

33  
2 Gen.

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**Hidroxilación Microbiológica de un Esteroide  
(17 Acetato de "Compuesto S") en posición 11**

**T E S I S**

**Que para obtener el Título de**

**QUIMICO**

**P r e s e n t a**

**PORFIRIO PEREYRA MONROY**



**México, D. F.**

**1985**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

### INTRODUCCIÓN

- I. ESTEROIDES
  - 1.1 GENERALIDADES
    - 1.1.1. ESTRUCTURA Y NOMENCLATURA BÁSICA
    - 1.2. CORTICOIDES
      - 1.2.1. CLASIFICACIÓN
      - 1.2.2. LOS GLUCOCORTICOIDES
      - 1.2.3. ESTRUCTURA
      - 1.2.4. BIOSÍNTESIS EN EL ORGANISMO HUMANO
      - 1.2.5. ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA Y ANTIREUMÁTICA
      - 1.2.6. METABOLISMO Y ACTIVIDAD
  2. EL MICROORGANISMO
    - 2.1. LOS MICROORGANISMOS Y SU UTILIZACIÓN EN LA TRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES
    - 2.2. CLASIFICACIÓN
      - 2.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO CURVULARIA
      - 2.2.2. CURVULARIA BOEDJIN
    - 2.3. UTILIZACIÓN DE CURVULARIA LUNATA PARA LA HIDROXILACIÓN DEL ESTEROIDE
      - 2.3.1. CONDICIONES Y CARACTERÍSTICAS EN LA UTILIZACIÓN DE CURVULARIA LUNATA PARA LA HIDROXILACIÓN DEL ESTEROIDE

2.4. ORIGEN DEL OXÍGENO DEL HIDROXILO Y CURSO,  
ESTÉRICO DE LA REACCIÓN

3. PARTE EXPERIMENTAL

INDICE DE EXPERIMENTOS

3.1. CRECIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CURVULARIA LUNATA  
(CLT-123)

3.1.1. CRECIMIENTO DE CURVULARIA LUNATA (CLT-123)

3.1.2. TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

3.1.3. IDENTIFICACIÓN

3.2. OBTENCIÓN DE MICELIO DE CURVULARIA LUNATA (CLT-123)

3.2.1. RESIEMBRA MEDIO SÓLIDO SDA A MEDIO LÍQUIDO VCG-1

3.2.2. VARIACIÓN DE TIEMPO DE CRECIMIENTO CON VCG-1

3.2.3. VARIACIÓN DE PH

3.2.4. RESIEMBRA DE MEDIO VCG-1 A MEDIO VCG-2

3.2.4.1. VARIACIÓN DE TIEMPO DE CRECIMIENTO CON VCG-2

3.2.4.2. VARIACIÓN DE PH

3.2.5. CULTIVO FINAL. DE MEDIO VCG-2 A MEDIO CG

3.2.5.1. RESIEMBRA DE MEDIO VCG-2 A MEDIO CG-60 Y CG-40

3.2.5.2. VARIACIÓN DE PH

3.2.6. ALMACENAMIENTO DE MICELIO DE CURVULARIA LUNATA  
(CLT-123)

3.3. TRANSFORMACIÓN DEL ESTEROIDE (17 ACETATO DE - , -  
"COMPUESTO S")

3.3.1. PREPARACIÓN DEL ESTEROIDE

3.3.2. ADICIÓN DE MICELIO DE CURVULARIA LUNATA (CLT-123)

3.3.2.1. BIOTRANSFORMACIÓN DEL ESTEROIDE

3.3.2.2. EXTRACCIÓN

3.3.3. VARIACIONES

3.3.3.1. DE PH

3.3.3.2. DE CRECIMIENTO DE MICELIO DE CURVULARIA LUNATA DE  
DIFERENTE MEDIO DE CULTIVO

3.3.3.3. DE REUTILIZACIÓN DE CURVULARIA LUNATA (CLT-123)

3.3.4. OBTENCIÓN DE PRODUCTO

3.3.5. OPTIMIZACIÓN

3.3.6. RESULTADOS

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

## INTRODUCCIÓN

LA INDUSTRIA DE ESTEROIDES FUÉ DURANTE LOS PASADOS AÑOS, UNA DE LAS MÁS IMPORTANTES DENTRO DE LA INDUSTRIA QUÍMICO-FARMACÉUTICA YA QUE SU PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES HIZO POSIBLE REALIZAR EXPORTACIONES CON UN RESULTADO POSITIVO EN LA BALANZA DE COMERCIO EXTERIOR. DESAFORTUNADAMENTE SURGIERON PROBLEMAS EN 1975, QUE HICIERON CAER EN FORMA VERTICAL ESAS EXPORTACIONES Y MÉXICO DEJÓ DE SER EL PRINCIPAL PROVEEDOR DE HORMONAS ESTEROIDES AL MERCADO INTERNACIONAL. ÉSTA CIRCUNSTANCIA PROPICIÓ EL DESARROLLO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS EN EL EXTRANJERO, QUE LOGRARON SÍNTESIS - COMPETITIVAS.

EN LA ACTUALIDAD LA INDUSTRIA NACIONAL ESTÁ TRABAJANDO POR DEBAJO DE SU CAPACIDAD INSTALADA, SIN EMBARGO, EL DESARROLLO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS A PARTIR DE PRODUCTOS NATURALES Y SUS DERIVADOS SEMI-SINTÉTICOS EN LA OBTENCIÓN DE ESTEROIDES, HA DADO RESULTADOS FAVORABLES.

LAS INVESTIGACIONES A PARTIR DE MÉTODOS BIOLÓGICOS HAN DADO MEJORES RESULTADOS RESPECTO A MÉTODOS QUÍMICOS, POR LAS VENTAJAS -- QUE PRESENTA EN EL USO DE FERMENTACIONES CON MICROORGANISMOS.

ÉSTOS POR TRADICIÓN FUERON PROBADOS PARA TRANSFORMAR DIVERSOS ALIMENTOS Y BEBIDAS, LO QUE DIÓ ORIGEN A UNA INVESTIGACIÓN SISTEMÁTICA Y PERMANENTE DONDE UNO DE LOS PRIMEROS RESULTADOS FUÉ LA OBTENCIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

EL PRESENTE TRABAJO TIENE COMO ENTE BIOLÓGICO A LOS HONGOS LLA-

MADOS "MOHOS" QUE SON ORGANISMOS QUE TIENEN UN SISTEMA ENZIMÁTICO CAPAZ DE TRANSFORMAR EL NÚCLEO BÁSICO DE LOS ESTEROIDES, OBTENIENDO UN COMPUESTO FISIOLÓGICAMENTE ACTIVO PARA UTILIZARSE EN EL TRATAMIENTO DE ALGUNAS ENFERMEDADES DEL ORGANISMO HUMANO. (12)

LOS OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACIÓN SON:

- A) POR UN MÉTODO MICROBIOLÓGICO OBTENER UN COMPUESTO ESTEROIDE ("HIDROCORTISONA") FISIOLÓGICAMENTE ACTIVO.
- B) A TRAVÉS DE UN MICROORGANISMO LLAMADO CURVULARIA LUNATA, DESARROLLAR UNA TECNOLOGÍA PROPIA A NIVEL PRIMARIO EN LA PRODUCCIÓN DE UN ESTEROIDE ("HIDROCORTISONA") PARA SATISFACER LAS NECESIDADES DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA NACIONAL. (32)

## I. ESTEROIDES.

### 1.1 GENERALIDADES.

LA PALABRA "ESTEROL" QUE PROVIENE DEL GRIEGO "ESTEREOS" (SÓLIDO) EN UN PRINCIPIO FUÉ APLICADA A ALCOHÓLES OBTENIDOS DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DE LOS EXTRACTOS LÍPIDOS DE LOS TEJIDOS.

TIEMPO DESPUÉS SE CAMBIA ÉSTA Y SE UTILIZA LA PALABRA "ESTEROIDE" PARA NOMBRAR A UN GRUPO DE MOLÉCULAS ORGÁNICAS DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA, QUE POSEEN UNA ESTRUCTURA FUNDAMENTAL DEL TIPO DE LOS ESTEROLES Y QUE INCLUYE UNA GRAN VARIEDAD DE COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL COMO SON: LOS ESTEROLES, LOS ÁCIDOS BILIARES, LAS HORMONAS SEXUALES, LAS SAPOGENINAS, ALGUNOS ALCALOIDES, LOS GLUCÓSIDOS CARDIOTIÓNICOS Y LAS HORMONAS ADRENOCORTICALES QUE SON DE INTERÉS EN EL PRESENTE TRABAJO.

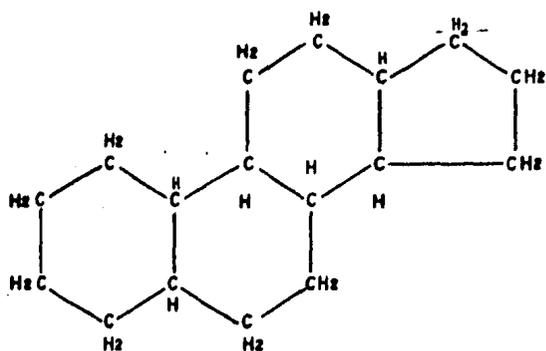
EL DESARROLLO DE LA QUÍMICA DE LOS ESTEROIDES SE HA DIVIDIDO EN 4 PERIÓDOS QUE SON:

- I ANTIGUO. HASTA 1900.
- II CLÁSICO. 1900-1932. CUANDO SE ESTABLECIÓ LA ESTRUCTURA FUNDAMENTAL DEL NÚCLEO ESTEROIDAL.
- III MODERNO. 1932-1947. ÉPOCA EN QUE SE DILUCIDÓ LA QUÍMICA BÁSICA DE LOS ESTEROIDES DE ORI--

GEN NATURAL.

IV. CONTEMPORÁNEO. DE 1947 A LA FECHA. LAPSO EN -  
QUE GRAN PARTE DE LA INVESTIGACIÓN HA SIDO  
PARA LA SÍNTESIS DE "CORTISONA", "HIDROCORTISONA" Y CORTICOIDES SIMILARES.

ESTE ÚLTIMO PERÍODO SE DEFINIÓ POR LA GRAN DEMANDA EN LA TERAPEÚTICA DE LAS HORMONAS "CORTISONA", "HIDROCORTISONA" Y CORTICOIDES RELACIONADOS. LA SÍNTESIS PARCIAL Y TOTAL DE ESTAS HORMONAS PROPICIÓ UNA SERIE DE RESULTADOS IMPORTANTES COMO SON MÉTODOS, REACCIONES Y REACTIVOS NUEVOS. (4)



CICLOPENTANO PERHIDROFENANTRENO

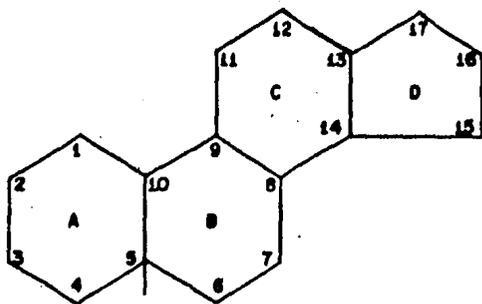


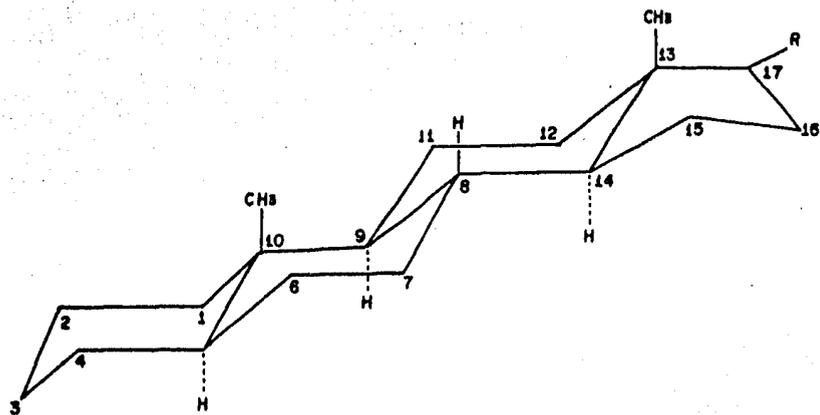
FIGURA 1

### 1.1.1. ESTRUCTURA Y NOMENCLATURA BÁSICA.

LOS ESTEROIDES POSEEN UN NÚCLEO BÁSICO, CICLOPENTANO PERHIDROFENANTRENO, Y SU ESTRUCTURA NO ES REPRESENTADA CON LOS ÁTOMOS DE CARBONO E HIDRÓGENO (FIG. 1). EL NÚCLEO ESTEROIDAL SE REPRESENTA EN FORMA DE UN ANILLO HEXAGONAL POR CADA 6 CARBONOS UNIDOS, Y UN ANILLO PENTAGONAL POR CADA 5 CARBONOS UNIDOS. -- LOS HIDRÓGENOS SE OMITEN EN LA ESTRUCTURA DEJANDO IMPLÍCITO -- QUE CADA CARBONO COMPLETA SUS 4 VALENCIAS CON HIDRÓGENOS. - (FIG. 1).

