



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

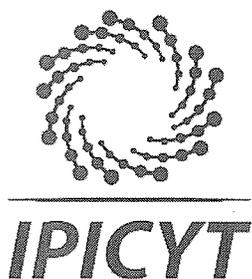
**Biotransformación de metabolitos secundarios por  
cultivo de células en suspensión de *Nicotiana  
tabacum* NT1**

Tesis que presenta  
**Arianna Duque Ortiz**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Codirectores de la Tesis:**  
**Dr. Guillermo Pastor Palacios**  
**Dr. Samuel Lara González**

San Luis Potosí, S. L. P. Julio 2019



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Biotransformación de metabolitos secundarios por cultivo de células en suspensión de Nicotiana tabacum NT1***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Arianna Duque Ortiz** y aprobada el nueve de julio del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Samuel Lara González**  
Codirector de la tesis

**Dr. Guillermo Pastor Palacios**  
Codirector de la tesis

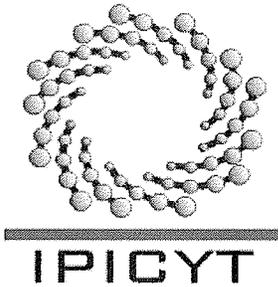
**Dra. Fabiola Jaimes Miranda**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales del Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas (CIIDZA), así como en el laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular, ambos del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Guillermo Pastor Palacios y Dr. Samuel Lara González.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, número de registro 636737, y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 194 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de julio del año 2019, se reunió a las 09:10 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Fabiola Jaimes Miranda</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Samuel Lara González</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Guillermo Pastor Palacios</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Arianna Duque Ortiz**

sobre la Tesis intitulada:

***Biotransformación de metabolitos secundarios por cultivo de células en suspensión de Nicotiana tabacum NTI***

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Guillermo Pastor Palacios**  
**Dr. Samuel Lara González**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 11:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de julio de 2019.

**Mtra. Yvonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## **Dedicatorias**

A todas aquellas personas que han enriquecido mi vida con su existencia

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 636737.

Al instituto Potosino de investigación Científica y Tecnológica IPICYT.

Al Dr. Guillermo Pastor Palacios y al Dr. Samuel Lara Palacios por la codirección y apoyo en este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Fabiola Jaimes Miranda, por las aportaciones en la tesis.

Al Dr. Elihú Bautista por su apoyo en este trabajo.

# Contenido

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	III
DEDICATORIAS	V
AGRADECIMIENTOS	VI
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
ANEXOS	XI
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
I- INTRODUCCIÓN	1
1.1 Metabolitos secundarios	1
1.1.1 Biosíntesis de metabolitos secundarios	1
1.2 Biotransformación	3
1.2.1 Biotransformación de compuestos aromáticos	4
1.3 Terpenos	4
1.3.1 Biosíntesis de Terpenos	7
1.3.2 Biotransformación de terpenos	7
1.3.2.1 Biotransformación de terpenos por cultivo de células vegetales	9
1.4 Ácido <i>p</i> -aminobenzoico (PABA)	11
1.4.1 Biosíntesis de ácido <i>p</i> -aminobenzoico (PABA)	12
1.4.2 Biotransformación de PABA	14
1.4.2.1 Biotransformación de PABA por cultivo de células vegetales	14
II- OBJETIVO GENERAL	15
2.1 Objetivos específicos	15
III- MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Cultivo de células vegetales <i>Nicotiana tabacum</i> NT1	16
3.2 Metabolitos secundarios	16
3.3 Curva de crecimiento de las células NT1	16
3.4 Ensayo de biotransformación	17
3.5 Extracción de los compuestos de biotransformación.	17
3.6 Cromatografía en capa fina	19
3.7 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	19
3.8 Purificación de los productos de biotransformación	19
3.9 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	19
IV-RESULTADOS	20
4.1 Efecto de los metabolitos exógenos sobre el crecimiento células vegetales NT1	20
4.2 Biotransformación de los compuestos exógenos por células NT1	22

4.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	22
4.4 Purificación de los productos de biotransformación	26
4.5 Resonancia magnética nuclear de compuestos de biotransformación de linearolactona y ácido <i>p</i> -aminobenzoico	29
V- DISCUSIÓN	32
IV-CONCLUSIONES	39
V-PERSPECTIVAS	39
VI-REFERENCIAS	40

## Lista de tablas

Tabla 1: Nomenclatura de terpenos	5
Tabla 2: Ejemplos de biotransformación de terpenos mediante hongos, bacterias, células vegetales y enzimas.	10
Tabla 3: Compuestos usados en los ensayos de biotransformación	18
Tabla 4: Fase móvil utilizada en TLC para cada compuesto	19
Tabla 5: Comparación señales del espectro $^{13}\text{C}$ de productos de biotransformación a partir de PABA	35
Tabla 6: Comparación de señales de espectro de $^1\text{H}$ de productos de biotransformación de PABA por células vegetales.	37

## Lista de figuras

Figura 1: Vías de biosíntesis de metabolitos secundarios.	2
Figura 2: Terpenos de origen vegetal con importancia farmacológica.	6
Figura 3. Vías de biosíntesis de terpenos.	8
Figura 4: Vía de biosíntesis de ácido <i>p</i> -aminobenzoico.	13
Figura 5. Efecto de los metabolitos exógenos sobre el crecimiento de las células vegetales NT1.	21
Figura 6: Resolución por TLC de los productos de biotransformación.	24
Figura. 7: Cromatogramas en HPLC de los compuestos de biotransformación de la Linearolactona a longitud de onda ( $\lambda$ ) 254nm.	25
Figura 8: Resolución por TLC de productos de biotransformación a partir de Linearolactona.	27
Figura 9: Resolución en TLC de los productos de biotransformación del ácido <i>p</i> -aminobenzoico.	28
Figura 10: Espectros comparativos de RMN $^{13}\text{C}$ de PABA y el compuesto de la fracción 4-5.	30
Figura 11: Espectros comparativos de RMN $^1\text{H}$ de PABA y el compuesto de la fracción 4-5.	31
Figura 12: Estructuras químicas de productos de biotransformación de PABA por células vegetales	38

## **Anexos**

Anexo 1: Medio mínimo Murashige & Skoog líquido	45
Anexo 2: Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la fracción 2	46
Anexo 3: Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la fracción 15-16	47
Anexo 4: Expansión del espectro de RMN $^1\text{H}$ de la fracción 4-5	48

## Abreviaturas

<b>°C.</b>	Grados Celsius
<b>µg.</b>	Microgramos
<b>µM.</b>	microMolar
<b>mL.</b>	Mililitros
<b>L.</b>	Litros
<b>ppm.</b>	partes por millón
<b>MS.</b>	Metabolito secundario
<b>RMN.</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>ATP.</b>	trifosfato de adenosina
<b>NADP.</b>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>ADP.</b>	difosfato de adenosina
<b>CoA.</b>	coenzima A
<b>CYP450.</b>	Citocromo p450s
<b>PABA.</b>	ácido <i>p</i> -aminobenzioco
<b>ADC.</b>	4-amino-4-desoxicorismato
<b>CD<sub>3</sub>OD.</b>	Metanol deuterado
<b>DMSO.</b>	Dimetilsulfóxido
<b>C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.</b>	piridina deuterada
<b>IIP.</b>	disfosfato de isopentenilo
<b>DMAPP.</b>	disfosfato de dimetilalilo
<b>MEP.</b>	fosfato de metileritritol
<b>FPP.</b>	disfosfato de farnesilo
<b>GPP.</b>	disfosfato de geranilo
<b>GGPP.</b>	disfosfato de geranilgeranilo
<b>MVA.</b>	Ácido mevalónico o Mevalonato
<b>HPLC.</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución

## Resumen

### Biotransformación de metabolitos secundarios por cultivo de células en suspensión de *Nicotiana tabacum* NT1.

Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos orgánicos con gran diversidad química; se clasifican en: terpenos, alcaloides, fenilpropanoides y compuestos fenólicos relacionados. La biotransformación de MS consiste en la modificación química de un compuesto a través de un sistema biológico, con la finalidad de obtener análogos o compuestos nuevos con características diferentes. El cultivo de células vegetales puede ser usado en procesos de biotransformación de varios compuestos orgánicos, tomando ventaja del repertorio enzimático que poseen. El presente trabajo se enfoca en explorar la biotransformación de MS mediante el uso del cultivo de células vegetales en suspensión de *Nicotiana tabacum* NT1. Y para ello, inicialmente se evaluó el efecto de siete MS exógenos sobre el cultivo NT1, mediante una cinética de crecimiento de las células en presencia de cada uno de los metabolitos. Posteriormente, con aquellos compuestos tolerados por las células, se procedió a analizar la capacidad del cultivo para realizar reacciones de biotransformación. Esto se determinó mediante la adición de los compuestos al medio de cultivo y posterior a un período de incubación, se procedió a extraer y purificar los posibles productos de biotransformación. Los resultados obtenidos muestran que, de los siete compuestos evaluados, solo los compuestos linearolactona y el ácido *p*-aminobenzoico (PABA) fueron biotransformados. El producto de purificación de linearolactona no fue suficiente para dilucidar su estructura química por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . El producto mayoritario obtenido por modificación del PABA se analizó por RMN, y el resultado sugiere que corresponde a un compuesto glicosilado derivado de PABA.

PALABRAS CLAVE: terpenos; ácido *p*-aminobenzoico; glicosilación

## **Abstract**

### **Biotransformation of secondary metabolites by cell suspension culture of *Nicotiana tabacum* NT1**

The secondary metabolites (MS) are organic compounds with great chemical diversity, they can be classified based on their biosynthetic origin, in three large groups: terpenes, alkaloids and phenylpropanoids and related phenolic compounds. The biotransformation of MS consists of the chemical modification of a compound in order to obtain analogues or new compounds with different characteristics. The use of plant cell culture is an efficient alternative, which can be used in the biotransformation processes of several organic compounds, taking advantage of the enzymatic repertoire that they possess. The present work focuses on exploring the biotransformation of MS through the use of plant cell culture in *Nicotiana tabacum* NT1. The effect of seven exogenous MS on the NT1 culture was evaluated by means of a kinetics of cell growth in the presence of each of the metabolites. Subsequently, with the compounds tolerated by NT1 cells, the ability of these cells to perform biotransformation reactions was analyzed. This was determined by the addition of the compounds to the culture medium and after an incubation period, the possible biotransformation products were extracted and purified. The tests carried out show that, of the seven compounds evaluated, only the compounds linearolactone and *p*-aminobenzoic acid (PABA) were biotransformed. The product of linearolactone purification was not enough to elucidate its chemical structure by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The major product obtained by modification of PABA was analyzed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, this allowed us to know that PABA is glycosylated by plant cells and suggest a possible chemical structure of this compound.

**KEYWORDS:** terpenoids; *p*-aminobenzoic, glycosylation

## I- Introducción

### 1.1 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos los cuales no tienen una función esencial en el metabolismo central o primario<sup>1</sup>. La biosíntesis de estos compuestos es por vías metabólicas secundarias presentes en las células, y en algunos casos factores externos o ambientales influyen en su producción. Por otra parte, los metabolitos secundarios presentan una gran diversidad química y estructural, que les confiere una amplia gama de actividades biológicas y aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética o alimentaria. Los metabolitos secundarios se pueden clasificar con base en su origen biosintético, en tres grandes grupos: terpenos, alcaloides y fenilpropanoides con compuestos fenólicos relacionados<sup>2</sup>.

#### 1.1.1 Biosíntesis de metabolitos secundarios

Las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan directamente de las vías del metabolismo primario. En la Figura 1 se muestra un esquema de la interacción entre el metabolismo primario y las vías de biosíntesis de metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios de los procesos de fotosíntesis, glucólisis y ciclo de Krebs intervienen fuera del proceso de generación de energía para proporcionar intermediarios biosintéticos. Entre los principales precursores en la biosíntesis de metabolitos secundarios están acetil coenzima A (acetil-CoA), ácido shikímico, ácido mevalónico, y 1-desoxilulosa 5-fosfato<sup>3,4</sup>. Por otro lado, las reacciones químicas que participan en la biosíntesis de los metabolitos secundarios son de tipo oxidación-reducción, hidroxilación, metilación, amino-acilación, glicosilación- acilación, reacciones de alquilación (sustitución nucleofílica, adición electrofílica), reacciones de descarboxilación, acoplamiento fenólicos oxidativos, reacciones de epoxidación, etc<sup>1</sup>. Todas estas reacciones son catalizadas principalmente por enzimas especializadas que pueden ser únicas en cada organismo.

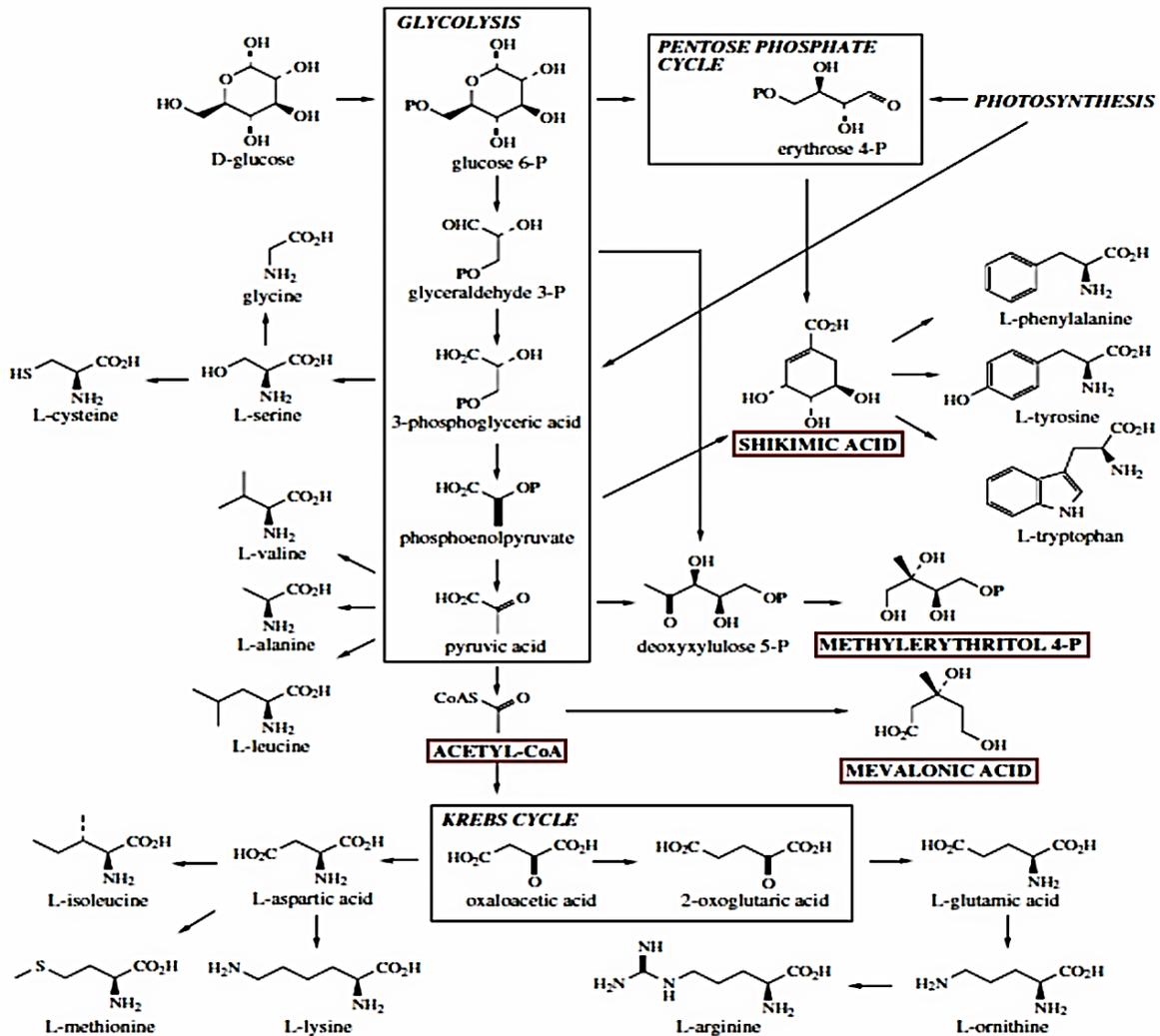


Figura 1: Formación de metabolitos secundarios a partir de metabolitos primarios.

