (Smitha *et al.*, 2017; Birolli *et al.*, 2015).

La biotransformación se ha utilizado para la obtención de derivados a partir de alcaloides (Pervaiz *et al.*, 2013; Orabi *et al.*, 2000), productos fenólicos, principalmente flavonoides (Das y Rosazza, 2006; Torres y Torres y Rosazza, 2001) y terpenoides (Alfarra y Omar, 2013; Severiano *et al.*, 2013).

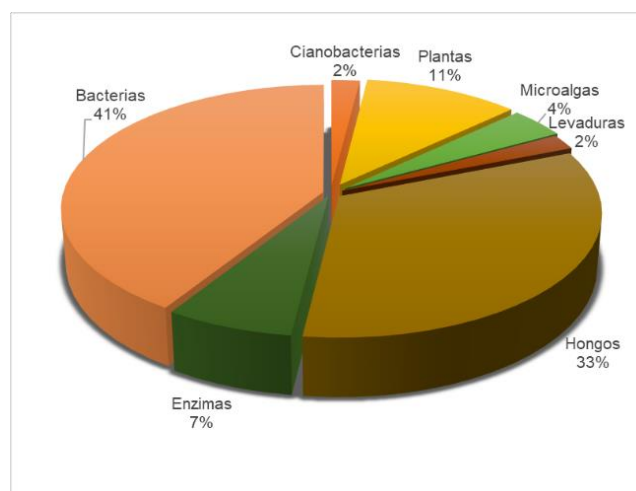
### 1.3 BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOIDES

La biotransformación de terpenoides se ha utilizado en la industria de fragancias y saborizantes (De Carvalho y Da Fonseca, 2006) y, se ha empleado para la obtención o mejoramiento de las propiedades biológicas de los terpenoides, ya que algunos han sido reportados con propiedades antibacterianas, citotóxicas, antialimentarias, insecticidas y antivirales (Bhatti y Khera, 2014).

De acuerdo a lo reportado en la literatura, para la biotransformación de toda clase de terpenoides se han utilizado principalmente bacterias y hongos (Figura 1.9), asimismo, se han utilizando enzimas, extractos celulares o células completas de estos microorganismos (Hegazy *et al.*, 2015; De Carvalho y Da Fonseca, 2006).

Los géneros de bacterias más utilizados para la biotransformación de terpenoides son *Streptomyces* (e.g. *S. acidoresistans*, *S. bottropensis* y *S. ikutamanensis*) y *Nocardia* (e.g. *N. coralline*, *N. iowensis* y *Nocardia* sp.) (Bhatti y Khera, 2014; Rico-Martínez *et al.*, 2014), mientras que los principales géneros de hongos utilizados para la biotransformación de estos PN's son *Aspergillus* (e.g. *A. flavus*, *A. niger* y *A. ochraceus*), *Cunninghamella* (e.g. *C. blakesleeana*, *C. echinulata* y *C. elegans*), *Mucor* (e.g. *M. circinelloides*, *M. plumbeus* y *M. rouxii*) y *Rhizopus* (e.g. *R. arrhizus*, *R. oryzae* y *R. stolonifer*). Se ha reportado que la principal biomodificación que realizan estos microorganismos en terpenoides son

oxidaciones (Bhatti y Khera, 2014; Bhatti *et al.*, 2014; Rico-Martínez *et al.*, 2014; Parshicove y Sutherland, 2014; Muffler *et al.*, 2011).



**Figura 1.9** Organismos utilizados para la biotransformación (Bhatti y Khera, 2014).

Algunos ejemplos de biotransformaciones de terpenoides incluyen la biotransformación de L-mentol por *Rhizoctonia solani* (Borges *et al.*, 2009), de squamulosa por *C. lunata* (Collins *et al.*, 2001), del ácido 13-*epi-ent*-pimara-9(11),15-diene-19-oico por *Gibberella fujikuroi* (Rico-Martínez *et al.*, 2014) y del ácido glicirrhetínico por *Nocardia* sp. (Zhang *et al.*, 2005) (Figura 1.10). De estas biotransformaciones se ha reportado la obtención de derivados oxidados dando lugar a la introducción de grupos oxhidrilo, cetonas, epóxidos y productos de tipo Baeyer-Villiger.

Se ha reportado la biotransformación de diterpenoides con esqueleto abietano (Özsen *et al.*, 2017), atisano (Fraga *et al.*, 2010), beyerano (Chang *et al.*, 2006), clerodano (Choudhary *et al.*, 2013), kaurano (Fraga *et al.*, 2005), labdano (Haridy *et al.*, 2006), pimarano (Fraga *et al.*, 2009), stemodano (Martín *et al.*, 2005), taxano (Hu *et al.*, 1996) y trachylobano (Fraga *et al.*, 2012) (Figura 1.11); utilizando especies de *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Gibberella*, *Mucor* y *Rhizopus*, principalmente (Rico-Martínez, *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2009).

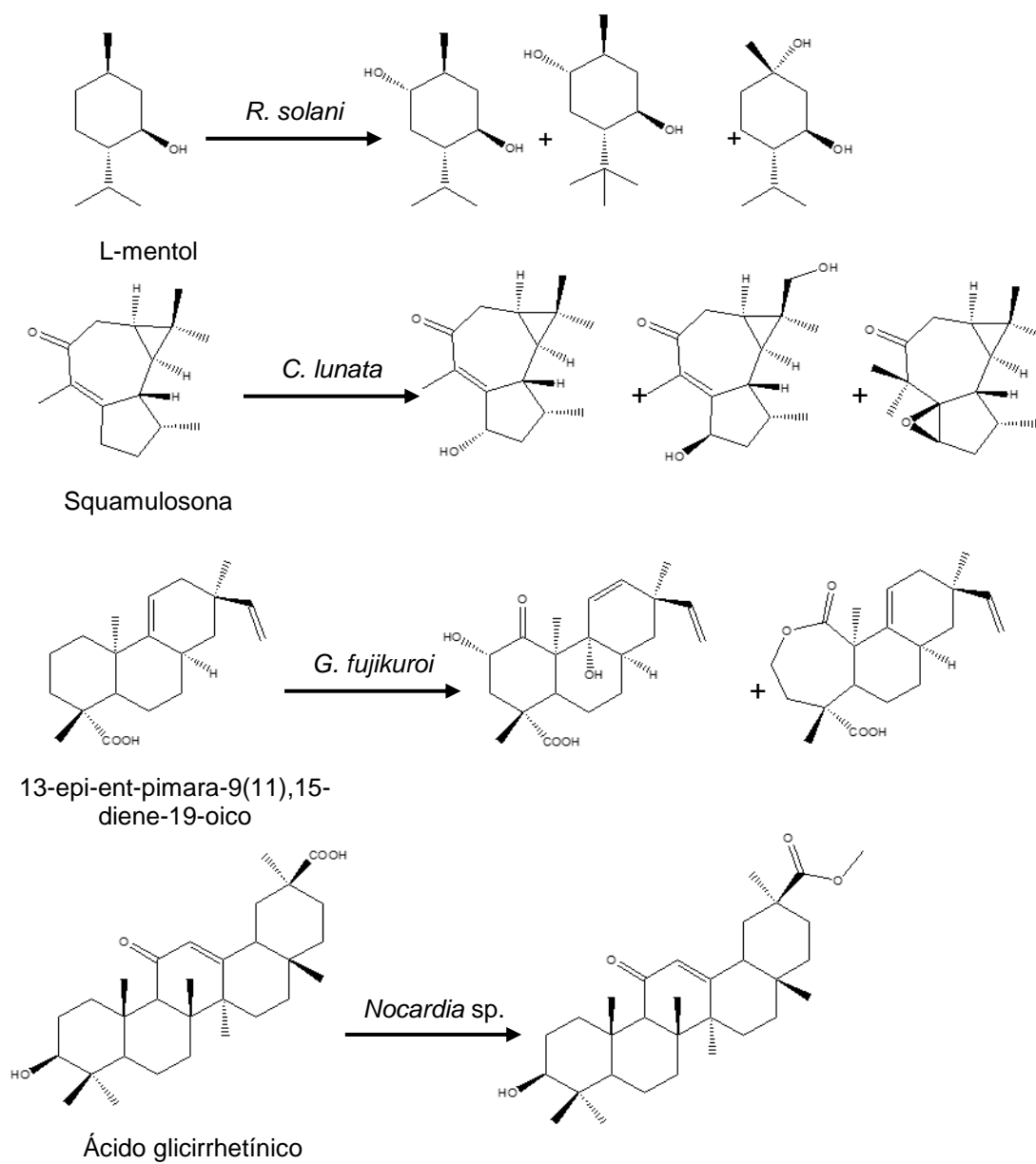
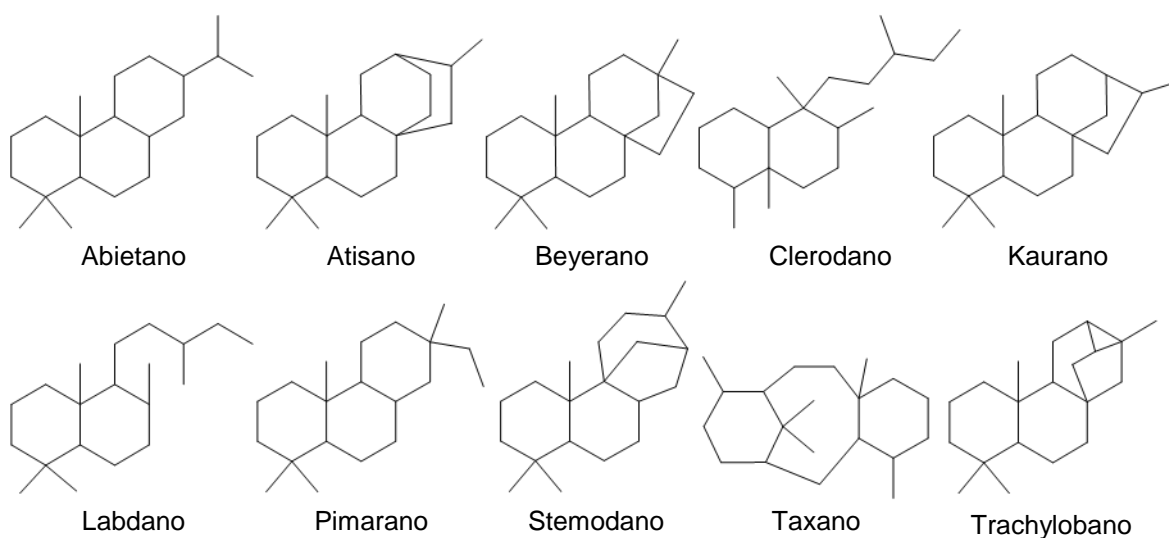


Figura 1.10 Terpenoides biotransformados y sus derivados.