EN EL NÚCLEO ESTEROIDAL EXISTEN 3 TIPOS DE CARBONO CON BASE - AL NÚMERO DE HIDRÓGENOS UNIDOS A CADA CARBONO. EL CARBONO SECUNDARIO TIENE 2 CARBONOS ADYACENTES Y 2 HIDRÓGENOS. EL CARBONO TERCIARIO ESTÁ UNIDO A 3 CARBONOS, ES COMÚN A 2 ANILLOS DEL NÚCLEO ESTEROIDAL Y TIENE 1 HIDRÓGENO. LOS CARBONOS 10 Y 13 DEL ANILLO ESTEROIDAL ESTÁN UNIDOS A 4 CARBONOS LLAMÁNDOSE CARBONOS CUATERNARIOS. LA NUMERACIÓN DE LOS CARBONOS EN EL NÚCLEO DEL ESTEROIDE ES CON NÚMEROS ÁRABIGOS Y LOS ANILLOS SON DESIGNADOS CON LETRAS A, B, C Y D DE IZQUIERDA A DERECHA RESPECTIVAMENTE, POR DONDE EMPIEZA LA NUMERACIÓN (FIG.1). EL NÚCLEO BÁSICO ES DE 17 CARBONOS, Y LOS CARBONOS 18 Y 19 ESTÁN LOCALIZADOS ENTRE LOS ANILLOS C:D Y A:B RESPECTIVAMENTE.

EL NÚCLEO ESTEROIDAL NO ES PLANO COMO SE REPRESENTA EN EL PAPEL; SU ESTEREOQUÍMICA PRESENTA UNA CONFORMACIÓN EN DIVERSOS



NUCLEO ESTEROIDAL VISTO EN PERSPECTIVA

FIGURA 2

PLANOS (FIG. 2).

LOS ANILLOS A, B, C Y D SON CAPACES DE EXISTIR EN FORMA DE BOTE O DE SILLA Y ÉSTA PREDOMINA EN LA CONFORMACIÓN DEL ESTEROIDE (18).

LAS HORMONAS DEL TIPO DE LOS ESTEROIDES TIENEN UNIÓN TRANS ENTRE LOS ANILLOS B:C Y C:D Y ESTÁN EN FORMA DE SILLA (LA DEFINICIÓN DE UNIÓN TRANS ES QUE LOS SUSTITUYENTES ESTÁN -- ORIENTADOS HACIA POSICIONES OPUESTAS EN EL PLANO DE REFERENCIA Y PARA ORIENTACIÓN CIS ES QUE ESTOS SUSTITUYENTES ESTÁN HACIA EL MISMO LADO DEL PLANO DE REFERENCIA).

EL ANILLO A CUANDO ES AROMÁTICO TIENE FORMA DE CUASI-BOTE - YA QUE EL DOBLE ENLACE EN EL CARBONO 4 INCREMENTA SU PLANARIDAD. ESTAS DIFERENCIAS EN LA CONFORMACIÓN DEL ESTEROIDE - TIENEN GRAN INFLUENCIA EN SUS PROPIEDADES BIOLÓGICAS (26).

## 1.2. CORTICOIDES.

### 1.2.1. CLASIFICACIÓN.

EL GRUPO DE LOS ESTEROIDES ADRENOCÓRTICALES O CORTICOIDES SE DIVIDE PARA SU ESTUDIO EN 2 GRUPOS PRINCIPALES:

1) LOS GLUCOCORTICOIDES QUE POSEEN UN GRUPO FUNCIONAL CON UN ÁTOMO DE OXÍGENO EN CARBONO 11 (11 OXICORTICOIDES) DE SU NÚCLEO BÁSICO, TIENEN ACCIONES SOBRE EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS. Y ANTIINFLAMATORIA Y ANTIREUMÁTICA EN TEJIDOS Y HUESOS EN EL ORGANISMO HUMANO.

2) LOS MINERALOCORTICOIDES, CON ACCIÓN PREPONDERANTE SOBRE LOS ELECTROLITOS Y EL AGUA EN LAS CÉLULAS DE LOS TEJIDOS DEL ORGANISMO.

### 1.2.2. LOS GLUCOCORTICOIDES.

EN LA CORTEZA SUPRARRENAL DEL ORGANISMO HUMANO SE ENCUENTRAN -  
LOS SIGUIENTES CORTICOIDES QUE POSEEN UNA ACCIÓN REGULADORA SO  
BRE EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y UNA ACCIÓN ANTIINFLAMATQ  
RIA Y ANTIREUMÁTICA:

- A) CORTICOSTERONA
- B) CORTISONA o 17-HIDROXI-11-DEHIDROCORTICOSTERONA
- C) HIDROCORTISONA o CORTISOL (HIDROCORTISONA) o 17-HIDROXI--  
CORTICOSTERONA, QUE ES MUY EMPLEADA EN LA TERAPÉUTICA SO--  
BRE PADECIMIENTOS DEL HOMBRE Y QUE ES MOTIVO DE PERMANENTE  
ESTUDIO PARA SU MEJOR OBTENCIÓN Y APLICACIÓN.

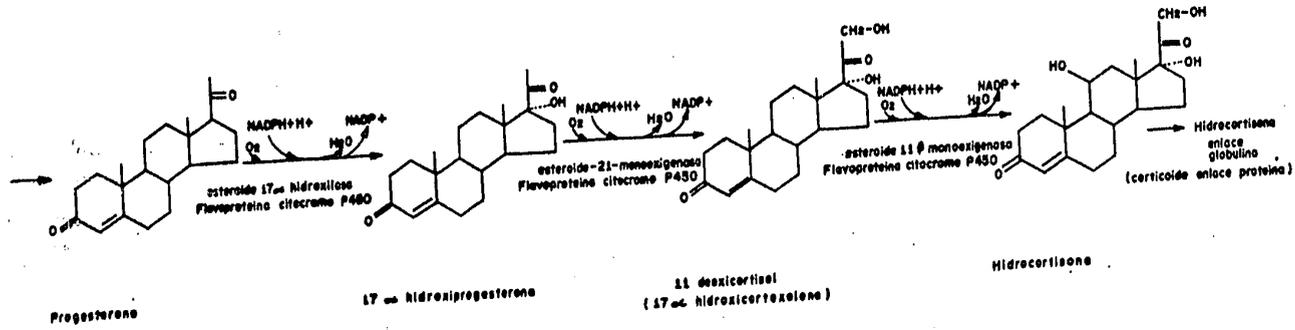
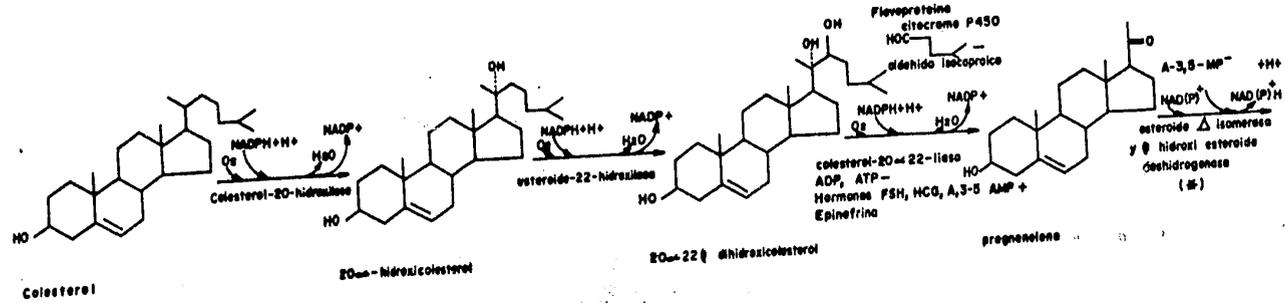
### 1.2.3. ESTRUCTURA

LOS CORTICOIDES SON UN GRUPO DE ESTEROIDES CON 21 CARBONOS Y SE CARACTERIZAN POR LO SIGUIENTE:

- 1.-UN DOBLE ENLACE EN CARBONO 4 Y UN GRUPO OXO EN CARBONO 3 (SE NOMBRAN GENÉRICAMENTE COMO 4-EN-3-ONA).
- 2.-UNA CADENA LATERAL EN CARBONO 17.
- 3.-UN GRUPO HIDROXILO EN CARBONO 21, CON UN GRUPO OXO EN CARBONO 20.
- 4.-UN GRUPO FUNCIONAL HIDROXILO U OXO, ALGUNO DE LOS CUALES PUEDE O NO ESTAR EN CARBONO 11.

### 1.2.4. BIOSÍNTESIS EN EL ORGANISMO HUMANO.

TODAS LAS HORMONAS ADRENOCORTICALES O CORTICOIDES SE SINTETIZAN EN LA CÉLULA A PARTIR DE COLESTEROL (FIG. 3). PARA LA FORMACIÓN DE "HIDROCORTISONA" INTERVIENEN LAS ENZIMAS 11, 17 Y 21 HIDROXILASAS RESPECTIVAMENTE, ASÍ COMO TAMBIÉN LA PRESENCIA DE DINUCLEÓTIDO DE NICOTINAMIDA Y ADENINA (NADP) NECESARIO PARA QUE SE EFECTÚE LA BIOSÍNTESIS DE ESTE COMPUESTO Y OTROS AFINES EN LAS CÉLULAS.



**OBTENCION DE Hidrocortisona EN LA CELULA**

(\* la existencia de 2 enzimas ha sido establecida en microorganismos, pero no ha sido aclarada)

### 1.2.5. ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA Y ANTIREUMÁTICA.

EN EL HOMBRE LOS GLUCOCORTICOIDES CONSTITUYEN LOS FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS POR EXCELENCIA. ÉSTOS SON LOS MÁS POTENTES - YA QUE TIENEN LA PROPIEDAD DE INHIBIR TODO TIPO DE INFLAMACIÓN YA SEA DESEABLE O ÚTIL (MECANISMO DE DEFENSA), O INDESEABLES O INÚTILES (QUE PRODUCE DAÑOS), A CAUSA DE AGENTES INFECCIOSOS, IRRITANTES Y AGRESIVOS.

LOS CORTICOIDES INHIBEN LA FORMACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS, EL TEJIDO DE GRANULACIÓN Y EL DEPÓSITO DE SUSTANCIA FUNDAMENTAL (Ó GEL) DEL TEJIDO CONECTIVO, CON PRESERVACIÓN DEL TEJIDO EPITELIAL Y DEL ENDOTELIO CAPILAR. ES EL CASO DE "HIDROCORTISONA", EL GLUCOCORTICOIDE MÁS ACTIVO DE ESTOS COMPUESTOS YA QUE SUPRIME LA INFLAMACIÓN DE LOS TEJIDOS, ACTUANDO EN LOS FIBROBLASTOS, QUE SON IMPORTANTES CÉLULAS DE ATAQUE. LA "HIDROCORTISONA" EN DOSIS FISIOLÓGICAS ORIGINA CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LOS FIBROBLASTOS EN VIVO.

EN RESUMEN, LA "HIDROCORTISONA" Y LOS DEMÁS CORTICOIDES, INHIBEN LA FORMACIÓN DEL COLÁGENO Y MUCOPOLISACÁRIDOS EN LOS FIBROBLASTOS Y SU PROLIFERACIÓN EN LOS TEJIDOS.

LA ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DE LOS CORTICOIDES SE OBSERVA DE MANERA SOBRESALIENTE EN LOS PROCESOS REUMÁTICOS INFLAMATORIOS COMO SON LA ARTRITIS REUMATOIDEA Y LA FIEBRE REUMÁTICA AGUDA.

