



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**Biotransformación de monoterpenos —óxido de cariofileno,
isomentol y mentol— y Aislamiento de la(s) fitoalexina(s)
inducidas en una variedad de mango mexicano *Mangifera indica*
L., por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.**

Informe de Laboratorio de Investigación Formativa VII
y VIII.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A

Almazán Alvarez Corina Guadalupe

Director: M. en C. Arturo Eduardo Cano Flores

**Laboratorio de Biotransformaciones y Química de Productos
Naturales L-314**



MÉXICO D.F., OCTUBRE 2013

AGRADECIMIENTOS

- A la DGAPA por el apoyo financiero al proyecto: PE205910
- A la DGAPA por el apoyo financiero al proyecto: IN216012
- Al Dr. Guillermo Delgado Lamas
Instituto de Química, UNAM.
- Dra. Dora Alicia Pérez G.
Lab. de Microbiología Farmacéutica L-313 de la FES- Zaragoza, UNAM.
- Dr. José Antonio Mora Aguilera
Lab. de Fitopatología del Colegio de *Postgraduados*, UACH.
- Al Personal Técnico Académico del Instituto de Química, UNAM.
- A la Carrera de Biología de la FES Zaragoza, UNAM.

DEDICATORIAS

- ❖ *Agradezco infinitamente al “todopoderoso”, por permitir el término de este trabajo, que fue realizado con mucho gusto y entereza... y por dejar que las personas que más quiero hayan estado y se encuentren todavía junto a mí!*
- ❖ *A mi Mami!!! **Rosa María Álvarez Pérez**, por estar siempre a mi lado, por hacer de mí una persona de valores, y sobre todo mucha fortaleza, también por enseñarme a no rendirme, simplemente por existir y estar ahora junto a nosotros...*
- ❖ *A mi papi **Roberto Almazán Pérez** porque siempre fuiste y serás un pilar muy importante en mi vida, por ser como eres, y por tanto, pero sobre todo por darme la vida!!!*
- ❖ *A mi hermano **Roberto Ángel**, que sacrificó sus estudios por darme cuanto tenía, para que yo concluyera mi carrera, por enseñarme a ser fría! y fuerte ante todas las circunstancias, y por darme tantas alegrías... Te quiero mucho!*
- ❖ *A **Alejandra**..... Si a ti!!! Por todo el apoyo que me has brindado, por tu fortaleza y por estar siempre apoyando a toda la familia.... Por ser una extraordinaria persona y un gran ejemplo a seguir!!!! Gracias!*
- ❖ *A **Carlos (Iorek)** por ser mi conciencia, por ayudarme a ver las cosas como son y simplemente por estar siempre para mí! Igual que a tu mami, **Dolores**, gracias por el apoyo incondicional, por creer en mí, y por hacerme sentir importante.*
- ❖ *A mis amigas, que siempre han estado ahí! **Flor, Ilse, Lupe, Fabiola**, que a pesar de tantos años, aún seguimos juntas y siendo amigas, y que sobre todo me siguen dando herramientas para seguir en esto!!!*
- ❖ *Mis cuates que son tantos..., **Croma, Rulo, Black, Goreti, Chucho, Carmina, Carlos, Massiel, Fer, Wendoline**; por compartir tantos momentos de alegría*
- ❖ *A mis compañeros de laboratorio, por hacer amenos los días en esa mi primera casa. ;P Más a **Claudia, Lorena, Iván, Samuel, Rigo, Lalo, Miguel, Javier y Jorge**.*
- ❖ *Y a ustedes, **Yaneli, Lupis, Lore, Estrella, Jaime, Sinaí, Luis, Arlene, Elías, Chucho y Gaby** por haberme aceptado y compartido tantos momentos en esta bonita etapa, que tuvo muchos momentos inolvidables... pero sobre todo a ustedes, **Yaneli, Jaime y Sinaí**... por estar justo en el momento que más los necesite! Por permitirme entrar en sus vidas, y por permanecer ustedes en la mía, por hacer de esta etapa la más feliz de mi vida!... Los quiero mucho!!!!*

*A la Profesora **Catalina Machuca**, que gracias a usted supe que el laboratorio, campo y un excelente equipo de trabajo hace que el tiempo se pase rápido... Pero en realidad por ser la primera profesora que me demostró la pasión de la biología y el amor por su trabajo!!!*

*A usted Profesor **Carlos Castillejos Cruz**, Por ser más que un excelente profesor, por abrirme las puertas de su casa, al igual que la Profesora **Sonia Rojas**, que han sido para mí, más que mis profesores, alguien en quien puedo confiar... Gracias!!!*

El profesor mediocre, dice; El buen profesor, explica;

El profesor superior, demuestra; El gran profesor inspira.

William G. Wond

- ❖ *A mi director de tesis M. en C. **Arturo E. Cano Flores**, por enseñarme a ser mejor persona, mejor alumna; por mostrarme las bases de un excelente trabajo en laboratorio, Pero sobre todo por dejarme ser parte de su equipo de trabajo y apoyarme en los momentos más importantes, porque para mí usted siempre será mi mejor profesor; académica y personalmente hablando; me ha demostrado que con constancia y responsabilidad, todo se puede lograr... Gracias por ser una inspiración para mí!!!*

INDICE

| | | |
|------------|--|----|
| I | Introducción | 1 |
| II | Marco Teórico | 3 |
| 2.1 | Descripción y clasificación taxonómica del mango <i>Mangifera indica</i> L. | 4 |
| 2.2 | Distribución en la República Mexicana y usos | 4 |
| 2.3 | Valor alimenticio del mango y descripción de algunas variedades | 6 |
| 2.4 | Características generales de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz. | 7 |
| 2.4.1 | Clasificación taxonómica | 7 |
| 2.4.2 | Ciclo patológico de la antracnosis producida por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . | 9 |
| 2.5 | Fitoalexinas | 11 |
| 2.6 | Monoterpenos | 13 |
| 2.7 | Generalidades de las biotransformaciones. | 15 |
| 2.8 | Biotransformaciones de productos naturales con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Glomerella cingulata</i> | 16 |
| III | Justificación | 24 |
| IV | Planteamiento del Problema | 27 |
| V | Hipótesis | 29 |
| VI | Objetivos | 31 |
| 6.1 | Objetivo General | 32 |
| 6.2 | Objetivos Particulares | 32 |
| VII | Metodología | 33 |
| 7.1 | Aislamiento, caracterización e identificación de la(s) fitoalexina(s) inducida (s) en el mango por la presencia de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . | 34 |
| 7.2 | Extracción de la mezcla de productos de los extractos diclorometánicos. | 35 |
| 7.2.1 | Separación cromatográfica del extracto diclorometánico (CH ₂ Cl ₂) del epicarpio sano de <i>Mangifera indica</i> L. | 35 |
| 7.2.2 | Separación cromatográfica del extracto diclorometánico (CH ₂ Cl ₂) del epicarpio infectado de <i>Mangifera indica</i> L. | 37 |
| 7.3 | Obtención del extracto metanólico del fruto de <i>Mangifera indica</i> L. | 37 |
| 7.3.1 | Acetilación de la mezcla de productos obtenida con Acetona a partir del Extracto MeOH. | 39 |
| 7.3.2 | Separación cromatográfica del residuo AcOEt (C), obtenido a partir del extracto MeOH. | 40 |
| 7.4 | Aislamiento del hongo <i>C. gloeosporioides</i> en el fruto de <i>Mangifera indica</i> L. | 41 |
| 7.5 | Factibilidad de bioconversión del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3). | 43 |
| 7.6 | Biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (1) con <i>C. gloeosporioides</i> | 46 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 7.7 | Reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (1) | 48 |
| 7.8 | Reacción de la apertura del epóxido del óxido de cariofileno (1) | 49 |
| 7.9 | Biotransformación cuantitativa del isomentol (2) con <i>C. gloeosporioides</i> . | 50 |
| 7.10 | Biotransformación cuantitativa del mentol (3) <i>C. gloeosporioides</i> . | 52 |
| 7.11 | Biotransformación cuantitativa del mentol (3) con <i>Glomerella cingulata</i> . | 53 |
| VIII | Resultados y Discusión | 56 |
| 8.1 | Productos de la biotransformación del óxido de cariofileno (1) | 57 |
| 8.2 | Productos de la biotransformación del (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> , 5 <i>R</i>)-(+)-isomentol (2) | 69 |
| 8.3 | Productos de la biotransformación del (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-(-)-mentol (3) | 74 |
| 8.4 | Caracterización e identificación del producto mayoritario obtenido de la transformación química de 1 con p-TsOH. | 82 |
| IX | Conclusiones | 87 |
| X | Sugerencias | 89 |
| XI | Bibliografía | 91 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Principales Estados productores de mango en la República Mexicana | 5 |
| Figura 2 | CCF correspondiente a los extractos CH ₂ Cl ₂ de <i>Mangifera indica</i> L. no infectado y del tratado con CuSO ₄ ·5H ₂ O. | 35 |
| Figura 3 | CCV desarrollada para la separación cromatográfica del residuo orgánico de la epicarpio sano. | 36 |
| Figura 4 | CCF con algunas fracciones del residuo CH ₂ Cl ₂ del epicarpio sano de <i>Mangifera indica</i> L. | 36 |
| Figura 5 | Valores de R _f para la sustancia mayoritaria presente en las fracciones 151-211. | 40 |
| Figura 6 | CCF de las mezclas de productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3). | 45 |
| Figura 7 | CCF de los compuestos obtenidos de la biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (1) con <i>C. gloeosporioides</i> . | 47 |
| Figura 8 | CCF de la mezcla de productos obtenidos de la reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (1). | 49 |
| Figura 9 | CCF de los diferentes compuestos obtenidos de la reacción de apertura del epóxido del óxido de cariofileno (1). | 50 |
| Figura 10 | CCF de los compuestos obtenidos de la biotransformación cuantitativa del isomentol (2) con <i>C. gloeosporioides</i> . | 51 |
| Figura 11 | CCF de los compuestos obtenidos de la biotransformación cuantitativa del mentol (3) con <i>C. gloeosporioides</i> . | 52 |

INDICE DE ESQUEMAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Esquema 1 | Representación esquemática de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . | 8 |
| Esquema 2 | Ciclo patológico de la antracnosis producida por <i>C. gloeosporioides</i> | 10 |
| Esquema 3 | Biotransformación de (-)-maackiaina por <i>C. gloeosporioides</i> . | 16 |
| Esquema 4 | Biotransformación del acetato de (-)-dihidromircenilo con <i>G. cingulata</i> . | 17 |
| Esquema 5 | Biotransformación del (±)-citronelal con <i>G. cingulata</i> . | 17 |
| Esquema 6 | Biotransformación del tetrahidrogeraniol y tetrahidrolavandulol con <i>G. cingulata</i> . | 18 |
| Esquema 7 | Biotransformación del <i>cis</i> y <i>trans</i> -mirtanol por <i>G. cingulata</i> . | 18 |
| Esquema 8 | Biotransformación del (-)-nopol por <i>G. cingulata</i> | 19 |
| Esquema 9 | Biotransformación de (-)-isopinocamfeol y (+)-isopinocamfeol con <i>G. cingulata</i> | 19 |
| Esquema 10 | Resolución de la mezcla racémica del óxido de linalool por medio de la esterificación microbiológica con <i>G. cingulata</i> | 20 |
| Esquema 11 | Biotransformación del (-)-β-selineno con <i>G. cingulata</i> | 20 |
| Esquema 12 | Biotransformación del (-)-α bisabolol con el hongo <i>G. cingulata</i> | 21 |
| Esquema 13 | Biotransformación de (+)-cedrol (61) con <i>G. cingulata</i> | 21 |
| Esquema 14 | Biotransformación del (+)-γ-gurjumeno (66) con <i>G. cingulata</i> | 22 |
| Esquema 15 | Biotransformación de (+)-(1 <i>R</i>)-aromadendreno (69), (-)-(1 <i>S</i>)-alloaromadendreno (70). | 22 |
| Esquema 16 | Biotransformación del (-)- globulol (71) y (+)-ledol (72) por <i>G. cingulata</i> . | 23 |
| Esquema 17 | CCF de la mezcla de los productos de reacción de acetilación del residuo acetónico B , obtenido a partir del extracto MeOH. | 39 |
| Esquema 18 | Crecimiento del hongo y bacterias aisladas del fruto de <i>M. indica</i> L. | 42 |
| Esquema 19 | Representación esquemática y referencia de <i>C. gloeosporioides</i> . | 43 |
| Esquema 20 | Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y ¹³ C para algunos átomos de H y C presentes en el óxido de cariofileno (1). | 57 |
| Esquema 21 | Productos de biotransformación aislados de la biotransformación del óxido de cariofileno (1) por <i>Botrytis cinerea</i> . | 58 |
| Esquema 22 | Biotransformación del óxido de cariofileno (1) con <i>A. niger</i> . | 61 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Esquema 23 | Orientación relativa en C-14 en el 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-14-ol (94). | 61 |
| Esquema 24 | Espectro de RMN ¹³ C para el compuesto 4β,5α-epoxi,8,3-dihidroxi-cariofileno (98) | 64 |
| Esquema 25 | Espectro DEPT para el compuesto 4β,5α-epoxi,8,3-dihidroxi-cariofileno (98) | 65 |
| Esquema 26 | Espectro HSQC para el compuesto 4β,5α-epoxi,8,3-dihidroxi-cariofileno (98) | 66 |
| Esquema 27 | Biotransformación del óxido de cariofileno (1) con <i>Chaetomium cochliodes</i> y <i>Diplodia gossypina</i> . | 67 |
| Esquema 28 | Espectro NOESY para el compuesto 4β,5α-epoxi,8,3-dihidroxi-cariofileno (98) | 68 |
| Esquema 29 | Biotransformación del isomentol (2) con <i>F. lini</i> y <i>R. stolonifer</i> . | 69 |
| Esquema 30 | Biotransformación del isomentol (2) con <i>A. niger</i> . | 70 |
| Esquema 31 | Diferentes posibilidades de ubicación del nuevo grupo hidroxilo en la estructura del isomentol (2) | 71 |
| Esquema 32 | Interacciones H-H observadas en el espectro COSY para los epímeros del 5-hidroxi-isomentol (100). | 72 |
| Esquema 33 | Biotransformación del (-)-mentol (3) con <i>A. niger</i> . | 74 |
| Esquema 34 | Biotransformación del (+)-mentol (3) con <i>A. niger</i> . | 75 |
| Esquema 35 | Productos de biotransformación del (+)-neomentol con <i>A. niger</i> . | 75 |
| Esquema 36 | Biotransformación del (-)-neomentol con <i>A. niger</i> . | 76 |
| Esquema 37 | Biotransformación del (+)-mentol con <i>Macrophomina phaseolina</i> . | 77 |
| Esquema 38 | Posible ubicación del nuevo grupo hidroxilo en la estructura del mentol | 78 |
| Esquema 39 | Interacciones del H-6 _{βax} con H-5 _{βec} , H-5 _{αax} y H-1 _{αax} para el compuesto 6α,8-hidroximentol (135). | 81 |
| Esquema 40 | Espectro DEPT para el compuesto 9α-hidroxi-cloveno (136). | 84 |
| Esquema 41 | Espectro HMBC para el compuesto 9α-hidroxi-cloveno (136). | 85 |
| Esquema 42 | Espectro HMBC para el compuesto 9α-hidroxi-cloveno (136). | 86 |

INDICE DE DIAGRAMAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Diagrama 1 | Obtención del extracto CH ₂ Cl ₂ del mesocarpio y epicarpio del mango infectado. | 34 |
| Diagrama 2 | Obtención del extracto metanólico de <i>M. indica</i> L. | 37 |
| Diagrama 3 | Obtención de los residuos de AcOEt (A) y acetona (B), a partir del extracto “crudo” MeOH de <i>Mangifera indica</i> L. | 38 |
| Diagrama 4 | Acetilación de una mezcla del residuo B del extracto MeOH. | 39 |
| Diagrama 5 | Aislamiento e identificación del hongo y bacterias presentes en el fruto infectado de <i>M. indica</i> L. | 41 |
| Diagrama 6 | Factibilidad de bioconversión de óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3), con <i>C. gloeosporioides</i> . | 43 |
| Diagrama 7 | Separación y extracción de la mezcla de bioconversión. | 45 |
| Diagrama 8 | Recuperación de la mezcla de productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3) con <i>C. gloeosporioides</i> . | 46 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabla 1 | Valor nutricional del mango | 6 |
| Tabla 2 | Ejemplos de fitoalexinas | 12 |
| Tabla 3 | Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y ¹³ C para las sustancias 82, 83, 84, 91 | 59 |
| Tabla 4 | Desplazamientos químicos RMN ¹ H y RMN ¹³ C del compuesto 94 . | 60 |
| Tabla 5 | Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ¹³ C para los compuestos 90, 94 y el compuesto en discusión. | 62 |
| Tabla 6 | Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C para el compuesto 98 . | 63 |
| Tabla 7 | Constantes Espectroscópicas de RMN ¹ H (ppm, J en Hz) y ¹³ C (ppm) para el compuesto 99 . | 73 |
| Tabla 8 | Desplazamientos químicos de RMN ¹ H (ppm, J en Hz) y ¹³ C (ppm) para el compuesto 102 . | 79 |
| Tabla 9 | Comparación de las Constantes Espectroscópicas de RMN ¹ H (ppm, J en Hz) y ¹³ C (ppm) para los compuesto 102 y 135 . | 81 |
| Tabla 10 | Constantes Espectroscópicas de RMN ¹ H (ppm, J en Hz) y ¹³ C (ppm) para el compuesto 136 . | 82 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|--|
| [α] | Rotación Óptica. |
| AcOEt | Acetato de Etilo. |
| AMCPB | Ácido <i>m</i> -cloro- perbenzoico. |
| APD | Medio de cultivo Agar Papa Dextrosa. |
| p-TsOH | Ácido <i>p</i> -toluensulfónico. |
| CCV | Cromatografía en Columna a Vacío. |
| CCF | Cromatografía en Capa Fina. |
| CC-Flash | Cromatografía en Columna Flash. |
| CCP | Cromatografía en Capa Preparativa. |
| CYP | Forma isofórmica del Citocromo P450. |
| CDCl₃ | Cloroformo Deuterado. |
| COSY | Correlación Homonuclear de Hidrógeno en dos dimensiones. |
| <i>d</i> | Doble. |
| DEPT | Desacoplamiento parcial de C ⁻¹³ . |
| EM | Espectrometría de Masas. |
| <i>i</i>-Pr₂O | Éter Isopropílico |
| IR | Infrarrojo. |
| IE | Impacto Electrónico. |
| J | Constante de acoplamiento (Hz). |
| HMBC | Correlación Heteronuclear de Enlace Múltiple |
| HSQC | Correlación Heteronuclear Cuántica Simple |
| Hz | Hertz. |
| <i>m</i> | Multiplete. |
| MHz | Mega Hertz. |
| MeOH | Metanol. |
| NOESY | Efecto Nuclear Overhauser. |
| pf | Punto de Fusión. |
| ppm | Partes por millón. |
| Py | Piridina. |
| <i>c</i> | Cuarteto. |
| RMN⁻¹H | Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno. |
| RMN⁻¹³C | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13. |
| R_f | Factor de Retención. |
| rpm | Revoluciones por minuto. |
| δ | Desplazamiento químico. |
| <i>s</i> | Singulete. |
| <i>sa</i> | Singulete amplio |
| <i>t</i> | Triplete. |
| uma | Unidad de masa atómica |
| TMS | Tetra Metil Silano. |
| UV | Ultra Violeta. |
| v_{max} | Longitud de Onda Máxima. |
| YEPGA | Medio de cultivo líquido YEPGA |

Este trabajo fue presentado en:

VII Congreso de Investigación y I de Posgrado de la FES Zaragoza.

30° Congreso Latinoamericano de Química.

Introducción

El mango es un fruto de gran importancia económica para México y otros países, actualmente ocupa el primer lugar en volumen de exportación en el mundo, donde en México la mayor parte de superficie cultivada se encuentra en los estados de Veracruz, Michoacán, Nayarit, Guerrero, Sinaloa y Chiapas.

Este tipo de plantas superiores son muy susceptibles a las enfermedades post-cosecha y al almacenamiento prolongado, esto ocurre como resultado de cambios fisiológicos que ocurren en los frutos, haciendo más fácil el desarrollo de patógenos. La enfermedad más importante que afecta a estos frutos es la Antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, Penz., En México, esta enfermedad se encuentra prácticamente en todas las entidades federativas donde se produce el mango, se estima que las pérdidas en mango fluctúan entre un 30 y 60 por ciento del total de la producción nacional, provocando una disminución de la calidad del producto y hasta la pérdida total de la planta. Existen otros tipos de patógenos que atacan esta especie, como *Fusarium moniliforme* y *F. oxysporum* dañando no sólo los frutos de importancia comercial, sino también órganos y tejidos de la planta completa.

El control de plagas y enfermedades, depende en gran medida de la aplicación de productos químicos —pesticidas, herbicidas, insecticidas, entre otros—, pero el uso indiscriminado de éstos, ha ocasionado severos problemas de contaminación ambiental, generando organismos altamente resistentes. La utilización de microorganismos en el control biológico de plagas y de enfermedades es una alternativa atractiva, desarrollando técnicas biotecnológicas que permiten realizar acciones metabólicas, o biotransformaciones utilizando como biocatalizadores al mismo organismo; desarrollando el conocimiento de sustancias que sirven como mecanismo de defensa para algunas plantas ante una infección o un depredador. O bien, la acumulación de metabolitos secundarios para la atracción de polinizadores [1].

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se pretende, aislar de su hábitat natural al hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, Penz., para posteriormente emplearlo como un biocatalizador en la biotransformación del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3); así como aislar la fitoalexina mayoritaria producida por dicho hongo en la fruta del mango —*Mangifera indica* L.—.

Marco Teórico

2.1. Descripción y clasificación taxonómica del mango —*Mangifera indica* L.—

Reino: Plantae
Filo: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Sapindales
Familia: Anacardiaceae
Género: *Mangifera*
Especie: *Mangifera Indica* L.

Mangifera indica L., es un árbol de crecimiento rápido y tamaño mediano de 10-15 m de altura, perennifolio, originario de la India y Ceilán, de copa frondosa y tronco que puede llegar a medir hasta un metro de diámetro. De hoja perenne, las jóvenes de color violeta rojizo que tornan al verde brillante con el paso del tiempo. Cada árbol de mango tiene una producción de 200 Kg hasta 1000 Kg de fruta; la variedad “manila” es muy dulce y con un sabor más suave, jugoso, rica en ácidos y aroma peculiar [2].

2.2. Distribución en la República Mexicana y usos.

El mango es un frutal de importancia económica en México¹⁻², ver figura 1. Donde los principales productores de mango son los estados de Sinaloa, Guerrero, Jalisco, Colima, Chiapas, Oaxaca, Nayarit, Michoacán y Veracruz.

¹ Las exportaciones mundiales de mango indican que México es uno de los principales exportadores, con un 23.5% del total exportado (FAO, 2005).

² El mango ocupa el tercer lugar en cuanto a superficie sembrada en México dentro de los árboles frutales, siendo el café el principal, seguido de la naranja.

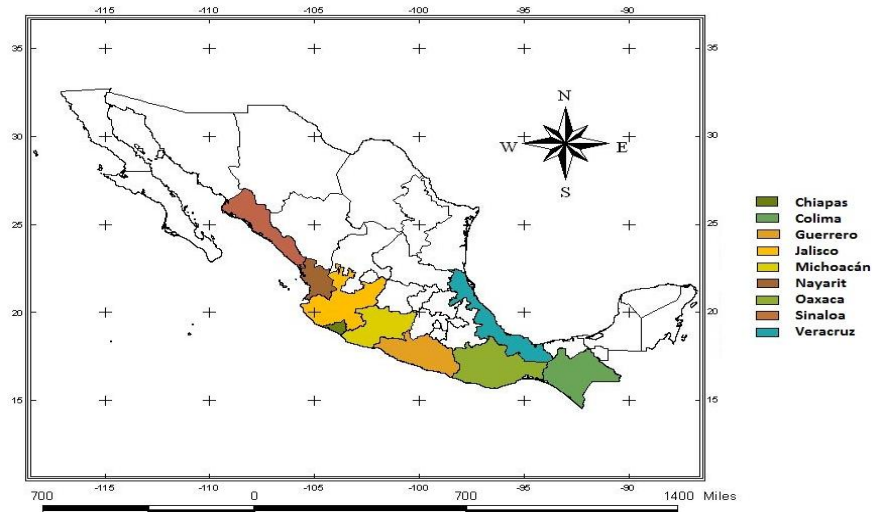


Figura 1. Principales Estados productores de mango —*Mangifera indica* L.— en la República Mexicana³

Por ejemplo, el Estado de Guerrero⁴, ocupa el tercer lugar a nivel nacional en la producción de mango. Siendo las regiones de Tierra caliente y Norte, las más afectadas por la enfermedad de la “*escoba de bruja*”. En los municipios de Iguala, Tuxpan, Huitzucó, Tonalapa del Río y Tepecoacuilco, el mango tiene una mayor importancia económica, donde las especies cultivadas de haden y criollo son los más susceptibles y se alcanzan pérdidas mayores al 60% de la producción [3].

La madera se utiliza en algunos lugares para fabricar muebles, chapa, triplay, pisos, artículos torneados, decoración de interiores, cajas para el té. La resina aromática se emplea localmente como remedio casero en afecciones cutáneas, fiebres y diarreas. Por otro lado, las semillas poseen propiedades astringentes; la infusión que se obtiene del cocimiento de la corteza, se utiliza en la medicina popular como laxante y febrífugo.

La producción de mango en México enfrenta una serie de limitantes en su cadena productiva entre los que destacan: altos costos de producción, deficiencias en la comercialización, manejo de *post cosecha*, incidencia de plagas, enfermedades y períodos cortos de cosecha, entre otros; lo que trae como consecuencia bajos rendimientos por unidad de superficie y en general una baja

³ Mapa realizado en el programa de Sistemas de Información Geográfica Arc. View GIS 3.2

⁴ Regiones Productoras: Costa Grande, Costa Chica, Tierra Caliente y Norte.

rentabilidad. De las diferentes enfermedades que disminuyen la producción y la calidad del fruto, las más importantes es la denominada “*escoba de bruja*”⁵ que se encuentra distribuida en todos los estados productores de la República Mexicana y puede reducir el 60% o más del rendimiento de la producción.

El mango al igual que otros frutos cultivados son atacados por depredadores o patógenos que disminuyen la producción del cultivo y empobrecen las características de estos, los microorganismos presentes en los cultivos van desde bacterias que afectan tejidos radicales, hojas, flores y frutos, al igual que los hongos e insectos que llegan a convertirse en patógenos, plagas o destructores de las plantas.

2.3 Valor Alimenticio del mango y descripción de algunas variedades.

Desde el punto de vista del valor nutritivo, el mango es una fuente importante de vitaminas A y C, su contenido nutrimental se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Valor nutrimental del mango.

| Contenido | 100 gr. Muestra |
|-----------------|-----------------|
| Agua | 81.8g |
| Calorías | 63g |
| Proteínas | 0.5g |
| Grasas | 0.1g |
| Carbohidratos | 16.4g |
| Fibras | 0.7g |
| Calcio | 10mg |
| Hierro | 0.4mg |
| Vitamina A | 1100 U.I |
| Tiamina | 0.04mg |
| Riboflavina | 0.07mg |
| Ácido ascórbico | 80mg |
| Desechos | 34% |

⁵ Escoba de bruja: Malformación causada por la infección del hongo *Fusarium mangiferae* y *F. subglutinans*.

Como resultado del proceso de selección y mejoramiento que se ha llevado a cabo a través del tiempo, se han obtenido nuevas especies cultivadas de importancia económica en distintas partes del mundo. Entre las principales variedades que se cultivan y aprovechan comercialmente en nuestro país, están las siguientes [4].

Manila: Produce frutos de tamaño medio (200 a 275 g), de forma elíptica y color amarillo, con epicarpio delgado, mesocarpio amarillo, firme, muy dulce, cuenta con un bajo contenido de fibra. Esta variedad es ampliamente aceptada en el mercado nacional tanto para consumo en fresco como industrial.

Ataulfo: Su fruto ha tenido gran aceptación por su excelente calidad. Es de color amarillo, resistente al manejo y con un peso promedio que varía de 200 a 370 g. El color del mesocarpio es amarillo y no tiene fibra.

Diplomático: Sus frutos pesan entre 280 y 320 g, son de color amarillo y una base con chapeo rojo. El mesocarpio es dulce con algo de fibra y resistente al manejo, presenta una gran demanda para el mercado nacional [5].

2.4 Características generales de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

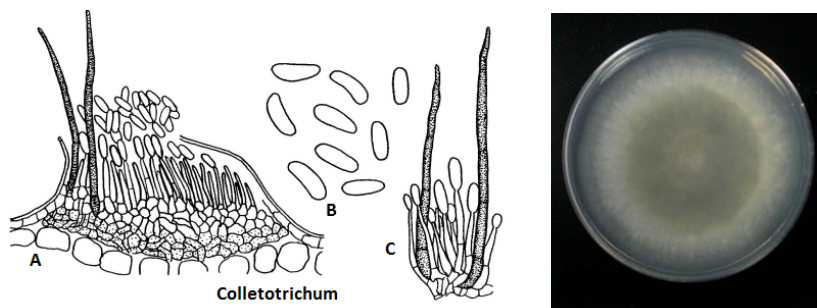
2.4.1 Clasificación Taxonómica [6].

| | | | |
|--------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Reino | Fungi | Reino | Fungi |
| División | Myxomycotina | División | Myxomycotina |
| Subdivisión | Ascomycotina | Subdivisión | Deuteromycotina |
| Clase | Euascmycetes | Clase | Coelomycetes |
| Orden | Diaporthales | Orden | Melanconiales |
| Familia | Diaporthaceae | Familia | Melanconiaceae |
| Genero | <i>Glomerella</i> | Genero | <i>Colletotrichum</i> |
| Especie | <i>Glomerella cingulata</i> | Especie | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> |

Es un hongo que vive de la materia orgánica, y en ocasiones especiales tiene la capacidad de volverse patógeno, prefiriendo atacar tejidos muy viejos o físicamente débiles. Las fuentes del inóculo se encuentran en las hojas, ramas, inflorescencias, brácteas de las flores y en los frutos, en términos generales, en todo el árbol

Colletotrichum gloeosporioides es el hongo causante de la enfermedad llamada antracnosis en un gran número de plantas incluyendo cereales, leguminosas, frutas y vegetales.

La antracnosis causada por este género, se presenta en un amplio rango de hospedantes ampliamente distribuidos, registrándose tanto en el desarrollo de la planta como también en pre y postcosecha. [7-9].



Esquema 1. Representación esquemática de *Colletotrichum gloeosporioides*: A) acérvulo B) conidiosporas y C) conidióforos

Acérvulos: Es la agregación parenquimatosa de hifas, a manera de colchoncillo, sobre la que se forman conidióforos cortos, estrechamente unidos en los tejidos de las plantas parasitadas.

Conidioforos: Hifa simple o ramificada, que se diferencia de una somática y que produce y sustenta conidios, estos son generados en células especializadas llamadas conidiogenas.

Conidiospora: Espora asexual, no móvil, generalmente formada en el ápice o en un lado de la célula esporógena especializada, son las esporas de los deuteromicetes, pueden ser uni, bi, o pluricelulares; secos o mucosos.

