

Review

BIOTRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS SUSTITUIDOS MEDIANTE HONGOS FILAMENTOSOS FITOPATÓGENOS DE LOS GÉNEROS *Botryodiplodia* y *Colletotrichum*

Rodrigo Velasco B., Diego L. Montenegro M., John F. Vélez S., Carlos M. García P.¹,
Diego L. Durango R.^{1*}

RESUMEN

Los hongos fitopatógenos de los géneros *Colletotrichum* y *Botryodiplodia* han sido reconocidos por poseer la habilidad natural de transformar compuestos presentes en las plantas, tanto en su proceso de colonización como para hacer frente a los mecanismos de defensa del huésped (destoxificación de fitoalexinas). Asimismo, han demostrado su versatilidad para metabolizar algunas sustancias xenobióticas. Actualmente, esta clase de microorganismos poseen aplicación potencial en procesos de biotransformación para la síntesis orgánica de moléculas pequeñas, las cuales nutren la industria química, farmacéutica, y agrícola. Entre las ventajas que presenta el empleo de los sistemas biológicos para la síntesis orgánica, se encuentra el hecho de que son procesos frecuentemente más regio-, quimio- y estereoselectivos que los métodos de síntesis clásica y además, se llevan a cabo bajo condiciones suaves y amigables con el ambiente. Esta revisión describe algunos de los artículos recientes más relevantes relacionados con la biotransformación de sustratos aromáticos sustituidos y también algunas de las aproximaciones que hemos realizado en nuestro grupo de investigación, empleando los hongos fitopatógenos de los géneros *Colletotrichum* y *Botryodiplodia* como biocatalizadores en la química orgánica sintética.

Palabras clave: Rutas metabólicas, precursores sintéticos, hidroxilación, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Botryodiplodia theobromae*.

BIOTRANSFORMATION OF COMPOUNDS AROMATIC SUBSTITUTED BY FILAMENTOUS PHYTOPATOGENIC FUNGUS OF THE GENERA *Botryodiplodia* and *Colletotrichum*

ABSTRACT

Phytopathogenic fungi of genus *Colletotrichum* and *Botryodiplodia* have been recognized for their natural ability to transform natural compounds from plants, as in their processes of colonization as to counteract to the defenses mechanisms from the host (detoxification of phytoalexins). Likewise, they have shown versatility for metabolize some xenobiotics substances. Nowadays, these classes of microorganisms have potential application in biotransformation processes for the organic synthesis of small molecules, which feed the

¹ Grupo de Química de los Productos Naturales y los Alimentos, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Nacional de Colombia, Calle 59ª 63-020 Autopista Norte, AA 3840, Medellín, Colombia.

* Autor para la Correspondencia: Tel.: + 57-4-430 93 92; fax: +57-4-260 44 89.

Correo electrónico: <dldurango@unalmed.edu.co>; <dldurango@unal.edu.co> (D.L. Durango).

chemical, pharmaceuticals and agricultural industries. Inside the advantages of the employ of the biological systems for the organic synthesis is in fact that they are processes frequently more regio-, chemo- and stereoselectives than the methods of classic synthesis, besides they are carry out under mild and soft conditions with the environment. This review describe some of the more relevant recent articles related with the biotransformation of substrates aromatic substituted and also some approximations which we have developed in our research group, employed the phytopatogenic fungi of the genus **Colletotrichum** and **Botryodiplodia** like biocatalyst in the synthetic organic chemistry.

Key word: Metabolic pathway, synthetic intermediates, hydroxylation, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Botryodiplodia theobromae*.

INTRODUCCIÓN

La bioconversión es el proceso por el cual se produce la transformación de un compuesto químico en otro mediante el uso de un sistema biológico, que puede ser un organismo completo, o una enzima o sistema enzimático. Si la conversión química de la sustancia se lleva a cabo con la ayuda de una enzima libre o inmovilizada, se emplea el término biocatálisis. Por su parte, si se lleva a cabo con la ayuda de una célula completa (usualmente) conteniendo la enzima necesaria, se habla de biotransformación¹. Debido a que esta clase de procesos biotecnológicos, son una alternativa limpia y económica para la obtención de productos químicos, se han catapultado al interior del sector químico especializado, donde el escenario de trabajo y las características de sus productos exigen óptimas condiciones de operación.

En la última década, las biotransformaciones han recibido un interés creciente y actualmente, se han constituido en una de las áreas más promisorias de investigación científica, debido a su posible aplicación en la obtención de materias primas y productos útiles en diferentes procesos industriales y en sectores tan trascendentes como el farmacéutico, el químico, el de los alimentos y el agrícola; de ahí que en el mundo se destinen altas inversiones para su desarrollo²⁻⁴. Se considera que de los 134 procesos industriales reconocidos que utilizaron este tipo de procesos en el año 2002, más de la mitad aparecieron en los últimos 10 años, y la tendencia aumentó notoriamente en el pasado trienio⁵. De estos procesos, la mayor parte corresponden al sector farmacéutico, con un 55%, y tienen como finalidad obtener fármacos quirales enantioméricamente puros. En esta industria la modificación estructural de compuestos esteroidales también es una prioridad.

Las ventajas que los procedimientos de biotransformación tienen sobre los métodos químicos, se basan en que las reacciones catalizadas por enzimas son frecuentemente más regio-, quimio- y estereoselectivas⁶⁻⁸. Muchas biotransformaciones no sólo son regio- y estereoespecíficas sino también enantiospecíficas, permitiendo la producción de productos quirales a partir de mezclas racémicas⁹⁻¹¹. Las condiciones para las biotransformaciones en la mayoría de los casos no requieren de la protección de otros grupos funcionales¹². Además, las características que gobiernan su regioespecificidad difieren de aquellas que controlan la especificidad química, ya que la característica dominante en una biotransformación es la relación topológica entre el sustrato y el sitio activo de la enzima. De esta manera, las biotransformaciones encuentran especial aplicación en la preparación de algunos compuestos en los que la transformación química es, hasta ahora, imposible^{6,13}. Por ejemplo, es posible realizar biotransformaciones en centros que son no reactivos químicamente, como la oxidación de enlaces C-H de hidrocarburos para la obtención de compuestos oxifuncionalizados^{14,15}. Desde el punto de vista comercial, algunas biotransformaciones

pueden ser más económicas y directas que sus análogas químicas, y adicionalmente, las transformaciones proceden bajo condiciones que son normalmente reconocidas como amigables con el ambiente, ya que tienen lugar principalmente en agua y los subproductos son biodegradables o reutilizables, lo que constituye una contribución a la generación de una "química verde", de bajo impacto ambiental¹⁶. Adicionalmente, cuando el biocatalizador, microorganismo o enzimas aisladas, están inmovilizados se pueden reciclar varias veces sin pérdida significativa de sus propiedades catalíticas⁶.