HENCH Y COLABORADORES (24) DEMOSTRARON QUE EN LA TERAPIA CON

CORTICOIDES EN ARTRITIS REUMATOIDEA, EL DOLOR ARTICULAR DESAPARECE RÁPIDAMENTE Y LUEGO LA TUMEFACCIÓN, RUBOR Y COLOR QUE SON SIGNOS INFLAMATORIOS ARTICULARES. SE OBSERVÓ TAMBIÉN -- QUE LA LIMITACIÓN DE MOVIMIENTOS Y LA ERITROSEDIMENTACIÓN DISMINUYE A LO NORMAL.

EN LA FIEBRE REUMÁTICA LOS CORTICOIDES SUPRIMEN LAS INFLAMACIONES TAMBIÉN EN LOS TEJIDOS. LA ACCIÓN DE ESTA CLASE DE COMPUESTOS NO VA DIRIGIDA AL ORIGEN DE LA ENFERMEDAD O DOLENCIA, SINO A SUS SÍNTOMAS O MANIFESTACIONES EXTERNAS QUE SON SUPRIMIDAS, POR LO QUE AL SUSPENDERSE EL TRATAMIENTO CON ESTE TIPO DE MEDICAMENTOS LA ENFERMEDAD CON SUS SÍNTOMAS VUELVEN GENERALMENTE A PRESENTARSE DEBIDO A QUE NO FUÉ ERRADICADA DEL TODO.

ESTOS CORTICOIDES DEMOSTRARON SU EFICACIA AL SUPRIMIR INFLAMACIONES AGUDAS Y CRÓNICAS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

### 1.2.6. METABOLISMO Y ACTIVIDAD.

AL ADMINISTRARSE "HIDROCORTISONA" (O ALGÚN OTRO CORTICOIDE) SE ABSORBE Y PASA A LA SANGRE, DONDE CIRCULA COMBINADO CON PROTEÍNAS DEL TIPO DE LAS GLOBULINAS.

LA "HIDROCORTISONA", SE COMBINA CON UNA GLOBULINA ("TRANSCORTINA" O GLOBULINA DE ENLACE DE CORTICOIDES) QUE LE SIRVE DE TRANSPORTE EN LA SANGRE.

CUANDO DICHA GLOBULINA SE SATURA (20-30 MG DE CORTICOIDE POR 100 MG DE GLOBULINA; LO NORMAL ES 10-20 MG POR 100 MG ), - EL EXCESO DE CORTICOIDE SE UNE A LA ALBÚMINA DEL PLASMA.

LOS CORTICOIDES TRANSPORTADOS SE LIBERAN EN LOS TEJIDOS Y LUEGO SON METABOLIZADOS SOBRE TODO EN EL HÍGADO.

UNO DE LOS EFECTOS DE LOS CORTICOIDES ES UN INCREMENTO EN LA GLUCONEOGÉNESIS, POR AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE VIAS ENZIMAS AMINO TRANSFERASAS ("TRANSAMINASAS" : FOSFO-ENOL-PIRUVATO-KINASA, FRUCTOSA -1,6-DIFOSFATASA Y GLUCOSA-6-FOSFATASA) INVOLUCRADAS EN LA TRANSFORMACIÓN DE AMINOÁCIDOS, A SUS CORRESPONDIENTES OXOÁCIDOS.

LA "HIDROCORTISONA" TIENE 2 CONDICIONES PARA INTERACTUAR CON LA MACROMOLÉCULA PROTEICA (TRANSCORTINA) QUE SON:

- 1) EL GRUPO REACTIVO HIDROXILO QUE POSEE LA "HIDROCORTISONA".

2) LA DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE ESTOS GRUPOS EN LA "HIDROCORTISONA".

LA INTERACCIÓN ES CONFORME "LA REGLA DE LA POLARIDAD" EN -- DONDE UN INCREMENTO EN EL NÚMERO DE SUSTITUYENTES POLARES EN EL ESTEROIDE DISMINUYE EL ENLACE CON LA PROTEÍNA.

ESTA INTERACCIÓN ES OBVIAMENTE DE TIPO HIDROFÍLICO. LA DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LOS SUSTITUYENTES INFLUYE EN EL ENLACE, PERO NO EN LA MISMA EXTENSIÓN PARA CADA TIPO DE ENLACE (24).

EL SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LA HIDROXILACIÓN ESTEROIDAL PERMANECE SIN DEFINIR, PERO CON LA POSIBILIDAD DE QUE EL HIDROXILO DEL ESTEROIDE EN EL METABOLISMO DEL HÍGADO, PUEDE ESTAR ÍNTIMAMENTE RELACIONADO CON LOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS MICROSOMALES INDUCIBLES DE LAS CÉLULAS, QUE ESTÁN ESTRECHAMENTE RELACIONADOS CON EL METABOLISMO QUE ACTÚA SOBRE COMPUESTOS O FÁRMACOS EXTRAÑOS, AJENOS A LAS VÍAS METABÓLICAS DEL ORGANISMO HUMANO.

## 2. EL MICROORGANISMO.

### 2.1. LOS MICROORGANISMOS Y SU UTILIZACIÓN EN LA TRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES.

LA INFORMACIÓN SOBRE LAS DIFERENTES HIDROXILACIONES EN ESTEROIDES TANTO DE TEJIDO ANIMAL COMO DE MICROORGANISMOS, APUNTA LAS TRANSFORMACIONES DE COMPUESTOS ESTEROIDES COMO SON LA 11 $\alpha$  , 17 Y 21 HIDROXILACIONES DE LA CORTEZA SUPRARRENAL, LA CUAL CORRESPONDE A LA BIOSÍNTESIS DE CORTICOIDES.

LA HIDROXILACIÓN DE ESTEROIDES POR MICROORGANISMOS ES TAN AMPLIA QUE INCLUYE TODAS O CASI TODAS LAS POSIBLES POSICIONES PARA HIDROXILAR EN EL NÚCLEO ESTEROIDAL, DONDE LOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS MICROBIANOS SON CAPACES DE INTRODUCIR EL GRUPO HIDROXILO EN MOLÉCULAS ESTEROIDES DE 21 ÁTOMOS DE CARBONO Y HASTA DE 23 ÁTOMOS DE CARBONO EN DIFERENTES POSICIONES DEL NÚCLEO ESTEROIDAL Y SU CADENA LATERAL: 1 $\alpha$  , 1 $\beta$  , 2 $\beta$  , 6 $\alpha$  , 7 $\alpha$  , 7 $\beta$  , 9 $\alpha$  , 10 $\beta$  , 11 $\alpha$  , 11 $\beta$  , 12 $\alpha$  , 12 $\beta$  , 14 $\alpha$  , 15 $\alpha$  , 15 $\beta$  , 16 $\alpha$  , 16 $\beta$  , 17 $\alpha$  , 18, 19, 21 Y PROBABLE EN 5 $\alpha$  . Y 8 $\beta$  . (EL SIGNO  $\alpha$  INDICA QUE LOS HIDRÓGENOS O SUSTITUYENTES SE ENCUENTRAN HACIA ARRIBA Y HACIA ABAJO DEL ANILLO Y SE LLAMAN "AXIALES". EL SIGNO  $\beta$  INDICA QUE LOS HIDRÓGENOS O SUSTITUYENTES SE ENCUENTRAN HACIA LOS LADOS Y SE LLAMAN "ECUATORIALES"),

## 2.2 CLASIFICACIÓN.

EL ORDEN DE HYPOMYCETALES COMPRENDE TODOS LOS HONGOS IMPERFECTOS FORMADOS POR CONIDIÓFOROS CORTOS IRREGULARES QUE SE PRODUCEN EN CUALQUIER PARTE DEL MICELIO.

### 2.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO CURVULARIA.

EL MOHO CURVULARIA ESTÁ FORMADO POR ESPORAS DISPUESTAS DE MANERA SEMEJANTE, CON VARIOS SEPTOS VERDADEROS GENERALMENTE CURVADOS Y CON LAS CÉLULAS CENTRALES ENGROSADAS. PERTENECE A LA FAMILIA DE LOS DEMATIACEAE.

2.2.2. CURVULARIA BOEDJIN (EL NOMBRE SE REFIERE A LA FORMA DE MEDIA LUNA DE LAS ESPORAS).

TANTO EL MICELIO COMO LAS ESPORAS DEL MOHO SON DE COLOR CAFÉ OSCURO; LAS ESPORAS ESTÁN EN ESPORÓFOROS SEPTADOS, MÁS O MENOS ERECTOS EN EL ÁPICE DEL ESPORÓFORO. LA ESPORA SE DESARRROLLA DEBAJO DEL ESPORÓFORO, LA CUAL CONTINÚA Y FORMA DESPUÉS OTRA ESPORA TERMINAL. EL PROCESO SE REPITE HASTA FORMAR UN RACIMO DONDE SIEMPRE EL ESPORÓFORO, DEL CUAL PROCEDEN LAS ESPORAS, APARECE EN FORMA MODULAR O RETORCIDO EN LA PARTE PORTADORA DEL MISMO. LAS ESPORAS TIENEN TRES O CUATRO SEPTOS TRANSVERSALES Y ESTÁN EN SU MAYOR PARTE CURVADAS HACIA EL TERCER SEPTO DE LA BASE, EL CUAL ES MÁS ANCHO Y OSCURO QUE LOS OTROS.

CURVULARIA LUNATA (WAKKER); BOEDJIN (DEL LATÍN LUNATUS=SEMEJANZA A LA LUNA CRECIENTE).

C. LUNATA ESTÁ FORMADA POR ESPORÓFOROS CORTOS DE APROXIMADAMENTE 100 $\mu$  DE LONGITUD Y 2-4 $\mu$  DE DIÁMETRO. SON SEPTADOS CON ESPORAS DE 3-4 SEPTOS CURVADOS, DE 20-30 POR 8-16 $\mu$  EN SU MAYORÍA.

EL MOHO UTILIZADO ES DESIGNADO (CLT-123) COMO UNA CEPA PARTICULAR DE LA C. LUNATA, QUE SE CARACTERIZA POR SU ALTA ACTI

VIDAD HIDROXILANTE.

### 2.3. UTILIZACIÓN DE C. LUNATA PARA LA HIDROXILACIÓN DEL ESTEROIDE.

LA 11 $\beta$  -HIDROXILACIÓN ES UNA REACCIÓN MUY IMPORTANTE QUE PUEDE SINTETIZAR A HIDROCORTISONA O SUS PRECURSORES EN UN SOLO PASO CON ALGÚN MOHO A PARTIR DE SUS CORRESPONDIENTES 11-DESOXI-ESTEROIDES QUE SON OBTENIDOS DE DIOSGENINA.

C. LUNATA EN SU BIOSÍNTESIS TIENE LA CAPACIDAD DE HIDROXILACIÓN 11 $\beta$  EN COMPUESTOS ESTEROIDES. POR EJEMPLO C. LUNATA CON "COMPUESTO S DE REICHSTEIN" DA LUGAR A HIDROCORTISONA CON REGULARES RENDIMIENTOS.

#### 2.3.1. CONDICIONES Y CARACTERÍSTICAS EN LA UTILIZACIÓN DE C. LUNATA PARA LA HIDROXILACIÓN DEL ESTEROIDE.

C. LUNATA POSEE LA CAPACIDAD DE HIDROXILAR TANTO EN POSICIÓN 11 $\alpha$  COMO 14 $\alpha$ , POR TANTO LA ESTRUCTURA DEL NÚCLEO ESTEROIDAL DEBE TENER ALGÚN GRUPO FUNCIONAL VOLUMINOSO (POR EJEMPLO EL "ÉSTER") DEL LADO  $\alpha$  A LA POSICIÓN CERCANA AL CARBONO

14 DEL ESTEROIDE, PARA QUE SU SISTEMA ENZIMÁTICO SÓLO PUEDA HIDROXILAR EN POSICIÓN 11 $\beta$  Y FAVOREZCA MAS EL RENDIMIENTO DE LA TRANSFORMACIÓN PARA OBTENER HIDROCORTISONA. POR EJEMPLO, CON 17 $\alpha$ -ACETATO, DONDE EL RENDIMIENTO DE TRANSFORMACIÓN EN POSICIÓN 11 $\beta$  DE LA MOLÉCULA ESTEROIDE SERÁ EXCELENTE UTILIZANDO C. LUNATA PORQUE EL 17-ACETATO BLOQUEA LA POSICIÓN 14, QUE ES SUSCEPTIBLE DE SER HIDROXILADA.