La biosíntesis de metabolitos secundarios es a partir de los metabolitos primarios de los procesos de fotosíntesis, glucólisis y el ciclo de Krebs. En recuadros se indican los principales precursores biosintéticos de la mayoría de los metabolitos secundarios. Tomado de Giweli et al 2013<sup>4</sup>.

## 1.2 Biotransformación

La biotransformación de metabolitos secundarios, consiste en la modificación química de un compuesto orgánico exógeno, realizada por un cultivo celular (bacterias, hongos o células eucarióticas) o con enzimas aisladas de microorganismos. Esta es una estrategia que ha ganado considerable atención en los últimos tiempos, debido a que es una herramienta biotecnológica para la obtención de compuestos con propiedades químicas de interés, o bien para la producción de nuevos compuestos químicos. Entre las aplicaciones de la biotransformación de metabolitos secundarios están, la conversión de sustancias disponibles abundantemente en la naturaleza a productos con relevancia para la industria farmacéutica, cosmética, o alimentaria. Así mismo, la biotransformación es usada para encontrar soluciones más eficientes para eliminar del medio ambiente sustancias tóxicas, estrategia conocida como bioremediación<sup>5</sup>.

En la literatura, existen muchos reportes de procesos de biotransformación mediante el uso de cultivo de hongos. Sin embargo, también se han utilizado células vegetales, y enzimas aisladas de microorganismos.

En este sentido, se ha observado que las células vegetales pueden transformar un compuesto mediante diferentes tipos de reacciones químicas, por ejemplo: oxidación, hidroxilación, reducción, metilación, desmetilación, aminoacetilación, glucosilación-acilación, esterificación, y saponificación. Además, puede tolerar diferentes tipos de compuestos como los esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos, y compuestos glicosilados. En todos los casos, la biotransformación es catalizada por enzimas específicas o enzimas con capacidad de utilizar varios sustratos (flexibilidad catalítica). Los resultados de las reacciones catalizadas enzimáticamente pueden ser mejores a aquellos obtenidos por reacciones de síntesis química<sup>6</sup>. Por ejemplo, las velocidades de los procesos mediados por enzimas se aceleran en comparación con catalizadores químicos; las enzimas pueden ser efectivas a baja concentración y actuar a temperaturas fáciles de manipular (20-40°C), minimizan reacciones secundarias no deseadas como la formación de isómeros, y pueden tener actividad en solventes orgánicos<sup>7</sup>.

### 1.2.1 Biotransformación de compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos son abundantes en la naturaleza. Tienen usos muy diversos y se destacan por sus diferentes efectos biológicos. Algunos de ellos pueden inducir cáncer o causar mutaciones, incluso a concentraciones muy bajas. Las reacciones de biotransformación de compuestos aromáticos mediadas por microorganismos, células de plantas y animales generan diferentes productos de alto valor para las industrias química y farmacéutica <sup>8</sup>.

### 1.3 Terpenos

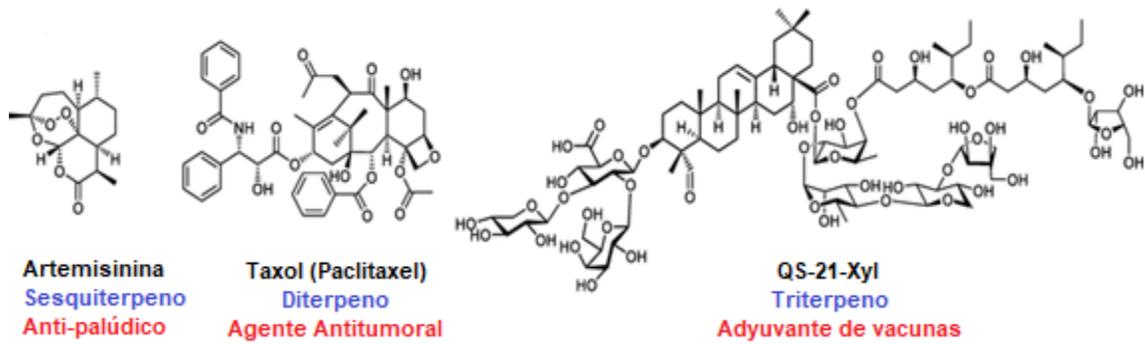
Los terpenos son compuestos aromáticos presentes tanto en células procariotas como eucariotas, por lo que son los metabolitos secundarios más abundantes en la naturaleza. Su nombre deriva del primer miembro de esta clase que fue aislado de trementina ("terpentina" en alemán). Todos los terpenos son una fusión de unidades ramificadas de cinco carbonos (C<sub>5</sub>) basadas en el esqueleto de isopentano. Estos monómeros generalmente se conocen como unidades isopreno. La diversidad química de estos metabolitos ha llevado al descubrimiento de 55,000 estructuras diferentes y este número probablemente aumentará en los próximos años a medida que aumenten los estudios de estos compuestos químicos <sup>9</sup>.

Los terpenos se clasifican por el número de las unidades de isopreno que se encuentren presentes en su estructura, en la tabla 1 se muestra su clasificación.

El estudio de terpenos ha permitido identificar metabolitos farmacológicamente importantes, por ejemplo el taxol, un agente anticancerígeno encontrado en concentraciones muy bajas (0.01% en peso seco) en la corteza de tejo (*Taxus brevifolia*); y el diperteno forskolina, un compuesto utilizado para tratar el glaucoma y obtenido de la planta *Coleus forskhlii* <sup>10; 11</sup>; la artemisinina un sesquiterpeno con actividad antipalúdica (Figura 2) <sup>12</sup>.

Tabla 1: Clasificación de Terpenos.

N° Carbonos	Nombre	Ejemplo	Función biológica	Ref.
C <sub>5</sub>	Hemiterpenos	Isopreno	Compuestos volátiles emitidos por la planta desde tejidos fotosintéticamente activos	9
C <sub>10</sub>	monoterpenos	Geraniol	Están presentes en la esencia de las flores y aceites esenciales de las plantas; están implicados en las interacciones mutualistas con polinizadores de plantas, y como repelentes a insectos	9;13
C <sub>15</sub>	sesquiterpenos	zingibereno	Se encuentran en aceites esenciales Actúan como fitoalexinas y compuestos antibióticos producido por las plantas como respuesta antimicrobiana y contra ataque de herbívoros oportunistas	9
C <sub>20</sub>	diterpenos	giberelinas ácido abscísico, estrigolactonas, brasinoesteroides, citoquininas	Reguladores del crecimiento y desarrollo	14
C <sub>30</sub>	triterpenos	Fitosterol y fitoalexinas	Incluye los componentes de la membrana	15
C <sub>40</sub>	tetraterpenos	Carotenoides	Realizan funciones esenciales en la fotosíntesis.	15; 16
+C <sub>40</sub>	politerpenos	plastoquinona y ubiquinona	Coenzimas que participan en el transporte de electrones	15



**Figura 2: Terpenos producidos por plantas importantes farmacológicamente.**

En la figura se representan las estructuras químicas de terpenos con aplicación farmacológica. Las estructuras químicas pueden ser relativamente sencillas o tan complejas como se puede observar en la figura. Los nombres y las clases de los productos se muestran en negro y azul, respectivamente, con las aplicaciones médicas en rojo <sup>12</sup>.

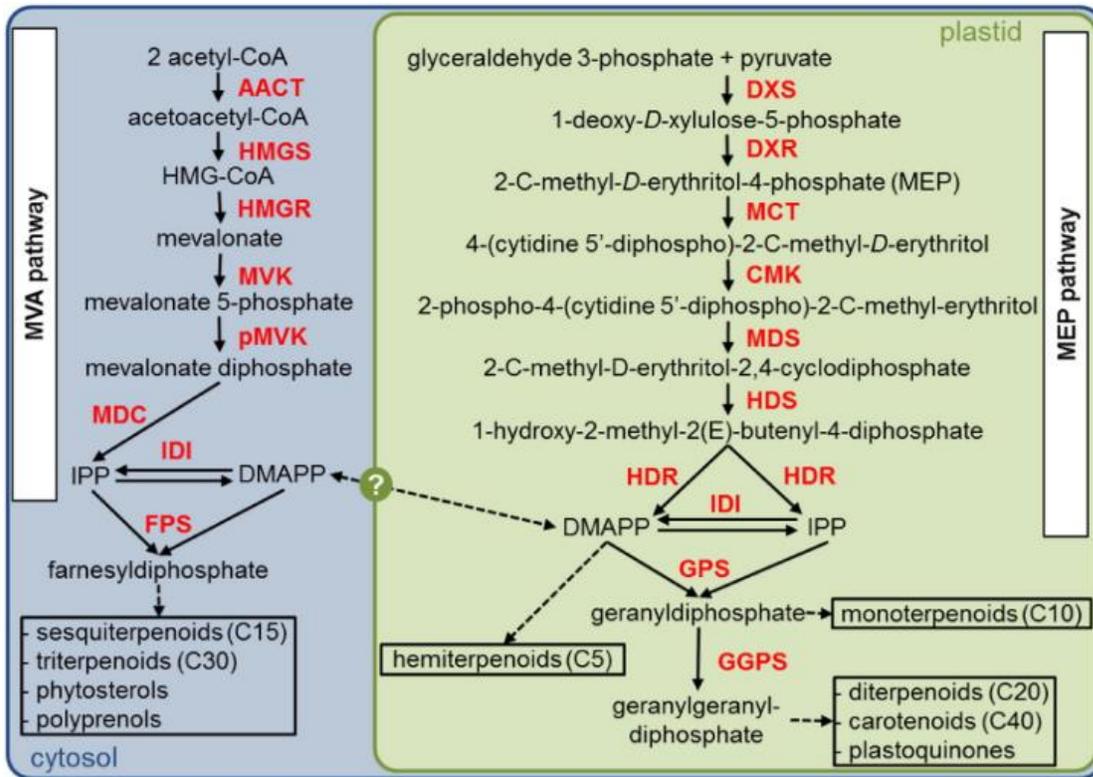
### 1.3.1 Biosíntesis de Terpenos

Los terpenos están presentes en plantas, hongo, animales y microorganismos. Existen dos vías biosintéticas: 1) ruta del ácido mevalónico o mevalonato (MVA), y 2) ruta del metileritritol fosfato (MEP). Ambas son responsables de la síntesis de las moléculas precursoras de los terpenos: difosfato de isopentenilo (IIP) y su isómero, difosfato de dimetilalilo (DMAPP). La ruta MVA se lleva a cabo en el citosol de las células Eucarióticas y bacterias, originando principalmente triterpenos, esteroides y sesquiterpenos. Mientras que la ruta MEP ocurre en compartimentos subcelulares como los plastidos, por lo que es común en plantas y algunos protozoarios, produciendo monoterpenos, diterpenos, carotenoides y algunos sesquiterpenos (Figura 3)<sup>17</sup>.

Las rutas MVA y MEP coexisten en las células vegetales permitiendo conversión cruzada entre las rutas MEP y MVA<sup>18;19</sup>. Por lo tanto, las plantas producen una variedad amplia de terpenos. La producción de grandes cantidades de terpenos, así como su posterior acumulación, emisión o secreción, se asocia casi siempre con la presencia de estructuras anatómicas altamente especializadas<sup>20</sup>.

### 1.3.2 Biotransformación de terpenos

Los terpenos pueden ser biotransformados mediante sistemas *in vivo* en modelos animales. Sin embargo, los sistemas *in vitro* utilizando microorganismos en diferentes condiciones, son más eficientes<sup>21</sup>. Por lo que diferentes cultivos de bacterias, hongos, así como de células vegetales han sido utilizados en procesos de biotransformación de terpenos. Por otro lado, las biotransformaciones usando enzimas aisladas de microorganismos ha aumentado significativamente en años recientes. Este tipo de biotransformación permite llevar a cabo reacciones con control regio y estereoquímico, generando compuestos ópticamente puros<sup>22</sup>. Las enzimas que catalizan los diferentes tipos de reacciones de biotransformación de metabolitos secundarios se clasifican como oxidoreductasas, hidrolasas, transferasas, lipasas, e isomerasas<sup>23</sup>.



**Figura 3. Vías de biosíntesis de terpenos.**

Los terpenos tienen dos rutas de síntesis la vía citosólica o MVA, y la vía plástica o MEP. Las flechas discontinuas denotan varios pasos y las flechas sólidas un solo paso. AACT, acetoacetyl-coenzima A tiolasa; HMGS, 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) –CoA sintasa; HMGR, HMG-CoA reductasa; MVK, mevalonato quinasa, pMVK, fosfomevalonato cinasa; MDC, mevalonato disfosfato descarboxilasa, DXS, 1-deoxietilulosa-5-fosfato sintasa; DXR, 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa, MCT, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidiltransferasa; CMK, 4-difosfobidicil-2-C-metil-D-eritritol quinasa; MDS, 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa; HDS, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintasa; HDR, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa; IPP, isopentil difosfato, DMAPP, dimetilalil difosfato; IDI, IPP/DMAPP isomerasa, GPS, geranyl difosfato sintasa; GGPS, geranylgeranyl difosfato sintasa; FPS, farnesil difosfato sintasa. Tomado de Champagne and Boutry 2016<sup>19</sup>.

El Citocromo p450 (CYP450) es una de las familias proteínicas más grandes conocidas. Están presentes en todos los reinos y catalizan reacciones esenciales, como la asimilación de fuentes de carbono, la síntesis de hormonas y metabolitos secundarios, y degradación de xenobióticos<sup>24 25 26</sup>. Debido a la capacidad intrínseca de las enzimas CYP450 para hidrolizar específicamente hidrocarburos complejos, su uso en biotransformaciones y aplicaciones industriales ha aumentado. Entre sus aplicaciones se incluyen la producción de fármacos, vitaminas, saborizantes, fragancias y pesticidas<sup>27 28</sup>.

En la Tabla 2 se presentan ejemplos de biotransformaciones de terpenos llevadas a cabo por hongos, bacterias y enzimas en los últimos diez años.