2.4.2 Ciclo patológico de la antracnosis producida por *Colletotrichum gloeosporioides*. [10]

C. gloeosporioides es el agente causal de una diversidad de daños y síntomas en diferentes frutales tropicales y subtropicales en México, que afecta diferentes órganos vegetales de la planta; así como, en diferentes etapas fenológicas del cultivo.

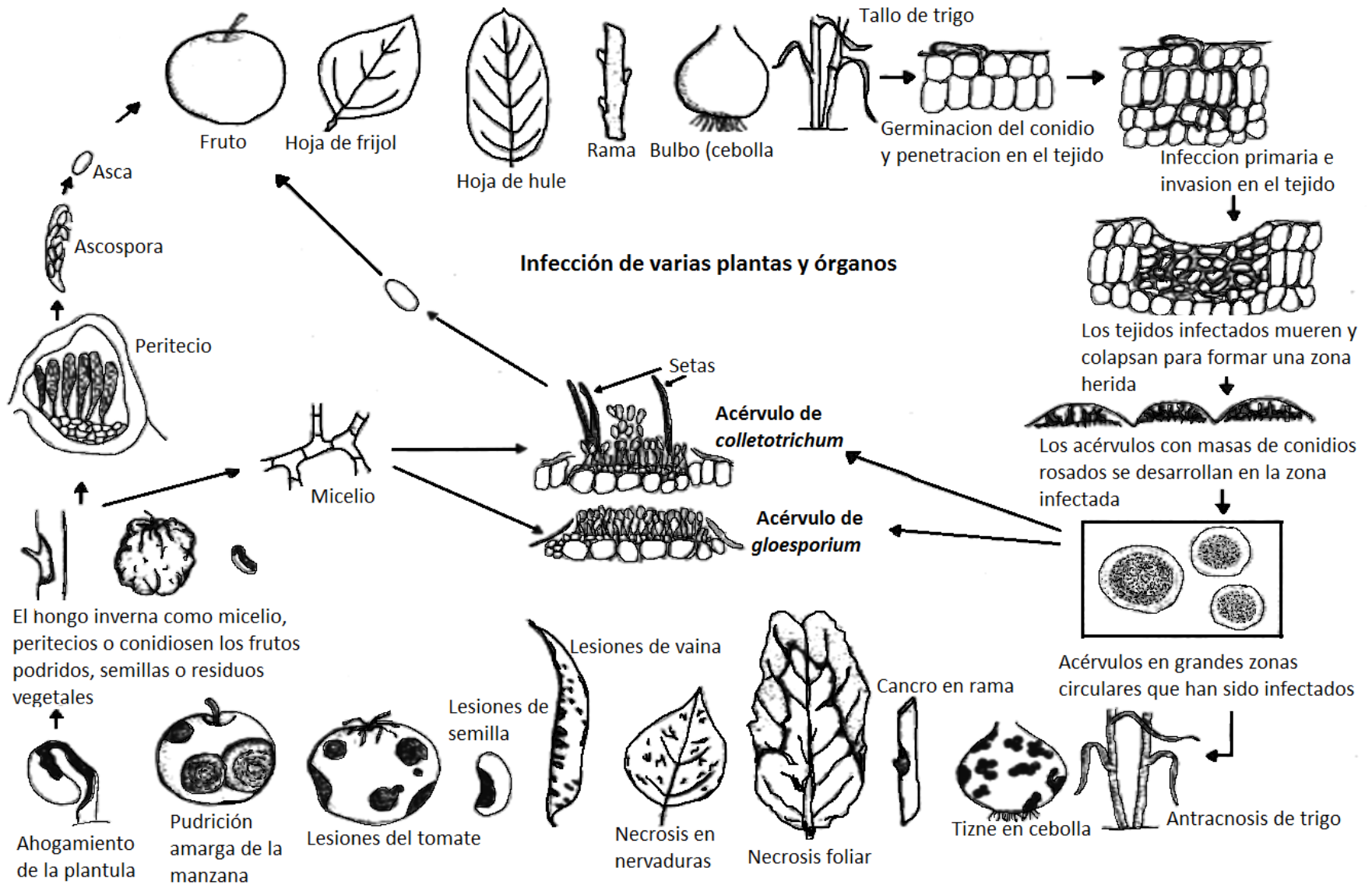
Este hongo se reproduce profusamente y forma masas rosáceas de conidios agrupadas en acérvulos. Los acérvulos constan de un estroma micelial en forma de cojín de pocas a muchas células de espesor y se forma inmediatamente por debajo de la cutícula de la planta, a la cual rompe al ejercer una cierta presión hacia la parte superior de la masa de conidióforos y conidios en proceso de desarrollo.

Los conidios se mantienen unidos en una masa viscosa que es firme y dura cuando el clima es seco; sin embargo, en climas cálidos húmedos los conidios son liberados en una masa rosácea, pueden ser arrastrados o salpicados por las gotas de lluvia, o ser transportados por algunos insectos o dispersado por el viento.

La infección que produce el hongo se lleva a cabo mediante la penetración directa en los tejidos sanos, donde el micelio crece intercelularmente y puede permanecer latente durante cierto tiempo antes de que las células empiecen a colapsarse y pudrirse.

El micelio del hongo produce entonces acérvulos y conidios inmediatamente por debajo de la cutícula, la cual se rompe y libera los conidios para una vez más iniciar más infecciones. Por lo general, el hongo requiere de altas temperaturas y humedad para tener una mayor actividad y aún pueda atacar a los tallos, hojas, cotiledones y frutos jóvenes. En los frutos jóvenes se requiere que pasen por una cierta etapa de desarrollo y madurez, momento en el cual la infección se desarrolla por completo.

Esquema 2: Ciclo patológico de la antracnosis producida por *Colletotrichum* o *Gloeosporium sp* [10].



2.5 Fitoalexinas


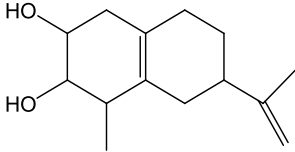

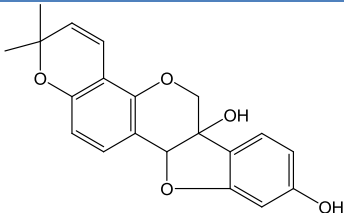
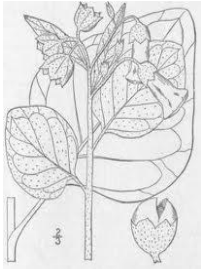
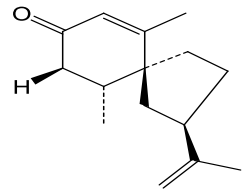

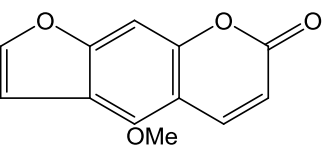
Como parte de la respuesta de defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores, se induce la síntesis y acumulación de sustancias conocidas como fitoalexinas [11-14].

Los primeros informes sobre la presencia de las fitoalexinas fueron descritos por Muller y Boger, quienes mostraron fuertes evidencias de la respuesta de las plantas a enfermedades, ocasionadas principalmente por hongos. Por ejemplo, la resistencia de la papa al hongo *Phytophthora infestans* causada por la producción de compuestos fungitóxicos por la planta hospedera [12]. Algunos investigadores sugieren que las fitoalexinas son metabolitos secundarios generados por estrés, radiación ultravioleta, heridas, descenso de temperatura y por la aplicación de fungicidas. Las fitoalexinas se biosintetizan en las células sanas adyacentes a las células dañadas y se acumulan tanto en tejidos necróticos resistentes, como susceptibles; es decir, se producen restringidamente alrededor del sitio de infección. La resistencia ocurre horas después, cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno [12].

Las fitoalexinas constituyen un grupo químicamente heterogéneo de varias clases de productos naturales. Se han identificado cerca de 150 metabolitos distribuidos dentro de los isoflavonoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, poliacetilenos, dihidrofenantrenos, estilbenos, furanocumarinas, flavanos, alcaloides, y otros tipos de sustancias. Los cuales se biosintetizan en los vegetales después de una infección microbiana. En la tabla 2, se ejemplifican algunas fitoalexinas y su fuente natural [13].

Por lo tanto, las fitoalexinas pueden ser utilizadas como agroquímicos naturales, debido a que pueden contribuir de manera alternativa en el control y manejo de organismos fitopatógenos; así como, en el campo de la ingeniería genética, donde se pueden utilizar estos metabolitos generando especies resistentes a algunos patógenos [12].

Tabla 2. Ejemplos de Fitoalexinas [12-13]

| Planta | Figura | Usos | Nombre y Estructura |
|---|---|--|---|
| <p>Tomate <i>(Lycopersicon esculentum Mill.)</i></p> |  | <p>Antimicrobiano</p> |  <p>Risitina (4)</p> |
| <p>Soya <i>(Glycine max)</i></p> |  | <p>Anticancerígeno</p> |  <p>Gliceolina (5)</p> |
| <p>Tabaco <i>(Nicotiana sp.)</i></p> |  | <p>Antibacteriano Antifúngico</p> |  <p>Solavetivona (6)</p> |
| <p>Apio <i>Apium graveolens L.</i></p> |  | <p>Tratamiento de enfermedades de la piel: vitiligo, psoriasis</p> |  <p>Bergapteno (7)</p> |

2.6 Monoterpenos

Los monoterpenos son compuestos formados por diez átomos de carbono cuya estructura está formada por dos unidades de cinco átomos de carbono (ramificados) de tipo isopreno (2-metil-1,3-butadieno), y pueden estar en forma cíclica o acíclica.

Son sustancias lipofílicas, volátiles responsables del olor característico de muchas plantas. Estos compuestos se han encontrado en cerca de cincuenta familias de angiospermas y suelen ser los sustituyentes principales de los aceites y resinas de las gimnospermas. Cumplen diversos roles ecológicos, entre los que destacan, atrayentes, polinizadores, agentes alelopáticos o sustancias de defensa contra depredadores y parásitos. Se conocen más de quinientos monoterpenos de origen vegetal, la gran mayoría son compuestos cíclicos que pueden tener uno o dos ciclos. Así mismo, hay monoterpenos acíclicos como el mircenol o el linalol, pero la familia es poco numerosa [14].

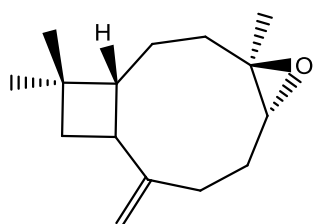
Los monoterpenos son muy apreciados en la industria de los saborizantes y aromas. Sus usos comerciales también comprenden las áreas farmacéuticas y de agroquímicos, las fuentes comerciales más abundantes por su extracción son a partir de naranja, limón, pino, menta y plantas aromáticas, en las cuales los monoterpenos son sintetizados y acumulados en cantidades significativas —más del 0.01% del peso fresco del tejido—.

El control de la biosíntesis de monoterpenos es múltiple, comprende regulación temporal, espacial y ambiental; los niveles de acumulación de los monoterpenos sufren cambios drásticos durante el crecimiento. Aparecen estructuras secretorias en ciertos órganos de la planta como hojas y flores, en momentos particulares del desarrollo del vegetal, casi siempre es en la fase juvenil y bajo estímulos especiales como el estrés hídrico, pero en general la síntesis de monoterpenos está regulada por luz y la concentración de CO₂.

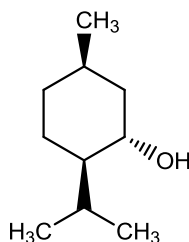
La regulación espacial comprende los límites histológicos, celulares y subcelulares, se sabe que la composición de la oleorresina varía según el tejido de que se trate. Dada la característica hidrofóbica de los monoterpenos, son generalmente acumulados en estructuras secretorias complejas, tales como ductos, cavidades de resina o tricomas glandulares. La biosíntesis puede estar restringida a los tejidos donde son utilizadas las sustancias en partes de la planta que son

importantes para su reproducción y supervivencia, como compuestos de defensa, entre otros. Los monoterpenos se encuentran en los pétalos de las flores y funcionan como atrayentes de polinizadores, también se encuentran en los cromoplastos del fruto y como colorantes que indican la maduración a los dispersores de semillas. A nivel enzimático la regulación incluye tanto cambios en la cantidad absoluta de enzimas, resultado de la variación en la tasa de síntesis y degradación controlados a nivel transcripcional, como cambios en la capacidad catalítica relacionados con modificación alostérica o covalente regulados a nivel postranscripcional.

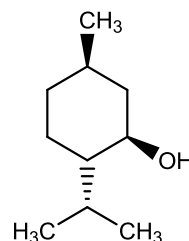
En el presente trabajo se propone la biotransformación de los compuestos —Óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3)—



Óxido de cariofileno (1)
 $C_{15}H_{24}O$
 PM = 220.35
 pf = 62-63°C



Isomentol (2)
 $C_{10}H_{20}O$
 PM = 156.27
 pf = 77-83°C



Mentol (3)
 $C_{10}H_{20}O$
 PM = 156.27
 pf = 43- 44°C

Óxido de cariofileno (1) es un sesquiterpeno presente en el aceite esencial del clavo (*Eugenia caryophyllata*), donde se encuentra mezclado con eugenol, acetato de eugenol, cariofileno, entre otros.

Isomentol (2) Es un componente del aceite esencial de la menta (*Mentha piperita*) junto con él mentol, neomentol, neoisomentol, piperitoles, piperitenol, isopiperitenol —monoterpenos—.

El mentol (3) es un alcohol secundario saturado —monoterpeno—, que se encuentra en los aceites de menta (*Mentha arvensis*).

2.7 Generalidades de las biotransformaciones.

Los procesos de bioconversión se definen como aquellos en los cuales se emplean sistemas biológicos para llevar a cabo transformaciones químicas sobre un sustrato exógeno. Los biocatalizadores, pueden ser sistemas enzimáticos, microorganismos, tejidos celulares o células completas, ya sean de microorganismos naturales o recombinantes.

El uso de los hongos en procesos de bioconversión ha ido en aumento y se ha colocado como una herramienta muy importante; ya que estos organismos presentan una alta *regio*-, *quimio*- y *estereo*- selectividad. Para que un microorganismo sea viable como biocatalizador, debe cumplir con un conjunto de condiciones: a) fácil adquisición, b) inocuo, c) susceptible a modificación genética, d) resistente ante condiciones adversas, y e) alta selectividad hacia los sustratos de interés [15]. Difícilmente una clase de microorganismos llenaría todos los requisitos descritos; sin embargo, algunas bacterias y hongos reúnen características que los hacen excelentes biocatalizadores.

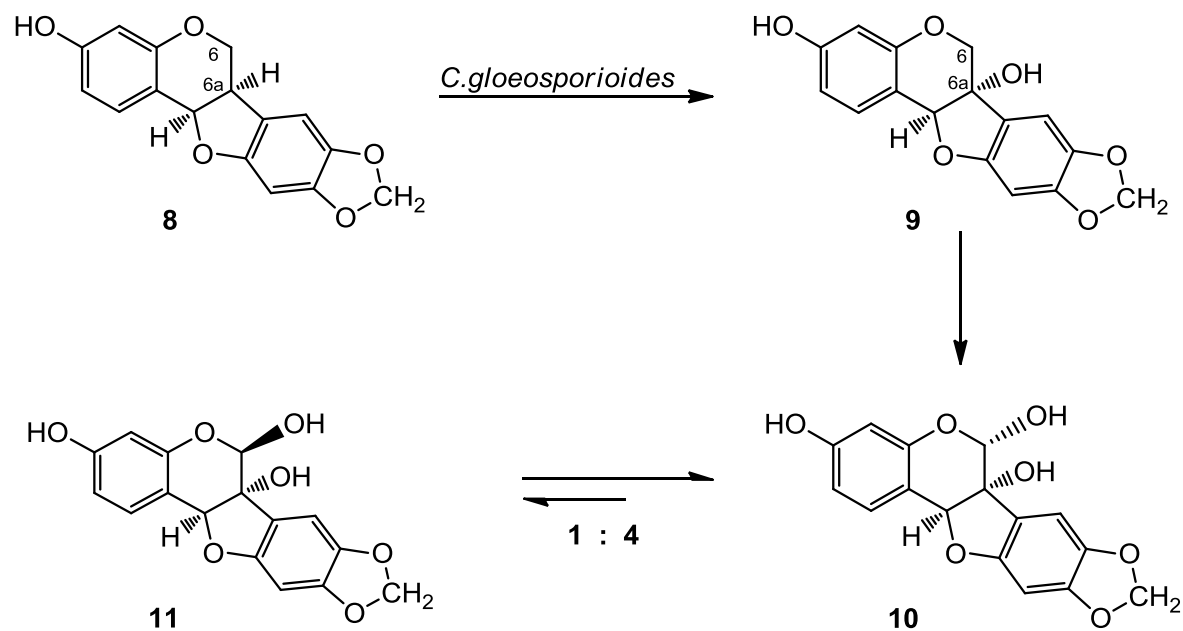
Los hongos filamentosos son capaces de catalizar *regio* y *estereo selectivamente* una amplia variedad de sustratos orgánicos hidrófobos naturales y sintéticos.

Un beneficio importante de los hongos, es la hidroxilación en centros de carbono no activados, que se pueden funcionalizar en formas que no pueden ser fácilmente realizados por medios orgánicos clásicos [16]

Actualmente existe una tendencia creciente hacia el uso de biocatalizadores aplicados en la obtención de moléculas complejas de interés industrial, especialmente en el sector farmacéutico, donde son requisitos fundamentales las propiedades de selectividad y especificidad en un proceso de síntesis [17].

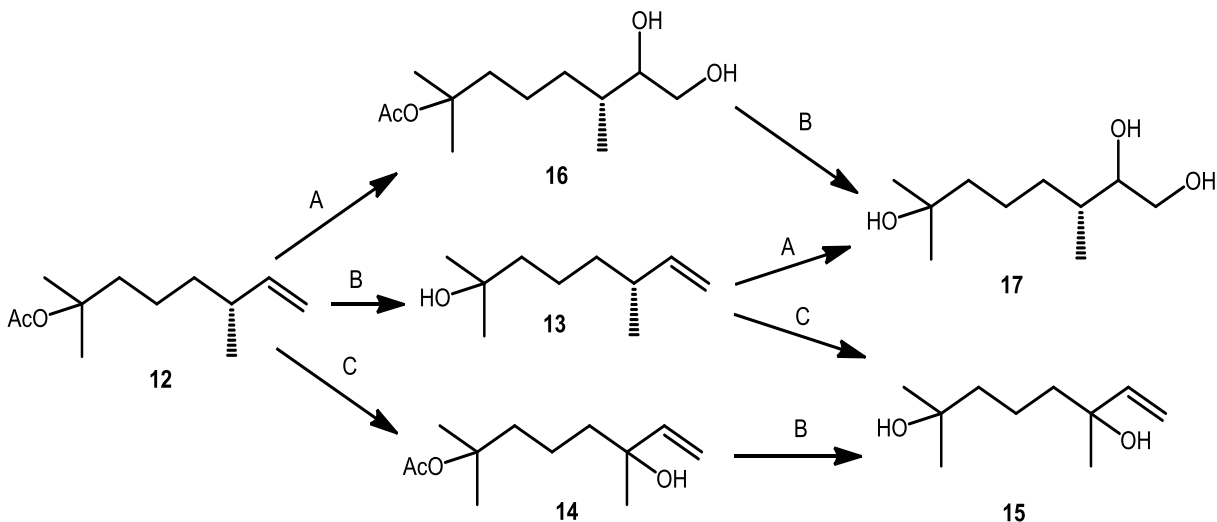
2.8 Biotransformaciones de productos naturales con *Colletotrichum gloeosporioides* y *Glomerella cingulata*.

Los pterocarpenos (-)-maackiaina (**8**) y (-)-medicarpina (**9**) son fitoalexinas presentes en *Medicago sativa* (alfalfa) y *Trifolium pratense* (trébol rojo); además, presentan actividad anti-fúngica frente a diversas especies de hongos. Sin embargo, la biotransformación de **8** con *C. gloeosporioides* ocurre una hidroxilación *estereoselectiva* en la posición C-6a del anillo B para producir (-)-6 α -hidroximakiaina (**9**), la cual fue aislada junto con un compuesto más polar que fue identificado como el diol (-)-6, 6 α -dihidroximakiaina (**10**), este diol se encontró presente en una relación 4:1 con su epímero **11** [18-19].



Esquema 3. Biotransformación de (-)-maackiaina por *C. gloeosporioides*, mediante hidroxilación del C-6a.

En la literatura se ha informado la biotransformación de diferentes productos naturales con *G. cingulata*. Por ejemplo, los terpenoides acíclicos insaturados, como **12** (Acetato (-)-dihidromircenilo) fue oxidado *regio*-selectivamente en el doble enlace lejano a un grupo éster, como se ilustra en el esquema 4.

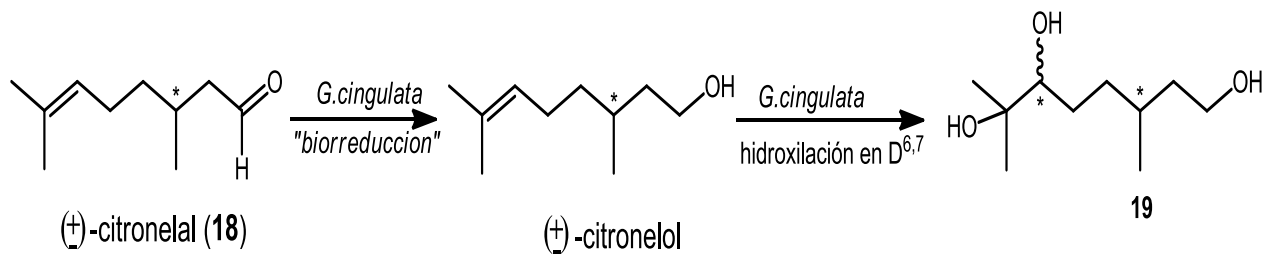


A: Hidroxilación, B: Hidrólisis del éster, C: Hidroxilación alílica

12: Acetato de (-)-dihidromircenilo, **13:** Dihidromircenol, **14:** Acetato de 3-hidroxi-dihidromircenilo, **15:** 3-hidroxi-dihidromircenol, **16:** 3,7-dimetil-octan-1,2,7-triol-7-carboxilato, **17:** 3,7-dimetil-octan-1,2,7-triol

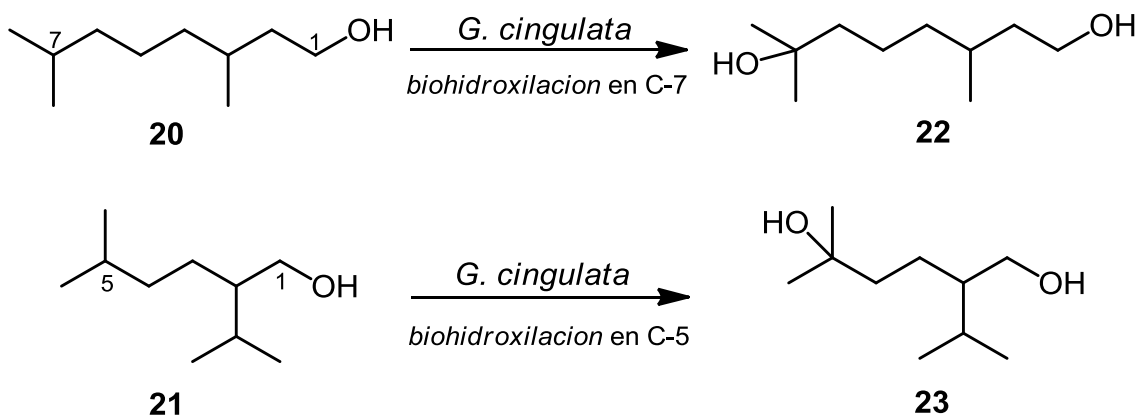
Esquema 4. Biotransformación del acetato de (-)-dihidromircenilo (**12**) con *G. cingulata*.

La biotransformación del (\pm)-citronelal (**18**) produjo una mezcla de diastereoisómeros del 3,7-dimetil-1, 6, 7-octano-triol (**19**), como se muestra en el esquema 5.



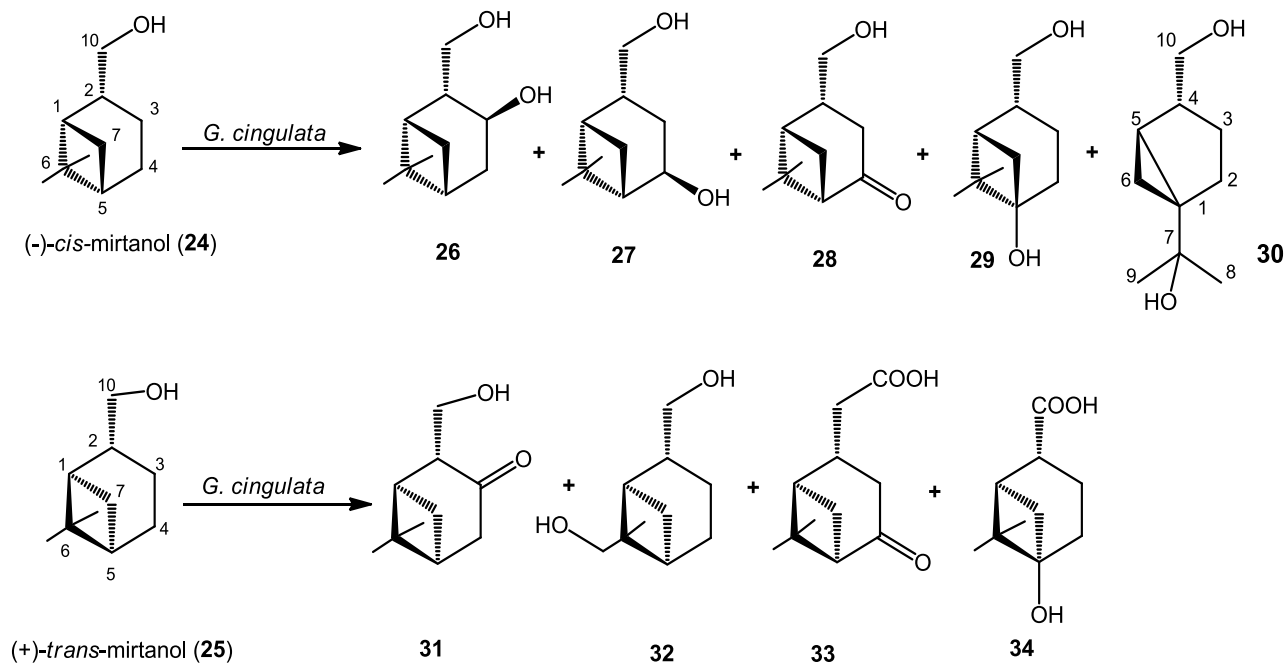
Esquema 5. Biotransformación del (\pm)-citronelal (**18**) con *G. cingulata*.

Por otro lado, en terpenoides acíclicos saturados fue hidroxilado principalmente el carbono terciario del grupo isopropilo más alejado de la función hidroxilo. Por ejemplo la biotransformación del tetrahydrogeraniol (**20**) y tetrahydrolavandulol (**21**) fueron biotransformados por *G. cingulata* mediante una oxidación *regioselectiva* en el grupo isopropilo. El principal compuesto aislado a partir de **20** fue el 7-hidroxitetrahydrocitronelol (**22**) mientras que en el producto principal obtenido a partir de **21** fue el alcohol 5-hidroxitetrahydrolavandulol (**23**), como se muestra en el esquema 6 [18].



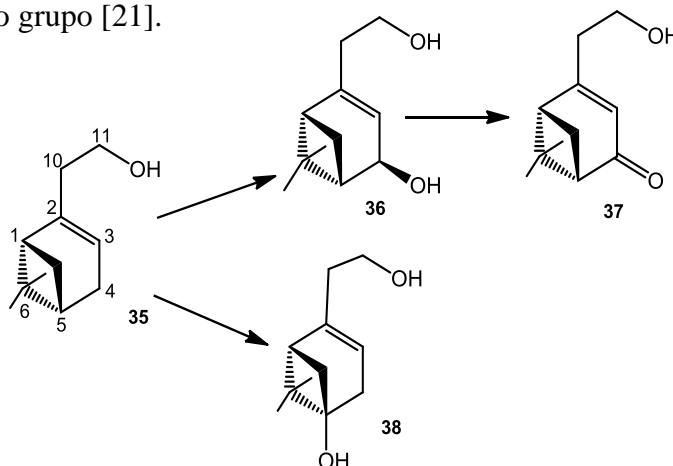
Esquema 6. Biotransformación del tetrahydrogeraniol (**20**) y tetrahydrolavandulol (**21**) con *G. cingulata*.

De la biotransformación de los diastereoisómeros (-)-*cis*-mirtanol (**24**) y (+)-*trans*-mirtanol (**25**) con *G. cingulata*, se observó la hidroxilación de los C-3 (**26**), C-4 (**27**) y C-5 (**28**); además de la oxidación del C-4 (**29**) y la identificación del [1*R*,4*R*,5*S*]-tujano-7,10-diol (**30**), de la biotransformación de **24**. Mientras que los productos de biotransformación del (+)-*trans*-mirtanol (**25**) fueron los productos de oxidación en C-3 (**31**), la oxidación en C-4 y C-10 (**33**), la hidroxilación en C-5 y la oxidación de C-10 para **34**, ver esquema 7 [20].



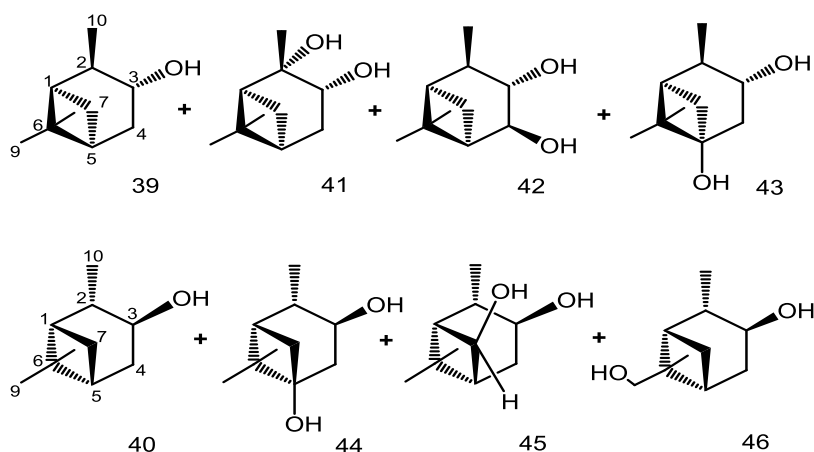
Esquema 7. Biotransformación del *cis* (**24**) y *trans*-mirtanol (**25**) por *G. cingulata* [19].

De la biotransformación del (-)-nopol (**35**) con *G. cingulata*, como se muestra en el esquema 8, se obtuvieron los compuestos **36-38** que corresponden a los productos de oxidación en C-4 para dar (4*R*)-(-)-4-hidroxi- y 4-oxo-nopol. La hidroxilación *enantioselectiva* es debido al impedimento estérico que ocasiona el grupo dimetilo en C-6, obligando al grupo hidroxilo que se incorpore por el lado opuesto a dicho grupo [21].