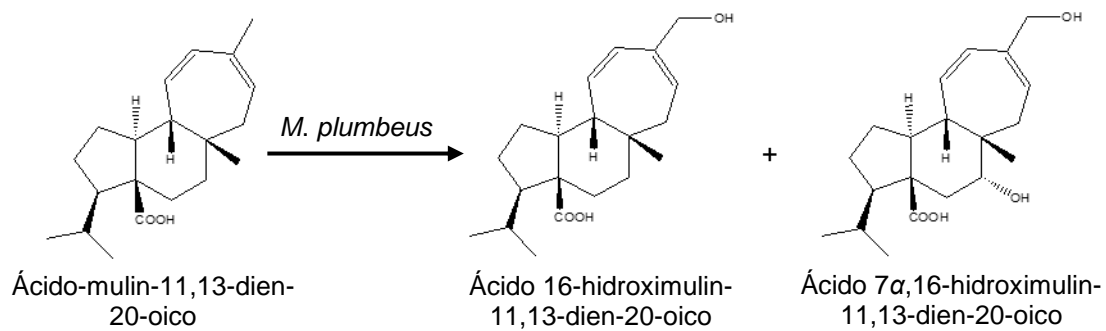
**Figura 1.11** Esqueletos de diterpenoides empleados para la biotransformación.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se propuso la biotransformación como una alternativa para la formación de derivados de diterpenoides de tipo mulinano y azorellano, utilizando los microorganismos *A. alliaceus*, *C. echinulata*, *C. lunata*, *M. circinelloides* y *N. iowensis*. Cabe mencionar que a pesar de que los reportes sobre la biotransformación de diterpenoides por parte de *A. alliaceus* son nulos o escasos, se ha reportado el uso de este microorganismo para la biotransformación de chalconas (Sánchez y Rosazza, 2006; Sánchez y Rosazza) y esteroides (Williamson *et al.*, 1989; Williamson *et al.*, 1985). En el Cuadro 1.1 se enlistan las principales biomodificaciones realizadas por los microorganismos utilizados en el presente estudio.

**Cuadro 1.1** Principales sustratos y tipos de biomodificaciones realizadas por los microorganismos utilizados en el presente estudio.

Microorganismo	Tipo de biomodificación	Sustrato	Referencia
<i>A. alliaceus</i>	Oxidación Ciclación Dealquilación	Chalcona	Sánchez y Rosazza, 2006; Sánchez y Rosazza, 2003
		Esteroide	Williamson <i>et al.</i> , 1989; Williamson <i>et al.</i> , 1985
<i>C. echinulata</i>	Oxidación Dealquilación	Alcaloide	Abel <i>et al.</i> , 2003
		Compuesto bifenílico	Seigle-Murandi <i>et al.</i> , 1991
		Diterpenoide	Lamm <i>et al.</i> , 2006
		Esteroide	Baydoun <i>et al.</i> , 2016; Dong <i>et al.</i> , 2010
		Vitamina A	Hartman <i>et al.</i> , 1990
<i>C. lunata</i>	Oxidación	Diterpenoide	Frija <i>et al.</i> , 2011; Schmeda-Hirschmann <i>et al.</i> , 2004
		Esteroide	Yang <i>et al.</i> , 2007; Changtam <i>et al.</i> , 2006; Collins y Reese, 2002
		Saponina	Feng <i>et al.</i> , 2005
		Sesquiterpenoide	Collins y Reese, 2002; Collins y Reese, 2001
<i>M. circinelloides</i>	Oxidación Alquilación Hidratación	Diterpenoide	Mitsukura <i>et al.</i> , 2005
		Monoterpenoide	Miyazawa <i>et al.</i> , 1995
		Sesquiterpenoide	Boufridi <i>et al.</i> , 2016; Maatooq, 2002
<i>N. iowensis</i>	Alquilación Rearreglo Reducción Oxidación	Fenilpropeno	Sheshadri <i>et al.</i> , 2008
		Diterpenoide	Hosny <i>et al.</i> , 2002
		Triterpenoides	Zhang <i>et al.</i> , 2005; Cheng <i>et al.</i> , 2004

Hasta ahora existe un solo trabajo sobre la biotransformación de terpenoides de tipo mulinano; reportándose la obtención de dos derivados oxidados, el ácido 16-hidroximulin-11,13-dien-20-oico y el ácido 7 $\alpha$ ,16-hidroximulin-11,13-dien-20-oico, al utilizar *M. plumbeus* para la biotransformación del ácido-mulin-11,13-dien-20-oico (Figura 1.12). Los productos obtenidos mostraron una mayor actividad gastroprotectora en comparación con el diterpenoide natural (Sepúlveda *et al.*, 2016; Areche *et al.*, 2008).



**Figura 1.12** Productos de biotransformación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico por *M. plumbeus*.

## JUSTIFICACIÓN

La resistencia de *M. tuberculosis* a los fármacos actualmente suministrados para el tratamiento de la TB, y los efectos secundarios que éstos causan, han promovido la búsqueda de nuevos productos activos contra cepas MDR y XDR de *M. tuberculosis*. Diterpenoides naturales y derivados semisintéticos de tipo mulinano y azorellano han demostrado potencial antituberculoso contra cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis*; sin embargo, la obtención de nuevos derivados semisintéticos de estos diterpenoides está limitada por los pocos grupos funcionales presentes en su estructura. La biotransformación brinda una alternativa para la obtención de derivados mediante el uso de microorganismos, principalmente de bacterias y hongos.

## HIPÓTESIS

La biotransformación de terpenoides de tipo mulinano y azorellano genera derivados con diferentes grupos funcionales con mayor actividad biológica contra *Mycobacterium tuberculosis*.

## OBJETIVO GENERAL

Obtener derivados novedosos de diterpenoides mulinano y azorellano con potencial antituberculoso mediante biotransformación utilizando cultivos fúngicos y bacterianos.

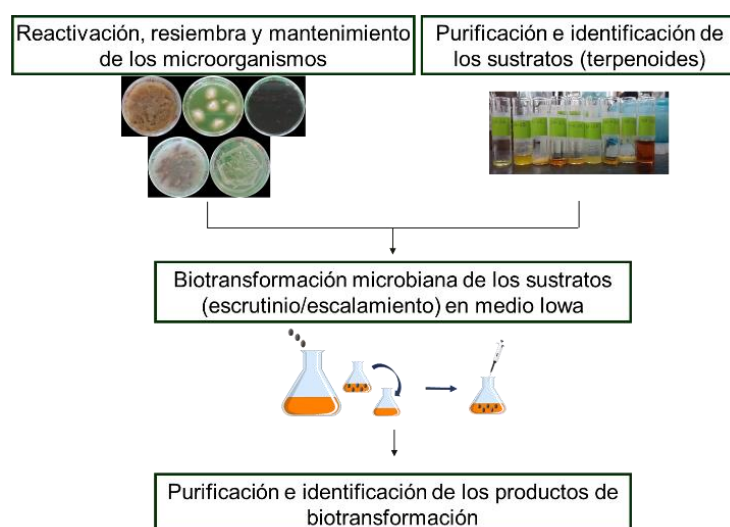
## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar e identificar a partir del extracto de *Azorella compacta* los diterpenoides a ser usados como sustratos en el proceso de biotransformación.
2. Definir las condiciones para la biotransformación de los diterpenoides de tipo mulinano utilizando diferentes microorganismos.
3. Aislar e identificar los productos de biotransformación mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo el aislamiento de los diterpenoides (sustratos) a partir del extracto hexánico de *A. compacta* utilizando técnicas cromatográficas de purificación, entre ellas la Cromatografía Líquida al Vacío (VLC) y la Cromatografía por Columna de Gravedad (CCG). Los diterpenoides (sustratos) identificados de acuerdo a sus datos espectroscópicos fueron el 13 $\beta$ -hidroximulinano (**1**), ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**2**) y 13 $\beta$ -hidroxiazorellano (**6**). Los hongos (*A. alliaceus*, *C. echinulata*, *C. lunata* y *M. circinelloides*) se reactivaron en Caldo Papa Dextrosa (PDB) y la bacteria (*N. iowensis*) en

Medio Líquido de Esporulación (MLE). Las resiembras se realizaron en tubos inclinados de Agar Papa Dextrosa (PDA) y Medio Sólido de Esporulación (MSE), para los hongos y la bacteria, respectivamente. El proceso de biotransformación de los sustratos se realizó empleando cultivos de los cinco microorganismos en medio Iowa. El potencial de biotransformación en la etapa de escrutinio de *A. alliaceus* y *M. circinelloides* para la modificación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico, dio pauta para el escalamiento de la biotransformación con la finalidad de aislar e identificar los productos generados por estos dos microorganismos. El aislamiento de los productos se realizó mediante Cromatografía en Columna Flash (CCF) y la identificación fue mediante el uso de técnicas como HPLC-ESIMS,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN, así como RMN bidimensionales.



**Figura 1.13** Diagrama de la estrategia experimental para la obtención de los productos de biotransformación.



## CAPÍTULO II

### BIOTRANSFORMACIÓN DE DITERPENOIDES TIPO MULINANO\*

#### 2.1 RESUMEN

La biotransformación del 13 $\beta$ -hidroxi-mulinano (**1**) y ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**2**), dos diterpenos aislados de extractos de *Azorella compacta*, fueron evaluados usando cuatro hongos (*Aspergillus alliaceus*, *Cunninghamella echinulata*, *Curvularia lunata* y *Mucor circinelloides*) y una bacteria (*Nocardia iowensis*). Mientras que ninguno de los microorganismos fue capaz de biotransformar a **1**, cultivos de *A. alliaceus* conteniendo **2** produjeron el metabolito conocido como ácido 16-hidroxi-mulin-11,13-dien-20-oico (**3**) en un 19.5% de rendimiento. Alternativamente, la biotransformación de **2** por cultivos de *M. circinelloides* produjo dos nuevos metabolitos identificados con base en sus datos espectroscópicos como ácido mulin-11,13-dien-16,20-dioico (**4**) y 7 $\alpha$ ,13 $\beta$ -dihidroxi-mulin-11-en-20-oico ácido (**5**).