### 1.3.2.1 Biotransformación de terpenos por cultivo de células vegetales

La biotransformación de terpenos en el laboratorio también se ha realizado mediante el uso de cultivos de células vegetales. Un ejemplo de esto es la producción de derivados de germacrono por cultivo celular de *Solidago altissima* con reacciones de monoepoxidación, di-epoxidación e hidroxilación. De esta manera, se han optimizado procesos para la extracción y purificación de los terpenos esclarol (*Salvia sclarea*), lavandulol (*Lavándula luisieri*), geranil geranol y trixagol (*Bellardia trixago*). Además, se desarrollan muchos procesos que usan cultivos de células vegetales en suspensión, tejidos diferenciados y no diferenciados; también son ampliamente utilizados los cultivos transformados genéticamente con *Agrobacterium* spp<sup>12</sup>.

Existen diferentes técnicas de biotransformación utilizando células, entre estas están:

- a) Biotransformación con células inmovilizadas: se ha observado que las células vegetales inmovilizadas pueden tener una tasa de producción más alta en comparación con las células suspendidas libremente en las mismas condiciones de conversión. La inmovilización de las células consiste en poner a las células a crecer en condiciones similares a un tejido de una planta completa<sup>29 30</sup>.

Tabla 2: Ejemplos de biotransformación de terpenos mediante hongos, bacterias, células vegetales y enzimas.

	Microorganismo	Resultado	Ref.
Hongos	<i>Penicillium purpurogenum</i> JS03-21	Purpúridos B y C. Dos sesquiterpenos	31
	<i>Diaporthe</i> sp. aislado de las hojas de <i>Rhizophora stylosa</i>	10 Sesquiterpenos	32
	<i>Aspergillus niger</i>	(+) – limoneno obtención de 6 terpenos	33
	Micorriza arbuscular	Producción de terpenos en la parte aérea de la planta <i>Isodon adenantha</i>	34
	<i>Penicillium</i> sp	Citral se obtuvieron 6 monoterpenos timol, limoneno, $\alpha$ -pinene, geraniol, geranial y nerol	35
Bacterias	<i>Escherichia coli</i>	Taxol (Paclitaxel)	36
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PTCC 1074,	Del mircenol se obtuvo dihidrolinalool y 2,6-dimetiloctano, $\alpha$ -terpineol y 2,6-dimetiloctano	37
	<i>Chloralla</i> , <i>Oocystis</i> , <i>Chlamydomonas</i> y <i>Synechococcus</i>	Carvona, limoneno, timol y linalol	38
	<i>Synechococcus</i> sp. MCCS 034	R-(+)-Limoneno (1S,5S), -cis-Carveol	39
Cultivos de células vegetales	<i>Salvia austriaca</i> Jacq	Diterpenos (royleanona, 15-deoxyfuerstiona, taxodiona)	40
	<i>Taxus</i>	Diterpenos de tipo taxano (paclitaxel, 10-deacetybaccatin III)	41
	<i>Ginkgo biloba</i> L.	Diterpenos (ginkgolida)	42
Enzimas	Citocromo P450 71D174 <i>Perilla frutescens</i>	Limoneno se obtiene del alcohol perillylico, trans-isopiperitenol, trans-carveol	43
	Citocromo P450 71D178 <i>Thymus vulgaris</i>	De $\gamma$ -terpineno se obtiene carvacrol y timol	44
	Citocromo P450 76B10 <i>Swertia mussoitii</i>	De geraniol se obtiene $\beta$ -hydroxy-geraniol	45

- b) Biotransformación con cultivo de raíz: el cultivo de raíz se aplica con más frecuencia en la producción de metabolitos derivados de las raíces de plantas dicotiledóneas, debido a que son más susceptibles a la transformación *Agrobacterium* spp. La ventaja de este cultivo es la cantidad de biomasa que se puede generar en poco tiempo y bajo costo<sup>30 46</sup>.
- c) Biotransformación en cultivo de células libres: una técnica útil para la biotransformación. Las células crecen en diferentes tipos de cultivos:
- 1.- Cultivo de callo: el cultivo de callo es una masa de células o tejido resultante después de la iniciación y la proliferación continua de las células de parénquima no diferenciadas del tejido parental en un medio semisólido. Cuando un explante de un tejido diferenciado se cultiva en un medio, las células quiescentes experimentan cambios para lograr un estado meristemático. Este fenómeno de reversión de células maduras al estado meristemático que conduce a la formación de callos se llama diferenciación. La formación del callo está controlada por las auxinas endógenas y citoquinina. La organogénesis puede iniciarse y regularse en el cultivo de callo mediante la manipulación de la proporción de auxinas y citoquininas.
  - 2.- Cultivo en suspensión: este cultivo contiene esencialmente células vegetales individuales homogéneas en su medio líquido. Las células en cultivo son meristemáticas y generalmente no diferenciadas. Existen varias formas de cultivos en suspensión que comúnmente se usan: cultivos de suspensión discontinua, cultivo semicontinuo, cultivo continuo<sup>6 30</sup>.

#### 1.4 Ácido *p*-aminobenzoico (PABA)

El ácido *p*-aminobenzoico (PABA) es un compuesto aromático ampliamente distribuido en la naturaleza como un factor del complejo de vitaminas B. El PABA es sintetizado por levaduras, plantas y algunas bacterias. Este compuesto no es sintetizado por mamíferos, pero es un compuesto importante del metabolismo suministrado por los alimentos y las bacterias simbióticas del tracto digestivo<sup>47</sup>.

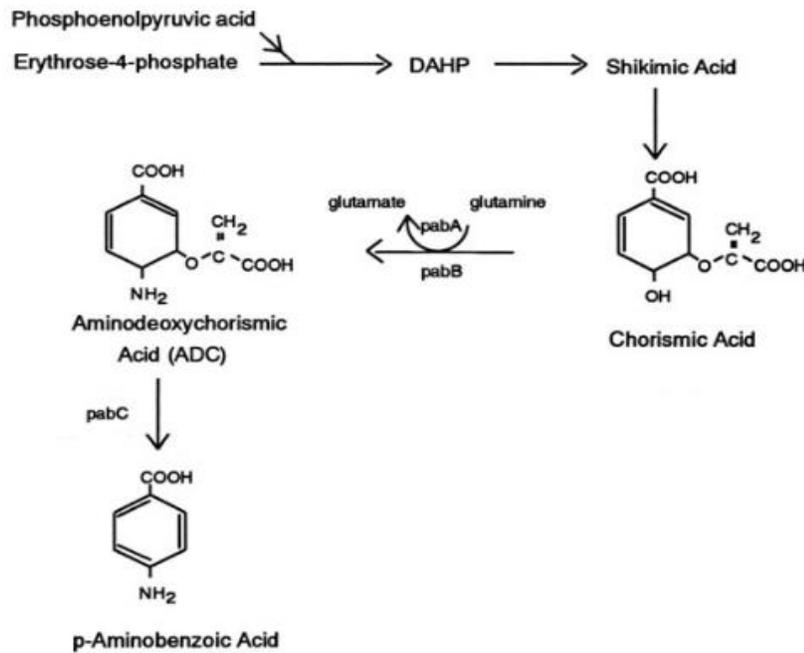
El PABA era usado como ingrediente cosmético en los protectores solares, por su espectro de absorción en el rango de 290 a 320nm. Sin embargo, la exposición

continúa a sustancias químicas de este tipo puede conducir a respuestas autoinmunes, por lo que fue retirado de los protectores solares <sup>48</sup>.

Otra característica que se le atribuye a PABA es su efecto antibacteriano, del cual se conocen al menos dos mecanismos de acción involucrados. El primero es la capacidad que tiene el PABA de difundirse libremente a través de la membrana celular, dando resultado el desacople de la fosforilación oxidativa del sistema de transporte de electrones a medida que el pH disminuye; y la inhibición de la captación celular de aminoácidos, fosfato y ácidos orgánicos. El otro mecanismo es un bloqueo competitivo de la enzima dihidrofolato reductasa que produce un efecto negativo en la síntesis de peptidoglicanos<sup>49</sup>.

#### **1.4.1 Biosíntesis de ácido *p*-aminobenzoico (PABA)**

La biosíntesis de PABA ocurre a través de la ruta del ácido shikímico, la cual es ruta alternativa para la producción de otros compuestos aromáticos, en particular los aminoácidos fenilalanina, triptófano y tirosina (Figura 4)<sup>50</sup>. Por otro lado, PABA en las plantas se sintetiza en los plástidos a partir del corismato, donde el PABA sirve de intermediario en otras reacciones en la célula vegetal <sup>51</sup>.



**Figura 4: Biosíntesis de ácido *p*-aminobenzoico a través del ácido corísmico en *Streptomyces venezuelae*.**

Vía de biosíntesis del ácido *p*-aminobenzoico en *Streptomyces venezuelae* partiendo desde el ácido shikímico del cual se obtiene el ácido corísmico que es el precursor principal de PABA <sup>52</sup>. Primero, las proteínas PabA y PabB interactúan para catalizar la transferencia del nitrógeno amida de la glutamina al corismato, formando 4-amino-4-desoxicorismato (ADC). La proteína PabC luego media la eliminación de piruvato y la aromatización para producir PABA.

### 1.4.2 Biotransformación de PABA

Existen reportes de biotransformación de PABA usando microorganismos, enzimas aisladas y cultivo de células vegetales. Por ejemplo, la biotransformación de PABA por *Aspergillus niger* produce la reducción de este ácido aromático a su aldehído específico, el *p*-aminobenzaldehído<sup>53 54</sup>. Entre las enzimas usadas en las reacciones biotransformación de PABA está la enzima Lacasa. El PABA se usó como precursor fenólico no coloreado y se probó como sustrato individual y acoplado para la oxidación. La presencia de grupos funcionales como el amino mejora la formación de pigmentos. Representando uno de los compuestos que pueden ser usados como posibles precursores de colorantes <sup>55</sup>

#### 1.4.2.1 Biotransformación de PABA por cultivo de células vegetales

Los cultivos de células vegetales son capaces de biotransformar diferentes tipos de compuestos aromáticos. Furuya y colaboradores realizaron el primer reporte de la capacidad del cultivo de células de *Eucalyptus perriniana* para transformar el PABA a través de reacciones de glicosilación. En este estudio se obtuvieron dos compuestos, el *p*-aminobenzoyl  $\beta$ -D-glucopiranosido, y el *p*-(N- $\beta$ -D-glucopyranosylamino) benzoyl  $\beta$ -D-glucopiranosido <sup>56</sup>. En otro trabajo, Syahrani y colaboradores demostraron la capacidad del cultivo celular de *Solanum mammosum* de producir esteres  $\beta$  – D – glucopiranosidos a partir de la administración de PABA al cultivo <sup>57</sup>. Los compuestos glucopiranosidos pueden tener actividad antimicrobiana como recientemente se demostró<sup>58</sup>.

Dada la capacidad de los cultivos de células vegetales para llevar a cabo reacciones de biotransformación, en el presente trabajo nos enfocamos en explorar la biotransformación de terpenos purificados extraídos de plantas medicinales, así como el compuesto de interés farmacológico PABA, mediante el uso del cultivo de células vegetales en suspensión de *Nicotiana tabacum* NT1.

## **II- Objetivo general**

Evaluar la biotransformación de metabolitos secundarios por el cultivo de células vegetales en suspensión de *Nicotiana tabacum* NT1.

### **2.1 Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto de metabolitos exógenos sobre el crecimiento de las células NT1.
2. Evaluar la capacidad de las células NT1 para la biotransformación de terpenos y ácido *p*-aminobenzoico.
3. Extraer y purificar los productos de biotransformación.
4. Elucidar la estructura química de los productos de biotransformación.

### III- Materiales y métodos

#### 3.1 Cultivo de células vegetales *Nicotiana tabacum* NT1

El medio de cultivo líquido Murashige y Skoog (MS) suplementado con 1mg/L de 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) fue utilizado para crecer el cultivo de células NT1 (Anexo 1). A partir de un cultivo de células NT1 en suspensión de 10 días de crecimiento, se tomó un volumen de 30 mL (mg o g de células) y se adicionó a 70mL de medio MS. El cultivo fue incubado en una cámara de crecimiento para plantas con temperatura de 25°C y agitación 100 rpm.

#### 3.2 Metabolitos secundarios

Los compuestos ensayados corresponden a terpenos aislados y purificados a partir de fuentes vegetales, los cuales fueron proporcionados por el Dr. Elihú Bautista. En la Tabla 3 se indican los nombres y el origen vegetal de cada terpeno. En los ensayos, cada compuesto fue disuelto a una concentración de 10mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO). Los compuestos fueron adicionados al cultivo a partir del día 4 de crecimiento, en condiciones de esterilidad para evitar contaminación.

#### 3.3 Curva de crecimiento de las células NT1

La curva de crecimiento de los cultivos se realizó en presencia de cada uno de los compuestos. Los controles utilizados fueron el cultivo de células NT1, y el cultivo de células NT1 suplementado con DMSO y Etanol. De cada cultivo se tomó una muestra, por duplicado, en los días 0,1,2,4,6,8,10, 12 y 14. La muestra de 5mL, se centrifugó a 4500 rpm y el paquete celular fue pesado. Con el peso promedio y la desviación estándar de cada muestra se elaboró una curva de crecimiento.

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, seguido por la prueba de Turkey-Kramer. Se utilizó el programa GRphPad 5 y el nivel de significancia fue de 95%.

### **3.4 Ensayo de biotransformación**

Los ensayos de biotransformación se realizaron de la siguiente manera. En matraces Erlenmeyer de 250mL, con 100mL de cultivo de células vegetales NT1 de cuatro días de crecimiento a 25°C y agitación a 100rpm. A estos cultivos se adicionaron 1mL a la concentración de 10mg/mL, los compuestos utilizados se describen en la Tabla 3. El cultivo fue incubado durante cinco días más en las mismas condiciones. Los cultivos fueron etiquetados de la siguiente manera: 1) Cultivo NT1 100mL; 2) Cultivo NT1 100mL + 1mL de DMSO o Etanol; 3) Cultivo NT1 100mL + 10mg/mL del compuesto disuelto en 1mL DMSO o Etanol.

### **3.5 Extracción de los compuestos de biotransformación.**

Los cultivos a los diez días de crecimiento en presencia de los metabolitos secundarios, fueron cosechados y procesados para la extracción de los compuestos de biotransformación siguiendo la siguiente metodología:

- 1- Colectar y centrifugar los cultivos a 3500rpm por 15 minutos. Separar el medio de la pastilla celular. Filtrar el medio con filtro Whatman número 2.
- 2- La pastilla celular se resuspende en 30mL de agua destilada estéril y se realiza la lisis con sonicador con 40% de amplitud por un tiempo de 2 minutos con ciclos de 15 segundos de pulso y 15 segundos de descanso. Luego, el lisado se centrifugó a 12000rpm por 15 minutos y se recupera el sobrenadante.
- 3- El extracto celular y medio de cultivo se tratan con acetato de etilo (3x) y la mezcla separada en un embudo de separación. La muestra se concentra en un rotoevaporador con presión de 240bar y temperatura de 40°C.
- 4- Se seca el matraz de separación con bomba de secado y con una mezcla de 0.5mL de acetato de etilo, 0.5ml de metanol y 0.5mL de acetona se recupera el compuesto del balón y se colecta en un tubo de cristal y se deja secar para concentrar el producto de biotransformación.

