



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**BIOTRANSFORMACIÓN DE TOCOTRIENOS PARA
LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS CON POTENCIAL
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA**

Tesis que presenta

Areli Robles Romero

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2020

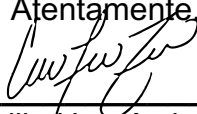
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Areli Robles Romero titulado “BIOTRANSFORMACIÓN DE TOCOTRIENOS PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA” fue realizado dentro de la línea 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 de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Mérida, Yucatán, México, a 12 de octubre de 2020

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 regirán 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.



Areli Robles Romero

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 “Biotransformación de tocotrienoles para la obtención de derivados con potencial actividad antiinflamatoria”, en el que participé bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y de la Dra. Mónica Noel Sánchez González.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para mis estudios de maestría con No. 702174

Al laboratorio de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología del CICY y a las instalaciones del CICY para llevar a cabo los experimentos de la tesis.

Al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de la UADY que me permitieron realizar parte de los experimentos de la tesis.

A mis directores de tesis, el Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y la Dra. Mónica Noel Sánchez González, por su asesoría y enseñanza durante mis estudios de maestría, les agradezco por aceptarme en su equipo de trabajo.

Al Dr. Felipe Barahona y a la Dra. Blondy Canto, integrantes de mi comité tutorial, por sus observaciones y comentarios que contribuyeron a la realización de este proyecto.

A los técnicos Karlina García Sosa (CICY) y Karla Ku (UADY-FIQ), por su apoyo técnico y enseñanzas en el laboratorio. A la Dra. Gloria I. Hernández por su apoyo en los análisis espectroscópicos por RMN y al Maestro Martín Baas por su ayuda en los análisis espectroscópicos por FT-IR.

A mis compañeros y amigos de laboratorio de Química Orgánica del CICY por todo su apoyo y ayuda durante estos dos años y por hacer más ameno y divertida mi estancia en Mérida, especialmente a Jimmy y a Stephy que me enseñaron distintas técnicas que pude aplicar en este trabajo.

A mis amigos de generación de CICY (Antonio, Yessi, Rufi, Eddy, Yuneisi, Ricardo y Erika) y amigos de otros laboratorios por apoyarme, ayudarme, escucharme practicar mis seminarios y acompañarme estos dos años. A Toño por acompañarme durante las clases y por apoyarme durante la mudanza de laboratorio. A Yessi por escuchar tantas veces mis seminarios y darme consejos para mejorar. A Rufi por ayudarme a controlar mis nervios antes de los exámenes y seminarios. A Sam por sus enseñanzas y consejos para mejorar mis presentaciones y mi documento. A Ernesto por siempre escucharme y aconsejarme, por su apoyo moral durante la época de la pandemia, y por siempre estar.

A mi familia, porque desde el comienzo nunca me hizo falta su apoyo, y a pesar de la distancia siempre estuvieron pendientes de mí y me impulsaron a seguir adelante.

A mis amigos de CDMX, a Edgar por ayudarme a conseguir en Estados Unidos una pieza que le faltaba al shaker; a Vio, Lau, Memo, Miriam, Pame, Pau, Juan, Fernanda, Dany, Fernando, Oscar, Diana, Javier, Irene y Cintya.

A mis maestros de la licenciatura por inspirarme a crecer profesionalmente y ser un ejemplo a seguir, principalmente al Dr. Marco Loza, a la Dra. Isabel Ruiz y la Dra. Rosario Ayala.

DEDICATORIAS

A mi familia: a mi mamá y hermano, por sus llamadas, por apoyarme y acompañarme en esta aventura. A mi papá, quien siempre me apoyó en luchar por mis sueños. A mis abuelos por ser un impulso. A mis tíos (Luz, Pilar, Alejandro y Ricardo), a mis primos hermanos (Aline, Montse, Alejandra, Roberto, Ricardo y Gerardo).

A mis amigos Edgar, Vio, Lau, Memo, Miriam, Fernanda, Daniela, por sus consejos y apoyo incondicional.

A Ernesto, por apoyarme y acompañarme, y por siempre estar.

A Dios.

¡Gracias!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
ANTECEDENTES	5
1.1 Productos naturales como fuente de nuevos medicamentos	5
1.2 Productos naturales con actividad antiinflamatoria	7
1.3 Derivados de δ -tocotrienol obtenidos por semisíntesis	9
1.4 Biotransformación como alternativa a la semisíntesis para la obtención de derivados de productos naturales	11
HIPÓTESIS	17
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
CAPÍTULO II – BIOTRANSFORMACIÓN DE δ -TOCOTRIENOL	
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.3 DISCUSIÓN Y RESULTADOS	22
2.4 CONCLUSIONES	33
2.5 PERSPECTIVAS	34
ANEXO	34
BIBLIOGRAFÍA	42

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica para la formación de prostaglandinas y leucotrienos a partir del del ácido araquidónico_____	3
Figura 1.1 Ejemplos de productos naturales con actividad antiinflamatoria_____	7
Figura 1.2 Derivados semisintéticos obtenidos a partir de ácido δ -garcinoico _____	10
Figura 1.3 Actividad antiinflamatoria de derivados semisintéticos de δ -tocotrienol____	11
Figura 1.4 Epoxidación de ácido linoleico por la acción de la lipasa B de <i>Candida antártica</i> _____	13
Figura 1.5 Biotransformación de productos naturales _____	14
Figura 1.6 Reacciones de biotransformación de tocoferoles por <i>Streptomyces catenulae</i> _____	14
Figura 1.7 Diagrama de la estrategia experimental para la obtención de derivados de δ -tocotrienol_____	18
Figura 2.1 Estructura de δ -tocotrienol_____	23
Figura 2.2 Perfiles cromatográficos por CCD de productos crudos de biotransformación por hongos después de 240 h_____	24
Figura 2.3 Perfiles cromatográficos por CCD de productos crudos de biotransformación por bacterias después de 240 h _____	24
Figura 2.4 Porcentaje de δ -tocotrienol en productos crudos de biotransformación durante la etapa de escrutinio_____	25
Figura 2.5 Perfiles cromatográficos por HPLC de extractos crudos producidos por los microorganismos candidatos <i>P. notatum</i> , <i>P. testosteronei</i> y <i>S. griseus</i> para el escalamiento de la biotransformación de δ -tocotrienol _____	27
Figura 2.6 Perfiles cromatográficos por CCD de producto crudo en el escalamiento de biotransformación de δ -tocotrienol en cultivos de <i>P. notatum</i> después de 240 h_____	28

Figura 2.7 Purificación de derivados de δ -tocotrienol a partir del extracto crudo obtenido durante el escalamiento de biotransformación de δ -tocotrienol en cultivos de <i>P. notatum</i>	29
Figura 2.8 Cromatogramas de 11A, 11B y tiempos de retención de componentes mayoritarios, analizados por GC-MS.....	30
Figura 2.9 Patrón de fragmentación de δ -tocotrienol por GC-MS.....	31
Figura 2.10 Perfil cromatográfico por CCD de los productos puros 17A y 17B.....	32

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Ejemplos de productos naturales con aplicación en la medicina_____	6
Cuadro 1.2 Productos semisintéticos obtenidos a partir de δ -tocotrienol y sus derivados_____	9
Cuadro 1.3 Reacciones de oxidación comúnmente realizadas por diferentes géneros y especies de bacterias, hongos y levaduras_____	12
Cuadro 1.4 Principales sustratos y tipos de biomodificaciones realizadas por los microorganismos utilizados en el presente estudio_____	15

ANEXO

Figura A1 Curva de calibración del δ -tocotrienol	35
Figura A2 Espectro de FT-IR (KBr) del δ -tocotrienol	35
Figura A3 Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 600MHz) de δ -tocotrienol	36
Figura A4 Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100MHz) de δ -tocotrienol	37
Figura A5 Perfil cromatográfico (a) y patrón de fragmentación de la fracción 11A durante su análisis por GC-MS	38
Figura A6 Perfil cromatográfico (a) y patrón de fragmentación de la fracción 12A durante su análisis por GC-MS	39
Cuadro A1 Comparación de datos espectroscópicos (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) experimentales y reportados en la literatura para δ -tocotrienol	40

ABREVIATURAS

PDA	Agar de papa y dextrosa (Potato Dextrose Agar)
PDB	Caldo de papa y dextrosa (Potato Dextrose Broth)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCG	Cromatografía en columna de gravedad
VLC	Cromatografía líquida al vacío
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AA	Ácido araquidónico
COX	Ciclooxigenasa
LOX	Lipooxigenasa
δt_3	δ -tocotrienol
GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
δ	Desplazamiento químico
t_R	Tiempo de retención
AUC	Área bajo la curva
$^1\text{H-RMN}$	Resonancia magnética nuclear-Protón
$^{13}\text{C-RMN}$	Resonancia magnética nuclear-Carbono

RESUMEN

La inflamación es la respuesta a un estímulo capaz de causar daño a tejidos y células. El tratamiento para las enfermedades inflamatorias incluye a los fármacos antiinflamatorios esteroideos (corticoides) y a los antiinflamatorios no-esteroideos (AINEs); estos últimos son los comúnmente prescritos debido a que tienen la capacidad de inhibir la actividad de las enzimas 5-lipooxigenasa (LOX) y las ciclooxigenasas (COX) 1 y 2, que catalizan la formación de leucotrienos, prostanoideos y tromboxanos. Sin embargo, los efectos adversos de estos fármacos han llevado a la búsqueda de nuevas moléculas con potencial actividad antiinflamatoria.

Los productos naturales han permitido la búsqueda de nuevos fármacos. El δ -tocotrienol, componente mayoritario en las semillas de *Bixa orellana*, es reconocido por su actividad antioxidante y recientemente se reportó que la derivatización de su cadena lateral produce derivados con una mejor actividad antiinflamatoria, misma que ya ha sido reportada.

Dadas las dificultades para derivatizar químicamente la cadena lateral del δ -tocotrienol, en este trabajo se planteó investigar la biotransformación de este producto natural utilizando diferentes microorganismos. Los resultados obtenidos muestran que diferentes microorganismos, y particularmente *Penicillium notatum*, producen derivados del δ -tocotrienol que posteriormente podrían ser candidatos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

ABSTRACT

Inflammation is a response with the ability to cause cell and tissue damage. The treatment prescribed for the inflammatory diseases includes the antiinflammatory non-steroidal drugs (AINEs), which can inhibit the enzymatic activity of 5-lipoxygenase (LOX) and the cyclooxygenases (COX) 1 and 2 enzymes that catalyze the production of leukotrienes, prostanooids and thromboxanes. Nevertheless, because of the adverse effects of these drugs, the search and development of new molecules with a better antiinflammatory activity is of great importance.

Natural products represent an important source of new drugs; δ -tocotrienol, the principal component of *Bixa orellana* seeds, is recognized for its antioxidant activity and recently it was reported that the derivatization of the side chain produces molecules with better antiinflammatory activity.

Because of the difficulties of derivatizing the side chain of δ -tocotrienol using chemical methods, it was decided to explore the biotransformation of this natural product using different microorganisms. The results showed that different microorganisms, especially *Penicillium notatum*, are able to produce δ -tocotrienol derivatives that could represent new therapeutic options for inflammatory diseases.

INTRODUCCIÓN

El oxígeno representa la fuerza motriz para el buen funcionamiento del metabolismo y la viabilidad celular; sin embargo, también permite la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), principalmente en la mitocondria. Las ROS se encargan de regular diversos procesos celulares, pero pueden causar daño si se producen en gran cantidad. Entre las ROS destacan los radicales libres y los no radicales. Durante la respuesta inflamatoria, las células en las regiones dañadas captan oxígeno produciendo y liberando ROS. Las células del sistema inmune generan mediadores inflamatorios más solubles (citoquinas, ácido araquidónico y quimiocinas), que actúan a través de las células activas en el área dañada, liberando más ROS. En condiciones normales existe un balance entre la formación de radicales libres y los mecanismos de defensa del organismo; pero ante un desequilibrio, se genera estrés oxidativo, el cual conduce a la muerte celular, pudiendo causar enfermedades como diabetes, inflamación y cáncer, entre otras (Palanisamy *et al.*, 2016).

La inflamación es la respuesta del sistema inmune ante un estímulo (organismos patógenos, heridas, factores químicos); los signos que indican que se está llevando a cabo el proceso inflamatorio son enrojecimiento, calor, hinchazón, dolor y pérdida de la función. Aun cuando la inflamación es una respuesta benéfica para el hospedero y puede ser resuelta exitosamente, una mala regulación de ésta puede causar daños en células y tejidos, dando lugar a enfermedades como problemas cardiovasculares, asma, Alzheimer, artritis reumatoide, inflamación del intestino y cáncer, entre otras. La inflamación de tipo agudo puede llegar a convertirse en severa en un corto tiempo, los síntomas pueden atrasarse y comenzar a definirse unos días después; mientras que, en la inflamación crónica, el periodo en que se presenta el desorden puede llegar a durar meses o años (Nordqvist, 2017).

El ácido araquidónico (AA) es una molécula que participa en el proceso inflamatorio; su concentración aumenta durante la inflamación como consecuencia del daño a la membrana celular, siendo liberado de ésta para producir metabolitos llamados eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, etc.) mediante la ciclación e incorporación de oxígeno, catalizada por las enzimas COX-1/2 y 5-LOX (Figura 1) (McClelland *et al.*, 2009). Los leucotrienos, eicosanoides producidos por la enzima 5-

LOX, son importantes mediadores de procesos alérgicos e inflamatorios, principalmente causan broncoconstricción y aumentan la permeabilidad vascular, lo que ocasiona edemas; mientras que los prostanoïdes y tromboxanos, producidos por COX-1, centran su función en la homeostasis, la agregación plaquetaria y la protección gástrica; los producidos por COX-2 son inducidos por un estímulo, dando como productos prostanoïdes que causan edemas, inflamación y dolor (Zarghi y Arfaei, 2011).

Las enzimas COX-1, COX-2 y 5-LOX son consideradas como dianas para el desarrollo de medicamentos antiinflamatorios. Los medicamentos prescritos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias se clasifican por su estructura química en antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y corticosteroides; los primeros actúan inhibiendo las enzimas COX y 5-LOX en la ruta metabólica del AA, en tanto que los segundos interactúan con receptores proteicos que son translocados al núcleo en donde inducen la regulación de expresión de genes (Ricciotti y FitzGerald, 2011). Sin embargo, los medicamentos existentes en el mercado tienen como limitante la toxicidad por sus efectos adversos; se ha reportado que los corticoides desarrollan desórdenes hormonales y metabólicos principalmente, mientras que los AINEs causan lesiones en el tracto gastrointestinal, así como daño renal y hepático, entre otros (Sostres *et al.*, 2010).

Debido a esto, existe la búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios. Una fuente importante de obtención de nuevos fármacos es a partir de los productos naturales. Se han reportado distintos extractos de plantas y compuestos con la capacidad de inhibir a la enzima 5-LOX; estos inhibidores son en su mayoría compuestos fenólicos (polifenoles, flavonoides y cumarinas); sin embargo, también destacan poliacetilenos, triterpenos y tocotrienoles contenidos en la vitamina E (Werz, 2007).

En el presente trabajo se exploró el proceso de biotransformación del δ -tocotrienol, utilizando microorganismos reconocidos por su capacidad para transformar metabolitos secundarios, esto con la finalidad de obtener nuevos derivados con potencial actividad antiinflamatoria.

