

II Encuentro de Jóvenes Investigadores.

Biotransformación de Ambroxido usando un hongo fitopatógeno *Melampsora sp.*

Romina Salem.

Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Filosofía, Humanidades y Artes, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina.

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTACIÓN.

Antecedentes de biotransformaciones:

La utilización de microorganismos como biocatalizadores altamente eficientes nos remonta atrás en el tiempo en que antiguas civilizaciones aprendieron a hacer vinagre, vino y queso. En tiempos modernos, nuestra civilización ha ampliado su relación amistosa con los microorganismos, no sólo a través de su utilización como única fuente para la producción de antibióticos indispensables y hormonas esenciales sino también desarrollando su uso como biocatalizadores regio y estereoespecíficos en la síntesis de muchos compuestos químicos importantes y farmacéuticos¹.

La acidificación del vino al vinagre fue practicada en Babilonia 500 años a.C., pero fue solamente en 1894 cuando Pasteur percibió el papel de los microorganismos en la acetificación. Durante la última parte del siglo diecinueve Bertrand inició un enfoque sistemático de las transformaciones microbianas y a la vuelta del siglo se habían encontrado las siguientes reacciones: *Oxidación*: etanol a acético, glucosa a ácido glucónico; *Reducción*: ácido málico a ácido succínico, fructosa a manitol; *Hidrólisis*: taninos a ácido gálico, di- y tri-sacáridos a los monosacáridos constituyentes; *Resolución de mezclas racémicas* de: ácido tartárico (los famosos experimentos de Pasteur), ácidos láctico, mandélico y glicérico⁵.

Varias transformaciones fueron pronto añadidas, y así la observación de Mamoli y Vercellone en 1937 de que una levadura durante la fermentación pudo reducir 17-cetoesteroides a 17 β -hidroxiesteroides, condujo 15 años más tarde a una de las más importantes aplicaciones de las biotransformaciones, la producción de hormonas esteroidales⁵.

Fundamentos del trabajo:

Los microorganismos se usan como biocatalizadores regio- y estereoespecíficos en la síntesis de muchos compuestos químicos importantes y farmacéuticos¹.

Hoy en día los **microorganismos** son utilizados como **reactivos químicos** para la preparación de intermediarios clave necesarios en síntesis orgánica o para la producción económica de productos finales, especialmente hormonas esteroidales. Las biotransformaciones operan en la industria, en el desarrollo de agentes antitumorales naturales y semisintéticos, resolución de mezclas racémicas de aminoácidos y preparaciones de ácidos orgánicos².

Una **biotransformación** es una **reacción química catalizada por microorganismos o por preparaciones de enzimas derivadas de ellos**¹. La biotransformación es un proceso biológico por el que un compuesto orgánico es modificado a un producto recuperable, mediante reacciones sencillas, químicamente definidas, catalizadas por enzimas contenidas en las células.

Las enzimas seleccionadas para llevar a cabo las biotransformaciones son sintetizadas por las células de los organismos vivos. Pueden utilizarse las enzimas, o en realidad, las células de grupos de organismos particulares como bacterias, levaduras y hongos filamentosos. La mayoría de las enzimas sintetizadas por las células están retenidas para funcionar intracelularmente. Hay algunas enzimas que son secretadas fuera del límite de la membrana².

Las enzimas son biocatalizadores que aceleran la reacción de la misma forma que un catalizador químico. La propiedad sobresaliente por la que los biocatalizadores son distinguidos favorablemente de los catalizadores químicos comunes es su alta especificidad, no solo respecto a la reacción que catalizan sino también respecto a la estructura e incluso la estereoquímica del sustrato que aceptan y el producto que forman. Además, altas tasas de reacción se obtienen bajo condiciones de reacción moderadas, debido a un descenso significativo de la energía de activación de las reacciones químicas en el complejo enzima-sustrato³.

