

**BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOS HALOGENADOS POR MEDIO DE  
LOS HONGOS MARINOS *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM* Y  
*GEOTRICHUM SP.***

**POR: SILVIA MILENA OREJARENA DÍAZ  
CÓD. 2012068**

**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA.  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE BIOQUÍMICA E INGENIERÍA DE  
PROTEÍNAS.  
ESCUELA DE QUÍMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
BUCARAMANGA  
COLOMBIA  
2007**

**BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOS HALOGENADOS POR MEDIO DE  
LOS HONGOS MARINOS *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM* Y  
*GEOTRICHUM SP.***

**POR: SILVIA MILENA OREJARENA DÍAZ  
CÓD. 2012068**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE QUÍMICO**

**DIRIGIDO POR:**

**Dr. RODRIGO TORRES SÁEZ  
ESCUELA DE QUÍMICA, FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**Dr. AURELIO SAN MARTÍN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
BUCARAMANGA  
COLOMBIA  
2007**

## **DEDICATORIA**

***A DIOS, POR ACOMPAÑARME SIEMPRE EN TODO MOMENTO DE DIFICULTAD. A MIS PADRES Y A MIS HERMANOS, POR LA FORTALEZA Y EL APOYO INCONDICIONAL EN ESTE PROCESO DE FORMACIÓN PROFESIONAL.***

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis más sinceros agradecimientos:

A mis padres y hermanos por todo el apoyo recibido durante mi formación profesional.

A mis Profesores Aurelio San Martín y Rodrigo Torres, por su confianza y por darme la oportunidad de realizar este proyecto.

A mis Profesoras Cristina Chamy y Juana Roviroso por su apoyo en el desarrollo de éste trabajo de investigación.

Al Proyecto FONDECYT N° 1040895 Y Proyecto Anillo ACT-38, por la financiación de este trabajo de investigación.

A mis calificadores Aide Perea Villamil y Jairo René Martínez, por acompañarme en el proceso de evaluación.

A mis amigos y compañeros de trabajo por su paciencia, ayuda y disposición incondicional.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. MARCO DE REFERENCIA</b>	2
2.1 Antecedentes generales	2
2.2 Fundamentos teóricos	8
2.2.1 Metabolismo primario y secundario	8
2.2.2 Algas	8
2.2.2.1 Algas del género <i>Laurencia</i>	9
2.2.3 Hongos	9
2.2.3.1 Hongos filamentosos	12
2.2.4 Terpenos	17
2.2.4.1 Sesquiterpeno pacifenol	19
2.2.5 Biotransformaciones	21
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	24
3.1 Materiales	24
3.2 Metodología Experimental	24
3.2.1 Reacciones preliminares del sesquiterpeno pacifenol	25
3.2.1.1 Deshidratación del pacifenol	25
3.2.1.2 Deshalogenación del pacifenol	26
3.2.2 Biotransformación de los sesquiterpenos pacifenol, pacifidieno y $\Delta^2$ -3-decloropacifenol	26
3.2.2.1 Cultivo de las cepas a escala de laboratorio en medio sólido	27
3.2.2.2. Elaboración del medio de cultivo líquido e inoculación de las cepas de los hongos: <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Geotrichum sp.</i> y <i>Mucor sp.</i>	27

3.2.2.3 Adición del sustrato y control de la biotransformación	28
3.2.2.4 Extracción y purificación del producto de biotransformación	29
3.2.3 Extracción de metabolitos secundarios de la cepa del hongo <i>Geotrichum sp.</i>	30
3.2.3.1 Elaboración del medio de cultivo líquido e inoculación de la cepa del hongo <i>Geotrichum sp.</i>	30
3.2.3.2 Extracción y purificación de metabolitos del hongo <i>Geotrichum sp.</i>	31
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
4.1 Reacciones preliminares	32
4.1.1 Reacción de deshidratación del pacifenol	32
4.1.2 Reacción de deshalogenación del pacifenol	34
4.2 Biotransformación de los sesquiterpenos pacifenol, pacifidieno y $\Delta^2$ -3-decloropacifenol	36
4.2.1 Cultivo de las cepas de los hongos <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Geotrichum sp.</i> , <i>Mucor sp.</i> y posterior adición del sustrato	36
4.2.2 Evaluación de la capacidad biotransformadora de las cepas de los hongos filamentosos <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Geotrichum sp.</i> y <i>Mucor sp.</i>	37
4.2.2.1 Evaluación de la biotransformación del sustrato pacifenol	38
4.2.2.2 Evaluación de la biotransformación del sustrato pacifidieno	46
4.2.2.3 Evaluación de la biotransformación del sustrato $\Delta^2$ -3-decloropacifenol	47
4.3 Extracción de metabolitos secundarios de la cepa <i>Geotrichum sp.</i>	48
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>57</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>59</b>

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Macro y micro nutrientes para un medio de cultivo.	11
<b>Tabla 2.</b> Composición nutricional del medio marino	28
<b>Tabla 3:</b> Estrategia de adición del sustrato a los medios fermentados	28
<b>Tabla 4:</b> Composición nutricional del medio Czapek	30
<b>Tabla 5.</b> Microorganismos y sustratos empleados en la biotransformación	38
<b>Tabla 6.</b> Resultados obtenidos de la biotransformación del pacifenol	40
<b>Tabla 7.</b> Datos espectroscópicos del pacifenol y el producto de biotransformación (3-hidroxidecloropacifenol) con los hongos <i>Mucor sp</i> , <i>Geotrichum sp</i> y <i>Penicillium brevicompactum</i> .	45
<b>Tabla 8.</b> Comparación de datos espectroscópicos del compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona obtenido en el laboratorio con los registrados en la literatura.	54

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura del Ácido micofenólico (MPA)	6
<b>Figura 2.</b> Estructura química del ciclopentano perhidrofenantreno	13
<b>Figura 3.</b> Estructura peróxido de ergosterol	15
<b>Figura 4.</b> Cepa <i>Geotrichum sp.</i>	16
<b>Figura 5.</b> Cepa <i>Penicillium brevicompactum</i>	16
<b>Figura 6.</b> Cepa <i>Mucor sp</i>	16
<b>Figura 7.</b> Estructura química del pacifenol.	19
<b>Figura 8.</b> Catió n del 3,7,7,11-tetrametilespiro [5, 5] undec-2-eno.	20
<b>Figura 9.</b> Estructura del $\gamma$ -bisaboleno	20
<b>Figura 10.</b> Estructura espiro[5,5]undecano.	20
<b>Figura 11.</b> Estructura química de los sesquiterpenos: (a) jonhntonol, (b) pacifenediol y (c) pacifidieno	21
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del producto de biotransformación del pacifenol mediante el hongo <i>Geotrichum sp.</i>	41
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del producto de biotransformación del pacifenol mediante el hongo <i>Mucor sp.</i>	42
<b>Figura 14.</b> Señales de los metilos pertenecientes al espectro de RMN- <sup>1</sup> H del producto 3-hidroxidecloropacifenol mediante el hongo <i>Mucor sp.</i>	43

<b>Figura 15.</b> Señales de los metilenos pertenecientes al espectro de RMN- <sup>1</sup> H del producto 3-hidroxidecloropacifenol mediante el hongo <i>Mucor sp</i>	44
<b>Figura 16.</b> Señales de los protones olefínicos y de los metinos pertenecientes al espectro de RMN- <sup>1</sup> H del producto 3-hidroxidecloropacifenol mediante el hongo <i>Mucor sp</i>	44
<b>Figura 17.</b> Estructura del pacifenol, 3-hidroxidecloropacifenol y pacifidieneo	47
<b>Figura 18.</b> Estructura del ergosterol y peróxido de ergosterol	49
<b>Figura 19.</b> Estructura de ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona	50
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del cetoesterol ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona	51
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona	52
<b>(a)</b> Ampliación región comprendida entre 10 y 90ppm	
<b>(b)</b> Ampliación región comprendida entre 120 y 200ppm	
<b>Figura 22.</b> Espectro <sup>13</sup> C-DEPT 135 del compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona	53
<b>Figura 23.</b> Espectro IR del compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona	55

## LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
<b>Esquema 1.</b> Transformaciones químicas del pacifenol	4
<b>Esquema 2.</b> Reacción de $\alpha$ -hidroxilación de la progesterona por el hongo <i>Rhizopus arrhizus</i>	5
<b>Esquema 3.</b> Biotransformación del pacifenol con el hongo <i>Penicillium brevicompactum</i>	7
<b>Esquema 4.</b> Biosíntesis de algunos esteroides	14
<b>Esquema 5.</b> Formación biosintética de terpenos.	17
<b>Esquema 6.</b> Reacción de deshidratación del pacifenol	25
<b>Esquema 7.</b> Reacción de deshalogenación del pacifenol.	26
<b>Esquema 8.</b> Obtención química del pacifidieno	33
<b>Esquema 9.</b> Mecanismo de deshidratación del pacifenol	33
<b>Esquema 10.</b> Obtención del $\Delta^2$ -3-decloropacifenol	35
<b>Esquema 11.</b> Mecanismo de deshalogenación del pacifenol	35
<b>Esquema 12.</b> Producto obtenido de la biotransformación del pacifenol con los hongos filamentosos <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Geotrichum sp.</i> y <i>Mucor sp.</i>	39

## RESUMEN

### TÍTULO

BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOS HALOGENADOS POR MEDIO DE LOS HONGOS MARINOS *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM* Y *GEOTRICHUM SP.*\*

**AUTOR:** SILVIA MILENA OREJARENA DÍAZ\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Biotransformación, terpenos, *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.*

### DESCRIPCIÓN:

En éste trabajo se realizó la biotransformación de los sesquiterpenos halogenados pacifenol, pacifidieno y  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol por medio de las cepas de hongos marinos *Penicillium brevicompactum* y *Geotrichum sp.* Alternativamente, se llevó a cabo la biotransformación de estos sesquiterpenos con el hongo terrestre *Mucor sp.* Los microorganismos fueron cultivados en un medio sólido agar papa dextrosa (PDA) y posteriormente se inocularon en un medio marino líquido en el cual se llevo a cabo la biotransformación.

Los ensayos de biotransformación de los sesquiterpenos se llevaron a cabo en un medio de cultivo líquido enriquecido con extracto de levadura y glucosa. Las modificaciones de la estructura original del sustrato, se evidenciaron por medio de cromatografía en capa fina y se caracterizaron los productos finales de fermentación por RMN de  $^1\text{H}$ . Dichos espectros de RMN mostraron que el pacifenol fue biotransformado por las cepas *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.* produciendo un compuesto hidroxilado con fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{Br}_2$ . (3-hidroxidecloropacifenol). Por otro lado, solo se evidenció la transformación del sustrato pacifidieno por la cepa *Mucor sp.*, mientras que el sustrato  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol no mostró señales de transformación en las condiciones de reacción estudiadas con ninguna de las dos cepas de hongos *Penicillium brevicompactum* y *Mucor sp.*

Adicionalmente al trabajo de biotransformación, se identificaron metabolitos secundarios del hongo *Geotrichum sp.* en medio de cultivo líquido, obteniendo compuestos como el ergosterol ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ ), peróxido de ergosterol ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ ) y el ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona ( $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}$ ) que no había sido aislado de hongos filamentosos como el *Geotrichum sp.*

\*Proyecto de grado.

\*\*Facultad de ciencias. Escuela de química. Director: Rodrigo Torres Sáez.

## ABSTRACT

### TITLE

BIOTRANSFORMATION OF HALOGENATED TERPENES BY *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM* AND *GEOTRICHUM SP*\*.

**AUTHOR:** SILVIA MILENA OREJARENA DIAZ.\*\*

**KEY WORDS:** Biotransformation, terpenes, *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp*, *Mucor sp*.

### DESCRIPTION:

In this work, biotransformation of halogenated sesquiterpenes, pacifenol, pacifidieno, and  $\Delta^2$ -3-dichlorinepacifenol was performed by using of marine fungi strains of *Penicillium brevicompactum* and *Geotrichum sp*. Additionally, biotransformation of these sesquiterpenes using the terrestrial fungi *Mucor sp* was carried out. The microorganisms were grown in a solid medium potato dextrose agar (PDA) and then inoculated in a marine environment liquid in wich was carried out the biotransformation.

Sesquiterpene biotransformation assays were carried out in a liquid culture medium enriched with yeast extract and glucose. Structural modifications of original substrate were evidenced by means of Thin Layer Chromatography (TLC), and the final fermentation products were characterized by  $^1\text{H}$  NMR. The obtained spectra obtained showed that pacifenol was biotransformed by *Penicillium brevicompactum* and *Geotrichum sp*. strains, producing a hidroxyl compound with molecular formula  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{Br}_2$  (3-hidroxydichlorinepacifenol). On the other hand, pacifidieno was only transformed by *Mucor sp* strain while  $\Delta^2$ -3-dichlorinepacifenol was not transformed with any of the strain from fungus *Penicillium brevicompactum* and *Mucor sp* in the studied reaction conditions.

Additionally, it was possible to identify secondary metabolites from *Geotrichum sp* in a liquid culture medium, obtaining compounds such as ergosterol ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ ), ergosterol peroxide ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ ), and ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one ( $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}$ ), these product were not isolated before from filamentous fungus

\*Chemistry degree project

\*\*Faculty of science. School of chemistry. Director: Rodrigo Torres Sáez

## 1. INTRODUCCIÓN

En años recientes, los metabolitos derivados de plantas han sido usados como sustratos de partida para la síntesis parcial de nuevas sustancias que aumentan su actividad biológica.<sup>1</sup> Debido a esto, algunos compuestos, tales como los terpenos, han tenido una gran acogida a nivel comercial por su potencial uso en la prevención y terapia de varias enfermedades. Estas moléculas orgánicas pueden ser modificadas químicamente y así obtener compuestos con un mayor potencial biológico. Dichas modificaciones pueden ser realizadas por medio de biotransformaciones, que permiten la obtención de nuevas moléculas bajo condiciones suaves de reacción. Los productos de estas biotransformaciones son considerados como naturales, ya que son llevados a cabo por ejemplo, mediante diferentes tipos de microorganismos, que se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes.

En este sentido, se han llevado a cabo estudios preliminares, los cuales indican por ejemplo, que la abundancia de la diversidad microbiana en los océanos del mundo presenta un futuro prometedor para el descubrimiento de nuevas sustancias medicinales.

En las biotransformaciones realizadas con hongos se presentan generalmente diversos productos que provienen del metabolismo microbiano; lo que complica la identificación del compuesto biotransformado. Sin embargo, el avance actual en la tecnología y los procesos de biotransformación, sugieren que la producción de muchos compuestos terpénicos biotransformados puede ser económicamente viable y factible en un futuro cercano.<sup>2</sup>

## 2. MARCO DE REFERENCIA

### 2.1 ANTECEDENTES GENERALES

En la búsqueda de nuevos compuestos químicos bioactivos, el hombre ha iniciado investigaciones sobre las características farmacológicas de productos naturales marinos, debido principalmente a que el ambiente oceánico es un depósito excepcional de productos naturales bioactivos. Estas moléculas, exhiben generalmente características estructurales y químicas no encontradas en los productos naturales terrestres, lo que ha conducido al descubrimiento de muchos agentes activos considerados dignos de uso clínico.

Hasta la fecha, los investigadores han aislado aproximadamente 7000 productos naturales marinos; el 33 por ciento proviene de esponjas, el 25 por ciento de algas, el 24 por ciento de invertebrados como los moluscos y el 18 por ciento de algunos corales. Un análisis de estos datos revela que la búsqueda de nuevos productos bioactivos originarios del océano aumenta en un 10 por ciento cada año.<sup>3</sup>

W. Bergman podría ser considerado el pionero en el estudio de productos naturales marinos para uso medicinal, ya que en 1949 inició una búsqueda de agentes antibacterianos en especies oceánicas,<sup>4</sup> provocando un fuerte interés científico hacia organismos marinos como una fuente de metabolitos activos estructuralmente diverso y farmacológicamente más interesante.

Una de las mayores fuentes de metabolitos activos de origen marino la constituyen las algas. Así por ejemplo, algas del género *Laurencia sp.* han sido extensamente estudiadas, describiéndose en ellas, una amplia variedad de metabolitos secundarios.

La gran mayoría de los compuestos aislados son halogenados y pueden clasificarse en sesquiterpenos, diterpenos y metabolitos de 15 carbonos no terpenoides.<sup>5</sup> Así por ejemplo, en 1971, Sims y Fenical, aislaron el compuesto pacifenol del alga *Laurencia pacífica*.<sup>6</sup> Años después, en 1986, fue aislado el mismo de la especie *Laurencia majuscula*, por Caccamese, Compagnini & Toscazo.<sup>7</sup> A su vez, ese mismo año, se realizó la redeterminación de su estructura por medio de difracción de rayos X.<sup>8</sup>

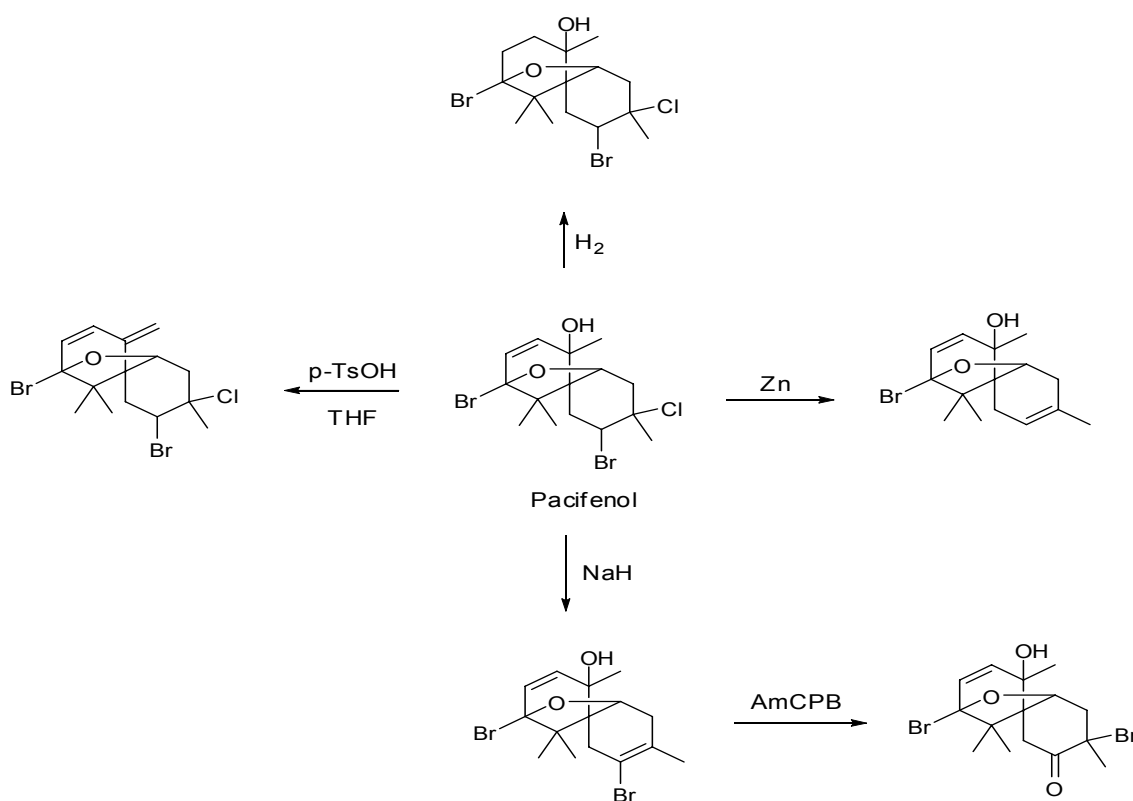
En el año 1989, se inició un estudio del alga marina *Laurencia claviformis* de la Isla de Pascua (Chile), en la cual se encontraron metabolitos secundarios halogenados especialmente sesquiterpénicos. Muchos metabolitos halogenados presentan actividades biológicas, entre las que se incluyen propiedades antivirales y antimicrobianas. El compuesto identificado como mayoritario en la especie *Laurencia claviformis* fue el pacifenol, al cual se le han realizado una serie de transformaciones químicas (Esquema 1). Además, se ha determinado la actividad antimicrobiana frente a microorganismos que comprenden bacterias Gram positivas y Gram negativas.<sup>9</sup>

Posteriormente, debido a la moderada actividad del pacifenol, éste fue utilizado como precursor en la síntesis de varios derivados de plaguicidas<sup>10</sup> y algunos de sus derivados obtenidos por transformaciones químicas fueron expuestos a diversos ensayos biológicos probando el efecto que poseen sobre la división celular del huevo fecundado del erizo *Tetrapygyus niger* y la toxicidad frente a *Artemia salina*.<sup>5</sup>

Una herramienta adicional para aumentar la actividad de algunos productos naturales es llevar a cabo biotransformaciones por medio de microorganismos. Éstos realizan transformaciones que involucran hidroxilaciones, oxidaciones, epoxidaciones, reducciones, apertura y cierre de anillos; reacciones que son posibles gracias a las enzimas que emplean los microorganismos para catalizar las reacciones metabólicas.