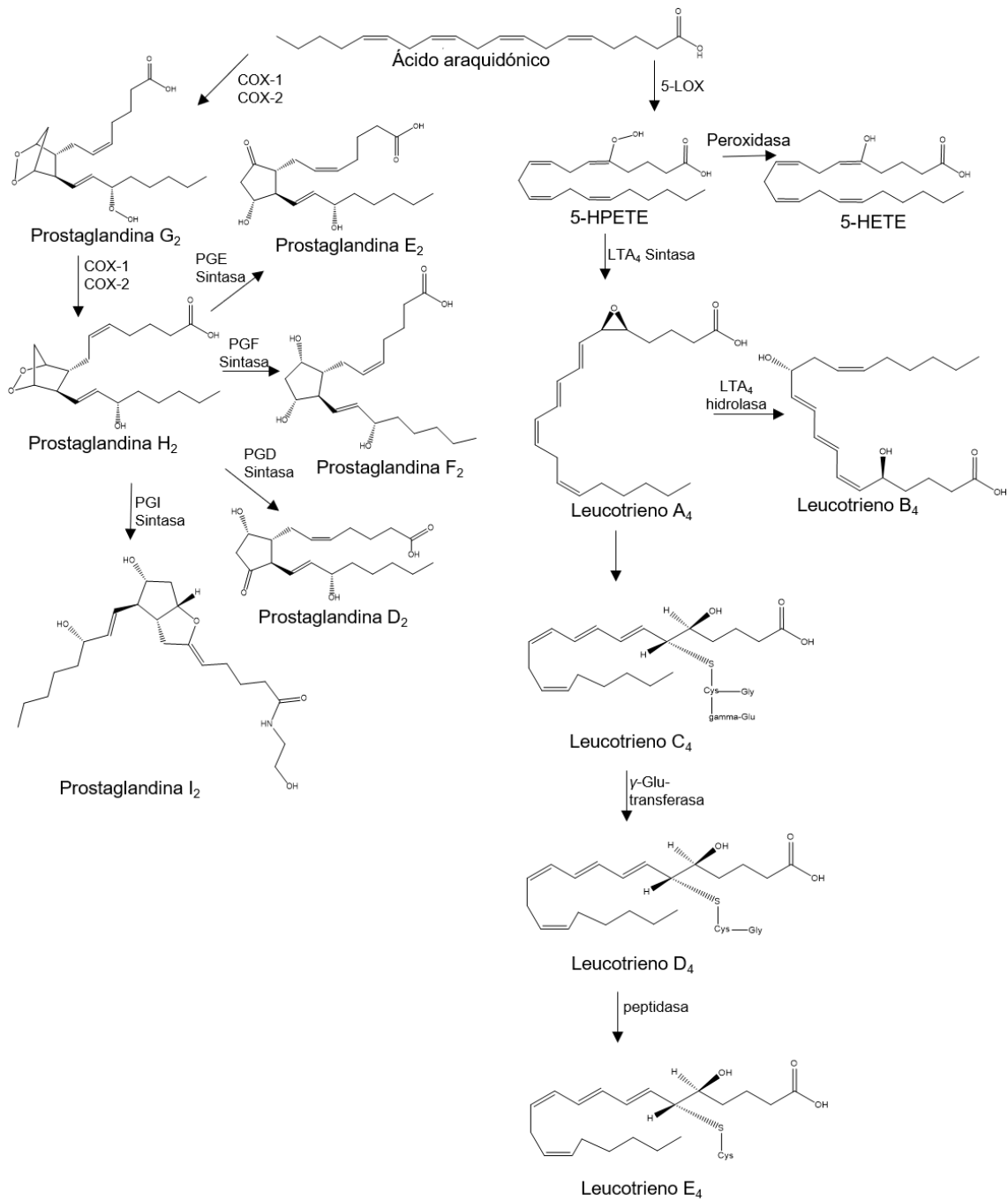


Figura 1. Ruta metabólica para la formación de prostaglandinas y leucotrienos a partir del ácido araquidónico

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

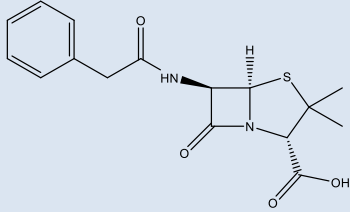
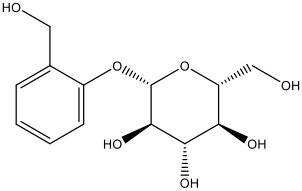
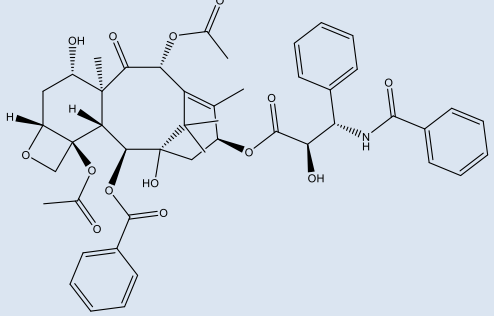
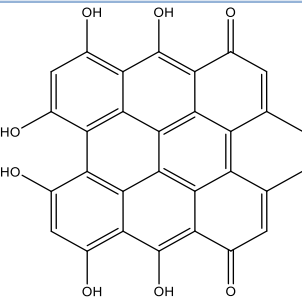
1.1 PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE NUEVOS MEDICAMENTOS

El término de productos naturales se refiere a los metabolitos secundarios producidos por seres vivos; estas moléculas no participan en sus procesos vitales (como metabolismo primario, crecimiento y desarrollo del organismo, entre otros). Se estima que existen alrededor de 300,000 metabolitos secundarios cuya principal función es ayudar a la sobrevivencia del organismo que los produce (McMurry, 2010).

Los productos naturales, metabolitos secundarios provenientes de plantas, microorganismos y animales, son una fuente importante para la obtención de nuevos fármacos. Hasta el año 2014, el 4% de los fármacos aprobados correspondieron a metabolitos secundarios obtenidos de una fuente natural; sin embargo, el 21% incluyó a los derivados de productos naturales, y únicamente el 27% de los fármacos correspondieron a productos de origen sintético. Por lo que aquellos metabolitos secundarios obtenidos de fuentes naturales, al derivatizarlos, se convierten en fármacos candidatos para el tratamiento de distintas enfermedades (Newman y Cragg, 2016).

En el Cuadro 1.1 se muestran algunos ejemplos de productos naturales obtenidos de organismos vivos, los cuales forman parte de los medicamentos prescritos mundialmente para el tratamiento de distintas enfermedades (Koparde, 2019).

Cuadro 1.1 Ejemplos de productos naturales con aplicación en la medicina.

Producto natural	Origen del producto natural	Uso farmacológico	Estructura
Penicilina	<i>Penicillium notatum</i>	Antibiótico	
Salicina	<i>Salix</i> spp. Y <i>Populus</i> spp.	Analgésico	
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Anticancerígeno	
Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i>	Antiviral	

Existe un gran número de fármacos que continúan en estudios clínicos en espera de ser aprobados, muchos de estos han sido obtenidos de organismos vivos, por lo que los productos naturales y sus derivados son considerados una fuente importante para el desarrollo de nuevos fármacos (Mohs y Greug, 2017).

1.2. PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Entre los productos naturales reportados con actividad antiinflamatoria, destacan los ácidos grasos omega 3, el 3-galato de epigallocatequina, el resveratrol y los tocotrienoles (Figura 1.1). Estos últimos, han mostrado actividad antioxidante, antineoplásica y antiinflamatoria, y son reconocidos por su inhibición de las enzimas óxido nítrico sintasa (iNOS) y COX-2, así como la inhibición de la expresión de NF- κ B. (Shu-Jing, 2008); y por la inhibición de la enzima 5-LOX (Pein *et. al.*, 2018). Los tocotrienoles forman parte de la vitamina E, contenida en alimentos como el arroz, la avena, el aceite de palma y el achiote, entre otros (Pein *et al.*, 2018).

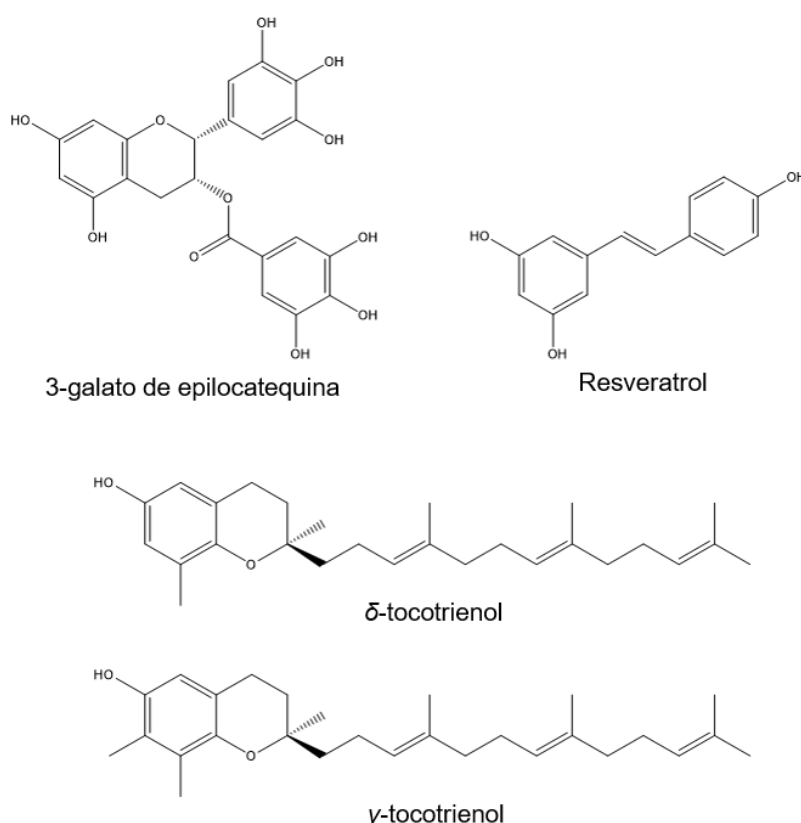


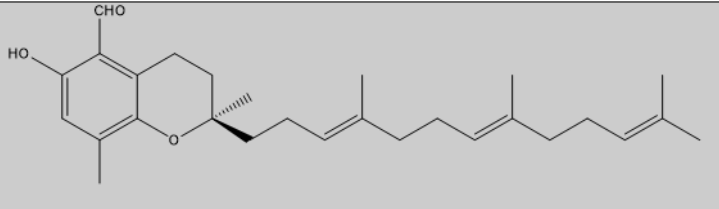
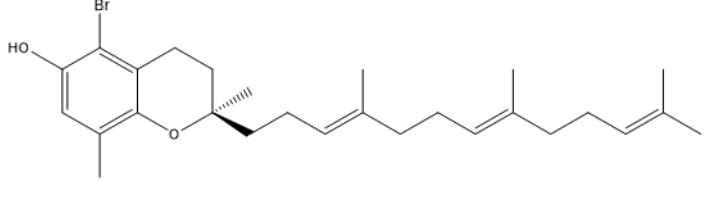
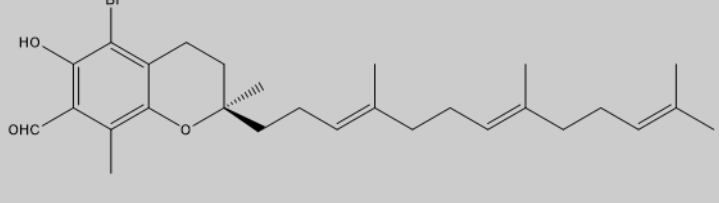
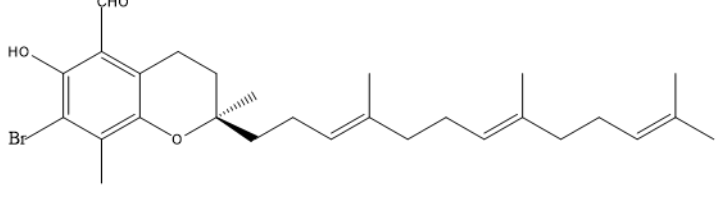
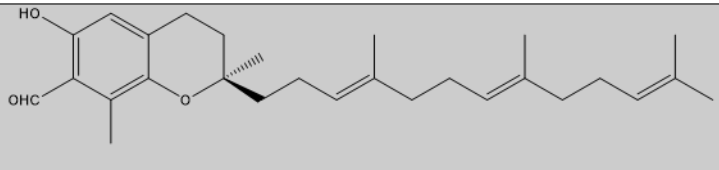
Figura 1.1 Ejemplos de productos naturales con actividad antiinflamatoria.

La vitamina E está formada por cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Los tocotrienoles son moléculas que se caracterizan por tener un núcleo de cromanol y una cadena lateral prenilada saturada en el caso de los tocoferoles e insaturada en los tocotrienoles (Shahid-ul-Islam *et al.*, 2016). En cuanto a estudios de vitamina E y su actividad biológica, se ha reportado la actividad antiinflamatoria del gamma-tocotrienol combinado con celecoxib (inhibidor selectivo de COX-2), mostrando una reducción significativa de prostanoïdes (Shirode *et al.* 2010). Recientemente, estudios de acoplamiento molecular entre derivados de vitamina E y la enzima 5-LOX, demostraron que estos productos lograron una inhibición de tipo alostérica con la enzima (Pein *et al.*, 2018).

1.3. DERIVADOS DE DELTA-TOCOTRIENOL OBTENIDOS POR SEMISÍNTESIS

Recientemente se han obtenido derivados de vitamina E por semisíntesis para posteriormente evaluar su actividad antiinflamatoria. Como se puede observar en el Cuadro 1.2, se ha logrado funcionalizar el núcleo de cromanol con la finalidad de potenciar la actividad antiinflamatoria del producto original (Alsabil *et al.*, 2017). Sin embargo, la semisíntesis no ha sido una alternativa adecuada para modificar la cadena lateral de este tipo de metabolitos, debido a los problemas de regio y estereoespecificidad que enfrentan la mayoría de las reacciones.

Cuadro 1.2 Productos semisintéticos obtenidos a partir de δ -tocotrienol y sus derivados.

Materia prima	Producto
δ -tocotrienol	5-formil- δ -tocotrienol 
δ -tocotrienol	5-bromo- δ -tocotrienol 
5-bromo- δ -tocotrienol	5-bromo-7-formil- δ -tocotrienol 
5-bromo- δ -tocotrienol	7-bromo-5-formil- δ -tocotrienol 
7-bromo-5-formil- δ -tocotrienol	7-formil- δ -tocotrienol 

Como resultado del estudio de *Garcinia amplexicaulis* se identificó al ácido- δ -garcinoico (ó ácido δ -tocotrienólico). Este producto es similar al δ -tocotrienol, pero se diferencia por la presencia de un grupo metilo en la posición 8 del anillo de cromanol y un grupo carboxilo terminal en la cadena prenilada. La derivatización química de este producto resultó en la obtención de cuatro productos con modificaciones en el anillo aromático del núcleo de cromanol (Figura 1.2) (Alsabil *et al.*, 2017).

