



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Posgrado en Ciencias Biológicas Opción Biotecnología

ESTUDIO DE LA BIOSÍNTESIS DE TERPENOIDES EN Pentalinon andrieuxii

Tesis que presenta JESÚS ALEJANDRO YAM PUC

En opción al título de DOCTOR EN CIENCIAS (Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

> Mérida, Yucatán, México Diciembre 2013





RECONOCIMIENTO

POSGRADO EN

CIENCIAS BIOLÓGICAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Estudio de la biosíntesis de terpenoides en *Pentalinon andrieuxii*" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y del Dr. Gregorio Godoy Hernández, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de docencia

Mérida, Yucatán, México a 14 de noviembre de 2013

Mérida, Yucatán, México a 14 de noviembre de 2013

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: QBB. Ussus Aleiandro Yam Puc

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr.Luis Manuel Peña Rodríguez y del Dr. Gregorio Godoy Hernández.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero a través de la beca 224263 y la Beca mixta para la estancia en la Universidad de Munich, Alemania.

Al proyecto FOMIX-Yucatán 66262 y al apoyo del proyecto CONACYT CB-2006-59695-Z.

Al los proyectos en colaboración con Alemania El 384/8-1 y al German Academic Exchange Service DAAD, A/11/00471. CONACYT-México (exp. N° 160813)

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), por las facilidades para la realización de este proyecto, de manera especial a la Unidad de Biotecnología y la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, así como a la subdirección de Posgrado por su amable atención.

A los integrantes de mi comité tutoral, Dr. Gumersindo Mirón López y Dra. María Luisa Villarreal, por todas las aportaciones hechas a mi trabajo de tesis a lo largo de cada semestre.

A mi comité revisor, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dra. Rocío Borges Argáez y Dra. Renata Rivera Madrid por todas las sugerencias aportadas en la mejoría de este trabajo.

Al Dr. Olov Sterner de la Universidad de Lund, Suecia, por la espectroscopía realizada y por los estudios de difracción por rayos X de uno de los metabolitos esteroidales.

Al Dr. Wolfgang Eisenreich de la Universidad Técnica de Munich (TUM) por su apoyo en la realización de los experimentos de incorporación de ¹³CO₂ durante mi estancia en Alemania, al igual a su equipo de trabajo, Nihat Knispel, Érika Kutzner y Claudia Huber, gracias por todo lo aportado en los estudios de biosíntesis. Al personal del invernadero de la uiversidad de Munich, Dr. Arthur Manukyan, Abine Dvoski, Ivonne Juttner, Florian Steinbacher y Petra Gardener.

Al Laboratorio 2 de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología del CICY, a los técnicos QBB. Fabiola Escalante Erosa, QBB. Karlina García Sosa, a mis compañeros del laboratorio, Hiatzy, Glendy, Carlos, Landy, Iván, Radamés, Mickel, Gloria, Azeret, Osiris y Wendy, a quienes agradezco su amistad y momentos importantes en el doctorado.

A mis compañeros del doctorado, Carlos, Andrés, Édgar, Ana Lilia, Ángel, Arelly, Abril, Raúl, Cecy por sus consejos y amistad brindados. .

Al laboratorio N° 26 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY, en especial a la QFB. Elidé Avilés Berzunza, por todo su apoyo en los estudios de establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales y Transformación Genética de *Pentalinon andrieuxii*, a mis compañeros, Carlos Sandoval, Raymundo, Carlos Martín, Dinora, Diana, Reyna, Gregorio, Jonhy, Norma, por su amistad y convivencia durante mi trabajo experimental en esa unidad.

De manera especial agradezco a dos grandes personas que sin su apoyo no hubiese podido llevar a cabo este proyecto, al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y al Dr. Gregorio Godoy Hernández, mis dos asesores a quienes les agradezco todo el conocimiento transmitido a lo largo del doctorado. Al Dr. Peña en especial por su paciencia y dedicación en la enseñanza de identificación de metabolitos secundarios, el haberme confiado e involucrado en un proyecto de biosíntesis, del cual he aprendido mucho y que a lo largo de los próximos años me gustaría seguir aprendiendo. Al Dr. Godoy, le agradezco todo su apoyo y los consejos brindados en el establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales en *Pentalinon andrieuxii*, así como a la realización de la Transformación Genética, dos campos de la biotecnología que son de gran utilidad en el estudio del metabolismo secundario.

DEDICATORIAS

A Dios, por estar presente en cada obstáculo que se me presentó y por estar conmigo para salir siempre adelante.

A mis padres, Salvador e Isela, por toda la confianza que en mí depositaron, por su ayuda incondicional en mi deseo de indagar por los caminos de la Ciencia. A mis hermanos, Salvador, Enrique, Ligia, Luis y Humberto por el cariño brindado y por estar conmigo en momentos importantes de mi vida.

A mis sobrinos, Enrique, Grecia, Jimena, Karime y Leonardo por ser parte importante en mi vida. A mis cuñadas, Salomé, Mary y Yuliana por estar siempre conmigo.

A mi tía Lilia, por confiar en mí y por apoyarme incondicionalmente, al igual que a su familia, Carlos, Fabiola, Francisco y Conchi.

A mi segunda familia, de quien siempre he recibido apoyo, Lilia, Don Eusebio, Rígel, Mercy, Lucelly, Martín Peña, Rina, Ruby, Héctor, Álex, Xail, Priscila, Yessamin y Dani.

A la Familia Canul Baas, Mary, Gloria, Doña Marcelina, Adriana, Manuel, Isha Betel y Jezabel por su valiosa amistad, así como a la familia Esquivel Rodríguez, Don José, Doña Wendy, Enrique y Andrea.

A mis amigas Cecy y Hiatzy, dos grandes personas a quienes valoro y aprecio de manera especial. A Hiatzy por ser una gran amiga en la que he confiado y siempre me ha brindado su apoyo incondicional. A Cecy por ser una persona maravillosa que siempre ve la vida con alegría y que ha comunicado esa visión. Asimismo a la Dra. Gloria Molina, por sus consejos, amistad y apoyo brindados.

A mis amigos, Calín, Álex, Martín, Dinorah, Viridiana, Amairany, René, Salet, Nelly, María Esther, María Argelia, Mauricio, Abigail, por compartir momentos agradables a su lado.

A Cristian, por todos sus consejos, por hacerme reír, por levantarme el ánimo y por su valiosa amistad.

De manera especial al "Coro San Pedro y San Pablo", Melina, Max, Carla, Moisés, Ángel, Enrique, Rígel, por ser un gran equipo en quien he depositado plenamente mi confianza y con quienes se puede contar para seguir adelante con nuestro ministerio. Dedico de manera especial a todos ustedes este trabajo de investigación porque forman parte importante de mi vida y de la familia de amigos que he deseado tener a mi lado.

ÍNDICE GENERAL

| ABREVIATURAS |
|---|
| ÍNDICE DE FIGURAS |
| ÍNDICE DE ESQUEMAS |
| ÍNDICE DE CUADROS IX |
| RESUMEN |
| ABSTRACT |
| REFERENCIAS |
| CAPITULO I ANTECEDENTES |
| 1.1 EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES |
| 1.1.1 CLASES DE CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES |
| 1.1.1.2 SUSPENSIONES CELULARES |
| 1.1.1.3 CÉLULAS INMOVILIZADAS |
| 1.1.1.4 CULTIVO DE ÓRGANOS |
| 1.1.2 EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN LA ELUCIDACIÓN DE RUTAS BIOSINTÉTICAS |
| 1.2 LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS |
| 1.2.1 PROCEDIMIENTOS PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA |
| 1.2.1.1 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA VIA AGROBACTERIUM SPP |
| 1.3 LOS TERPENOIDES |
| 1.3.1 LA BIOSINTESIS DE TERPENOIDES |
| 1.3.1.2 LA VIA DEL MEVALONATO (MVA) |
| 1.3.1.3 PRECURSORES LITILIZADOS EN ESTUDIOS DE BIOSÍNTESIS DE TERPENOS |
| 1.3.1.3.1 ESTUDIOS USANDO PRECURSORES A PARTIR DE ¹³ C ACETATO |
| 1.3.1.3.2 ESTUDIOS USANDO PRECURSORES A PARTIR DE ¹³ C 1-DESOXI-D-XILULOSA |
| 1.3.1.3.3 ESTUDIOS USANDO PRECURSORES A PARTIR DE ¹³ C GLUCOSA |
| 1.3.1.3.4 ESTUDIOS INCORPORANDO ¹³ CO ₂ |
| 1.4 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS EN PENTALINON ANDRIEUXII |
| 1.5 HIPÓTESIS |
| 1.6 OBJETIVOS |
| 1.6.1 OBJETIVO GENERAL |
| 1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS |
| 1.7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL |
| 1.8 JUSTIFICACIÓN |
| 1.9 REFERENCIAS |
| CAPITULO II ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS IN VITRO DE PENTALINON ANDRIEUXII |
| 2.1. INTRODUCCIÓN |
| 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS |
| 2.2.1 COLECTAS DE LAS SEMILLAS DE P. ANDRIEUXII |
| 2.2.2 PROTOCOLO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE P. ANDRIEUXII |
| 2.2.2.1 ASEPSIA DE LAS SEMILLAS |

| 2.2.2.2 CONDICIONES DE PREGERMINACIÓN | 65 |
|--|----------|
| 2.2.2.3 CONDICIONES DE GERMINACIÓN | 65 |
| 2.2.3 INDUCCIÓN DE CALLOS | 66 |
| 2.2.3.1 RESIEMBRA | 66 |
| 2.2.3.2 TRATAMIENTOS. | 67 |
| 2.2.3.3 MANTENIMIENTO DE CALLOS | 67 |
| 2.2.4 CULTIVO DE RAÍCES NORMALES | 67 |
| 2.2.4.1 CULTIVOS DE RAÍCES IN VITRO TRATADAS CON REGULADORES DE CRECIMIENTO ÁCIDO | |
| INDOLBUTÍRICO (IBA) Y ÁCIDO NAFTALENACÉTICO (ANA) | 67 |
| 2.2.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE P. ANDRIEUXII VÍA AGROBACTERIUM RHIZOGENES. | 68 |
| 2.2.5.1 CEPA A. RHIZOGENES ATCC 15834 | 68 |
| 2.2.5.2 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE EXPLANTES DE P. ANDRIEUXII VÍA A. RHIZOGENES | 68 |
| 2.2.6 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS | 69 |
| 2.2.6.1 PREPARACIÓN DE FRACCIONES DE POLARIDAD MEDIA DE A PARTIR DE TALLO, HOJAS Y RAÍZ DE | |
| PLANTAS SILVESTRES DE P. ANDRIEUXII | 69 |
| 2.2.6.2 PREPARACIÓN DE FRACCIONES DE POLARIDAD MEDIA A PARTIR DE RAÍZ, HIPOCÓTILO Y HOJAS D | ε |
| PLÁNTULAS GERMINADAS IN VITRO DE P. ANDRIEUXII. | 69 |
| 2.2.6.3 PREPARACIÓN DE FRACCIONES DE POLARIDAD MEDIA A PARTIR DE LOS CALLOS FORMADOS A | |
| PARTIR DE RAÍZ, HIPOCÓTILO Y HOJAS DE PLÁNTULAS DE P. ANDRIEUXII. | 70 |
| 2.2.6.4 PREPARACIÓN DE FRACCIONES DE POLARIDAD MEDIA A PARTIR DEL CULTIVO DE RAÍCES | |
| NORMALES IN VITRO DE P. ANDRIEUXII TRATADAS CON ÁCIDO INDOLBUTIRICO (IBA) Y ÁCIDO | |
| NAFTALENACÉTICO (ANA) | 70 |
| 2.2.6.5 PREPARACION DE FRACCIONES DE POLARIDAD MEDIA A PARTIR DEL CULTIVO DE RAICES | |
| TRANSFORMADAS A PARTIR DE HOJAS DE P. ANDRIEUXII CON LA CEPA A. RHIZOGENES A I CC 15834 | 70 |
| 2.3. RESULTADOS Y DISCUSION | 71 |
| 2.3.1 ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE P. ANDRIEUXII IN VITRO |)71 |
| 2.3.2 INDUCCIÓN DE CALLOS EN HOJAS, HIPOCÓTILO Y RAIZ DE P. ANDRIEUXII | 71 |
| 2.3.3 ANÁLISIS POR CG-EM DE FRACCIONES DE POLARIDAD MEDIA PROVENIENTES DE HOJA, TALLO Y | |
| RAIZ DE PLANTAS SILVESTRES, PLANTULAS GERMINADAS IN VITRO Y TEJIDO CALLOSO DE P. ANDRIEUXII. | .72 |
| 2.3.4 ANALISIS POR CG-EM DE LOS CULTIVOS DE RAICES NORMALES DE P. ANDRIEUXII. | 75 |
| 2.3.5 ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO DE RAICES TRANSFORMADAS DE P. ANDRIEUXII | 76 |
| 2.4 CONCLUSIONES |) |
| | 01 |
| 2.3 REFERENCIAS | 01 |
| 2.0 AGRODACTERIUM-MEDIATED TRANSIENT TRANSFORMATION OF PENTALINON | 81 |
| ANDRIEUXII MIULL, ARG. | 84 |
| 2.6.2 ABSTRACT | 84 |
| | 81 |
| | 25 |
| 2.6.4 1 PLANT MATERIAL | 0J 05 |
| 2.6.4.1 PLANT MATERIAL | 85 |
| 2.6.4.2 AGROBACTERIUM TUMEFACIENS STRAINS AND VECTORS | 00 |
| 2.6.4.3 GENETIC TRANSFORMATION | 00 |
| | 0/ 97 |
| 2.0.5.1 TRANSIENT TRANSFORMATION OF PENTALINON ANDRIEUXII | 0/ |
| 2.5.6 CONCLUSIONS | 0/ |
| 2.0.7 ACKNOWLEDGEMENTS | 07 |
| | 02 |
| | 90 |
| Z.T.T.AGROBACTERIUM TUMEFACIENS CEPA LBA4404 + PCANIBIA Z301 | . 33 |

| CAPÍTULO III | 95 |
|--|--------|
| IDENTIFICACIÓN DE DOS ESTEROIDES DE LA RAÍZ DE PENTALINON ANDRIEUXII | 95 |
| 3.1 DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO | 95 |
| 3.2 STEROIDS FROM THE ROOT EXTRACT OF PENTALINON ANDRIEUXII | 95 |
| 3.2.1 ABSTRACT | 96 |
| 3.2.2 INTRODUCTION | 96 |
| 3.2.3 RESULTS AND DISCUSSION | 96 |
| 3.2.4.1 GENERAL EXPERIMENTAL PROCEDURES | 101 |
| 3.2.4.2 PLANT MATERIAL | 101 |
| 3.2.4.3 EXTRACTION AND ISOLATION | 101 |
| 3.2.4.3.1 3β,14β,20-TRIHYDROXYPREGN-5-ENE-18-OIC-(18-20)-LACTONE (1) | 102 |
| 3.2.4.3.2 3β,14β,20-TRIHYDROXY-5β-PREGN-18-CARBOXYLIC-20-LACTONE (2) | 102 |
| 3.2.4.4 ACETYLATION OF 2 | 102 |
| 3.2.4.5 UXIDATION OF 2 | 103 |
| 3.2.4.0 REDUCTION OF Z | 103 |
| 3.2.4.7 A-RAT CRYSTALLOGRAPHT | 104 |
| 3 2 5 AKNOWI EDGEMENTS | 104 |
| 3 2 6 REFERENCES | 104 |
| 3 3 ESPECTROSCOPÍA DE LOS METABOLITOS ESTEROIDALES 36 146 20- | |
| TRIHYDROXYPREGN-5-ENE-18-OIC-(18-20)-LACTONE (1) Y 38, 148, 20-TRIHYDROXY-58-PREGN-18 | 3- |
| CARBOXYLIC-20-LACTONE (2) | 107 |
| | 111 |
| CAPITOLO IV | 111 |
| AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL 3-(3'R-HIDROXI)-ESTEARATO DE LUPEOL DEL | |
| EXTRACTO METANOLICO DEL TALLO DE PENTALINON ANDRIEUXII | 111 |
| 4.1 DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO | 111 |
| 4.2 A CASE OF MISTAKEN IDENTITY. LUPEOL-3-(3'R-HYDROXY)-STEARATE CAN BE | |
| MISTAKENLY IDENTIFIED AS LUPEOL ACETATE WHEN ONLY ANALIZED BY GC-MS | 111 |
| 4.2.1 ABSTRACT | 112 |
| | 112 |
| 4.2.3 RESULTS AND DISCUSSION | 113 |
| | 117 |
| 4.2.3.1 GENERAL EXPERIMENTAL PROCEDURES | PIM B) |
| 4.2.3.2 EXTRACTION AND ISOLATION OF METABOLITE LOPEOL-3-(5 IC-IT DROXT)-STEAKATE (FROC | . 118 |
| 4.2.4 AKNOWLEDGEMENTS | 119 |
| 4.2.5 REFERENCES | 120 |
| 4.3 ESPECTROSCOPÍA DEL METABOLITO 3-(3'R-HIDROXI)-ESTEARATO DE LUPEOL | 123 |
| CAPÍTULOV | 129 |
| | |
| BIOSINTESIS DEL3-(3'R)-HIDROXI-ESTEARATO DE LUPEOL EN PENTALINON ANDRIEU | JXII. |
| ON ESTODIO DE INCORFORACIÓN DE "COZ | 123 |
| 5.1 DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO | 129 |
| 5.2 ISOTOPOLOGUE PROFILING OF TRITERPENE FORMATION UNDER PHYSIOLOGIC | |
| ANDREWIN | 120 |
| 5.2.1 ARSTRACT | 130 |
| 5.2.2 INTRODUCTION | 131 |
| 5.2.3 RESULTS | 138 |
| | |
| 5.2.4 DISCUSSION | 145 |

Índice

| | 5.2.5 EXPERIMENTAL PROCEDURES | 149 |
|----|---|-----|
| | 5.2.5.2 EXTRACTION OF PLANT MATERIAL AND ISOLATION OF LUPEOL-3-(3' <i>R</i> -HYDROXY)-STEARATE (1 |) |
| | | 149 |
| | 5.2.5.3 ISOLATION AND CG/MS ANALYSIS OF ALANINE | 149 |
| | 5.2.5.4 CG/MS ANALYSIS OF LUPEOL-3-(3'R-HIDROXY)-STEARATE (PROCRIM B, 1) | 150 |
| | 5.2.5.5 NMR ANALYSIS OF LUPEOL-3-(3'R-HIDROXY)-STEARATE (PROCRIM B, 1) | 150 |
| | 5.2.6 ACKNOWLEDGEMENTS | 151 |
| | 5.2.7 REFERENCES | 152 |
| | 5.2.8 INFORMACIÓN ADICIONAL | 155 |
| ~ | | 157 |
| C | | 12/ |
| D | ISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 157 |
| | 6.2 CONCLUSIONES | 158 |
| | 6.3 PERSPECTIVAS | 158 |
| A | NEXO | 161 |
| ١N | IFORMACIÓN BOTÁNICA DE PENTALINON ANDRIEUXII MUELL-ARG | 161 |
| Р | ENTALINON ANDRIEUXII MUELL-ARG | 161 |
| | DEEDENOLO | |
| | REFERENCIAS | 163 |

ABREVIATURAS

| CTV's | Cultivo de tejidos vegetales |
|---------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADN-T | ADN de transferencia |
| Ti | Plásmido inductor de tumor |
| IPP | Isopentenil difosfato |
| DMAPP | Dimetil-alil difosfato |
| MVA | mevalonato |
| MEP | 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato |
| CoA | Coenzima A |
| IDI | Isopentenil difosfato isomerasa |
| HMGR | 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa |
| DXS | 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato |
| GA3-P | Gliceraldehido-3-fosfato |
| DXR | 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reducto isomerasa |
| НМВРР | 1-hidroxi-2-metil-2-E-butenil-4-difosfato |
| CMS | 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-4-fosfato sintasa |
| СМК | 4-difosfocitidinil-2C-metil-D-eritritol-4-fosfato cinasa |
| HDS | 2C-metil-D-eritritol ciclo difosfato sintasa |
| HDR | 1-hidroxi-2-metil-butenil-4-difosfato reductasa |
| RMN/NMR | Resonancia magnética nuclear |
| PC | Medio de cultivo de Phillips y Collins |
| TDZ | N-fenil-N'-1,2,3-tidiazol-5-ilurea |
| ANA | Ácido naftalenacético |
| IBA | Ácido indolbutírico |
| gus | Gen reportero que codifica para la β-glucoronidasa |
| CG-EM | Cromatografía de gases-Espectrometría de masas |
| pCAMBIA | Center for the Applications of Molecular Biology to International Agriculture |
| ntpll | Gen de la neomicina transferasa II |

| YEB | Yeast extract and beef |
|------------|---|
| X-GLUC | 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucorónico |
| CAMV | Virus del mosaico de la coliflor |
| VLC | Vacuum liquid chromatography |
| HSQC | Heteronuclear single quantum coherence |
| TLC | Thin layer chromatography |
| UV | Ultravioleta |
| PCC | Piridinium chlorochromate |
| IR | Infrared |
| HMBC | Heteronuclear multiple bond correlation |
| COSY | Correlation spectroscopy |
| J | Constante de acoplamiento |
| INADEQUATE | Incredible Natural Abundance Double Quantum Transition Experiment |
| ADEQUATE | Adequate Double Quantum Transfer Experiment |
| LC/MS | Liquid chromatography/Mass Spectroscopy |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura 1.1 Ejemplos de metabolitos secundarios producidos por CTV's. Figura 1.2 Posibles rutas biosintéticas del antecotuloide (10) (Tomado de Klink <i>et al.</i> , 2003). Figura 1.3 Incorporación de cuatro moléculas de [3- ¹³ C ₁] tirosina en la biosíntesis de amorolina (11) en cultiv de raíces de <i>S. cepharantha.</i> *Posición marcada (Tomado de Sugimoto <i>et al</i> , 1990). Figura 1.4 Formación del anillo tropano en la biosíntesis de los alcaloides litorina (12) y hiosciamina (13). Incorporación de una unidad de [² H ₃] acetato en las posiciones C-6 y C-7 (Tomado de Durán-patrón <i>et al.</i> , 2000). | 13 15 /os 16 17 |
|---|-----------------------------|
| Figura 1.5 Enriquecimientos observados en el derivado metilado del metabolito 14 en las posiciones C-3, C- C-14, C-18, C-9, C-7 y C-16, después de incorporar [1- ¹³ C ₁] glucosa al medio de cultivo de las suspensiones celulares de <i>A. officinalis</i> , comparándolo con una muestra control del metabolito 14 (Tomado de Terada <i>et a</i> 1995). | .5, s n/., 18 |
| Figura 1.6 Interacción Agrobacterium-célula vegetal (McCullen y Binns, 2006). Figura 1.7 Diversidad en terpenos. Figura 1.8 Formación y clasificación de terpenos (Tomado de Dewick 2002). | 20 23 24 |
| Figura 1.9 Biosíntesis de terpenos: A) Vía MVA y B) Vía MEP (Tomado y modificado de Kuzuyama, 2002). Figura 1.10 Sitios de de las vías de MVA y MEP en la célula (Tomado y modificado de Lichtenthaler, 1999). Figura 1.11 Isotopólogos formados por la vía MVA a partir de precursores marcados universalmente. Figura 1.12 Isotopólogos formados por la vía MEP a partir de precursores marcados universalmente. Figura 1.13 Enriquecimiento de unidades de isopreno vía MVA. Con: A) [1- ¹³ C ₁] acetato y B) [2- ¹³ C ₁] acetato | 28 29 30 31 0. |
| Figura 1.14 Marcaje observado en verrucosan- 2β -ol (15). Con: A) [1- ¹³ C ₁] acetato, B) [2- ¹³ C ₁] acetato. C) [1, ¹³ C ₂] acetato y D) Unidades de isopreno en la estructura. Las líneas oscuras representan los acoplamientos ¹³ C- ¹³ C (Tomado de Rieder <i>et al.</i> , 1998). | 2- 33 |
| Figura 1.15 Enriquecimiento de unidades de isopreno vía MEP. Con: A) [1- ¹³ C ₁] 1-Desoxi-D-xilulosa y B) [3,4,5- ¹³ C ₃] 1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato Figura 1.16 Análisis del marcaje del Lamalbido (15) usando como precursores A: [3,4,5- ¹³ C ₃] 1-desoxi-D- xilulosa-5-fosfato y B: [2- ¹³ C ₁] mevalonolactona (Tomado de Heng <i>et al.</i> , 2010). | 34 35 |
| Figura 1.17 Enriquecimientos observados en el bisabolóxido A (18), chamazuleno (17) y FPP (19) a partir de [1- ¹³ C ₁] 1-Desoxi-D-xilulosa (Tomado de Adam y Zapp, 1999). Figura 1.18 Intermediarios generados a partir del metabolismo de la glucosa: A) Gliceraldehído-3-fosfato, piruvato y acetil CoA. B) Biosíntesis de unidad de isopreno proveniente de la condensación de tres unidades de acetil CoA (vía MVA). C) Biosíntesis de una unidad de isopreno proveniente de la condensación de tres unidades de acetil CoA (vía MVA). | е 36 s |
| piruvato y gliceraldehido-3-fosfato (vía MEP). Los símbolos indican posiciones biosintéticamente equivalente (Tomado de Eisenreich <i>et al.</i> , 2004). Figura 1.19 Enriquecimiento en unidades de isopreno formados por las vías MVA y MEP a partir de [1- ¹³ C ₁] | es 37 |
| glucosa. Figura 1.20 Enriquecimientos observados en el bisabolóxido A (17), chamazuleno (18) y FPP (19) a partir de [1- ¹³ C ₁] glucosa (Tomado de Adam y Zapp, 1998). Figura 1.21 Acontamientos ¹³ C- ¹³ C observas en unidades isoprénicas: A) Vía MVA y B) Vía MEP | 37 e 38 39 |
| Figura 1.22 Marcaje establecido para el 8α-acetoxi-13α-hidroxi-5-oxo-13-epi-neoverrucosano (22) en <i>Fossombronia alaskana con:</i> A) [U- ¹³ C ₆] glucosa y B) [1- ¹³ C ₁] glucosa. C) Unidades de isopreno. Las líneas oscuras representan los acoplamientos ¹³ C- ¹³ C (Tomado de Eisenreich <i>et al.</i> , 1999). Figura 1.23 Unidades isoprénicas de artemisinina (23) y su composición isotopológica con ¹³ C a partir de los experimentos con ¹³ CO ₂ (Tomado de Schramek <i>et al.</i> , 2010). | 40 s 42 |
| Figura1. 24 Modelo de biosíntesis de la artemisinina (23) con un origen biosintético mixto a partir de las vías MVA y MEP (Tomado de Schramek <i>et al.</i> , 2010) Figura 1.25 Espectro parcial ¹³ C RMN de hiperforina (24) obtenido a partir de los experimentos de incorporación de ¹³ CO ₂ , en donde se indican las constantes de acoplamiento. El asterisco señala una impureza (Tomado de Ostrozhenkova, 2009) | 42 |
| Figura 1.26 Posible ongen biosintético del urechitol A a partir de matricina (25) Figura 2.1 Germinación de semillas de <i>P. andrieuxii</i> | 46 |
| Figura 2.2 Inducción de tejido calloso al mes con TDZ 0.15-5 µM en A) hipocótilo y B) raíz.C) Inducción de | |

Índice

| Figura 2.4 Perfiles cromatográficos parciales por CG de las fracciones de polaridad media de raíz, h | ipocótilo y |
|---|------------------------|
| Figura 2.5 Cultivo de raíces normales con tratamientos con IBA y ANA. A y E: controles (cultivos lib) | res de |
| reguladores de crecimiento), B: ANA 1 mg/L, C: ANA 2.5 mg/L, D: ANA 5 mg/L, F: IBA 1 mg/L, G: IE | A 2.5 |
| Figura 2.6 Experimento de raíces transformadas en explantes de boja, bipocótilo y raíz de <i>P. andri</i> e | |
| tres semanas de transformación con la cepa <i>A. rhizogenes</i> ATCC 15834. A) Formación de raíces a | partir de |
| transformada obtenida a partir de hoia en medio PC líquido | 77 |
| Figura 2.7 CG-EM de la fracción de AcOEt correspondiente a la extracción del medio de cultivo PC | líquido de |
| las raíces transformadas obtenidas a partir de hoja de <i>P. andrieuxii</i> . La flecha indica el pico que cort | responde a |
| urechitol A con tiempo de retención de 9.35 min. | |
| Figura 2.8 Histochemical GUS assay performed on transformed explants of Pentalinon andrieuxii M | üll. Arg. |
| Explants transformed with pCAMBIA 2301 via Agrobacterium tumefaciens stain LBA4404. A) Young | -root, B) |
| Old-root, C) Leaf, D) Hypocotyl E) Hypocotyl calli. | |
| Figura 2 9 Estructura del plásmido pCAMBIA 2301 | |
| Figure 3.1 Single-crystal X-ray structure and relative stereochemistry of metabolite 1 | 99 |
| Figura 3.2 Espectro de masas de alta resolución 1. | |
| Figura 3.3 Espectro ¹³ C RMN (CDCl ₃ , 100 MHz) de 1. | 107 |
| Figura 3.4 Espectro ¹ H RMN (CDCI ₃ , 400 MHz) de 1 | 108 |
| Figura 3.5 Experimento HSQC de 1. | 108 |
| Figura 3.6 Experimento HMBC de 1. | 109 |
| Figura 3.7 Espectro de masas de alta resolución de 2. | |
| Figura 3.8 Espectro 'H RMN de 2. | |
| Figura 3.9 Espectro *C Rivin de 2. | |
| | |
| Figura 4.1 a) ¹ H- ¹ H COSY couplings between H-3' and H-2'/H4'. b) Key HMBC correlations between 3' and carbons C-1' (³ J), C4' (² J) and C5' (³ J), and between H-3 and carbon C-1' of lupeol-3-(3' R)-h | n proton H- ydroxy- |
| stearate (procrim b) (1). | 115 |
| Figura 4.2 Thermally-induced reverse aldol reaction of Jupeol-3-(3'R)-hydroxy-stearate (procrim b) (| 1) 117 |
| Figura 4.3 Cromatograma y patrón de fragmentación por CG-EM del acetato de lupeol (2) | |
| Figura 4.4 Cromatograma y patron de tragmentación por CG-ENI del 3-(3 R-hidroxi)-estearato de luj | 124 |
| Figura 4.5. Espectro de ¹ H RMN del 3-(3'R-hidroxi)-estearato de luneol, procrim b (1) | 124 |
| Figura 4.6 Espectro parcial de ¹³ C RMN del 3-(3' <i>R</i> -hidroxi)-estearato de lupeol, procrim b (1). | |
| Figura 4.7 Experimento HSQC del 3-(3'R)-hidroxi-estearato de lupeol, procrim b (1). | 126 |
| Figura 4.8 Experimento ¹ H- ¹ H COSY del 3-(3'R-hidroxi)-estearato de lupeol, procrim b (1). | 126 |
| Figura 4.9 Experimento HMBC del 3-(3'R-hidroxi)-estearato de lupeol, procrim b (1). | 127 |
| Figura 4.10 A) Patrón de fragmetación del componente a 9.4 min en el análisis por CG del 3-(3'R-hi | droxi)- |
| estearato de lupeol, procrim b (1). B) Patrón de fragmentación del hexadecanal (Tomado de la biblio | oteca |
| NIST) | 127 |
| | |
| Figure 5.1 (a) Structure and isoprenoid dissection of lupeol -3-(3' <i>R</i> -hydroxy)-stearate (procrim b, 1); | isoprene |
| units are indicated by differen colors. (b) Labelling pattern of 1 from the ¹³ CO ₂ experiment; biosynthe | nically 120 |
| Contributed "C atom pairs are indicated by green lines | 138 are |
| indicated | 141 |
| Figure 5.3 INADEQUATE spectrum of 1 from the ¹³ CO ₂ experiment. The bottom part displays an exit | bended |
| view of the region boxed in blue in the overall spectrum. Observed correlations are indicated by bold | lines and |

view of the region boxed in blue in the overall spectrum. Observed correlations are indicated by bold lines and arrows in the structure. 143 Figure 5.4 1,1-ADEQUATE spectrum of 1 from the ¹³CO₂ experiment. Observed correlations are indicated by bold lines and arrows in the structure. 144

ÍNDICE DE ESQUEMAS

| Scheme 5.1 Biosynthetic origin of IPP (5) and DMAPP (6) via the mevalonate pathway (a) and the alternative | |
|--|----|
| MEP pathway (b) | 33 |
| Scheme 5.2 Biosynthetic origin of triterpenes | 34 |
| Scheme 5.3 Biosynthetic origin of lupeol. Bold lines indicate adjacent ¹³ C-atom pairs that were contributed via [1,2- ¹³ C-1 acetyl-CoA. The blue line and dots indicate a [¹³ C-1-unit that is disrupted by skeletal rearrangement. | 8 |
| | 37 |
| Scheme 5.4 Differential labeling of lupped when formed via the MVA (a) and MEP (b) pathways 14 | 47 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro 1.1 Distribución en la naturaleza de las vías de MVA y MEP en la biosíntesis de terpenoides (To | omado |
|--|-------|
| y modificado de Eisenreich et al., 2001) | 26 |
| Cuadro 2.1 Infection frequency and number of GUS foci in P. andrieuxii explants | 89 |
| Cuadro 3.1 NMR spectroscopic data of metabolites 1 and 2 | 100 |

| Table 5.1 ¹ H NMR and ¹³ C NMR data of lupeol-3-(3' <i>R</i> -hydroxy)-stearate (procrim b) (1) from ¹³ CO ₂ | |
|--|-----|
| experiment | 140 |

RESUMEN

El cultivo de células vegetales ha surgido como una alternativa para la obtención de metabolitos de alto valor agregado, así como una herramienta indispensable en el estudio de rutas biosintéticas. Estudios recientes en *Pentalinon andrieuxii*, una planta utilizada en la península de Yucatán para el tratamiento de erupciones cutáneas derivadas de la leishmaniosis, resultaron en el aislamiento de dos nuevos trinorsesquiterpenoides, urechitoles A y B, con un esqueleto novedoso denominado campechano. Dada la novedad de este esqueleto carbonado y al no existir reportes en la literatura del esqueleto campechano ni de metabolitos que lo posean, el presente trabajo pretende realizar estudios de la producción y biosíntesis de los urechitoles utilizando un modelo de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* de *P. andrieuxii*.

Como resultado de la investigación en este trabajo se logró el establecimiento de un protocolo de germinación in vitro de semillas de P. andrieuxii y la inducción de callos a partir de explantes de raíz, hipocótilo y hoja. El análisis por CG-EM de los diferentes extractos mostró la presencia de urechitol A en la raíz y las hojas de plantas silvestres, así como en hojas de plántulas in vitro; sin embargo, no se detectó la presencia del trinorsesquiterpeno en los extractos de callos. Pruebas preliminares mostraron que P. andrieuxii es susceptible a la transformación genética usando Agrobacterium tumefaciens, encontrándose los mejores resultados de transformación en explantes de raíz madura y hoja. Lo anterior permitió establecer un cultivo de raíces transformadas mediante la infección de explantes de hoja, hipocótilo y raíz de plántulas de P. andrieuxii con Agrobacterium rhizogenes, detectándose por CG-EM la presencia de urechitol A en el medio de cultivo de las raíces transformadas a partir de hoja, pero no en el material vegetal. Por otra parte, como resultado de la búsqueda de terpenos de estructura similar a los urechitoles y que pudieran aportar información acerca de su biosíntesis, se obtuvieron dos metabolitos provenientes de una fracción neutra de raíz de P. andrieuxii identificados como 3β, 14β, 20-trihidroxipregn-5-en-18-oic-(18-20)-lactona y 3β, 14β, 20-trihidroxi-5βpregn-18-carboxilic-20-lactona, siendo este último un nuevo producto natural. Asimismo de la purificación de la fracción CH₂Cl₂ de tallo de P. andrieuxii se logró el aislamiento de 3-(3'R-hidroxi)-esterearato de lupeol (procrim b). El empleo de incorporación de ¹³CO₂ en plantas de P. andrieuxii permitió el establecer la vía del mevalonato como la que da a procrim b. Los resultados obtenidos representan las bases para estudios posteriores en P. andrieuxii enfocados a la biosíntesis de los urechitoles.

ABSTRACT

Plant cell culture have emerged as an alternative for the production of high value secondary metabolites and are also an essential tool in the study of biosynthetic pathways. Recent studies on *Pentalinon andrieuxii*, a plant used in the Yucatan Peninsula for the treatment of skin ulcers derived from leishmaniasis, resulted in the isolation of two new trinorsesquiterpenoids, urechitols A and B, with the new carbon skeleton campechane. Given the innovacion of this skeleton and when do not exist reports in the literature about metabolites wich posses it, the present work tries to realize studies of the production and biosynthesis of the urechitols using an *in vitro* model of plant cell culture in *P. andrieuxii*.

As a result of this investigation, an *in vitro* procedure for the germination of the seeds of P. andrieuxii and the induction of callus from root, hypocotyl and leaf explants have been established. The GC-MS analysis of the different extracts showed the presence of urechitol A in roots and leaves of wild plants, as well as in *in vitro* leaves, however the trinorsesquiterpenoid could not be detected in any of the callus extracts. Preliminar experiments showed that P. andrieuxii is susceptible to genetic transformation with Agrobacterium tumefaciens, for which the best results were found in mature roots and leaf explants. This allowed the establishment of a hairy root transformation system by means of infection of leaves, hypocotyls and roots from P. andrieuxii plantlets using Agrobacterium rhizogenes. The presence of urechitol A in the growth medium of hairy roots culture obtained from leaves was detected by GC-MS. Separately, as a result of the purification of wild P. andrieuxii root extract, two metabolites were isolated from a neutral fraction and characterized as 3β, 14β, 20-trihidroxipregn-5-en-18-oic-(18-20)-lactone and 36, 146, 20-trihidroxi-56-pregn-18-carboxilic-20-lactone, the latter being a new natural product. Similarly purification of the dichloromethane fraction of the stems of P. andrieuxii resulted in the isolation and identification of lupeol-3-(3'R-hydroxy)-sterearate (procrim b). A ¹³CO₂ incorporation experiment into living plants of *P. andrieuxii* allowed established that the biosynthetical origin of procrim b derives from the mevalonate pathway. These results set the basis for further studies on P. andrieuxii aimed at establishing the biosynthetic origin of the urechitols.

1. INTRODUCCIÓN

La importancia de los productos naturales como fármacos o modelos de los mismos es evidente si se toma en cuenta que en los últimos 30 años, de los 1,184 productos que se incorporaron al mercado como nuevos fármacos, el 5% correspondió a productos naturales con estructuras novedosas, el 23% se obtuvo como derivados de los mismos, el 10% correspondió a nuevas moléculas modeladas a partir de productos naturales y el 4% a moléculas de productos naturales obtenidos por síntesis química (Newman y Cragg, 2012). Con base a lo anterior es de esperar que en el futuro los productos naturales continúen teniendo un papel importante como modelos moleculares para el descubrimiento y validación de fármacos objetivos (Vuorelaa *et al.*, 2004).

Entre las principales fuentes de productos naturales con potencial aplicación farmacéutica se encuentran las plantas. Sin embargo, se ha reportado que de las 300,000 especies de plantas superiores que se estima existen en el planeta, únicamente entre el 10 y el 15% han sido investigadas en cuanto a su producción de metabolitos bioactivos (Harvey, 2000). Los metabolitos bioactivos de plantas son utilizados como fármacos, pesticidas, colorantes, saborizantes y fragancias, entre otros. Comúnmente, estos metabolitos secundarios se producen en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés por lo que su acumulación es baja y lenta, lo que a menudo representa una limitante para su producción comercial (Verpoorte *et al.*, 2002).

