



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

BIOTRANSFORMACIÓN Y DERIVATIZACIÓN
QUÍMICA DE TERPENOIDES PARA LA OBTENCIÓN
DE NUEVOS AGENTES CON POTENCIAL
ANTITUBERCULOSO

Tesis que presenta

STEPHANIE GUADALUPE HERRERA CANCHÉ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2023

*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 **Stephanie Guadalupe Herrera Canché** titulado “**Biotransformación y derivatización química de terpenoides para la obtención de nuevos agentes con potencial antituberculoso**”, fue realizado en la **Unidad de Biotecnología**, en la línea de investigación Biotecnología de Productos Naturales, en los laboratorios de Química Orgánica del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C y el laboratorio de Biotecnología (Facultad de Ingeniería Química, UADY). bajo la dirección del **Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez** y la **Dra. Mónica Noel Sánchez González**, dentro de la opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de junio de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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:



Stephanie Guadalupe Herrera Canché

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado Biotransformación y derivatización química de terpenoides para la obtención de nuevos agentes con potencial antituberculoso bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y la Dra. Mónica Noel Sánchez González.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero a través de la beca mensual con número de CVU 773524.

Al Proyecto ECOS-Nord denominado “Valoración de los recursos vegetales, naturales y renovables de la península de Yucatán”, por haberme otorgado un apoyo económico para la estadía en el laboratorio SONAS de la Universidad de Angers, Francia.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), por las facilidades para la realización de este proyecto, especialmente a la Unidad de Biotecnología, Laboratorio de Química Orgánica ubicado en el Parque Científico Tecnológico, Sierra Papacal.

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

Al laboratorio SONAS (Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux) de la Universidad de Angers, Francia, por permitirme usar sus instalaciones y llevar a cabo la derivatización química de los compuestos de interés. De manera especial al Dr. Jean-Jacques Helesbeux por su asesoría, paciencia y disposición para realizar las reacciones químicas. De igual manera, agradezco el apoyo de los Dres. Guillaume Viault, Khaled Alsabil y Denis Séraphin.

A los Dres. Luis A. Loyola y Jorge Bórquez de la Universidad de Antofagasta, Chile, por la proporción de los extractos hexánicos de *Azorella compacta* y *Mulinum crassifolium* para el aislamiento de los terpenoides utilizados como sustrato en los procesos de biotransformación.

A la Dra. Gloria María Molina Salinas del IMSS, Yucatán, por haber realizado el aislamiento e identificación de los terpenoides utilizados como sustrato y materia prima para emplear en los diferentes procesos de biotransformación y derivatización química.

Al Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales, Cinvestav-IPN a cargo de la Dra. Gloria Ivonne Hernández Bolio, por los análisis de RMN realizados y por su apoyo para la realización de la rotación óptica de los compuestos nuevos.

Agradezco enormemente a mis directores de tesis, el Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y la Dra. Mónica Noel Sánchez González, por haber aceptado continuar con este proyecto, darme consejos para mejorar el trabajo, palabras de ánimo y críticas constructivas que, hicieron posible mi formación académica y personal.

A los miembros de mi Comité tutorial, Comité predoctoral y Comité revisor, Dr. Raúl Tapia Tussel, Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández, Dr. Rodrigo Arturo Rivera Solís, Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y Dra. Laura Patricia Álvarez Berber, por sus aportaciones para el desarrollo de este trabajo y por enriquecer la investigación con sus acertadas observaciones. Así como a los Dres. Cecilia Mónica Rodríguez García y Luis Felipe Barahona Pérez, quienes formaron parte de mi comité tutorial y predoctoral.

A la QBB Karlina García Sosa, técnico del Laboratorio de Química Orgánica por su apoyo para la realización del trabajo en el laboratorio y su orientación para los análisis cromatográficos.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Orgánica, por hacer ameno el trabajo en el laboratorio, así como por sus aportaciones y consejos.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología y del Laboratorio SONAS, por su apoyo, consejos, aportaciones y permitir que mi estancia haya sido muy agradable.

Al Prof. Dr. Pascal Richomme Peniguel y Dra. Ann Marie Le Ray, por compartir conmigo su hogar, familia y anécdotas durante mi estancia en Angers, así como su amabilidad y hospitalidad.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Presentación en congreso: XI Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sur-Sureste (San Francisco Campeche, noviembre 2022). Cartel: "Modificación de diterpenoides mulinano y azurellano mediante transformación microbiana".

Artículo "Microbial transformation of azurellane and mulinane diterpenoids". Publicación publicada por la revista *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. Autores: Stephanie Guadalupe Herrera-Canché, Mónica Noel Sánchez González, Gloria María Molina-Salinas, Luis A. Loyola, Jorge Bórquez, Luis Manuel Peña-Rodríguez.

DEDICATORIAS

A Dios, por permitir cumplir esta meta y por darme una segunda oportunidad de vida para continuar.

A mis papás, Sr. Jorge Herrera Arjona y Sra. Rosaura Canché Palomo por todo su apoyo, palabras de aliento y cuidados para seguir cumpliendo mis sueños.

Especialmente, quiero dedicar y agradecer a mi esposo Ananías Ek Ucan por toda su dedicación, oraciones, cuidados, apoyo y palabras de aliento para no rendirme y poder cumplir con esta meta y propósito de vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA TB	3
1.2. PRODUCTOS NATURALES COMO FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS.....	13
1.3. BIOTRANSFORMACIÓN	23
1.4. BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOIDES.....	26
1.5. JUSTIFICACIÓN.....	29
1.6. HIPÓTESIS.....	30
1.7. OBJETIVO GENERAL.....	30
1.8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
CAPÍTULO II	33
TRANSFORMACIÓN MICROBIANA DE DITERPENOIDES MULINANO Y AZORELLANO	33
2.1. INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO	33
2.2. MICROBIAL TRANSFORMATION OF AZORELLANE AND MULINANE DITERPENOIDS.....	33
2.2.1. ABSTRACT	33
2.2.2. RESUMEN.....	33

2.2.3. INTRODUCTION	34
2.2.4. MATERIALS AND METHODS	35
2.2.5 RESULTS AND DISCUSSION	38
2.2.6. AUTHOR CONTRIBUTIONS	39
2.3 SUPPORTING INFORMATION.....	41
CAPÍTULO III	57
DERIVATIZACIÓN QUÍMICA DE DITERPENOIDES MULINANO Y AZORELLANO PARA LA EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO FRENTE A CEPAS SENSIBLES Y RESISTENTES DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	57
3.1. INTRODUCCIÓN	57
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
3.2.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES EXPERIMENTALES	58
3.2.2. MATERIAS PRIMAS EMPLEADAS PARA LA DERIVATIZACIÓN QUÍMICA	59
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
3.4. CONCLUSIONES	66
CAPÍTULO IV	67
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	67
4.1. DISCUSIÓN GENERAL	67
4.2. CONCLUSIONES GENERALES.....	73
4.3. PERSPECTIVAS	74
4.4. BIBLIOGRAFÍA	75

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	4
Figura 1.2. Ciclo de infección por <i>M. tuberculosis</i>	5
Figura 1.3. Países con mayor número de incidencias de TB a nivel mundial.	5
Figura 1.4. Estructuras químicas de los fármacos de primera línea empleados para el tratamiento de la TB y año de introducción.	7
Figura 1.5. Estructuras químicas de los fármacos inyectables de segunda línea utilizados para el tratamiento de la TB y el año de su introducción.	8
Figura 1.6. Estructuras químicas de los fármacos fluoroquinolonas de segunda línea utilizados para el tratamiento de la TB y el año de su introducción.	9
Figura 1.7. Estructuras químicas de los fármacos bacteriostáticos orales de segunda línea utilizados para el tratamiento de la TB y el año de su introducción	9
Figura 1.8. Estructuras químicas de los fármacos de tercera línea empleados para el tratamiento de la TB y año de introducción.	10
Figura 1.9. Sitios de acción de los fármacos anti-TB.	11
Figura 1.10. Mecanismos de resistencia desarrollados por <i>M. tuberculosis</i>	12
Figura 1.11. Modificación de fármacos para el tratamiento de la tuberculosis mediante la acción de las enzimas <i>Eis</i> y β -lactamasa.	13
Figura 1.12. Año de introducción de productos naturales (PN) y derivados de productos naturales (DPN) que se utilizan como fármacos.	15
Figura 1.13. Productos naturales y derivados de productos naturales utilizados como fármacos para el tratamiento de la TB.	16
Figura 1.14. Estructuras químicas de las rifamicinas en estudio como posibles fármacos	

para el tratamiento de la TB.....	17
Figura 1.15. Productos naturales activos contra <i>M. tuberculosis</i>	18
Figura 1.16. Estructuras químicas de los terpenoides con actividad anti-TB.	19
Figura 1.17. Esqueleto de los diterpenoides mulinano y azorellano.	20
Figura 1.18. Actividad anti-TB de diterpenoides tipo mulinano y azorellano contra dos cepas de <i>M. tuberculosis</i> : a. <i>M. tuberculosis</i> sensible (ATCC 27294). b. <i>M. tuberculosis</i> resistente (CIBIN/UMF15:99).....	21
Figura 1.19. Actividad anti-TB de derivados semisintéticos de diterpenoides tipo mulinano contra dos cepas de <i>M. tuberculosis</i> : a. <i>M. tuberculosis</i> sensible (ATCC 27294). b. <i>M. tuberculosis</i> resistente (CIBIN/UMF15:99).	22
Figura 1.20. Biotransformación de compactina a pravastatina.	25
Figura 1.21. Biotransformación del β -sitosterol por <i>Mycobacterium</i> sp.....	26
Figura 1.22. Organismos utilizados para la biotransformación.	26
Figura 1.23. Esqueletos de diterpenoides modificado por biotransformación.	27
Figura 1.24. Productos de biotransformación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico por <i>M. plumbeus</i>	28
Figura 1.25. Productos de biotransformación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico en cultivos de <i>A. alliaceus</i> (a) y <i>M. circinelloides</i> (b).	29
Figura 1.26. Diagrama experimental propuesto para el presente trabajo.	31
Figure 2.1. Microbial transformation of 1 and 2 and their corresponding products 3-7.....	37

Figure 2.1S. ^1H -NMR spectrum (600 MHz, CD_3OD) of 4,16-dihydroxy-azorellanol (4). ...	41
Figure 2.2S. ^{13}C -NMR spectrum (150 MHz, CD_3OD) of 4,16-dihydroxy-azorellanol (4)...	42
Figure 2.3S. HSQC experiment of 4,16-dihydroxy-azorellanol (4).	43
Figure 2.4S. HMBC experiment of 4,16-dihydroxy-azorellanol (4).	44
Figure 2.5S. ^1H -RMN spectrum (600 MHz, CD_3OD) of 2β ,16-dihydroxy-14-en-azorellanol (5).....	45
Figure 2.6S. ^{13}C -RMN spectrum (150 MHz, CD_3OD) of 2β ,16-dihydroxy-14-en-azorellanol (5).....	46
Figure 2.7S. HSQC experiment of 2β ,16-dihydroxy-14-en-azorellanol (5).....	47
Figure 2.8S. HMBC experiment of 2β ,16-dihydroxy-14-en-azorellanol (5).....	48
Figure 2.9S. NOESY experiment of 2β ,16-dihydroxy-14-en-azorellanol (5).....	49
Figure 2.10S. ^1H -NMR spectrum (600 MHz, CD_3OD) of 13β , 14β -dihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (6).....	50
Figure 2.11S. ^1H -NMR spectrum (600 MHz, CD_3OD) of 13α , 14β ,16-trihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (7).....	51
Figure 2.12S. ^{13}C -NMR spectrum (150 MHz, CD_3OD) of 13α , 14β ,16-trihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (7).....	52
Figure 2.13S. HSQC experiment of 13α , 14β ,16-trihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (7)..	53
Figure 2.14S. HMBC experiment of 13α , 14β ,16-trihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (7)..	54
Figure 2.15S. NOESY experiment of 13α , 14β ,16-trihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (7).55	
Figura 3.1. Productos obtenidos por derivatización química.....	64

Figura 4.1. Biotransformación de la testosterona por <i>P. notatum</i>	68
Figura 4.2. Biotransformación del ácido deshidroabiético en cultivos de <i>M. circinelloides</i> y <i>M. isabelina</i>	69
Figura 4.3. Biotransformación del esclareol por <i>M. plumbeus</i> , <i>C. elegans</i> y <i>C. aphidicola</i>	69
Figura 4.4. Relación filogenética de los hongos.	70
Figura 4.5. Estructura química del intermediario cloruro de ácido mulin-11,13-dien-20-oilo.	71

ABREVIATURAS

TB	Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculosis multirresistente
TB-XDR	Tuberculosis extremadamente resistente
TB-DRT	Tuberculosis de resistencia total
PN's	Productos naturales
DPN's	Derivado (s) de productos naturales
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
p. ej.	Por ejemplo
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
HSQC	Correlación cuántica única heteronuclear
HMBC	Correlación de enlaces múltiples heteronucleares
NOESY	Espectroscopia de mejoramiento nuclear de Overhauser
δ_H	Desplazamiento químico de protón
δ_C	Desplazamiento químico de carbono
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
ppm	Partes por millón
Hz	Hertz
d	Doblete

s	Singulete
m	Multiplete
dd	Doblete de doblete
UV	Ultravioleta
VLC	Cromatografía líquida al vacío
CCG	Cromatografía en columna de gravedad
CCF	Cromatografía en columna flash
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG-EM	Cromatografía de gases- espectrometría de masas
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
PDB	Caldo papa dextrosa
MLE	Medio líquido de esporulación
PDA	Agar papa dextrosa
MSE	Medio sólido de esporulación
g	Gramo
mg	Miligramo
µg	Microgramo
cm	Centímetro
mm	Milímetro
meq	Miliequivalente
mmol	Milimolar
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
<i>t_R</i>	Tiempo de retención
h	Horas
min	Minutos
rpm	Revoluciones por minuto
°C	Grados Celsius

N

Normalidad

R_f

Factor de retención

RESUMEN

El incremento de los nuevos casos de tuberculosis continúa siendo un grave problema de salud pública a nivel mundial. Esta enfermedad es causada por *Mycobacterium tuberculosis* y afecta de forma mayoritaria a los pulmones. De acuerdo a las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tuberculosis es actualmente considerada la segunda enfermedad infecciosa de mayor mortalidad al año. A pesar de que existe una terapia combinada de fármacos para contrarrestar esta enfermedad, la resistencia que ha adquirido la micobacteria hacia estos fármacos dificulta su tratamiento. Debido a esto, la búsqueda de productos con potencial antituberculoso sigue siendo importante para el desarrollo de nuevos fármacos. Se ha demostrado que los productos naturales son una fuente importante para el desarrollo de nuevos fármacos. Dentro de los productos naturales con actividad antituberculosa destacan los diterpenoides de tipo azorellano y mulinano, debido a que han mostrado actividad biológica prometedora frente a cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis*. Asimismo, se ha reportado que algunos derivados semisintéticos de azorellanos y mulinanos mostraron un aumento en su potencial antituberculoso. Con base en lo anterior, se planteó la preparación de derivados de azorellanos y mulinanos naturales mediante estrategias de biotransformación, empleando cultivos fúngicos (*Aspergillus alliaceus*, *Mucor circinelloides* y *Penicillium notatum*) y bacterianos (*Nocardia iowensis*), y de transformación química. Los procesos de biotransformación del azorellanol (1) en cultivos de *N. iowensis* dio como resultado la obtención del diterpenoide previamente reportado 7-desacetil-azorellanol (3), en tanto que, *P. notatum* produjo dos nuevos metabolitos identificados como 4,16-dihidroxi-azorellanol (4) y 2 β ,16-dihidroxi-azorellanol (5). Por otro lado, la biotransformación del diterpenoide ácido 13 α -hidroximulin-11-en-20-oico (2) en cultivos de *P. notatum* dio como resultado la obtención del producto conocido como ácido 13 β ,14 β -dihidroximulin-11-en-20-oico (6) y un nuevo metabolito identificado como ácido 13 α ,14 β ,16-trihidroximulin-11-en-20-oico (7). Adicionalmente, se llevó a cabo la obtención de amidas a través de la transformación química del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (8), dando como resultado la obtención de tres nuevos derivados identificados como *N*-metil-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (9), *N*-4'-metoxi-bencil-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (10) y *N*-3'-metil-pirido-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (11). Con estos resultados se propone a la biotransformación y la transformación química de diterpenoides tipo azorellano y mulinano

como opciones futuras para la obtención de nuevas cabezas de serie de derivados con potencial antituberculoso.

ABSTRACT

The increase in new cases of tuberculosis continues to be a serious public health problem worldwide. This disease is caused by *Mycobacterium tuberculosis* and mainly affects the lungs. According to World Health Organization (WHO) estimates, tuberculosis is considered currently the second infectious disease with the highest mortality per year. Despite the fact that there is a combined drug therapy to counteract this disease, the resistance that mycobacteria have acquired towards these drugs makes their treatment difficult. Because of this, the search for products with anti-TB potential remains important for the development of new drugs. Natural products have been shown to be an important source for new drug development. Among the natural products with tuberculosis activity, the azorellano and mulinano diterpenoids stand out, because they have shown promising biological activity against sensitive and resistant strains of *M. tuberculosis*. Likewise, it has been reported that some semisynthetic derivatives of azorellane and mulinane showed an increase in their antituberculosis potential. Based on the above, for this work, the preparation of natural azorellane and mulinane derivatives was proposed through biotransformation strategies, using fungal (*Aspergillus alliaceus*, *Mucor circinelloides* and *Penicillium notatum*) and bacterial (*Nocardia iowensis*) cultures, and chemical transformation. The biotransformation processes of azorellanol (**1**) in cultures of *N. iowensis* resulted in obtaining the previously reported diterpenoid 7-desacetyl-azorellanol (**3**), while *P. notatum* produced two new metabolites identified as 4,16 -dihydroxy-azorellanol (**4**) and 2 β ,16-dihydroxy-azorellanol (**5**). On the other hand, the biotransformation of diterpenoid 13 α -hidroxymulin-11-en-20-oic acid (**2**) in *P. notatum* cultures resulted in obtaining the product known as 13 β ,14 β -dihydroxymulin-11-en-20-oic acid (**6**) and a new metabolite identified as 13 α ,14 β ,16-trihydroxymulin-11-en-20-oic acid (**7**). Additionally, amides were obtained through the chemical transformation of mulin-11,13-dien-20-oic acid (**8**), resulting in the obtaining of three new derivatives identified as *N*-methyl-mulin-11,13-dien-20-carboxamide (**9**), *N*-4'-methoxy-benzyl-mulin-11,13-dien-20-carboxamide (**10**) and *N*-3'-methyl-pyrido-mulin-11,13-dien-20-carboxamide (**11**). With these results, the biotransformation and chemical transformation of azorellane and mulinane diterpenoids are proposed as future options for obtaining new series heads of derivatives with antituberculosis potential.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se describen diversas enfermedades que tienen como consecuencia un gran número de pérdidas humanas al año. Entre estos padecimientos con altos índices de mortalidad se encuentra la tuberculosis (TB), afección infecto-contagiosa que año con año registra millones de nuevos casos y defunciones alrededor del mundo, posicionándola en el octavo lugar de la lista de enfermedades con mayor número de muertes (OMS, 2020).

La TB es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, micobacteria que se transmite por vía aérea provocando que su contagio sea de gran facilidad (OMS, 2021; Koul *et al.*, 2011). Sin embargo, de ser detectada a tiempo y con el tratamiento adecuado, puede ser erradicada (OMS, 2021). Actualmente el tratamiento de la TB consta de la administración de fármacos de primera línea (isoniazida y rifampicina son los más eficaces), los cuales son prescritos a pacientes que presentan la enfermedad por primera vez (OMS, 2021; Brown Jr. *et al.*, 2016). Sin embargo, la aparición de formas resistentes de *M. tuberculosis* impide que estos fármacos de primera línea cumplan con su función de eliminar a este microorganismo. Estas formas resistentes de *M. tuberculosis* se conocen como tuberculosis multirresistente (MDR por sus siglas en inglés) y tuberculosis extremadamente resistente (XDR por sus siglas en inglés) y su tratamiento requiere de fármacos de segunda (p. ej. kanamicina, amikacina, fluoroquinolonas) y tercera (p. ej. bedaquilina, delamanida) líneas (OMS, 2021; Brown Jr. *et al.*, 2016; Seung *et al.*, 2015). No obstante, los efectos adversos y la limitada eficacia de los fármacos continúan siendo graves problemas, por lo que es necesario la búsqueda de nuevas fuentes para la obtención de moléculas con potencial anti-TB (García *et al.*, 2012).

Los productos naturales (PN's), conocidos también como metabolitos secundarios, dada su importancia en la medicina moderna, son reconocidos como una alternativa para la búsqueda de fármacos y en particular de nuevos agentes con potencial actividad antituberculosa (Liu *et al.*, 2012). En este sentido, se ha demostrado que PN's como los diterpenoides tipo azorellano y mulinano, así como sus derivados semisintéticos, inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* en su forma sensible y resistente (Molina-Salinas *et al.*, 2010a, 2010b, 2010c).

Estudios recientes demuestran la importancia de la biotransformación como alternativa para la obtención de nuevos derivados de diterpenoides tipo mulinano y azorellano con potencial antituberculoso importante (Herrera-Canché *et al.*, 2020). Por lo anterior, en este trabajo se propuso la obtención de nuevos derivados de azorellanos y mulinanos mediante biotransformación y derivatización química, así como la evaluación de su potencial antituberculoso.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA TB

Hoy en día la TB continúa siendo un problema de salud pública, registrándose 1.6 millones de muertes a nivel mundial tan sólo en 2021 (OMS, 2022). El agente causal de esta enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis* (especie distribuida en todo el mundo) y *M. africanum* (especie identificada en pacientes de países africanos) en humanos, que junto con seis especies más del género *Mycobacterium* (*M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. mungi* y *M. pinnipedii*, en algunos animales) conforman el complejo de bacterias causantes de la TB (Koch y Mizrahi, 2018; Delogu *et al.*, 2013; Forrellad *et al.*, 2013; Sreevatsan *et al.*, 1997). Estas especies son consideradas genéticamente similares, en comparación con las especies restantes del género *Mycobacterium* (Viñuelas-Bayón *et al.*, 2017).

M. tuberculosis es una bacteria aerobia obligada, alcohol-resistente (tinción Ziehl-Neelsen) y aunque sus características son muy particulares, es considerada Gram positiva (Koch y Mizrahi, 2018). Se caracteriza por tener una pared celular compleja, compuesta principalmente por ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono) conocidos como ácidos micólicos, así como de peptidoglicano y arabinogalactano (Figura 1.1). Esta particularidad le confiere una baja permeabilidad celular y les brinda resistencia a algunos fármacos utilizados para el tratamiento de la TB (Maitra *et al.*, 2019; Rozman *et al.*, 2016; Forrellad *et al.*, 2013).

La infección por TB inicia cuando un individuo sano inhala las gotas finas que contienen la bacteria, después de ser expulsadas por un enfermo contagiado de TB al estornudar, hablar o toser, alojándose en los alvéolos pulmonares del nuevo hospedero (Figura 1.2). En esta etapa inicial, *M. tuberculosis* puede ser fagocitada por los macrófagos alveolares y evitar el crecimiento de la bacteria como respuesta inmediata del sistema inmune (TB latente); se estima que la cuarta parte de la población padece esta forma de TB, en la cual el individuo porta a la bacteria en su organismo pero no logra desarrollar los síntomas de la enfermedad (p. ej. dolor torácico, fatiga, fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso y tos prolongada) ni transmitir la infección (OMS, 2021; Cambier *et al.*, 2014).

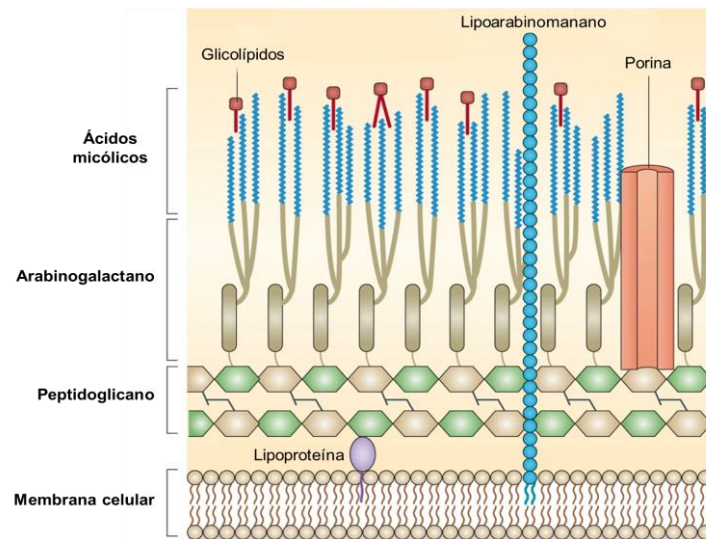


Figura 1.1. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis* (modificado de Brown *et al.*, 2015).

Por otro lado, la bacteria puede cruzar la primera línea de defensa y replicar su crecimiento de tal forma que provoque una infección activa en los pulmones (TB pulmonar) o, propagarse a otros órganos (TB extrapulmonar) mediante diseminación por el torrente sanguíneo o por los vasos linfáticos (p. ej. renal, genitourinaria, sistema nervioso central, ósea, digestivo, cutánea) (OMS, 2021; Cambier *et al.*, 2014; Delogu *et al.*, 2013; Fanlo y Tiberio, 2007). La TB se desarrolla principalmente en individuos con el sistema inmunodeprimido causado por enfermedades como la diabetes, el VIH, e inclusive en consumidores de tabaco (OMS, 2021).

A pesar de que la TB es una enfermedad que puede ser curada si se detecta a tiempo y con el tratamiento adecuado, en el año 2021 se registraron 10.6 millones de nuevos casos, cifra que aumentó en un 4.6% en comparación a lo reportado en 2020. Asimismo, este aumento se reflejó en el número de defunciones en todo el mundo, que para 2021 fue de 1.6 millones. La mayoría de los enfermos por TB en 2021 se concentraron en Asia Sudoriental (45%) y África (23%) y principalmente en países con escasez de recursos como Bangladesh, China, Filipinas, India, Indonesia, Nigeria, Pakistán y República Democrática de Congo (Figura 1.3). Ese mismo año se registraron aproximadamente 500

millones de nuevos casos de TB en su forma resistente, siendo India el país con mayor número de casos (26%), seguido por Rusia (8.5%) y Pakistán (7.9%) (OMS, 2022).

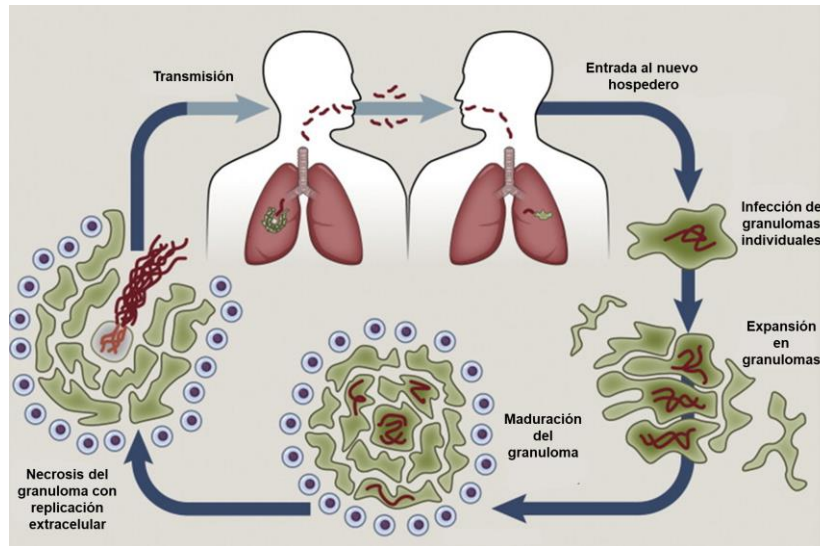


Figura 1.2. Ciclo de infección por *M. tuberculosis* (modificado de Cambier *et al.*, 2014).

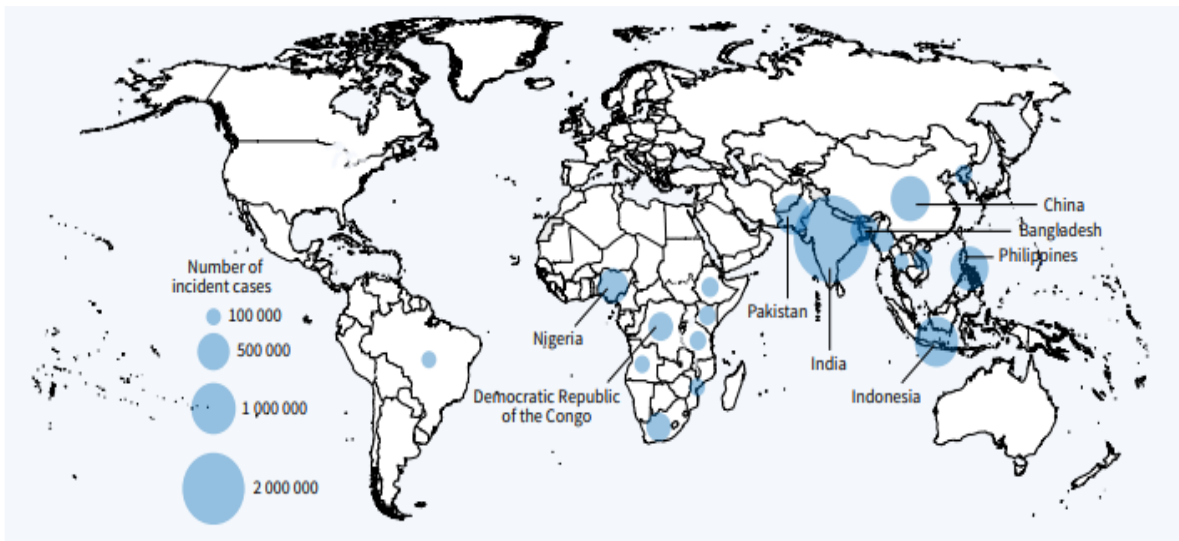


Figura 1.3. Países con mayor número de incidencias de TB a nivel mundial (Reporte Global de la Tuberculosis, 2022).

Hasta el último reporte del Boletín Epidemiológico Nacional (Semana 52), en México se han documentado 21,419 nuevos casos de TB en todas sus formas. Actualmente son siete las entidades federativas que concentran los mayores registros de TB en todo el país, donde el 57.8% de los casos se distribuyen en los estados de Baja California (2,528), Veracruz (2,407), Nuevo León (1,874), Chiapas (1,586), Tamaulipas (1,367), Sinaloa (1,332) y Sonora (1,293). Por otro lado, en el estado de Yucatán se reporta un total de 357 nuevos casos (307 de TB pulmonar y 50 casos de TB extrapulmonar) (SINAVE, 2022).