Aunque la principal aplicación de las biotransformaciones en síntesis orgánica está en la preparación de compuestos enantiopuros, éstas también se usan para efectuar transformaciones de grupos funcionales aquirales; ya que las biotransformaciones se llevan a cabo, generalmente, a temperatura ambiente y presión atmosférica, evitándose con ello el uso de condiciones de reacción extremas, las cuales pudieran causar isomerizaciones, racemizaciones, epimerizaciones o transposiciones⁶. Estas ventajas significativas resultan más importantes aún si consideramos que los productos obtenidos tendrán aplicación en la vida humana ya sea directamente en el uso de medicamentos o indirectamente, en el caso de los agroquímicos, a través de los alimentos ingeridos¹⁷.

EL BIOCATALIZADOR

En las bioconversiones, el agente biológico que activa o acelera la reacción química (biocatalizador) puede ser una enzima o sistema enzimático aislado, o bien el orgánulo, célula o tejido completo en el que este sistema se encuentra¹⁸. El procedimiento más comúnmente empleado en procesos de bioconversión involucra el uso de células completas, en donde toda la maquinaria enzimática está disponible. De otro lado, las preparaciones enzimáticas incluyen extractos enzimáticos de microorganismos, plantas, protozoarios, insectos, entre otros; muchas de estas preparaciones se encuentran actualmente disponibles o son relativamente fáciles de aislar, al menos, en forma bruta¹⁹. Se pueden emplear, además, enzimas puras, aisladas de microorganismos, muchas de las cuales están disponibles comercialmente²⁰. No obstante, cada aproximación presenta sus ventajas y desventajas. Así el procedimiento de emplear células completas es frecuentemente más económico de usar que los sistemas enzimáticos aislados, aunque se tiende a generar más de un producto, lo cual puede o no ser una ventaja²¹. El uso de células completas, en crecimiento o células en reposo (*resting cells*), sin embargo, puede verse afectado cuando se dificulta el paso de los sustratos y productos desde la disolución a través de las membranas y paredes celulares. Las enzimas puras pueden ser estables y fáciles de usar, conduciendo frecuentemente a la obtención de productos únicos y con buen grado de pureza. Para muchas reacciones hidrolíticas, no es necesario el empleo de cofactores. Sin embargo, para reacciones redox, en las cuales se usan cofactores, la necesidad de regenerar este cofactor puede presentar una complicación adicional²¹.

El uso de microorganismos (por ejemplo, bacterias y hongos) como biocatalizadores ha despertado un interés particular, en parte como consecuencia de su habilidad para producir grandes cantidades de biomasa y una amplia variedad de enzimas diferentes en corto tiempo. Además, muchos microorganismos pueden crecer bajo condiciones diversas y en una amplia variedad de sustratos. Esta flexibilidad metabólica exige que los microorganismos posean la capacidad de producir enzimas diferentes para toda clase de reacciones²². Adicionalmente, diversas enzimas, requeridas para llevar a cabo la transformación requerida, pueden estar presentes en las células completas de un microorganismo y actuar simultáneamente sin generar interferencias entre ellas⁶.

En el caso de las enzimas (biocatálisis) pueden usarse de varias maneras: pueden ser de tipo salvaje, recombinadas, o genéticamente modificadas para incrementar su actividad o especificidad. Alternativamente, las enzimas pueden estar en solución, en un reactor de membrana, como suspensión, “cross-linked” o inmovilizadas^{6, 23, 24}. El medio de reacción puede ser acuoso, orgánico o en dos fases^{6, 25, 26}. Además, con los avances en la modificación estructural de las enzimas se posibilita la creación de nuevas moléculas proteicas con actividades catalíticas hechas a la medida de las necesidades; por ejemplo, la preparación de enzimas termoestables o estables a cierto pH, por medio de la mutagénesis aleatoria o dirigida^{6, 27, 28}.

INMOVILIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR

En los procesos de inmovilización, las células completas o las enzimas son confinadas en una porción de espacio con retención de sus actividades catalíticas, las cuales pueden ser usadas repetida y continuamente²⁹. Esta definición se ha ampliado al proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc., por su unión a un soporte³⁰. La inmovilización puede extender la vida del biocatalizador, facilitar su recuperación y reutilización. Cuando las células son usadas como los agentes biocatalíticos, el sistema permite velocidades adecuadas de penetración y difusión de los reactivos y productos al interior de la célula; mientras que en las reacciones con enzimas la formación de subproductos indeseables o la degradación de los productos deseados, son inhibidos o minimizados³¹. Se ha demostrado que la inmovilización de las enzimas y en especial de aquéllas insolubles en agua, aumenta su estabilidad considerablemente, además de permitir la separación de la enzima de los productos y sustratos con un menor costo al requerido mediante técnicas de separación, y con su posterior reutilización, o bien, estableciéndose un proceso continuo con el que se obtienen mejoras evidentes. Adicionalmente, el uso de células o enzimas inmovilizadas es más ventajoso, puesto que permite en uso de concentraciones mayores de compuestos que, normalmente les son tóxicos, aunado a que la densidad celular es superior, lo que implica una mayor proporción de bioconversión y se evita la pérdida de biocatalizadores en el caldo de extracción^{32, 33}. Es de anotar, sin embargo, que la naturaleza heterogénea del catalizador, como es el caso de las enzimas, impone limitaciones de difusión que reducen y afectan su actividad; la alteración de la conformación de la enzima de su estado nativo conlleva una pérdida de la actividad durante el proceso de inmovilización. Además, la enzima inmovilizada presenta un costo superior con respecto a la forma nativa de la enzima.

En los procesos de inmovilización, la retención puede ser por vía física o química, dependiendo del tipo de interacción presente en la inmovilización. Diferentes revisiones enfocadas en los procesos de inmovilización de biocatalizadores pueden encontrarse en la literatura reciente^{34, 35}.

INGENIERÍA GENÉTICA

Las perspectivas de la biotransformación son teóricamente buenas; el número de tecnologías disponibles actualmente y la ingeniería genética acelerarán el impacto de las biotransformaciones en la síntesis orgánica. Con los avances en la ingeniería genética, las enzimas pueden sobreexpresarse en los organismos (por ejemplo, los microorganismos), haciendo los procesos de biotransformación más económicos y eficientes. Así, una vez una enzima ha sido encontrada y su secuencia de aminoácidos (o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína) analizada, se puede hacer uso de la precisión quirúrgica de la ingeniería genética o el clonado de genes.

Cuando la ingeniería genética se aplica a la modificación de las proteínas se utiliza el término de ingeniería de proteínas. De la misma manera, cuando de lo que se trata es de modificar un proceso metabólico se emplea el término de ingeniería metabólica³⁶. Las herramientas de la ingeniería de proteínas y de la metabólica se han desarrollado no sólo para ampliar el conocimiento de la bioquímica, sino que hoy en día, mediante estas herramientas, se optimizan muchos procesos biocatalíticos para producir compuestos de interés químico y sobre todo farmacéutico. Junto con estas herramientas se han desarrollado nuevos conceptos y metodologías, como la evolución dirigida o la genética combinatorial en sus distintas versiones, que pretenden conseguir nuevas formas de proteínas o de sistemas metabólicos mediante la inclusión al azar en un organismo de distintos genes o librerías génicas (biblioteca o conjunto de genes clonados en un vector). La posterior selección del organismo recombinante mediante el empleo de sistemas robotizados de cribado masivo de muestras (*high-throughput screening*) permite obtener en poco tiempo la proteína o el organismo deseado³⁷.