Por otra parte, el creciente desarrollo de la biotecnología y la bioingeniería y la aparición de nuevas demandas han conllevado a la apertura de nuevos horizontes para la aplicación de productos naturales en la medicina, la veterinaria y la agricultura (Brizuela *et al.*, 1998).

Actualmente el cultivo de células y tejidos vegetales es considerada una herramienta importante en estudios básicos en plantas, así como en aplicaciones comerciales (Trevor, 2007), pero también representa una alternativa biotecnológica importante para la producción de metabolitos secundarios, lo cual se ha incrementado en los últimos 50 años (Bourgaud *et al.*, 2001), de igual manera el cultivo de células y tejidos vegetales es

considerado un modelo particularmente atractivo para estudios de elucidación de rutas biosintéticas (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007).

Estudios fitoquímicos recientes en *Pentalinon andrieuxii*, una planta utilizada en la medicina tradicional yucateca para el tratamiento de la leishmaniosis, han resultado en el aislamiento y la identificación de dos nuevos trinorsesquiterpenos, urechitoles A y B (1 y 2) con un esqueleto novedoso denominado campechano (3) (Yam-Puc *et al.*, 2009). En este trabajo se plantea utilizar el establecimiento de un modelo de cultivo de tejidos vegetales de *P. andrieuxii*, que resulte en la producción de los terpenoides de interés y que permita la elucidación de su origen biosintético.







REFERENCIAS

- Bourgaud, F., Graviot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Review. Plant Science, 161, 839-851.
- Brizuela, M.A., García, L., Pérez, L., Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Revista Iberoamericana de Micología, 15, 69-74.
- Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Discovery Today, 5(7), 294-300.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products, 75 (3), 311-335.
- Trejo-Tapia, G. y Rodríguez-Monroy, M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. Interciencia, 32 (10), 669-674.
- Trevor, A.T. (2007). History of plant tissue culture. Review. Molecular Biotechnology, 37, 169-180.
- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews, 1, 13-25.
- Vuorelaa, P., Leononenb, M., Saikkuc, P., Tammela, P., Rauhad, J.P., Wennberge, T., Vourelaa, H. (2004). Natural products in the process of finding new drugs candidates. Current Medicinal Chemistry, 11, 1375-1389.
- Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., Pech-López, M., Chan-Bacab, M.J., Arunachalampillai, A., Wend, O.F., Sterner, O., Peña-Rodríguez, L.M. (2009). Trinorsesquiterpenoids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. Journal of Natural Products, 72, 745-748.

CAPITULO I ANTECEDENTES

1.1 El cultivo de tejidos vegetales

El término "cultivo de tejidos vegetales" (CTV's) se refiere al cultivo in vitro de cualquier estructura viva de una planta, sea ésta una célula, un tejido o un órgano. También se le denomina micropropagación debido al diminuto tamaño del propágulo empleado durante el proceso de cultivo; sin embargo, la principal característica de los CTV's es que el procedimiento se realiza bajo condiciones asépticas y consiste en aislar cualquier parte de la planta (explante), a la cual se le aplican diferentes condiciones físicas (luz, temperatura y humedad) y químicas (sales inorgánicas, pH, reguladores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos, proteínas, carbohidratos, y agua) con el fin de inducir una respuesta en los explantes o propágulos (Bernadett, 2000; Trevor, 2007). El cultivo de células vegetales ha surgido como una alternativa para la obtención de metabolitos de interés, en especial cuando las plantas son silvestres, requieren largos periodos de cultivo, tienen rendimientos de metabolitos secundarios bajos o no se cuenta con procesos de síntesis química (Sajc et al, 2000). Los CTV's representan una alternativa biotecnológica para la producción de metabolitos secundarios en combinación con otras estrategias como la selección de líneas celulares, la incitación y la adición de precursores para la producción de metabolitos secundarios que tengan alto valor agregado (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007).

El objetivo de los CTV's es conseguir que las células expresen su totipotencialidad, es decir, la capacidad que tienen las células vegetales de regenerar una planta completa cuando son separadas del organismo. Cuando los explantes se cultivan en condiciones apropiadas, es posible inducir la formación de estructuras organizadas y la formación de plantas completas. Si la formación de la planta completa se realiza mediante la formación de brotes o yemas adventicias, seguidas del enraizamiento de éstos, se dice que el proceso es de organogénesis. Pero si la regeneración se obtiene a través de estructuras semejantes a los embriones sexuales, se dice que la vía es embriogénesis somática (Roca, 2000). La técnica de CTV's se relaciona estrechamente con la biotecnología moderna, puesto que sirve de base para la obtención de células vegetales individuales, las que posteriormente se pueden estudiar o manipular (Montes-Ayala, 2007).

9

Los cultivos de células y tejidos *in vitro* constituyen actualmente una alternativa para la producción de metabolitos de uso farmacéutico, agrícola o industrial, cuya producción comercial por los métodos convencionales –síntesis química o extracción a partir de las plantas que los producen- resulta difícil o económicamente inviable (Loyola-Vargas *et al.*, 2004). Entre algunos ejemplos de producción de metabolitos por CTV's se encuentra la producción de Taxol[®], un producto anticancerígeno, a partir de *Taxus mairei*, la producción de imperatonina, un metabolito bioactivo de *Angelica dahurica* var. *formosana* y la producción de diosgenina a partir de *Dioscorea doryophora* (Vanisree y Hsin-Sheng, 2004).

1.1.1 Clases de cultivos de tejidos vegetales

Existen varios tipos de cultivos *in vitro*: callos, suspensiones celulares, células inmovilizadas, tejidos u órganos. La clase de cultivo afecta, entre otras cosas, el crecimiento celular, la formación y purificación de metabolitos secundarios, y el tipo de biorreactor que puede ser utilizado (Arias *et al.*, 2009).

1.1.1.1 Cultivo de callos

Los callos vegetales son tejidos sin diferenciar que pueden desarrollarse a partir de células diferenciadas en la naturaleza o en cultivo *in vitro* bajo condiciones de cultivo controladas (medio de cultivo, luz y temperatura), que muestran un crecimiento y disposición de células desorganizado. Una de las principales características del cultivo *in vitro* de callos es que en ocasiones constituye un paso necesario para la obtención de plantas genéticamente modificadas. Además, la relativa simplicidad del sistema experimental para el control del crecimiento, hace del cultivo *in vitro* de callos un excelente modelo para estudiar y caracterizar la morfología y las propiedades dinámicas de la evolución de estos sistemas (Cross y Hohenberg, 1993; Koch y Meinhard, 1994).

1.1.1.2 Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares se distribuyen en forma homogénea a través del medio de cultivo y, al estar rodeadas del mismo, se facilita la transferencia de nutrientes y oxígeno hacia el citoplasma. Este tipo de cultivo presenta la ventaja de permitir el control relativamente sencillo de variables como temperatura, pH y oxígeno disuelto; sin embargo, en este caso pueden verse modificadas algunas características de las células presentes en las plantas, tales como su diferenciación y la comunicación intercelular (Schlatmann *et al.*, 1996). Algunos de los procesos exitosos de las suspensiones celulares han sido la obtención de paclitaxel, un fármaco anticancerígeno obtenido de especies del género *Taxus*, la obtención de shikonina de *Lithospermum erythrorhizon* (Zhang *et al.*, 2010); la producción de berberina de *Coptis japonica* y la obtención de gingenósidos de *Panax ginseng* (Chandra y Chandra, 2011; Arias *et al.*, 2009).

1.1.1.3 Células inmovilizadas

El cultivo de células inmovilizadas es una alternativa que, en muchos casos, ha mostrado estimulación del metabolismo secundario, debido probablemente a que una tasa de crecimiento más lenta favorece un mayor flujo de nutrientes y energía hacia este metabolismo; en tanto que un mayor contacto célula-célula y un mayor grado de diferenciación hacen que el ambiente físico-químico sea más parecido al de la planta. Sin embargo las células inmovilizadas presentan una mayor limitación a la transferencia de masa, debido a la resistencia aportada por el soporte; además, se ha reportado la inducción de cambios morfológicos y fisiológicos, que pueden estimular no sólo la producción, sino también la liberación de metabolitos secundarios al medio, posiblemente por la permeabilización de la membrana celular, lo que representa un beneficio en la búsqueda de metabolitos secundarios de interés (Prakash y Srivastava, 2005; Dörnenburg, 2004; Gillet *et al.*, 2000).

1.1.1.4 Cultivo de órganos

La producción de metabolitos secundarios está asociada a células muy especializadas o a la interacción de células en la planta, que en algunos casos pueden ser de diferentes tipos celulares (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007); en estos casos resulta útil cultivar el órgano o tejido completo (Yeoman y Yeoman, 1996). Existen dos tipos de órganos que usualmente son cultivados para la producción de metabolitos secundarios: raíces y brotes, que se caracterizan por tener un patrón metabólico muy similar al de los órganos en la planta y que pueden o no estar transformados genéticamente. En el caso de órganos no transformados, el tejido se obtiene a partir de un explante y la diferenciación se logra utilizando una combinación apropiada de reguladores de crecimiento (Arias *et al.*, 2009; Bougard *et al.*, 2001; Ray y Jha, 1999; Patulun *et al.*, 2007).

1.1.2 El cultivo de tejidos vegetales en la elucidación de rutas biosintéticas

Los CTV's representan una herramienta básica para el estudio de las rutas biosintéticas de metabolitos secundarios y los flujos metabólicos que permiten entender la fisiología de las plantas. Las diferentes clases de CTV's que se han empleado para la producción de metabolitos secundarios, incluyen suspensiones celulares de *Catharanthus roseus* para la producción de los alcaloides indólicos, serpentina (4) y ajmalicina (5), y *Rubia akane* para la producción de purpurina (6) (Calva-Calva *et al.*, 2002); y cultivos de callos de Salvia miltiorrhiza para la producción de criptotanshinona (7) (Figura 1.1) (Vanisree y Hsin-Shen, 2004). De igual manera el cultivo de células inmovilizadas se ha utilizado para la producción de glucósidos de spirostanol (8) de *Solanum chrysotricum* (Charlet *et al.*, 2000), de antocianinas de *Cruciata glabra* (Dörnenburg, 2004) y de capsaicina (9) de *Capsicum frutescens* (Figura 1.1) (Arias *et al.*, 2009).










Figura 1.1 Ejemplos de metabolitos secundarios producidos por CTV's.

Las técnicas de CTV's más empleadas para estudios de biosíntesis de metabolitos secundarios incluyen suspensiones celulares, cultivos de raíces transformadas y la obtención de plántulas *in vitro* en un medio de cultivo conteniendo un precursor marcado

isotópicamente. En la literatura se reportan varios trabajos en los cuales se hace uso de isótopos estables para los análisis de fluios metabólicos, tal es el caso del origen biosíntético del antecotuloide (10), una sesquiterpenlactona aislada de Anthemis cotula L. en donde la adición de derivados de glucosa marcados con ¹³C y ²H al medio de cultivo semisólido de las plántulas, sugirió que el antecotuloide puede formarse a partir de la condensación cabeza-cabeza del geranil difosfato con dimetilalil difosfato o a partir de farnesil difosfato (Figura 1.2) (Klink et al., 2003). De igual manera, la incorporación de tirosina, tiramina y dopamina marcadas con ¹⁴C a los cultivos de raíces de Stephania cepharantha, mostraron sólo la incorporación de 4 unidades de tirosina en el estudio de la biosíntesis de aromolina (11), un alcaloide bisbencilisoquinolínico (Figura 1.3) (Sugimoto et al., 1990). Asimismo en estudios de biosíntesis de litorina (12) y hiosciamina (13) en cultivos de raíces de Datura stramonium. la incorporación de precursores derivados de acetato, metionina, lactato y tropina marcados con ¹³C, ²H y ¹⁸O, mostró la incorporación de una unidad de [2H3] acetato en las posiciones C-6 y C-7 del anillo de tropano y no en C-2 y C-4 como se había reportado anteriormente (Figura 1.4) (Durán-Patrón et al., 2000). Por otra parte, estudios de la ruta biosintética de 4-[5-(4-metoxifenoxi)-3-penten-1-inil] fenol (14) y metabolitos relacionados, utilizando suspensiones celulares de Asparagus officinalis, a las que se les incorporó [1-13C1] y [U-13C6] alucosa, revelaron que los dos anillos aromáticos de 14 son formados por la ruta del ácido shiquímico, esto con base a los resultados de la incorporación de [1-13C1] glucosa al medio de cultivo y observarse por ¹³C RMN los enriquecimientos de C-3, C-5, C-7, C-9, C-14, C-18 y C-16. (Figura 1.5). Estos patrones de enriquecimiento fueron comparados con los reportados en la literatura para el ácido shiquímico y la fenilalanina (Terada et al., 1995).



Figura 1.2 Posibles rutas biosintéticas del antecotuloide (10) (Tomado de Klink et al., 2003).



Figura 1.3 Incorporación de cuatro moléculas de $[3-{}^{13}C_1]$ tirosina en la biosíntesis de amorolina (**11**) en cultivos de raíces de *S. cepharantha*. *Posición marcada (Tomado de Sugimoto *et al*, 1990).





Figura 1.4 Formación del anillo tropano en la biosíntesis de los alcaloides litorina (12) y hiosciamina (13). Incorporación de una unidad de [²H₃] acetato en las posiciones C-6 y C-7 (Tomado de Durán-patrón *et al.*, 2000).



17

¹³C labelled, using [1-13C]-glucose



Figura 1.5 Enriquecimientos observados en el derivado metilado del metabolito 14 en las posiciones C-3, C-5, C-14, C-18, C-9, C-7 y C-16, después de incorporar [1-¹³C₁] glucosa al medio de cultivo de las suspensiones celulares de *A. officinalis*, comparándolo con una muestra control del metabolito 14 (Tomado de Terada *et al.*, 1995).

1.2 La transformación genética en plantas

Los primeros reportes científicos de plantas transgénicas datan del año 1983 con el desarrollo de plantas de *Nicotiana tabacum* (Herrera-Estrella *et al.*, 1983), de *Nicotiana plumbaginifolia* (Bevan *et al.*, 1983), de plantas del género *Petunia* (Fraley *et al.*, 1983) y de *Helianthus annuus* (girasol) (Murai *et al.*, 1983) resistentes al antibiótico kanamicina. Posteriormente se logró producir plantas transgénicas con características importantes como resistencia a herbicidas, insectos y virus, control de la maduración de frutos, resistencia a condiciones adversas como estrés hídrico (Dai *et al.*, 2001), alcalinidad, salinidad (Mohanty *et al.*, 2002) y frío (Huang *et al.*, 2002).

La transformación genética de plantas ofrece la posibilidad de introducir genes estructurales de rutas metabólicas con el fin de incrementar la biosíntesis de metabolitos secundarios. Los estos estudios de transformación genética en plantas han abierto

nuevos caminos en el conocimiento y producción de alcaloides, polifenoles, terpenoides y algunos metabolitos nuevos que no son encontrados en plantas silvestres, o en cultivos *in vitro* no transformados (Ortiz-Caltempa, 2008).

1.2.1 Procedimientos para la transformación genética

Para realizar la transformación genética en plantas se utilizan dos procedimientos: uno es por vía directa, mediante la introducción de genes utilizando agentes físicos o químicos como rayos láser, microinyección, sonicación y la biobalística. El otro método, es de transferencia indirecta mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* que, de manera natural, insertan sus genes en el genoma de células vegetales. Este último método se ha utilizado para la producción a nivel experimental de metabolitos secundarios que incluyen terpenos, alcaloides, antocianinas y polifenoles (Belarmino y Mii, 2000; Xie *et al.*, 2000; Luczkzkiewcs y Cisowski, 2001).

1.2.1.1 Transformación genética vía Agrobacterium spp.

A. tumefaciens y especies relacionadas como A. rhizogenes y A. vitis, son patógenos reconocidos de plantas que la capacidad de incorporar establemente parte de su material genético al genoma de su hospedero (Tzfira y Citovsky, 2000; Pitzchke y Hirt, 2010). El mecanismo mediante el cual A. tumefaciens induce la formación de tumores en plantas se ha estudiado desde el año 1970 hasta nuestros días (Figura 1.6) y el conocimiento adquirido ha sido fundamental para su uso como herramienta en la ingeniería genética de plantas. Asimismo, esta interacción ha dado pie a la formulación de modelos de señalización celular, de transporte célula a célula, del importe nuclear de proteínas y ADN y de mecanismos de integración genómica (Tzfira y Citovsky, 2000; Tomlinson y Fugua, 2009). Durante el proceso de infección, A. tumefaciens transfiere una parte de su ADN (ADN de transferencia, ADN-T) a la célula vegetal, el cual es integrado all genoma de la planta. Los genes del ADN-T son expresados en el hospedero e inducen la formación de tumores y la síntesis de opinas (derivados de aminoácidos aprovechados por la bacteria). El ADN-T está localizado en el plásmido Ti (Plásmido inductor de tumores), que contiene los genes vir necesarios para la transferencia e incorporación del fragmento de ADN al genoma de la planta (White y Winans, 2007).



Figura 1.6 Interacción Agrobacterium-célula vegetal (McCullen y Binns, 2006).

El proceso de transformación genética se inicia con el reconocimiento y la unión de *A. tumefaciens* a la célula hospedera a través de receptores específicos; posteriormente el sistema de dos componentes de *Agrobacterium* (Vir A-Vir G), percibe señales específicas, donde Vir G (factor transcripcional) es activado e induce la transcripción de la región *vir* del plásmido Ti. Las proteínas codificadas por la región de virulencia, generarán la cadena sencilla del ADN-T, la cual forma un complejo con la proteína Vir D2, el cual es transportado a través del pili formado por las proteínas VirB 2-11/D4. En el citoplasma de la célula vegetal, las proteínas Vir E2 se unen al complejo ADN-T-VirD2, con lo que lo protegen de la degradación. Posteriormente, el complejo ADN-T-VirD2-VirE2 es importado hacia el núcleo, facilitado por proteínas del mismo hospedero, e integrado al genoma de la célula hospedera, por recombinación (Tzfira y Citovsky, 2002). Algunos de los genes presentes en el ADN-T transferido a la célula vegetal son conocidos como *onc*, los cuales codifican para enzimas involucradas en la producción de reguladores de crecimiento de

las plantas (auxinas y citocininas), en tanto que otros codifican para enzimas que sintetizan opinas (Figura 1.6). Los cultivos transformados presentan una alta tasa de crecimiento, de estabilidad genética, de altos niveles de producción de metabolitos secundarios o de cantidades comparables a cultivos no modificados genéticamente y síntesis endógena de fitorreguladores de crecimiento. Asimismo, en estos cultivos se puede incrementar el flujo de las vías biosintéticas de los productos deseados y reducir su catabolismo (Gelvin, 2000; Valentine, 2003; Citovsky *et al.*, 2007; Pitzchke y Hirt, 2010).

A. *rhizogenes* induce el crecimiento vigoroso de raíces infectadas mediante un mecanismo semejante al de *A. tumefaciens*. Y en este caso el plásmido que contiene el ADN-T es llamado Ri (plásmido inductor de raíces) (Sevón y Oksman-Caldentey, 2002; Valdemarra-Fonseca *et al.*, 2005). El principio de transferencia de ADN con *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* ha sido útil para la transformación de especies de plantas dicotiledóneas; sin embargo, ciertas condiciones experimentales deben ser establecidas para que el sistema de transformación funcione bien en nuevas especies vegetales. Aún cuando las monocotiledóneas no son generalmente susceptibles a *A. tumefaciens*, se ha logrado la transferencia de genes a especies monocotiledóneas de importancia económica como el arroz (Cheng *et al.*, 1998), el banano (May *et al.*, 1995), el maíz (Ishida *et al.*, 1996), el trigo (Cheng *et al.*, 1997) y la caña de azúcar (Arencibia *et al.*, 1998), entre otras.

La inserción de nuevos genes y sus elementos reguladores en el ADN-T ha permitido la transformación genética de plantas susceptibles con genes de importancia agronómica. Esto a su vez ha servido para el estudio de la función y expresión de genes, y para el desarrollo de plantas con nuevas características (Gelvin, 2003). Asimismo los estudios de transformación genética en plantas ofrecen nuevas oportunidades para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios como alcaloides, polifenoles, terpenos, etc (Chandra y Chandra, 2011). El interés por obtener plantas con un mejor rendimiento en la producción de metabolitos activos ha llevado al desarrollo de plantas transgénicas; algunos ejemplos incluyen la transformación con *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* de *Withania somnífera* para la producción de whitanólidos y whitanósidos, metabolitos con propiedades antitumorales y antiinflamatorias (Pandey *et al.*, 2010; Murthy *et al.*, 2008; Bandyopadhyay *et al.*, 2007), el cultivo de raíces transformadas vía *A. rhizogenes* de *Camptotheca acuminata* para la

producción de camptotecina, un metabolito utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer (Lorence y Nessler, 2004), y un modelo de cultivo de raíces transformadas de *Atropa belladona* en el que la enzima que convierte hiosciamina a escopolamina está sobreexpresada para aumentar la producción de escopolamina (Chandra y Chandra, 2011).

1.3 Los terpenoides

Los terpenoides o isoprenoides son un grupo de metabolitos sintetizados por todos los organismos y son tal vez el grupo de productos naturales más diverso. Se han descrito decenas de miles de isoprenoides y la mayor diversidad de estos metabolitos se presenta en las plantas (Figura 1.7) (Eisenreich et al., 2001 y 2004). Los isoprenoides tienen una gran variación estructural; pueden ser desde ser acíclicos, monocíclicos y policíclicos (Sacchettini y Poulter, 1997) y además presentan diferentes funciones biológicas que incluyen participación en la fotosíntesis (carotenoides, clorofilas, plastoquinonas) y en la respiración (ubiquinona), además de actuar como hormonas (esteroides), reguladores de crecimiento (giberelinas, ácido abscísico, brasinoesteroides, estrigolactonas), moléculas protectoras contra patógenos, como atraventes, como aromas y sabores etc. (Wanke, et al., 2001; Enfissi, et al., 2005). Todos los isoprenoides derivan de dos unidades básicas, el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetil-alil difosfato (DMAPP). Estos dos bloques estructurales se unen en diferente número y sufren diversas modificaciones como ciclizaciones, oxidaciones e hidroxilaciones a través de diferentes reacciones enzimáticas para producir la gran diversidad de isoprenoides que se clasifican de acuerdo al número de unidades básicas que los constituyen, (Figura 1.8) (McGarvey y Croteau, 1995; Dewick 2002; Dubey et al., 2003).



Figura 1.7 Diversidad en terpenos.



Figura 1.8 Formación y clasificación de terpenos (Tomado de Dewick 2002).

1.3.1 La biosíntesis de terpenoides

Inicialmente se consideraba que los precursores isopentenil difosfato (IPP) y dimetil-alildifosfato (DMAPP) eran sintetizados por todos los organismos vivos a través de una ruta metabólica universal denominada vía del mevalonato (MVA) (Hunter, 2007). Sin embargo, varios resultados experimentales relacionados con la biosíntesis de isoprenoides en plantas y en bacterias no podían ser explicados de forma clara a través de su biosíntesis por la ruta MVA. En particular destacan los estudios sobre ubiquinonas y hopanoides en bacterias, en los cuales se encontró que cuando se utilizaba como sustrato [1-¹³C₁] y [2-¹³C₁] acetato, éste no se incorporaba a los metabolitos (Rohmer, 1999), poniendo en duda que el acetato fuera su precursor. Finalmente, estudios realizados con cloroplastos aislados demostraron de manera inequívoca que estos organelos eran incapaces de sintetizar IPP y DMAPP a partir de ácido mevalónico (Rohmer, 1999). Estos resultados, complementados con el uso de inhibidores de la vía MVA, demostraron la existencia de una vía alterna para la biosíntesis de isoprenoides.

Investigaciones posteriores dieron como resultado el descubrimiento de una vía alterna e independiente, la vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) para la biosíntesis de isoprenoides en los cloroplastos (Rohmer, 1996 y 1999). Actualmente se sabe que tanto el IPP como el DMAPP pueden ser sintetizados por dos rutas metabólicas independientes cuya evolución es un ejemplo notable de convergencia ya que no parece existir relación alguna entre las enzimas que participan en cada una de ellas (Lange *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2006). La vía MVA opera en el citoplasma de prácticamente todos los eucariotes, mientras que la vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) está presente en la mayoría de las eubacterias y en organismos fotosintéticos como algas y plantas superiores, pero está ausente en las arqueobacterias, hongos y animales (Cuadro 1.1). Por lo tanto, la biosíntesis de isoprenoides se realiza a través de ambas rutas tanto en algas como en plantas. La vía MVA es responsable de la biosíntesis de isoprenoides citoplásmicos, mientras la formación de éstos por la vía MEP tiene lugar en los plástidos (Eisenreich *et al.*, 2004; Lichtenthaler, 1999; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002).

| Organismo | Vía MVA | Vía MEP |
|--------------|---------|---------|
| Bacterias | X | x |
| Archaea | X | |
| Hongos | X | |
| Algas | X | x |
| Plantas | | |
| Plástidos | | x |
| Citosol | x | |
| Protozoarios | x | x |
| Animales | x | |
| | | |

Cuadro 1.1 Distribución en la naturaleza de las vías de MVA y MEP en la biosíntesis de terpenoides (Tomado y modificado de Eisenreich *et al.*, 2001).

1.3.1.1 La vía del mevalonato (MVA)

La vía MVA (Figura 1.9A) se caracterizó hace casi 50 años y durante mucho tiempo se le consideró como la vía universal para la síntesis de IPP y DMAPP. Esta vía inicia a partir de la condensación de tres moléculas de acetil-coenzima A (CoA) por la acción de tres enzimas para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-conezima A (HMG-CoA) la cual, después de ser reducirda por dos moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH), produce ácido mevalónico, el primer intermediario comprometido de esta vía y de donde deriva su nombre. El ácido mevalónico, a su vez es transformado en IPP después de consumir tres moléculas de ATP y pérdida de CO2. Finalmente, la enzima IPP isomerasa (IDI) utiliza este producto como sustrato para generar DMAPP (Rohmer, 1999; Dubey, 2003). De los múltiples estudios bioquímicos, genéticos y moleculares de la vía del mevalonato destaca la identificación de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa (HMGR) como uno de los pasos limitantes de la ruta. La HMGR está codificada por una familia de genes cuyo número varía en diferentes especies. Estos genes están sujetos a una regulación compleja, incluyendo múltiples señales ambientales y expresión tejido específica. Sin embargo, la caracterización bioquímica de la enzima HMGR es todavía limitada debido, entre otras cosas, a lo difícil de su purificación. Uno de los logros más importantes de los estudios clásicos de la vía MVA es el desarrollo de inhibidores de la actividad de la enzima HMGR (Yi *et al.*, 2006).

1.3.1.2 La vía del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP)

En el primer paso biosintético de la vía MEP ocurre la condensación del piruvato y el gliceraldehido-3-fosfato (GA3-P) mediante la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS), produciendo 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) (Figura 1.9B). En el segundo paso, el DXP es convertido a 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), por la acción de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reducto isomerasa (DXR) (Hunter, 2007; Dubey *et al.*, 2003). En los siguientes pasos de la vía, el MEP es transformado en 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato (HMBPP) por la acción consecutiva de las enzimas 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-4-fosfato sintasa (CMS), 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-4-fosfato cinasa (CMK), 2C-metil-D-eritritol-2,4 difosfato sintasa (MCS) y 2C-metil-D-eritritol ciclo difosfato sintasa (HDS) (Figura 1.9B). En el último paso de la vía, la enzima 1-hidroxi-2-metil-butenil-4-difosfato reductasa (HDR), convierte el 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato (HMBPP) en isopentenil difosfato (IPP) y dimetil-alil difosfato (DMAPP) (Rohdich *et al.*, 1999; Lüttgen *et al.*, 2000; Herz *et al.*, 2000; Altincicek *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2001).





Capítulo I



MITOCONDRIA

CLOROFLASIO

Figura 1.10 Sitios de de las vías de MVA y MEP en la célula (Tomado y modificado de Lichtenthaler, 1999).

1.3.1.3 Precursores utilizados en estudios de biosíntesis de terpenos.

Entre los principales precursores marcados con ¹³C utilizados en estudios de biosíntesis de terpenoides se encuentran el acetato, el mevalonato, la glucosa, la desoxixilulosa y el CO₂. El uso de acetato y mevalonato se debe a que estos precursores son incorporados con facilidad en terpenos que provienen de la vía MVA, en tanto que la desoxixilulosa se usa para incorporarse a terpenos provenientes de la vía MEP (Dubey *et al.*, 2003). Los estudios utilizando glucosa como precursor marcado han permitido establecer que, para el caso de algunos terpenos, ambas vías participan en su biosíntesis, i.e. algunas de sus unidades isoprénicas derivan de la ruta MVA y otras de la ruta MEP. Finalmente el uso de ¹³CO₂ y la aplicación de perfiles isotopológicos en el metabolismo en plantas bajo condiciones fisiológicas, representa un método innovador para el estudio de la biosíntesis de terpenos (Shuters *et al.*, 2007; Römisch-Margl *et al.*, 2007). Este método está basado en la generación de intermediarios metabólicos universalmente marcados (e.g. [U-¹³C₆]

glucosa) durante un pulso fotosintético que ocurre en una atmósfera de ¹³CO₂, seguido de una fase de fotosíntesis bajo condiciones normales (Schramek *et al.*, 2010). Para el caso del uso de precursores con ¹³C universalmente marcados, la distribución isotopológica de los metabolitos de interés se hace interpretando los acomplamientos ¹³C-¹³C a través del uso de RMN y espectrometría de masas (EM) (Schramek *et al.*, 2010). Los isotopólogos generados son diferentes para cada vía, lo que permite diferenciar el origen de las unidades isoprénicas en los estudios de biosíntesis de terpenoides. Tomando en cuenta que para la vía MVA se condensan tres unidades de acetil-CoA y que una de las unidades se decarboxila, existe la posibilidad de generarse tres isotopólogos [1,2-¹³C₂] y [3,5-¹³C₂]), y el tercero presentando sólo un carbono marcado (isotopólogo [4-¹³C₁]), ya que corresponde a la unidad de acetato que sufre la decarboxilación (Figura 1.11). Con base en los isotopólogos generados por la vía MVA, sólo es de esperarse en ¹³C RMN acoplamientos ¹³C-¹³C adyacentes (*J*= 30-80 Hz) y por espectrometría de masas fragmentos M+1 y M+2 (Schramek *et al.*, 2010).



Figura 1.11 Isotopólogos formados por la vía MVA a partir de precursores marcados universalmente.

Por otra parte en la vía MEP se forman dos isotopólogos a partir de precursores marcados universalmente, tomando en cuenta que los iniciadores de esta vía son piruvato y gliceraldehído-3-fosfato. En el caso de esta ruta, uno de los isotopólogos contiene dos carbonos marcados derivados del piruvato (isotopólogo $[3,5-{}^{13}C_2]$) y el otro tiene tres carbonos marcados derivado de la incorporación intacta de una unidad de gliceraldehído universalmente marcado (isotopólogo $[1,2,4-{}^{13}C_3]$) (Figura 1.12). La identificación de unidades isoprénicas proveniente de la vía MEP, están dadas básicamente por el acoplamiento ${}^{13}C-{}^{13}C$ a distancia (*J*= 1-10 Hz) observado por ${}^{13}C$ RMN, característico de uno de sus isotopólogos, y por espectrometría de masas a través de los fragmentos M+2 y M+3 (Adam *et al.*, 2002; Eisenreich *et al.*, 2013).





En el caso de los estudios de biosíntesis de terpenos con precursores que no son universalmente marcados, los resultados de incorporación se interpretan con base en los enriquecimientos observados en las unidades de acuerdo al precursor empleado y a la ruta biosintética seguida (Adam *et al.*, 2002; Eisenreich *et al.*, 2013).

1.3.1.3.1 Estudios usando precursores a partir de ¹³C acetato

Los precusores derivados de ¹³C-acetato son importantes para estudiar o confirmar el origen biosintético de terpenos cuya biosíntesis derivan de la vía MVA, esto tomando en cuenta que la vía MVA inicia con la condensación de tres unidades de acetil CoA. El patrón de enriquecimiento en las unidades de isopreno dependerá del átomo de carbono marcado en el precursor de acetato, i.e. si el precursor es [1-¹³C₁] acetato, las unidades de isopreno se enriquecerán en las posiciones C-1 y C-3, pero si es [2-¹³C₁] acetato las unidades de isopreno se enriquecerán en las posiciones C-2, C-3 y C-4 (Figura 1.13). El uso de [1,2-¹³C₂] acetato permitirá la formación de dos isotopólogos que lleven dos carbonos marcados adyacentes ([1,2-¹³C₂] y [3,5-¹³C₂]) o un isotopólogo que esté marcado en un solo átomo de carbono ([4-¹³C₁] isotopólogo) en las unidades isoprénicas, esto debido a que en la ruta MVA dos de las unidades de acetil CoA se incorporan de forma intacta, en tanto que una de ellas sufre una decarboxilación (Eisenreich *et al.*, 2004).



Figura 1.13 Enriquecimiento de unidades de isopreno vía MVA. Con: A) [1-¹³C₁] acetato y B) [2-¹³C₁] acetato.

Los estudios de incorporación de precursores de ¹³C-acetato permitieron establecer el origen biosintético de verrucosan-2 β -ol (**15**), un diterpeno de la clase de los verrucosanos producido por la bacteria *Chloroflexus aurantiacus*. La incorporación de [1-¹³C₁], [2-¹³C₁] y [1,2-¹³C₂] acetato y el análisis por RMAL del metabolito obtenido en cada caso, mostró que ocho de los carbonos del diterpeno (**15**) se enriquecieron al utilizar [1-¹³C₁] acetato (Figura 1.14A) y 12 al utilizar [2-¹³C₁] acetato (Figura 1.14B), en ambos casos los patrones de enriquecimiento en las unidades de isopreno se dio en las posiciones señaladas en la

figura 1.13, estableciéndose que el diterpeno **15** deriva de la vía MVA. Lo anterior se confirmó mediante la incorporación de [1,2-¹³C₂] acetato, al observarse los acoplamientos esperados ¹³C-¹³C adyacentes (Figura 1.14C) (Rieder *et al.*, 1998; Eisenreich *et al.*, 2004).





Figura 1.14 Marcaje observado en verrucosan- 2β -ol (15). Con: A) [1-¹³C₁] acetato, B) [2-¹³C₁] acetato. C) [1,2-¹³C₂] acetato y D) Unidades de isopreno en la estructura. Las líneas oscuras representan los acoplamientos ¹³C-¹³C (Tomado de Rieder *et al.*, 1998).

1.3.1.3.2 Estudios usando precursores a partir de ¹³C 1-Desoxi-D-xilulosa

Tomando en cuenta que la condensación de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato genera 1desoxi-D-xilulosa-5-fosfato en la vía MEP, los precursores derivados de este intermediario facilitan el estudio de terpenos provenientes de esta vía. La marca de la unidad del precursor será la clave para los enriquecimientos observados en las unidades de isopreno. Por ejemplo el precursor [1-¹³C₁] 1-desoxi-D-xilulosa formará unidades de isopreno con enriquecimiento en la posición C-5, en tanto que [3,4,5-¹³C₃] 1-desoxi-Dxilulosa formará unidades isoprénicas con enriquecimientos en las posiciones C-1, C-2 y C-4 (Figura 1.15 A y B).



Figura 1.15 Enriquecimiento de unidades de isopreno vía MEP. Con: A) [1-¹³C₁] 1-Desoxi-Dxilulosa y B) [3,4,5-¹³C₃] 1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato.

La incorporación de precursores de 1-Desoxi-D-xilulosa fue utilizada para el estudio de la biosíntesis de lamalbido (**16**), un iridoide glicosilado, aislado de *Lamium barbatum* (Lamiaceae). Los resultados demostraron que la [$3,4,5-^{13}C_3$] 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato se incorpora a la estructura del lamalbido siguiendo el patrón de enriquecimiento esperado para la ruta de biosíntesis de la vía MEP (Figuras 1.15B y 1.16A) (Heng *et al.*, 2010).





Figura 1.16 Análisis del marcaje del Lamalbido (**15**) usando como precursores A: $[3,4,5-{}^{13}C_3]$ 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato y B: $[2-{}^{13}C_1]$ mevalonolactona (Tomado de Heng *et al.*, 2010).

35

De manera similar, la incorporación de [1-¹³C₁] 1-DesoxI-D-xilulosa a *Matricaria recutita*, (Figura 1.17), como parte de los estudios de la biosíntesis de los sesquiterpenos bisabolóxido A (**17**) y chamazuleno (**18**), permitió establecer que las dos primeras unidades de isopreno en la biosíntesis de los sesquiterpenos provienen de la vía MEP (Figura 1.15A), y que el bajo enriquecimiento en la posición C-5 de la tercera unidad, sugiere que ésta puede derivarse de una combinación de las vías MVA y MEP en la formación del farnesil difosfato (FPP) (**19**) (Figura 1.17) (Adam *et al.*, 1999; Adam y Zapp, 1998).



Figura 1.17 Enriquecimientos observados en el bisabolóxido A (18), chamazuleno (17) y FPP (19) a partir de [1-¹³C₁] 1-Desoxi-D-xilulosa (Tomado de Adam y Zapp, 1999).

1.3.1.3.3 Estudios usando precursores a partir de ¹³C glucosa

Los experimentos de incorporación con ¹³C glucosa han permitido establecer las diferencias de contribución entre las vías MVA y MEP en la formación de terpenos individuales usando diferentes modelos de cultivo de tejidos. Es importante enfatizar que la glucosa a través de su metabolismo da origen a los intermediarios gliceraldehido-3-fosfato, piruvato y acetil CoA, los cuales participan en las rutas de biosíntesis de terpenos, y genera unidades de isopreno provenientes tanto de la ruta MVA como MEP (Figura 1.18) (Eisenreich *et al.*, 2004). En la figura 1.18 se muestra la distribución de los átomos de carbono de la glucosa que dan origen a los intermediarios antes mencionados y a las unidades de isopreno, cuyo patrón de enriquecimiento depende del átomo o átomos de carbono que lleve la marca de ¹³C en la glucosa y de la ruta biosintética del cual

provenga, e.g. el precursor $[1^{-13}C_1]$ glucosa genera unidades de isopreno con enriquecimientos en las posiciones C-2, C-5 y C-4 si proviene de la ruta MVA y en C-1 y C-5 si las unidades de C5 se forman partir de la vía MEP (Figura 1.19) (Adam y Zapp, 1998).



Figura 1.18 Intermediarios generados a partir del metabolismo de la glucosa: A) Gliceraldehído-3-fosfato, piruvato y acetil CoA. B) Biosíntesis de unidad de isopreno proveniente de la condensación de tres unidades de acetil CoA (vía MVA). C) Biosíntesis de una unidad de isopreno provenienente de la condensación de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato (vía MEP). Los símbolos indican posiciones biosintéticamente equivalentes (Tomado de Eisenreich *et al.*, 2004).



Figura 1.19 Enriquecimiento en unidades de isopreno formados por las vías MVA y MEP a partir de [1-¹³C₁] glucosa.

La incorporación de [1-¹³C₁] glucosa a las flores de *M. recutita* permitió confirmar el origen biosintético de las unidades de isopreno en FPP (**19**), como parte de la biosíntesis de los sesquiterpenos bisabolóxido A (**17**), y chamazuleno (**18**). El perfil de los átomos de carbono enriquecidos observado en el ¹³C RMN de los sesquiterpenos mostró que las dos primeras unidades de isopreno provienen de la ruta MEP y que la tercera unidad se origina de una combinación de las rutas MVA y MEP (Figura 1.20) (Adam y Zapp, 1998).