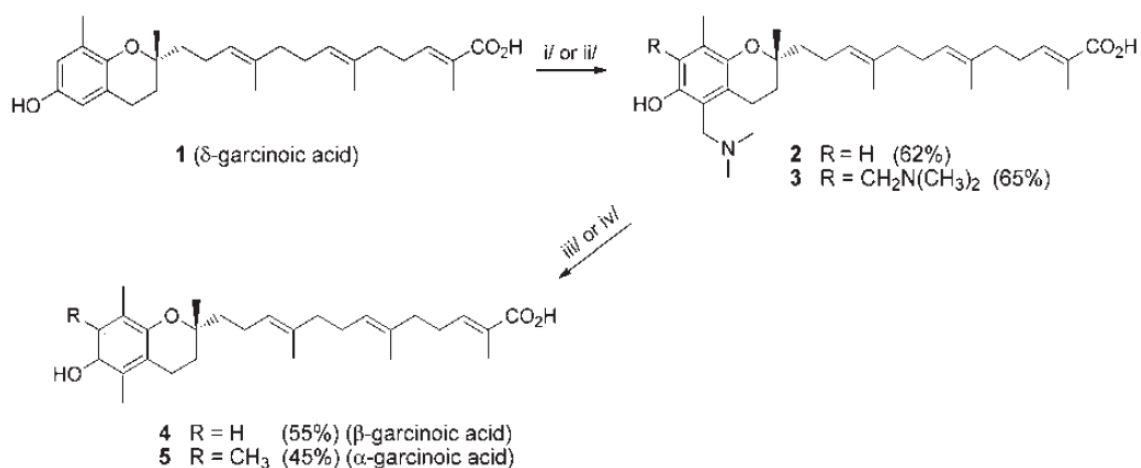


Figura 1.2 Derivados semisintéticos obtenidos a partir del ácido δ -garcinoico.

Los derivados del ácido- δ -garcinoico, así como el δ -tocotrienol, fueron evaluados en cuanto su actividad antiinflamatoria utilizando una enzima 5-LOX recombinante. En este estudio también se realizó un ensayo de acoplamiento molecular o docking. Se concluyó que la funcionalización de la cadena lateral favorece la actividad antiinflamatoria (Figura 1.3), en tanto que el análisis de acoplamiento mostró que estos derivados son inhibidores alostéricos de la 5-LOX, lo que significa que se unen a la enzima en un lugar que no es el sitio activo, y al ocurrir esta unión, el sitio activo se altera de manera que ya no es posible la unión del sustrato (i.e., el ácido araquidónico) (Pein *et al.*, 2018).

Sin embargo, y dadas las limitaciones para llevar a cabo la funcionalización de la cadena lateral de tocotrienoles y otros metabolitos secundarios con estructuras similares, se han explorado diferentes opciones para la obtención de este tipo de derivados. Una

alternativa a la semisíntesis química para la obtención de derivados, es la biotransformación.

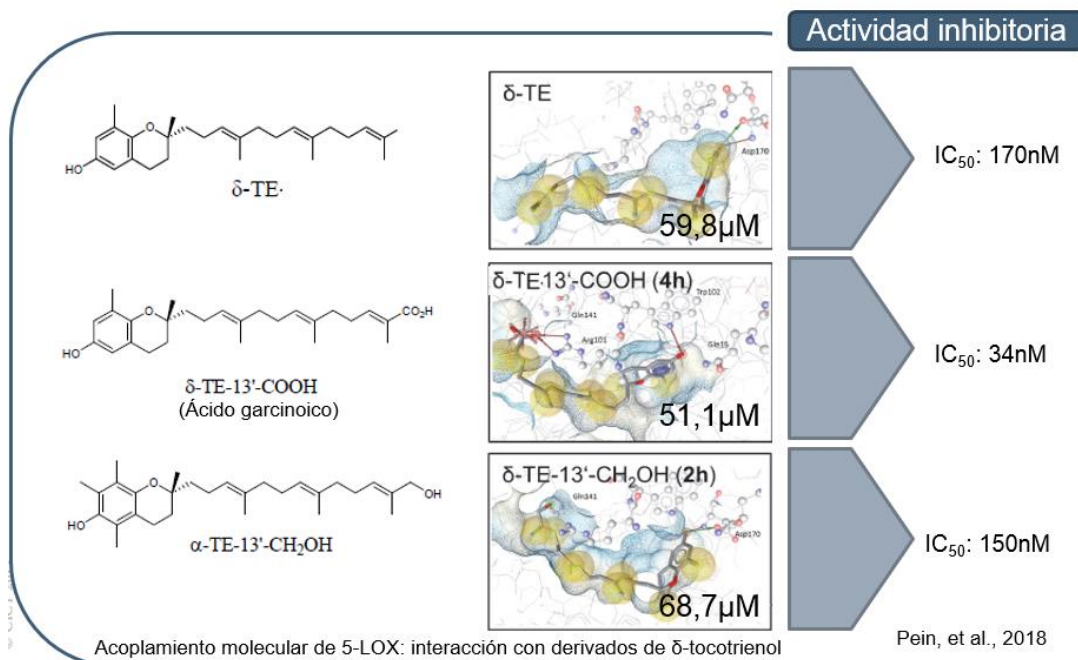


Figura 1.3 Actividad antiinflamatoria de derivados semisintéticos de δ -tocotrienol (Pein, *et al.*, 2018).

1.4 BIOTRANSFORMACIÓN COMO ALTERNATIVA A LA SEMISÍNTESIS PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE PRODUCTOS NATURALES

Las biotransformaciones son reacciones catalizadas por microorganismos o enzimas aisladas de éstos (Pervaiz *et al.*, 2013). Es importante que el esqueleto de la molécula original se mantenga durante la biotransformación hasta la obtención del producto final (Smitha *et al.*, 2017).

La biotransformación representa una opción importante para la preparación de derivados dada sus capacidades de regioespecificidad y regioselectividad. Otras ventajas de la biotransformación sobre la semisíntesis química son las condiciones de operación requeridas (temperatura, pH y presión) y la cantidad de pasos es menor a los utilizados por semisíntesis. Sin embargo, la principal desventaja de la biotransformación es que no se tiene la certeza del producto se va a obtener, dada la capacidad de los

microorganismos para realizar reacciones estereo o regio específicas sobre los sustratos, utilizando distintas enzimas (Mohamed-Elami, *et al.*, 2015).

Los estudios de biotransformación constan de dos fases, la primera incluye el crecimiento y adaptación a las condiciones por parte de los microorganismos en condiciones específicas (temperatura, agitación, medio de cultivo, pH); posteriormente, se inocula en nuevo medio fresco, aplicándose condiciones (temperatura, agitación, medio de cultivo, pH); y a continuación, se agrega el sustrato. Esta segunda fase permite que los microorganismos lleven a cabo la biotransformación como parte de su metabolismo secundario (Abourashed *et al.*, 1999).

Los metabolitos secundarios producidos por los microorganismos son usualmente generados en la fase tardía de su crecimiento y no son esenciales para su crecimiento, a diferencia de los metabolitos primarios. Diversas especies de microorganismos son reconocidos por su producción de metabolitos secundarios, entre las que se destacan las especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Streptomyces* y *Dacrymyces* (Mohamed-Elamir *et al.*, 2015). Los organismos contienen sistemas enzimáticos capaces de transformar productos, al igual que metabolizan los compuestos endógenos a otros más hidrosolubles para ser excretados (Smitha *et al.*, 2017).

La elección de microorganismos y condiciones para el proceso de biotransformación depende del tipo de reacción deseada. En el Cuadro 1.3 se muestran dos reacciones de biotransformación realizadas por diferentes especies de microorganismos (Birolli *et al.*, 2015; Castañeda, 2012; Borges *et al.*, 2007 y Patel 2000).

Cuadro 1.3 Reacciones de oxidación comúnmente realizadas por diferentes géneros y especies de bacterias, hongos y levaduras.

Reacción	Microorganismos
Hidroxilación	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> , <i>Cunninghamella blakesleana</i> , <i>Mucor plumbeus</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i>
Epoxidación	<i>Curvularia lunata</i> , especies de <i>Penicillium</i> , <i>Gibberella fujikuroi</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Cryptococcus</i> y <i>Staphylococcus</i> .

Estas reacciones se llevan a cabo debido a enzimas producidas por los microorganismos, e.g. lipasas, que permiten la oxidación de productos con dobles enlaces, como los ácidos grasos insaturados (Figura 1.4). Algunos géneros de microorganismos que producen lipasas capaces de llevar a cabo reacciones de oxidación son *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Serratia*, *Nocardia*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus* y *Staphylococcus* (Birolli *et al.*, 2015; Borges *et al.*, 2009).

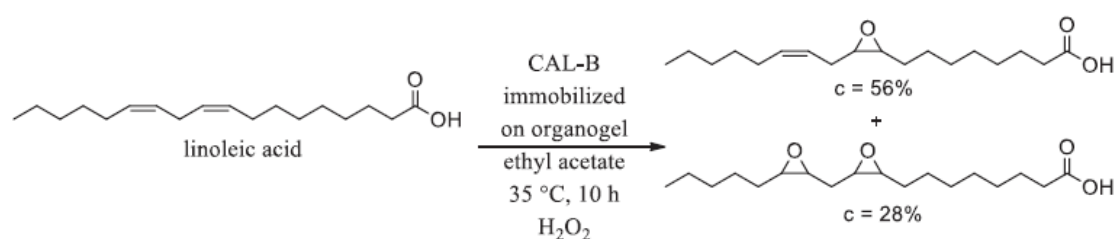


Figura 1.4 Epoxidación de ácido linoleico por la acción de la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B).

Entre los metabolitos aislados de plantas que han sido modificados utilizando microorganismos destacan alcaloides, esteroides, terpenoides y flavonoides (Figura 1.5). Los fármacos sintéticos como son el meloxicam, el celecoxib, el metoprolol, el ciprofloxacín y el albendazol también han sido sujetos de estudio de biotransformación. Los productos transformados han mostrado ser más activos que los existentes en el mercado, además de que se han obtenido derivados novedosos; los microorganismos, por su selectividad y especificidad, tienen la capacidad de producir modificaciones que por semisíntesis difícilmente se obtendrían (Pervaiz *et al.*, 2013).

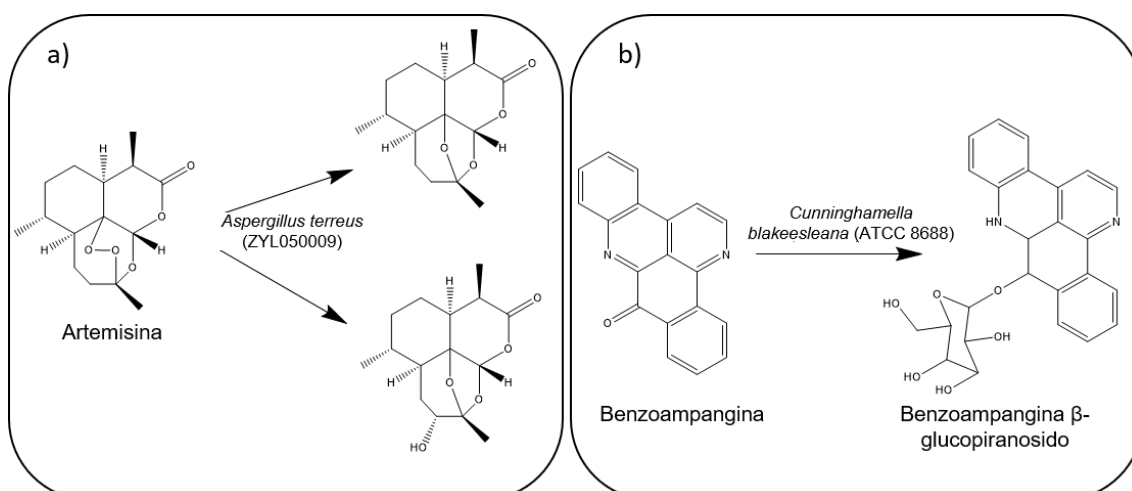


Figura 1.5 Biotransformación de productos naturales a) obtención de dos derivados de artemisinina por *Aspergillus terreus*, b) glicosilación de benzoampangina por *Cunninghamella blakeesleana*.

Hasta ahora los estudios de biotransformación de derivados de vitamina E son limitados. El único reporte en la literatura describe la modificación de δ -tocoferol y γ -tocoferol utilizando *Streptomyces catenulae*, obteniendo productos de nitración en el anillo aromático del núcleo de cromanol (Figura 1.6) (Rousseau *et al.*, 1997).

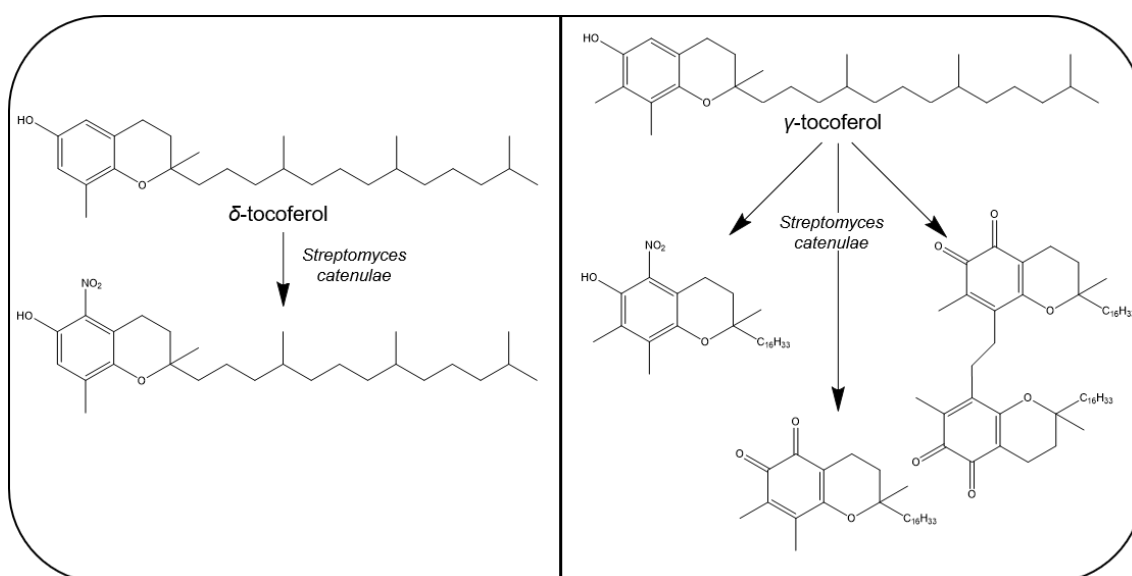


Figura 1.6 Reacciones de biotransformación de tocoferoles por *Streptomyces catenulae*.

Al investigar microorganismos reportados por su capacidad de modificar compuestos con estructura similar al δ -tocotrienol, se encontró que distintas especies de *Pseudomonas* (principalmente *P. putida* y *P. oleovorans*) pueden realizar reacciones de oxidación y epoxidación en alquenos y cadenas alifáticas (Wiley *et al.*, 2014; Guerrero *et al.*, 1997). Asimismo, lipasas aisladas de distintos microorganismos (e.g. *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, entre otros) lograron la epoxidación de alquenos (Birolli *et al.*, 2015). Finalmente, se ha reportado que especies de los géneros *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Xanthobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* y *Corynebacterium* son también capaces de oxidar alquenos y cadenas alifáticas (Ensign, 2001). Para este trabajo, y de acuerdo con la disponibilidad y a la literatura revisada, se escogieron ocho microorganismos (Cuadro 1.4) para investigar la posible biotransformación de δ -tocotrienol.

Cuadro 1.4 Principales sustratos y tipos de biomodificaciones realizadas por los microorganismos utilizados en el presente estudio.