Tabla 3: Compuestos usados en los ensayos de biotransformación

Nombre y fórmula química	Fuente	Metabolito secundario	Peso Molar	Concentración Molar	Ref.
Galfimina A/H C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>8</sub>	<i>Galphimia glauca</i>	Triterpeno	533g*mol <sup>-1</sup>	187µM	59
Amarissinina C C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> O <sub>7</sub>	<i>Salvia amarissima</i>	Diterpeno	375g*mol <sup>-1</sup>	267µM	60
Incomptina B C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	<i>Decachaeta incompta</i>	Sesquiterpeno	262g*mol <sup>-1</sup>	381µM	61
Polystaquina B C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	<i>Salvia polystachya</i>	Diterpeno	358 g*mol <sup>-1</sup>	279µM	62
Linearolactona C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	<i>Salvia polystachya</i>	Diterpeno	340g*mol <sup>-1</sup>	294µM	63
Polystaquina A C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	<i>Salvia polystachya</i>	Diterpeno	342g*mol <sup>-1</sup>	292µM	62
ácido <i>p</i> -aminobenzoico C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> (PABA)	Reactivo comercial Sigma.	Compuesto Nitrogenado	137.1g*mol <sup>-1</sup>	729µM	56

### 3.6 Cromatografía en capa fina

Los productos de biotransformación se resolvieron mediante cromatografía en capa fina con las fases móviles indicadas en la Tabla 4. Las placas de sílica se revelaron con sulfato sérico IV [Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>].

**Tabla 4: Fase móvil utilizada en TLC para cada compuesto**

Compuesto	Fase móvil
Linearolactona	CHCl <sub>3</sub> : EtOAc (95:5) x2
Galfimina A/H	Hexano:EtOAc: Metanol (45:50:5) x2
Amarissinina C	Hexano: EtOAc (70:30) x2
Incomptina B	Hexano: EtOAc (70:30) x2
Polystaquina B	Hexano: EtOAc: Metanol (45:50:5) x2
ácido <i>p</i> -aminobenzoico	EtOAc: Metanol: H <sub>2</sub> O (73:13:10)x2

### 3.7 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Los compuestos de biotransformación extraídos, se analizaron en un equipo HPLC-PDA Shimadzu, utilizando una columna Luna® 5µm C18(2) 100Å Size: LC Column 250 x 4.6mm y una fase móvil de metanol/agua 60/40.

### 3.8 Purificación de los productos de biotransformación

El proceso se escaló a 500mL de cultivo de células NT1, con 50mg de compuesto. Se usaron las mismas condiciones que se ensayaron para 100mL de cultivo NT1. La purificación se realizó en columna de cristal de 1cm de diámetro y fase estacionaria Sílica gel 230-400µm con una altura 8cm. La fase móvil que se usó fue 50mL CHCl<sub>3</sub>: EtOAc (98:2) y 100mL de CHCl<sub>3</sub>: EtOAc (95:5) para linearolactona y 500mL de EtOAc: Metanol (75:25) para PABA. Se obtuvieron 26 fracciones de 5mL cada una y 19 fracciones de 25mL respectivamente. Las fracciones fueron analizadas por TLC.

### 3.9 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El análisis de RMN fue realizado en el Instituto de Química de la UNAM a través del Dr. José Rivera Chavéz. Los espectros de RMN se adquirieron en un equipo Bruker Ascend III 700MHz, operando a <sup>1</sup>H 700MHz y 175MHz para <sup>13</sup>C. Los datos fueron procesados usando Mnova NMR software versión 6.0.

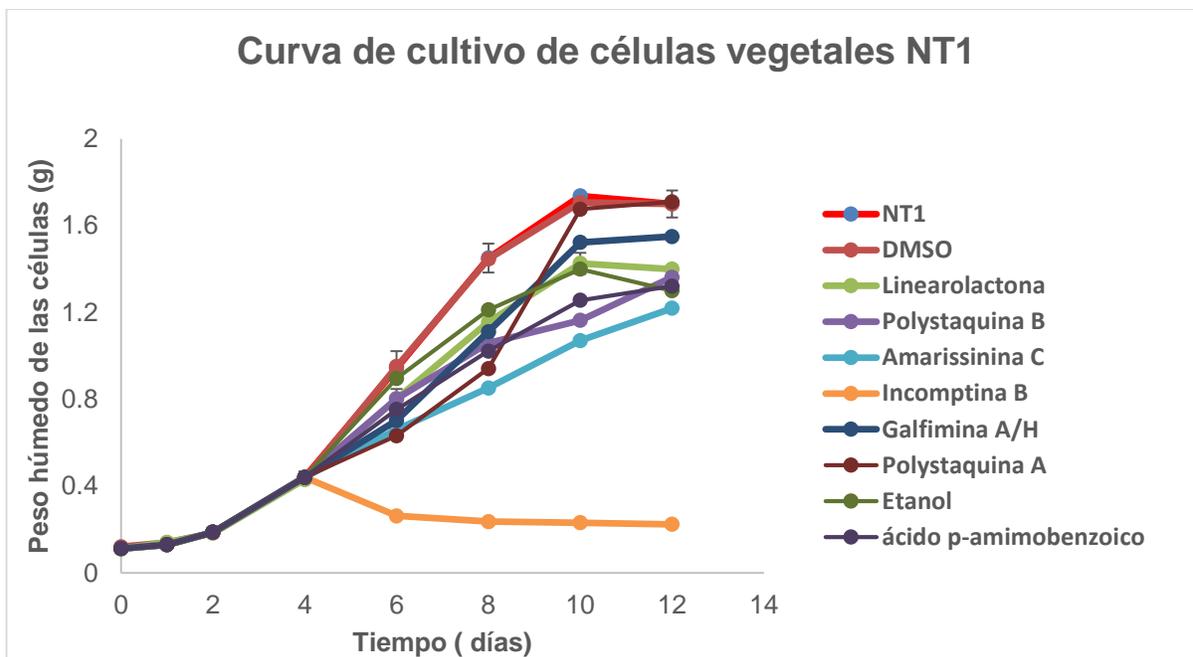
## IV-Resultados

### 4.1 Efecto de los metabolitos exógenos sobre el crecimiento células vegetales NT1

Con la finalidad de determinar si las células NT1 son capaces de tolerar la presencia de los MS exógenos descritos en la tabla 3, se evaluó el efecto de éstos sobre el crecimiento de las células vegetales. Para lo cual, cada uno de los compuestos fue adicionado a cultivos de células NT1 en el cuarto día de crecimiento. En este tiempo el cultivo se encuentra en su fase logarítmica de crecimiento, las células son metabólicamente más activas y crecen en confluencia. Cada uno de los compuestos fue disuelto a una concentración de 10 mg/mL en DMSO, y en etanol para el caso del PABA. El crecimiento del cultivo celular se monitoreó cada 24 o 48 horas, tomando una alícuota de 5 mL y pesando sólo paquete celular.

Los resultados se muestran en la figura 5, en la cual se observa que para el caso de los compuestos linearolactona, polystaquina A, polystaquina B, amarissinina C, galfimina A/H y PABA el crecimiento de las células disminuye 0.1 g/mL en comparación con el crecimiento de las células NT1 sin compuestos, lo que no representa una disminución significativa ( $p < 0.05$ ). En el caso del compuesto incompitina B se observa una severa disminución del crecimiento de las células NT1.

Con los datos obtenidos podemos considerar que las células NT1 toleran los compuestos linearolactona, polystaquina A, polystaquina B, amarissinina C, galfimina A/H y PABA.



**Figura 5. Efecto de los metabolitos exógenos sobre el crecimiento de las células vegetales NT1.**

En la gráfica se puede observar el crecimiento de las células NT1 en presencia de cada compuesto, así como en presencia de sólo DMSO (NT1+DMSO) y sólo las células NT1 (NT1). La cinética de crecimiento presencia de cada uno de los compuestos se realizó adicionando 10mg del compuesto disuelto en 1mL del DMSO. De cada cultivo se tomó una muestra (5mL), por duplicado, en los días 0,1,2,4,6,8,10, 12 y 14. La muestra se centrifugó a 4500rpm y el paquete celular húmedo se pesó en balanza analítica. El promedio del peso celular fue graficado, así como la desviación estándar de cada punto.

## 4.2 Biotransformación de los compuestos exógenos por células NT1

Los ensayos de biotransformación se realizaron para evaluar la capacidad de las células NT1 de modificar los metabolitos secundarios exógenos: linearolactona, polystaquina A, polystaquina B, amarissinina C, galfimina A/H, incomptina B y PABA. Para ello, a 100 mL de cultivo de células vegetales NT1 con cuatro días de crecimiento, se adicionaron cada uno de los compuestos a una concentración de 10 mg/mL. Posteriormente, los cultivos fueron incubados durante cinco días más en la cámara crecimiento con temperatura de 25°C y 85 rpm. A los diez días de crecimiento, se separaron las células del medio, y cada uno tratado con el mismo volumen de disolvente. Los productos de biotransformación presentes en las fracciones de acetato de etilo y n-butanol fueron concentrados en un rotavapor. Y resueltos mediante cromatografía de capa fina TLC.

De los siete compuestos evaluados, se obtuvieron productos de biotransformación en los compuestos linearolactona y PABA. No se observó biotransformación para los compuestos polystaquina A, polystaquina B, amarissinina C, galfimina A/H e incomptina B, los cuales se monitorearon en TLC.

Los resultados de la cromatografía en capa fina de linearolactona y PABA se muestran en la figura 6, en la cual podemos observar que solo tenemos compuestos de biotransformación en la célula, lo que sugiere que los compuestos son transformados y almacenado en el interior de la célula, y no son exportados al medio. Además, en la figura 6A podemos observar que hay un compuesto que al exponerse a la luz UV de onda larga (365nm) no fluoresce, esto puede sugerir que es un compuesto diferente a la linearolactona.

En la figura 6B observamos que el compuesto obtenido de las células es completamente diferente y tiene un factor de retención (Rf) mayor al del PABA.

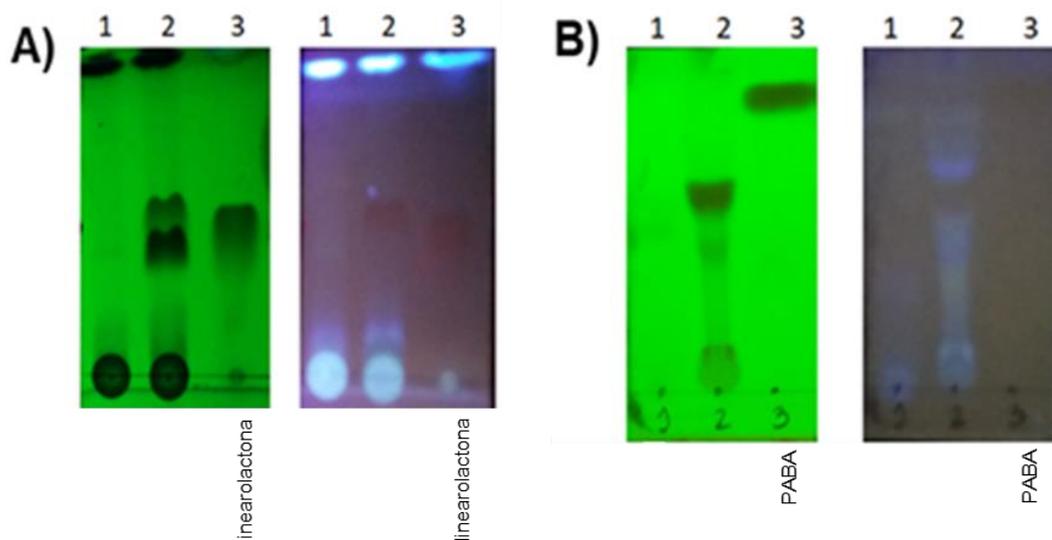
## 4.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

Para determinar que los compuestos obtenidos son producto de biotransformación de los sustratos, realizamos su análisis en un equipo HPLC-PDA Shimadzu, se utilizó una columna C18(2) 100Å Luna® (250 x 4.6mm). El análisis mediante HPLC de los compuestos biotransformados a partir de la linearolactona se muestra en la

figura 7, en la cual podemos observar varios cromatogramas en los que podemos comparar los tipos de compuestos en las muestras ensayadas.

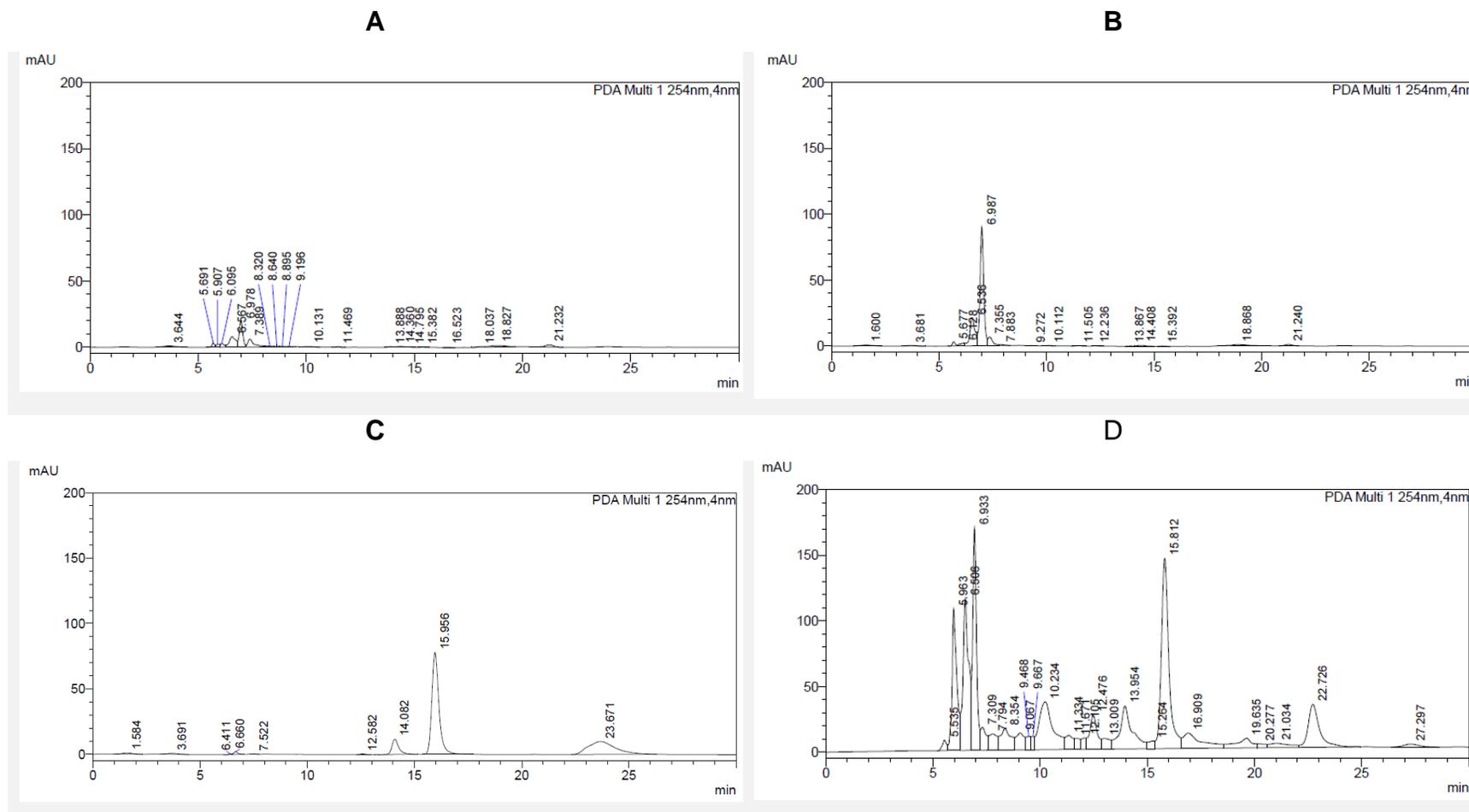
En la figura 7D se muestra los productos de biotransformación de la linearolactona, donde se pueden observar varios picos entre 5-6 mn y 10-13 mn. También se encuentran presentes los picos correspondientes a los controles negativos mostrados en las figuras 7 (A, B, C), lo que descarta estos compuestos que no son de nuestro interés.