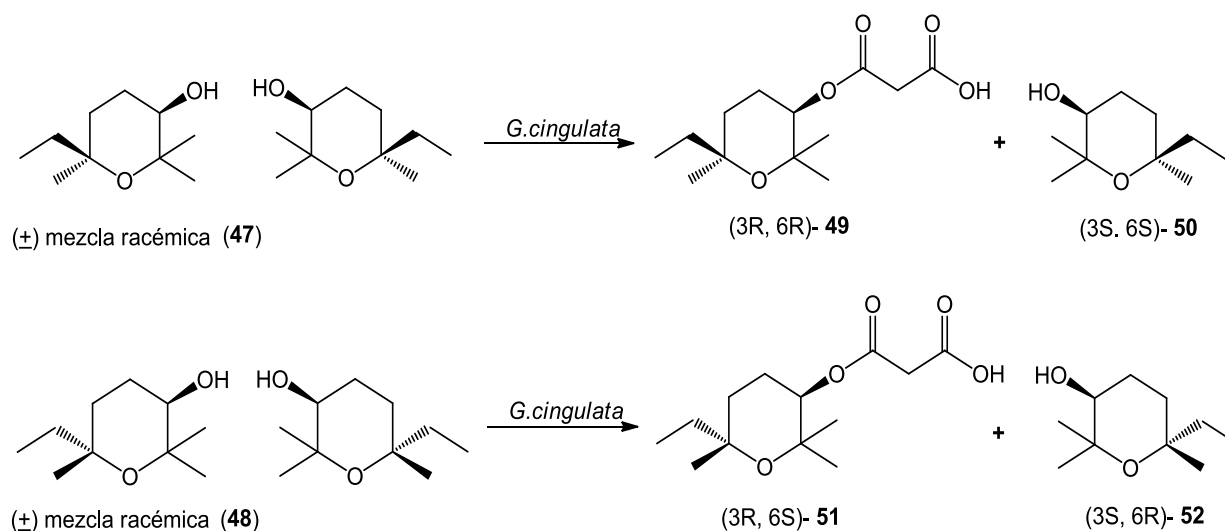
Esquema 8. Biotransformación del (-)-nopol (**35**) por *G. cingulata* [21].

La biotransformación del (-)-isopinocamfeol (**39**) y el (+)-isopinocamfeol (**40**) por *G. cingulata* condujo a la formación de tres dioles (pinanodiolos). A partir de **39** se obtuvieron los compuestos **41-43** y del compuesto **40** se obtuvieron de **44-46**. La biotransformación de **39** fue más rápida que la de **40**. El principal producto de **39** fue (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4-pinanodiol y de **40** fue (1*S*,2*S*,3*S*,5*R*,7*R*)-3,7-pinanodiol ver esquema 9 [22].



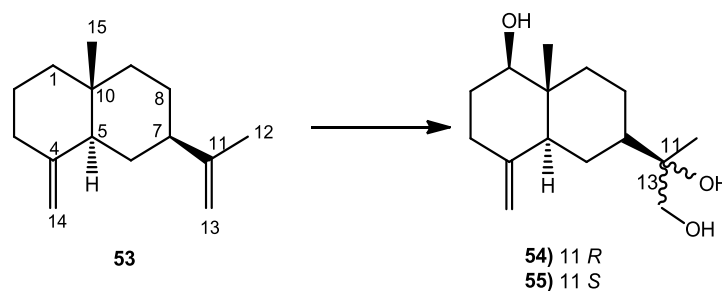
Esquema 9. Biotransformación de (-)-isopinocamfeol (**39**) y (+)-isopinocamfeol (**40**) con *G. cingulata* [22].

Se ha informado sobre la resolución racémica del óxido del *cis* (**47**) y *trans*-linalool-piranoilo (**48**), ver esquema 10, mediante la esterificación con ácido malónico en presencia de *G. cingulata*. Los ésteres malónicos **49** y **50**; así como **51** y **52** fueron obtenidos con un 100% y un 50% de rendimiento después de 24 horas de incubación. Los ésteres malónicos fueron formados a partir del ácido malónico biosintetizado por el microorganismo durante la biotransformación.



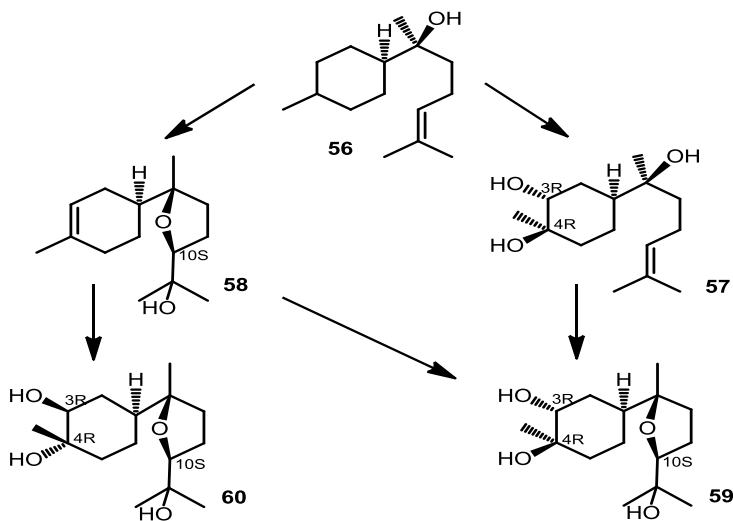
Esquema 10. Resolución de la mezcla racémica del óxido de linalool por medio de la esterificación microbiológica con *G. cingulata* [23].

De la biotransformación del β -selineno (**53**) con *G. cingulata*, se observó la oxidación *regioselectiva* de los C-11 y C-13 del grupo isopropilo en C-6, y la hidroxilación en C-1 para formar una mezcla diastereoisomérica de los trioles (1*S*,6*S*,9*S*,10*R*,11*R*)- (**54**), (1*S*,6*S*,9*S*,10*R*,11*S*)-1,11,13-trihidroxi- β -selineno (**55**), ver esquema 11 [24].



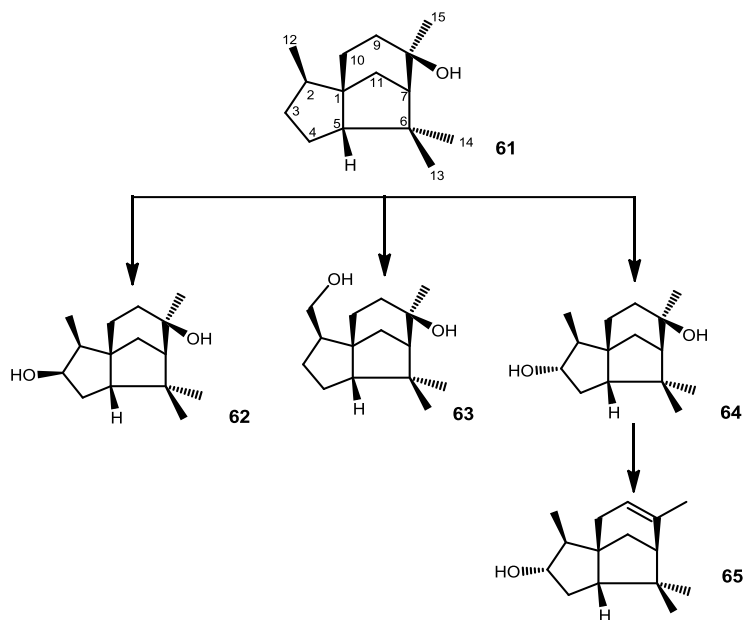
Esquema 11. Biotransformación del (-)- β -selineno (**53**) con *G. cingulata* [24].

La biotransformación del sesquiterpeno cíclico (-)- α -bisabolol (**56**) llevado a cabo con *G. cingulata* produjo los compuestos (1*S*,3*R*,4*R*,7*S*)-3,4-dihidroxi- α -bisabolol (**57**), el óxido B del bisabolol (**58**), óxido B del (1*R*,3*R*,4*R*,7*S*,10*S*)-3,4-dihidroxisabolol (**59**) y el óxido B (1*S*,3*S*,4*S*,7*S*,10*S*)-3,4-dihidroxisabolol (**60**), como se muestra en la esquema 12 [25].



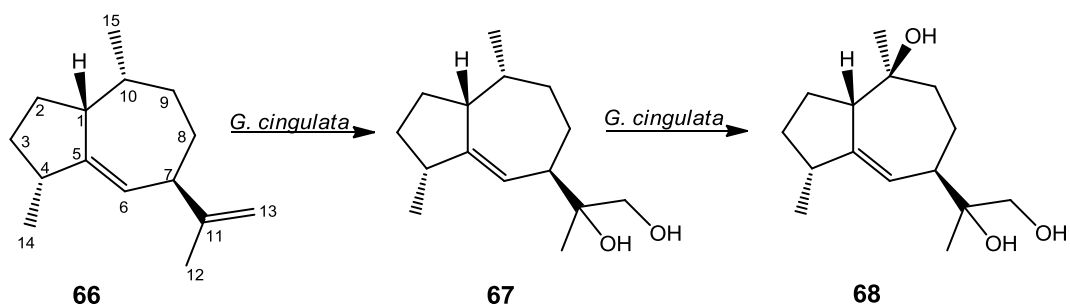
Esquema 12. Biotransformación del (-)- α bisabolol (**56**) con el hongo *G. cingulata*. [25].

En el esquema 13 se ilustra la biotransformación del (+)-cedrol (**61**), sesquiterpeno tricíclico, el cual ocurre vía una hidroxilación *estereoselectiva* en C-3 y C-12, para dar los compuestos **62-65** [26].



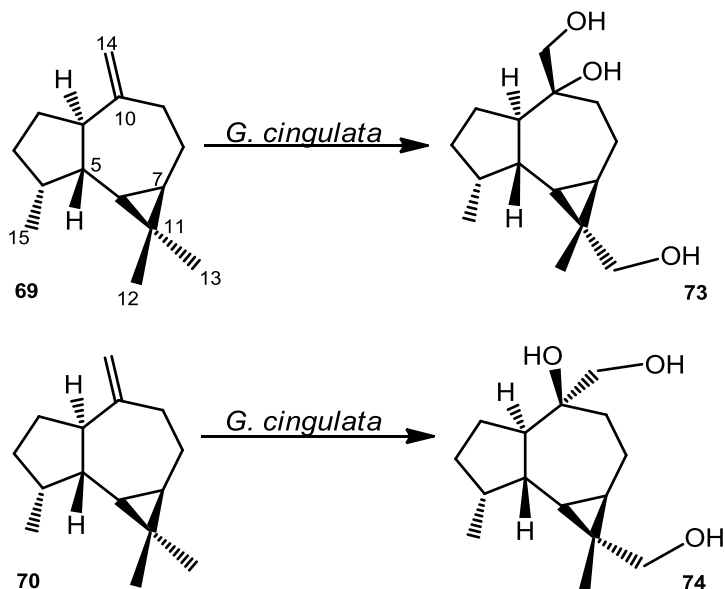
Esquema 13. Biotransformación de (+)-cedrol (**61**) con *G. cingulata* [26].

La biotransformación del (+)- γ -gurjumenol (**66**) por *G. cingulata*, produjo los productos de oxidación en las posiciones C-11 y C-13 de la doble ligadura presente en la cadena isopropílica. Para generar los compuestos (1*S*,4*S*,7*R*,10*R*)-5-guaien-11,13-diol (**67**). La biotransformación subsecuente de **67** permitió aislar el triol **68**, (1*S*,4*S*,7*R*,10*S*)-5-guaien-10,11,13-triol, dicha biotransformación se muestra en el esquema 14.



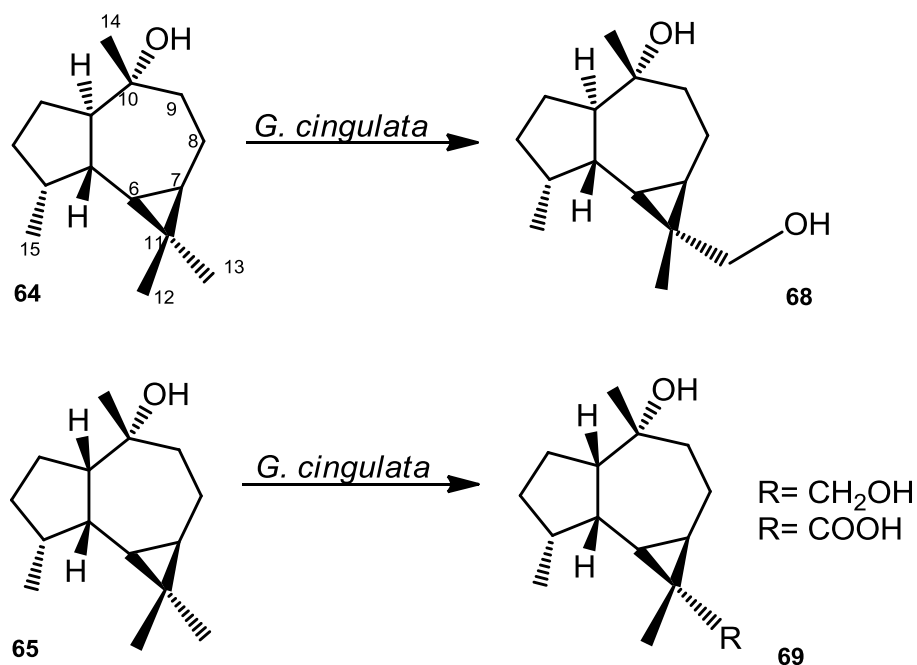
Esquema 14. Biotransformación del (+)- γ -gurjumenol (**66**) con *G. cingulata*. [27].

La biotransformación (+)-(1*R*)-aromadendrenol (**69**), (-)-(1*S*)-alloaromadendrenol (**70**) por *G. cingulata* [28], oxidó el doble enlace de C₁₀-C₁₄ y un grupo metilo geminal del ciclopropano para generar de manera *regioselectiva*, trioles hidroxilados en C-10, C-13 y C-14, como se muestra en el esquema 15, donde corresponden a los compuestos **73** y **74** respectivamente.



Esquema 15. Biotransformación de (+)-(1*R*)-aromadendrenol (**69**), (-)-(1*S*)-alloaromadendrenol (**70**).

Por otro lado, el (-)-globulol (**71**) y el (+)-ledol (**72**) fueron biotransformados por *G. cingulata*. De la biotransformación de **71**, se obtuvo un producto hidroxilado en C-13 (**75**), mientras que el (+)-ledol generó varios productos siendo el metabolito mayoritario el que contiene un grupo carboxilo en C-11 (**77**), además del producto de hidroxilación en C-13 (**76**) [29], ver esquema 16.



Esquema 16. Biotransformación del (-)- globulol (**71**) y (+)-ledol (**72**) por *G. cingulata* [28-29].

Justificación

La importancia económica del mango estriba en la alta demanda del consumo local que se realiza, se trata de una de las plantas más fructíferas de los países tropicales. Esta especie se cultiva en todos los países de Latinoamérica, siendo México uno de los principales países exportadores del mundo. El mango es consumido en gran parte en estado fresco, pero también puede ser utilizado para preparar otros productos. Actualmente se está empleando bastante en la industria farmacéutica, por su composición química y su alta concentración de vitaminas.

En la literatura se ha informado sobre la conservación del fruto mediante un pre-tratamiento por calor (38°C), antes de su almacenamiento a bajas (5°C) temperaturas. En caso contrario desarrollan daños por bajas temperaturas mucho más rápidamente.

Las técnicas actuales sobre conservación *post* cosecha de los frutos de mango tienden al control: de la humedad (>95%), aire caliente (47-49° C) y tratamientos con fungicidas en momentos puntuales para minimizar los daños causados por plagas y enfermedades. Algunos ensayos para controlar los ataques de insectos sobre mangos almacenados indican que la utilización de insecticidas en atmósferas con bajos niveles de oxígeno, controlan muy bien estas plagas, sin modificar las características organolépticas de los frutos y la aplicación de sustancias orgánicas sobre los mismos.

Colletotrichum gloeosporioides es el organismo patógeno *post* cosecha más importante en el mango y causante de la enfermedad denominada “antracnosis”.

Con base en lo anterior, una de las aplicaciones de las biotransformaciones en la agricultura es la obtención de biopesticidas⁶ — existen numerosos bioinsecticidas de origen vegetal, entre ellos podemos citar el piretro, rotenona, nicotina, aceites vegetales, entre otros— por lo que es importante conocer dos cuestiones con respecto al hongo —*C. gloeosporioides* — *i*) el tipo de fitoalexina que se produce, con la finalidad de conocer su estructura química y evaluar su

⁶ El término biopesticida se suele utilizar para los productos ocupados en el control de plagas, principalmente de la agricultura cuyo origen es procedente de algún organismo vivo.

actividad como agente anti-fúngico. *ii*) aislar al hongo del fruto del mango para poder utilizarlo como un biocatalizador.

Por lo tanto, en el presente proyecto se propone realizar el aislamiento y caracterización de la fitoalexina mayoritaria inducida por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en la fruta del mango —*Mangifera indica* L—. Así como, el aislamiento de dicho hongo, para su uso como biocatalizador en la biotransformación del óxido de cariofileno (**1**), isomentol (**2**) y mentol (**3**).

Planteamiento del problema

La antracnosis es una de las enfermedades más difundida y destructiva del follaje del mango y puede causar graves daños *post* cosecha. Es producida por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, que aparece en forma de manchas oscuras en las flores y hojas, las cuales se convierten en agujeros por destrucción de tejidos.

Una de las aplicaciones de la biotransformación en la industria de los agroquímicos es la obtención de biopesticidas de origen vegetal. Por lo cual, *i*) es importante conocer el tipo de fitoalexina que induce para conocer su estructura química y evaluar su actividad como agente anti-fúngico y *ii*) aislar al hongo del fruto del mango para poder utilizarlo como biocatalizador.

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se propone realizar el aislamiento y caracterización de la fitoalexina mayoritaria inducida por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en la fruta del mango —*Mangifera indica*—. Así como el aislamiento de dicho hongo, para su uso como biocatalizador en la biotransformación del óxido de cariofileno (**1**), isomentol (**2**) y mentol (**3**).

Hipótesis

Una de las aplicaciones de las biotransformaciones en la industria de los agroquímicos es en la producción de biopesticidas— piretro, la rotenona, la nicotina, aceites vegetales, entre otros— por lo que es importante *i*) conocer el tipo de fitoalexina (agente anti-fúngico) que induce y *ii*) aislar al hongo del fruto del mango para poder utilizarlo como un biocatalizador.

Entonces se podrá inducir la formación de las fitoalexinas por medio de una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y determinar la actividad antifúngica de dichas sustancias. Además del aislamiento del hongo para su posterior uso como biocatalizador del óxido de cariofileno (**1**), isomentol (**2**) y mentol (**3**).

Objetivos

6.1 Objetivo General

Realizar el aislamiento y caracterización de la fitoalexina mayoritaria producida por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* L en el fruto del mango —*Mangifera indica* L—. Así como el aislamiento de dicho hongo, para su uso como biocatalizador en la biotransformación del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3).

6.2 Objetivos Particulares.

- Revisión bibliográfica sobre *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. y su utilidad como biocatalizador.
- Aislamiento, caracterización e identificación de las fitoalexinas mayoritarias, inducidas por la presencia de *C. gloeosporioides* en el fruto del mango, empleando técnicas de separación y extracción.
- Caracterización e identificación por técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Aislamiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* L, a partir del epicarpio del fruto del mango.
- Determinar la factibilidad de biotransformación del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3) por parte del hongo *C. gloeosporioides*.
- Biotransformación de los compuestos: óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3) con *C. gloeosporioides*, de acuerdo con los resultados del punto 6.1.5.
- Aislar, caracterizar e identificar los productos obtenidos de la biotransformación del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3).
- Análisis de resultados

Metodología

7.1. Aislamiento, caracterización e identificación de la (s) fitoalexina (s), inducida (s) en el mango por la presencia de *C. gloeosporioides*.

A partir de 5 kg de mango manila infectado por el hongo (presencia de coloración oscura, en el fruto en más de 70%), se procedió a la separación del epicarpio y el mesocarpio de dicho fruto. A los cuales, se les realizó una extracción sól-líquido (maceración) durante 92 h, con CH_2Cl_2 . La fase orgánica resultante se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y el exceso de disolvente se eliminó a baja presión.

Por otro lado, se separaron el mesocarpio (3 Kg) y epicarpio (1 Kg) con menos de un 20% de coloración oscura, se les agregó una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1M) en Tween 20 (0.5%) [29]. Después de 92 h de reposo en dicha solución, se realizó una extracción sól-líquido con CH_2Cl_2 , la fase orgánica resultante se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a baja presión, ver diagrama 1.

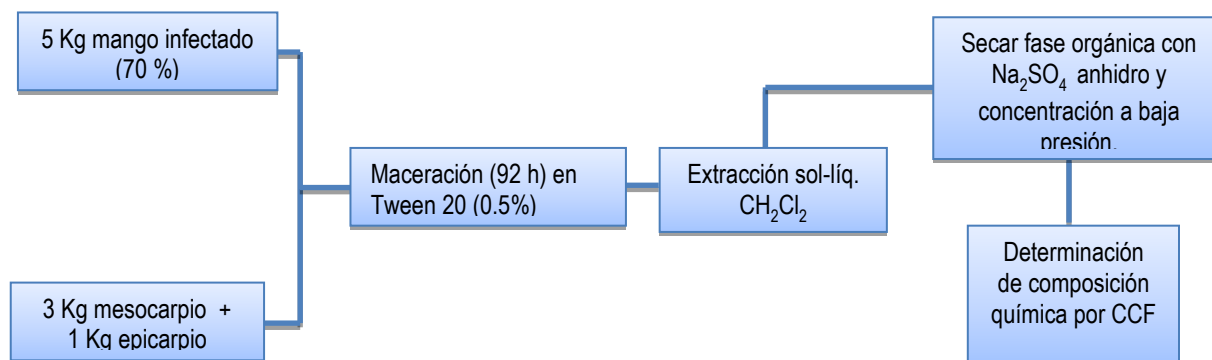


Diagrama 1. Obtención del extracto CH_2Cl_2 del mesocarpio y epicarpio del mango infectado.

7.2 Extracción de la mezcla de productos de los extractos diclorometánicos.

Una vez obtenidos los residuos orgánicos a partir de mesocarpio y epicarpio de mango infectado y mango tratado con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1M), se determinó la composición química de ambos extractos en CCF con una mezcla de elusión $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9.5:0.5), ver figura 2, comparándolos contra un extracto de epicarpio y mesocarpio de mango no infectado (blanco de mesocarpio y epicarpio).

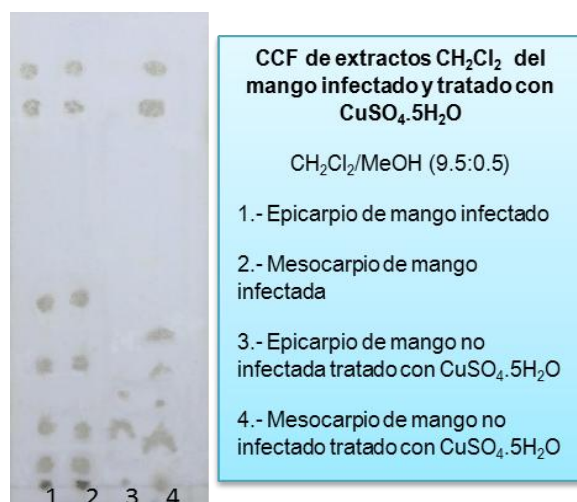


Figura 2. CCF correspondiente a los extractos CH_2Cl_2 de *M. indica* L., no infectado y del tratado con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

7.2.1 Separación cromatográfica del extracto diclorometánico (CH_2Cl_2) del epicarpio sano de *Mangifera indica* L.

El residuo orgánico 388.8 mg, se adsorbió en 655.2 mg de SiO_2 gel y posteriormente se aplicó en una columna de vidrio empacada con 2.8481g de SiO_2 gel para CCF. En la figura 3, se muestra la cromatografía en columna a vacío (CCV) [30], utilizada para la separación cromatográfica del residuo orgánico (CH_2Cl_2) del epicarpio sano. El desarrollo cromatográfico se logró empleando como eluyente mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente.

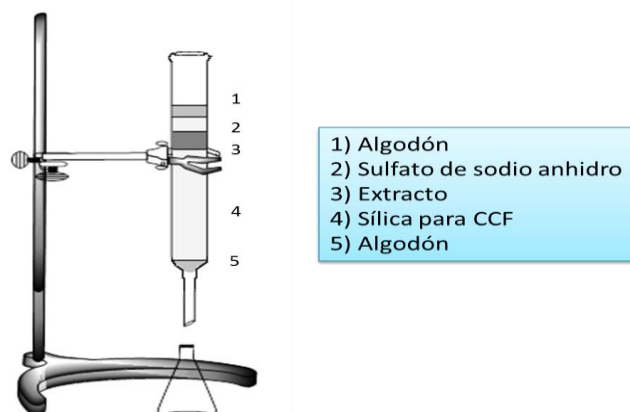


Figura 3. CCV desarrollada para la separación cromatográfica del residuo orgánico de la epicarpio sano. [30]

De las fracciones obtenidas con n- hexano/AcOEt (9:1) se obtuvieron las fracciones 38-49, 55-61, como se ilustra en la figura 4, las cuales muestran ser una mezcla de productos que por su bajo rendimiento, no pudieron ser sujetos de un análisis espectroscópico más minucioso. Sin embargo, a continuación se enlistan los datos de IR, para algunas fracciones:

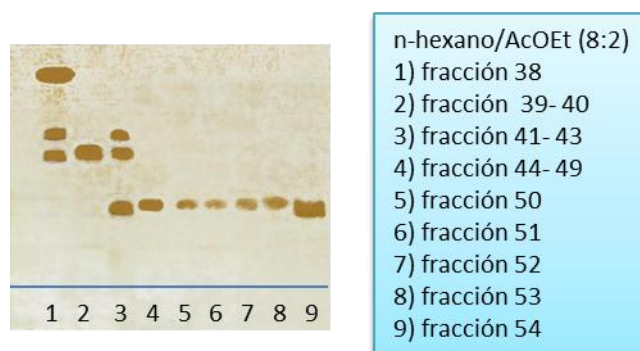


Figura 4. CCF con algunas fracciones del residuo CH_2Cl_2 del epicarpio sano de *Mangifera indica* L.

Fracción 38: IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx.}}$: 2928, 2855, 1734, 1464, 1232, 1201, 1169, 1114 cm^{-1}

Fracción 39-40: IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx.}}$: 2927, 2855, 1997, 1714, 1463, 1353, 1114, 973 cm^{-1}

Fracción 41-43: IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx.}}$: 3037, 3022, 3005, 2974, 2927, 2855, 1726, 1465, 1206, 1046 cm^{-1} .

Fracción 44-49: IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx.}}$: 3037, 3022, 2928, 2855, 1731, 1465, 1206 cm^{-1}

Fracción 55-57: IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$: 3313, 3032, 2928, 2855, 1725, 1601, 1465 cm⁻¹

Fracción 58-61: IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$: 3037, 3004, 2975, 2928, 1527, 1515, 1426 cm⁻¹

Fracción 62-66: IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$: 3776, 3024, 3020, 3004, 2974, 2928, 1521, 1475 cm⁻¹

7.2.2 Separación cromatográfica del extracto diclorometánico (CH₂Cl₂) del epicarpio infectado de *Mangifera indica* L.

El residuo orgánico (2.1809 g del extracto), se adsorbió en (3.2713 g de SiO₂ gel) y posteriormente se aplicó en una columna de vidrio previamente empacada con 2.9652 g de SiO₂ gel para CCF, y empleando como eluyente mezclas de n-hexano/AcOEt de polaridad creciente.

Fracción 69-88: IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$: 3523, 2927, 2855, 1734, 1465, 1378, 1261 cm⁻¹.

7.3 Obtención del extracto metanólico del fruto de *Mangifera indica* L.

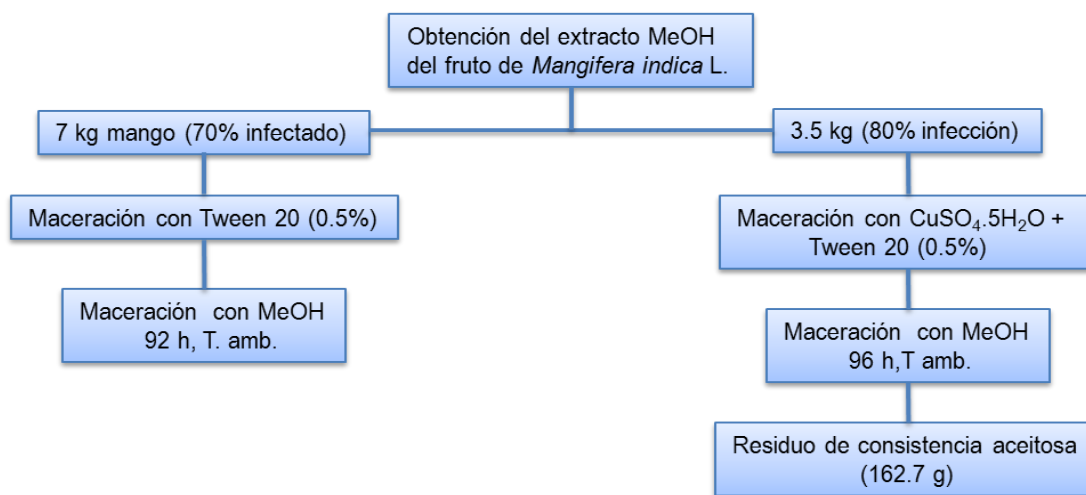


Diagrama 2. Obtención del extracto metanólico de *M. indica* L.

A partir de 7 kg de mango manila infectado por el hongo (aproximadamente 40%), se realizó la separación del epicarpio (1 Kg) y mesocarpio (3 Kg) del fruto, dichos residuos se pusieron

en maceración con una solución de Tween 20 (0.5%) por 92 h. Posteriormente, se realizó una filtración, para separar la materia orgánica de la fase líquida. A la materia orgánica se le realizó una extracción sól-líquido con MeOH a temperatura ambiente.

A partir de 3.5 kg de mango infectado (80% de coloración oscura) se le agregó una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1M) en Tween 20 (0.5%) durante 92 h. Una vez transcurrido el tiempo, se realizó una extracción sól-líquido con MeOH. La fase metanólica obtenida se concentró a baja presión, obteniendo 162.7 g de un residuo aceitoso de color café, el cual se disolvió en 700 mL de H_2O .

A la fase acuosa se le realizó una extracción líquido-líquido con AcOEt (5 x 50 mL), seguido de una extracción líquido-líquido con acetona (3 x 50 mL) y n-butanol (2 x 70 mL). Los residuos orgánicos con AcOEt (**A**) y acetónico (**B**) se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a baja presión. Obteniéndose 31.32 g (**A**) y 16.35 g (**B**) respectivamente, ver diagrama 3.