Las estructuras obtenidas por medio de las biotransformaciones, son potencialmente interesantes para efectuar posteriores bioensayos y una posible solución para llevar a cabo reacciones que presentan complicaciones en síntesis orgánica.<sup>2</sup>

**Esquema 1.** Transformaciones químicas del pacifenol<sup>9</sup>



Una de las primeras aplicaciones en biotransformaciones fue la realizada por Pasteur, quien en 1858 usó el hongo *Penicillium glaucum* para obtener L-tartrato de amonio a partir del DL-tartrato de amonio por medio de la destrucción selectiva del D-enantiomero.

En 1874, Dumas descubre la acción reductiva del hongo unicelular, *Saccharomyces cerevisiae* de tipo levadura, que describe la conversión del sulfuro a sulfuro de hidrógeno. En 1914, Carl Neuberg experimentó con la misma

levadura, y desarrolló la producción microbiana de glicerol por medio de la fermentación gliceropirúvica.

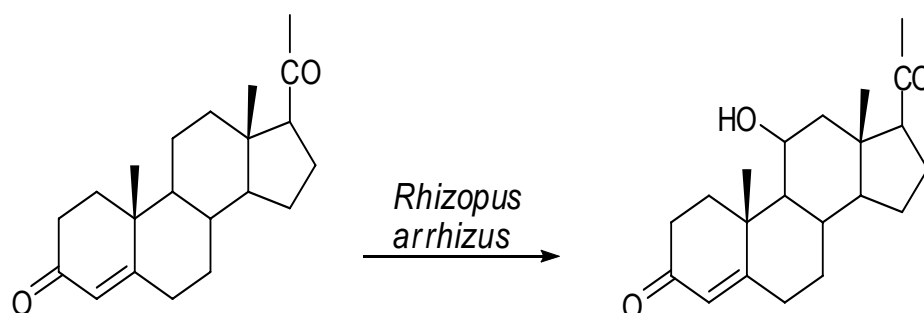
Años después, en 1928, Alexander Fleming descubrió la penicilina, mientras observaba que el hongo *Penicillium notatum*, mataba los cultivos de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Tras cultivar el hongo en medio líquido y separar el líquido de las células, encontró que el líquido celular podía inhibir el crecimiento de muchas especies bacterianas.

En 1933 varias especies del hongo *Penicillium*, fueron usadas para realizar alquilaciones reductivas, y entre 1938 y 1940, Chain y Florey, los padres de la industria biotecnológica, diseñaron un medio de cultivo líquido para hacer crecer el hongo *Penicillium*, así como los recipientes adecuados llamados fermentadores o biorreactores, donde el hongo podía cultivarse a gran escala sin ser contaminado por otros microorganismos.

En 1952, Murray y Patterson patentaron el proceso de  $\alpha$ -hidroxilación de la progesterona mediante el hongo *Rhizopus arrhizus*, proceso difícil de conseguir por medio de síntesis orgánica. (Esquema 2).

Con el tiempo, este tipo de reacciones fue cobrando gran importancia para la producción de hormonas esteroidales y sus análogos a escala comercial.<sup>11</sup>

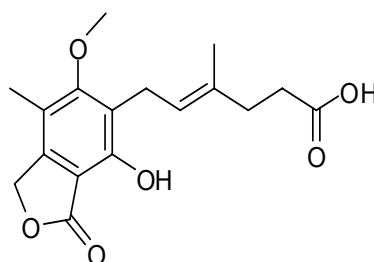
**Esquema 2.** Reacción de  $\alpha$ -hidroxilación de la progesterona por el hongo *Rhizopus arrhizus*.



En este sentido, se ha llevado a cabo la biotransformación microbiana de compuestos aislados de organismos marinos. Así por ejemplo, recientemente se ha realizado la biotransformación de los sesquiterpenos marinos (S)-(+)-curcufenol y (S)-(+)-curcudiol, aislados de la esponja jamaicana, *Didiscus oxeada*. En este estudio se utilizó la levadura *Kluyveromyces marxianus*, que tiene la capacidad de deshalogenar compuestos que contienen cloro en su estructura.<sup>12</sup>

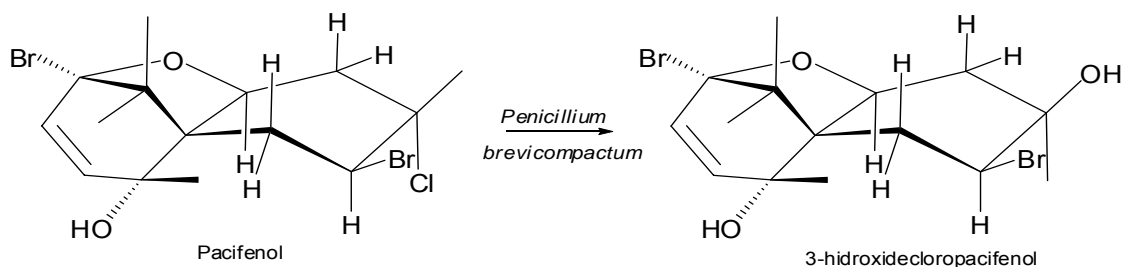
Esta misma propiedad, la presenta el hongo *Penicillium camemberti* y el hongo *Penicillium brevicompactum* que tienen la capacidad de eliminar el cloro en compuestos polifenólicos y de los cuales se han aislado metabolitos secundarios, como el ácido micofenólico (MPA), (Figura 1).<sup>13</sup>

**Figura 1.** Estructura del Ácido micofenólico (MPA)



En el año 2005, el hongo *Penicillium brevicompactum*, fue utilizado para realizar la biotransformación del pacifenol, un metabolito secundario aislado del alga *Laurencia claviformis*. De esta biotransformación (Esquema 3), se obtuvo un nuevo metabolito con fórmula molecular  $C_{15}H_{22}O_3Br_2$  al cual se le realizaron ensayos de actividad antibacteriana con varios microorganismos, entre ellos la bacteria *Staphylococcus enteriditis*.

**Esquema 3.** Biotransformación del pacifenol con el hongo *Penicillium brevicompactum*



Al mismo tiempo, a uno de los derivados del pacifenol, el pacifidieno, obtenido mediante deshidratación semisintética, o aislado directamente de algas tipo *Laurencia* o moluscos como la *Aplysia*, se le encontró una fuerte actividad antibacteriana contra *B. cereus*.<sup>14</sup>

En algunas biotransformaciones de terpenos, se ha utilizado la cepa *Mucor plumbeus*, para activar algunos carbonos en diterpenos como el epicandicandiol, candicandiol<sup>15</sup> y ribenona<sup>16</sup>, sesquiterpenos como el valerianol<sup>17</sup> y patchulol,<sup>18</sup> originando un cambio en la orientación del grupo hidroxilo presente en estos compuestos.<sup>15</sup>

Otra especie de hongo filamentoso empleado para realizar biotransformaciones es el hongo *Geotrichum sp*, que ha sido utilizado para biotransformar algunos reactivos azo colorantes usados en la industria<sup>19</sup>, ciclohexanona<sup>20</sup> y aceite de ricino.<sup>21</sup>

## **2.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

### **2.2.1 Metabolismo primario y secundario**

El metabolismo es la suma de todas las reacciones bioquímicas que tienen lugar en un organismo y todas las moléculas que ingresan a éste son procesadas de diversos modos.<sup>22</sup>

El metabolismo primario involucra todos los procesos químicos que intervienen en forma directa en la conservación, crecimiento y reproducción del organismo; mientras que el metabolismo secundario es la suma de los procesos no esenciales para las funciones metabólicas básicas de la célula; siendo los metabolitos secundarios no necesarios para el crecimiento del organismo que los produce.<sup>23</sup>

### **2.2.2 Algas**

Las algas son organismos autótrofos, incapaces de sintetizar sus metabolitos esenciales a partir de sustancias inorgánicas. De ésta manera, absorben la energía solar o fuentes inorgánicas como el dióxido de carbono y las convierten en moléculas orgánicas, utilizadas para desarrollar funciones biológicas como su propio crecimiento celular.<sup>24</sup>

Las algas, así como otros organismos marinos, producen una increíble diversidad de metabolitos secundarios. Estos metabolitos son compuestos químicos sintetizados por las algas y cumplen funciones no esenciales en ellas, ya que no intervienen en el metabolismo primario.<sup>25</sup> Los metabolitos secundarios de las algas y plantas pueden ser divididos en tres grandes grupos en base a su estructura química: Terpenoides, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados.<sup>23</sup>

La elaboración de metabolitos secundarios por parte de las algas, puede estar influenciada por varios factores externos, tales como las condiciones ambientales predominantes, por ejemplo, la presencia de depredadores, infecciones producidas por parásitos, temperatura del agua, profundidad y nutrientes presentes en el medio.<sup>26</sup>

#### **2.2.2.1 Algas del género *Laurencia***

Las algas del género *Laurencia*, familia *Rhodomelaceae* (familia que se caracteriza básicamente por presentar una estructura interna visible y corteza compacta), son algas rojas, reconocidas como las mayores productoras de sustancias halogenadas del medio marino. En algas del género *Laurencia*, se han encontrado metabolitos secundarios del tipo sesquiterpénicos halogenados y debido a esto han sido ampliamente estudiadas y hoy son catalogadas como una fuente fascinante de nuevos productos naturales.<sup>27</sup>

De las especies de esta alga roja, *Laurencia pacífica*, *Laurencia majuscula* y *Laurencia claviformis*, se han aislado sesquiterpenos halogenados, entre los cuales se encuentra el pacifenol, un sesquiterpeno halogenado con esqueleto tipo espiro.<sup>6,7,9</sup>

#### **2.2.3 Hongos**

Durante mucho tiempo los hongos fueron clasificados dentro del Reino *Plantae* ya que fueron considerados organismos inmóviles presentando estructuras que se asientan firmemente en el sustrato sobre el que crecían. Sin embargo, cuando se ha aplicado la biología molecular en los estudios taxonómicos, se ha observado que los hongos están más próximos al Reino *Animalia* que al *Plantae*. Actualmente, los hongos se clasifican en un reino separado y desempeñan un papel ecológico importante, ya que descomponen materia orgánica y son de gran

utilidad en la industria alimenticia, farmacéutica, de productos biotecnológicos y en el control biológico de plagas y enfermedades.<sup>28</sup>

Estos microorganismos son organismos eucarióticos incapaces de fijar carbono a través de la fotosíntesis, debido a esto, usan el carbono fijado por otros organismos para su metabolismo. Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares, tienen una membrana plasmática (donde predomina el ergosterol en vez de colesterol), núcleo, cromosomas, y orgánulos intracelulares, como mitocondrias y retículo endoplasmático. La mayoría de estos microorganismos, están constituidos por finas fibras llamadas hifas que secretan ácidos y enzimas que biodegradan el material orgánico en compuestos de menor complejidad y de fácil digestión. La proliferación de estas hifas forma lo que se conoce como micelio.<sup>29</sup>

La mayoría de los hongos se reproducen por esporas, las cuales son diminutas partículas de protoplasma rodeadas de pared celular. Las esporas se forman de dos maneras. En el primer proceso, las esporas se originan después de la unión de dos o más núcleos, lo que ocurre dentro de una o de varias células especializadas. Estas esporas, que tienen características diferentes, heredadas de las distintas combinaciones de genes de sus progenitores, suelen germinar en el interior de las hifas. Los cuatro tipos de esporas que se producen de esta manera (oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas) definen los cuatro grupos principales de hongos.

Los cuatro *Phylums* principales en los hongos son: *Oomicetes (Oomycota)*, *Zigomicetes (Zygomycota)*, *Ascomicetes (Ascomycota)* y *Basidiomicetes (Basidiomycota)*. Una gran variedad de especies se colocan, de forma arbitraria, en un quinto filo: *Deuteromicetes (Deuteromycota)*, también llamados hongos imperfectos. Se incluyen en este grupo aquellos hongos en los que sólo se

conocen procesos de multiplicación vegetativa. Sin embargo, la mayoría de esas especies están emparentadas con los *Ascomycetes*.<sup>30</sup>

Los hongos viven en ambientes naturales, donde su crecimiento es afectado tanto por las interacciones con otras poblaciones como por las características físicas y químicas de su entorno. Consecuencia de esas interacciones, se producen metabolitos secundarios, con actividades biológicas variadas, que juegan un papel importante en su supervivencia.<sup>31</sup>

No obstante, la generación de energía y de metabolitos primarios y secundarios en los microorganismos, depende considerablemente de los macro y micro nutrientes que obtienen de su medio de cultivo.<sup>29</sup> (Tabla 1)

**Tabla 1.** Macro y micro nutrientes para un medio de cultivo.<sup>29</sup>

<b>Macronutrientes</b>	
En compuestos orgánicos	En solución
Carbono (CO <sub>2</sub> )	Potasio (K <sup>+</sup> )
Hidrógeno (H <sub>2</sub> O)	Sodio (Na <sup>+</sup> )
Oxígeno (O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O)	Cloro (Cl <sup>-</sup> )
Nitrógeno (NH <sub>3</sub> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N <sub>2</sub> )	Cálcio (Ca <sup>2+</sup> )
Azufre (H <sub>2</sub> S, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	Magnesio (Mg <sup>2+</sup> )
Fósforo (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ).	Hierro (Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , FeS, Fe(OH) <sub>3</sub> )
<b>Micronutrientes</b>	
En solución	
Cobre (Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup> ), Manganeseo (Mn <sup>2+</sup> )	
Cobalto (Co <sup>2+</sup> ), Zinc (Zn <sup>2+</sup> )	
Molibdeno (Mo <sup>2+</sup> ), Níquel (Ni <sup>2+</sup> )	

Los microorganismos generan metabolitos primarios durante la fase primaria del crecimiento, mientras que los metabolitos secundarios se forman cerca del final de esta fase, o en la fase estacionaria del crecimiento, siendo extremadamente dependientes de las condiciones en las cuales el hongo se reproduce, especialmente de la composición del medio.<sup>32</sup>

En el metabolismo secundario existen dos fases distintas denominadas trofofase e idiofase. La trofofase es la fase de crecimiento logarítmico mientras que la idiofase es la fase estacionaria donde normalmente se producen metabolitos secundarios. El metabolito secundario se produce, generalmente, a partir de varios productos intermedios que se acumulan, bien en el medio de cultivo o bien en las células, durante el metabolismo primario. La mayoría de los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas complejas que para su formación requieren un gran número de reacciones enzimáticas. Sin embargo, las vías metabólicas de estos metabolitos secundarios comienzan en el metabolismo primario porque los materiales de partida para el metabolismo secundario vienen de las vías biosintéticas principales.<sup>29</sup>

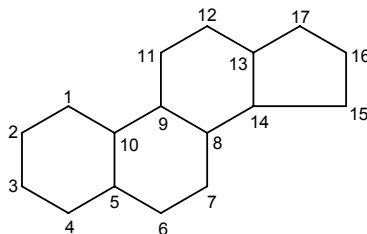
### **2.2.3.1 Hongos filamentosos**

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentososa y otra unicelular denominada levaduriforme. Los hongos filamentosos (miceliares o mohos), son aerobios y representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos. En medio de cultivo sólido y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen, producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características. La mayoría de hongos filamentosos tienen la capacidad de realizar transformaciones químicas quirales, lo cual ofrece múltiples aplicaciones en la química de productos naturales y síntesis orgánica, ya que pueden biotransformar sustancias como alcaloides, antibióticos, ácidos grasos y aminoácidos. De esta forma, los hongos filamentosos, son un medio útil

para acceder a nuevos productos biológicamente activos, o con elementos estructurales que sugieren bioactividad.<sup>28, 32</sup>

En los hongos, junto con los animales y algunas algas rojas, se encuentra una serie de compuestos llamados esteroides, que son lípidos presentes en las membranas de la mayoría de las células eucarióticas. Los esteroides, se derivan del escualeno, un terpeno que por medio de biosíntesis genera ciclopentano perhidrofenantreno (Figura 2), el cual es un hidrocarburo policíclico.<sup>24, 33</sup>

**Figura 2.** Estructura química del ciclopentano perhidrofenantreno

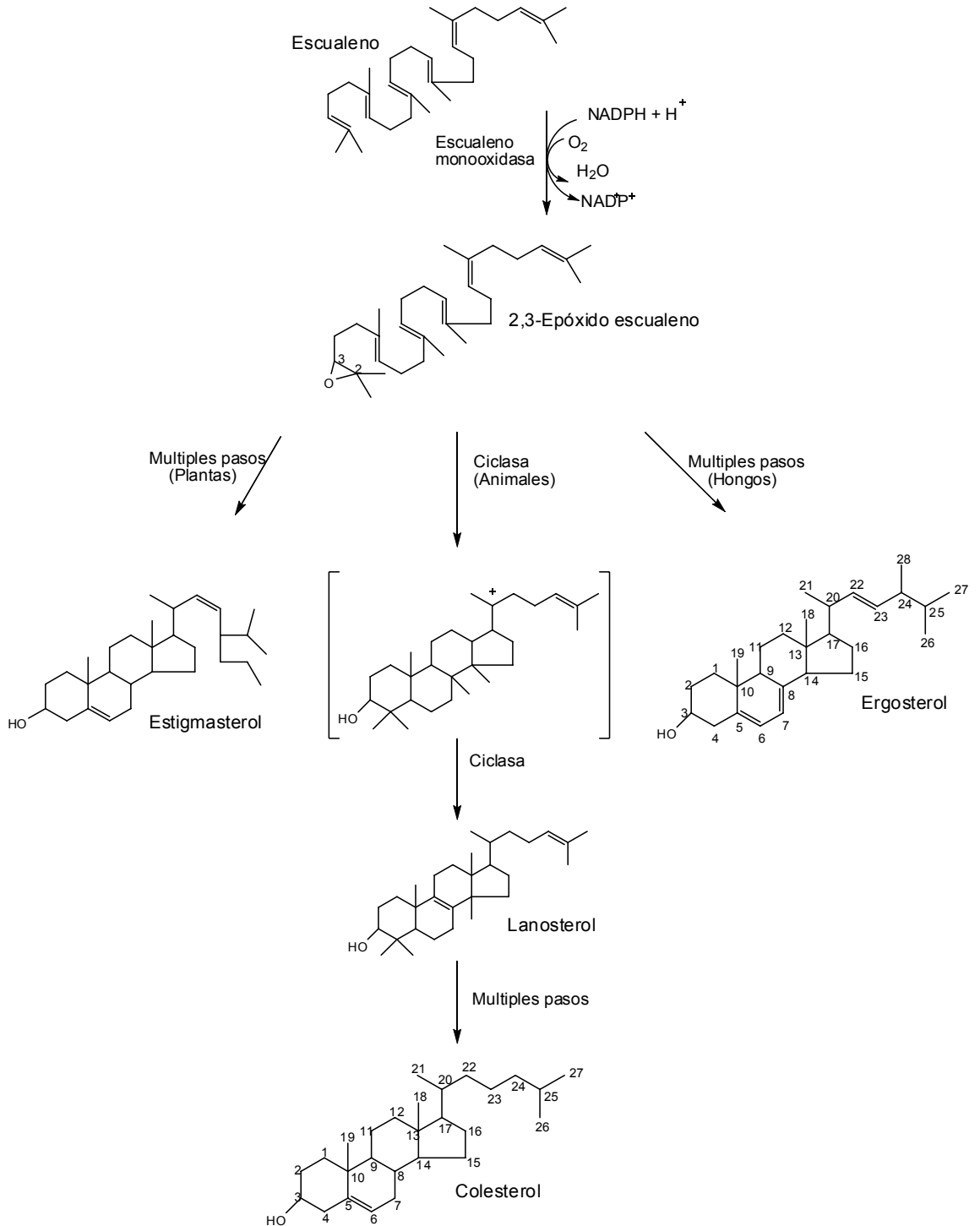


Los esteroides, ácidos y sales biliares y hormonas esteroideas pertenecen al grupo de los esteroides. Los esteroides son moléculas rígidas y planas, que refuerzan las membranas celulares en los eucariotas.

Los esteroides más abundantes en las plantas superiores son el  $\beta$ -sitosterol y el estigmasterol, que difieren del colesterol solo en las cadenas alifáticas. Las levaduras y hongos filamentosos contienen otros esteroides en sus membranas como el ergosterol, que presenta tres insaturaciones en su estructura química. (Esquema 4)<sup>24, 34, 35</sup>

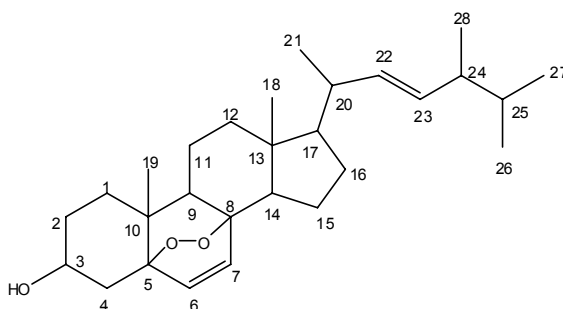
Numerosas investigaciones se han realizado acerca de los esteroides que contienen algunos hongos y levaduras; el ergosterol fue uno de los primeros esteroides aislados tanto de hongos silvestres como cultivados, y es un importante precursor sintético de la vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol).<sup>36, 37</sup>

**Esquema 4. Biosíntesis de algunos esteroides.**<sup>35</sup>



El peróxido de ergosterol (Figura 3), es otro de los esteroides naturales que ha sido obtenido de una variedad de hongos (*Ganoderma carnosum*, *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps cicadae* y varias especies de *Aspergillus*), líquenes, esponjas y mamíferos marinos; considerado como un compuesto inmunosupresor, con actividad antiviral y antitumoral.<sup>38</sup>

**Figura 3.** Estructura peróxido de ergosterol



Son muchos los hongos filamentosos con los cuales se han realizado biotransformaciones, por esta razón, tres de ellos se han utilizado en este proyecto de investigación para biotransformar sustratos sesquiterpénicos.