BIOTRANSFORMACIÓN DE SUSTRATOS AROMÁTICOS SUSTITUIDOS

Los compuestos aromáticos alquilsustituídos han sido empleados como sustratos en diferentes procesos de biotransformación, con el objeto de obtener productos con valor agregado a partir de sustratos económicos y disponibles comercialmente^{38, 39}. La biotransformación de compuestos ha permitido la obtención de moléculas pequeñas mediante procesos económicos de bajo impacto ambiental, tales como los alcoholes secundarios enantioméricamente puros, los cuales han sido utilizados como precursores en la industria química, farmacéutica y para la obtención de sabores, fragancias y cristales líquidos^{40, 41}. Frecuentemente, la aplicación de estos procesos pretende aprovechar el alto grado de selectividad, e incluso especificidad, que poseen los sistemas enzimáticos para la obtención de materiales especializados, como los ciclohexadieno-*cis*-dioles; sintones quirales valiosos en la síntesis de una amplia variedad de productos naturales y moléculas de interés biológico⁴². Asimismo, se ha empleado la biorresolución en diversos sustratos aromáticos sustituidos, para la obtención de sintones ópticamente activos a partir de mezclas racémicas, con el objeto de obtener productos de síntesis final con características espaciales determinadas; lo anterior con el ánimo de evitar la formación de productos con alguna actividad biológica indeseable, o potenciar las características del producto de interés. Este tipo de aplicación ha recibido un interés particular para la preparación de aromatizantes y saborizantes^{43, 44}. En la tabla 1, se mencionan algunas de las biotransformaciones que se han llevado a cabo en los últimos años empleando algunos sustratos aromáticos sustituidos; un amplio número de estos trabajos emplean como biocatalizador células completas de hongos y levaduras. Otros trabajos han sido reportados empleando células vegetales^{11, 45} y algas rojas⁴⁰ para efectuar modificaciones sobre este tipo de sustratos. Entre los compuestos más utilizados en las modificaciones biocatalíticas se encuentran la acetofenona y el benzaldehído. El primer sustrato permite, mediante biorreducción asimétrica, la obtención de un sintón quiral de amplio uso en la síntesis de fármacos, aromas y productos naturales⁴⁶. La biotransformación del benzaldehído, por su parte, conduce a la formación de fenilacetilcarbinol, un intermedio quiral en la producción de compuestos farmacéuticos como la efedrina y pseudoefedrina.

Tabla 1. Biotransformación de sustratos aromáticos sustituidos

SUSTRATO	PRODUCTOS	ORGANISMO	REFERENCIA
Acetofenona	Alcohol <i>R</i> - y <i>S</i> -feniletílico	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
Acetofenona	Alcohol <i>S</i> -feniletílico	Células vegetales Raíces de zanahorias (<i>Daucus carota</i>) modificadas naturalmente mediante <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	48
Benzaldehído	<i>R</i> -fenilacetilcarbinol	Hongos <i>Rhizopus javanicus</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus tamarii</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Polyporus eucalyptorum</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Monilia sitophila</i> , <i>Paecilomyces lilacinus</i> y <i>Mucor rouxii</i>	49
		Levaduras <i>Candida utilis</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
		Levadura Piruvato descarboxilasa (PDC) en forma de <i>Candida utilis</i>	50, 51
		Hongo Piruvato descarboxilasa (PDC) de <i>Rhizopus javanicus</i>	52, 53
Benzaldehído	<i>S</i> -fenilacetilcarbinol	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
Ácido <i>p</i> -coumárico	Ácido caféico Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico Ácido protocatechuico	Bacteria <i>Streptomyces caeruleus</i>	41
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	Ácido protocatechuico	Bacteria <i>Streptomyces caeruleus</i>	41
Ácido caféico	Ácido protocatechuico	Bacteria <i>Streptomyces caeruleus</i>	41
Ácido <i>p</i> -coumárico	Ácido caféico	Hongo <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	39
Ácido cinámico, Ácido caféico, Ácido ferúlico, Ácido <i>p</i> -coumárico, Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	Esteres con alcoholes alifáticos (1-octanol)	Hongos Lipasas inmovilizadas de <i>Candida antarctica</i> y <i>Rhizomucor miehei</i>	55
Dietil de 2-oxo-2-feniletilfosfonato	Derivados de 2-hidroxi-2-feniletilfosfonato <i>o</i> -fosforilados <i>o</i> -fosforilados dietil hidroxifosfonato	Hongos <i>Beauveria bassiana</i> <i>Rhodotorula rubra</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Penicillium oxalicum</i> <i>Cladosporium</i> sp.	56
Alcohol <i>p</i> -2-hidroxibencilico (HBA)	Gastrodin	Hongos <i>Armillaria luteo-virens</i> Sacc <i>Aspergillus foetidus</i> <i>Penicillium cycloptium</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Trichoderma</i> sp. <i>Penicillium notatum</i> <i>Mucor</i> sp.	57
Ácido vanílico	Metoxihidroquinona, Alcohol vanílico, Vanillina	Hongo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	38
Óxido de <i>trans</i> -1-fenilpropano, 1,2-diol	<i>trans</i> -1-fenilpropano-1,2-diol	Levaduras <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Trichosporon</i> sp.	58
(2,3 -epoxi-propil)-benceno	3-fenilpropano-1,2-diol	Levaduras <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Trichosporon</i> sp.	58

BIOTRANSFORMACIONES CON HONGOS FITOPATÓGENOS

Entre los organismos que más se han explorado por su capacidad transformadora, se destacan por su eficiencia los hongos fitopatógenos. Éstos, además de poseer la habilidad natural de modificar compuestos presentes en las plantas (por ejemplo, terpenos, coumarinas, estilbenos, fenilpropanos y flavonoides) en su proceso de colonización, y en algunas ocasiones para hacer frente a los mecanismos de defensa del huésped (destoxicación de fitoalexinas); también pueden metabolizar algunas sustancias xenobióticas, tales como pesticidas y colorantes, entre otros⁵⁹⁻⁶¹. Las células completas de los hongos fitopatógenos se emplean frecuentemente debido a su habilidad para mediar en muchas reacciones diferentes, incluyendo transformaciones oxidativas, reductivas, e hidrolíticas sobre un amplio rango de sustratos⁶². Debido a lo anterior, las biotransformaciones con esta clase de microorganismos permiten generar diversidad estructural en los productos metabólicos, de manera que puedan llevarse a cabo evaluaciones de estructura-actividad biológica sobre una quimioteca particular.