En la actualidad, el tratamiento de la TB se basa en la administración combinada de fármacos que, de acuerdo a su eficacia, uso y seguridad, se clasifican en fármacos de primera, segunda y tercera líneas, este último grupo es también denominado de eficacia limitada (OMS, 2021; Brown Jr. *et al.*, 2016, 2016; D'Ambrosio *et al.*, 2015). Los fármacos de primera línea (Figura 1.4) son los de máxima eficacia para el tratamiento de la TB en su forma sensible; por más de 50 años se ha utilizado una terapia combinada de isoniazida y rifampicina, principalmente, por su alta eficacia para el tratamiento primario de la enfermedad y por los efectos adversos leves en los pacientes. Dentro de este grupo de fármacos se incluyen también el etambutol, la estreptomina y la pirazinamida (D'Ambrosio *et al.*, 2015; Guzman *et al.*, 2013; Rivers y Mancera, 2008; Lozano, 2002).

Aun cuando tanto la isoniazida como la rifampicina son bactericidas, sus mecanismos de acción son completamente diferentes. La isoniazida es un pro-fármaco que se activa mediante una enzima catalasa-peroxidasa de *M. tuberculosis* formando un radical isonicotínico. Este radical se une al cofactor NAD⁺ bloqueando la biosíntesis de ácido micólico y, por ende, provoca la muerte celular de la micobacteria (Mishra *et al.*, 2017; Vilcheze y Jacobs, 2007). Por otra parte, la rifampicina inhibe la transcripción del ARN, por unión a la unidad beta del ARN polimerasa (Mishra *et al.*, 2017; Kolyva y Karakousi, 2012). El etambutol y la estreptomina también actúan sobre la pared celular de *M. tuberculosis*, inhibiendo la biosíntesis de arabinogalactano y polipéptidos, respectivamente (Guzman *et al.*, 2013).

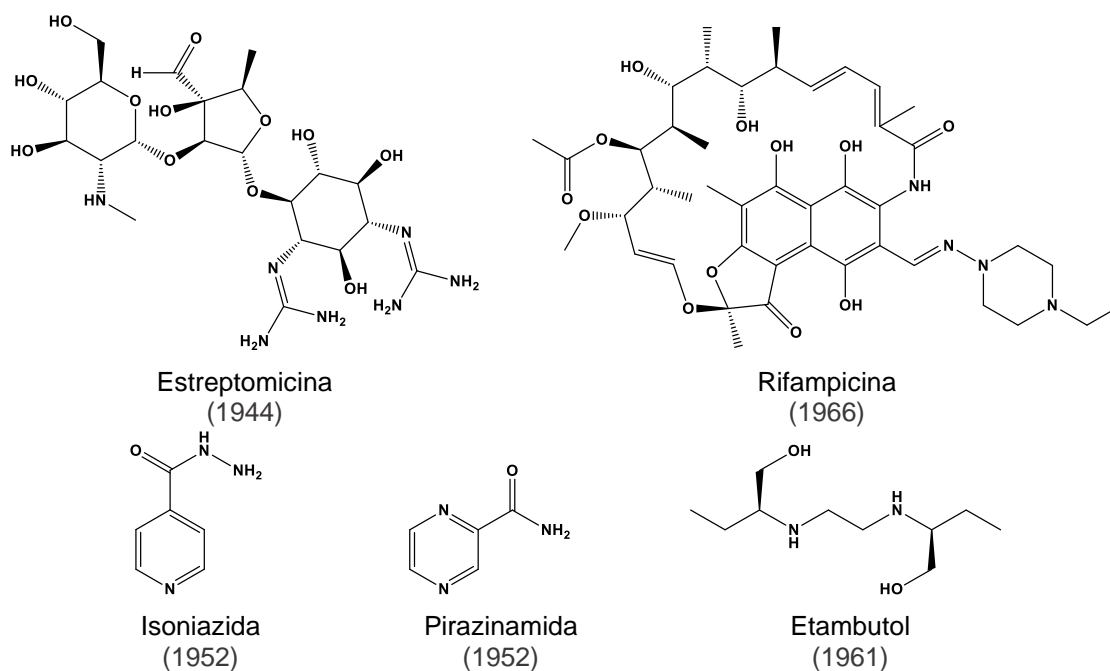


Figura 1.4. Estructuras químicas de los fármacos de primera línea empleados para el tratamiento de la TB y año de introducción.

El segundo grupo de fármacos para el tratamiento de la TB son los de segunda línea. Aunque su eficacia es menor comparado con los de primera línea y propician la aparición de más efectos adversos, su administración es principalmente para el tratamiento de la TB multirresistente (TB-MDR). Esta forma resistente de bacterias no responde al tratamiento con los fármacos más potentes isoniazida y rifampicina (OMS, 2021; Lozano, 2002). En este grupo de segunda línea se encuentran los inyectables aminoglucósidos (p. ej. amikacina y kanamicina) y los polipéptidos (p. ej. capreomicina y viomicina) (Figura 1.5), fluoroquinolonas (p. ej. ciprofloxacina, gatifloxacina, levofloxacina, moxifloxacina y ofloxacina) (Figura 1.6) y bacteriostáticos orales, entre ellos el ácido *p*-aminosalicílico, cicloserina, terizidona y tioamidas (p. ej. etionamida y protionamida) (Figura 1.7) (Brown Jr. *et al.*, 2016; D'Ambrosio *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2007).

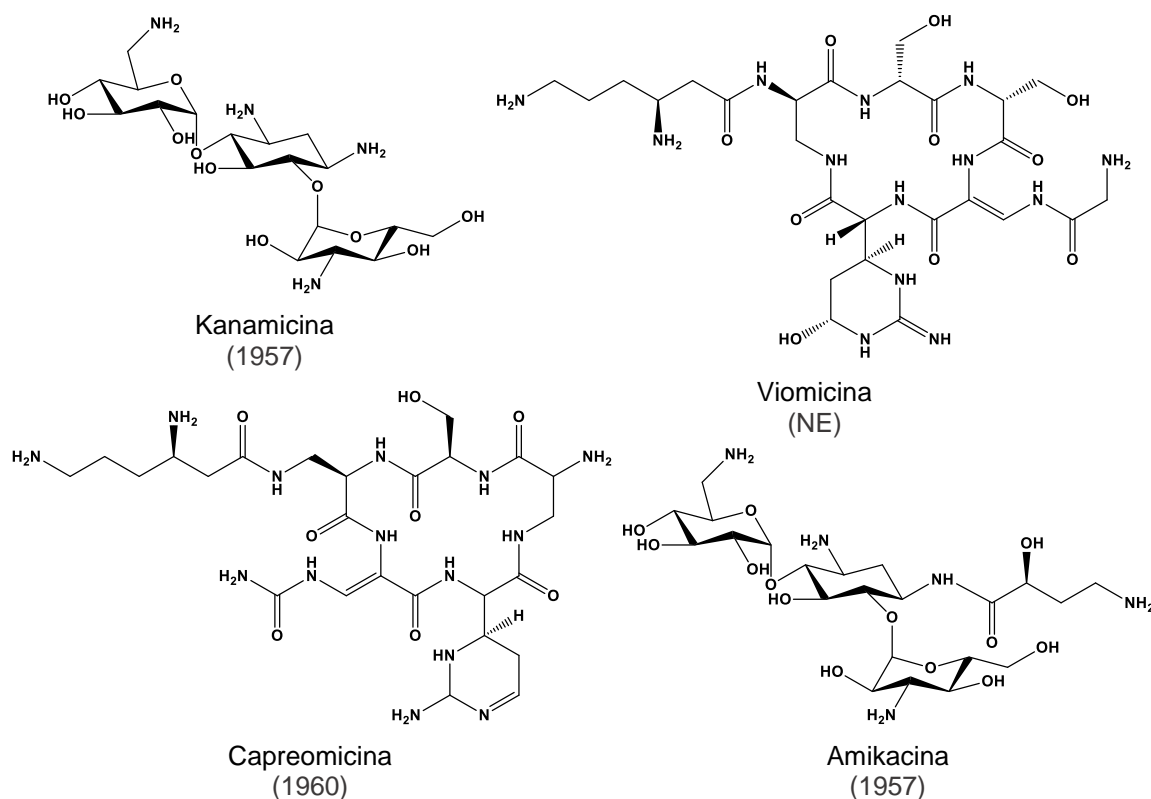


Figura 1.5. Estructuras químicas de los fármacos inyectables de segunda línea utilizados para el tratamiento de la TB y el año de su introducción (NE = dato no encontrado).

Los sitios de acción de los fármacos de segunda línea son variados. Los inyectables amikacina, kanamicina y capreomicina inhiben la síntesis de proteínas mediante la modificación de estructuras ribosomales en *M. tuberculosis*. Las fluoroquinolonas tienen un gran potencial antibacteriano, bloquean la replicación y transcripción de ADN. Las tioamidas y la cicloserina son fármacos que actúan sobre la pared celular de la micobacteria, las primeras inhiben la formación del ácido micólico y la segunda impide la síntesis de peptidoglicano (Guzmán *et al.*, 2013; Kolyva y Karakousi, 2012).

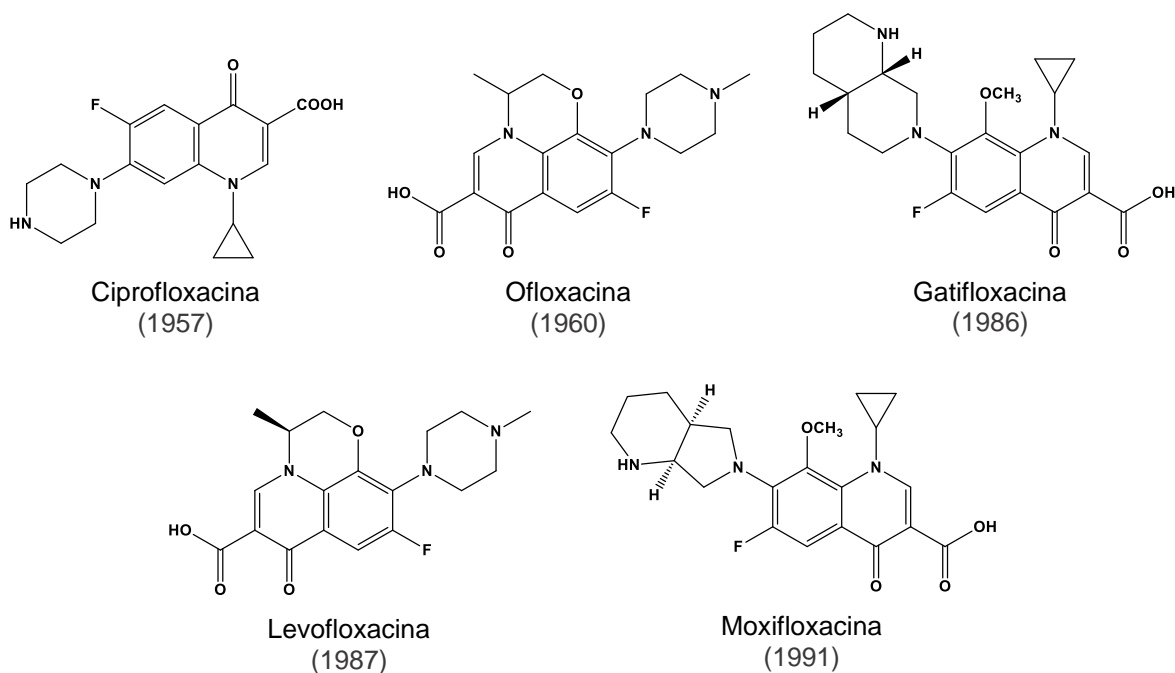


Figura 1.6. Estructuras químicas de los fármacos fluoroquinolonas de segunda línea utilizados para el tratamiento de la TB y el año de su introducción (NE = dato no encontrado).

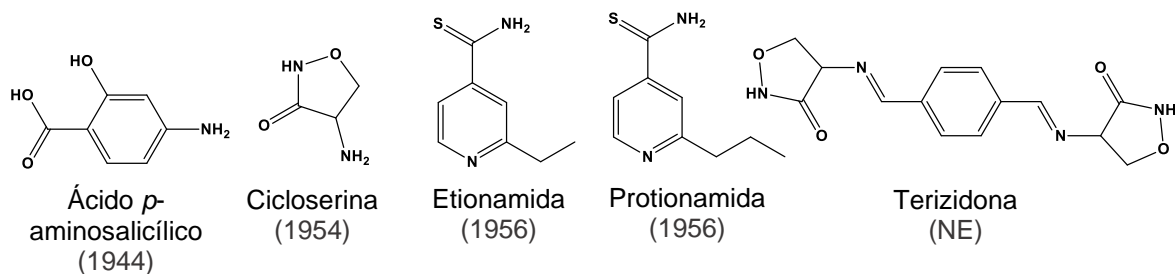


Figura 1.7. Estructuras químicas de los fármacos bacteriostáticos orales de segunda línea utilizados para el tratamiento de la TB y el año de su introducción (NE = dato no encontrado).

Por último, los fármacos de tercera línea son empleados para el tratamiento de las formas resistentes de la TB, tanto para la TB-MDR como para la TB-XDR; esta resistencia aparece cuando *M. tuberculosis* no responde al tratamiento con los fármacos de primera línea más eficaces (isoniazida y rifampicina), más una quinolona y uno de los inyectables

de segunda línea (OMS, 2021; Seung *et al.*, 2015). Algunos de los medicamentos de tercera línea empleados para el tratamiento de la TB presentan un mayor número de reacciones adversas, la evidencia en cuanto a su eficacia es escasa o no comprobable.

Asimismo, el costo del tratamiento con estos fármacos puede ser elevado y tardío (Mishra *et al.*, 2017). Este grupo incluye a la bedaquilina, considerado el último fármaco antituberculoso aprobado por la FDA en 2014; esta diarilquinolona tiene una gran selectividad e inhibe la síntesis de ATP en la replicación (Seung *et al.*, 2015; Guzmán *et al.*, 2013; Maxmen, 2013). Además de la bedaquilina, se incluyen dentro de este grupo (Figura 1.8) a la delamanida, clofazimina, linezolida, clavulanato y meropenem (D'Ambrosio *et al.*, 2015).

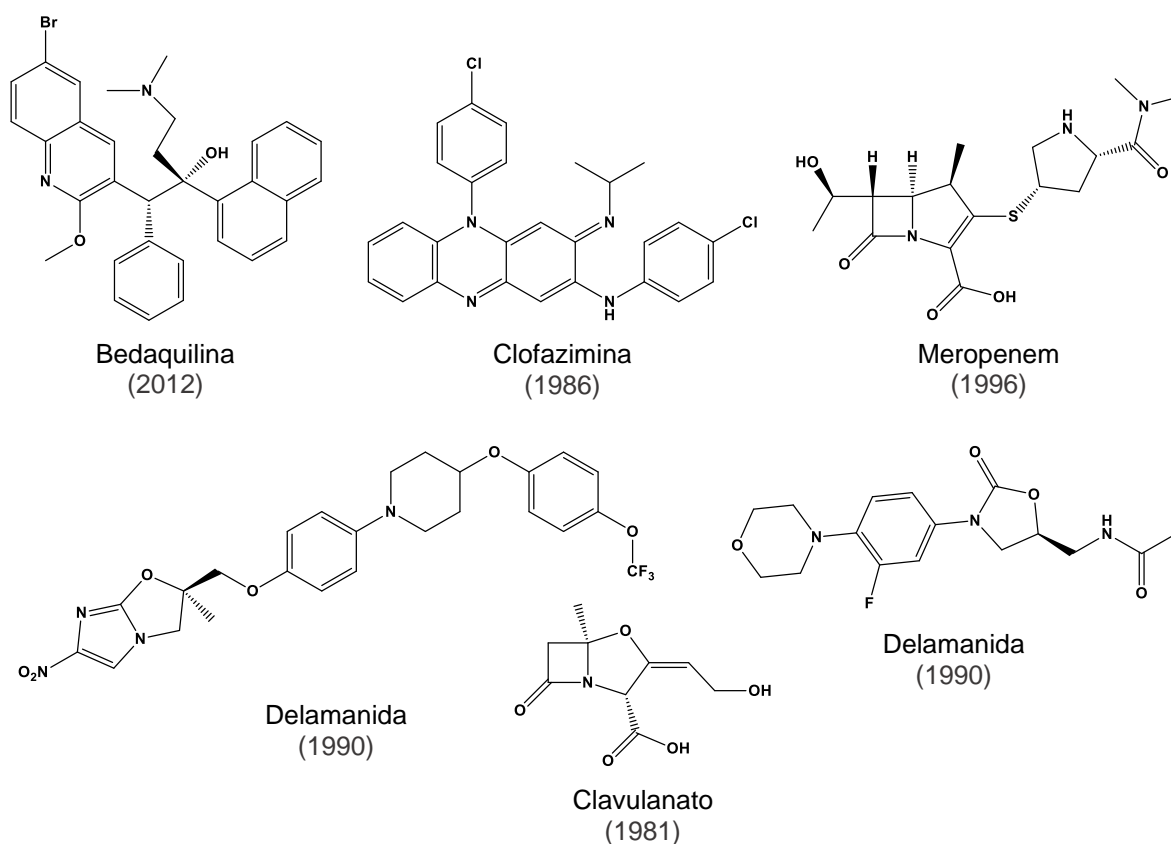


Figura 1.8. Estructuras químicas de los fármacos de tercera línea empleados para el tratamiento de la TB y año de introducción.

A pesar de que existe un número considerable de medicamentos para el tratamiento de la TB con sitios de acción variados, las formas resistentes de *M. tuberculosis* (TB-MDR y TB-XDR) limitan cada vez más la eficacia de los fármacos, aumentan el tiempo del tratamiento e incrementan los efectos adversos (p. ej. insuficiencia renal, problemas gastrointestinales, fotosensibilidad) (Seung *et al.*, 2015) (Figura 1.9). Recientemente se plantea la aparición de una forma más agresiva de resistencia, denominada TB de resistencia total (TB-DRT) hacia todos los medicamentos antituberculosos (Hoagland *et al.*, 2016; Klopper *et al.*, 2013).

Actualmente, se han descrito los tipos de mecanismos de resistencia que presenta *M. tuberculosis* hacia algunos de los fármacos utilizados para tratar la enfermedad y que son la base para el diseño de nuevos compuestos (Figura 1.10) (Singh *et al.*, 2019). Entre estos tipos de resistencia se puede destacar la impermeabilidad de la envoltura celular; como se ha mencionado anteriormente, su característica hidrofóbica juega un papel importante en la resistencia hacia algunos fármacos. Algunos fármacos como la rifampicina, la ciprofloxacina y la ofloxacina presentan cierta dificultad para atravesar la pared celular, incluso algunos productos con carácter hidrofóbico presentan esta particularidad (Houghton *et al.*, 2013a; 2013b).

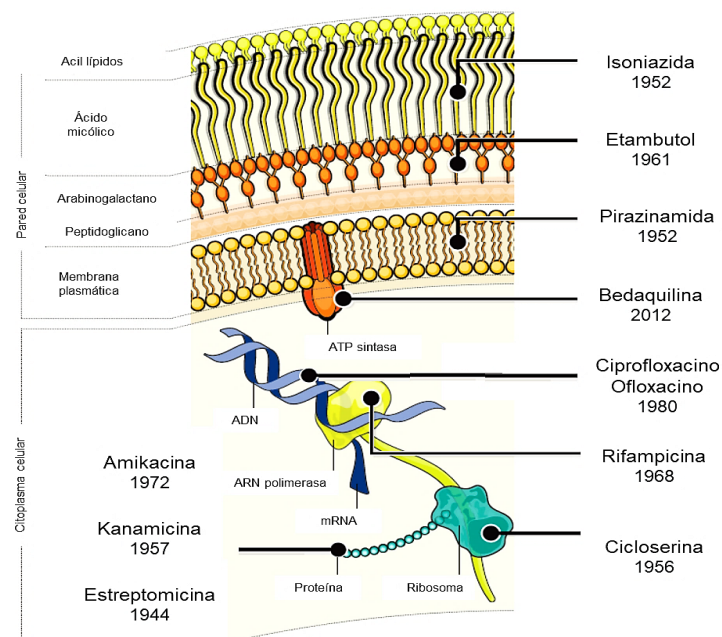


Figura 1.9. Sitios de acción de los fármacos anti-TB (modificado de Maxmen, 2013).

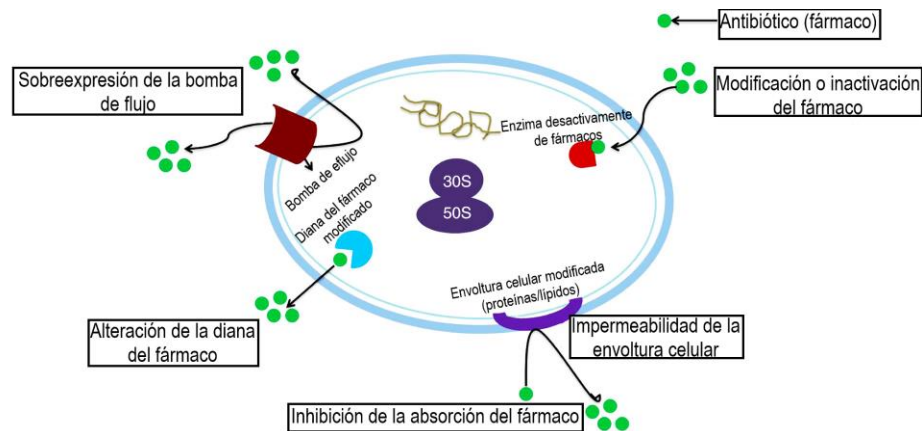


Figura 1.10. Mecanismos de resistencia desarrollados por *M. tuberculosis* (modificado de Singh *et al.*, 2019).

Otro mecanismo de resistencia importante a considerar es la modificación o inactivación del fármaco. Este mecanismo se debe a que *M. tuberculosis* posee un sistema enzimático que ha logrado modificar algunos productos, volviéndolos inactivos y, por lo tanto, evitando que actúen sobre el sitio de acción. *M. tuberculosis* posee al menos dos enzimas muy importantes que han sido relacionadas con la modificación de algunos productos, p. ej. la enzima acetiltransferasa (Eis) que permite la introducción de grupos acetilo en los fármacos capreomicina, kanamicina y amikacina, evitando que actúen sobre la diana a la cual están destinados (Houghton *et al.*, 2013a). Asimismo, la enzima β -lactamasa permite la hidrólisis del anillo β -lactámico de los productos como el ácido clavulánico y meropenem produciendo su ruptura e inactivando el fármaco (Figura 1.11) (Houghton *et al.*, 2013b).

Por lo anterior, en años recientes se ha propuesto la búsqueda exhaustiva de nuevos productos con potencial actividad antituberculosa, con diferentes mecanismos de acción, rápido efecto bactericida y menos efectos adversos (Hoagland *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que algunos productos naturales aislados de plantas, microorganismos y organismos marinos, han servido como fuente para la formulación de diversos medicamentos para el tratamiento y prevención de una gran cantidad de enfermedades (Kumar *et al.*, 2014; Chin *et al.*, 2006), los metabolitos secundarios continúan representando una fuente prometedora para el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos (Pandey y Doerksen, 2016; Liu *et al.*, 2012).

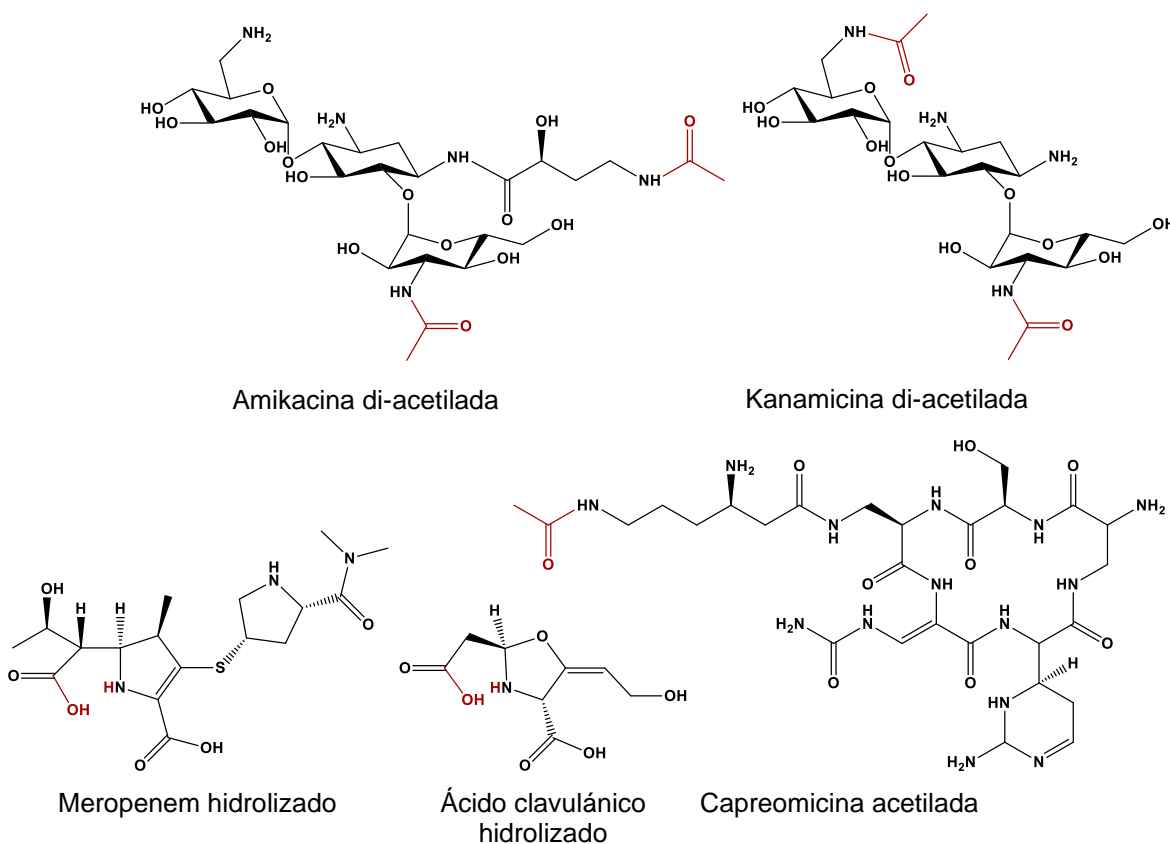


Figura 1.11. Modificación de fármacos para el tratamiento de la tuberculosis mediante la acción de las enzimas *Eis* y β -lactamasa (en rojo se indican las modificaciones de cada producto).

1.2. PRODUCTOS NATURALES COMO FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

Los productos naturales desempeñan un papel muy importante para el tratamiento y prevención de un gran número de enfermedades y han servido como base para el diseño de nuevos fármacos. Se han obtenido principalmente de plantas, microorganismos y organismos marinos (Kumar *et al.*, 2014; Mishra y Tiwari, 2011). Algunos productos naturales poseen estructuras químicas novedosas y muy complejas. Asimismo, su importancia en la industria farmacéutica es de gran importancia debido a su gran eficacia para el tratamiento de diversas enfermedades y como modelo para la obtención de nuevos fármacos por métodos semisintéticos (Shen, 2015; Liu *et al.*, 2012; Chin *et al.*, 2006).

Se ha reportado que aproximadamente el 6.1% de los fármacos aprobados hasta 2019 son productos naturales y se emplean para el tratamiento de enfermedades como mal de Parkinson (p. ej. apomorfina), las causadas por bacterias (p. ej. penicilina) y parásitos (p. ej. ivermectina), así como para el tratamiento del cáncer (p. ej. doxorubicina). Por otra parte, mientras que el porcentaje de los derivados de productos naturales como fármacos es mayor (42.3%), su uso es aún más variado ya que se emplean para el tratamiento de procesos inflamatorios (p. ej. aspirina), para aliviar la malaria (p. ej. arteether), contra infecciones bacterianas (p. ej. biapenem) y virales (p. ej. zanamivir) y para el tratamiento del cáncer (p. ej. cabazitaxel) (Figura 1.12) (Newman y Cragg, 2019; Dias *et al.*, 2012).

Entre los productos naturales utilizados para el tratamiento de la TB se encuentran la estreptomina, el fármaco de primera línea usado por más de 60 años para combatir la TB, los fármacos de segunda línea capreomicina, kanamicina y cicloserina, y el fármaco de tercera línea clavulanato (Guzman *et al.*, 2013). Asimismo, entre los derivados de productos naturales actualmente administrados para combatir la TB se encuentra la rifampicina, el fármaco de primera línea de mayor eficacia, en tanto que del grupo de segunda línea destaca la amikacina y de la tercera línea el meropenem (Figura 1.13) (Guzman *et al.*, 2013).

Actualmente, tres derivados del grupo de las rifamicinas (rifabutina, rifapentina y rifalazil), al que pertenece la rifampicina (Figura 1.14), continúan en fases clínicas para su aprobación como medicamentos para el tratamiento de la TB sensible (OMS, 2021; Rivers y Mancera, 2008). Con lo anterior, se demuestra que los productos naturales y sus derivados continúan siendo una alternativa importante para la búsqueda de nuevos fármacos (Pandey y Doerksen, 2016).

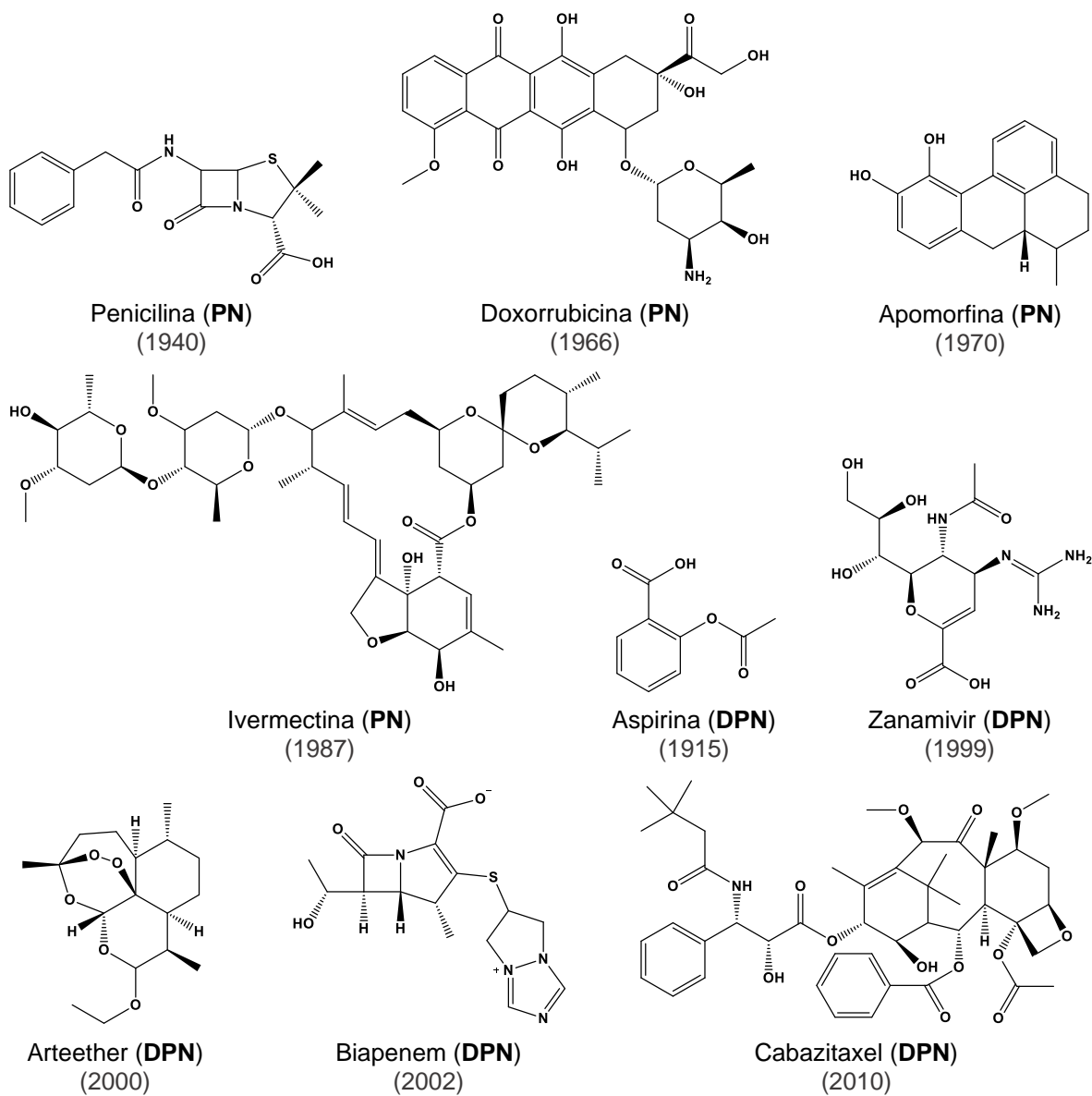


Figura 1.12. Año de introducción de productos naturales (PN) y derivados de productos naturales (DPN) que se utilizan como fármacos.