Microorganismo	Tipo de biomodificación	Sustrato	Referencia
<i>Penicillium notatum</i>	Oxidación	Compuestos aromáticos	Veiga, <i>et al.</i> , 2012; Oliveira, <i>et al.</i> , 1999; Borges <i>et al.</i> , 2009
	Hidroxilación	Terpeno	
	Oxidación (epoxidación)	Terpeno	
<i>Aspergillus niger</i>	Oxidación	Alcanos	Birolli <i>et al.</i> , 2015; Borges <i>et al.</i> , 2009
		Terpeno	
<i>Aspergillus alliaceus</i>	Oxidación	Chalcona	Sánchez y Rosazza 2006; Sánchez y Rosazza 2003; Burkhead, <i>et al.</i> , 1994
	Hidroxilación	Anilina	
<i>Curvularia lunata</i>	Oxidación	Terpenos	Collins et al 2001
<i>Streptomyces griseus</i>	Oxidación	Ácidos grasos	Katsuyama y Horinouchi, 2010; Chater 2016; Gurram, <i>et al.</i> , 2009
	Oxidación	Ácido enólico	
<i>Pseudomonas putida</i>	Oxidación	Compuestos alifáticos	Wiley <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Oxidación	Compuestos aromáticos	Kamerneek <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas testosteroni</i>	Oxidación	Ácido graso	Guerrero <i>et al.</i> , 1997
<i>Nocardia iowensis</i>	Oxidación	Terpenos	Zhang <i>et al.</i> , 2005; Cheng <i>et al.</i> , 2004

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se pretende modificar, mediante un proceso de biotransformación, la estructura de δ -tocotrienol, utilizando microorganismos (bacterias y hongos) que anteriormente han mostrado su capacidad de producir derivados novedosos y activos, con la finalidad de potencializar la actividad antiinflamatoria de este sustrato.

JUSTIFICACIÓN

Distintas enfermedades relacionadas con una mala respuesta inflamatoria son causantes de muertes a nivel mundial y nacional. Los medicamentos analgésicos y antiinflamatorios que se encuentran en el mercado presentan como limitante efectos adversos en el organismo, por lo que continúa la búsqueda de nuevos y mejores tratamientos.

El metabolito δ -tocotrienol ha sido evaluado por su actividad antiinflamatoria, misma que podría potencializarse al modificar grupos funcionales de la molécula, principalmente en la cadena lateral. La obtención de nuevos derivados semisintéticos está limitada por la falta de especificidad. La biotransformación brinda una alternativa para la obtención de derivados mediante el uso de microorganismos.

HIPÓTESIS

Dada la regioespecificidad reportada por microorganismos, se esperan obtener modificaciones en la estructura del δ -tocotrienol que resulten en la obtención de derivados con potencial actividad antiinflamatoria.

OBJETIVOS

Objetivo general

Demostrar la biotransformación del δ -tocotrienol utilizando cepas microbianas para la obtención de nuevos derivados con potencial actividad antiinflamatoria.

Objetivos específicos

1. Aislar e identificar δ -tocotrienol, a partir del extracto diclorometánico de semillas de *Bixa orellana*.
2. Identificar los microorganismos con capacidad para biotransformar δ -tocotrienol.
3. Analizar el rendimiento de consumo de sustrato mediante la cuantificación de la materia prima remanente durante la biotransformación.
4. Aislar los productos de biotransformación obtenidos durante el escalamiento.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo este proyecto, inicialmente se aisló el sustrato a utilizar (δ -tocotrienol) a partir de extracto diclorometánico de semillas de *Bixa orellana* y se reactivaron los microorganismos seleccionados (de acuerdo a investigación bibliográfica y existencia en el cepario); posteriormente se planteó un escrutinio para elegir al mejor candidato para la producción de metabolitos.

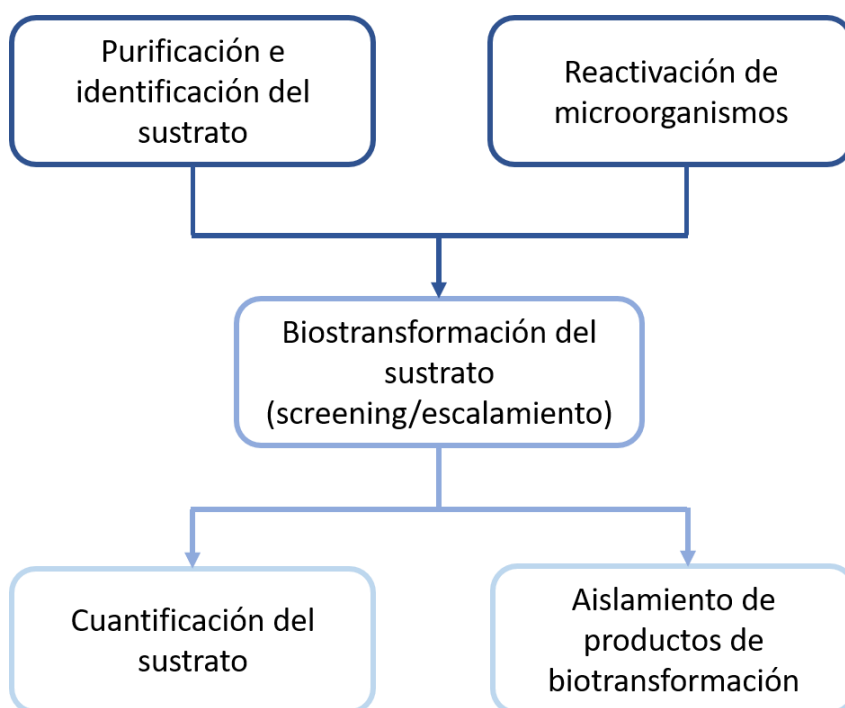


Figura 1.7 Diagrama de la estrategia experimental para la obtención de derivados de δ -tocotrienol.

CAPÍTULO II

BIOTRANSFORMACIÓN DE δ -TOCOTRIENOL

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

El fraccionamiento y purificación de los compuestos se llevaron a cabo utilizando solventes destilados en el laboratorio, mismos que fueron eliminados mediante un evaporador rotatorio Büchi RE111. Para el análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se utilizaron placas de aluminio impregnadas con sílica gel GF254 (E. M. Merck); fueron revelados bajo luz UV y con ácido fosfomolibdico y calor.

Equipos: Los análisis de IR se realizaron en un espectrómetro FT-IR modelo Nicolet 8700 (Thermo Scientific), por transmisión en pastillas de bromuro de potasio (KBr). Los análisis de RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Varian/Agilent Premium Compat 600MHz (14.1 t). Los análisis de HPLC se realizaron en un equipo Waters e2695 Alliance, utilizando las columnas Luna C18 Phenomenex y Xselect HSS C18. Para el análisis de cromatografía de gases acoplado a masas se utilizó un equipo marca Agilent modelo 7890B (CG)- 5977A (MS), se utilizó una columna HP5-MS de 30 m x 2.50 μ m x 0.25 μ m, gas portador N₂, flujo 1 mL/min, temperatura de 300 ° sosteniendo una presión de 2.56 psi.

Purificación de sustrato: el metabolito δ -tocotrienol fue aislado del extracto diclorometánico de semillas de *Bixa orellana* (9.94 kg). Las semillas fueron extraídas con 6 ciclos de maceración con diclorometano (DCM), obteniendo un extracto de 914.60 g; éste fue fraccionado por cromatografía líquida al vacío (VLC). Finalmente se evaporó el disolvente para posteriormente filtrar a través de celita 503 y obtener 301 g de la fracción enriquecida con δ -tocotrienol. Se pesaron 24.25 g de esta fracción enriquecida, y posteriormente se le realizó una cromatografía en columna por permeación de gel empleando Sephadex LH-20 (25-100 μ m; Sigma Aldrich) y una mezcla de DCM:Hexano:MeOH (40:40:2) como fase móvil. Se obtuvieron 20 fracciones de 10 mL cada una, las cuales fueron monitoreadas por CCD y combinadas en 5 nuevas fracciones (A-E) con base a la similitud de su perfil cromatográfico. Se obtuvieron 2.47 g de la fracción D (fracción con presencia de δ -tocotrienol) y se realizó una última purificación por cromatografía en columna por gravedad, ocupando gel de sílice (Malla 230-400) como fase estacionaria y diclorometano como fase móvil, obteniéndose el producto puro con un peso final de 1.74 g (6.89% de rendimiento). El δ -tocotrienol fue

identificado utilizando las técnicas espectroscópicas de IR y RMN y comparando los datos obtenidos con los reportados en la literatura (Ohnmacht et al., 2008).

Microorganismos: Se utilizaron las cepas de *Nocardia iowensis* (NRRL 5646), *Pseudomonas putida* (ATCC 33015), *Pseudomonas testosteroni* (ATCC 11996), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC AM-670), *Streptomyces griseus* (ATCC 13273), *Curvularia lunata* (ATCC 2178), *Aspergillus niger* (ATCC 9142), *Aspergillus alliaceus* (UI-315) y *Penicillium notatum* (ATCC 36740) para los experimentos de escrutinio y escalamiento de biotransformación. Se almacenaron a 4°C y se sembraron cada 3 meses para su conservación.

Medios de cultivo: Los hongos fueron reactivados en medio de cultivo comercial de Caldo Papa Dextrosa marca Bioxon (PDB) y las bacterias fueron reactivadas usando caldo nutritivo, excepto *N. iowensis*, que fue reactivado en Medio Líquido de Esporulación (LSM) [extracto de levadura (1 g/L), extracto de carne (1 g/L), triptona (2 g/L), FeSO₄ (0.002 g/L) y dextrosa (10 g/L)]. Los hongos fueron sembrados para su mantenimiento en Agar Papa Dextrosa marca Merck (PDA), mientras que las bacterias en Agar Nutritivo marca Merck y *N. iowensis* en Medio Sólido de Esporulación (SSM)[extracto de levadura (1 g/L), extracto de carne (1 g/L), triptona (2 g/L), FeSO₄ (0.002 g/L), dextrosa (10 g/L) y agar (15 g/L)]. Para los experimentos de biotransformación se ocupó medio de cultivo lowa (20g/L glucosa, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L harina de soya desgrasada, 5 g/L NaCl, 5 g/L K₂HPO₄) y HCL 6N (para ajustar pH a 7). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Biotransformación-Escrutinio: El proceso de biotransformación se llevó a cabo en dos fases. Para la primera fase se ocupó 1 mL de suspensión de esporas con una concentración de 1x10⁶ esporas/mL de *P. notatum*, *A. niger* y *A. alliaceus*, 2x10⁶ esporas/mL de *C. lunata* y suspensión celular de *N. iowensis*, *P. testosteroni*, *P. putida*, *P. fluorescens* y *S. griseus*. Este volumen se inoculó en 25 mL de medio lowa contenido en matraces de 125 mL. Durante la primera fase los cultivos se mantuvieron en crecimiento por 72 h a 28°C y en agitación (200 rpm). Para la segunda fase, se tomó una alícuota (10% v/v) de los cultivos de la fase 1, inoculando en medio fresco (25 mL medio lowa), los cuales se dejaron en incubación a 28°C y 200 rpm. Después de 24 h se añadieron 250µL de sustrato (0.5 mg/mL de δ-tocotrienol en DMSO) en cada matraz. A partir de este último paso, se realizó un monitoreo diario durante 10 días (240 h), el cual consistió en tomar una alícuota de 2mL de cada matraz y centrifugar (1300 rpm,

22°C, 5min) para lograr la separación del micelio y finalmente realizar una extracción con acetato de etilo, tanto del micelio como del filtrado. Los extractos crudos fueron analizados por CCD. Los 3 controles utilizados fueron medio lowa solo, medio lowa con sustrato y medio lowa con microorganismo sin sustrato.

Producción de compuestos biotransformados (escalamiento): Se pesaron 300 mg del sustrato δ -tocotrienol y se utilizaron cultivos de *P. notatum*. Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para la fase 1. Después de las 24 h, se inocularon 250 μ L del sustrato en DMSO (0.5 mg/mL) en matraces Erlenmeyer con 25 mL de medio lowa fresco cada uno (24 matraces en total) y se incubaron a 28°C y 200 rpm. Después de las 240 h se recuperó el medio de cultivo separándolo del micelio, el filtrado se extrajo con acetato de etilo que posteriormente se evaporó al vacío, obteniendo un extracto crudo de 350 mg.

Aislamiento de productos de biotransformación: El extracto de *P. notatum* (350 mg) fue purificado por cromatografía en columna por gravedad (2 x 20 cm, con sistema de elución DCM:Hx:An 55:45:1) usando como fase estacionaria gel de sílice (70-230; Sigma Aldrich) de la cual se obtuvieron 195 tubos con 2 mL cada uno que fueron reunidos en 6 fracciones, siendo la de interés la fracción nombrada como 10E. A la fracción 10E (150mg) se le realizó otra purificación por cromatografía en columna por gravedad (2 x 20 cm, con sistema de elución DCM:MeOH 99:1) usando como fase estacionaria gel de sílice (70-230; Sigma Aldrich), obteniendo 115 tubos que fueron reunidos en 7 fracciones, siendo de mayor interés las fracciones nombradas 11A y 11B. Con la finalidad de un mejor análisis espectroscópico y para una correcta identificación, se realizó una reacción de derivatización, utilizando como materia prima 11A y 11B; en donde se emplearon los reactivos de acetona (2 mL), K_2CO_3 (200 mg) y CH_3I (1 mL) que fueron adicionado a la materia prima. Las condiciones de reacción fueron bajo agitación por 24 h y a temperatura ambiente (las reacciones se ejecutaron por separado). Finalmente se obtuvieron 10 mg (12A) de producto de reacción en donde se observó la presencia de dos compuestos mayoritarios. Para la purificación de estos dos compuestos se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina preparativa (el sistema de elución fue diclorometano:hexano en proporción 1:1, y se realizaron dos eluciones), obteniendo dos productos puros de biotransformación (17A y 17B).

Cuantificación de δ -tocotrienol en extractos crudos de escrutinio: El análisis de HPLC se llevó a cabo en un equipo marca Waters e2695 Alliance utilizando una columna Luna C18 Phenomenex y una fase móvil de isopropanol (75%) y H₂O (25%) a 295 nm con un flujo de 0.25 mL/min. Los productos resueltos fueron detectados a 295 nm. Se realizó una curva de calibración ocupando como referencia el δ -tocotrienol aislado anteriormente. Se preparó una solución stock al 0.1% en metanol y se inyectaron 5 volúmenes distintos (1, 5, 10, 15, 25 μ L). Posteriormente se inyectaron los extractos crudos al 0.1% (disueltos en metanol) para la obtención del área bajo la curva (correspondiente a la señal del δ -tocotrienol, en un tiempo de retención de 12 minutos) de cada muestra (figura A1-Anexo).

2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de δ -tocotrienol: El espectro obtenido por FT-IR (figura A2-anexo) muestra bandas de absorción características de los grupos funcionales presentes en la molécula (Figura 2.1); una banda ancha en la región de 3400cm^{-1} que corresponde al grupo oxhidrilo en el anillo del núcleo de cromanol y una banda débil a 1600cm^{-1} con vibración tipo stretching, característico de enlaces C=C, en el caso del δ -tocotrienol, corresponde a los dobles enlaces de la cadena lateral. A 1200cm^{-1} se observa una banda característica de enlace C-O (carbonos sp^3/sp^2 unidos a oxígeno). En el espectro $^1\text{H-RMN}$ (Figura A3-Anexo) se observan dos señales de multipletes, correspondientes a los protones en C-4 (δ 2.69), C-3' (δ 5.12), y dos dobletes de dobletes correspondientes a los protones aromáticos en C-5 (δ 6.38; $J = 2.94, 0.86$ Hz) y C-7 (δ 6.48; $J = 0.88, 3.08$ Hz). Finalmente, los protones correspondientes a los grupos metilo y los protones unidos a carbonos sp^3 , se observan a campo alto, en el rango de δ 1.26-2.13 (Cuadro A1-Anexo). De la misma forma, los resultados del análisis de $^{13}\text{C-RMN}$ (Figura A3-Anexo y Cuadro A1-Anexo) mostraron señales entre δ 112.78-147.85 correspondientes a los carbonos sp^2 del anillo aromático y de los carbonos vinílicos de la cadena lateral; las señales de C-6 y C-10 del anillo aromático se observan desplazadas a campo bajo (δ 147.85 y 145.98, respectivamente) por la desprotección generada debido al oxígeno del grupo OH. Estos datos coinciden con los reportados en la literatura (Cuadro A1-Anexo).