OTRA CONDICIÓN IMPORTANTE ES EL PH. LA 14 $\alpha$ -HIDROXILACIÓN ES POSIBLE CON C. LUNATA, PERO ES SUPRIMIDA CASI POR COMPLETO CUANDO EL PH DURANTE LA TRANSFORMACIÓN ESTÁ ABAJO DE 6.5 Y TAMBIÉN EVITA UNA TRANSACILACIÓN INTERNA DEL 17 $\alpha$ -ÉSTER AL 21 ÉSTER DEL ESTEROIDE. DEPUÉS DE LA TRANSFORMACIÓN, EL ACETATO PUEDE SER CONVERTIDO A SU ALCOHOL RESPECTIVO POR UNA HIDRÓLISIS QUÍMICA.

PARA PODER REALIZAR ESTAS TRANSFORMACIONES, PRIMERO ES NECESARIO OBTENER UN CRECIMIENTO SUFICIENTE DEL MICROORGANISMO DE LA ESPECIE C. LUNATA EN UN MEDIO DE CULTIVO IDÓNEO, QUE CONTENGA POR LO MENOS UNA FUENTE DE CARBONO (ALMIDÓN, DEXTRINA, MELASA, AZÚCAR DE CAÑA, GLUCOSA, ETC.), PROTEÍNAS COMO FUENTE DE NITRÓGENO (CASEÍNA, EXTRACTO DE HÍGADO, AGUA DE COCIMIENTO DE MAÍZ, HARINA DE SOYA HIDROLIZADA, PEPTONA, ETC.) O UNA FUENTE DE NITRÓGENO INORGÁNICA (SULFATO DE AMO

NIO, NITRATO, ETC.); SALES MINERALES Y FACTORES DE CRECIMIENTO (POR EJEMPLO, VITAMINAS DEL GRUPO B). LA FASE DEL CRECIMIENTO SE LLEVA A CABO PREFERENTEMENTE BAJO EL AGUA CON AGITACIÓN, AEREACIÓN, TEMPERATURA Y PH ÓPTIMOS (TEMPERATURA 24-30C Y PH 5.5-7.0) PARA C. LUNATA SELECCIONADA.

EL MICELIO DE C. LUNATA QUE SE OBTIENE, SE FILTRA, SE LAVA Y PUEDE UTILIZARSE O ALMACENARSE EN CONGELACIÓN SIN SUFRIR ALTERACIONES PARA SU POSTERIOR USO. TAMBIÉN SE PUEDEN AISLAR LAS ENZIMAS DEL MICELIO DE C. LUNATA Y UTILIZARSE EN LUGAR DEL MICELIO.

CUANDO EL MOHO ALCANZA UN DESARROLLO FISIOLÓGICO ADECUADO, EL ESTEROIDE A HIDROXILAR SE PUEDE AGREGAR EN DIVERSAS FORMAS (CRISTALINA, EN SOLUCIÓN, EN AGUA, METANOL, DIMETIL FORMAMIDA, EN GLICOL O EN UN AGENTE DE DISPERSIÓN O EMULSIFICANTE COMO TWEEN 80).

LA HIDROXILACIÓN DEL ESTEROIDE REQUIERE DE UNA BUENA FUENTE DE AGITACIÓN CON UNA BUENA AEREACIÓN CON OXÍGENO. LA DURACIÓN DE LA HIDROXILACIÓN DEPENDE ENTRE OTROS FACTORES, DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL Y DEL TIPO DE ESTEROIDE.

ESTA CONCENTRACIÓN ES ENTRE 200 MG A 5 G /L

EL TIEMPO NECESARIO PARA LA TRANSFORMACIÓN PUEDE VARIAR ENTRE 24 H.-72 H. AL TERMINAR LA TRANSFORMACIÓN EL ESTEROI

DE ES EXTRAÍDO CON UN DISOLVENTE ADECUADO. POR EJEMPLO, CON CLOROFORMO, ETIL O BUTILCETONA, METIL ISOBUTILCETONA. ESTE EXTRACTO ES CONCENTRADO Y EL RESIDUO ES RECRISTALIZADO DE UN DISOLVENTE APROPIADO COMO POR EJEMPLO METANOL, ACETONA, DMF O ÉTER DE PETRÓLEO. ASÍ SE OBTIENE UN ESTEROIDE HIDROXILADO EN POSICIÓN 11 $\beta$  POR C. LUNATA (23).

## 2.4 ORIGEN DEL OXÍGENO DEL HIDROXILO Y CURSO ESTÉRICO DE LA REACCIÓN.

ENSAYOS CON  $O_2^{18}$  MUESTRAN QUE EL OXÍGENO MOLECULAR ATMOSFÉRICO ES DIRECTAMENTE INCORPORADO EN EL GRUPO HIDROXILO DEL ESTEROIDE EN EL CURSO DE LA HIDROXILACIÓN MICROBIOLÓGICA O SUPRARRENAL ENVUELTAS EN LAS POSICIONES:  $11\alpha$  ,  $11\beta$  ,  $6\alpha$  ,  $17\alpha$  ,  $12\alpha$  ,  $15\alpha$  Y  $21$ .

CUANDO SE UTILIZA  $D_2O$  O  $H_2O^{18}$  NO APARECE EL OXÍGENO MARCADO EN LOS PRODUCTOS DE LA HIDROXILACIÓN.

LOS ESTEROIDES MARCADOS CON ISÓTOPOS DE HIDRÓGENO EN EL CARBONO  $11$  DAN EVIDENCIAS DEL GRUPO HIDROXILO AL INCORPORARSE, EL CUAL ESPECÍFICAMENTE REEMPLAZA A UN HIDRÓGENO DE LA CONFIGURACIÓN EN EL CARBONO  $11$  DEL ESTEROIDE (31).

LOS MECANISMOS DEL PROCESO DE HIDROXILACIÓN SON DOS FACTORES BIEN ESTABLECIDOS:

- A) EL OXÍGENO QUE SE INTRODUCE EN EL GRUPO HIDROXILO PROVIENE DEL OXÍGENO MOLECULAR ATMOSFÉRICO Y NO DEL OXÍGENO DEL AGUA DEL MEDIO DE REACCIÓN.
- B) EL SEGUNDO FACTOR DEL MECANISMO DE HIDROXILACIÓN DEL ESTEROIDE CONSISTE EN ESTABLECER EL CARÁCTER -

DE LA REACCIÓN, EL CUAL ES UNA SUSTITUCIÓN DIRECTA DEL HIDRÓGENO EN LA POSICIÓN HIDROXILABLE DEL ESTEROIDE Y NO ES UN ARREGLO DE WALDEN CON DESPLAZAMIENTO DEL HIDRÓGENO DESDE LA POSICIÓN OPUESTA AL SITIO DEL ESTEROIDE DONDE SE HIDROXILA (15).

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### INDICE DE EXPERIMENTOS

- 3.1 CRECIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE C. LUNATA (CLT-123)
  - 3.1.1. CRECIMIENTO DE C. LUNATA (CLT-123).
  - 3.1.2. TEMPERATURA DE INCUBACIÓN.
  - 3.1.3. IDENTIFICACIÓN DE C. LUNATA (CLT-123).
  
- 3.2. OBTENCIÓN DE MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123).
  - 3.2.1. RESIEMBRA. MEDIO SÓLIDO SDA A MEDIO LÍQUIDO VCG-1.
  - 3.2.2. VARIACIÓN DE TIEMPO DE CRECIMIENTO CON VCG-1.
  - 3.2.3. VARIACIÓN DE PH.
  - 3.2.4. RESIEMBRA. DE MEDIO VCG-1 A MEDIO VCG-2.
    - 3.2.4.1. VARIACIÓN DE TIEMPO DE CRECIMIENTO CON VCG-2.
    - 3.2.4.2. VARIACIÓN DE PH.
  - 3.2.5. CULTIVO FINAL. DE MEDIO VCG-2 A MEDIO CG.
    - 3.2.5.1. RESIEMBRA DE MEDIO VCG-2 A MEDIO CG-60 Y CG-40.
    - 3.2.5.2. VARIACIÓN DE PH.
  - 3.2.6. ALMACENAMIENTO DE MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123)
  
- 3.3. TRANSFORMACIÓN DEL ESTEROIDE (17 ACETATO DE - -  
"COMPUESTO S").
  - 3.3.1. PREPARACIÓN DEL ESTEROIDE.
  - 3.3.2. ADICIÓN DE MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123).

- 3.3.2.1. BIOTRANSFORMACIÓN DEL ESTEROIDE.
- 3.3.2.2. EXTRACCIÓN.
- 3.3.3. VARIACIONES.
  - 3.3.3.1. DE PH.
  - 3.3.3.1. DE CRECIMIENTO DE MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123)  
EN DIFERENTE MEDIO DE CULTIVO.
  - 3.3.3.3. DE REUTILIZACIÓN DE C. LUNATA (CLT-123).
- 3.3.4. OBTENCIÓN DE PRODUCTO.
- 3.3.5. OPTIMIZACIÓN.
- 3.3.6. RESULTADOS.

### 3.1 CRECIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE C. LUNATA (CLT-123).

#### 3.1.1. CRECIMIENTO DE C. LUNATA (CLT-123) EN 2 MEDIOS DE CULTIVO DIFERENTES.

MEDIO 1.-MEDIO SDA (SABOURAD-DEXTROSA AGAR) EN CAJA PETRI.

LAS COLONIAS DEL MOHO TIENEN UN COLOR BLANCO-GRIS DESPUÉS DE 2-3 DÍAS Y PRESENTAN UN ASPECTO COMO DE FIBRILLAS DE ALGODÓN.

DESPUÉS SU DESARROLLO AUMENTA HASTA CUBRIR POR COMPLETO LA CAJA PETRI, Y LAS COLONIAS VAN ADQUIRIENDO UN COLOR OSCURO HASTA SER CAFÉ ROJIZO A LOS 10-12 DÍAS.

MEDIO 2.-MEDIO PDA (PAPA DEXTROSA AGAR) EN CAJA PETRI.

LAS COLONIAS DEL MOHO TIENEN UN COLOR BLANCO-GRIS A LOS 2-3 DÍAS. LUEGO SE VUELVE MÁS ABUNDANTE EL MICELIO, QUE ES COMPLETAMENTE NEGRO A LOS 10-12 DÍAS.

EN AMBOS MEDIOS, CUANDO EL CULTIVO ES "VIEJO" (12-13 DÍAS O MÁS) SE PRODUCE UN PIGMENTO ROJO QUE NO SE APRECIA A SIMPLE VISTA POR EL COLOR OSCURO (CAFÉ ROJIZO O NEGRO DEPENDIENDO DEL MEDIO DE CULTIVO) DEL MICELIO; Y ESTE PIGMENTO ROJO SE OBTIENE AL HACER EXTRACCIONES CON CLOROFORMO DEL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123). EL MEDIO SDA DÁ MEJORES RESULTADOS -- POR SU COLORACIÓN DEL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123).

### 3.1.2. TEMPERATURA DE INCUBACIÓN.

LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE CRECIMIENTO PARA C. LUNATA (CLT-123) EN CAJA PETRI ES DE 28-29°C CTE.

### 3.1.3. IDENTIFICACIÓN DE C. LUNATA (CLT-123).

DESPUÉS DE OBTENER UN BUEN CRECIMIENTO DE C. LUNATA (CLT-123) SE PREPARARON MICROCULTIVOS CON MEDIO SDA EN CAJA PETRI PARA SU OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO. SE PREFIRIÓ ESTA TÉCNICA YA QUE AL TERNIRSE EL MICROCULTIVO SE LOGRA DEFINIR BIEN LAS ESTRUCTURAS NORMALES DEL MICROORGANISMO.

C. LUNATA (CLT-123) PRESENTA AGRUPAMIENTOS EN FORMA DE RACIMOS DONDE SE ENCUENTRAN SUS ESPORAS. ESTAS TIENEN FORMA DE MEDIA LUNA Y SON TRISEPTADAS, DONDE LA PARTE CENTRAL ES MÁS OSCURA QUE LOS EXTREMOS Y SE ENCUENTRAN EN POSICIÓN TERMINAL EN LOS ESPORÓFOROS SEPTADOS MÁS O MENOS ERECTOS.