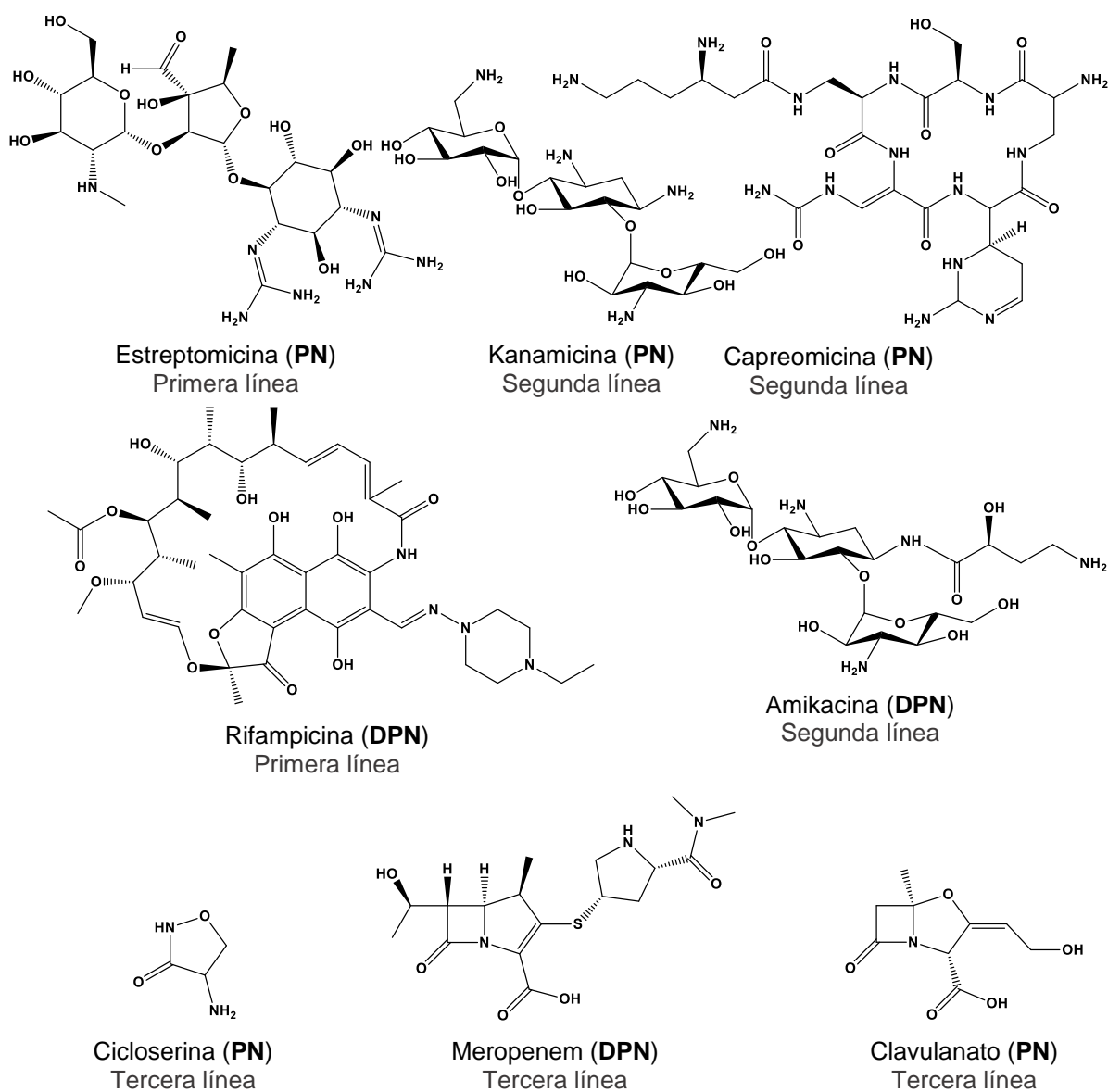


Figura 1.13. Productos naturales y derivados de productos naturales utilizados como fármacos para el tratamiento de la TB.

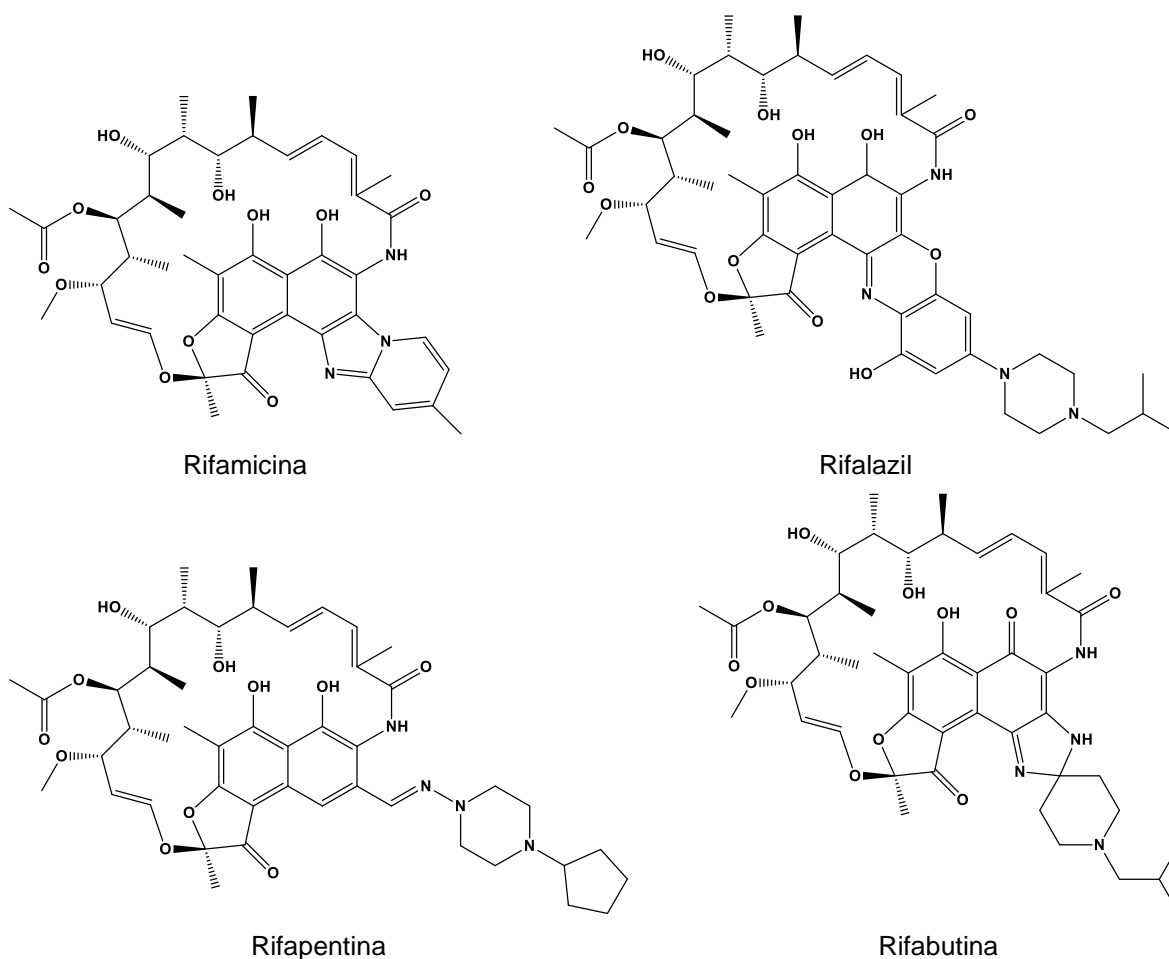


Figura 1.14. Estructuras químicas de las rifamicinas en estudio como posibles fármacos para el tratamiento de la TB.

Dependiendo de la ruta biosintética para su formación, los productos naturales se agrupan en policétidos (ruta del acetato), productos fenólicos (ruta del ácido shikímico), terpenoides (ruta del mevalonato o metileritritol fosfato) y alcaloides (ruta derivada de los aminoácidos) (Dewick, 2009). De estas cuatro familias químicas se reportan a los alcaloides sarmentina (Avilés y Rodríguez, 2010) y monamphiletina (Tuntiwachwuttikul *et al.*, 2006), los compuestos fenólicos beilschmina D (Chen *et al.*, 2007) y pinocembrina (Songsiang *et al.*, 2009), los policétidos chaetoviridina E (Phonkerd *et al.*, 2008) y howiinina A (Lekphrom *et al.*, 2009), y los terpenoides ramiferina (Bunyapaiboonsri *et al.*, 2008) y ácido pimárico (Lekphrom *et al.*, 2010) (Figura 1.15), como productos naturales con actividad contra *M. tuberculosis* (García *et al.*, 2012).

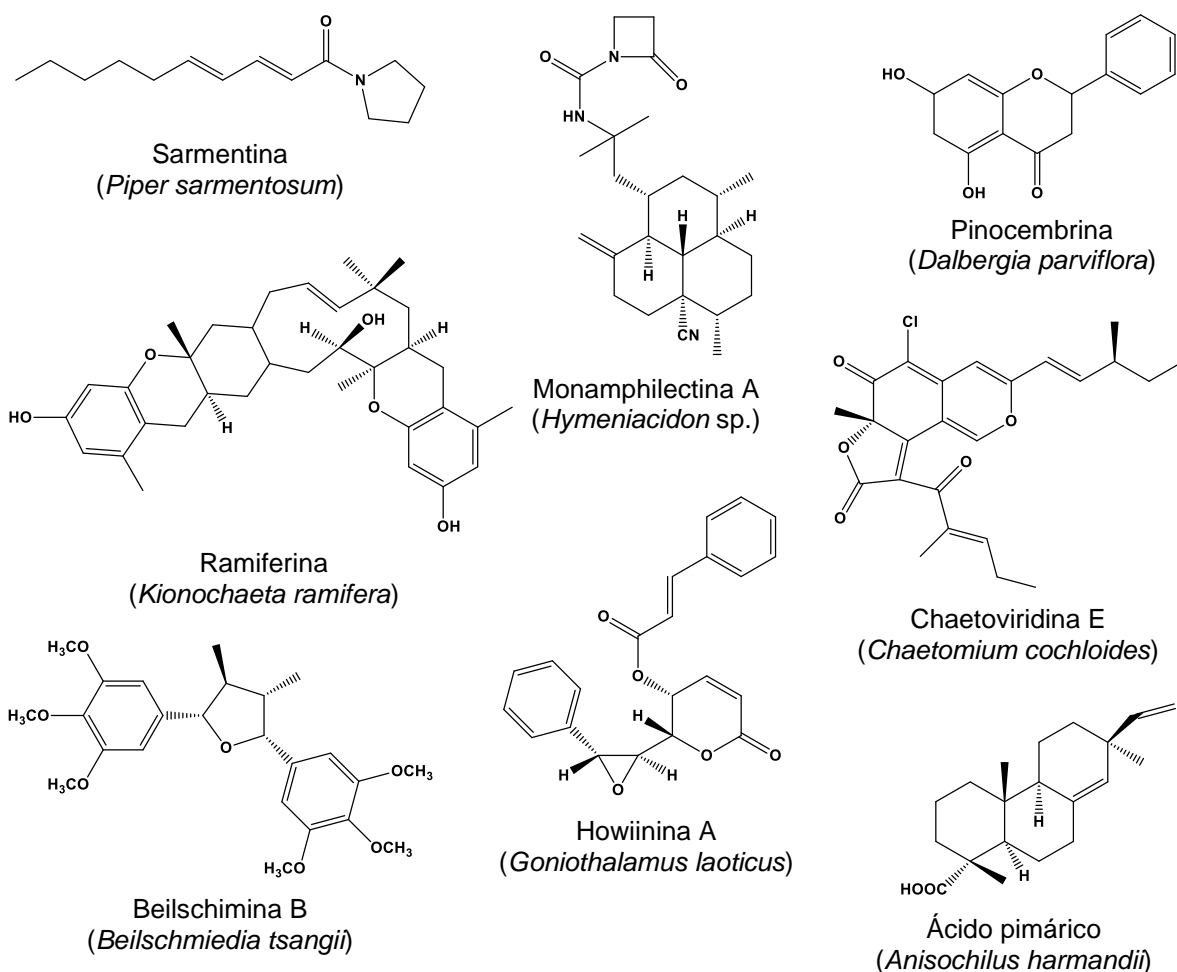


Figura 1.15. Productos naturales activos contra *M. tuberculosis*.

Entre los productos naturales, los terpenoides constituyen una de las familias más importantes dado que son los más abundantes en la naturaleza y han sido aislados de fuentes como plantas, animales, microorganismos, insectos y organismos marinos. Se les atribuyen diferentes propiedades biológicas con fines terapéuticos y medicinales (Perveen, 2018; Wang *et al.*, 2005), por lo que continúan siendo una fuente importante para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la TB (Sansinenea y Ortiz, 2014).

Los monoterpenoides (C_{10}) citronellol y geraniol (Cantrell, 1998; Rajab *et al.*, 1998); los sesquiterpenoides (C_{15}) germacreno y centratherina (Vongvanich *et al.*, 2006); los

diterpenoides (C₂₀) azorellanol y ácido mulin-11,13-dien-20-oico (Molina-Salinas *et al.*, 2010a); los sesterterpenoides (C₂₅) scytoscalarol y heteronemina (Mo *et al.*, 2009; Wonganuchitmeta *et al.*, 2004); y los triterpenoides (C₃₀) como la zeorina y el ácido boniánico B (Truong *et al.*, 2011; Wachter *et al.*, 1999) (Figura 1.16), son ejemplos de terpenoides que han demostrado actividad contra cepas sensibles y, en algunos casos, resistentes de *M. tuberculosis*.

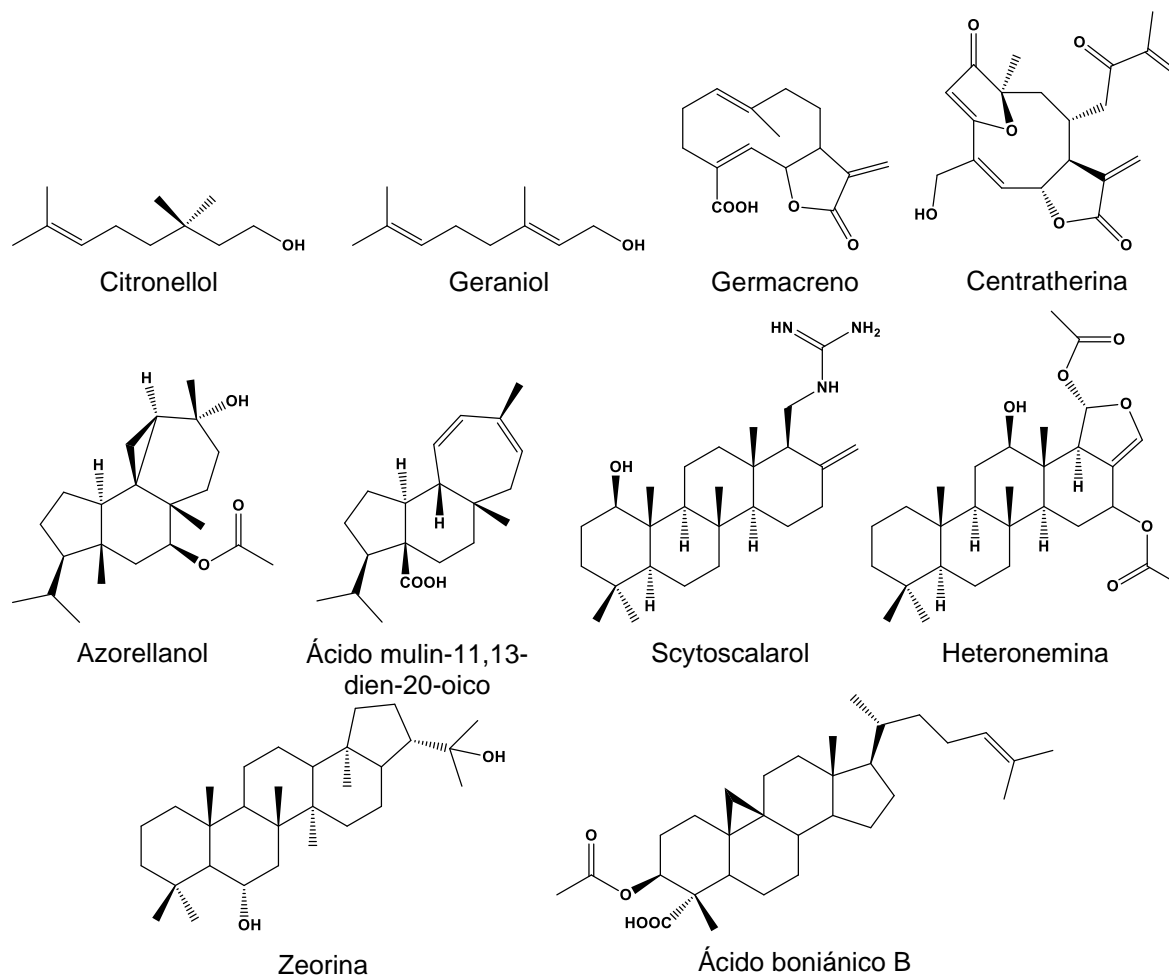


Figura 1.16. Estructuras químicas de los terpenoides con actividad anti-TB.

De forma particular, los diterpenoides de esqueleto azorellano y mulinano (Figura 1.17) son un grupo único de metabolitos secundarios producidos por plantas de los géneros *Azorella*, *Bolax*, *Laretia* y *Mulinum*, pertenecientes a la familia Apiaceae (Liu *et al.*, 2017;

Molina-Salinas *et al.*, 2010b). Los diterpenoides de tipo azorellano se caracterizan por tener un biciclo [4.1.0] heptano, principal diferencia con respecto al diterpenoide de tipo mulinano, además de tener un grupo oxigenado en C-13 y la ausencia de un grupo carboxilo en C-20. En tanto que, los diterpenoides de tipo mulinano se caracterizan por la presencia de 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, además de poseer grupos oxigenados (Marcos *et al.*, 2016).

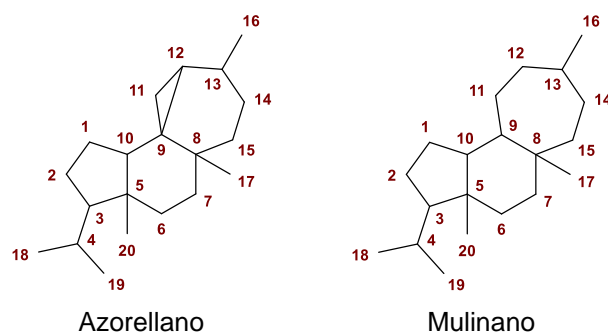


Figura 1.17. Esqueleto de los diterpenoides mulinano y azorellano.

Además de la actividad antituberculosa (Molina-Salinas *et al.*, 2010a) los diterpenoides tipo mulinano y azorellano han demostrado propiedades biológicas como analgésica (Delporte *et al.*, 2013), antibacteriana (Wächter *et al.*, 1998), antihiperglicémica (Fuentes *et al.*, 2005), antiinflamatoria (Delporte *et al.*, 2013), antiprotozoaria (Neira *et al.*, 1998), 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).

Recientemente se reportó el potencial antituberculoso de diterpenoides tipo mulinano y azorellano en ensayos *in vitro* contra cepas sensibles (ATCC 27294 H37Rv) y resistentes (CIBIN/UMF 15:99) de *M. tuberculosis* (Molina-Salinas *et al.*, 2010a). Los resultados mostraron que los diterpenoides de tipo azorellano tiene una mayor actividad antituberculosa en comparación con los de tipo mulinano, siendo el azorellanol, el 17-acetoxi-13 α -hidroxiazorellano, el 13 β -hidroxiazorellano, la azorellanona y el mulinol, los

diterpenoides con mayor actividad antituberculosa (Figura 1.18) (Molina-Salinas *et al.*, 2010a).

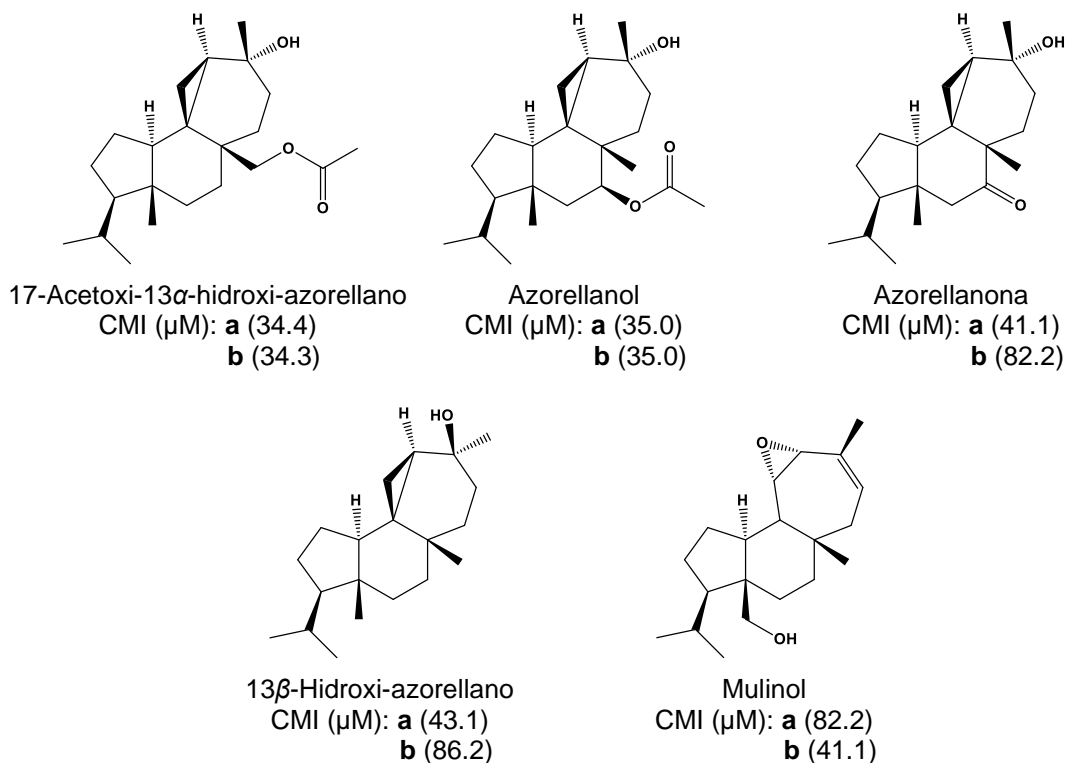


Figura 1.18. Actividad anti-TB de diterpenoides tipo mulinano y azorellano contra dos cepas de *M. tuberculosis*: **a.** *M. tuberculosis* sensible (ATCC 27294). **b.** *M. tuberculosis* resistente (CIBIN/UMF15:99).

De forma similar, se reportó la preparación de diferentes derivados semisintéticos de algunos diterpenoides tipo mulinano y azorellano, usando reacciones de alquilación, deshidratación, oxidación, reducción e hidrogenación (Molina-Salinas *et al.*, 2010b; 2010c). Los resultados obtenidos indicaron que los derivados alquilados (ésteres metílicos, etílicos, propílicos y butílicos) de los diterpenoides mulinano, principalmente, mostraron un incremento del potencial antituberculoso en comparación con su diterpenoide natural, de los cuales destacan el éster metílico del ácido 13 α -hidroximulin-11-en-20-oico y el éster metílico del ácido mulinénico, por su alta actividad contra la cepa sensible de *M. tuberculosis* (Molina-Salinas *et al.*, 2010b). Por otro lado, el éster n-propílico del ácido 13 α -hidroximulin-11-en-20-oico, el éster n-propílico del ácido

isomulínico y el éster butílico del ácido isomulínico (Figura 1.19) mostraron la mayor actividad antituberculosa frente a la cepa resistente de *M. tuberculosis* (Molina-Salinas *et al.*, 2010c).

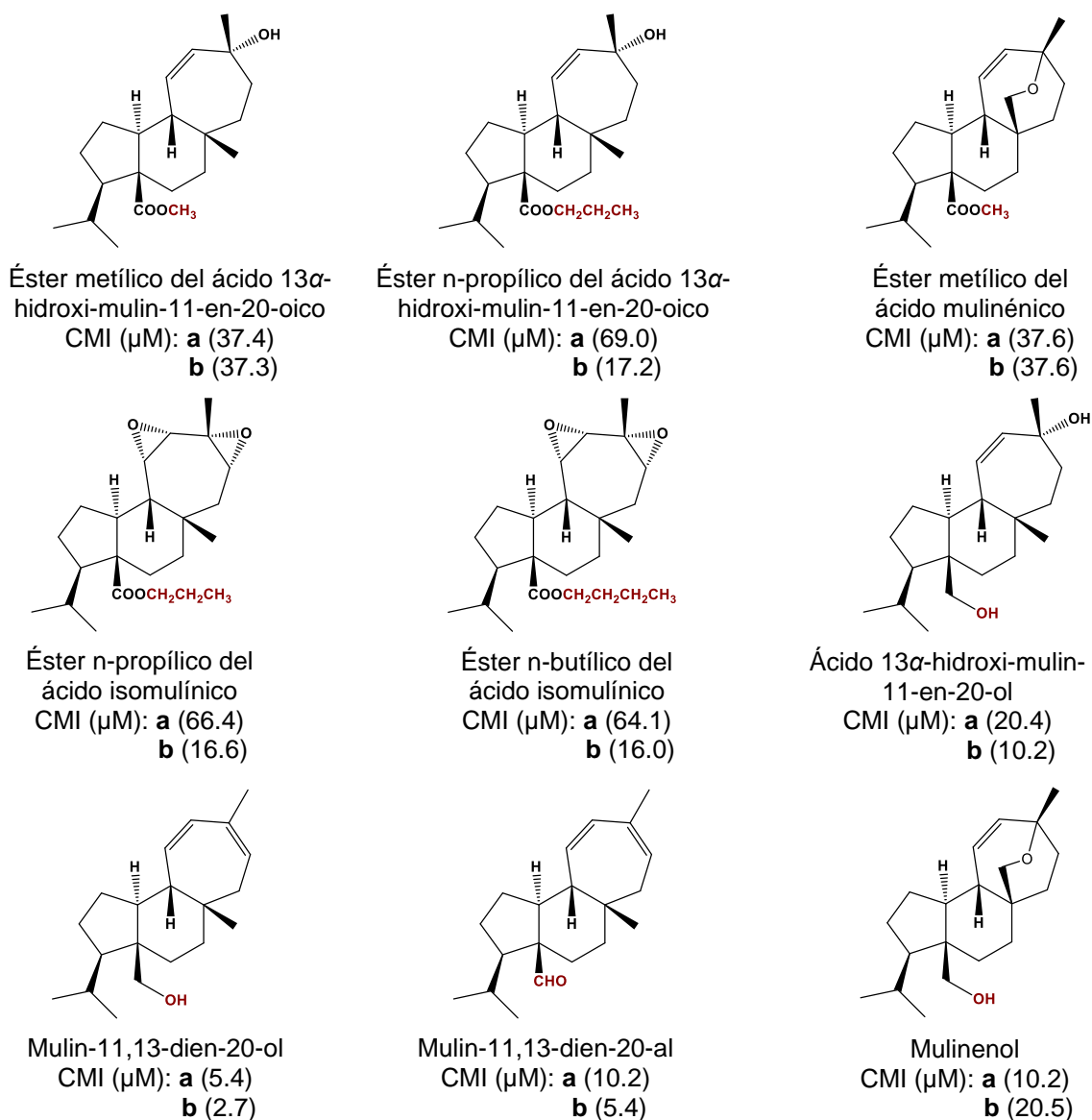


Figura 1.19. Actividad anti-TB de derivados semisintéticos de diterpenoides tipo mulinano contra dos cepas de *M. tuberculosis*: **a.** *M. tuberculosis* sensible (ATCC 27294). **b.** *M. tuberculosis* resistente (CIBIN/UMF15:99) (en rojo se indican las modificaciones de cada producto).

La transformación química a partir de los ésteres metílicos del ácido mulin-11,13-dien-20-oico, ácido 13 α -hidroximulin-11-en-20-oico y ácido mulinénico dio como resultado la formación de nuevos grupos funcionales en C-20 (acetato, aldehído y alcohol). La evaluación del potencial antituberculoso del nuevo grupo de derivados de diterpenoides tipo mulinano mostró que el ácido mulin-11,13-dien-20-ol, ácido mulin-11,13-dien-20-al, ácido 13 α -hidroxi-mulin-11-en-20-ol y mulinenol (Figura 1.19) fueron los más activos contra cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis*, mostrando concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 2.0-20 μ M, valores menores que el de los derivados alquilados. Con lo anterior se ha demostrado que el papel de los grupos funcionales y la posición en la que éstos se encuentran son de gran importancia con relación al efecto antituberculoso tanto contra cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis* (Martínez, 2017).

Gran parte de los derivados de diterpenoides tipo mulinano han sido obtenidos mediante la modificación del grupo carboxilo por ser el grupo funcional de mayor susceptibilidad a la transformación química. Se han reportado reacciones de esterificación, oxidación y reducción en el C-20. Asimismo, se ha intentado obtener derivados nitrogenados, mediante la formación de amidas, aminas e iminas a partir del ácido carboxílico de los diterpenoides tipo mulinano; sin embargo, no ha sido posible su obtención debido a la baja electrofilicidad del grupo carbonilo en C-20, siendo una limitante para la obtención de nuevos derivados por métodos químicos, además del escaso número de grupos funcionales en estos tipos de diterpenoides (Martínez, 2017). Una alternativa para la obtención de nuevos derivados de productos naturales es la biotransformación, dado que algunos microorganismos y enzimas purificadas han mostrado la capacidad de realizar modificaciones en sitios de las moléculas donde no es posible realizar una transformación por métodos químicos (Patel, 2018; Woodley, 2008; Pollard y Woodley, 2006).