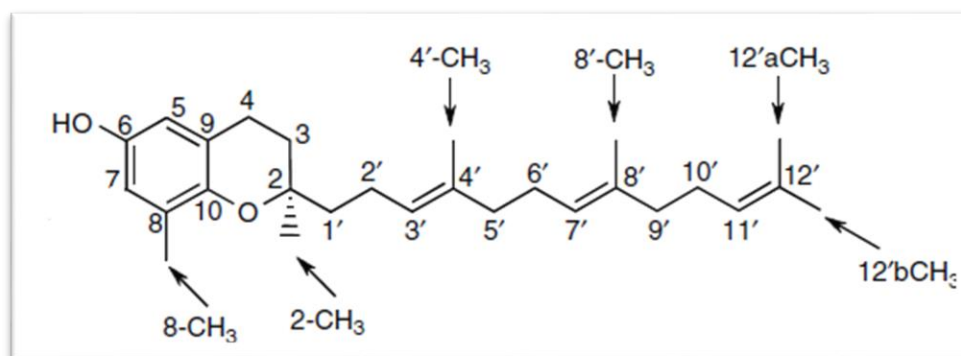


Figura 2.1 Estructura de δ -tocotrienol.

Biotransformación-Escrutinio: La biotransformación del δ -tocotrienol se realizó con cuatro hongos (*Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus alliaceus* y *Curvularia lunata*) y con cinco bacterias (*Streptomyces griseus*, *Pseudomonas testosteroni*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Nocardia iowensis*), cultivados en el medio de cultivo Iowa (descrita previamente en el apartado de metodología). Se analizaron los extractos del filtrado y del micelio, para posteriormente llevar a cabo el escalamiento del proceso.

Un primer análisis cualitativo por CCD de los extractos crudos producidos por los microorganismos a las 240 horas de biotransformación, mostró que en ningún caso se consumía el total de sustrato; sin embargo, como se puede observar de manera cualitativa en las Figuras 2.2 y 2.3, las bacterias aparentemente consumieron una mayor cantidad de sustrato que los hongos.

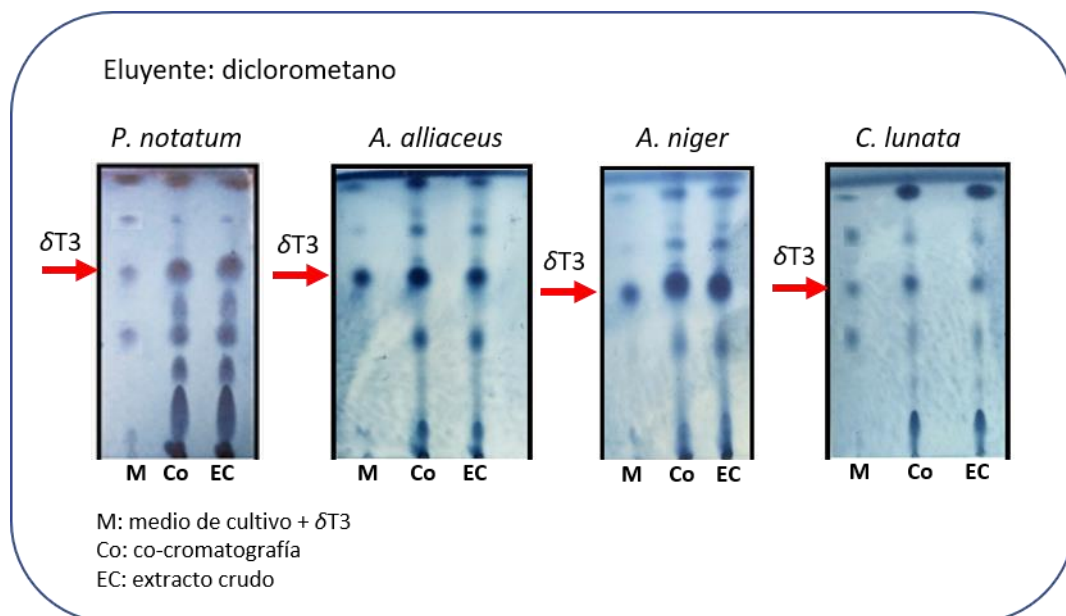


Figura 2.2 Perfiles cromatográficos por CCD de productos crudos de biotransformación por hongos después de 240 h.

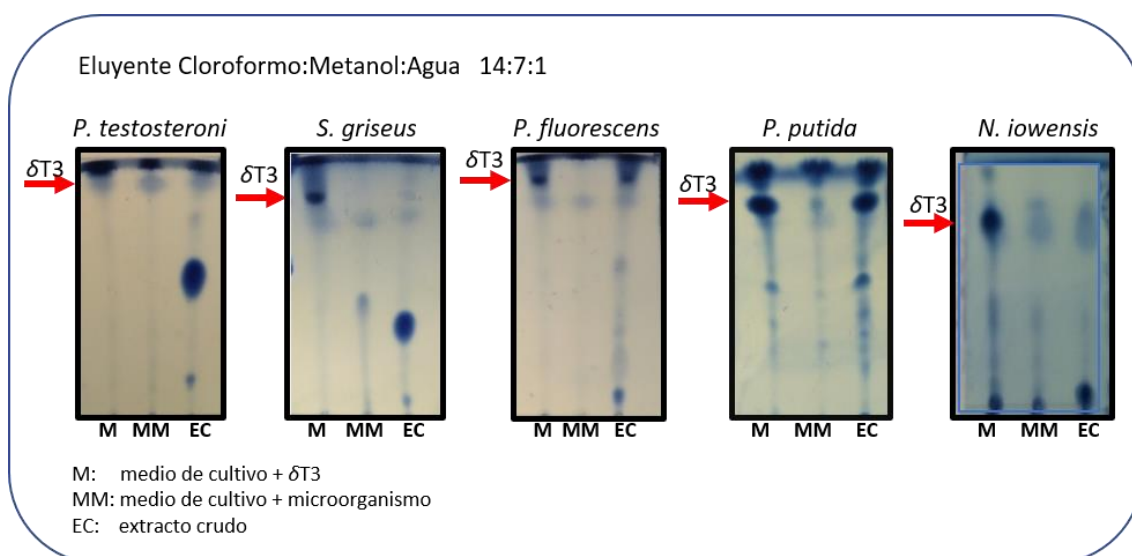


Figura 2.3 Perfiles cromatográficos por CCD de productos crudos de biotransformación por bacterias después de 240 h.

Para establecer los niveles de consumo de sustrato en cada uno de los cultivos, se llevó a cabo la cuantificación por HPLC del δ -tocotrienol presente en cada uno de los extractos crudos. Para esto, primeramente, se preparó una curva de calibración utilizando diferentes volúmenes de δ -tocotrienol. En la Figura 2.4 se aprecia que el porcentaje de sustrato consumido por las bacterias es mayor que el de los hongos, lo que coincide con los resultados observados de manera cualitativa por CCD. Mientras que los extractos crudos de biotransformación de *S. griseus* y *N. iowensis* muestran menos del 1% de sustrato, los extractos crudos de biotransformación de *A. niger* y *P. notatum* muestran contenidos importantes (22 y 15%, respectivamente) de δ -tocotrienol.

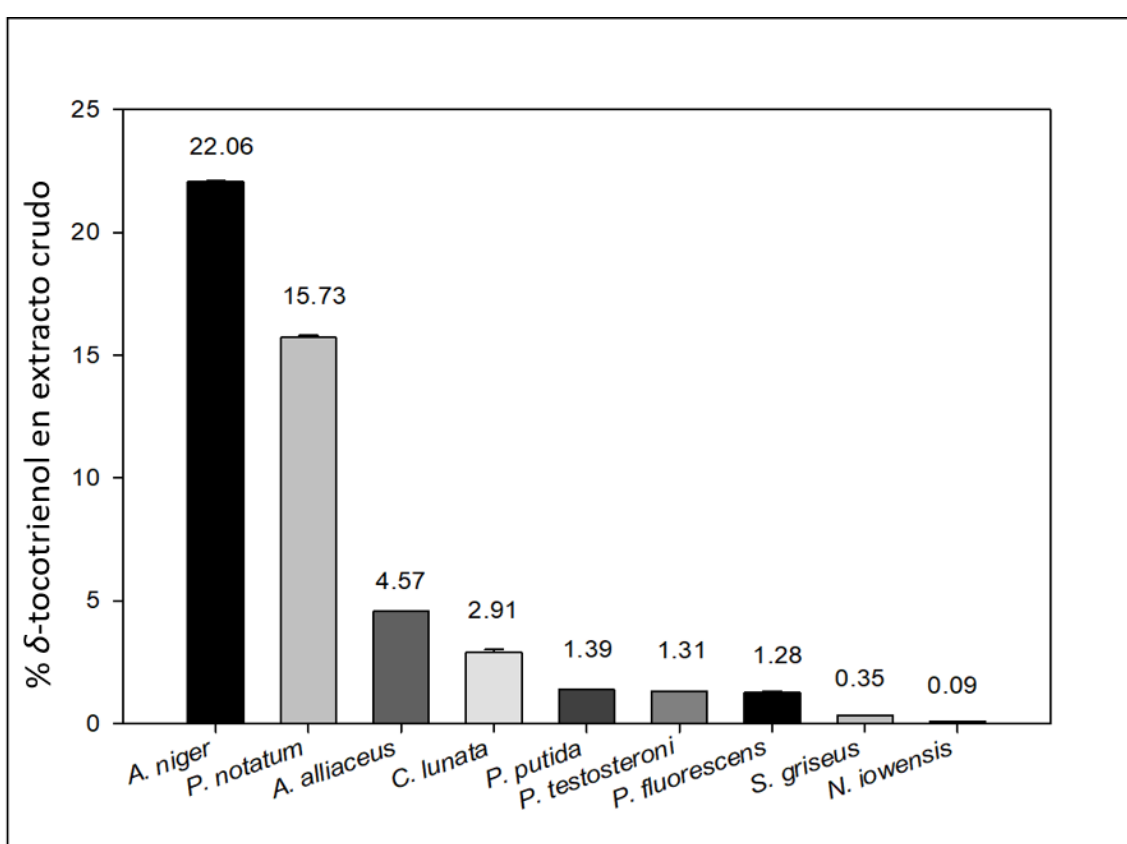


Figura 2.4 Porcentaje de δ -tocotrienol en extractos crudos de biotransformación durante la etapa de escrutinio.

El análisis cualitativo de los perfiles cromatográficos por CCD de los diferentes extractos crudos de biotransformación mostró que *P. notatum* fue el microorganismo que produjo el mayor número de derivados, en tanto que *S. griseus* y *P. testosteroni* produjeron un solo derivado (Figuras 2.2 y 2.3). Es interesante mencionar que aun cuando *N. iowensis*

mostró un consumo total del sustrato, no se observaron productos de biotransformación, lo que sugiere que esta bacteria pudo haber aprovechado el sustrato como fuente de carbono. Previamente se ha reportado que compuestos orgánicos pueden ser utilizados como fuente de energía y carbono; Waschina *et al.* (2016) reportaron que *E. coli* es capaz de utilizar más de 80 compuestos como fuente de energía y carbono, mientras que del género *Nocardia*, Sariaslani *et al.* (1973) encontraron que la especie *N. salmonicolor* es capaz de utilizar productos aromáticos (fenilalcanos) y cicloalcanos para su crecimiento.

El análisis de los diferentes perfiles cromatográficos por CCD, y particularmente la naturaleza de los eluyentes en cada uno de los casos, permitió establecer que los productos de biotransformación de los hongos son principalmente de carácter lipofílico, en tanto que los producidos por las bacterias, son de mayor polaridad.

Para complementar los resultados referentes a la diversidad de productos de biotransformación, cada uno de los extractos crudos fue analizado por HPLC. En la Figura 2.5 se observa que *P. notatum* genera productos en mayor abundancia (se logran apreciar cinco componentes mayoritarios), y que las bacterias *S. griseus* y *P. testosteroni* presentan un componente mayoritario, estos resultados coinciden con lo mostrado anteriormente en los perfiles cromatográficos por CCD. Por lo que estos tres microorganismos resultan ser los mejores candidatos para un posterior escalamiento.

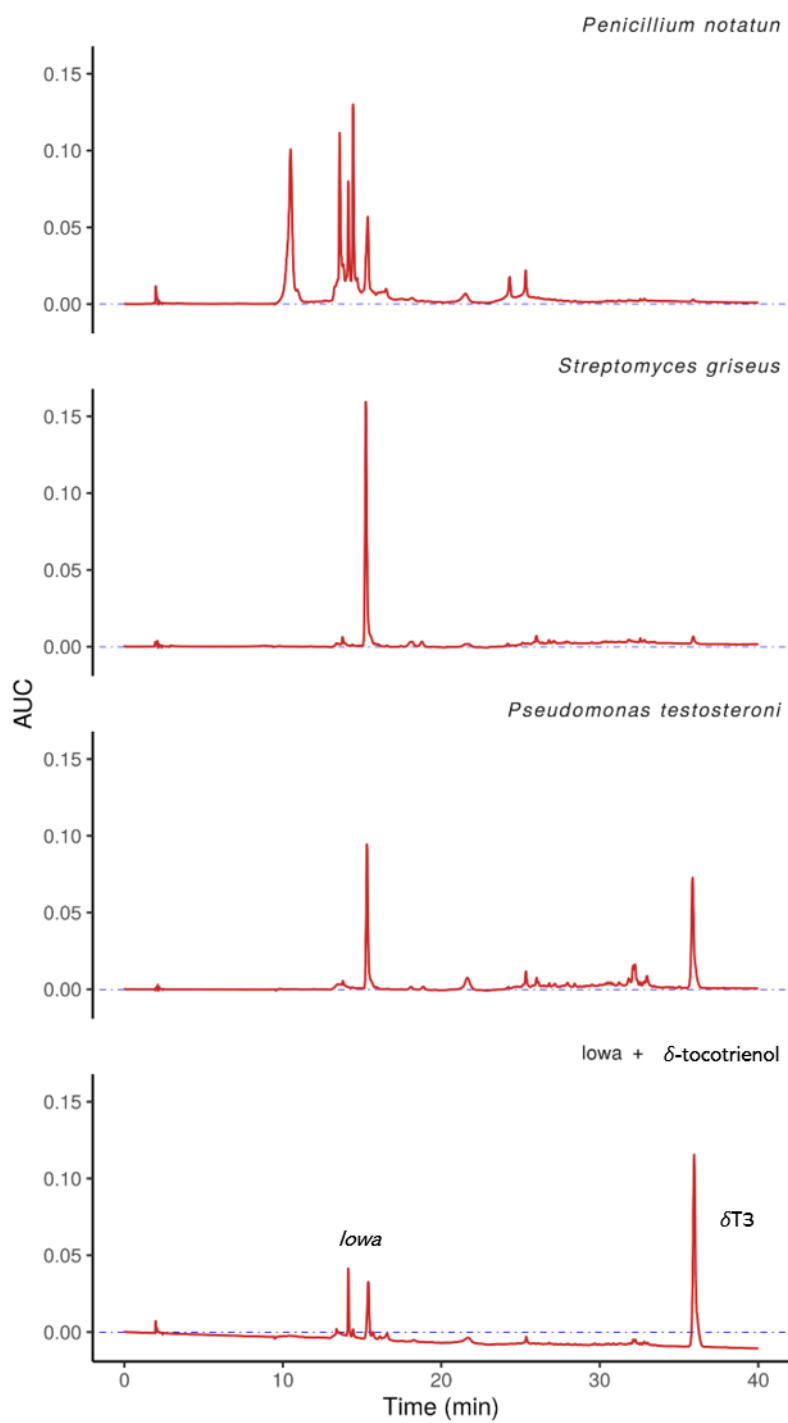


Figura 2.5 Perfiles cromatográficos por HPLC de extractos crudos producidos por los microorganismos *P. notatum*, *P. testosteroni* y *S. griseus* candidatos para el escalamiento de la biotransformación de δ -tocotrienol.