La biotransformación de la linearolactona es exitosa en el cultivo de células NT1 como se evidencia en los cromatogramas. Por lo que un paso para escalar este producto es necesario para poder extraer el producto de biotransformación que nos permita poder identificarlo.



**Figura 6: Resolución por cromatografía en Capa fina de los productos de biotransformación.**

Los resultados de la biotransformación de linearolactona (6A) y ácido *p*-aminobenzoico (6B) se muestran (misma placa) en diferentes longitudes de onda ( $\lambda$ ) 254nm (verde) y 365nm (azul). Carril 1 células NT1, carril 2: productos de biotransformación de la linearolactona o PABA, carril 3 controles de referencia (linearolactona o PABA).



**Figura. 7: Cromatogramas en HPLC de los compuestos de biotransformación de la Linearolactona a longitud de onda ( $\lambda$ ) 254nm.**

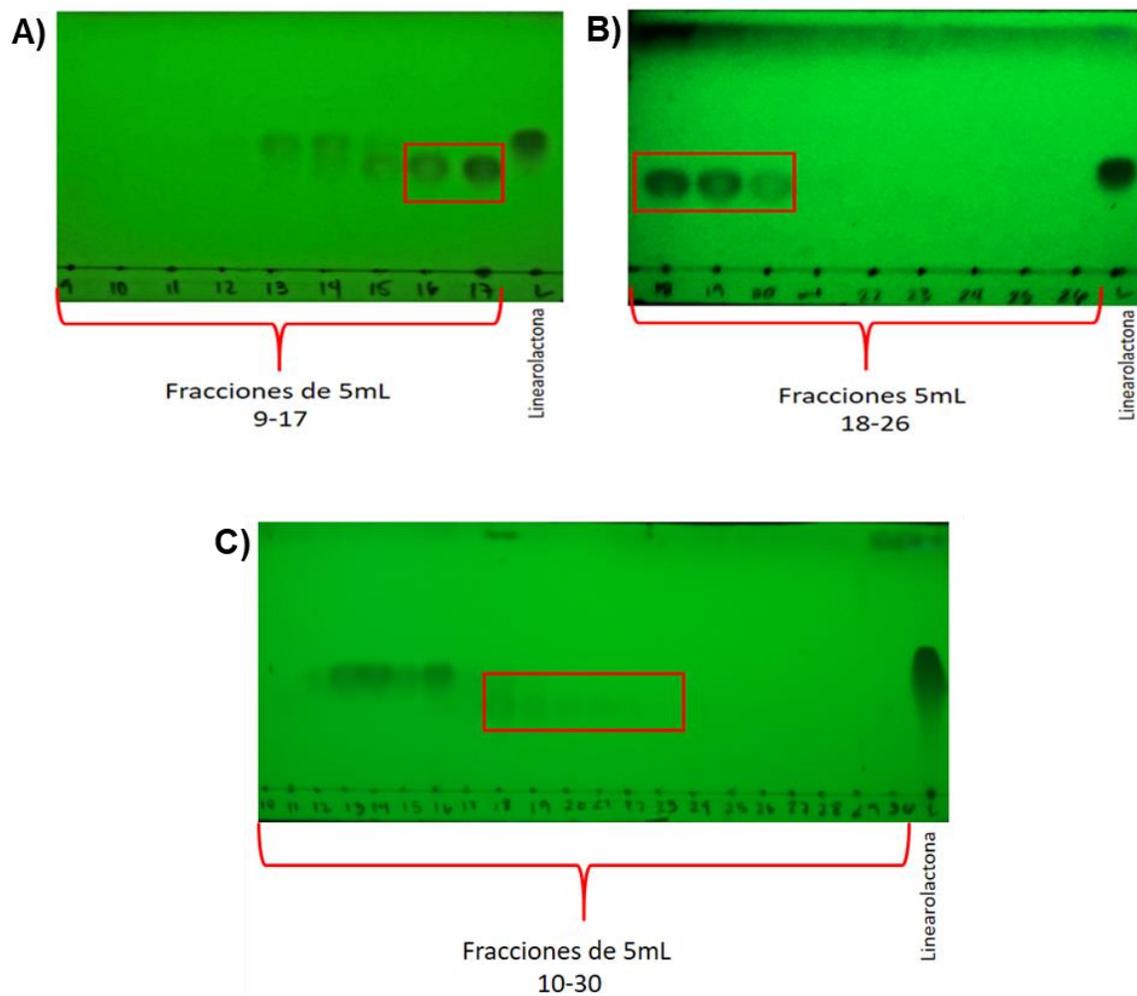
En el panel 7A se muestra las células NT1. En 7B las células NT1 con DMSO; en 7C la linearolactona a 1mg/mL; y en 7D los compuestos de biotransformación de la linearolactona.

#### **4.4 Purificación de los productos de biotransformación**

Una vez analizada la capacidad de las células NT1 para biotransformar los compuestos Linearolactona y PABA, es necesario realizar la caracterización química de los productos obtenidos. Sin embargo, es necesario tener los productos puros y en cantidades suficientes para realizar ensayos de resonancia magnética nuclear. Por ello, se realizó el escalado de los ensayos a un volumen de 500mL de cultivo y de 50mg/mL de linearolactona y PABA.

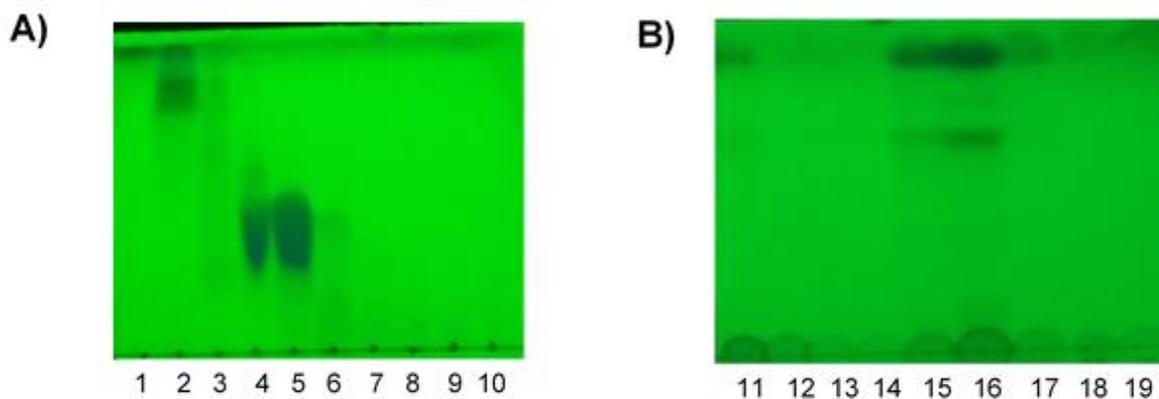
La purificación del producto de biotransformación de la linearolactona se realizó en columna de cristal de 1cm de diámetro, se usó como fase estacionaria Sílica gel 230-400 $\mu$ m y una altura de 8cm. La fase móvil CHCl<sub>3</sub>: EtOAc (95:5). Se obtuvieron 26 fracciones de 5mL cada una. En la figura 8 se muestran las fracciones obtenidas en cromatografía en capa fina. En las figuras 8A y 8B se muestran las fracciones de 5mL obtenidas desde la 9-26, el producto de biotransformación se obtuvo en las células vegetales de la fracción 16-20. La purificación permitió obtener 2.1 mg del compuesto de biotransformación, lo cual es suficiente para RMN y poder dilucidar su estructura química. Este proceso fue repetido dos veces ya que en la primera ocasión no se obtuvo compuesto con la calidad requerida para enviarlo a resonancia magnética nuclear.

Por otra parte, al escalar el proceso identificamos que el producto de biotransformación también fue exportado al medio del cultivo por las células, como se muestra en la figura 8C. Es posible que en los primeros ensayos no observamos esto debido a las cantidades utilizadas.



**Figura 8: Purificación de los productos de biotransformación de la linearolactona.**

Figura 8A muestra las fracciones de 5 mL de la fase móvil 9-17, la figura 8B muestra fracciones de 5 mL de la fase móvil 18-26 en las células. La Figura 8C muestra el resultado de las fracciones de 5 mL 10-30 de los productos de biotransformación en el medio NT1. En los dos casos se muestra el control positivo de la linearolactona en el último carril.



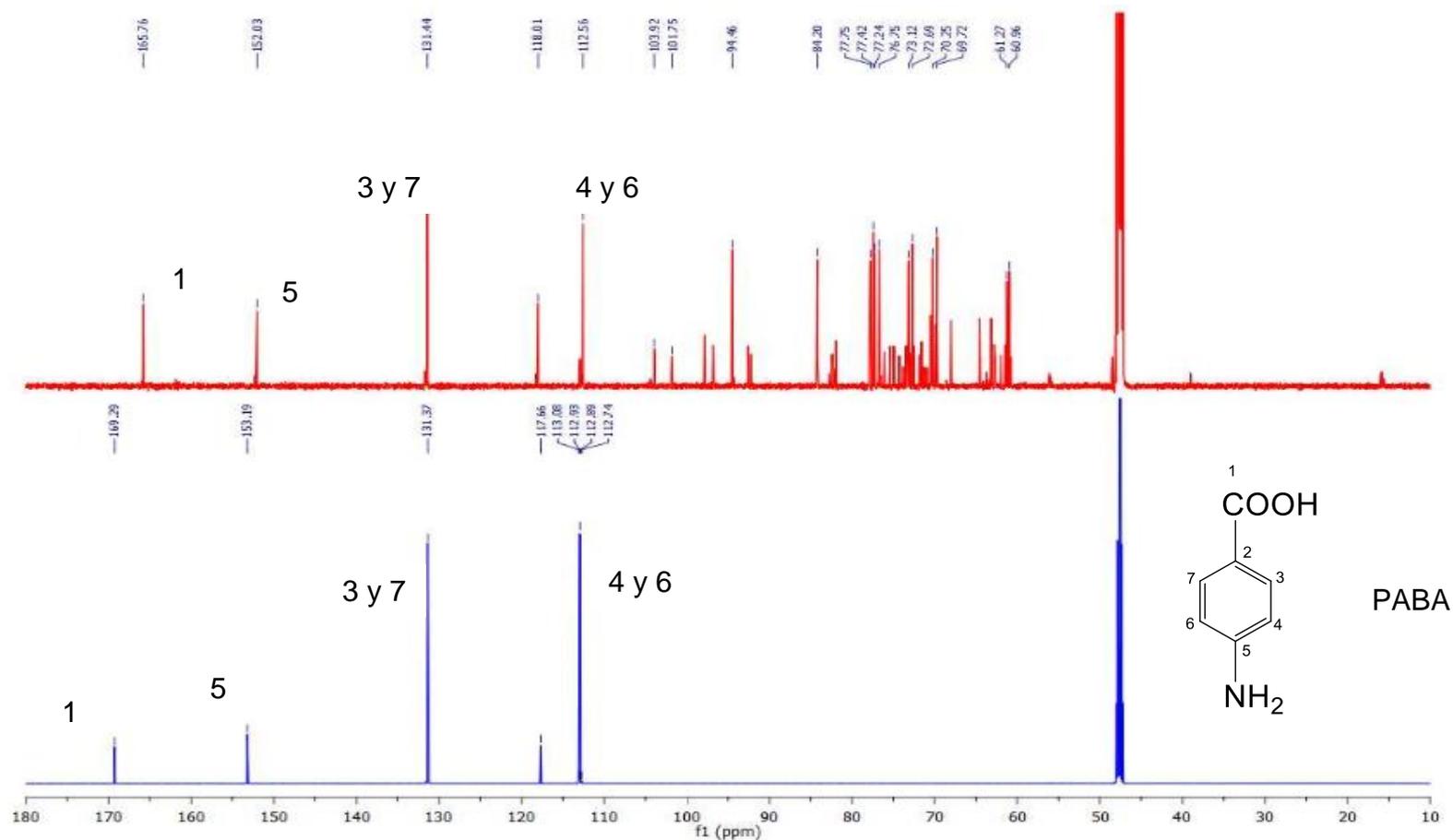
**Figura 9: Resolución en TLC de los productos de biotransformación del ácido *p*-aminobenzoico.**

Panel A muestra las fracciones de 1-10. Panel B, Fracciones de 11-19. En los dos casos se muestra el control positivo del ácido *p*-aminobenzoico. Revelado a  $\lambda 254\text{nm}$ .

La purificación de los productos de biotransformación de PABA se realizó en columna de cristal de 1,8cm de diámetro, se usó como fase estacionaria Sílica gel 260 de altura 8cm, y la fase móvil EtOAc: metanol (75:25). Se obtuvieron 19 fracciones de 25mL cada una. En la figura 9 se muestran las fracciones obtenidas en cromatografía en capa fina. En las figuras 9A y 9B se muestran las fracciones de 25mL obtenidas desde la 1-19. Los productos de biotransformación se obtuvieron tres productos de biotransformación en las células vegetales en las fracciones 2, 4-5 y 15-16. La purificación permitió obtener 28mg, 90.6mg y 7.2mg de las fracciones 2, 4-5 y 15-16 respectivamente de los compuestos de biotransformación. Este proceso tuvo dos replicas, se obtuvo compuesto con la calidad requerida para enviarlo a resonancia magnética nuclear. Aunque en la fracción 4-5 se obtuvo el producto mayoritario.