Además de sus sustratos naturales, muchas enzimas aceptan sustratos extraños, y por lo tanto catalizan reacciones “no naturales” con sustratos suministrados al medio. Los productos de la reacción que ya no son degradados se acumulan en el medio, de donde pueden ser aislados³.

Existen básicamente dos estrategias para llevar a cabo biotransformaciones, o bien usando enzimas puras o utilizando células enteras³.

La metodología de trabajo general adoptada, descrita ampliamente en la bibliografía, es un procedimiento de fermentación de dos etapas^{2,4}, para asegurarse que las células microbianas hayan alcanzado la fase estacionaria en su ciclo de crecimiento antes de que el sustrato sea agregado. En la fase estacionaria, los microorganismos llevan a cabo la mayoría de sus transformaciones dado que no están creciendo rápidamente y han producido la mayoría de los metabolitos primarios necesarios para sostener la vida¹.

Las biotransformaciones se han empleado para llevar a cabo reacciones que son difícilmente o del todo no factibles por métodos químicos puros. Los problemas sintéticos típicos que han sido resueltos por biotransformaciones han sido los siguientes: introducción de un centro quiral en una molécula, resolución de mezclas racémicas (racematos), conversión selectiva de un grupo funcional particular en varios grupos con reactividades similares, funcionalización regioselectiva de un carbono específico no activado³

Una de las mayores batallas libradas en la naturaleza es aquella observada entre las plantas y los hongos fitopatógenos, estos constituyen un gran grupo de microbios que usualmente reside en la parte exterior de las plantas, y son uno de los principales objetivos del sistema de defensa de las plantas. Para combatir estos hongos las plantas generan una gran cantidad de compuestos tales como terpenos, flavonoides y alcaloides, conocidos como fitoalexinas. Estos productos del metabolismo secundario de las plantas son, casi siempre, producidos en respuesta a una infección. Estos invaden la célula del microorganismo interrumpiendo su metabolismo, retardando así su crecimiento o aún matándolo¹⁰.

Es decir que, las fitoalexinas son antibióticos; metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por las plantas en respuesta al ataque microbiano. Dado que todos los metabolismos fúngicos de plantas originan fungitoxinas, reconocidas como sustancias de defensa, producen metabolitos más polares y menos tóxicos que los sustratos, por lo tanto el proceso se denomina desintoxicación. Se cree que puede estar cercanamente relacionado con la compatibilidad entre la planta y su patógeno⁷.

A su vez estos hongos han desarrollado respuestas a las fitoalexinas por medio de enzimas. Estas enzimas a menudo son muy similares a las P-450 monooxigenasas encontradas en humanos y otros mamíferos, y son capaces de modificar los compuestos tóxicos que generan las plantas¹⁰.

La mayoría de las fitoalexinas y compuestos relacionados son hidrofóbicos, y ellos son metabolizados por los hongos fitopatógenos a compuestos hidrofílicos por desintoxicación a través de la introducción de grupo/s hidroxilo, por oxigenación, hidratación, reducción o ruptura de grupo carbonilo. Los metabolitos hidrofílicos pueden por lo tanto ser almacenados en vacuolas y excretados, y este proceso es similar a la oxidación en mamíferos de xenobióticos por la enzima citocromo P-450 monooxigenasa⁷.

Características del sustrato:

Para referirnos al sustrato seleccionado podemos decir, que el Ambergris es un producto metabólico del cachalote (*Physeter macrocephalus*)⁹, y es una mezcla compleja de compuestos naturales producidos en el tracto gastrointestinal¹³. Después de varios años de envejecimiento, como resultado de la acción de la luz solar, aire y agua, el ambergris final combina un olor único con propiedades de fijación, particularmente valorado por las perfumerías⁴. Es considerado uno de los productos más valiosos aparte de civet, musk y castoroleum⁹. La liberación de la fragancia ambergris está relacionada principalmente con la presencia del (-)-oxo-nor-labdano (**1**), registrado por Firmenich S.A. como la marca registrada Ambrox, y hoy en día constituye su sustituto comercial más importante⁴. Las fragancias de Ambergris en el mercado más interesantes y valiosas son: Ambrox® (Firmenich), Ambroxide, Metilambroxide y Ambracetel¹³.