Producción de metabolitos por biotransformación de δ -tocotrienol en cultivos de *P. notatum* : Los perfiles cromatográficos por CCD de los extractos crudos (filtrado y micelio) obtenidos a las 240 h del escalamiento de la biotransformación (Figura 2.6), muestran valores de RF (0.07, 0.21 y 0.62) que coinciden con los obtenidos durante el escrutinio, siendo reproducible el proceso de biotransformación.

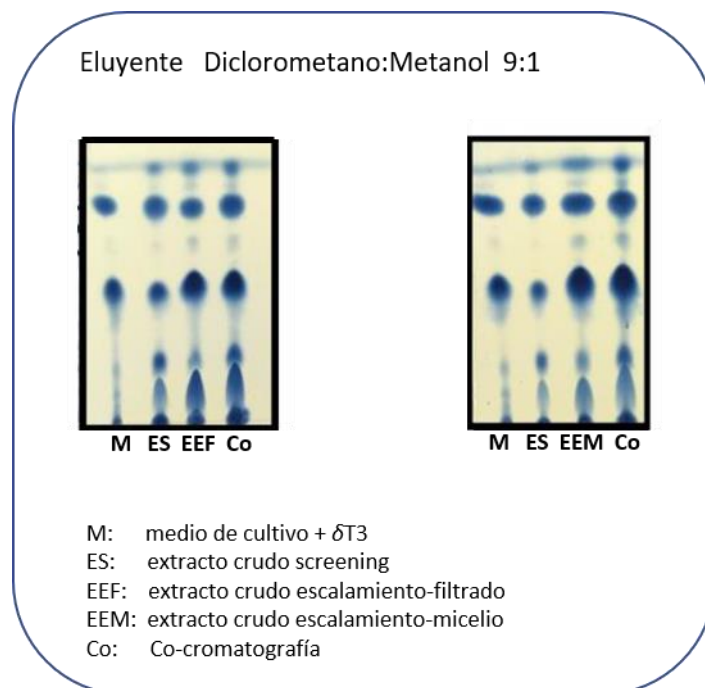


Figura 2.6 Perfiles cromatográficos por CCD de producto crudo en el escalamiento de biotransformación de δ -tocotrienol en cultivos de *P. notatum* después de 240 h (extracto crudo de filtrado y de micelio).

Se procedió a realizar una serie de purificaciones por cromatografía en columna (figura 2.7), y posteriormente la fracción con el componente mayoritario (11A) se derivatizó por medio de una metilación. La derivatización se realizó con la finalidad de metilar él(los) grupo(s) OH presente(s) en la molécula y posteriormente purificar los componentes por CCD preparativa. Al finalizar la reacción se observó la presencia de dos componentes mayoritarios (figura 2.7).

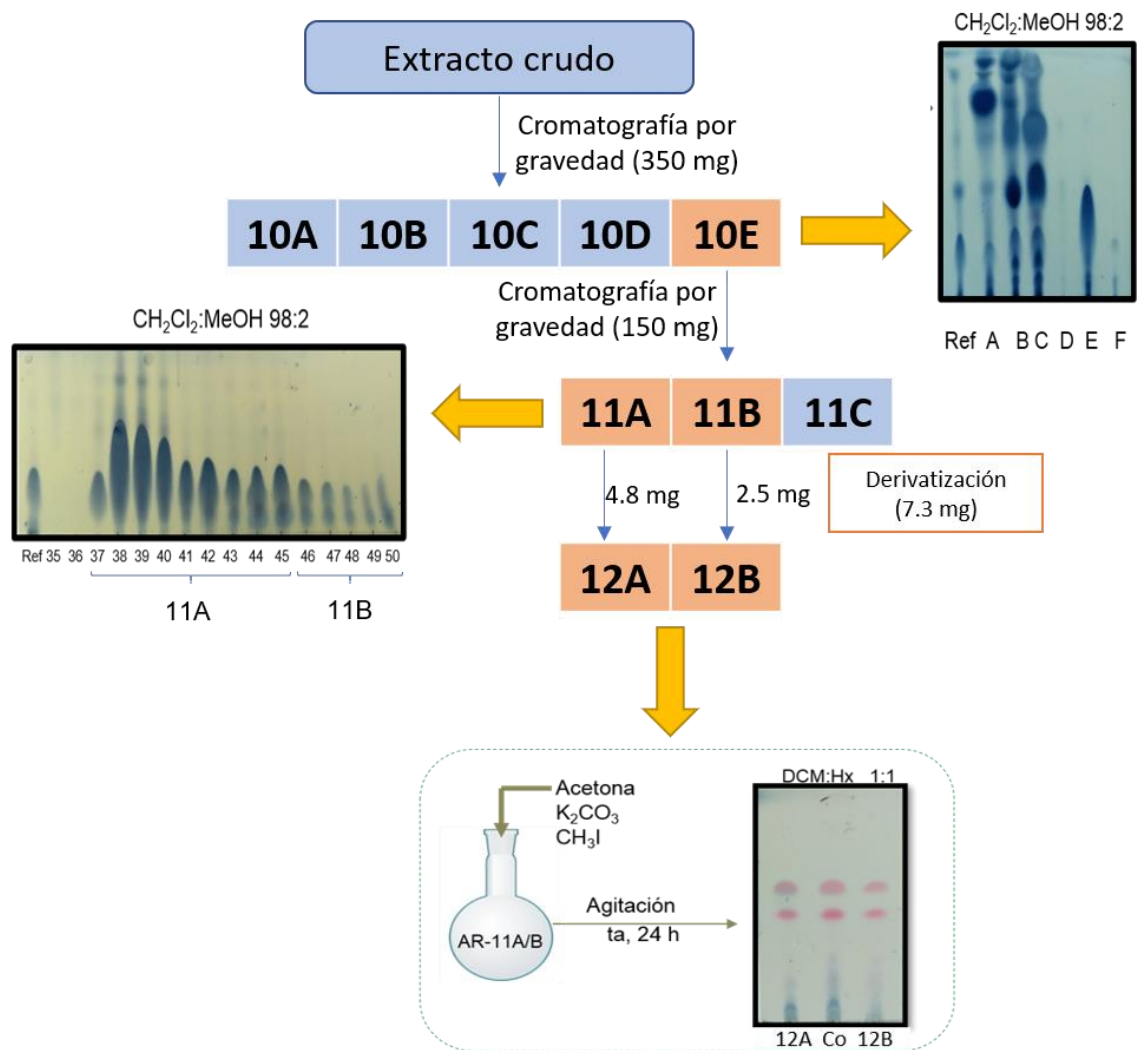


Figura 2.7 Purificación de derivados de δ -tocotrienol a partir del extracto crudo obtenido durante el escalamiento de biotransformación de δ -tocotrienol en cultivos de *P. notatum*.

Las muestras 11A (antes de derivatizar) y 12A (después de derivatizar) fueron analizadas por GC-MS (figura 2.8). Al comparar los dos perfiles cromatográficos, se observan distintos componentes con diferentes tiempos de retención, lo que comprueba que la reacción de metilación se llevó a cabo.

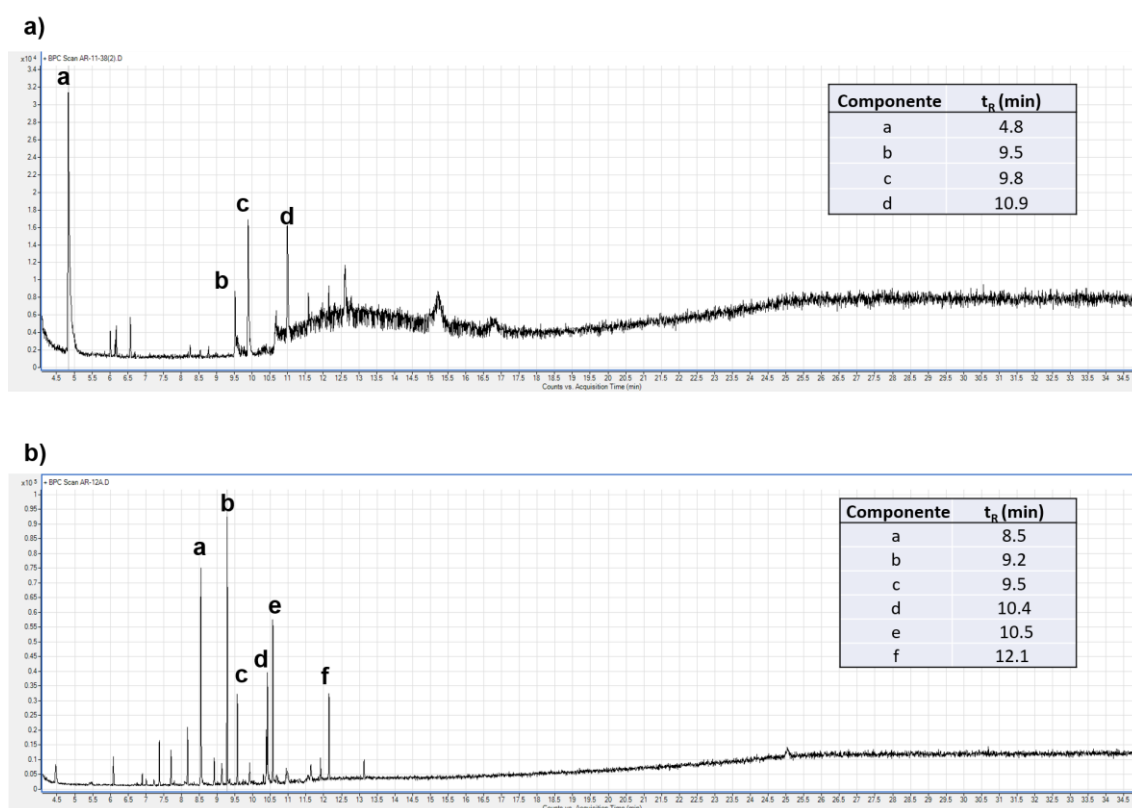


Figura 2.8 Cromatogramas de a) 11A y b) 12A y tiempos de retención de componentes mayoritarios, analizados por GC-MS.

Previamente se analizó una muestra pura de δ -tocotrienol por GC-MS (Figura 2.9), demostrando en su patrón de fragmentación tres principales picos en 177, 137 y 69 m/z ; los cuales ya han sido reportados en la literatura (Mesquita *et al.*, 2011). Los componentes mayoritarios observados en los cromatogramas de las muestras 11A y 12A, fueron seleccionados para analizar sus patrones de fragmentación (Figuras A5 y A6-Anexo); sin embargo, no se observan patrones de fragmentación relacionados a los esperados para la estructura de δ -tocotrienol, lo que sugiere que GC-MS no es la técnica adecuada para analizar estas muestras.

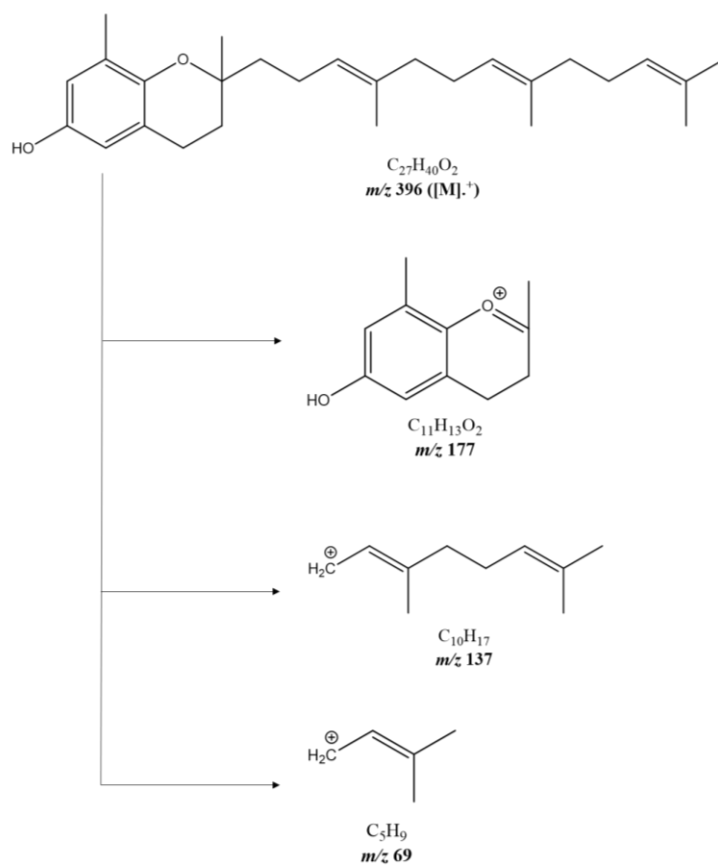
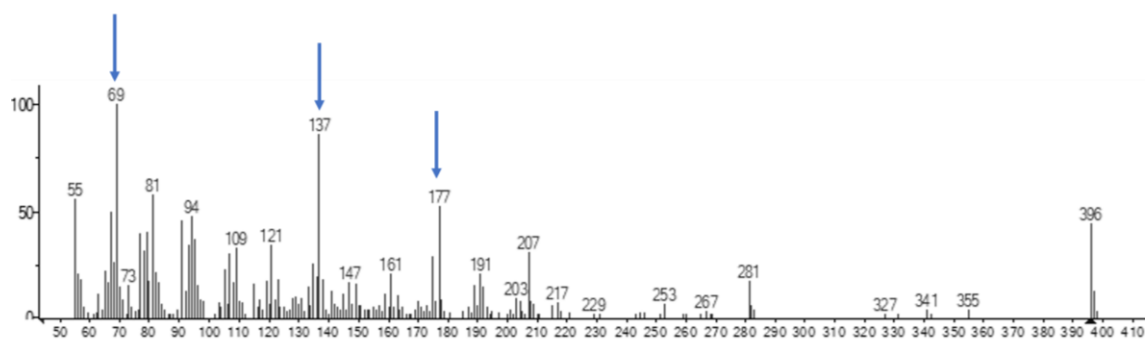


Figura 2.9 Patrón de fragmentación de δ -tocotrienol por GC-MS.

Con el fin de purificar los componentes mayoritarios presentes en la muestra 12A, se decidió realizar una cromatografía preparativa. Como puede observarse en la Figura 2.10, se obtuvieron dos productos puros (17A: 2.7 mg y 17B: 1.2 mg), posteriormente sus estructuras podrán ser elucidadas por métodos espectroscópicos. Se propone realizar análisis por RMN y LC-MS.



Figura 2.10 Perfil cromatográfico por CCD de los productos puros 17A y 17B

2.3 CONCLUSIONES

Las condiciones utilizadas para el proceso de biotransformación (pH, medio de cultivo, agitación, temperatura) fueron adecuadas para el crecimiento de los microorganismos empleados durante la etapa de escrutinio y producción de metabolitos a partir del sustrato, teniendo como resultado derivados de carácter hidrofílico mediante el uso de bacterias; mientras que, al emplear hongos, los derivados fueron más diversos en cuanto a su polaridad.

Siendo el primer estudio de biotransformación de δ -tocotrienol, se observa que *P. notatum* al generar derivados en mayor abundancia, es el mejor candidato para la producción de metabolitos a partir de este compuesto, seguido por las bacterias *S. griseus* y *P. testosteroni*.