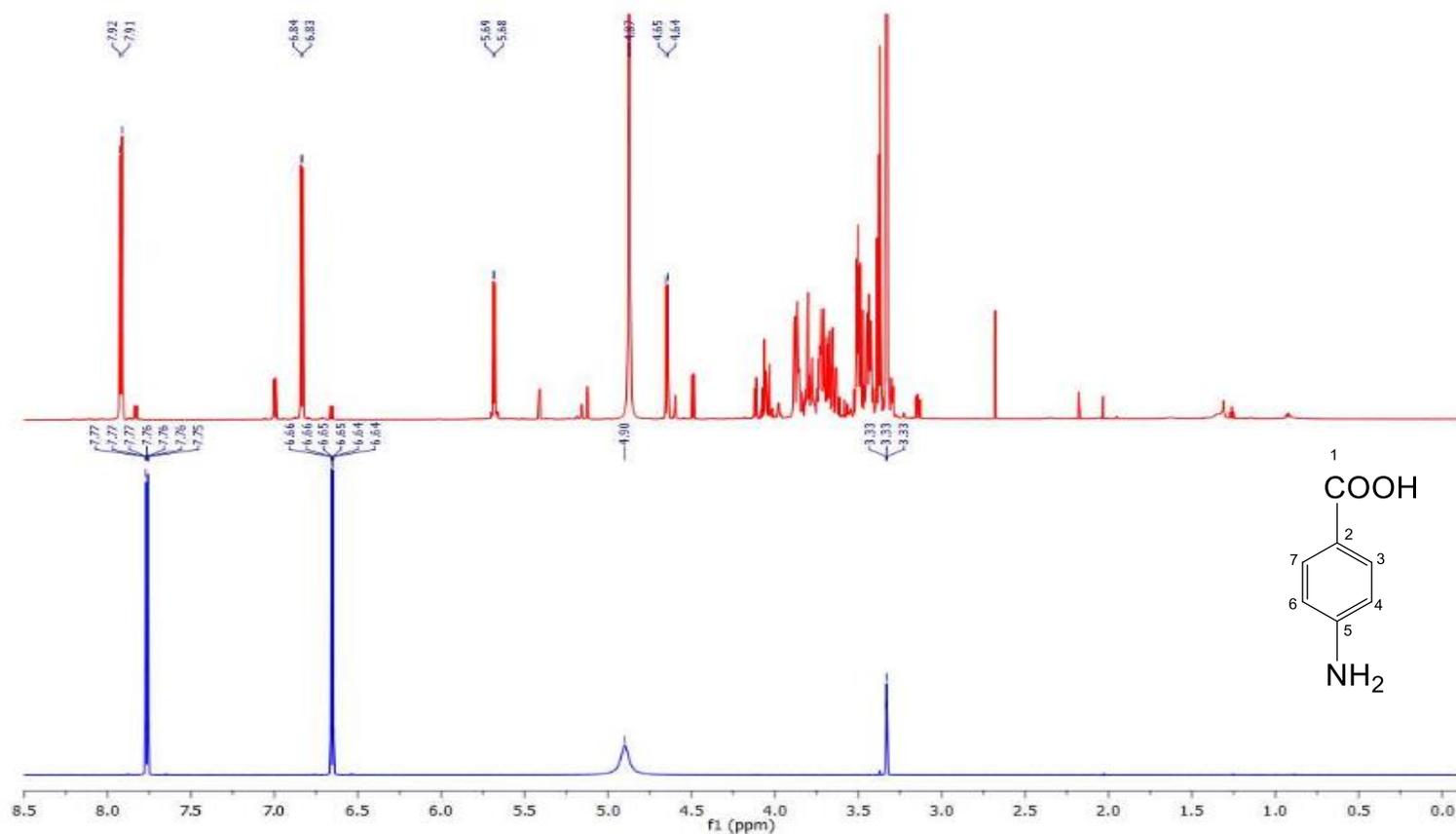
#### **4.5 Resonancia magnética nuclear de compuestos de biotransformación de linearolactona y ácido *p*-aminobenzoico**

Los espectros de RMN de los productos de biotransformación de linearolactona no se obtuvieron debido a la poca cantidad del producto que se obtuvo en el ensayo. Los espectros RNM de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  de producto de biotransformación mayoritario de PABA (fracción 4-5) se muestran en la figura 10 y 11.



**Figura 10: Espectros comparativos de RMN <sup>13</sup>C de PABA y el compuesto de la fracción 4-5.**

La figura muestra el espectro de RMN de carbono 13 del producto mayoritario de la biotransformación del PABA. En azul se muestran los picos correspondientes a los átomos de carbono de la estructura química de PABA. En rojo los picos correspondientes al producto de biotransformación, correspondientes en parte a la estructura de PABA con adición de otros picos que responden a las modificaciones del compuesto inicial (PABA).



**Figura 11: Espectros comparativos de RMN <sup>1</sup>H de PABA y el compuesto de la fracción 4-5.**

La figura muestra el espectro de RMN de protón (H1) del producto mayoritario de la biotransformación del PABA. En azul se muestran los picos correspondientes a los protones de la estructura química de PABA. En rojo los picos correspondientes al producto de biotransformación, correspondientes en parte a la estructura de PABA con adición de otros picos que responden a las modificaciones del compuesto inicial (PABA).

## V- Discusión

Los procesos de biotransformación de metabolitos secundarios utilizando cultivos de célula vegetales es una herramienta biotecnológica para la obtención de compuestos análogos con diversas aplicaciones, así como para la obtención de nuevos compuestos químicos. El cultivo de células vegetales en suspensión de *Nicotiana tabacum* poseen la capacidad bioquímica para la transformación de sustratos xenobióticos, realizando reacciones enzimáticas de hidroxilación, oxidación, epoxidación, reducción y/o glicosilación<sup>64</sup>.

En el presente trabajo, utilizamos el cultivo de células vegetales en suspensión de *Nicotiana tabacum* NT1, para explorar la biotransformación de terpenos y de un compuesto aromático. Nosotros evaluamos siete compuestos exógenos correspondientes a terpenos extraídos de plantas medicinales, y el compuesto aromático ácido *p*-aminobenzoico (PABA) adquirido con Sigma-Aldrich, este es un metabolito secundario que se obtiene de plantas, bacterias y levaduras. Los resultados obtenidos muestran que solo el compuesto incomptina B disminuyó el crecimiento celular significativamente ( $p > 0.05$ ), considerándose un efecto fitotóxico, como ya se ha reportado en un trabajo previo utilizando plantas de diferentes especies<sup>65</sup>. No obstante, todos los compuestos fueron evaluados en los ensayos de biotransformación ya que se ha demostrado la capacidad de algunos organismos de biotransformar compuestos xenobióticos con efectos tóxicos<sup>66</sup>.

Por otro lado, los resultados de biotransformación del terpeno linearolactona, mostraron un posible producto de biotransformación. Sin embargo, no se obtuvieron cantidades suficientes ya que se añadieron al cultivo de células NT1 50 mg y se recuperó 2.1mg de compuesto biotransformado. Al respecto, podemos especular que este compuesto fue utilizado como una fuente de carbono y metabolizado por las células.

En el caso del compuesto PABA, se observó la obtención de tres posibles productos de biotransformación. Sin embargo, sólo el compuesto obtenido en la fracción 4-5 fue el mayoritario.

Nuestros productos de biotransformación se analizaron por RMN con dos isotopos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . La resonancia magnética nuclear (RMN) es la técnica que mayor información estructural proporciona, donde se observan los núcleos de los átomos y se puede conocer la influencia de cada entorno molecular sobre cada uno de los átomos. En los resultados, la cantidad de compuesto de biotransformación de la linearolactona no fue suficiente para poder dilucidar la estructura. Las señales que se observan son muy débiles y no nos permite inferir que tipo de transformación se llevó a cabo.

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de las fracciones 2 y 15-16 de los productos de biotransformación de PABA indican que aún no se encuentran totalmente puros Anexo 2 y 3. Solo se analizaron los espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto mayoritario en fracción 4-5. El análisis estructural del compuesto en fracción 4-5 se realizó comparando los espectros de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  con los espectros obtenidos de nuestro producto de referencia PABA y con los espectros de los compuestos obtenidos en otros trabajos anteriores de biotransformación de PABA por cultivos celulares de *Eucalyptus perriniana* y *Solanum mammosum*<sup>56; 57</sup>. En la primera columna de la tabla 5 se describen las señales de los carbonos en la estructura de PABA, los espectros se muestran en las figuras 10 y 11. En la segunda columna se describen las señales de los carbonos de la fracción 4-5 de nuestro producto de biotransformación. En la figura 10 y 11 se describen las numeraciones de los carbonos en la estructura de PABA.

En los espectros de  $^{13}\text{C}$  la señal del grupo carboxilo de PABA se observa en 169.3ppm y la señal del grupo carboxilo del compuesto 4-5 aparecen en 165.7ppm, en este último se observa un desplazamiento de la señal lo que sugiere que hay una modificación en el grupo carboxilo. Comparando además, con los productos obtenidos con el cultivo *Eucalyptus perriniana*<sup>56</sup> la señal aparece en 167.2 y 167.4ppm para los productos A y B respectivamente, el producto obtenido por el cultivo *Solanum mammsum*<sup>57</sup> se observa una señal en 164.6ppm. Estas diferencias sugieren que el grupo carboxilo de la fracción 4-5 está modificado.

La señal del carbono aromático unido al grupo amino de PABA se observa en 153.19ppm y la señal del grupo amino en el compuesto 4-5 aparecen en

152.03ppm, de igual manera se observa un desplazamiento. Analizando los espectros de  $^{13}\text{C}$  de otros compuestos obtenidos por otros autores se observa la señal del grupo amino para los compuestos A, B y C en 155.3, 153.4 y 153.9 ppm respectivamente (Tabla 5). Esto sugiere que el grupo amino pudiera estar modificado. Los restantes carbonos  $\text{C}_3\text{-C}_7$ ,  $\text{C}_4\text{-C}_6$  y  $\text{C}_2$  del compuesto 4-5 tiene el mismo desplazamiento que PABA los cuales se ubican en la misma posición. En el espectro del  $^{13}\text{C}$  de la fracción 4-5 se observan señales similares al espectro del compuesto PABA puro, sugiriendo que es un producto derivado de PABA.

Las señales adicionales de la fracción 4-5 en el espectro de  $^{13}\text{C}$  como 94.5ppm y las ocho señales 77.8~69.7ppm, así como las dos señales de 60.9 y 61.27ppm sugieren la presencia de al menos dos moléculas de glucosa en la estructura. Comparando con los datos del compuesto B obtenido de *Eucalyptus perriniana* que contiene dos moléculas de glucosa coinciden estas señales.

La tabla 6 muestra una comparación de los picos observados en el espectro de  $^1\text{H}$  del compuesto PABA, de la fracción 4-5 del producto de biotransformación mayoritario de PABA en *Nicotiana tabacum*, y de otros productos de biotransformación obtenidos a partir de PABA en cultivos de células vegetales (*Eucalyptus perriniana* y *Solanum mammosum*).

Para el espectro de  $^1\text{H}$  se obtuvieron las señales correspondientes a los hidrógenos en la estructura de PABA  $\text{H}_3\text{-H}_7$  y  $\text{H}_4\text{-H}_6$  las cuales coincidieron con las obtenidas en el compuesto 4-5 y las reportadas por los dos trabajos comparados.

En una ampliación del espectro de  $^1\text{H}$  de la región 3-4.7ppm se observan muchas señales en la región 3.29~3.89 las cuales pertenecen a los hidrógenos de las glucosas (Anexo 4). Los hidrógenos de la glucosa de los productos de biotransformación reportado por los dos autores comparados se ubican en 3.25~3.86ppm, lo cual confirma nuestra sugerencia. Las intensidades de las señales nos sugieren que se trata de al menos dos moléculas de glucosa, corroborando los datos del espectro de  $^{13}\text{C}$

**Tabla 5: Comparación señales del espectro  $^{13}\text{C}$  de productos de biotransformación a partir de PABA**

PABA $^{13}\text{C}$ (CD <sub>3</sub> OD)		Producto de biotransformación <i>Nicotiana tabacum</i> $^{13}\text{C}$ (CD <sub>3</sub> OD) ppm		Productos de biotransformación <i>Eucalyptus perriniana</i> <sup>56</sup> $^{13}\text{C}$ (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) ppm			Productos de biotransformación <i>Solanum mammsum</i> <sup>57</sup> $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) ppm	
	PABA		4-5		A	B		C
1	169.3	1	165.8	1	167.4	167.2	1	164.6
2	117.7	2	118.0	2	117.6	119.5	2	115.1
3	131.4	3	131.4	3	133.1	132.8	3	131.6
4	112.9	4	112.6	4	114.3	114.0	4	112.7
5	153.2	5	152.0	5	155.3	153.4	5	153.9
6	112.9	6	112.6	6	114.3	114.0	6	112.7
7	131.4	7	131.4	7	133.1	132.8	7	131.6
		1'	94.5*	1'	95.8	95.9	1'	94.2
		2'	73.1*	2'	74.1	74.1	2'	72.6
		3'	77.8*	3'	78.2	78.2	3'	76.6
		4'	72.7*	4'	71.2	71.2	4'	69.6
		5'	77.2*	5'	78.8	78.8	5'	77.8
		6'	60.9*	6'	62.4	62.2	6'	60.6
		1''	84.20*	1''		85.6	1''	
		2''	70.3*	2''		74.5	2''	
		3''	77.4*	3''		78.6	3''	
		4''	69.7*	4''		71.7	4''	
		5''	76.5*	5''		79.2	5''	
		6''	61.3*	6''		62.7	6''	

\*Los números en color rojo son desplazamientos experimentales de la fracción 4-5 obtenida en nuestro trabajo

A. *p*-aminobenzoyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, B. *p*-(N- $\beta$ -D-Glucopyranosylamino) benzoyl  $\beta$ -D-glucopyranoside <sup>56</sup>

C. *p*-aminobenzoic acid 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester <sup>57</sup>

Sin embargo, en los dos espectros,  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ , aparecen señales las cuales no sabemos el origen, lo cual nos hace suponer que este producto, aunque es mayoritario en la fracción 4-5, no está totalmente puro. Además, se necesitan más pruebas de RNM para poder definir una estructura final, como por ejemplo espectros en dos dimensiones COSY y HMBC que nos ayuden a saber la ubicación exacta de los protones.

En la figura 12 se muestran en el panel A y B las estructuras obtenidas por los autores comparados. En el panel 3C proponemos tres posibles estructuras de nuestro compuesto de biotransformación obtenido en la fracción 4-5, las cuales pueden estar presentes en mezclas. Esto lo podemos deducir en base a las señales obtenidas en los espectros  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  analizados y a las comparaciones realizadas con los dos trabajos referidos.

Las inferencias realizadas sugieren que el compuesto de biotransformación de PABA en el cultivo de células vegetales NT1 ha sido producto de reacciones de glicosilación de la molécula de PABA. La glicosilación del PABA era una de las modificaciones esperadas ya que otros autores han reportado reacciones de glicosilación con distintos tipos de cultivos de células vegetales<sup>64</sup>. Existen reportes de reacciones de glicosilación de las células NT1; Furuya et al., (1987) reportaron la glicosilación del ácido 2-fenilpropiónico y 2- fenilpropionato de etilo por éstas células<sup>67</sup>.