\* Manuscrito sometido a la revista "Natural Product Communications" como "Biotransformation of mulinane diterpenoids". Autores: Stephanie G. Herrera-Canché, Mónica Sánchez-González, Luis A. Loyola, Jorge Bórquez, Karlina García-Sosa y Luis Manuel Peña-Rodríguez.



---

**Biotransformation of mulinane diterpenoids**

Stephanie G. Herrera-Canché<sup>a</sup>, Mónica Sánchez-González<sup>b</sup>, Luis A. Loyola<sup>c</sup>, Jorge Bórquez<sup>c</sup>, Karlina García-Sosa<sup>a</sup> and Luis Manuel Peña-Rodríguez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratorio de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán 97200, México*

<sup>b</sup> *Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte, Km. 33.5, Mérida, Yucatán 97200, México*

<sup>c</sup> *Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Universidad de Antofagasta, Av. Coloso S-N, Antofagasta 1240000, Chile*

lmanuel@cicy.mx

The biotransformation of 13 $\beta$ -hydroxy-mulinane (**1**) and mulin-11,13-dien-20-oic acid (**2**), two diterpenes isolated from extracts of *Azorella compacta*, was evaluated using four fungi (*Aspergillus alliaceus*, *Cunninghamella echinulata*, *Curvularia lunata*, and *Mucor circinelloides*) and one bacteria (*Nocardia iowensis*). While none of the microorganisms was able to biotransform **1**, cultures of *A. alliaceus* containing **2** produced the known metabolite 16-hydroxy-mulin-11,13-dien-20-oic acid (**3**) in 19.5% yield; alternatively, biotransformation of **2** by cultures of *M. circinelloides* produced two new metabolites identified as mulin-11,13-dien-16,20-dioic acid (**4**) and 7 $\alpha$ ,13 $\beta$ -dihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (**5**) on the basis of their spectroscopic data.

**Keywords:** *Azorella compacta*, Apiaceae, *Aspergillus alliaceus*, *Mucor circinelloides*.

## 2.2 INTRODUCTION

In the search for compounds for the treatment of different diseases, natural products continue to represent one of the most important options for obtaining and developing new pharmaceuticals (Pandey & Doerksen, 2016). It has been reported that, while 4.31% of the drugs currently in the market are natural products, a larger fraction, more than 20%, are natural products derivatives with important applications as analgesics, antibacterials, anticarcinogenic, antidiabetic, anti-inflammatory and antiviral (Newman & Cragg, 2016). Currently, terpenoids represent one of the largest and most structurally diverse groups of secondary metabolites (Guo, 2017; Dewick, 2009); of these, the diterpenoids having the azorellane and mulinane skeletons constitute a unique group of secondary metabolites produced by plants of the family Apiaceae, particularly of the genera *Azorella*, *Bolax*, *Laretia* and *Mulinum* (Liu *et al.*, 2012; Molina-Salinas *et al.*, 2010b), showing a wide variety of biological activities including antibacterial (Wächter *et al.*, 1998), antihyperglycemic (Fuentes *et al.*, 2005), antituberculosis (Molina-Salinas *et al.*, 2010a), cytotoxic (Bórquez *et al.*, 2016), gastroprotective (Salgado *et al.*, 2014; Areche *et al.*, 2008), spermicidal (Morales *et al.*, 2003), tricomonicidal (Loyola *et al.*, 2001) and trypanocidal (Araya *et al.*, 2003) of some diterpenoids azorellane and mulinane. Recently, it has been reported that semisynthetic derivatives of azorellane and mulinane diterpenoids show an increase in their antituberculosis activity when tested against susceptible and resistant strains of *M. tuberculosis* (Molina-Salinas *et al.*, 2010a; Molina-Salinas *et al.*, 2010b).

The limited number and type of functional groups in the chemical structures of natural azorellane and mulinane diterpenoids limit the number of semisynthetic derivatives that can be prepared through chemical modification; because of this, azorellane and mulinane diterpenoids represent an excellent model to study biotransformation as a new strategy to obtain new molecules with biological activity (Rico-Martínez *et al.*, 2014). Biotransformation, biocatalytic transformation or microbial transformation is defined as the modification of a substrate to generate a new, structurally-similar but different, product using cells or isolated enzymes from microorganisms (Hegazy *et al.*, 2015; Pervaiz *et al.*, 2013). The ability of microorganisms to adapt to changes in their environment, their production of a wide variety of enzymes in a short time (Smitha *et al.*, 2017), and their capacity to carry out stereo and regio specific reactions, makes biotransformation an attractive and commercially inexpensive option to obtain analogues that might not be

readily attainable by chemical modification (Sultana, 2018; Mutafova *et al.*, 2016; Parshicove & Sutherland, 2014).

The biotransformation of a number of diterpenoids with skeleton abietane (Özşen *et al.*, 2017), atisane (Fraga *et al.*, 2010), beyerane (Chang *et al.*, 2006), clerodane (Choudhary *et al.*, 2013), kaurane (Fraga *et al.*, 2005), labdane (Haridy *et al.*, 2006), pimarane (Fraga *et al.*, 2009), stemodane (Martin *et al.*, 2005), taxane (Hu *et al.*, 1996) and trachylobane (Fraga *et al.*, 2012) has been explored using mainly fungi of the *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Gibberella*, *Mucor* and *Rhizopus* genus (Rico-Martínez *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2009).

### 2.3 EXPERIMENTAL

**General and experimental procedures:** Fractionation and purification of the metabolites were carried out using technical grade solvents distilled in the laboratory. Solvents were eliminated under reduced pressure using a Büchi RE111 rotary evaporator. Vacuum Liquid Chromatography (VLC) purifications were carried out using TLC-grade silica gel GF<sub>254</sub> (Sigma-Aldrich). Thin Layer Chromatography (TLC) analysis were carried out on aluminium-backed plates impregnated with silica gel GF<sub>254</sub> (E. M. Merck); chromatograms were examined under UV light and visualised by spraying with phosphomolibdic acid reagent, followed by gentle heating. Open Column Chromatography (OCC) and Flash Column Chromatography (FCC) were carried out using silica gel 70-230 mesh and 200-400 mesh (Sigma-Aldrich), respectively.

**Equipment:** NMR analysis was carried out in a Varian/Agilent Premium Compat 600 MHz (14.1 T) spectrometer. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra and HMBC experiment of metabolite **4** were carried out in a Bruker Avance III HD 500 MHz spectrometer using a 1.7 mm capillary probe (Bruker TXI H-X/YD). HPLC analysis were carried out in a Waters e2695 Alliance instrument with PDA 2998 detector, using an Agilent Eclipse XDB-C18 column (5 µm, 4.6 x 250 mm) and a mobile phase of mixtures of H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid)-acetonitrile, with a flow rate of 0.4 mL/min. The gradient was started with 25% to 100% acetonitrile in 30 min, maintained at 100% acetonitrile for 10 min, continuing to 100% to 25% of acetonitrile in 10 min, maintaining 25% acetonitrile for 10 min.

**Purification of substrates:** The substrates **1** and **2** were isolated from a hexane extract (27 g) of *A. compacta*. The extract was fractionated by VLC (column 9 x 5 cm) using a gradient elution with mixtures of hexane:ethylacetate (300 mL). The collected fractions were combined into nine major fractions by comparing their TLC chromatographic profiles. Successive chromatographic purifications using OCC resulted in the isolation of 13 $\beta$ -hydroxy-mulinane (**1**, 135 mg) and mulin-11,13-dien-20-oic acid (**2**, 1.111 mg), which were identified by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature (Areche *et al.*, 2013; Loyola *et al.*, 1997a).

**Microorganisms:** *Aspergillus alliaceus* UI 315, *Cunninghamella echinulata* ATCC 3655, *Curvularia lunata* ATCC 2178, *Mucor circinelloides* ATCC 7941 and *Nocardia iowensis* NRRL 5646 cultures were used for screening and scale up of biotransformation experiments.

**Conditions of culture medium:** Fungi were reactivated using commercial Potato Dextrose Broth (PDB), while *N. iowensis* was reactivated using Liquid Sporulation Medium (LSM) [yeast extract (1 g/L), meat extract (1 g/L), tryptone (2 g/L), FeSO<sub>4</sub> (0.002 g/L) and dextrose (10 g/L)]. Fungi were maintained in Potato Dextrose Agar (PDA) slants, while *N. iowensis* was maintained in Solid Sporulation Medium (SSM) slants [yeast extract (1 g/L), meat extract (1 g/L), tryptone (2 g/L), FeSO<sub>4</sub> (0.002 g/L), dextrose (10 g/L) and agar (15 g/L)]. Finally, biotransformation studies were carried out using the Iowa Culture Medium (ICM) [glucose (20 g/L), yeast extract (5 g/L), soybean meal (5 g/L), NaCl (5 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 g/L), and 6N HCl to adjust pH to 7].

**Screening biotransformation:** Initial 1 mL spore suspensions of 1x10<sup>6</sup> sp/mL for *A. alliaceus* and *M. circinelloides*, 2x10<sup>6</sup> sp/mL for *C. lunata*, as well as a mycelium suspension of *C. echinulata* and a cellular suspension of *N. iowensis* were used to inoculate 25 mL of ICM contained in a 125 mL flask (two flasks). The cultures were allowed to grow for 72 h, at 28° C, under shake (200 rpm) conditions. For the second stage, an aliquot (10% v/v) of the 72 h cultures was used to inoculate 25 mL of fresh ICM and the new cultures were left to incubate at 28° C and 200 rpm. After 24 h, 250  $\mu$ L of the substrate (50 mg/mL) in *N,N*-dimethylformamide was added. The biotransformation process was monitored every 24 h for 10 days; a 1 mL aliquot of the culture was separated from the mycelium by centrifugation and both the mycelium and culture broth were extracted with ethylacetate. Biotransformation was evaluated by analysing the TLC

chromatographic profiles of the different extracts. Both the non-inoculated and the inoculated ICM, without substrate, were used as controls.