3.2. OBTENCIÓN DE MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123).

3.2.1. RESIEMBRA.-MEDIO SÓLIDO SDA A MEDIO LÍQUIDO MEDIO VCG-1.

EN EL MEDIO SDA QUE CONTIENE C. LUNATA (CLT-123) SE AÑADEN 5 ML DE AGUA DESTILADA ESTÉRIL Y CON UN ASA MICROBIOLÓGICA SE FROTA Y SE OBTIENE UNA SUSPENSIÓN DE ESPORAS/MICELIO.

DE LA SUSPENSIÓN ANTERIOR DE C. LUNATA (CLT-123) 3 ML SON TRANSFERIDOS A UN MATRAZ ERLIENMEYER DE 250 ML (CON DEFLECCIONES) QUE CONTIENE 30 ML DE MEDIO VCG-1.

EL MATRAZ ES COLOCADO EN UN AGITADOR ROTATORIO (220 - RPM) A 28°C POR UN PERÍODO DE 25-30 HORAS. EL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123) ES DE COLOR CAFÉ BRILLANTE (CLARO). CON APARIENCIA GRANULAR DE LAS HIFAS DE MICELIO.

SI EL MICELIO "ENVEJECE" RÁPIDAMENTE PRESENTA UN COLOR CAFÉ NEGRUZCO Y NO SIRVE PARA LA SIGUIENTE OPERACIÓN -- PORQUE NO HAY CRECIMIENTO EN CONDICIONES ADECUADAS, QUE SON EN LA FASE LOGARÍTMICA O EXPONENCIAL DEL DESARROLLO NORMAL DE C. LUNATA (CLT-123), EN SU CURVA DE CRECIMIENTO.

CUANDO EL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123) APARECIÓ DE CO

LOR NEGRO, SE OBTUVO UN RESULTADO NEGATIVO PARA SU CRECIMIENTO Y UTILIZACIÓN.

### 3.2.2. VARIACIÓN DE TIEMPO CON VCG-1.

DEL MEDIO SDA QUE CONTIENE C. LUNATA (CLT-123) SE TOMAN 3 - ALICUOTAS DE 5 ML. QUE TRANSFERIDAS A 3 MATRACES ERLLENMEYER DE 250 ML (CON DEFLECCIONES) QUE CONTIENEN 30 ML DE MEDIO VCG-1.

A 6 Y 8 DÍAS NO HAY CRECIMIENTO DE C. LUNATA (CLT-123) DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN CON AGITACIÓN ROTATORIA.

A 11 DÍAS SÍ HAY CRECIMIENTO DE C. LUNATA (CLT-123) EN LAS MISMAS CONDICIONES.

### 3.2.3. VARIACIÓN DE PH.

EL MEDIO DE CULTIVO VCG-1 QUE TIENE UN PH INICIAL DE 6.0-6.1 ES INOCULADO CON C. LUNATA (CLT-123). DESPUÉS DE 25 HORAS DE INCUBACIÓN EL MEDIO VCG-1 TIENE UN PH FINAL DE 5.8.

Curvularia lunata (CLT-123)

Medio SDA (caja petri)

Tiempo:	6 días	8 días	11 días
Medio líquido:	VCG-1	VCG-1	VCG-1
Resultado:	Negativo.	Negativo.	Positivo.

Experimento de variación de tiempo para un óptimo crecimiento en medio de cultivo sólido.

### 3.2.4. RESEMBRA DE MEDIO VCG-1 A MEDIO VCG-2.

EL CULTIVO DE C. LUNATA (CLT-123) OBTENIDO EN MEDIO VCG-1 ES PARA RESEMBRA. SE TOMAN 3 ML DEL CULTIVO DE C. LUNATA - (CLT-123) EN MEDIO VCG-1 Y SE INOCULA EN UN MATRAZ ERLLENME--YER DE 250 ML (CON DEFLECCIONES) CONTENIENDO 30 ML DE ME--DIO VCG-2. ESTE MATRAZ ES COLOCADO EN AGITACIÓN ROTATORIA (220 RPM) A 28°C POR UN PERÍODO DE 20-24 HORAS. HASTA AQUÍ EL MICELIO APARECE CAFÉ BRILLANTE (CLARO) COMO ESFERAS GRA--NULARES. SI EL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123) SE VUELVE NEGRO EN ESTE TIEMPO YA NO PRESENTA LAS CARACTERÍSTICAS NE--CESARIAS PARA EL SIGUIENTE PASO. EL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123) DE COLOR NEGRO ES RESEMBRADO EN MEDIO VCG-2 CON UN RESULTADO NEGATIVO DE CRECIMIENTO.

#### 3.2.4.1. CON EL MEDIO VCG-2.

NO SE HIZO VARIACIÓN DE TIEMPO. SE UTILIZÓ EL ÓPTIMO DEL EXPERIMENTO CON MEDIO VCG-1.

#### 3.2.4.2. VARIACIÓN DE PH.

EL MEDIO DE CULTIVO VCG-2 QUE TIENE UN PH INICIAL DE 6.2 -

DESPUÉS DE 22 HORAS DE INCUBACIÓN CON CULTIVO DE C. LUNATA (CLT-123) TIENE UN PH FINAL DE 5.8.

### 3.2.5. CULTIVO FINAL. DE MEDIO VCG-2 A MEDIO CG.

DEL CULTIVO DE C. LUNATA (CLT-123) OBTENIDO EN MEDIO VCG-2 SE TOMAN ALICUOTAS DE 3 ML PARA CADA 30 ML DE MEDIO CG - CONTENIDOS EN MATRACES ERLLENMEYER DE 250 ML (CON DEFLECCIONES) Y SE COLOCAN EN AGITACIÓN ROTATORIA (220 RPM) A 28°C POR UN PERÍODO DE 40 HORAS. DESPUÉS DE 24 HORAS, EL MICELIO EN EL MEDIO CG ES DE COLOR CAFÉ CLARO. DURANTE LAS SIGUIENTES HORAS EL CULTIVO EMPIEZA A SER MÁS OSCURO Y MÁS ABUNDANTE. EL MICELIO APARECE CAFÉ NEGRUZCO ALREDEDOR DE LAS 40 HORAS; LISTO PARA UTILIZARSE O ALMACENARSE.

### VARIACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE MEDIO LÍQUIDO CG.

#### 3.2.5.1. MEDIO CG-60 Y CG-40

SE OBTIENE IGUAL CANTIDAD DEL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123) EN 40 HORAS TANTO EN MEDIO CG-60 Y CG-40 COMO EN MEDIO DE CULTIVO CG.

LA "CALIDAD" DEL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123) SE COMPRUE-

BA AL ADICIONARLE EL ESTEROIDE 17 ACETADO DE "COMPUESTO S", DONDE SU RENDIMIENTO DE TRANSFORMACIÓN DEPENDE DE CUAL MEDIO DE CULTIVO FUÉ EL MEJOR EN LA PRODUCCIÓN DE MICELIO. - EL MEJOR MICELIO FUÉ DEL MEDIO CG.

### 3.2.5.2. VARIACIÓN DE PH.

LOS MEDIOS DE CULTIVO CG, CG-60 Y CG-40 TIENEN UN PH INICIAL 6.1-6.2 DESPUÉS DE 40 HORAS CON C. LUNATA (CLT-123) EL PH DE LOS MEDIOS ES 5.8-5.7.

### 3.2.6. ALMACENAMIENTO DE MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123).

EL CONTENIDO DE VARIOS MATRACES DEL CULTIVO FINAL DE C. LUNATA (CLT-123) EN LOS DIFERENTES MEDIOS (CG, CG-60 Y CG-40) ES FILTRADO POR SEPARADO CADA UNO EN EMBUDO BUCHNER AL VACÍO, CON GASA ESTÉRIL COMO MEDIO FILTRANTE.

EL MICELIO SE LAVA 3 VECES CON 10 ML DE AGUA DESTILADA ESTÉRIL POR MATRAZ DE CULTIVO PARA REMOVER TODA LA CANTIDAD POSIBLE DE MEDIO DE CULTIVO. EL MICELIO SE GUARDE A  $-10^{\circ}\text{C}$  Y ASÍ MANTIENE SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR UN PERÍODO DE 3 MESES.

EL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123) DE LOS MEDIOS VCG-1 Y -- VCG-2 ES FILTRADO Y LAVADO GUARDÁNDOSE PARA SU POSTERIOR -- UTILIZACIÓN.

### 3.3. TRANSFORMACIÓN DEL ESTEROIDE (17 ACETATO DE "COMPUUESTO S").

#### 3.3.1. PREPARACIÓN DEL ESTEROIDE.

EL ESTEROIDE (SUSTRATO) ESTARÁ SUJETO A UNA TRANSFORMACIÓN BIOLÓGICA CRÍTICA Y REQUIERE UNA MICRONIZACIÓN DE TAL MODO QUE LAS PARTÍCULAS TENGAN UNA DIMENSIÓN APROXIMADA DE 10 $\mu$ . ESTO SE LOGRA AL DISOLVER EL ESTEROIDE EN UN DISOLVENTE ORGÁNICO (MISCIBLE EN AGUA) PARA DESPUÉS PROVOCAR SU PRECIPITACIÓN EN AGUA.

EL ESTEROIDE UTILIZADO COMO SUSTRATO ES EL 17 ACETATO DE -- "COMPUUESTO S" QUE FUÉ OBTENIDO PREVIAMENTE A PARTIR DE -- TRIAC (3 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21 $\beta$  -ACETOXICOLESTAN-5-EN-20-ONA) POR TRANSFORMACIÓN MICROBIOLÓGICA CON FLAVOBACTERIUM DEHIDROGENANS F-93. EL ESTEROIDE 17 ACETATO DE "COMPUUESTO S" SE -- PREPARA DISOLVIÉNDOSE EN POCA CANTIDAD DE ACETONA. DESPUÉS ESTA SOLUCIÓN SE ADICIONA LENTAMENTE A AGUA FRÍA (30 ML) - EN AGITACIÓN; SE FILTRA LUEGO POR MEMBRANA MILLIPORE (0,45 $\mu$ ).

LA PASTA OBTENIDA DEL ESTEROIDE (SUSTRATO) DESPUÉS DE LA --  
FILTRACIÓN SE SUSPENDE EN UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOS--  
FATOS CON TWEEN 80 AL 5%.

PARA LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL ESTEROIDE DE LA SUSPENSIÓN AN--  
TERIOR SE TOMAN 10 ML MÁS OTROS 10 ML DE SOLUCIÓN AMORTI--  
GUADORA DE FOSFATO QUE CONTENGA 1 G DE GLUCOSA/100 ML DE  
AGUA, POR CADA MATRAZ.

### 3.3.2. ADICIÓN DEL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123).

POR CADA MATRAZ QUE CONTENGA 20 ML DE LA SUSPENSIÓN DE ES--  
TEROIDE EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA FOSFATO-GLUCOSA SE AGRE--  
GAN 2 G DE MICELIO C. LUNATA (CLT-123) OBTENIDO DE LOS ME--  
DIOS CG-60, CG-40 Y CG.

#### 3.3.2.1. BIOTRANSFORMACIÓN DEL ESTEROIDE.

LOS MATRACES PREPARADOS CON LA SUSPENSIÓN DEL ESTEROIDE Y --  
EL MICELIO C. LUNATA (CLT-123) SON COLOCADOS EN AGITACIÓN  
ROTATORIA (220 RPM) A 28°C. LA TRANSFORMACIÓN DEL 17 ACE--  
TATO DE "COMPUESTO S" CON C. LUNATA (CLT-123) SE SIGUIÓ TO--  
MANDO ALICUOTAS DE 5 ML DE CADA MATRAZ CADA 10 HORAS, EX--

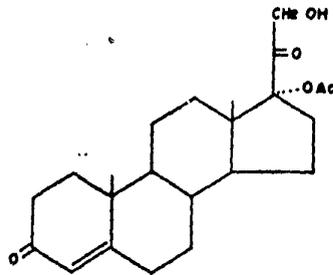
TRAYENDO CON CLOROFORMO Y USANDO CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA Y LA MEZCLA DE DISOLVENTES DICLOROMETANO/ACETONA 6:4 HASTA COMPROBAR LA HIDROXILACIÓN DEL ESTEROIDE QUE SE EFECTUÓ DESPUÉS DE 44-48 HORAS.