En un reciente trabajo de Hernandez *et al.* (2018), obtuvo de la planta *Bidens odorata* un compuesto glicosilado derivado de PABA el cual demostró un efecto importante en la disminución de colesterol, triglicéridos y en el aumento lipoproteínas de alta densidad, que podrían ser posibles agentes hipolipemiantes. Además, el extracto etanólico del compuesto glicosilado mostró actividad antimicrobacteriana, esto contribuye a encontrar alternativas naturales potenciales para el tratamiento de la tuberculosis, aliviando así el problema emergente de resistencia a los medicamentos que muestran algunas cepas de tuberculosis<sup>58</sup>. En este sentido, la estructura definitiva del producto de biotransformación de PABA obtenido en este trabajo, así como sus posibles actividades biológicas pueden ser evaluadas en un trabajo posterior.

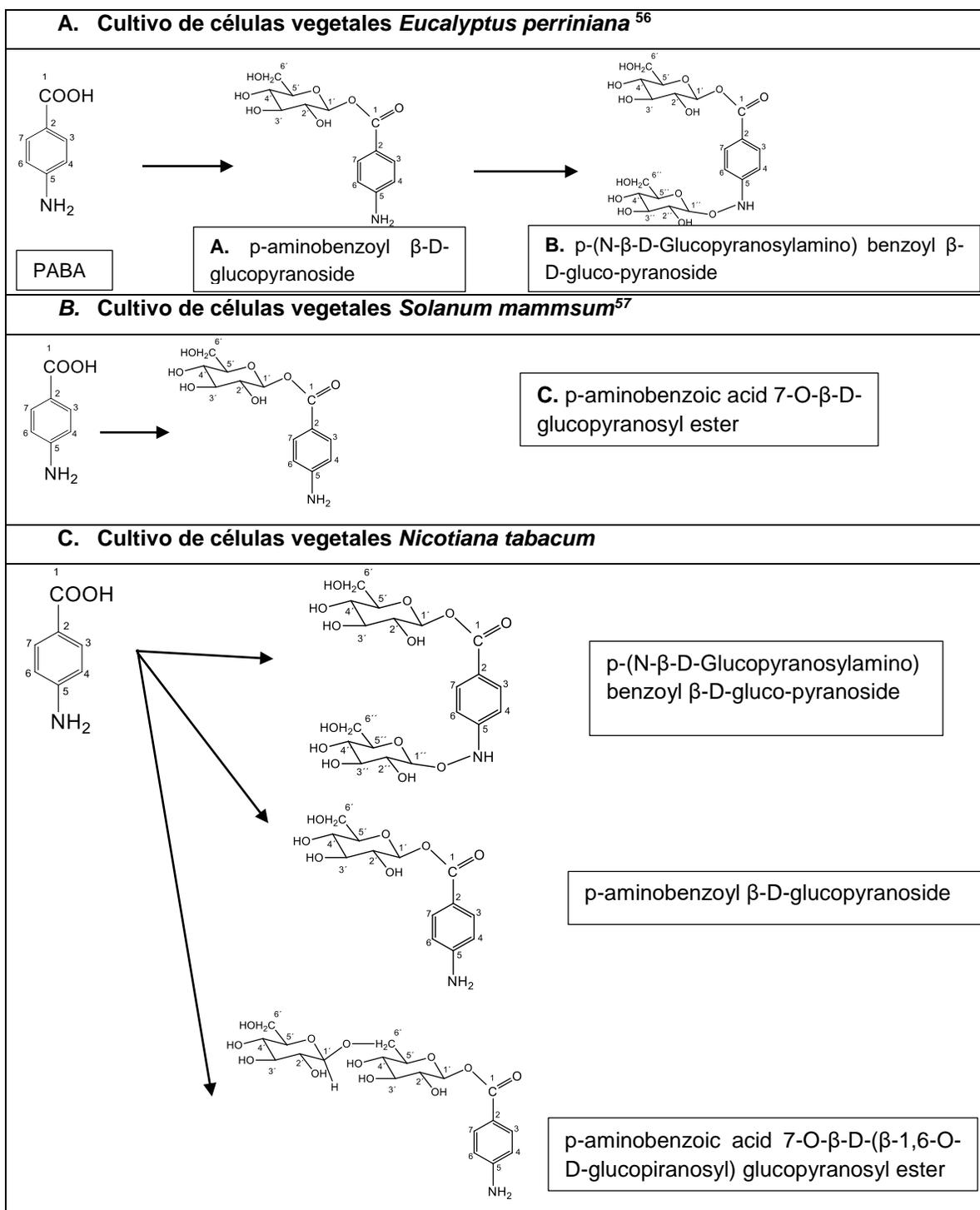
**Tabla 6: Comparación de señales de espectro de  $^1\text{H}$  de productos de biotransformación de PABA por células vegetales.**

PABA $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ppm		<i>Nicotiana tabacum</i> (en este trabajo) $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ppm		<i>Eucalyptus perriniana</i> <sup>56</sup> $^1\text{H}$ ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) ppm			<i>Solanum mammosum</i> <sup>57</sup> $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ DMSO- $d_6$ ) ppm	
H	PABA		4-5		A	B		C
H3-H7	7.76	H3-H7	7.9	H3-H7	7.81	7.9	H3-H7	7.78
H4-H6	6.65	H4-H6	6.8	H4-H6	6.63	6.81	H4-H6	6.67
		H'4-H'5	3.29~3.89	H'4-H'5	3.39~3.45	3.39~3.45	H'4-H'5	3.39
		H'2-H'3	3.29~3.89	H'2-H'3	3.45~3.51	3.45~3.51	H'3-H'2	3.25~3.32
		H'6a	3.29~3.89	H'6a	3.69	3.67~3.7	H'6a	3.56
		H'6b	3.29~3.89	H'6b	3.85	3.86	H'6b	3.73
		H'1	5.69	H'1	5.65	5.66	H'1	5.59
		H''1	4.65	H''1		4.63		
		H''2	3.29~3.89	H''2		3.36		
		H'2	3.29~3.89	H'2		3.47		
		H'3,4,5- H''3,4,5	3.29~3.89	H'3,4,5- H''3,4,5		3.35~3.5		
		H''6a	3.29~3.89	H''6a		3.67		
		H''6a	3.29~3.89	H''6a		3.7		
		H''6b	3.29~3.89	H''6b		3.86		

\*Los números en color rojo son desplazamientos experimentales de la fracción 4-5 obtenida en nuestro trabajo

A. *p*-aminobenzoyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, B. *p*-(N- $\beta$ -D-Glucopyranosylamino) benzoyl  $\beta$ -D-glucopyranoside<sup>56</sup>

C. *p*-aminobenzoic acid 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester<sup>57</sup>



**Figura 12: Estructuras químicas de productos de biotransformación de PABA por células vegetales**

Panel A y B productos de biotransformación de PABA obtenidos de los cultivos de células vegetales *Eucalyptus perriniana* y *Solanum mammosum*<sup>56; 57</sup>. Panel C Productos de biotransformación de PABA sugeridos en nuestro trabajo obtenidos del cultivo de células vegetales NT1.

## IV-Conclusiones

- 1- Las células NT1 toleraron la presencia de metabolitos secundarios exógenos y que naturalmente no están presentes en estas células. Sin embargo, sólo incomptina B afectó drásticamente el crecimiento celular, considerando que este compuesto es fitotóxico como anteriormente se reportó.
- 2- Las células de NT1 mostraron ser un sistema biológico capaz de biotransformar la linearolactona y el ácido *p*-amimobenzoico (PABA), esto sugiere su utilidad para la modificación de compuestos de interés con características químicas similares, a fin de obtener compuestos análogos con posibles aplicaciones farmacológicas o industriales.
- 3- El análisis de los datos de RMN del producto de biotransformación de PABA por las células NT1, sugieren que este compuesto es un derivado glicosilado.

## V-Perspectivas

- 1- Identificar posibles enzimas que participen en las reacciones de biotransformación de ácido *p*-aminoenzoico y linearolactona.
- 2- Evaluar la posible actividad biológica de los productos de biotransformación.
- 3- Realizar la expresión heteróloga de enzimas (por ejemplo, CYP450) en células NT1, y evaluar su capacidad de modificar los compuestos químicos.

## VI-Referencias

1. Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants* 24, 1250-1319.
2. Verpoorte, R. (1998). Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today* 3, 232-238.
3. Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R., and He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J Pharm Pharmacol* 2, 377-392.
4. Giweli, A.A., Džamić, A.M., Soković, M., Ristić, M., Janačković, P., and Marin, P. (2013). The chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Salvia fruticosa* growing wild in Libya. *Archives of Biological Sciences* 65, 321-329.
5. Edwards, S.J., and Kjellerup, B.V. (2013). Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Applied microbiology and biotechnology* 97, 9909-9921.
6. Dave, V., Khirwadkar, P., and Dashora, K. (2014). A review on biotransformation. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology* 2, 1136.
7. Loughlin, W.A. (2000). Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology* 74, 49-62.
8. Blumer, M. (1976). Polycyclic Aromatic Compounds in Nature. *Scientific American* 234, 34-45.
9. Breitmaier, E. (2006). Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. (John Wiley & Sons).
10. Barrales-Cureño, H.J., and Soto-Hernández, R.M. (2012). Taxoides: metabolitos secundarios del árbol del tejo (*Taxus* spp.). *Revista Chapingo Serie ciencias forestales y del ambiente* 18, 207-218.
11. Wagh, V., Patil, P., Surana, S., and Wagh, K. (2012). Forskolin: upcoming antiglaucoma molecule. *Journal of postgraduate medicine* 58, 199.

12. Reed, J., and Osbourn, A. (2018). Engineering terpenoid production through transient expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant cell reports*.
13. Tholl, D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In *Biotechnology of isoprenoids*. (Springer), pp 63-106.
14. Citron, C.A., Brock, N.L., Tudzynski, B., and Dickschat, J.S. (2014). Labelling studies on the biosynthesis of terpenes in *Fusarium fujikuroi*. *Chemical Communications* 50, 5224-5226.
15. Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L. (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants*. (American Society of Plant Physiologists Rockville, MD).
16. Tanaka, Y., Sasaki, N., and Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54, 733-749.
17. Tong, W.-Y. (2013). Biotransformation of terpenoids and steroids. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, 2733-2759.
18. Hemmerlin, A., Hoeffler, J.F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I.A., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., and Bach, T.J. (2003). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 26666-26676.
19. Champagne, A., and Boutry, M. (2016). Proteomics of terpenoid biosynthesis and secretion in trichomes of higher plant species. *Biochimica et biophysica acta* 1864, 1039-1049.
20. De Carvalho, C.C., and da Fonseca, M.M.R. (2006). Biotransformation of terpenes. *Biotechnology advances* 24, 134-142.
21. Ishida, T. (2005). Biotransformation of terpenoids by mammals, microorganisms, and plant-cultured cells. *Chemistry & biodiversity* 2, 569-590.
22. Koeller, K.M., and Wong, C.H. (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409, 232-240.
23. Faber, K., and Faber, K. (1992). *Biotransformations in organic chemistry*. (Springer).

24. Hausjell, J., Halbwirth, H., and Spadiut, O. (2018). Recombinant production of eukaryotic cytochrome P450s in microbial cell factories. *Bioscience reports* 38.
25. Werck-Reichhart, D., and Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome biology* 1, Reviews3003.
26. Monk, B.C., Tomasiak, T.M., Keniya, M.V., Huschmann, F.U., Tyndall, J.D., O'Connell, J.D., 3rd, Cannon, R.D., McDonald, J.G., Rodriguez, A., Finer-Moore, J.S., et al. (2014). Architecture of a single membrane spanning cytochrome P450 suggests constraints that orient the catalytic domain relative to a bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 3865-3870.
27. Girvan, H.M., and Munro, A.W. (2016). Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology. *Current opinion in chemical biology* 31, 136-145.
28. Çelik, A., Flitsch, S.L., and Turner, N.J. (2005). Efficient terpene hydroxylation catalysts based upon P450 enzymes derived from actinomycetes. *Organic & biomolecular chemistry* 3, 2930-2934.
29. Sánchez, F.O., Sánchez, R.H., and Zabala, M.E.A. (2002). Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 55, 1473-1495.
30. Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Hong, S., Jang, M.O., Jin, Y.W., Lee, E.K., and Loake, G.J. (2016). Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB reports* 49, 149-158.
31. Wang, H., Wang, Y., Liu, P., Wang, W., Fan, Y., and Zhu, W. (2013). Purpurides B and C, Two New Sesquiterpene Esters from the Aciduric Fungus *Penicillium purpurogenum* JS03-21. *Chemistry & biodiversity* 10, 1185-1192.
32. Chen, C.-J., Liu, X.-X., Zhang, W.-J., Zang, L.-Y., Wang, G., Ng, S.W., Tan, R.-X., and Ge, H.-M. (2015). Sesquiterpenoids isolated from an endophyte fungus *Diaporthe* sp. *RSC Advances* 5, 17559-17565.

33. Garcia-Carnelli, C., Rodriguez, P., Heinzen, H., and Menendez, P. (2014). Influence of culture conditions on the biotransformation of (+)-limonene by *Aspergillus niger*. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences* 69, 61-67.
34. Han, B.Y., Wang, K.D., Zhou, N., and Jiang, B. (2013). [Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on terpenoids in *Isodon adenantha*]. *Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials* 36, 191-195.
35. Esmaeili, A., and Tavassoli, A. (2010). Microbial transformation of citral by *Penicillium* sp. *Acta biochimica Polonica* 57, 265-268.
36. Ajikumar, P.K., Xiao, W.-H., Tyo, K.E., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., Mucha, O., Phon, T.H., Pfeifer, B., and Stephanopoulos, G. (2010). Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science* 330, 70-74.
37. Esmaeili, A., and Hashemi, E. (2011). Biotransformation of myrcene by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry Central journal* 5, 26.
38. Rasoul-Amini, S., Fotooh-Abadi, E., and Ghasemi, Y. (2011). Biotransformation of monoterpenes by immobilized microalgae. *Journal of applied phycology* 23, 975-981.
39. Balcerzak, L., Lipok, J., Strub, D., and Lochyński, S. (2014). Biotransformations of monoterpenes by photoautotrophic micro-organisms. *Journal of applied microbiology* 117, 1523-1536.
40. Kuzma, L., Kisiel, W., Krolicka, A., and Wysokinska, H. (2011). Genetic transformation of *Salvia austriaca* by *Agrobacterium rhizogenes* and diterpenoid isolation. *Die Pharmazie* 66, 904-907.
41. Cusido, R.M., Onrubia, M., Sabater-Jara, A.B., Moyano, E., Bonfill, M., Goossens, A., Pedreño, M.A., and Palazon, J. (2014). A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnology advances* 32, 1157-1167.
42. Ayadi, R., and Trémouillaux-Guiller, J. (2003). Root formation from transgenic calli of *Ginkgo biloba*. *Tree physiology* 23, 713-718.