1.3. BIOTRANSFORMACIÓN

La biotransformación, transformación biocatalítica o transformación microbiana, es la modificación de un sustrato a un producto, mediante el uso de células o enzimas aisladas de organismos vivos (Hegazy *et al.*, 2015; Pervaiz *et al.*, 2013). Sin embargo, la

modificación de sustratos de diferente naturaleza se lleva a cabo mayormente utilizando hongos y bacterias. El uso de células microbianas se debe, en primera instancia, a su capacidad de adaptación a los cambios generados en su medio ambiente y a su producción de una gran variedad de enzimas en corto tiempo (Smitha *et al.*, 2017; De Carvalho y Da Fonseca, 2006).

La biotransformación como estrategia alterna o como complemento de la síntesis química tiene varias ventajas; el proceso se desarrolla en condiciones suaves, ya que se realiza a pH neutro, a temperatura ambiente y presión atmosférica, y las condiciones de esterilidad son de fácil manipulación. En algunos casos, el uso de microorganismos para la modificación de sustratos resulta de bajo costo comparado con el uso de métodos químicos (Smitha *et al.*, 2017; Gopishetty *et al.*, 2012). Sin embargo, la ventaja más importante de la biotransformación sobre los métodos químicos está dada por los diferentes tipos de reacciones que realizan los microorganismos para funcionalizar estereo o regio específicamente posiciones en los sustratos que, por métodos químicos, a menudo implica varias reacciones químicas (p. ej. protección y desprotección de grupos funcionales) y económicamente no resulta viable (Mutafova *et al.*, 2016; Hegazy *et al.*, 2015; Gopyshetty *et al.*, 2012). Las reacciones más comúnmente realizadas por microorganismos son las de oxidación, reducción, hidrólisis, isomerización y formación de nuevos enlaces, principalmente (Smitha *et al.*, 2017; Birolli *et al.*, 2015). Estas modificaciones son catalizadas principalmente por las enzimas monooxigenasas del citocromo P450, como parte de la fase I de la biotransformación de xenobióticos, incorporando grupos funcionales que brindan un ligero aumento en la polaridad de los sustratos (p. ej. grupos hidroxilo, amino, ácido carboxílico) (Huarte-Bonnet *et al.*, 2017; Bianchini *et al.*, 2015). Asimismo, algunos de los productos de biotransformación de la fase I, continúan siendo modificados en la fase II de la modificación de xenobióticos. En esta segunda fase los microorganismos realizan reacciones de acetilación, metilación y sulfonación. Estos grupos funcionales permiten la incorporación de metabolitos endógenos (p. ej. ácido glucorónico y glutatión), reduciendo la toxicidad de los xenobióticos y facilitando su excreción (Beiras, 2018). Lo anterior, indica que la biotransformación representa una buena estrategia para el descubrimiento de nuevos fármacos a partir de productos naturales (Alfarra y Omar, 2013; Severiano *et al.*, 2013),

incluyendo alcaloides (Pervaiz *et al.*, 2013; Orabi *et al.*, 2000), productos fenólicos (Das y Rosazza, 2006; Torres y Torres y Rosazza, 2001) y terpenoides (Severiano *et al.*, 2013).

Actualmente, la biotransformación continúa siendo una estrategia empleada en la industria farmacéutica, ya sea para la obtención de fármacos o para la formación de intermediarios. Un ejemplo de lo anterior está dado por la obtención de la pravastatina, un medicamento empleado para el control de la hipercolesterolemia y problemas cardiovasculares, mediante la oxidación de la compactina por *Streptomyces carbophilus* (Figura 1.20) (Arroyo *et al.*, 2017; Watanabe *et al.*, 1995).

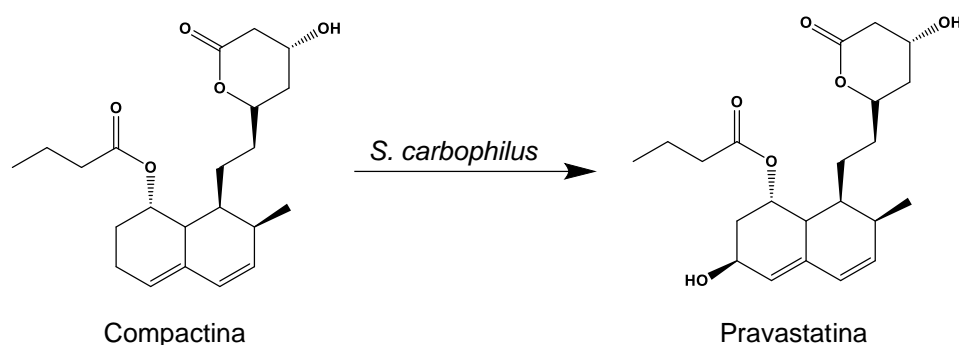


Figura 1.20. Biotransformación de compactina a pravastatina.

La formación de intermediarios utilizando procesos de biotransformación ha tomado gran importancia para la síntesis de un gran número de compuestos con potencial farmacéutico (Arroyo *et al.*, 2017), p. ej. la modificación del β -sitosterol por *Mycobacterium* sp., resulta en la producción de la androstenediona, intermediario importante para la síntesis por métodos químicos de anticonceptivos, corticoesteroides y compuestos para el tratamiento del cáncer (Figura 1.21) (Arroyo *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2001).

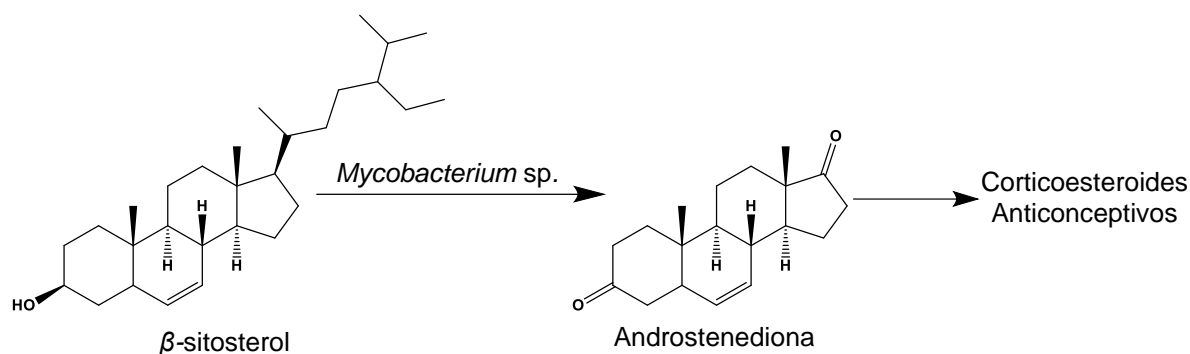


Figura 1.21. Biotransformación del β -sitosterol por *Mycobacterium* sp.

1.4. BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOIDES

A la fecha se ha reportado la biotransformación de toda clase de terpenoides (p. ej. monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, etc.) mediante el uso de enzimas, extractos celulares y células completas, cianobacterias, levaduras, microalgas, plantas, hongos y bacterias (Figura 1.22) (De Carvalho y Da Fonseca, 2006). A menudo este proceso se ha utilizado como estrategia para la obtención de derivados con diferentes actividades biológicas, incluyendo antibacteriana, antiinflamatoria, antituberculosa, antiviral, citotóxica, e insecticida, por mencionar algunas (Bhatti y Khera, 2014).

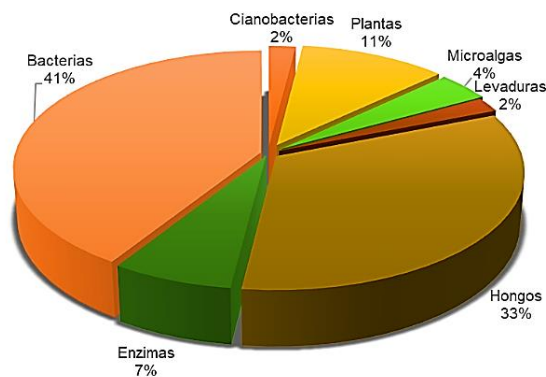


Figura 1.22. Organismos utilizados para la biotransformación (Bhatti y Khera, 2014).

Los géneros de bacterias más utilizados para la biotransformación de terpenoides son *Streptomyces* y *Nocardia* (Bhatti y Khera, 2014; Rico-Martínez *et al.*, 2014), en tanto que, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Gibberella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus*, son los géneros de hongos reportados con gran frecuencia para la transformación de esta familia de metabolitos secundarios (Rico-Martínez *et al.*, 2014; Parshicove y Sutherland, 2014).

En la biotransformación de terpenoides destaca una gran variedad de diterpenoides con esqueletos de 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), trachylobano (Fraga *et al.*, 2012) y mulinano (Figura 1.23) (Areche *et al.*, 2008).

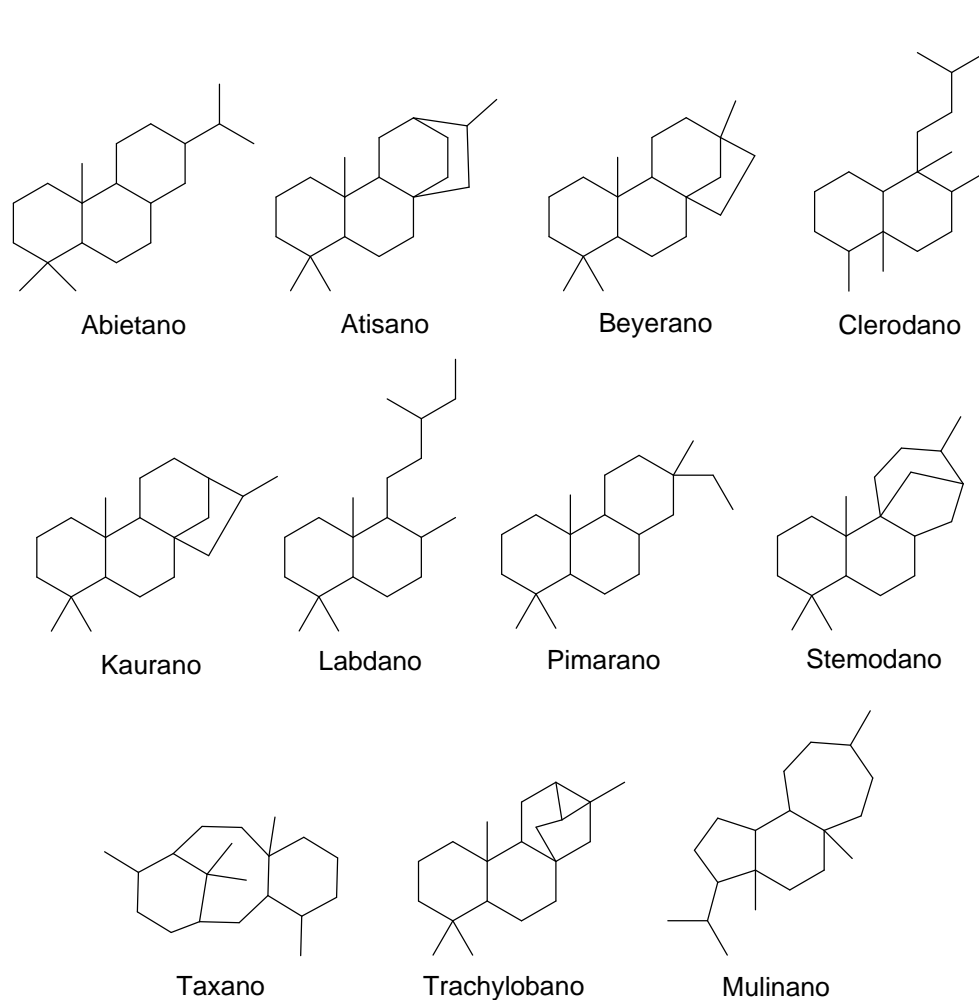


Figura 1.23. Esqueletos de diterpenoides modificado por biotransformación.

Hasta ahora, los reportes sobre la biotransformación de diterpenoides de esqueleto mulinano son limitados; mientras que el primer trabajo describió la modificación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico utilizando cultivos de *Mucor plumbeus* para obtener los derivados oxidados ácido 16-hidroximulin-11,13-dien-20-oico y ácido 7 α ,16-hidroximulin-11,13-dien-20-oico (Figura 1.24) (Areche *et al.*, 2008), en el segundo trabajo se evaluó la actividad gastroprotectora de los derivados que mostraron un incremento en la actividad (Sepúlveda *et al.*, 2016).

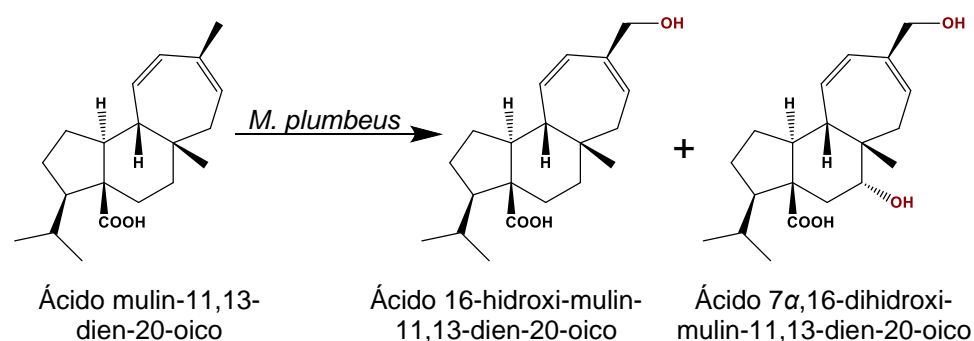


Figura 1.24. Productos de biotransformación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico por *M. plumbeus* (en rojo se indican las modificaciones).

Recientemente se reportó la transformación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico en cultivos de *Aspergillus alliaceus*, dando como resultado la obtención del ácido 16-hidroximulin-11,13-dien-20-oico, en tanto que la biotransformación del mismo diterpenoide en cultivos de *Mucor circinelloides* resultó en la obtención de dos derivados novedosos identificados como ácido mulin-11,13-dien-16,20-dioico y ácido 7 α ,13 β -dihidroxi-mulin-11-en-20-oico (Figura 1.25) (Herrera-Canché *et al.*, 2020).

Dado que la incorporación de nuevos grupos funcionales (OH y COOH) en el esqueleto mulinano representa una nueva oportunidad para la derivatización por semisíntesis química, el objetivo de este trabajo fue escalar la producción de los productos de biotransformación 16-hidroximulin-11,13-dien-20-oico, ácido mulin-11,13-dien-16,20-dioico y ácido 7 α ,13 β -dihidroxi-mulin-11-en-20-oico y preparar derivados semisintéticos de los principales sustratos para evaluar su potencial antituberculoso.

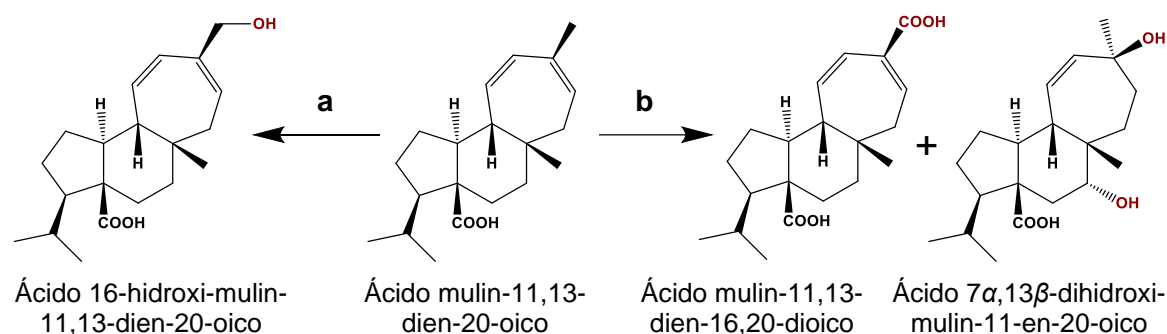


Figura 1.25. Productos de biotransformación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico en cultivos de *A. alliaceus* (a) y *M. circinelloides* (b) (en rojo se indican las modificaciones de cada producto).

1.5. JUSTIFICACIÓN

La TB continúa representando un problema de salud pública a nivel mundial. Los efectos adversos y la aparición de cepas resistentes hacia los fármacos administrados actualmente para el tratamiento de la TB sensible y resistente (MDR y XDR) dificultan su eficacia. Por lo tanto, actualmente se promueve la búsqueda de alternativas novedosas para la obtención de productos nuevos activos contra *M. tuberculosis*. En este sentido, los productos naturales han demostrado gran potencial antituberculoso. Dentro del grupo de terpenoides con actividad antituberculosa destacan los diterpenoides tipo mulinano y azorellano, tanto naturales como semisintéticos, que han mostrado actividad antituberculosa prometedora frente a cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis*. La obtención de moléculas novedosas a partir de la biotransformación de diterpenoides de tipo azorellano y mulinano, como resultado de la incorporación de nuevos grupos funcionales en el esqueleto hidrocarbonado, darán lugar a productos-cabezas de serie que permitirán la preparación de nuevos derivados semisintéticos.

1.6. HIPÓTESIS

La biotransformación y derivatización química de diterpenoides de tipo mulinano y azorellano permitirá la obtención de derivados con mayor actividad contra cepas susceptibles y resistentes de *M. tuberculosis*.

1.7. OBJETIVO GENERAL

Obtener, mediante biotransformación y derivatización química, nuevos diterpenoides tipo mulinano y azorellano con potencial antituberculoso.

1.8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Explorar el potencial de biotransformación de diterpenoides tipo mulinano y azorellano mediante el empleo de cultivos fúngicos y bacterianos.
2. Obtener cantidades suficientes de los diferentes productos de biotransformación para su identificación y su derivatización por métodos químicos.
3. Establecer estrategias para la derivatización química de diterpenoides tipo mulinano y azorellano.
4. Evaluar el potencial antituberculoso de los productos de biotransformación y de derivatización química.

1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo el proceso de biotransformación de los diterpenoides (sustratos) azorellanol (**1**), ácido 13 α -hidroximulin-11-en-20-oico (**2**), 7-desacetil-azorellanol (**3**) y ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**8**). Los sustratos **1-3** fueron proporcionados de forma pura por el Laboratorio de Química Orgánica del CICY, en tanto que, el sustrato **8** fue aislado de los extractos hexánicos de *Azorella compacta* y *Mulinum crassifolium* empleando técnicas cromatográficas de purificación como Cromatografía Líquida al Vacío (VLC) y Cromatografía en Columna de Gravedad (CCG). Para la biotransformación se

utilizaron cultivos fúngicos (*Aspergillus alliaceus*, *Mucor circinelloides* y *Penicillium notatum*) y bacterianos (*Nocardia iowensis*) en medio de cultivo IOWA. Los microorganismos se resembraron cada tres meses para mantener su viabilidad en tubos inclinados de agar papa dextrosa para los hongos y medio sólido de esporulación para la bacteria. Se realizó el escalamiento del proceso de biotransformación de los sustratos **1** y **2** para el aislamiento e identificación de sus productos de biotransformación en cultivos de *P. notatum*. La purificación de los extractos de biotransformación se realizó mediante Cromatografía en Columna Flash (CCF) y la identificación de los productos fue mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos (^1H , ^{13}C RMN y experimentos bidimensionales) y por Espectrometría de Masas (EM). Por otro lado, los diterpenoides **1**, **2** y **8** fueron utilizados como materias primas para la obtención de derivados por transformación química, principalmente para la obtención de compuestos nitrogenados (amidas o aminas). Por último, se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana de los productos de biotransformación y derivados semisintéticos frente a cepas sensibles y resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.

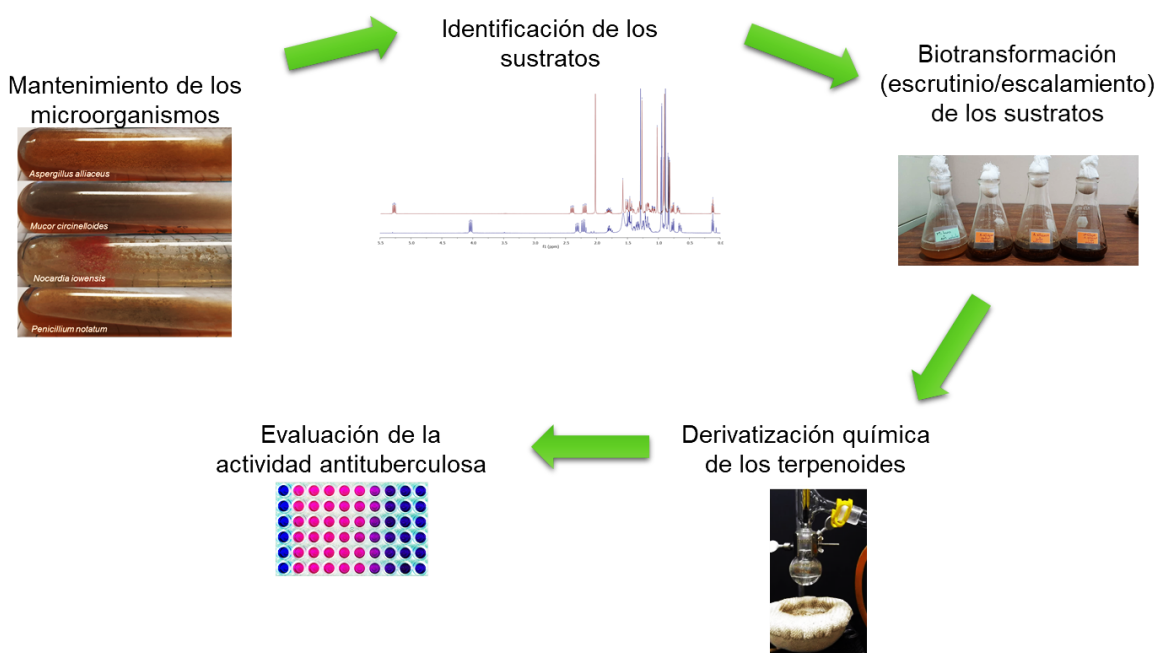


Figura 1.26. Diagrama experimental propuesto para el presente trabajo.

CAPÍTULO II

TRANSFORMACIÓN MICROBIANA DE DITERPENOIDES MULINANO Y AZORELLANO

2.1. INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Manuscrito publicado en la revista “Brazilian Journal of Pharmacognosy” como “Microbial transformation of azurellane and mulinane diterpenoids”. Autores: Stephanie Guadalupe Herrera-Canché, Mónica Noel Sánchez-González, Gloria María Molina-Salinas, Luis A. Loyola, Jorge Bórquez y Luis Manuel Peña-Rodríguez. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00364-z>

2.2. MICROBIAL TRANSFORMATION OF AZORELLANE AND MULINANE DITERPENOIDES

2.2.1. Abstract

Microbial transformation is an alternate strategy to obtain novel derivatives from natural products using whole cells or enzymes because of their capability to introduce functional groups in chemically inactive carbon positions. In this investigation, the microbial transformation of two diterpenoids, azurellanol and 13 α -mulin-11-en-20-oic acid, in three fungal cultures (*Aspergillus alliaceus* UI 315, *Mucor circinelloides* ATCC 7941, and *Penicillium notatum* ATCC 36740) and one bacterium (*Nocardia iowensis* NRRL 5646) was explored. The results showed that while biomodification of azurellanol by *N. iowensis* produced the known diterpenoid 7-deacetyl-azurellanol, *P. notatum* produced two new derivatives identified as 4,16-dihydroxy-azurellanol and 2 β ,16-dyhydroxy-14-en-azurellanol. Similarly, microbial transformation of 13 α -hydroxymulin-11-en-20-oic acid by *P. notatum* produced the known derivative 13 β ,14 β -dihydroxymulin-11-en-20-oic acid and the novel product 13 α ,14 β ,16-trihydroxymulin-11-en-20-oic acid.

2.2.2. Resumen

La transformación microbiana es una estrategia alternativa para obtener nuevos derivados de productos naturales utilizando células enteras o enzimas, debido a su capacidad para introducir

grupos funcionales en posiciones de carbono químicamente inactivas. En esta investigación se exploró la transformación microbiana de dos diterpenoides, azorellanol y ácido 13 α -hidroximulin-11-en-20-oico, en tres cultivos fúngicos (*Aspergillus alliaceus* UI 315, *Mucor circinelloides* ATCC 7941 y *Penicillium notatum* ATCC 36740) y una bacteria (*Nocardia iowensis* NRRL 5646). Los resultados mostraron que, mientras que la biomodificación del azorellanol por parte de *N. iowensis* produjo el diterpenoide conocido como 7-desacetil-azorellanol, *P. notatum* produjo dos nuevos derivados identificados como 4,16-dihidroxi-azorellanol y 2 β ,16-dihidroxi-14-en-azorellanol. De manera similar, la transformación microbiana del ácido 13 α -hidroximulin-11-en-20-oico por *P. notatum* produjo el derivado conocido como ácido 13 β ,14 β -dihidroxi-mulin-11-en-20-oico y el nuevo producto ácido 13 α ,14 β ,16-trihidroxi-mulin-11-en-20-oico.

2.2.3. Introduction

Mulinane and azorellane diterpenoids are the major group of natural products isolated from plants of the *Azorella*, *Bolax*, *Laretia*, and *Mulinum* genera from the Apiaceae or parsley family (Dzul-Beh *et al.*, 2020). Although their chemical skeletons are very similar, the azorellane skeleton includes the characteristic bicycle [4.1.0]-heptane (Marcos *et al.*, 2016; Molina-Salinas *et al.*, 2010). These diterpenoids have shown a great number of biological activities including analgesic (Delporte *et al.*, 2003), antibacterial (Wächter *et al.*, 1998), antihyperglycemic (Fuentes *et al.*, 2005), anti-inflammatory (Delporte *et al.*, 2003), antiprotozoal (Neira *et al.*, 1998), antiviral (Abdel-Malek *et al.*, 1996), cytotoxic (Mongelli *et al.*, 1997), spermicidal (Morales *et al.*, 2003), gastroprotective (Areche *et al.*, 2008), toxoplasmodicidal (Loyola *et al.*, 2001), trypanocide (Araya *et al.*, 2003), and antitubercular (Molina-Salinas *et al.*, 2010).

We have recently reported that the chemical derivatization of several of these diterpenoids has produced semisynthetic derivatives with an important *in vitro* activity against susceptible and resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* (Martínez-González *et al.*, 2021; Molina-Salinas *et al.*, 2010). However, because of the limited number of functional groups in the mulinane and azorellane skeletons that makes it difficult to obtain new derivatives through chemical modification, microbial transformation represents an interesting alternative to obtain novel bioactive derivatives of these diterpenoids. Microbial transformation, or biotransformation, makes use of whole cells or isolated enzymes to modify a substrate and produce a structurally similar derivative. Biotransformation processes have significant advantages over chemical

transformations since they can be carried out at low cost and under mild conditions (e.g., neutral pH, room temperature, and normal atmospheric pressure); most importantly, cells and isolated enzymes can catalyze stereo- or regio-specific reactions such as new bond formation, hydrolysis, oxidation, and reduction, and functionalize chemically inactive positions in the substrate (Mutafova *et al.*, 2016; Rico-Martínez *et al.*, 2014). A great number of natural products, including diterpenoids, have been modified using fungal whole cells because of the ability of these microorganisms to adapt to changes in their environment and to their production of a wide variety of enzymes (Hegazy *et al.*, 2015; De Carvalho and Da Fonseca 2006).

Even though microbial transformation represents a good strategy to obtain novel derivatives of natural products, to date there are only three reports on the biotransformation of mulinane and azorellane diterpenoids (Herrera-Canché *et al.*, 2020; Sepúlveda *et al.*, 2016; Areche *et al.*, 2008), which include the derivatization of mulin-11,13-dien-20-oic acid using whole cells of *Mucor plumbeus*, *Aspergillus alliaceus*, and *Mucor circinelloides*. As part of our interest to use biotransformation to obtain novel derivatives of azorellane and mulinane diterpenoids, we wish to report herein the identification of four new derivatives when using two natural diterpenoids as substrates in cultures of *N. iowensis* and *P. notatum*.

2.2.4. Materials and methods

NMR analyses were carried out in a Varian/Agilent Premium Compat (14.1 T) spectrometer. GC–MS analyses were carried out in an Agilent Technologies 7890B model chromatographer, coupled to an Agilent Technologies 5977A model mass detector, using an HP-5MS (5% diphenyl-95% dimethylsiloxane) J&W Scientific/Agilent Technologies column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.1 µm) and helium (flow, 1.5 ml/min) as the carrier gas. The temperature program included an initial temperature of 65° C for 2 min, with a 6° C/min gradient to reach a final temperature of 300° C, where it was maintained for 20° min (Simoneit *et al.*, 2019).

The substrate diterpenoids azorellanol (**1**) and 13 α -hydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (**2**) were previously obtained from the low-polarity extracts of *Azorella compacta* Phil. and *Mulinum crassifolium* Phil., respectively (Molina-Salinas *et al.* 2010). Screening and scale-up of microbial transformation experiments were carried out using cultures of *Aspergillus alliaceus* UI 315, *Mucor circinelloides* ATCC 7941, *Penicillium notatum* ATCC 36740, and *Nocardia iowensis* NRRL 5676.

Fungi were grown in potato dextrose agar (PDA) slants, while *N. iowensis* was maintained in solid sporulation medium (SSM): yeast extract (1 g/l), meat extract (1 g/l), tryptone (2 g/l), FeSO₄ (0.002 g/l), dextrose (10 g/l), and agar (15 g/l) slants. Microbial transformation processes were carried out using the liquid Iowa Culture Medium (ICM): glucose (20 g/l), yeast extract (5 g/l), soybean meal (5 g/l), NaCl (5 g/l), K₂HPO₄ (5 g/l), and 6N HCl to adjust pH to 7.

For the microbial transformation screening, an initial 1 ml spore suspension (1×10^6 spores/ml) of *A. alliaceus*, *M. circinelloides*, and *P. notatum*, and a cellular suspension of *N. iowensis*, were used to inoculate two 125 ml Erlenmeyer flasks containing 25 ml of ICM each. Cultures were allowed to grow for 96 h, at 28° C and constant stirring conditions (150 rpm). For the second stage, an aliquot (10% v/v) of the 96 h cultures was used to inoculate 25 ml of fresh ICM and the new cultures were left to incubate under the same conditions described before. After 24 h, 250 µl of a solution of the substrate (50 mg/ml) in *N,N*-dimethylformamide (DMF) was added. The biotransformation process was monitored by TLC, taking an aliquot (1 ml) of the culture every 48 h for 10 days; after this time, the culture filtrate was separated from the mycelium or cellular pellet by centrifugation and extracted three times (2:1, 1:1, 1:1; v/v) with ethyl acetate. Microbial transformation was evaluated by analyzing the chromatographic profiles of the different extracts by TLC. Controls used included non-inoculated, substrate-containing ICM; inoculated, substrate-free ICM; inoculated ICM with DMF; non-inoculated, substrate-free ICM.

For the microbial transformation scale-up, a microbial transformation of **1** (600 mg) was carried out using cultures of *P. notatum*. The first and second stages followed the procedure described before; after 24 h, 250 µl of the substrate solution (50 mg/ml) in DMF was added to 48 125 ml Erlenmeyer flasks containing 25 ml of ICM, and the cultures were incubated at 28° C and 150 rpm. After 48 h, the mycelium was separated from the culture medium by centrifugation and the filtrate was extracted three times with ethyl acetate (2:1, 1:1, 1:1; v/v). The solvent was dried with Na₂SO₄, filtered, and evaporated to produce the corresponding crude extract (784 mg; 0.60 mg/ml). The scale-up of **2** (300 mg) was carried out using cultures of *P. notatum* and a similar procedure in the first and second stages. After 196 h of incubation, the mycelium was separated from the culture medium by centrifugation and the filtrate was extracted three times with ethyl acetate (2:1, 1:1, 1:1; v/v). The solvent was dried with Na₂SO₄ and evaporated to produce the corresponding crude extract (280 mg; 0.46 mg/ml).