**Scale up of biotransformation:** Scale up biotransformation of **2** (100 mg) was carried out using cultures of *A. alliaceus* and *M. circinelloides*; first and second stage followed the procedure described before; after 24 h, 250  $\mu$ L of the substrate solution (50 mg/mL) in *N,N*-dimethylformamide was used to inoculate 25 mL (eight flasks) and the cultures were incubated at 28°C and 200 rpm. After 144 h the mycelium was separated from the culture medium and the filtrate was extracted with ethylacetate. The solvent was dried over with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated *in vacuo* to produce the corresponding crude extracts of *A. alliaceus* (106 mg; 0.53 mg/mL) and *M. circinelloides* (168 mg; 0.79 mg/mL).

**Isolation of biotransformation products:** The extract of *A. alliaceus* (106 mg) was purified by FCC (2 x 20 cm; gradient elution with mixtures of hexane:ethylacetate) to produce 4 mg (4%) of substrate **2** and 19.5 mg (19.5%) of biotransformation product **3**. Similarly purification of the *M. circinelloides* extract using FCC (2 x 20 cm, gradient elution with mixtures of hexane:ethylacetate) yielded 0.5 mg of **2** (0.5%) and 4 mg (4%) of **4** and 0.9 mg of **5** (0.9%).

#### **Mulin-11,13-dien-16,20-dioic acid (4)**

Yellow oil

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Table 1.

$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Table 1.

ESI-MS: negative mode  $m/z = 330.86$  [ $\text{M}-2\text{H}$ ] $^-$ .

#### **7 $\alpha$ ,13 $\beta$ -dihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (5)**

Yellow oil

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Table 1.

$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Table 1.

## **2.4 RESULTS AND DISCUSSION**

As part of our continuing interest for preparing new azorellane and mulinane derivatives with biological activity, we wish to report herein on the biotransformation of two mulinane diterpenoids, 13 $\beta$ -hydroximulinane (**1**) and mulin-11,13-dien-20-oic acid (**2**), using four

fungi (*Aspergillus alliaceus*, *Cunninghamella echinulata*, *Curvularia lunata*, *Mucor circinelloides*) and one bacteria (*Nocardia iowensis*), which resulted in the identification of metabolites **3-5** (Figure 1).

The initial screening of the biotransformation of substrates **1** and **2** showed that none of the microorganisms appeared to biotransform **1**. However, cultures of *A. alliaceus* containing **2** as the substrate generated a biotransformation product after 144 hours of incubation; the isolated metabolite was identified as 16-hydroxy-mulin-11,13-dien-20-oic acid (**3**) by comparing its  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectral data with those reported in the literature (Areche *et al.*, 2008). This oxidized derivative of **2** was first reported as a biotransformation product from Czapek-Dox cultures of *M. plumbeus* and has been reported to show a gastroprotective effect (Sepúlveda *et al.*, 2016; Areche *et al.*, 2008). It is interesting to point out that while **3** was obtained in only 0.8% yield after culturing *M. plumbeus* for 15 days [30a], our investigation allowed the isolation of the same product with a higher yield (19.5 %), in a shorter time (6 days), from cultures of *A. alliaceus* kept in lowa medium.

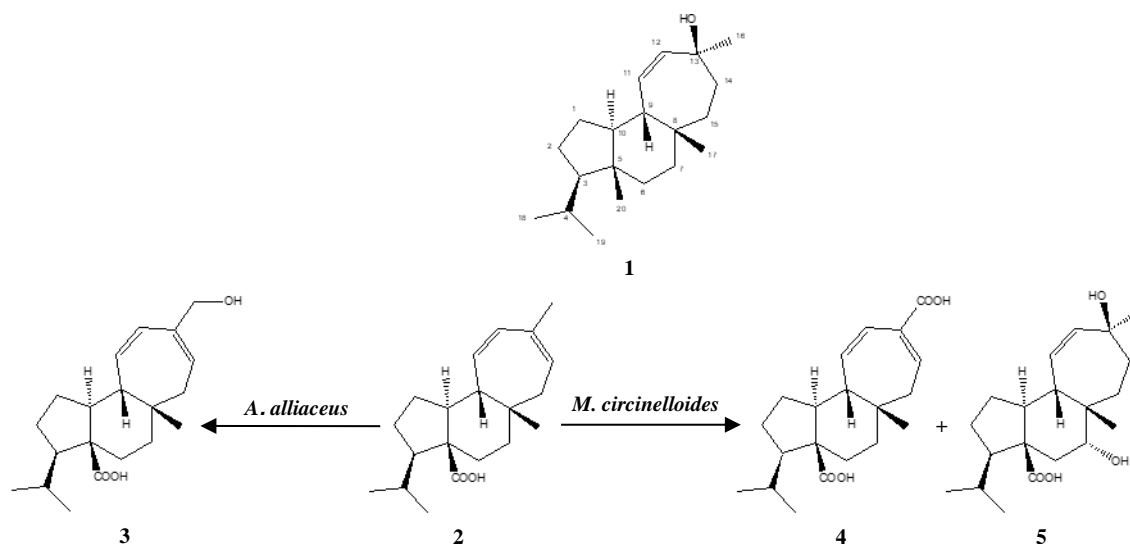


Figure 1: Mulinane substrates (**1-2**) and the biotransformation products of **2** (**3-5**).

Alternatively, cultures of *M. circinelloides* having **2** as the substrate generated the new metabolites **4** and **5** as biotransformation products after 144 hours of incubation. The ESIMS (negative mode) fragmentation pattern of **4** showed a molecular ion peak  $[\text{M}-2\text{H}]^-$  at  $m/z$  330, which suggested a molecular formula of  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$  for the isolated metabolite. The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of **4** (Table 1) proved to be very similar to that of **2**, with the main

difference being the absence of the characteristic H-16 methyl group signal in the spectrum of the new metabolite; a closer analysis of the signals corresponding to the three vinyl protons in the structure showed that, while they were all displaced to lower fields [ $\delta_{\text{H}}$  5.81 (dd,  $J = 12.5, 6.5$  Hz, H-11); 6.39 (d,  $J = 12.5$  Hz, H-12); and 7.18 (d,  $J = 6.5$  Hz, H-14)], H-14 proved to be the most deshielded signal, suggesting its being part of an  $\alpha,\beta$ -unsaturated system with a carbonyl group at C-16. The presence of an extra unsaturation site in the structure of **4**, when compared to that of **2**, was confirmed by its index of hydrogen deficiency (IHD) calculated from the corresponding molecular formula; the absence of the characteristic aldehyde proton signal in the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of **4** strongly suggested that C-16 had been oxidized to a carboxyl group by *M. circinelloides*. This was confirmed by comparing the chemical shift values of the H-11, H-12 and H-14 of **4** with those reported for mulin-11,13-dien-18-acetoxy-16,20-dioic acid [ $\delta_{\text{H}}$  5.80 (dd,  $J = 13.0, 6.5$  Hz, H-11); 6.42 (d,  $J = 13.0$  Hz, H-12); and 7.21 (brd,  $J = 7.1$  Hz, H-14)] (Areche *et al.*, 2013) and by the long-range correlations observed between the C-16 carboxyl group carbon ( $\delta_{\text{C}}$  172.1) and the H-14 and H-12 signals ( $\delta_{\text{H}}$  7.18 and 6.39, respectively) in the HMBC experiment of **4**. On the basis of these findings, the new metabolite **4** was identified as mulin-11,13-dien-16,20-dioic acid.

The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the second biotransformation product **5** (Table 1) was also similar to that of the substrate **2**; the main differences being the absence of the characteristic H-14 vinyl proton signal in the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of **5**, indicating that the C-13/C-14 double bond had been reduced, and the presence of a carbinol proton at  $\delta_{\text{H}}$  3.17 (d,  $J = 10.5$  Hz), suggesting the presence of a secondary alcohol in the structure of **5**. The reduction of the C-13/C-14 double bond was confirmed by a new two-proton signal at  $\delta_{\text{H}}$  1.42 (bd,  $J = 13.1$  Hz) in the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum, corresponding to the C-14 methylene protons, and an oxygenated carbon signal at  $\delta_{\text{C}}$  64.7 in the  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum, indicating the presence of a hydroxyl group in C-13. The  $\beta$ -orientation of the C-13 hydroxyl group was established by comparing the  $^{13}\text{C}$  chemical shifts for C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  64.7) and C-16 ( $\delta_{\text{C}}$  32.4) in **5** with those reported for the same carbons in in  $13\beta$ -hydroxymulinane ( $\delta_{\text{C}}$  70.9 and 33.2, respectively) (Areche *et al.*, 2013). The position of the secondary alcohol in the structure of **5** was suggested by the reported isolation of  $7\alpha,16$ -dihydroxy-mulin-11,13-dien-20-oic acid as a biotransformation product of **2** by cultures of *M. plumbeus* (Areche *et al.*, 2008), and confirmed by the chemical shifts of the carbinol proton ( $\delta_{\text{H}}$  3.17) and the oxygenated methine carbon ( $\delta_{\text{C}}$  67.2) in the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra of **5**, respectively. On

the basis of these results, metabolite **5** was identified as the novel  $7\alpha,13\beta$ -dihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid. The results of this investigation confirm the importance of biotransformation as an alternative to obtain new derivatives of natural products.

Table 1.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data (600 and 150 MHz,  $\delta$  in ppm) for **4** and **5** in  $\text{CDCl}_3$ .

C	<b>4</b>		<b>5</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	2.04, dd (9.8; 7.8)	24.5	2.08, d (12.3)	24.7
2	1.94, m	28.8	1.95, m	28.6
3	1.48, m	57.6	1.54, m	57.3
4	1.48, m	31.8	1.54, m	31.8
5	--	58.5	--	57.3
6	2.48, d (12.9)	32.7	2.46, d (10.1)	42.7
7	2.85, d (13.0)	40.8	3.17, d (10.5)	67.2
8	--	35.1	--	41.5
9	2.29, dd (10.0, 6.5)	50.2	2.32, d (12.5)	47.6
10	1.64, m	55.4	1.79, m	51.5
11	5.81, dd (12.5, 6.5)	135.0	5.59, d (12.0)	131.6
12	6.39, d (12.5)	120.4	5.79, d (12.0)	132.6
13	--	128.4	--	64.7
14	7.18, d (6.5)	143.5	1.42, d (13.1)	32.4
15	1.47, d (6.0)	37.3	2.21, dd (12.5, 9.0)	30.7
16	--	172.1	1.22, s	32.4
17	0.86, s	27	0.85, s	27.2
18	0.87, d (6.0)	22.7	0.86, d (5.5)	22.7
19	1.03, d (6.0)	22.3	1.01, d (5.5)	22.2
20	--	179.4	--	179.0

**Acknowledgments.** This work is part of the master thesis of Stephanie G. Herrera-Canché supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant number 612330). The authors wish to thank to Karla Kú Durán, Erick Ic Caamal, and Fabiola Escalante Erosa for technical support. Additionally, LMPR wishes to recognize the very important role played by Prof. Mahabir Gupta in many of our international collaborations, particularly with Latin America; the legacy of his vision and dedication as “Coordinador del Sub-Programa X de Química Fina Farmacéutica del Programa Iberoamericano CYTED” will endure for many years to come.