43. Mau, C.J., Karp, F., Ito, M., Honda, G., and Croteau, R.B. (2010). A candidate cDNA clone for (-)-limonene-7-hydroxylase from *Perilla frutescens*. *Phytochemistry* 71, 373-379.
44. Crocoll, C. (2011). Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. Academic Dissertation, der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.
45. Wang, Y.-H., and Essenberg, M. (2010). Inhibitor and substrate activities of sesquiterpene olefins toward (+)- $\delta$ -cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase (CYP706B1). *Phytochemistry* 71, 1825-1831.
46. Giri, A., Dhingra, V., Giri, C., Singh, A., Ward, O.P., and Narasu, M.L. (2001). Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology advances* 19, 175-199.
47. Akberova, S. (2002). New biological properties of *p*-aminobenzoic acid. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences* 29, 390-393.
48. Mackie, B.S., and Mackie, L.E. (1999). The PABA story. *Australasian journal of dermatology* 40, 51-53.
49. Richards, R., Xing, D., and King, T. (1995). Activity of *p*-aminobenzoic acid compared with other organic acids against selected bacteria. *Journal of applied bacteriology* 78, 209-215.
50. Ghosh, S., Chisti, Y., and Banerjee, U.C. (2012). Production of shikimic acid. *Biotechnology Advances* 30, 1425-1431.
51. Basset, G.J.C., Quinlivan, E.P., Ravanel, S., Rébeillé, F., Nichols, B.P., Shinozaki, K., Seki, M., Adams-Phillips, L.C., Giovannoni, J.J., Gregory, J.F., et al. (2004). Folate synthesis in plants: The *p*-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1496-1501.
52. He, J., Magarvey, N., Pirae, M., and Vining, L. (2001). The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 includes

- novel shikimate pathway homologues and a monomodular non-ribosomal peptide synthetase gene. *Microbiology* 147, 2817-2829.
53. Raman, T.S., and Shanmugasundaram, E.R. (1962). Metabolism of some aromatic acids by *Aspergillus niger*. *Journal of bacteriology* 84, 1339-1340.
54. Parshikov, I.A., Woodling, K.A., and Sutherland, J.B. (2015). Biotransformations of organic compounds mediated by cultures of *Aspergillus niger*. *Applied microbiology and biotechnology* 99, 6971-6986.
55. Polak, J., and Jarosz-Wilkolazka, A. (2012). Structure/redox potential relationship of simple organic compounds as potential precursors of dyes for laccase-mediated transformation. *Biotechnology progress* 28, 93-102.
56. Furuya, T., Asada, Y., Mizobata, S., Matsuura, Y., and Hamada, H. (1998). Biotransformation of *p*-Aminobenzoic Acid by Cultured Cells of *Eucalyptus Perriniana*. *Phytochemistry* 49, 109-111.
57. Syahrani, A., Ratnasari, E., Indrayanto, G., and Wilkins, A.L. (1999). Biotransformation of *o*- and *p*-aminobenzoic acids and *N*-acetyl *p*-aminobenzoic acid by cell suspension cultures of *Solanum mammosum*. *Phytochemistry* 51, 615-620.
58. Hernández-Sánchez, K.M., Garduño-Siciliano, L., Luna-Herrera, J., Zepeda-Vallejo, L.G., Lagunas-Rivera, S., García-Gutiérrez, G.E., and Vargas-Díaz, M.E. (2018). Antimycobacterial and hypolipemiant activities of *Bidens odorata* (Cavanilles). *Journal of ethnopharmacology* 222, 159-164.
59. Cardoso Taketa, A.T., Lozada-Lechuga, J., Fragoso-Serrano, M., Villarreal, M.L., and Pereda-Miranda, R. (2004). Isolation of nor-secofriedelanes from the sedative extracts of *Galphimia glauca*. *Journal of natural products* 67, 644-649.
60. Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Ortiz-Pastrana, N., Toscano, R.A., and Ortega, A. (2016). Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A–C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia* 114, 1-6.
61. Soriano-García, M., and Guerrero, C. (1993). Structure of (1 $\alpha$ H, 6 $\beta$ H, 7 $\alpha$ H, 8 $\alpha$ H)-1 $\alpha$ , 10 $\alpha$ -epoxy-8 $\beta$ -hydroxy-germacr-2, 11 (13)-dien-6, 12-olide (Incomptine

- B): A sesquiterpenoid lactone. *Journal of crystallographic and spectroscopic research* 23, 813-819.
62. Maldonado, E., and Ortega, A. (2000). Polystachynes A–E, five cis-neoclerodane diterpenoids from *Salvia polystachya*. *Phytochemistry* 53, 103-109.
63. Calzada, F., Yopez-Mulia, L., Tapia-Contreras, A., Bautista, E., Maldonado, E., and Ortega, A. (2010). Evaluation of the antiprotozoal activity of neoclerodane type diterpenes from *Salvia polystachya* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 24, 662-665.
64. Ishihara, K., Hamada, H., Hirata, T., and Nakajima, N. (2003). Biotransformation using plant cultured cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 23, 145-170.
65. Rial, C., Varela, R.M., Molinillo, J.M., Bautista, E., Hernández, A.O., and Macías, F.A. (2016). Phytotoxicity evaluation of sesquiterpene lactones and diterpenes from species of the *Decachaeta*, *Salvia* and *Podachaenium* genera. *Phytochemistry letters* 18, 68-76.
66. Noma, Y., Okajima, Y., Takahashi, H., and Asakawa, Y. (1991). Biotransformation of aromatic aldehydes and related compounds by *Euglena gracilis* Z. *Phytochemistry* 30, 2969-2972.
67. Furuya, T., Ushiyama, M., Asada, Y., and Yoshikawa, T. (1987). Glycosylation of 2-phenylpropionic acid and its ethyl ester in suspension cultures of *Nicotiana tabacum*, *Dioscoreophyllum cumminsii* and *Aconitum japonicum*. *Phytochemistry* 26, 2983-2989.

## VII-Anexos

### Anexo 1: Medio mínimo Murashige & Skoog líquido

Preparar las siguientes soluciones stock

Solución	Contenido	Para 450ml (stock 100X)	Condiciones de Almacenamiento
I-Nitratos	Nitrato de amonio	74.25g	TA
	Nitrato de potasio	85.5g	
II-Sulfatos	Sulfato de magnesio 7H <sub>2</sub> O	15.426g	4°C
	Sulfato de magnesio H <sub>2</sub> O	0.7605g	
	Sulfato de zinc 7H <sub>2</sub> O	0.387g	
	Sulfato cúprico 5H <sub>2</sub> O	0.001125g	
III-Halógenos	Cloruro de calcio 2H <sub>2</sub> O	19.8g	4°C
	Yoduro de potasio	0.0378g	
	Cloruro de cobalto 6H <sub>2</sub> O	0.001125g	
IV-Fosfatos	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.65g	4°C
	Ácido bórico	0.279g	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.001125g	
V-Quelatos y vitaminas	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (a 4°C)	1.251g	4°C (Cubrir con aluminio)
	EDTA 2H <sub>2</sub> O	1.6785g	
	Myo-inositol	4.5g	
	Tiamina HCL	0.045g	

Preparar por separado un stock de ácido 2-4diclorofenoxiacético (2-4,D) a una concentración de 1mg/ml. Almacenar a -20°C.

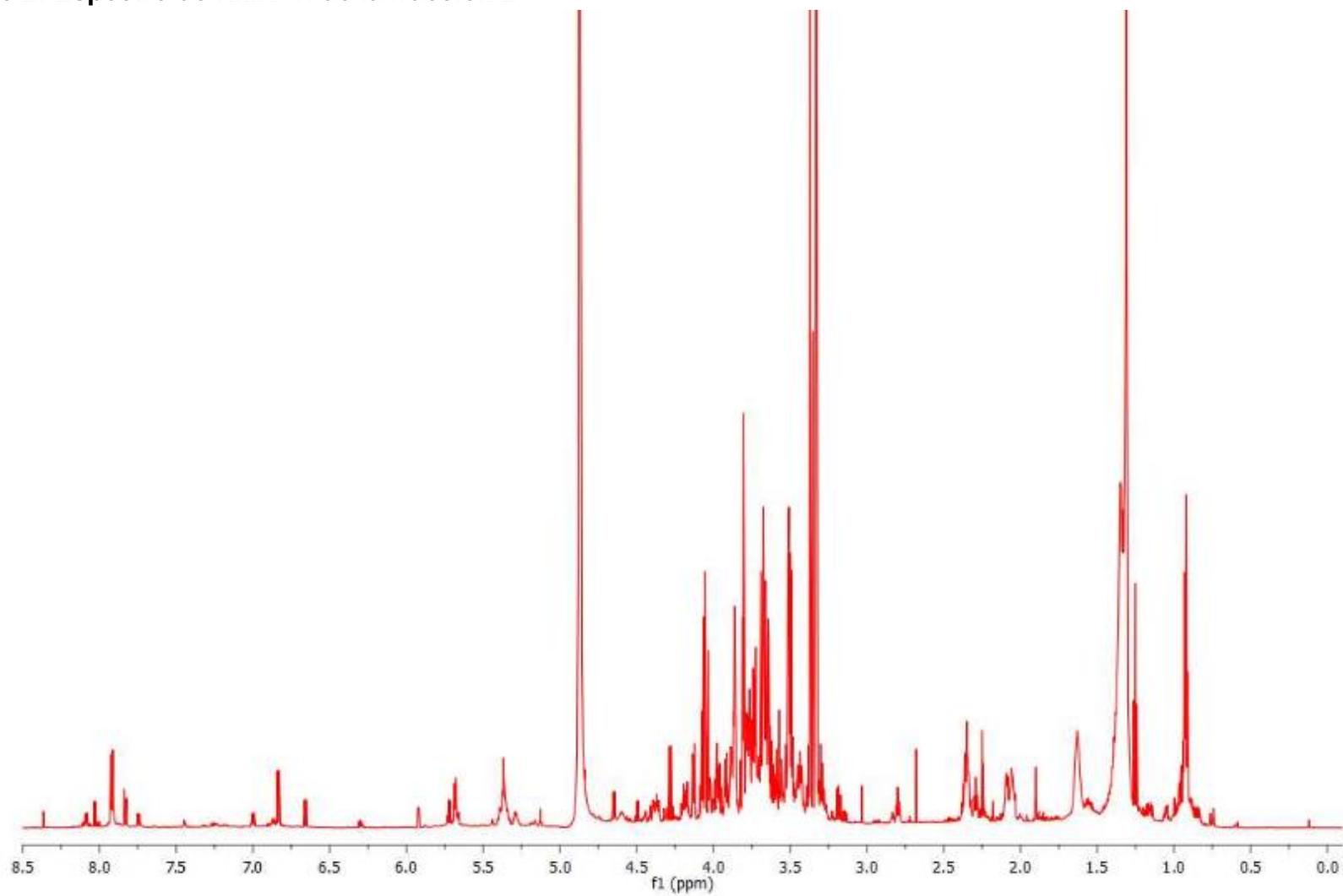
Preparación del medio NT1

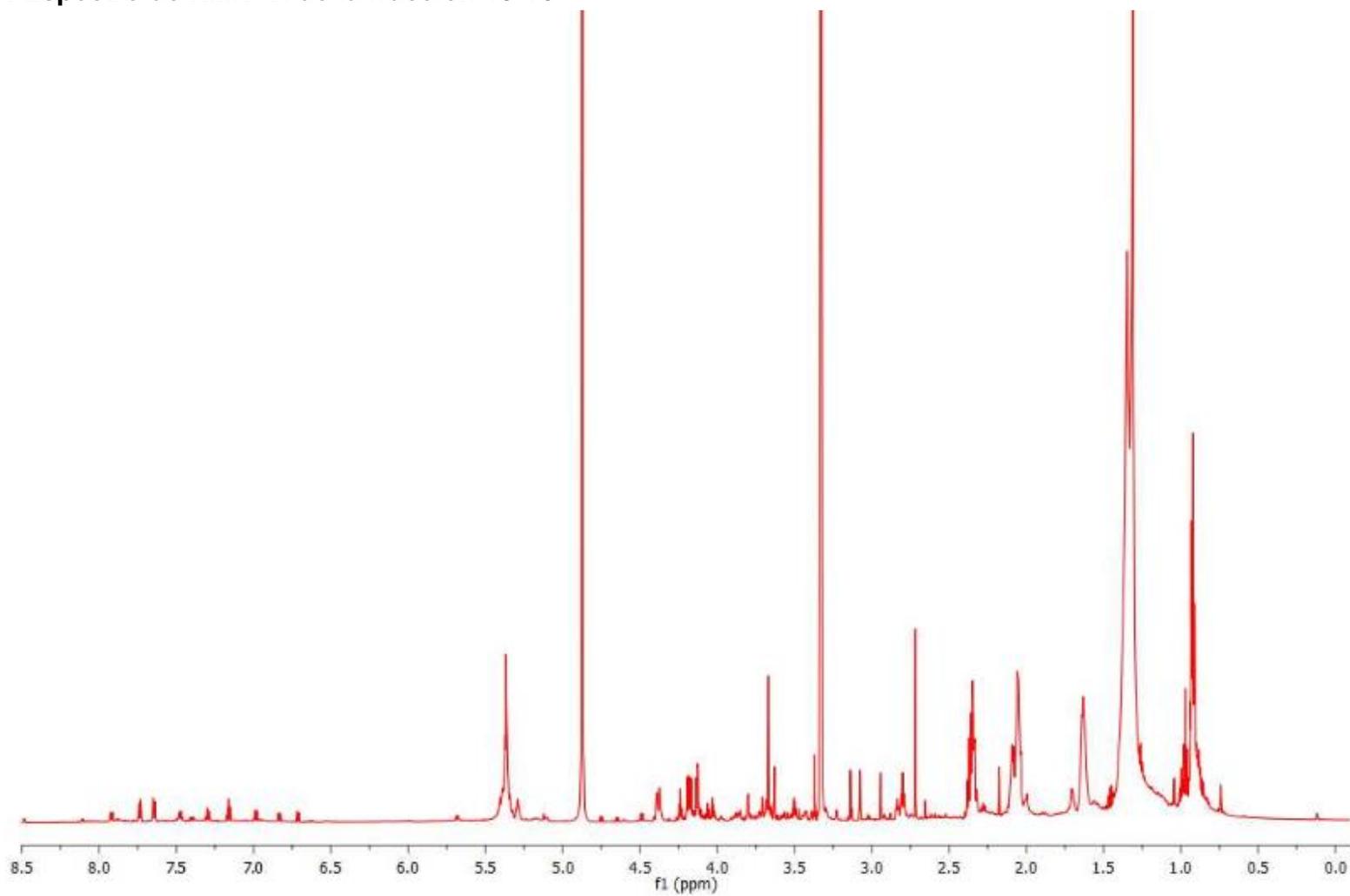
Para un litro:	Para 5L
Agregar 10ml de c/u de las soluciones stock en la mitad de agua	50ml c/u
Agregar 30g de sacarosa	150g
Agregar 2ml de 2-4,D a 1mg/ml (Almacenado a -20°C)	10ml
Aforar a 1L	Aforar a 5L

Ajustar pH entre 5.2-5.7 con KOH

Esterilizar al momento de la preparación y almacenar a -4°C

Esterilizar nuevamente cada alícuota que se vaya a usar para cambio de medio

**Anexo 2: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción 2**

**Anexo 3: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción 15-16**

Anexo 4: Expansión del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción 4-5