Los hongos fueron los siguientes:

- ***Geotrichum sp.*** (Marino): Hongo filamentosos del *Phylum Ascomycota*. Se ha aislado de los sedimentos de la bahía de Concepción (Chile), a 88 metros de profundidad. Forma colonias de crecimiento moderado, y aterciopelada, con colores blancos durante su etapa de crecimiento. (Figura 4).<sup>39</sup>
- ***Penicillium brevicompactum*** (Marino): Hongo filamentosos del *Phylum Ascomycota*. Forma colonias de crecimiento moderado, vellosa, aterciopelada, con colores verdes y fisuras radiales. Es incapaz de crecer a 37 °C. (Figura 5).<sup>28</sup>

**Figura 4.** Ceba *Geotrichum sp.*



**Figura 5.** Ceba *P. brevicompactum.*



- ***Mucor sp.*** (Terrestre): Hongo filamentoso del *Phylum Zygomycota* que presenta esporangióforos con ramificación irregular. Forma colonias de crecimiento rápido, muy vellosas, algodonosas, blancas al principio, después, al fructificar, toman un gris oscuro o pardo (Figura 6).<sup>28</sup>

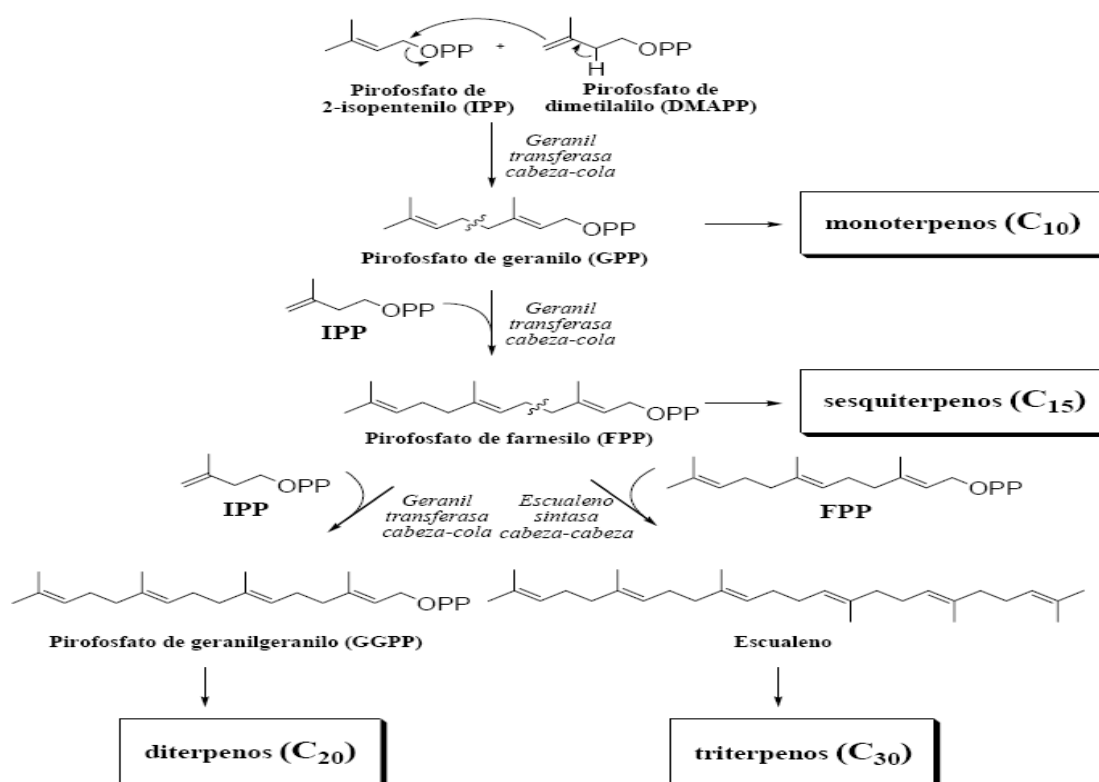
**Figura 6.** Ceba *Mucor sp.*



## 2.2.4 Terpenos

Posiblemente la química orgánica de los productos naturales se inició con el aislamiento de terpenoides en forma de aceites esenciales. Los terpenos forman una amplísima y muy diversa familia de sustancias naturales, y tradicionalmente se han considerado derivadas del 2-metilbutadieno, conocido como isopreno. La formación biosintética de los distintos tipos de terpenos a partir del isopreno tiene lugar mediante uniones mayoritariamente cabeza-cola o cabeza-cabeza originando cadenas acíclicas de varios átomos de carbono<sup>40</sup> (Esquema 5). Sin embargo, el isopreno no es el precursor de los terpenos, ya que no es un producto natural, el verdadero precursor de los terpenos es el ácido mevalónico (ácido 3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), el cual proviene de la acetilcoenzima A (Ac-CoA).<sup>41</sup>

**Esquema 5.** Formación biosintética de terpenos.<sup>40</sup>



La ruta biogénica se inicia por condensación de dos moléculas de AcCoA, dando acetoacetil-CoA, el cual se condensa a su vez con otra molécula de AcCoA originando 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Este compuesto se reduce para convertirse en ácido mevalónico y posteriormente por fosforilación y descarboxilación, en isopentenilpirofosfato (IPP), el cual, por isomerización da lugar a dimetilalil-pirofosfato (DAMPP), compuesto altamente reactivo. La condensación, mediante unión cabeza-cola de estos dos últimos compuestos origina el geranyl pirofosfato (GPP) que posee 10 átomos de carbono y es precursor de un gran número de principios activos vegetales (monoterpenos, iridoides y algunos alcaloides). El acoplamiento a este GPP de nuevas unidades de IPP origina moléculas de mayor peso molecular, incrementándose el número de carbonos de cinco en cinco:<sup>40, 41</sup>

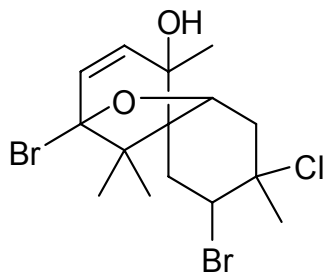
- Monoterpenos: (C-10), están formados por dos unidades de isopreno. En este grupo se encuentran los aceites esenciales de muchas plantas, a las que dan su olor y sabor característicos, tales como mentol, geraniol, limoneno,  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno, alcanfor entre otros.
- Sesquiterpenos: (C-15), formados por tres unidades de isopreno; el sesquiterpeno más sencillo es el farnesol, sustancia de olor agradable presente en numerosas plantas, pero en pequeñas cantidades.
- Diterpenos: (C-20), formados por cuatro unidades de isopreno. Es de destacar el fitol que forma parte de la clorofila y es precursor de la vitamina A. Las vitaminas E y K son también diterpenos.
- Tetraterpenos: (C-40), formados por ocho unidades de isopreno. En este grupo son abundantes las xantofilas y carotenos, pigmentos vegetales amarillo y anaranjado respectivamente.

- Politerpenos: (C-n), formados por n unidades de isopreno. Es de destacar el caucho, obtenido del *Hevea brasiliensis*, que contiene miles de isoprenos y se usa en la fabricación de objetos de goma.<sup>41, 42</sup>

#### 2.2.4.1 Sesquiterpeno pacifenol

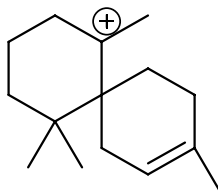
El pacifenol (Figura 7) es un sesquiterpeno aislado por métodos cromatográficos convencionales desde el extracto con acetato de etilo del alga *Laurencia claviformis*. Esta especie de alga fue recolectada en diferentes lugares de la Isla de Pascua (Vinapu, Vaihu, Hanga to tenga y Anakena), comprobándose que todos los lotes recolectados tenían la misma composición cualitativa y sólo algunas diferencias en los componentes minoritarios. Estos resultados sugieren que en esta especie de alga no habría variaciones genéticas que se manifiesten en la composición química, como se ha informado en otras especies de este género.<sup>9</sup>

**Figura 7.** Estructura química del pacifenol

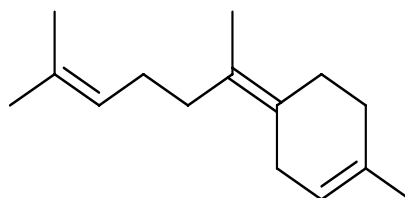


El pacifenol, presenta una estructura de sesquiterpeno tricíclico que podría ser derivada del ión (Figura 8) que se produce por la ciclación del  $\gamma$ -bisaboleno (Figura 9), que también ha sido postulado como precursor de varios tipos de sesquiterpenos.<sup>43</sup>

**Figura 8.** Cación del 3,7,7,11-tetrametilespiro[5,5]undec-2-eno

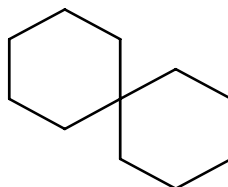


**Figura 9.** Estructura del  $\gamma$ -bisaboleno



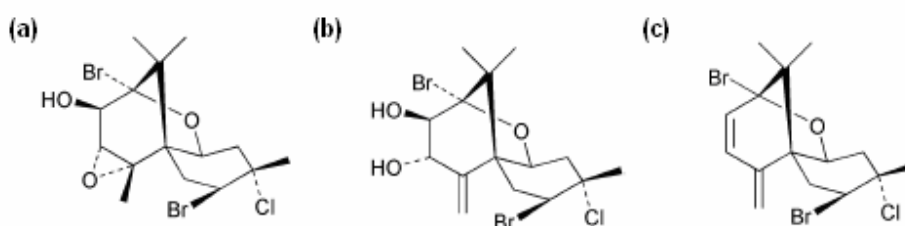
El pacifenol es el primer compuesto natural que presenta Br y Cl en un esqueleto espiro-[5,5]-undecano<sup>6, 43</sup> (Figura 10). Este sesquiterpeno también puede ser aislado del molusco *Opisthobranchio*, *Aplysia dactylomela*; ya que esta especie se alimenta de algas marinas del género *Laurencia*. El molusco acumula en sus glándulas digestivas los metabolitos que obtiene de su dieta. Por lo tanto, al aislar uno de estos metabolitos, cabe esperar que su estructura sea similar o idéntica a la de su fuente inicial, es decir, a algas del género *Laurencia*.<sup>44</sup>

**Figura 10.** Estructura espiro[5,5]undecano



Además del pacifenol, del molusco *A. dactylomela*, se han aislado compuestos conocidos como el johnstonol, pacifenediol y pacifidieno (Figura 11).<sup>45</sup> Este último también fue encontrado en la glándula digestiva del molusco *Aplysia californica* y en la especie *Laurencia pacifica*.<sup>27</sup>

**Figura 11.** Estructura química de los sesquiterpenos: (a) Jonhntonol (b) pacifenediol (c) pacifidieno



Debido a que estos metabolitos han revelado actividad bactericida, fungicida y antitumoral, se ha realizado la caracterización estructural de estas moléculas por resonancia magnética nuclear (RMN) en una y dos dimensiones.<sup>46</sup>

### 2.2.5 Biotransformaciones

El uso de sistemas biológicos para originar cambios químicos en compuestos que no son sustratos naturales, se conoce como biotransformación; que se distingue de la biosíntesis, que se refiere a la capacidad sintética natural de sistemas biológicos en su hábitat normal.

Existen transformaciones xenobióticas que involucran biotransformaciones de sustratos que son totalmente ajenos al sistema particular. Además, también hay biotransformaciones biosintéticas dirigidas, en las cuales el sustrato lleva a un intermediario biosintético natural. Las biotransformaciones pueden considerarse un complemento racional a la síntesis orgánica debido a que presentan numerosas ventajas comparativas con los procesos químicos. Muchas biotransformaciones pueden ser regio y estereoespecíficas, pero las que son

enantioespecíficas, permiten la obtención de productos quirales a partir de mezclas racémicas, lo cual, es muy interesante desde el punto de vista de síntesis bio-orgánica.<sup>11, 47</sup>

Las reacciones de biotransformación pueden ser llevadas a cabo por microorganismos o a través de reacciones enzimáticas en sistemas acuosos, debido a que estos medios son generalmente compatibles con las enzimas y presentan una apreciable actividad catalítica. Los microorganismos son comunes en las biotransformaciones, debido a que estos promueven la oxidación de componentes con alta estereoespecificidad y estereoselectividad, usualmente en condiciones de reacción muy suaves dando lugar a compuestos naturales en lugar de sintéticos.

Los microorganismos utilizados para biotransformar, pueden emplearse para atacar posiciones de las moléculas que no son afectadas por métodos químicos, debido a que no están suficientemente activadas o requieren un número importante de pasos intermedios antes que reaccionen químicamente.

La variedad de metabolitos secundarios que presentan los hongos, es debida principalmente a que estos organismos son incapaces de sintetizar macromoléculas a partir del dióxido de carbono y la energía procedente de la luz, porque no poseen clorofila. Por lo tanto, su biogénesis está condicionada principalmente por el tipo de nutrientes propios del sustrato donde se desarrollan. Algunos hongos pueden crecer en sustratos que varíen en composición, esto puede alterar y cambiar su metabolismo generando una amplia diversidad de compuestos químicos. Debido a esto, en las biotransformaciones microbiológicas, es muy importante el cultivo del hongo en un medio adecuado, así como el desarrollo en condiciones normales de temperatura y presión.

En este proceso, los sustratos utilizados pueden presentar similitud estructural con productos naturales del hongo, y por tanto, logran ser integrados a su ruta biosintética.<sup>48, 49</sup>

Las biotransformaciones implican el uso de enzimas, o de microorganismos capaces de realizar reacciones químicas con una mayor complejidad a nivel sintético. Un número considerable de conversiones de terpenoides han sido orientadas a la producción de compuestos con una mayor actividad biológica, utilizando varias especies de microorganismos. Esto ha originado exitosos productos de biotransformación, debido a la capacidad que tienen las células para seleccionar específicamente un sustrato y transformarlo en productos de interés.<sup>2</sup>

De esta manera, el objetivo principal de éste trabajo es efectuar la biotransformación de los sesquiterpenos pacifenol, pacifidieno y  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol, en un medio de cultivo marino, enriquecido con extracto de levadura y glucosa, empleando los hongos marinos *Penicillium brevicompactum* y *Geotrichum sp.* y de forma alternativa el hongo terrestre *Mucor sp.* comprobando la capacidad degradativa de estos microorganismos, sobre compuestos sesquiterpénicos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

Todos los reactivos y disolventes empleados en este proyecto de investigación fueron de grado analítico Merck y Sigma Chemical Co

#### 3.2 Metodología Experimental

El curso de las reacciones se controló mediante cromatografía en capa fina (CCF) sobre cromatoplasmas de sílica gel 60F 254 atomizadas con una mezcla de ácido sulfúrico/metanol y posterior calentamiento a 110°C durante 2 minutos.

La separación y purificación de los compuestos de biotransformación se llevó a cabo por cromatografía en columna sobre sílica gel 60 y Sephadex LH-20 (25-100µm). Como eluyente se utilizaron mezclas de éter de petróleo/acetato de etilo y éter de petróleo/diclorometano/metanol con aumento gradual de polaridad.

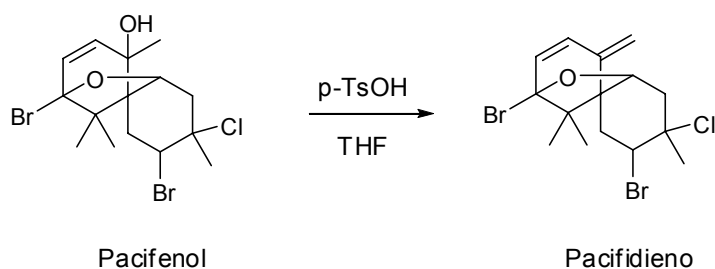
La elucidación estructural de los compuestos sintetizados y aislados se llevó a cabo con métodos instrumentales y respectiva comparación con los datos registrados en la literatura.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN)  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT se registraron en un espectrómetro Bruker AC-200 y AMX-500 disolviendo las muestras en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y utilizando como referencia interna tetrametilsilano (TMS).

### 3.2.1 Reacciones preliminares del sesquiterpeno pacifenol

#### 3.2.1.1 Deshidratación del pacifenol

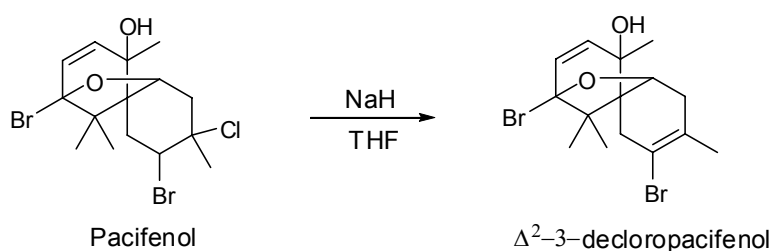
**Esquema 6.** Reacción de deshidratación del pacifenol



Se puso a reaccionar 0.242 g (0.564 mmol) de pacifenol y 0.11 g (0.578 mmol) de ácido p-toluensulfónico (p-TsOH), en 25 mL de tetrahidrofurano (THF). La mezcla se mantuvo 12 h bajo agitación y calentamiento constante hasta finalizar la reacción (CCF). Posteriormente, se diluyó el producto de reacción en una solución de bicarbonato de sodio (10%) y se extrajo con acetato de etilo (3 X 15 mL). La fase orgánica se separó, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró al vacío. El producto resultante se purificó por cromatografía en columna (sílica gel, éter de petróleo/acetato de etilo) obteniendo un sólido blanco que fue comparado con su respectivo patrón, identificado anteriormente por medio de resonancia magnética nuclear.<sup>50</sup> El compuesto obtenido es conocido como pacifidieno  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{OBr}_2\text{Cl}$  (410.4 g/mol), presenta rendimiento del 96% (0.221 g, 0.538 mmol) y punto de fusión entre 114-115 °C.

### 3.2.1.2 Deshalogenación del pacifenol

Esquema 7. Reacción de deshalogenación del pacifenol



Se puso a reaccionar 0.463 g (1.081 mmol) de pacifenol y 0.03 g (1.25 mmol) de hidruro de sodio (NaH) en 25 mL de tetrahidrofurano seco (THF). La mezcla se mantuvo por 12 h bajo agitación y calentamiento constante hasta finalizar la reacción (CCF). El producto se diluyó en una solución de bicarbonato de sodio (10%) y se extrajo con acetato de etilo (3 X 15 mL). La fase orgánica se separó, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró al vacío. El producto resultante se purificó por cromatografía en columna (sílica gel, éter de petróleo/acetato de etilo) obteniendo un aceite de color amarillo pardo, que fue comparado con su respectivo patrón, identificado anteriormente por medio de resonancia magnética nuclear.<sup>50</sup> El compuesto obtenido elimina el cloro de su estructura  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{Br}_2$  (392 g/mol) y presenta un rendimiento del 66% (0.280 g, 0.714 mmol).

### 3.2.2 Biotransformación de los sesquiterpenos pacifenol, pacifidieno y $\Delta^2$ -3-decloropacifenol.

Para la biotransformación de los sesquiterpenos, se emplearon las cepas *Penicillium brevicompactum* y *Mucor sp.* obtenidas de la colección de cepas del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Chile. La cepa *Geotrichum sp.* fue obtenida de los sedimentos marinos de la Bahía de

Concepción (Chile).<sup>39</sup> De igual forma, el sustrato pacifenol fue obtenido del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Chile.

### **3.2.2.1 Cultivo de las cepas a escala de laboratorio en medio sólido**

Se colocaron 200 mL de solución de agar papa dextrosa (PDA) 0.039 g/mL en un Erlenmeyer que a continuación se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 psi y 121°C. Posteriormente, se prepararon las placas de cultivo (cajas Petri), adicionando 2 mL de solución a cada una de ellas. Una vez solidificadas, con un asa metálica se inocularon las cajas de forma independiente con cada uno de los hongos; *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.* Las placas inoculadas se cultivaron en estufa de cultivo a una temperatura entre 22 y 25 °C. El proceso anterior se realizó en una cabina de flujo laminar para evitar la contaminación de las placas inoculadas.

Una vez crecidos los hongos, se conservaron en nevera a 4 °C hasta su posterior uso en las reacciones de biotransformación.