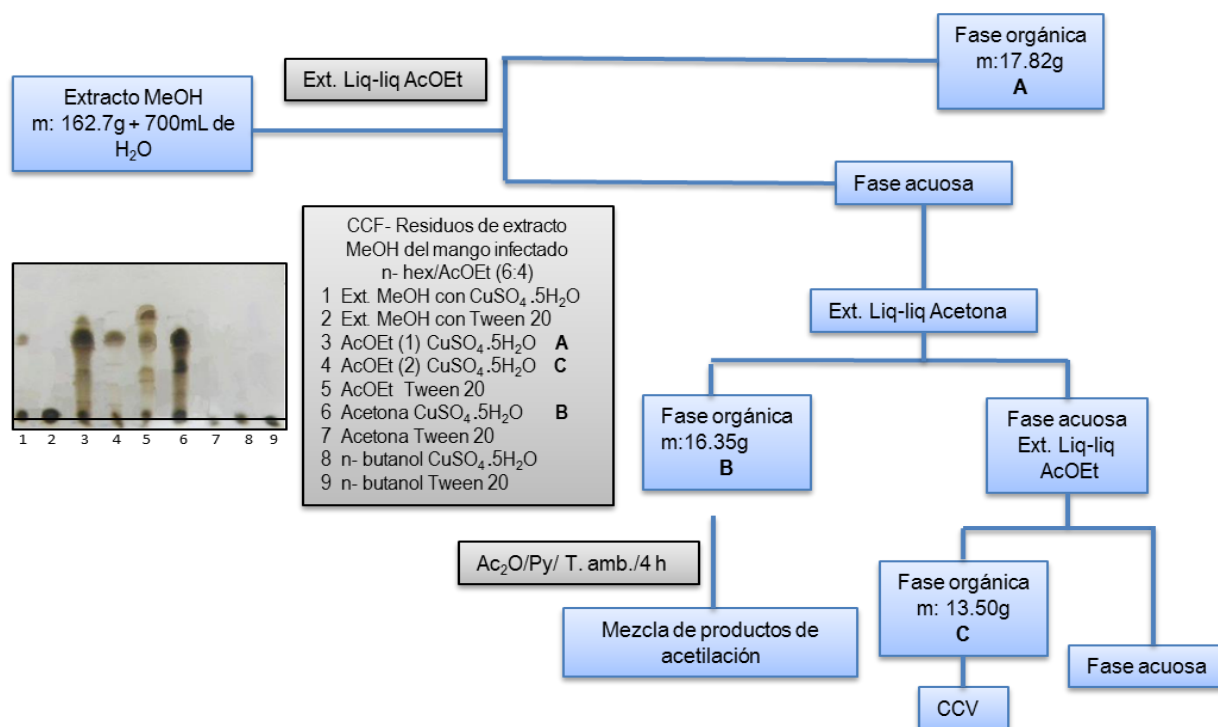


Diagrama 3. Obtención de los residuos con AcOEt (**A**) y acetona (**B**), a partir del extracto “crudo” MeOH de *Mangifera indica* L

7.3.1 Acetilación de la mezcla de productos obtenida con Acetona a partir del extracto MeOH.

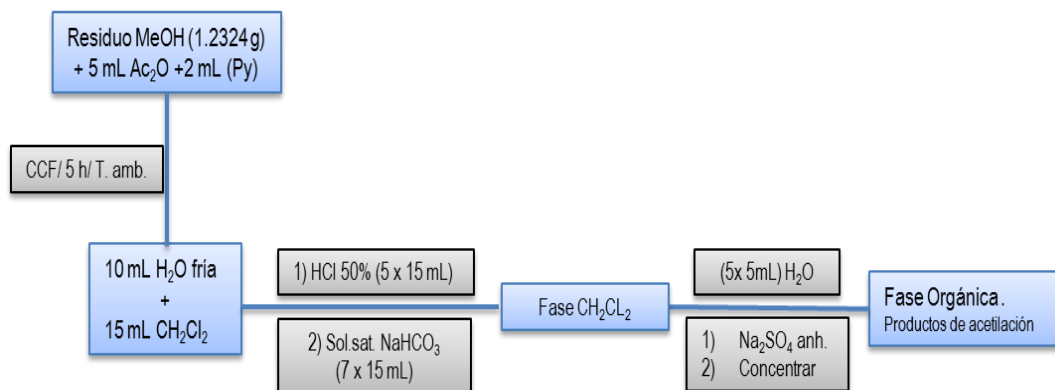
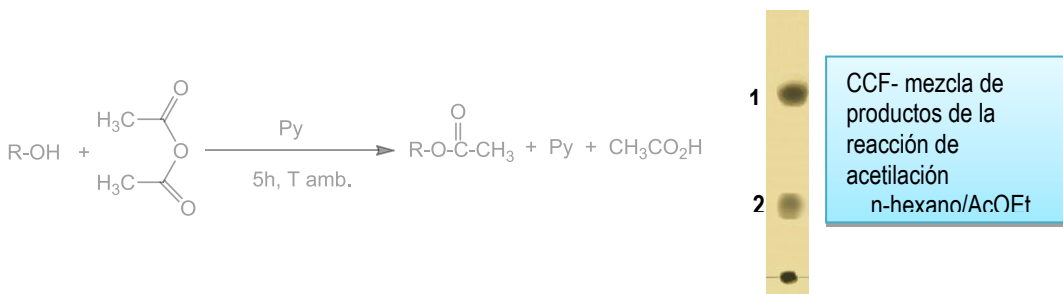


Diagrama 4. Acetilación de la mezcla del residuo **B** del extracto MeOH.

Una alícuota (1.2334 g) del residuo obtenido con acetona a partir del extracto MeOH, se disolvió en Ac₂O (5 mL) y se agregaron 2 mL de Py a temperatura ambiente, siguiendo el curso de la reacción por CCF. Después de 5 h se procedió a la obtención de la mezcla de productos de acetilación, ver diagrama 4. Para la recuperación de los productos, se adicionaron 10 mL de H₂O fría y 15 mL de CH₂Cl₂, la fase orgánica resultante se trató con una solución de HCl al 50% (5x15 mL) hasta eliminar el exceso de Py (pH≈0) en forma de clorhidrato de piridinio, el exceso de ácido en la fase orgánica se eliminó con una solución sobresaturada de NaHCO₃ (7x15 mL), y cualquier exceso de reactivo presente en el medio, se eliminó al lavarlo con H₂O (5x15 mL). Posteriormente la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, obteniéndose 257.3 mg de residuo (20.86%) ver esquema 17.



Esquema 17. CCF de la mezcla de los productos de reacción de acetilación del residuo acetónico **B**, obtenido a partir del extracto MeOH.

7.3.2 Separación cromatográfica del residuo con AcOEt (C) obtenido a partir del extracto MeOH.

El residuo obtenido con AcOEt (13.5 g) del extracto metanólico fue adsorbido en 5 g de sílica-gel para CCF, los cuales fueron posteriormente aplicados en una columna de vidrio (d= 2.6 cm) y como fase estacionaria 27.9 g de SiO₂ gel para CC-Flash. La separación cromatográfica se realizó con mezclas de n- hexano/AcOEt de polaridad creciente.

De las fracciones 151-211, obtenidas con una mezcla de n-hex/AcOEt (85:15) se separó un residuo aceitoso de color amarillento, el cual presenta un R_f de 0.27 [hex/AcOEt (1:1)] y 0.36 [CH₂Cl₂/MeOH (9.5:0.5)], ver figura 5.

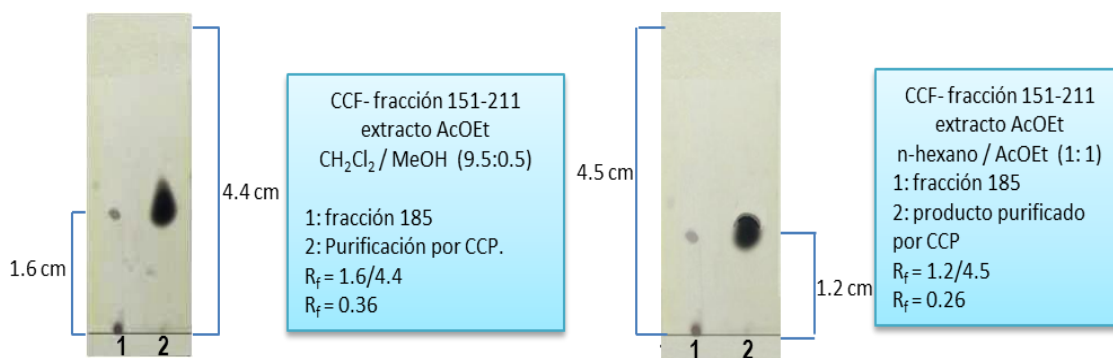


Figura 5. Valores de R_f para la sustancia mayoritaria presente en las fracciones 151-211.

Fracción 185: IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3381, 2926, 1718, 1673, 1522, 1399, 1340, 1194 cm⁻¹.

7.4 Aislamiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*⁷ en el fruto de *Mangifera indica* L.

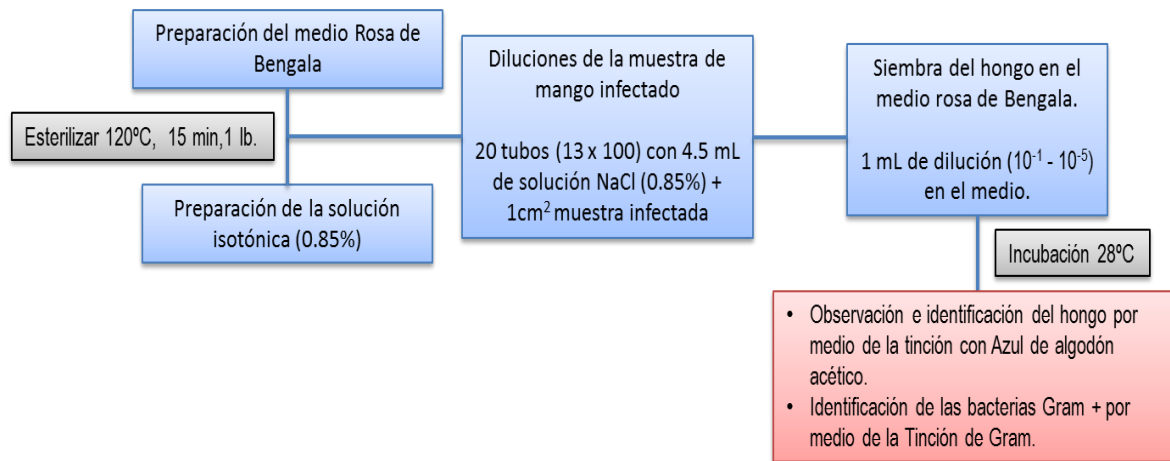


Diagrama 5. Aislamiento e identificación del hongo y bacterias presentes en el fruto infectado de *M. indica* L.

Preparación de una solución salina de NaCl (0.85%)

Se preparó una solución salina al 0.85% de NaCl y se vertieron 4.5 mL de solución en veinticinco tubos de ensayo (13 x 100). Se esterilizaron a 11b de presión, 120°C por 15 minutos.

Preparación del medio Rosa de Bengala

Se prepararon 220 mL del medio Rosa de Bengala, el cual presenta la siguiente composición: Rosa de bengala (0.035 g), KH₂PO₄ (1g), MgSO₄ (0.5 g), fitona (5.0 g), glucosa (10 g), agar (20 g), en 1 L de agua destilada. Se esterilizó a 120°C, 15 min a 1 lb.

Siembra del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.

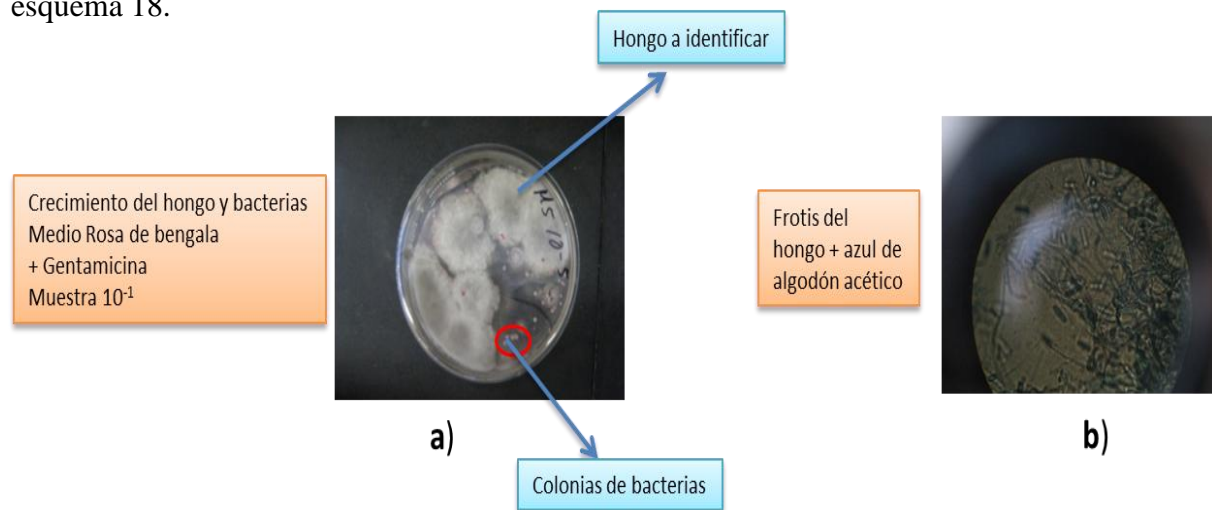
Se realizaron 5 diluciones de 10⁻¹ hasta 10⁻⁵ de la muestra de mango infectado (1cm²) por *C. gloeosporioides*, esta operación se repitió cinco veces a partir de diferentes partes del mango infectado.

⁷ Laboratorio L-313 Microbiología Farmacéutica de la FES-Zaragoza

De cada dilución se tomó 1 mL y se vertió en 9 cajas Petri con medio Rosa de Bengala, el cual contenía gentamicina como agente inhibidor bacteriano y se incubó a 28°C.

Observación e identificación del crecimiento fúngico.

A partir de las cinco cajas Petri que mostraron un mayor crecimiento de micelio y algunas colonias de bacterias, se realizaron diferentes frotis con la finalidad de identificar al hongo⁸ —hifas, esporangios, esporas— y las bacterias como Gram positivas y Gram negativas, ver esquema 18.

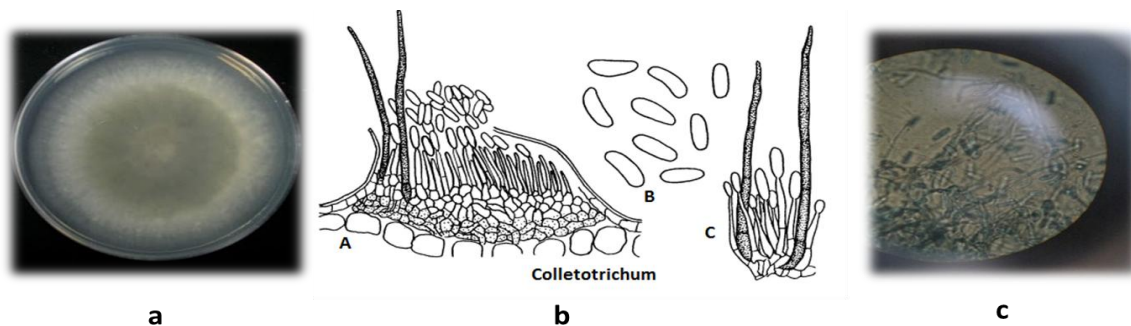


Esquema 18. a) Crecimiento del hongo y bacterias aisladas del fruto de *M. indica* L., b) Cepa de *C. gloeosporioides*.⁹

En el esquema 19(c) se muestra la fotografía obtenida del aislamiento de los microorganismos presentes en el fruto del mango. Observándose una morfología diferente al descrito en la literatura y lo cual sirvió como referencia en la identificación del hongo objeto de este estudio [32]. Además se comparó con la cepa de referencia donada por el Laboratorio de Fitopatología del Colegio de *Post* graduados.

⁸ Composición del azul de algodón acético (azul de algodón 0.5g, Ácido Acético 3mL, H₂O destilada 97mL) para la identificación de los hongos.

⁹ Cepa de *C. gloeosporioides* donada por el Dr. José Antonio Mora Aguilera del laboratorio del Colegio de *Post* graduados de la UACH.



Esquema 19. a) Ceca del hongo de referencia, b) Esquema de la morfología de *Colletotrichum*: acérvulos (A), conidiosporas (B), conidias (C), c) Ceca del hongo aislado.

7.5 Factibilidad de bioconversión del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3).

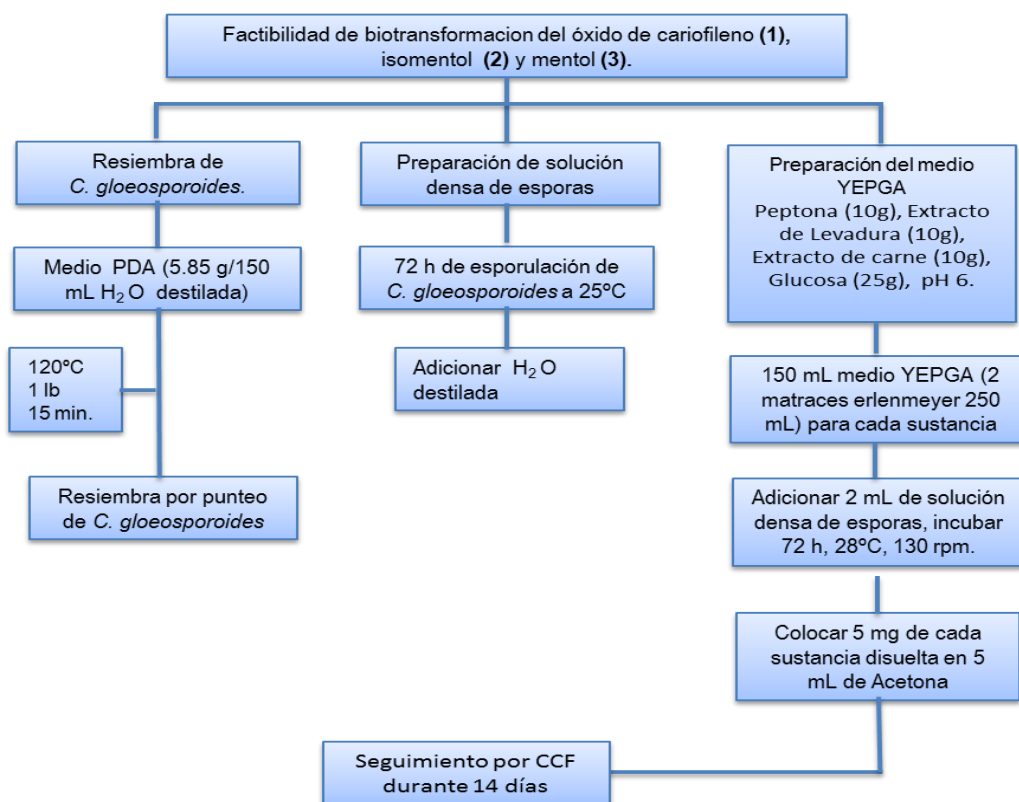


Diagrama 6. Factibilidad de bioconversión de óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3) con *C. gloeosporioides*.

Resiembra de *Colletotrichum gloeosporioides*¹⁰

Se disolvieron 5.85 g de medio PDA en 150 mL de agua destilada, los cuales se repartieron en 15 matraces erlenmeyer (25 mL), para posteriormente esterilizarlos a 120°C, 1 lb, 15 min. Una vez solidificado el medio se procedió a la resiembra del hongo a estudiar.

Preparación de la solución densa de esporas

Después de 72 h de esporulación de *C. gloeosporioides* se adicionaron 10 mL de agua destilada previamente esterilizada.

Factibilidad de la biotransformación del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3).

Para determinar la capacidad de biotransformación de *C. gloeosporioides* Penz., frente al óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3). Se procedió de la siguiente manera: A 2 matraces erlenmeyer de 250 mL (150 mL de medio YEPGA) para cada sustancia, fueron inoculados con 2 mL¹¹ de una solución densa de esporas y se incubaron por 72 h, a 28°C y 130 rpm. Transcurridas las 72 h de incubación se procedió a adicionar las sustancias (5 mg) a biotransformar disueltas en 5 mL de acetona grado analítico. Asimismo, se emplearon 2 matraces de blanco del hongo, blanco del medio, y blanco de cada sustancia y se incubaron a 28°C y 130 rpm. La factibilidad de biotransformación se siguió por medio de CCF durante 14 días. La utilización de los diferentes blancos fue para eliminar cualquier fuente de error e identificación de algún compuesto que no fuera producto de biotransformación de las sustancias a ensayar.

Una vez transcurrido los 14 días de biotransformación de los compuestos objeto de estudio, se procedió a la recuperación de la mezcla de productos de bioconversión; para lo cual, se llevó a cabo la separación de la biomasa de la fase líquida por medio de una filtración a vacío. La biomasa fue tratada con AcOEt por medio de una extracción sól-líq, la fase resultante fue secada con Na₂SO₄ anhidro y concentrada a baja presión.

¹⁰Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Post graduados de la Universidad Autónoma de Chapingo.

¹¹ Dos mililitros (2 mL) de la solución densa de esporas contenían 2 x 10⁶ esporas.

Por otro lado, la fase acuosa fue extraída de manera discontinua con CH_2Cl_2 (5 x 30 mL) —extracción líq-líq—, el volumen total fue secado con Na_2SO_4 anhidro y el exceso de disolvente se eliminó por medio del rotavapor, ver diagrama 7.

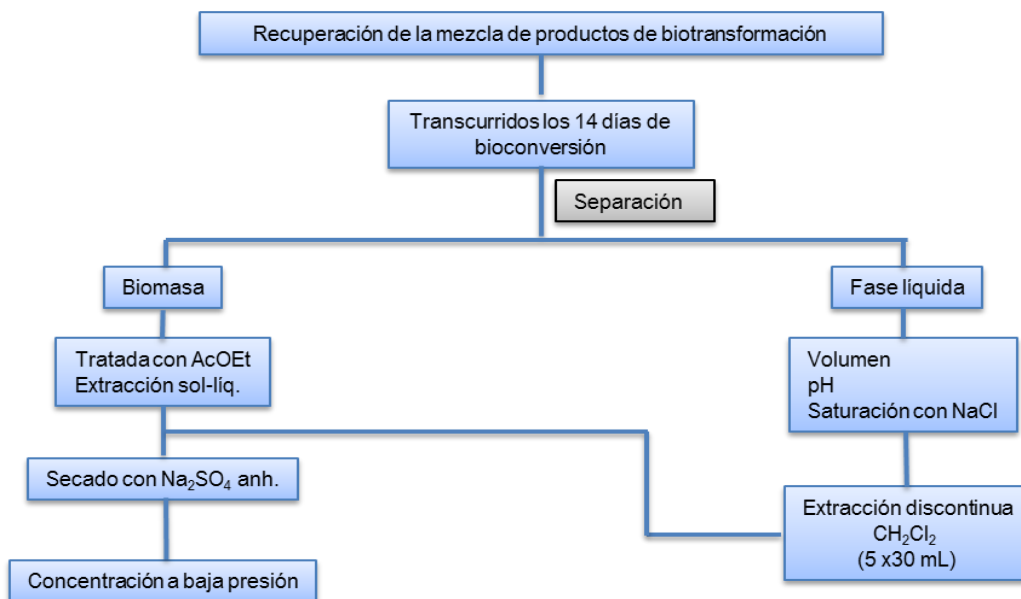


Diagrama 7. Separación y extracción de la mezcla de bioconversión.

En la figura 6 se muestran las cromatoplasmas (CCF) de la mezcla de productos de bioconversión del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3).

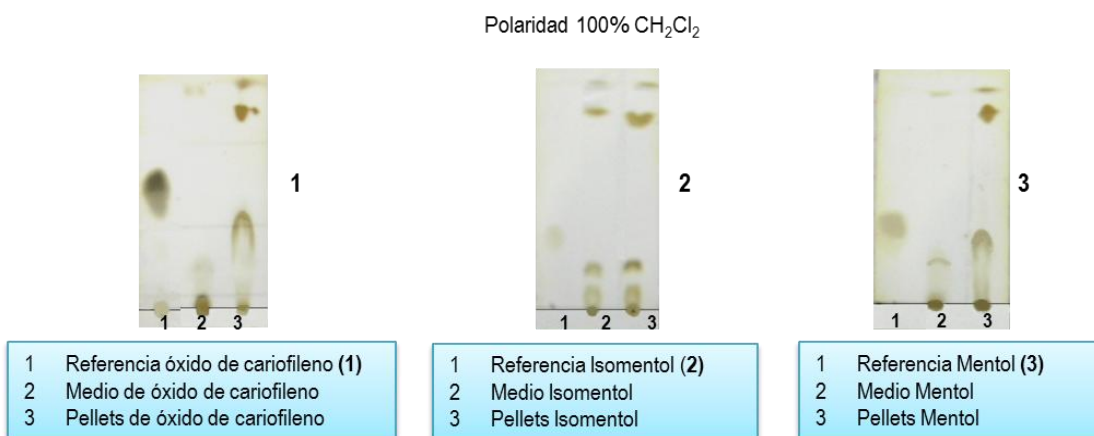


Figura 6. Cromatoplasmas (CCF) de las mezclas de productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3).

7.6 Biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (1) con *C. gloeosporioides*.

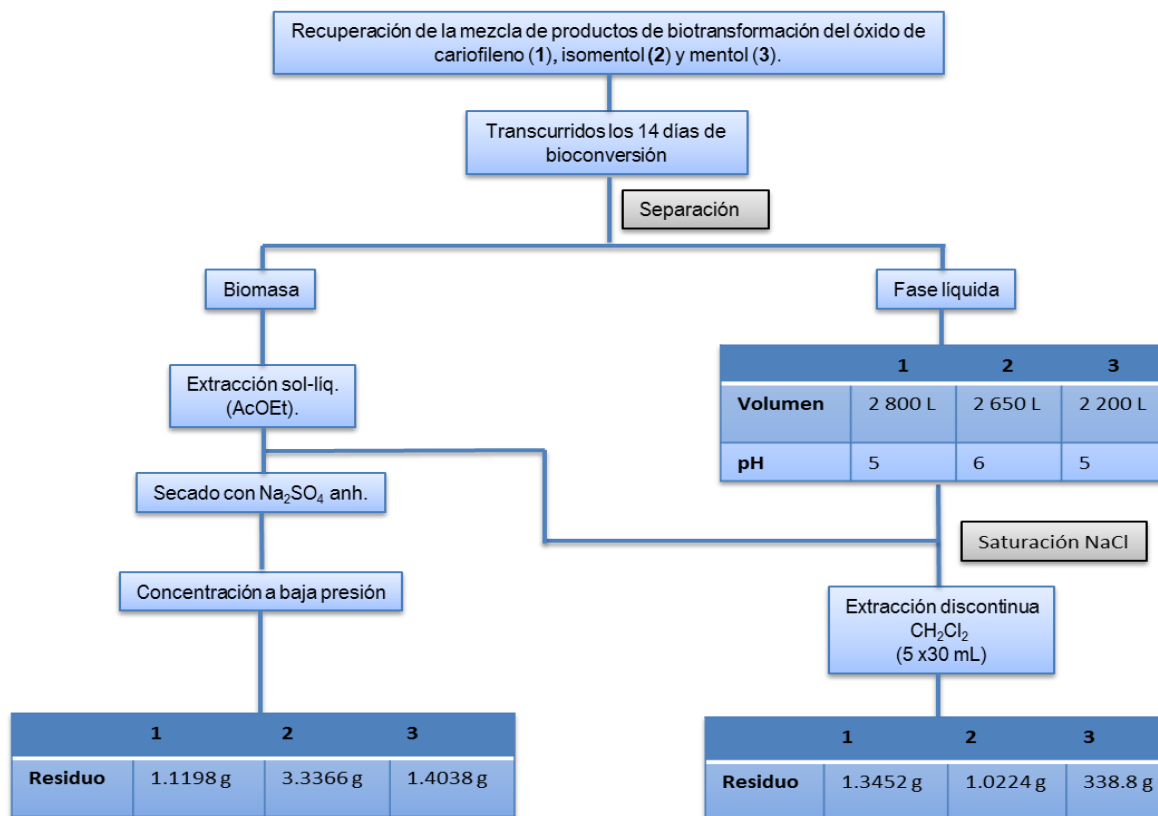


Diagrama 8. Recuperación de la mezcla de productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3) con *C. gloeosporioides*.

En 19 matraces erlenmeyer de 250 mL (125 mL de medio YEPGA) fueron inoculados con 2 mL de una solución densa de esporas de *C. gloeosporioides*, después de 96 h de incubación, se adicionaron 403.2 mg de óxido de cariofileno (1) en la mínima cantidad de Acetona. El curso de la biotransformación se siguió por CCF, empleando una mezcla de hex/AcOEt (7:3); transcurridos los 14 días de incubación, se procedió a realizar la recuperación de la mezcla de los productos de biotransformación. Los productos de biotransformación presentes en el medio de cultivo líquido, fueron recuperados por extracción líq-líq con CH₂Cl₂, obteniéndose 587.5 mg de un residuo de color café, ver diagrama 8. El residuo fue adsorbido en 881.25 mg de SiO₂ gel para CC-Flash.

La separación cromatográfica de la mezcla de productos de biotransformación, se realizó por medio de CC-Flash, empleando como eluyente mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente. De la separación cromatográfica se obtuvieron dos compuestos mayoritarios, ver figura 7.

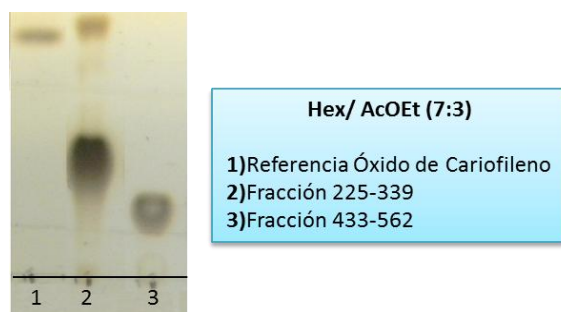


Figura 7. CCF de los compuestos obtenidos de la biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (**1**) con *C. gloeosporioides*.

De la fracción 225-339 obtenidas con hex/AcOEt (8:2) se obtuvo un compuesto de consistencia aceitosa de color amarillo 22.7 mg (5.62 %), soluble en CH_2Cl_2 , CHCl_3 , AcOEt. Con $R_f = 0.53$ [hex/AcOEt (3:7)] y 0.30 [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9.8: 0.2)], con pf. 115-117°C, el cual fue identificado como el 4,5-epoxi-carofileno-8(13)-en-14-ol (**94**) con base en sus propiedades espectroscópicas.

IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx.}}$ (cm^{-1}): 3428, 3067, 2930, 2862, 1715, 1630, 1455, 1384, 1339, 1258.

EM (IE) m/z (% rel.): 256 (1), 250 (9), 221 (4), 205 (11), 202 (10), 161 (20), 147 (29), 121 (38), 79 (84), 67 (40), 43 (61), 93 (100).

RMN¹³C (CDCl_3): δ 45.1 (C-1), 27.8 (C-2), 39.0 (C-3), 59.7 (C-4), 63.7 (C-5), 30.1 (C-6), 30.1 (C-7), 151.7 (C-8), 48.2 (C-9), 34.1 (C-10), 38.6 (C-11), 17.0 (C-12), 113.1 (C-13), 70.8 (C-14), 17.0 (C-15).

De la fracción 433-562 obtenida con mezclas de hex/AcOEt (8:2 a 7:3) se obtuvo un sólido amarillo claro 32.1 mg (7.96 %), soluble en *i*-Pr₂O, MeOH a temperatura ambiente e insoluble en *n*-hexano. Con $R_f = 0.35$ [hex/AcOEt (3:7)] y 0.46 [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1)], el cual se identificó como el 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-carofileno (**98**), por medio de la comprobación de sus propiedades espectroscópicas con las informadas en la literatura.

IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx.}}$ (cm^{-1}): 3557, 3481, 3449, 3381, 3286, 2950, 2927, 2858, 1455, 1386.

EM (IE) m/z (% rel.): 250 (2), 237 (7), 223 (69), 205 (37), 187 (32), 167 (26), 149 (59), 135 (81), 111 (64), 95 (93), 107 (100).

RMN¹³C (Py): δ 49.8 (C-1), 28.6 (C-2), 41.3 (C-3), 58.9 (C-4), 61.3 (C-5), 25.7 (C-6), 33.7 (C-7), 74.0 (C-8), 46.2 (C-9), 35.6 (C-10), 33.2 (C-11), 16.5 (C-12), 69.8 (C-13), 29.5 (C-14), 22.7 (C-15).

RMN¹H (Py): δ 2.25 (*m*, 1H, H-1), 1.60 (*m*, 1H, H-2_a), 1.47 (*m*, 1H, H-2_b), 1.16 (*ddd*, J=12.0, 12.0, 4.0, 1H, H-3 α), 2.09 (*m*, 1H, H-3 β), 3.76 (*m*, 1H, H-5), 2.59 (*m*, 1H, H-6a), 1.47 (*m*, 1H, H-6b), 2.59 (*m*, 1H, H-7a), 1.69 (*m*, 1H, H-7b), 2.25 (*m*, 1H, H-9), 2.09 (*m*, 1H, H-10a), 1.69 (*m*, 1H, H-10b), 1.35 (*s*, 1H, H-12), 3.72 (*d*, J= 10.0, 1H, H-13), 3.64 (*d*, J= 10.0, 1H- H-13), 0.94 (*s*, 1H, H-14), 0.97 (*s*, 1H, H-15).

7.7 Reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (1).

A una solución de **1** (100.4 mg) en 10 mL de CH₂Cl₂, se le adicionaron 220.9 mg de AMCPB a temperatura ambiente. El curso de la reacción siguió por CCF empleando como eluyente mezclas de n-hexano/AcOEt (9:1).

Transcurridos 10 min de la reacción se procedió a añadir 0.5 mL de Py disuelta en 5 mL de CH₂Cl₂.

Después de transcurridas 68 horas se dio por concluida la reacción, adicionando 5 mL de una solución de Na₂SO₃ al 10%. La fase orgánica resultante se trató (5 x 5 mL) con la misma solución, para eliminar el AMCPB presente en la reacción.

La fase orgánica se lavó posteriormente con una solución de HCl (10%). La fase CH₂Cl₂ fue tratada con una solución de NaHCO₃ saturada (3 x 5 mL) y finalmente se lavó con H₂O (3 x 5 mL). Posteriormente se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a baja presión.

Para obtener una mayor cantidad de producto, se procedió a realizar la reacción con una mayor cantidad de óxido de cariofileno (**1**, 300.3 mg), el cual se disolvió en 10 mL de CH₂Cl₂. A la mezcla de reacción se le adicionó 631 mg de AMCPB. Después de 9:10 h se adicionaron 0.5 mL de Py. El curso de la reacción se siguió por CCF empleando como eluyente mezclas de n-hexano/ AcOEt (8:2).

Después de 31:30 h se procedió a detener el curso de la reacción mediante la adición de 10 mL de una solución de Na₂SO₃ al 10%. La fase orgánica resultante se trató con la misma solución

(5 x 5 mL) para transformar el exceso de AMCPB a ácido m-cloro benzoico. La fase orgánica resultante se lavó con una solución de HCl al 10% (6 x 5 mL), seguido del tratamiento de la fase orgánica con una solución saturada de NaHCO₃. Finalmente, la fase orgánica se lavó con H₂O (3 x 5 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. En la figura 8 se muestra la CCF de la mezcla de productos obtenida de dicha reacción.

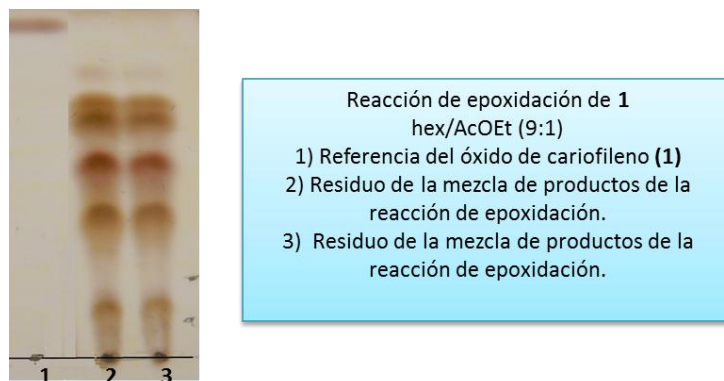


Figura 8. CCF de la mezcla de productos obtenidos de la reacción de epoxidación del óxido de cariofileno (**1**).

7.8 Reacción de la apertura del epóxido del óxido de cariofileno (**1**)

A una solución de **1** (525.1 mg) en 20 mL de CH₂Cl₂, se le adicionaron 1.204 g de p-TsOH a temperatura ambiente. El curso de la reacción se siguió por CCF empleando como eluyente mezclas de hex/AcOEt (7:3). Después de transcurridas 120 h se dio por concluida la reacción, agregando inicialmente 10 mL de agua y 5 mL de CH₂Cl₂.

La fase orgánica resultante se trató con una solución saturada de NaHCO₃ (5 x 10 mL), una vez obtenida la mezcla de productos de reacción se secó por medio de Na₂SO₄ anhidro y se concentró a baja presión, obteniéndose una mezcla compleja de productos (586.7 mg), en la figura 9, se muestra algunas fracciones correspondientes a la separación de la mezcla obtenida.

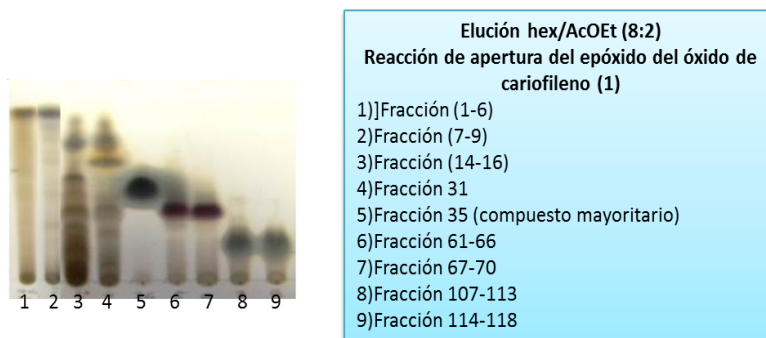


Figura 9. CCF de los diferentes compuestos obtenidos de la reacción de apertura del epóxido del óxido de cariofileno (**1**) con Ac. p-TsOH.

De la mezcla de productos obtenida, se aisló un sólido blanco de pf. 76-78°C, que fue identificado como el 9-hidroxi-cloveno (**136**).

7.9 Biotransformación cuantitativa del isomentol (2) con *C. gloeosporoides*

En 19 matraces erlenmeyer de 250 mL (125 mL de medio YEPGA) fueron inoculados con 2 mL de una solución densa de esporas de *C. gloeosporoides*, después de 96 h de incubación, se adicionaron 301.2 mg de isomentol (**2**) en la mínima cantidad de Acetona. El curso de la biotransformación se siguió por CCF, empleando una mezcla de hex/AcOEt (7:3). Transcurridos 14 días de incubación, se procedió a realizar la recuperación de la mezcla de los productos de biotransformación. Los productos de biotransformación presentes en el medio de cultivo líquido, fueron recuperados por extracción líq-líq con CH₂Cl₂, obteniéndose 1.0224 g de un residuo de color amarillo, ver diagrama 8 (pp. 38).

Los productos de biotransformación presentes en la biomasa, fueron recuperados por una extracción sól-líq, con AcOEt, obteniéndose 3.3366 g de un residuo amarillento de apariencia aceitosa, ver diagrama 8 (pp. 39). El residuo fue adsorbido en 4.4489 g de SiO₂ gel para CC-Flash.

La separación cromatográfica de la mezcla de productos de biotransformación de la biomasa, se realizó por medio de CC-Flash, empleando como eluyente mezclas de hex/AcOEt de polaridad creciente. De la separación cromatográfica se obtuvieron 3 compuestos mayoritarios, ver figura 10.

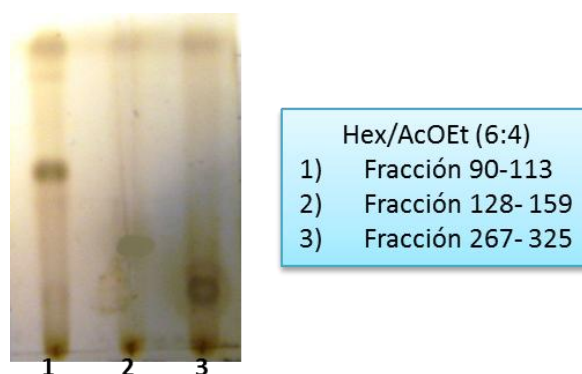


Figura 10. CCF de los compuestos obtenidos de la biotransformación cuantitativa del isomentol (2) con *C. gloeosporioides*.

De la separación cromatográfica del residuo obtenido de la fase líquida del medio de biotransformación, se obtuvieron tres compuestos que por su bajo rendimiento no pudieron ser caracterizados e identificados. Sin embargo, a continuación se enlista las fracciones, polaridad y rendimiento de cada una.

De la fracción 90-113 obtenidas con [hex/AcOEt (9:1)] se obtuvieron 0.3 mg (0.09 %) de un sólido amarillo de pf. 99-101°C.

De la fracción 128-159 obtenidas con [hex/AcOEt (8.5:1.5)] se obtuvo un sólido amarillo 2.3 mg (0.76 %).

De las fracciones 267-325 obtenidas con [hex/AcOEt (1:1)], se obtuvo un sólido impuro 24.33 mg (8.07%), el cual no pudo ser identificado en base a sus propiedades espectroscópicas

De la separación cromatográfica del residuo de la biomasa de *C. gloeosporioides*, se obtuvo en las fracciones 370-390 [hex/AcOEt (3.5:6.5)] un sólido amarillo 7.4 mg, (2.45 %) de pf 143-145°C.

7.10 Biotransformación cuantitativa del mentol (**3**) con *C. gloeosporioides*

A quince matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 125 mL de medio YEPGA fueron inoculados con 2 mL de una solución densa de esporas de *C. gloeosporioides*. Después de 96 horas de incubación —28°C, 130 rpm— se procedió a la adición del mentol (**3**), para lo cual se disolvieron 301.2 mg de **3** en 30 mL de Acetona y se distribuyeron en 15 matraces Erlenmeyer —2 mL de solución de **3** en cada uno de los matraces—. El curso de la biotransformación se siguió por CCF [hex/AcOEt (7:3)], transcurridos 14 días de incubación, se procedió a la recuperación de la mezcla de biotransformación. De donde se obtuvieron 388.8 mg de un residuo de consistencia aceitosa de color café.

Posteriormente, se procedió a la separación y purificación del residuo por medio de CC-Flash (adsorbidos en 655.2 mg de sílica gel), empleando como eluyente mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente. De la separación cromatográfica se obtuvieron cuatro compuestos, los cuales se muestran en la figura 11.

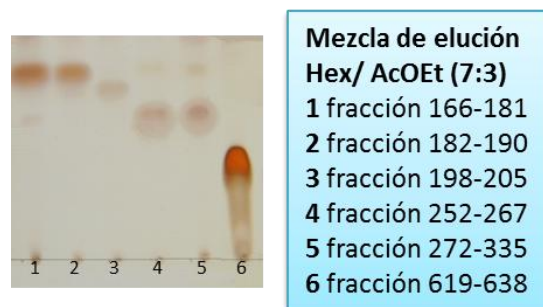


Figura 11. CCF de los compuestos obtenidos de la biotransformación cuantitativa del mentol (**3**) con *C. gloeosporioides*.

De las fracciones obtenidas al eluir la columna con mezcla de hexano/AcOEt (7.5:2.5) se obtuvieron 9.1 mg (2.34%) de un sólido blanco de pf. 142-144°C [AcOEt/hex].

IR_{vmax} (cm^{-1}): 3402, 3010, 2967, 2879, 1667, 1426, 1293, 1234 cm^{-1} .

De las fracciones (648-767) obtenidas al eluir la columna con mezcla de hexano/AcOEt (7:3) se obtuvieron 34.7 mg de una mezcla, la cual fue purificada por medio de CCP utilizando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂/AcOEt (8:2). De donde se separaron tres compuestos, el compuesto de polaridad intermedia corresponde a un sólido blanco 9.1 mg, (2.34%) de pf.122-124°C.

IR_{v_{max}} (cm⁻¹): 3691, 3379, 3007, 2929, 2855, 1671, 1421, 1219, 1211.

7.11 Biotransformación cuantitativa del mentol (3) con *G. cingulata*.

A veinte matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 125 mL de medio YEPGA fueron inoculados con 2 mL de una solución densa de esporas de *Glomerella cingulata*. Después de 96 horas de incubación —28°C, 130 rpm— se procedió a la adición del mentol (3), para lo cual se disolvieron 129.3 mg de 3 en 15 mL de Acetona y se distribuyeron en 20 matraces Erlenmeyer —0.5 mL de solución de 3 en cada uno de los matraces—. El curso de la biotransformación se realizó por CCF [hex/AcOEt (8:2)], transcurridos 14 días de incubación, se procedió a la recuperación de la mezcla de biotransformación. De donde se obtuvieron 115.1mg de un residuo café de consistencia aceitosa, el cual fue adsorbido (371.5 mg de sílica gel para CCF). El desarrollo cromatográfico se realizó empleando como fase estacionaria SiO₂-gel para CCF y como eluyente mezclas de hex/AcOEt de polaridad creciente, lo cual permitió la purificación e identificación de los compuestos 3c a 3e, los cuales ya habían sido informados previamente en la literatura [33].

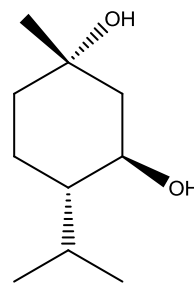
1α-hidroximentol (102)

C₁₀H₂₀O₂

pf. 164°C [CH₂Cl₂/*i*-Pr₂O]

[α]_D²⁵ = 38.6° (CH₃Cl₃, 1.0)

IR: 3342, 1463, 1348 y 1051cm⁻¹.



EM (IE) m/z (% rel): 154 (8), 139 (62), 121 (12), 111 (20), 97 (13), 87 (76), 81 (15), 71 (48), 67 (8), 55 (34), 43 (100).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 3.76 (*ddd*, $J=11.0, 4.0$ Hz, 1H, H-3), 1.24 (*s*, 3H, H-7), 0.85 (*d*, $J=7.0$ Hz, 3H, H-9), 0.95 (*d*, $J=7.0$ Hz, 3H, H-10).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 71.4 (C-1), 50.2 (C-2), 68.6 (C-3), 48.4 (C-4), 19.3 (C-5), 38.6 (C-6), 31.6 (C-7), 26.1 (C-8), 16.4 (C-9), 20.9 (C-10).

6 α -hidroximentol (104)

$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$

Aceite de color amarillo

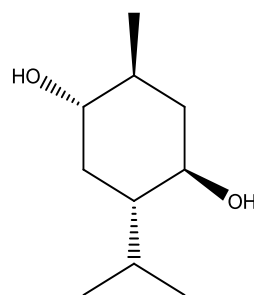
$[\alpha]_{25}^{\text{D}} = -42$ (CH_3Cl_3 , 0.4)

IR v_{max} (cm^{-1}): 3264, 1450, 1343, 1029 cm^{-1}

EM (IE) m/z (%rel): 154 (15), 139 (48), 121 (13), 111 (15), 97 (40), 95 (17), 83 (33), 69 (37), 67 (10), 55 (67), 43 (100).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 1.61(*dddd*, $J=11.0, 7.0$ Hz, 1H, H-1), 3.45 (*m*, 1H, H-3), 1.09 (*dd*, $J=11.0, 2.0$ Hz, 1H, H-5ax), 1.76 (*ddd*, $J=13, 4.2, 4.0$ Hz, 1H, H-5ec), 3.19 (*ddd*, $J=11.2, 11.0, 3.9$ Hz, 1H, H-6), 0.82 (*d*, $J=7.0$ Hz, 1H, H-7), 2.15 (*t*, 7.2 Hz, 1H, H-8), 0.99 (*d*, $J=7.0$ Hz, 3H, H-9), 1.03 (*d* $J=7.0$ Hz, 3H, H-10).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 38.4 (C-1), 42.5 (C-2), 70.7 (C-3), 48.6 (C-4), 32.4 (C-5), 76.0 (C-6), 25.8 (C-7), 21.0 (C-8), 15.9 (C-9), 18.1 (C-10).

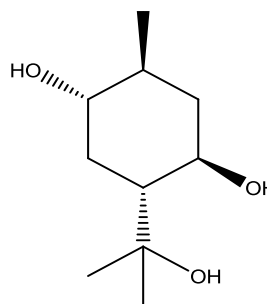


6 α , 8-dihidroximentol (135)

$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3$

Aceite de color amarillo

$[\alpha] = +52$ (CH_3Cl_3 , $C=1.0$)



IR: 3332, 1369, 1159, 1022 cm^{-1} .

EM (IE) m/z (% rel): 173 (1), 155 (1), 137 (3), 116 (22), 94 (80), 83 (10), 79 (30), 70 (11), 58 (100), 53 (4), 43 (47).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 1.41 (*ddd*, $J=10.0, 10.0, 7.0$ Hz, H-1), 1.94 (*ddd*, $J= 13.0, 10.0, 10.0$ Hz, H-2 $_{ax}$), 1.16 (*ddd*, $J= 13.0, 4.0, 4.0$ Hz, H-2 $_{ec}$), 3.77 (*ddd*, $J= 10.4, 10.1, 4.1$ Hz, H-3), 1.56 (*ddd*, $J= 10.4, 10.3, 4.2$ Hz, H-4), 0.94 (*ddd*, $J= 13.0, 10.5, 10.4$ Hz, H-5 $_{ax}$), 1.86 (*ddd*, $J= 13.0, 4.3, 4.2$ Hz, H-5 $_{ec}$), 3.21 (*ddd*, $J= 10.5, 10.0, 4.3$ Hz, H-6), 1.02 (*d*, $J=7.0$ Hz, H-7), 1.22 (*s*, H-9), 1.24 (*s*, H-10).

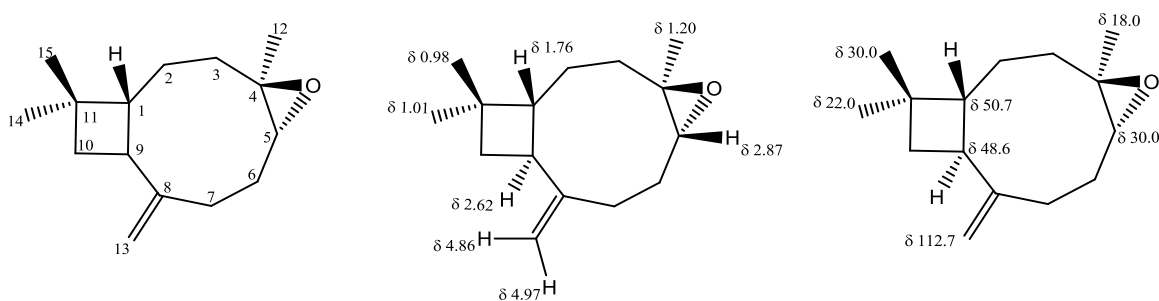
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 38.1 (C-1), 42.2 (C-2), 72 (C-3), 51.8 (C-4), 36.1 (C-5), 75.6 (C-6), 17.9 (C-7), 74.8 (C-8), 23.7 (C-9), 30.1 (C-10).

Resultados y Discusión

8.1 Productos de biotransformación del óxido de cariofileno (1).

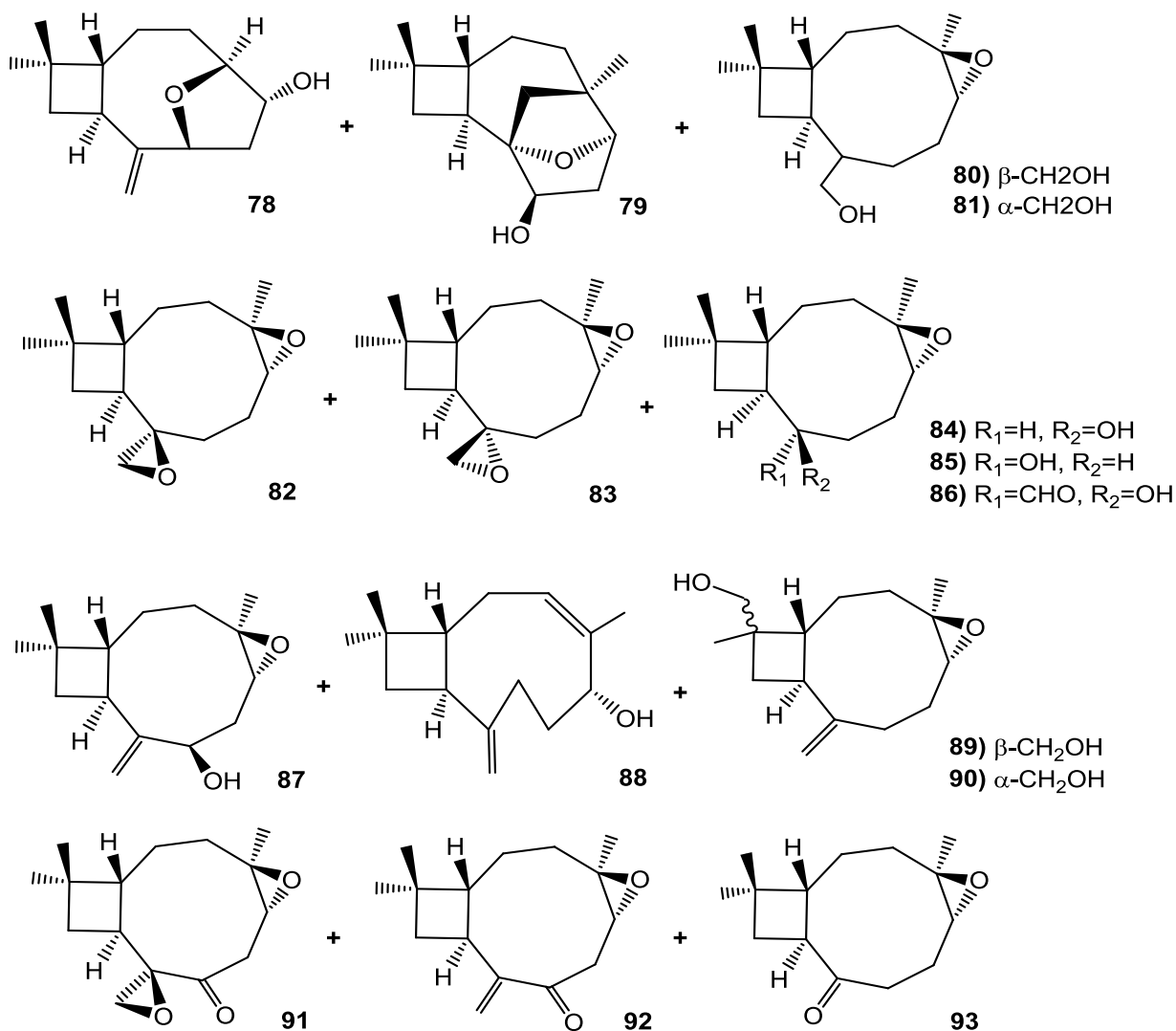
El óxido de cariofileno (**1**) es un sólido blanco de pf. 52-54°C [pf.45- 59°C]. En su espectro de IR se observan las bandas características de los carbonos C_{sp^2} [$\nu(3013$ y $3002)$] y C_{sp^3} [$\nu(2954, 2935$ y $2863)$]. En su espectro de EM (IE) se observa un ion molecular de m/z 220.35, lo cual sugiere una fórmula molecular $C_{15}H_{24}O$ con 4Ω . En su espectro de RMN¹H se observan dos señales dobles en δ_H 4.86 y 4.97 ($J= 1.5$ Hz) asignada a los hidrógenos del metileno *exocíclico* en C-13. La señal *dd* en δ_H 2.87 que integra para 1H corresponde a H-5 base de la función epóxido. La señal múltiple observada en δ_H 2.25 y 1.32 corresponden al metileno del C-6. Por otro lado, las señales que se observan como *ddd* en δ_H 2.11 y 2.34 ($J= 12.0, 8.0$ y 4.5 Hz) se asignaron a los hidrógenos del metileno en C-7. También se observa una señal en δ_H 2.62 (*dt*, $J= 10.0$ y 9.5 Hz) que corresponde al metino de C-9, la cual muestra un acoplamiento con H-1 (δ_H 1.76, *t*, $J=10$ Hz, 1H). Las señales de los hidrógenos en C-10 se observan a δ_H 1.62 y 1.69 respectivamente, las cuales muestran un acoplamiento con H-9. Los grupos metilos en los carbonos C-12 (δ_H 1.20), C-14 (δ_H 1.01) y C-15 (δ_H 0.98) aparecen como una señal simple. La señal múltiple centrada en δ_H 1.65 corresponde a los hidrógenos en C-2, mientras que las señales δ_H 1.43 y 2.09 se asignan a los hidrógenos del C-3.

En el esquema 20 se ilustran los desplazamientos químicos de RMN¹H y ¹³C para algunos átomos presentes en el óxido de cariofileno (**1**).



Esquema 20: Desplazamientos químicos de RMN¹H y ¹³C para algunos átomos de H y C presentes en el óxido de cariofileno (**1**).

En la literatura química especializada se ha informado de la biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) por *Botrytis cinerea*, de donde se aislaron e identificaron quince productos de biotransformación, los cuales se muestran en el esquema 21 [34]. Observándose que las principales reacciones involucradas en la biotransformación de **1** son la epoxidación de la doble ligadura en $\Delta^{8,13}$ y la hidroxilación en C-7. Además, productos que muestran un rearrreglo en el esqueleto diferente (**78-79**) a la materia prima. En la tabla 3 se enlistan los desplazamientos químicos (δ_H , δ_C) de RMN¹H y ¹³C para las sustancias (**82**, **83**, **84** y **91**).



Esquema 21: Productos de biotransformación aislados de la biotransformación del óxido de cariofileno por *Botrytis cinerea* [34].

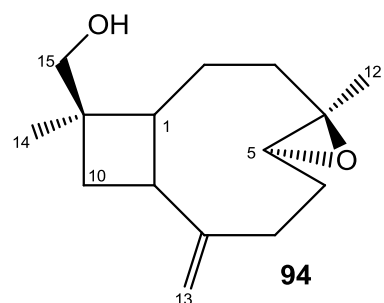
Tabla 3: Desplazamientos químicos (δ_H , δ_C) de RMN¹H y ¹³C para las sustancias **82, 83, 84, 91**.

| | 1 | | 82 | | 84 | | 83 | | 91 | |
|-----|--|------------|---|-------------------|---|-------------------|---|-------------------|---|-------------------|
| | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C |
| 1 | | | 1.76 <i>t</i> 9.6 | 47.9 | 1.83 <i>dd</i> 8.3, 8.9 | 45.9 | | 49.3 | 1.80 <i>t</i> 9.6 | 48.4 |
| 2 | | | 1.46-1.36 <i>m</i> | 27.5 | 1.45-1.39 <i>m</i> 1.24-1.16 <i>m</i> | 28.5 | 1.65 <i>m</i> | 27.3 | 1.59 <i>m</i> 1.41 <i>m</i> | 26.1 |
| 2' | 2.62 <i>dt</i> J=10.0, 9.5 Hz | | | | | | | | | |
| 3 | 1.62-1.69 | | 1.65 <i>ddd</i> 14.0, 4.1, 3.9 1.02 <i>ddd</i> 14.0, 13.2, 4.4 | 40.3 | 1.95 <i>ddd</i> 12.3 4.0, 2.5 1.04 <i>m</i> | 40.9 | 0.99 <i>m</i> | 39.5 | 2.13 <i>ddd</i> 12.9, 4.2, 2.8 1.00 <i>m</i> | 39.5 |
| 3' | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | 58.4 ^a | | 58.5 | | 58.9 ^a | | 59.3 |
| 5 | 1.76 <i>t</i> J=10.0 Hz | | 3.07 <i>dd</i> 10.2, 4.6 | 61.8 | 3.34 <i>dd</i> 9.3, 5.6 | 60.7 | 2.87 <i>dd</i> 10.5 4.4 | 62.6 | 3.48 <i>dd</i> 8.8, 6.6 | 55.0 |
| 6 | 1.65-1.43 | | 1.24 <i>m</i> | 25.5 | 2.28 <i>dddd</i> 5.6, 12.9, 5.4, 5.0 | 25.4 | 1.43 <i>dddd</i> 10.5, 13.9, 4.9, 5.8 2.05 <i>dddd</i> 4.4, 13.9, 9.7, 5.2 | 24.8 | 3.31 <i>dd</i> 6.6, 13.0 2.05 <i>dd</i> 8.8, 13.0 | 40.8 |
| 6' | | | 2.16 <i>m</i> | | | | | | | |
| 7 | 2.09 | | | 30.4 | 1.29 <i>ddd</i> 5.0, 14.0, 13.0 | 36.1 | 1.93 <i>ddd</i> 5.8, 5.2, 14.3 1.76 <i>ddd</i> 4.9, 9.7, 14.3 | 31.3 | | 214.0 |
| 7' | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | 57.9 ^b | | 71.7 | | 59.8 ^b | | 64.2 |
| 9 | 2.87 <i>dd</i> | | 2.13-2.02 <i>m</i> | 46.8 | 1.57 <i>dd</i> 8.3, 9.5 | 52.6 | 2.11 <i>m</i> | 47.1 | 2.77 <i>q</i> 9.6 | 39.7 |
| 10 | 2.25-1.32 | | 1.58-1.47 <i>m</i> | 35.1 | 1.54-1.42 <i>m</i> | 38.6 | 1.56 <i>dd</i> 9.5, 11.9 1.25 <i>dd</i> 11.0, 11.9 | 35.5 | 1.48 <i>dd</i> 8.0, 10.3 1.17 <i>dd</i> 10.5, 10.3 | 33.4 |
| 10' | | | | | | | | | | |
| 11 | 2.11-2.34 <i>ddd</i> 12.0, 8.0, 4.5 | | | 33.3 | | 32.1 | | 33.4 | | 33.6 |
| 12 | 4.86-4.97 <i>d</i> J=1.5 Hz | | 1.26 <i>s</i> | 16.4 | 1.15 <i>s</i> | 16.4 | | 16.2 | 1.17 <i>s</i> | 16.2 |
| 13 | 1.01 | | 2.66 <i>dd</i> 5.2, 0.8 2.55 <i>d</i> 5.2 | 56.0 | 0.81 <i>s</i> | 31.8 | 2.67 <i>d</i> 4.6 2.65 <i>d</i> 4.6 | 50.1 | 2.85 <i>d</i> 4.6 2.70 <i>d</i> 4.6 | 50.1 |
| 13' | | | | | | | | | | |
| 14 | 0.98 | | 0.94 <i>s</i> | 29.4 ^a | 0.85 <i>s</i> | 29.5 ^a | 0.95 <i>s</i> | 29.9 ^a | 0.97 <i>s</i> | 29.0 ^a |
| 15 | 1.20 | | 0.92 <i>s</i> | 21.6 ^b | 0.88 <i>s</i> | 22.6 ^b | 0.93 <i>s</i> | 21.9 ^b | 0.92 <i>s</i> | 21.7 ^b |

De la biotransformación de **1** con *Colletotrichum gloeosporioides*, se obtuvieron dos compuestos. El compuesto menos polar es un aceite de color amarillo con $R_f = 0.53$ [n-hex/AcOEt (3:7)] y 0.30 [CH₂Cl₂/MeOH (9.8:0.2)], en su espectro de IR se observan las bandas correspondientes a $\nu(\text{O-H})$ en 3428. En 3067 y 2930 la $\nu(\text{C-H})$ correspondientes a C_{sp}²-H y C_{sp}³-H respectivamente. En su espectro de RMN¹³C se observan dos señales de carbonos con hibridación sp² en δ_C 151.7 y δ_C 113.1, lo cual sugiere que la doble ligadura *exocíclica* $\Delta^{8,13}$ presente en **1** no fue biotransformada. Por lo tanto, los δ_H 5.02 (*m*, 1H, H-13') y δ_H 4.89 (*dd*, J=1.5, 0.7, 1H, H-13'') corresponden a los hidrógenos vinílicos de C-13 (δ_C 113.1). En la tabla 4 se enlistan los δ_H (RMN¹H) y δ_C (RMN¹³C) para la sustancia en discusión.