Los hongos en medio líquido pueden crecer, como micelio libre en una forma filamentosa, o permanecer en forma agregada como “bolitas” (pellet/floc). Estos patrones morfológicos regulan fuertemente la producción de metabolitos; sin embargo, los efectos que dichas variaciones morfológicas fúngicas pueden tener sobre las biotransformaciones continúan siendo oscuras.

BIOTRANSFORMACIONES MEDIANTE ESPECIES DEL GÉNERO

Botryodiplodia

Las especies de este género de hongos filamentosos fitopatógenos han sido poco explotadas en cuanto a su capacidad biotecnológica⁶³; los estudios realizados comprenden la obtención de metabolitos propios del patógeno, que como en el caso del ácido jasmónico y sus derivados, poseen potencial aplicación como reguladores del crecimiento de especies vegetales⁶⁴. Desde este punto de vista, la especie *B. theobromae*, más conocida como *Lasiodyplodia theobromae*, ha demostrado una alta capacidad para elaborar esta clase de sustancias, catalogándose como fuente promisoría para la producción a escala industrial. Esta especie se clasifica como un organismo eucariota; en sus condiciones naturales se encuentra en los estados imperfecto (anamorfo) con el nombre de Botryodiplodia y perfecto o teleomorfo con el de Botryosphaeria. Son mínimos los reportes en los cuales se consideran estos microorganismos o sus sistemas enzimáticos para la conversión de sustratos orgánicos, dentro de los cuales se reporta la tendencia del fitopatógeno a producir hidroxilaciones alquílicas, las cuales pueden ser efectuadas sobre las cadenas de algunos esteroides^{65,66}. Este hecho hace que la dinámica de transformar este tipo de metabolitos secundarios mediante especies del género Botryodiplodia sea atractiva. Del mismo modo, se ha publicado la biotransformación de la sesquiterpenolactona zaluzanin-D, sustancia reconocida por sus actividades antifúngicas, antitumorales y de regulación del crecimiento de insectos^{67, 68}. Debido a la facilidad de manipulación de este género en cultivos artificiales, rápido crecimiento e importancia que ha venido adquiriendo como patógeno en los procesos de poscosecha de frutas y verduras, entre otros, amerita que se estudie más detalladamente su dinámica metabólica. En la tabla 2 se compilan algunos trabajos que se encuentran en la literatura científica sobre biotransformaciones con especies del género Botryodiplodia.

Tabla 2. Biotransformación de sustratos empleando especies del género *Botryodiplodia*

SUSTRATO	PRODUCTOS	ESPECIE	REFERENCIA
Derivados del ácido β -resorcílico	<i>R</i> -2,4-dihidroxi-6-(6-hidroxiheptil)-benzoato de etilo, <i>R</i> -2,4-dihidroxi-6-(6-hidroxiheptil)-benzoato de isobutilo, Ácido <i>R</i> -2,4-dihidroxi-6-(6-hidroxiheptil)-benzoico, <i>R</i> -2,4-dimetoxi-6-(6-hidroxiheptil)-benzoato de etilo, <i>R</i> -2,4-dimetoxi-6-(6-hidroxiheptil)-benzoato de isobutilo, Ácido <i>R</i> -2,4-dimetoxi-6-(6-hidroxiheptil)-benzoico.	<i>L. theobromae</i>	69
2-metilquinoxalina	Ácido 2-quinoxalinacarboxílico	<i>Diplodia gossypina</i> ^a ATCC No. 20575	70
zaluzanin-D	11,13-dihidrozaluzanina-C	<i>B. theobromae</i>	68
^b Acetato [1- ¹³ C] de sodio, acetato [2- ¹³ C] de sodio, acetato [1,2- ¹³ C ₂] de sodio, acetato [2- ² H ₃ ,2- ¹³ C] de sodio	(1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>)-3-metil-7-oxa-biciclo[4.1.0]-3-hepteno-2,5-diol; (1 <i>S</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>)-7,9-dioxa-3-metil-8-oxobiciclo[4.3.0]-2-noneno-4,5-diol	<i>L. theobromae</i>	71

^a *D. gossypina*, sinón. *L. theobromae* reportado por Cooke.

^b Marcación isotópica del sustrato para seguimiento por espectroscopía.

BIOTRANSFORMACIONES DE SUSTRATOS AROMÁTICOS SUSTITUIDOS CON *Botryodiplodia theobromae*

En investigaciones preliminares realizadas en nuestro grupo de investigación, exploramos la dinámica de las reacciones enzimáticas que produce la especie *B. theobromae*, con el objeto de determinar su viabilidad en la reducción de grupos carbonilo, y las posibles preferencias para la hidroxilación de cadenas alquílicas o sistemas aromáticos en sustratos aromáticos sustituidos⁶³. En los procesos se utiliza medio de cultivo líquido Czapeck-Dox, sustituyendo sacarosa por glucosa en la formulación original y conservando la misma proporción por litro del medio. El proceso se realizó en un ambiente aeróbico en erlenmeyers de 1,0 litros taponados con tarugos de algodón conteniendo 500 ml del medio. La inoculación se realizó con trozos de cultivos con edad no superior a 10 días. El proceso de biotransformación se extendió por un periodo máximo de 7 días, procurando biotransformar la mayor parte del sustrato de partida, y la obtención de una gama amplia de compuestos de biotransformación, que incluyeran metabolitos de oxidación iniciales y los provenientes de procesos de oxidaciones más avanzadas.

Biotransformación del sustrato 2-feniletanol (A)

A partir de este sustrato se logró aislar e identificar los metabolitos: acetato de 2-feniletanol (B), feniletanodiol (C), ácido 2-fenilacético (D) y fenilacetato de 2-feniletanol (E). En la figura 1 se plantea el posible origen de cada uno de los compuestos formados. Se observa que el metabolismo de *B. theobromae* tiene la capacidad de hidroxilar la cadena alquílica en la posición bencílica, dando lugar a la formación del metabolito (C). La oxidación de la cadena alquílica en la posición 1 del sustrato de partida, permite formar el compuesto (D), el cual se consideró como el precursor del éster del 2-feniletanol, compuesto (E); finalmente, se observó la tendencia del microorganismo a esterificar mediante acetilación para producir el compuesto (B)⁷².

En estudios realizados modificando las condiciones del proceso de biotransformación del sustrato 2-feniletanol, tales como el pH, el tiempo y la oxigenación, con la especie *B. theobromae*, se concluye que la eficiencia del proceso es dependiente de las condiciones del mismo. Así, uno de los factores que más influyó en la eficiencia del proceso fue el pH. Los estudios revelaron una marcada tendencia del hongo fitopatógeno a reducir el pH durante la conversión biocatalítica; el empleo de soluciones tamponadas condujo a la formación en mayor concentración de los productos metabólicos⁷³.