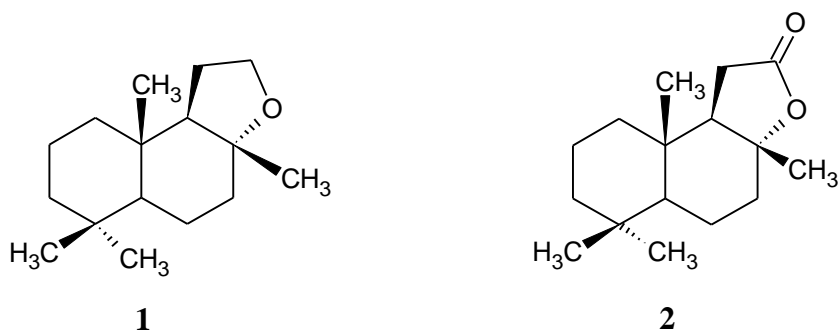
La disminución en la población de cachalotes y el aumento continuo en la contaminación costera, ha forzado a la industria de la perfumería a satisfacer sus necesidades por los productos naturales con equivalentes sintéticos¹³. Este hecho ha promovido también a los químicos a desarrollar rutas sintéticas para la producción de (-)-ambrox como también el compuesto racémico (\pm)-ambrox cuyo olor es algo diferente al del producto natural. Desde su preparación inicial en 1950, varias síntesis de (-)-ambrox se han desarrollado a partir de sesquiterpenos o diterpenos naturales como (-)-drimenol, (-)-sclareol, (-)-óxido de manoilo, ácido (-)-abiético, ácido (-)-levopimárico, ácido (-)-labdanólico y a partir de monoterpenos como la (+)-carvona y tuyona⁴.

(-)-Ambroxide (**1**) es un sustrato de estructura terpénica, barato y fácilmente disponible, es también un sustrato atractivo para biotransformaciones dado que está estructuralmente relacionado con fitoalexinas como el sclareolide (**2**) y no se encuentra en plantas. Dado que no comparte un nicho en la naturaleza con hongos fitopatógenos, la transformación de (-)-ambroxide por estos hongos puede resultar en compuestos novedosos no existentes en la naturaleza¹⁰.

Dado que las fitoalexinas tienen capacidad antioxidante, es posible que compuestos estructuralmente relacionados como (-)-ambroxide o sus productos puedan presentar de igual manera capacidad antioxidante¹⁰.

Finalmente podemos ver que existen pocos antecedentes de la biotransformación de **1**. En uno de ellos Hanson y Trunch¹¹ realizaron la biotransformación de (-)-

ambroxide (1) y sclareolide (2) para obtener compuestos oxidados en diferentes posiciones de los anillos, utilizando el hongo *Cephalosporium aphidicola*, produciendo 3 β -hidroxiambroxide, 3 β ,12 β -dihidroxiambroxide, 3 β ,6 β -dihidroxiambroxide y 3 β ,6 β -dihidroxiambroxidelactona. Farooq y Tahara⁸ hicieron otro tanto con *Botrytis cinerea*, obteniendo 1 β -hidroxi-8-epiambrox, 3 β -hidroxiambrox, sclareolide y 3 β -hidroxisclareolide.



Características del hongo

Melampsora medusae.

Taxonomía: Dominio: Eukaryota, Reino: Fungi, Phylum: Basidiomycota, Clase: Urediniomycetes, Orden: Uredinales, Familia: Melampsoraceae.

Melampsora sp., es un hongo fitopatógeno que causa una de las enfermedades más serias a nivel mundial: la roya. Se produce generalmente sobre las hojas tanto en árboles como arbustos, plantas de interior, árboles frutales, verduras y hortalizas. Se distinguen principalmente por la presencia de pequeños abultamientos rojizos ó marrones en el envés de las hojas, que son en realidad, las esporas acumuladas en esta zona. Por el haz de la hoja se corresponden con manchas amarillas que son porciones de hoja decoloradas.¹⁴

No existen antecedentes en la bibliografía acerca de alguna biotransformación realizada por *Melampsora medusae*.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.