---

ATCC 27924) y resistente (CIBIN/UMF 15:99) de *M. tuberculosis*, respectivamente (Molina-Salinas *et al.*, 2010a).

Los diterpenoides **1**, **2** y **6** se utilizaron como sustrato para el proceso de biotransformación empleando cultivos fúngicos y bacterianos. El proceso de biotransformación se llevó a cabo controlando parámetros como concentración del inóculo inicial, temperatura de incubación, agitación y pH inicial, con la finalidad de hacer el proceso reproducible para el escalamiento de la biotransformación. Estas condiciones de biotransformación son comúnmente utilizadas en la mayoría de los reportes encontrados en la literatura, debido a que son fáciles de controlar y son de bajo costo (De Carvalho y Da Fonseca, 2005). Asimismo, se consideró el empleo de cultivos en medio líquido para la biotransformación de los diterpenoides, empleando el medio de cultivo lowa que, por su contenido de componentes como el extracto de levadura y la harina de soya, favorece el crecimiento de los microorganismos en corto tiempo (Willey *et al.*, 2008). En general, se ha reportado el uso de medios de cultivo complejos, es decir, aquellos de composición variable y que puedan contener componentes de origen animal o vegetal, para la biotransformación de diversos sustratos, y también para el caso de la biotransformación de diterpenoides de tipo abietano (Özşen *et al.*, 2017; Willey *et al.*, 2008), atisano (Fraga *et al.*, 2010) y taxano (Hu *et al.*, 1996). El medio lowa en particular ha sido empleado para la biotransformación de diterpenoides de tipo beyerano (Chang *et al.*, 2006).

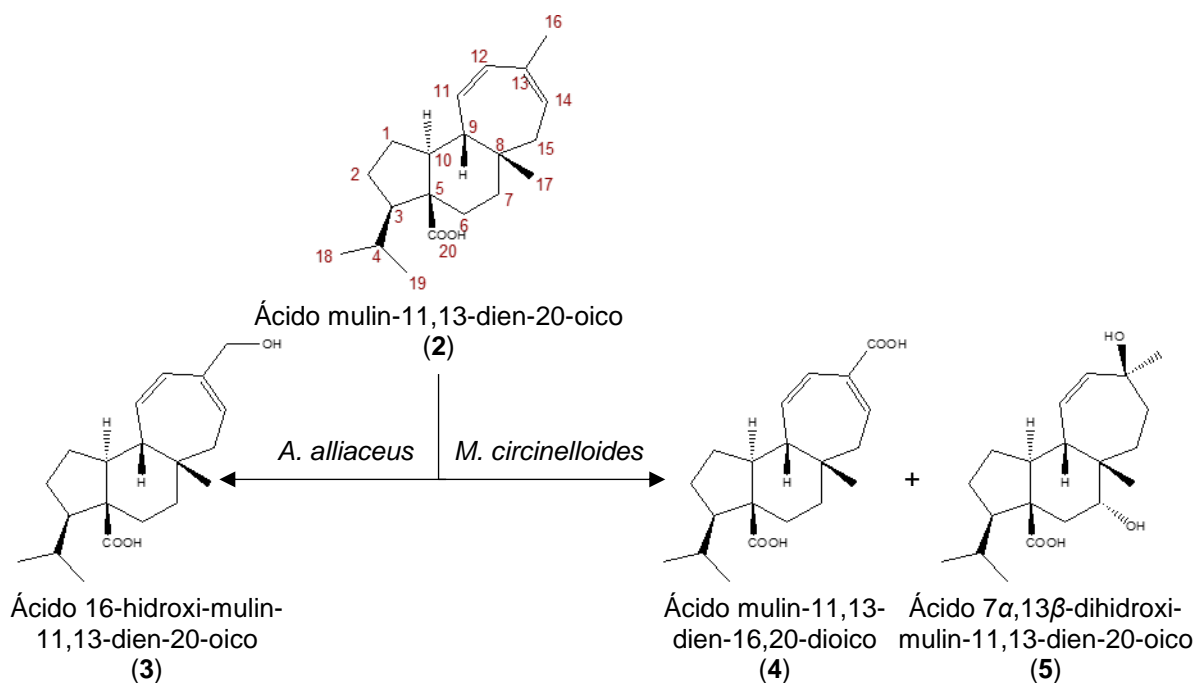
En cuanto a la biotransformación de los sustratos **1**, **2** y **6**, se observó que ninguno de los microorganismos empleados en este trabajo tuvo la capacidad de biotransformar a **1**, posiblemente porque el diterpenoide no es tóxico para los microorganismos bajo las condiciones llevadas a cabo en el proceso de biotransformación (Pervaiz *et al.*, 2013). En el escrutinio de la biotransformación de **2**, el análisis del perfil cromatográfico por HPLC, indicó que a las 72 horas de incubación *C. lunata* generó cuatro productos de mayor polaridad ( $t_R$  21.27, 24.93, 25.77 y 27.03 min) respecto a **2** ( $t_R$ : 43.48 min). En cuanto al escrutinio de la biotransformación de **6**, el análisis del perfil cromatográfico por HPLC, indicó la generación de productos de biotransformación por *C. lunata* ( $t_R$  27.08 min) a las 72 h, *M. circinelloides* ( $t_R$  14.76 y 17.91) a las 144 h y *N. iowensis* ( $t_R$  19.07 min) a las 144 h, estos microorganismos generaron productos de mayor polaridad con respecto a **6** ( $t_R$ : 43.40 min). Con lo anterior se sugiere que los microorganismos catalizaron posiblemente la formación de alcoholes o ácidos carboxílicos en la molécula, dando como resultado el aumento de su polaridad con respecto a los sustratos. Por otro lado, debido a la poca

cantidad de sustrato disponible, no se logró la obtención de los productos de biotransformación en su forma pura de los derivados de **2** por *C. lunata* y **6** por *C. lunata*, *M. circinelloides* y *N. iowensis*. Asimismo, no se logró realizar la evaluación contra *M. tuberculosis* debido a que la cantidad obtenida de los productos de biotransformación (**3**, **4** y **5**) fueron insuficientes para llevar a cabo el ensayo.

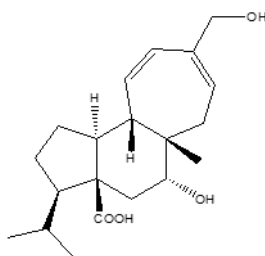
El escalamiento de la biotransformación **2** por *A. alliaceus* a las 144 h de incubación (6 días), dio lugar a la generación del metabolito oxidado reportado anteriormente como ácido 16-hidroxi-mulin-11,13-dien-20-oico (**3**) (Figura 3.2), con un rendimiento del 19.5%. Este rendimiento es más alto al reportado en la literatura, en donde utilizando *M. plumbeus* lograron obtener **3** con un rendimiento del 0.8% a los 15 días de cultivo (Areche *et al.*, 2008). *A. alliaceus* constituye una mejor opción para la producción de **3** debido al alto rendimiento de producción y a su obtención en corto tiempo. De igual forma, en este trabajo se reporta por primera vez la obtención de **3** empleando cultivos de *A. alliaceus* en medio Iowa y la biotransformación de diterpenoides utilizando este microorganismo. *A. alliaceus* realiza reacciones de oxidación, principalmente la formación de grupos oxhidrilo (OH), en sustratos como chalconas (Sanchez y Rosazza, 2006) y en el alcaloide ellipticina (Formisyn *et al.*, 1994). Por otro lado, otras especies de *Aspergillus* como *A. niger* han sido empleadas ampliamente para biotransformar diterpenoides de esqueleto abietano (Choudhary *et al.*, 2005), beyerano (De Oliveira *et al.*, 1999), labdano (Haridy *et al.*, 2006) kaurano (García-Granados *et al.*, 1986), stemodano (Chen y Reese, 2002) y taxano (Shen *et al.*, 2003).

Cultivos de *M. circinelloides* conteniendo **2** generaron dos metabolitos nuevos después de 144 h (6 días) de cultivo, los productos de biotransformación fueron identificados como ácido mulin-11,13-dien-16,20-dioico (**4**) y ácido 7 $\alpha$ ,13 $\beta$ -dihidroxi-mulin-11-en-20-oico (**5**) (Figura 3.2), obtenidos con un 4% y 0.9%, respectivamente, mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos. Los resultados de este trabajo y de trabajos anteriores demuestran que, el metilo en C-16 de **2** es una de las posiciones más susceptibles a la oxidación microbiana (Areche *et al.*, 2008). Mientras *A. alliaceus* y *M. plumbeus* han tenido la capacidad de oxidar el C-16 a un alcohol primario, *M. circinelloides* produjo un grupo carboxilo. Asimismo, la obtención del 7 $\alpha$ ,13 $\beta$ -dihidroxi-mulin-11-en-20-oico (**5**) resulta aún más interesante, debido a la capacidad de *M. circinelloides* para oxidar el C-7 formando un alcohol secundario en posición  $\alpha$ , la formación de alcoholes en carbonos inactivados (e.g. C-7) por transformación química representa un reto muy grande, debido

a la complejidad que resulta modificar esos sitios (Birolli *et al.*, 2009). La oxidación en posición  $\alpha$  del C-7 ha sido reportada por primera vez en la biotransformación de **2** dando lugar al ácido  $7\alpha,16$ -dihidroxi-mulin-11,13-dien-20-oico (Figura 3.3) en cultivos de *M. plumbeus* (Areche *et al.*, 2008).