### **3.2.2.2. Elaboración del medio de cultivo líquido e inoculación de las cepas de los hongos: *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.***

Como medio de cultivo líquido se utilizó medio marino (pH 7.6) compuesto de agua de mar (proveniente de la playa del Quisco, V Región, Chile), extracto de levadura y glucosa. A continuación, el medio fue esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 15 psi y 121 °C. Posteriormente, el medio de cultivo se separó en 8 fracciones y se inoculó con las tres cepas de hongos cultivadas previamente en PDA. Los cultivos fueron realizados en forma aeróbica y mantenidos a una temperatura entre 25 y 28 °C con agitación orbital constante de 150-180 rpm.

**Tabla 2.** Composición nutricional del medio marino

Nutriente	Concentración (g/L)
Glucosa	10,0
Extracto de levadura	5,00

### 3.2.2.3 Adición del sustrato y control de la biotransformación

A cada cultivo de hongo se adicionó pacifenol, pacifidieno y  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol disueltos en etanol. (Tabla 3) De forma paralela, para cada cepa de hongo, se mantuvo un control o blanco, constituido por el medio de cultivo líquido y el hongo, para poder hacer el seguimiento de la biotransformación por medio de cromatografía en capa fina (CCF).

**Tabla 3:** Estrategia de adición del sustrato a los medios fermentados

Hongos filamentosos	Sustrato adicionado		Tiempo de biotransformación (días)
	Compuesto	(mg)	
<i>Mucor sp.</i>	Pacifenol	150	15
<i>Mucor sp.</i>	Pacifidieno	70	15
<i>Mucor sp.</i>	$\Delta^2$ -3-decloro- pacifenol	80	15
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Pacifenol	150	15
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Pacifidieno	150	15
<i>Penicillium brevicompactum</i>	$\Delta^2$ -3-decloro- pacifenol	80	15
<i>Geotrichum sp.</i>	Pacifenol	80	15

Para la verificación de la biotransformación del sustrato, se tomaron muestras de los medios fermentados cada 7 días (en condiciones de esterilidad y en una cámara de flujo laminar), y se realizó una extracción posterior con acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se concentró al vacío y se comparó con los controles de cada hongo fermentado (CCF).

#### **3.2.2.4 Extracción y purificación del producto de biotransformación**

Una vez identificados los posibles productos de biotransformación (CCF) se realizó la extracción de cada uno de los cultivos. El medio líquido se extrajo con acetato de etilo (3 X 20 mL) y el micelio por maceración con arena de mar en el mismo solvente. La fase orgánica se separó, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío en un rotaevaporador. El producto resultante se purificó por cromatografía en columna con Sephadex LH-20 eluyendo con una mezcla de éter de petróleo/diclorometano/metanol, y alternativamente en columnas con sílica gel eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo.

De la biotransformación del pacifenol con las tres cepas de hongos, se obtuvo un sólido blanco con fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>Br<sub>2</sub> (410.0 g/mol) denominado 3-hidroxidecloropacifenol.

De los tres ensayos realizados en medio marino con cada una de las cepas de hongos: *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.*, se alcanzaron rendimientos de producción de 10% (0.015 g, 0.037 mmol), 13.8% (0.011 g, 0.027 mmol) y 17.1% (0.026 g, 0.063 mmol), respectivamente. La identificación de este compuesto se realizó por medios espectroscópicos y posterior comparación con la literatura.<sup>14</sup>

Por medio de cromatografía en capa fina, se evidenció la transformación del sustrato pacifidieno mediante la cepa *Mucor sp.* La estructura de este compuesto no se logró elucidar debido a la poca cantidad obtenida (0.0049 g). Por otro lado,

no se evidenció transformación durante 15 días de fermentación para el derivado clorado del pacifenol, el  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol.

### **3.2.3 Extracción de metabolitos secundarios de la cepa del hongo *Geotrichum sp***

El hongo *Geotrichum sp.* fue aislado de los sedimentos de la bahía de Concepción (Chile), a 88 metros de profundidad. Esta cepa fue estudiada taxonómicamente en el Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción (Chile).<sup>39</sup>

#### **3.2.3.1 Elaboración del medio de cultivo líquido e inoculación de la cepa del hongo *Geotrichum sp.***

Como medio de cultivo se utilizó medio Czapek (Cz) ajustado a pH 7 y esterilizado durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi.

**Tabla 4:** Composición nutricional del medio Czapek.

<b>Nutriente</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NaNO <sub>3</sub>	2.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
Sacarosa	30.0
Extracto de levadura	5.0

El medio fue inoculado usando un asa metálica con la cual se hace un barrido sobre la superficie del agar solidificado de la cepa madre de *Geotrichum sp.* El

cultivo fue realizado en forma aeróbica y mantenido a 25 °C con agitación orbital constante de 150-180 rpm durante cinco semanas.

### **3.2.3.2 Extracción y purificación de metabolitos del hongo *Geotrichum sp.***

Después de las cinco semanas de fermentación del hongo *Geotrichum sp* en medio Czapek, se realizó la extracción con acetato de etilo (3 X 500 mL). La fase orgánica se separó, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró al vacío.

El producto resultante se purificó por cromatografía en columna (Sephadex LH-20, éter de petróleo/diclorometano/metanol), obteniendo 20 fracciones, de las cuales la fracción 10 (28 mg), fue purificada con cromatografía en columna (sílica gel, éter de petróleo/acetato de etilo), obteniendo 27 fracciones respectivamente monitoreadas (CCF). La fracción 5 y la fracción 10 constituyen el ergosterol ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ , 396 g/mol) y el peróxido de ergosterol ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ , 428 g/mol) de los cuales se obtuvo (0.03 g, 0.076 mmol) y (0.08 g, 0.187 mmol) respectivamente. Estos dos compuestos fueron identificados por comparación de constantes físicas con su respectivo compuesto de referencia del Laboratorio de Productos Naturales Marinos de la Universidad de Chile.

La fracción 21 fue purificada por medio de cromatografía preparativa (sílica gel, éter de petróleo/acetato de etilo) obteniendo un sólido amarillo identificado como ergosta-4,6, 8(14),22-tetraen-3-ona, ( $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}$ , 392 g/mol), con punto de fusión entre 115-116 °C , del cual se obtuvo 0.01 g, 0.0255 mmol. La identificación de éste compuesto se realizó por medios espectroscópicos y posterior comparación con la literatura.<sup>51</sup>

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación se realizó la semisíntesis del pacifidieno y de un derivado declorado del pacifenol, el  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol. Posteriormente, estos sesquiterpenos junto con su precursor pacifenol, fueron sometidos a biotransformaciones por medio de los hongos *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.*

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la biotransformación de los sustratos pacifenol, pacifidieno y  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol, por medio de los hongos anteriormente mencionados.

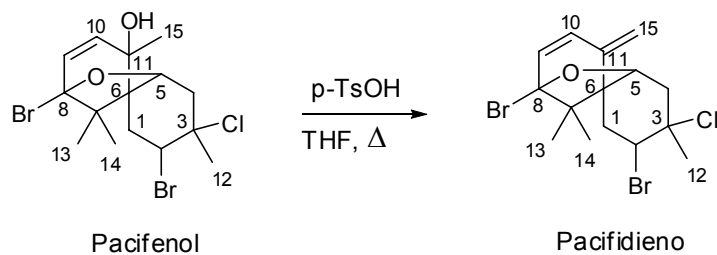
### 4.1 Reacciones preliminares

#### 4.1.1 Reacción de deshidratación del pacifenol

El pacifidieno se obtuvo por medio de la reacción de deshidratación del pacifenol catalizada por ácido p-toluensulfónico (p-TsOH). Esta reacción transcurrió fácilmente utilizando tetrahidrofurano (THF) como disolvente. Luego de 12 horas de reacción, el producto fue purificado con sílica gel eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo. Se obtuvo un sólido blanco identificado como pacifidieno (Esquema 8) con rendimiento del 96% (0.221 g, 0.538 mmol) y punto de fusión de 114-115 °C.

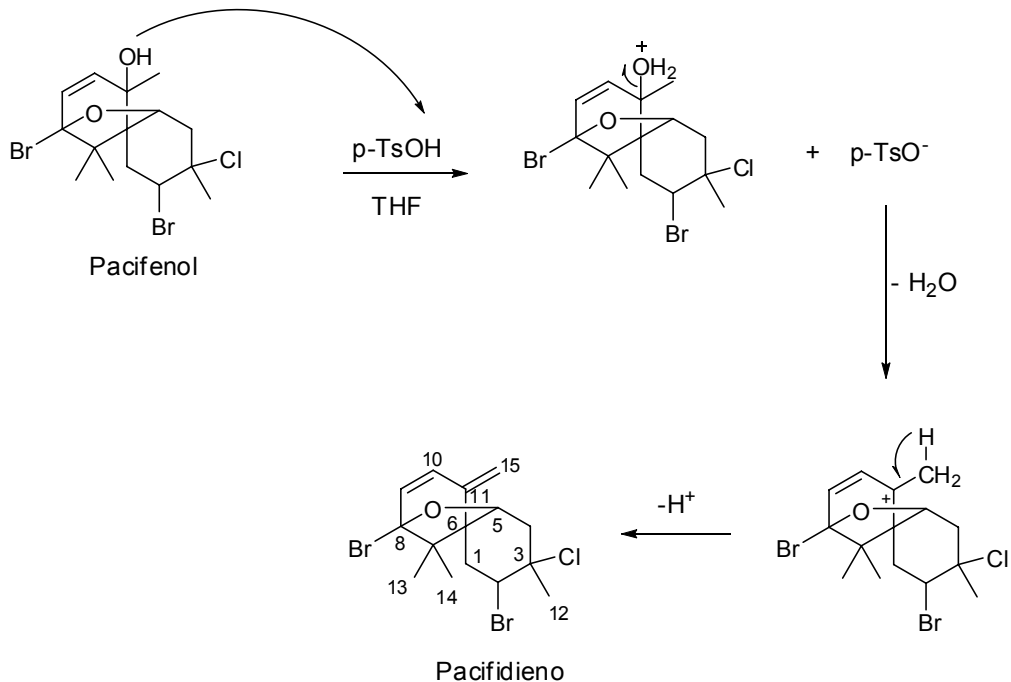
La identificación del compuesto pacifidieno ( $C_{15}H_{19}OBr_2Cl$ , 410.4 g/mol) se realizó por medio de la comparación con su respectivo patrón mediante cromatografía en capa fina y constantes físicas.

### Esquema 8. Obtención química del pacifidieno



De acuerdo con esta reacción, se propuso que el mecanismo probable de formación semisintética del pacifidieno se realiza vía reacción de deshidratación del sesquiterpeno pacifenol (Esquema 9), el cual se lleva a cabo a través del grupo hidroxilo en el carbono quiral (C -11) del pacifenol.

### Esquema 9. Mecanismo de deshidratación del pacifenol



Una posible explicación para la reacción de deshidratación es que esta se lleva a cabo por un mecanismo de eliminación tipo E<sub>1</sub>. Esta implica la transferencia de un protón del ácido a uno de los pares de electrones no compartidos del grupo hidroxilo para formar un excelente grupo saliente. A continuación, se elimina una molécula de agua generando un carbocatión terciario que, tras la posterior eliminación de un protón del metilo adyacente (C-15), (probablemente para regenerar el p-TsOH), forma un doble enlace, dando lugar al alqueno pacifidieno.<sup>52, 53</sup>

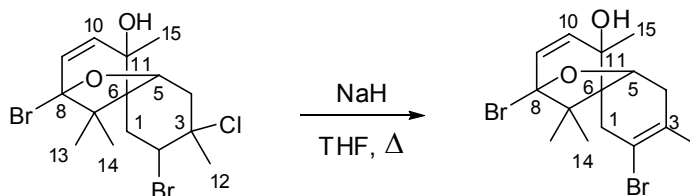
El uso de THF y del p-TsOH se justifica debido a que el THF favorece los mecanismos de eliminación, fortaleciendo las condiciones de la reacción, mientras que el p-TsOH por su parte, es un ácido fuerte usado en esta deshidratación como catalizador.

#### **4.1.2 Reacción de deshalogenación del pacifenol.**

La reacción de deshalogenación (descloración) del pacifenol, transcurrió durante 12 horas en presencia de hidruro de sodio (NaH) y tetrahidrofurano (THF). El producto de la reacción fue purificado con sílica gel eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo, obteniéndose un aceite de color amarillo pardo identificado como un derivado desclorado del pacifenol, alcanzando un rendimiento del 66% (0.280 g, 0.714 mmol). (Esquema 10)

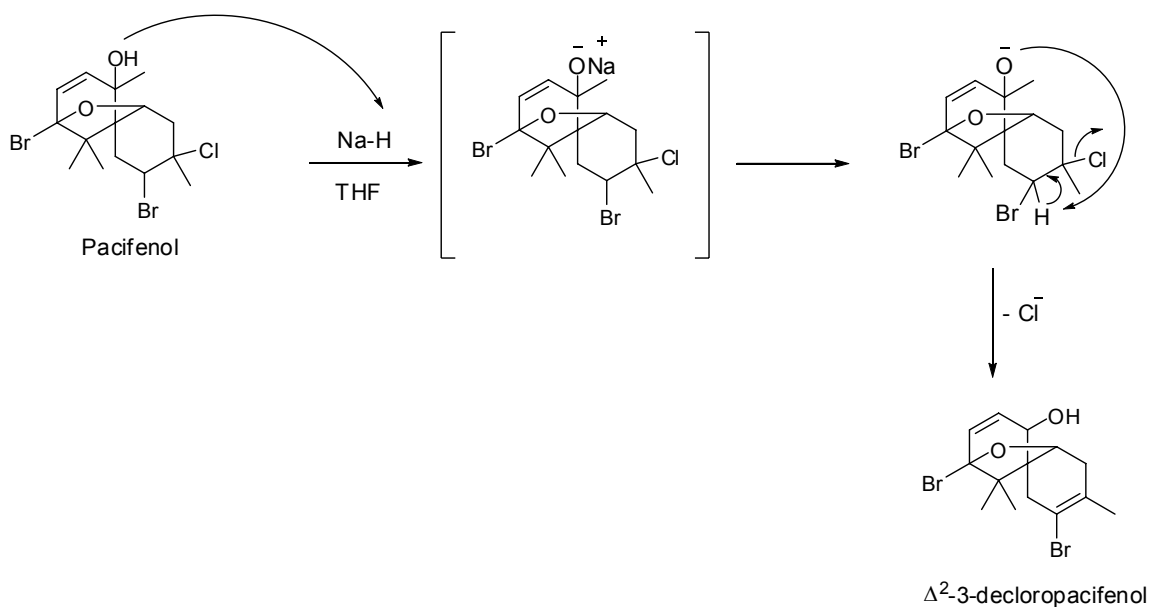
La identificación del compuesto, que no posee cloro en su estructura y tiene un nuevo enlace doble carbono-carbono, (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>, 392 g/mol) se realizó por medio de la comparación con su respectivo patrón, mediante cromatografía en capa fina y determinación de constantes físicas.

### Esquema 10. Obtención del $\Delta^2$ -3-decloropacifenol



Este derivado del pacifenol se obtiene mediante la eliminación del cloro de la molécula mediante el uso del hidruro de sodio como base fuerte. (Esquema 11).

### Esquema 11. Mecanismo de deshalogenación del pacifenol



La formación del doble enlace carbono-carbono ocurre por la eliminación del cloro presente en la molécula, probablemente como parte de un mecanismo  $E_2$ . En este mecanismo, el ión hidruro actúa como una base fuerte atrapando al hidrógeno del grupo hidroxilo y originando un alcóxido. Luego, de forma concertada, el par de electrones libres del oxígeno del grupo alcóxido atrapa al hidrógeno ácido

presente en el carbono 2, formando así un enlace covalente. Al mismo tiempo el par de electrones que deja el hidrógeno, permite la formación del nuevo doble enlace eliminando de esta forma el cloro.

Este mecanismo permite justificar el rendimiento de la reacción, ya que el ión hidruro es una base fuerte que atrapa con facilidad al hidrógeno más ácido de la molécula, el cual corresponde al del grupo hidroxilo. Por otra parte, la eliminación del cloro se ve favorecida al aumentar la temperatura y la presencia de THF anhidro que permite que el medio esté libre de agua.<sup>37</sup>

#### **4.2 Biotransformación de los sesquiterpenos pacifenol, pacifidieno y $\Delta^2$ -3-decloropacifenol.**

Se llevaron a cabo los ensayos de biotransformación para el sustrato pacifenol y los dos derivados semisintéticos pacifidieno y  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol en medio marino, y mediante los hongos filamentosos *Penicillium brevicompactum* y *Mucor sp.* obtenidos de la colección de cepas del laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Chile y la cepa *Geotrichum sp.* aislada de los sedimentos marinos de la Bahía de Concepción (Chile).<sup>39</sup>

##### **4.2.1 Cultivo de las cepas de los hongos *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.* y posterior adición del sustrato.**

El crecimiento de las colonias de los hongos marinos *Penicillium brevicompactum* y *Geotrichum sp.* en medio PDA fue moderado, a diferencia del hongo terrestre *Mucor sp.* que mostró un crecimiento de mayor rapidez. Esto se debe posiblemente a que el medio PDA utilizado proporcionó las condiciones químicas y nutritivas adecuadas para que los microorganismos pudieran multiplicarse de forma controlada.

Tras la verificación visual del crecimiento de las tres cepas de los hongos en PDA, se inoculó el medio marino donde se realizó la biotransformación. En este medio líquido enriquecido con glucosa y extracto de levadura, se observó un crecimiento constante tanto de los hongos marinos *Penicillium brevicompactum* y *Geotrichum sp.*, como del hongo terrestre *Mucor sp.* Esto muestra que las tres cepas tuvieron una exitosa adaptación al medio salino, lo que les confiere características de microorganismos halotolerantes.<sup>54</sup>

La adición del sustrato al medio marino se realizó a los tres días de crecimiento de la colonia de cada uno de los hongos, realizando un control cada 7 días por medio de cromatografía en capa fina. (Ver tabla 5)

#### **4.2.2 Evaluación de la capacidad biotransformadora de las cepas de los hongos filamentosos *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.***

Se realizó la evaluación de la capacidad transformadora de los hongos filamentosos *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.* sobre los sesquiterpenos halogenados: pacifenol, pacifidieno y  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol por medio de cromatografía en capa fina (CCF).

Mediante este método, se observaron productos de fermentación con recorrido (Rf) diferente al del sustrato original y al de los metabolitos primarios de cada uno de los hongos (control).

Las placas de CCF para la biotransformación del pacifenol mostraron que se efectuó la biotransformación del sustrato por medio de las tres cepas utilizadas. El pacifidieno sólo presentó un producto con tiempo de retención diferente, en el proceso de biotransformación con la cepa *Mucor sp.* Por otro lado, no se evidenció

ningún producto diferente cuando se intentó biotransformar el derivado de cloro  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol según las observaciones llevadas a cabo con CCF.

**Tabla 5.** Microorganismos y sustratos empleados en la biotransformación

Hongos filamentosos	Sustrato adicionado		Obtención de productos de biotransformación
	Compuesto	(mg)	
<i>Mucor sp.</i>	Pacifenol	150	SÍ
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Pacifenol	150	SÍ
<i>Geotrichum sp.</i>	Pacifenol	80	SÍ
<i>Mucor sp.</i>	Pacifidieno	70	SÍ
<i>Penicillium Brevicompactum</i>	Pacifidieno	150	N.D.
<i>Mucor sp.</i>	$\Delta^2$ -3-decloropacifenol	80	N.D.
<i>Penicillium brevicompactum</i>	$\Delta^2$ -3-decloropacifenol	80	N.D.

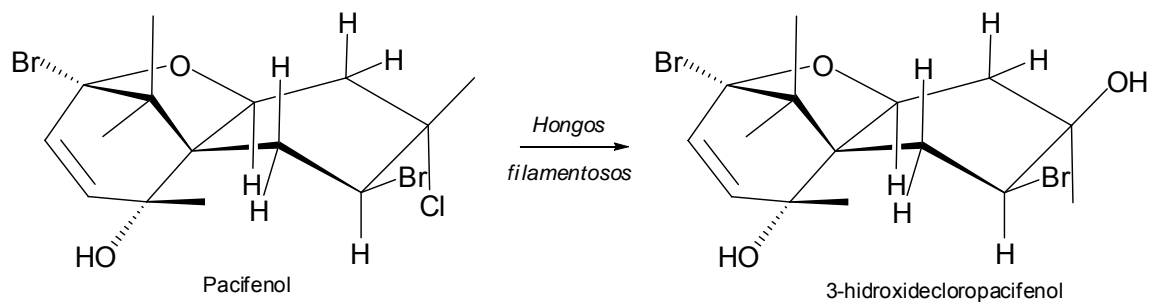
\*N.D: No se detectó.