Figura 1.20 Enriquecimientos observados en el bisabolóxido A (**17**), chamazuleno (**18**) y FPP (**19**) a partir de [1-¹³C₁] glucosa (Tomado de Adam y Zapp, 1998).

Los estudios de incorporación de $[1^{-13}C_1]$ glucosa a los sesquiterpenos ricciocarpina (**20**) de *Ricciocarpos natans* y cubebanol (**21**) de *Conocephalum conicum*, revelaron que las unidades de isopreno de ambos metabolitos presentan un patrón de enriquecimiento característico de un origen biosintético vía MVA (Adam *et al.*, 1998).



Por otra parte estudios realizados con [U-¹³C₆] glucosa han mostrado ser útiles en estudios de biosíntesis de terpenos, debido a la obtención de isotopólogos con patrones de enriquecimientos que dependen de la ruta biosintética involucrada como se mencionó antes, y donde los criterios de análisis por ¹³C RMN se basan en los acomplamientos observados ¹³C-¹³C en posiciones adyacentes o a distancia, y por los fragmentos M+1, M+2 y M+3 presentados por espectrometría de masas. Los acoplamientos ¹³C-¹³C adyacentes en los isotopólogos de las unidades isoprénicas provenientes de las vías MVA son C-1 con C-2, C-3 con C-5, en tanto que para la vía MEP los acoplamientos ¹³C-¹³C observados son C-3 con C-5 (acoplamiento adyacente) y a distancia entre C-1 y C-2 con C-4 (Schwender *et al.*, 1996) (Figura 1.21).



Figura 1.21 Acoplamientos ¹³C-¹³C observas en unidades isoprénicas: A) Vía MVA y B) Vía MEP

Estudios de incorporación de $[U^{-13}C_6]$ glucosa en la biosíntesis de 8 α -acetoxi-13 α -hidroxi-5-oxo-13-epi-neoverrucosano (**22**), un diterpeno tipo verrucosano aislado de la especie hepática *Fossombronia alaskana*, revelaron que la biosíntesis del diterpeno es a través de la vía MEP, con base a los análisis de los acomplamientos ¹³C-¹³C en el espectro de ¹³C RMN y en el experimento bidimensional INADEQUATE. Los resultados de estos experimentos indicaron que siete pares de carbonos fueron incorporados en los anillos del diterpeno a partir del precursor de glucosa, observándose acoplamientos ¹³C-¹³C adyacentes y a distancia (Figuras 1.22A y 1.22B), además de observarse un isotopólogo con dos carbonos marcados derivado de acetato en la unidad de acetilo presente del diterpeno **22**. Estos resultados fueron confirmados con la incorporación del precursor [1-¹³C₁] glucosa que mostró un enriquecimiento en las posiciones C-1 y C-5 en las unidades de isopreno del diterpeno, característico de la vía MEP (Figura 1.19) (Eisenreich et al., 1999 y 2004).





Figura 1.22 Marcaje establecido para el 8α -acetoxi-13 α -hidroxi-5-oxo-13-epi-neoverrucosano (22) en *Fossombronia alaskana con:* A) [U-¹³C₆] glucosa y B) [1-¹³C₁] glucosa. C) Unidades de isopreno. Las líneas oscuras representan los acoplamientos ¹³C-¹³C (Tomado de Eisenreich *et al.*, 1999).

1.3.1.3.4 Estudios incorporando ¹³CO₂

La importancia de incorporación de ¹³CO₂ en plantas para estudios de biosíntesis de terpenos es debido a la generación intermediarios metabólicos universalmente marcados. En comparación con el empleo de otros precursores, el empleo de ¹³CO₂ requiere de un procedimiento muy simple, ya que los experimentos de incorporación pueden realizarse en plantas enteras bajo una amplia variedad de condiciones experimentales, el nivel de marcaje puede ser modulado en función al tiempo de pulso con ¹³CO₂ y al periodo de acumulación empleado (Ostrozhenkova, 2008 y 2009). En el caso de plantas de Artemisia annua que se expusieron a una atmósfera de ¹³CO₂, para estudiar el origen biosintético de la artemisinina (23), un sesquiterpeno con actividad antimalárica, el análisis de los isotopómeros y sus acoplamientos ¹³C-¹³C reveló que de las tres unidades de isopreno, la primera y la tercera unidad provenían de la vía MVA, en tanto que la segunda unidad isoprénica era derivada de la vía MEP (Schramek et al., 2010). Estos resultados ya se habían observado con experimentos usando inhibidores de las vías MVA y MEP, en los que se demostró que inhibiendo ambas rutas de biosíntesis se da una disminución en la producción de artemisinina (Towler y Weaters, 2007). El patrón isotopológico para la biosíntesis de la artemisinina con incorporación de ¹³CO₂ se muestra en la figura 1.23C, en donde se señalan las tres unidades de isopreno y los acoplamientos ¹³C-¹³C adyacentes de la primera y tercera unidades, y los acoplamientos a distancia de segunda unidad. En el espectro de ¹³C RMN de la artemisinina se observan doce señales de carbonos que presentaron satélites con constantes de acoplamiento ¹³C-¹³C entre 30-50 Hz, indicando acoplamiento advacente. La señal de C5, que mostró un acoplamiento adicional de 3.2 Hz caracteíristica de un acoplamiento a distancia, sugirió la presencia de un isotopólogo ¹³C₃ resultante de la incorporación de un precursor ¹³C₃-gliceraldehido a través de la vía MEP en la unidad isoprénica central. Tomando en cuenta que de las tres unidades isoprénicas de la artemisinina, sólo la unidad central tiene su origen en la vía MEP, se propone un modelo de biosíntesis del sesquiterpeno (Figura 1.24), partiendo inicialmente de una unidad de DMAPP originada en el citosol a través de la vía MVA que luego es transferida al interior del plástido, donde una unidad de IPP (vía MEP) es utilizada para elongar la cadena, formándose geranil difosfato (GPP). En el siguiente paso el GPP es exportado al compartimento citosólico en donde otra unidad de DMAPP derivada de la vía MVA es incorporada hasta formar FPP, con un origen biosintético mixto, el cual a través de una serie de reacciones es transformado en artemisinina.



Figura 1.23 Unidades isoprénicas de artemisinina (23) y su composición isotopológica con ¹³C a partir de los experimentos con ¹³CO₂ (Tomado de Schramek *et al.*, 2010).



Figura 1. 24 Modelo de biosíntesis de la artemisinina (23) con un origen biosintético mixto a partir de las vías MVA y MEP (Tomado de Schramek *et al.*, 2010)

Asimismo estudios de la biosíntesis de hiperforina (24), un terpenoide aislado *Hypericum perforatum*, usando la exposición a ¹³CO₂ confirmaron lo que se había observado en los primeros experimentos usando [U-¹³C₆]-glucosa, i.e. que las unidades de isopreno son predominantemente provenientes de la vía MEP (Ostroshenkova *et al.*, 2009; Adam *et al.*, 2002). Lo anterior fue confirmado por los isotopólogos ¹³C de 24, e.g. los dos pares de satélites observados en la señal de C-9 como resultados de sus acoplamientos con C-1 (38.7 Hz) y con C-5 (35.2 Hz), que indican la presencia de isotopólogos [1,9-¹³C₂] y [5,9-¹³C₂], respectivamente (Figura 1.25). Algunos de los carbonos mostraron acomplamientos ¹³C-¹³C a distancia característicos de la vía MEP, entre ellos C-21 con C-22 y C-25 (43.4 y 4.5 Hz), así como C-27 con C-26 y C-30 (43.4 y 3.1 Hz) (Figura 1.25), estableciéndose de esta manera los isotopólogos [21, 22, 25-¹³C₃] y [26, 27, 30-¹³C₃] para la hiperforina (Ostrozhenkova, 2009).



Figura 1.25 Espectro parcial ¹³C RMN de hiperforina (**24**) obtenido a partir de los experimentos de incorporación de ¹³CO₂, en donde se indican las constantes de acoplamiento. El asterisco señala una impureza (Tomado de Ostrozhenkova, 2009).

1.4 Estudios fitoquímicos en Pentalinon andrieuxii

Una de las familias de plantas que se caracteriza por su producción de metabolitos secundarios de interés farmacológico es la familia Apocynaceae. El género *Pentalinon*, perteneciente a esta familia, ha recibido poca atención en cuanto a su composición química y en la literatura se reporta la producción de cardenólidos, alcaloides pirrolizidínicos, triterpenos, esteroles, glicósidos y coumarinas (Tillequin *et al.*, 1993; Domínguez-Carmona *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2012). Un estudio fitoquímico reciente del extracto de la raíz de *Pentalinon andrieuxii* reportó el aislamiento y la identificación de dos nuevos trinorsesquiterpenos, urechitoles A y B, con un esqueleto novedoso derivado del guaianólido (Yam-Puc *et al.*, 2009).

Dada la estructura novedosa del esqueleto campechano y la falta de reportes de otros metabolitos que posean dicho esqueleto, se pretende estudiar la biosíntesis de los urechitoles utilizando un modelo de CTV's. Revisando la literatura buscando la existencia de metabolitos que presenten similitud estructural con los urechitoles, se propone que la estructura tetracíclica del Urechitol A, podría ser explicada como derivada de la matricina (**25**), un sesquiterpeno aislado de las flores de *Chamomilla recutita* (L.) (Ness *et al.*, 1996), en una ruta biosintética que incluye un esqueleto guaiano como punto de partida (Figura 1.26). En este trabajo se describe el establecimiento y utilización de un sistema de cultivo *in vitro* de *P. andrieuxii* para el estudio del origen biosintético de los urechitoles.



Figura 1.26 Posible origen biosintético del urechitol A a partir de matricina (25)

1.5 HIPÓTESIS.

Los urechitoles A y B, obtenidos de la raíz de *P. andrieuxii*, deben producirse en un sistema de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general

Establecer y utilizar un modelo de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* de *P. andrieuxii* para estudios de producción y biosíntesis de terpenoides.

1.6.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones óptimas para la germinación de plántulas de P. andrieuxii in vitro.
- Establecer una metodología para generar un sistema de cultivo de callos a partir de hojas, hipocótilo y raíces de *P. andrieuxii*.
- Comparar los perfiles cromatográficos del extracto de raíz, tallo y hojas de P. andrieuxii silvestre (adultas) con el extracto de raíz, hipocótilo y hojas de las plántulas in vitro así como de los callos formados a partir de los mismos explantes.
- Establecer un modelo de CTV's adecuado (cultivo de raíces transformadas) para el estudio de biosíntesis de los urechitoles A y B.
- Aislar e identificar terpenoides en *P. andrieuxii* que faciliten el conocimiento del origen biosintético de los urechitoles.
- Establecer un modelo de incorporación de ¹³CO₂ en plantas de *P. andrieuxii* y aislar a los urechitoles y otros terpenoides marcados

1.7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





La estrategia experimental se puede dividir en tres partes principales, la primera parte consiste en el aislamiento de metabolitos de plantas silvestres de *P. andrieuxii* que aporten información sobre la biosíntesis de los urechitoles. En la segunda parte el establecimiento de un modelo de CTV's que conduzcan a la producción de los urechitoles y, finalmente la tercera parte consiste en el estudio de la incorporación de ¹³CO₂ de plantas de *P. andrieuxii* con el fin de conocer el origen biosintético de los urechitoles.
1.8 JUSTIFICACIÓN.

Los estudios de producción de metabolitos secundarios a partir de organismos cultivados *in vitro* han contribuido al esclarecimiento del origen biosintético de distintos productos naturales, así como a la producción de metabolitos secundarios de importancia económica.

P. andrieuxii es una de las plantas más empleadas en la medicina tradicional de la península de Yucatán para el tratamiento de la leishmaniosis. Recientemente se ha reportado la identificación de dos nuevos trinorsesquiterpenos (urechitoles A y B) del extracto de la raíz de esta planta que han contribuido al conocimiento fitoquímico de la especie. Dada la novedad del esqueleto carbonado de los urechitoles, denominado campechano y al no existir reportes en la literatura de este esqueleto ni de metabolitos que lo posean, el presente trabajo pretende realizar estudios de la producción y biosíntesis de los urechitoles utilizando un modelo de cultivo *in vitro*, incluyendo la obtención de tejido calloso y raíces transformadas genéticamente, permitiendo de esta manera establecer las bases para estudios de biosíntesis de estos terpenoides mediante el uso de precursores marcados con ¹³C.

1.9 REFERENCIAS

- Adam, K.P. and Zapp, J. (1998). Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. Phytochemistry, 48 (6), 953-959.
- Adam, K.P., Thiel, R., Zapp, J. (1999). Incorporation of 1-[1-¹³C]-deoxy-D-xylulose in chamomille sesquiterpenes. Archives of Biochemistry and Biophysics, 369 (1), 127-132.
- Adam, K.P., Thiel, R., Zapp, J., Becker, H. (1998). Involvement of them mevalonic acid pathway and the glyceraldehydes-pyruvate in terpenoid biosynthesis of the Liverworts *Ricciocarpos natans* and *Conocephalum conicum*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 354 (1), 181-187.
- Adam, P., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. (2002). Biosynthesis of Hiperforin in *Hypericum perforatum*. Journal of Medicinal Chemistry, 45, 4786-4793.
- Altincicek, B., Kollas, A., Eberl, M., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Hintz, M., Beck, E., Jomaa, H. (2001). LytB, a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. FEBS Letters, 499, 37-40.
- Arencibia, A.D., Carmona, E.R., Téllez, P., Chan, M.T., Yu, S.M., Trujillo, L.E., Oramas, P. (1998). An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Transgenic Research, 7, 1-10.
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C., Restrepo, J. (2009). Engineering aspects of the *in vitro* plant cell culture for the production of secondary metabolites. DYNA, 76 (157), 109-121.
- Bandyopadhyay, M., Jha, S., Tepfer, D. (2007). Changes in morphological phenotypes and whitanolide composition of Ri-transformed roots of *Whitania somnifera*. Plant Cell Reports, 26, 599-609.

Belarmino, M. and Mii, M. (2000). Agrobaterium-mediated genetic transformation of a

Phalaenopsis orchid. Plant Cell Reports, 19, 435-442.

- Bernardett, O. (2000). Avances en la morfogénesis *in vitro* de trinitaria (*Boungainvillea glabra*) cvs Glabra y *Sandierlana variegata*. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. UCV. Maracay, Venezuela.
- Bevan, M.W., Flavell, R.B., Chilton, M.D. (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as selectable marker for plant cell transformation. Nature, 304, 184-187.
- Bougard, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of secondary metabolites: a historical perspective. Plan Science, 161 (5), 839-851.
- Calva-Calva, G., Esparza-García, F., Pérez-Vargas, J., Martínez-Juárez, V.M., Silva-Cervantes, S., López-Sánchez, C. (2002). Plantas como biorreactores para la producción de biomoléculas y remoción de xenobióticos. Avance y perspectiva, 21, 307-312.
- Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Seeman, M., Rohmer, M., Boronat, A. (2001). Identification of gcpE as a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. FEBS Letters, 488 (3), 170-173.
- Chandra, S. and Chandra, R. (2011). Engineering secondary metabolite production in hairy roots. Phytochemistry Reviews, 10, 371-395.
- Charlet, S., Gillet, F., Villarreal, M., Barbotin, J.N., Fliniaux, M.A., Nava, J.E. (2000). Immobilization of Solanum chrysotrichum plant cells within Ca-alginate gel beads to produce an antimycotic spirostanol saponin. Plant Physiology Biochemistry, 38 (11), 875-880.
- Cheng, M., Fry J.E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, M., Duncan, D.R., Conner, T.W., Wan,
 Y. (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.
 Plant Physiology, 115 (3), 971-980.

- Cheng, X., Sardana, R., Kaplan, H., Altosaar, I. (1998). Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic cryIA(b) and cryIA(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 95 (6), 2767-2772.
- Citovzky, V., Kozlovsky, S.V., Lacroix, B., Zaltsman, A., Dafny-Yelin, M., Vyas, S., Tovkach, A., Tzfira, T. (2007). Biological system of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. Cellular Microbiology, 9 (2), 9-20.
- Cross, M. and Hohenberg, P.C. (1993). Pattern formation outside equilibrium. Reviews of Modern Physics, 65, 851-1112.
- Dai, X., Wang, Y., Yang, B., Zhou, J. (2001). Expression of *otsA* gene in tobacco and improvement stress tolerance. Wei Sheng Wu Xue Bao, 41 (4), 427-431.
- Dewick, P.M. (2002). Medicinal Natural Products, Wiley editorial offices, 2nd edition, 162-172.
- Dörnenburg, H., (2004). Evaluation of immobilizatiion effects on metabolic activities and productivity in plant processes. Processes Biochemistry, 39 (11), 1369-1375.
- Domínguez-Carmona, D.B., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Ruiz-Pinelli, G., Gutiérrez-Yapu, D., Chan-Bacab, M.J., Giménez-Turba, A., Peña-Rodríguez, L.M. (2010). Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. Phytomedicine, 17, 379-382.
- Dubey, V.S., Bhalla, R., Luthra, R. (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. Journal of Biosciences, 28 (5), 637-646.
- Durán-Patrón, R., O'Hagan, D., Hamilton, J.T., Wong, C.W. (2000). Biosynthetic studies on the tropane ring system of the tropane alkaloids from *Datura stramonium*. Phytochemistry, 53 (7), 777-784.

Eisenreich, W., Rieder, C., Grammes, C., Hebler, G., Adam, K.P., Becker, H., Arigoni, D.,

Bacher, A. (1999). Biosynthesis of a Neo-epi-verrucosane diterpene in liverwort *Fossombronia alaskana*. The Journal of Biological Chemistry, 274 (51), 36312-36320.

- Eisenreich, W., Rohdich, F., Bacher, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. Trends in Plant Science, 6 (2), 78-84.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. Cellular and Molecular Life Sciences, 61, 1401-1426.
- Eisenreich, W., Huber, C., Kutzner, E., Knispel, N., Schramek, N. (2013). Isotopologue profiling -toward a better understanding of metabolic pathways. The handbook of plant metabolomics.
- Enfissi, E.M.A., Fraser, P.D., Louis, L.M., Boronat, A., Schuch, W., Bramley, Peter, M. (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. Plant Biotechnology Journal, 3 (1), 17-27.
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A. Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L., Woo, S.C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. En Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 80, 4803-4807.
- Gelvin, S. (2000). Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51, 223-256.
- Gelvin, S. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67 (1), 16-37.
- Gillet, F., Rosin, C., Fliniaux, M., Jacquin-Dubreil, A., Barbotin, J., Nava-Saucedo, J. (2000). Immobilization of *Nicotiana tabacum* plant cell suspensions within calcium alginate gel beads for the production of enhanced amounts of scopolin. Enzyme and

Microbial Technology, 26, 229-234.

- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van-Montagu, M., Schell, J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. Nature, 303, 209-213.
- Heng, L., Shao-Qing, Y., Hui, W., Jie, T., Wen-Yun, G. (2010). Biosynthesis of the iridoid glucoside, lamalbid, in *Lamium barbatum*. Phytochemistry, 71, 1690-1694.
- Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C.A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M.H., Bacher, A., Rohdich, F. (2000).
 Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidil-2-C-methyl-Derythritol-2-phosphate to 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclophosphate. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 97, 2486-2490.
- Huang, T. (2002). Expression of an insect (*Dendroides canadiensis*) antifreeze protein in *Arabidopsis thaliana* results in a decrease in plant freezing temperature. Plant Molecular Biology, 50 (3), 333-344.
- Hunter, W.N. (2007). The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. The Journal of Biological Chemistry, 282 (30), 21573-21577.
- Klink, J., Becker, H. Andersson, S., Boland, W. (2003). Biosynthesis of anthecotuloide, an irregular sesquiterpene lactone from *Anthemis cotula* L. (Asteraceae) via a nonfarnesyl diphosphate route. Organic and Biomolecular Chemistry, 1 (9), 1503-1508.
- Koch, A.J. and Meinhardt, H. (1994). Biological pattern formation: from basic mechanism to complex structures. Reviews of Modern Physics, 66, 1481-1507.
- Kuzuyama, T. (2002). Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. Bioscience, Biotechnology and Biiochemistry, 66 (8), 1619-1627.
- Lange, B.M., Wildung, M.R. McCaskill, D., Croteau, R. (1998). A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independient pathway.

Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 95 (5), 2100-2104.

- Lichtenthaler, H.K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant physiology and Plant Molecular Biology, 50, 47-65.
- Lorence, A. and Nessleer, C.L. (2004). Molecules of interest: Camptothecin, over four decades of surprising findings. Phytochemistry, 65, 2735-2749.
- Loyola-Vargas, V.M., Sánchez-Iturbide, P., Canto Canché, B., Gutiérrez-Pacheco, L.C., Galaz-Ávalos, R.M., Moreno-Valenzuela, O. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. Revista de la Sociedad Química de México, 48, 67-94.
- Luczkzkiewcz, M. and Cisowski, W. (2001). Optimization of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*. Plant Cell Tissue and Organ Cultures, 65, 57-68.
- Lüttgen, H., Rohdich, F., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C.A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M.H., Bacher, A., Eisenreich, W. (2000). Biosynthesis of isoprenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2hydroxy group of 4-diphosphocytidil-2C-methyl-D-erythritol. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 97, 1062-1067.
- May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J., Arnttzen, C.J. (1995). Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*mediated transformation. Nature Biotechnology, 13, 486-492.
- McCullen, C.A. and Binns, A.N. (2006). Agrobacterium tumefaciens and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 22, 101-127.
- McGarvey, D.J. and Croteau, R., (1995). Terpenoids metabolism. Plant Cell, 7, 1015-1026.

- Montes-Ayala, M.E. (2007). La importancia actual de la técnica de cultivo de tejidos vegetales con referencia a la biotecnología. Revista virtual de la Universidad de Occidente, Santa Ana, El Salvador, Centroamérica, 2, 50-55.
- Mohanty, A., Kathuria, H., Ferjani, A., Sakamoto, A., Mohanty, P. Murata, N., Tyagi, A. (2002). Transgenics of an elite indica rice variety *Pusa basmati* 1 harbouring the codA gene are highly tolerant to sal stress. Theoretical and Applied Genetics, 106 (1), 51-57.
- Murai, N. (1983). Phaseolin gene from vean is expressed after transfer tos sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. Science 222, 476-482.
- Murthy, H.N., Dijkstra, C., Anthomy, P., White, D.A., Davey, M.R., Power, J.B., Hahn, E.J., Peak, K.Y. (2008). Establishment of *Whithania somnifera* hairy roots cultures for the production of Withanolide A. Journal of Integrative Biology, 50 (8), 975-981.
- Ness, A., Metzger, J.W., Schmidt, P.C. (1996). Isolation, identification and stability of 8desacetylmatricine, a new degradation product of matricine. Pharmacetica Acta Helvetiae, 71 (4), 265-271.
- Ortiz-Caltempa, A. (2008). Establecimiento de un cultivo de células transformadas de *Galphimia glauca* en suspensión para la producción de triterpenos. Tesis de doctorado. Instituto Politécnico Nacional. Centro de desarrollo de productos bióticos. 61 p.
- Ostrozhenkova, E., Schramek, N., Winzenhörlein, B., Bacher, A., Eisenreich, W. (2009) Precursor strategies for studies of isoprenoid biosynthesis in plants. In Plant Secondary Terpenoids, 75-95 ISBN: 978-81-308-0332-6.
- Ostrozhenkova, E. (2008). Metabolite and isotopologue profiling in plants. Studies on the biosynthesis of terpenoids and alkaloids. Universidad Técnica de Munich, Alemania. Tesis de doctorado.

- Pan, L., Lezama-Dávila, C.M.; Isaac-Márquez, A.P., Calomeni, E.P., Furchs, J.R., satoskar, A.R., Kinghorn, A.D. (2012). Sterols with antileishmanial activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. Phytochemistry, 82, 128-135.
- Pandey, V., Misra, P., Chaturvedi, P., Mishra, M.K., Trivedi, P.K., Tuli, R. (2010). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Whitania somnifera (L.) Dunal: an important medicinal plant. Plant Cell Reports, 29, 133-141.
- Patulun, W., Luealon, W., Deeknamkul, W., Tanala H., Shoyama, Y. (2007). Improvement of artemisin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. Biotechnology Letters, 29 (7), 1143-1146.
- Pitzschke, A. and Hirt, H. (2010). New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. The European Molecular Biology Organization Journal, 29, 1021-1032.
- Prakash, G. and Srivastava, A. (2005). Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azaridachta indica* (A. Jyss) suspension cultures. Process Biochemistry, 40 (12), 3795-3800.
- Ray, S. and Jha, S. (1999). Withanolide synthesis in cultures of *Withania somnifera* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science, 146 (1), 1-7.
- Rieder, C., Straub, G., Fuchs, G., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. (1998). Biosynthesis of the diterpene verrucosan-2β-ol in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. The Journal of Biological Chemistry, 273 (29), 18099-18108.
- Roca, W.M. (2000). Introducción a la biotecnología vegetal. Centro para el desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. CEDAF. Universidad Nacional de Colombia, pg 22-25.
- Rodríguez-Concepción, M. and Boronat, A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathways for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. Plant Physiology, 130 (3), 1079-1089.

- Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M.H. (1999). Cytidime 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidil-2C-methyl-D-erythritol. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 96, 11758-11763.
- Rohmer, M., Seeman, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1996). Glyceraldehyde-3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. Journal of the American Chemical Society, 118, 2564-2566.
- Rohmer, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independient pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. Natural Product Reports, 16, 565-574.
- Römisch-Margl, W., Schramek, N., Radykewicz, T., Ettenhuber, C., Eylett, E., Huber, C.,
 Römish-Margl, L., Schwarz, C., Dobner, M., Demmel, N., Winzenhörlein, B., Bacher,
 A., Eisenreich, W. (2007). ¹³CO₂ as a universal metabolic tracer in isotopologue
 perturbation experiments. Phytochemistry, 68, 2273-2289.
- Sajc, L., Grubisic, D., Vunjak-Novakovik, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an Outlook for further reserarch. Biochemical Engineering Journal, 4 (2), 89-99.
- Sacchettini, J.C. and Poulter, C.D. (1997). Creating isoprenoid diversity. Science, 277, 1788-1789.
- Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. (1996). Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehydes-3-phosphate non mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. Journal of Biochemistry, 316, 73-80.

Schlatmann, J., Hoopen, H., Heljnen, J. (1996). Large-scale production of secondary

metabolites by plant cell cultures. En: Dicosmo F., Misawa, M., Editores. Plant cell culture secondary metabolism: Howard industrial application. New Cork: CRS Press, 11-52.

- Schramek, N., Wang, H., Römisch-Margl, W., Keil, B., Radykewicz, T., Winzenhörlein, B., Beerhues, L., Bacher, A., Rohdich, F., Liu, B., Eisenreich, W. (2010). Artemisinin biosynthesis in growing plants of *Artemisia annua*. A ¹³CO₂ study. Phytochemistry, 71, 179-187.
- Sevón, N. and Oksman-Caldentey, K.M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Planta Medica, 68, 859-868.
- Shuters, P.F., Burgard, A.P., Dasika, M.S., Nowroozi, F., Van-Dien., Keasling, J.D., Maranas, C.D. (2007). Metabolic flux elucidation for large-scale models using ¹³C labeled isotopes. Metabolic Engineering, 9, 387-405.
- Sugimoto Y., Sugimura Y., Yamada Y. (1990). Biosynthesis of bisbenzylisoquinoline alkaloids in cultured roots of *Stephania cepharantha*. FEBS Letters, 273 (1-2), 82-86.
- Terada K., Honda C., Takeyama S., Suwa K., Kamisako W. (1995). Biosynthesis of acetylenic compounds in cultured cells of *Asparagus officinalis* from [1-¹³C]- and [U-¹³C₆] Glucose. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 18 (11), 1472-1475.
- Tillequin, F., Michael, S., Seguin, I. (1993). "Pirrolizidine alkaloids" in alkaloids and sulphur compounds. Waterman, P.G. ed., Academic press, San Diego, Vol. 8, pp. 175-181.
- Tomlinson, A.D. and Fuqua, C. (2009). Mechanisms and regulation of polar surface attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. Current Opinion in Microbiology, 12 (6), 708-714.
- Towler, M.J. and Weathers, P.J. (2007). Evidence of artemisinin production from IPP stemming from both the mevalonate and nonmevalonate pathways. Plant Cell Reports, 26, 2129-2136.

- Trejo-Tapia, G. y Rodríguez-Monroy, M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. Interciencia, 32 (10), 669-674.
- Trevor, A.T. (2007). History of plant tissue culture. Review. Molecular Biotechnology, 37, 169-180.
- Tzfira, T. and Citovsky, V. (2000). From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. Molecular Plant Pathology, 1 (4), 201-212.
- Tzfira, T. and Citovsky, V. (2002). Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cell by *Agrobacterium*. Trends in Cell Biology, 12 (3), 121-129.
- Valderrama-Fonseca, A.M., Arango-Isaza, R., Afanador-Kafuri, L. (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "Ingeniería genética natural aplicada".
 Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín, 58, 2569-2585.
- Valentine, L. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* and the plant: the David and Goliat of Modern Genetics. Plant Physiology, 133, 948-955.
- Vanisree, M. and Hsin-Shen, T. (2004). Plant cell cultures –An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering, 2 (1), 29-48.
- Wanke, M., Skorupinska-Tudek, K., Swiezewska, E. (2001). Isoprenoid biosynthesis via 1deoxy-D-xylulose-5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway. Acta Biochimica Polonica, 48 (3), 663-672.
- White, C.E. and Winans S.C. (2007). Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 362, 1135-1148.
- Wu, S., Schalk, M., Clark, A., Miles, B., Coates, R., Chappell, J. (2006). Redirection of

cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. Nature Biotechnology, 24 (11), 1441-1447.

- Xie, D., Wang, L., Ye, H. (2000). Isolation and production of artemisinin and stigmasterol in hairy roots cultures of *Artemisia annua*. Planta Medica, 63, 161-166.
- Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., Pech-López, M., Chan-Bacab, M.J., Arunachalampillai, A., Wend, O.F., Sterner, O., Peña-Rodríguez, L.M. (2009). Trinorsesquiterpenoids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. Journal of Natural Products, 72, 745-748.
- Yeoman, M. and Yeoman, C. (1996). Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. New Phytologist, 134 (4), 553-569.
- Yi, P., Han, Z., Li, X., Olson, E.N. (2006). The mevalonate pathway controls heart formation in *Drosophila* by isoprenylation of G gamma 1. Science, 313 (5791), 1301-1303.
- Zhang, W.J., Su, J., Tan, M.Y., Liu, G.L., Pang, Y.J., Shen, H.G., Qi, J.L., Yang, Y. (2010). Expression analysis of shikonin-biosynthetic genes in response to M9 medium and light in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 101, 135-142.

CAPITULO II

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS IN VITRO DE PENTALINON ANDRIEUXII¹

2.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de células vegetales ha surgido como una alternativa para la obtención de metabolitos producidos en las plantas en bajas concentraciones y de alto valor agregado, para los cuales, no existen procesos de síntesis química conocidos; sin embargo, para la implementación de esta tecnología es necesario el desarrollo de estrategias que permitan incrementar la productividad de los cultivos in vitro (Arias-Zabala et al., 2009). Los callos son agregados celulares amorfos que surgen del crecimiento deorganizado de explantes sobre un medio de cultivo específico en condiciones asépticas. Estos agregados no corresponden con ningún tejido particular de la planta completa. (Whaby, 2007). Uno de los principales del cultivo de callos es la obtención de suspensiones celulares. En muchos casos, para obtener suspensiones celulares finas, es adecuado aumentar la friabilidad (callo disgregado y esponjoso) del tejido calloso por incremento de la concentración de la auxina o disminución de la citocinina en el medio de crecimiento (Pérez-Bran, 2010). A partir de los cultivos de callos y células en suspensión, se puede lograr la producción de nuevos metabolitos que en la planta de origen no se detectan, o bien el incremento en la producción de aquellos que son sintetizados a bajas concentraciones. Aún cuando es deseable contar con cultivos controlados, estos pueden presentar ciertas desventajas como son las variaciones somaclonales y mutaciones que se acumulan a través de los subcultivos y la baja o nula producción de los metabolitos de interés; por lo que en ocasiones se prefieren los cultivos de tejidos organizados como son las raíces, las cuales presentan un alto potencial biosintético. Sin embargo, los cultivos de raíces presentan problemas importantes al intentar escalarlos a volúmenes mayores (Shuler y Hallsby, 1985). La regeneración de plantas se puede lograr por dos vías: organogénesis y embriogénesis somática. La priemra vía es la más clásica, habiéndose publicado cientos de trabajos desde los inicios del cultivo in vitro, siendo la que ha llevado a estas técnicas al ámbito comercial de las plantas ornamentales. La forma más común de regeneración, y

¹Antes de iniciar los trabajos de obtención de raíces transformadas de *P.andrieuxii* se comprobó que la especie era susceptible a las transformación genética con *A. tumefaciens*. Lo realizado al respecto, fue publicado en la revista Advances in Bioscience and Biotechnology, 2012, 3, 256-258. Anexo al final del Capítulo II.

la que presenta mayores garantías de estabilidad genética, es la inducción de yemas axilares, seguida del enraizamiento de las mismas (Frampton et al., 1998; Deshpande et al., 1998). Los estudios sobre obtención de metabolitos secundarios se han incrementado durante los últimos años, además que la biotecnología vegetal ha demostrado ampliamente que la generación de plantas transgénicas destinadas a la producción de alimentos y compuestos biológicamente activos es la alternativa más viable (Calva-Calva, G. y Pérez-Vargas, J., 2005; Bourgaud et al., 2001). Usando cultivo de células vegetales se ha logrado la producción de una amplia variedad de compuestos útiles incluvendo saborizantes, colorantes, aceites esenciales, edulcorantes, antioxidantes y fármacos e inclusive se han desarrollado varios sistemas de cultivos a gran escala (Alfermann y Petersen, 1995). Una de las estrategias para incrementar la acumulación de metabolitos secundarios es la transformación genética, la cual se logra introduciendo el ADN-T del plásmido de Agrobacterium al genoma vegetal (Yang y Choi, 2000). La obtención de raíces transformadas o peludas mediante la infección con Agrobacterium rhizogenes ha sido planteada como una estrategia para incrementar la producción de la biomasa, y por lo tanto de los metabolitos en plantas cultivadas in vitro, además de que en éstas se han estudiado la adición de precursores y otras estrategias más exitosas como la incitación para incrementar la producción de estos metabolitos, la cual consiste en aplicar estrés físico o químico a las suspensiones celulares y/o los tejidos para que aumenten la producción de metabolitos a niveles que normalmente no se producen (Piñeros-Castro et al., 2009; Weathers et al., 2010). Las raíces transformadas tiene la capacidad de continuar creciendo de una manera autónoma, aún separadas de la planta madre, si son cultivadas in vitro. Los cultivos de raíces presentan muchas ventajas en comparación con el cultivo de células y raíces sin transformar. Algunas de estas ventajas es una mayor estabilidad genética, un crecimiento acelerado y una mayor productividad de metabolitos secundarios (Loaiza y Valerde, 2006).

En este capítulo se presenta la estrategia de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* en P. *andrieuxii* desde el protocolo para la germinación de las semillas así como la formación de tejido calloso monitoreando la producción de urechitol A. De igual manera se describe la obtención de un sistema de raíces transformadas de *P. andrieuxii* con el objetivo de establecer un sistema de cultivos *in vitro* para la producción de terpenoides que permita realizar el estudio de la biosíntesis de los urechitoles.

64

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.2.1 Colectas de las semillas de P. andrieuxii

Se realizaron 7 colectas con las siguientes fechas:

- a) 13 de septiembre de 2008
- b) 25 de octubre de 2008
- c) 5 de noviembre de 2008
- d) 12 de noviembre de 2008
- e) 12 de diciembre de 2008
- f) 19 de enero de 2009
- g) 4 de febrero de 2009

2.2.2 Protocolo de germinación de semillas de P. andrieuxii

2.2.2.1 Asepsia de las semillas

1.- En el laboratorio se separaron las semillas de las vainas (25-30 cm) secas y maduras, éstas se lavaron con extrán al 5% durante 5 min en agitación constante.

2.- Se decantó la solución de extrán y se enjuagaron las semillas con agua estéril 3 veces. En una campana de flujo laminar a las semillas lavadas, se les agregó etanol al 70% durante 5 min en agitación constante.

3.- Se decantó la solución de etanol y se enjuagaron las semillas tres veces con agua estéril. A las semillas lavadas se le agregó una solución de cloro comercial al 50% durante 20 min en agitación constante.

4.- Finalmente se lavaron las semillas con agua estéril 5 veces.

2.2.2.2 Condiciones de pregerminación

Las semillas asépticas de P. andrieuxii se dejaron embebidas en agua estéril una hora.

2.2.2.3 Condiciones de germinación

1.- Para la germinación de las semillas de *P. andrieuxii* se utilizaron frascos con 20 mL de medio PC semi-sólido (Phillips y Collins, 1979) libre de regulador de crecimiento. Los

frascos con el medio de cultivo fueron previamente esterilizados en autoclave durante 20 min.

2.- Los frascos se limpiaron en una campana de flujo laminar estéril previamente limpiada con etanol al 70% y algodón estéril; las pinzas se esterilizaron y enfriaron con agua estéril y se colocaron 7 semillas/frasco.

3.- Las tapas se flamearon, se taparon los frascos y se incubaron en el cuarto de cultivo a una temperatura de 25 °C, en obscuridad total, durante aproximadamente dos semanas.

4.- Las plántulas de semillas germinadas en estas condiciones se pasaron al cuarto de luz continua y se utilizaron para los siguientes experimentos.

2.2.3 Inducción de callos

Para inducir callos de *P. andrieuxii* se utilizaron segmentos de hojas, hipocótilos y raíces de plantas crecidas durante dos semanas en luz continua bajo condiciones asépticas. La campana, pinzas, bisturí y los frascos con medios de cultivo se limpiaron con etanol al 70%. Las pinzas y el bisturí fueron esterilizados en cada manipulación del material biológico:

2.2.3.1 Resiembra.

Con la ayuda de pinzas se procedió a extraer de los frascos las plántulas de semillas germinadas bajo condiciones asépticas y se colocaron en cajas de Petri para luego cortarlas en secciones con el bisturí. Los hipocótilos y las raíces se cortaron de 1 cm de largo; las hojas se cortaron en dos segmentos iguales tomando en cuenta que las hojas de las plántulas tenían aproximadamente el mismo tamaño. Ya cortados los explantes de cada tejido, se colocaron en los frascos con el medio de cultivo con diferentes concentraciones de thidiazurón (TDZ), procurando que el lado cortado estuviera en contacto con el medio de cultivo. En cada frasco se colocaron cuatro segmentos de cada explante. Por último se taparon los frascos y se incubaron en el cuarto de cultivo a 25 °C bajo luz continua, durante 60 días y con una resiembra a los 30 días. Para cada combinación de medio se realizaron un total de 5 réplicas por cada tipo de explante (hipocótilo, hoja y raíz).

2.2.3.2 Tratamientos.

Para inducir la formación de callos se probaron diferentes concentraciones del regulador de crecimiento TDZ en medio semisólido PC (TDZ 0.00, 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.25, 0.35, 0.50, 1.00, 5.00 μ M).

2.2.3.3 Mantenimiento de callos.

Una vez inducidos los callos de los explantes (hipocotilo, raíz y hoja), estos fueron mantenidos en medio semisólido PC con 5 μ M de TDZ en el cuarto de cultivo bajo luz continua para su proliferación.