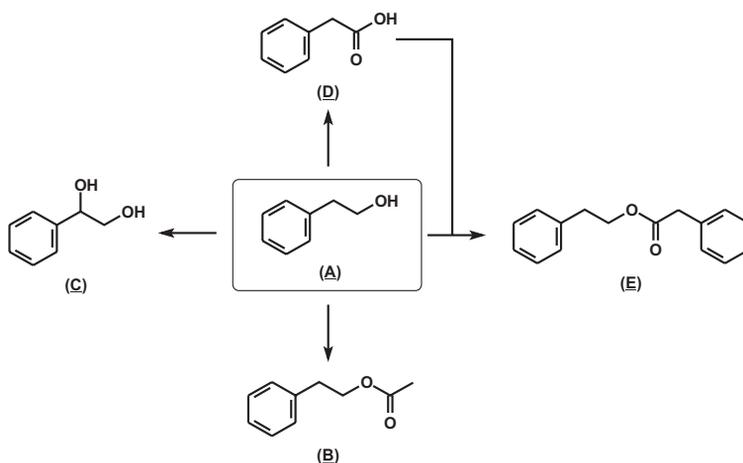


Figura 1. Proceso de biotransformación del sustrato 2-feniletanol (A) mediante el hongo *B. theobromae*

Biotransformación del sustrato acetofenona (F)

A partir del proceso de biotransformación de la acetofenona (F) se logró aislar e identificar los metabolitos: 2-feniletanol (A), 1-feniletanol (G), acetato de 1-feniletanol (H), 2-feniletanol (I), y ácido 2-fenilacético (J). En la figura 2 se presenta una posible ruta metabólica de la acetofenona. Se aprecia que *B. theobromae* tiene la capacidad de reducir el grupo carbonilo, para generar el correspondiente alcohol secundario (G); no se logró determinar la estereoquímica de esta reducción, por lo tanto no se obtuvieron datos que permitieran esclarecer la estereoselectividad del proceso. De manera similar que la biotransformación del sustrato (A), se observó la tendencia de *B. theobromae* para acetilar el alcohol secundario, dando lugar a la formación del compuesto (H)⁷².

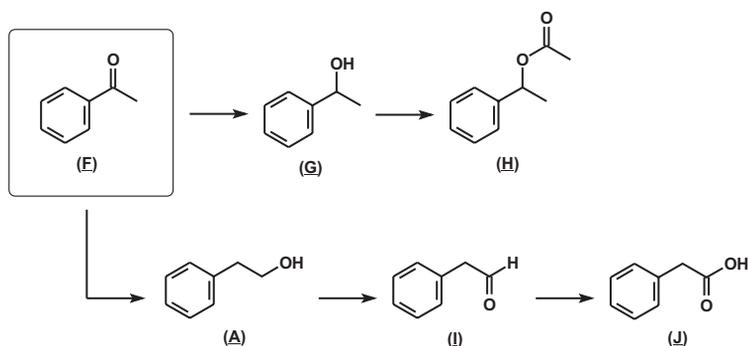


Figura 2. Proceso de biotransformación del sustrato acetofenona (**F**) mediante el hongo *B. theobromae*

Curiosamente, en esta biotransformación se logró obtener el metabolito (**A**), el cual proviene de un posible reagrupamiento del sustrato de partida, a través de un proceso de tautomerismo ceto-enol; posterior hidratación de la insaturación enólica y deshidratación-hidrogenación enzimática (figura 3). En los productos de biotransformación no se logró observar la presencia de los enoles (**K**) y (**L**), muy posiblemente debido a la baja estabilidad de estas especies precursoras o su rápida conversión en el medio de cultivo. La presencia del aldehído (**I**) y el ácido 2-fenilacético (**J**), confirman la formación del compuesto (**A**) y descartan la posibilidad de que se trate de un contaminante. La formación de estos dos últimos metabolitos es muy probable que se origine desde el sustrato (**A**), a través de un proceso de oxidación secuencial: alcohol-aldehído-ácido carboxílico^{73,74}.

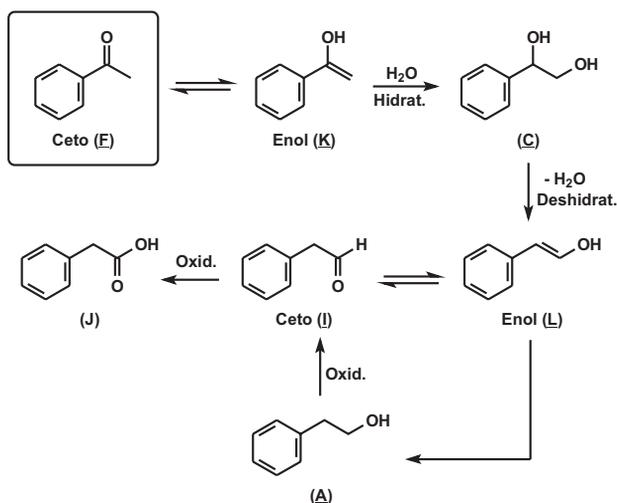


Figura 3. Posible origen de formación de los metabolitos 2-feniletanol (**A**), 2-feniletanal (**I**) y ácido 2-fenilacético (**J**) mediante el hongo *B. theobromae*

BIOTRANSFORMACIONES MEDIANTE ESPECIES DEL GÉNERO *Colletotrichum*

Este es un género de hongos filamentosos fitopatógenos que tienen gran incidencia económica sobre la producción agrícola de los países tropicales y en las zonas templadas. Normalmente se encuentra como saprofito en residuos de cultivos y sus ataques se ven favorecidos por las condiciones de alta humedad y temperatura, las cuales prevalecen en los trópicos durante gran parte del año y en la mayoría de las zonas de producción⁷⁵. Las enfermedades que ocasionan se conocen comúnmente con el nombre de antracnosis y se presentan tanto en los cultivos como en las labores de poscosecha; los ataques se observan en mayor proporción en las partes aéreas de las plantas y ocasionan la caída prematura de hojas, flores y frutos, y en muchas ocasiones pueden causar su muerte. Las especies de *Colletotrichum* pueden causar infecciones latentes, en las cuales el hongo contamina la fruta verde en el campo y permanece inactivo hasta que la fruta madura, en cuyo caso reanuda su crecimiento pudiendo infectar a las demás que estén alrededor durante el almacenamiento^{76, 77}. En la literatura científica se encuentran un buen número de trabajos de investigación relacionados con las biotransformaciones realizadas por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*); la mayor parte de los estudios se compilan en la revisión bibliográfica presentada por García y otros⁷⁸. En la tabla 3, se citan algunos de los trabajos más recientes sobre biotransformaciones con especies del género *Colletotrichum*.