#### 4.2.2.1 Evaluación de la biotransformación del sustrato pacifenol.

Las placas de CCF obtenidas de los extractos del proceso de biotransformación del pacifenol indicaron la presencia de un producto diferente al sustrato de partida. Debido a esto, se prosiguió con la purificación y caracterización del compuesto, obteniendo un sólido blanco con fórmula molecular  $C_{15}H_{22}O_3Br_2$  (410 g/mol). Este producto fue obtenido a partir de los tres ensayos realizados en medio marino con las cepas *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.*

El compuesto obtenido mediante la biotransformación es llamado 3- hidroxidecloro pacifenol ( $C_{15}H_{22}O_3Br_2$ , 410 g/mol), debido a la sustitución por un grupo hidroxilo del cloro del carbono 3 en la estructura del pacifenol. (Esquema 12)

**Esquema 12.** Producto obtenido de la biotransformación del pacifenol con los hongos filamentosos *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.*



El producto de la biotransformación del pacifenol mediante las cepas *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.* fue analizado mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ . Posteriormente, se compararon los espectros de RMN con el producto obtenido de la biotransformación del pacifenol por medio del hongo *Penicillium brevicompactum* en medio Czapek por San Martín y colaboradores, quienes caracterizaron la estructura del compuesto 3-hydroxidecloropacifenol por métodos espectroscópicos ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, HMQC, HMBC, NOESY, 1H-1H COSY, IR), sugiriendo la presencia de un nuevo grupo hidroxilo en la molécula. (Ver trabajo realizado por San Martín y colaboradores).<sup>14</sup>

A diferencia de las biotransformaciones con los hongos *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.*, la realizada con el hongo *Penicillium brevicompactum* en medio marino, sólo fue evaluada mediante cromatografía en capa fina y por comparación con las constantes físicas del compuesto de referencia del Laboratorio de Productos Naturales Marinos de la Universidad de Chile. Los resultados indicaron que se trataba del mismo compuesto de fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{Br}_2$  (3-hydroxidecloropacifenol) determinado anteriormente por San Martín y colaboradores.<sup>14</sup>

Los rendimientos de producción del compuesto 3- hidroxidecloropacifenol ( $C_{15}H_{22}O_3Br_2$ ), mediante el proceso de biotransformación fueron significativos de acuerdo con datos reportados en literatura para transformaciones mediante microorganismos.<sup>14,11</sup> Se estima que en una fermentación se convierte aproximadamente entre el 15% y el 20% del sustrato en producto, mientras que en una reacción enzimática la transformación se aproxima al 90%.<sup>55</sup> (Tabla 6)

**Tabla 6.** Resultados obtenidos de la biotransformación del pacifenol

Hongos filamentosos	Cantidad de Pacifenol a biotransformar (mg)	% Rendimiento del producto obtenido
<i>Mucor sp.</i>	150	17.1% (0.026 g, 0.063 mmol)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	150	10% (0.015 g, 0.037 mmol)
<i>Geotrichum sp</i>	80	13.8% (0.011 g, 0.027 mmol)

Los porcentajes de conversión se obtuvieron teniendo en cuenta los pesos moleculares del producto de partida y del producto mayoritario postulado como compuesto de biotransformación.

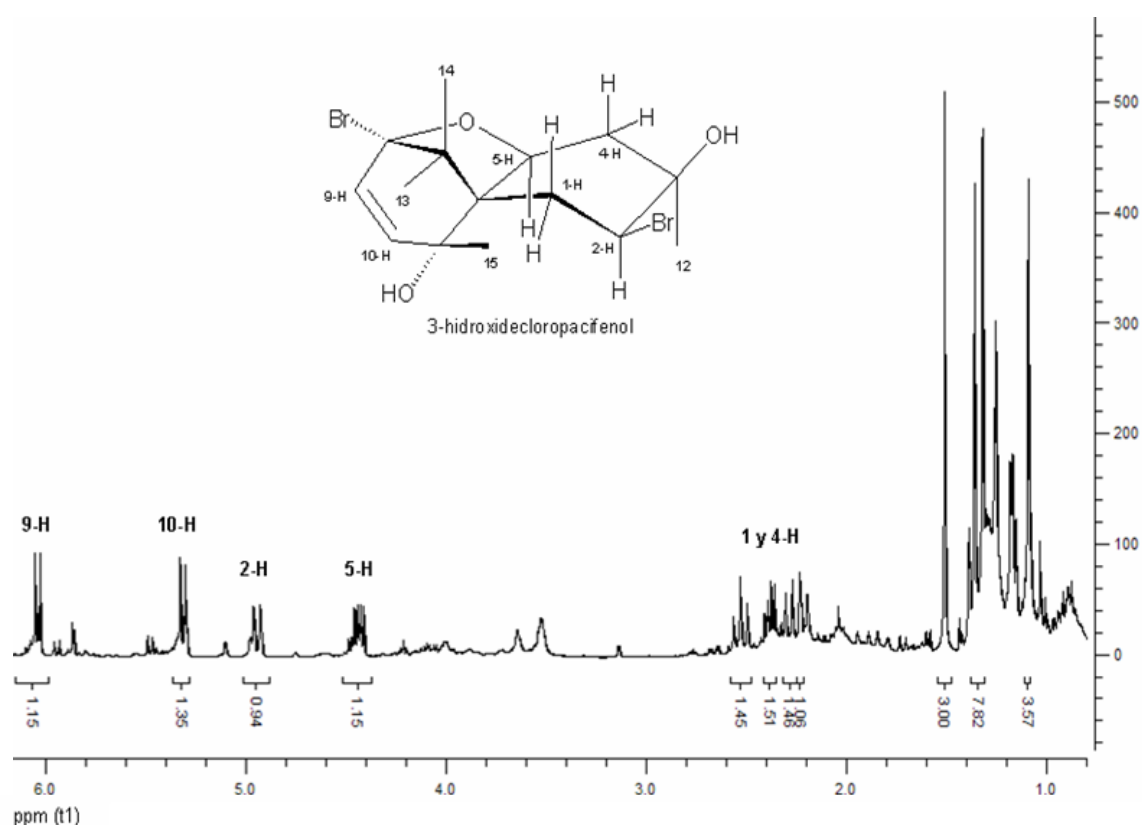
Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H para las biotransformaciones del pacifenol con los hongos *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.* muestran las mismas señales del espectro obtenido por San Martín y colaboradores. (Ver anexo 1)

En los espectros de RMN-<sup>1</sup>H del producto de la biotransformación del pacifenol, llevado a cabo con los hongos *Geotrichum sp.* (Figura 12) y *Mucor sp.* (Figura 13), se observan las señales generadas por los protones correspondientes a los metilos en la región comprendida entre  $\delta$  1.09 y 1.51 ppm, metilenos entre  $\delta$  2.23 y

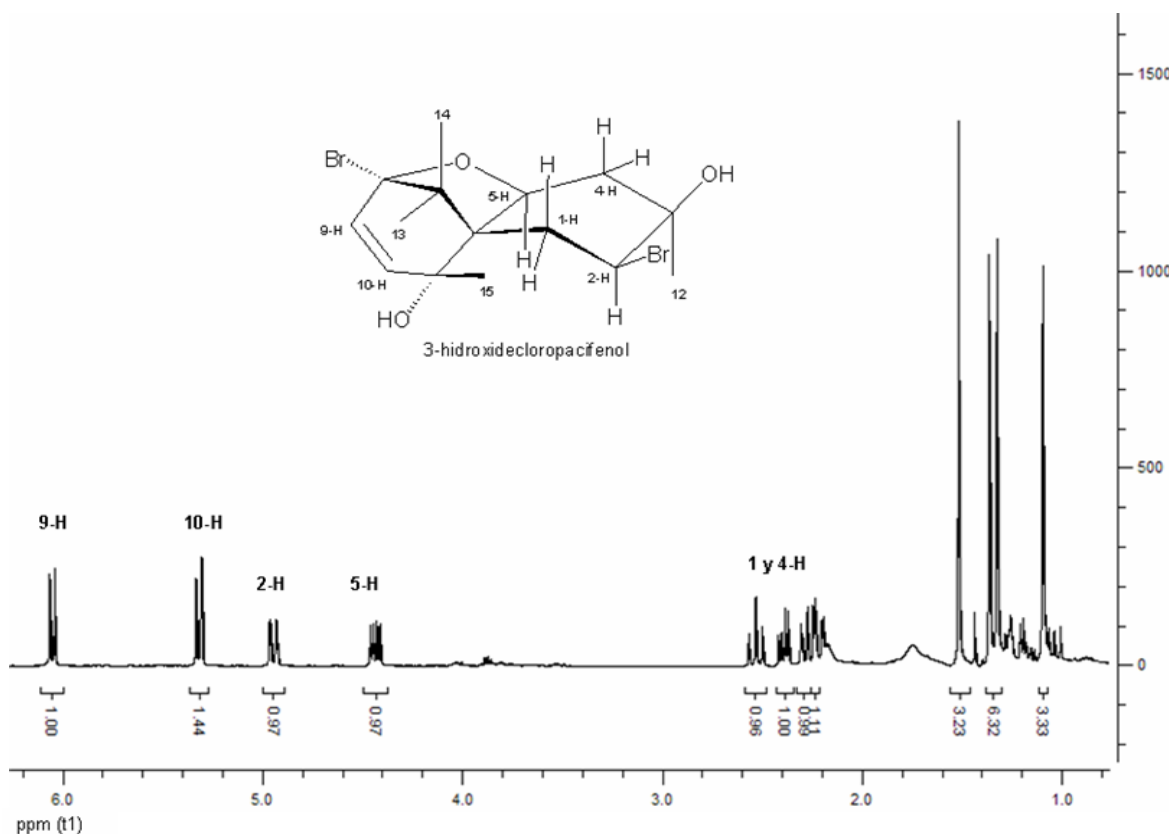
2.52 ppm, metinos entre  $\delta$  4.43 y 4.94 ppm y las señales correspondientes a los protones olefínicos en la zona comprendida entre  $\delta$  5.30 y 6.04 ppm.

Además de éstas señales, en los dos espectros del producto de la biotransformación, se presenta una señal ancha y pequeña, en el intervalo 1.6 a 1.9 ppm, que correspondería al protón del nuevo grupo hidroxilo<sup>56</sup> que aparece como sustituyente del carbono cuaternario (C-3) y que corresponde a los datos reportados por San Martín<sup>14</sup> y no se observa en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del pacifenol, utilizado como sustrato en la biotransformación. (Ver anexo 2)

**Figura 12.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del producto de biotransformación del pacifenol mediante el hongo *Geotrichum* sp.



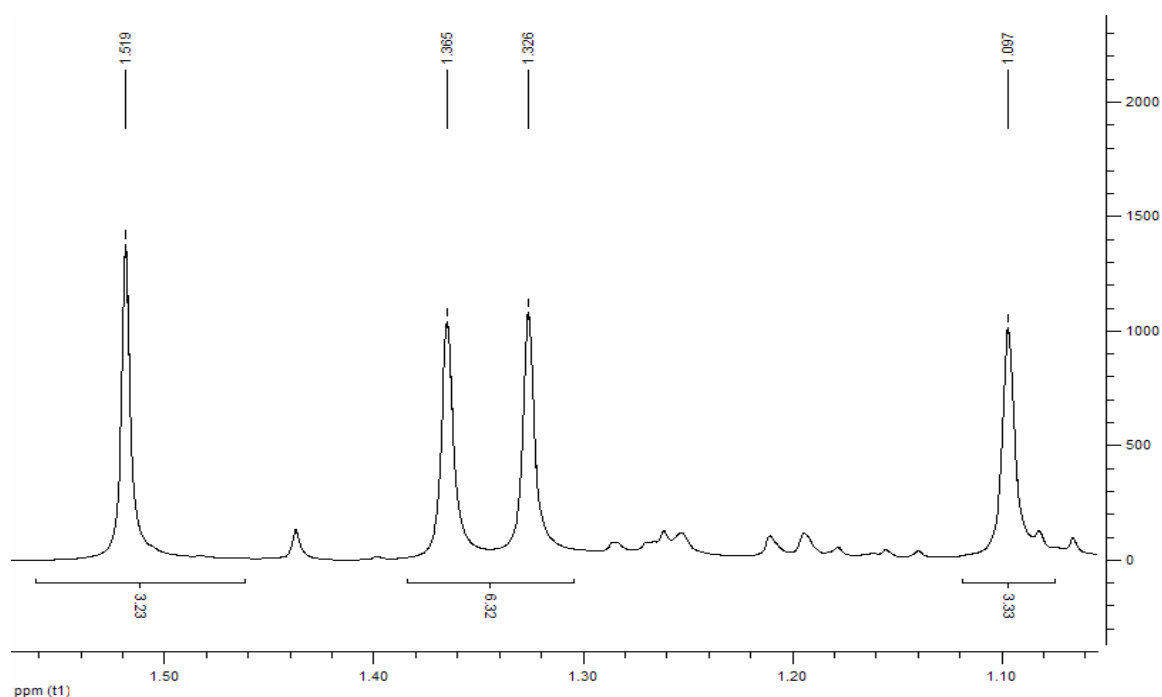
**Figura 13.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del producto de biotransformación del pacifenol mediante el hongo *Mucor sp.*



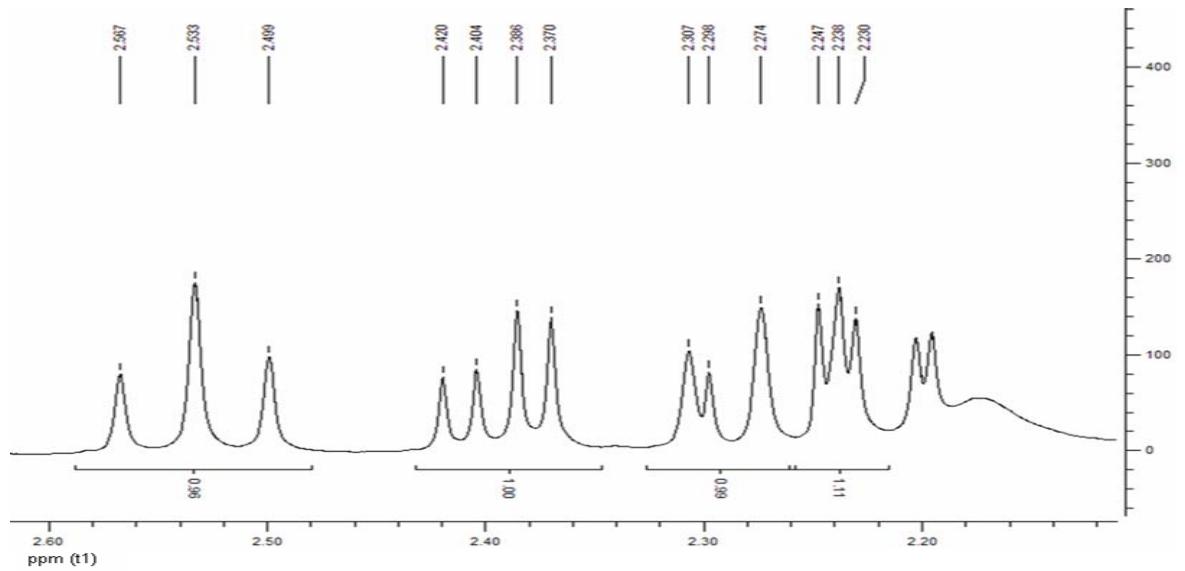
En el espectro RMN-<sup>1</sup>H de la biotransformación del pacifenol con el hongo *Geotrichum sp.* se pueden observar otras señales de menor intensidad en el intervalo  $\delta$  3.8 a 4 ppm, que podrían atribuirse a un subproducto minoritario del proceso de biotransformación. A su vez, en el intervalo  $\delta$  5.4 a 5.9 ppm se presentan otras señales que podrían pertenecer al sustrato pacifenol,<sup>46</sup> el cual posiblemente no logró biotransformarse en su totalidad (Ver anexo 3). A diferencia de este espectro, el obtenido con el hongo *Mucor sp.* no muestra señales que indiquen la presencia del sustrato de partida.

En el espectro de la biotransformación con el hongo *Mucor sp.* se observan en  $\delta$  1.09, 1.32, 1.36 y 1.51 ppm, las señales pertenecientes a los protones de los metilos (Figura 14), las señales correspondientes a los protones metilénicos en  $\delta$  2.23, 2.28, 2.39 y 2.53 ppm (Figura 15) y las señales de los protones de los metinos en 4.43 ppm (1H, dd,  $J=6.2$  Hz,  $J=13.6$  Hz) y 4.94 ppm (1H, dd,  $J=2.9$  Hz,  $J=13.7$  Hz). Por otra parte, se observan los dobletes de los protones olefínicos en  $\delta$  5.32 ppm (1H, d,  $J=9.8$  Hz, 10-H) y 6.05 ppm (1H, d,  $J=9.8$  Hz, 9-H). (Figura 16)

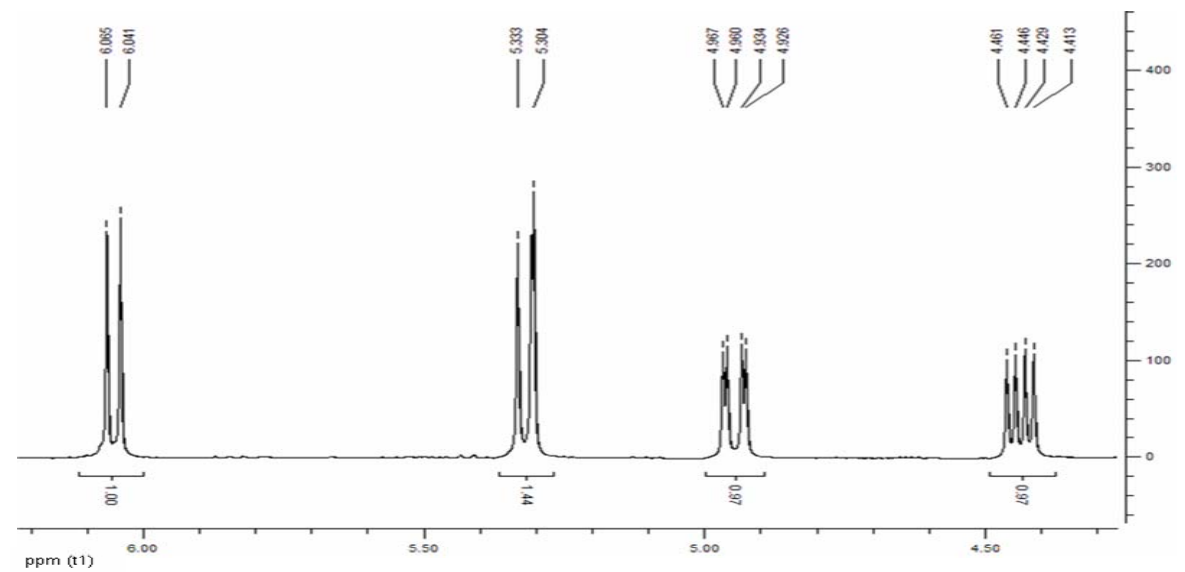
**Figura 14.** Señales de los metilos pertenecientes al espectro de RMN- $^1\text{H}$  del producto 3-hidroxidecloropacifenol mediante el hongo *Mucor sp.*



**Figura 15.** Señales de los metilenos pertenecientes al espectro de RMN-<sup>1</sup>H del producto 3-hidroxidecloropacifenol mediante el hongo *Mucor sp.*



**Figura 16.** Señales de los protones olefínicos y de los metinos pertenecientes al espectro de RMN-<sup>1</sup>H del producto 3-hidroxidecloropacifenol mediante el hongo *Mucor sp.*



A continuación, en la tabla 7 se presentan los datos espectroscópicos obtenidos mediante el análisis para las biotransformaciones del sustrato pacifenol, con las cepas *Mucor sp.* y *Geotrichum sp.* En esta tabla se incluyen los datos reportados para el producto 3-hidroxidecloropacifenol ( $C_{15}H_{22}O_3Br_2$ ) obtenido mediante biotransformaciones con el hongo *Penicillium brevicompactum*<sup>14</sup> en medio Czapek, y para el sustrato de partida pacifenol.<sup>46</sup>

**Tabla 7.** Datos espectroscópicos del pacifenol y el producto de biotransformación (3-hidroxidecloropacifenol) con los hongos *Mucor sp.*, *Geotrichum sp.* y *Penicillium brevicompactum*.