2.2.4 Cultivo de raíces normales

2.2.4.1 Cultivos de raíces *in vitro* tratadas con reguladores de crecimiento ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA)

Para el cultivo de raíces normales, se preparó medio PC líquido con ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (IBA) a 3 concentraciones en 5 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio cada uno, los cuales sumaron un total de 30 matraces Erlenmeyer para el experimento de proliferación de las raíces normales. Para cada regulador de crecimiento se probaron las concentraciones de 1, 2.5 y 5 mg/L, los cuales se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 20 minutos. Encada matraz de Erlenmeyer se colocaron 3 gramos de raíces normales y se incubaron en un orbitador a 25 ± 2 °C en luz continua a una densidad de flujo de fotones de 40-60 mol m⁻² s⁻¹ provista por lámparas fluorescentes (Philips, USA), por un período de 30 días. Se utilizó como control un cultivo de raíces libre de reguladores de crecimiento.

2.2.5 Transformación genética de *P. andrieuxii* vía Agrobacterium rhizogenes.

2.2.5.1 Cepa A. rhizogenes ATCC 15834

La cepa utilizada para esta investigación fue donada por la Dra. María Luisa Villarreal de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y fue mantenida en medio semisólido YM (K₂HPO₄ 500 mg/L, MgSO₄.7H₂O 200 mg/L, NaCl 100 mg/L, Manitol, 1 g/L, Extracto de levadura 400 mg/L, Agar 10 g/L, pH 7.2) libre de antibiótico.

2.2.5.2 Transformación genética de explantes de *P. andrieuxii* vía *A. rhizogenes*

1.- La cepa ATCC15834 de *A. rhizogenes* se inoculó en 20 mL de medio YM y se mantuvo a 200 rpm durante 48 horas en un orbitador en oscuridad continua, a 200 rpm.

2.- Se tomaron 200 μ L del cultivo de *A. rhizogenes* y se inocularon en 10 mL de medio YM y el nuevo cultivo se incubó por 24 horas en un orbitador en oscuridad continua a 200 rpm.

3.- Al cultivo generado en el paso 2 se agregaron 10 mL de medio YEB y 10 μ L de una solución de acetosiringona 200 mM. El cultivo se incubó de nuevo en el orbitador a 200 rpm en oscuridad continua, durante 5 horas y a 200 rpm.

4..- En una cápsula de desecación protegida de la luz se pusieron en contacto, por infiltración durante 20 minutos, explantes (hipocótilo, raíz y hoja) de plántulas germinadas in vitro de P. andrieuxii de dos meses de edad y el cultivo bacteriano del paso 3 (D.O. = 0.1) adicionado con 25 μL de acetosiringona (200 mM)

5.- Los diferentes explantes se secaron con una toalla de papel, y se colocaron en cajas de Petri en medio PC semisólido libre de regulador de crecimiento y se mantuvieron en cocultivo durante 5 días en obscuridad.

6.- Se transfirieron los tejidos de 5 días de transformación a frascos conteniendo medio PC semisólido y claforán (500 mg/L).

7.- Como testigo, se utilizaron explantes de *P. andrieuxii* sin transformar y sembrándolos en medio PC semisólido y medio PC con claforán (500 mg/mL).

2.2.6 Preparación de extractos

2.2.6.1 Preparación de fracciones de polaridad media de a partir de tallo, hojas y raíz de plantas silvestres de *P. andrieuxii*.

Tallo (52.5 g), hojas (13.1 g) y raíz (469 g) de *P. andrieuxii* secos y molidos fueron extraídos por maceración con metanol a temperatura ambiente. Se realizaron 4 extracciones usando 500 mL por cada 250 g de material vegetal. Al término de cada extracción el disolvente fue decantado, filtrado y evaporado a presión reducida obteniéndose 5.3 g de extracto metanólico de tallo (RPA-4),1.6 g de extracto de hoja (RPA-5) y 47 g de extracto de raíz (RPA-1). Se tomaron de los diferentes extractos metanólicos de los tres tejidos [raíz (47 g), tallo (698. 2 mg) y hoja (552.6 mg)] y fueron extraídos por sonicación con CH₂Cl₂ durante una hora (3x). Para cada extracción se utilizó 70 mL de CH₂Cl₂, obteniéndose las correspondientes fracciones de polaridad media de tallo (RPA-19A, 177.5 mg, 25.42 %), de hoja (RPA-19B, 54.7 mg, 9.89 %) y de raíz (12.4 g, 26.38 %).

2.2.6.2 Preparación de fracciones de polaridad media a partir de raíz, hipocótilo y hojas de plántulas germinadas *in vitro* de *P. andrieuxii*.

Plántulas de *P. andrieuxii* de dos meses de edad germinadas *in vitro* fueron seccionadas en hipocótilo, hoja y raíz. Los diferentes tejidos fueron cortados, secados por 48 horas a temperatura ambiente [hoja (3.5 g), hipocotilo (4.6 g) y raíz (4.7 g)] y extraídos por maceración con metanol por 24 horas tres veces. Después de cada extracción el disolvente fue removido por decantación y eliminado a presión reducida en un rotavapor dando lugar a los correspondientes extractos metanólicos crudos de hoja (RPA-17C, 1.18g, 33.27 %), hipocótilo (RPA-17B, 812.2 mg, 17.40 %) y raíz (RPA-17A, 711.1 mg, 15.12 %) de plántulas de *P. andrieuxii*. Los extractos metanólicos de cada extracción se utilizó 70 mL de CH₂Cl₂, obteniéndose las correspondientes fracciones de polaridad media de raíz (RPA-20A, 63.3 mg, 8.90 %) de hipocótilo (RPA-20B, 96.0 mg, 11.81 %) y de hoja (RPA-20C, 259.9 mg, 21.69 %) de plántulas *in vitro* de *P. andrieuxii*.

2.2.6.3 Preparación de fracciones de polaridad media a partir de los callos formados a partir de raíz, hipocótilo y hojas de plántulas de *P. andrieuxii*.

Los callos de hoja (1.9 g), hipocótilo (5.7g) y raíz (2.4 g) de *P. andrieuxii* fueron secados a temperatura ambiente y extraídos por maceración con metanol por 24 h (3x). Al final de cada extracción el solvente fue removido por decantación y eliminado a presión reducida en un rotavapor dando lugar a los correspondientes extractos metanólicos crudos de callos de raíz (RPA-18A, 697.5 mg, 28.50 %), hipocótilo (RPA-18B, 738.8 mg, 12.80 %) y hoja (RPA-18C, 234.9 mg, 12.00 %) de *P. andrieuxii*. Los diferentes extractos metanólicos fueron extraídos por sonicación con CH₂Cl₂ durante una hora (3x). Para cada extracción se utilizó 70 mL de CH₂Cl₂, obteniéndose las correspondientes fracciones de polaridad media de callos de raíz (RPA-21A, 15.9 mg, 2.27 %) de hipocótilo (RPA-21B, 29.6 mg, 4.00 %) y de hoja (RPA-21C, 25.4 mg, 10.81 %) de *P. andrieuxii*.

2.2.6.4 Preparación de fracciones de polaridad media a partir del cultivo de raíces normales *in vitro* de *P. andrieuxii* tratadas con ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA)

Las raíces secas cultivadas in vitro de *P. andrieuxii* fueron extraídas con MeOH por separado según el tratamiento con cada regulador de crecimiento a las concentraciones correspondientes. Se hicieron los cultivos utilizando tres diferentes concentraciones de cada regulador de crecimiento: 1, 2.5 y 5 mg/L y utilizándose como control raíz cultivada libre de regulador de crecimiento. Los extractos metanólicos correspondientes fueron extraídos por sonicación con CH₂Cl₂ en un baño de ultrasonido durante 30 minutos (3x). Para cada extracción se utilizó 70 mL de CH₂Cl₂, obteniéndose las correspondientes fracciones de polaridad media. Los rendimientos de las fracciones diclorometánicas fueron de 16.63%, 14.90% y 5.91% para los tratamientos con IBA y 7.50%, 29.10% y 7.81% para los tratamientos con ANA.

2.2.6.5 Preparación de fracciones de polaridad media a partir del cultivo de raíces transformadas a partir de hojas de *P. andrieuxii* con la cepa *A. rhizogenes* ATCC 15834.

Una muestra de raíces transformadas de *P. andrieuxii* cultivadas en medio PC líquido con claforán 500 mg/L, fueron secadas y molidas (2.64 g) y posteriormente extraídas con

MeOH, obteniéndose 0.354 g de extracto MeOH crudo, el cual fue extraído por sonicación con CH₂Cl₂ en un baño de ultrasonido durante 30 minutos (3x). Para cada extracción se utilizó 70 mL de CH₂Cl₂, obteniéndose las correspondientes fracciones de polaridad media (0.083 g). El medio líquido PC (700 mL) fue extraído con AcOEt (2:1, 3x) obteniéndose 5.8 mg correspondiente a esta fracción. Las fracciones de polaridad media correspondiente a las raíces transformadas de *P. andrieuxii* y al medio PC líquido fueron analizadas por CG-EM.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Establecimiento de un protocolo de germinación de semillas de *P. andrieuxii in vitro*

Después de evaluar diferentes condiciones para inducir la germinación de las semillas de *P. andrieuxii*, se encontró que las semillas colectadas en el mes de enero y febrero de 2009, germinaron después de un tratamiento de secado, seguido de una saturación con agua. Lo anterior, permitió establecer las condiciones para la obtención de plántulas de *P. andrieuxii*, a partir de semillas germinadas *in vitro*.



2.3.2 Inducci Figura 2.1 Germinación de semillas de P. andrieuxii. ieuxii

La inducción de los callos se hizo utilizando explantes de plántulas de *P. andrieuxii* germinadas *in vitro* de dos semanas de edad. De este experimento se logró inducir callo de hipocotilo y de raíz al mes con los tratamientos con TDZ a una concentración entre

0.15 a 5 μ M (Figura 2.2). En el caso de las hojas la inducción del tejido calloso se logró a los dos meses de tratamiento con TDZ 5 μ M (Figura 2.2).



Figura 2.2 Inducción de tejido calloso al mes con TDZ 0.15-5 μ M en A) hipocótilo y B) raíz.C) Inducción de callo en hoja a los dos meses con TDZ 5 μ M.

2.3.3 Análisis por CG-EM de fracciones de polaridad media provenientes de hoja, tallo y raíz de plantas silvestres, plántulas germinadas *in vitro* y tejido calloso de *P. andrieuxii*.

Mediante el análisis por TLC no fue posible comprobar la presencia o ausencia de urechitol A. Para hacer un monitoreo más confiable de las fracciones se procedió a la utilización de la técnica de CG-EM [Columna ultra 1 (no polar), temperatura 150 °C (3 min), 10 °C/min, 280 °C (20 min), detector (280 °C), invector (250 °C), gas helio (1.2 mL/min)]. Para dichos análisis, se trabajó con las fracciones diclorometánicas obtenidas por sonicación de los extractos metanólicos de los diferentes tejidos (raíz, tallo y hoja) de las plantas silvestres, plántulas germinadas in vitro, así como de callos obtenidos a partir de los tres explantes de las plántulas in vitro. El monitoreo de las fracciones diclorometánicas fue con el objetivo de tener una fracción de polaridad media menos compleja que permitiera mostrar con más claridad la presencia de urechitol A. El análisis de las fracciones correspondientes a los tejidos sivestres reveló la presencia urechitol A en los tejidos de hoja y raíz, con el fin de confirmar la presencia de urechitol A en ambos extractos, se procedió a realizar unas coinvecciones por CG-EM de las fracciones de polaridad media de raíz, tallo y hoja con urechitol A (Figura 2.3) de plantas silvestres. Los cromatogramas sólo mostraron la presencia de urechitol A en hoja y raíz de plantas silvestres, observándose el incremento en la intensidad del pico (t_R= 9.48 min) correspondiente al metabolito de interés. El área bajo la curva de urechitol A por CG es mayor en la raíz que en la hoja, indicando una mayor concentración del metabolito en tejido de raíz. Los estudios fitoquímicos de P. andrieuxii donde se reporta el aislamiento de urechitol A (Yam-Puc et al., 2009), fueron realizados en extractos metanólicos de raíz.

Capítulo II



Figura 2.3 Perfiles cromatográficos parciales por CG y coinyecciones de las fracciones de polaridad media de hoja, tallo y raíz de plantas silvestres de *P. andrieuxii* comparadas con urechitol A.

El análisis por CG-EM de las fracciones diclorometánicas correspondientes a raíz, hipocótilo y hoja de plántulas de dos meses edad germinadas *in vitro* (Figura 2.4) resultaron en la detección de urechitol A únicamente en las hojas, lo cual sugiere que al ser las plántulas organismos jóvenes, el urechitol A solamente se encuentra en el órgano

73

de su biosíntesis. Los resultados de la determinación de urechitol A en hojas y raíces en plantas silvestres y su detección solamente en hojas de plántulas jóvenes, sugieren que probablemente la biosíntesis del urechitol A, se realiza en la hoja y su almacenamiento ocurre en la raíz, esto apoyándose en la diferencia de abundancia de urechitol en raíz y en hoja de plántulas silvestres.



Figura 2.4 Perfiles cromatográficos parciales por CG de las fracciones de polaridad media de raíz, hipocótilo y hoja de plántulas *in vitro* de *P. andrieuxii.*

Por otra parte el análisis de las fracciones de polaridad media de los callos obtenidos a partir de raíz, hipocótilo y hoja, no presentan urechitol A, la ausencia del metabolito en los callos sugiere que la biosíntesis de urechitol A requiere la presencia de tejidos diferenciados o cierto grado de compartamentalizacion en su biosíntesis. Aún cuando los cultivos de células no diferenciadas presentan velocidades de crecimiento mayores a los de células diferenciadas u órganos (raíces y brotes), la falta de diferenciación celular en los cultivos puede ocasionar que la concentración del metabolito en el cultivo sea menor que en la planta o que la falta de diferenciación no permita la producción del metabolito de interés (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007). Existen varios estudios de la producción de

algún metabolito de interés con diferentes aplicaciones, tal es el caso de la producción de shikonina por células de Lithospermun erythrorhizon, de Taxol por células de Taxus spp (Zhao et al., 2005) y la producción de azadiractina, un metabolito con actividad insecticida, por Azadirachta indica (Orozco-Sánchez y Rodríguez- Monroy, 2007). Por otra parte, la producción de ciertos metabolitos secundarios solamente se da en células presentes en tejidos diferenciados. Por ejemplo la acumulación de terpenoides depende de la diferenciación de plástidos, debido a que la mayoría de las enzimas de la ruta de biosíntesis se localizan en estos organelos (Treio-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007), es por ello que como alternativa a las suspensiones celulares se ha considerado el uso de sistemas in vitro diferenciados como son brotes y raíces, que si bien presentan rendimientos mejores a los de las suspensiones celulares, desde el punto de vista tecnológico su cultivo a gran escala es más complejo y costoso (Verpoorte et al., 2002). Un ejemplo de la estrecha relación entre la biosíntesis de un metabolito secundario y la diferenciación celular en plantas, se presenta el caso de los alcaloides indólicos, cuya biosíntesis es muy compleja y no se conocen todas las enzimas involucradas, ni los mecanismos que regulan su biosíntesis. La distribución de las enzimas involucradas en la biosíntesis de alcaloides indólicos se localizan en células epidérmicas de tallo, hoja, botones florales, etc., mostrando de esta manera que la biosíntesis de estos alcaloides requiere de células de diferentes tipos y con determinadas características, además de la especialización celular que involucra a múltiples compartimentos celulares (Roberts y Strack, 1999; St-Pierre et al, 1999).

Tomando en cuenta que dependiendo de la ruta biosintética de los metabolitos, la biosíntesis se puede realizar en tejidos no diferenciados (tejido calloso) o en tejidos diferenciados, en el caso de urechitol A se presenta un ejemplo de metabolito que necesita sintetizarse a partir de un tejido diferenciado (hoja). Este resultado nos condujo a diseñar una estrategia de cultivo *in vitro*, como son los cultivos de raíces normales y/o raíces peludas, que nos permitieran trabajar con tejidos diferenciados de tal manera que lograramos obtener la producción de urechitol A.

2.3.4 Análisis por CG-EM de los cultivos de raíces normales de P. andrieuxii.

Se establecieron cultivos de raíces normales de *P. andrieuxii* en medio PC líquido empleando los reguladores de crecimiento IBA y ANA a concentraciones de 1, 2.5 y 5

mg/L respectivamente. Aún, cuando los cultivos de las raíces de plántulas *in vitro* de *P. andrieuxii* mostraron el mejor desarrollo cuando se usó la auxina ANA a una concentración de 2.5 y 5 mg/L (Figura 2.5), el análisis por CG-EM de los extractos correspondientes mostró que ninguno de los cultivos de raíces *in vitro* contenía urechitol A. Lo anterior es congruente con el supuesto de que la hoja es el sitio de biosíntesis y la raíz el sitio de acumulación. Por lo que considerando estos resultados se planteó el establecimiento de un sistema de raíces transformadas a partir de hojas de *P. andrieuxii*.



Figura 2.5 Cultivo de raíces normales con tratamientos con IBA y ANA. A y E: controles (cultivos libres de reguladores de crecimiento), B: ANA 1 mg/L, C: ANA 2.5 mg/L, D: ANA 5 mg/L, F: IBA 1 mg/L, G: IBA 2.5 mg/L y H: IBA 5 mg/L.

2.3.5 Establecimiento de un cultivo de raíces transformadas de P. andrieuxii

Debido a que los análisis por CG-EM de las fracciones de CH₂Cl₂ correspondientes al cultivo de raíces normales de *P. andrieuxii in vitro*, no mostraron la presencia de urechitol A, se estableció el cultivo de raíces transformadas a partir de hojas de *P. andrieuxii* utilizando la cepas de *A. rhizogenes*.

Antes iniciar los trabajos de obtención de raíces transformadas, comprobamos que la especie era susceptible a la transformación con *Agrobacterium*. Lo realizado al respecto, quedó integrado en la publicación anexa al final de este capítulo.

Para lograr el objetivo definido en esta sección, se utilizaron tres cepas de *A. rhizogenes* (ATCC 15834, ATCC 15834PTDT y K599 PTDT) proporcionadas por la Dra. María Luisa Villarreal de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, para infectar explantes de

hoja de plántulas de *P. andrieuxii* de 2 meses de edad y se aprovecharon las cepas para probar la capacidad infectiva en hipocótilo y raíz. Después de tres semanas de transformación de explantes, sólo se observó respuesta en explantes de hoja infectados con la cepa ATCC15834 (Figura 5.1). Las otras dos cepas no lograron inducir raíces transformadas. En el primer experimento de raíces transformadas sólo se logró la obtención de raíces a partir de hojas con la cepa ATCC 15834, los explantes infectados de hipocótilos y raíces se contaminaron con hongos. En experimentos sucesivos se logró la obtención de raíces transformadas a partir de los tres explantes (Figura 2.6).



Figura 2.6 Experimento de raíces transformadas en explantes de hoja, hipocótilo y raíz de *P. andrieuxii* a las tres semanas de transformación con la cepa *A. rhizogenes* ATCC 15834. A) Formación de raíces a partir de hoja, B) Formación de raíces a partir de hipocótilo, C) Formación de raíces a partir de raíz, D) Raíz transformada obtenida a partir de hoja en medio PC líquido.

Se prepararon fracciones de mediana polaridad de las raíces transformadas obtenidas a partir de hoja, raíces e hipocótilos de *P. andrieuxii*, así como la extracción líquido-líquido del medio de cultivo con acetato de etilo (AcOEt) para monitorear la producción de urechitol A. El análisis por CG-EM de la fracción de polaridad media obtenida a partir del peso seco de las raíces transformadas provenientes de hoja no mostró la presencia de urechitol A, sin embargo la fracción de AcOEt proveniente de la extracción del medio de cultivo de las raíces transformadas, mostró un componente con un tiempo de retención de 9.35 min que corresponde a urechitol A (Figura 2.7), y ninguna otra fracción mostró contenido de urechitol A. Por los resultados obtenidos de detectar la presencia de urechitol A solamente en el medio líquido de raíces transformadas obtenidas a partir del

hoja, proponemos la hipótesis de que las hojas son el sitio de biosíntesis del urechitol A, y las raíces el sitio de acumulación. Ya que en el medio líquido de las raíces normales, no se detectó la presencia de urechitol A.



Figura 2.7 CG-EM de la fracción de AcOEt correspondiente a la extracción del medio de cultivo PC líquido de las raíces transformadas obtenidas a partir de hoja de *P. andrieuxii.* La flecha indica el pico que corresponde a urechitol A con tiempo de retención de 9.35 min.

En la búsqueda de alternativas para su estudio, las técnicas biotecnológicas como los cultivos de raíces transformadas genéticamente con *A. rhizogenes*, se utilizan como sistema experimental para el estudio del metabolismo específico de la raíz. Por otra parte, constituyen una técnica eficiente para analizar y producir metabolitos secundarios que se biosintetizan normalmente en las raíces de plantas diferenciadas. La capacidad de

crecimiento de estos cultivos, su estabilidad genética, su facilidad de mantenimiento y la capacidad para sintetizar un amplio espectro de compuestos químicos, hacen que los cultivos de raíces transformadas se presenten como una tecnología atractiva para la producción de metabolitos secundarios de las raíces de plantas (Mehrotra *et al.*, 2010). En los últimos años se han descrito en la literatura científica, como fuente de productos naturales, cultivos de raíces transformadas de aproximadamente doscientas especies de plantas en los que se puede observar un amplio rango de capacidades biosintéticas (Amador, 2010).

Algunas especies vegetales que han sido transformadas con *A. rhizogenes*, entre ellas los cultivos de *Galphimia glauca*, presentan la particularidad de excretar diversos metabolitos secundarios al medio de cultivo, en el caso de esta especie los triterpenos glaucacetalinas A y D fueron aislados del medio de cultivo (Ortiz-Caltempa, 2008). Tomando en cuenta, que muchos de los metabolitos secundarios de interés se pueden excretar al medio de cultivo, esto representa una forma de obtención de los mismos a partir de la extracción del medio de cultivo, de igual manera, si se desea se puede hacer uso de algún incitador y así aumentar la producción del metabolito excretado (Weathers *et al.*, 2010). En el caso de urechitol A que se excreta al medio de cultivo del sistema de raíces transformadas a partir de hoja, podría aprovecharse para probar algún incitador (elicitor), como el jasmonato de metilo, o el ácido acetilsalicílico, para estimular su producción y poder así obtenerlo a partir del medio de cultivo y sin sacrificar el cultivo de raíces y con ello una producción continua del mismo.

2.4 CONCLUSIONES

El establecimiento de CTV's de *P. andrieuxii* se realizó con el fin de encontrar un sistema que produzca urechitol A y pueda utilizarse como modelo para el establecimiento de la ruta biosintética de los urechitoles.

Al establecerse el protocolo de germinación *in vitro* de semillas de *P. andrieuxii*, se logró detectar urechitol A, únicamente en la fracción proveniente de hoja.

Por otra parte se pensó que obteniendo tejido calloso de las hojas de *P. andrieuxii* se lograría un cultivo que produjera urechitol A. Al realizar la inducción de callos en los tres tejidos (hoja, raíz e hipocótilo) no se detectó en ninguna de las fracciones urechitol A. Los cultivos de raíces normales no resultaron en la producción de urechitol A por lo que con base en esto, se realizó la transformación genética de las hojas vía *A. rhizogenes*, para la

cual se determinó que urechitol A se excretaba al medio de cultivo de las raíces transformadas en una de las líneas genéticas obtenidas, pero en pequeñas cantidades.

Una de las formas para poder incrementar la producción de urechitol A es el uso de elicitores, por lo que el empleo de éstos podría tomarse como estrategia a probar en los siguientes estudios.

Con lo obtenido de los CTV's de *P. andrieuxii* hasta el momento, podemos afirmar lo siguiente:

Contamos con el modelo de raíces transformadas, para la producción de urechitol A que nos permitirá utilizarlo como herramienta básica para estudios de su biosíntesis.

La raíz es el sitio de acumulación de los urechitoles.

La hoja es el lugar de biosíntesis de los urechitoles.

2.5 REFERENCIAS

- Alfermann, A.W. and Petersen, M., (1995). Natural product formation by plant cell biotechnology. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43, 199-205.
- Amador, L.J. (2010). Estudio fitoquímico de raíces transformadas genéticamente de plantas canarias. Premio de Investigación Agustín de Bethencourt 2008. Servicio de publicaciones de la caja general de ahorros de Canarias. Depósito legal TF-2162/2010. ISBN: 978-84-7985-334-1. pp. 1-300.
- Arias-Zabala, M., Angarita-Velázquez, M.J., Aguirre-Cardona, A.M., Restrepo-Flórez, J.M., Montoya-Vallejo, C. (2009). Strategies for the improvment of secondary metabolites production in plant cell cultures. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 62 (1), 4881-4895.
- Bougard, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of secondary metabolites: a historical perspective. Plan Science, 161 (5), 839-851.
- Calva-Calva, G. & Pérez-Vargas, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria, 6 (11), 1-16.
- Deshpande, S.R., Josekutty, P.C., Prathapasenan, G. (1998). Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa*. Plant Cell Reports, 17, 571-573.
- Frampton, L.J., Amerson, H.V., Leach, G.N. (1998). Tissue culture method affects *ex vitro* growth and development of loblolly pine. New Forests, 16, 125-138.
- Loaiza, J. y Valerde, R. (2006). Transformación genética de *Echinacea purpurea* y *E. angustifolia* mediante *Agrobacterium rhizogenes*. Agronomía Costarricense 30 (1), 27-34.
- Mehrotra, S., Rahman, L.U., Kukreja, A.K. (2010). An extensive case study of hairy-root cultures for enhanced secondary-metabolite production through metabolic-pathway engineering. Biotechnology and Applied Biochemistry, 56, 161-172.

- Orozco-Sánchez, F. y Rodríguez-Monroy, M. (2007). Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 6 (3), 251-258.
- Ortiz-Caltempa, A. (2008). Establecimiento de un cultivo de células transformadas de *Galphimia glauca* en suspensión para la producción de triterpenos. Tesis de doctorado. Instituto Politécnico Nacional. Centro de desarrollo de productos bióticos.
- Pérez-Bran, J.A. (2010). Evaluación de la producción de fitoquímicos a partir de cultivos de células en suspensión de Nerium oleander. Tesis de maestría en Ciencias-Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de Ciencias, Medellín.
- Phillips, G. and Collins, G. (1979). *In vitro* tissue culture selected legumes and plant regeneration from callus culture of red clover. Crop Science, 19, 59-64.
- Piñeros-Castro, Y., Otálvaro-Álvarez, A., Velásquez-Lozano, M. (2009). Efecto de la aplicación de elicitores sobre la producción de 4β-hidroxiwithanólido E, en raíces transformadas de *Physalis peruviana* L. Universitas Scientianum, 14 (1), 23-28.
- Roberts, M.F. and Strack, D. (1999). Biochemistry and physiology of alkaloids and betalains. En Wink M. (Ed.). Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual Plant Reviews, 2, 17-18.
- St-Pierre, B., Vázquez-Flota, F.A., De-Luca, V. (1999). Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercelular traslocation of a pathway intermédiate. Plant Cell, 11, 887-900.
- Shuler, L. and Hallsby, G. (1985). Bioreactor considerations for chemical production from plant cell cultures. En Zaitlin M. Hollander A. (ed) Biotechnology in plant science. Academic press. U.K. p. 191-206.

Trejo-Tapia, G. y Rodríguez-Monroy, M. (2007). La agregación celular en la producción de

metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. Interciencia, 32 (10), 669-674.

- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews, 1, 13-25.
- Weathers, P.J., Towler, M.J., Xu, J. (2010). Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. Applied Microbiology and Biotechnology, 85, 1339-1351.
- Wilkinson, J. and Lindsey, K. (1990). Use of the GUS reporter gene. Methods in Biotechnology. Recombinant proteins from plants: production and isolation of clinically useful compounds. Ed. C. Cunningham and J.R. Porter©Human Press Inc. USA 3:3947.
- Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., Pech-López, M., Chan-Bacab, M.J., Arunachalampillai, A., Wend, O.F., Sterner, O., Peña-Rodríguez, L.M. (2009). Trinorsesquiterpenoids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. Journal of Natural Products, 72, 745-748.
- Yang, D. and Choi, Y. (2000). Production of transgenic plants via Agrobacterium rhizogenes mediated transformation of Panax ginseng. Plant Cell Reports, 19, 491-496.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, 23, 283-333.

2.6 AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSIENT TRANSFORMATION OF Pentalinon andrieuxii MÜLL. ARG.

Alejandro Yam-Puc¹, Elidé Avilés-Berzunza^{1,2}, Manuel J. Chan-Bacab³, Luis Manuel Peña-Rodríguez¹, Gregorio Godoy-Hernández^{1,2*}

2.6.1 Descripción del manuscrito

El trabajo presentado a continuación contiene los resultados de la susceptibilidad de *Pentalinon andrieuxii* a la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*. Este trabajo se encuentra publicado en Advances in Bioscience and Biotechnology (2012), 3, 256-258.

2.6.2 Abstract

Sections of hypocotyls, roots and leaves from *Pentalinon andrieuxii* plantlets were transiently transformed with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 bearing the binary plasmid pCAMBIA 2301 with an interrupted β -glucuronidase (GUS) gene. Histochemical GUS assays showed transient gene expression in all infected tissues, being older roots those which displayed the most intense GUS staining. To our knowledge, this is the first report of *Pentalinon andrieuxii* susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation.

Keywords: β-Glucuronidase; Agrobacterium tumefaciens; Kanamycin; Apocynaceae

2.6.3 Introduction

Pentalinon andrieuxii Müll. Arg. (*Apocynaceae*), a plant commonly named "contrayerba" in the Yucatan Peninsula, is used in the treatment of *Leishmania*'s skin lesions ("chiclero's ulcer"). Mayan healers also recommend chewing their roots and leaves to relieve ailments derived from snake bites, and the stem-collected latex to alleviate headaches and nervous disturbances [1, 2]. Cardenolides, pyrrolizidine alkaloids, steroidal compounds and betulinic acid derivatives with different physiological activities have been found in
Pentalinon tissues [3-6]. Furthermore, two physiologically inactive, but structurally unusual trinorsesquiterpenoids, named urechitols A and B have been described in this specie. Urechitols include the novel bicyclic campechane skeleton, which is formed by two cyclic nuclei of five and seven carbon units, respectively [7]. Although, the synthesis of racemic mixtures of urechitol A was recently reported [8], the biosynthetic origin of urechitols or the campechane skeleton remains unknown. The availability of *in vitro* culture systems of *P*. andrieuxii tissues, including those used for genetic transformation, may allow not only the controlled production of these compounds, but also the development of the basic tools for functional genetics applied to the identification of genes involved in the biosynthetic pathway of urechitols. In here, we report the development of a protocol for the transient transformation of *P*. andrieuxii explants with Agrobacterium tumefaciens.

2.6.4 Materials and methods

2.6.4.1 Plant material

P. andrieuxii seeds were collected from mature dehiscent siliques in February 2009 from a population located 3.5 km northeast from Campeche City, Mexico (19°51'0"N 90°31'50"W). A voucher specimen was deposited in the Herbarium of Centro de Investigación Científica de Yucatán (P. Sima 2503). Seeds were surface sterilized with 5% Extran and 70% ethanol for 5 min each, followed by immersion in a 50% bleach solution (3% sodium hypochlorite) for 20 min. Disinfested seeds were germinated in modified hormone-free PC-L2 medium [9] pH 5.5, supplemented with 2.5% sucrose and 1% agar. Eight seeds per container were incubated at $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ for two weeks in the dark, and then on, under continuous light (40 - 50 mmol m²·seg⁻¹).

2.6.4.2 Agrobacterium tumefaciens Strains and Vectors

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 strain and the binary vector pCAMBIA 2301 (Center for the Applications of Molecular Biology to International Agriculture, Canberra, Australia (<u>http://www.cambia.org/daisy/bioforge_legacy/3724.html</u>)) were used in all experiments. The pCAMBIA 2301 plasmid contains the neomycin phosphotransferase II (*nptll*) gene for kanamycin selection, in addition to the *uidA* gene encoding the β -glucuronidase gene (GUS), interrupted by the catalase intron, for the phenotypical selection of transformed tissues. Both genetic markers are driven by the CaMV 35S promotor. The presence of an intron in *uidA* ensures expression in eukaryotic cells. *A. tumefaciens* was cultured in liquid yeast extract and beef (YEB) medium, pH 5.6, containing 100 mg·l⁻¹ rifampicin and streptomycin each (Sigma, St Louis, MO). Cultures were kept in the dark at 28°C for 48 h. Bacteria were made competent with CaCl₂ and transformed with the plasmid *via* heat shock [10]. Transformed cells, harboring pCAMBIA 2301, were screened on semisolid YEB media with 100 mg·l⁻¹ rifampicin and streptomycin each, and 50 mg·l⁻¹ kanamycin (YEB-AB), and then, cultured in 10 ml of liquid YEB-AB medium (pH 5.6). Cultures were kept at 28°C for 48 h in a rotatory shaker (200 rpm). A 200-µl aliquot of this suspension was diluted in 10 ml of YEB-AB, and further incubated for 24 h as described. Culture volume was then completed to 20 ml with YEB-AB, and added with 200 µM acetosyringone (AS). This was incubated up to 5 h, prior to tissue inoculation.

2.6.4.3 Genetic transformation

Sections of hypocotyls, roots (10 mm length) and leaves (*ca.* 0.25 cm^2) were excised from 15 day-old plantlets and superficially wounded in a longitudinal manner with a scalpel prior to infection with *A. tumefaciens*. Explants were vacuum infiltrated with a 20 ml of a 0.1 OD₆₀₀ bacterial suspension in PC-L2 medium for 20 min. Tissues were then blotted with sterile filter paper in order to eliminate the bacterial excess, and placed on semisolid PC-L2 medium for 72 h. After 3 days of cocultivation, at 28°C in the dark, explants were transferred to semisolid PC-L2 medium supplemented with 100 mg·l⁻¹ cefotaxime and 10 mg·l⁻¹ kanamycin for further development. Transient GUS expression was histochemically assayed 3, 6 and 21 days after infection by staining transformed tissues with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) [11]. Briefly, 50 explants were vacuum-infiltrated in the buffer solution for 5 min, and there after incubated for 24 h at 37°C in the dark [12]. GUS activity was estimated by the number of blue spots per explant after washing them in a 3:1 (v/v) mixture of methanol: acetone. A blue spot was considered as a single transient GUS-expression focus.

2.6.5 Results and discussion

2.6.5.1 Transient transformation of Pentalinon andrieuxii

After 21 days of infection, transient GUS expression was found in both root and leaf sections (Figure 2.8). Positive GUS activity could be solely attributed to the expression and correct splicing of the inserted *uidA* in eukaryotic plant cells. *P. andrieuxii* does not present endogenous GUS activity as reported for carrot, celery, parsley, rice [13], *Ricinus communis* [14], *Agave fourcroydes* [15] and *Capsicum chinense* [16]. Older roots displayed a higher GUS activity than younger root explants and leaf sections. Interestingly, even when hypocotyls explants did not show GUS activity during the first 20 days of infection, after a total of 40 days and once tissues had turned into undifferentiated calli, significant activity was ob- served (Figure 2.8). Older root tissues (two months) were the most susceptible to infection with a 26% of positive transformation events, followed by leaves (15%) and younger roots (3.3%) (Table 2.1). Furthermore, older roots also presented the highest foci number per explant in comparison to leaf sections (7.83 vs 3.96).

2.6.6 Conclusions

In conclusion, we have developed the first protocol for transient genetic transformation of *P. andrieuxii*. At the present time, this method is being used to probe a protocol for its stable genetic transformation, which in combination with the already developed plant regeneration system [17], will allow to assay the functional role of genes putatively involved in secondary metabolism.

Capítulo II



the sense have been as it to all the sense of the

Figura 2.8 Histochemical GUS assay performed on transformed explants of Pentalinon andrieuxii Müll. Arg. Explants transformed with pCAMBIA 2301 via Agrobacterium tumefaciens stain LBA4404. A) Young-root, B) Old-root, C) Leaf, D) Hypocotyl E) Hypocotyl calli.

| Explants | Explant number | Number of GUS positive explants | Infection frequency (%) ¹ | Number of GUS foci/explants ^{2,3} |
|------------|----------------|---------------------------------|---|--|
| Young-root | 450 | 15 | 3.33 | 1.00 (0) ^c |
| Old-root | 300 | 78 | 26.00 | 7.83 (3.5) ^a |
| Leaf | 360 | 54 | 15.00 | 3.96 (0.6) ^{ab} |
| Hypocotyl | 360 | 0 | 0 | 0 |

Cuadro 2.1 Infection frequency and number of GUS foci in P. andrieuxii explants

Histochemical analysis assays were performed on explants twenty one days after inoculation with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404: pCAMBIA 2301. ¹Infection frequency (%) = number of GUS positive explants/ total number of infected explants x 100. ²Number of GUS foci/explants, was the average of GUS positive foci in at least three independent experiments with more of 100 explants each one, with standard deviation in brackets. ³Values with different letters statiscally different (P= 0.05) according to Tukey's test.

2.6.7 Acknowledgements

The autors acknowledge receiving financial support from the National Council for Science and Technology-Mexico (CONACYT) (Project No. 59695-Z)

2.6.8 References

- [1] Chan-Bacab, M.J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., García-Durán, R. and Peña-Rodriguez, L.M. (2003) Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. Ethnopharmacology, 86, 243-247.
- [2] Lezama-Dávila, C.M., Isaac-Márquez, A.P., Zamora-Cresencio, P., Uc-Encalada, M.R., Justiniano-Apolinar, S.Y., Angel-Robles, R. del., Satoskar, A. and Hernández-Rivero, L. (2007) Leishmanicidal activity of *Urechites andrieuxii*. Fitoterapia, 78, 255-257. doi:10.1016/j.fitote.2006.12.005
- [3] Tillequin, F., Michael, S. and Seguin, I. (1993) Alkaloids and sulphur compounds. Academic Press, San Diego.
- [4] Yam-Puc, A., Chee-González, L., Escalante-Erosa, F., Arunachalampilai, A., Wendt, O.F., Sterner, O., Godoy-Hernández, G. and Peña-Rodríguez, L.M. (2012) Steroids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. Phytochemistry Letters, 5, 45-48.doi:10.1016/j.phytol.2011.09.004
- [5] Domínguez-Carmona, D.B., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Ruíz-Pinelli, G., Gutiérrez-Yapu, D., Chan-Bacab, M.J., Giménez-Turba, A. and Peña-Rodríguez, L.M. (2010) Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. Phytomedicine, 17, 379-382. doi:10.1016/j.phymed.2009.08.002
- [6] Yogeeswari, P. and Sriram, D. (2005) Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. Current Medicinal Chemistry, 12, 657-666. doi:10.2174/0929867053202214
- [7] Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., Pech-López, M., Chan-Bacab, M.J., Arunachalampilai, A., Wendt, O.F., Sterner, O. and Peña-Rodríguez, L.M. (2009) Trinorsesquiterpenoids from the root extract from *Pentalinon andrieuxii* Muell-Arg. Journal of Natural Products, 72, 745-748. doi:10.1021/np800554n
- [8] Sumiya, T., Ishigami, K. and Watanabe, H. (2010) Stereoselective total synthesis of

(±)—Urechitol A. Angewandte Chemie International Edition, 49, 5527-5528. doi:10.1002/anie.201002505

- [9] Phillips, G.C. and Collins, G.B. (1979) In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus culture of red clover. Crop Science, 19, 59-64. doi:10.2135/cropsci1979.0011183X001900010014x
- [10] Zhang, H.X. and Zeevaart, J.A.D. (1999) An efficient Agrobacterium tumefaciensmediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach (Spinacia oleracea L.). Plant Cell Reports, 18, 640-645. doi:10.1007/s002990050635
- [11] Jefferson, R. (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. Plant Molecular Biology Reporter, 5, 387-405. doi:10.1007/BF02667740
- [12] Humara, J.M., López, M. and Ordas, R.J. (2003) Agrobacterium tumefaciensmediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: An assessment of factors influencing the efficiency of uidA gen transfer. Plant Cell Report, 19, 51-58. doi:10.1007/s002990050709
- [13] Hu, C.Y., Chee, P.P., Chesney, R.H., Zhou, J.H., Miller, P.D. and O'Brien, W.T. (1990) Intrinsic GUS-like activities in seed plants. Plant Cell Reports, 9, 1-5. doi:10.1007/BF00232123
- [14] Rezmer, C., Schlichting, R., Wachter, R. and Ullrich, C.I. (1999) Identification and localization of transformed cells in *Agrobacterium* tumefaciens-induced plant tumors. Planta, 209, 399-405. doi:10.1007/s004250050742
- [15] Godoy-Hernández, G., Avilés-Berzunza, E., Carrillo-Pech M. and Vázquez-Flota, F. (2008) Agrobacterium-mediated transient transformation of Mexican prickly poppy (Argemone mexicana L.). Electronic Journal of Biotechnology, 11, 1-5.http://158.251.16.248/content/vol11/issue1/full/3/3.pdf
- [16] Solís-Ramos, L.Y., González-Estrada, T., Andrade-Torres, A., Godoy-Hernández, G. and Castaño de la Serna, E. (2010) Endogenous GUS-like activity in *Capsicum*

chinense Jacq. Electronic Journal of Biotechnology, 13, 1-7. http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/1733/173316385002.pdf

[17] Martín-Acosta, J.C., Avilés-Berzunza, E. and Godoy-Hernández, G. (2012) In vitro plant regeneration from explants of *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.). Hansen & Wunderlin, Unpublished.