Tabla 3. Biotransformaciones realizadas con hongos filamentosos del género *Colletotrichum*

SUSTRATO	PRODUCTOS	ESPECIES	REFERENCIA
zaluzanin-D	11,13-dihidrodeacetilaluzanin-D (dihidrozaluzanin-C).	<i>C. lindemuthianum</i>	68
(-)-2-(3',4'-diacetoxifenil)-3,4-diacetoxitetrahydrofurano	(2R(S), 3R(S), 4S(R))-2-(3',4'-dihidroxifenil)tetrahydrofuran-3,4-diol	<i>C. gloeosporioides</i>	79
cicloartenol	24,25-dihidroxicicloartan-3-ona	<i>C. fusarioides</i>	80
Widdrol	14R-hidroxiwiddrol	<i>C. gloeosporioides</i>	81

BIOTRANSFORMACIONES DE SUSTRATOS AROMÁTICOS SUSTITUIDOS CON *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum*

Biotransformación del sustrato 1-(4-clorofenil)-2-feniletanol (M)

Estudios de biotransformación efectuados empleando la cepa de *C. gloeosporioides*, 20122 CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) de origen canadiense y proveniente de aislamientos de fresa, sobre el sustrato 1-(4-clorofenil)-2-feniletanol (**M**) en el medio de cultivo líquido Czapeck-Dox modificado con relación a la fuente de carbono, condujo al aislamiento de los metabolitos presentados en la figura 4⁸².

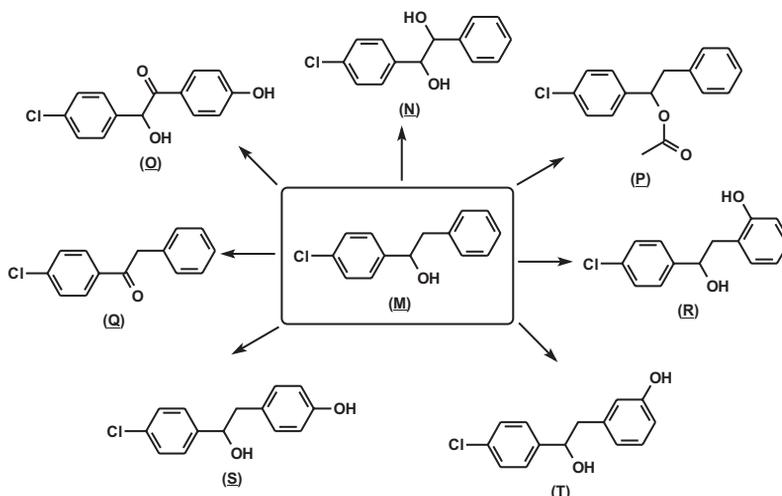


Figura 4. Productos de la biotransformación del sustrato 1-(4-clorofenil)-2-feniletanol (**M**) mediante la cepa 20122 CECT de *C. gloeosporioides*

Biotransformación del sustrato 2-feniletanol (A**)**

En los trabajos de biotransformación que se realizan actualmente en el grupo de Química de los Productos Naturales y los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia (Medellín), se ha encontrado que la especie *C. gloeosporioides* aislada de frutos de *Carica papaya* (papaya) y *C. acutatum* aislada de *Solanum betaceae* (tomate de árbol), biotransforman el sustrato 2-feniletanol (**A**) hacia los siguientes metabolitos: acetato de 2-feniletanol (**B**), feniletanodiol (**C**), y 2-feniletilmetiléter (**U**)⁸³⁻⁸⁵ (figura 5).

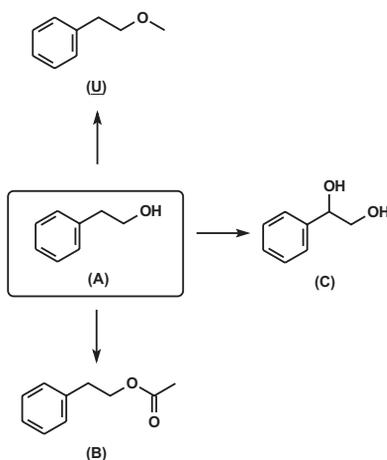


Figura 5. Proceso de biotransformación del sustrato 2-feniletanol (**A**) mediante los hongos *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*

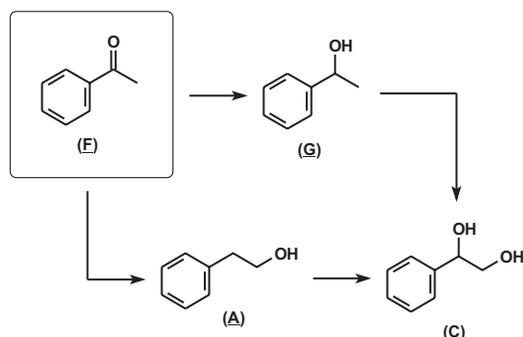


Figura 6. Proceso de biotransformación del sustrato acetofenona (F) mediante los hongos *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*.

Biotransformación del sustrato acetofenona (F)

A partir del sustrato acetofenona (F) se obtuvieron los metabolitos 1-feniletanol (G), feniletanodiol (C), y 2-feniletanol (A)⁸³⁻⁸⁵.

CONCLUSIONES

Con base en la revisión presentada y los trabajos realizados en el grupo de investigación sobre biotransformación con hongos fitopatógenos de los géneros *Colletotrichum* y *Botrydiodiplodia*, se concluye que dichos microorganismos presentan una marcada tendencia hacia la introducción de grupos hidroxilo sobre las cadenas sustituyentes; igualmente, se aprecia la tendencia hacia la reducción de grupos carbonilo de cetonas y aldehídos, además de reacciones de acetilación sobre grupos hidroxilo. Lo anteriormente expuesto, puede considerarse como una alternativa adecuada para la obtención de alcoholes y ésteres de tipo acetato con estructuras novedosas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, por el apoyo brindado en el transcurso de los proyectos de investigación relacionados con el tema.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leresche J.E., Meyer H.P. Chemocatalysis and biocatalysts (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Organic Process Research & Development.*, 2006, 10 (3), 572-580.
2. Food & Drug Administration: FDA's statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality*, 1992, 4, 338-340.
3. Schmid A., Dordick J, Hauer B., *et al.* Industrial biocatalysts today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409, 258-268.
4. Liese A, Filho M. Production of fine chemicals using biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, 10, 595-603.
5. Straathof J., Panke S., Schimid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13, 548-556.