Los resultados obtenidos mediante la metilación indican que probablemente se obtuvieron derivados con diversas hidroxilaciones en los carbonos.

Las condiciones ocupadas en el equipo de HPLC, permitió llevar a cabo una adecuada cuantificación de la materia prima, en donde se observó que el consumo del sustrato no está relacionado con la producción de productos de biotransformación.

2.4 PERSPECTIVAS

En estudios posteriores se propone optimizar las condiciones de biotransformación con la finalidad de obtener mayor cantidad de producto; por ejemplo, aumentar el tiempo de la fase 2 permitiría un mayor consumo del sustrato por parte de *P. notatum* y por lo tanto, mayor cantidad de producto.

Para un mejor aislamiento de los productos de biotransformación, se propone establecer un menor número de técnicas cromatográficas (por columna) seguida de la derivatización, para perder menor cantidad de muestra. De igual forma, al tener más cantidad de productos puros, se podría realizar una mejor identificación mediante métodos espectroscópicos.

De acuerdo con la estructura de los productos puros, realizar modificaciones por semisíntesis química. Al obtener una mayor diversidad de productos derivados del δ -tocotrienol, se propone evaluar su actividad antiinflamatoria (ensayo de inhibición con 5-LOX y docking) para discutir si el tipo de inhibición coincide con lo reportado anteriormente por Pein *et al.*, (2018).

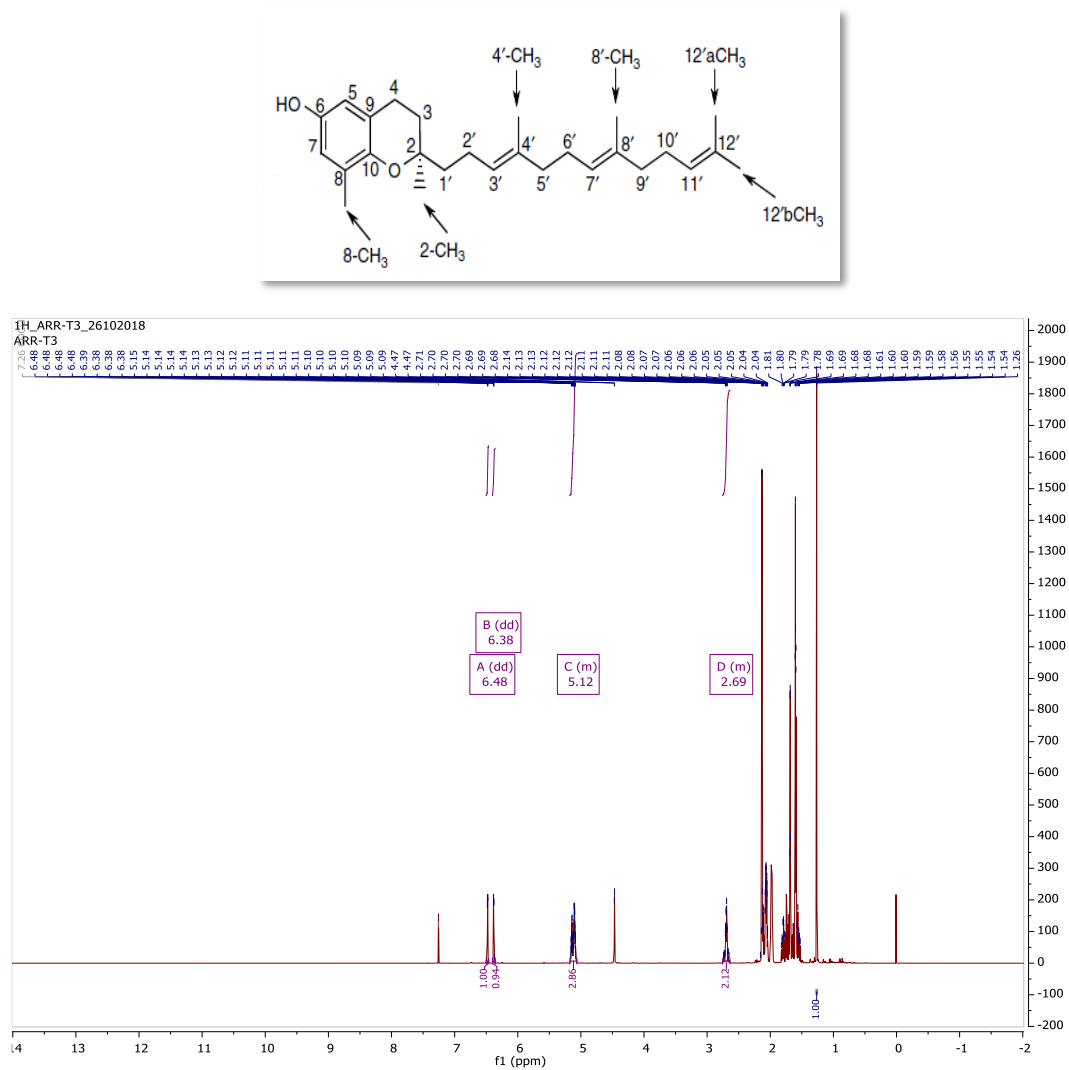


Figura A3 Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (CDCl₃, 600MHz) de δ -tocotrienol.

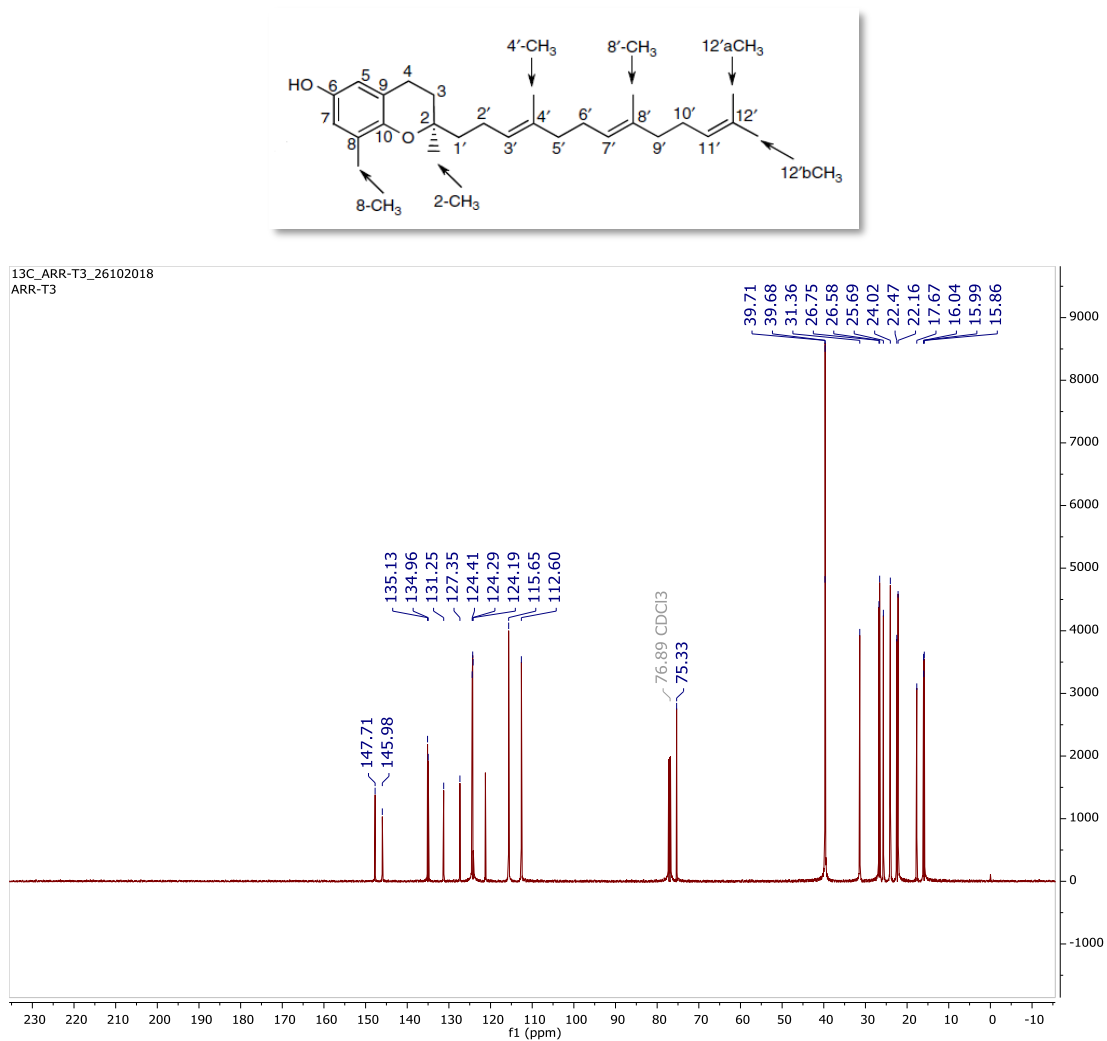


Figura A4 Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl₃, 100MHz) de δ -tocotrienol.

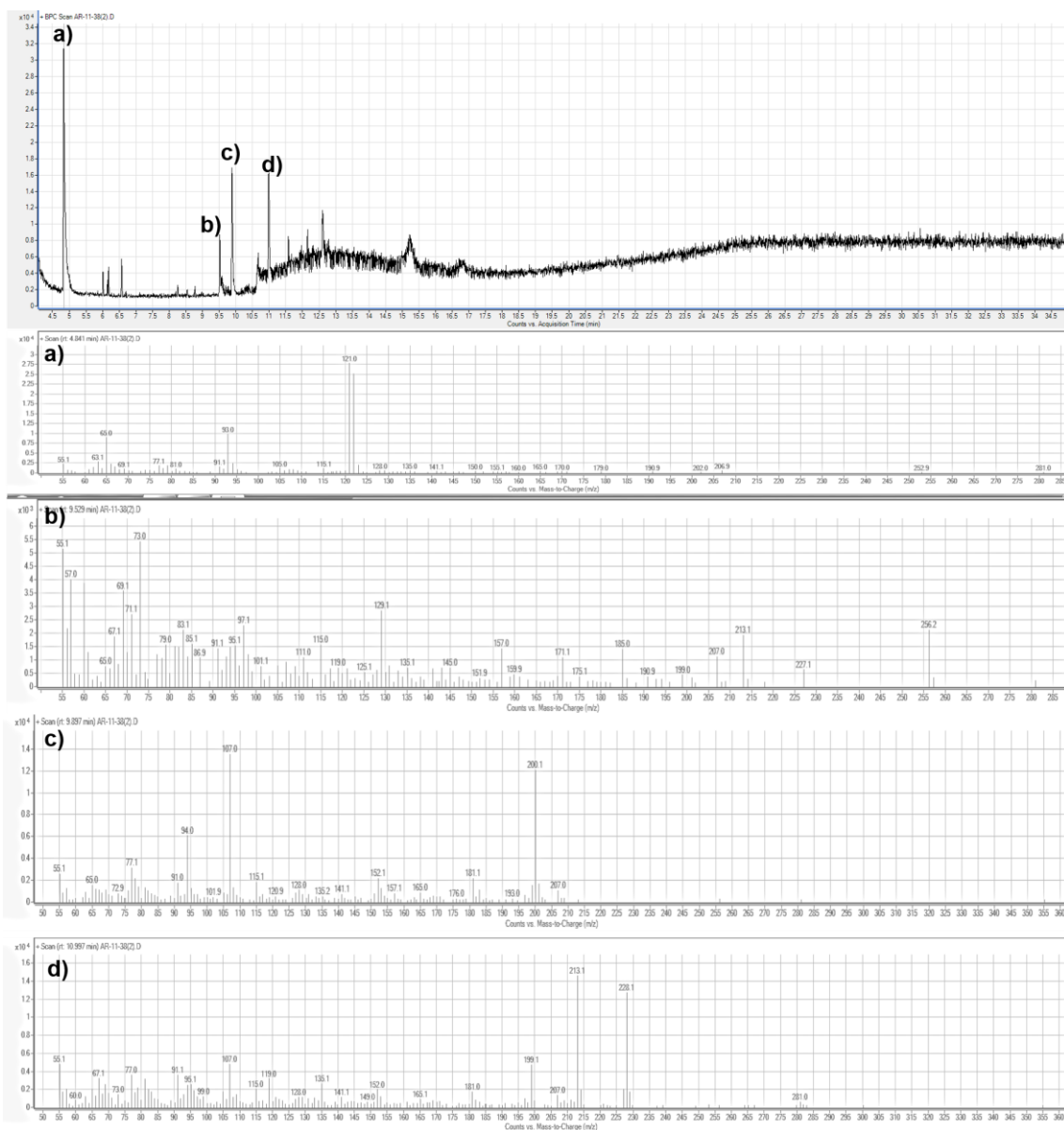


Figura A5 Perfil cromatográfico (a) y patrón de fragmentación de la fracción 11A durante su análisis por GC-MS.

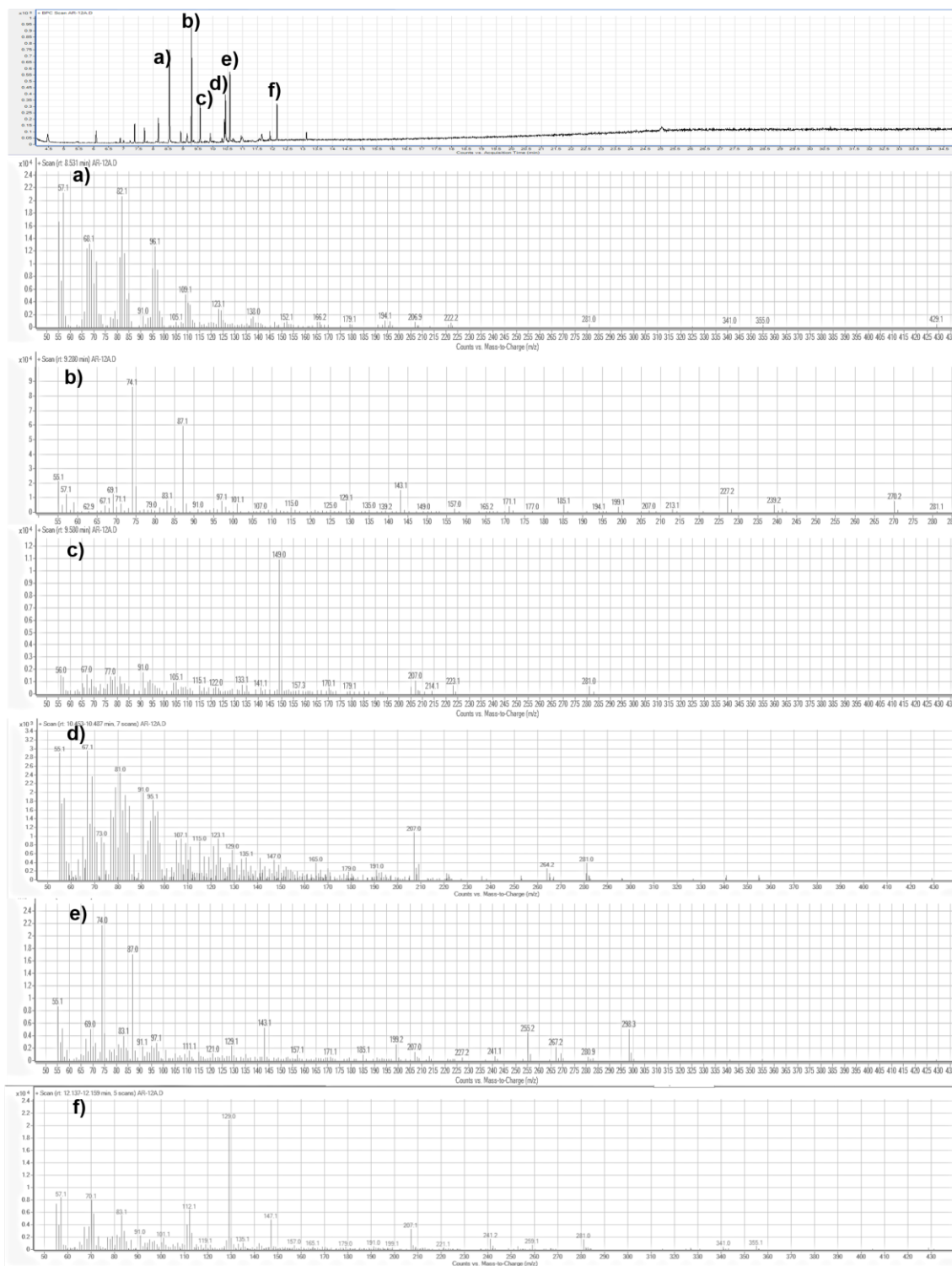


Figura A6 Perfil cromatográfico (a) y patrón de fragmentación de la fracción 12A por GC-MS.