2.7 INFORMACIÓN ADICIONAL

2.7.1 Agrobacterium tumefaciens cepa LBA4404 + pCAMBIA 2301

Se utilizó la cepa LBA4404 (tipo octopina) conteniendo el plásmido pCAMBIA 2301 (Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture) que contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa (*ntpll*) bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el gen *uidA* (*gusA*) que codifica la enzima β-glucuronidasa (GUS) con el intrón de la catalasa para la expresión específica en eucariotas bajo el control del promotor 35S (Fig. 2.9). El gen reportero *gusA* es ampliamente utilizado en plantas debido a la posibilidad de localizar la actividad de la enzima histoquímicamente (Wilkinson y Lindsey, 1990).



Figura 2 9 Estructura del plásmido pCAMBIA 2301

CAPÍTULO III

IDENTIFICACIÓN DE DOS ESTEROIDES DE LA RAÍZ DE PENTALINON ANDRIEUXII²

3.1 DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO

Los productos naturales son una fuente importante de metabolitos que poseen diferentes aplicaciones y que han provisto una mayor diversidad estructural que las moléculas obtenidas por Química combinatoria clásica. Debido al escaso conocimiento fitoquímico de *Pentalinon andrieuxii* se consideró importante el aislamiento de metabolitos de naturaleza terpénica que puedan tener estructura similar a los urechitoles y que nos permitieran aportar conocimiento de su origen biosintético.

En este capítulo se reporta el aislamiento y la elucidación estructural de dos metabolitos de naturaleza esteroidal (1 y 2) mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos y mediante reacciones de correlación química, además la estructura del metabolito 1 fue confirmada con un estudio de difracción en rayos X.

3.2 STEROIDS FROM THE ROOT EXTRACT OF Pentalinon andrieuxii

Alejandro Yam-Puc^a, Leticia Chee-González^a, Fabiola Escalante-Erosa^a, Athimoolam Arunachalampillai^c, Ola F. Wendt^c, Olov Sterner^c, Gregorio Godoy-Hernández^b, Luis Manuel Peña-Rodrígueza^{*}

²Los resultados de identificación estructural de estos dos metabolitos se incluyen en el trabajo "Steroids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*" publicado en Phytochemistry Letters (2012) 5, 45-48.

3.2.1 ABSTRACT

Two pregnane derivatives (1 and 2) were isolated from the methanolic root extract of Pentalinon and rieuxii, a plant used commonly in Yucatecan traditional medicine to treat leishmaniasis. The structures of both metabolites were established using spectroscopic methods and chemical correlation reactions. An X-ray structure of 1 is reported.

3.2.2 INTRODUCTION

The roots and leaves of *Pentalinon andrieuxii* Muell.-Arg. (Apocynaceae), a climbing plant commonly known as "bejuco guaco", "cantibteac" or "contrayerba", are commonly used in Yucatan traditional medicine to cure the lesions resulting from cutaneous leishmaniasis (Chan-Bacab *et al.*, 2003; Lezama-Davila *et al.*, 2007); the root of the plant is also used to treat snake bites and the latex is recommended to alleviate headaches and nervous disorders (Argüeta *et al.*, 1994; Pulido and Serralta, 1993). Existing phytochemical knowledge on the genus Pentalinon (formerly known as Urechites) is limited, with only two reports, one describing its production of cardenolides and pyrrolizidine alkaloids with antitumor and hepatotoxic activities (Tillequin *et al.*, 1993), and the other describing the isolation and identification of two structurally unusual trinorsesquiterpenes having the novel campechane skeleton (Yam-Puc *et al.*, 2009). As part of our continuing study of the Yucatecan native flora as a potential source of bioactive metabolites, we wish to report herein on the isolation and identification of the pregnanes **1** and **2** from the root extract of *P. andrieuxii*.

3.2.3 RESULTS AND DISCUSSION

The dichloromethane-soluble fraction of the methanolic root extract of *P. andrieuxii* was initially subjected to an acid–base extraction. Successive chromatographic purifications of the neutral fraction using a combination of VLC and column chromatography, resulted in the isolation of the secondary metabolites 1 and 2 in pure form. The ESI-MS of 1 showed a protonated fragment ion peak at m/z 311 [M-2H₂O+H]⁺ which suggested an original molecular formula of C₂₁H₃₀O₄ for the parent secondary metabolite; this in turn indicated the presence of seven unsaturation sites in the structure. The ¹³C NMR spectrum of 1 (Table 3.1) showed the expected twenty one carbon signals, including one ester or lactone

carbonyl carbon at 178.8 ppm and two olefinic carbons at 120.8 and 139.8 ppm. The combined analysis of the ¹³C NMR spectrum and the HSQC experiment of 1 established the nature of all carbon atoms as two methyl groups, eight methylene, six methine, and five quaternary carbons. The chemical shift values of the carbons at 83.3 (methine), 85.3 (quaternary) and 71.4 ppm (methine) clearly indicated that they were all bonded to oxygen. The presence of two oxygen-bearing methine groups in the structure of 1 was confirmed by two one-proton signals at δ 3.49 (m) and δ 4.39 (c, J= 6.6 Hz) in its ¹H NMR spectrum (Table 3.1), with the low-field chemical shift of the second proton suggesting its being part of an ester or lactone functionality. Additional signals in the ¹H NMR spectrum of 1 included a vinylic proton signal at δ 5.37 (t, J= 2.8 Hz), together with a three-proton singlet at δ 1.03 and a three-proton doublet at δ 1.33, indicating the presence of a trisubstituted double bond and two methyl groups, one bonded to a guaternary carbon and another to a methine, respectively. The spectroscopic data of 1 proved to be very similar to that reported for the advcone of amaloside C, a steroidal secondary metabolite with an extra hydroxyl group at C8, isolated from Amalocalyx yunnanensis (Apocynaceae) (Shen et al., 1993). The C-14 location of the tertiary hydroxyl group in the structure of 1 was established by comparing the chemical shift (85.3 ppm) of the guaternary oxygenated carbon in the ¹³C NMR spectrum of 1, with those reported for the oxygenated carbons C8 (76.1 ppm) and C14 (86.4 ppm) in amaloside C and similar pregnanes (Shen et al., 1993; Hu et al., 1992), Alternatively, a ³J correlation observed in the HMBC experiment between the protons of the C19 methyl group at δ 1.03 and the olefinic quaternary carbon at 139.8 ppm confirmed the C5 location of the double bond; similarly, the ³J correlation observed between the protons of the C21 methyl group at δ 1.33 and the methine carbon at 56.2 ppm, and the ²J correlation between the same protons and the oxygenated methine carbon at 83.3 ppm, confirmed C21 being a secondary methyl group. Both the structure and relative stereochemistry of 1 were confirmed unambiguously by a single-crystal X-ray diffraction experiment (Figure 3.1). The spectroscopic data of 1 proved to be identical to that reported for 3β , 14β , 20-trihydroxypregn-5-ene-18-oic-(18-20)-lactone, a secondary metabolite previously isolated from Ecdysanthera rosea Hook et Arn. (Apocynaceae) (Luger et al., 1998) and recently reported as the hydrolysis product of the novel saponins ecdysantherosides A and B (Zhu et al., 2011). The ESI-MS of 2 showed a fragment ion peak at m/z 347 $[M-H_2O+H]^+$ which suggested a molecular formula of $C_{21}H_{32}O_5$ for the parent secondary metabolite, and an extra oxygen atom and one less unsaturation site than 1. The ¹H NMR spectrum of 2 (Table 3.1) showed several differences when

compared to that of 1; namely, the presence of two high-field three-proton singlets at δ 1.58 and 0.94 corresponding to two methyl groups attached to quaternary carbons, the presence of a single carbinol proton at δ 4.12, and the absence of vinylic proton signals. The presence of a secondary alcohol in the structure of 2 was confirmed by preparing the corresponding acetylated and oxidized derivatives; the ¹H NMR spectrum of the acetylated derivative showed the expected shift to lower field of the carbinol proton (δ 4.12–5.08), while that of the oxidized derivative showed the expected absence of the carbinol proton signal. The ¹³C NMR spectrum of 2 showed an ester carbonyl carbon at 175.8 ppm, a hemiketal carbon at 113.1 ppm, and two additional oxygen-bearing carbons, one quaternary at 91.4 ppm and one methine at 66.8 ppm. The presence of the hemiketal group in the structure of 2 was confirmed when treatment of the natural product with NaBH₄ yielded the expected reduction product. The ¹H NMR spectrum of the reduction product showed a new carbinol proton signal at δ 4.38 and a three-proton doublet at δ 1.35. On the basis of these results, metabolite 2 was identified as 3β ,14 β ,20,20tetrahydroxy-5β-pregn-18-oic-(18-20)-lactone, a new natural product. The assignment of the cis configuration at the AB ring junction is based primarily on the chemical shift observed for the C19 methyl group carbon (23.6 ppm) in the ¹³C NMR spectrum of 2 (Table 3.1), since it is known that the signal for the ring junction methyl group carbon in the cis isomer occurs 11-12 ppm downfield when compared to that of the same methyl group in the trans isomer (Aver and Peña-Rodríguez, 1987; Wehrli and Nishida, 1979).



Figure 3.1 Single-crystal X-ray structure and relative stereochemistry of metabolite 1.

| No | Metabolite 1 | | | Metabolite 2 | |
|----|---------------------|-------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|--|
| | ¹³ C NMR | ¹ H NMR (δ) | ¹³ C NMR | ¹ Η NMR (δ) | |
| | (δ) | | (δ) | | |
| 1 | 37.2 (t) | 1.85 (1H, m) | 29.9 (t) | 1.47 (1H, m) | |
| | | 1.91 (1H, m) | | 1.50 (1H, m) | |
| 2 | 26.6 (t) | 2.21 (2H, m) | 22.3ª (t) | 1.32 (1H, d, <i>J</i> = 4.6) | |
| | | | | 2.11 (1H, dd, <i>J</i> =2.6, 4.2) | |
| 3 | 71.4 (d) | 3.49 (1H, hept, J= 5.6) | 66.8 (d) | 4.11 (1H, t, <i>J</i> = 2.6) | |
| 4 | 41.9 (t) | 2.23 (1H, m) | 28.2 ^b (t) | 1.85 (1H, m) | |
| | | 2.31 (1H, m) | | 1.98 (1H, m) | |
| 5 | 139.8 (s) | | 34.6 (s) | 1.66 (1H, m) | |
| 6 | 120.8 (d) | 5.37 (1H, t, J= 2.8) | 18.6ª (t) | 1.70 (2H, m) | |
| 7 | 34.7 (t) | 1.80 (1H, m) | 20.4ª (t) | 1.59 (1H, m) | |
| | | 1.84 (1H, m) | | 1.80 (1H, m)) | |
| 8 | 38.9 (d) | 1.96 (1H, d, <i>J</i> = 4.0) | 36.1 (d) | 1.77 (1H, m) | |
| 9 | 45.7 (d) | 1.35 (1H, dd, <i>J</i> = 4.0, 12.0) | 38.9 (d) | 1.74 (1H, m) | |
| 10 | 37.1 (s) | | 35.3 (s) | | |
| 11 | 20.8 (t) | 2.07 (1H, m) | 21.9ª (t) | 1.22 (1H, m) | |
| | | 2.10 (1H, m) | | 1.62 (1H, m) | |
| 12 | 31.3 (t) | 1.80 (1H, m) | 27.9 ^b (t) | 1.52 (1H, m) | |
| | | 1.85 (1H, m) | | 2.03 (1H, m) | |
| 13 | 59.7 (s) | | 59.2 (s) | | |
| 14 | 85.3 (s) | | 91.4 (s) | | |
| 15 | 33.4(t) | 1.98 (1H, m) | 33.3 (t) | 1.37 (1H, m) | |
| | | 2.03 (1H, m) | | 1.92 (1H, m) | |
| 16 | 25.8 (t) | 2.26 (2H, m) | 25.6 (t) | 1.18 (1H, m) | |
| | | | | 1.89 (1H, m) | |
| 17 | 56.2 (d) | 2.18 (1H, m) | 58.2 (d) | 2.62 (1H, dd, <i>J</i> = 1.0, 3.7) | |
| 18 | 178.8 (s) | | 175.8 (s) | | |
| 19 | 19.4 (c) | 1.03 (3H, s) | 23.6 (c) | 0.94 (3H, s) | |
| 20 | 83.3 (d) | 4.39 (1H, c, <i>J</i> = 6.6) | 113.1 (s) | | |
| | | | | | |
| 21 | 21.4 (c) | 1.33 (3H, d, J= 6.4) | 15.6 (c) | 1.58 (3H, s) | |

Cuadro 3.1 NMR spectroscopic data of metabolites 1 and 2

Chemical shift values are given in parts per million (ppm) relative to the solvent signal (7.26 and 77.0 ppm for ¹H and ¹³C NMR spectra, respectively); coupling constants are given in Hz. ^{a,b}assignment of signals with similar letters can be interchanged.

3.2.4 EXPERIMENTAL

3.2.4.1 General experimental procedures

Analytical TLC analyses were carried out using aluminum-backed silica gel (60F254) plates (E.M. Merck, 0.2 mm thickness); the plates were first examined under UV light (λ = 254 and 366 nm) and the various components in the chromatograms were visualized by dipping the plates in a solution of phosphomolybdic acid (20 g) and ceric sulfate (2.5 g) in 500 mL of sulfuric acid (5%), followed by drying and gentle heating. ¹H NMR (400 MHz) and ¹³C NMR (100 MHz) spectra were obtained in CDCl₃, on a Bruker Avance 400 spectrometer, using the residual CHCl₃ signal (7.26 and 77.00 ppm for ¹H and ¹³C, respectively) as reference. Mass spectra were performed with a JEOL-JMS-SX102 and ESI-HRMS (electrospray ionization mass) with the Waters Q-TOF microsystem using 0.1% phosphoric acid in a 1:1 water/acetonitrile mixture as reference. IR spectra were recorded in CHCl₃ (film) using an FT-Nicolet Magna Protégé 460 spectrophotometer.

3.2.4.2 Plant material

The roots of *P. andrieuxii* were collected in April 2006 from a field located 3.5 km northeast of the city of Campeche, on the road to Chiná, Campeche, México. The plant was identified by taxonomist Paulino Simá-Polanco, and a voucher specimen has been deposited in the herbarium of the Unidad de Recursos Naturales of the Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) under the collection number PSimá-2245 and folio number 46178.

3.2.4.3 Extraction and isolation

The plant material was washed with tap water and dried, first for a week at room temperature and then for 72 h in an oven at 55 °C. The dry roots (595 g) were cut, ground, and extracted four times with MeOH (2 L), at room temperature. The extracts were combined and the solvent was removed under reduced pressure to produce 60.2 g of crude methanolic extract. Sonication (ultrasound bath Cole-Parmer 8853) of the crude methanolic extract with CH_2CI_2 (500 mL) for 24 h yielded 18.2 g of a medium-to-low polarity fraction, which was then subjected to an acid–base extraction to produce the corresponding acidic (654.6 mg), basic (596.2 mg), and neutral (3.27 g) fractions.

Successive VLC (CH₂Cl₂/acetone) and column chromatography (hexane/acetone 8:2) purifications of the neutral fraction led to the isolation of **1** (10 mg) and **2** (35 mg) in pure form.

3.2.4.3.1 3β,14β,20-Trihydroxypregn-5-ene-18-oic-(18-20)-lactone (1)

Colorless needles (CHCl₃/methanol); IR (CHCl₃, film) v_{max} 3437 (OH), 2964 and 2939 (C– H), 1729 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz), see Table 3.1; ESI-MS m/z 311.1918 [M-2H₂O+H]⁺ (calcd. for C₂₁H₂₇O₂: 311.2011); TLC R_f 0.47 in CH₂Cl₂/methanol, 94:6.

3.2.4.3.2 3β , 14β , 20-Trihydroxy- 5β -pregn-18-carboxylic-20-lactone (2)

Yellow oil (CHCl₃); IR (CHCl₃, film) v_{max} 3436 (OH), 2939 and 2878 (C–H), 1782 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz), see Table 3.1; ESI-MS m/z 347.2226 [M–H₂O+H]⁺ (calcd. for C₂₁H₃₁O₄: 347.2222); TLC R_f 0.25 in hexane/acetone, 8:2.

3.2.4.4 Acetylation of 2

A fraction containing **2** (9 mg) was combined with acetic anhydride (1 mL) and pyridine (0.5 mL) and allowed to stir overnight at room temperature. The reaction mixture was poured over water (20 mL) and the resulting suspension was extracted with ethylacetate (3x, 1:1). The organic layer was successively washed (2x, 1:1) with 5% HCl, 5% NaHCO₃ and brine, and then dried over anhydrous sodium sulfate. Evaporation of the solvent under reduced pressure yielded 4 mg of acetylated derivative as a colorless oil; IR (CHCl₃, film) v_{max} 2939 and 2866 (C–H), 1785 and 1739 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.07 (1H, t, *J*= 2.6 Hz), 2.64 (1H, dd, *J*= 1.2, 3.3 Hz), 2.05 (3H, s, CH₃COO), 1.59 (3H, s), 0.96 (3H, s); ESI-MS m/z 429.2191 [M+Na] (calcd. For C₂₃H₃₄O₆ Na: 429.2253); TLC Rf 0.45 in CHCl₃/hexane/methanol, 50:48:2.

3.2.4.5 Oxidation of 2

An excess of pyridinium chlorochromate (PCC, Corey's reagent) was added to a solution of a fraction containing 2 (10 mg) in CH₂Cl₂ (2 mL), and the mixture was allowed to stir overnight at room temperature. The reaction mixture was passed through a silica gel bed (70–230 mesh; 2 cm diameter, 3 cm height), and the adsorbent was washed with CH₂Cl₂/methanol (99:1) to produce 3 mg of oxidized product as a colorless oil; IR (CHCl₃, film) v_{max} 2945 and 2879 (C–H), 1779 and 1719.23 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.07 (1H, t, *J*= 2.6 Hz), 2.68 (1H, dd, *J*= 1.1, 4.1 Hz), 1.61 (3H, s), 1.02 (3H, s); ESI-MS m/z 345.2037 [M–H₂O+H] (calcd. For C₂₁H₂₉O₄: 345.2066); TLC R_f 0.25 in CHCl₃/hexane/methanol 50:48:2.

3.2.4.6 Reduction of 2

A suspension of 2 (9 mg) in methanol (5 mL) was treated with an excess of NaBH₄. The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 72 h and then was poured over distilled water (20 mL); the resulting suspension was extracted with ethylacetate (3x, 2:1, 1:1, 1:1) and the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous sodium sulfate. Filtration and evaporation of the solvent yielded 3 mg of crude reduced product as a colorless oil; IR (CHCl₃, film) v_{max} 3436 (OH), 2932 and 2872 (C–H), 1785 and 1739.23 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.37 (1H, q, *J*= 6.3 Hz), 4.12 (1H, t, *J*= 2.5 Hz), 1.34 (3H, d, *J*= 6.3 Hz), 0.99 (3H, s); TLC R_f 0.12 in CHCl₃/hexane/methanol, 50:48:2.

3.2.4.7 X-ray crystallography

The intensity data set of compound 1 was collected at 293 K with an Oxford Diffraction X calibur 3 system using ω -scans and Mo-K α ($\lambda = 0.71073$ Å) (Crysalis CCD). The data were extracted and integrated using Crysalis RED. The structures were solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares calculations on F^2 using SHELXTL 5.1 (Sheldrick and Serralta, 1998). Non-H atoms were refined with anisotropic displacement parameters. Hydrogen atoms were constrained to parent sites, using a riding model. All crystallographic data are available in CIF format (CCDC reference number CCDC 822826).

3.2.4.7.1 Crystal data and collection and refinement details

 $C_{21}H_{29}O_4$, M = 345.44, monoclinic, a = 5.8408(2), b = 14.7268(5), c = 10.8519(5) Å, β = 104.554(4)° V = 903.48(6) Å³, space group P2₁, Z = 2, μ = 0.086 mm⁻¹, Dcalcd. = 1.27 g cm⁻³, θ range 2.38–33.088, 9361 reflections measured, 4721 unique (R_{int} = 0.0398) which were used in all calculations. The final $wR(F^2)$ was 0.0774 and the *S* value 0.974 (all data). The R(F) was 0.0456 (I > 2 σ (I)).

3.2.5 AKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Gilda Erosa-Rejón (Lund University) for NMR spectra, as well as Carlos Solano-Arribas for technical assistance. A.Y.-P. wishes to thank the EULADIV Alfa Project for supporting his research training stay at Lund University. Financial support from the FOMIX-Yucatán Project No. 66262 is also gratefully acknowledged.

3.2.6 REFERENCES

- Argüeta, A., Cano, L., Rodarte, M.E., 1994. Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana, vol. 1. Instituto Nacional Indigenista, Mexico City, p. 204.
- Ayer, W.A., Peña-Rodríguez, L.M., 1987. Metabolites produced by Alternaria brassicae, the black spot pathogen of canola. Part 1. The phytotoxic components. J. Nat. Prod. 50 (3), 400–407.
- Chan-Bacab, M.J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., Durán-García, R., Peña-Rodríguez, L.M., 2003. Variation of leishmanicidal activity in four populations of Urechites andrieuxii. J. Ethnopharmacol. 86, 243–247.

Crysalis CCD, Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, Oxfordshire, UK, 2005.

Crysalis RED, Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, Oxfordshire, UK, 2005.

- Hu, Y.-J., Shen, X., Mu, Q.-Z., Lu, Y., Zheng, Q-T., 1992. Steroidal constituents from *Amalocalyx yunnanensis*. Phytochemistry 31 (6), 2099–2102.
- Lezama-Davila, C.M., Isaac-Márquez, A.P., Zamora-Crescencio, P., Uc-Encalada, M.R., Justiniano-Apolinar, S.Y., Del Ángel-Robles, R., Satoskar, A., Hernández-Rivero, L., 2007. Leishmanicidal activity of *Pentalinon andrieuxii*. Fitoterapia 78, 255–257.
- Luger, P., Weber, M., Dung, N.X., Thanh-Ky, P., Le-The, C., 1998. The crystal structure of 3β,14β,20-trihydroxy-18oic(18-20)lactone pregnen-5, derived from a Vietnamese folk medical plant. Cryst. Res. Technol. 33 (2), 325–332.
- Pulido, M.T., Serralta, L., 1993. Lista Anotada de las Plantas Medicinales de Uso Actual en el Estado de Quintana Roo, México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo: Chetumal, Quintana Roo, p. 6.
- Sheldrick, G.M., 1998. SHELXTL, 5.1, Program for Structure Solution and Least Square Refinement. University of Göttingen, Göttingen, Germany.

- Shen, X., Hu, Y.-J., An, Y.-L., Mu S Q.-Z., 1993. Steroids from *Amalocalyx yunnanensis*. Phytochemistry 33 (3), 687–689.
- Tillequin, F., Michael, S., Seguin, I., 1993. In: Waterman, P.G. (Ed.), Alkaloids and Sulphur Compounds, vol. 8. Academic Press, San Diego, pp. 175–181.
- Wehrli, F.W., Nishida, T., 1979. The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy in natural products chemistry. Fortschr. Chem. Org. Naturst. (Prog. Chem. Org. Nat. Prod.).36, 104–109.
- Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., Pech-López, M., Chan-Bacab, M.J., Arunachalampillai,
 A., Wendt, O.F., Sterner, O., Peña-Rodríguez, L.M., 2009. Trinorsesquiterpenoids
 from the root extract from *Urechites andrieuxii*. J. Nat. Prod. 72, 745–748.
- Zhu, X., Wu, G., Xiang, J., Luo, H., Luo, S., Zhu, H., Wang, Y., 2011. New pregnane saponins from *Ecdysanthera rosea* and their cytotoxicity. Fitoterapia 82, 632–636.

3.3 ESPECTROSCOPÍA DE LOS METABOLITOS ESTEROIDALES 3β , 14β , 20-trihydroxypregn-5-ene-18-oic-(18-20)-lactone (1) Y 3β , 14β , 20-trihydroxy-5 β -pregn-18-carboxylic-20-lactone (2)



Figura 3.2 Espectro de masas de alta resolución 1.



Figura 3.3 Espectro ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) de 1.

Capítulo III



Figura 3.4 Espectro ¹H RMN (CDCI₃, 400 MHz) de 1.



Figura 3.5 Experimento HSQC de 1.



Figura 3.7 Espectro de masas de alta resolución de 2.



Figura 3.8 Espectro ¹H RMN de 2.



Figura 3.9 Espectro ¹³C RMN de 2.

CAPÍTULO IV

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL 3-(3'R-HIDROXI)-ESTEARATO DE LUPEOL DEL EXTRACTO METANÓLICO DEL TALLO DE PENTALINON ANDRIEUXII³

4.1 DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO

En este capítulo se reporta el aislamiento e identificación del 3-(3'*R*-hidroxi)-esterearato de lupeol (procrim b) del extracto metanólico de tallos de *Pentalinon andrieuxii* y se hace énfasis en la importancia de los análisis espectroscópicos y la CG-EM utilizados en la identificación de metabolitos secundarios, ya que ayuda a una correcta identificación de los mismos. Inicialmente el 3-(3'*R*-hidroxi)-estearato de lupeol fue identificado como acetato de lupeol utilizando un análisis de CG-EM, sin embargo análisis posteriores usando ¹H RMN y ¹³C RMN revelaron un error en la identificación del producto, sugiriendo la existencia de una cadena lateral esterificada con el hidroxilo en posición 3 del lupeol. Asimismo el uso de experimentos de RMN mono y bidimensionales junto con la espectrometría de masas de alta resolución reveló que el metabolito era un éster de lupeol con ácido 3-hidroxi-esteárico.

4.2 A CASE OF MISTAKEN IDENTITY. LUPEOL-3-(3'*R*-HYDROXY)-STEARATE CAN BE MISTAKENLY IDENTIFIED AS LUPEOL ACETATE WHEN ONLY ANALIZED BY GC-MS.

Alejandro Yam-Puc,^a Fabiola Escalante-Erosa,^a Karlina García-Sosa,^a Fabiola G.Ramírez-Torres,^a Manuel J. Chan-Bacab,^c Wolfgang Eisenreich,^d Claudia Huber,^d Nihat Knispel,^d Gregorio Godoy-Hernández,^b and Luis M. Peña-Rodríguez^{a*}

³Los resultados de identificación estructural del 3-(3'*R*)-hidroxi-estearato de lupeol se incluyen en el trabajo "A case of mistaken identity. Lupeol-3-(3'*R*)-hydroxy-stearate can be mistakenly identified as lupeol acetate when only analized by GC-MS". Phytochemistry Letters (2013) 6, 649-652.

4.2.1 ABSTRACT

Lupeol-3-(3'*R*-hydroxy)-stearate, also known as procrim b (1), was isolated from the methanolic stem extract of *Pentalinon andrieuxii* and initially mistaken as lupeol acetate when analyzed by GC-MS only. The correct structure of **1** was established following a careful analysis of its NMR and MS data.

Keywords: lupeol acetate, lupeol stearate, procrim b, *Pentalinon andrieuxii*, retro-aldol reaction, thermolysis, hydroxyl-fatty acid esters.

4.2.2 INTRODUCTION

Plant triterpenoids, which include sterols, steroids, and brassinosteroids, constitute a large and structurally diverse group of natural products, with over 100 different carbon skeletons (Stiti and Hartmann, 2012). Pentacyclic triterpene esters have been found to have pharmacological activities such as antiinflammatory, antiartritic, antidepressive, hepatoprotecting, and antitumoral; this wide range of biological activities is what makes the search of triterpene esters from plants particularly important (Miranda et al., 2006). The 3-O-acyl-derivatives of lupeol, a ubiquitous triterpene found in many plant species and reported to exhibit strong antiinflammatory, antiarthritic, antimutagenic, antimalarial, and anticancer activities (Saleem et al., 2005; Laszczyk, 2009), have also been reported to be biologically active; these esters include lupeol palmitate and lupeol linoleate, isolated from the bark of roots of Alstonia boonei (Rajic et al., 2000), which have shown in vitro selective activity as protease inhibitors (Hodges et al., 2003), and 3-docosanoyl lupeol and lupeol acetate, both obtained from the stems of *Willughbeia firma* and both having antiinflamatory activity (Patocka, 2003; Subhadhirasakul et al., 2000). We describe herein the isolation and identification of lupeol-3-(3'R-hydroxy)-steareate (1) from the stem extract of P. andrieuxii and, on doing so, emphasize the importance of carefully analyzing the full chromatographic and spectroscopic data, in addition to those from the GC-MS analysis, when identifying a pure, bioactive metabolite.

4.2.3 RESULTS AND DISCUSSION

Successive chromatographic purifications of the dichloromethane-soluble fraction of the stem extract of P. andrieuxii, using a combination of VLC and open column chromatography, resulted in the isolation of metabolite 1 in pure form. The GC-MS analysis of metabolite 1 showed a single component at t_R 24.07 min with an apparent parent ion peak at m/z 468, which indicated a molecular formula of C₃₂H₅₂O₂ and suggested 1 being lupeol acetate (2). However, and although both the t_{R} and the fragmentation pattern of metabolite 1 were identical to those observed when an authentic sample of lupeol acetate was analyzed by GC/MS (t_R: 24.02 min and M⁺ at m/z 468, respectively), and the ¹H NMR spectrum of **1** (Table 4.1) showed the characteristic signals for six methyl groups at δ 0.78 (s), 0.84 (6H, s), 0.93 (s), 1.02 (s) and 1.64 (s), together with the two vinylic protons of the exocyclic methylene group at δ 4.56 (s) and 4.68 (s), and the proton of the C-3 esterified oxymethine group at δ 4.53 (dd, J= 5.4, 13.0 Hz), the expected, characteristic signal for the acetate methyl group was missing. This indicated that metabolite 1 did not correspond to lupeol acetate but to a different type of lupeol ester. A careful analysis of the ¹H NMR spectrum of **1** showed the presence of a second oxymethine proton at δ 3.98 (bs) which, from the results of the COSY experiment (Figure 4.1a), appeared to be coupled to the protons of two methylene groups at $\delta 2.50$ (2H, bd, J= 12.9 Hz) and 1.51 (2H, m). The ¹³C NMR spectrum of 1 confirmed the presence of two carbons bonded to oxygen with the signals at 68.33 and 81.57 ppm and also showed the expected signals for an ester carbonyl carbon at 173.04 ppm, and for the two olefinic carbons of a disubstituted double bond at 109.50 and 151.09 ppm. However, a complex signal group in the 29-30 ppm chemical shift region of the ¹³C NMR spectrum indicated the presence of a large number of methylene carbons and strongly suggested 1 being a hydroxylated fatty acid ester of lupeol. The correct position of the free hydroxyl group in the fatty acid alkyl chain was established from the analysis of the HMBC experiment of 1 which showed a clear ³J correlation between the carbinol proton at δ 3.98 and the carbonyl group at 173.04 ppm, and ^{2}J and ^{3}J correlations between the carbinol proton and the methylene carbons at 36.69 and 25.61 ppm, respectively (Figure 4.1b). The HRMS of 1 showed a molecular ion peak with an exact mass of 708.6415, which indicated a molecular formula of $C_{48}H_{84}O_3$ that corresponded to the lupeol ester of a hydroxylated C18 fatty acid. On the basis of its spectroscopic data, and by comparing it with those reported in the literature, metabolite 1 was identified as lupeol-3-(3'R-hydroxy)-stearate, recently reported

from Alecrim-propolis and designated with the common name procrim b (Furukawa et al., 2001). However, it is interesting to point out that the optical rotation value of 1 is similar to that reported in the literature for procrim b but has the opposite sign (+154.5° vs -146.6°, respectively) indicating that the lupped ester isolated in this investigation corresponds to the enantiomer of procrim b. To date, the number of reported triterpene hydroxylated-fatty acid esters is limited (Salatino et al., 2005). The only other report of hydroxylated-fatty acid ester of lupeol is that of 3-O-(3'-hydroxyeicosanoyl) lupeol, isolated from Holarrhena floribunda and reported to show moderate activity against Plasmodium falciparum (Fotie et al., 2006). The similarity in the fragmentation patterns of 1 and lupeol acetate when analyzed by GC-MS, particularly in terms of the presence of the fragment ion peak at m/z468, can be explained by a thermally-induced reverse aldol reaction of 1 which results in the formation of lupeol acetate and hexadecanal (Figure 4.2) as a result of the high temperature (260 °C) in the injector of the GC-MS, since this type of thermolysis has been reported to be highly favored both theoretically and experimentally for B-hydroxy-esters (Quijano et al., 1994; Notario et al., 2002). Although, to date, there are no reports in the literature describing the occurrence of this type of reaction during the isolation or identification of natural products, the proneness of B-hydroxy-esters to readily undergo thermolysis under normal GC-analysis conditions, could explain the limited number of literature reports on the natural occurrence of triterpene hydroxylated-fatty acid esters. A quick literature search showed a significant number of reports where the identification of lupeol acetate as a bioactive metabolite was established only on the basis of results from the CG-MS analysis of the natural ester using thermolysis-favoring temperatures of 250°-300° C in the injector (Hooper et al., 1982; Vilegas et al., 1997; Peres-Ferreira and Rodrigues de Oliveira, 2010; Oyo-Ita et al., 2010; Márguez-Hernández et al., 2010; Goncalves et al., 2011; Pereira et al., 2012; Stiti and Hartmann, 2012; Di Stefano and Pitonzo, 2012); taking into account the results presented here, it might be advisable to confirm the identification of the isolated natural product and whether the biological activity being reported is indeed due to lupeol acetate or if it is due to a misidentified hydroxylated fatty acid lupeol ester such as 1. Finally, our initial, mistaken identification of 1 as lupeol acetate, emphasizes the importance of using additional chromatographic and spectroscopic data to confirm the chemical structure of the isolated metabolites, particulary those which are ubiquitous and commonly found in phytochemical research.

Capítulo IV





R







Figura 4.1 a) ¹H-¹H COSY couplings between H-3' and H-2'/H4'. b) Key HMBC correlations between proton H-3' and carbons C-1' (³J), C4' (²J) and C5' (³J), and between H-3 and carbon C-1'of lupeol-3- (3'*R*)-hydroxy-stearate (procrim b) (1).

| Position | ¹³ C NMR | ¹ H NMR | Position | ¹³ C NMR | ¹ H NMR |
|----------|---------------------|---------------------------|----------|---------------------|--------------------|
| 1 | 38.14 | 1.66 (m) | 25 | 16.30 | 0.84 (s) |
| 2 | 23.88 | 1.61 (m) | 26 | 16.10 | 1.02 (s) |
| 3 | 81.57 | 4.53 (dd, J=5.4, 13.0) | 27 | 14.65 | 0.93 (s) |
| 4 | 37.93 | | 28 | 18.13 | 0.78 (s) |
| 5 | 55.49 | 0.79 (m) | 29 | 109.5 | 29a 4.56 (s) |
| | | | | | 29b 4.68 (s) |
| 6 | 18.32 | 1.49 (m) | 30 | 19.42 | 1.64 (s) |
| 7 | 34.30 | 1.38 (m) | 1' | 173.04 | |
| 8 | 40.96 | | 2' | 41.72 | 2.50 (d, J= 12.96) |
| 9 | 50.44 | 1.29 (m) | 3' | 68.33 | 3.98 (s) |
| 10 | 37.20 | | 4' | 36.69 | 1.51 (m) |
| 11 | 21.07 | 1.41 (m) | 5' | 25.61 | 1.43 (m) |
| 12 | 25.19 | 1.67 (m) | 6'-16' | 29.0-30.0 | 1.24 (m) |
| 13 | 38.46 | 0.97 (m) | 17' | 22.85 | 1.24 (m) |
| 14 | 42.95 | | 18' | 14.29 | 0.87 (m) |
| 15 | 27.55 | 1.67 (m) | | | |
| 16 | 35.69 | 1.43 (m) | | | |
| 17 | 43.12 | | | | |
| 18 | 48.39 | 1.35 (m) | | | |
| 19 | 48.13 | 2.36 (m) | | | |
| 20 | 151.09 | | | | |
| 21 | 29.55 | 1.24 (m) | | | |
| 22 | 40.12 | 2.40 (m) | | | |
| 23 | 28.16 | 0.84 (s) | | | |
| 24 | 16.30 | 0.83 (s) | | | |

Cuadro 4 1 Spectroscopic data of lupeol-3-(3'*R*-hydroxy)-stearate (procrim b) (1).



Figura 4.2 Thermally-induced reverse aldol reaction of lupeol-3-(3'*R*)-hydroxy-stearate (procrim b) (1).