The crude extract (784 mg) from the biotransformation of **1** by *P. notatum* was purified by flash column chromatography (FCC), eluting with mixtures of chloroform/methanol of increasing

polarity to produce biotransformation products **4** (40 mg) and **5** (40.6 mg). A similar purification of the crude extract (280 mg) from the biotransformation of **2** by *P. notatum* eluting with mixtures of hexane/ethyl acetate/ methanol as mobile phase produced biotransformation products **6** (35.8 mg) and **7** (48.5 mg).

7-Deacetyl-azorellanol (3): GC: t_R : 30.35 min. MS: m/z 288.3 $[M-H_2O]^+$.

4,16-Dihydroxy-azorellanol (4): Brown oil. $[\alpha]_D^{25} +16.1$ (c 0.0033, CH_3OH); GC: t_R 36.53 min. MS: m/z 344.3 $[M-2H_2O]^+$. 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) and ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz): see Table 1.

2 β ,16-Dihydroxy-14-en-azorellanol (5): Brown oil. $[\alpha]_D^{25} +3.7$ (c 0.0031, CH_3OH); GC: t_R 36.85 min. MS: m/z 348.3 $[M-CH_2O]^+$. 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) and ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz): see Table 1.

13 β ,14 β -dHydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (6): Colorless oil. 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz): see Figure S10.

13 α ,14 β ,16-Trihydroxy-11-en-mulin-20-oic acid (7): White solid amorphous. $[\alpha]_D^{25} +123.1$ (c 0.0008, CH_3OH); 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) and ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz): see Table 1.

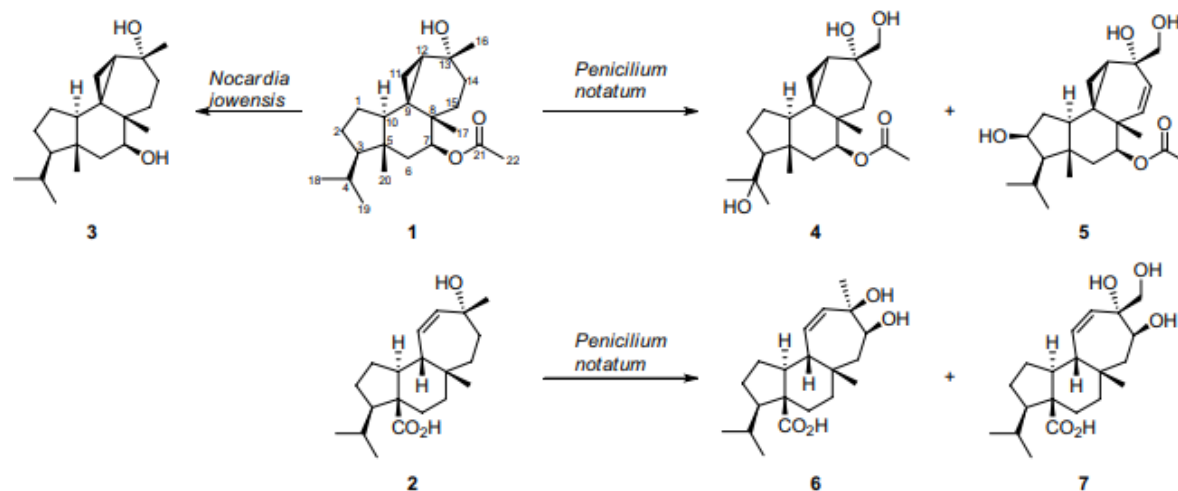


Figure 2.1. Microbial transformation of **1** and **2** and their corresponding products **3-7**.

2.2.5 Results and discussion

Figure 2.1 illustrates the microbial transformation of azorellanol (**1**) and 13 α -mulin-11-en-20-oic acid (**2**) and their corresponding products. The screening of the microbial transformation of azorellanol (**1**) showed that both the bacterium *N. iowensis* and the fungus *P. notatum* had the ability to transform the substrate after 96 h and 48 h of incubation, respectively. The modification of **1** by *N. iowensis* resulted in the formation of the already known natural derivative 7-deacetyl-azorellanol (**3**) (Loyola *et al.*, 2001); the identification was confirmed by comparing the GC retention time (t_R 30.35 min) and the fragmentation pattern of the biotransformation product with those of an authentic sample of **3**. Alternatively, biotransformation of **1** by *P. notatum* produced two derivatives of higher-polarity; the ^1H NMR spectrum of the less-polar of the two derivatives proved to be very similar to that of **1**. However, in the ^1H NMR spectrum of the biotransformation product (Figure 2.1S), the C-16 methyl group had been substituted by two new signals at δ_H 3.45 (dd, $J = 11.2$ Hz) and 3.38 (dd, $J = 11.2$ Hz), and the C-18/C-19 methyl groups of the isopropyl side chain had lost their couplings to H-4. These changes suggested the presence of a primary and tertiary alcohols at positions C-16 and C-4, respectively, of the chemical structure. This was confirmed by both the displacement to lower fields of the C-18/C-19 methyl group signals (δ_H 1.27/1.16) and the presence of two new oxygenated carbon signals at δ_C 72.2 and 70.1 in the ^{13}C -NMR spectrum (Figures 2.2S, 2.3S). Long-range HMBC correlations observed between the carbon signal at δ_C 72.2 and the protons of the C-18/C-19 methyl groups, confirmed the presence of a tertiary alcohol at C-4; similarly, HMBC correlations observed between the C-16 protons and the C-13/C-14 carbons confirmed the assignment of the second hydroxyl group to position C-16 (Figure 2.4S). These results, together with a fragment ion peak at m/z 344 [$M - 2 \text{H}_2\text{O}$] $^+$ in the mass spectrum of the biotransformation product, allowed its identification as the new diterpene 4,16-dihydroxy-azorellanol (**4**) (Figure 2.1). The ^1H NMR spectrum of the second more-polar biotransformation product (Figure 2.5S), showed some similarities to both substrate **1** and the biotransformation product **4**, namely the presence of the characteristic isopropyl group at C-3 and the primary alcohol at C-16, respectively, together with the tertiary alcohol at C-13 and the acetate group at C-7; however, the ^1H NMR spectrum of the second biotransformation product showed two vinyl proton signals at δ_H 7.86 (d, $J = 8.5$ Hz) and 6.80 (d, $J = 8.5$ Hz) and a carbinol proton signal at δ_H 4.26 (m), indicating the presence of a *cis* double bond and a secondary alcohol, respectively, in its chemical structure. This was confirmed by the two sp^2 carbons signals at δ_C 131.5 and 114.5 and an additional oxygenated sp^3 carbon signal at δ_C 70.5 in the ^{13}C NMR spectrum (Figures 2.6S, 2.7S). The correlations observed in the HMBC experiment between the carbinol proton at

δ_{H} 4.26 and the C-10 and C-5 carbons signals, together with that between the H-3 proton signal (δ_{H} 1.20) and the oxygenated carbon signal at δ_{C} 70.5 allowed placement of the secondary alcohol at C-2, leaving C-14/C-15 as the only possibility to accommodate the double bond (Figure 2.8S). The α orientation of the H-2 proton was assigned when a *cis* spatial correlation was observed between H-2 and H-3 in the NOESY experiment (Figure 2.9S). These results, together with a fragment ion peak at m/z 348 $[\text{M} - \text{CH}_2\text{O}]^+$, allowed the identification of the biotransformation product as the new diterpenoid 2 β ,16-dihydroxy-14-en-azorellanol (**5**) (Figure 2.1).

A similar microbial transformation of the substrate 13 α -hydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (**2**) by the fungus *P. notatum* produced derivatives **6** and **7**, after 192 h of incubation. While the ^1H NMR spectrum of **6** proved to be identical to that of 13 β ,14 β -dihydroxy-11-en-mulin-20-oic acid (Bórquez *et al.*, 2016) (Figure 2.1), the ^1H -NMR spectrum of **7** (Figure 2.10S) showed, in addition to the C-14 carbinol proton signal at δ_{H} 3.96 (dd, $J = 6.0, 2.9$ Hz), two signals at δ_{H} 3.69 (d, $J = 11.0$ Hz) and δ_{H} 3.55 (d, $J = 11.0$ Hz), corresponding to the protons of a primary alcohol; these new signals, together with the oxygenated carbon signal at δ_{C} 69.1 in the ^{13}C -NMR spectrum (Figures 2.11S, 2.12S), and the absence of the C-16 methyl group signal in both spectra, indicated an oxidation of this carbon during biotransformation. A correlation observed between the protons of the C-16 hydroxymethyl and the C-17 methyl groups in the NOESY experiment (Figures 2.14S) confirmed their β orientation. On the basis of these results, **7** was identified as the new diterpene 13 α ,14 β ,16-trihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid. See Table 2.1.

These results confirm microbial transformation as a good alternative to introduce new functional groups in chemically-inactive positions to produce novel mulinane and azorellane with potential application as new leads in drug development.

2.2.6. Author contributions

SGHC carried out all experiments of microbial transformation, identification of biotransformation products and participated in preparing the manuscript. MNSG supervised microbial transformation experiments and revised the manuscript. LAL and JB collected the plant material, prepared the crude extracts and carried out initial fractionation. GMMS purified and identified the substrate diterpenoids. LMPR designed the study, supervised the laboratory work and contributed to the preparation and critical reading of the manuscript. All the authors have read the final manuscript and approved the submission.

Table 2.1. ^1H NMR (600 MHz, δ in ppm) and ^{13}C -RMN (150 MHz, δ in ppm) spectral data of biotransformation products **4**, **5** and **7** in CD_3OD .

C	4		5		7	
	δ_{H} , mult., (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult., (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult., (J in Hz)	δ_{C}
1	1.35, m 1.77, m	19.8	1.84, m	33.2	1.65, m	25.8
2	1.79, m —	21.4	4.25, m	70.5	1.86, m	30.2
3	1.79, m	60.6	1.20, m	64.1	1.41, m	58.9
4	—	72.2	1.29, m	24.8	1.42, m	33.3
5	—	42.6	—	41.8	—	59.1
6	2.37, dd (13.9, 7.0) 1.56, m	38.9	2.21, dd (14.0, 7.3) 1.44, m	39.7	2.43, m	34.3
7	5.28, dd (11.2, 7.1)	78.4	5.25, dd (11.2, 7.2)	78.4	1.35, dd (7.8, 5.3)	44.0
8	—	34.3	—	34.5	—	37.1
9	—	24.2	—	24.2	2.13, dd (12.2, 9.1)	49.4
10	2.47, dd (12.3, 7.1)	47.1	2.31, dd (13.2, 7.1)	44.5	2.41, m	52.2
11	0.78, dd (9.7, 5.7) 0.31, t (5.8)	9.1	0.81, dd (9.7, 6.0) 0.34, t (6.0)	8.8	5.78, dd (12.4, 8.9)	136.1
12	0.70, m	20.7	0.69, m	20.8	5.45, d (12.3)	132.1
13	—	71.0	—	71.0	—	75.6
14	1.34, m	24.8	7.86, d (8.5)	131.5	3.96, dd (6.0, 2.9)	74.6
15	1.51, m	30.5	6.80, d (8.5)	114.5	2.64, dd (15.2, 2.7)	39.5
16	3.45, dd (11.2) 3.37, dd (11.2)	70.1	3.46, d (11.2) 3.38, d (11.2)	70.1	3.69, dd (11.0) 3.55, dd (11.0)	69.1
17	1.05, s	18.2	1.06, s	18.0	1.13, s	31.8
18	1.27, s	28.4	0.99, d (6.5)	21.6	0.85, d (6.3)	22.9
19	1.16, s	29.7	0.96, d (6.5)	21.2	1.03, d (6.2)	23.3
20	1.09, s	17.7	1.11, s	17.6	—	178.3
21	—	171.2	—	171.2	—	—
22	2.01, s	19.1	2.01, s	19.7	—	—

2.3 SUPPORTING INFORMATION

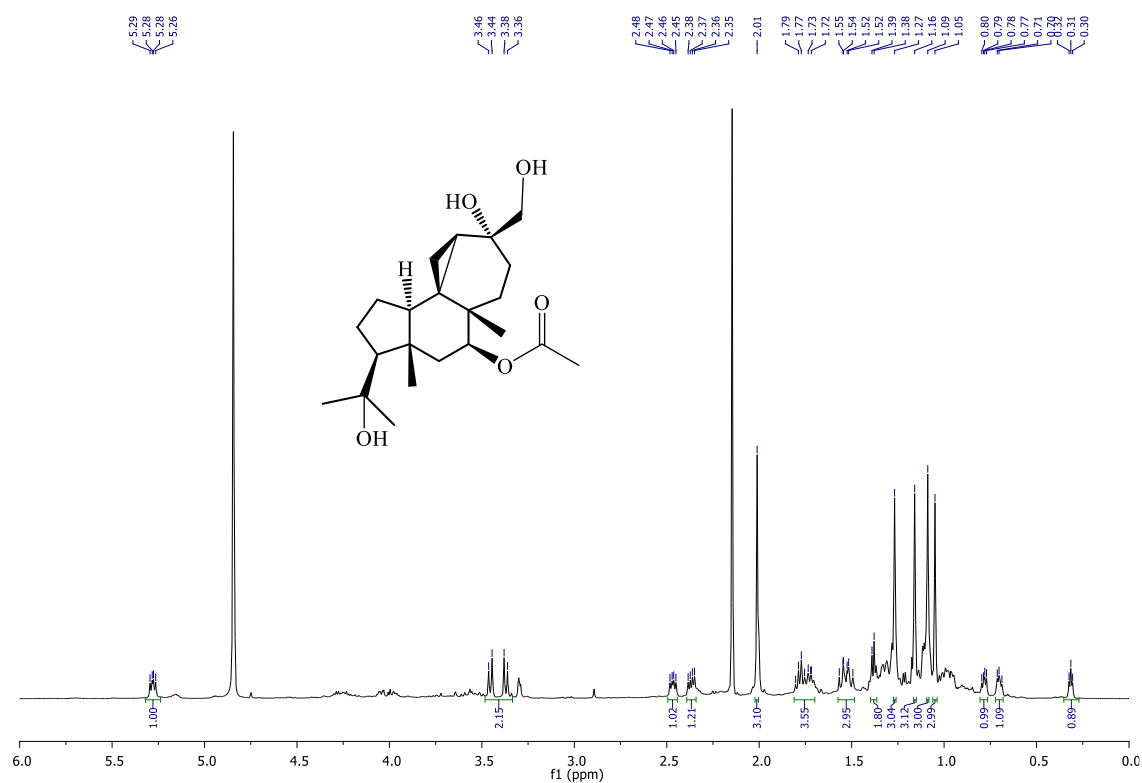


Figure 2.1S. ¹H-NMR spectrum (600 MHz, CD₃OD) of 4,16-dihydroxy-azorellanol (4).

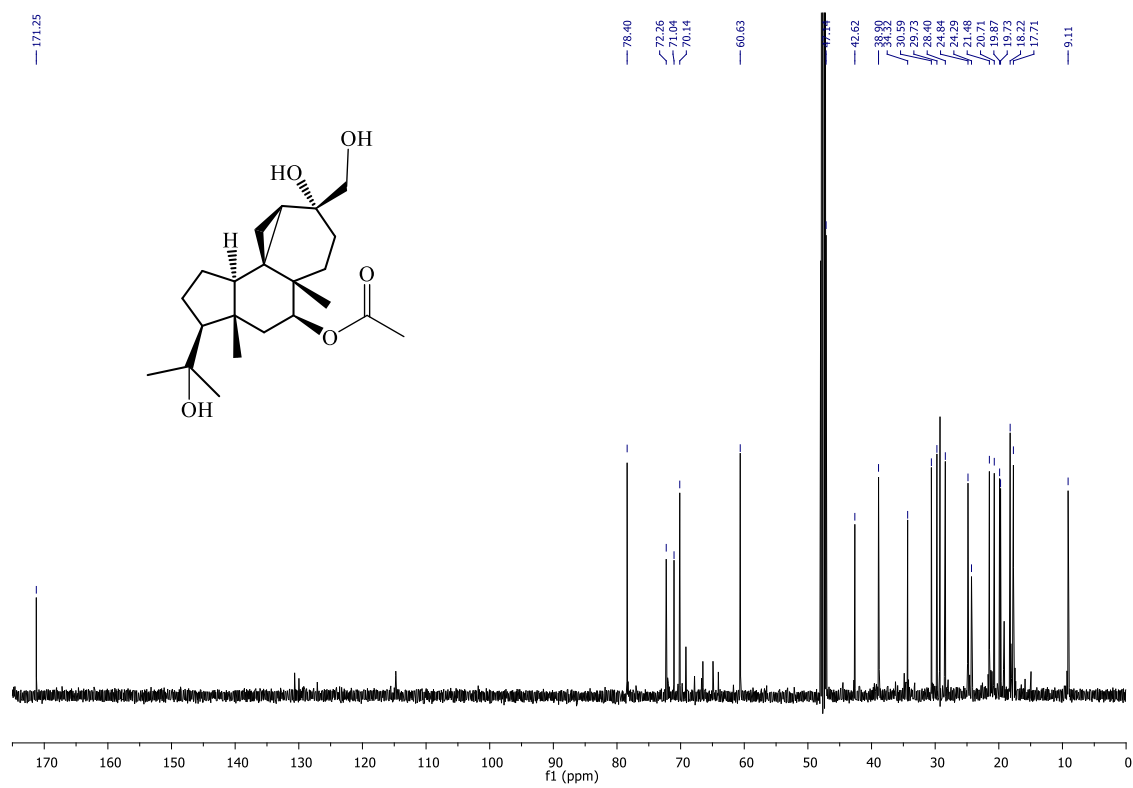


Figure 2.2S. ¹³C-NMR spectrum (150 MHz, CD₃OD) of 4,16-dihydroxy-azorellanol (**4**).

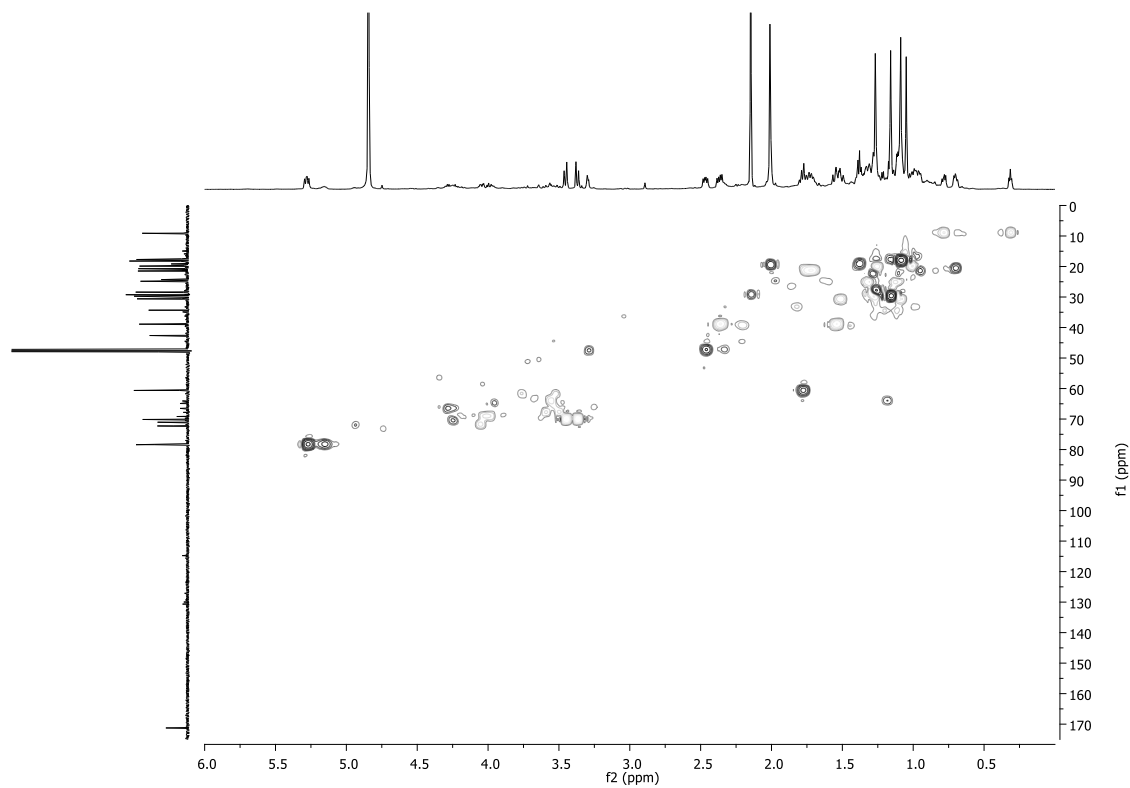


Figure 2.3S. HSQC experiment of 4,16-dihydroxy-azorellanol (**4**).

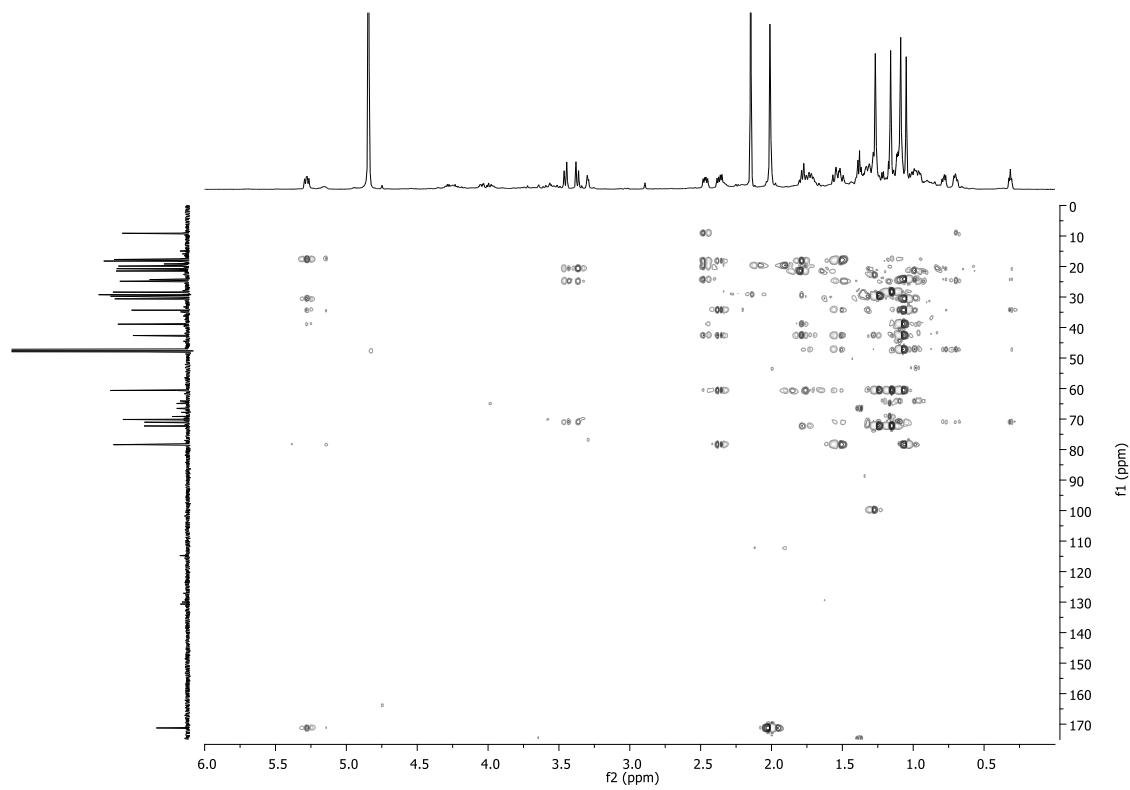


Figure 2.4S. HMBC experiment of 4,16-dihydroxy-azorellanol (**4**).

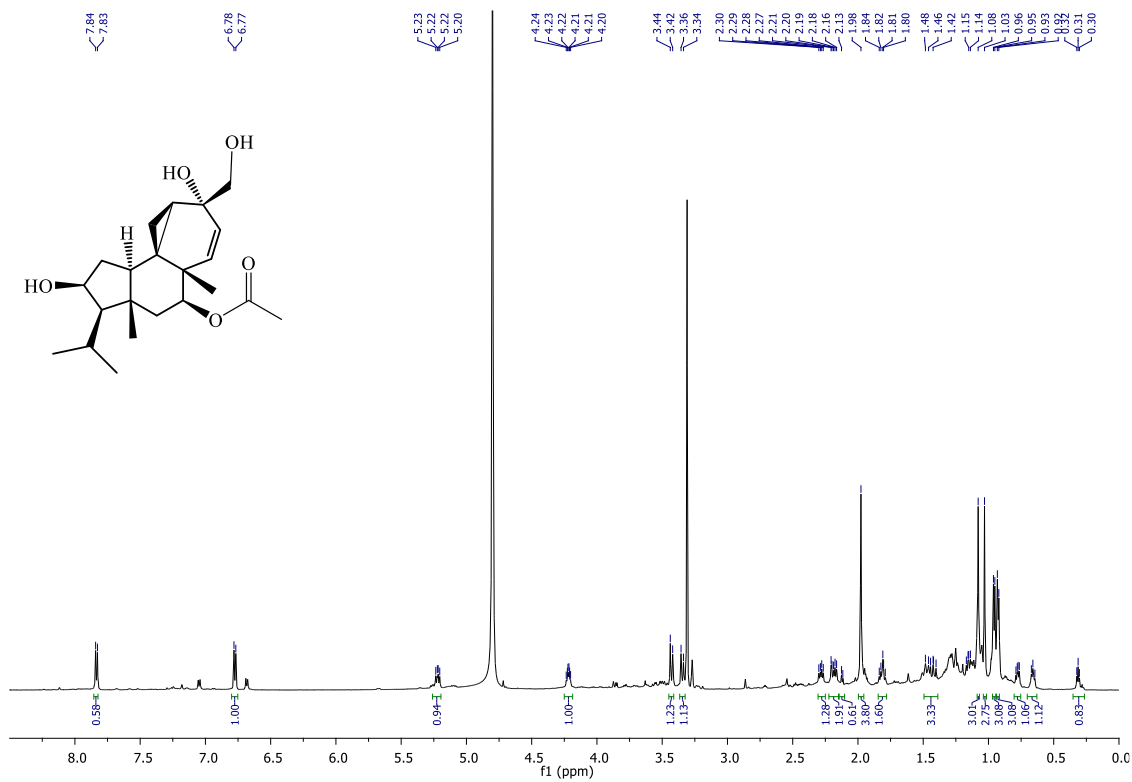


Figure 2.5S. ¹H-RMN spectrum (600 MHz, CD₃OD) of 2β,16-dihydroxy-14-en-azorellanol (5).

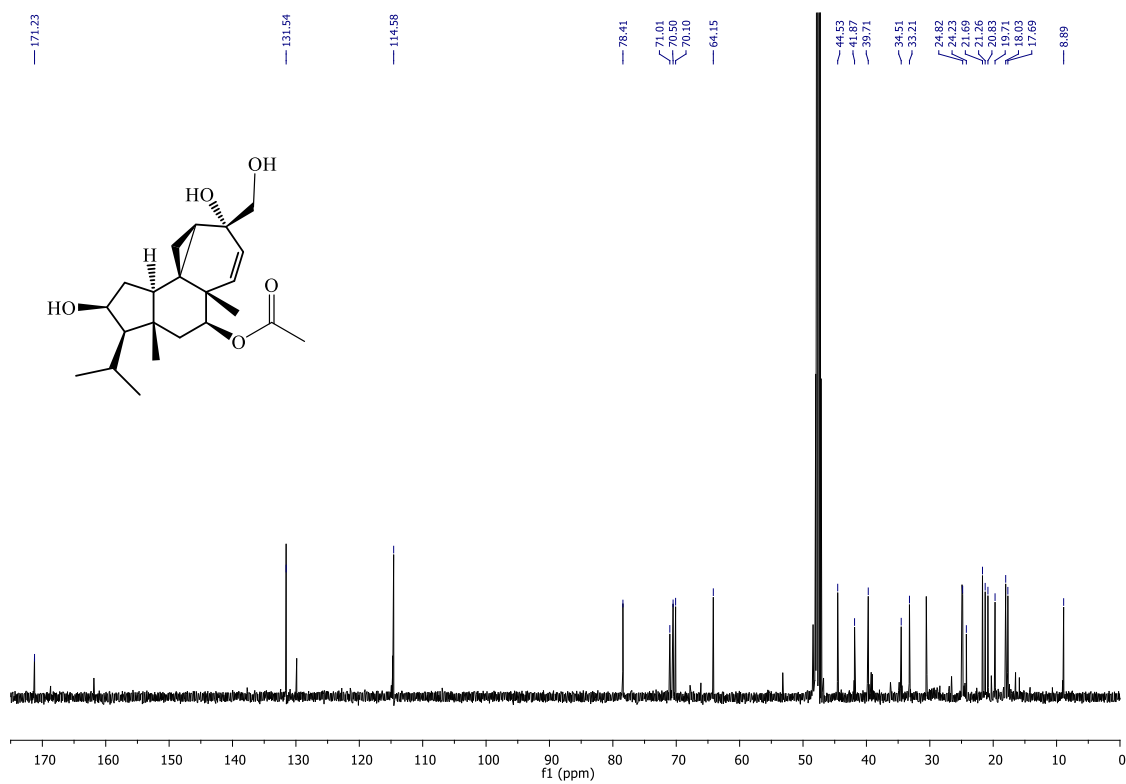


Figure 2.6S. ^{13}C -RMN spectrum (150 MHz, CD_3OD) of 2β,16-dihydroxy-14-en-azorellanol (5).