Tabla 4: Desplazamientos químicos δ_H (RMN¹H) y δ_C (RMN¹³C) para el compuesto **94**.

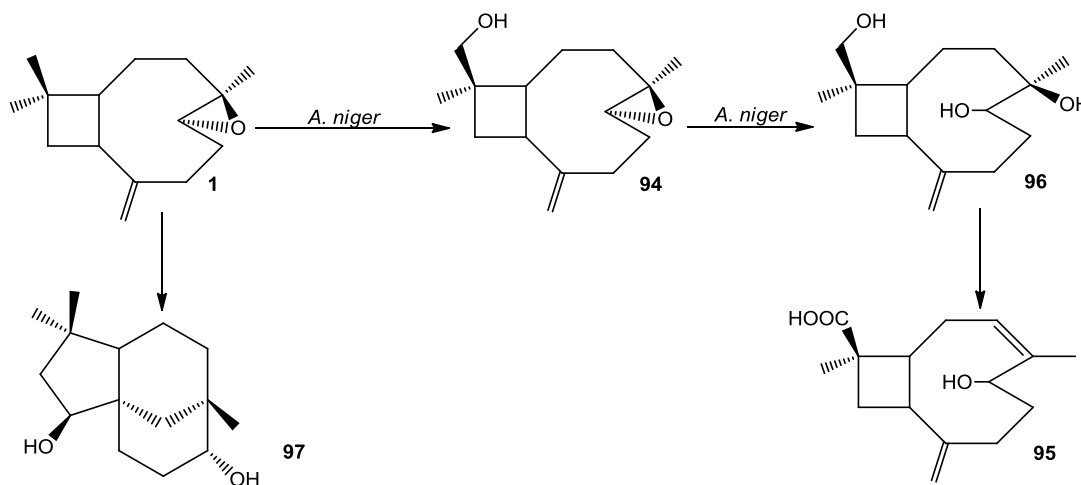
| # Carbono | δ_H | <i>m</i> | <i>J</i> | δ_C | DEPT |
|-----------|------------|-----------|-----------|------------|-----------------|
| 1 | 2.08 | | | 45.1 | CH |
| 2 | | | | 27.8 | CH ₂ |
| 3 | | | | 39.0 | CH ₂ |
| 4 | | | | 59.7 | C |
| 5 | 2.92 | <i>dd</i> | 11.0, 4.0 | 63.7 | CH |
| 6 | | | | 30.1 | CH ₂ |
| 7 | | | | 30.1 | CH ₂ |
| 8 | | | | 113.1 | C |
| 9 | | | | 48.2 | CH |
| 10 | 1.83 | <i>t</i> | 10.6 | 34.1 | CH ₂ |
| 11 | | | | 38.6 | C |
| 12 | 1.21 | <i>s</i> | | 17.0 | CH ₃ |
| 13 | 5.02 | <i>m</i> | | 151.7 | CH ₂ |
| | 4.89 | <i>dd</i> | 1.5, 0.7 | | |
| 14 | 1.07 | | | 70.8 | CH ₃ |
| 15 | 3.35 | | | 17.0 | CH ₃ |



Abraham y col., informaron de la biotransformación del cariofileno por *Diplodia gossypina* obteniendo diversos productos derivados del 4,5-epoxi-cariofileno, donde destaca el 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-14-ol (**94**)¹² [35]. Por otro lado, Noma y col., biotransformaron al óxido de

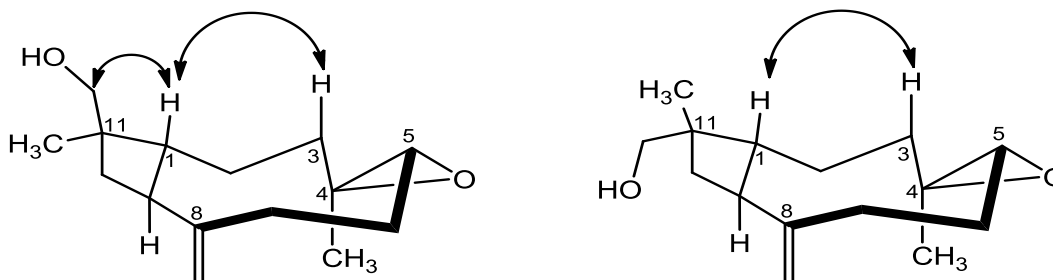
¹² El compuesto **94** es uno de los constituyentes principales del aceite esencial de *Cannabis sativa*, el cual es detectado fácilmente por los perros. Además es el principal metabolito obtenido de la biotransformación del cariofileno por los conejos.

cariofileno (**1**) con *A. niger* (TBUYN-2) obteniendo al ácido (-)-6-hidroxi-7-cariofilen-12-oico (**95**) y el (-)-cariofilen-6, 7,12-triol (**96**). Además de clovandiol (**97**)¹³, y del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-14-ol (**94**), ver esquema 22 [36].



Esquema 22. Biotransformación del óxido de cariofileno (**1**) con *A. niger*

Con base en lo anterior, en la literatura química se ha informado del aislamiento y la caracterización del 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-14-ol, el cual puede existir como epímero en C-11 con una orientación β ó α . La configuración relativa de C-11 fue determinada con base en su espectro NOESY del compuesto **94**, donde se observa la interacción entre H-1 (δ_H 2.08) con el metileno ubicado en C-14 (δ_H 1.07), ver esquema 23.



Esquema 23. Orientación relativa en C-14 en el 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-14-ol (**94**).

¹³ El clovandiol (**97**) es el componente principal de *Salvia canadiensis*.

En la tabla 5, se enlistan los desplazamientos químicos para los compuestos **90** [34], **94** [35] y el compuesto en discusión, deduciéndose que existe una mejor aproximación entre los desplazamientos químicos informados por Wolf-Rainer, col., con la sustancia (**94**). Por lo que se concluye, que el compuesto aislado es el (4*R*,5*R*,11*S*)-4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-14-ol (**94**).

Tabla 5. Comparación de los desplazamientos químicos de δ_C (RMN¹³C) para los compuestos **90**, **94** y el compuesto en discusión (**94**).

| # Carbono | 94 | 90 [34] | 94 [35] |
|--------------------|-----------|----------------|----------------|
| 1 | 45.1 | 51.6 | 45.1 |
| 2 | 27.8 | 26.3 | 27.8 |
| 3 | 39.0 | 39.3 | 39.0 |
| 4 | 59.7 | 59.5 | 59.8 |
| 5 | 63.7 | 63.5 | 63.7 |
| 6 | 30.1 | 30.3 | 30.0 |
| 7 | 30.1 | 29.8 | 30.0 |
| 8 | 151.7 | 151.7 | 151.7 |
| 9 | 48.2 | 48.3 | 48.2 |
| 10 | 34.1 | 35.2 | 34.2 |
| 11 | 38.6 | 38.6 | 38.6 |
| 12 | 17.0 | 16.9 | 17.1 |
| 13 | 113.1 | 112.9 | 113.1 |
| 14 α | 70.8 | 24.8 | 70.7 |
| 15 β | 17.0 | 67.0 | 17.0 |

El segundo compuesto obtenido de la biotransformación de **1** con *C. gloeosporioides*, es un sólido blanco de pf 115-117°C con $R_f = 0.35$ [n-hex/AcOEt (3:7)] y 0.46 [CH₂Cl₂/MeOH (9:1)], en su espectro de IR se observan las bandas correspondientes a $\nu(\text{O-H})$ en 3481-3449 y $\nu(\text{C-H})$ en 2927 para C_{sp³}. Al analizar los espectros de RMN¹³C para las sustancias **1**, **94** y la sustancia en discusión, se observa que las señales correspondientes a los carbonos con hibridación sp² (C-8/C-13) no están presentes en el espectro de la sustancia en discusión, lo cual sugiere que la doble ligadura *exocíclica* $\Delta^{8,13}$ presente en **1** y **94** fue modificada durante la biotransformación, lo cual se confirma en su espectro de IR donde no se observan la $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H})$. Con base en su espectro de RMN¹³C (esquema 24) por desacoplamiento total, se observan 15 señales entre 74.0-15.0 ppm; mientras que en su espectro DEPT (esquema 25) se observan tres metilos, seis metilenos, tres

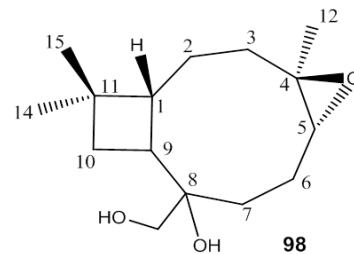
metinos y tres carbonos cuaternarios. En su espectro de masas por impacto electrónico se observa un ion molecular de m/z 254 que corresponde a una fórmula molecular $C_{15}H_{26}O_3$.

En su espectro RMN¹H se observan tres señales simples en δ_H 0.94 (δ_C 29.4), δ_H 0.96 (δ_C 22.3) y δ_H 1.28 (δ_C 16.2) que corresponden a los metilos en C-14, C-15 y C-12 respectivamente. En la tabla 6 se enlistan los desplazamientos químicos de RMN-¹³C.

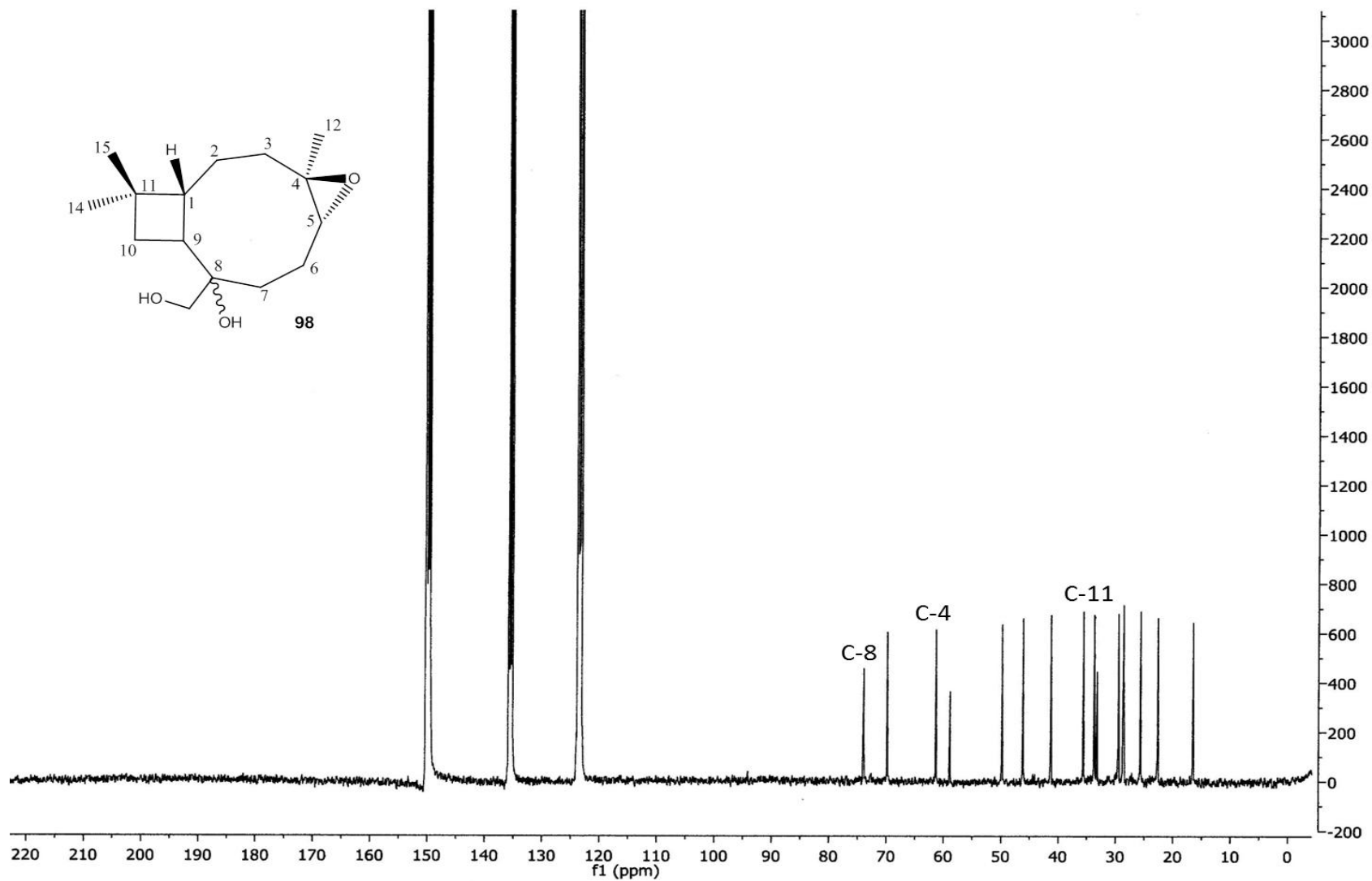
La correlación directa entre los átomos de carbono e hidrógeno en la molécula, fueron determinados con base en su espectro HSQC (esquema 26).

Tabla 6. Desplazamientos químicos de δ_C (RMN¹³C) para el compuesto **98**

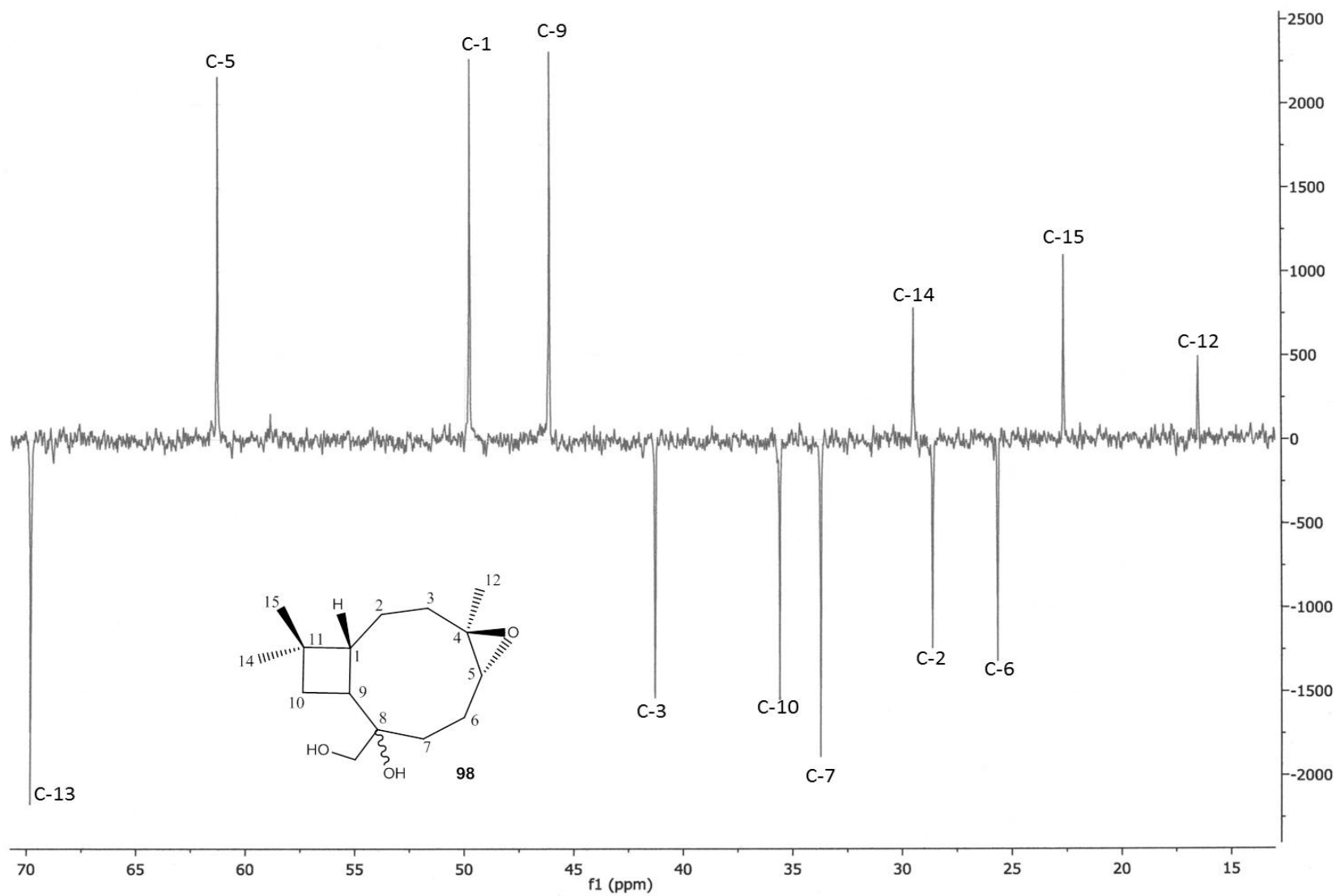
| # Carbono | δ_H | δ_H (Py d ₅) | J (Hz) | δ_C (CDCl ₃) | δ_C (Py d ₅) | DEPT |
|-----------------------------|----------------|------------------------------------|------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| 1 | | 2.25 <i>m</i> | | 49.2 | 49.8 | CH |
| 2 | | 1.60 <i>m</i> 1.47 <i>m</i> | | 28.1 | 28.6 | CH ₂ |
| 3α | | 1.16 <i>ddd</i> | 12.0, 12.0 | 40.4 | 41.3 | CH ₂ |
| 3β | | 2.09 <i>m</i> | 4.0 | | | |
| 4 | | | | 59.2 | 58.9 | C |
| 5 | 3.27 <i>dd</i> | 3.76 | 8.0, 4.0 | 61.2 | 61.3 | CH |
| 6 | | 2.59 <i>m</i> 1.47 <i>m</i> | | 24.8 | 25.7 | CH ₂ |
| 7 | | 2.59 <i>m</i> 1.69 <i>m</i> | | 32.1 | 33.7 | CH ₂ |
| 8 | | | | 73.8 | 74.0 | C |
| 9 | | 2.25 <i>m</i> | | 46.1 | 46.2 | CH |
| 10β | | 2.09 <i>m</i> | | 35.3 | 35.6 | CH ₂ |
| 10' | | 1.69 <i>m</i> | | | | |
| 11 | | | | 33.5 | 33.2 | C |
| 12 | 1.28 | 1.35 <i>s</i> | | 16.2 | 16.5 | CH ₃ |
| 13 | 3.35 | 3.72 <i>d</i> | 10.0, | 68.9 | 69.8 | CH ₂ |
| 13' | 3.16 | 3.64 <i>d</i> | 10.0 | | | |
| 14 | 0.94 | 0.94 <i>s</i> | | 29.4 | 29.5 | CH ₃ |
| 15 | 0.96 | 0.97 <i>s</i> | | 22.3 | 22.7 | CH ₃ |



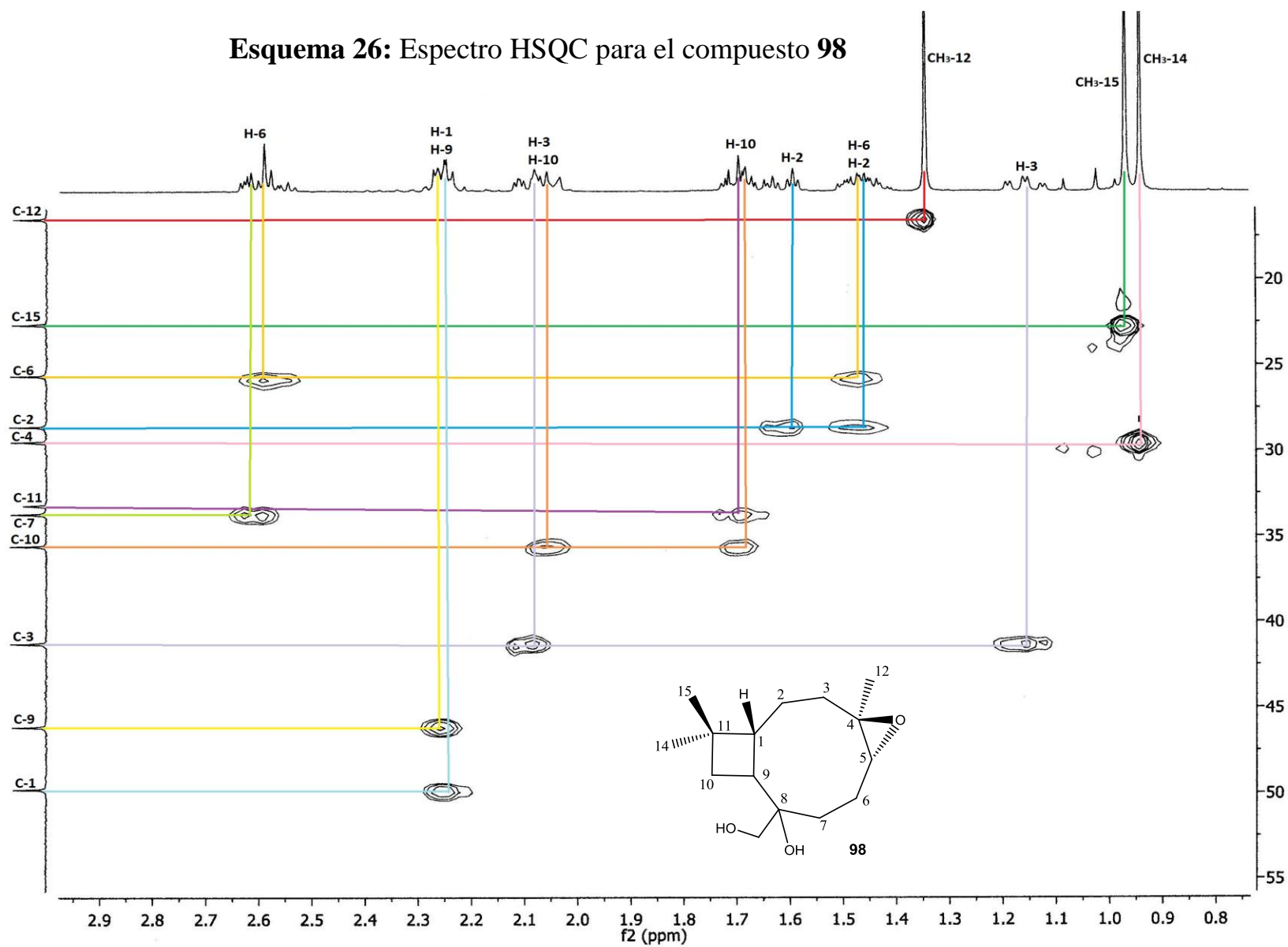
Esquema 24: Espectro de RMN ^{13}C para el compuesto **98**



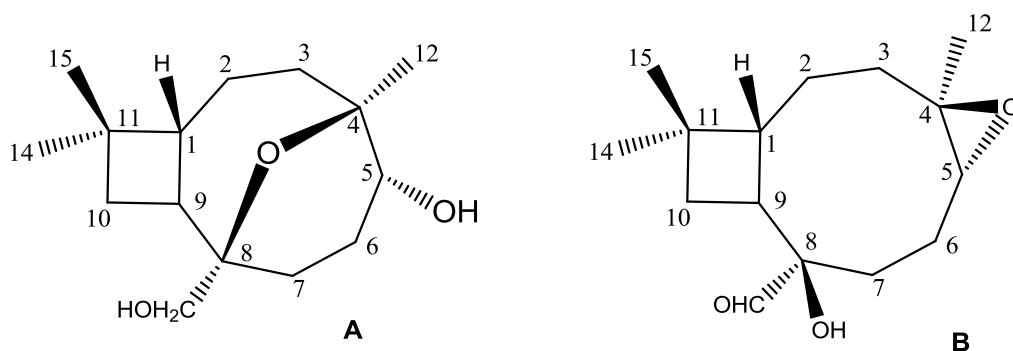
Esquema 25: Espectro DEPT para el compuesto **98**



Esquema 26: Espectro HSQC para el compuesto 98

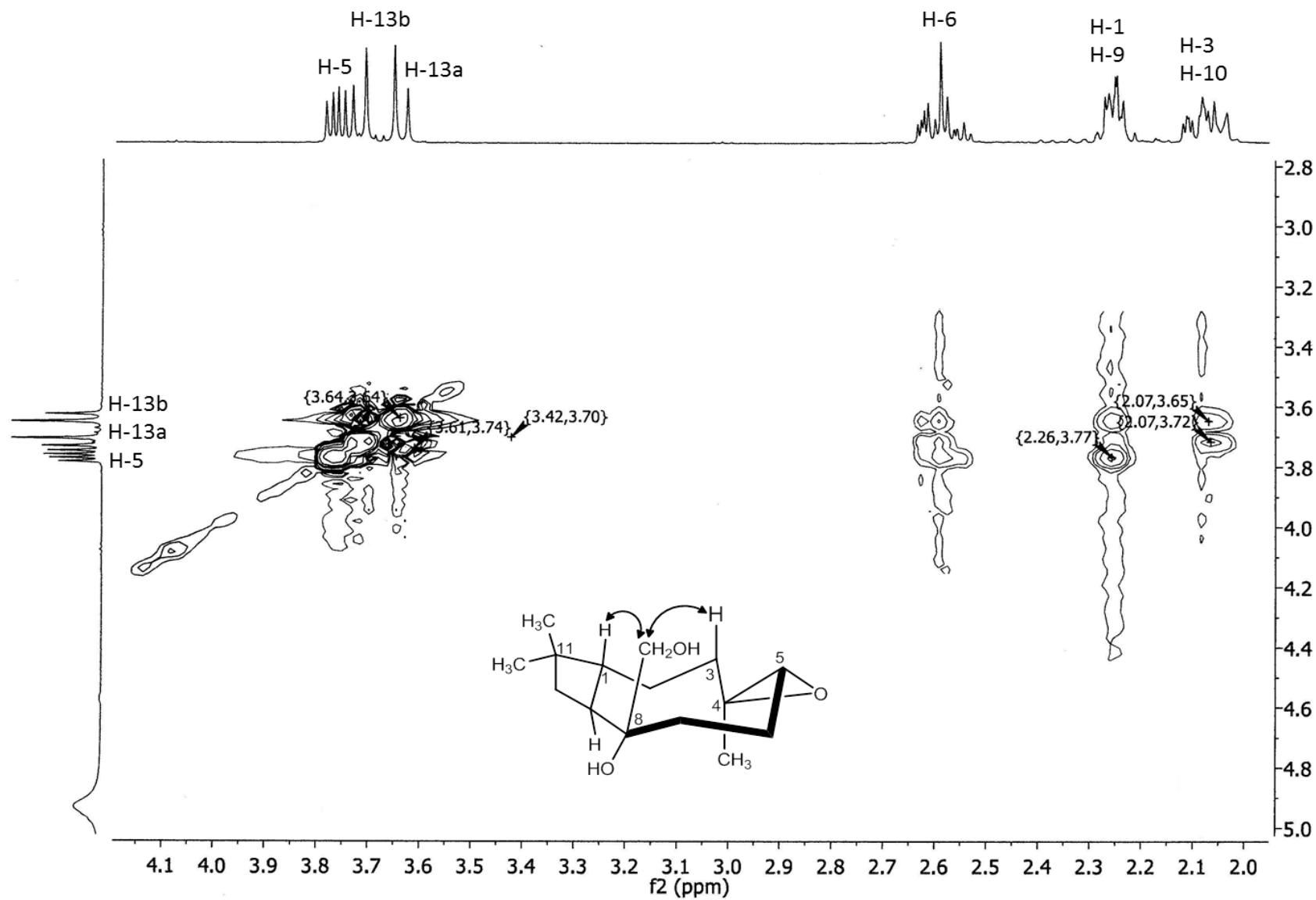


La configuración relativa del grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ unido al C-8 fue determinada con base en su espectro NOESY (esquema 28), donde se observan las interacciones de H-13 con $\text{H}_\beta\text{-1}$, $\text{H}_\beta\text{-10}$ y $\text{H}_\beta\text{-3}$, lo cual sugiere que el grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ tiene una orientación β . Dicha sustancia ya había sido informada por Abraham y col. quienes sugieren que la presencia de dicho diol (**98**) es el precursor de los compuestos **A** y **B** aislados de la biotransformación del óxido de cariofileno con *Chaetomium cochliodes* y *Diplodia gossypina*, ver esquema 27 [35].



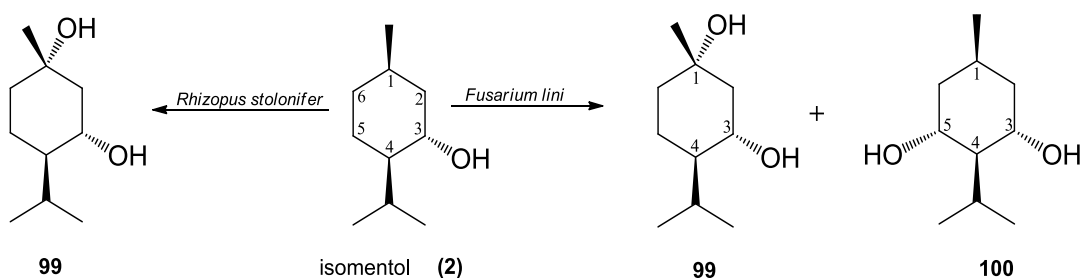
Esquema 27: Biotransformación del óxido de cariofileno con *Chaetomium cochliodes* y *Diplodia gossypina*.