4.2.3 EXPERIMENTAL

4.2.3.1 General experimental procedures

Analytical TLC analyses were carried out using aluminum-backed silica gel (60F254) plates (E.M. Merck, 0.2 mm thickness); the plates were first examined under UV light and the various components in the chromatograms were visualized by dipping the plates in a solution of phosphomolybdic acid (20 g) and ceric sulfate (2.5 g) in 500 mL of sulfuric acid (5%), followed by drying and gentle heating. Plant material was liophylized overnight at 0.83 mbar using an Alpha 2-4 LD plus Lyophilisator (Christ, Osterode am Harz, Germany) equipped with a Chemistry Hybrid Pump RC 6 (Vaccubrand GmbH+Co, Wertheim, Germany). GC-MS analysis was performed on a GC-QP2010 Plus chromatograph (Shimadzu, Duisburg, Germany) equipped with a fused silica capillary column (Equity TM-5; 30 m, 0.25 m film thickness; SUPELCO, Bellefonte, PA) and a mass detector working with electron ionization at 70 eV. The sample was injected at an interface temperature of 260 °C and helium inlet pressure of 70 kPa. The column was run at 200 °C

for 3 min and then with a temperature gradient of 20 °C/min to a final temperature of 280°C that was held for 30 min. High resolution measurements were done using a Trace GC Ultra (Thermo Scientific) with a direct inlet system. Metabolite 1 evaporated at ca. 210° C in high vacuum. Additional GC-Ms analysis were done using a Hewlett Packard 5890 gas chromatograph [GC conditions: split injection of 1 mL of sample; Ultra 1 column (25 m × 0.2 mm i.d.), flow rate 1.0 mL/min (Nitrogen); oven temperature program $T_1 = 150^{\circ}$ C (3) min), T₂ = 280° C (30 min), gradient 10° C/min, injector 300° and detector (FID) 300° C].Mass spectra were obtained with a JEOL-JMS-SX102. ¹³C NMR spectra were obtained from an Avance III 500 system (Bruker, Germany) with a cryo probe head (5 mm CPQNP, ¹H/¹³C/³¹P/¹⁹F/²⁹Si (Z-gradient)). The ¹H-NMR spectra and the two dimensional experiments were performed with an Avance I 500 system with a SEI 500 S2 probe head (5 mm, inverse with Z-gradient). The measurements were performed at magnetic fields of11.75 Tesla. The resonance frequencies of ¹H and ¹³C were 500.13 MHz and 125.82 MHz respectively. The temperature was 300 K. The one dimensional ¹³C NMR spectra as well as the one- and two-dimensional ¹H NMR spectra were measured with standard Bruker parameter sets. Data processing was done with the MestReNova Software Version7.0.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain).

4.2.3.2 Extraction and isolation of metabolite lupeol-3-(3'R-hydroxy)-stearate (procrim b) (1)

The stems of two plants (nine months old) of *P. andrieuxii* grown under glasshouse conditions were frozen using liquid nitrogen and then lyophilized. The dry-ground plant material (46.84 g) was extracted four times with MeOH (1 L, 72 h) at room temperature. The extracts were combined and the solvent was removed under reduced pressure to produce 10.92 g of crude methanolic extract. Refluxing of the crude methanolic extract twice with CH_2Cl_2 (600 mL, 1 h) yielded 1.42 g of a CH_2Cl_2 -soluble fraction which was initially fractionated by vacuum liquid chromatography (5 cm diameter) using a gradient elution with mixtures of $Hx/CH_2Cl_2/An$ to produce nine fractions (A-I). Successive open column chromatography (1 x 40 cm) purifications of combined fractions A and B (217.4 mg) using $Hx/CH_2Cl_2/An$ 110:10:5 and $Hx/Et_{x2}O$ 95:5 resulted in the isolation of **1** (25mg) in pure form.

4.2.4 AKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Ivonne Jüttner for growing the plants of *P. andrieuxii*. We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (EI 384/8-1) for generous sponsoring of this research work. A. Y.-P. wishes to thank CONACYT and CICY for their support to carry out a research training stay at TUM. F. R.-T. wishes to thank Academia Mexicana de Ciencias, through the Verano de Investigación Científica program, for supporting her summer research internship at CICY. LMPR and WE thank the German Academic Exchange Service (DAAD, A/11/00471) and CONACYT-México (exp. No. 160813) for supporting the sabbatical stay of LMPR at TUM. Financial support from the FOMIX-Yucatán Project No. 66262 is also gratefully acknowledged.

4.2.5 REFERENCES

- Di Stefano, V. and Pitonzo, R., 2012. Phytochemical studies on *Ptilostemon greuteri* Raimondo & Domina (Compositae). Records of natural products, 6 (4), 390-393.
- Fotie, J., Bohle, D.S., Leimans, M.L., Georges, E., Rukunga, G., Nkengfack., 2006. Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. Journal of natural products 69, 62-67.
- Furukawa, S., Takagi, N., Ikeda, T., Ono, M., Nafady, A.M., Nohara, T., Sugimoto, H., Doi,
 S., Yamada, H., 2002. Two novel long-chain alkanoic acid esters of lupeol
 fromAlecrim-Propolis. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 50 (3), 439-440.
- Goncalves, L.D., Almeida, H.R., De Oliveira, P.M., Lopes, N.P., Turatti, I.C.C., Archanjo,F.C., Grael, C.F.F., 2011. Contribution for the phytochemical studies of *Ageratumfastigiatum*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 21 (6), 936-942.
- Hodges, L.D., Kweifio-Okai, G., Macrides, T.A., 2003. Antiprotease effect ofanti inflamatorylupeol esters. Molecular and Cellular Biochemistry 252, 97-101.
- Hooper, S.N., Chandler, R.F., Lewis, E., Jamieson, W.D., 1982.Simultaneous determination of Sonchs arvensis L. Triterpenes by Gas Chromatography-MassSpectrometry. Lipids 17 (1), 60-63.
- Lazszczyk M.N., 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupine, oleanane and ursane groups as tools in cancer therapy.Planta Medica 75, 1549-1560.
- Márquez-Hernández, I., Cuesta-Rubio, O., Campo-Fernández, M., Rosado-Pérez, A., Montes de Oca-Porto, R., Piccinelli, A.L., Rastrelli, L., 2010. Studies on the constituents of yellow cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. Journal ofAgricultural and food chemistry, 58, 4725-4730.
- Miranda, R.R.S., Silva, G.D.F., Duarte, L.P., Fortes I.C.P., Vieira-Filho, S.A., 2006. Structural determination of 3 β-sterayloxy-urs-12-ene from *Maytenus salicifolia* by ¹D
and ²D NMR and quantitative ¹³C NMR spectroscopy.Magnetic resonance in chemistry 44,127-131.

- Notario, R., Quijano, J., Quijano, C., Gutiérrez, L.P., Suárez, W.A., Sánchez, C., León, L.A., Chamorro, E., 2002. Teoretical study of the thermolysis reaction of ethyl βhydroxycarboxylates in the gas phase. Journal Physical Chemistry, 106, 4377-4383.
- Oyo-Ita, O.E., Ekpo, B.O., Oros, D.R., Simoneit, B.R.T., 2010.Occurrence and sources of triterpenoid methyl ethers and acetates in sediments of the Cross-River system Southeast Nigeria. International Journal of Analytical Chemistry, Volume 2010, Article ID 502076, 1-8, doi: 10.1155/2010/502076
- Patocka, J., 2003. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicinesignification. Journal of Applied Biomedicine, 1, 7-12.
- Pereira, D.M., Vinholes, J., Guedes de Pino, P., Valentao, P., Mouga, T., Texeira, N., Andrade, P.B., 2012.A gas chromatography-mass spectrometry multi-target method for the simultaneous analysis of three clases of metabolites in marine organisms.Talanta, 100, 391-400.
- Peres-Ferreira, F., Rodriguez de Oliveira, D.C., 2010. New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker. Tetrahedron Letters 51, 6856-6859.
- Quijano, J., Restrepo, I., Gallego, L.H., Yepes, M.S., 1994. Alpha-deuterium isotope effects in the thermolysis of β -hydroxy esters. Tetrahedron Letters, 35, 4735-4738.
- Rajic, A., Kweifio-Okai, G., Macrides, T., Sandseman, R.M., chandler, D.S., Polya, G.M.,
 2000. Inhibition of serine proteases by antiinflamatory triterpenoids. Planta Medica,
 66, 206-210.
- Salatino, A., Weinstein-Teixeira, E., Negri, G., Message, D., 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. eCAM, 2 (1), 33-38.

Saleem, M., Kaur, S., Kweon, M.H., Adhami, V.M., Afag, F., Mukhtar, H., 2005. Lupeol,

afruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreaticadenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. Carcinogenesis 26 (11),1956-1964.

- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J., 2005. Spectrometric identification oforganic compounds, 7th ed.; John Wiley & Sons: New York, p 19.
- Stiti, N. and Hartmann, M.A., 2012. Nonsterol triterpenoids as major constituents of *Olea europaea*. Journal of Lipids, Volume 2012, Article ID 476595, 1-13, doi:10.1155/2012/476595.

Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Kitajima, F.M., Aimi, N.F., 2000. Triterpenoids from Thai medicinal plant, *Willughbeia firma*. Natural Medicine 54, 155-157.

Vilegas, J.H.Y., Lancas, F.M., Vilegas, W., 1997. Further triterpenes, steroids and furanocoumarins from brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). Journal of Brazilian Chemical Society, 8 (5), 529-535. 4.3 ESPECTROSCOPÍA DEL METABOLITO 3-(3'R-HIDROXI)-ESTEARATO DE LUPEOL





123



Figura 4.4 Cromatograma y patrón de fragmentación por CG-EM del 3-(3'*R*-hidroxi)estearato de lupeol, procrim b (1).







Figura 4.6 Espectro parcial de ¹³C RMN del 3-(3'*R*-hidroxi)-estearato de lupeol, procrim b (1).







Figura 4.8 Experimento ¹H-¹H COSY del 3-(3'*R*-hidroxi)-estearato de lupeol, procrim b (1).

Capítulo IV







Figura 4.10 A) Patrón de fragmetación del componente a 9.4 min en el análisis por CG del 3-(3'*R*-hidroxi)-estearato de lupeol, procrim b (1). B) Patrón de fragmentación del hexadecanal (Tomado de la biblioteca NIST).

CAPÍTULO V

BIOSÍNTESIS DEL3-(3'R-HIDROXI)-ESTEARATO DE LUPEOL EN PENTALINON ANDRIEUXII. UN ESTUDIO DE INCORPORACIÓN DE ¹³CO₂⁴

5.1 DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO

Este capítulo describe la importancia de los estudios de incorporación de ¹³CO₂ en la biosíntesis de terpenoides. Este modelo y la aplicación de perfiles isotopológicos en el metabolismo de plantas bajo condiciones fisiológicas, representa un método innovador que puede ser aplicado sin mayores modificaciones en el análisis de rutas biosintéticas y flujos metabólicos en especies vegetales. A continuación se describe la incorporación de ¹³CO₂ en el estudio de la biosíntesis del 3-(3'*R*-hidroxi)-estearato de lupeol. La espectroscopía de ¹³C RMN, INADEQUATE y ADEQUATE mostró un patrón de marcaje con enriquecimientos de ¹³C₂-isotopólogos en las unidades de lupeol, así como en la cadena de hidroxiestearato. Cinco de las seis unidades isoprénicas en el esqueleto del lupeol mostraron patrones de marcaje con $[1,2^{-13}C_2]$ y $[3,5^{-13}C_2]$ para los precursores C5, isopentenil difosfato y dimetilalil difosfato, en tanto que una unidad isoprénica en el anillo E del lupeol experimentó un rearregió y solamente mostró la conectividad $[3,5-^{13}C_2]$ del precursor C5 original. Los análisis CG-MS identificaron ¹³C₃-isotopólogos en alanina derivada de una proteína obtenida del mismo material vegetal. Al no detectarse ¹³C₃isotopólogos en el esqueleto lupano del 3-(3'R-hidroxi)-estearato de lupeol, se puede concluir que la unidad triterpénica deriva completamente de la ruta del mevalonato vía [¹³C₂]-acetil-CoA y no de la ruta del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato vía [¹³C₃]-1-deoxi-Dxilulosa-5-fosfato. Los patrones de marcaje también concuerdan con el mecanismo conocido de la formación de triterpenos con la conformación silla-silla-silla-bote del óxido de (S)-2,3-escualeno donde se muestra que el metileno sp² en el grupo isopropenilo es generado del grupo (Z)-metilo en la unidad de isopropilideno del óxido de escualeno, el cual se origina del grupo metilo del mevalonato. Estos resultados sugieren, que la sintasa

⁴Los resultados de los estudios de la biosíntesis del 3-(3'*R*)-hidroxi-estearato de lupeol se encuentran sometidos para su publicación en el Journal of Organic Chemistry con el título: "Isotopologue profiling of triterpene formation under physiological conditions. Biosynthesis of lupeol-3-(3'*R*-hydroxy)-stearate in *Pentalinon andrieuxii*".

de lupeol de *P. andrieuxii* es del mismo tipo de la de *Olea europea* y *Taraxacum officinale*, pero diferente que el de *Arabidopsis thaliana*.

5.2 ISOTOPOLOGUE PROFILING OF TRITERPENE FORMATION UNDER PHYSIOLOGICAL CONDITIONS. BIOSYNTHESIS OF LUPEOL-3-(3'*R*-HIDROXY)-STEARATE IN *Pentalinon andrieuxii.*

Luis M. Peña-Rodríguez,^{1,2} Alejandro Yam-Puc,² Nihat Knispel,¹ Nicholas Schramek,¹ Claudia Huber,¹ Fabiola G. Ramírez-Torres,² Fabiola Escalante-Erosa,² Karlina García-Sosa,² Manuel J. Chan-Bacab,³ Gregorio Godoy-Hernández,⁴ Adelbert Bacher¹ and Wolfgang Eisenreich^{1*}

Key words: *Pentalinon andrieuxii*; Apocynacea; biosynthesis; ¹³CO₂; triterpene; lupeol; procrim; mevalonate.

5.2.1 ABSTRACT

The biosynthesis of lupeol-3-(3'*R*-hydroxy)-stearate (procrim b, **1**) was investigated by ${}^{13}CO_2$ pulse-chase experiments, under quasi-physiological conditions, in the Mexican medicinal plant *Pentalinon andrieuxii*. One-dimensional and two-dimensional NMR analyses revealed positional enrichments of ${}^{13}C_2$ -isotopologues in both the lupeol and the hydroxystearate moieties of **1**. Five of the six isoprene units reflected a pattern with [1,2- ${}^{13}C_2$]- and [3,5- ${}^{13}C_2$]-isotopologues from the respective C₅-precursors, IPP and DMAPP, whereas one isoprene unit in the ring E of **1** showed only the [3,5- ${}^{13}C_2$]-connectivity of the original C₅-precursor due to rearrangement of the putative dammarenyl cation intermediate during the cyclization process. The presence of ${}^{13}C_2$ -isotopologues was indicative of ${}^{13}C_2$ -acetyl-CoA being the precursor units in the formation of the fatty acid moiety and of the triterpene via the mevalonate route. Significant contributions of the alternative non-mevalonate pathway were ruled by the virtual absence of [${}^{13}C_3$]-isotopolgues.

The observed labeling pattern was also in perfect agreement with a chair-chair-chair-boat conformation of the (S)-2,3-oxidosqualene precursor during the cyclization process, and

showed that the sp²-methylene carbon in the isopropenyl group of lupeol was generated specifically from the (*Z*)-methyl group in the isopropylidene moiety of oxidosqualene, which in turn originated from the methyl group of mevalonate. This suggests that the lupeol synthase from *P. andrieuxii* is of the same type as that from *Olea europea* and *Taraxacum officinale*, but different from that of *Arabidopsis thaliana*. The study shows that ¹³CO₂ pulse-chase experiments are powerful in elucidating, under *in vivo* conditions and in a single experiment, the biosynthesis of complex plant products including higher terpenes.

5.2.2 INTRODUCTION

Terpenoids constitute one of the largest groups of natural products and play important roles all organism.¹ Some terpenoids are essential components of membranes (e.g. hopanoids in prokaryotes and cholesterol in eukaryotes), while others are involved in reactions of energy transformation (e.g. ubiquinone, phytol, and carotenoids) or in the regulation of growth and development (e.g. vitamins A, D, E and K, steroid hormones, phytohormones). However, in spite of their structural diversity, all terpenoids are biosynthesized from the universal C₅ precursors, isopentenyl diphosphate (IPP, **5**, Scheme 5.1) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP, **6**, Scheme 5.1).^{2,3} All C₅ precursors were initially believed to be arise via the mevalonate pathway (Scheme 5.1a)⁴⁻⁷ thatinvolves the condensation of three units of acetyl-CoA (**2**) to produce 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA, **3**), which is reduced to produce mevalonic acid (**4**). Two successive phosphorylation steps and a final decarboxylation/elimination step afford IPP (**5**) which can be interconverted into DMAPP (**6**).

More recently, a mevalonate-independent pathway (MEP pathway) for the biosynthesis of IPP and DMAPP was discovered independently by the groups of Rohmer and Arigoni in some bacteria and plants (Scheme 5.1b).⁸⁻¹⁰ The first step in this pathway is the condensation of a C₂ unit derived from pyruvate (**7**) with glyceraldehyde 3-phosphate (**8**) to produce 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DOXP, **9**). In the second step, DOXP is rearranged and reduced to 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP, **10**), which is converted by several steps into (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphate (HMBPP, **11**) that affords, in the last step of the pathway, a mixture of IPP (**5**) and DMAPP (**6**).¹¹⁻¹⁴ A third pathway that produces **9** from 5-methylthioadenosine, a side-product of S-

adenosylmethionine-dependent polyamine biosynthesis, was reported in *Rhodospirillum rubrum*.¹⁵ however wheter this route plays a more general role in terpene producing organisms including plants is a yet unknown.

It is current knowledge that the MEP pathway is operative in the plastids of plant cells, whereas the mevalonate pathway is active in their cytosolic compartment. It is therefore assumed that plant terpenes biosynthesized in the cytosol (e.g. phytosterols) are formed via the mevalonate pathway, whereas terpenes formed in the plastids (e.g. monoterpenes, diterpenes and carotenoids) are derived from the MEP route.¹³ However, this separation is not absolute, since trafficking of early precursors across the membranes of plastids has been observed.¹⁶⁻²¹





Triterpenoids constitute a structurally diverse group derived from a linear C_{30} precursor (all-trans-2,3-oxidosqualene, **14**, Scheme 5.2)^{22,23} obtained by the head-to-head condensation of two C_{15} units of farnesyldiphosphate (FPP, **12**) to produce squalene (**13**). Oxidosqualene can then be converted via the dammarenyl cation (**15**) into 6-6-6-5 tetracycles (e.g. sitosterol and stigmasterol), 6-6-6-6-5 pentacycles (e.g. lupeol, **16**) or 6-6-6-6-6 pentacycles (e.g. taraxasterol, **17**) (Scheme 5.2).





Lupeol (16) is one of the most abundant triterpene alcohols found in higher plants. Frequently, the 3β-hydroxyl group of 16 is esterified with fatty acids and these derivatives have been reported to lower the cholesterol-induced risks for human health.²⁴⁻²⁷ Moreover, certain lupeol esters appear to exhibit antimalarial activity.^{28,29} 3-Hydroxypalmitate and 3-hydroxystearate esters of lupeol (named procrim a and b, respectively) have been identified from the African plant *Holarrhena floribunda* (Apocynaceae)²⁸ and from a propolis extract thought to be derived from *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae).³⁰ More recently, lupeol-3-(3'*R*-hydroxy)-stearate (procrim b, 1) was also isolated from the stems of the Mexican plant *Pentalinon andrieuxii* Muell-Arg (syn.: *Urechites andrieuxii*; Apocynaceae),³¹ which is known to produce cardenolides, pyrrolizidine alkaloids, trinorsesquiterpenoids, triterpenoids, pregnane sterols, glycosides, and coumarins.35-38 and used in Yucatecan traditional medicine for the traetment of leishmaniasis ("chiclero's ulcer").³²⁻³⁴

Whereas the biosynthetic steps in the formation of triterpenes are well known on the basis of pioneering studies by Ruzicka, Eschenmoser, Arigoni and their coworkers,²³ the origin of the basic building units IPP and DMAPP in triterpenes is still unknown. Although the literature gives the impression of cytoplasm-based mevalonate origin of plant triterpenes, experimental evidence is scare and essentially limited to reports that phytosterols are made predominantly via the mevalonate route, albeit with contributions from the non-mevalonate pathway.^{16,17}

Lupeol (16) originates from the chair-chair-chair-boat conformation of (S)-2,3oxidosqualene (14) via the dammarenyl cation (15, Scheme 5.3). Expansion of ring D (via migration of C-16) to generate the E ring and a subsequent trans-D/E ring junction (via attack at C-18 from the β -side) generates the lupyl cation (18) which, after deprotonation, affords 16.²³ It has been reported that this last step occurs stereospecifically, under catalysis by the lupeol synthases of *Olea europea* and *Taraxacum officinale*, with the sp²methylene of the isopropylene group in 16 originating from the Z-methyl group of the isopropylidene moiety of oxidosqualene.³⁹ On the other hand, a lupeol synthase from *Arabidopsis thaliana* can abstract a proton alternatively from the Z- or E-methyl groups in the deprotonation step.⁴⁰ This manuscript reports on the labeling profiles of lupeol-3-(3'*R*-hydroxy)-sterarate (procrim b, 1) from a ¹³CO₂ pulse/chase experiment using *P. andrieuxii* plants grown under quasi physiological conditions. The ¹³C-pattern reveals the origin of the IPP/DMAPP precursors, as well as important details on the cyclizytion process occurring in the biosynthesis of 1.

Scheme 5.3 Biosynthetic origin of lupeol. Bold lines indicate adjacent ¹³C-atom pairs that were contributed via $[1,2-^{13}C_2]$ acetyl-CoA. The blue line and dots indicate a $[^{13}C_2]$ -unit that is disrupted by skeletal rearrangement.



137

5.2.3 RESULTS

In order to elucidate the biosynthetic origin of lupeol-3-(3'*R*-hydroxy)-stearate (procrim b, **1**) (Figure 5.1a), two *P. andrieuxii* plants (grown for 10 months to the size of about 1 m) were exposed to an atmosphere containing 800 ppm ${}^{13}CO_2$ for 5 h. During this pulse period, the plants consumed about 380 mL ${}^{13}CO_2$. Subsequently, the plants were grown for six days under standard greenhouse conditions (i.e. in an atmosphere with natural ${}^{13}CO_2$ abundance of about 1.1 %) (chase period). As an indicator for ${}^{13}C$ -incorporation into biomass, protein-derived alanine was isolated from the stems of the ${}^{13}CO_2$ -treated plants after the chase period and was analyzed as TBDMS-derivative by GC/MS. The amino acid showed a ${}^{13}C$ abundance of 2.4 % (i.e. 1.3 % ${}^{13}C$ -excess over the natural ${}^{13}C$ -abundance of 1.1 %) (Fig. 5.5). Moreover, more than 30% of the excess ${}^{13}C$ was present as [U- ${}^{13}C_3$] alanine. Obviously, the ${}^{13}CO_2$ pulse had enabled the biosynthetic generation of universally labeled intermediary metabolites such as [U- ${}^{13}C_3$] piruvate, the precursor of [U- ${}^{13}C_3$] alanine.



Figure 5.1 (a) Structure and isoprenoid dissection of lupeol -3-(3'*R*-hydroxy)-stearate (procrim b, 1); isoprene units are indicated by differen colors. (b) Labelling pattern of 1 from the ¹³CO₂ experiment; biosynthetically contributed ¹³C atom pairs are indicated by green lines.

Capítulo V

With this positive finding in mind, procrim b (1) was isolated from stems of labeled *P*. andrieuxii in a yield of approximately 0.5 mg per g of dry weight. The total amount of purified 1 was about 20 mg. The GC/MS analysis of lupeol acetate, which was formed from 1 as a consequence of the high injector temperature,³¹ revealed a low but significant ¹³C-excess of about. 0.4 %). This ¹³C-enrichment is well in line with expectations for downstream metabolites obtained from pulse-chase experiments with short pulses of ¹³CO₂ (i.e. 5 h) since the newly formed material is harvested together with natural abundance material that had already been present at the start of pulse-chase experiment. The detected isotopomer distribution of ¹³C labeled lupeol acetate showed major fractions of the single-labeled and the double labeled isotopologues (as reflected by excessive M+1 and M+2 peaks), but also minor contributions of isotopologues with more than two ¹³Catoms (Fig. 5.5), resulting from statistical combination of ¹³C-labelled building units in the biosynthetic process of the large molecule.

The isotopologue distribution observed in the MS analysis is not sufficient to provide the positional labeling information that is requerid for the deconvolution of the biosynthetic labeling pattern. Quantitative NMR analysis is much better suited than MS to obtain this required information. For optimum sensitivity and resolution, we used a cryo-cooled NMR probe with an inner ¹³C-coil.

The ¹H- and ¹³C-NMR signals of procrim b (1) were assigned unequivocally by own COSY, HSQC and HMBC spectroscopy (Table 5.1).³¹ The ¹³C-coupled satellites in the ¹H NMR spectrum of **1** displayed a ¹³C-abundance of approximately 1.5 %,, in full agreement with the GC/MS-analysis described above. Despite the low ¹³C incorporation, most of the signals in the ¹³C NMR spectrum of **1** showed sharp satellite pairs due to ¹³C-¹³C couplings (Table 5.1, Fig. 5.2), indicating the presence of [¹³C₂]- isotopologues carrying pairs of adjacent ¹³C-atoms). Taking into account that satellites due to ¹³C in natural abundance materials display intensities of about 1 % relative to the overall signal intensity of a given carbon, coupling pairs with 15 % and higher relative intensities could be clearly assigned to isotopologues originating from the pool of multiply ¹³C-labelled precursor units due to the ¹³CO₂ labeling. The less intense satellites (up to 5 % relative intensities) must be assigned to stochastic occurrence multiple ¹³C-atoms due to natural ¹³C abundance and/or single molecules made from more than one ¹³C-enriched precursor unit (Table 5.1). While

the first set of couplings was highly informative for the analysis of the biosynthetic pathway (see below), the second set is not relevant for the biosynthetic problem under study.

| Table 5.1 | ¹ H NMR | and 13 | C NMR | data d | of lupeol- | 3-(3'R-h | ydroxy) | -stearate | (procrim | b) (1) | from | 13CO2 |
|-----------|--------------------|--------|-------|--------|------------|----------|---------|-----------|----------|--------|------|-------|
| experimen | t. | | | | | | | | | | | |

| Carbon | ¹³ C (ð) [ppm] | (ð) H' [mqq] | Jec [Hz] | % Signal intensity of ¹³ C ¹³ C-coupled | Correlations observed | | |
|--------|------------------------------|------------------------------|-------------|--|-----------------------|----------|--|
| | | | | satellites | INADEQUATE | ADEQUATE | |
| 1 | 38.14 | 1.66 (m) | | 4.2% | | | |
| 2 | 23.88 | 1.61(m) | 36.9 | 18.0% | 3 | 3 | |
| 3 | 81.57 | 4.53 (dd, J= 5.4, 13.0) | 37.0 | 17.5% | 2 | 2 | |
| 4 | 37.93 | | 35.5 | 14.2% | 24 | 24 | |
| 5 | 55.49 | 0.79 (m) | 34.5 | 16.7% | 6 | 6 | |
| 6 | 18.32 | 1.49 (m) | 35.1 | 17.9% | 5 | 5 | |
| 7 | 34.30 | 1.38 (m) | | 7.7% | | | |
| 8 | 40.96 | | 36.6 | 17.5% | 26 | 26 | |
| 9 | 50.44 | 1.29 (m) | 34.3 | 18.0% | 11 | 11 | |
| 10 | 37.20 | | 35.4 | 16.2% | 25 | | |
| 11 | 21.07 | 1.41 (m) | 34.5 | 17.8% | 9 | 9 | |
| 12 | 25.19 | 1.67 (m) | 33.8 | 18.2% | 13 | | |
| 13 | 38.46 | 0.97 (m) | 33.8 | 17.9% | 12 | | |
| 14 | 42.95 | Same and | 37.4 | 13.9% | 27 | 27 | |
| 15 | 27.55 | 1.67 (m) | | 6.6% | | | |
| 16 | 35.69 | 1.43 (m) | | 6.0% | | | |
| 17 | 43.12 | | 35.5 | 14.5% | 28 | 28 | |
| 18 | 48.39 | 1.35 (m) | 32.9 | 5.9% | and the second | | |
| 19 | 48.13 | 2.36 (m) | 31.9 | 11.4% | 21 | | |
| 20 | 151.09 | | 72.4 | 13.7% | 29 | | |
| 21 | 29.55 | 1.24 (m) | 31.7 | nd | 19 | | |
| 22 | 40.12 | 2.40 (m) | 33.7 | 5.1% | | | |
| 23 | 28.16 | 0.84 (s) | 35.8 | 2.6% | | | |
| 24 | 16.30 | 0.83 (s) | 35.5 | 17.2% | 4 | | |
| 25 | 16.30 | 0.84 (s) | 35.7 | 16.4% | 10 | | |
| 26 | 16.10 | 1.02 (s) | 36.7 | 17.2% | 8 | | |
| 27 | 14.65 | 0.93 (s) | 37.4 | 17.0% | 14 | | |
| 28 | 18.13 | 0.78 (s) | 35.2 | 16.2% | 17 | | |
| 29 | 109.5 | 29a 4.56 (s) 29b 4.68 (s) | 72.1 | 16.1% | 20 | | |
| 30 | 19.42 | 1.64 (s) | | <5% | | | |
| 1' | 173.05 | | 57.2 | 15.3% | 2' | 2 | |
| 2' | 41.72 | 2.50 (d, J= 12.96) | 57.3 | 16.3% | 1' | | |
| 3' | 68.33 | 3.98 (s) | 39.0 | 16.7% | 4 | 4 | |
| 4' | 36.69 | 1.51 (m) | 39.0 | 14.1% | 3. | 3 | |
| 5' | 25.61 | 1.43 (m) | 34.5 | 14.1% | nd | 6 | |
| 6' | 29.42 | 1.24 (m) | nd | nd | nd | 5 | |
| 7'-16' | 29.0 | 1.24 (m) | nd | nd | nd | | |
| 17° | 22.85 | 1.24 (m) | 34.5 | 14.8% | 18' | 18' | |
| 18' | 14.29 | 0.87 (m) | 34.6 | 15.4% | 17' | 17 | |



Figure 5.2 ¹³C-NMR signals of 1 from the ¹³CO₂ experiment. Satellite pairs due to ¹³C-¹³C couplings are indicated.

The positional assignments of the ${}^{13}C_2$ -pairs could now be established following a careful analysis of the coupling constants and two-dimensional INADEQUATE and ADEQUATE experiments (Table 5.1, Figs. 5.2 and 5.3). INADEQUATE spectroscopy enables the assignments of ${}^{13}C$ NMR signals by sorting ${}^{13}C$ -chemical shifts of carbons (displayed in the Fig. 5.2 dimension of the two-dimensional matrix) involved in ${}^{13}C_2$ -pairs at their respective double quantum coherences (displayed in the F1 dimension). In practical terms, INADEQUATE spectra display horizontal signal pairs of [${}^{13}C_2$]-isotopologues in F1 (Fig. 5.3). The detected signal pairs indicate [${}^{13}C_2$]-labelled precursor units that were specifically incorporated into 1 during the biosynthetic process (Fig. 5.3). Fourteen signal pairs could be clearly observed in the INADEQUATE spectrum of ${}^{13}C_2$ -pairs is indicated as bold green bars in the structure of 1 (Fig. 5.3).



Figure 5.3 INADEQUATE spectrum of **1** from the ¹³CO₂ experiment. The bottom part displays an expended view of the region boxed in blue in the overall spectrum. Observed correlations are indicated by bold lines and arrows in the structure.

The assignments of ¹³C₂-pairs were further substantiated by 1,1-ADEQUATE experiments (Fig. 5.4) based on magnetization transfer via one-bond ¹³C-¹³C couplings in the [¹³C₂]-pairs and a subsequent transfer of magnetization to a proton attached to one of the carbons in the [¹³C₂]-pair. Again, due to the specific labelling pattern in the [¹³CO₂]-labeled sample, only a few (but highly significant) correlations were observed in the ADEQUATE experiment. As shown in Table 5.1 and in Figure 4, the 1,1-ADEQUATE experiment displayed signals due to the following transfer paths: ¹³C-2 \rightarrow ¹³C-3 \rightarrow H-3, ¹³C-3 \rightarrow ¹³C-2 \rightarrow H-2, ¹³C-6 \rightarrow ¹³C-5 \rightarrow H-5, ¹³C-9 \rightarrow ¹³C-11 \rightarrow H-11, ¹³C-11 \rightarrow ¹³C-9 \rightarrow H-9, ¹³C-24 \rightarrow ¹³C-4 \rightarrow H-4, ¹³C-26 \rightarrow ¹³C-8 \rightarrow H-8, ¹³C-27 \rightarrow ¹³C-14 \rightarrow H-14, ¹³C-2' \rightarrow ¹³C-1' \rightarrow H-1', ¹³C-3' \rightarrow ¹³C-18' \rightarrow ¹³C-18' \rightarrow ¹³C-17' \rightarrow H-17'.



Figure 5.4 1,1-ADEQUATE spectrum of 1 from the ¹³CO₂ experiment. Observed correlations are indicated by bold lines and arrows in the structure.

In summary, eleven pairs of ${}^{13}C_2$ -isotopologues were detected in the lupeol moiety of **1**, whereas three [${}^{13}C_2$]-pairs could be observed for the 3'-hydroxystearate moiety (Fig. 5.1b). As expected, several signals for CH₂-groups in the long chain of the fatty acid moiety could not be discriminated due to signal overlap of similar carbons.

5.2.4 DISCUSSION

Tracer studies using potential precursors labeled with radioactive or stable isotopes are among the most important methods for elucidating the biosynthetic pathways and mechanisms leading to natural products. To study biosynthesis in plants, specific or more general tracers, such as [U-¹³C₆]glucose, are typically supplied to plant tissue (e.g. plant cell cultures or cut plant segments) and the transfer of the labeled precursors into the products are used to reconstruct the pathways and mechanisms by considering the position and distribution of the label.⁴¹ Although our current knowledge about natural product biosynthesis in plants is predominantly based on these studies, one should keep in mind that most of these studies were carried out under laboratory conditions and, in comparison to the pathways in whole plants, data from these experiments can be artifactual due to non-natural metabolic reactions triggered by the cellular system under study, the non-natural environment, or the use of non-physiological tracers.

The use of ¹³CO₂ to generate labeled precursors by incorporating the one-carbon compound into whole plants represents a welcome option when studying metabolic pathways in plants since, in this case, the experimental setup emulates physiological growth conditions.⁴² The supply of ¹³CO₂ can result in the photosynthetic generation of completely ¹³C-labeled metabolic intermediates (e.g. triose phosphates, pentose phosphates and derivatives thereof) during an incubation period under an atmosphere containing ¹³CO₂ (pulse period for several hours). In the present study, this is demonstrated by the formation of [U-¹³C₃] alanine derived from [U-¹³C₃]pyruvate via [U-¹³C₃]triose phosphate generated by the Calvin cycle. The labeling pulse is followed by a chase period in which the plants are allowed to grow under normal conditions (i.e. in an atmosphere with natural ¹²CO₂ atmosphere) for several days. During the chase period, unlabeled photosynthetic intermediates are generated. As a consequence, a mixture of labeled and unlabeled precursors is then shuffled into the various biosynthetic processes to generate complex mixtures of [¹²C]- and [¹³C]-isotopologues in the final natural products. The concept of biosynthetic ¹³CO₂ labeling goes back to the pioneering studies of Schäfer

and Hutchinson during the 1970's.^{43,44} However, only recently, and owing to the tremendous progress made in NMR and mass spectrometry, the analysis of complex isotopologue mixtures in ¹³CO₂-labelled natural products became possible and their biosynthetic origins could be studied in considerably detail.^{21, 45-48}

The crucial prerequisite in ${}^{13}CO_2$ pulse-chase experiments aimed at the elucidation of terpene biosynthesis is the generation of $[U-{}^{13}C_2]$ acetyl-CoA, $[U-{}^{13}C_3]$ triose phosphate, and $[U-{}^{13}C_3]$ pyruvate, to serve as potential building blocks of IPP and DMAPP. Labeling patterns of these precursor could then be imprinted on the labeling patterns down stream terpenes via either the mevalonate pathway (i.e. reflecting the patterns due to $[U-{}^{13}C_2]$ acetyl-CoA) or the MEP pathway (i.e. reflecting the patterns from $[U-{}^{13}C_3]$ glyceraldehyde phosphate and $[U-{}^{13}C_3]$ pyruvate).

The labeling pattern of the 3-hydroxystearate moiety in **1** provides direct experimental proof for the formation of $[U^{-13}C_2]$ acetyl-CoA during the pulse period. At the same time, similarly, the formation of $[U^{-13}C_3]$ glyceraldehydes phosphate and $[U^{-13}C_3]$ piruvate during the pulse period can be gleaned from the formation of $[U^{-13}C_3]$ alanine.

The experimentally observed patterns of potential early precursors can now be used to predict the hypothetical labeling profiles of **1** when produced either via the mevalonate or the MEP pathways (Scheme 5.4). Via the mevalonate pathway, three molecules of ${}^{13}C_{2^{-1}}$ acetyl-CoA would result in [1,2- ${}^{13}C_{2}$]-, [3,5- ${}^{13}C_{2}$]-, and [4- ${}^{13}C_{1}$]-labeled mevalonate, which in turn will be converted into [1,2- ${}^{13}C_{2}$]-, [3,5- ${}^{13}C_{2}$]-, and [4- ${}^{13}C_{1}$]-IPP/DMAPP (Scheme 5.4a). Alternatively, via the MEP pathway, the C₅-precursors would display [3,5- ${}^{13}C_{2}$]- and [1,2,4- ${}^{13}C_{3}$]-signature via [U- ${}^{13}C_{3}$]pyruvate precursor (with loss of 1 ${}^{13}C$ -atom during the formation of [1,2- ${}^{13}C_{2}$]-1-deoxyxylulose 5-phosphate) and [U- ${}^{13}C_{3}$]glyceraldehyde phosphate, respectively, as shown in Scheme 5.4b.



Scheme 5. 4 Differential labeling of lupeol when formed via the MVA (a) and MEP (b) pathways.

Comparison of the experimentally determined isotopologue mixture of 1 (cf. Fig. 5.1b) leaves no doubt that the incorporation of the six isoprene units follows the patterh shown in Scheme 5.4a. Since one isoprenoid unit is fragmented by the skeletal rearrangement affording **16** (cf. Scheme 5.3), only five of six isoprene units retained their full carbon connectivities when forming the lupeol skeleton; this can be explained by the breakage of a carbon-carbon bond (connecting two ¹³C-atoms in ring D of the dammarenyl cation, **15**) during the ring expansion to form the lupenyl cation (**17**, Scheme 5.3). As a consequence

of this rearrangement, one of the six isoprene units in 1 displayed only one ¹³C₂connectivity, i.e. that between ¹³C-17 and ¹³C-28, since the carbons of the second ¹³C-pair (¹³C-16 and ¹³C-18, indicated by blue dots in Scheme 5.3) become separated during the rearrangement. As shown in Scheme 5.4, the detected labeling pattern in ¹³CO₂-labelled 1 (Fig. 5.1b) perfectly matched the one predicted for the IPP and DMAPP units derived from mevalonate and via known mechanism of lupeol formation from a 2,3-oxidosqualene precursors (Schemes 5.3 and 5.4a). On the other hand, if lupeol had been assembled from DMAPP and IPP originating from the non-mevalonate pathway, it would have carried six ¹³C₃-isotopologues, namely [2,3,23-¹³C₃], [1,5,6-¹³C₃], [9,11,26-¹³C₃], [12,13,27-¹³C₃], $[16,18,22^{-13}C_3]$ and $[9,21,30^{-13}C_3]$, which would have been easily detected by the presence of long range (via two or three bonds) ¹³C-¹³C couplings in the ¹³C-NMR spectrum of 1. Since no spectroscopic evidence could be observed for these species, we can conclude that the MEP pathway did not contribute significantly (i.e. > 5 % estimated on the basis of the NMR detection limits) to the formation of the lupeol moiety in 1. This result is in agreement with the results from the GC/MS analysis of the lupeol acetate derived from 1. which shows that no more than 10 % of the labeled molecules carry three ¹³C-atoms (Fig. 5.5); these molecules are not due to the specific ${}^{13}C_3$ -isotopologues predicted by the MEP route (see above), but reflect a random mixture of ¹³C₃-species due to statistical events of ¹³C-assembly during the experiment.