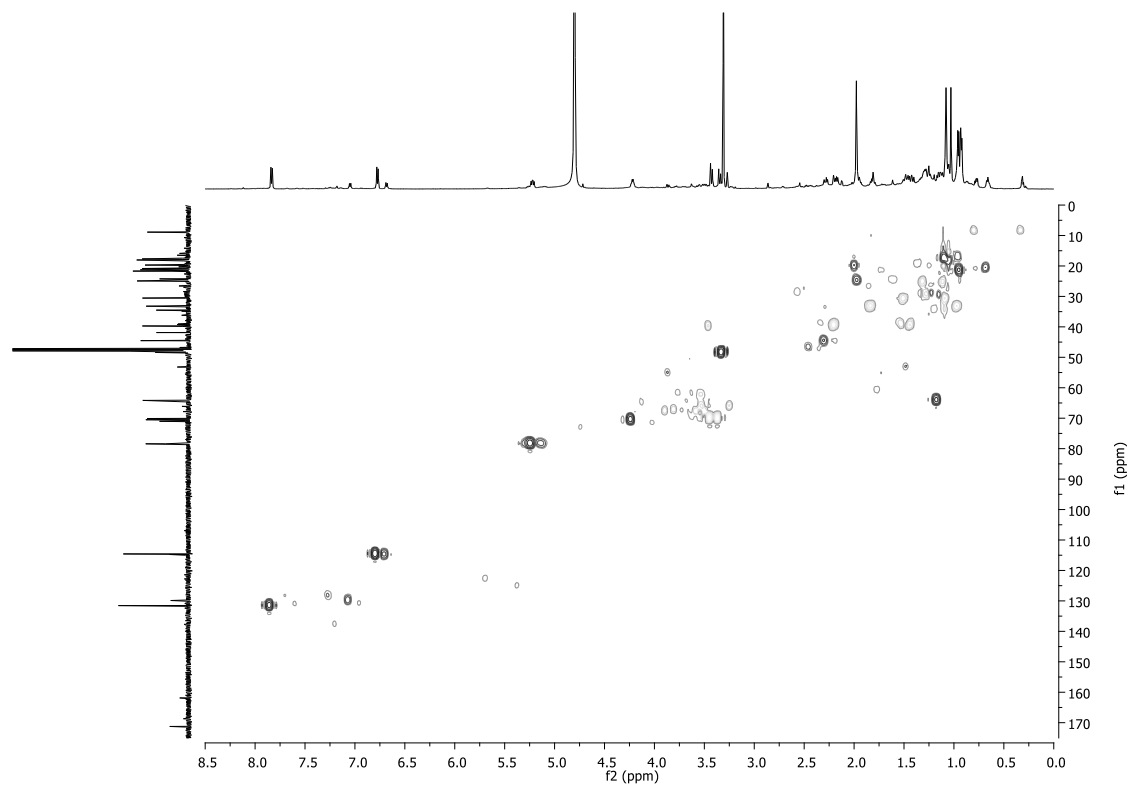


Figure 2.7S. HSQC experiment of 2 β ,16-dihydroxy-14-en-azorellanol (**5**).

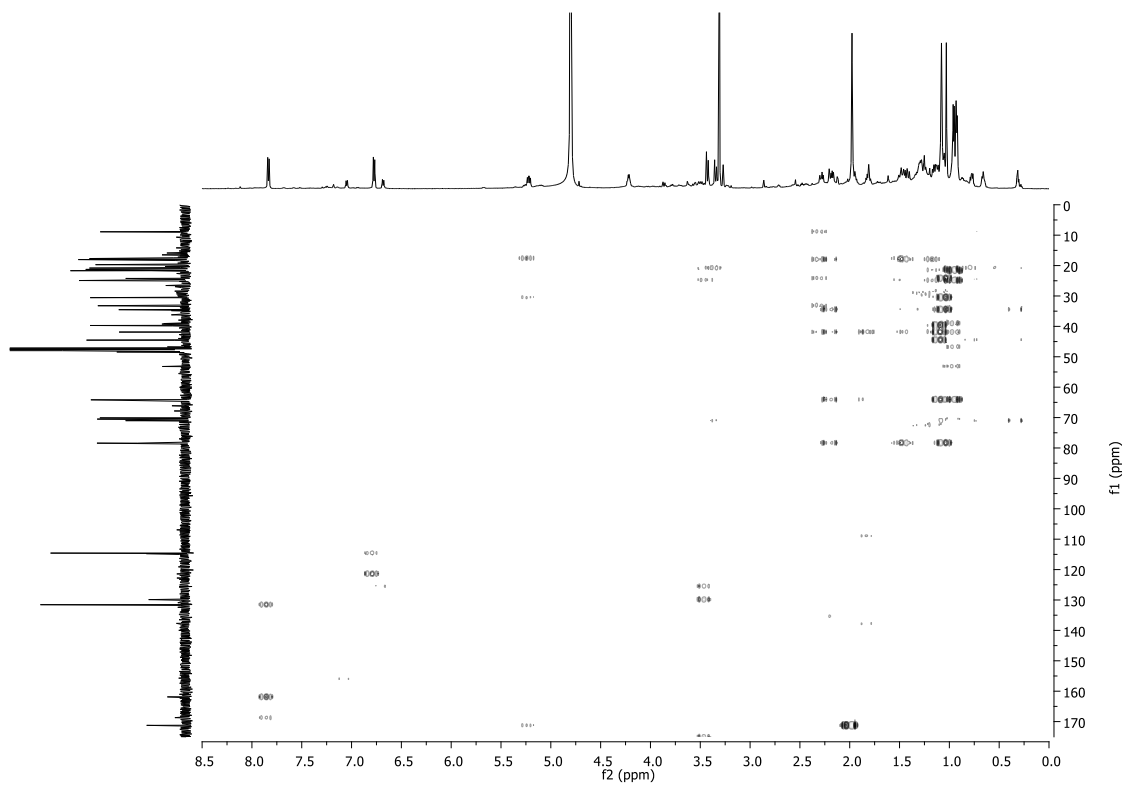


Figure 2.8S. HMBC experiment of 2 β ,16-dihydroxy-14-en-azorellanol (5).

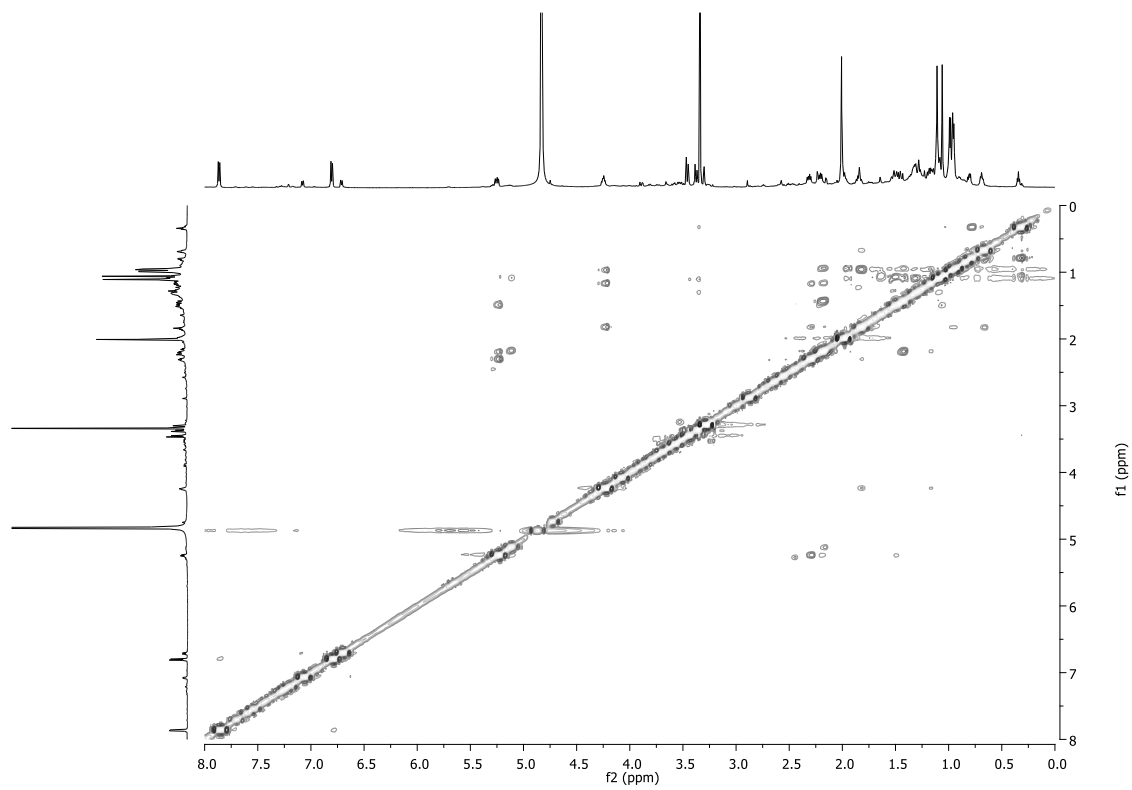


Figure 2.9S. NOESY experiment of 2 β ,16-dihydroxy-14-en-azorellanol (5).

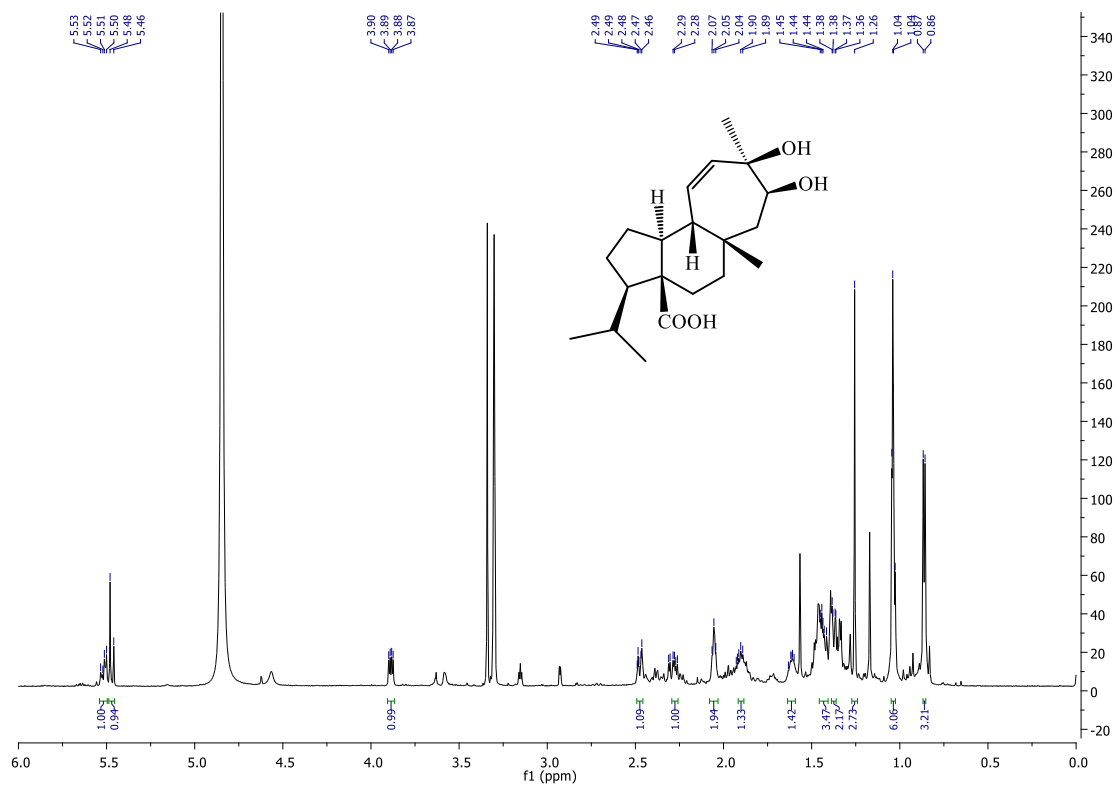


Figure 2.10S. ¹H-NMR spectrum (600 MHz, CD₃OD) of 13β,14β-dihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (**6**).

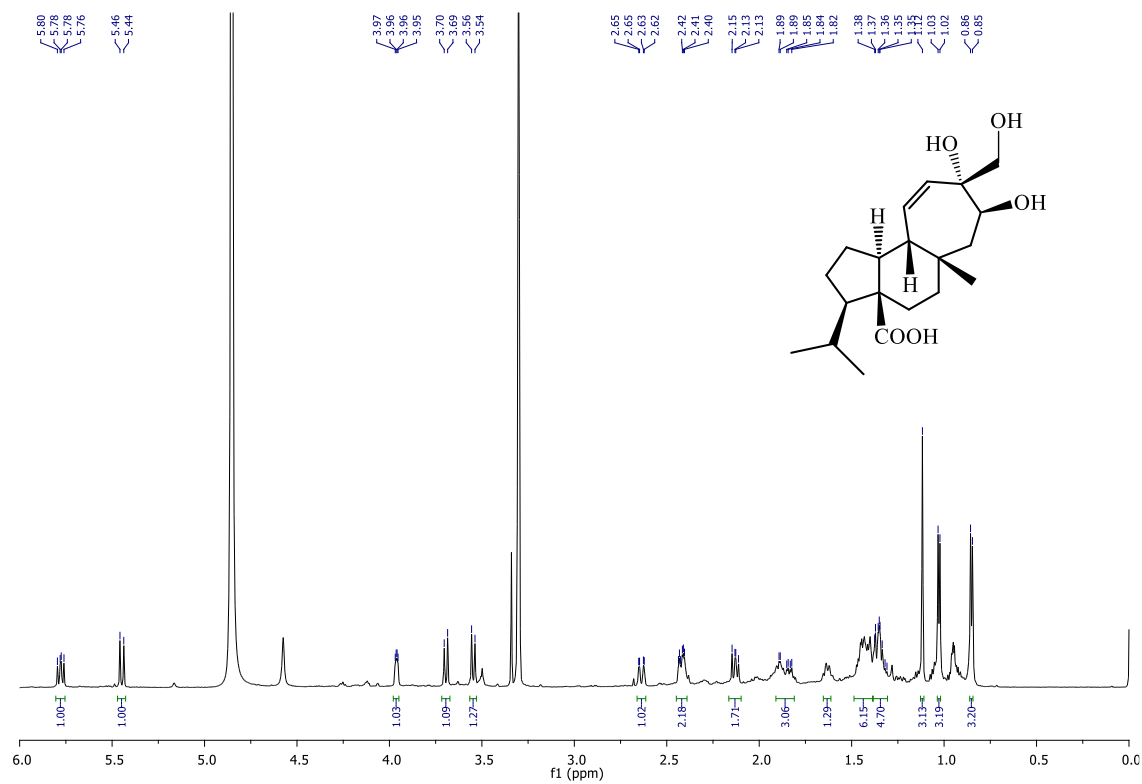


Figure 2.11S. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (600 MHz, CD_3OD) of 13 α ,14 β ,16-trihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (7).

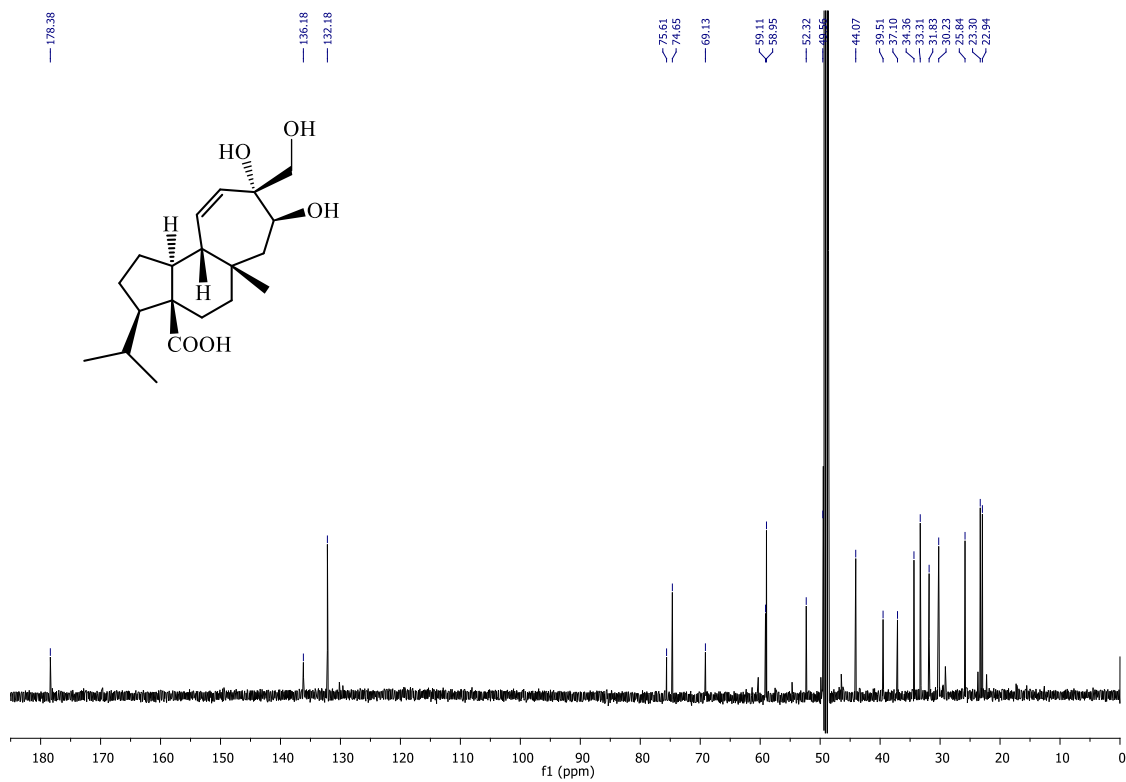


Figure 2.12S. ^{13}C -NMR spectrum (150 MHz, CD_3OD) of 13 α ,14 β ,16-trihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (7).

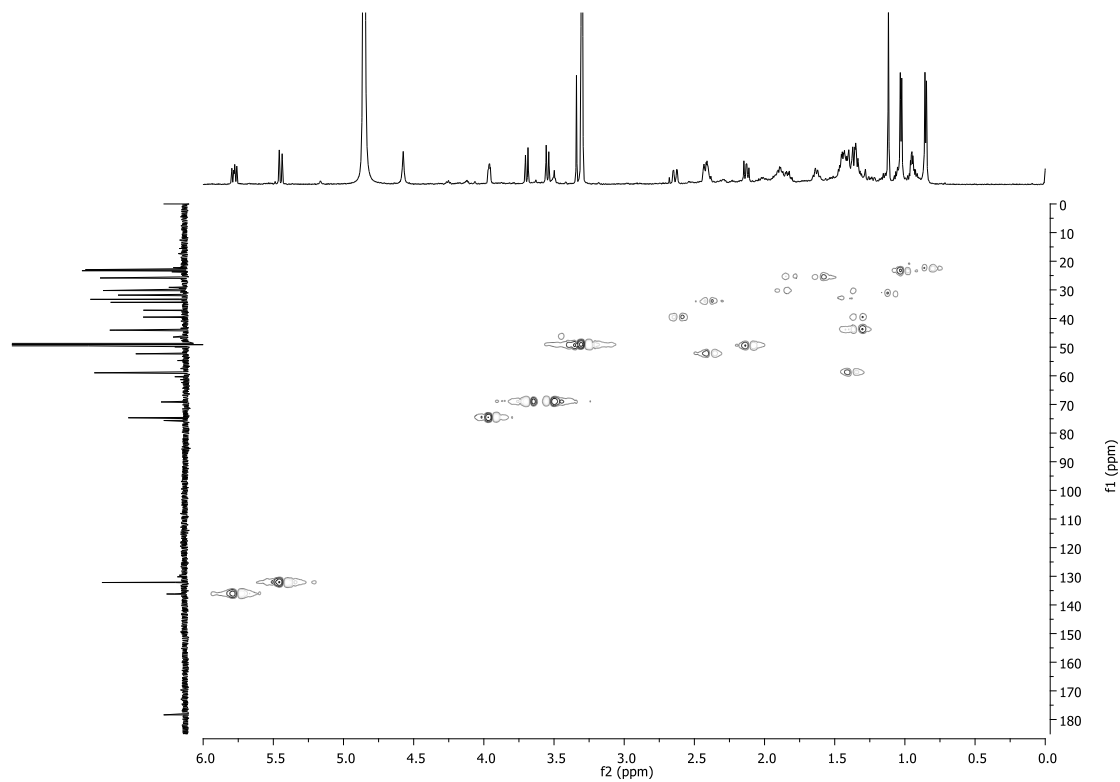


Figure 2.13S. HSQC experiment of 13 α ,14 β ,16-trihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (**7**).

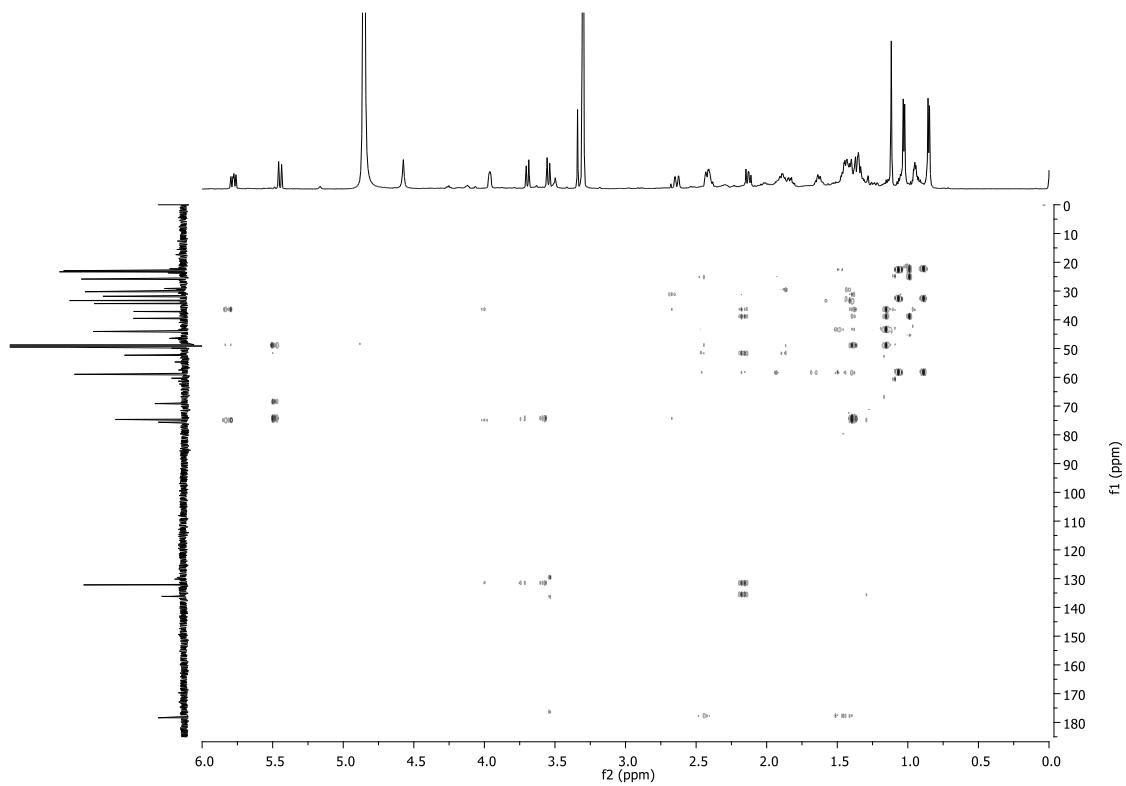


Figure 2.14S. HMBC experiment of 13 α ,14 β ,16-trihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (7).

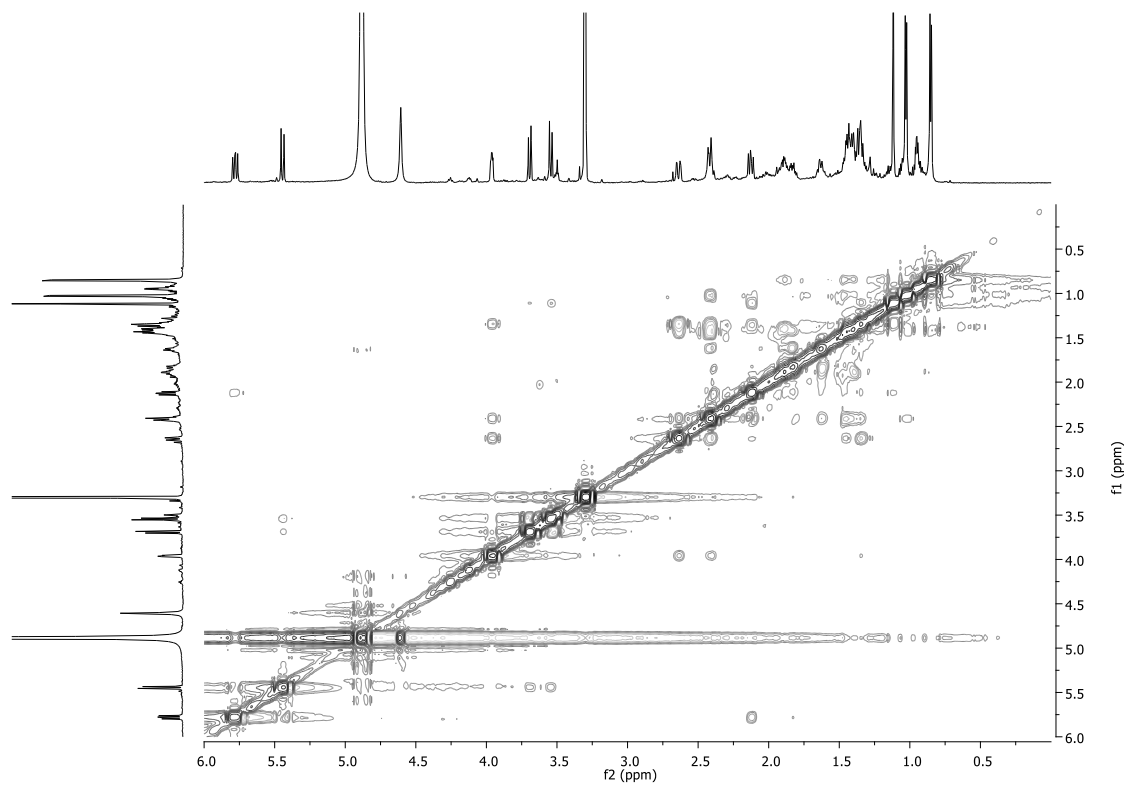


Figure 2.15S. NOESY experiment of 13 α ,14 β ,16-trihydroxy-mulin-11-en-20-oic acid (7).

CAPÍTULO III**DERIVATIZACIÓN QUÍMICA DE DITERPENOIDES MULINANO Y AZORELLANO PARA LA EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO FRENTE A CEPAS SENSIBLES Y RESISTENTES DE *Mycobacterium tuberculosis*****3.1. INTRODUCCIÓN**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que se contagia de persona a persona al expulsar microgotas generadas al toser, estornudar o hablar; el agente causal de esta enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis*, bacteria que se aloja principalmente en los pulmones. Cada año se registran alrededor de 10 millones de nuevos casos, 1.5 millones de defunciones y 500 millones de nuevos casos de tuberculosis en sus formas resistentes en todo el mundo (OMS, 2022). Estas formas resistentes impiden que el tratamiento de la TB sea exitoso a pesar de que se cuenta con un régimen establecido de terapias combinadas de fármacos de primera línea (p. ej. isoniazida, rifampicina, etambutol, pirazinamida), segunda línea (p. ej. kanamicina, amikacina, ofloxacina, cicloserina) y de tercera línea (p. ej. bedaquilina, meropenem) (Sing *et al.*, 2019; Brown Jr. *et al.*, 2016; D'Ambrosio *et al.*, 2015). Es por esto, que se continúa con la búsqueda de nuevos productos con potencial antimicobacteriano. Los productos naturales son una fuente importante para la búsqueda de fármacos activos contra *M. tuberculosis*. De acuerdo a la última recopilación de Newman y Cragg sobre los fármacos comercializados hoy en día en el mercado, se estima que el 6.1% son productos naturales, destacando a la estreptomycin (primera línea), kanamicina (segunda línea), capreomicina (segunda línea), cicloserina (segunda línea) y clavulanato (tercera línea) como fármacos usados para el tratamiento de la TB. En tanto que los derivados de productos naturales representan el 42.3% de los fármacos usados para el tratamiento de diversas enfermedades, de los cuales rifampicina (primera línea), amikacina (segunda línea) y meropenem (tercera línea) son usados en el tratamiento de la TB (Newman y Cragg, 2019; Guzman *et al.*, 2013).

Entre los productos naturales y sus derivados que han mostrado actividad antituberculosa se encuentran los diterpenoides de tipo mulinano y azorellano que han mostrado actividad promisoriosa frente a cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis*. Se ha reportado que los diterpenoides naturales con mayor potencial antituberculosa son el 17-acetoxi-13 α -hidroxiazorellano (CMI = 34.3 μ M; 34.3 μ M), el azorellanol (CMI = 35.0 μ M; 35.0 μ M) y la

azorellanona (CMI = 43.1 μM ; 86.2 μM) evaluados sobre la cepa sensible de *M. tuberculosis* H37RV ATCC 27294) y la cepa resistente CIBIN/UMF 15:99 (aislado clínico), respectivamente. Asimismo, del grupo de derivados semisintéticos de los diterpenoides azorellano y mulinano, los productos con mayor actividad antituberculosa son los derivados alquilados éster metílico del ácido mulinólico (CMI = 37.4 μM ; 37.4 μM), éster n-propílico del ácido mulinólico (CMI = 69.0 μM ; 17.2 μM), el aldehído ácido mulin-11,13-dien-20-al (CMI = 10.2 μM ; 5.1 μM) y el alcohol mulin-11,13-dien-20-ol (CMI = 5.4 μM ; 2.7 μM) (Martínez-González *et al.*, 2017; Molina-Salinas *et al.*, 2010a; 2010b). Aun cuando, hasta el momento, se han realizado reacciones de alquilación, reducción, oxidación, hidrólisis, entre otras, para la obtención de derivados semisintéticos de estos diterpenoides, hasta ahora no se ha reportado la obtención de derivados nitrogenados, particularmente amidas o aminas de estos diterpenoides. Tomando en cuenta que se ha reportado que algunos grupos funcionales nitrogenados potencializan el efecto sobre *M. tuberculosis* de productos naturales, en este trabajo se propuso establecer metodologías para la obtención de derivados de tipo amidas y aminas de diterpenoides mulinano y azorellano.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Procedimientos generales experimentales

Todos los disolventes se secaron por destilación en presencia de carbonato de calcio anhidro. Las reacciones se realizaron en atmósfera de nitrógeno. Las reacciones bajo irradiación de microondas se realizaron en un equipo Monowave 300 (Anton Paar), equipado con un automuestreador MAS 24, utilizando viales de vidrio de borosilicato con tapas a presión. Los espectros de ^1H - y ^{13}C -RMN se registraron en un espectrómetro JEOL 400 MHz NMR, disolviendo la muestra en disolventes deuterados y usando la señal residual del disolvente como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Las reacciones fueron monitoreadas por cromatografía de capa fina usando placas Alugram® Xtra Sil G/UV254 (Macherey-Nagel; gel de sílice 60 Å, 0.25 mm de espesor sobre lámina de aluminio). Las purificaciones por cromatografía en placa preparativa se llevaron a cabo en placas de vidrio Alugram® Xtra Sil G/UV254 (Macherey-Nagel; gel de sílice 60 Å, 1 mm de espesor).

3.2.2. Materias primas empleadas para la derivatización química

Para la derivatización química se emplearon los diterpenoides azorellanol (**1**), ácido 13 α -hidroxi-mulin-11-en-20-oico (**2**) y ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**8**), previamente aislados de los extractos de *Azorella compacta* Phil. y *Mulinum crassifolium* Phil. (Herrera-Canché *et al.*, 2020; Molina-Salinas *et al.* 2010).

Reacción de desacetilación del azorellanol (1): En un matraz balón de 100 mL se agregaron 300 mg de **1** (0.86 mmol) disueltos en 24 mL de metanol (MeOH); la disolución se dejó en agitación 5 min y se añadieron 10 meq (8.62 mmol) de hidróxido de potasio (KOH). La reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se detuvo agregando 46 mL de H₂O; la mezcla se pasó a un embudo de separación y se extrajo con AcOEt (3x, 3:1, 1:1, 1:1), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio (Na₂SO₄) anhidro, el disolvente se filtró y se eliminó a presión reducida obteniéndose 400 mg del producto crudo hidrolizado que se purificó por cromatografía en columna de gravedad (diámetro de la columna 3 cm, altura de empaque 25 cm, sistema de elución hexano/AcOEt) que resultó en el aislamiento del 7-desacetil-azorellanol (**3**) (182 mg; 68%).