Objetivo General.

El objetivo general es usar una cepa de *Melampsora medusae* adquiridas comercialmente, como fuente de enzimas para transformar un sustrato orgánico de estructura terpénica.

Objetivos Específicos

a-Hacer un screening preliminar de la biotransformación de (-)-ambroxide por acción de las enzimas producidas por una cepa pura del hongo filamentoso *Melampsora medusae*, en un medio de cultivo líquido (Papa-Dextrosa)

b-Realizar un seguimiento de cada biotransformación mediante análisis por Cromatografía en Capa Delgada (CCD).

c-Llevar la biotransformación a escala preparativa con el medio seleccionado, en base a criterios de pureza y cantidad de compuestos detectados por CCD.

d-Aislar, purificar y determinar la estructura de los metabolitos obtenidos por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C .

DESARROLLO

Biotransformación de (-)-Ambroxide

Se usó una cepa pura de *Melampsora medusae* del cepario del Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Cuyo.

En este trabajo se siguió el procedimiento general descrito en la bibliografía². Los ensayos realizados se llevarán a cabo por duplicado.

a-Se preparan dos erlenmeyers de 250 ml con 30 ml de cada medio (Papa-Dextrosa), se tapan con algodón y se llevan a autoclave durante 17 min. a 121°C. Una vez retirados del autoclave se dejan enfriar, se inoculan asépticamente con esporas de la cepa pura del microorganismo, dejando incubar 72 horas en shaker a 110 rpm en sala a 25-30° C (etapa I).

b- Después de obtenida la biomasa, se transfiere una alícuota de 1,5 ml de medio de cultivo a cada uno de dos erlenmeyers de 250 ml seleccionados para llevar a cabo la biotransformación y a uno como control de caldo dejando dos erlenmeyers sin inocular, uno como control solvente y otro como control sustrato, conteniendo cada erlenmeyer 30 ml de caldo de cultivo.

c-Se dejan incubar los tres erlenmeyers inoculados con el microorganismo durante 24 horas en las mismas condiciones descritas anteriormente (etapa II).

d-Luego, todos excepto el que corresponda al control sustrato, se inoculan con una solución del compuesto orgánico (1.33% p/v) en una mezcla de DMSO:EtOH (5:1) de manera de tener una concentración final del compuesto de 0,2 mg/ml de caldo.

Todos los erlenmeyers se llevan a agitación en las mismas condiciones antes mencionadas, durante un período máximo de 21 días.

e-La evolución de la biotransformación se sigue mediante la toma de muestras cada 48 horas: T₀: inmediatamente después de agregado el sustrato, T₁: 48 hs, T₂: 96 hs, T₃: 144 hs, T₄: 192 hs, T₅: 240 hs, T₆: 288 hs, T₇: 336 hs y T₈: 384 hs.

Para ello se toma una alícuota de 0.5 ml, se vuelca en un tubo de ensayo y se agrega un pequeño volumen de AcOEt puro, agitando vigorosamente para realizar una extracción líquido-líquido. La fase orgánica se siembra en placa de silicagel y se corre el cromatograma con una mezcla de solventes (EP:AcOEt). Para revelar los compuestos se expone cada placa a la luz UV de 254 nm de longitud de onda y posteriormente se pulveriza con una solución de p-anisaldehído y se calienta sobre plancha metálica hasta la aparición de las manchas características del cromatograma.

f- Posteriormente en base a criterios de pureza y cantidad de metabolitos producidos, detectados por cromatografía en capa delgada en la etapa de screening preliminar, se procede a la biotransformación a escala preparativa.

g-Los metabolitos obtenidos se aíslan por cromatografía en columna, se separan y se purifican.

h-Se determina su estructura por métodos espectroscópicos (IR, Espectrometría de Masas y RMN de ¹H y ¹³C)

CONSIDERACIONES FINALES

Por estudios por cromatografía en capa delgada un metabolito ya fue individualizado (Fig.1) contra un patrón conocido, y fue identificado como 1,β hidroxiambroxide .Posteriormente se continuará con la purificación del metabolito obtenido que será enviado para su análisis e identificación por métodos espectroscópicos.