Finally, the intense ¹³C-¹³C coupling observed between ¹³C-20 and ¹³C-29 with the absence of ¹³C-¹³C coupling between ¹³C-20 and ¹³C-30 (Table 5.1) confirms the fact that the final deprotonation in lupeol formation occurs stereospecifically (Scheme 5.3). This pattern indicates that the sp²-methylene of the isopropylene group in **1** originates exclusively from the Z-methyl group of the isopropylidene moiety in oxidosqualene precursor (Scheme 5.3), and suggests that the lupeol synthase of *Pentalinon andrieuxii* is similar to that of *Olea europea* and *Taraxacum officinale*,³⁹ but not to that of *Arabidopsis thaliana*, where the deprotonation step is reported to involve both methyl groups of the original C30-precursor.⁴⁰

5.2.5 EXPERIMENTAL PROCEDURES

5.2.5.1 ¹³CO₂ labelling

Two plants of *Pentalinon andrieuxii* (ten months-old, each about 1 m in height) were placed into a closed gas incubation chamber (modified Advance Optima Biobox AO2000, GWS, Berlin, Germany) and illuminated with white light (20,000 lux). The temperature was adjusted to 25 °C and the humidity was kept at about 60 % during the whole experiment. To remove unlabelled CO₂, the chamber was flushed with synthetic air (Westfalen AG, Münster, Germany) containing only oxygen (20.5 vol. %) and nitrogen (79.5 vol. %). Then, ¹³CO₂ gas (99.9 % ¹³C-enrichment; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was introduced and adjusted during the pulse period to a level of 800 ppm. The concentration of ¹³CO₂ was registered and controlled during the whole period of 5 hours within the chamber. Subsequently the plants were allowed to grow under standard greenhouse conditions at ambient temperature for six days (chase period). The plants were separated into leaves, stems and roots, cut in small pieces, frozen with liquid nitrogen, and lyophilized.

5.2.5.2 Extraction of plant material and isolation of lupeol-3-(3'*R*-hydroxy)stearate (1)

The dry-ground stems of two *P. andrieuxii* plants (47 g) were extracted four times with distilled methanol (1 L, 72 h) at room temperature. The extracts were combined and the solvent was removed under reduced pressure to produce 11 g of crude methanolic extract. Refluxing of the crude methanolic extract twice with CH_2CI_2 (600 mL, 1 h) yielded 1.4 g of a CH_2CI_2 -soluble fraction, which was initially fractionated by vacuum liquid chromatography (5 cm diameter) using a gradient elution with mixtures of $Hx/CH_2CI_2/An$ to produce nine major fractions (A-I). Successive open column chromatography (1 x 40 cm) purifications of combined fractions A and B (217 mg), eluting with $Hx/CH_2CI_2/An$ (110:10:5; v/v) and Hx/Et_2O (95:5; v/v) resulted in the isolation of **1** (20 mg) in pure form.

5.2.5.3 Isolation and CG/MS analysis of alanine

A sample (5 mg) of the methanol-extracted residue was suspended in 0.5 ml of 6 M HCl and incubated for 24 h at 105°C. After removal of the HCl using a flow of dry nitrogen gas,

200 µl of glacial acetic acid were added to the dried sample. The hydrolyzate was transferred to a Dowex 50WX8 column (H⁺ form: 200 to 400 mesh: 0.5 x 1 cm). The column was washed twice with water and eluted with 1 ml of 4 M ammonium hydroxide. An aliquot of the eluate was dried under a flow of nitrogen gas and the residue was dissolved in 50 µl of dry acetonitrile. A total of 50 µl of N-(tert-butyldimethylsilyl)-Nmethyltrifluoracetamide containing 1% N-(tert-butyldimethylsilylchloride (TBDMS: Sigma-Aldrich) were added and the mixture was kept at 70°C for 30 min. The resulting TBDMSalanine was subjected to GC/MS analysis. GC/MS was performed on a GC-QP 2010 plus (Shimadzu, Duisburg, Germany) equipped with a fused silica capillary column (equity TM-5; 30m by 0.25mm,0.25-µmfilm thickness; Supelco, Bellafonte, PA). The mass detector worked in the electron ionization (EI) mode at 70 eV. An aliguot of the solution was injected in split mode (1:10) at an injector and interface temperature of 260°C. The column was kept at 150°C for 3 min and then the temperature was increased with a gradient of 7°C/min to a final temperature of 280°C. The sample was analyzed three times in SIM mode using the alanine-TBDMS fragment after the loss of one tert-butyl group as a reference?. Data were collected with LabSolution software (Shimadzu, Duisburg, Germany). The overall ¹³C excess values and the isotopologue compositions were calculated by an Excel-based in-house software package according to Lee et al.⁵⁷

5.2.5.4 CG/MS analysis of lupeol-3-(3'R-hidroxy)-stearate (procrim b, 1)

The same GC/MS conditions described above, with the exception of the temperature program, were used for the analysis of **1**. The temperature program used included keeping the temperature of the column at 200°C for 3 min, heating with a gradient of 10°C/min to a final temperature of 280°C?, which was kept for 30 min.. Lupeol acetate, which forms through a thermically-induced rearrangement in the injector, eluted after 28.1 min. For SIM measurement, the molecular mass signal of lupeol acetate (m/z, 468) was used. ¹³C-enrichment and isotopologue patterns were calculated as described above.

5.2.5.5 NMR analysis of lupeol-3-(3'R-hidroxy)-stearate (procrim b, 1)

¹³C NMR spectra were measured with a Bruker Avance III 500 system equipped with a cryo probe (5 mm CPQNP, ¹H/¹³C/³¹P/ ¹⁹F/²⁹Si; Z-gradient). ¹H NMR spectra were registered with an Avance I 500 system and an inverse probe head (5 mm SEI, ¹H/¹³C; Z-

gradient). The temperature was 300 K. Data processing and analysis was done with the TOPSPIN 2.3 program (Bruker). The one-dimensional ¹³C NMR spectra as well as the one- and two-dimensional INADEQUATE and 1,1-ADEQUATE spectra were measured with standard Bruker parameter sets. ¹³C abundances were determined via the ¹³C-coupled satellites in ¹H NMR spectra. Multiple-labelled isotopologues displaying ¹³C¹³C-couplings were quantified from the corresponding satellite signals in the ¹³C NMR spectra. The integral of each respective satellite pair was referenced to the total signal integrals of given carbon atoms (% ¹³C-¹³C in Table 1).

5.2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Ivonne Jüttner for growing the plants of *P. andrieuxii*. We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (EI 384/8-1) for generous sponsoring of this research work. A. Y.-P. wishes to thank CONACYT and CICY for their support to carry out a research training stay at TUM. F. R.-T. wishes to thank Academia Mexicana de Ciencias, through the Verano de Investigación Científica program, for supporting her summer research internship at CICY. LMPR and WE thank the German Academic Exchange Service (DAAD, A/11/00471) and CONACYT-México (exp. No. 160813) for supporting the sabbatical stay of LMPR at TUM. Financial support from the FOMIX-Yucatán Project No. 66262 and the Hans-Fischer Gesellschaft (Munich) is also gratefully acknowledged.

5.2.7 REFERENCES

(1) Sacchettini, J. C.; Poulter, C. D. *Science (Washington, D. C.)***1997**, 277, 1788.

(2) Ruzicka, L. *Experientia* **1953**, *9*, 357.

(3) McGarvey, D. J.; Croteau, R. *Plant Cell* **1995**, *7*, 1015.

(4) W., Q. N. a. P. J. Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentyl pyrophosphate; John Wiley: New York, 1981; Vol. 1.

(5) Bloch, K. Steroids 1992, 57, 378.

(6) Bach, T. J. *Lipids* **1995**, *30*, 191.

(7) Bochar, D. A.; Friesen, J. A.; Stauffacher, C. V.; Rodwell, V. W.; Elsevier Science B.V.: 1999; Vol. 2, p 15.

(8) Schwender, J.; Seemann, M.; Lichtenthaler, H. K.; Rohmer, M. *Biochem. J.* **1996**, *316*, 73.

(9) Schwarz, M. K. PhD Thesis, ETH Zurich, Switzerland, 1994.

(10) Broers, S. T. J. PhD Thesis, ETH Zurich, Switzerland, 1994.

(11) Nagegowda, D. A. FEBS Letters 2010, 584, 2965.

(12) Grawert, T.; Groll, M.; Rohdich, F.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *Cell Mol Life Sci* **2011**, *68*, 3797.

(13) Vranova, E.; Coman, D.; Gruissem, W. Mol. Plant 2012, 5, 318.

(14) Chang, W.-c.; Song, H.; Liu, H.-w.; Liu, P. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013, *17*, 571.

(15) Erb, T. J.; Evans, B. S.; Cho, K.; Warlick, B. P.; Sriram, J.; Wood, B. M.; Imker, H. J.; Sweedler, J. V.; Tabita, F. R.; Gerlt, J. A. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 926.

(16) Arigoni, D.; Sagner, S.; Latzel, C.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 10600.

(17) Hemmerlin, A.; Hoeffler, J.-F.; Meyer, O.; Tritsch, D.; Kagan, I. A.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M.; Bach, T. J. J. Biol. Chem. **2003**, *278*, 26666.

(18) Hemmerlin, A.; Harwood, J. L.; Bach, T. J. Prog. Lipid Res. 2012, 51, 95.

(19) Aharoni, A.; Jongsma, M. A.; Bouwmeester, H. J. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, 594.

(20) Fluegge, U. I.; Gao, W. Plant Biol. (Stuttgart, Ger.) 2005, 7, 91.

(21) Schramek, N.; Wang, H.; Roemisch-Margl, W.; Keil, B.; Radykewicz, T.; Winzenhoerlein, B.; Beerhues, L.; Bacher, A.; Rohdich, F.; Gershenzon, J.; Liu, B.;

Eisenreich, W. Phytochemistry (Elsevier) 2010, 71, 179.

(22) Hill, R. A.; Connolly, J. D. Nat. Prod. Rep. 2013, 30, 1028.

(23) Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. T. *Phytochemistry (Elsevier)* 2004, 65, 261.

(24) Rudkowska, I.; AbuMweis, S. S.; Nicolle, C.; Jones, P. J. H. *J. Am. Coll. Nutr.* **2008**, *27*, 588.

(25) Rudkowska, I.; AbuMweis, S. S.; Nicolle, C.; Jones, P. J. H. *Appl. Physiol.*, *Nutr., Metab.* **2008**, *33*, 728.

(26) Vissers, M. N.; Zock, P. L.; Meijer, G. W.; Katan, M. B. *Am. J. Clin. Nutr.*2000, 72, 1510.

(27) Sudhahar, V.; Kumar, S. A.; Varalakshmi, P. Life Sci. 2006, 78, 1329.

(28) Fotie, J.; Bohle, D. S.; Leimanis, M. L.; Georges, E.; Rukunga, G.; Nkengfack, A. E. *J. Nat. Prod.* **2006**, *6*9, 62.

(29) Kumar, S.; Misra, N.; Raj, K.; Srivastava, K.; Puri, S. K. Nat. Prod. Res.2008, 22, 305.

(30) Furukawa, S.; Takagi, N.; Ikeda, T.; Ono, M.; Nafady, A. M.; Nohara, T.; Sugimoto, H.; Doi, S.; Yamada, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 439.

Yam-Puc, A.; Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Ramírez-Torres, F. G.;
 Chan-Bacab, M. J.; Eisenreich, W.; Huber, C.; Knispel, N.; Godoy-Hernández, G.;
 Peña-Rodríguez, L. M. *Phytochemistry Letters* 2013, *6*, 649.

(32) Argüeta, A., Cano, L., Rodarte, M. Instituto Nacional Indigenista, México 1994, 2, 204.

(33) Chan-Bacab, M. J.; Balanza, E.; Deharo, E.; Munoz, V.; Garcia, R. D.; Pena-Rodriguez, L. M. *J Ethnopharmacol* **2003**, *86*, 243.

(34) Lezama-Davila, C. M.; Isaac-Marquez, A. P.; Zamora-Crescencio, P.; Uc-Encalada, M. d. R.; Justiniano-Apolinar, S. Y.; del, A.-R. L.; Satoskar, A.; Hernandez-Rivero, L. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 255.

(35) Yam-Puc, A.; Escalante-Erosa, F.; Pech-Lopez, M.; Chan-Bacab, M. J.; Arunachalampillai, A.; Wendt, O. F.; Sterner, O.; Pena-Rodriguez, L. M. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 745.

(36) Yam-Puc, A.; Chee-Gonzalez, L.; Escalante-Erosa, F.; Arunachalampillai,
A.; Wendt, O. F.; Sterner, O.; Godoy-Hernandez, G.; Pena-Rodriguez, L. M. *Phytochem. Lett.* 2012, 5, 45.

(37) Dominguez-Carmona, D. B.; Escalante-Erosa, F.; Garcia-Sosa, K.; Ruiz-

Pinell, G.; Gutierrez-Yapu, D.; Chan-Bacab, M. J.; Gimenez-Turba, A.; Peña-Rodriguez, L. M. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 379.

(38) Pan, L.; Lezama-Davila, C. M.; Isaac-Marquez, A. P.; Calomeni, E. P.;
Fuchs, J. R.; Satoskar, A. R.; Kinghorn, A. D. *Phytochemistry (Elsevier)* 2012, *82*, 128.

(39) Shibuya, M.; Zhang, H.; Endo, A.; Shishikura, K.; Kushiro, T.; Ebizuka, Y. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *266*, 302.

(40) Herrera, J. B. R.; Bartel, B.; Wilson, W. K.; Matsuda, S. P. T. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1905.

(41) Eisenreich, W.; Bacher, A. *Phytochemistry (Elsevier)* **2007**, *68*, 2799.

(42) Eisenreich, W.; Huber, C.; Kutzner, E.; Knispel, N.; Schramek, N.; Wiley-Blackwell: 2013, p 25.

(43) Schaefer, J.; Stejskal, E. O.; Beard, C. F. Plant Physiol. 1975, 55, 1048.

(44) Hutchinson, C. R.; Hsia, M. T. S.; Carver, R. A. J. Am. Chem. Soc. **1976**, 98, 6006.

(45) Roemisch-Margl, W.; Schramek, N.; Radykewicz, T.; Ettenhuber, C.; Eylert,
E.; Huber, C.; Roemisch-Margl, L.; Schwarz, C.; Dobner, M.; Demmel, N.;
Winzenhoerlein, B.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *Phytochemistry (Elsevier)* 2007, 68, 2273.

(46) Knispel, N.; Ostrozhenkova, E.; Schramek, N.; Huber, C.; Pena-Rodriguez,
L. M.; Bonfill, M.; Palazon, J.; Wischmann, G.; Cusido, R. M.; Eisenreich, W. *Molecules* 2013, *18*, 7686.

(47) Precursor strategies for studies of isoprenoid biosynthesis in plants;
 Ostrozhenkova, E., Schramek, N., Winzenhörlein, B., Bacher, A., Eisenreich, W.,
 Ed.; Research Signpost: Trivandrum, 2009.

(48) Ostrozhenkova, E.; Eylert, E.; Schramek, N.; Golan-Goldhirsh, A.; Bacher,A.; Eisenreich, W. *Phytochemistry (Elsevier)* **2007**, *68*, 2816.

(49) Lee, W. N. P.; Byerley, L. O.; Bergner, E. A.; Edmond, J. *Biol. Mass Spectrom.* **1991**, *20*, 451.

5.2.8 INFORMACIÓN ADICIONAL



Figure 5.5 Isotopomer contribution for protein bound alanine and lupeol acetate derived from procrim b measured by GC/MS SIM analysis. Isotopomers are shown from M+1 up to M+10. Higher isotopomers were not detected
CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 DISCUSIÓN GENERAL

Al evaluar diferentes técnicas de CTV's como herramientas para la producción y el estudio del origen biosintético de terpenoides con esqueleto de campechano, urechitoles en *P. andrieuxii*, se detectó la presencia de urechitol A únicamente en hojas de plántulas de *P. andrieuxii* germinadas *in vitro*; el trinorsesquiterpeno no se encontró en raíces normales cultivadas *in vitro* y tampoco se detectó en cultivos de callos de la planta. Tomando en cuenta que la presencia de urechitol A se ha detectado en hojas y raíces de plantas silvestres, estos resultados sugieren que la biosíntesis de urechitol A requiere de una diferenciación celular; y que el urechitol A se produce en las hojas de *P. andrieuxii* y se acumula en la raíz.

Tomando en cuenta que *P. andrieuxii* es una especie susceptible a la transformación genética por parte de *Agrobacterium* spp., se estudió la producción de urechitol A en cultivos de raíces transformadas de *P. andrieuxii*, obtenidos al infectar hojas de la planta con *A. rhizogenes*. Los resultados obtenidos revelaron que el metabolito no se detecta en el material vegetal y que su liberación al medio de cultivo es limitada y observada únicamente en una de las líneas genéticas. Estos resultados, y los discutidos anteriormente, indican que los CTV's de *P. andrieuxii* no representan un buen modelo para el estudio de la biosíntesis de urechitol A.

Una alternativa al uso de CTV's para el estudio de la biosíntesis de los urechitoles está dada por la exposición durante varias horas de plantas enteras de *P. andrieuxii* a una atmósfera de ¹³CO₂, seguida de un cultivo durante varios días en condiciones normales, con el fin de generar intermediarios metabólicos universalmente marcados con ¹³C. En este trabajo, y aun cuando no se logró la detección de urechitol A en el extracto de raíz de plantas expuestas a una atmósfera de ¹³CO₂, se logró el aislamiento de un terpenoide, el 3-(3'*R*-hidroxi)-estearato de lupeol (procrim b), que mostró una incorporación significativa de ¹³C a su estructura y que permitió confirmar su origen biosintético como derivado de la vía del mevalonato (MVA).

Finalmente, es importante mencionar que, aun cuando *P. andrieuxii* pertenece a la familia Apocynaceae, reconocida por su producción de alcaloides, hasta ahora los reportes sobre

la presencia de este tipo de metabolitos en esta especie son escasos, la mayoría de los estudios realizados recientemente reportan únicamente la obtención de terpenoides.

6.2 CONCLUSIONES

Los CTV's de *P. andrieuxii* no representan un modelo adecuado para estudiar la biosíntesis de terpenoides con esqueleto de campechano; sin embargo, la alternativa de exponer plantas completas de *P. andrieuxii* a una atmósfera de ¹³CO₂, con el fin de generar precursores enriquecidos con ¹³C y utilizarlos en estudios de biosíntesis, permitió el establecimiento del origen biosintético del 3-(3'*R*-hidroxi)-estearato de lupeol (procrim b) y representa un modelo importante que puede emplearse para el estudio del origen biosintético del surechitoles.

6.3 PERSPECTIVAS

El establecimiento del origen biosintético del 3-(3'R-hidroxi)-estearato de lupeol (procrim b) usando la incorporación de ¹³CO₂ en plantas completas de *P. andrieuxii*, demuestra la importancia y confirma la utilidad de este modelo en estudios de elucidación de rutas biosintéticas, tanto de metabolitos primarios como secundarios. Sin embargo, la ausencia de urechitol A enriquecido con ¹³C a partir de extractos de plantas de P. andrieuxii tratadas con ¹³CO₂ indica que la producción de este metabolito ocurre bajo condiciones específicas en la planta, por lo que futuros estudios sobre la biosíntesis de este tipo de terpenoides deben considerar los diferentes factores que influyen en la producción de metabolitos secundarios en las plantas, incluyendo factores fisiológicos (estado de desarrollo, órgano vegetal, variaciones estacionales), condiciones ambientales (contaminación y efectos climatológicos, estrés biótico o abiótico, suelo), variaciones geográficas y factores genéticos. Las condiciones de ontogenia y fenología deberán considerarse en futuros estudios sobre el origen biosintético del urechitol A en P. andrieuxii, ya que el conocimiento de estos factores permitirá determinar el momento preciso de la producción de este metabolito y el momento adecuado para llevar a cabo los estudios de incorporación de ¹³CO₂ en las plantas y la incorporación de ¹³C a la estructura del urechitol A. De esta manera se podrá definir si la ruta biosintética que resulta en la formación del esqueleto campechano ocurre a través de la ruta MVA o de la ruta MEP o, si en este caso, ambas rutas contribuyen a la construcción del esqueleto terpenoide. Los perfiles isotopológicos han demostrado ser una herramienta importante para identificar el flujo del carbono en las vías metabólicas en una variedad de organismos, incluyendo las plantas. En un futuro los estudios de los perfiles isotopológicos tendrán más beneficios, al aplicarse al estudio de sistemas biológicos complejos y su interacción con factores bióticos y abióticos del entorno.

ANEXO

INFORMACIÓN BOTÁNICA DE PENTALINON ANDRIEUXII MUELL-ARG

PENTALINON ANDRIEUXII MUELL-ARG

Pentalinon andrieuxii Muell-Arg es una planta trepadora comúnmente conocida como bejuco guaco, cantibteac o contrayerba. Es un bejuco de tamaño variable, usualmente leñoso, con hojas ligeramente anchas, hasta de 12 cm de largo; las inflorescencias son de color amarillo, en forma de trompeta y escasas, y los frutos son alargados, semejando arcos sin flecha. (Argüeta, 1994)



Figura 6.1 Pentalinon andrieuxii

Clasificación Taxonómica

Reino: Vegetal División: Magnaliophyta Clase: Magnaliopsida Subclase: Asteridae Orden: Gentianales Suborden: Apocyninae Familia: Apocynaceae Género: Pentalinon Especie: Pentalinon andrieuxii

Ubicación geográfica

La distribución de *P. andrieuxii* en el continente americano incluye desde Florida, México y las Antillas hasta el norte de Colombia. En la República Mexicana se encuentra en la vertiente del Pacífico desde Michoacán hasta Chiapas y en la vertiente del golfo de México desde Veracruz hasta Yucatán y Quintana Roo. En la península de Yucatán tiene una distribución amplia como parte de la vegetación de selva mediana y alta subperenifolia. (Chan *et al.*, 2003)

Usos y aplicaciones

Pentalinon andrieuxii es utilizada en la medicina tradicional de la península de Yucatán, la cual recomienda masticar la raíz o las hojas frescas y aplicarlas a manera de cataplasma contra la mordedura de serpientes. Asimismo el látex de la planta se utiliza para aliviar el dolor de cabeza y los disturbios nerviosos. (Pulido, 1993)

Sin embargo, la principal aplicación de *P. andrieuxii* es en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea localizada; la medicina tradicional recomienda el uso de una infusión de las raíces frescas para lavar la lesión y la utilización de raíz seca pulverizada para aplicar sobre la lesión después del lavado (Chan *et al.*, 2003). Hasta la fecha sólo se han realizado dos estudios para detectar actividad biológica en *P. andrieuxii*. En uno de estos estudios se determinó actividad sedante y antiinflamatoria en el extracto de la raíz y en el otro estudio se detectó actividad tóxica del extracto de la raíz contra promastigotes de *Leishmania mexicana*, sugiriéndose que los productos responsables de la actividad leishmanicida son de polaridad media con características ácidas (Chan *et al.*, 2003).

REFERENCIAS

- Argüeta, A., Cano, L., Rodarte, M. (1994) Atlas de la medicina tradicional mexicana. Vol 2, Instituto Nacional Indigenista, México, p 204
- Chan-Bacab, M.J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., Durán, R., Peña-Rodríguez, L.M., (2003). Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. Journal of Ethnopharmacology, 86, 243-247.
- Pulido, M.T y Serralta, L., (1993). Lista anotada de las plantas medicinales de uso actual en el estado de Quintana Roo, México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo, Chetumal, Quintana Roo, p 6.

Agrobacterium-mediated transient transformation of Pentalinon andrieuxii Müll. Arg.

Alejandro Yam-Puc¹, Elidé Avilés-Berzunza^{1,2}, Manuel J. Chan-Bacab³, Luis Manuel Peña-Rodríguez¹, Gregorio Godoy-Hernández^{1,2*}

¹Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Laboratorio de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, Mérida, México ²Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Mérida, México

³Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universidad Autónoma de Campeche, Campeche, México Email: <u>ggodoy@cicy.mx</u>, <u>alexqbb@cicy.mx</u>, <u>avibeli@cicy.mx</u>, <u>manjchan@mail.uacam.mx</u>, <u>lmanuel@cicy.mx</u>

Received 13 March 2012; revised 20 April 2012; accepted 30 April 2012

ABSTRACT

Sections of hypocotyls, roots and leaves from *Pentalinon andrieuxii* plantlets were transiently transformed with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 bearing the binary plasmid pCAMBIA2301 with an interrupted β -glucuronidase (GUS) gene. Histochemical GUS assays showed transient gene expression in all infected tissues, being older roots those which displayed the most intense GUS staining. To our knowledge, this is the first report of *Pentalinon andrieuxii* susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation.

Keywords: β -Glucuronidase; Agrobacterium tumefaciens; Kanamycin; Apocynaceae

1. INTRODUCTION

Pentalinon andrieuxii Müll. Arg. (Apocynaceae), a plant commonly named "contrayerba" in the Yucatan Peninsula, is used in the treatment of Leishmania's skin lesions ("chiclero's ulcer"). Mayan healers also recommend chewing their roots and leaves to relieve ailments derived from snakebites, and the stem-collected latex to alleviate headaches and nervous disturbances [1,2]. Cardenolides, pyrrolizidine alkaloids, steroidal compounds and betulinic acid derivatives with different physiological activities have been found in *Pentalinon* tissues [3-6]. Furthermore, two physiologically inactive, but structurally unusual trinorsesquiterpenoids, named urechitols A and B have been described in this species. Urechitols include the novel bicyclic *campechane* skeleton, which is formed by two cyclic nuclei of five and seven carbon units, respectively [7]. Although, the synthesis of racemic mixtures of urechitol A was recently reported [8], the biosynthetic origin of urechitols or the campechane

Corresponding author.

skeleton remains unknown. The availability of *in vitro* culture systems of *P. andrieuxii* tissues, including those used for genetic transformation, may allow not only the controlled production of these compounds, but also the development of the basic tools for functional genetics applied to the identification of genes involved in the biosynthetic pathway of urechitols. In here, we report the development of a protocol for the transient transformation of *P. andrieuxii* explants with *Agrobacterium tume-faciens*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material

P. andrieuxii seeds were collected from mature dehiscent siliques in February 2009 from a population located 3.5 km northeast from Campeche City, Mexico (19°51'0"N 90°31'50"W). A voucher specimen was deposited in the Herbarium of Centro de Investigación Científica de Yucatán (P. Sima 2503). Seeds were surface sterilized with 5% Extran and 70% ethanol for 5 min each, followed by immersion in a 50% bleach solution (3% sodium hypochlorite) for 20 min. Disinfested seeds were germinated in modified hormone-free PC-L2 medium [9] pH 5.5, supplemented with 2.5% sucrose and 1% agar. Eight seeds per container were incubated at $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ for two weeks in the dark, and then on, under continuous light (40 - 50 mmol m²·seg⁻¹).

2.2. Agrobacterium tumefaciens Strains and Vectors

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 strain and the binary vector pCAMBIA 2301 (Center for the Applications of Molecular Biology to International Agriculture, Canberra, Australia (<u>http://www.cambia.org/daisy/bioforge</u> <u>legacy/3724.html</u>)) were used in all experiments. The pCAMBIA 2301 plasmid contains the neomycin phosphotransferase II (*nptII*) gene for kanamycin selection, in addition to the *uidA* gene encoding the β -glucuronidase gene (GUS), interrupted by the catalase intron, for the phenotypical selection of transformed tissues. Both genetic markers are driven by the CaMV 35S promotor. The presence of an intron in *uidA* ensures expression in eukaryotic cells. A. tumefaciens was cultured in liquid veast extract and beef (YEB) medium, pH 5.6, containing 100 mg·l⁻¹ rifampicin and streptomycin each (Sigma, St Louis, MO). Cultures were kept in the dark at 28°C for 48 h. Bacteria were made competent with CaCl, and transformed with the plasmid via heat shock [10]. Transformed cells, harboring pCAMBIA 2301, were screened on semisolid YEB media with 100 mg·l⁻¹ rifampicin and streptomycin each, and 50 mg·l⁻¹ kanamycin (YEB-AB), and then, cultured in 10 ml of liquid YEB-AB medium (pH 5.6). Cultures were kept at 28°C for 48 h in a rotatory shaker (200 rpm). A 200-ul aliquot of this suspension was diluted in 10 ml of YEB-AB, and further incubated for 24 h as described. Culture volume was then completed to 20 ml with YEB-AB, and added with 200 µM acetosyrin-gone (AS). This was incubated up to 5 h. prior to tissue inoculation.

2.3. Genetic Transformation

Sections of hypocotyls, roots (10 mm length) and leaves (ca. 0.25 cm²) were excised from 15 day-old plantlets and superficially wounded in a longitudinal manner with a scalpel prior to infection with A. tumefaciens. Explants were vacuum infiltrated with a 20 ml of a 0.1 OD₆₀₀ bacterial suspension in PC-L2 medium for 20 min. Tissues were then blotted with sterile filter paper in order to eliminate the bacterial excess, and placed on semisolid PC-L2 medium for 72 h. After 3 days of cocultivation, at 28°C in the dark, explants were transferred to semisolid PC-L2 medium supplemented with 100 mg·l⁻¹ cefotaxime and 10 mg·l⁻¹ kanamycin for further development. Transient GUS expression was histochemically assayed 3, 6 and 21 days after infection by staining transformed tissues with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-GLUC) [11]. Briefly, 50 explants were vacuum-infiltrated in the buffer solution for 5 min, and thereafter incubated for 24 h at 37°C in the dark [12]. GUS activity was estimated by the number of blue spots per explant after washing them in a 3:1 (v/v) mixture of methanol: acetone. A blue spot was considered as a single transient GUS-expression focus.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Transient Transformation of Pentalinon andrieuxii

After 21 days of infection, transient GUS expression was found in both root and leaf sections (Figure 1). Positive GUS activity could be solely attributed to the expression and correct splicing of the inserted uidA in eukaryotic plant cells. P. andrieuxii does not present endogenous GUS activity as reported for carrot, celery, parsley, rice [13], Ricinus communis [14], Agave fourcroydes [15] and Capsicum chinense [16]. Older roots displayed a higher GUS activity than younger root explants and leaf sections. Interestingly, even when hypocotyls' explants did not show GUS activity during the first 20 days of infection, after a total of 40 days and once tissues had turned into undifferentiated calli, significant activity was observed (Figure 1), Older root tissues (two months) were the most susceptible to infection with a 26% of positive transformation events, followed by leaves (15%) and younger roots (3.3%) (Table 1). Furthermore, older roots also presented the highest foci number per explant in comparison to leaf sections (7.83 vs 3.96).

4. CONCLUSIONS

In conclusion, we have developed the first protocol for transient genetic transformation of P. andrieuxii. At the present time, this method is being used to probe a protocol for its stable genetic transformation, which in combination with the already developed plant regeneration system [17], will allow to assay the functional role of genes putatively involved in secondary metabolism.



Figure 1. Histochemical GUS assay performed on tansformed explants of *Pentalinon andrieuxii* Müll. Arg. Explants tansformed with Pcambia2301 via *Agrobacterium tumefaciens* stain LBA4404.

| Explants | Explant number | Number of GUS positive explants | Infection frequency (%) ¹ | Number of GUS foci/explants ^{2,3} |
|------------|----------------|---------------------------------|--------------------------------------|--|
| Young-root | 450 | 15 | 3.33 | 1.00 (0) ^e |
| Old-root | 300 | 78 | 26.00 | 7.83 (3.5)" |
| Leaf | 360 | 54 | 15.00 | 3.96 (0.6) ^{ab} |
| Hypocotyl | 360 | 0 | 0 | 0 |

Table 1. Infection frequency and number of GUS foci in P. andrieuxii explants.

Histochemical analysis assays were performed on explants twenty one days after inoculation with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404: pCAM-BIA2301. ¹Infection frequency (%) = number of GUS positive explants/ total number of infected explants × 100. ²Number of GUS foci/explants, was the average of GUS positive foci in at least three independent experiments with more of 100 explants each one, with standard deviation in brackets. ³Values with different letters are statiscally different (P = 0.05) according to Tukey's test.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge receiving financial support from the National Council for Science and Technology-Mexico (CONACYT) (Project No. 59695-Z).

REFERENCES

- Chan-Bacab, M.J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., García-Durán, R. and Peña-Rodriguez, L.M. (2003) Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii. Ethnopharmacology*, 86, 243-247. doi:10.1016/S0378-8741(03)00011-4
- [2] Lezama-Dávila, C.M., Isaac-Márquez, A.P., Zamora-Cresencio, P., Uc-Encalada, M.R., Justiniano-Apolinar, S.Y., Angel-Robles, R. del., Satoskar, A. and Hemández-Rivero, L. (2007) Leishmanicidal activity of *Urechites andrieuxii*. *Fitoterapia*, 78, 255-257. doi:10.1016/j.fitote.2006.12.005
- [3] Tillequin, F., Michael, S. and Seguin, I. (1993) Alkaloids and sulphur compounds. Academic Press, San Diego.
- [4] Yam-Puc, A., Chee-González, L., Escalante-Erosa, F., Arunachalampilai, A., Wendt, O.F., Sterner, O., Godoy-Hernández, G. and Peña-Rodríguez, L.M. (2012) Steroids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry Letters*, 5, 45-48. doi:10.1016/j.phytol.2011.09.004
- [5] Domínguez-Carmona, D.B., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Ruíz-Pinelli, G., Gutiérrez-Yapu, D., Chan-Bacab, M.J., Giménez-Turba, A. and Peña-Rodríguez, L.M. (2010) Antiprotozoal activity of *Betulinic acid* derivatives. *Phytomedicine*, 17, 379-382. doi:10.1016/j.phymed.2009.08.002
- [6] Yogeeswari, P. and Sriram, D. (2005) Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 657-666. doi:10.2174/0929867053202214
- [7] Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., Pech-López, M., Chan-Bacab, M.J., Arunachalampilai, A., Wendt, O.F., Sterner, O. and Peña-Rodríguez, L.M. (2009) Trinorsesquiterpenoids from the root extract from *Pentalinon andrieuxii* Muell-Arg. Journal of Natural Products, 72, 745-748. doi:10.1021/np800554n
- [8] Sumiya, T., Ishigami, K. and Watanabe, H. (2010) Stereoselective total synthsis of (±)—Urechitol A. Angewandte

Chemie International Edition, 49, 5527-5528. doi:10.1002/anie.201002505

- [9] Phillips, G.C. and Collins, G.B. (1979) In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus culture of red clover. Crop Science, 19, 59-64. doi:10.2135/cropsci1979.0011183X001900010014x
- [10] Zhang, H.X. and Zeevaart, J.A.D. (1999) An efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach (Spinacia oleracea L.). Plant Cell Reports, 18, 640-645. doi:10.1007/s002990050635
- [11] Jefferson, R. (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5, 387-405. doi:10.1007/BF02667740
- [12] Humara, J.M., López, M. and Ordas, R.J. (2003) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Pinus pinea L. cotyledons: An assessment of factors influencing the efficiency of uidA gen transfer. Plant Cell Report, 19, 51-58. doi:10.1007/s002990050709
- [13] Hu, C.Y., Chee, P.P., Chesney, R.H., Zhou, J.H., Miller, P.D. and O'Brien, W.T. (1990) Intrinsic GUS-like activties in seed plants. *Plant Cell Reports*, 9, 1-5. doi:10.1007/BF00232123
- [14] Rezmer, C., Schlichting, R., Wachter, R. and Ullrich, C.I. (1999) Identification and localization of transformed cells in Agrobacterium tumefaciens-induced plant tumors. *Planta*, 209, 399-405. doi:10.1007/s004250050742
- [15] Godoy-Hernández, G., Avilés-Berzunza, E., Carrillo-Pech M. and Vázquez-Flota, F. (2008) Agrobacterium-mediated transient transformation of Mexican prickly poppy (Argemone mexicana L.). Electronic Journal of Biotechnology, 11, 1-5. http://158.251.16.248/content/vol11/issue1/full/3/3.pdf
- [16] Solís-Ramos, L.Y., González-Estrada, T., Andrade-Torres, A., Godoy-Hernández, G. and Castaño de la Serna, E. (2010) Endogenous GUS-like activity in *Capsicum chinense* Jacq. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13, 1-7. <u>http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/1733/17331638500</u> 2.pdf
- [17] Martin-Acosta, J.C., Avilés-Berzunza, E. and Godoy-Hernández, G. (2012) *In vitro* plant regeneration from explants of *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.). Hansen & Wunderlin, Unpublished.

Phytochemistry Letters 5 (2012) 45-48



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters



journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol

Steroids from the root extract of Pentalinon andrieuxii

Alejandro Yam-Puc^a, Leticia Chee-González^a, Fabiola Escalante-Erosa^a, Athimoolam Arunachalampillai^c, Ola F. Wendt^c, Olov Sterner^c, Gregorio Godoy-Hernández^b, Luis Manuel Peña-Rodríguez^{a,*}

^a Laboratorio de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná, Mérida, Yucatán, México ^b Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná, Mérida, Yucatán, México ^c Centre for Analysis and Synthesis, Department of Chemistry, Lund University, PO Box 124, SE-22100 Lund, Sweden

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2011 Received in revised form 10 August 2011 Accepted 17 September 2011 Available online 29 September 2011

Keywords: Pentalinon andrieuxii Urechites andrieuxii Apocynaceae Pregnanes Steroids Leishmaniasis

ABSTRACT

Two pregnane derivatives (1 and 2) were isolated from the methanolic root extract of *Pentalinon* andrieuxii, a plant used commonly in Yucatecan traditional medicine to treat leishmaniasis. The structures of both metabolites were established using spectroscopic methods and chemical correlation reactions. An X-ray structure of 1 is reported.

© 2011 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The roots and leaves of Pentalinon andrieuxii Muell,-Arg. (Apocynaceae), a climbing plant commonly known as "bejuco guaco", "cantibteac" or "contrayerba", are commonly used in Yucatan traditional medicine to cure the lesions resulting from cutaneous leishmaniasis (Chan-Bacab et al., 2003; Lezama-Davila et al., 2007); the root of the plant is also used to treat snake bites and the latex is recommended to alleviate headaches and nervous disorders (Argüeta et al., 1994; Pulido and Serralta, 1993). Existing phytochemical knowledge on the genus Pentalinon (formerly known as Urechites) is limited, with only two reports, one describing its production of cardenolides and pyrrolizidine alkaloids with antitumor and hepatotoxic activities (Tillequin et al., 1993), and the other describing the isolation and identification of two structurally unusual trinorsesquiterpenes having the novel campechane skeleton (Yam-Puc et al., 2009). As part of our continuing study of the Yucatecan native flora as a potential source of bioactive metabolites, we wish to report herein on the isolation and identification of the pregnanes 1 and 2 from the root extract of P. andrieuxii.