#C	Pacifenol $C_{15}H_{21}O_2Br_2Cl$		Producto de biotransformación* ( <i>P. brevicompactum</i> ) $C_{15}H_{22}O_3Br_2$		Producto de biotransform. ( <i>Mucor sp.</i> ) $C_{15}H_{22}O_3Br_2$	Producto de biotransform. ( <i>Geotrichum sp.</i> ) $C_{15}H_{22}O_3Br_2$
	$\delta_c$	$\delta_H$ (J/Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J/Hz)	$\delta_H$ (J/Hz)	$\delta_H$ (J/Hz)
1	34.5	2.10 dd (13.1, 14.2) 2.26 dd (3.6, 14.3)	32.5	2.53 dd (14.7, 14.7) 2.22 dd (3.4, 14.7)	2.53 dd (13.8, 13.8) 2.23 dd (2.9, 13.8)	2.53 dd (13.7;13.7) 2.23 dd (2.9, 13.7)
2	59.6	5.25 dd (3.6, 13.1)	61.9	4.94 dd (3.4, 14.7)	4.94 dd (2.92, 13.8)	4.94 dd (2.92, 13.7)
3	69.3	---	69.4	---	---	---
4	46.3	2.28 dd (12.6, 14.0) 2.63 dd (5.2, 14.0)	42.6	2.39 dd (7.4, 14.0) 2.28 dd (14.0, 14.0)	2.39 dd (6.2, 13.6) 2.28 dd (13.6, 13.6)	2.38 dd (6.3, 13.0) 2.26 dd (13.0, 13.0)
5	74.4	4.61 dd (5.2, 12.6)	74.4	4.43 dd (7.4, 14.0)	4.43 dd (6.2, 13.6)	4.44 dd (6.3, 13.0)
6	53.6	---	53.7	---	---	---
7	49.3	---	52.1	---	---	---
8	99.8	---	100.1	---	---	---
9	132.7	5.90 d (9.8)	132.7	6.05 d (9.7)	6.05 d (9.8)	6.04 d (9.7)
10	134.5	5.32 d (9.8)	134.1	5.32 d (9.7)	5.32 d (9.8)	5.31 d (9.7)
11	77.6	---	76.6	---	---	---
12	33.9	1.72 s	29.5	1.51 s	1.51 s	1.51 s
13	23.6	1.04 s	23.4	1.32 s	1.32 s	1.32 s
14	24.7	1.23 s	24.8	1.09 s	1.09 s	1.09 s
15	25.3	1.44 s	25.5	1.36 s	1.36 s	1.36 s

\* Biotransformación de pacifenol con el hongo *Penicillium brevicompactum*. San Martín y colaboradores (2005)

El análisis de estos datos permite señalar que la biotransformación del pacifenol fue exitosa, lo cual indica que los medios tanto de cultivo como de biotransformación contenían los nutrientes necesarios para que las cepas de los hongos crecieran de manera significativa, transformando los nutrientes en masa celular y productos metabólicos, y el pacifenol en el compuesto hidroxilado: 3-hidroxidecloropacifenol ( $C_{15}H_{22}O_3Br_2$ ).

Esta biotransformación indica que se produce una posible deshalogenación y posterior hidroxilación atribuible a un conjunto de enzimas presentes en los microorganismos filamentosos utilizados para la transformación del sustrato.

Además, el resultado de esta biotransformación refleja la especificidad degradativa de los hongos filamentosos *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.* sobre un sustrato sesquiterpénico halogenado, lo cual era un objetivo de este trabajo de investigación.

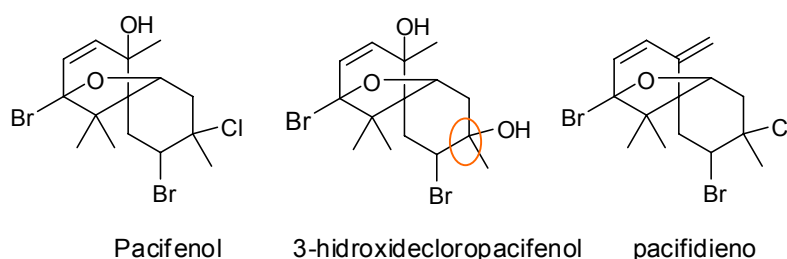
#### **4.2.2.2 Evaluación de la biotransformación del sustrato pacifidieno.**

En la evaluación de la capacidad biotransformadora de los hongos filamentosos *Penicillium brevicompactum* y *Mucor sp.* sobre el sesquiterpeno halogenado pacifidieno por CCF, se observó que durante el proceso de fermentación se presentaron algunas manchas con recorridos (Rf) diferentes al del sustrato pacifidieno y al control de cada uno de los hongos.

Al analizar las placas de CCF no se observó modificación del sustrato pacifidieno durante el proceso de biotransformación con la cepa *Penicillium brevicompactum*. Por otro lado, en la CCF de los extractos de la fermentación de la cepa *Mucor sp.* se observaron algunas manchas con un desplazamiento similar al del patrón de sustrato, mientras que otras presentaron un Rf menor. Esto sugiere que la sustancia resultante de la fermentación con la cepa *Mucor sp.* es más polar que el sustrato original pacifidieno (Ver anexo 4).

El producto de la biotransformación del pacifidieno visualizado mediante CCF no pudo ser purificado debido a la baja cantidad obtenida (0.0049 g) del producto. Por esta razón, no fue posible realizar el análisis de RMN-<sup>1</sup>H y presentar la posible estructura del compuesto biotransformado. Sin embargo, se presume que el hongo *Mucor sp.* pudo haber realizado una posible introducción de un grupo hidroxilo, en la misma posición que lo hizo en el caso del pacifenol, debido a la similitud de las estructuras en la posición donde se realizó la hidroxilación del pacifenol (Figura 17).

**Figura 17.** Estructura del pacifenol, 3-hidroxi-decloropacifenol y pacifidieno



Es posible considerar este tipo de transformación en el pacifidieno, ya que en estudios anteriores, se ha observado que independientemente de las funciones presentes en el esqueleto del terpeno a biotransformar, la mayoría de hongos filamentosos que presentan el conjunto de enzimas del citocromo P450, tienden a hidroxilar la molécula.<sup>11</sup>

#### 4.2.2.3 Evaluación de la biotransformación del $\Delta^2$ -3-decloropacifenol

En la evaluación de la biotransformación del  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol por medio de CCF no se observaron manchas diferentes a las del sustrato de partida, ni de los controles de cada uno de los hongos utilizados para dicha transformación. El sustrato  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol no presentó variación de su polaridad durante el

transcurso del tiempo establecido para la fermentación (15 días) según los resultados obtenidos por CCF.

La transformación del sustrato  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol por medio de los hongos filamentosos *Mucor sp* y *Penicillium brevicompactum* no pudo ser llevada a cabo satisfactoriamente, posiblemente a la ausencia de un átomo de cloro en la estructura original y a la dificultad del hongo para introducirlo en su dieta metabólica y así poder realizar una hidroxilación similar a la del sustrato pacifenol.

#### **4.3 Extracción de metabolitos secundarios de la cepa *Geotrichum sp.***

Adicionalmente, en el trabajo acerca de la capacidad transformadora de la cepa *Geotrichum sp.* sobre el sesquiterpeno halogenado pacifenol, se realizó la extracción de algunos metabolitos naturales presentes en el hongo, ya que no ha sido muy estudiada la maquinaria metabólica de esta especie.

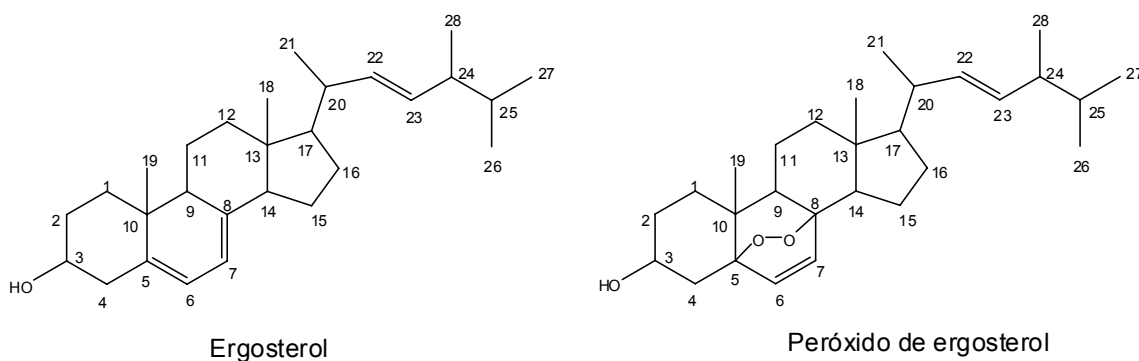
Del extracto orgánico de la fermentación del hongo *Geotrichum sp.*, en medio Czapek, se aislaron compuestos como el ergosterol ( $C_{28}H_{44}O$ , 396 g/mol) y el peróxido de ergosterol ( $C_{28}H_{44}O_3$ , 428 g/mol) de los cuales se obtuvo (0.03 g, 0.076 mmol) y (0.08 g, 0.187 mmol), respectivamente. Asimismo, se obtuvo un sólido amarillo identificado como ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona (0.01 g, 0.0255 mmol) con punto de fusión 115-116 °C y fórmula molecular:  $C_{28}H_{40}O$  (392 g/mol).

El ergosterol ( $C_{28}H_{44}O$ , 396 g/mol) y el peróxido de ergosterol ( $C_{28}H_{44}O_3$ , 428 g/mol), fueron identificados por comparación de constantes físicas y cromatografía en capa fina con sus respectivos compuestos análogos, obtenidos del Laboratorio de Productos Naturales Marinos de la Universidad de Chile.

La estructura de estos esteroides presenta 28 átomos de carbono, dos grupos metilo en C-10 y C-13, una cadena lateral en C-17 y un grupo hidroxilo en el C-3; características principales en esta clase de compuestos.

El ergosterol presenta tres insaturaciones que involucran a los carbonos: C5 - C6, C7 - C8, y C22 - C23. A diferencia de este compuesto, el peróxido de ergosterol presenta solo dos dobles enlaces entre los carbonos C6 - C7 y C22 - C23, junto con un enlace peróxido entre los carbonos 5 y 8. (Figura 18)

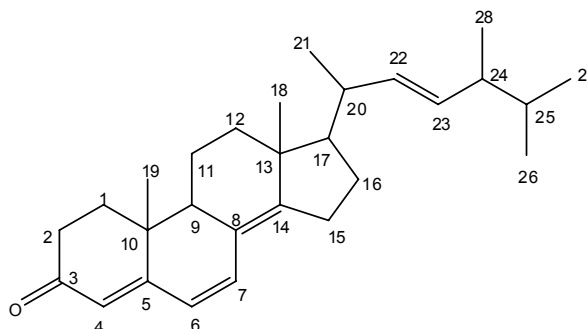
**Figura 18.** Estructura del ergosterol y peróxido de ergosterol



El ergosterol como el peróxido de ergosterol, son compuestos que se encuentran en las membranas de levaduras y hongos filamentosos, y son considerados esteroides naturales muy activos.

Por otra parte, el compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona ( $C_{28}H_{40}O$ , 392 g/mol), también aislado del extracto orgánico de la fermentación del hongo *Geotrichum sp.* en medio Czapek (Figura 19), fue identificado mediante resonancia magnética nuclear de  $^1H$ ,  $^{13}C$  y DEPT. Posteriormente, estos datos se compararon con los registrados en la literatura para el compuesto cetosteroidal.

**Figura 19.** Estructura de ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona

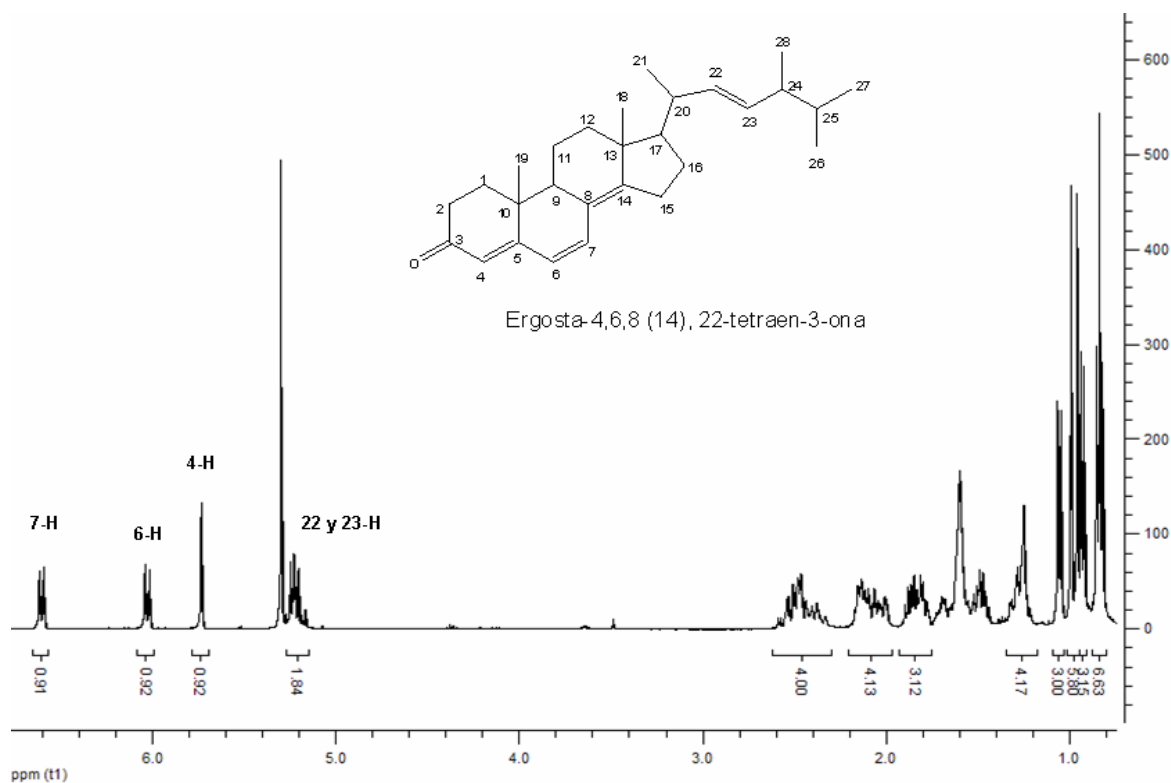


Ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona

Este compuesto al igual que el ergosterol y el peróxido de ergosterol, presenta las características típicas de un esteroide: 28 átomos de carbono, dos grupos metilo en C-10 y C-13, una cadena lateral en C-17 y una función oxigenada en C-3.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona, se observan en  $\delta$  0.83, 0.93, 0.95, 0.99 y 1.06 ppm, las señales pertenecientes a los seis metilos presentes en la molécula y las señales correspondientes a los protones olefínicos en  $\delta$  5.18 - 5.23(2H, m, 22 y 23-H), 5.71(1H, s, 4-H), 6.01(1H, d, J = 9.5 Hz, 6-H) y 6.58(1H, d, J = 9.5 Hz, 7-H) ppm. También se observan desdoblamientos de otros productos minoritarios en la región comprendida entre 1.3 y 2.5 ppm (Figura 20), debido a que el compuesto no estaba competentemente puro; sin embargo, se observa que este compuesto fue el metabolito mayoritario. (Ver anexo 5)

**Figura 20.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del cetoesterol ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona

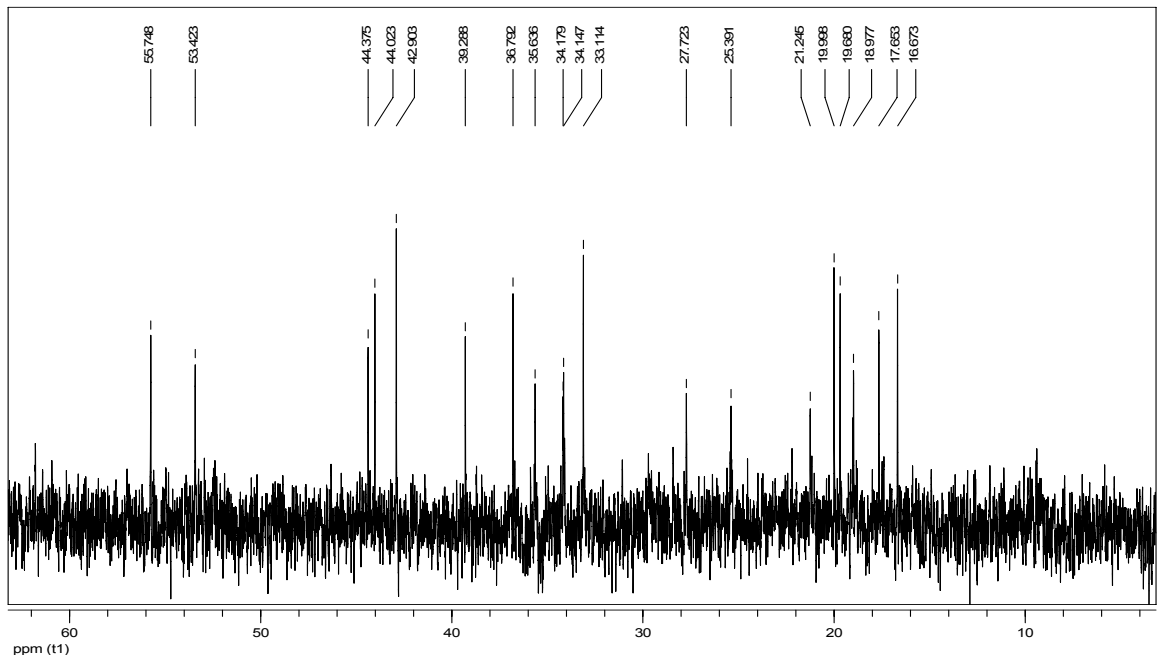


El espectro de RMN-<sup>13</sup>C presenta 28 señales correspondientes a cada uno de los carbonos presentes en la molécula ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona (Figura 21). La señal en 199.5 ppm sugiere la presencia de un enlace C=O, ya que el rango general de desplazamiento químico para la función cetona está comprendida entre  $\delta$  220 y 190 ppm.<sup>57</sup>

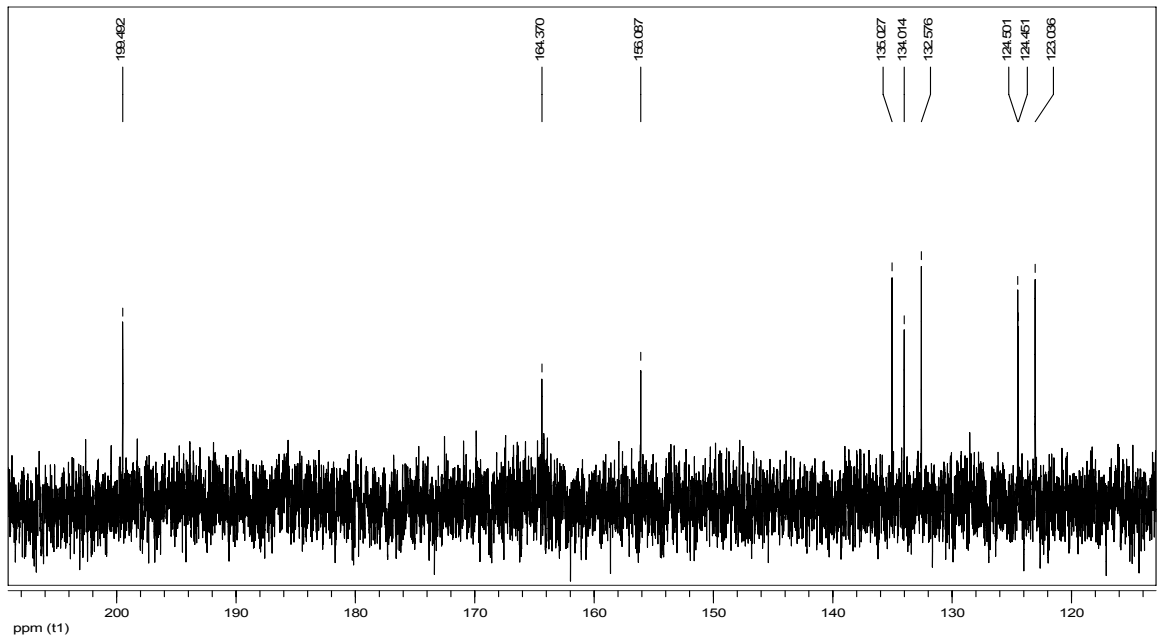
Las señales presentes en la región comprendida entre  $\delta$  16.7 y 21.3 ppm corresponden a los seis metilos de la molécula, mientras que en  $\delta$  123.0, 124.5, 134.1, 135.0 y 132.6 ppm se observan las señales correspondientes a los carbonos insaturados.