**Figura 3.2** Estructuras químicas de los productos de biotransformación (**3**, **4** y **5**) de **2**.



**Figura 3.3** Estructura química del ácido  $7\alpha,16$ -dihidroxi-mulin-11,13-dien-20-oico.

Por otro lado, la reducción del doble enlace en los C-13/C-14 del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**2**) para dar lugar a la formación del alcohol terciario en posición  $\beta$  en el ácido  $7\alpha,13\beta$ -dihidroxi-mulin-11,13-dien-20-oico (**5**) resulta particularmente interesante, por lo que es

posible considerar a *M. circinelloides* por su capacidad de realizar más de una modificación en la misma molécula.

De manera general, los microorganismos utilizados en el presente estudio generaron principalmente reacciones de oxidación en diferentes sitios de la molécula. Se ha reportado que las enzimas monooxigenasas del citocromo P-450 de los microorganismos catalizan la oxidación de una gran cantidad de moléculas de carácter hidrofóbico principalmente (Das y Rosazza, 2006), dando lugar a derivados con mayor polaridad en comparación con los sustratos (Smitha *et al.*, 2017).

### 3.2 CONCLUSIONES

Se confirmó que el extracto de baja polaridad (hexánica) de la especie *A. compacta* Phil. es una de las fuentes más ricas para la obtención de diterpenoides de tipo mulinano y azorellano. En este trabajo se aislaron los diterpenoides reportados en la literatura como 13 $\beta$ -hidroximulinano (**1**), ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**2**) y 13 $\beta$ -hidroxiazorellano (**6**), los cuales fungieron como sustratos para el proceso de biotransformación.

Las condiciones utilizadas para el proceso de biotransformación (pH, medio de cultivo, temperatura, concentración inicial del inóculo y agitación) fueron adecuadas para el crecimiento y desarrollo de los cinco microorganismos empleados, así como para llevar a cabo la biotransformación de los sustratos **2** y **6**, teniendo como resultado la generación de derivados de mayor polaridad a partir del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**2**) y 13 $\beta$ -hidroxiazorellano (**6**).

Ninguno de los microorganismos empleados en este estudio tuvo la capacidad de biotransformar al 13 $\beta$ -hidroximulinano (**1**) bajo las condiciones establecidas en el presente estudio, por lo que posiblemente no fue tóxico para los microorganismos.

Se reporta por primera vez la biotransformación de diterpenoides por *A. alliaceus*, así como la obtención del derivado oxidado ácido 16-hidroxi-mulin-11,13-dien-20-oico (**3**) a partir del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**2**) en cultivos de este microorganismo en medio lowa, con un rendimiento del 19.5%, considerado un rendimiento alto comparado con lo reportado en la literatura (0.8%).

Se reporta por primera vez la obtención de dos nuevos derivados del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**2**) empleando cultivos de *M. circinelloides* en medio lowa, el producto oxidado ácido mulin-11,13-dien-16,20-dioico (**4**) y el producto oxidado/reducido ácido 7 $\alpha$ ,13 $\beta$ -dihidroximulin-11-en-20-oico (**4**), en un 4% y 0.9% de rendimiento. Con estos productos se confirmó la importancia de *M. circinelloides* para catalizar reacciones en sitios inactivos de la molécula (C-7).

Por otro lado, se confirmó que las principales reacciones catalizadas por los microorganismos son oxidaciones en diferentes puntos de la molécula, sin embargo, *M. circinelloides* catalizó una reacción de reducción.

La obtención de los derivados ácido 16-hidroxi-mulin-11,13-dien-20-oico (**3**), ácido mulin-11,13-dien-16,20-dioico (**4**) y ácido  $7\alpha,13\beta$ -dihidroxi-mulin-11-en-20-oico (**5**), dan pauta para la preparación de nuevos derivados por transformación química, modificando los grupos funcionales formados en las moléculas y evaluar su posible efecto antituberculoso.

### 3.3 PERSPECTIVAS

En estudios posteriores se propone realizar el escalamiento en mayor cantidad del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**2**) para la obtención de los productos generados por *C. lunata* en su forma pura, así como el escalamiento de la biotransformación del  $13\beta$ -hidroxiazorellano (**3**), para la obtención de los productos de biotransformación generados por *C. lunata*, *M. circinelloides* y *N. iowensis*.

Se propone realizar el aislamiento de un mayor número de diterpenoides de tipo mulinano y azorellano a partir del extracto de baja polaridad de *A. compacta*, considerada una rica fuente para la obtención de este tipo de diterpenoides, en cantidades necesarias para el escrutinio de biotransformación y posible escalamiento, así como emplear un mayor número de microorganismos tanto de hongos como bacterias para llevar a cabo dicho proceso.

En cuanto a los productos purificados, ácido 16-hidroxi-mulin-11,13-dien-20-oico (**3**), ácido mulin-11,13-dien-16,20-dioico (**4**) y ácido  $7\alpha,13\beta$ -dihidroxi-mulin-11-en-20-oico (**5**), se sugiere realizar la obtención en mayor cantidad para realizar la evaluación antituberculosa contra cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis*, y con ello relacionar la actividad antituberculosa con los nuevos grupos funcionales formados en los derivados.

Se propone considerar a los derivados ácido 16-hidroxi-mulin-11,13-dien-20-oico (**3**), ácido mulin-11,13-dien-16,20-dioico (**4**) y ácido  $7\alpha,13\beta$ -dihidroxi-mulin-11-en-20-oico (**5**), como cabeza de serie para la obtención de nuevos derivados por derivatización química, realizando reacciones de alquilación, reducción u oxidación en los nuevos grupos funcionales formados en las moléculas por biotransformación y evaluar su efecto antituberculoso contra cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis*.



---

**REFERENCIAS**

- Abdel-Malek, S., Bastien, J. W., Mahler, W. F., Jia, Q., Reinecke, M. G., Robinson Jr., W. E., Shu, Y. H. y Zalles-Asin, J. (1996). Drug leads from the Kallawaya herbalists of Bolivia. 1. Background, rationale, protocol and anti-HIV activity. *Journal of Ethnopharmacology*, *50*, 157-166.
- Abel, A. M., Carnell, A. J., Davis, J. A. y Paylor, M. (2003). The synthesis of buprenorphine intermediates by regioselective microbial *N*- and *O*-demethylation reactions using *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384. *Enzyme and Microbial Technology*, *33*, 743-748.
- Aguinaldo, A. M., Dalangin-Mallari, V. M., Macabeo, A. P. G., Byrne, L. T., Abe, F., Yamauchi, T. y Franzblau, S. G. (2007). Quinoline alkaloids from *Lunasia amara* inhibit *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *29*, 744-746.
- Alfarra, H. Y. y Omar, M. N. (2013). Microbial transformation of natural products. *Greener Journal of Biological Sciences*, *3*, 357-364.
- Araya, J. E., Neira, I., Silva, S. D., Mortara, R. A., Manque, P., Cordero, E., Sagua, H., Loyola, A., Bórquez, J., Morales, G. y González, J. (2003). Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *98*, 413-418.
- Areche, C., Rojas-Álvarez, F., Campos-Briones, C., Lima, C., Pérez, E. G. y Sepúlveda, B. (2013). Further mulinane diterpenoids from *Azorella compacta*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *65*, 1231-1238.
- Areche, C., Loyola, L. A., Bórquez, J., Rovirosa, J. y San-Martin, A. (2008). Microbial transformation of the diterpene mulin-11, 13-dien-20-oic acid by *Mucor plumbeus*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *46*, 765-768.
- Baydoun, E., Wahab, A. T., Shoaib, N., Ahmad, M. S., Abdel-Massih, R., Smith, C., Naveed, N. y Choudhary, M. I. (2016). Microbial transformation of contraceptive drug etonogestrel into new metabolites with *Cunninghamella blakesleeana* and *Cunninghamella echinulata*. *Steroids*, *115*, 56-61.

- Bhatti, H. N., Khan, S. S., Khan, A., Rani, M., Ahmad, V. U. y Choudhary, M. I. (2014). Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. *Phytomedicine*, *21*, 1597-1626.
- Bhatti, H. N. y Khera, R. A. (2014). Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research*, *16*, 70-104.
- Birolli, W. G., Ferreira, I. M., Alvarenga, N., Santos, D. D. A., Matos, I. L. D., Comasseto, J. V. y Porto, A. L. M. (2015). Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. *Biotechnology Advances*, *33*, 481-510.
- Borges, K. B., Souza Borges, W. D., Durán-Patrón, R., Tallarico Pupo, M., Sueli Bonato, P. y González Collado, I. (2009). Stereoselective biotransformation using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, *20*, 385-397.
- Bórquez, J., López Bartolucci, N., Echiburú-Chau, C., Winterhalter, P., Vallejos, J., Jerz, G. y Simirgiotis, M. J. (2016). Isolation of cytotoxic diterpenoids from the Chilean medicinal plant *Azorella compacta* Phil from the Atacama Desert by high-speed counter-current chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*, 2832-2838.
- Boufridi, A., Petek, S., Evanno, L., Beniddir, M. A., Debitus, C., Buisson, D. y Poupon, E. (2016). Biotransformations versus chemical modifications: new cytotoxic analogs of marine sesquiterpene ilimaquinone. *Tetrahedron Letters*, *57*, 4922-4925.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE), 2009. Estándares para la atención de la Tuberculosis en México. [Online] Disponible en: [http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/estándares\\_atencion\\_tb\\_sinlogos.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/estándares_atencion_tb_sinlogos.pdf) [Acceso 10 de abril 2018]
- Chang, S. F., Yang, L. M., Hsu, F. L., Hsu, J. Y., Liaw, J. H. y Lin, S. J. (2006). Transformation of steviol-16 $\alpha$ ,17-epoxide by *Streptomyces griseus* and *Cunninghamella bainieri*. *Journal of Natural Products*, *69*, 1450-1455.