Esquema 28: Espectro NOESY para el compuesto **98**



8.2 Productos de biotransformación del (1*S*, 2*R*, 5*R*)-(+)-Isomentol (**2**)¹⁴

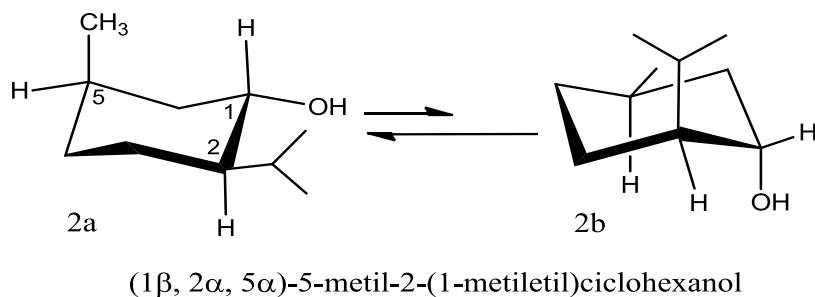
En la literatura química especializada se ha informado la biotransformación del (+)-isomentol (**2**) con *Fusarium lini*, donde se obtuvo un compuesto hidroxilado en C-1 (**99**) y C-5 (**100**) de manera *estereoselectiva* (orientación α) como se muestra en el esquema 29 [37]. Por otro lado, la biotransformación de **2** con *Rhizopus stolonifer* produjo de manera *regio* y *estereoselectiva* al 1-hidroxi-isomentol [1*S*,2*R*,5*S*-(+)-isomentol], el cual se encuentra hidroxilado en C-1.



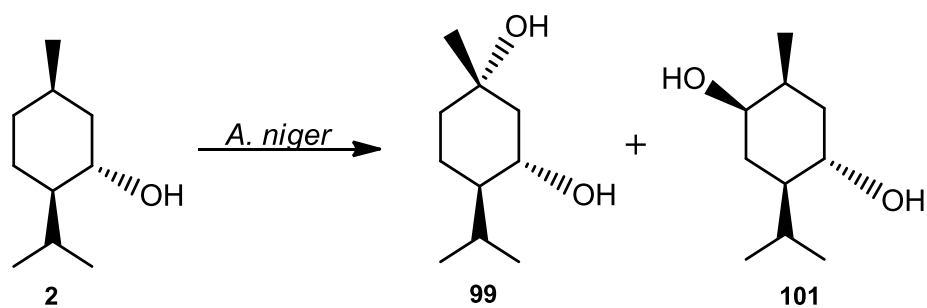
Esquema 29. Biotransformación del isomentol con *F. lini* y *R. stolonifer*.

Además, también se ha descrito la biotransformación del (+)-isomentol (**2**) con *A. niger* [38], para dar el 1-hidroxi-isomentol (**99**) y el 6-hidroxi-isomentol [1*S*,2*R*,6*R*-(+)-isomentol, **101**], ver esquema 30.

¹⁴ El isomentol utilizado como materia prima según Sigma-Aldrich, corresponde al [1*S*, 2*R*, 5*R*-(+)-Isomentol], mientras en The Merck Index lo nombra (1 β , 2 α , 5 α)-5-metil-2-(1-metiletil)-ciclohexanol. Para el isomentol (**2**) existe el equilibrio conformacional representado por **2a** y **2b**; donde la conformación **2a** representa el conformero más estable [39].



(1 β , 2 α , 5 α)-5-metil-2-(1-metiletil)ciclohexanol

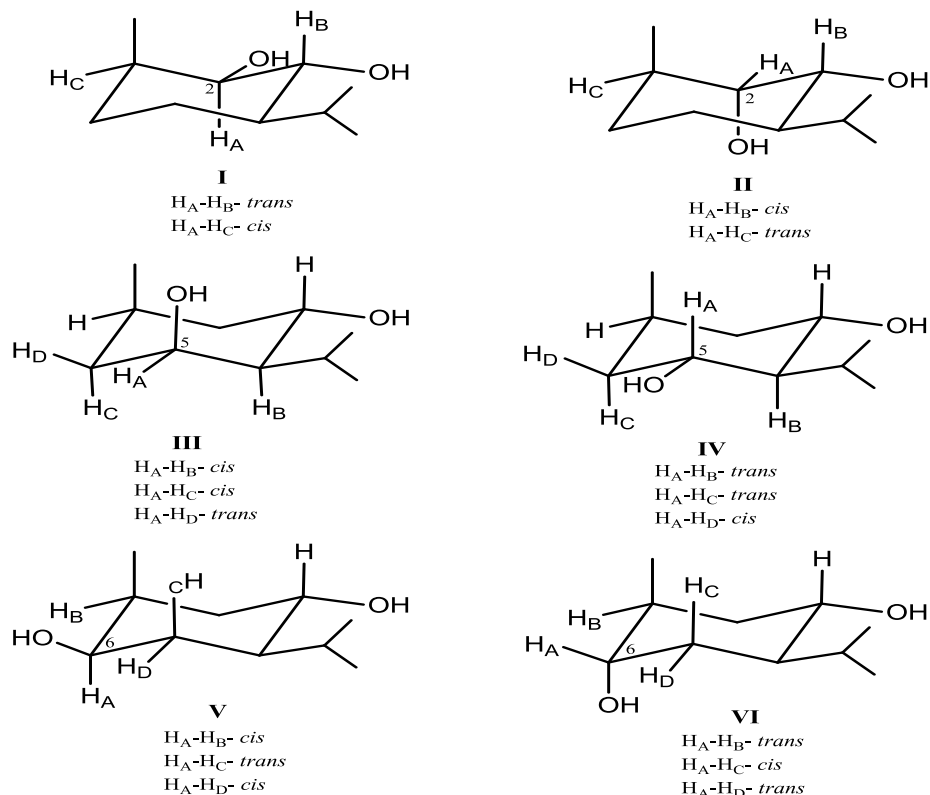


Esquema 30. Biotransformación del isomentol con *A. niger*.

De la biotransformación del isomentol (**2**) con *Glomerella cingulata* (fase sexual de *C. gloeosporioides*) se obtuvo un compuesto de peso molecular 176.26 g/mol con una fórmula molecular $C_{10}H_{20}O_2$. Además, presentó un pf. 232-234°C [lit. pf. 232°C,] [37] y una rotación específica $[\alpha] = -72.6$ (c 3×10^{-3} , $CHCl_3$). En su espectro de IR se observan las bandas características ν (O-H) alrededor de 3350 cm^{-1} y ν (C-H) en aproximadamente $3000\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$.

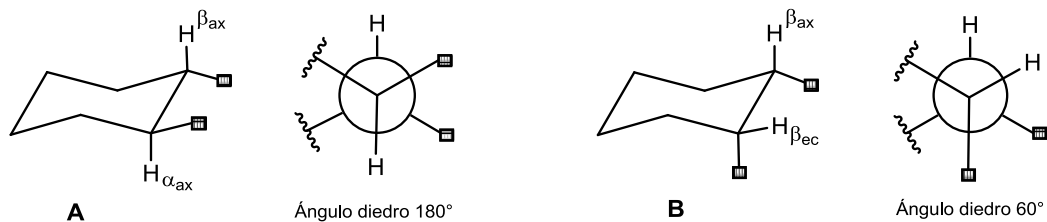
Al comparar los pesos moleculares de **2** (156.27 g/mol) con la sustancia en discusión (172.26 g/mol), se puede deducir que la acción de *G. cingulata*, fue la hidroxilación de la molécula del isomentol al aumentar el peso molecular en 16 una. La presencia del grupo hidroxilo se corroboró mediante sus datos de RMN- 1H , en el cual se observa una señal a campo bajo correspondiente a un grupo metino en δ_H 3.54 (*dt*, $J=8.8$ y 4.3). El grupo hidroxilo puede ubicarse en C-2, C-5 ó C-6 en la molécula del isomentol (**2**).

Con base en el esquema 31 se puede descartar la posibilidad de que el nuevo grupo hidroxilo se ubique en C-2 con una orientación β -ecuatorial (orientación **I**) o α -axial (orientación **II**), ya que la multiplicidad observada para H_A sería una señal *dd* con constantes de acoplamiento iguales ($J_{trans}: H_A-H_B, J_{cis}: H_A-H_C$)¹⁵.

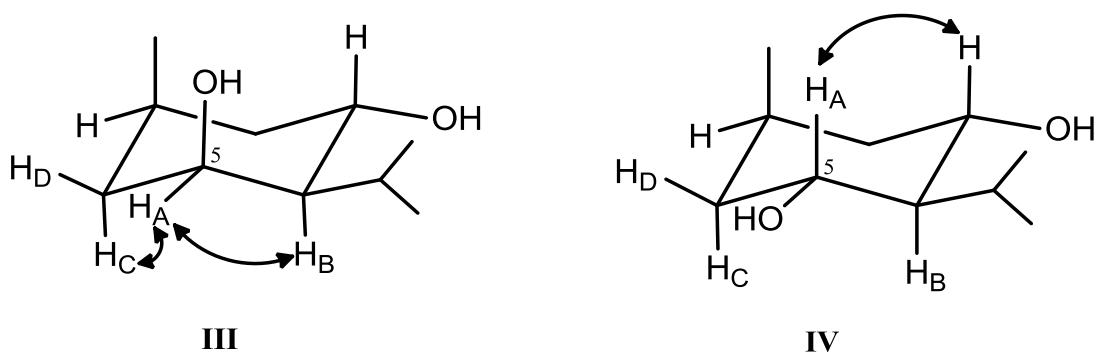


Esquema 31. Diferentes posibilidades de ubicación del nuevo grupo hidroxilo en la estructura del isomentol.

¹⁵ La constante de acoplamiento (*J*) está determinada por el ángulo diedro. En la fórmula **A**, los hidrógenos se encuentran *antiperiplanar* (β_{ax} - α_{ax}), con un ángulo diedro de 180° y $J=13-7$ Hz; mientras en la fórmula **B**, los hidrógenos se encuentran *synclinal* (β_{ax} - β_{ec}), con un ángulo diedro de 60° y $J=5-2$ Hz. [38].



La ubicación del grupo hidroxilo en C-5 (β_{ax} o α_{ec}) o C-6 (α_{ax} o β_{ec}) muestra una multiplicidad similar con constantes de acoplamiento iguales, por lo cual se tomó en cuenta la información proporcionada en su espectro COSY (esquema 32), donde se observa la interacción de $H\beta_{ax}$ del C-1 con el $H\beta_{ax}$ del C-5, estableciéndose de manera inambigua que el grupo hidroxilo en C-5 tiene una orientación α_{ec} (epímero **IV**). Por lo tanto se pudo concluir que uno de los productos obtenido de la biotransformación del isomentol con *G. cingulata*, corresponde al 5 α -hidroxi-isomentol (**100**), previamente informado en la biotransformación del isomentol por *Fusarium lini* y *Rhizopus stolonifer* [37].



Esquema 32. Interacciones H-H observadas en el espectro COSY para los epímeros del 5-hidroxi-isomentol (**100**).

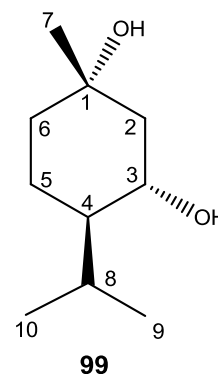
De la biotransformación del isomentol (**2**) con *Glomerella cingulata* (fase sexual de *C. gloeosporioides*) se obtuvo un segundo compuesto de mayor polaridad que el 5-hidroxi-isomentol (**100**) con el mismo peso molecular (176.26 g/mol) y una fórmula molecular $C_{10}H_{20}O_2$. Además, presentó un pf. 219°C ($CH_2Cl_2/i-Pr_2O$) [lit. pf. 219°C, 37] y una rotación específica $[\alpha] = -75.6$ ($c \ 3 \times 10^{-3}$, $CHCl_3$). En su espectro de IR se observan las bandas características ν (O-H) alrededor de 3350 cm^{-1} y ν (C-H) en aproximadamente $3000\text{-}2900 \text{ cm}^{-1}$.

En su espectro de $RMN^{13}C$ del isomentol (**2**), se pueden observar por desacoplamiento total 10 átomos de carbono (10 C), que corresponden a $3CH_3$, $3CH_2$, $4CH$ aplicando la técnica del DEPT. Al comparar dichos espectros con el de la sustancia en discusión se observa que un grupo metino (CH) se transformó a un carbono cuaternario (C) por el proceso de biotransformación, ver tabla 7.

Tabla 7. Constantes espectroscópicas de RMN ^1H (ppm, J en Hz) y ^{13}C (ppm) para el compuesto **99**.

1-hidroxi-isomentol

| No. -C | δ_{H} | | | δ_{C} |
|--------|---------------------|-----------|------------|---------------------|
| 1 | | | | 70.0 |
| 2 | 1.60-1.83 | <i>m</i> | J=8.8, 4.2 | 42.2 |
| 3 | 3.72 | <i>dt</i> | | 71.2 |
| 4 | 1.21 | <i>m</i> | | 48.7 |
| 5 | 1.53-1.72 | <i>m</i> | | 36.4 |
| 6 | 1.40-1.51 | <i>m</i> | | 37.2 |
| 7 | 1.17 | <i>s</i> | | 27.1 |
| 8 | 1.91 | <i>m</i> | | 27.2 |
| 9 | 0.85 | <i>d</i> | J=6.8 | 19.0 |
| 10 | 0.92 | <i>d</i> | J= 6.8 | 20.9 |

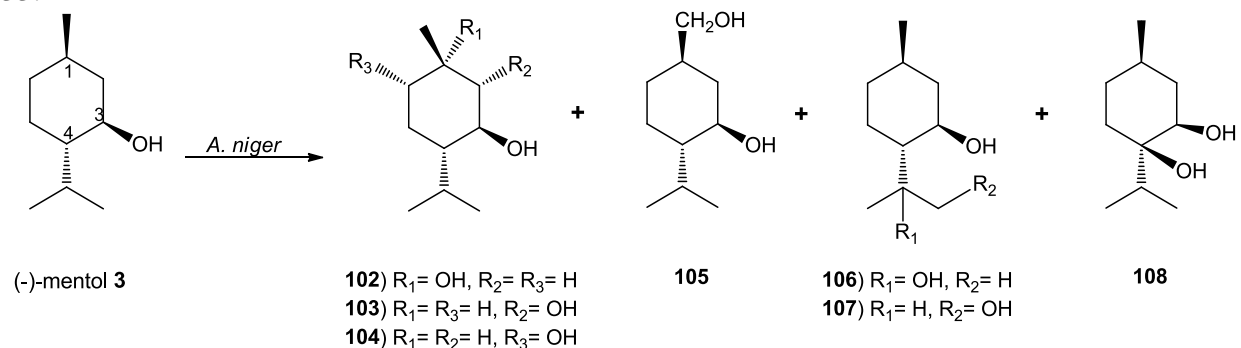


La ubicación del grupo hidroxilo adicional se puede proponer en C-1, C-4 y C-8, dando como resultado un carbono cuaternario. Sin embargo, la ubicación del grupo hidroxilo en C-1 es confirmada por la multiplicidad observada en su espectro de RMN ^1H (ver tabla 7), donde la señal simple (*s*) en δ_{H} 1.17 (δ_{C} 27.1) corresponde a CH $_3$ -7, el cual se ve desplazado a campo bajo con respecto a CH $_3$ -9 (δ_{H} 0.85, *d*) y CH $_3$ -10 (δ_{H} 0.92, *d*) por la presencia del grupo hidroxilo.

Por lo tanto, al comparar las propiedades físicas y espectroscópicas con las informadas por Gondal y col. para el 1 α -hidroxi-isomentol (**99**), se puede concluir que el producto de la biotransformación de **2** con *G. cingulata* es el compuesto **99**.

8.3 Productos de biotransformación del (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-Mentol (mentol) **3**¹⁶.

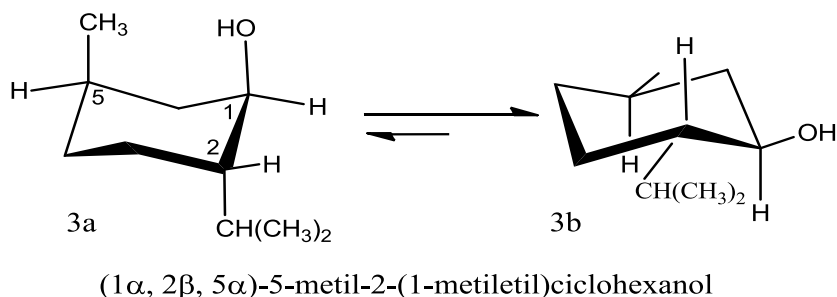
Se ha informado de la biotransformación del (-)-mentol (**3**) con *A. niger* para obtener derivados hidroxilados de manera *estereoselectiva* en los carbonos C-1 (**102**), C-2 (**103**) y C-6 (**104**) con una orientación α ; además de la hidroxilación en C-7 (**105**), C-8 (**106**) y C-9 (**107**); así como el producto hidroxilado en C-4 (**108**) con una orientación β_{ax} [40-42]. Cabe señalar que la configuración absoluta del C-8 en el compuesto **107**, no se encuentra determinada, ver esquema 33.

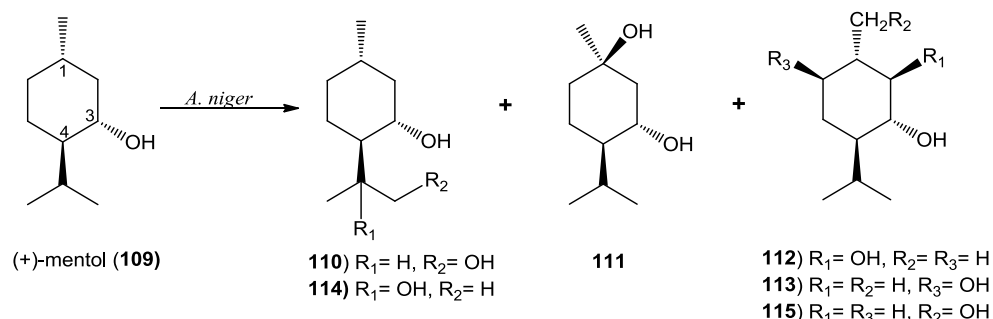


Esquema 33. Biotransformación del (-)-mentol **3** con *A. niger*

Los productos aislados de la biotransformación del (+)-mentol **109** con *A. niger*, fueron productos hidroxilados en C-9 (**110**, 100 mg) como producto mayoritario, mientras que la hidroxilación en C-1 (**111**, 12 mg), C-2 (**112**, 2 mg), C-6 (**113**, 10 mg), C-8 (**114**, 25 mg) y C-7 (**115**, 3 mg) son productos minoritarios en dicha biotransformación, y se enlistan en el esquema 34.

¹⁶ El mentol utilizado como materia prima según Sigma-Aldrich, corresponde al [1*R*, 2*S*, 5*R*]-(-)-mentol]; mientras en The Merck Index lo nombra (1 α , 2 β , 5 α)-5-metil-2-(1-metiletil)-ciclohexanol. Para el mentol (**3**) existe el equilibrio conformacional representado por **3a** y **3b**; donde la conformación **3b** representa el confórmero más estable [39].

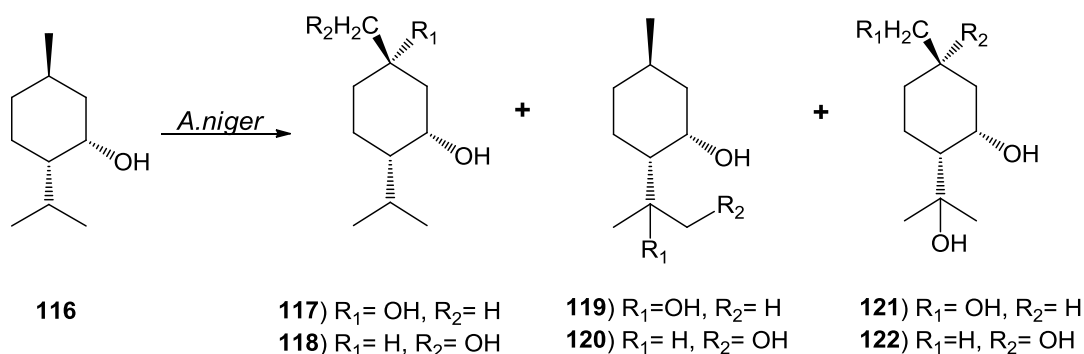




Esquema 34. Biotransformación del (+)-mentol **109** con *A. niger*

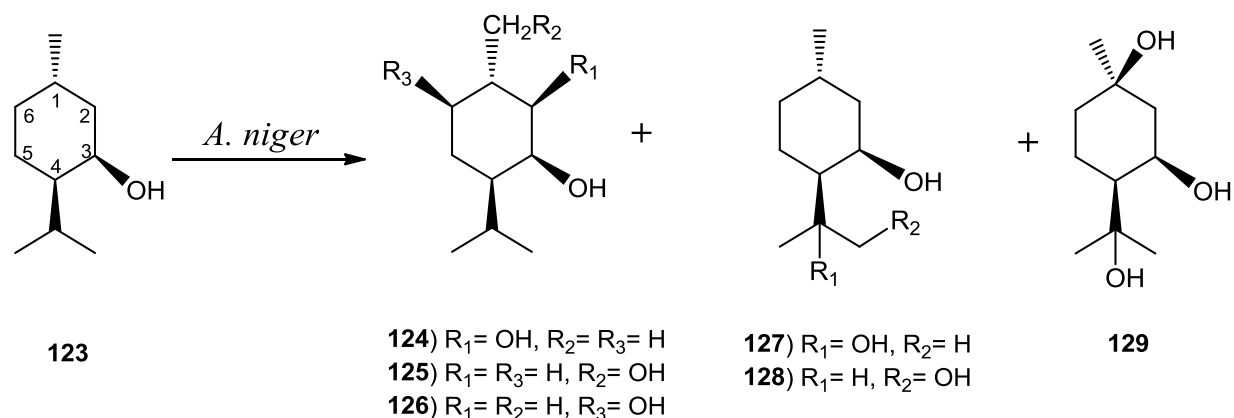
Por otro lado, de la biotransformación de **109** con diferentes cepas de *Aspergillus* se observó que el 4-hidroxi-mentol es el producto mayoritario obtenido con *A. cellulosa* (77), y con *A. cellulosa* (IFO 4040) y *A. terreus*. Sin embargo, al hacer la revisión del artículo en cuestión, no se observó la descripción física y espectroscópica para dicha sustancia [40].

De la biotransformación del (+)-neomentol **116** con *A. niger*, se aislaron cuatro derivados dihidroxilados en los carbonos C-1 (**117**), C-7 (**118**), C-8 (**119**), C-10 (**120**); además de los compuestos trihidroxilados en los carbonos de la posición C-7 y C-8 (**121**); y en las posiciones C-1 y C-8 (**122**), como se ilustra en el esquema 35 [38]; donde se observa que el compuesto **120** presenta un nuevo centro estereogénico. Sin embargo, Takahashi y col., no le asignan la configuración absoluta al C-8.



Esquema 35. Productos de biotransformación del (+)-neomentol (**116**) con *A. niger*

Takahashi y col., también informan de la biotransformación del (-)- neomentol (**123**) con *A. niger*, para dar productos dihidroxilados en C-2 (**124**), C-6 (**125**), C-7 (**126**), C-8 (**127**), C-9 (**128**) y un compuesto trihidroxilado en C-1 y C-8 (**129**), como se muestra en el esquema 36 [38].



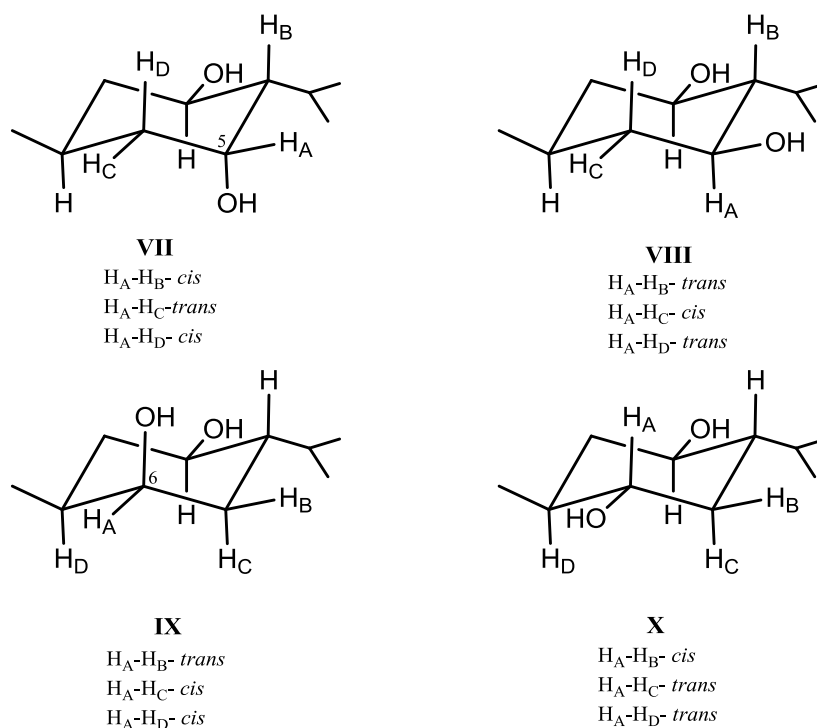
Esquema 36. Biotransformación del (-)-neomentol (**123**) con *A. niger*

De la biotransformación de los neomentoles con *A. niger*, se observa que la hidroxilación no procede de manera *regioespecífica*, de acuerdo a lo mostrado en los esquemas 35-36.

De la biotransformación del (+)-mentol (**109**) con *Macrophomina phaseolina*¹⁷ se obtuvieron los productos de hidroxilación en C-9 [9-hidroximentol, **110**], C-1 [(1*R*)-hidroximentol, **111**], C-6 [6-hidroximentol, **113**], C-8 [8-hidroximentol, **114**] previamente descritos en la literatura [40]. Además se describen los productos (2*R*)-8-dihidroximentol (**130**, 6.4 mg), (8*S*)-9-dihidroximentol (**131**, 5.2 mg), (6*R*)-8-dihidroximentol (**132**, 8.1 mg), (1*R*)-8-dihidroximentol (**133**, 6.8 mg) y 7,8-hidroximentol (**134**, 9.4 mg), ver esquema 37 [43].

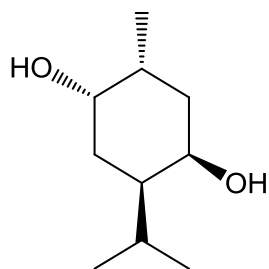
¹⁷ *Macrophomina phaseolina* es un hongo fitopatógeno de la familia *Botryosphaeriaceae*, que causa manchas carbonosas en muchas especies de plantas, entre ellas *Zea mays* y *Pinus elliottii*.

Al comparar los pesos moleculares de **3** (156.27 g/mol) con la sustancia en discusión (172.26 g/mol), se puede deducir que la acción de *G. cingulata*, fue la hidroxilación de la molécula del mentol al aumentar el peso molecular en 16 uma. La presencia del grupo hidroxilo se corroboró mediante sus datos de RMN-¹H, en el cual se observa una señal a campo bajo correspondiente a un grupo metino en δ_H 3.19 (*ddd*, $J=11.0$ y 4.0) y por su EM (IE) donde se observa la pérdida de una molécula de agua (-18 uma). De acuerdo con lo anterior el grupo hidroxilo puede ubicarse en C-5 ó C-6 en la molécula del mentol (**3**) ver esquema 38.



Esquema 38. Posible ubicación del nuevo grupo hidroxilo en la estructura del mentol **3**

En la conformación VII y IX pueden ser excluidas con base en la multiplicidad observada en el espectro de RMN¹H para la sustancia en discusión, mientras las conformaciones VIII (C₅-OHβ_{ec}) y X (C₆-OHα_{ec}) podrían mostrar una multiplicidad (*ddd*) similar a la observada en dicho espectro. La posición y orientación del grupo hidroxilo fue corroborada por su espectro NOESY, donde se observa la interacción a través del espacio del hidrógeno base de oxígeno (H_A) con el hidrógeno ubicado en C-4, por lo tanto el grupo hidroxilo tiene una orientación α_{ec} y corresponde al 6α-hidroxi-mentol (**104**), sustancia previamente descrita en la literatura [40-42].



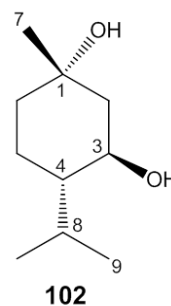
6 α -hidroximentol (104)

La segunda sustancia aislada de la biotransformación del mentol (**3**) con *Glomerella cingulata*, se obtuvo un sólido blanco, de pf. 164°C [CH₂Cl₂/MeOH], de peso molecular 176.28 g/mol con una fórmula molecular C₁₀H₂₀O₂ con una rotación específica [α]= -38.6° (*c* 1.0, CHCl₃). En su espectro de IR se observan las bandas características ν (O-H) alrededor de 3342 cm⁻¹ y ν (C-H) en aproximadamente 3000-2900 cm⁻¹.

Al comparar el espectro de RMN¹³C del mentol y de la sustancia en cuestión, se pueden observar por desacoplamiento total 10 átomos de carbono (10 C) en cada una de las sustancias; los cuales corresponden a 3CH₃, 3CH₂, 4CH aplicando la técnica del DEPT para el mentol (**3**), mientras para el producto de biotransformación se observan 3CH₃, 3CH₂, 3CH y un carbono cuaternario. Por lo cual, se puede concluir que un grupo metino (CH) fue transformado a un carbono cuaternario por el proceso de biotransformación, ver tabla 8.

Tabla 8. δ de RMN ¹H (ppm, J en Hz) y ¹³C (ppm) para el compuesto **102**.
1-hidroxi-mentol

| No. -C | δ_H | | δ_C |
|--------|------------|------------------------|------------|
| 1 | | | 71.4 |
| 2 | | | 50.2 |
| 3 | 3.76 | <i>ddd</i> J=11.0, 4.0 | 68.6 |
| 4 | | | 48.4 |
| 5 | | | 19.3 |
| 6 | | | 38.6 |
| 7 | 1.24 | <i>s</i> | 31.6 |
| 8 | | | 26.1 |
| 9 | 0.85 | <i>d</i> J=7.0 | 16.4 |
| 10 | 0.95 | <i>d</i> J= 7.0 | 20.9 |



La ubicación del grupo hidroxilo adicional se puede proponer en C-1, C-4 y C-8, dando como resultado un carbono cuaternario. Sin embargo, la ubicación del grupo hidroxilo en C-1 es confirmada por la multiplicidad observada en su espectro de RMN¹H (ver tabla 8), donde la señal simple (*s*) en δ_{H} 1.24 *s* (δ_{C} 31.6) corresponde a CH₃-7, el cual se ve desplazado a campo bajo con respecto a CH₃-9 (δ_{H} 0.85, *d*) y CH₃-10 (δ_{H} 0.95, *d*) por la presencia del grupo hidroxilo.

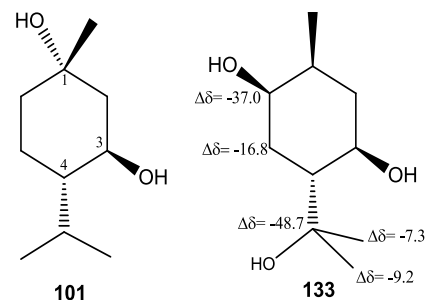
Por lo tanto, al comparar las propiedades físicas y espectroscópicas con las informadas por Asakawa y col. para el 1 α -hidroxi-mentol (**102**), se puede concluir que el producto de la biotransformación de **3** con *G. cingulata* es el compuesto **102** [33-42].