**Figura 21.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona.

**(a)** Ampliación región comprendida entre 10 y 90ppm.

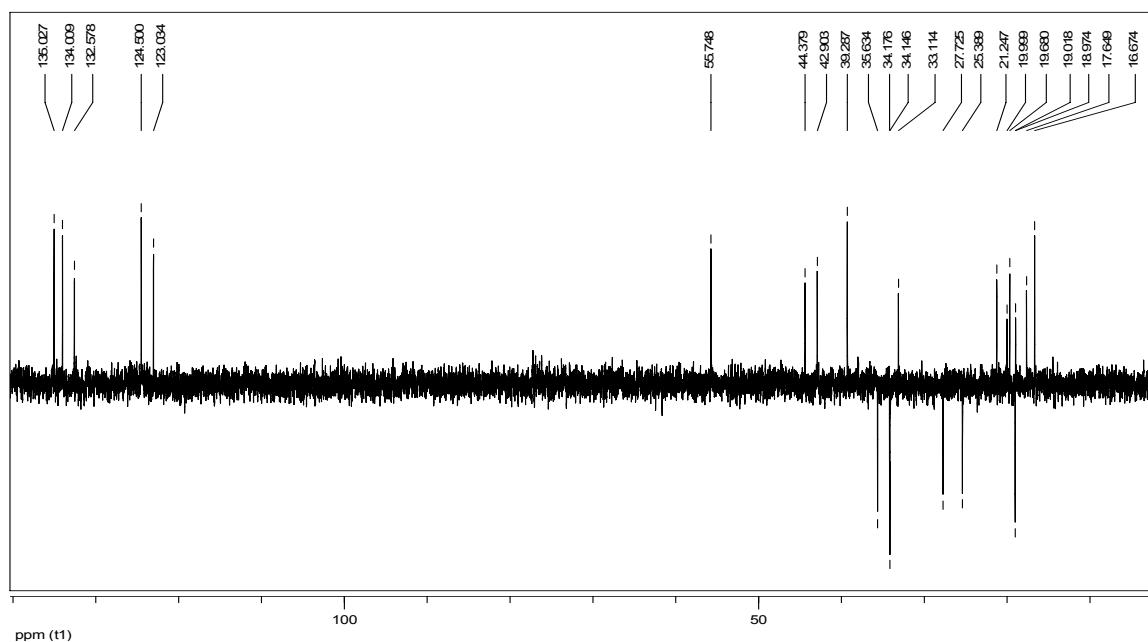


**(b)** Ampliación región comprendida entre 120 y 200ppm.



Por otro lado, se observan las señales de los carbonos metilenos en 34.2, 19.0, 25.4, 34.2, 35.6 y 27.7 ppm. Estas señales observadas, se comprobaron por medio del espectro  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 y mediante comparación con los datos registrados en la literatura <sup>58, 51</sup> para el compuesto cetoesteroidal. (Figura 22)

**Figura 22.** Espectro  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 del compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona



En la tabla 8 se presentan los datos espectroscópicos obtenidos mediante el análisis del compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona, obtenido de la fermentación del hongo *Geotrichum sp*, además de la comparación con los datos reportados en la literatura.

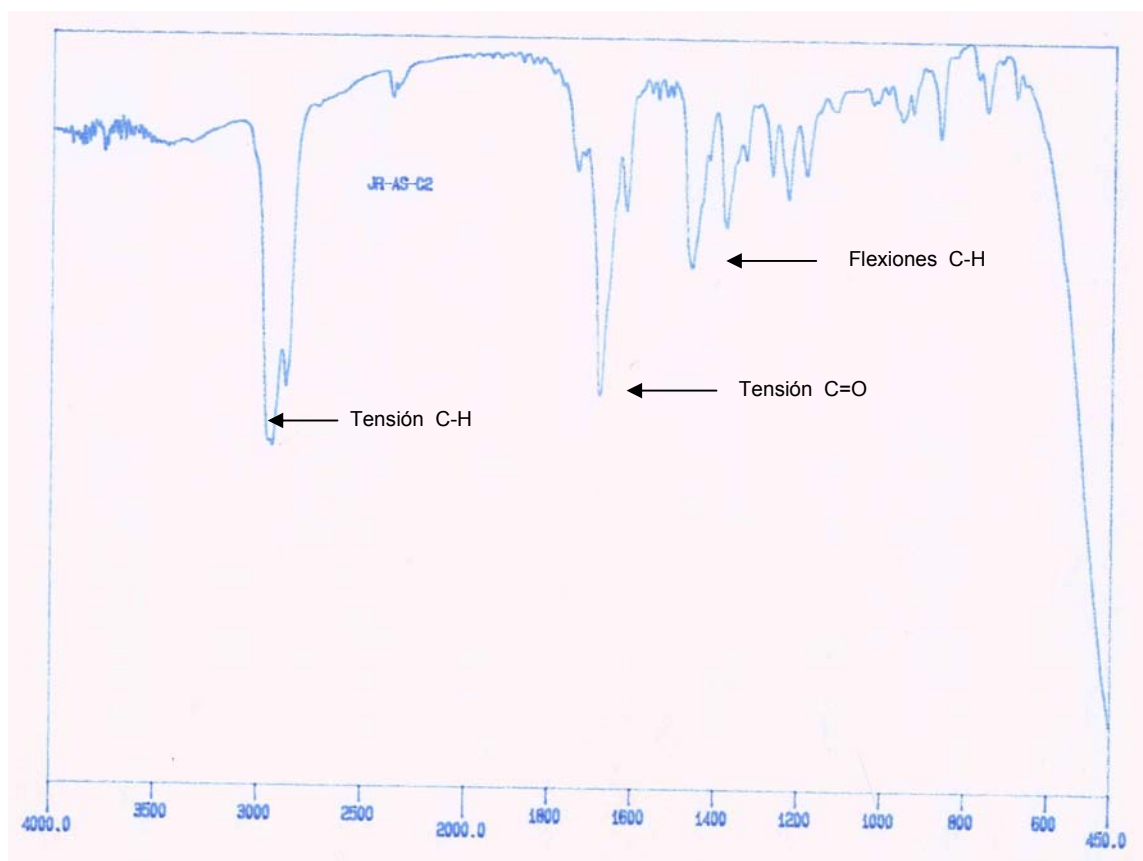
**Tabla 8.** Comparación de datos espectroscópicos del compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona obtenido en el laboratorio con los registrados en la literatura.<sup>58</sup>

#C	Ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona (C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O) <sup>58</sup>		Ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona (C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O)	
	$\delta_C$ ppm	$\delta_H$ (J/Hz)	$\delta_C$ ppm	$\delta_H$ ppm (J/Hz)
1	34.1	1.98 m	34.1	1.84 m
2	19.0	1.60 t	19.0	1.64 m
3	199.2	---	199.5	---
4	122.9	5.71 s	123.0	5.71 s
5	164.3	---	164.4	---
6	124.4	6.01 d (9.4)	124.5	6.01 d (9.5)
7	133.9	6.58 d (9.5)	134.1	6.58 d (9.5)
8	124.4	---	124.4	---
9	44.3	2.08 m	44.4	2.15 m
10	36.7	---	36.8	---
11	25.3	1.33 m	25.4	1.29 m
12	35.7	1.26 m	34.2	1.25 m
13	44.0	---	44.0	---
14	156.0	---	156.1	---
15	35.6	2.45 m	35.6	2.5 m
16	27.7	1.46 m	27.7	1.48 m
17	55.7	1.23 m	55.8	1.27 m
18	19.0	0.93 s	19.0	0.95 s
19	16.6	0.97 s	16.7	0.99 s
20	39.3	2.12 m	39.2	2.11 m
21	21.2	1.03 d(6.7)	21.3	1.06 d (6.7)
22	134.9	5.18 dd	135.0	5.18 dd
23	132.5	5.23 dd	132.6	5.23 dd
24	42.8	1.83 m	43.0	1.70 m
25	33.1	1.45 m	33.2	1.51 m
26	19.6	0.80 d (6.7)	19.7	0.83 d (6.8)
27	20.0	0.82 d (6.7)	20.0	0.83 d (6.8)
28	17.6	0.90 d (6.7)	17.6	0.93 d (6.7)

Adicionalmente, se analizó el compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona por medio del espectro IR, comparando las bandas observadas con las registradas en la literatura.<sup>51, 58, 59</sup>

En el espectro se observan las bandas mas significativas correspondientes a la vibración de tensión del enlace C-H en  $2980\text{ cm}^{-1}$ , la vibración de tensión del C=O que se encuentra entre  $1675$  y  $1640\text{ cm}^{-1}$  y las flexiones C-H en  $1590\text{ cm}^{-1}$ . (Figura 23)

**Figura 23.** Espectro IR del compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona



La estructura propuesta para el compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona, representa un cetosteroido, aislado del hongo *Geotrichum sp.* Este compuesto había sido aislado anteriormente del hongo *Lampteromyces japonicus* y de esponjas marinas; sin embargo, no se conocen trabajos donde el ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona haya sido aislado del hongo *Geotrichum sp* cultivado a escala de laboratorio en medio Czapek.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se realizó las semisíntesis de los sesquiterpenos pacifidieno y  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol que posteriormente fueron utilizados para ser biotransformados con las cepas de hongos *Penicillium brevicompactum* y *Mucor sp.*
- Fue posible lograr la biotransformación del pacifenol utilizando cepas de los hongos *Penicillium brevicompactum*, *Geotrichum sp.* y *Mucor sp.* cultivados en un medio de cultivo líquido, enriquecido con glucosa y extracto de levadura; obteniendo el producto hidroxilado 3-hidroxiclropacifenol, de fórmula molecular  $C_{15}H_{22}O_3Br_2$  (410.0 g/mol) y punto de fusión de 157°C.
- Se evidenció la transformación del sustrato pacifidieno únicamente por medio de la cepa *Mucor sp.*, pero debido a la poca cantidad obtenida no pudo ser elucidada su estructura. La cepa *Penicillium brevicompactum* no fue capaz de transformar este sustrato en las condiciones estudiadas.
- En las placas cromatográficas del control de transformación del pacifidieno con el hongo *Mucor sp.*, se observó un único producto de biotransformación que es diferente al sustrato de partida y a los metabolitos del hongo filamentoso, lo cual indica que el hongo *Mucor sp.* es sumamente específico.
- El sustrato  $\Delta^2$ -3-decloropacifenol no presentó modificaciones según la evaluación por medio de cromatografía en capa fina. No se observaron cambios en la polaridad del sustrato en ninguna de las biotransformaciones realizadas por medio de los hongos filamentosos *Penicillium brevicompactum* y *Mucor sp.*

- Se logró la identificación de algunos metabolitos secundarios del hongo marino *Geotrichum sp* en medio de cultivo líquido, obteniendo compuestos como el ergosterol ( $C_{28}H_{44}O$ ) y el peróxido de ergosterol ( $C_{28}H_{44}O_3$ ) comunes en las diferentes especies de hongos. También se identificó el compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona ( $C_{28}H_{40}O$ ) que por primera vez es aislado de la cepa del hongo *Geotrichum sp.* cultivado en el laboratorio.
- El porcentaje relativo del producto de biotransformación obtenido por las tres cepas de hongos no es muy alto en las condiciones utilizadas. Por lo tanto, es recomendable optimizar la reacción de biotransformación para obtener una mayor conversión de sustrato.
- Cada vez que se efectúe el control de la transformación, se recomienda controlar el pH del medio para poder llevar un seguimiento del crecimiento y condiciones del medio donde se cultiva el hongo y se genera la biotransformación.
- Se recomienda continuar y profundizar en el estudio del metabolismo secundario de los microorganismos con un potencial de aplicación a nivel biológico, farmacológico e industrial.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. MUÑOZ, O. Química de la flora de Chile. Departamento técnico de investigación, Universidad de Chile. Santiago, **1992**.
2. CARVALHO, C.C; and FONSECA, M.M.**2006**. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.* 24, 134-142.
3. KIJJOA, Anake and SAWANGWONG, Pichan. **2004**. Review Drugs and Cosmetics from the Sea. *Mar. Drugs* 2, 73-82.
4. BERGMANN W, **1949**. Comparative biochemical studies on the lipids of marine invertebrates, with special reference to the sterols. *J. Mar. Res* 8, 137-171.
5. ROVIROSA, J.; SOTO, H.; CUETO, M.; DARIAS, J.; HERRERA, J.; SAN-MARTÍN, A. **1999**. Sesquiterpenes from *Laurencia claviformis*, *Phytochemistry*, 50, 745-748.
6. SIMS, J.J; FENICAL, W; WING, R.M. and RADLICK, P. **1971**. Pacifenol, a rare sesquiterpene containing bromine and chlorine from the red alga, *Laurencia pacifica*. *J. Am. Chem. Soc*; 93(15) p. 3774.
7. CACCAMESE, S., COMPAGNINI, A. & TOSCANO, R. M. **1986** Pacifenol from the mediterranean red alga *Laurencia majuscula*. *J. Nat. Prod.* 49, 173-174.

8. FRONCZEK, F; CACCAMESE, S. **1986** Redetermination of Pacifenol, a Halogenated Sesquiterpene from the Mediterranean Red Alga *Laurencia majuscula*. Acta Crystallogr. Sect. C: 42, 1651-1652.
9. ROVIROSA, J.; ASTUDILLO, L; SÁNCHEZ, I; PALACIOS, Y; SAN-MARTÍN, A. **1989**. Actividad antimicrobiana de sesquiterpenos halogenados de *Laurencia claviformis* de la Isla de Pascua. Bol. Soc. Chil. Quím., 34, 147-152
10. ROVIROSA, J.; DARIAS, J; MANRIQUEZ, V; BRITO, I; LARA, N; ARGANDOÑA, V; SAN-MARTÍN, A. **1994**. Structure and insecticidal activities of chemigrene derivatives. Bol. Soc. Chil. Quím., 39, 193-198.
11. HANSON, James. An introduction to Biotransformations in Organic Chemistry. W.H. Freeman and Company Limited. New York. **1995**, 2-10.
12. EL SAYED, K; YOUSAF, M; HAMANN, M; AVERY, M; KELLY, M| AND WIPF, P. **2002**. Microbial and Chemical Transformation Studies of the Bioactive Marine Sesquiterpenes (S)-(+)-Curcuphenol and -Curcudiol Isolated from a Deep Reef Collection of the Jamaican Sponge *Didiscus oxeata*. J. Nat. Prod. 65, 1547-1553.
13. ROVIROSA, J, MARRERO, A, DARIAS, J, PAINEMAL, K y SAN MARTIN, A. **2006**. Secondary metabolites from marine *Penicillium brevicompactum*. J. Chil. Chem. Soc., 51, N° 1
14. SAN-MARTÍN, A; ASTUDILLO, L; RUIZ, D; ROVIROSA, J Y SANMARTÍN, C. **2005**. Decloración y actividad antimicrobiana del Pacifenol y sus derivados Semisintéticos. V Congreso internacional de Química de Productos Naturales y sus aplicaciones. Chile, Puerto Natales. Fecha: 18-25/04/05

15. FRAGA, M; ALVAREZ, L; SUÁREZ, S. **2003**. Biotransformation of the Diterpenes Epicandicandiol and Candicandiol by *Mucor plumbeus*. J. Nat. Prod. 66, 327-331
16. FRAGA, M; HERNÁNDEZ, G; GONZÁLEZ, P; LÓPEZ, M; SUÁREZ, S. **2001**. Biotransformation of the diterpene ribenone by *Mucor plumbeus*. Tetrahedron. 57, 761-770
17. ARANTES, F.; HANSON. R; HITCHCOCK, B. **1999**. The hydroxylation of the sesquiterpenoid valerianol by *Mucor plumbeus*. Phytochemistry, 52 (6) 1063-1067
18. ARANTES, F.; HANSON. R; HITCHCOCK, B. **1999**. The microbiological hydroxylation of the sesquiterpenoid patchoulol by *Mucor plumbeus* Phytochemistry, 52, (4) 635-638.
19. MAXIMO C.; AMORIM, P.; COSTA-FERREIRA, M. **2003** Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum sp.* CCM1 1019 Enzyme Microb. Technol. 32, (7) 145-151
20. CARBALLEIRA, D; ALVAREZ, E; SINISTERRA, V. **2004**. Biotransformation of cyclohexanone using *Geotrichum candidum* NCYC49. Factors affecting the selectivity of the process. J. Mol. Catal. B: Enzym. 28(1), 25-32
21. NETO, S; PASTORE M; MACEDO, A. **2004**. Biocatalysis and Biotransformation Producing  $\gamma$ -Decalactone. J. Food Sci. 69 (9) 677-680
22. CAMPBELL, M; FARRELL, S. Bioquímica, 4<sup>a</sup> ed. Thomson. México **2004**, p. 415

23. BOURGAUD, F; GRAVOT, A; MILESI, S; GONTIER, E. **2001**. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161, 839–851
24. BILBAO, M, R. Análisis fitoquímico preliminar. Oficina de publicaciones Universidad del Quindío. Colombia **1997**. p. 9-12
25. CURTIS Y BARNES *Biología*. 6° Ed. Médica Panamericana. **2000**, p. 495-502.
26. DARIAS, J **1998**. La biodiversidad de las algas marinas como fuente de interés farmacológico. *Rev. Medio Ambiente Canarias: Revista* 9.
27. CRESPO, R; LANEUVILLE, V. **1999**. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia lamouroux* (ceramiales, rhodophyta). *Quim. Nova* 22 (3), p. 369-373.
28. PONTÓN, MORAGUES, GENÉ, GUARRO, QUINDÓS. **2002**. Hongos y actinomicetos alergénicos. *Rev. Iberoam. Micol.* 1, 34, 35.
29. HOGG, S. *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd. England. **2005**. 77-154, 197-199.
30. PRESCOTT L., HARLEY J., KLEIN D., *Microbiología*, Editorial McGraw-Hill, 4ª ed, p 97-105, 124-128, y 973-985. **2001**.
31. MANZI, V; MAYZ , C. **2003** Valorando los Microorganismos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* v.23 n.1.

32. MADIGAN, M; MARTINKO, J; PARKER, J. Brock, Biología de los microorganismos. 10º Ed. Prentice Hall. Madrid **2000**. 3-10, 103-114, 142-144, 686-691
33. SAN-MARTÍN, A.; ROVIROSA, J.; DARIAS, J.; ASTUDILLO, L. **1996**. Semisíntesis y actividad biológica de derivados del sesquiterpeno pacifenol. Bol. Soc. Chil. Quím.,41, 403-408
34. VEEN, M; LANG, C. **2005**. Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways. Biochem. Soc. Trans. V. 33, part 5.
35. NELSON D.L and COX, M.M Lehninger Principles of biochemistry 4º Ed. Worth Pub.. New York. **2004**. CAP. 10 PAG 354-355, 819
36. KERR, R; BAKER, B. **1991**. Marine sterols. Review. J. Nat. Prod. 465-467
37. CAREY, Francis. Química Orgánica. 3º Ed, McGrawHill, Inc. España, **1999**. p..957, 162-167
38. KUO, Y; WENG, S; CHOU, C; CHANG, T; TSAI, W. **2003**. Activation and proliferation signals in primary human T lymphocytes inhibited by ergosterol peroxide isolated from *Cordyceps cicadae*. Br. J. Pharmacol. 140, 895–906
39. ERRATCHOU, C; BECERRA, J. Derivados Bioactivos de Hongos Filamentosos Presentes en Sedimentos de Bahía Concepción y Exterior. Tesis de pregrado. Universidad de La Santísima Concepción. Concepción, Chile. **2007**.