ANEXO-TABLAS

Tabla A1 Comparación de datos espectroscópicos (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) experimentales y reportados en la literatura para δ -tocotrienol

Posición	Experimental		Ohnmacht <i>et al.</i> , 2018	
	^1H -RMN (δ)	^{13}C -RMN (δ)	^1H -RMN (δ)	^{13}C -RMN (δ)
2	-	75.46	-	75.23
2-CH ₃	1.26	24.14	1.28	23.94
3	1.81	31.49	1.75 y 1.81	31.32
4	2.69	22.33	2.70	22.41
5	6.38	112.78	6.40	112.61
6	-	147.85	-	147.78
7	6.48	115.76	6.50	115.67
8	-	127.20	-	127.21
8-CH ₃	2.13	16.02	2.14	16.02
9	-	122.85	-	121.12
10	-	145.98	-	145.77
1'	1.69	39.86	1.57 y 1.67	39.60
2'	2.12	22.35	2.12-2.16	22.11
3'	5.12	124.98	5.16	124.35
4'	-	135.21	-	135.03
4'-CH ₃	1.60	16.18	1.62	15.94
5'	2.06	34.82	1.98-2.01	39.65
6'	2.06	26.84	2.07-2.11	26.68
7'	5.12	124.48	5.13	124.24
8'	-	146.12	-	134.88
8'-CH ₃	1.60	16.18	1.62	15.81
9'	1.98	34.82	1.98-2.01	39.63
10'	2.03	26.86	2.07-2.11	26.52
11'	5.12	124.48	5.12	124.13
12'	-	128.45	-	131.18
12'a-CH ₃	1.60	16.18	1.61	17.63
12'b-CH ₃	1.69	25.80	1.70	25.65
6-OH	4.47	-	5.33	-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abourashed E.A., Clarck A.M. and Hufford C.D. (1999). Microbial Models of Mammalian Metabolism of Xenobiotic: An Updated Review. *Current Medical Chemistry*, 6 (5), 359-374.
- Ahn, K.S., G. Sethi, K. Krishnan & B.B. Aggarwal (2007). Gamma-tocotrienol inhibits nuclear factor-kappaB signaling pathway through inhibition of receptor interacting protein and TAK1 leading to suppression of antiapoptotic gene products and potentiation of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 809–820.
- Alsabil Khaled, Suor-Cherer Sorphon, Koeberle Andreas, Viault Guillaume, Lavaud Alexis, Temm Veronika, Waltenberger Birgit, Schuster Daniela, Litaudon Marc, Lorkowski Stefan, de Vaumas René, Helesbeux Jean-Jacques, Guilet David, Stuppner Hermann, Werz Oliver, Seraphin Denis, Richomme Pascal. (2016). Semisynthetic and Natural Garcinoic Acid Isoforms as New mPGES-1 Inhibitors. *Planta Medica*, 82, 1110-1116.
- Alsabil Khaled, Viault Guillaume, Suor-Cherer Sorphon, Helesbeux Jean-Jacques, Merza Joumaa, Dumontet Vincent, Peña-Rodríguez Luis Manuel, Richomme Pascal, Séraphin Denis (2017). Efficient ortho-formylation in vitamin E series, application to the semi-synthesis of natural 5- and 7-formyl- δ -tocotrienols revealing an unprecedented 5-bromo-7-formyl exchange. *Tetrahedron*, 73 (49), 6863-6870.
- Amit Koparde A., Chandrashekar Doijad R., and Shripal Magdum C., "Natural Products in Drug Discovery," in Pharmacognosy-Medicinal Plants, *IntechOpen*, 2019.
- Barnes, P. J. (2006). How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture. *British Journal of Pharmacology*, 148 (3), 245–254.
- Biolli Willian G., Ferreira Irlon M., Alvarenga Natália, de A. Santos Darlisson, de Matos Iara L., Comasseto João V., Porto André L. (2015). Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. *Biotechnology Advances*, 33, 481–510.
- Borges Keyller Bastos, Borges Warley de Souza, Durán-Patrón Rosa, Tallarico PupoMónica, BonatoPierinaSueli, González Collado Isidro (2009). Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, 385–397.

- Burkhead, K. D., S. W. Peterson, y P. L. Bolen (1994). Hydroxylation of aniline by *Aspergillus alliaceus*, *A. albertensis*, and *A. terreus*. *J. Ind. Microbiol*; 13, 233-237
- Celotti F., Laufer S. (2001). Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacological Research*, 43 (5), 429-36.
- Charlier Caroline and Michaux Catherine (2003). Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 645-659.
- Chater KF. (2016) Recent advances in understanding *Streptomyces* [version 1; peer review: 4 approved]. *F1000Research*, 5 (F1000 Faculty Rev), 2795
- 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.
- Collins, D. O., Buchanan, G. O., Reynolds, W. F. y Reese, P. B. (2001). Biotransformation of squamulose by *Curvularia lunata* ATCC 12017. *Phytochemistry*, 57, 377-383.
- Conner Elaine M. and Grishman Matthew B. (1996). Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants. *Nutrition*, 12, 274-277
- Curtis CL, Rees SG, Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Wilson C, et al. (2002) Pathologic indicators of degradation and inflammation in human osteoarthritic cartilage are abrogated by exposure to n-3 fatty acids. *Arthritis and Rheumatology.*, 46,1544–1553.
- Elinder, Fredrik & Liin, Sara. (2017). Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels. *Frontiers in Physiology*, (43) 8, 1-24.
- Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B (2007). Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation*, 30,1–6.
- Ensign, Scott A. (2001). Microbial Metabolism of Aliphatic Alkenes. *Biochemistry*, 40 (20), 5846-5853.
- GhoshS, May MJ, Kopp EB (1998). NF-k B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 16, 225–260.
- Guerrero, A., Casals, I., Busquets, M., Leon, Y., Manresa, A. (1997). Oxidation of oleic acid to (E)-10-hydroperoxy-8-octadecenoic and (E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acids by *Pseudomonas sp.* 42A2. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1347, 75-81.

- Gurram S.P., Rama P., Sivadenuvi G. y Solipuram M.R. (2009). Oxidation of meloxicam by *Streptomyces griseus*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 7 (3), 142-147.
- Herrera-Canché Stephanie G., Sánchez-González Mónica, Loyola Luis A., Bórquez Jorge, García-Sosa Karolina and Peña-Rodríguez Luis Manuel (2019). Biotransformation of a mulinane diterpenoid by *Aspergillus alliaceus* and *Mucor circinelloides*. *Biocatalysis and Biotransformation*; T01:38:34Z
- Hu C. and Ma S. (2018). Recent development of lipoxygenase inhibitors as anti-inflammatory agents. *Medicinal Chemistry Communications*, 9, 212-225
- Informed Health Online, Institute for Quality and Efficiency in Health Care, 2015. What is inflammation? [Online]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072482> [Acceso 18 abril 2018]
- Kamerbeek N.M., Moonen M.J., van der Ven J.G., van Berkel W.J.H., Fraaije M.W., Janssen D.B. (2001). 4-Hydroxyacetophenone monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens* ACB A novel flavoprotein catalyzing Baeyer-Villiger oxidation of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry*, 268 (9), 2547-2557.
- Katsuyama Yohei y Horinouchi Sueharu (2010). Natural Products Structural Diversity-I Secondary Metabolites: Organization and Biosynthesis. Comprehensive Natural Products II. *Chemistry and Biology*, 1, 147-170
- McClelland S, Gawaz M, Kennerknecht E, Konrad CS, Sauer S, Schuerzinger K, Massberg S, Fitzgerald DJ, Belton O. (2009). Contribution of cyclooxygenase-1 to thromboxane formation, platelet vessel wall interactions and atherosclerosis in the ApoE null mouse. *Atherosclerosis*, 202, 84–91.
- McMurry, J., 2010. Organic Chemistry with Biological Approach, In Secondary Metabolites: An Introduction to Natural Products Chemistry, Cengage Learning, Science, pp: 1016.
- Mesquita, Mariana L., Araújo, Renata M., Pereira, Daniel B., Braz, Raimundo F., de Paula, J. E., Rocha, Edilberto S., Pessoa C., de Moraes, Manoel O., Costa Lotudo, Leticia V., Espindola, Laila S. (2011). Cytotoxicity of δ -tocotrienols from *Kielmeyera coriacea* against cancer cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19, 623-630.
- Mohamed-Elamir F. Hegazy, Tarik A. Mohamed, Abdelsamed I. ElShamy, Abou-El-Hamd H. Mohamed, Usama A. Mahalel, Eman H. Reda, Alaa M. Shaheen, Wafaa A. Tawfik, Abdelaaty A. Shahat, Khalid A. Shams, Nahla S. Abdel-Azim, Fayza M. Hammouda (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.
- Mohs Richard C. y Greig Nigel H. (2017). Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimers Dement (N Y)*; 3 (4), 651-657.
- Nordqvist, Christian. Medical News Today, 2017. Everything you need to know about inflammation [Online] (Actualizado 24 Noviembre 2017). Disponible en: <http://www.medicalnewstoday.com> [Acceso 8 Abril 2018].
- Ocampo, R.A. (1994). *Bixa Orellana* L. *Species Plantarum*, 1 (512), 58-61.
- Ohnmacht S., West R., Simionescu R. and Atkinson J. (2008). Assignment of the ^1H and ^{13}C NMR of tocotrienols. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 46, 287–294
- Okin, D., Medzhitov, R. (2012). Evolution of Inflammatory Diseases. *Current Biology* : CB, 22 (17), R733–R740.
- Oliveira Brás H., dos Santos Márcia C. y Leal Paulo C. (1999). Biotransformation of the diterpenoid, isosteviol, by *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus arrhizus*. *Phytochemistry*, 51 (6), 737-741.
- Palanisamy Arulselvan, Masoumeh Tangestani Fard, Woan Sean Tan, Sivapragasam Gothai, Sharida Fakurazi, Mohd Esa Norhaizan, and S. Suresh Kumar. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2016, 1-15.
- Pein H., Ville A., Pace S., Temml V., Garscha U., Raasch M., Alsabil K., Viault G., Dinh P., Guilet D., Troisi F., Neukirch K., König S., Bilancia R., Waltenberger B., Stuppner H., Wallert M., - Lorkowski S., Weinigel C. and Koeberle A. (2018); Endogenous metabolites of vitamin E limit inflammation by targeting 5-lipoxygenase. *Nature Communications*, 9, 3834.
- Pervaiz I., Ahmad S., Madni M. A., Ahmad H., and KhaliqF. H. (2013). Microbial Biotransformation: a Tool for Drug Designing. *Applied biochemistry and microbiology*, 49(5), 437-450.
- Rådmark Olof and Samuelsson Bengt (2009). 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *Journal of Lipid Research*, April Supplement, S40-S45.
- Ricciotti Emanuela and FitzGerald Garret A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 31 (5), 986–1000.

- Rousseau Brigitte, Dostal Larry, Rosazza John. Biotransformations of Tocopherols by *Streptomyces catenulae*. (1997). *Lipids*, 32 (1), 79-84.
- Sala A., Zarini S., Bolla M. (1998). REVIEW: Leukotrienes: Lipid Bioeffectors of Inflammatory Reactions. *Biochemistry*, 63 (1), 84-92
- 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.
- Sariaslani F. Sima, Harper David B., Higgins I. John (1974). Microbial degradation of hydrocarbons. Catabolism of 1-phenylalkanes by *Nocardia salmonicolor*. *Biochemistry Journal* 1, 140 (1), 31–45.
- Shahid-ul-Islam, Luqman J. Rather, Faqeer Mohammad (2016). Phytochemistry, biological activities and potential of *annatto* in natural colorant production for industrial applications – A review. *Journal of Advanced Research*, 7, 499–514.
- Shirode, A.B. and P.W. Sylvester (2010). Synergistic anticancer effects of combined gamma-tocotrienol and celecoxib treatment are associated with suppression in Akt and NFκB signaling. *Biomedical and Pharmacology*, 64, 327–332.
- Shu-Jing Wu, Po-Len Liu and Lean-Teik Ng (2008). Tocotrienol-rich fraction of palm oil exhibits anti-inflammatory property by suppressing the expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 921-929.
- Smitha MS, Singh S and Singh R. (2017). Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 4 (2), 1-6.
- Sostres C., Gargallo C., Arroyo M., Lanás A (2010). Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best practice and research clinical gastroenterology*, 24 (2), 121-132.
- Srivastava S., Luqman S., Fatima A., Darokar M.P., Negi A.S., Kumar J.K., Shanker K., Chanotiya C.S., Tandon S., Khanuja S.P.S. (2009). Biotransformation of Artemisinin Mediated through Fungal Strains for Obtaining Derivatives with Novel Activities. *Scientia Pharmaceutica*, 77, 87-96.

- Strohl WR. 2000. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, 5: 39-41.
- Ting Liu, Lingyun Zhang, DonghyunJoo and Shao-Cong Sun (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, e17023.
- Veeresham, C. (2012). Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 3 (4), 200–201.
- Veiga Tânia, Gombert Andreas K., Landes Nils, Verhoeven Maarten D., Kiel Jan A.K.W., Krikken Arjen M., Nijland Jeroen G., Touw Hesselien, Luttik Marijke A. H., Van der Toorn John C., Driessen Arnold J.M., Bovenberg Roel A. L., Van den Berg Marco A., Van der Klei Ida J. , Pronk Jack T., Jean-MarcDaran. (2012). Metabolic engineering of β -oxidation in *Penicillium chrysogenum* for improved semi-synthetic cephalosporin biosynthesis. *Metabolic Engineering* 14 (4), 437-448.
- Viault Guillaume, Helesbeux Jean-Jacques, Richomme Pascal, Séraphin Denis. (2018). Concise semisynthesis of novel phenazine-vitamin E hybrids via regioselective tocopheryl ortho-quinone formation. *Tetrahedron Letters*; 59, 2627-2630.
- Waschina Silvio, D'Souza Glen, Kost Christian y Kaleta Christoph (2016). Metabolic network architecture and carbon source determine metabolite production costs. *The FEBS Journal*, 283, 2149–2163.
- Werz Oliver, (2007). Inhibition of 5-Lipoxygenase Product Synthesis by Natural Compounds of Plant Origin. *Planta Medica*, 73 (13), 1331-57.
- Zarghi A. and Arfaei S. (2011). Selective COX-2 Inhibitors: A review of their structure-activity relationships. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10 (4), 655-683.
- 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.