Oxidación del 7-desacetil-azorellanol (3): En un matraz balón de 100 mL se añadieron 140 mg de **3** (0.45 mmol) disueltos en 14 mL de cloroformo (CHCl₃) y se agregaron 5 meq (2.29 mmol) de dicromato de piridinio (PDC). La reacción se dejó en agitación constante y a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un papel filtro Whatman y el matraz balón se enjuagó con 20 mL de CHCl₃. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener 118 mg del producto crudo de oxidación que se purificó por cromatografía en columna flash (diámetro de la columna 2 cm, altura de empaque 30 cm, gel de sílice 200-400 mallas, sistema de elución hexano/AcOEt 9:1), obteniéndose 85 mg (61%) de azorellanona (**12**) (Figura 3.1).

Reacción de iminación de la azorellanona (12): Método A. En un matraz balón de 25 mL se agregaron 10 mg (0.032 mmol) de **12** disueltos en 4 mL de diclorometano (CH₂Cl₂), se añadieron 20 mol% de FeCl₃ hexahidratado, 5 meq de 4-metoxi-benzilamina (0.16 mmol) y Na₂SO₄ anhidro. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se calentó a reflujo durante 24 h, no observándose cambio en la materia prima. Método B. En un matraz balón de 25 mL se agregaron 10 mg (0.032 mmol) de **12** disueltos en 4 mL de CH₂Cl₂, se añadieron 20 mol% de ácido *p*-toluensulfónico y 5 meq de 4-metoxi-benzilamina (0.16 mmol). A la mezcla de reacción se le agregó Na₂SO₄ anhidro y se

dejó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente; posteriormente se calentó a reflujo durante 24 h, sin observarse cambio en la materia prima.

Reacción de amidación del ácido 13 α -hidroxi-mulin-11-en-20-oico (2). Método A: A un matraz balón de 50 mL se agregaron 60.4 mg de **2** (0.18 mmol) disueltos en 2 mL de DMF. Bajo atmósfera inerte de N₂ se añadieron 5 meq (0.94 mmoles) de cloruro de oxalilo (COCl)₂ y la mezcla de reacción se dejó en agitación constante durante 3 h a temperatura ambiente. Se eliminó el DMF a presión reducida obteniéndose el producto de reacción que se resuspendió en 2 mL de CH₂Cl₂ seco; bajo atmósfera inerte de N₂ se añadieron 10 meq (1.8 mmol) de trietilamina (Et₃N) y 10 meq (1.8 mmol) de metilamina hidrocioruro (MeNH₂·HCl) y la mezcla de reacción se dejó en agitación constante durante 19 h. La reacción se detuvo agregando H₂O y la mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (3 \times). Las trazas de agua de la fase orgánica se eliminaron con Na₂SO₄ anhidro; el disolvente se filtró y se eliminó a presión reducida, obteniéndose 61.3 mg de producto crudo de reacción que se purificó por cromatografía en capa delgada preparativa usando como sistema de elución una mezcla de éter de petróleo/acetona/MeOH (84:12:4). Se observaron dos bandas principales bajo luz UV (254 nm); se extrajeron los componentes de cada banda utilizando una mezcla de CH₂Cl₂/acetona (1:1). El análisis por ¹H-RMN del componente de la banda 1 (menor polaridad) se identificó como el ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**8**) (3.9 mg, 5%), en tanto que el componente de la banda 2 (mayor polaridad) se identificó como el *N*-metil-mulin,11,13-dien-20-carboxamida (**9**) (20 mg, 33%) (Figura 3.1).

N-metil-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (**9**): ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 5.62 (1H, d, J = 12.6 Hz, H-12), 5.59 (1H, dd, J = 11.2, 6.7 Hz, H-11); 5.59 (1H, d, J = 4.4 Hz, NH), 5.43 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-14), 2.81 (3H, d, J = 4.7 Hz, Me-1'), 2.66 (2H, m, H-7), 2.27 (1H, dd, J = 8.5, 4.5 Hz, H-9), 2.10 (1H, dd, J = 11.9, 4.4 Hz, H-6), 2.09 m (2H, m, H-2), 1.85 (1H, m, H-1), 1.85 (1H, m, H-10), 1.77 (3H, s, Me-16), 1.63 (1H, m, H-4), 1.51 (2H, d, J = 5.4, 2.5 Hz, H-15), 1.50 (2H, m, H-3), 0.97 (3H, d, J = 6.4 Hz, Me-18), 0.81 (3H, d, J = 6.4 Hz, Me-19), 0.81 (3H, s, Me-17).

¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ = 174.4 (C-20), 133.2 (C-11), 131.9 (C-13), 127.6 (C-12), 125.1 (C-14), 57.9 (C-5), 57.7 (C-3), 56.2 (C-10), 49.9 (C-9), 40.9 (C-15), 36.3 (C-7), 35.0 (C-8), 33.8 (C-6), 30.8 (C-4), 28.7 (C-2), 27.1 (C-17), 26.4 (C-16), 25.7 (C-1), 25.2 (C-1'), 23.2 (C-18), 22.6 (C-19).

Reacción de amidación del ácido 13 α -hidroxi-mulin-11-en-20-oico (2). Método B: A un matraz balón de 50 mL se agregaron 60.4 mg de **2** (0.18 mmol) disueltos en 3 mL de DMF. Bajo atmósfera inerte de N₂ se añadieron 2 meq (0.37 mmol) de MeNH₂·HCl, 4 meq de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) (0.75 mmol) y 1.5 meq (0.28 mmol) de hexafluorofosfato benzotriazol tetrametil uronio (HBTU). La mezcla de reacción se dejó en agitación constante durante 19 h. Sin embargo, no se observaron cambios en la materia prima, por lo que se detuvo la reacción.

Reacción de amidación del ácido 13 α -hidroxi-mulin-11-en-20-oico (2). Método C: En un matraz balón de 50 mL bajo atmósfera inerte de N₂, se añadieron 1 mL de CH₂Cl₂ seco, 5 meq (0.94 mmoles) de (COCl)₂ y 3 gotas de DMF como catalizador; la mezcla se dejó en agitación por un min y posteriormente se agregaron 10 meq de DIPEA (1.8 mmol), seguidos de 60.4 mg de **2** (0.18 mmol) disueltos en 2 mL de CH₂Cl₂:DMF (1:1). La mezcla de reacción se dejó en agitación constante bajo atmósfera inerte de N₂; después de 3 h se eliminó el disolvente a presión reducida, se añadieron 2 mL de CH₂Cl₂ seco, 10 meq de DIPEA (1.8 mmol) y 10 meq de MeNH₂ HCl (1.8 mmol) y la mezcla de reacción se dejó en agitación constante. Después de 19 h, se detuvo la reacción con H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x); se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente. Se obtuvieron 65 mg del producto crudo de reacción que se purificó por placa preparativa de TLC, empleando como sistema de elución éter de petróleo/AcOEt/MeOH (90:6:4). Una banda a R_f 0.46 observada bajo luz UV (254 nm) se extrajo con CH₂Cl₂:acetona (1:1) en agitación durante 20 min; el disolvente se filtró y se eliminó a presión reducida obteniéndose 26.4 mg (45%) del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**8**).

Reacción de amidación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (8). Método A: Se agregaron 50.1 mg de **8** (0.16 mmol) disueltos en 2 mL de CH₂Cl₂ seco a un matraz balón de 50 mL. Bajo atmósfera inerte de N₂ se añadieron 11.1 meq (1.77 mmoles) de (COCl)₂, se añadieron 2 gotas de DMF como catalizador y se dejó la mezcla de reacción en agitación constante a temperatura ambiente. Después de 3 h se eliminó el disolvente a presión reducida, se obtuvo el producto crudo de reacción con una consistencia oleosa y se resuspendió en 2 mL de CH₂Cl₂ seco. Bajo atmósfera inerte de N₂ se añadieron 20 meq (3.2 mmol) de Et₃N, 10 meq (1.6 mmol) de MeNH₂·HCl y la mezcla de reacción se dejó en agitación constante. Después de 24 h se detuvo la reacción con H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 47 mg de producto crudo de reacción que se purificó por placa preparativa de TLC, usando como sistema de elución éter de petróleo/AcOEt (80:20). Bajo luz UV (254 nm) se observó una banda con un R_f

de 0.47 que se extrajo con una mezcla de CH₂Cl₂/acetona (1:1); el disolvente se filtró y se eliminó a presión reducida, obteniéndose 16.7 mg (31%) del producto *N*-metil-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (**9**) (Figura 3.1).

Reacción de amidación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (8). Método B: Se agregaron 50.1 mg de **8** (0.16 mmol) disueltos en 2 mL de CH₂Cl₂ seco a un matraz balón de 50 mL. Bajo atmósfera inerte de N₂ se añadieron 11.1 meq (1.77 mmoles) de (COCl)₂, se añadieron 2 gotas de DMF como catalizador y se dejó la mezcla de reacción en agitación constante a temperatura ambiente. Después de 3 h se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose el producto de reacción con una consistencia oleosa que se resuspendió en 2 mL de CH₂Cl₂ seco. Se agregaron 20 meq (3.2 mmol) de Et₃N y 10 meq (1.6 mmol) de 4-metoxi-benzilamina y se dejó la reacción en agitación constante a temperatura ambiente. Después de 20 h se detuvo la reacción con H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x). La fase orgánica se lavó con HCl 10% (2x), H₂O (1x) y NaCl sat. (1x); el disolvente se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó obteniéndose 100 mg del producto crudo de reacción que se purificó por CCG (diámetro de la columna 2 cm, altura de empaque 20 cm, gel de sílice 200-400 mallas, sistema de elución éter de petróleo/acetona 96:4 hasta 94:6), obteniéndose 20.5 mg (29%) del producto *N*-4'-metoxi-bencil-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (**10**) (Figura 3.1).

N-4'-metoxi-bencil-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (**10**): ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.22 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 7.20 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3'), 6.85 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5'); 5.62 (1H, d, *J* = 12.2 Hz, H-12), 5.60 (1H, d, *J* = 5.6 Hz, NH), 5.99 (1H, dd, *J* = 11.1, 5.4 Hz, H-11), 5.43 (H, d, *J* = 8.4 Hz, H-14), 4.46 (1H, dd, *J* = 14.4, 5.5 Hz, H-7'), 4.33 (1H, dd, *J* = 14.4, 5.5 Hz, H-7'), 3.79 (3H, s, Me-8'), 2.68 (2H, m, H-7), 2.29 (1H, dd, *J* = 9.3, 5.5 Hz, H-9), 2.08 (1H, m, H-2), 2.08 (2H, m, H-6), 1.78 (3H, s, Me-16), 1.66 (1H, m, H-1), 1.66 (1H, m, H-10), 1.60 (1H, m, H-4), 1.50 (1H, m, H-3), 1.46 (2H, m, H-15), 0.94 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, Me-18), 0.82 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, Me-19), 0.82 (3H, s, Me-17).

Reacción de amidación del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (8). Método C: Se agregaron 50.1 mg de **8** (0.16 mmol) disueltos en 2 mL de CH₂Cl₂ seco a un matraz balón de 50 mL. Bajo atmósfera inerte de N₂ se añadieron 11.1 meq (1.77 mmoles) de (COCl)₂, se añadieron 2 gotas de DMF como catalizador y se dejó la mezcla de reacción en agitación constante a temperatura ambiente. Después de 3 h se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose el producto de reacción con una consistencia oleosa, se resuspendió en 2 mL de CH₂Cl₂ seco, se añadieron 20 meq (3.2 mmol) de Et₃N y 10 meq (1.6 mmol) de 3-aminometil-piridina. Después

de 20 h de agitación constante a temperatura ambiente se detuvo la reacción añadiendo H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x). La fase orgánica se lavó con HCl 10% (2x), H₂O (1x), NaCl sat. (1x), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó, obteniéndose 38 mg del producto crudo que se purificó por TLC preparativa empleando como sistema de elución éter de petróleo/AcOEt/MeOH (70:20:10). Se observó una banda de mayor intensidad bajo luz UV (254 nm) a un R_f de 0.46, se extrajo el producto con una mezcla de CH₂Cl₂/acetona (1:1); el disolvente se filtró y se eliminó a presión reducida obteniéndose 15.7 mg (24%) de *N*-3'-metil-pirido-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (**11**) (Figura 3.1).

N-3'-metil-pirido-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (**11**): ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 8.54 (1H, s, H-2'), 8.51 (1H, d, *J* = 6.1 Hz, H-6'), 7.66 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4'), 7.25 (1H, dd, *J* = 8.8, 5.0 Hz, H-5'); 5.62 (1H, d, *J* = 13.0 Hz, H-12), 5.60 (1H, d, *J* = 5.6 Hz, NH) 5.56 (1H, dd, *J* = 12.9, 5.8 Hz, H-11), 5.42 (1H, d, *J* = 10.4 Hz, H-14), 4.54 (1H, dd, *J* = 15.4, 6.2 Hz, H-7'), 4.41 (1H, dd, *J* = 15.2, 5.9 Hz, H-7'), 2.64 (1H, d, *J* = 17.7 Hz, H-7), 2.24 (1H, dd, *J* = 10.8, 5.8 Hz, H-9), 2.14 (1H, m, H-4), 2.14 (1H, m, H-2), 1.76 (3H, s, Me-16), 1.68 (1H, m, H-10), 1.67 (1H, m, H-1), 1.63 (1H, m, H-7), 1.49 (1H, dd, *J* = 7.5, 3.6 Hz, H-15), 1.48 (1H, m, H-6), 1.32 (1H, m, H-3), 0.94 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, Me-18), 0.79 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, Me-19), 0.78 (3H, s, Me-27).

¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ = 173.6 (C-20), 149.3 (C-2'), 148.3 (C-6'), 135.9 (C-4'), 134.8 (C-3'), 132.9 (C-11), 132.0 (C-13), 127.8 (C-12), 125.0 (C-14), 123.6 (C-5'), 57.9 (C-5), 57.8 (C-3), 56.1 (C-10), 50.0 (C-9), 40.9 (C-7'), 40.6 (C-15), 36.2 (C-7), 35.0 (C-8), 33.7 (C-6), 31.0 (C-4), 28.9 (C-2), 27.2 (C-17), 25.7 (C-16), 25.2 (C-1), 23.1 (C-18), 22.7 (C-19).

Reacción de reducción de N'-metil-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (**9**). Método A: En un matraz balón de 50 mL se agregaron 20 mg (0.06 mmol) de **9**, se disolvió en 1 mL de tetrahidrofurano (THF), se añadieron 3 meq de hidruro de litio y aluminio (LiAlH₄) (0.18 mmol) y se dejó en agitación constante a TA durante 18 h. Después de este tiempo no se observó cambio en la materia prima. Método B: En un matraz balón de 50 mL bajo atmósfera inerte de N₂ se añadieron 10 meq de LiAlH₄ (0.3 mmol) y 2 mL de THF (seco); la mezcla se dejó en agitación constante durante 10 min y posteriormente se añadieron 12.1 mg (0.03 mmol) de **9**. Se dejó la mezcla de reacción en agitación durante 30 min y después se colocó a reflujo durante 6 h. Después de este tiempo se dejó en agitación la reacción durante 18 h a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte de N₂. Sin embargo, no se observaron cambios en el material de partida. Se introdujo la mezcla de reacción al equipo de microondas, añadiendo 2 mL de THF seco y exceso de LiAlH₄. Las condiciones del equipo de microondas fueron:

alcance de temperatura a 90 °C en 3 min; se mantuvo la temperatura por 20 min. Pasado este tiempo, no se observaron cambios en el material de partida, por lo que se incrementó la temperatura del equipo a 110 °C en 3 min y se mantuvo durante 30 min. Después de este tiempo no se observó cambio en el material de partida.

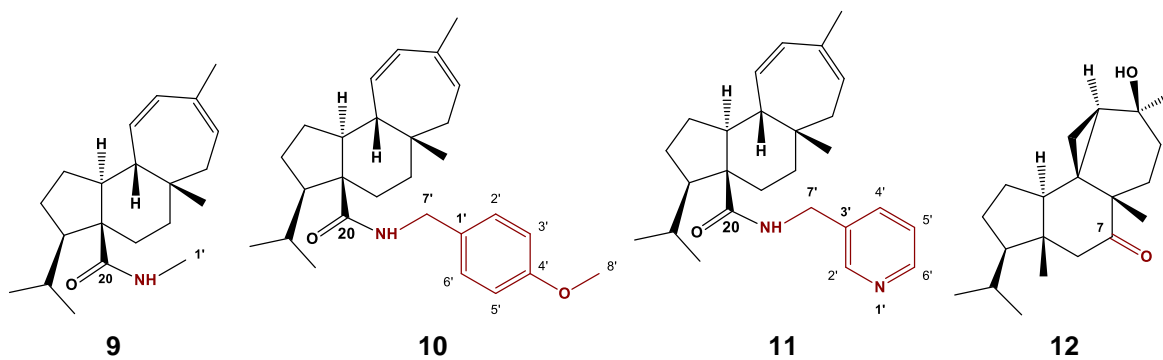


Figura 3.1. Productos obtenidos por derivatización química (en rojo se indican las modificaciones de cada producto).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la obtención de aminas secundarias se propuso utilizar el 7-desacetil-azorellanol (**3**) como materia prima. Para ello, se realizó la oxidación del hidroxilo en C-7 empleando el dicromato de piridinio (PDC) como agente oxidante. El producto obtenido, correspondiente a la azorellanona (**12**), se obtuvo con un 61% de rendimiento, similar a lo reportado para la derivatización química del 13-*epi*-7-desacetil-azorellanol usando como agente oxidante el clorocromato de piridinio (PCC o reactivo de Collins) (Bórquez *et al.*, 2016). La identificación de la azorellanona (**12**) se realizó mediante la comparación del tiempo de retención (t_R 30.14 min) por CG y su patrón de fragmentación ($[M-H_2O]^+$: m/z 286.3) con un estándar de **12**.

Posterior a la obtención del producto **12** se propusieron dos metodologías para la formación de la imina correspondiente, empleando dos catalizadores de reacción diferentes. En primera instancia se empleó el $FeCl_3$ hexahidratado, debido a que se ha reportado su uso como activador de grupos carbonilos (Fan *et al.*, 2015); sin embargo, la esperada formación de la imina bajo las condiciones de reacción empleadas no se llevó a cabo. El segundo catalizador que se evaluó fue el ácido *p*-toluensulfónico, comúnmente utilizado para la formación de iminas debido a sus propiedades para desplazar el equilibrio de la reacción hacia este último grupo

funcional (Fan *et al.*, 2015). Sin embargo, nuevamente, la obtención de la imina esperada no fue exitosa, muy posiblemente debido a la presencia de agua en la mezcla de reacción que provocó que el equilibrio de la reacción se desplazara hacia el carbonilo.

Por otro lado, para la obtención de amidas de los mulinanos ácido 13 α -hidroxi-mulin-11-en-20-oico (**2**) y ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**8**) se propuso la formación inicial de intermediarios clorados en C-20 utilizando cloruro de oxalilo, seguido de la reacción de amidación con metil amina. Como resultado de estas reacciones se obtuvo la misma *N*-metil-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (**9**) como producto de derivatización de los mulinanos **2** y **8**, ante la deshidratación del alcohol terciario en **2**.

La formación de la amida **9** se confirmó mediante el análisis de sus datos espectroscópicos de ^1H - y ^{13}C -RMN. El espectro de ^1H -RMN mostró dos señales adicionales con respecto a los espectros de los mulinanos **2** y **8**, un doblete a δ_{H} 2.81 ($J = 4.7$ Hz) correspondiente al metilo C-1' y otro doblete asignado al protón del grupo amino a δ_{H} 5.59 ($J = 4.4$ Hz). Asimismo, el espectro de ^{13}C -RMN de **9** mostró la señal del metilo en C-1' a δ_{C} 25.7. Cabe mencionar que la intención al llevar a cabo la derivatización química de **2** no era obtener la amida **9**, pues se esperaba conservar el grupo OH en C-13. Sin embargo, y a pesar de que se propusieron alternativas de reacción para evitar la deshidratación del alcohol en C-13, p. ej. mediante el uso de reactivos como HBTU o DIPEA, no se logró obtener de manera exitosa el producto deseado.

Una vez establecida la ruta semisintética para la obtención de amidas empleando como materia prima el mulinano **8**, se utilizaron dos aminas aromáticas diferentes, la 4-metoxi-benzilamina y la 3-aminometil-piridina, para obtener las amidas **10** y **11**, respectivamente. El espectro de ^1H -RMN del producto **10** mostró señales de protones aromáticos a δ_{H} 6.86 y 6.87 (d, $J = 8.7$ Hz), correspondientes a los protones H-3' y H-5', respectivamente; así como las señales a δ_{H} 7.20 y 7.22 (d, $J = 8.7$ Hz), correspondientes a H-2' y H-6'. Asimismo, se observaron las señales del metilo de grupo metoxilo (OCH₃) como un singulete a δ_{H} 3.79 y las dos señales del metileno de la posición H-7' a δ_{H} 4.46 y 4.33 (dd, $J = 14.4, 5.5$ Hz). Por último, la señal del grupo amino NH se observó a δ_{H} 5.60 (d, $J = 5.6$ Hz), confirmando la identificación de la *N*-4'-metoxi-bencil-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (**10**).

Adicionalmente se confirmó la incorporación de la 3-aminometil-piridina al esqueleto del mulinano **8** en la posición C-20, mediante el análisis de los datos espectroscópicos de ^1H - y ^{13}C -RMN de **11**. El espectro de ^1H -RMN mostró las señales de los cuatro protones aromáticos

esperados a δ_{H} 8.54 (s, H-2'), 8.51 (d, $J = 6.1$ Hz, H-6'), 7.66 (d, $J = 8.0$ Hz) y 7.25 (dd, $J = 8.8$, 5.0 Hz), en tanto que la señal del grupo amino se observó a δ_{H} 5.60 (d, $J = 5.6$ Hz) y las señales del metileno H-7' a δ_{H} 4.54 (dd, $J = 15.4$, 6.2 Hz) y δ_{H} 4.41 (dd, $J = 15.2$, 5.9 Hz). El espectro de ^{13}C -RMN de **11** mostró la presencia de cinco carbonos aromáticos (C-2 – C-6') a δ_{C} 149.3, 134.8, 135.9, 123.6 y 148.3 y la señal de C7' a 40.9, confirmándose así la identificación de *N*-3'-metil-pirido-mulin-11,13-dien-20-carboxamida (**11**).

3.4. CONCLUSIONES

La formación de los intermediarios clorados de los diterpenoides mulinano fueron efectivos para la formación de amidas dada su reactividad. La metodología descrita para la obtención de este tipo de compuestos brinda una nueva alternativa para la semisíntesis de los diterpenoides mulinano y, asimismo, evaluar su potencial contra cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis*.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

La biotransformación de los diterpenoides azorellanol (**1**), ácido 13 α -hidroxi-mulin-11-en-20-oico (**2**), 7-desacetil-azorellanol (**3**) y ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**8**), se llevó a cabo en medios de cultivo IOWA. Este medio de cultivo ha sido previamente reportado para la biotransformación de diterpenoides de esqueleto beyerano y mulinano (Herrera-Canché *et al.*, 2020; Chang *et al.*, 2006). El medio IOWA es un medio de cultivo complejo, dado que posee componentes químicos variables de origen animal (peptona) o vegetal, que incluyen extracto de levadura y harina de soya, brindando los requerimientos como carbono, nitrógeno y vitaminas, que promueven el crecimiento de hongos y bacterias (Willey *et al.*, 2008; Tortora *et al.*, 2007). Asimismo, todos los procesos de biotransformación se realizaron bajo parámetros controlados con el propósito de hacer los escalamientos de forma reproducible. Estos parámetros incluyeron la agitación, concentración del inóculo inicial, pH inicial y temperatura de incubación. Estos parámetros de cultivo en los procesos de biotransformación son considerados en la mayoría de los reportes encontrados en la literatura, dada su facilidad de ser controladas y a su bajo costo (De Carvalho y Da Fonseca, 2005).

La biotransformación del diterpenoide **1** en cultivos de *N. iowensis*, indicó la formación del producto 7-desacetil-azorellanol (**3**) a las 144 h de incubación. El producto **3** ha sido aislado previamente del extracto de baja polaridad de *A. compacta* y se le atribuyen propiedades biológicas como toxoplasmacida (Loyola *et al.*, 2001), antiinflamatoria (Delporte *et al.*, 2003), analgésica (Bórquez *et al.*, 2016) y antituberculosa (Molina-Salinas *et al.*, 2010a). Por otro lado, la bacteria *N. iowensis* ha mostrado su capacidad de modificación en sustratos como diterpenoides de esqueleto abietano (Hosny *et al.*, 2002) y triterpenoides de esqueleto oleanano y ursano (Zhang *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2004), catalizando rearrreglos así como reacciones de oxidación, es decir, la formación de grupos hidroxilo (OH), epóxido y cetona.

Por otro lado, la biotransformación de **1** por el hongo *P. notatum*, tuvo como resultado la obtención de dos productos nuevos, el 4,16-dihidroxi-azorellanol (**4**) y 2 β ,16-dihidroxi-14-en-azorellanol (**5**) después de 48 h de incubación. Se pudo notar la capacidad del hongo para catalizar reacciones de oxidación en diferentes partes del sustrato formando alcoholes (OH) terciarios o secundarios. Esta particularidad le brindó un aumento en la polaridad de los

productos de biotransformación respecto al sustrato **1**. Se ha reportado que *P. notatum* cataliza la oxidación de diterpenoides de esqueleto beyerano formando grupos hidroxilo (OH) (De Oliveira *et al.*, 1999). Es importante destacar la capacidad del hongo *P. notatum* para modificar en su totalidad al sustrato **1** y en periodos cortos de incubación (48 h), dado que se ha observado esta tendencia en la biotransformación de la testosterona para catalizar la formación de la testolactona después de 72 h de incubación (Figura 4.1) (Hanson *et al.*, 1994).

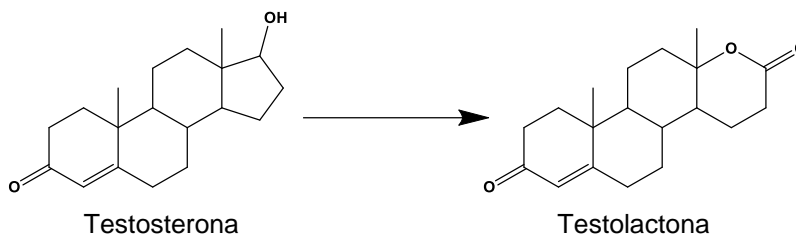


Figura 4.1. Biotransformación de la testosterona por *P. notatum*.

El análisis de los perfiles cromatográficos por CG-EM de los extractos crudos obtenidos durante el escrutinio de la biotransformación del 7-desacetil azorellanol (**3**) indicó que este sustrato fue modificado por los tres hongos empleados en este estudio. *A. alliaceus* generó dos productos de biotransformación a las 48 h de incubación (t_R 31.66 y 32.76 min), *M. circinelloides* cinco productos (t_R 31.42, 32.76, 32.93, 33.13 y 34.41 min) a las 96 h y *P. notatum* dos productos (t_R 30.9 y 31.73 min) a las 72 h. Todos los productos mostraron un incremento en su polaridad con respecto al sustrato **3** (t_R 30.35 min), por lo que se sugiere la incorporación de uno o más grupos hidroxilo en diferentes partes del sustrato dada la capacidad de *A. alliaceus*, *M. circinelloides* y *P. notatum* para catalizar reacciones de oxidación. Asimismo, se pudo notar que *A. alliaceus* y *M. circinelloides* generaron producto de reacción con el mismo t_R (32.76 min), pero a diferentes tiempos de incubación (48 y 96 h, respectivamente); el patrón de fragmentación por EM de ambos productos mostró un fragmento a m/z 304.3, sugiriendo que se trata del mismo producto. Esta tendencia se ha reportado previamente entre los hongos *M. circinelloides* y *Mortierella isabelina* en la biotransformación del diterpenoide ácido deshidroabiético dando lugar al mismo producto oxidado (Figura 4.2). Asimismo, los hongos *M. plumbeus*, *Cephalosporium aphidicola* y *Cunninghamella elegans* producen los derivados 3 β -hidroxi-esclareol y 18 α -hidroxi-esclareol (Figura 4.3) (Bartmanska *et al.*, 2005; Mitsukura *et al.*, 2005).

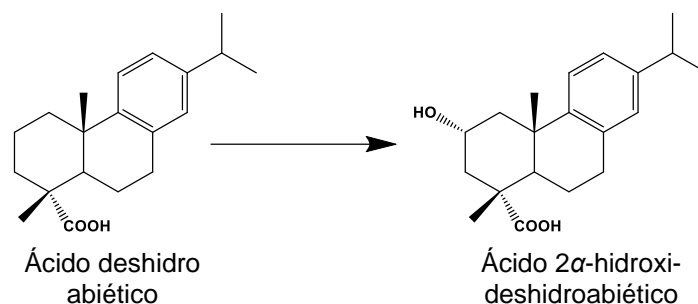


Figura 4.2. Biotransformación del ácido deshidroabiético en cultivos de *M. circinelloides* y *M. isabelina*.

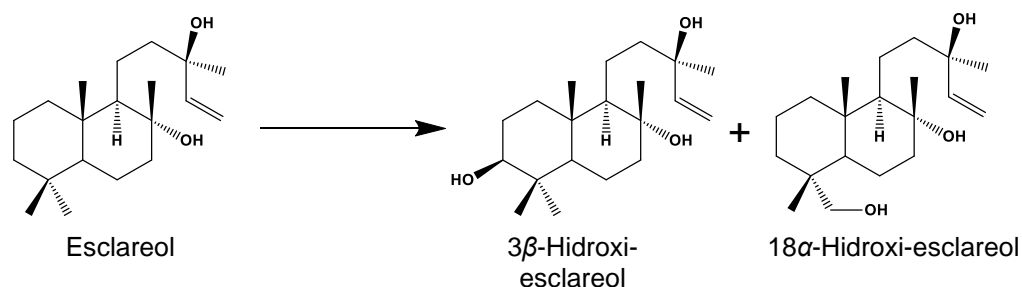


Figura 4.3. Biotransformación del esclareol por *M. plumbeus*, *C. elegans* y *C. aphidicola*.

Por otro lado, el diterpenoide ácido 13 α -hidroximulin-11-en-20-oico (**2**) únicamente fue modificado por *P. notatum* a las 192 h de incubación, dando lugar a la identificación del producto ya reportado ácido 13 β ,14 β -dihidroxi-mulin-11-en-20-oico (**6**) y el producto nuevo ácido 13 α ,14 β ,16-trihidroxi-11-en-mulin-20-oico (**7**). Con estos resultados se confirma la capacidad de *P. notatum* para catalizar reacciones de oxidación, formando grupos hidroxilo (OH) en diferentes partes del sustrato, principalmente la modificación de carbonos inactivados como el C-14 y el C-16; es importante enfatizar que estas posiciones presentan una gran dificultad para ser modificadas por transformación química, debido a la complejidad que resulta modificar esos sitios (Birolli *et al.*, 2009).