### 3.3.2.2. EXTRACCIÓN.

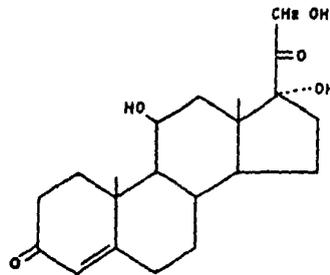
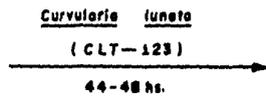
EL CONTENIDO DE LOS MATRACES SE EXTRAÉ CON 3 VOLÚMENES IGUALES DE CLOROFORMO, DESPUÉS SE EVAPORA Y SE SECA. EL PRODUCTO SE RECRISTALIZA DE METANOL-ACETATO DE ETILO, SE FILTRA, SE SECA Y SE PESA.

#### COMPOSICIÓN POR MATRAZ:

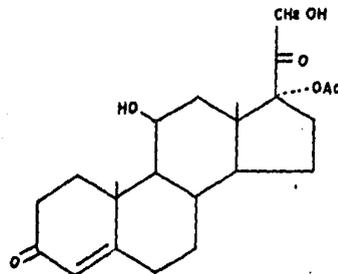
- 2 ML TWEEN 80 AL 5% EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS.
- 8 ML SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS.
- 10 ML SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS CON GLUCOSA.
- 40 MG 17 ACETATO DE "COMPUESTO S" (ESTEROIDE).
- 2 G MICELIO C. LUNATA (CLT-123)



17 acetato de "Compuesto S"



+



17 acetato de Hidrocortiseno

TRANSFORMACION DEL ESTEROIDE

### 3.3.5. VARIACIONES.

#### 3.3.3.1. De pH.

EL MEDIO C G PARA LA BIOTRANSFORMACIÓN TIENE UN PH INICIAL DE 5.3 Y AL FINAL TIENE UN PH DE 6.0.

#### 3.3.3.2. VARIACIÓN DE CRECIMIENTO DE MICELIO EN DIFERENTE MEDIO.

EL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123) DEL MEDIO CG FUÉ EL QUE --  
DIÓ MEJOR RESULTADO EN COMPARACIÓN CON EL MICELIO DE LOS --  
OTROS MEDIOS EN LAS MISMAS CONDICIONES.

#### 3.3.3.3. DE REUTILIZACIÓN DEL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123)

EL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123) DESPUÉS DE UNA PRIMERA --  
TRANSFORMACIÓN SOBRE EL 17 ACETATO DE "COMPUESTO S" DONDE SE  
REALIZA LA HIDROXILACIÓN ES RECUPERADO. ÉSTE MISMO MICELIO  
ES COLOCADO EN LAS MISMAS CONDICIONES DEL ANTERIOR OBTENIÉN-  
DOSE RESULTADOS NEGATIVOS ES DECIR, QUE ESTA SEGUNDA OCA- -  
SIÓN NO SE REALIZÓ LA HIDROXILACIÓN.

### 3.3.4. OBTENCIÓN DEL PRODUCTO.

EL ÉSTER DEL 17 ACETATO DE "COMPUESTO S" AL SER HIDROXILADO EN POSICIÓN 11 SE HIDROLIZA PARCIALMENTE DANDO UNA MEZCLA - DE: HIDROCORTISONA COMO PRODUCTO PRINCIPAL Y EL 17 ACETATO DE HIDROCORTISONA.

SE REQUIERE ASÍ UNA HIDRÓLISIS QUÍMICA SOBRE EL 17 ACETATO DE HIDROCORTISONA PARA OBTENER COMO ÚNICO PRODUCTO FINAL LA HIDROCORTISONA.

### 3.3.5. OPTIMIZACIÓN.

A CONTINUACIÓN SE DESCRIBEN LAS CONDICIONES Y MEDIOS ÓPTI-- MOS A SEGUIR EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL 17 ACETATO DE "COM PUESTO S" CON C. LUNATA (CLT-123), DESPUÉS DE LOS EXPERIMEN TOS DE VARIACIÓN EN TODAS LAS FASES DEL PROCESO DESCRITO AN TERIORMENTE.

#### 1.-CRECIMIENTO INICIAL. MEDIO SDA.

EL CRECIMIENTO DE C. LUNATA (CLT-123) EN CAJA PETRI USANDO MEDIO SDA (SABOURAD-DEXTROSA-AGAR) ES DE 10-12 DÍAS A 28°C (CTE.)

2.-RESIEMBRA. DE MEDIO SDA A MEDIO VCG-1.

EL CULTIVO DE C. LUNATA (CLT-123) EN MEDIO SDA ES LAVADO -- CON 5 ML DE AGUA PARA OBTENER UNA SUSPENSIÓN DE ESPORAS/ - MICELIO; DE AQUÍ SE TOMAN 3 ML QUE SE TRANSFIEREN A UN MATRAZ ERLLENMEYER DE 250 ML (CON DEFLECCIONES) QUE CONTIENE 30 ML DE MEDIO LÍQUIDO VCG-1. ESTE MATRAZ ASÍ PREPARADO ES COLOCADO EN UN AGITADOR ROTATORIO (220 RPM) A 28°C DURANTE 25-30 HORAS.

3.-RESIEMBRA. DE MEDIO VCG-1 A MEDIO VCG-2.

DEL MATRAZ ERLLENMEYER DE 250 ML (CON DEFLECCIONES) QUE -- CONTIENE C. LUNATA (CLT-123) EN MEDIO VCG-1 SE TOMAN 3 ML Y SE ADICIONAN A UN MATRAZ ERLLENMEYER DE 250 ML (CON DEFLECCIONES) QUE CONTIENE 30 ML DE MEDIO LÍQUIDO VCG-2. ESTE MATRAZ SE COLOCA EN UN AGITADOR ROTATORIO (220 RPM) A -- 28°C (CTE.) POR UN PERÍODO DE 20-24 HORAS.

4.-RESIEMBRA DEL CULTIVO FINAL. DE MEDIO VCG-2 A MEDIO CG.

AL MATRAZ ERLLENMEYER DE 250 ML. (CON DEFLECCIONES) QUE CONTIENE C. LUNATA (CLT-123) EN MEDIO VCG-2 SE TOMAN 5 ML Y -

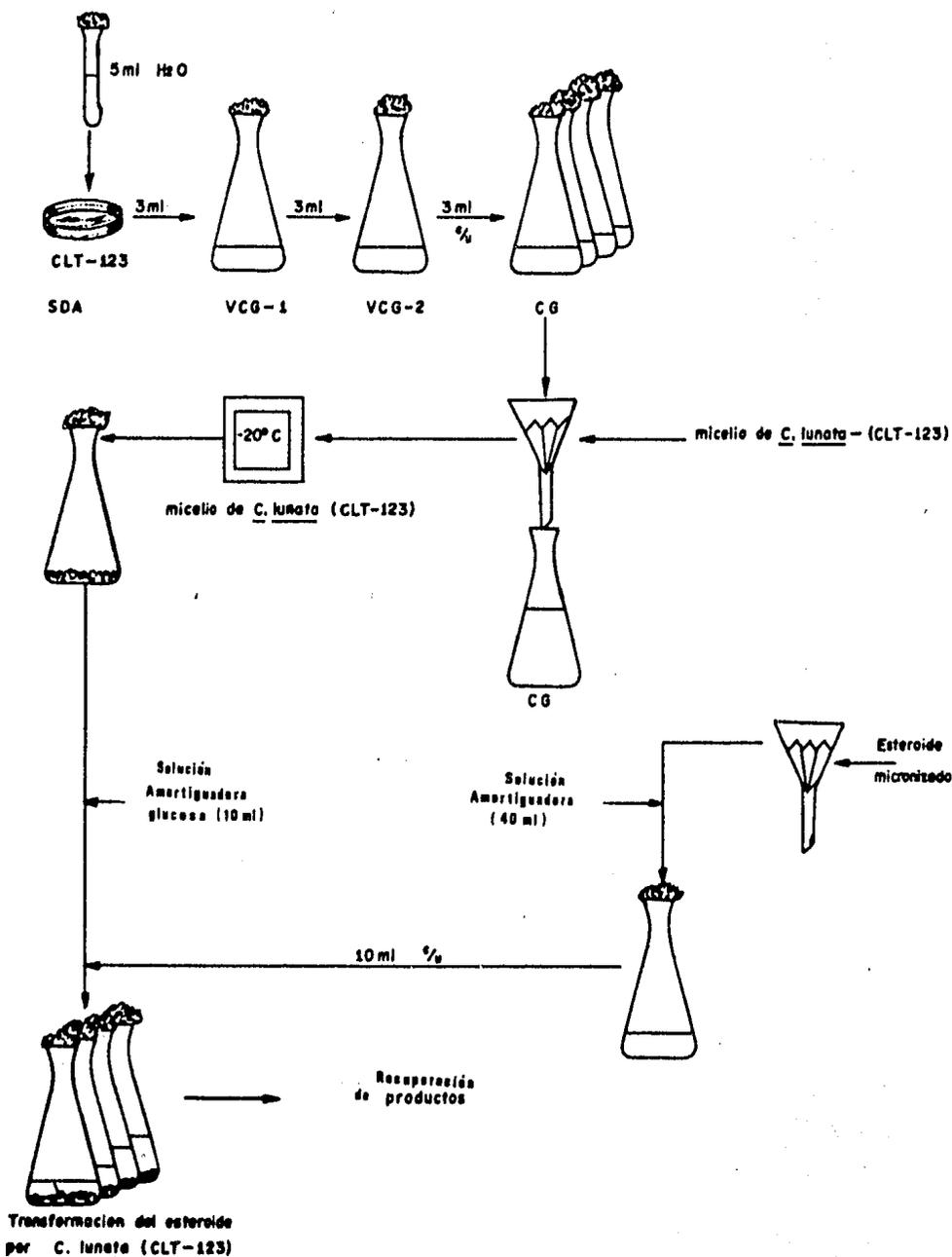
SE ADICIONAN A UN MATRAZ ERLLENMEYER DE 250 ML (CON DEFLECCIONES) QUE CONTENGA 30 ML DE MEDIO LÍQUIDO CG. ESTE MATRAZ SE COLOCA EN AGITACIÓN ROTATORIA (220 RPM) A 28°C -- (CTE.) POR UN PERIODO DE 40 HORAS.

#### 5.-ALMACENAMIENTO DEL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123).

EL MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123) DEL MEDIO LÍQUIDO CG, SE FILTRA AL VACÍO CON GASA ESTÉRIL COMO MEDIO FILTRANTE. EL MICELIO DESPUÉS SE LAVA 3 VECES CON 10 ML DE AGUA DESTILADA ESTÉRIL. EL MICELIO SE GUARDA A -10°C.

#### 6.-TRANSFORMACIÓN DEL ESTEROIDE 17 ACETATO DE "COMPUESTO S" 6A. PREPARACIÓN DEL ESTEROIDE.

EL ESTEROIDE 17 ACETATO DE "COMPUESTO S" SE DISUELVE EN POCAS CANTIDAD DE ACETONA. DESPUÉS ESTA SOLUCIÓN SE AGREGA -- LENTAMENTE A 30 ML DE AGUA FRÍA CON AGITACIÓN Y PRECIPITA. LA PASTA OBTENIDA SE FILTRA POR MEMBRANA MILLIPORE. ESTA PASTA SE AGREGA A UN MATRAZ ERLLENMEYER DE 250 ML (CON DEFLECCIONES) PARA DISOLVERSE EN UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS CON TWEEN 80 AL 5% Y 10 ML MÁS DE UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS QUE CONTENGA 1 G. DE GLUCOSA POR 100 ML DE ESTA SOLUCIÓN. DESPUÉS SE AGREGAN 2 G DE MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123) PREVIAMENTE OBTENIDO DE LOS MEDIOS CG, CG-60 Y CG-40. ESTE MATRAZ SE COLOCA EN AGITACIÓN



**Obtención de Hidrocortisona y acetato de Hidrocortisona con *Curvularia lunata* CLT-123**

ROTATORIA (220 RPM) A 28°C (cte.). LA HIDROXILACIÓN DEL 17 ACETATO DE "COMPUESTO S" SE LLEVA A CABO DESPUÉS DE 44 A 48 HORAS.