6. Luna H. Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos. *Rev. Soc. Quím. Méx.*, 2004, 48 (3), 211-219.
7. Sime J.T. Applications of biocatalysis to industrial processes. *J. Chem. Educ.*, 1999, 76, 1658-1661.
8. Wandrey C., Liese A., Kihumbu D. Industrial biocatalysis: past, present, and future. *Org. Process Res. Dev.*, 2000, 4, 286-290.
9. Holland H.L. Microbial transformations. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, 2, 77-84.
10. Fotheringham I., Archer I., Carr R., et al. Preparative deracemization of unnatural amino acids. *Biochemical Society Transactions*. 2006, 34 (parte 2), 287-290.
11. Ishihara K., Hamada H., Hirata T., et al. Biotransformation using plant cultured cells. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 2003, 23, 145-170.
12. Hage A., Petra D., Field J., et al. Asymmetric reduction of ketones via whole cell bioconversions and transfer hydrogenation: complementary approaches. *Tetrahedron Asymmetry*, 2001, 12, 1025-1034.
13. Brenna E. Enzyme-mediated syntheses of chiral communication substances: fragrances for perfumery applications. *Current Org. Chem.*, 2003, 7, 1347-1367.
14. Holland H.L. C-H activation. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, 2, 77-84.
15. Uzura A., Katsuragi T., Tani Y. Conversion of various aromatic compounds by resting cells of *Fusarium moniliforme* Strain MS 31. *J. of Bioscience and Bioengineering.*, 2001, 4, 381-384.
16. Rasor P., Voss E. Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Applied Catalysis A: General*, 2001, 221, 145-158.
17. Tang, S., Smith R., Poliakov M. Principles of green chemistry: Productively. *Green Chem.*, 2005, 7, 761-762.
18. Parales R., Bruce N., Schmid A., et al. Minireview: Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3). *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68 (10), 4699-4709.
19. Faber K. Biotransformations of Non-Natural Compounds: State of the Art and Future Development. *Pure & Appl. Chem.*, 1997, 69 (8), 1613-1632.
20. Davies, H. "Biotransformations in preparative organic chemistry : the use of isolated enzymes and whole cell systems in synthesis". London, Academic Press, 1989.
21. Chenault H., Simon, E., Whitesides, G. Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis. *Biotechnology and Genetic Engineering Review*. 1988, 6, 221-70.
22. Holland H., Bergen E., Chenchiah C., et al. Side chain hydroxylation of aromatic compounds by fungi. 1. Products and stereochemistry. *Canadian J. Chem.*, 1987, 65, 502-507.
23. Roberts, S., Casy G., Nielsen M., et al. "Biocatalysis for Fine Chemicals Synthesis". Wiley, New York, 1999.
24. Wong C., Whitesides G. "Enzymes in Synthetic Organic Chemistry". Pergamon, Oxford, 1994.
25. Molinari F., Occhiato E., Aragozzini F., et al. Microbial biotransformations in water/organic solvent system. Enantioselective reduction of aromatic β - and γ -nitroketones. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, 9, 1389-94.
26. Martínez-Lagos F., del Campo C., Sinisterra J., et al. Preparation of halohydrin β -blocker precursors using yeast-catalyzed reduction. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, 11, 4651-60.
27. Kinch L., Grishin N. Evolution of protein structures and functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2002, 12, 400-408.

28. Arnold F., Wintrode P., Miyazaki K., et al. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem Sciences*, 2001, 26, 100-105.
29. Wingard L. "Enzyme Engineering". Interscience Publishers, New York, 1972.
30. Taylor R. "Protein Immobilization: fundamentals and applications". Marcel Dekker, New York, 1991.
31. De Torres C., Fernández-Mayoralas A. Chemoenzymatic polymer-supported liquid phase synthesis of glucose γ -aminobutyric ester. *Tetrahedron Letters*, 2003, 44, 2383.
32. Klivanov A. Immobilized enzymes and cells as practical catalysis. *Science*, 1983, 219, 722-727.
33. Chibata I., Tosa T. Immobilized microbial cells and their applications. *Trends Biochem. Sci.*, 1980, 5, 88-90.
34. Batista-Viera F., Ovsejevi K., Manta C. "Reversible covalent immobilization of enzymes via their thiol groups (Chapter 17)". In: *Methods in Biotechnology*, Vol.22: Immobilization of enzymes and cells. Second edition. José M. Guisán (Ed.). Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2006.
35. Brena B., Batista-Viera F. "Enzyme Immobilization Methods 1965-1995: a literature survey (Chapter 2)". In: *Methods in Biotechnology*, Vol.22: Immobilization of enzymes and cells. Second edition. Guisán J., (Ed.). Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2006.
36. Ogawa, J., Shimizu, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *TIBTECH.*, 1999, 17, 13-20.
37. Centro de Investigaciones Biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. <http://www.ranf.com/publi/mono/015/05.pdf>. Último acceso: Sept. 30 de 2008.
38. Stentelaire, C., Lesage-Meessen L., Delattre M., et al. Short communication: By-passing of unwanted vanillyl alcohol formation using selective adsorbents to improve vanillin production with *Phanerochaete chysosporium*. *World J. Microbiology & Biotechnology*, 1998, 14, 285-287.
39. Estrada I., Navarro D., Record E., et al. Fungal biotransformation of *p*-coumaric acid into caffeic acid by *Pycnoporus cinnabarinus*: an alternative for producing a strong natural antioxidant. *World J. Microbiology & Biotechnology*, 2003, 19, 157-160.
40. Utsukihara T., Misumi O., Nakajima K., et al. Stereoinversion of 1-arylethanols by *Cyanidioschyzon merolae* NEIS-1332. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2008, 51, 19-23.
41. Sachan A., Ghosh S., Kumar S., et al. Co-production of caffeic acid and *p*-hydroxybenzoic acid from *p*-coumaric acid by *Streptomyces caeruleus* MTCC 6638. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 71, 720-727.
42. Hudlicky T., Thorpe A. Current status and future perspectives of cyclohexadiene-*cis*-diols in organic synthesis: versatile intermediates in the concise design of natural products. *J. Chem. Educ. Chem. Commun.*, 1996, 1993-2000.
43. Xu P., Hua D., Ma C. Review: Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. *Trends in Biotechnology*, 2007, 21(12), 571-576.
44. Krings U., Berger R. Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 49, 1-8.
45. Furuya T., Ushiyama M., Asada Y., et al. Biotransformation of phenylacetic acid and 2-phenyl-propionic acid in suspension culture of *Coffea arabica* *Phytochem.*, 1988, 27(3), 803-807.
46. Nakamura K., Yamanaka R., Matsuda T., et al. Recent development in asymmetric reduction of ketones with biocatalysis. *Tetrahedron: Asymmetry.*, 2003, 14, 2659-2681.