2. Results and discussion

The dichloromethane-soluble fraction of the methanolic root extract of P. andrieuxii was initially subjected to an acid-base extraction. Successive chromatographic purifications of the neutral fraction using a combination of VLC and column chromatography, resulted in the isolation of the secondary metabolites 1 and 2 in pure form. The ESI-MS of 1 showed a protonated fragment ion peak at m/z 311 [M-2H₂O+H]⁺ which suggested an original molecular formula of C21H30O4 for the parent secondary metabolite; this in turn indicated the presence of seven unsaturation sites in the structure. The ¹³C NMR spectrum of 1 (Table 1) showed the expected twenty one carbon signals, including one ester or lactone carbonyl carbon at 178.8 ppm and two olefinic carbons at 120.8 and 139.8 ppm. The combined analysis of the ¹³C NMR spectrum and the HSQC experiment of 1 established the nature of all carbon atoms as two methyl groups, eight methylene, six methine, and five quaternary carbons. The chemical shift values of the carbons at 83.3 (methine), 85.3 (quaternary) and 71.4 ppm (methine) clearly indicated that they were all bonded to oxygen. The presence of two oxygen-bearing methine groups in the structure of 1 was confirmed by two oneproton signals at δ 3.49 (m) and δ 4.39 (c, J = 6.6 Hz) in its ¹H NMR spectrum (Table 1), with the low-field chemical shift of the second proton suggesting its being part of an ester or lactone functionality. Additional signals in the ¹H NMR spectrum of 1 included a vinylicproton signal at δ 5.37 (t, J = 2.8), together with a three-proton singlet

Corresponding author. Tel.: +52 999 942 8330; fax: +52 999 981 3900.
E-mail address: Imanuel@cicy.mx (L.M. Peña-Rodríguez).

^{1874-3900/\$ -} see front matter © 2011 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.phytol.2011.09.004

| 4 | 4 | 6 | 5 | | |
|---|---|---|---|--|--|
| | | | | | |

| IMR spectroscopic data of metabolites 1 and 2 | 2 | 2. |
|---|---|----|
|---|---|----|

| No | Metabolite 1 | | Metabolite 2 | |
|----|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|
| | ¹³ C NMR (δ) | ¹ Η NMR (δ) | ¹³ C NMR (δ) | ¹ Η NMR (δ) |
| 1 | 37.2 (t) | 1.85 (1H, m) | 29.9 (t) | 1.47 (1H, m) |
| | | 1.91 (1H, m) | | 1.50 (1H, m) |
| 2 | 26.6 (t) | 2.21 (2H, m) | 22.3 ^a (t) | 1.32 (1H, d, J=4.6) |
| | | | | 2.11 (1H, dd, J=2.6, 4.2) |
| 3 | 71.4 (d) | 3.49 (1H, hept, J=5.6) | 66.8 (d) | 4.11 (1H, t, J=2.6) |
| 4 | 41.9 (t) | 2.23 (1H, m) | 28.2 ^b (t) | 1.85 (1H, m) |
| | | 2.31 (1H, m) | | 1.98 (1H, m) |
| 5 | 139.8 (s) | | 34.6 (s) | 1.66 (1H, m) |
| 6 | 120.8 (d) | 5.37 (1H, t, /= 2.8) | 18.6 ^a (t) | 1.70 (2H, m) |
| 7 | 34.7 (t) | 1.80 (1H, m) | 20.4 ^a (t) | 1.59 (1H, m) |
| | | 1.84 (1H, m) | | 1.80 (1H, m) |
| 8 | 38.9 (d) | 1.96 (1H, d, J=4.0) | 36.1 (d) | 1.77 (1H, m) |
| 9 | 45.7 (d) | 1.35 (1H, dd, /= 4.0, 12.0) | 38.9 (d) | 1.74 (1H, m) |
| 10 | 37.1 (s) | | 35.3 (s) | |
| 11 | 20.8 (t) | 2.07 (1H, m) | 21.9 ^a (t) | 1.22 (1H, m) |
| | | 2.10 (1H, m) | | 1.62 (1H, m) |
| 12 | 31.3 (t) | 1.80 (1H, m) | 27.9 ^b (t) | 1.52 (1H, m) |
| | | 1.85 (1H, m) | (1) | 2.03 (1H, m) |
| 13 | 59.7 (s) | | 59.2 (s) | |
| 14 | 85.3 (s) | | 91.4 (s) | |
| 15 | 33.4(t) | 1.98 (1H. m) | 33.3 (1) | 1.37 (1H, m) |
| | 0011(0) | 2.03 (1H m) | 5515 (1) | 1.92 (1H, m) |
| 16 | 25.8 (t) | 2.26 (2H m) | 25.6 (1) | 1.18 (1H, m) |
| | | | | 1.89 (1H, m) |
| 17 | 562 (d) | 2 18 (1H m) | 58.2 (d) | 2.62(1H, dd, l=1.0, 3.7) |
| 18 | 178.8 (s) | | 175.8 (s) | (|
| 19 | 19.4 (c) | 1.03 (3H. s) | 23.6 (c) | 0.94 (3H, s) |
| 20 | 83.3 (d) | 439 (1H c /= 6.6) | 113.1 (s) | 0.0 1 (0.11 0) |
| 21 | 21.4 (c) | 1.33 (3H. d. /=6.4) | 15.6 (c) | 1.58 (3H, s) |

Chemical shift values are given in parts per million (ppm) relative to the solvent signal (7.26 and 77.0 ppm for ¹H and ¹³C NMR spectra, respectively); coupling constants are given in Hz. ^{a,b}assignment of signals with similar letters can be interchanged.

at δ 1.03 and a three-proton doublet at δ 1.33, indicating the presence of a trisubstituted double bond and two methyl groups, one bonded to a quaternary carbon and another to a methine, respectively. The spectroscopic data of 1 proved to be very similar to that reported for the aglycone of amaloside C, a steroidal secondary metabolite with an extra hydroxyl group at C8, isolated from Amalocalyx yunnanensis (Apocynaceae) (Shen et al., 1993). The C-14 location of the tertiary hydroxyl group in the structure of 1 was established by comparing the chemical shift (85.3 ppm) of the quaternary oxygenated carbon in the ¹³C NMR spectrum of 1, with those reported for the oxygenated carbons C8 (76.1 ppm) and C14 (86.4 ppm) in amaloside C and similar pregnanes (Shen et al., 1993; Hu et al., 1992). Alternatively, a ³J correlation observed in the HMBC experiment between the protons of the C-19 methyl group at δ 1.03 and the olefinic quaternary carbon at 139.8 ppm confirmed the C5 location of the double bond; similarly, the ³ correlation observed between the protons of the C-21 methyl group at δ 1.33 and the methine carbon at 56.2 ppm, and the ²J correlation between the same protons and the oxygenated methine carbon at 83.3 ppm, confirmed C21 being a secondary methyl group. Both the structure and relative stereochemistry of 1 were confirmed unambiguously by a single-crystal X-ray diffraction experiment (Fig. 1). The spectroscopic data of 1 proved to be identical to that reported for 3\$,14\$,20-trihydroxypregn-5-ene-18-oic-(18-20)lactone, a secondary metabolite previously isolated from Ecdysanthera rosea Hook et Arn. (Apocynaceae) (Luger et al., 1998) and recently reported as the hydrolysis product of the novel saponins ecdysantherosides A and B (Zhu et al., 2011).

The ESI-MS of 2 showed a fragment ion peak at m/z 347 [M-H₂O+H]⁺ which suggested a molecular formula of C₂₁H₃₂O₅ for the parent secondary metabolite, and an extra oxygen atom and one less unsaturation site than 1. The ¹H NMR spectrum of 2 (Table 1) showed several differences when compared to that of 1; namely, the presence of two high-field three-proton singlets at δ 1.58 and 0.94

corresponding to two methyl groups attached to quaternary carbons, the presence of a single carbinol proton at δ 4.12, and the absence of vinylic proton signals. The presence of a secondary alcohol in the structure of 2 was confirmed by preparing the corresponding acetylated and oxidized derivatives; the ¹H NMR spectrum of the acetylated derivative showed the expected shift to lower field of the carbinol proton (δ 4.12–5.08), while that of the oxidized derivative showed the expected absence of the carbinol proton signal. The ¹³C NMR spectrum of 2 showed an ester carbonyl carbon at 175.8 ppm, a hemiketal carbon at 113.1 ppm, and two additional oxygen-bearing carbons, one quaternary at 91.4 ppm and one methine at 66.8 ppm. The presence of the hemiketal group in the structure of 2 was confirmed when treatment of the natural product with NaBH₄ yielded the expected reduction product. The ¹H NMR spectrum of the reduction product showed a new carbinol proton signal at δ 4.38 and a three-proton doublet at δ 1.35. On the basis of these results, metabolite 2 was identified as 3β , 14β , 20, 20-tetrahydroxy-5 β -pregn-18-oic-(18-20)-lactone, a new natural product. The assignment of the cis configuration at the AB ring junction is based primarily on the chemical shift observed for the C-19 methyl group carbon (23.6 ppm) in the ¹³C NMR spectrum of 2 (Table 1), since it is known that the signal for the ring junction methyl group carbon in the cis isomer occurs 11-12 ppm downfield when compared to that of the same methyl group in the trans isomer (Ayer and Pena-Rodriguez, 1987; Wehrli and Nishida, 1979).

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Analytical TLC analyses were carried out using aluminumbacked silica gel (60F254) plates (E.M. Merck, 0.2 mm thickness); the plates were first examined under UV light ($\lambda = 254$ and







Fig. 1. Single-crystal X-ray structure and relative stereochemistry of metabolite 1.

366 nm) and the various components in the chromatograms were visualized by dipping the plates in a solution of phosphomolybdic acid (20 g) and ceric sulfate (2.5 g) in 500 mL of sulfuric acid (5%), followed by drying and gentle heating. ¹H NMR (400 MHz) and ¹³C NMR (100 MHz) spectra were obtained in CDCl₃, on a Bruker Avance 400 spectrometer, using the residual CHCl₃ signal (7.26 and 77.00 ppm for ¹H and ¹³C, respectively) as reference. Mass spectra were performed with a JEOL-JMS-SX102 and ESI-HRMS (electrospray ionization mass) with the Waters Q-TOF microsystem using 0.1% phosphoric acid in a 1:1 water/acetonitrile mixture as reference. IR spectra were recorded in CHCl₃ (film) using an FT-Nicolet Magna Protégé 460 spectrophotometer.

3.2. Plant material

The roots of *P. andrieuxii* were collected in April 2006 from a field located 3.5 km northeast of the city of Campeche, on the road to

Chiná, Campeche, México. The plant was identified by taxonomist Paulino Simá-Polanco, and a voucher specimen has been deposited in the herbarium of the Unidad de Recursos Naturales of the Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) under the collection number PSimá-2245 and folio number 46178.

3.3. Extraction and isolation

The plant material was washed with tap water and dried, first for a week at room temperature and then for 72 h in an oven at 55 °C. The dry roots (595 g) were cut, ground, and extracted four times with MeOH (2 L), at room temperature. The extracts were combined and the solvent was removed under reduced pressure to produce 60.2 g of crude methanolic extract. Sonication (ultrasound bath Cole-Parmer 8853) of the crude methanolic extract with CH₂Cl₂ (500 mL) for 24 h yielded 18.2 g of a medium- to-low polarity fraction, which was then subjected to an acid-base

47

extraction to produce the corresponding acidic (654.6 mg), basic (596.2 mg), and neutral (3.27 g) fractions. Successive VLC ($CH_2Cl_2/acetone$) and column chromatography (hexane/acetone 8:2) purifications of the neutral fraction led to the isolation of **1** (10 mg) and **2** (35 mg) in pure form.

3.3.1. 3B,14B,20-Trihydroxypregn-5-ene-18-oic-(18-20)-lactone (1)

Colorless needles (CHCl₃/methanol); IR (CHCl₃, film) ν_{max} 3437 (OH), 2964 and 2939 (C–H), 1729 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz), see Table 1; ESI-MS *m/z* 311.1918 [M-2H₂O+H]⁺ (calcd. for C₂₁H₂₇O₂: 311.2011); TLC *R*_f 0.47 in CH₂Cl₂/methanol, 94:6.

3.3.2. 3β , 14β , 20-Trihydroxy- 5β -pregn-18-carboxylic-20-lactone (2) Yellow oil (CHCl₃); IR (CHCl₃, film) ν_{max} 3436 (OH), 2939 and 2878 (C-H), 1782 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz), see Table 1; ESI-MS m/z 347.2226 [M-H₂O+H]⁺ (calcd. for C₂₁H₃₁O₄: 347.2222); TLC R_f 0.25 in hexane/acetone, 8:2.

3.4. Acetylation of 2

A fraction containing **2** (9 mg) was combined with acetic anhydride (1 mL) and pyridine (0.5 mL) and allowed to stir overnight at room temperature. The reaction mixture was poured over water (20 mL) and the resulting suspension was extracted with ethylacetate (3×, 1:1). The organic layer was successively washed (2×, 1:1) with 5% HCl, 5% NaHCO₃ and brine, and then dried over anhydrous sodium sulfate. Evaporation of the solvent under reduced pressure yielded 4 mg of acetylated derivative as a colorless oil; IR (CHCl₃, film) ν_{max} 2939 and 2866 (C–H), 1785 and 1739 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.07 (1H, *t*, *J* = 2.6 Hz), 2.64 (1H, *dd*, *J* = 1.2, 3.3 Hz), 2.05 (3H, s, CH₃COO), 1.59 (3H, s), 0.96 (3H, s); ESI-MS *m/z* 429.2191 [M+Na] (calcd. for C₂₃H₃₄O₆ Na: 429.2253); TLC *R_f* 0.45 in CHCl₃/hexane/methanol, 50:48:2.

3.5. Oxidation of 2

An excess of pyridinium chlorochromate (PCC, Corey's reagent) was added to a solution of a fraction containing 2 (10 mg) in CH₂Cl₂ (2 mL), and the mixture was allowed to stir overnight at room temperature. The reaction mixture was passed through a silica gel bed (70–230 mesh; 2 cm diameter, 3 cm height), and the adsorbent was washed with CH₂Cl₂/methanol (99:1) to produce 3 mg of oxidized product as a colorless oil; IR (CHCl₃, film) ν_{max} 2945 and 2879 (C–H), 1779 and 1719.23 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.07 (1H, *t*, *J* = 2.6 Hz), 2.68 (1H, *dd*, *J* = 1.1, 4.1 Hz), 1.61 (3H, s), 1.02 (3H, s); ESI-MS *m/z* 345.2037 [M–H₂O+H] (calcd. for C₂₁H₂₉O₄: 345.2066); TLC *R*_f 0.25 in CHCl₃/hexane/methanol 50:48:2.

3.6. Reduction of 2

A suspension of 2 (9 mg) in methanol (5 mL) was treated with an excess of NaBH₄. The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 72 h and then was poured over distilled water (20 mL); the resulting suspension was extracted with ethylacetate (3×, 2:1, 1:1, 1:1) and the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous sodium sulfate. Filtration and evaporation of the solvent yielded 3 mg of crude reduced product as a colorless oil; IR (CHCl₃, film) ν_{max} 3436 (OH), 2932 and 2872 (C–H), 1785 and 1739.23 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.37 (1H, q, J = 6.3 Hz), 4.12 (1H, t, J = 2.5 Hz) 1.34 (3H, d, J = 6.3 Hz), 0.99 (3H, s); TLC R_f 0.12 in CHCl₃/hexane/methanol, 50:48:2.

3.7. X-ray crystallography

The intensity data set of compound 1 was collected at 293 K with an Oxford Diffraction Xcalibur 3 system using ω -scans and Mo-K α (λ = 0.71073 Å) (Crysalis CCD). The data were extracted and integrated using Crysalis RED. The structures were solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares calculations on F^2 using SHELXTL 5.1 (Sheldrick and Serralta, 1998). Non-H atoms were refined with anisotropic displacement parameters. Hydrogen atoms were constrained to parent sites, using a riding model. All crystallographic data are available in CIF format (CCDC reference number CCDC 822826).

3.7.1. Crystal data and collection and refinement details

 $C_{21}H_{29}O_4$, M = 345.44, monoclinic, a = 5.8408(2), b = 14.7268(5), c = 10.8519(5) Å, $\beta = 104.554(4)^\circ V = 903.48(6)$ Å³, space group P_{21} , Z = 2, $\mu = 0.086$ mm⁻¹, Dcalcd. = 1.27 g cm⁻³, θ range 2.38–33.08°, 9361 reflections measured, 4721 unique ($R_{int} = 0.0398$) which were used in all calculations. The final w $R(F^2)$ was 0.0774 and the *S* value 0.974 (all data). The R(F) was 0.0456 ($I > 2\sigma(I)$).

Acknowledgements

The authors wish to thank Gilda Erosa-Rejón (Lund University) for NMR spectra, as well as Carlos Solano-Arribas for technical assistance. A.Y.-P. wishes to thank the EULADIV Alfa Project for supporting his research training stay at Lund University, Financial support from the FOMIX-Yucatán Project No. 66262 is also gratefully acknowledged.

References

- Argūeta, A., Cano, L., Rodarte, M.E., 1994. Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana, vol. 1. Instituto Nacional Indigenista, Mexico City, p. 204.
- Ayer, W.A., Pena-Rodriguez, L.M., 1987. Metabolites produced by Alternaria brassicae, the black spot pathogen of canola. Part 1. The phytotoxic components. J. Nat. Prod. 50 (3), 400-407.
- Chan-Bacab, M.J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., Durán-García, R., Peña-Rodríguez, L.M., 2003. Variation of leishmanicidal activity in four populations of Urechites andrieuxii. J. Ethnopharmacol. 86, 243-247.
- Crysalis CCD, Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, Oxfordshire, UK, 2005.
- Crysalis RED, Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, Oxfordshire, UK, 2005.
- Hu, Y.-J., Shen, X., Mu, Q.-Z., Lu, Y., Zheng, Q.-T., 1992. Steroidal constituents from Amalocalyx yunnanensis. Phytochemistry 31 (6), 2099–2102.
- Lezama-Davila, C.M., Isaac-Marquez, A.P., Zamora-Crescencio, P., Uc-Encalada, M.R., Justiniano-Apolinar, S.Y., Del Ángel-Robles, R., Satoskar, A., Hemández-Rivero, L., 2007, Leishmanicidal activity of Pentalinon andrieuxii. Fitoterapia 78, 255-257.
- Luger, P., Weber, M., Dung, N.X., Thanh-Ky, P., Le-The, C., 1998. The crystal structure of 3*β*,14*β*,20-trihydroxy-18oic(18-20)lactone pregnen-5, derived from a Vietnamese folk medical plant. Cryst. Res. Technol. 33 (2), 325-332.
- Pulido, M.T., Serralta, L., 1993. Lista Anotada de las Plantas Medicinales de Uso Actual en el Estado de Quintana Roo, México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo: Chetumal, Quintana Roo, p. 6.
- Sheldrick, G.M., 1998. SHELXTL, 5.1, Program for Structure Solution and Least Square Refinement. University of Göttingen, Göttingen, Germany.
- Shen, X., Hu, Y.-J., An, Y.-L., Mu S Q.-Z., 1993. Steroids from Amalocalyx yunnanensis. Phytochemistry 33 (3), 687–689.
- Tillequin, F., Michael, S., Seguin, I., 1993. In: Waterman, P.G. (Ed.), Alkaloids and Sulphur Compounds, vol. 8. Academic Press, San Diego, pp. 175-181.
- Wehrli, F.W., Nishida, T., 1979. The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy in natural products chemistry. Fortschr. Chem. Org. Naturst. (Prog. Chem. Org. Nat. Prod.).36, 104–109.
- Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., Pech-López, M., Chan-Bacab, M.J., Arunachalampillai, A., Wendt, O.F., Sterner, O., Peña-Rodríguez, L.M., 2009. Trinorsesquiterpenoids from the root extract from *Pentalinon andrieuxii*. J. Nat. Prod. 72, 745-748.
- Zhu, X., Wu, G., Xiang, J., Luo, H., Luo, S., Zhu, H., Wang, Y., 2011. New pregnane saponins from Ecdysanthera rosea and their cytotoxicity. Fitoterapia 82, 632–636.

Phytochemistry Letters 6 (2013) 649-652

ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters



journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol

A case of mistaken identity: Lupeol-3-(3'R)-hydroxy-stearate can be mistakenly identified as lupeol acetate when only analyzed by GC-MS



Alejandro Yam-Puc^a, Fabiola Escalante-Erosa^a, Karlina García-Sosa^a, Fabiola G. Ramírez-Torres^a, Manuel J. Chan-Bacab^c, Wolfgang Eisenreich^d, Claudia Huber^d, Nihat Knispel^d, Gregorio Godoy-Hernández^b, Luis M. Peña-Rodríguez^{a,*}

* Laboratorio de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, C.43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, Mexico

^b Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, C.43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, Mexico

^c Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universidad Autónoma de Campeche, Av. Agustín Melgar s/n, Campeche, Mexico ^d Lehrstuhl für Blochemie, Technische Universität München, Lichtenberg Str. 4, D-85747 Garching, Germany

ARTICLE INFO

Article history: Received 19 April 2013 Received in revised form 16 August 2013 Accepted 20 August 2013 Available online 6 September 2013

Keywords:

Lupeol acetate Lupeol stearate Procrim b Pentalinon andrieuxii Retro-aldol reaction Thermolysis Hydroxyl-fatty acid esters

ABSTRACT

Lupeol-3-(3'*R*-hydroxy)-stearate, also known as procrim b (1), was isolated from the methanolic stem extract of *Pentalinon andrieuxii* and initially mistaken as lupeol acetate when analyzed by GC-MS only. The correct structure of 1 was established following a careful analysis of its NMR and MS data. © 2013 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Plant triterpenoids, which include sterols, steroids, and brassinosteroids, constitute a large and structurally diverse group of natural products, with over 100 different carbon skeletons (Stiti and Hartmann, 2012). Pentacyclic triterpene esters have been found to have pharmacological activities such as antiinflammatory, antiarthritic, antidepressive, hepatoprotecting, and antitumoral; this wide range of biological activities is what makes the search of triterpene esters from plants particularly important (Miranda et al., 2006). The 3-O-acyl-derivatives of lupeol, a ubiquitous triterpene found in many plant species and reported to exhibit strong antiinflammatory, antiarthritic, antimutagenic, antimalarial, and anticancer activities (Saleem et al., 2005; Laszczyk, 2009), have also been reported to be biologically active; these esters include lupeol palmitate and lupeol linoleate, isolated from the

Corresponding author. Tel.: +52 999 9428330x159; fax: +52 999 9813900. E-mail address: Imanuel@cicy.mx (LM. Peña-Rodríguez). bark of roots of Alstonia boonei (Rajic et al., 2000), which have shown in vitro selective activity as protease inhibitors (Hodges et al., 2003), and 3-docosanoyl lupeol and lupeol acetate, both obtained from the stems of Willughbeia firma and both having antiinflammatory activity (Patocka, 2003; Subhadhirasakul et al., 2000). We describe herein the isolation and identification of lupeol-3-(3'R-hydroxy)-steareate (1) from the stem extract of Pentalinon andrieuxii and, on doing so, emphasize the importance of carefully analyzing the full chromatographic and spectroscopic data, in addition to those from the GC-MS analysis, when identifying a pure, bioactive metabolite.

2. Results and discussion

Successive chromatographic purifications of the dichloromethane-soluble fraction of the stem extract of *P. andrieuxii*, using a combination of VLC and open column chromatography, resulted in the isolation of metabolite **1** in pure form. The GC–MS analysis of metabolite **1** showed a single component at t_R 24.07 min with an apparent parent ion peak at m/z 468, which indicated a molecular

1874-3900/\$ - see front matter © 2013 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2013.08.010

| pectrosco | pic data | of lupeol-3- | (3'R-hydroxy |)-stearate (| procrim b |)(| 1 |
|-----------|----------|--------------|--------------|--------------|-----------|----|---|
|-----------|----------|--------------|--------------|--------------|-----------|----|---|

| Position | ¹³ C NMR | ¹ H NMR | Position | ¹³ C NMR | ¹ H NMR |
|----------|---------------------|------------------------|----------|---------------------|--------------------|
| 1 | 38.14 | 1.66 (m) | 25 | 16.30 | 0.84 (s) |
| 2 | 23.88 | 1.61 (m) | 26 | 16.10 | 1.02 (s) |
| 3 | 81.57 | 4.53 (dd, J=5.4, 13.0) | 27 | 14.65 | 0.93 (s) |
| 4 | 37.93 | | 28 | 18.13 | 0.78 (s) |
| 5 | 55.49 | 0.79 (m) | 29 | 109.5 | 29a 4.56 (s) |
| | | | | | 29b 4.68 (s) |
| 6 | 18.32 | 1.49 (m) | 30 | 19.42 | 1.64 (s) |
| 7 | 34.30 | 1.38 (m) | 1' | 173.04 | |
| 8 . | 40.96 | | 2' | 41.72 | 2.50 (d, J= 12.9) |
| 9 | 50.44 | 1.29 (m) | 3' | 68.33 | 3.98 (s) |
| 10 | 37.20 | | 4' | 36.69 | 1.51 (m) |
| 11 | 21.07 | 1.41 (m) | 5' | 25.61 | 1.43 (m) |
| 12 | 25.19 | 1.67 (m) | 6'-16' | 29.0-30.0 | 1.24 (m) |
| 13 | 38.46 | 0.97 (m) | 17' | 22.85 | 1.24 (m) |
| 14 | 42.95 | | 18' | 14.29 | 0.87 (m) |
| 15 | 27.55 | 1.67 (m) | | | |
| 16 | 35.69 | 1.43 (m) | | | |
| 17 | 43.12 | | | | |
| 18 | 48.39 | 1.35 (m) | | | |
| 19 | 48.13 | 2.36 (m) | | | |
| 20 | 151.09 | | | | |
| 21 | 29.55 | 1.24 (m) | | | |
| 22 | 40.12 | 2.40 (m) | | | |
| 23 | 28.16 | 0.84 (s) | | | |
| 24 | 16.30 | 0.83 (s) | | | |

formula of C32H52O2 and suggested 1 being lupeol acetate (2). However, and although both the t_R and the fragmentation pattern of metabolite 1 were identical to those observed when an authentic sample of lupeol acetate was analyzed by GC/MS (tg: 24.02 min and M⁺ at m/z 468, respectively), and the ¹H NMR spectrum of 1 (Table 1) showed the characteristic signals for six methyl groups at δ 0.78 (s), 0.84 (6H, s), 0.93 (s), 1.02 (s) and 1.64 (s), together with the two vinylic protons of the exocyclic methylene group at δ 4.56 (s) and 4.68 (s), and the proton of the C-3 esterified oxymethine group at δ 4.53 (dd, J = 5.4, 13.0 Hz), the expected, characteristic signal for the acetate methyl group was missing. This indicated that metabolite 1 did not correspond to lupeol acetate but to a different type of lupeol ester. A careful analysis of the ¹H NMR spectrum of 1 showed the presence of a second oxymethine proton at δ 3.98 (bs) which, from the results of the COSY experiment (Fig. 1a), appeared to be coupled to the protons of two methylene groups at δ 2.50 (2H, bd, J = 12.9 Hz) and 1.51 (2H, m). The ¹³C NMR



Fig. 1. (a) $^{1}H^{-1}H$ COSY couplings between H-3' and H-2'/H4'. (b) Key HMBC correlations between proton H-3' and carbons C-1' (^{3}J), C4' (^{2}J) and C5' (^{3}J), and between H-3 and carbon C-1' of lupeol-3-(3'*R*-hydroxy)-stearate (procrim b) (1).

spectrum of 1 confirmed the presence of two carbons bonded to oxygen with the signals at 68.33 and 81.57 ppm and also showed the expected signals for an ester carbonyl carbon at 173.04 ppm, and for the two olefinic carbons of a disubstituted double bond at 109.50 and 151.09 ppm. However, a complex signal group in the 29-30 ppm chemical shift region of the ¹³C NMR spectrum indicated the presence of a large number of methylene carbons and strongly suggested 1 being a hydroxylated fatty acid ester of lupeol. The correct position of the free hydroxyl group in the fatty acid alkyl chain was established from the analysis of the HMBC experiment of 1 which showed a clear ³J correlation between the carbinol proton at δ 3.98 and the carbonyl group at 173.04 ppm, and ²J and ³J correlations between the carbinol proton and the methylene carbons at 36.69 and 25.61 ppm, respectively (Fig. 1b). The HRMS of 1 showed a molecular ion peak with an exact mass of 708.6415, which indicated a molecular formula of C48H84O3 that corresponded to the lupeol ester of a hydroxylated C18 fatty acid. On the basis of its spectroscopic data, and by comparing it with those reported in the literature, metabolite 1 was identified as lupeol-3-(3'R-hydroxy)-stearate, recently reported from Alecrimpropolis and designated with the common name procrim b (Furukawa et al., 2002). However, it is interesting to point out that the optical rotation value of 1 is similar to that reported in the literature for procrim b but has the opposite sign (+154.5° vs -146.6°, respectively) indicating that the lupeol ester isolated in this investigation corresponds to the enantiomer of procrim b. To date, the number of reported triterpene hydroxylated-fatty acid esters is limited (Salatino et al., 2005). The only other report of hydroxylated-fatty acid ester of lupeol is that of 3-O-(3'-hydroxyeicosanoyl) lupeol, isolated from Holarrhena floribunda and reported to show moderate activity against Plasmodium falciparum (Fotie et al., 2006).

The similarity in the fragmentation patterns of 1 and lupeol acetate when analyzed by GC-MS, particularly in terms of the presence of the fragment ion peak at m/z 468, can be explained by a thermally-induced reverse aldol reaction of 1 which results in the formation of lupeol acetate and hexadecanal (Fig. 2), as a result of the high temperature (260°) in the injector of the GC-MS, since this type of thermolysis has been reported to be highly favored both theoretically and experimentally for β -hydroxy-esters (Quijano



Fig. 2. Thermally induced retroaldol reaction of lupeol-3-(3'R-hydroxy)-stearate (procrim b) (1).

et al., 1994; Notario et al., 2002). To date, there are no reports in the literature describing the occurrence of this type of reaction during the isolation or identification of natural products; however, the proneness of β-hydroxy-esters to readily undergo thermolysis under normal GC-analysis conditions, could explain the limited number of literature reports on the natural occurrence of triterpene hydroxylated-fatty acid esters. A quick literature search showed a significant number of reports where the identification of lupeol acetate as a bioactive metabolite was established only on the basis of the results from the GC-MS analysis of the natural ester using thermolyisis-favoring temperatures of 250°-300 °C in the injector (Hooper et al., 1982; Vilegas et al., 1997; Peres-Ferreira and Rodrigues de Oliveira, 2010; Oyo-Ita et al., 2010; Márquez-Hernández et al., 2010; Goncalves et al., 2011; Pereira et al., 2012; Stiti and Hartmann, 2012; Di Stefano and Pitonzo, 2012); taking into account the results presented here, it might be advisable to confirm the identification of the isolated natural product and whether the biological activity being reported is indeed due to lupeol acetate or if it is due to a misidentified hydroxylated fatty acid lupeol ester such as 1. Finally, our initial, mistaken identification of 1 as lupeol acetate, emphasizes the importance of always using additional chromatographic and spectroscopic data to confirm the chemical structure of the isolated metabolites, particularly those which are ubiquitous and commonly found in phytochemical research.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Analytical TLC analyses were carried out using aluminumbacked silica gel (60F254) plates (E.M. Merck, 0.2 mm thickness); the plates were first examined under UV light and the various components in the chromatograms were visualized by dipping the plates in a solution of phosphomolybdic acid (20 g) and ceric sulfate (2.5 g) in 500 mL of sulfuric acid (5%), followed by drying and gentle heating. Plant material was liophylized overnight at 0.83 mbar using an Alpha 2–4 LD plus Lyophilisator (Christ, Osterode am Harz, Germany) equipped with a Chemistry Hybrid Pump RC 6 (Vaccubrand GmbH + Co, Wertheim, Germany). GC–MS analysis was performed on a GC-QP2010 Plus chromatograph (Shimadzu, Duisburg, Germany) equipped with a fused silica capillary column (Equity TM-5; 30 m, 0.25 mm, 0.25 m film thickness; SUPELCO, Bellefonte, PA) and a mass detector working with electron ionization at 70 eV. The sample was injected at an interface temperature of 260 °C and helium inlet pressure of 70 kPa. The column was run at 200 °C for 3 min and then with a temperature gradient of 20 °C/min to a final temperature of 280 °C that was held for 30 min. High resolution measurements were done using a Trace GC Ultra (Thermo Scientific) with a direct inlet system. Metabolite 1 evaporated at ca. 210 °C in high vacuum. Additional GC-MS analysis were done using a Hewlett Packard 5890 gas chromatograph [GC conditions: split injection of 1 mL of sample; Ultra 1 column (25 m \times 0.2 mm i.d.), flow rate 1.0 mL/min (Nitrogen); oven temperature program $T_1 = 150 \ ^{\circ}\text{C}$ $(3 \text{ min}), T_2 = 280^{\circ} \text{ C}$ (30 min), gradient 10 °C/min, injector 300° and detector (FID) 300 °Cl. Mass spectra were obtained with a JEOL-JMS-SX102, ¹³C NMR spectra were obtained from an Avance III 500 system (Bruker, Germany) with a cryo probe head (5 mm CPQNP, ¹H/¹³C/³¹P/¹⁹F/²⁹Si (Z-gradient). The ¹H NMR spectra and the two-dimensional experiments were performed with an Avance I 500 system with a SEI 500 S2 probe head (5 mm, inverse with Zgradient). The measurements were performed at magnetic fields of 11.75 T. The resonance frequencies of ¹H and ¹³C were 500.13 MHz and 125.82 MHz respectively. The temperature was 300 K. The one-dimensional ¹³C NMR spectra as well as the one- and twodimensional ¹H NMR spectra were measured with standard Bruker parameter sets. Data processing was done with the MestReNova Software Version 7.0.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain).

3.2. Extraction and isolation of metabolite lupeol-3-(3'R-hydroxy)stearate (procrim b) (1)

The stems of two plants (nine months old) of *P. andrieuxii* grown under glasshouse conditions were frozen using liquid nitrogen and then lyophilized. The dry-ground plant material (46.84 g) was extracted four times with MeOH (1 L, 72 h) at room temperature. The extracts were combined and the solvent was removed under reduced pressure to produce 10.92 g of crude methanolic extract. Refluxing of the crude methanolic extract twice with CH₂Cl₂ (600 mL, 1 h) yielded 1.42 g of a CH₂Cl₂-soluble fraction which was initially fractionated by vacuum liquid chromatography (5 cm diameter) using a gradient elution with mixtures of Hx/CH₂Cl₂/An to produce nine fractions (A–I). Successive open column chromatography (1 × 40 cm) purifications of combined fractions A and B (217.4 mg) using $Hx/CH_2CI_2/An$ 110:10:5 and Hx/Et_2O 95:5 resulted in the isolation of 1 (25 mg) in pure form.

Acknowledgements

The authors wish to thank Ivonne Jüttner for growing the plants of *P. andrieuxii*. We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (El 384/8-1) for generous sponsoring of this research work. A. Y.-P. wishes to thank CONACYT and CICY for their support to carry out a research training stay at TUM. F. R.-T. wishes to thank Academia Mexicana de Ciencias, through the Verano de Investigación Científica program, for supporting her summer research internship at CICY. LMPR and WE thank the German Academic Exchange Service (DAAD, A/11/00471) and CONACYT-México (exp. No. 160813) for supporting the sabbatical stay of LMPR at TUM. Financial support from the FOMIX-Yucatán Project No. 66262 is also gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2013.08.010.

References

- Di Stefano, V., Pitonzo, R., 2012. Phytochemical studies on Ptilostemon greuteri Raimondo & Domina (Compositae). Rec. Nat. Prod. 6 (4) 390-393.
- Fotie, J., Bohle, D.S., Leimans, M.L., Georges, E., Rukunga, G., Nkengfack, A.E., 2006. Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. J. Nat. Prod. 69, 62–67.
- Furukawa, S., Takagi, N., Ikeda, T., Ono, M., Nafady, A.M., Nohara, T., Sugimoto, H., Doi, S., Yamada, H., 2002. Two novel long-chain alkanoic acid esters of lupeol from alecrim-propolis. Chem. Pharm. Bull. 50 (3) 439–440.
- Goncalves, L.D., Almeida, H.R., De Oliveira, P.M., Lopes, N.P., Turatti, I.C.C., Archanjo, F.C., Grael, C.F.F., 2011. Contribution for the phytochemical studies of Ageratum fastigiatum, Braz. J. Pharmacogn. 21 (6) 936–942.
- Hodges, LD:, Kweifio-Okaí, G., Macrides, T.A., 2003. Antiprotease effect of antiinflamatory lupeol esters. Mol. Cell. Biochem. 252, 97-101.

- Hooper, S.N., Chandler, R.F., Lewis, E., Jamieson, W.D., 1982. Simultaneous determination of Sonchs arvensis L. triterpenes by gas chromatography-mass spectrometry. Lipids 17 (1) 60-63.
- Laszczyk, M.N., 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupine, oleanane and ursane groups as tools in cancer therapy. Planta Med. 75, 1549-1560.
- Márquez-Hernández, I., Cuesta-Rubio, O., Campo-Fernández, M., Rosado-Pérez, A., Montes de Oca-Porto, R., Piccinelli, A.L., Rastrelli, L., 2010. Studies on the constituents of yellow Cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. J. Agric. Food Chem. 58, 4725-4730.
- Miranda, R.R.S., Silva, G.D.F., Duarte, L.P., Fortes, I.C.P., Vieira-Filho, S.A., 2006. Structural determination of 3 β sterayloxy-urs-12-ene from *Maytenus salicifolia* by 1D and 2D NMR and quantitative ¹³C NMR spectroscopy. Magn. Reson. Chem. 44, 127–131.
- Notario, R., Quijano, J., Quijano, C., Gutlérrez, L.P., Suárez, W.A., Sánchez, C., León, L.A., Chamorro, E., 2002. Theoretical study of the thermolysis reaction of ethyl β-hydroxycarboxylates in the gas phase. J. Phys. Chem. 106, 4377–4383.
- Oyo-Ita, O.E., Ekpo, B.O., Oros, D.R., Simoneit, B.R.T., 2010. Occurrence and sources of triterpenoid methyl ethers and acetates in sediments of the Cross-River system Southeast Nigeria. Int. J. Anal. Chem. 2010, 8, http://dx.doi.org/10.1155/2010/ 502076, Article ID 502076.
- Patocka, J., 2003. Biollogically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. J. Appl. Biomed. 1, 7–12.
- Pereira, D.M., Vinholes, J., Guedes de Pino, P., Valentao, P., Mouga, T., Texeira, N., Andrade, P.B., 2012. A gas chromatography-mass spectrometry multi-target method for the simultaneous analysis of three classes of metabolites in marine organisms. Talanta 100, 391-400.
- Peres-Ferreira, F., Rodrigues de Oliveira, D.C., 2010. New constituents from Mikania laevigata Shultz Bip. ex Baker. Tetrahedron Lett. 51, 6856–6859.
- Quijano, J., Restrepo, I., Gallego, L.H., Yepes, M.S., 1994. Alpha-deuterium isotope effects in the thermolysis of β-hydroxy esters. Tetrahedron Lett. 35, 4735-4738.
- Rajic, A., Kweifio-Okai, G., Macrides, T., Sandseman, R.M., chandler, D.S., Polya, G.M., 2000. Inhibition of serine proteases by antiinflammatory triterpenoids. Planta Medica 66, 206–210.
- Salatino, A., Weinstein-Teixeira, E., Negri, G., Message, D., 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. eCAM 2 (1) 33–38.
- Saleem, M., Kaur, S., Kweon, M.H., Adhami, V.M., Afag, P., Mukhtar, H., 2005. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. Carcinogenesis 26 (11) 1956–1964.
- Stiti, N., Hartmann, M.A., 2012. Nonsterol triterpenoids as major constituents of Olea europaea. J. Lipids 2012, http://dx.doi.org/10.1155/2012/476595, 13 p. Article ID 476595.
- Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Kitajima, F.M., Aimi, N.F., 2000. Triterpenoids from Thai medicinal plant, Willughbeia firma. Nat. Med. 54, 155–157.
- Vilegas, J.H.Y., Lancas, F.M., Vilegas, W., 1997. Further triterpenes, steroids and furanocoumarins from Brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). J. Braz. Chem. Soc. 8 (5) 529-535.