Sustrato
Metabolito



(Fig.1) Placa del screening preliminar a los 16 días



(Fig.2)

Este es el primer reporte en que enzimas producidas por *Melampsora medusae* catalizan una oxidación estereo y regioselectiva de (-)- Ambroxide en carbonol. (Fig.2)

Posibles líneas de acción

Se realizará un bioensayo del sustrato de partida (-)-Ambroxide y del metabolito obtenido 1,β hidroxiambroxide con el fin de encontrar alguna propiedad biológica::

Capacidad Antioxidante: La utilización de sustancias con capacidad antioxidante puede ser de gran relevancia en prevención y terapia de enfermedades relacionadas con el aumento del estrés oxidativo⁷, utilizando el Método del radical estable difenilpicrilhidrazilo (DPPH), descrito en la bibliografía⁸.

BIBLIOGRAFÍA

1-Leuenerger, H.G.W. Biotransformation- A useful tool in organic chemistry. *Pure & Appl. Chem.* **62**, 753-768 (1990).

2-Abourashed E.A., Clark A.M. & Hufford C.D.. Microbial Models of Mammalian Metabolism of Xenobiotics: An Updated Review, *Current Medicinal Chemistry* **6**, 359-374 (1999).

3-Roberts, S.M., Turner N.J., Willetts A.J. & Turner M.K. Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms. © Cambridge University Press, ISBN 0-521-43070-4 (1995).

4-Kouzi, Samir A. Metabolism Studies of the Diterpene Sclareol. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, The University of Mississippi, Mississippi, USA, November (1991).

5-Farooq A. and Tahara S. Fungal metabolism of flavonoids and related phytoalexins, *Curr. Top. Phytochemistry* **2**, 1-33 (1999).

6-Emerenciano V.P, Kaplan M.A.C., Gottlieb O.R.. Evolution of sesquiterpene lactones in Angiosperms. *Biochem. System. Ecol.* **13**, 145-166 (1985).

7-Potterat, O. Antioxidants and Free Radical Scavengers of Natural Origin. *Current Organic Chemistry*, **1**, 415-440 (1997).

8-Ascoli, B., Machado Bernardi, A. P., Lino von Poser, G., Lissi, E. & Bridi, R. Estudo do potencial antioxidante de *Hypericum polyanthemum* a través do método DPPH. XIV Jornadas de Jovens Pesquisadores da AUGM, 13 a 15 de Setembro de 2006, pág 428, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

8. Farooq, A. and Tahara, S. Biotransformation of Two Cytotoxic Terpenes, α -Santonin and Sclareol by *Botrytis cinerea*. *Z. Naturforsch.* **55c.**, 713-717 (2000).

9. Giacomini, R.A., P.C.M. de L. Miranda, L.H.B. Baptistella & P.M. Imamura. Synthesis of ambergris odorant *ent*-ambrox. *ARKIVOC*, **10**, 314-322 (2003).

10. Gierman, Hincó J. Practical Time Organic Chemistry, Laboratorio de Química, Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Noviembre 2001.

11. Hanson, J. and Truneh, A. The biotransformation of Ambrox[®] and Sclareolide by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, **42**, 1021-1023 (1995).

12. <http://es.wikipedia.org/wiki/xenobiotico>,
<http://es.wikipedia.org/wiki/sinergia>.

13. Kouzi, Samir A., Metabolism Studies of the Diterpene Sclareol. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, The University of Mississippi, Mississippi, USA, November 1991.

14. www.botanical-online.com/roya.htm