47. Brzezińska-Rodak M., Żymańczyk-Duda E., Klimek-Ochab M., *et al.* A simple and green procedure for the microbial effective synthesis of 1-phenylethyl alcohol in both enantiomeric forms. *Biotechnology Letters*, 2006, 28, 511–513.
48. Caron D., Coughlan A., Simard M., *et al.* Stereoselective reduction of ketone by *Daucus carota* hairy root cultures. *Biotechnology Letters*, 2005, 27, 713–716.
49. Rosche B., Sandford V., Breuer M., *et al.* Biotransformation of benzaldehyde into (*R*)-phenylacetylcarbinol by filamentous fungi or their extracts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 57, 309–315.
50. Satianegara, G., Breuer M., Hauer B., *et al.* Enzymatic (*R*)-phenylacetylcarbinol production in a benzaldehyde emulsion system with *Candida utilis* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 70, 170–175.
51. Rosche B., Breuer M., Hauer B., *et al.* Cells of *Candida utilis* for *in vitro* (*R*)-phenylacetylcarbinol production in an aqueous/octanol two phase reactor. *Biotechnology Letters*, 2005, 27, 575–581.
52. Rosche B., Leksawasdi N., Sandford V., *et al.* Enzymatic (*R*)-phenylacetylcarbinol production in benzaldehyde emulsion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 60, 94–100.
53. Rosche B., Sandford V., Breuer M., *et al.* Enhance production of *R*-phenylacetylcarbinol (*R*-PAC) through enzymatic biotransformation. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 2002, 19-20, 109–115.
54. Zhang W., Wang Z., Li W., *et al.* Production of *L*-phenylacetylcarbinol by microbial transformation in polyethylene glycol-induced cloud point system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 78, 233–239.
55. Stamatis H., Sereti V., Kolisis F. Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *JACOS.*, 1999, 76-12, 1505–1510.
56. Żymańczyk-Duda E., Brzezińska-Rodak M., Klimek-Ochab M., *et al.* Chiral *o*-phosphorilated derivative of 2-hydroxy-2-phenylethylphosphonate as a valuable product of microbial biotransformation of diethyl 2-oxo-2-phenylethylphosphonate. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 2008, 52-53, 74–77.
57. Hai-Feng Z., Guo-Qing H., Jing L., *et al.* Production of gastrodin through biotransformation of *p*-2-hydroxybenzyl alcohol by cultures cells of *Armillaria luteovirens* Sacc. *Enzyme and Microbial Technology.*, 2008, 43, 25-30.
58. Lotter J., Botes A., van Dyk M., *et al.* Hydrolytic kinetic resolution of the enantiomers of the structural isomers *trans*-1-phenylpropene oxide and (2,3-epoxypropyl)benzene by yeast epoxide hydrolase. *Biotechnology Letters.*, 2004, 26, 1197–1200.
59. Doddapaneni H., Yadav J. Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes *pc-1* (CYP63A1) and *pc-2* (CYP36A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 65, 559-565.
60. Benner J., Wunch K., Faison B. “Use of fungi biodegradation”. In: *Manual of Environmental microbiology*. Second edition. Hurst C., (Ed.). ASM Press, Washington, D.C., 2002.
61. Nyanhongo G., Erlacher A., Schroeder M., *et al.* Enzymatic immobilization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) biodegradation products onto model humic substances. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39, 1197-1204.
62. Cundari T., Dinescu A., Zhu D., *et al.* A molecular modeling study on the enantioselectivity of aryl alkyl ketone reductions by a NADPH-dependent carbonyl reductase. *J. Mol. Model.*, 2007, 13, 685-690.

63. García-Pajón C., Valverde I., Velasco R. Biotransformación de los compuestos 2-feniletanol y acetofenona mediante el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*. Trabajo dirigido de grado, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, 2006.
64. Gutiérrez-Rojas M., Eng, F. and Favela-Torres, E. Culture conditions for jasmonic acid and biomass production by *Botryodiplodia theobromae* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 1998, 33, 7, 715-721.
65. Smith K., Latif S., Kirk D., *et al.* Microbial transformations of steroids—IV. 6,7-Dehydrogenation; a new class of fungal steroid transformation product white. *J. Steroid Biochemistry*, 1989, 33, 271-276.
66. He G., Matsuura H., Yoshihara T. Isolation of an α -methylene- γ -butyrolactone derivative, a toxin from the plant pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochem.*, 2004, 65, 2803–2807.
67. Li H., Cao R., Mu Y. *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop Protection*, 1995, 14, 187-191.
68. Krishna K., Masilamani S., Ganesh M., *et al.* Microbial transformation of zaluzanin-D. *Phytochem.*, 2003, 62, 1101–1104.
69. Yang Q., Toshima H., Yoshihara T. Syntheses of β -resorcylic acid derivates, novel potato microtuber inducing substances isolated from *Lasiodiplodia theobromae*. *Tetrahedron* 2001; 57: 5377-5384.
70. Wong J.W., Watson H.A., Jr., Bouressa J.F., Burns M.P., Cawley J. J., Doro A.E., *et al.* Biocatalytic Oxidation of 2-Methylquinoxaline to 2-Quinoxalinecarboxylic Acid. *Organic Process Research & Development* 2002; 6: 477-481.
71. Li P., Takei R., Takahashi K., Nabeta K. Biosynthesis of theobroxide and its related compounds, metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry* 2007; 68: 819-823.
72. Velasco R., Valverde I., Durango D., *et al.* Biotransformación de los compuestos 2-feniletanol y acetofenona mediante el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia: *Vitae.*, 2007, 14(2), 43-50.
73. Montenegro D., Vélez J. Optimización de las condiciones de biotransformación del sustrato 2-feniletanol mediante el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*. Trabajo dirigido de grado, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, 2008.
74. Valverde I., Velasco R., Vanegas N., *et al.* Procesos de biotransformación mediante hongos fitopatógenos: una alternativa importante para la obtención de productos químicos especializados. 3^{er}. Simposio de Biofábricas. Medellín, 2007.
75. Freeman S., Katan T., Shabi E., *et al.* Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Dis.*, 1998, 82, 596-605.
76. Kang H., Park Y., Go S. Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. *Microbiol. Res.*, 2003, 158, 321-326.
77. O'Quinn R., Hoffmann J., Boyd A., *et al.* *Colletotrichum* species as emerging opportunistic fungal pathogens: A report of 3 cases of phaeohiphomycosis and review. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2001, 45, 56-61.
78. García-Pajón C., Hernández-Galán R., Collado I. Biotransformation by *Colletotrichum* species. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, 14, 1229-1239.

79. Femenia-Ríos M, García-Pajón C. M. Hernández-Galán R., Macías-Sánchez A. J., Collado I. G. Synthesis and free radical scavenging activity of a novel metabolite from the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006; 16: 5836–5839.
80. Toshihiro Akihisa, Kenji Watanabe, Risa Yoneima, Takashi Suzuki, Yumiko Kimura. Biotransformation of Cycloartane-Type Triterpenes by the Fungus *Glomerella fusarioides*. *J. Nat. Prod.* 2006; 69: 604-607.
81. Ortiz-Núñez Y., Spengler-Salabarría I., Collado I. G., Hernández-Galán R. The Antifungal Activity of Widdrol and Its Biotransformation by *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Penz. & Sacc. And *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 7517-7521.
82. Bustillo A., García-Pajón C., Aleu J., et al. Studies on biotransformation of (\pm)-1-(4'-chlorophenylethanol). *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, 14, 3755-3760.
83. Restrepo I., Pérez A. Biotransformación de los compuestos 2-feniletanol y acetofenona mediante el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. Trabajo dirigido de grado, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, 2007.
84. Aristizábal D., Lezcano C. Biotransformación de los sustratos 2-feniletanol y acetofenona mediante el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*. Trabajo dirigido de grado, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, 2007.
85. Aristizábal D., Lezcano C., García C., et al. Biotransformación de los sustratos 2-feniletanol y acetofenona mediante el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*. *Rev. Col. Quím.*, 2008, 37, 7-20.