EL CONTENIDO DEL MATRAZ SE EXTRÁE 3 VECES CON CLOROFORMO. EL EXTRACTO CLOROFÓRMICO SE SECA. DESPUÉS SE RECRISTALIZA EL RESIDUO DE METANOL/ACETATO DE ETILO.

#### 6B. HIDRÓLISIS.

DE LA MEZCLA DE PRODUCTOS HIDROCORTISONA Y 17 ACETATO DE HIDROCORTISONA OBTENIDA DE LA TRANSFORMACIÓN UTILIZANDO C. LUNATA (CLT-123) SE DISUELVEN 200 MG. EN UN MATRAZ ERLIENMEYER DE 100 ML CON 6 ML DE UNA MEZCLA DE DIOXANO/METANOL 9:5 EN UNA ATMÓSFERA DE NITRÓGENO A 25°C CON AGITACIÓN; SE LE AÑADEN 7.5 ML DE UNA SOLUCIÓN METANÓLICA DE HIDRÓXIDO DE POTASIO 0.16 N

A LOS 5 MINUTOS SE AGREGA 1 ML DE AGUA. LA MEZCLA ES ENFRIADA Y ACIDIFICADA CON 6 ML DE ÁCIDO ACÉTICO AL 25% Y EN SEGUIDA ES VERTIDA EN UNA SALMUERA AL 5% EN FRÍO. EL PRECIPITADO SE FILTRA, SE LAVA Y SE SECA AL AIRE.

SE CRISTALIZA DE ACETATO DE ETILO/ACETONA Y SE RECRISTALIZA 2 VECES DE METANOL (29).

### 3.3.6. RESULTADOS

#### A) PESO DE MICELIO DE C. LUNATA (CLT-123)

POR MATRAZ EN MEDIO LÍQUIDO CG:

- I.- 13.51 g
- II.- 11.10 g
- III.- 12.55 g
- IV.- 10.70 g

#### B) EXPERIMENTO DE VARIACIÓN EN EL TIEMPO.

LA TRANSFORMACIÓN DE 17 ACETATO DE "COMPUESTO S" CON C. LU NATA (CLT-123) SE SIGUIÓ POR CROMATOGRFÍA EN CAPA DELGADA CADA 10 HORAS.

SISTEMA DICLOROMETANO/ACETONA 6:4 COMO ELUYENTE EN LA CROMATOGRFÍA.

#### ABREVIACIONES

- AS = 17 ACETATO DE "COMPUESTO S"; SUSTRATO Ó REACTIVO
- HC = HIDROCORTISONA; MUESTRA DE REFERENCIA O PATRÓN
- AHC = ACETATO DE HIDROCORTISONA; MUESTRA DE REFERENCIA Ó PATRÓN

P1 = HIDROCORTISONA; PRODUCTO

P2 = ACETATO DE HIDROCORTISONA; PRODUCTO

TOMA DE MUESTRAS CADA 10 HORAS

MUESTRA (HORAS)	COMPUESTO OBSERVADO	DESPLAZAMIENTO (CM)	Rf
10	AS	8.1	0.54
	AHC	7.5	0.50
	HC	7.0	0.46
20	AS	8.1	0.54
	AHC	7.5	0.50
	HC	7.0	0.46
30	AS	8.1	0.54
	AHC	7.5	0.50
	HC	7.0	0.46
	P <sub>2</sub>	7.5	0.50
40	AS	8.1	0.54
	AHC	7.5	0.50
	HC	7.0	0.46
	P1	7.0	0.46
	P2	7.5	0.50
50	AHC	7.5	0.50
	HC	7.0	0.46
	P1	7.0	0.46
	P2	7.5	0.50

DESPLAZAMIENTO TOTAL EN LA PLACA DE CROMATOGRAFIA = 15 CM

c) PUNTO DE FUSIÓN DE HIDROCORTISONA.

TEÓRICO	PRODUCTO
<u>198° - 202°C</u>	<u>199° - 200°C</u>

d) ESPECTROFOTOMETRÍA EN ULTRAVIOLETA A 242 MM.

1% EN ETANOL	TEÓRICO	PRODUCTO
E 1% 1 CM.	16,050	E 1% 1 CM 16,048

e)  $[\alpha]_{D_{25}}$  ROTACIÓN ESPECÍFICA = 1% EN DIOXANO

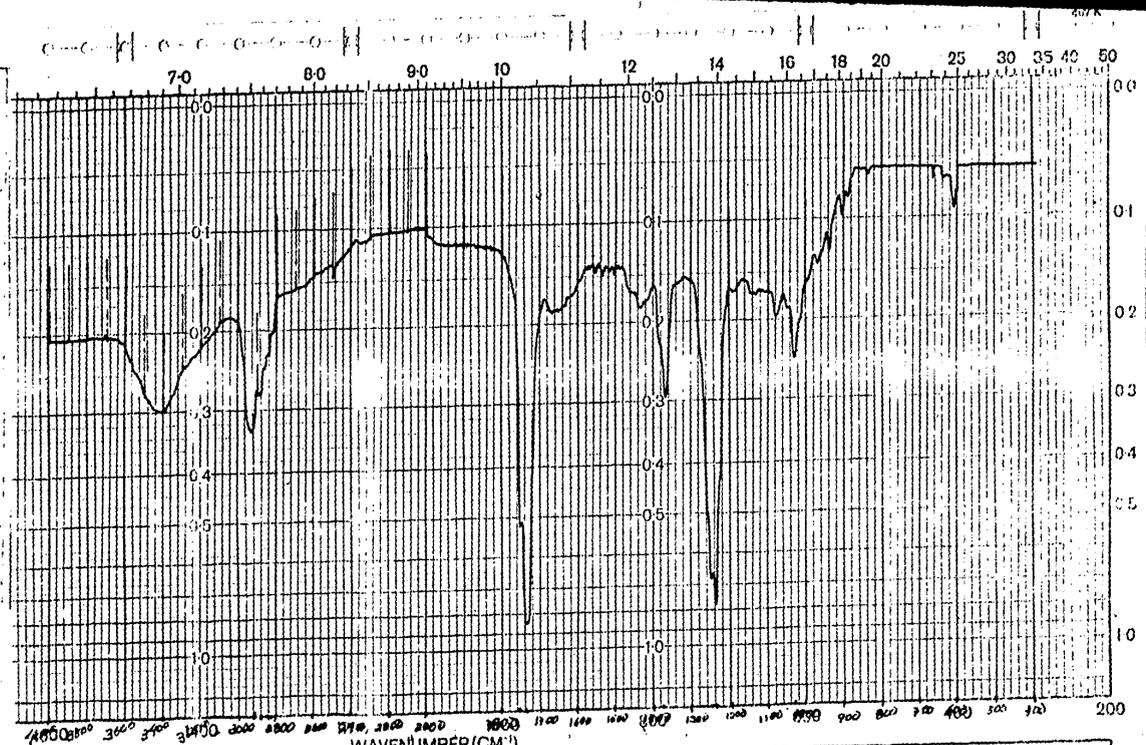
TEÓRICO	PRODUCTO
+ 151.1	+ 150.9

f) SOLUBILIDAD

DISOLVENTE	HC (ESTÁNDAR)	HC (PRODUCTO)
H <sub>2</sub> O	I (-)	I (-)
EtOH	S (+)	S (+)
BENCENO	S (+)	S (+)
ACETONA	S (+)	S (+)
PIRIDINA	S (-)	S (-)
ETER	I (-)	I (-)
DMF	S (-)	S (-)

g) EXPECTROSCOPIA AL INFRAROJO DEL 17 ACETATO DE "COMPUESTO S"

(NM)	GRUPO FUNCIONAL	BANDA
3 400	O-H	ANCHA ("PANZA")
2 920	C-H(CH <sub>3</sub> )	PICO
2 900	C-H(CH <sub>2</sub> )	HOMBRO
2 840	C-H(CH <sub>3</sub> )	HOMBRO
2 820	C-H(CH <sub>2</sub> )	HOMBRO
1 755	C=O(CETONA)	HOMBRO
1 740	C-O(ETER)	PICO DOBLE GRANDE
1 680	C=O	PICO ANCHO PEQUEÑO
1 370	O-H(PRIMARIO)	PICO PEQUEÑO
1 250	O-H(PRIMARIO)	HOMBRO
1 020	C-O(CETONA)	PICO ANCHO PEQUEÑO
650	C-O-H(ALCOHOL PRIMARIO)	PICO PEQUEÑO

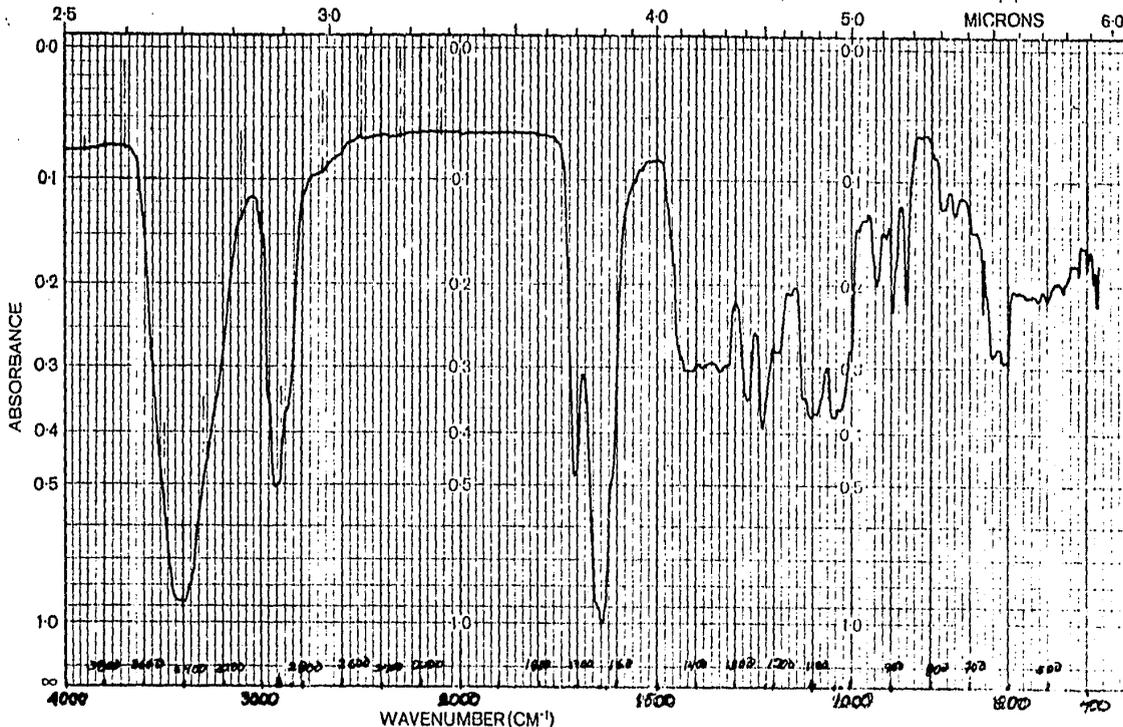


17 Acetate e "S" 2716		SCAN TIME 12		T. SB	PERKIN ELMER CHART No 5100 4306
SLIT N.		ORDINATE EXP. 120			
Date 12-08-89		OPERATOR Marisa DATE		TIME CONSTANT 1	REF No.

6.1 (1) (1) (1) (1) (1) (1)

H) ESPECTROSCOPÍA AL INFRAROJO DE HIDROCORTISONA

NM	GRUPO FUNCIONAL	BANDA
3 400	O-H	ANCHA ("PANZA")
2 900	C-H	PICO
2 890	CH(CH <sub>2</sub> )	HOMBRO
2 820	CH(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> )	HOMBRO
1 710	C=O (CETONA)	PICO
1 640	C=C	HOMBRO
1 260	C-O (CETONA)	PICO PEQUEÑO
1 020	C-O (CETONA)	HOMBRO
900	C+C	PICO PEQUEÑO
650	C-OH (ALCOHOL PRIMARIO)	PICO PEQUEÑO



MADE IN WEST GERMANY

SAMPLE <i>Nickartzama</i> <span style="float: right;">2718</span>	SOLVENT. <i>12/11/184 - Slna</i>	REMARKS
ORIGIN <i>Sina</i>	CONCENTRATION	
<i>praktik - KB</i>	CELL PATH	
	REFERENCE	

FORMULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA C. LUNATA (CLT-123)  
UTILIZADA EN ESTE TRABAJO.