- Changtam, C., Sukcharoen, O., Yingyongnarongkul, B. y Suksamran, A. (2006). Biotransformations of 20-hydroxyecdysone and analogues by *Curvularia lunata* NRRL 2178. *Steroids*, 71, 902-907.
- Chen, J. J., Chou, T. H., Peng, C. F., Chen, I. S. y Yang, S. Z. (2007). Antitubercular dihydroagarofuranoid sesquiterpenes from the roots of *Microtropis fokienensis*. *Journal of Natural Products*, 70, 202-205.
- Chen, A. R. M. y Reese, P. B. (2002). Biotransformation of terpenes from *Stemodia maritima* by *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Phytochemistry*, 59, 57-62.
- Cheng, Z. H., Yu, B. Y., Cordell, G. A. y Qiu, S. X. (2004). Biotransformation of quinovic acid glycosides by microbes: direct conversion of the ursane to the oleanane triterpene skeleton by *Nocardia* sp. NRRL 5646. *Organic Letters*, 6, 3163-3165.
- Chiang, C. C., Cheng, M. J., Peng, C. F., Huang, H. Y. y Chen, I. S. (2010). A novel dimeric coumarin analog and antimycobacterial constituents from *Fatoua pilosa*. *Chemistry and Biodiversity*, 7, 1728-1736.
- Chien, Y., Peng, C., Lin, C., Chen, I. y Tsai, I. (2010). Secondary metabolites from the root of *Ehretia longiflora* and their antitubercular activity. *Planta Medica*, 76, P436.
- Chinsembu, K. C. (2016). Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosis agents. *Acta Trópica*, 153, 46-56.
- Choudhary, M. I., Gondal, H. Y., Abbaskhan, A. y Atta-ur-Rahman (2005). Microbial transformations of gelomulide G: A member of the rare class of diterpene lactones. *Chemistry and Biodiversity*, 2, 1401-1408.
- Choudhary, M. I., Mohammad, M. Y., Musharraf, S. G., Onajobi, I., Mohammad, A., Anis, I., Shah, M. R. y Atta-ur-Rahman (2013). Biotransformation of clerodane diterpenoids by *Rhizopus stolonifer* and antibacterial activity of resulting metabolites. *Phytochemistry*, 90, 56-61.
- Claramunt, R., Farrán, M., Pérez, M. y Santa D. (2013). *Química bioorgánica y productos naturales*. UNED. Madrid. pp. 206.

- Collins, D. O., Buchanan, G. O., Reynolds, W. F. y Reese, P. B. (2001). Biotransformation of squamulosone by *Curvularia lunata* ATCC 12017. *Phytochemistry*, 57, 377-383.
- Collins, D. O. y Reese, P. B. (2002). Biotransformation of cadina-4,10(15)-dien-3-one and 3 $\alpha$ -hydroxycadina-4,10(15)-diene by *Curvularia lunata* ATCC 12017. *Phytochemistry*, 59, 489-492.
- Collins, D. O. y Reese, P. B. (2001). Biotransformation of cedrol by *Curvularia lunata* ATCC 12017. *Phytochemistry*, 56, 417-421.
- Das S. y Rosazza J. P. N. (2006), Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *Journal of Natural Products*, 69, 499-508.
- De Carvalho, C. C. C. R. y Da Fonseca, M. M. R. (2006). Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances*, 24, 134-142.
- De Oliveira, B. H., Dos Santos, M. C. y Leal, P. C. (1999). Biotransformation of the diterpenoid, isosteviol, by *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus arrhizus*. *Phytochemistry*, 51, 737-741.
- Delporte, C., Backhouse, N., Salinas, P., San-Martín, A., Bórquez, J. y Loyola, A. (2003). Pharmaco-toxicological study of diterpenoids. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 11, 1187-1190.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex. pp. 1256.
- Dong, T., Wu, G. W., Wang, X. N., Gao, J. M., Chen, J. G. y Lee, S. S. (2010). Microbiological transformation of diosgenin by resting cells of filamentous fungus, *Cunninghamella echinulata* CGMCC 3.2716. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, 251-256.
- Feng, B., Ma, B. P., Kang, L. P., Xiong, C. Q. y Wang, S. Q. (2005). The microbiological transformation of steroidal saponins by *Curvularia lunata*. *Tetrahedron*, 61, 11758-11763.

- 
- Fraga, B. M., Bressa, C., González-Vallejo, V., González, P. y Guillermo, R. (2012). Biotransformation of *ent*-kaur-16-ene and *ent*-trachylobane 7 $\beta$ -acetoxy derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*). *Phytochemistry*, *81*, 60-70.
- Fraga, B. M., González, P., González-Vallejo, V., Guillermo, R. y Díaz, L. N. (2010). Biotransformation of 7 $\alpha$ -hydroxy-and 7-oxo-*ent*-atis-16-ene derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, *71*, 1313-1321.
- Fraga, B. M., González, P., Hernández, M. G., Chamy, M. C. y Garbarino, J. A. (2009). Microbiological transformation of an *ent*-pimaradiene hydrocarbon by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry Letters*, *2*, 201-203.
- Fraga, B. M., González, P., Hernández, M. G. y Suárez, S. (2005). Biotransformation of 7-oxo-*ent*-kaur-16-ene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. *Tetrahedron*, *61*, 5623-5632.
- Frija, L. M. T., Frade, R. F. M. y Afonso, C. A. M. (2011). Isolation, chemical, and biotransformation routes of labdane-type diterpenes. *Chemical Reviews*, *111*, 4418-4452.
- Formisyn, P., Tran-Minh, C. y Bourgois, J. (1994). Biotransformation by fungi: oxidation of ellipticine into 9-hydroxy-ellipticine by an *Aspergillus alliaceus* strain CBS 536.65. *Letters in Applied Microbiology*, *19*, 244-246.
- Fuentes, N. L., Sagua, H., Morales, G., Bórquez, J., Martín, A. S., Soto, J. y Loyola, L. A. (2005). Experimental antihyperglycemic effect of diterpenoids of llareta *Azorella compacta* (Umbelliferae) Phil in rats. *Phytotherapy Research*, *19*, 713-716.
- García, A., Bocanegra-García, V., Palma-Nicolás, J. P. y Rivera, G. (2012). Recent advances in antitubercular natural products. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *49*, 1-23.
- García-Granados, A., Martínez, A., Onorato, M. E. y Arias, J. M. (1986). Microbial transformation of tetracyclic diterpenes: conversion of *ent*-kaurenones by *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, *49*, 126-132.

- 
- Guo, Z. (2017). The modification of natural products for medical use. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7, 119-136.
- Gupta, U. D. y Gupta, A. K. (2012). Drug resistance in tuberculosis, en *Multidrug resistance: A global concern*, Khan, A. U. y Zarrilli, R. (eds). Bentham Science Publishers, pp. 100-114.
- Guzmán, J. D., Montes-Rincón, X. y Ribón, W. (2013). Research and development of new drugs against tuberculosis, en *Tuberculosis-current issues in diagnosis and management*, Mahboub, B. (ed). InTech. pp. 331-358.
- Haridy, M. S. A., Ahmed, A. A. A. y Doe, M. (2006). Microbiological transformation of two labdane diterpenes, the main constituents of *Madia* species, by two fungi. *Phytochemistry*, 67, 1455-1459.
- Hartman, D. A., Basil, J. B., Robertson, L. W. y Curley, R. W. (1990). Microbial biotransformation of retinoic acid by *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella blakesleeana*. *Pharmaceutical Research*, 7, 270-273.
- Hegazy, M. E. F., Mohamed, T. A., ElShamy, A. I., Mohamed, A. E. H. H., Mahalel, U. A., Reda, E. H., Shaheen, A. M., Tawfik, W. A., Shahat, A. A., Shams, K. A., Abdel-Azim, N. S. y Hammouda, F. M. (2015). Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. *Journal of Advanced Research*, 6, 17-33.
- Hosny, M., Johnson, H. A., Ueltschy, A. K. y Rosazza, J. P. (2002). Oxidation, reduction, and methylation of carnosic acid by *Nocardia*. *Journal of Natural Products*, 65, 1266-1269.
- Hu, S., Tian, X., Zhu, W. y Fang, Q. (1996). Biotransformation of  $2\alpha,5\alpha,10\beta,14\beta$ -tetraacetoxy-4(20),11-taxadiene by the fungi *Cunninghamella elegans* and *Cunninghamella echinulata*. *Journal of Natural Products*, 59, 1006-1009.
- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K. y Lekphrom, R. (2007). Bioactive constituents of the roots of *Polyalthia cerasoides*. *Journal of Natural Products*, 70, 1536-1538.

- 
- Khan, R. A. (2018). Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26, 739-753.
- Kumar, S. V., Saravanan, D., Kumar, B. y Jayakumar, A. (2014). An update on prodrugs from natural products. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, S54-S59.
- Lamm, A. S., Reynolds, W. F. y Reese, P. B. (2006). Bioconversion of *Stemodia maritima* diterpenes and derivatives by *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Phytochemistry*, 67, 1088-1093.
- Liu, Y. T., Li, L. P., Xie, J. H. y Zhou, Q. L. (2017). Divergent asymmetric total synthesis of mulinane diterpenoids. *Angewandte Chemie International Edition*, 56, 12708-12711.
- Loyola, L. A., Bórquez, J., Morales, G., Araya, J., González, J., Neira, I., Sagua, H. y San-Martín, A. (2001). Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonocidal activities. *Phytochemistry*, 56, 177-180.
- Loyola, L. A., Bórquez, J., Morales, G. y San Martín, A. (1997a). Diterpenoids from *Azorella compacta*. *Phytochemistry*, 44, 649-651.
- Loyola, L. A., Bórquez, J., Morales, G. y San Martín, A. (1997b). Mulinol, a diterpenoid from *Azorella compacta*. *Phytochemistry*, 45, 1465-1467.
- Loyola, L. A., Bórquez, J., Morales, G., San-Martín, A., Darías, J., Flores, N. y Giménez, A. (2004). Mulinane-type diterpenoids from *Azorella compacta* display antiplasmodial activity. *Phytochemistry*, 65, 1931-1935.
- Maatooq, G. T. (2002). Microbial metabolism of partheniol by *Mucor circinelloides*. *Phytochemistry*, 59, 39-44.
- Maneerat, W., Laphookhieo, S., Koysomboon, S. y Chantrapromma, K. (2008). Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*. *Phytomedicine*, 15, 1130-1134.
- Marcos, I. S., Moro, R. F., Gil-Mesón, A. y Díez, D. (2016). 7-6-5 tricarboxylic diterpenes: valparanes, mulinanes, cyathanes, homoverrucosanes and relate ones, en *Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman, F.R.S (ed). Elsevier. pp. 137-208.