La tercer sustancia aislada de la biotransformación del mentol (**3**) con *Glomerella cingulata*, se obtuvo un aceite de color amarillo, de peso molecular 188.0 g/mol con una fórmula molecular C₁₀H₂₀O₃ y una rotación específica $[\alpha] = +5.2^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃). En su espectro de IR se observan las bandas características $\nu(\text{O-H})$ alrededor de 3332 y 1369 y $\nu(\text{C-H})$ en aproximadamente 3000-2900 cm⁻¹.

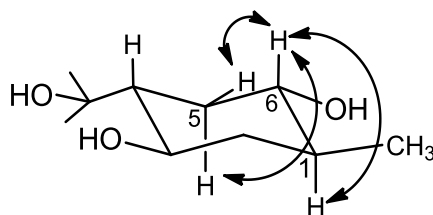
Con base en su espectro de EM (IE) se observa un ion molecular de *m/z* 173 que corresponde a la pérdida de un grupo CH₃ (-15 uma). Al comparar el espectro de RMN¹³C del mentol con la sustancia en cuestión se pueden observar por desacoplamiento total 10 átomos de carbono (10 C), los cuales corresponden a 3CH₃, 2CH₂, 4CH y 1 carbono cuaternario, todos con hibridación sp³ con base en lo observado en su espectro de RMN¹³C aplicando la técnica del DEPT. Además se puede observar, que un grupo metino (CH) fue transformado a un carbono cuaternario (C) y un grupo metileno (CH₂) a un grupo metino (CH), por el proceso de la biotransformación, ver tabla 9.

Tabla 9. Comparación de las constantes espectroscópicas de RMN ^1H (ppm, J en Hz) y ^{13}C (ppm) para los compuesto **102** y **135**.

| No. -C | 6 α ,8-dihidroxi-mentol (135) | | | 102 | | $\Delta\delta = \delta_{102} - \delta_{135}$ |
|-----------------|---|------------|---------------------|---------------------|---------------------|--|
| | δ_{H} | | | δ_{C} | δ_{C} | |
| 1 | 1.41 | <i>ddd</i> | J= 10.0, 10.0 7.0 | 38.1 | 71.4 | 33.3 |
| 2 _{ax} | 1.94 | <i>ddd</i> | J= 13.0, 10.0, 10.0 | 42.2 | 50.2 | 8.0 |
| 2 _{ec} | 1.16 | <i>ddd</i> | J= 13.0, 4.0, 4.0 | | | |
| 3 | 3.77 | <i>ddd</i> | J= 10.3, 10.0, 4.1 | 72.0 | 68.6 | -3.4 |
| 4 | 1.56 | <i>ddd</i> | J= 10.4, 10.3, 4.2 | 51.8 | 48.4 | -3.4 |
| 5 _{ax} | 0.94 | <i>ddd</i> | J= 13.0 10.5 10.5 | 36.1 | 19.3 | -16.8 |
| 5 _{ec} | 1.88 | <i>ddd</i> | J= 13.0, 4.3, 4.2 | | | |
| 6 | 3.21 | <i>ddd</i> | J= 10.5, 10.0, 4.3 | 75.6 | 38.6 | -37.0 |
| 7 | 1.02 | <i>d</i> | J=7.0 | 17.9 | 31.6 | 13.7 |
| 8 | | | | 74.8 | 26.1 | -48.7 |
| 9 | 1.22 | <i>s</i> | | 23.7 | 16.4 | -7.3 |
| 10 | 1.24 | <i>s</i> | | 30.1 | 20.9 | -9.2 |



Al analizar los desplazamientos químicos de la sustancia en discusión con respecto al compuesto **102**, se puede observar que los carbonos C-5 ($\Delta\delta = -16.8$), C-6 ($\Delta\delta = -37.0$), C-8 ($\Delta\delta = -48.7$), C-9 ($\Delta\delta = -7.3$) y C-10 ($\Delta\delta = -9.2$) sufren un efecto de desprotección por la presencia del grupo hidroxilo, donde la desprotección mayor se observa en C-6 y C-8; por lo tanto, es la posición donde pueden ser ubicados los grupos hidroxilos para cumplir con la fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3$. Lo anterior fue confirmado por su espectro de RMN ^1H donde H-6 ($\delta_{\text{H}} = 3.21$), aparece como una señal *ddd* (J= 10.5, 10.0 y 4.3) debido a las interacciones *trans*- diaxiales de H-6 $_{\beta\text{ax}}$ -H-1 $_{\alpha\text{ax}}$ y H-6 $_{\beta\text{ax}}$ -H-5 $_{\alpha\text{ax}}$, y la interacción H-6 $_{\beta\text{ax}}$ -H-5 $_{\beta\text{ec}}$ ver esquema 39. Por lo tanto el producto obtenido de la biotransformación de **3** con *G. cingulata* corresponde al compuesto **135** [33]



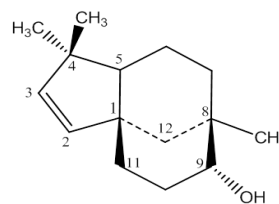
Esquema 39. Interacciones del H-6 $_{\beta\text{ax}}$ con H-5 $_{\beta\text{ec}}$, H-5 $_{\alpha\text{ax}}$ y H-1 $_{\alpha\text{ax}}$ para el compuesto 6 α ,8-hidroximentol (**135**).

8.4 Caracterización e identificación del producto mayoritario obtenido de la transformación química de 1 con p-TsOH.

Del tratamiento del óxido de cariofileno con p-TsOH después de una serie de recromatografías se obtuvo un sólido blanco (27.3 mg) de pf. 76-78°C. Con base en el análisis de sus constantes espectroscópicas de RMN¹H y RMN¹³C, se pudo identificar como el 9α-hidroxi-cloveno (**136**) [44]. En su espectro de RMN¹³C —desacoplamiento total—se observan 15 señales, de las cuales dos corresponden a C_{sp}² y 13 a C_{sp}³. En su espectro DEPT (ver esquema 40) se observan 3CH₃, 5CH₂, 4CH y 3 carbonos cuaternarios, los desplazamientos químicos de RMN¹H y ¹³C se enlistan en la tabla 10.

Tabla 10: Constantes espectroscópicas de RMN ¹H (ppm, J en Hz) y ¹³C (ppm) para el compuesto **136**.

| # Carbono | δ _H | <i>m</i> | δ _C * | δ _C (136) | DEPT | |
|-----------|----------------|----------------------|------------------|----------------------|-----------------|----|
| 1 | | | 50.1 | 50.6 | C | |
| 2 | 5.38 | <i>d</i> | 5.5 | 136.6 | 137.4 | CH |
| 3 | 5.39 | <i>d</i> | 5.5 | 139.0 | 138.8 | CH |
| 4 | | | 48.0 | 48.0 | C | |
| 5 | 1.59 | <i>m</i> | 49.9 | 50.1 | CH | |
| 6 | 2.01 1.36 | <i>m</i> | 33.6 | 34.3 | CH ₂ | |
| 7 | 1.36 1.10 | <i>m</i> <i>m</i> | 33.9 | 34.0 | CH ₂ | |
| 8 | | | Nd | 34.8 | C | |
| 9 | 3.54 | <i>sa</i> | 74.5 | 73.5 | CH | |
| 10 | 2.10 1.85 | <i>m</i> <i>m</i> | 27.5 | 28.3 | CH ₂ | |
| 11 | 1.45 | <i>m</i> | 21.3 | 21.7 | CH ₂ | |
| 12 | 1.89 | <i>m</i> | 35.7 | 36.0 | CH ₂ | |
| 13 | 0.98 | <i>s</i> | 24.9 | 25.1 | CH ₃ | |
| 14 | 1.10 | <i>s</i> | 32.8 | 32.9 | CH ₃ | |
| 15 | 1.17 | <i>s</i> | 28.4 | 29.3 | CH ₃ | |



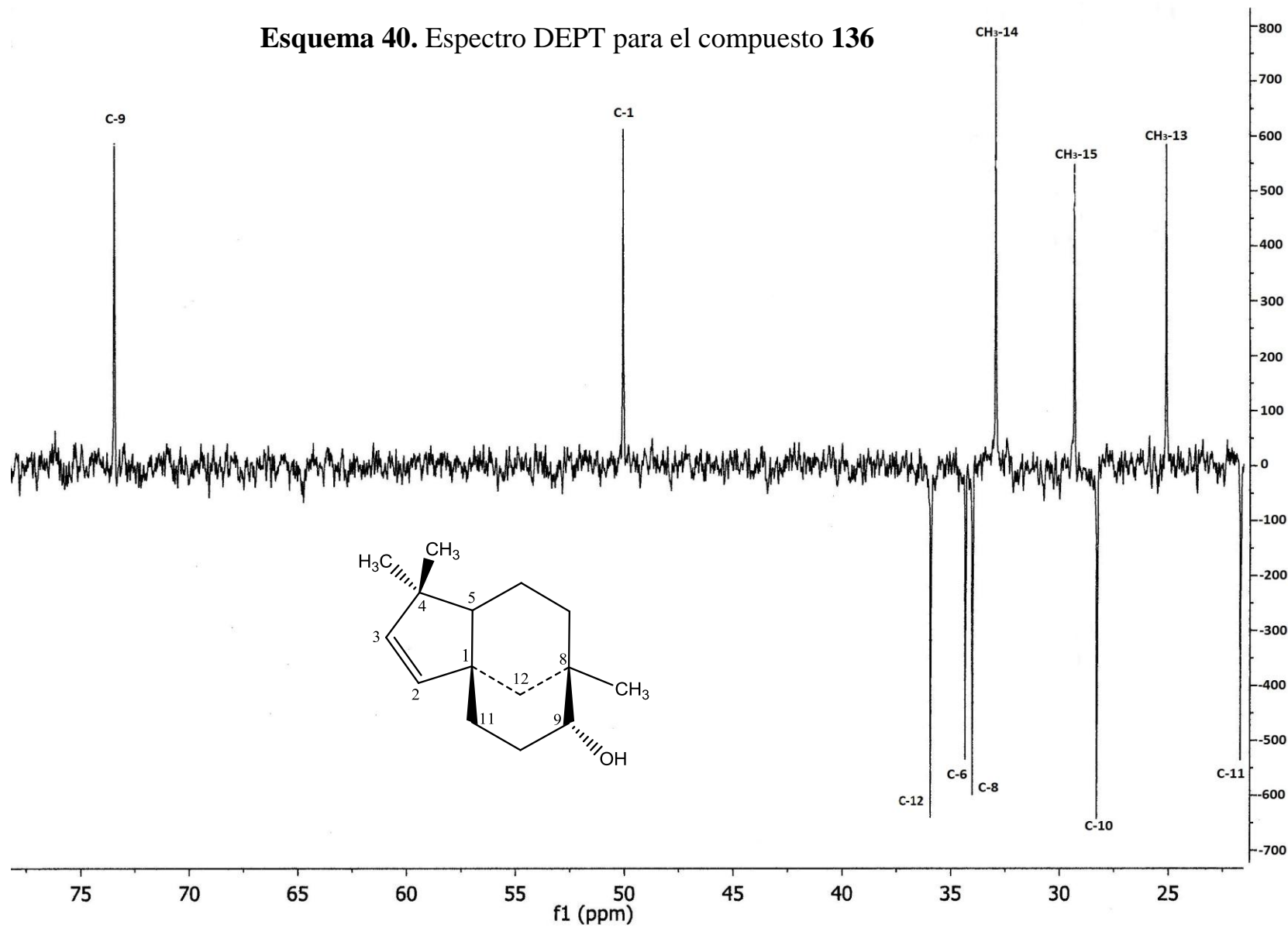
* Heymann, H., et al. [35]

Al comparar los desplazamientos químicos de ¹³C con los informados en la literatura [35, 44] se pudo concluir que se trataba de la misma sustancia. La asignación precisa de los diferentes átomos de carbono e hidrógeno en dicha molécula, se realizó con base en los espectros HMBC y HSQC. En el esquema 41, se observa la interacción a tres enlaces entre el C-9 (δ_C 73.5) y el CH₃-

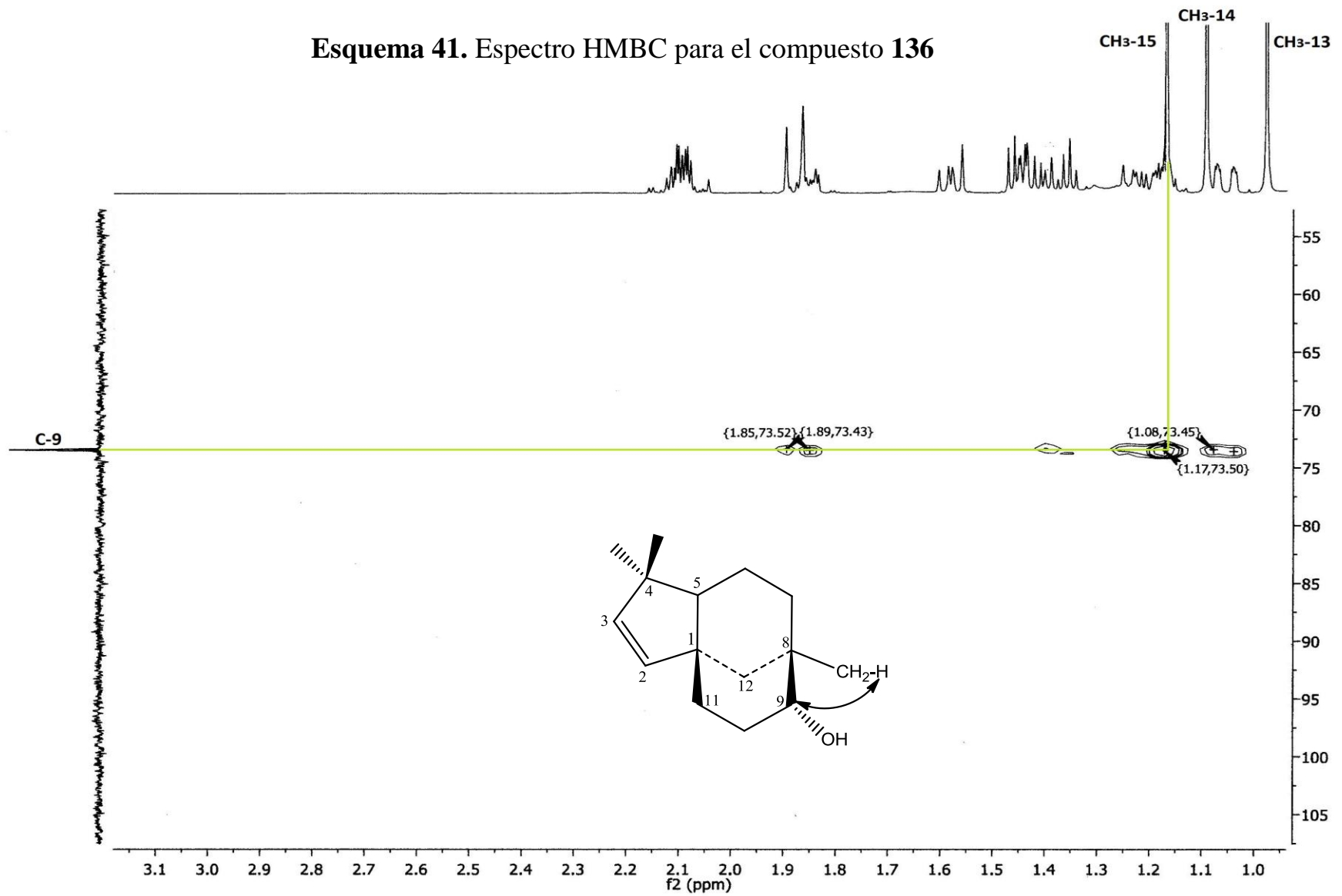
15 (δ_H 1.17); además se observa la interacción a dos enlaces entre el C-8 (δ_C 34.3) y CH₃-15 (δ_H 1.17), la interacción a tres enlaces entre C-12 (δ_C 36.0) y CH₃-15 (δ_H 1.17), lo cual establece que el grupo hidroxilo se encuentra C-9. Asimismo, se observan las interacciones de C-14 (δ_C 32.9) con CH₃-13 (δ_H 0.98) y C-13 (δ_C 25.1) con CH₃-14 (δ_H 1.10), lo que sugiere que ambos grupos metilos se encuentran unidos a C-4, ver esquema 42.

La obtención del compuesto **136** a partir del óxido de cariofileno (**1**) en medio ácido sugiere que las condiciones del medio de cultivo en la biotransformación con *C. gloeosporioides*, no son lo suficientemente acidas para favorecer la formación de **136**, vía un rearrreglo de **1** en medio ácido [35,45].

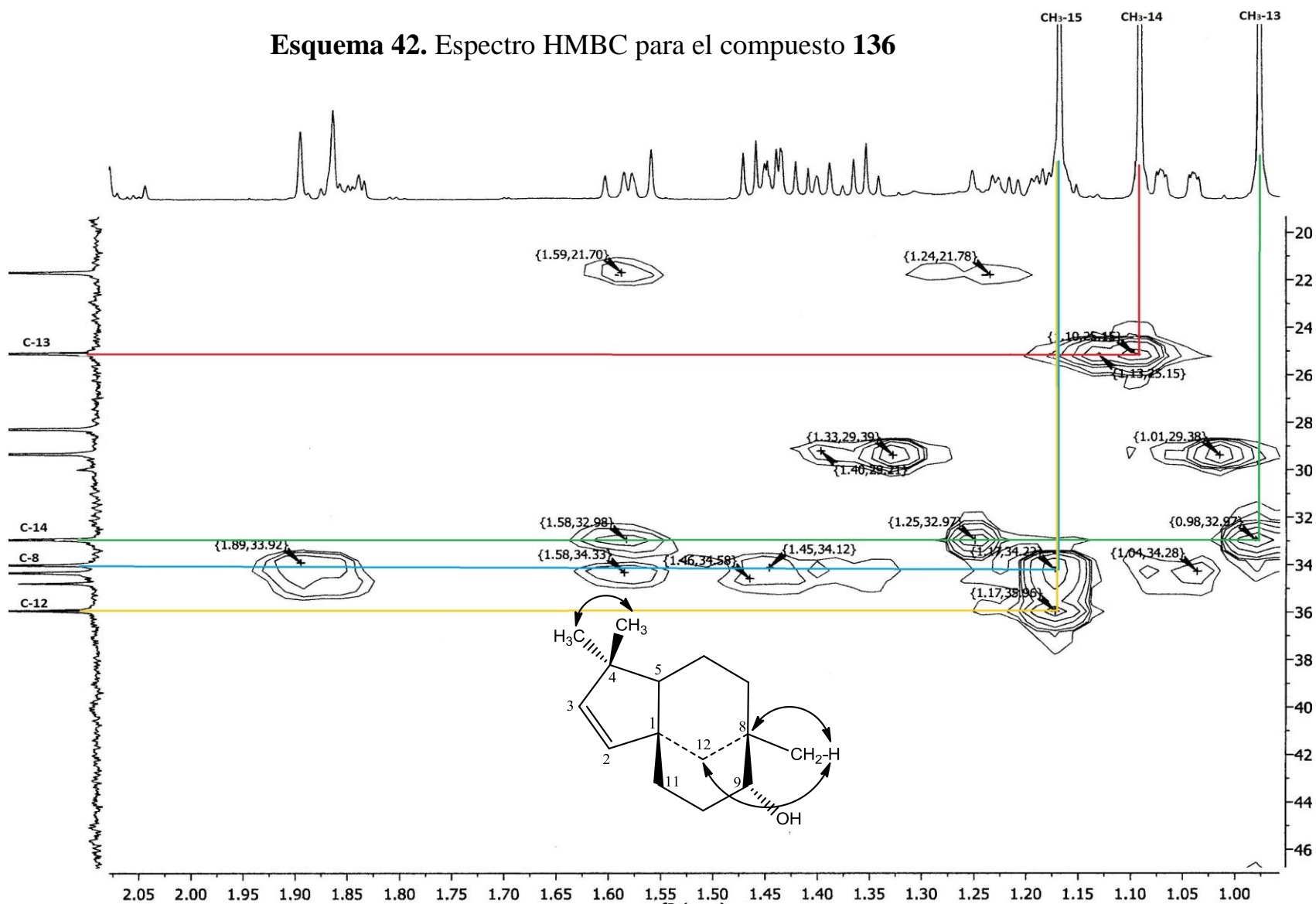
Esquema 40. Espectro DEPT para el compuesto 136



Esquema 41. Espectro HMBC para el compuesto 136



Esquema 42. Espectro HMBC para el compuesto 136



Conclusiones

- En el presente trabajo no se logró el aislamiento e identificación de *C. gloeosporioides* a partir del fruto del mango; sin embargo, se identificó especies pertenecientes al género *Aspergillus spp.*
- Se logró inducir, aislar y purificar la fitoalexina mayoritaria presente en el extracto metanólico de *Mangifera indica* L. y obtener el derivado acetilado correspondiente de dicha sustancia.
- De la biotransformación del óxido de cariofileno con *Colletotrichum gloeosporioides* en medio YEPGA, se aislaron e identificaron los productos 4,5-epoxi-cariofilen-8(13)-en-14-ol (**94**) y el 8,13-dihidroxi-4,5-epoxi-cariofileno (**98**).
- De la biotransformación del isomentol (**2**) con *Glomerella cingulata* en medio YEPGA, se aislaron e identificaron los productos de “biohidroxilación”, 1-hidroxi-isomentol (**99**) y 5 α -hidroxi-isomentol (**100**).
- De la biotransformación del mentol 3 con *Glomerella cingulata* en medio YEPGA, se aislaron e identificaron los productos de “biohidroxilación”, 1 α -hidroximentol (**102**), 6 α -hidroximentol (**104**) y 6 α ,8-dihidroximentol (**135**).
- Del tratamiento del óxido de cariofileno (**1**) con Ac. p-TsOH se obtuvo el 9 α -hidroxicloveno (**136**), la ausencia de dicha sustancia en los productos de biotransformación de **1** con *C. gloeosporioides* sugiere que el medio de cultivo no tiene el grado de acidez necesario para obtener dicho compuesto.

Sugerencias

1. Aislamiento y determinación del hongo.

Se sugiere enfatizar en el aislamiento del hongo a partir de otras fuentes naturales, para poder determinar su presencia en el periodo de la infección, ya que en el fruto del mango con un gran avance de descomposición se encontró predominantemente, especies del genero *Aspergillus*.

2. Biotransformación cuantitativa del óxido de cariofileno (1), isomentol (2) y mentol (3)

Con base en los resultados obtenidos se debe considerar la posibilidad de realizar las biotransformaciones de los compuestos **1**, **2** y **3**, utilizando una mayor cantidad de matraces con la finalidad de incrementar el rendimiento de los productos de biotransformación.

3. Realizar la separación cromatográfica de los productos de biotransformación empleando técnicas de separación más finas para determinar las sustancias minoritarias.

Realizar la separación cromatográfica de los productos de biotransformación de **1**, **2** y **3** por medio de HPLC, para poder identificar y caracterizar a los compuestos minoritarios.

4. Evaluación biológica de los productos mayoritarios de la biotransformación.

Se sugiere realizar la evaluación biológica [Actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antifúngica] de los productos mayoritarios de biotransformación del óxido de cariofileno (**1**), isomentol (**2**) y mentol (**3**).

Bibliografía

1. Ibarra E, J.; M, C, Del rincón, E, Galindo, *et al.* Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **2006**, *48*, 113-120.
2. Niembro R. A., Árboles y arbustos útiles de México naturales e inducidos, Edit. Limusa, 2° Edición, México D.F. **1990**, pp. 125.
3. Michel-Aceves, A. C.; Otero-Sánchez, M. A.; Solano. Pascacio, L.Y., Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb, y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes causales de la “Escoba de bruja” del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología.* **2009**, *27*, 18-26.
4. Noriega-Cantú D, et al. Epidemiology of Mango malformation in Guerrero, México, with traditional and integrated Management. *Plant Disease.* **1999**, *83*, 223 – 228.
5. Toledo, M. C., *et al.*, Elaboración del programa de necesidades de investigación y transferencia de tecnología en el estado de Guerrero. Red para el desarrollo Sostenible de México, A. C. **2003**, pp. 22-34. www.snitt.org.mx/pdfs/demanda/coco.pdf
6. Herrera, T.; Ulloa, M., El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. **1990**, Editorial Fondo de Cultura Económica UNAM, México D. F. pp. 196-252.
7. De los Santos V. S.; Folter, S.; Délano F. J.; Gómez L. M. A., Puntos críticos en el manejo integral de mango: floración, antracnosis y residuos industriales. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* **2011**, *2*, 221-234.
8. Sutton, B. C., in: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Vol. 1, Bailey J. A. and Jeger M. J., Ed., CAB Int., Wallingford, **1992**, 1-15.
9. Dodd, J. C.; Estrada, A.; Jeger M. J., in: *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Vol. 16, Bailey J. A. and Jeger M. J., Ed., CAB Int., Wallingford. **1992**, 308-313.
10. Agrios, G. N., Fitopatología. **2011**, 2° Ed., Editorial Limusa. México D.F. pp. 393-401.
11. García M, R.; Pérez L, R., Fitoalexinas: Mecanismo de defensa a las plantas. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.*, **2003**, *9*, 5- 10.

12. Kuc, J., Phytoalexins, Stress Metabolism, and Disease Resistance in Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1995**, *33*: 273-297.
13. Brooks, C. J. W.; Watson, D. J., Phytoalexins. *Nat. Prod. Rep.* **1985**, *2*, 431- 440.
14. Marco, J. A., Química de los productos naturales: aspectos fundamentales del metabolismo secundario, Edit. Síntesis, España, **2006**, pp. 190-196.
15. Pollard, D. J.; Woodley, J. M., Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol.* **2006**, *25*, 66-73.
16. Lehman, L. R.; Stewart, J. D., Filamentous fungi: potentially useful catalyst for the biohydroxylations of non-activated carbon centers. *Curr. Org. Chem.* **2001**, *5*, 439-470.
17. Schulze B.; Wubbolts, M, G., Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 609- 615.
18. García-Pajón, C. M., Hernández-Galán, R., Collado, I. G., Biotransformations by *Colletotrichum* species. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14*, 1229- 1239.
19. Soby, S.; Bates, R.; Van Etten, H. Oxidation of the phytoalexin maackiain to 6, 6 α -dihidroxy- maackiain by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 925-929.
20. Miyazawa, H.; Suzuki, Y.; Kameoka, H., Biotransformation of (-)-*cis*-myrtenol and (+)-*trans*-myrtenol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 935-943.
21. Miyazawa, M.; Suzuki, Y.; Kameoka, H., Biotransformation of (-)-nopol by *Glomerella cingulata*, *Phytochemistry* **1995**, *9*, 337-340.
22. Miyazawa, M.; Suzuki, Y.; Kamboka, H., Biotransformation of (-) and (+)-isopinocampheol by three fungi. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 945-950.

23. Miyazawa, M.; Yokote, K; Kameoka, H., Resolution of racemic linalool oxide-pyranoid by microbial esterification. *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *5*, 1067-1068.
24. Miyazawa, M.; Hongo, Y.; Kameoka, H., Biotransformation of the sesquiterpenoid β -selinene using the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata* as a biocatalyst. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 433-436
25. Miyazawa, M.; Nankai, H.; Kameoka, H., Biotransformation of (-)- α -bisabolol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 1077-1080.
26. Miyazawa, M.; Nankai, H.; Kameoka, H., Biotransformation of (+)-cedrol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 69-72.
27. Miyazawa, M.; Honjo, Y.; Kameoka, H., Biotransformation of the sesquiterpenoid (+)- γ -gurjumene using a plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*, as a biocatalyst. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1283-1285.
28. Miyazawa, M., Uemura, T., Kameoka, H., Biotransformation of sesquiterpenoids, (+)-aromadendrene and (-)-alloaromadendrene by *Glomerella cingulata*. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 793-796.
29. Miyazawa, M., Uemura, T., Kameoka, H., Biotransformation of sesquiterpenoids, (-)-globulol and (+)-ledol by *Glomerella cingulata*. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1027-1030.
30. Echeverry, F.; Torres, F.; Quiñones, W.; Cardona, G.; Archbold, R.; Roldan, J. Brito, I.; Luis, J. G.; Lahlou, El-H., Danielone, a phytoalexin from papaya fruit. *Phytochemistry*, **1997**, *44*, 255- 256.
31. Coll, J. C.; Bowden, B. F., The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 936-939.
32. Barnett, H. L.; Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing. 2^o Ed. Minezota USA. **1955**, pp. 200-201.

33. Miyazawa, M.; Kawazoe, H.; Hyakumachi, M., Biotransformation of *l*-menthol by twelve isolates of soil-borne pathogenic fungi (*Rhizoctonia solani*) and classification of fungi, *J Chem Technol Biotechnol*, **2003**, 78, 620-625.
34. Duran, R.; Corrales, E.; Hernandez-Galán R.; Collado, I. G., Biotransformation of Caryophyllene Oxide by *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 41-44.
35. Wolf-Rainer, A.; Ludger E.; Burghard S., Biotransformation of caryophyllene by *Diplodia gossypina*. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 115-120.
36. Noma, Y.; Hashimoto, T.; Uehara, S.; Asakawa, Y., Microbial transformation of isopinocampheol and caryophyllene oxide. *Flavour Fragr. J.* **2010**, 25, 161-170.
37. Gondal, H., Y.; Choudhary, M., I.; Khan, A., A., Microbial transformations of (+)-isomentol by *Fusarium lini* and *Rhizopus stolonifer*. *Chem. Pharm. Bull*, **2011**, 50 874-875.
38. Takahashi, H.; Noma, Y., Biotransformation of (-) and (+)- neomenthols and isomenthol by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry*, **1994**, 35, 1465-1467.
39. Eliel, E. L.; Wilen, S. H.; Stereochemistry of Organic Compounds. Edit. John Wiley & Sons, Inc., USA, pp. 690-709.
40. Asakawa, Y.; Takahashi, H.; Toyota, M.; Noma, Y., Biotransformation of monoterpenoids, (-) and (+)-menthols, terpinolene and carvotanacetone by *Aspergillus species*. *Phytochemistry*. **1991**, 30, 3981- 3987.
41. Miyazawa, M.; Kawazoe, H.; Hyakumachi, M., Biotransformation of *l*-menthol by soil-borne plant pathogenic fungi (*Rhizoctonia solani*), *J Chem Technol Biotechnol*, **2001**, 77, 21-24.
42. Miyazawa, M.; Kawazoe, H.; Hyakumachi, M., Biopreparation of (-)-(1S,3R,4S,6S)-6-Hydroxymenthol and (-)-(1S,3R,4S)-1-Hydroxymenthol from *l*-Menthol by *Rhizoctonia solani* AG-1-1A and 1B, *J. Nat. Prod*, **2003**, 17, 307-311.

43. Musharraf, S., G.; Ahmed, M., A.; Ali, R., A.; Choudhary, M., I., Hydroxylation of (+)-menthol by *Macrophomina phaseolina*. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2011**, *29*, 77-82.
44. Heymann, H.; Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; Supriyatna, S., Constituents of *Sindora sumatrana* MIQ. I. Isolation and NMR Spectral Analysis of Sesquiterpenes from the Dried Pods. *Chem Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 138-146.
45. Tatarova, L. E.; Korchagina, D. V.; Barkhash, V. A., Reactions of caryophyllene 4 β , 5 α -Epoxide with Carbonyl Compounds on Clay. *Russian J. Org. Chem.* **2002**, *38*, 519-524.