40. ARTEAGA, J. **2006**. Funcionalización selectiva y Síntesis Biomiméticas Mediadas por Ti<sup>III</sup> de Terpenoides. Tesis doctoral, Universidad de Granada, departamento de química orgánica.
41. VÁZQUEZ, Edgar. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR EN LÍNEA. Comité asesor de publicaciones. Facultad de Medicina, UNAM. Instituto de Química, UNAM. <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/terpenos.html>  
Fecha de ingreso:20/03/2007
42. ROMO DE VIVAR, A. Productos naturales de la flora mexicana. Limusa, México, **1989**. p. 59-62 y 69-73.
43. ITO, S; ENDO, K; YOSHIDA, T; YATAGAI, M and KODAMA, M. **1967**. Chamigrene, a Sesquiterpene Hydrocarbon of a Novel Carbon Skeleton. Chem. Commun. 186-188
44. ARGANDOÑA, V.H; SAN-MARTÍN, A; and ROVIROSA, J. **1993**. Halogenated sesquiterpenes pacifenol and pacifenol derivatives on the aphid *Schizaphis graminum*. Phytochemistry, 32, 1159-1161
45. BLUNT, J; COPP, B; MUNRO, M; NORTHCOTE, P; y PRINSEP, M. **2003**. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 20, 1–48
46. KAISER, C; PITOMBO, L y PINTO, A. **2001**. Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of chamigrenes from *Aplysia dactilomela*. Magn. Reson. Chem.; 39: 147–149
47. STAINER, R; INGRAHAM, J; WHEELIS, M; PAINTER, P. Microbiología. Reverté S.A. España **1989**. p. 722,724

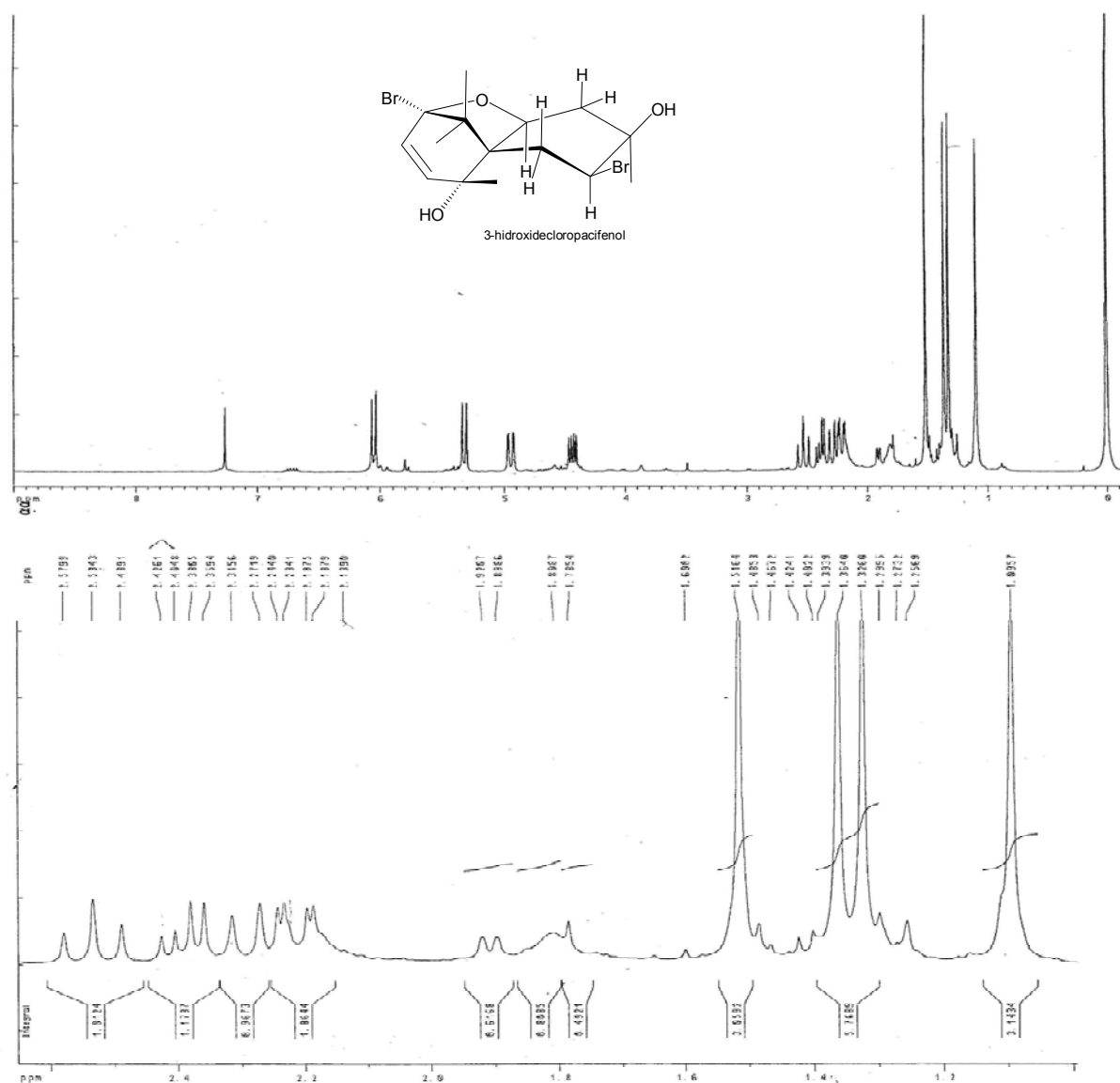
48. JONG S, BIRMINGHAM J M. **1992** Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Adv. Appl. Microbiol.* 37, 101-134.
49. WAINWRIGHT M. **1995** Introducción a la biotecnología de hongos. Editorial Acirbia, Segunda edición. Pag 57-73.
50. SAN-MARTÍN, A.; ROVIROSA, J.; DARIAS, J.; ASTUDILLO, L. **1996**. Semisíntesis y actividad biológica de derivados del sesquiterpeno pacifenol. *Bol. Soc. Chil. Quím.*,41, 403-408
51. YOUNG LEE, W; PARK, Y; AHN, J; PARK, Y AND LEE, H. **2005**. Cytotoxic Activity of Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one from the Sclerotia of *Polyporus umbellatus*. *Bull. Korean Chem. Soc.*, Vol. 26, No. 9, 1464-1466.
52. SOLOMONS, T. Química orgánica. Limusa, México **2000**. p.150-153
53. GROUTAS,W. Mecanismos de Reacción en química orgánica. McGrawHill, México. **2000**. p. 65-68
54. MARGESIN, R; SCHINNER, F. **2001**. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Review. Extremophiles* 5, (2) p. 73-83.
55. ILLANES A, Biotecnología de enzimas. Ediciones universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. Chile **1994**. p.48-53
56. LAMBERT, J; MAZZOLA, E. Nuclear magnetic resonance pectroscopy. Prentice Hall. New Jersey. **1998**.p. 80, 95, 25

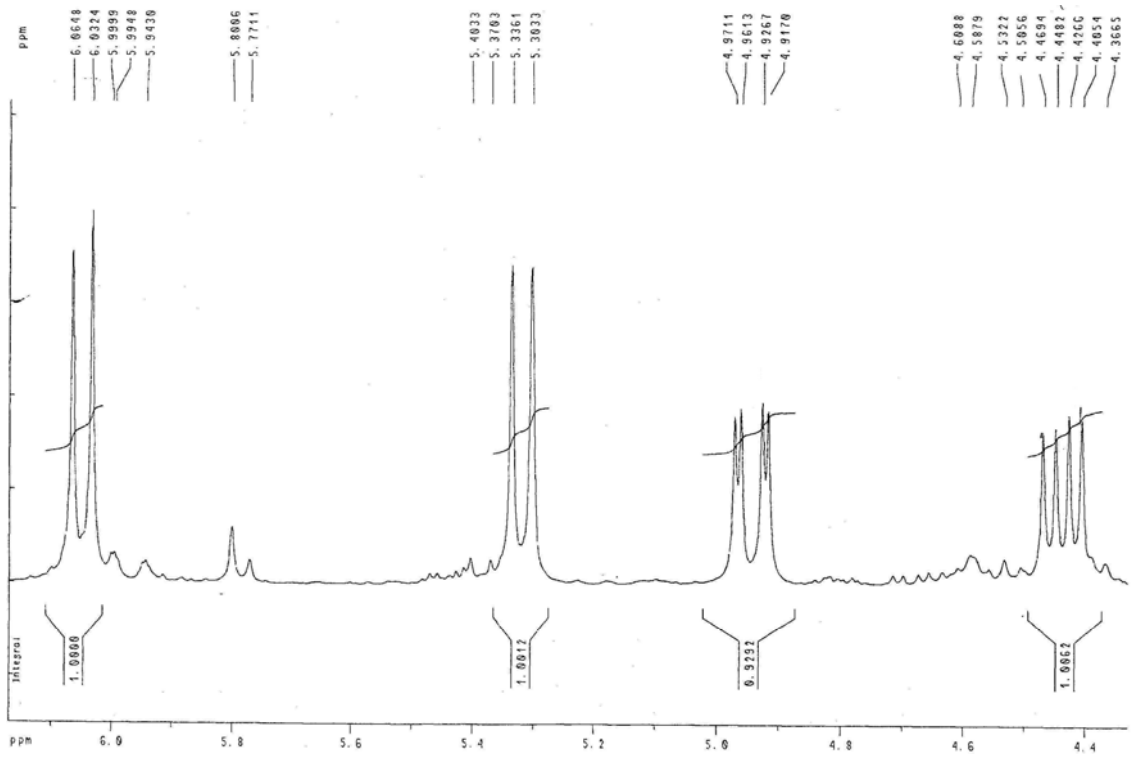
57. ESPINOSA, L. Introducción a la resonancia magnética nuclear de alta resolución 1D y 2D. Universidad técnica Federico Santa Maria. Chile **2004**. p 93-115
58. JINMING, G; LIN, H; JIKAI, L. **2001**. A novel sterol from chinese Truffles *Tuber indicum*. Sterols 66, p. 771-775.
59. CASTELLS, J; CAMPS, F. Elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Tomo II. Alambra S.A. Madrid **1980**. p. 75, 15-20

## ANEXOS

### Anexo 1.

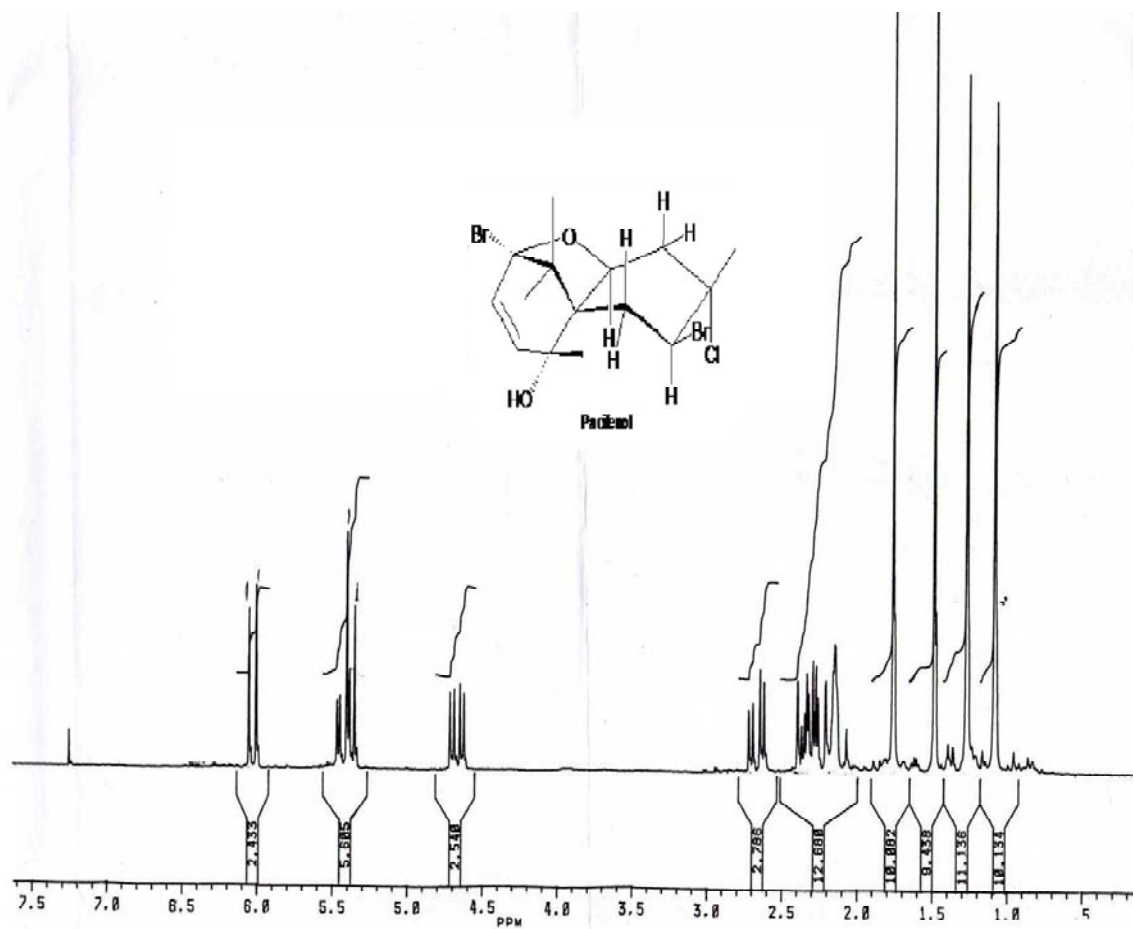
**Figura I.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del producto de biotransformación del pacifenol mediante el hongo *Penicillium brevicompactum*. (San Martín y col.)





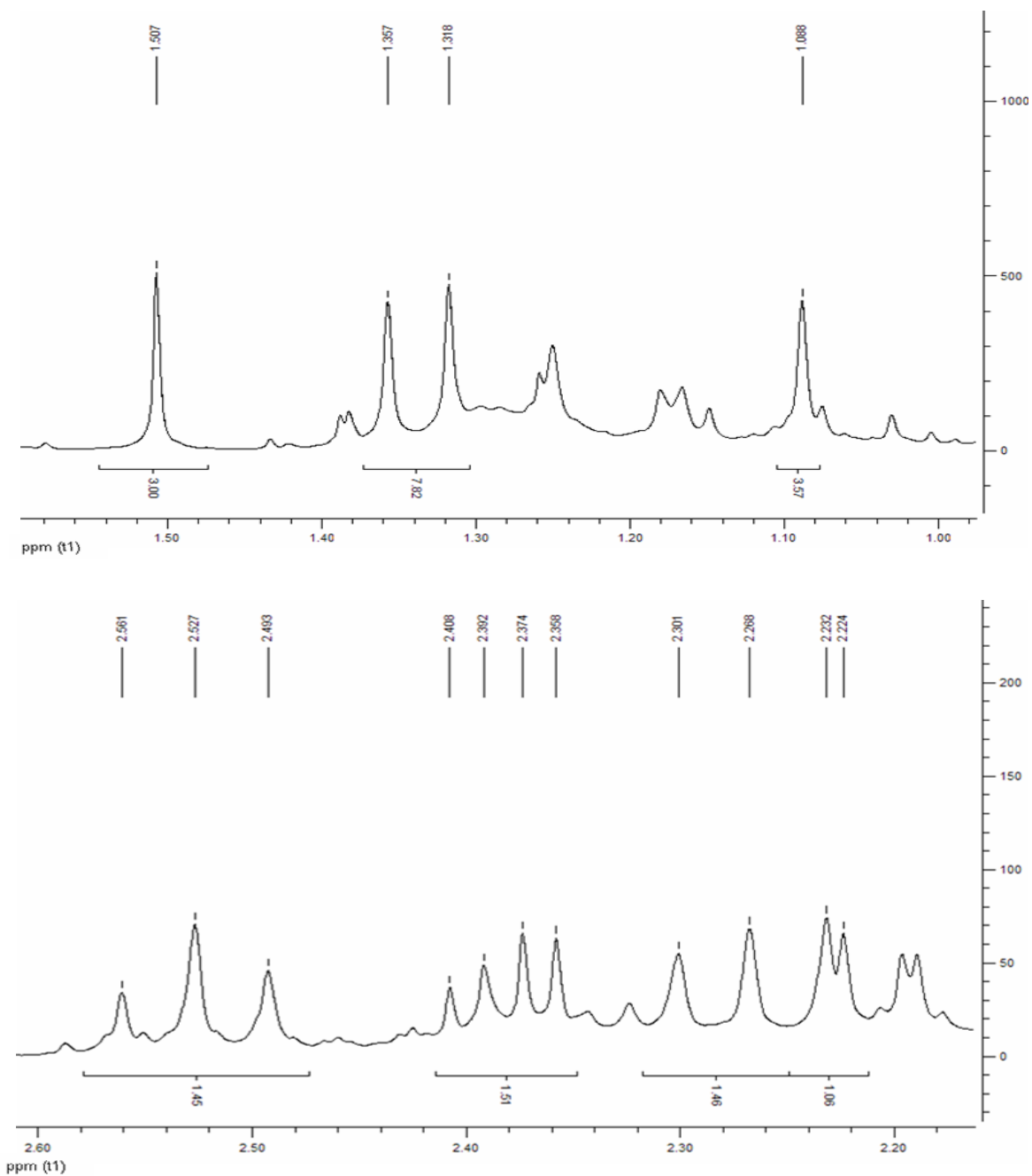
Anexo 2.

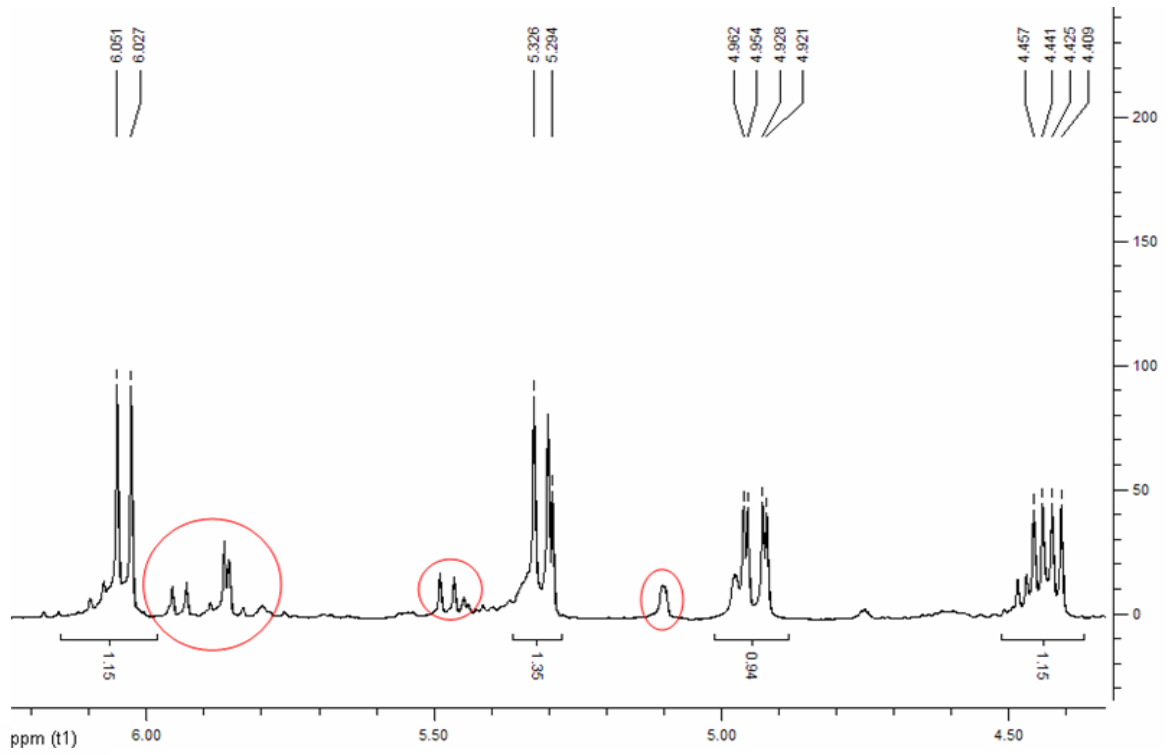
Figura I. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del pacifenol aislado del alga *Laurencia claviformis*.



### Anexo 3.

**Figura I.** Ampliaciones del espectro de RMN-<sup>1</sup>H del producto 3-hidroxidecloropacifenol mediante el hongo *Geotrichum sp.*

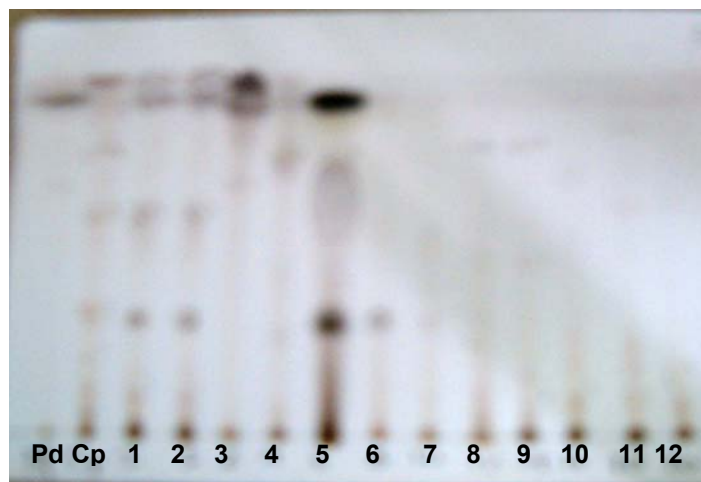


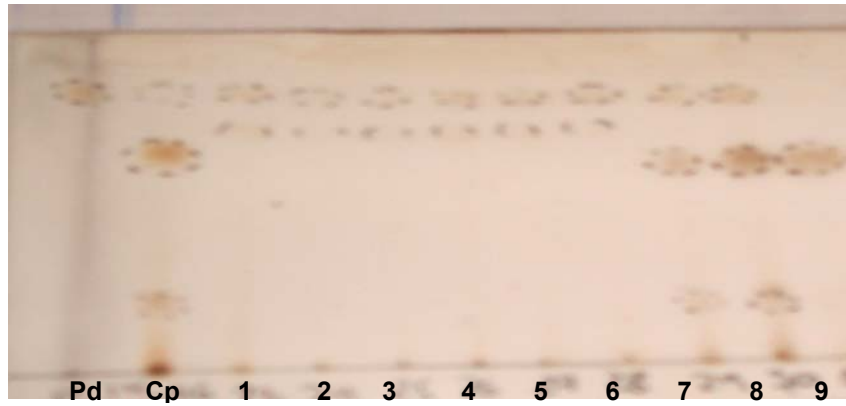


**Anexo 4.**

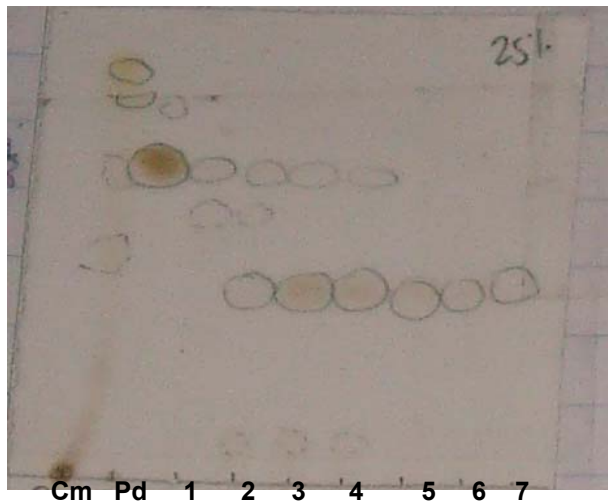
**Figura I.** CCF de la evaluación de transformación del pacifidieno con las cepas

a) *Penicillium brevicompactum*





b) *Mucor sp.*



\*Pd: Sustrato pacifidieno, Cp: Control hongo *Penicillium brevicompactum*, Cm: Control hongo *Mucor sp.* 1-9: Diferentes recipientes de fermentación

## Anexo 5.

**Figura I.** Ampliaciones del espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-ona