- Martin, G. D. A., Reynolds, W. F. y Reese, P. B. (2005). Stemodane skeletal rearrangement: chemistry and microbial transformation. *Phytochemistry*, *66*, 901-909.
- Martínez, A. (2017). Preparación de diterpenos semisintéticos tipo mulinano y su evaluación *in vitro* contra cepas sensible y MDR de *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. pp. 31-48.
- Mishra, B. B. y Tiwari, V. K. (2011). Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*, 4769-4807.
- Mitsukura, K., Imoto, T., Nagaoka, H., Yoshida, T. y Nagasawa, T. (2005). Regio- and stereo-selective hydroxylation of abietic acid derivatives by *Mucor circinelloides* and *Mortierella isabellina*. *Biotechnology Letters*, *27*, 1305-1310.
- Miyazawa, M., Nobata, M., Hyakumachi, M. y Kameoka, H. (1995). Biotransformation of (+)- and (-)-camphorquinones by fungi. *Phytochemistry*, *39*, 569-573.
- Mo, S., Kronic, A., Chlipala, G. y Orjala, J. (2009a). Antimicrobial ambiguine isonitriles from the cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *Journal of Natural Products*, *72*, 894-899.
- Mo, S., Kronic, A., Pegan, S. D., Franzblau, S. G. y Orjala, J. (2009b). An antimicrobial guanidine-bearing sesterterpene from the cultured cyanobacterium *Scytonema* sp. *Journal of Natural Products*, *72*, 2043-2045.
- Molina-Salinas, G. M., Bórquez, J., Ardiles, A., Said-Fernández, S., Loyola, L. A., Yam-Puc, Becerril-Montes, P., Erosa-Escalante, F., San-Martín, A., González-Collado, I. y Peña-Rodríguez, L. M. (2010a). Bioactive metabolites from the Andean flora. Antituberculosis activity of natural and semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Phytochemistry Reviews*, *9*, 271-278.
- Molina-Salinas, G. M., Bórquez, J., Ardiles, A., Said-Fernández, S., Loyola, L. A., San-Martín, A., González-Collado, I. y Peña-Rodríguez, L. M. (2010b). Antituberculosis activity of natural and semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*, *81*, 50-54.



- Molina-Salinas, G. M., Bórquez, J., Said-Fernández, S., Loyola, L. A., Yam-Puc, A., Becerril-Montes, P., Escalante-Erosa, F. y Peña-Rodríguez, L. M. (2010c). Antituberculosis activity of alkylated mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*, *81*, 219-222.
- Mongelli, E., Desmarchelier, C., Coussio, J. y Ciccía, G. (1997). Biological studies of *Bolax gummifera*, a plant of the Falkland Islands used as a treatment of wounds. *Journal of Ethnopharmacology*, *56*, 117-121.
- Morales, P., Kong, M., Pizarro, E., Pasten, C., Morales, G., Bórquez, J. y Loyola, L. A. (2003). Effect of azurellanone, a diterpene from *Azorella yareta* Hauman, on human sperm physiology. *Journal of Andrology*, *24*, 364-370.
- Muffler, K., Leipold, D., Scheller, M. C., Haas, C., Steingroewer, J., Bley, T., Neuhaus, H. E., Mirata, M. A., Schrader, J. y Ulber, R. (2011). Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry*, *46*, 1-15.
- Mutafova, B., Mutafov, S., Fernandes, P. y Berkov, S. (2016). Microbial transformations of plant origin compounds as a step in preparation of highly valuable pharmaceuticals. *Journal of Drug Metabolism and Toxicology*, *7*, 204.
- Neira, I., Poblete, L., Porcille, P., Silva, P., Araya, J., Bórquez, J., Morales, G., Loyola, L. A. y Sagua, H. (1998). Activity of Dipernoids isolated from *Azorella compacta* (Llaretá) on *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Boletín Chileno de Parasitología*, *53*, 9-13.
- Newman, D. J. y Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, *79*, 629-661.
- Orabi, K. Y., Clark, A. M. y Hufford, C. D. (2000). Microbial transformation of benzosampangine. *Journal of Natural Products*, *63*, 396-398.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018. Tuberculosis. [Online] (Actualizado 16 febrero 2018)  
Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>  
[Acceso 10 de abril 2018]

- Özşen, Ö., Kiran, İ., Dağ, İ., Atlı, Ö., Çiftçi, G. A. y Demirci, F. (2017). Biotransformation of abietic acid by fungi and biological evaluation of its metabolites. *Process Biochemistry*, *52*, 130-140.
- Pandey, P. y Doerksen, R. J. (2016). New drugs from natural products around the world. *Pharmaceutical Sciences*, *22*, 215-216.
- Parshikov, I. A. y Sutherland, J. B. (2014). The use of *Aspergillus niger* cultures for biotransformation of terpenoids. *Process Biochemistry*, *49*, 2086-2100.
- Pervaiz, I., Ahmad, S., Madni, M. A., Ahmad, H. y Khaliq, F. H. (2013). Microbial biotransformation: a tool for drug designing. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *49*, 437-450.
- Rico-Martínez, M., Medina, F. G., Marrero, J. G. y Osegueda-Robles, S. (2014). Biotransformation of diterpenes. *RSC Advances*, *4*, 10627-10647.
- Rojas, R., Caviedes, L., Aponte, J. C., Vaisberg, A. J., Lewis, W. H., Lamas, G., Sarasara C., Gilman, R. H. y Hammond, G. B. (2006). Aegicerin, the first oleanane triterpene with wide-ranging antimycobacterial activity, isolated from *Clavija procera*. *Journal of Natural Products*, *69*, 845-846.
- Sánchez-González, M. y Rosazza, J. P. N. (2003). Microbial transformations of chalcones: hydroxylation, O-demethylation, and cyclization to flavanones. *Journal of Natural Products*, *67*, 553-558.
- Sánchez-González, M. y Rosazza, J. P. N. (2006). Biocatalytic synthesis of butein and sulfuretin by *Aspergillus alliaceus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 4646-4650.
- Schmeda-Hirschmann, G., Astudillo, L. y Palenzuela, J. A. (2004). Biotransformation of solidagenone by *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Curvularia lunata* cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*, 93-97.

- Secretaría de Salud (SSA), 2012. Estándares para la atención de la tuberculosis en México. Disponible en: <http://www.cndh.org.mx/sites/all/doc/Programas/VIH/otraspublicacionesdeinteresrelacionadosconelVIH/CENSIDA/Estandares%20para%20la%20atencion%20en%20TB.pdf> [Acceso 17 de noviembre 2016]
- Seigle-Murandi, F. M., Krivobok, S. M. A., Steiman, R. L., Benoit-Guyod, J. L. A. y Thiault, G. A. (1991). Biphenyl oxide hydroxylation by *Cunninghamella echinulata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 428-430.
- Severiano, M. E., Simão, M. R., Ramos, H. P., Parreira, R. L. T., Arakawa, N. S., Said, S., Furtado, N. A. J. C., De Oliveira, D. C. R., Gregório, L. E., Tirapelli, C. R., Veneziani, R. C. S. y Ambrósio, S. R. (2013). Biotransformation of ent-pimaradienoic acid by cell cultures of *Aspergillus niger*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 5870-5875.
- Shen, B. (2015). A new golden age of natural products drug discovery. *Cell*, 163, 1297-1300.
- Shen, Y. C., Lo, K. L., Lin, C. L. y Chakraborty, R. (2003). Microbial transformation of baccatin VI and 1 $\beta$ -hydroxy baccatin I by *Aspergillus niger*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13, 4493-4496.
- Sepúlveda, B., Quispe, C., Simirgiotis, M., García-Beltrán, O. y Areche, C. (2016). Gastroprotective effects of new diterpenoid derivatives from *Azorella cuatrecasasii* Mathias & Constance obtained using a  $\beta$ -cyclodextrin complex with microbial and chemical transformations. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26, 3220-3222.
- Seshadri, R., Lamm, A. S., Khare, A. y Rosazza, J. P. (2008). Oxidation of isoeugenol by *Nocardia iowensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 486-494.
- Smitha, M. S., Singh, S. y Singh R. (2017). Microbial biotransformation: a process for chemical alterations. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 4, 1-6.

- Sutthivaiyakit, S., Thongnak, O., Lhinhatrakool, T., Yodchun, O., Srimark, R., Dowtaisong, P. y Chuankamnerdkarn, M. (2009). Cytotoxic and antimycobacterial prenylated flavonoids from the roots of *Eriosema chinense*. *Journal of Natural Products*, *72*, 1092-1096.
- Torres y Torres, J. L. y Rosazza, J. P. (2001). Microbial transformations of *p*-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. *Journal of Natural Products*, *64*, 1408-1414.
- Wächter, G. A., Franzblau, S. G., Montenegro, G., Suarez, E., Fortunato, R. H., Saavedra, E. y Timmermann, N. (1998). A new antitubercular mulinane diterpenoid from *Azorella madreporica* Clos. *Journal of Natural Products*, *61*, 965-968.
- Willey, J. M., Sherwood, L. y Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley, and Klein's microbiology. New York: McGraw-Hill Higher Education. pp. 110-113.
- Williamson, J. S., Van Orden, D. E. y Rosazza, J. P. N. (1989). O dealkylation and aliphatic and aromatic hydroxylation of 3-methoxy-17 $\beta$ -estradiol by *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*, 3029-3031.
- Williamson, J., Van Orden, D. y Rosazza, J. P. (1985). Microbiological hydroxylation of estradiol: formation of 2-and 4-hydroxyestradiol by *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *49*, 563-567.
- Wu, C. C., Peng, C. F., Tsai, I. L., El-Razek, M. H. A., Huang, H. S. y Chen, I. S. (2007). Secondary metabolites from the roots of *Engelhardia roxburghiana* and their antitubercular activities. *Phytochemistry*, *68*, 1338-1343.
- Yang, J., Yang, S., Yang, Y. L., Zheng, H., Weng, L. y Liu, L. (2007). Microbial hydroxylation of 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -dimethyl-17 $\beta$ -(1-oxopropyl)androsta-1,4-dien-3-one to rimexolone by *Curvularia lunata* AS 3.4381. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *47*, 155-158.
- Zhang, J., Cheng, Z. H., Yu, B. Y., Cordell, G. A. y Qiu, S. X. (2005). Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646. *Tetrahedron Letters*, *46*, 2337-2340.