MEDIO SDA.

SABOURAD DEXTROSA (DESH)	30 g	DIFCO
AGAR	20 g	BIOXÓN
H <sub>2</sub> O	1000 ML	

PH FINAL 5.7

MEDIO PDA.

PAPA DEXTROSA (DESH)	30 g	DIFCO
AGAR	20 g	BIOXÓN
H <sub>2</sub> O	1000 ML	

PH FINAL 5.8

MEDIO VCG-1

*CSL	40 g	PH = 6,3 CORREGIDO CON NAOH 2 N DESPUÉS DE ESTERI- LIZAR
GLUCOSA	20 g	
H <sub>2</sub> O	1000 ML	

MEDIO VCG-2

\*CSL        10 g  
H<sub>2</sub>O        1000 ML

PH = 6.3 CORREGIDO CON  
NAOH 2N DESPUÉS DE ESTERILI-  
ZAR

MEDIO CG

\*CSL        80 g  
GLUCOSA    10 g  
H<sub>2</sub>O        1000 ML

MEDIO CG-60

60 g  
10 g  
1000 ML

MEDIO CG-40

40 g  
10 g  
1000 ML  
PH = 6.3  
CORREGIDO  
CON NAOH 2N  
DESPUÉS DE  
ESTERILIZAR

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS

NAH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O                    12.19 g  
NAHPO<sub>4</sub>12H<sub>2</sub>O                    4.41 g  
  
H<sub>2</sub>O                    100 ML

TODOS LOS MEDIOS SE ESTERILIZAN A 120°C POR 15 MIN. EN AU-  
TOCLAVE.

\*CSL = CORN STEP LIQUOR (AGUA DE COCIMIENTO DE MAÍZ)

## CONCLUSIONES

1.-UTILIZANDO EL MOHO C. LUNATA (CLT-123) QUE TIENE UN SISTEMA ENZIMÁTICO CAPAZ DE HIDROXILAR MOLÉCULAS COMPLEJAS COMO SON LOS ESTEROIDES, SE LOGRÓ EL OBJETIVO ESTABLECIDO EN ESTE TRABAJO QUE FUÉ REALIZAR LA HIDROXILACIÓN CON EXCELEN- TES RESULTADOS SOBRE UN ESTEROIDE CON PROPIEDADES Y CONFOR- MACIÓN DEFINIDAS.

C. LUNATA (CLT-123) EN SU SISTEMA ENZIMÁTICO, CUENTA CON - UNA ENZIMA - 11-HIDROXILASA CON CAPACIDAD DE REARREGLO DEL  $O_2$  ATMOSFÉRICO Y DE AÑADIR UN HIDRÓGENO PARA FORMAR EL GRU- PO HIDROXILO Y SITUARLO EN EL CARBONO 11 DEL ESTEROIDE.

2.-DESDE EL PUNTO DE VISTA QUÍMICO ES MUY IMPORTANTE TAM- BIÉN ESTA REACCIÓN, YA QUE LA MOLÉCULA ESTEROIDE NO SE EN- CUENTRA EN UN SÓLO PLANO EN EL ESPACIO Y ASÍ LA HIDROXILA- CIÓN POR SÍNTESIS QUÍMICA ES DIFÍCIL DE EFECTUAR POR IMPEDI- MENTOS ESTÉRICOS INTERNOS DE LA MOLÉCULA ESTEROIDE.

3.-EL MÉTODO DESARROLLADO CON C. LUNATA (CLT-123) DÁ BUENOS RESULTADOS, EN COMPARACIÓN CON LA SÍNTESIS QUÍMICA, QUE ES MUY LARGA DEBIDO A LA COMPLEJIDAD DE LA MOLÉCULA ESTEROIDAL Y SU DIFICULTAD CONFORMACIONAL PARA SER HIDROXILADA. (4) (19).

4.-UNA VENTAJA DE TIPO ECONÓMICO AL FORMULAR LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA EL PROCESO, ES QUE SE UTILIZA AGUA DE COCIMIENTO DE MAÍZ (CSL SUBPRODUCTO EN EL COCIMIENTO DEL MAÍZ) QUE ES UNA RICA FUENTE DE NUTRIENTES PARA EL MICROORGANISMO; - CON LO CUAL SE REDUCEN LOS COSTOS DE PROCESO Y LA EFECTIVIDAD NUTRITIVA ES IGUAL QUE SI SE FORMULARA POR SEPARADO CADA COMPONENTE PARA TENER UN MEDIO NUTRIENTE EQUIVALENTE, SÓLO QUE EL COSTO DE ÉSTE SERÍA MAYOR.

5.-LOS OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO FUERON LOGRADOS, YA QUE SE PUDO ESTABLECER UN MÉTODO A NIVEL PRIMARIO, EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL 17 ACETATO DE "COMPUESTO S", A TRAVÉS DEL MOHO C. LUNATA (CLT-123) SOLICITADO EN EL EXTRANJERO -- POR TENER UNA ALTA EFICIENCIA HIDROXILANTE ESPECÍFICA Y POR QUE SE APROVECHARON NUTRIENTES Y COMPUESTOS SEMISINTÉTICOS DERIVADOS DE PROCESOS Y RECURSOS NATURALES DEL PAÍS.

BIBLIOGRAFIA

- 1) EL REFAT., SALLAM, L. INDIAN J. ESP. BIOL. 1975, 13  
(4) 400-1 11 -HYDROXILATION OF PROGESTERONE WITH  
CURVULARIA LUNATA  
CHEMICAL ABSTRACTS 83, 1975, 175600
- 2) CHARNEY, W. AND HERZOG, H.  
MICROBIAL TRANSFORMATIONS OF STEROIDS. A HAND BOOK.  
ACADEMIC PRESS, N. Y., LONDON (1967).
- 3) CASAS CAMPILLO, C., Y RIUZ HERRERA, J.  
ESTEROIDES CLXV. FACTORES NUTRICIONALES DE PHIZOPUS  
NIGRICANS EN LA 11 - - HIDROXILACIÓN DE LA 19-NOR  
PROGESTERONA. REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLO-  
GÍA 3 (4) Dic. 1960, México.
- 4) KLYNE, W.  
QUÍMICA DE LOS ESTEROIDES. 1A. EDICIÓN. COMP. EDIT.  
CONTINENTAL, S. A., ESPAÑA (1970)
- 5) YONG YENG LIN, LELAND, S.  
MICROBIAL HYDROXILATION IV. DIFFERENTIAL METABOLISM OF  
19 NOR STEROID ANTIPODES BY CURVULARIA LUNATA  
J. AM. CHEM. SOC. 34, 3530 (1959)

- 6) SHULL, G. AND KITA, D.  
MICROBIOLOGICAL CONVERSION OF STEROIDS  
INTRODUCTION OF THE 11-<sup>C</sup><sub>21</sub>-HYDROXYL GROUP INTO  
STEROIDS. J. AM. CHEM. SOC. 77, 763-64 (1955)
  
- 7) TALALAY, P.  
ENZYMATIC MECHANISMS IN STEROID BIOCHEMISTRY  
ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY 34, 347-90 (1965)
  
- 8) ZVIDWEG, J. H.  
HYDROXYLATION OF REICHSTEIN COMPOUND S WITH CELL-FREE  
PREPARATIONS FROM CURVULARIA LUNATA  
BIOCHIN. BIOPHYS. ACTA, 152, 144-158 (1968)
  
- 9) DE FLINES, J.  
THE USE OF BIOCATALYSIS IN THE SYNTHESIS AND TRANSFOR  
MATION OF STEROIDS. FERMENTATION ADVANCES, P. - -  
385-88 (1963).
  
- 10) BAILEY, E. OLLIS, D.  
BIOCHEMICAL ENGINEERING FUNDAMENTALS  
Mc GRAW HILL BOOK Co. (1977)

- 11) PELCZAR, M. Y REID P.  
MICROBIOLOGÍA. 1A. ED. MC GRAW HILL  
MÉXICO, (1966)
- 12) MALKINSON, A.  
ACCIÓN HORMONAL. CUADERNOS DE BIOLOGÍA.  
EDIT. OMEGA, S. A., BARCELONA (1979)
- 13) PÉREZ MIRANDA, L.  
COMPENDIO ANALÍTICO PARA CORTICOSTEROIDES EN FORMAS  
FARMACEÚTICAS. TESIS. UNAM, F.C. MÉXICO (1979)
- 14) HAYANO, M., SAITO, A., STONE, D.  
HYDROXYLATION OF STEROIDS BY MICROORGANISMS IN THE  
PRESENCE OF  $O_2^{18}$  BIOCHIM. BIOPHYS.  
ACTA. 19, 380-381 (1956)
- 15) CAPEK, A., HANC, O., TADRA, M.  
MICROBIAL TRANSFORMATIONS OF STEROIDS  
ACADEMIC OF SCIENCES PRESS. PRAGUE (1966)
- 16) MARENZI, A.  
HORMONAS CAP. XV, P. 628-9 EID. ATENEO  
BUENOS AIRES (1957)

- 17) DANIELLI, J., DAVIES, T.  
BRITISH FERMENTATION INDUSTRIES, LONDON (1955)
- 18) DORFMAN, R. Y UNGAR, F.  
METABOLISM OF STEROID HORMONES. N. Y. (1959)
- 19) DULANEY, E., STAPLEY, O.  
STUDIES ON THE TRANSFORMATION OF 11-DEOXY-17-STRAIN  
CURVULARIA LUNATA. APPL. MICROBIOL. 17, 726-84  
(1959).
- 20) FRIED, J., W., HERZ, J. E.  
THE USE OF MICROORGANISM IN THE SYNTHESIS OF STEROID  
HORMONES AND HORMONES ANALOGUES.  
RED. PROG. HORMONES RES. 11, 149-191 (1955)
- 21) BARRET, H., HUNTER, B.  
ILLUSTRED GENERA OF IMPERFECT FUNGI  
BURGESS PUB. Co., 3A. ED. N. Y. (1969)
- 22) PETROW, V.  
MICROBIAL TRANSFORMATIONS OF STEROLS  
SOC. OF CHEM. IND. LONDON (1969)

- 23) THOMA, R., LEE, B., BROWN, W.  
MICROBIL 11 HYDROXYLATION OF 16-17 DIHIDROXI PREGN  
4-EN-3-ONES. (SCUIBB. E. INC.) GER. OFFEN 1,928,602  
18 DEC. 1969, US 2016353 6 APR. 1970.
- 24) LITTER, M.  
FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL Y CLÍNICA CAP. 37  
5A. ED. EDIT. ATENEO, BUENOS AIRES (1960)
- 25) SMITH, G.  
INTRODUCCIÓN A LA MICOLOGÍA INDUSTRIAL  
EDIT. ACRIBIA, ZARAGOZA (1965)
- 26) KING, B.  
STEOIRD-CELLS INTERACTIONS. BUTERWORTHS  
LONDON, (1974)
- 27) SILVERSTEIN, R.  
SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ORGANIC COMPNDS  
SILLEY 1 SONS. N. Y. (1972)
- 28) DYAR, J.  
APPLICATIONS OF ABSORPTION SPECTROSCOPY OF ORGANIC  
COMPOUNDS  
PRENTICE HALL 3A. ED. N. Y. (1975)

- 29) MARSHALL, C., RAY., E., LAOS, I.  
7-KETOSTEROIDS II STEROIDAL 3 -HYDROXY 5-7 ONES  
AND 3,5 -7-ONES, J. A. C. S. 79 DEC. P 6308-13  
(1957)
- 30) REITHEL, F. J.  
CONCEPTOS DE BIOQUÍMICA Mc GRAW HILL  
MADRID (1970)
- 31) RAKOFF, H.  
QUÍMICA ORGÁNICA FUNDAMENTAL  
ED. LIMUSA MÉXICO (1975)
- 32) AGUILERA, G.,  
LA INDUSTRIA QUÍMICO-FARMACEÚTICA DURANTE LOS ÚLTIMOS  
CINCO AÑOS.  
QUIMITECNIC 3 (25) P.34-36, DIC. 1981.