Es notable observar que todos los productos de biotransformación identificados hasta el momento, poseen grupos OH en diferentes partes de su estructura, sin embargo, la posición C-

16, tanto de los diterpenoides mulinano como azorellano, muestra susceptibilidad a la biotransformación con los diferentes microorganismos, incluso a distintos tiempos de incubación, oxidando el metilo C-16 para dar lugar a un alcohol secundario. Esta peculiaridad puede estar sujeta a la relación filogenética que tienen los microorganismos empleados en este estudio, ya que, a pesar de pertenecer a diferentes familias y dominios, catalizan la formación del mismo grupo funcional, como es el caso de *P. notatum* y *A. alliaceus*, ambos microorganismos pertenecen a la clase Eurotiomycetes, y a pesar, de que *A. alliaceus* y *M. circinelloides* pertenecen a diferentes divisiones, Ascomycota y Mucoromycota, respectivamente, han mostrado la capacidad de catalizar la formación de grupos OH en C-16 del esqueleto mulinano (Figura 4.4) (Spatafora *et al.*, 2017).

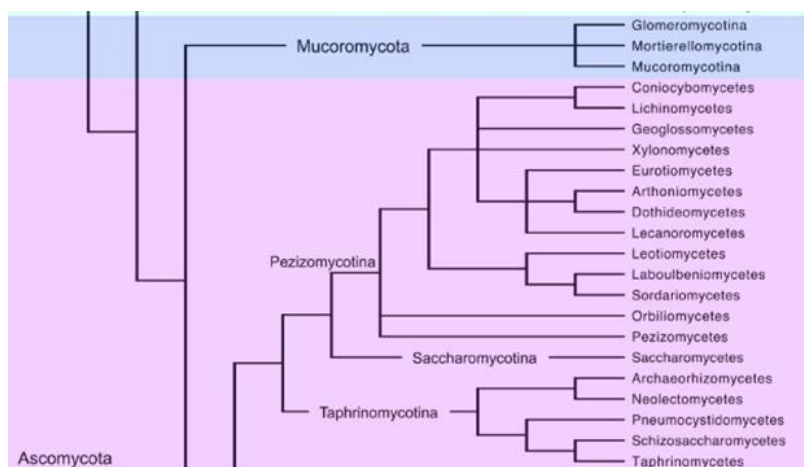


Figura 4.4. Relación filogenética de los hongos.

De forma general, los productos de biotransformación identificados hasta el momento (4-7) (Figura 2.1), muestran la formación de grupos funcionales como OH, incluso la formación de un doble enlace. Todas estas modificaciones son el resultado de la capacidad que tienen los microorganismos para la biotransformación de xenobióticos, llevando a cabo reacciones que generan un ligero aumento en la polaridad de los compuestos. Este tipo de modificaciones corresponden a la fase I de la biotransformación de xenobióticos, y está mediada por reacciones de monooxigenasas que involucran reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, teniendo como resultado la incorporación de grupos OH, NH₂, SH o COOH, generando un aumento en la polaridad (Huarte-Bonnet *et al.*, 2017; Bianchini *et al.*, 2015).

Las monooxigenasas pertenecen al complejo enzimático citocromo P450 (CYP) y, a su vez, están estrechamente relacionadas con la adaptación de los microorganismos hacia su entorno debido al estrés ambiental, desarrollando mecanismos de defensa celular, que incluyen la desintoxicación de compuestos exógenos de carácter hidrófobo principalmente (Shin *et al.*, 2018). Esta estrategia producida por microorganismos ha permitido la evolución del CYP permitiendo la modificación de un gran número de xenobióticos y, por lo tanto, ha resultado atractivo para la biotransformación de un gran número de moléculas de importancia (Moktali *et al.*, 2012). Además, los CYP tienen la capacidad de catalizar reacciones regioespecíficas y regioselectivas de oxidación en hidrocarburos no activados, en este sentido, la biotransformación resulta atractiva (Durairaj *et al.*, 2016). Se ha reportado que monooxigenasas como el CYP52 permiten la oxidación de grupos alquilo. Este complejo enzimático se ha encontrado en los hongos *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Metharizium anisoplae* y *Penicillium chrysogenum* (Huarte-Bonnet *et al.*, 2017).

En cuanto a la derivatización semisintética, se ha reportado el intento de obtener derivados nitrogenados a partir de la derivatización del ácido carboxílico de la posición C-20 del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**8**) (Martínez, 2017), sin embargo, las metodologías propuestas no fueron exitosas a pesar de que se menciona que no existe ningún impedimento estérico que pueda interferir en la obtención de amidas. La obtención del cloruro de ácido del mulinano **8** reportada, fue una pauta muy importante para proponer una nueva estrategia de obtención de amidas, y dado que el cloruro de ácido es el intermediario más reactivo comparado con el COOH de la posición C-20, se planteó obtener dicho derivado (Martínez, 2017) (Figura 4.5).

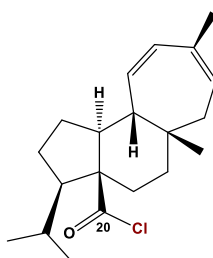


Figura 4.5. Estructura química del intermediario cloruro de ácido mulin-11,13-dien-20-oilo.

Por lo tanto, se empleó el uso de tres aminas (metil-amina, 4-metoxi-benzilamina, 3-aminometil-piridina) a incorporar en exceso, complementando la reacción con exceso de Et₃N dada su

capacidad de captar el grupo saliente Cl^- y favorecer el ataque del carbonilo por el par de electrones del grupo amino. Esta estrategia resultó exitosa y permitió su aplicación para la incorporación de diferentes aminos en el esqueleto mulinano **8**. A pesar de que resultó favorecedora la obtención de amidas del mulinano **8**, no se logró obtener la amida correspondiente del ácido 13 α -hidroxi-mulin-11-en-20-oico (**2**), dado que se deshidrató el OH de la posición C-13 y dio lugar a la formación del doble enlace en C-13/C-14 característico del mulinano **8**.

Por último, la evaluación de la actividad antimicobacteriana contra cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis* actualmente se encuentra en proceso. Este trabajo se está realizando en colaboración con la Dra. María del Rayo Camacho Corona en la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.2. CONCLUSIONES GENERALES

Todos los diterpenoides (**1**, **2**, **3** y **8**) utilizados como sustrato han sido susceptibles a la modificación mediante biotransformación, siendo el 7-desacetil-azorellanol (**3**) el sustrato transformado por tres microorganismos (*A. alliaceus*, *M. circinelloides* y *P. notatum*), caso contrario al ácido 13 α -hidroxi-mulin-11-en-20-oico (**2**), el cual sólo fue modificado por *P. notatum*.

Todos los productos de biotransformación mostraron un aumento en su polaridad con respecto a los sustratos. Esta característica se debe a la incorporación de uno o más grupos hidroxilo en el esqueleto hidrocarbonado.

De los microorganismos utilizados hasta el momento para los diferentes procesos de biotransformación, el hongo *P. notatum* ha demostrado una mayor capacidad de modificación, puesto que ha transformado a tres sustratos en su totalidad en periodos cortos de incubación (48 h).

La posición del metilo C-16 tanto en el esqueleto mulinano y azorellano ha resultado susceptible a la modificación por *A. alliaceus*, *M. circinelloides* y *P. notatum*, catalizando la oxidación de este grupo de forma regioselectiva.

Se reporta por primera vez la biotransformación del azorellanol (**1**), ácido 13 α -hidroxi-mulin-11-en-20-oico (**2**) y 7-desacetil-azorellanol (**3**) en cultivos de *P. notatum*, catalizando reacciones de oxidación formando grupos hidroxilados en diferentes partes de los sustratos, principalmente en carbonos inactivados.

La metodología propuesta para la obtención de amidas a partir de la derivatización química del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**8**) brinda una pauta importante para la incorporación de diferentes compuestos nitrogenados e incrementar los derivados semisintéticos y con ello evaluar su potencial anti-TB.

4.3. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se plantean cinco perspectivas principales. El primero es continuar con la identificación de los productos de biotransformación del 7-desacetil-azorellanol (**3**), realizando el escalamiento con los microorganismos *A. alliaceus*, *M. circinelloides* y *P. notatum*.

El segundo es continuar con la exploración de la biotransformación de los diterpenoides mulinano y azorellano ampliando el uso de microorganismos, ya que hasta el momento los derivados empleando esta estrategia son limitadas. Es importante enfatizar la importancia de la biotransformación, dado que se han obtenido compuestos novedosos.

El tercero es analizar el perfil de proteínas intra y extracelulares de los procesos de biotransformación, como por ejemplo de la modificación de los diterpenoides **1** y **2**, en cultivos de *P. notatum*, empleando técnicas como HPLC-MS para la identificación de las proteínas.

El cuarto es retomar la derivatización química del diterpenoide mulinano **8**, es decir, aumentar la gama de derivados nitrogenados en C-20. Asimismo, proponer metodologías para la obtención de aminas secundarias en C-7 del diterpenoide azorellano. De igual manera, considerar la posibilidad de modificar el diterpenoide mulinano **3**, proponiendo metodologías para la protección del grupo funcional OH en C-13.

Por último, interpretar los resultados de la actividad antimicobacteriana tanto de los productos de biotransformación como los de derivatización química y proponer una posible relación-estructura actividad de todos los diterpenoides mulinano y azorellano, así como de sus derivados reportados hasta el momento.

4.4. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Malek, S., Bastien, J.W., Mahler, W.F., Jia, Q., Reinecke, M.G., Robinson Jr., W.E., Shu, Y.H., 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.
- Alfarra, H.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., González, J. (2003). Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 413-418.
- Areche, C., Rojas-Alvarez, F., Campos-Briones, C., Lima, C., Pérez, E.G., Sepúlveda, B. (2013). Further mulinane diterpenoids from *Azorella compacta*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65, 1231-1238.
- Areche, C., Loyola, L.A., Borquez, J., Rovirosa, J., 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.
- Arroyo, M., De la Mata, I., García, J.L., Barredo, J.L. (2017). Biocatalysis for industrial production of active pharmaceutical ingredients (APIs), en: *Biotechnology of Microbial Enzymes*, Brahmachari, G. (Ed.). Academic Press, London, pp. 451-473.
- Avilés, E., Rodríguez, A.D. (2010). Monamphilectine A, a potent antimalarial β -lactam from marine sponge *Hymeniacidon* sp: isolation, structure, semisynthesis, and bioactivity. *Organic Letters*, 12, 5290-5293.
- Bartmańska, A., Dmochowska-Gładysz, J., Huszcza, E. (2005). Steroids' transformations in *Penicillium notatum* culture. *Steroids*, 70, 193-198.
- Beiras, R. (2018). *Marine pollution: marine ecotoxicology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 205-214.
- Bhatti, H.N., Khera, R.A. (2014). Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research*, 16, 70-104.

-
- Bianchini, L.F., Arruda, M.F., Vieira, S.R., Campelo, P., Grégio, A.M., Rosa, E.A. (2015). Microbial biotransformation to obtain new antifungals. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1433.
- Biolli, W.G., Ferreira, I.M., Alvarenga, N., Santos, D.D.A., Matos, I.L.D., Comasseto, J.V., Porto, A.L.M. (2015). Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. *Biotechnology Advances*, 33, 481–510.
- Bunyapaiboonsri, T., Veeranondha, S., Boonruangprapa, T., Somrithipol, S. (2008). Ramiferin, a bisphenol-sesquiterpene from the fungus *Kionochaeta ramifera* BCC 7585. *Phytochemistry Letters*, 1, 204-206.
- Bórquez, J., Bartolucci, N.L., Echiburú-Chau, C., Winterhalter, P., Vallejos, J., Jerz, G., 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.
- Bórquez, J., Loyola, L.A., Morales, G., San-Martín, A., Roldan, R., Marquez, N., Muñoz, E. (2007). Azorellane diterpenoids from *Laretia acaulis* inhibit nuclear factor-kappa B activity. *Phytotherapy Research*, 21, 1082-1086.
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 620-630.
- Brown Jr., E.G., Dooley, D.S., Smith, K. (2016). Drug Resistant Tuberculosis: A Survival Guide for Clinicians. Curry International Tuberculosis Center, California, pp. 65-70.
- Cambier, C.J., Falkow, S., Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 159, 1497-1509.
- Cantrell, C.L. (1998). Antimycobacterial natural products from higher plants. Department of Chemistry, Baton Rouge, LA: Louisiana State University. pp. 173.
- Chang, S.F., Yang, L.M., Hsu, F.L., Hsu, J.Y., Liaw, J.H., Lin, S.J. (2006). Transformation of steviol-16 α ,17-epoxide by *Streptomyces griseus* and *Cunninghamella bainieri*. *Journal of Natural Products*, 69, 1450-1455.

-
- Chen, J.J., Chou, E.T., Peng, C.F., Chen, I.S., Yang, S.Z., Huang, H.Y. (2007). Novel epoxyfuranoid lignans and antitubercular constituents from the leaves of *Beilschmiedia tsangii*. *Planta Medica*, 73, 567-571.
- Cheng, Z.H., Yu, B.Y., Cordell, G.A., 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.
- Chin, Y.W., Balunas, M.J., Chai, H.B., Kinghorn, A.D. (2006). Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*, 8, E239-E253.
- Choudhary, M.I., Mohammad, M.Y., Musharraf, S.G., Onajobi, I., Mohammad, A., Anis, I., Shah, M.R., Atta-ur-Rahman (2013). Biotransformation of clerodane diterpenoids by *Rhizopus stolonifer* and antibacterial activity of resulting metabolites. *Phytochemistry*, 90, 56-61.
- Cruz, A., Fernandes, P., Cabral, J.M.S., Pinheiro, H.M. (2001). Whole-cell bioconversion of β -sitosterol in aqueous-organic two-phase systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 579-585.
- Das S., Rosazza J.P.N. (2006). Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *Journal of Natural Products*, 69, 499-508.
- D'Ambrosio, L., Centis, R., Sotgiu, G., Pontali, E., Spanevello, A., Migliori, G.B. (2015). New anti-tuberculosis drugs and regimens: 2015 update. *ERJ Open Research*, 1, 00010-2015.
- De Carvalho, C.C.C.R., Da Fonseca, M.M.R. (2006). Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances*, 24, 134-142.
- De Oliveira, B.H., Dos Santos, M.C., Leal, P.C. (1999). Biotransformation of the diterpenoid, isosteviol, by *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus arrhizus*. *Phytochemistry*, 51, 737-741.
- Delogu, G., Sali, M., Fadda, G. (2013). The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 5, e2013070.

- Delporte, C., Backhouse, N., Salinas, P., San-Martín, A., Bórquez, J., Loyola, A. (2003). Pharmaco-toxicological study of diterpenoids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11, 1187–1190.
- Dewick, P.M. (2009). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex. pp. 1256.
- Dias, D.A., Urban, S., Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2, 303-336.
- Durairaj, P., Hur, J.S., Yun, H. (2016). Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microbial Cell Factories*, 15, 1-16.
- Dzul-Beh, A.D.J., Uc-Cachón, A.H., Bórquez, J., Loyola, L.A., Peña-Rodríguez, L.M., Molina-Salinas, G.M. (2020) Mulinane-and azorellane-type diterpenoids: A systematic review of their biosynthesis, chemistry, and pharmacology. *Biomolecules*, 10, 1333.
- Fan, X., Zhu, H.B., Lv, H., Guo, K., Guan, Y.H., Cui, X.M., An, B., Pu, Y.L. (2015). Assembly of homoallylamine derivatives through iron-catalyzed three-component sulfonamidoallylation reaction. *Applied Organometallic Chemistry*, 29, 588-592.
- Fanlo, P., Tiberio, G. (2007). Tuberculosis extrapulmonar. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30, 143-162.
- Forrellad, M.A., Klepp, L.I., Gioffré, A., Sabio y Garcia, J., Morbidoni, H.R., Santangelo, M.D.L. P., Cataldi, A.A., Bigi, F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4, 3-66.
- Fraga, B.M., Bressa, C., González-Vallejo, V., González, P., Guillermo, R. (2012). Biotransformation of *ent*-kaur-16-ene and *ent*-trachylobane 7 β -acetoxy derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*). *Phytochemistry*, 81, 60-70.
- Fraga, B.M., González, P., González-Vallejo, V., Guillermo, R., Díaz, L.N. (2010). Biotransformation of 7 α -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., 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., Suárez, S. (2005). Biotransformation of 7-oxo-*ent*-kaur-16-ene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. *Tetrahedron*, 61, 5623-5632.
- Fuentes, N.L., Sagua, H., Morales, G., Borquez, J., Martín, A.S., Soto, J., 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., Rivera, G. (2012). Recent advances in antitubercular natural products. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 1-23.
- Gopishetty, S.R., Louie, M.T., Subramanian, M.V. (2012). Microbial transformations of natural products, en *Phytochemistry and Pharmacognosy*, Pezzuto, J.M., Kato, M.J. (Eds.). EOLSS, United Kingdom, pp. 149-176.
- Guzman, J.D., Montes-Rincón, X., Ribón, W. (2013). Research and development of new drugs against tuberculosis, en: *Tuberculosis-Current Issues in Diagnosis and Management*, Mahboub, B., Vats, M. (Eds.). InTech, United Kingdom, pp. 331-358.
- Hanson, J.R., Hitchcock, P.B., Nasir, H., Truneh, A. (1994). The biotransformation of the diterpenoid, sclareol, by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 36, 903-906.
- Haridy, M.S.A., Ahmed, A.A.A., Doe, M. (2006). Microbiological transformation of two labdane diterpenes, the main constituents of *Madia* species, by two fungi. *Phytochemistry*, 67, 1455-1459.
- 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., 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.
- Herrera-Canché, S.G., Sánchez-González, M., Loyola, L.A., Bórquez, J., García-Sosa, K., Peña-Rodríguez, L.M. (2020). Biotransformation of a mulinane diterpenoid by

-
- Aspergillus alliaceus* and *Mucor circinelloides*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38, 1-6.
- Herrera, S. (2018). Búsqueda de nuevos agentes antituberculosos mediante la biotransformación de terpenoides con potencial antituberculoso. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México. pp. 31-48.
- Hoagland, D.T., Liu, J., Lee, R.B., Lee, R.E. (2016). New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 102, 55-72.
- Hosny, M., Johnson, H.A., Ueltschy, A.K., Rosazza, J P. (2002). Oxidation, reduction, and methylation of carnosic acid by *Nocardia*. *Journal of Natural Products*, 65, 1266-1269.
- Houghton, J.L., Green, K.D., Pricer, R.E., Mayhoub, A.S., Garneau-Tsodikova, S. (2013a). Unexpected N-acetylation of capreomycin by mycobacterial Eis enzymes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 800-805.
- Houghton, J.L., Biswas, T., Chen, W., Tsodikov, O.V., Garneau-Tsodikova, S. (2013b). Chemical and structural insights into the regioversatility of the aminoglycoside acetyltransferase Eis. *ChemBioChem*, 14, 2127-2135.
- Hu, S., Tian, X., Zhu, W., 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.
- Huarte-Bonnet, C., Kumar, S., Saparrat, M.C., Girotti, J.R., Santana, M., Hallsworth, J.E., Pedrini, N. (2018). Insights into hydrocarbon assimilation by eurotial and hypocrealean fungi: roles for CYP52 and CYP53 clans of cytochrome P450 genes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184, 1047-1060.
- Klopper, M., Warren, R.M., Hayes, C., Van Pittius, N.C.G., Streicher, E.M., Müller, B., Van Helden, P.D. (2013). Emergence and spread of extensively and totally drug-resistant tuberculosis, South Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 449.
- Koch, A., Mizrahi, V. (2018). *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*, 26, 555-556.

-
- Kolyva, A.S., Karakousis, P.C. (2012). Old and new TB drugs: mechanisms of action and resistance, en: *Understanding Tuberculosis—New Approaches to Fighting Against Drug Resistance*. Europe: InTech, pp. 209-232.
- Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J., Andries, K. (2011). The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, 469, 483.
- Kumar, S.V., Saravanan, D., Kumar, B., Jayakumar, A. (2014). An update on prodrugs from natural products. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, S54-S59.
- Lekphrom, R., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K. (2010). Bioactive diterpenes from the aerial parts of *Anisochilus harmandii*. *Planta Medica*, 76, 726-728.
- Lekphrom, R., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K. (2009). Bioactive styryllactones and alkaloid from flowers of *Goniothalamus laoticus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 47-50.
- Liu, Y.T., Li, L.P., Xie, J.H., Zhou, Q.L. (2017). Divergent asymmetric total synthesis of mulinane diterpenoids. *Angewandte Chemie International Edition*, 56, 12708-12711.
- Liu, X., Chen, C., He, W., Huang, P., Liu, M., Wang, Q., Guo, H., Bolla, K., Lu, Y., Song, F., Dai, H., Liu, M., Zhang, L. (2012). Exploring anti-TB leads from natural products library originated from marine microbes and medicinal plants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102, 447-461.
- Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., Araya, J., González, J., Neira, I., Sagua, H., San-Martín, A. (2002). Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonocidal activities. *Phytochemistry*, 56, 177-180.
- Loyola, L.A., Borquez, J., Morales, G., Araya, J., Gonzalez, J., Neira, I., Sagua, H., San-Martin, A. (2000). Azorellane diterpenoids from *Laretia acaulis*, and its toxoplasmodicidal activity. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 46, 9-13.
- Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San-Martín, A., Manríquez, V., Wittke, O. (1998). Azorellanol: a diterpenoid with a new carbon skeleton from *Azorella compacta*. *Tetrahedron*, 54, 15533-15540.

- Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San Martín, A. (1997). Diterpenoids from *Azorella compacta*. *Phytochemistry*, 44, 649-651.
- Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San Martín, A. (1996). Mulinolic acid, a diterpenoid from *Mulinum crassifolium*. *Phytochemistry*, 43, 165-168.
- Lozano, J.A. (2002). Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Offarm*, 21, 102-10.
- Maitra, A., Munshi, T., Healy, J., Martin, L.T., Vollmer, W., Keep, N.H., Bhakta, S. (2019). Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiology Reviews*, 43, 548-575.
- Marcos, I.S., Moro, R.F., Gil-Mesón, A., 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
- Martín, G.D.A., Reynolds, W.F., Reese, P.B. (2005). Stemodane skeletal rearrangement: chemistry and microbial transformation. *Phytochemistry*, 66, 901-909.
- Martínez-González, M.A., Peña-Rodríguez, L.M., Uc-Cachón, A.H., Bórquez, J., Simirgiotis, M.J., Barrios-García, H.B., Hernández-Pando, R., Loyola, L.A., Areche, C., Dzul-Beh, A.J., Barrios-Payán, J.A., Mata-Espinosa, D., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Molina-Salinas, G.M. (2021) Activity of semi-synthetic mulinanes against MDR, Pre-XDR, and XDR strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Metabolites*, 11, 876.
- 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, A.C., México. pp. 31-48.
- Maxmen, A. (2013). A combined effort. *Nature*. 502, S4-S6.
- Mishra, S.K., Tripathi, G., Kishore, N., Singh, R.K., Singh, A., Tiwari, V.K. (2017). Drug development against tuberculosis: Impact of alkaloids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 137, 504-544.
- Mishra, B.B., Tiwari, V.K. (2011). Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 4769-4807.

-
- Mo, S., Kronic, A., Pegan, S.D., Franzblau, S.G., Orjala, J. (2009). An antimicrobial guanidine-bearing sesterterpene from the cultured cyanobacterium *Scytonema* sp. *Journal of Natural Products*, 72, 2043-2045.
- Moktali, V., Park, J., Fedorova-Abrams, N.D., Park, B., Choi, J., Lee, Y.H., Kang, S. (2012). Systematic and searchable classification of cytochrome P450 proteins encoded by fungal and oomycete genomes. *BMC Genomics*, 13, 1-13.
- 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., 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., 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., Peña-Rodríguez, L.M. (2010c). Antituberculosis activity of alkylated mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*, 81, 219-222.
- Mongelli, E., Desmarchelier, C., Coussio, J., 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., Borquez, J., Loyola, L.A. (2003). Effect of azorellanone, a diterpene from *Azorella yareta* Hauman, on human sperm physiology. *Journal of Andrology*, 24, 364-370.
- Mutafova, B., Mutafov, S., Fernandes, P., 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., Sagua, H. (1998). Activity of Dipernoids isolated from *Azorella compacta* (Llareta) on *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Boletín Chileno de Parasitología*, 53, 9-13.

-
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2019). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83, 770-803.
- Orabi, K.Y., Clark, A.M., Hufford, C.D. (2000). Microbial transformation of benzosampangine. *Journal of Natural Products*, 63, 396-398.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2020). The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Acceso 24 de noviembre 2022]
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2021). Tuberculosis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/> [Acceso 27 de diciembre 2020]
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2022). Reporte global de la tuberculosis. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022> [Acceso 9 de enero 2022]
- Özşen, Ö., Kiran, İ., Dağ, İ., Atlı, Ö., Çiftçi, G.A., Demirci, F. (2017). Biotransformation of abietic acid by fungi and biological evaluation of its metabolites. *Process Biochemistry*, 52, 130-140.
- Pandey, P., Doerksen, R.J. (2016). New drugs from natural products around the world. *Pharmaceutical Sciences*, 22, 215-216.
- Parshikov, I.A., Sutherland, J.B. (2014). The use of *Aspergillus niger* cultures for biotransformation of terpenoids. *Process Biochemistry*, 49, 2086-2100.
- Patel, R.N. (2018). Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26, 1252-1274.
- Pervaiz, I., Ahmad, S., Madni, M.A., Ahmad, H., Khaliq, F.H. (2013). Microbial biotransformation: a tool for drug designing. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49, 437-450.
- Perveen, S. (2018). Terpenes and terpenoids, en: Terpenes and terpenoids. IntechOpen. pp. 1-3.

- Phonkerd, N., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Soyong, K., Prabpai, S., Kongsearee, P. (2008). Bis-spiro-azaphilones and azaphilones from the fungi *Chaetomium cochliodes* VTh01 and *C. cochliodes* CTh05. *Tetrahedron*, 64, 9636-9645.
- Pollard, D.J., Woodley, J.M. (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnology*, 25, 66-73.
- Rajab, M.S.; Cantrell, C.L.; Franzblau, S.G., Fischer, N.H. Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives (1998). A preliminary structure-activity study. *Planta Medica*, 64, 2-4.
- Rico-Martínez, M., Medina, F.G., Marrero, J.G., Osegueda-Robles, S. (2014). Biotransformation of diterpenes. *RSC Advances*, 4, 10627-10647.
- Rivers, E.C., Mancera, R.L. (2008). New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action. *Drug Discovery Today*, 13, 1090-1098.
- Rožman, K., Sosič, I., Fernandez, R., Young, R.J., Mendoza, A., Gobec, S., Encinas, L. (2017). A new 'golden age' for the antitubercular target InhA. *Drug Discovery Today*, 22, 492-502.
- Sansinenea, E., Ortiz, A. (2014). Antitubercular natural terpenoids: Recent developments and syntheses. *Current Organic Synthesis*, 11, 545-591.
- 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., Ambrósio, S.R. (2013). Biotransformation of ent-pimaradienoic acid by cell cultures of *Aspergillus niger*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 5870-5875.
- Seung, K.J., Keshavjee, S., Rich, M.L. (2015). Multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5, a017863.
- Sepúlveda, B., Quispe, C., Simirgiotis, M., García-Beltrán, O., Areche, C. (2016). Gastroprotective effects of new diterpenoid derivatives from *Azorella cuatrecasii* Mathias & Constance obtained using a β -cyclodextrin complex with microbial and chemical transformations. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26, 3220-3222.
- Shen, B. (2015). A new golden age of natural products drug discovery. *Cell*, 163, 1297-1300.

-
- Shin, J., Kim, J.E., Lee, Y.W., Son, H. (2018). Fungal cytochrome P450s and the P450 complement (CYPome) of *Fusarium graminearum*. *Toxins*, 10, 112.
- Singh, R., Dwivedi, S.P., Gaharwar, U.S., Meena, R., Rajamani, P., Prasad, T. (2020). Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Applied Microbiology*, 128, 1547-1567.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) (2022). Boletín epidemiológico <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico> [Acceso 15 de enero 2022]
- Smitha, M.S., Singh, S., Singh R. (2017). Microbial biotransformation: a process for chemical alterations. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 4, 1-6.
- Songsang, U., Wanich, S., Pitchuanom, S., Netsopa, S., Uanporn, K., Yenjai, C. (2009). Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. *Fitoterapia*, 80, 427-431.
- Sreevatsan, S., Pan, X.I., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Whittam, T.S., Musser, J.M. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 9869-9874.
- Torres y Torres, J.L., Rosazza, J.P. (2001). Microbial transformations of *p*-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. *Journal of Natural Products*, 64, 1408-1414.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2007). Introducción a la microbiología. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 168-170.
- Truong, N.B., Pham, C.V., Doan, H.T.M., Nguyen, H.V., Nguyen, C.M., Nguyen, H.T., Zhang, H.J., Fong, H.H.S., Franzblau, S.G., Soejarto, D.D., Chau, M.V. (2011). Antituberculosis cycloartane triterpenoids from *Radermachera boniana*, *Journal of Natural Products*, 74, 1318-1322.
- Tuntiwachwuttikul, P., Phansa, P., Pootaeng-on, Y. y Taylor, W. C. (2006). Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 149-151.

-
- Viñuelas-Bayón, J., Vitoria, M.A., Samper, S. (2017). Rapid diagnosis of tuberculosis. Detection of drug resistance mechanisms *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (English ed.), 35, 518-526.
- Vilchèze, C., Jacobs, Jr., W.R. (2007). The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annual Review of Microbiology*, 61, 35-50.
- Vongvanich, N., Kittakoop, P., Charoenchai, P., Intamas, S., Sriklung, K., Thebtaranonth, Y. (2006). Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea*. *Planta Medica*, 72, 1427-1430.
- Wachter, G.A., Valcic, S., Flagg, M.L., Franzblau, S.G., Montenegro, G., Suarez, E., Timmermann, B.N. (1999). Antitubercular activity of pentacyclic triterpenoids from plants of Argentina and Chile. *Phytomedicine*, 6, 341-5
- Wächter, G.A., Franzblau, S.G., Montenegro, G., Suarez, E., Fortunato, R.H., Saavedra, E., Timmermann, N. (1998). A new antitubercular mulinane diterpenoid from *Azorella madreporica* Clos. *Journal of Natural Products*, 61, 965-968.
- Wang, G., Tang, W., Bidigare, R.R. (2005). Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents, en: *Natural Products*, Zhang, L., Demain, A.L. (Eds.). Humana Press Inc., New Jersey, pp. 197-227.
- Watanabe, I., Nara, F., Serizawa, N. (1995). Cloning, characterization and expression of the gene encoding cytochrome P-450sca-in2 from *Streptomyces carbophilus* involved in production of pravastatin, a specific HMG-CoA reductase inhibitor. *Gene*, 163, 81-85.
- 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.
- Wonganuchitmeta, S.N., Yuenyongsawad, S., Keawpradub, N., Plubrukarn, A. (2004). Antitubercular sesterterpenes from the Thai sponge *Brachiaster* sp. *Journal of Natural Products*, 67, 1767-1770.
- Woodley, J.M. (2008). New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends in Biotechnology*, 26, 321-327.

Zhang, J., Cheng, Z.H., Yu, B.Y., Cordell, G.A., Qiu, S.X. (2005). Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646. *Tetrahedron Letters*, 46, 2337-2340.
