

© 2017 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.  
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).  
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 20(2): 15-22, 2017.  
DOI: 10.1016/j.recqb.2017.04.002

## OBTENCIÓN DE DEHIDRODIISOEUGENOL POR DIMERIZACIÓN DE ISOEUGENOL CON CULTIVOS CELULARES DE *Bouvardia ternifolia* (TROMPETILLA)

Liliana Hernández-Vázquez,<sup>1a</sup> Ma. Teresa de Jesús Olivera-Flores,<sup>2</sup>  
Héctor Luna<sup>1</sup> y Arturo Navarro-Ocaña<sup>3b</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso #1100, Col. Villa Quietud, Deleg. Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México, México. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Laboratorio de Cultivos Vegetales, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México. <sup>3</sup>Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México.  
E-mails: <sup>1a</sup>lhernandez@correo.xoc.uam.mx, <sup>3b</sup>arturono@unam.mx

### RESUMEN

Los cultivos celulares de *Bouvardia ternifolia* fueron usados como catalizadores en la reacción de acoplamiento oxidativo de isoeugenol. El compuesto dimérico dehidrodiisoeugenol se obtuvo con 77 % de rendimiento cuando se usó el sobrenadante obtenido de un cultivo de células en suspensión, que poseía actividad de peroxidasa. La conversión procede en condiciones suaves de reacción y al adicionar el peróxido de hidrógeno disminuye el rendimiento en la obtención del dehidrodiisoeugenol.

**Palabras Clave:** acoplamiento oxidativo, *Bouvardia ternifolia*, cultivo celular, dehidrodiisoeugenol, isoeugenol.

### Dehidrodiisoeugenol by dimerization of isoeugenol with cell culture of *Bouvardia ternifolia*

### ABSTRACT

Cell cultures of *Bouvardia ternifolia* were used as catalyst for the oxidative coupling of isoeugenol, to produce dehydrodiisoeugenol, a dimer, 77% isolated yield, when using the supernatant from the cell cultures suspension having peroxidase activity. The biotransformation proceeded under very mild conditions. It was observed that an increase in the amount of hydrogen peroxide decreases the yield.

**Key Words:** oxidative coupling, *Bouvardia ternifolia*, cell culture, dehydrodiisoeugenol, isoeugenol.

## INTRODUCCIÓN

Los *O*-metoxifenoles como el isoeugenol (2-metoxi-4-(1-propenil) fenol), son constituyentes de aceites esenciales en una gran diversidad de plantas (Wenqiang *et al.*, 2007). El isoeugenol es usado en perfumes, jabones, detergentes, aromatizantes, cosméticos, productos alimenticios (Findik *et al.*, 2011) y material de partida para la síntesis de vainillina usando microorganismos (Hua *et al.*, 2007) así como también para la preparación de salvinal (Wang *et al.*, 2006) y otros derivados (Findik *et al.*, 2011). El acoplamiento oxidativo del isoeugenol produce compuestos diméricos como el dehidrodiisoeugenol ( $\pm$ ) licarina A, y diisoeugenol (Figura 1) (Nascimento *et al.*, 2000). El dehidrodiisoeugenol es el compuesto mayoritario y el más activo de los compuestos fenólicos presentes en *Myristica fragrans* (Juhász *et al.*, 2000), ya que posee una potente actividad antiinflamatoria y antibacterial (Murakami *et al.*, 2005), actividad esquistosomocida y tripanocida (Pereira *et al.*, 2011).

Los cultivos celulares obtenidos de plantas, poseen un gran potencial bioquímico para la obtención de metabolitos secundarios. Así como para la transformación de sustratos exógenos en productos de interés farmacéutico. En la naturaleza se encuentran compuestos estructuralmente complicados, poco abundantes y de obtención costosa, pero gracias a las biotransformaciones en las que los cultivos celulares actúan como biocatalizadores, se ha encontrado una alternativa para que a partir de productos naturales simples, pero abundantes y de obtención barata, se extraigan los compuestos estructuralmente complicados. Las reacciones catalizadas por cultivos

celulares incluyen hidroxilaciones, oxidaciones, reducciones, hidrogenaciones e hidrólisis (Giri *et al.*, 2001; Suga & Hirata, 1990; Ishihara *et al.*, 2003).

El desarrollo de biocatalizadores, para la oxidación de compuestos orgánicos, en específico para los fenoles, es una importante y versátil área de investigación.

Recientemente, informamos que los cultivos celulares obtenidos a partir de *Medicago sativa* (alfalfa), *Bouvardia ternifolia* (trompetilla), *Prunus serotina* (capulín), *Coriandrum sativum* (cilantro), *Phaseolus vulgaris* (frijol), *Mammillaria hutzilopochtli*, *Psacalium peltratum*, *Cucumis melo* (melón) y *Dacus carota* (zanahoria) son capaces de transformar a los *O*-metoxifenoles como el eugenol e isoeugenol en compuestos diméricos vía la reacción de acoplamiento oxidativo, catalizada por peroxidasas, como el dehidrodieugenol (Hernández-Vázquez *et al.*, 2011). El mecanismo de reacción que se propone (Figura 2) para la dimerización está basado en los reportes de Moussouni *et al.*, 2011 y Anita *et al.*, 2014 los cuales indican que peroxidasas vegetales transforman fenoles sustituidos con un grupo metoxilo en la posición *orto* al correspondiente *O*-radical, que al estabilizarse por resonancia produce un *C*-radical; este último es el que conduce a la dimerización como lo indica lo reportado por Bartolomeazzi *et al.*, 2010 produciendo un dímero. Esta biotransformación representa una alternativa más limpia y verde a los métodos químicos tradicionales en los que las reacciones de acoplamiento oxidativo se efectúan usando catalizadores como  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{K}_3(\text{FeCN})_6$  y  $\text{Cu}(\text{OH})\text{Cl}$  (Farías-Días, 1988). Sánchez & Fernández, 1983, informaron

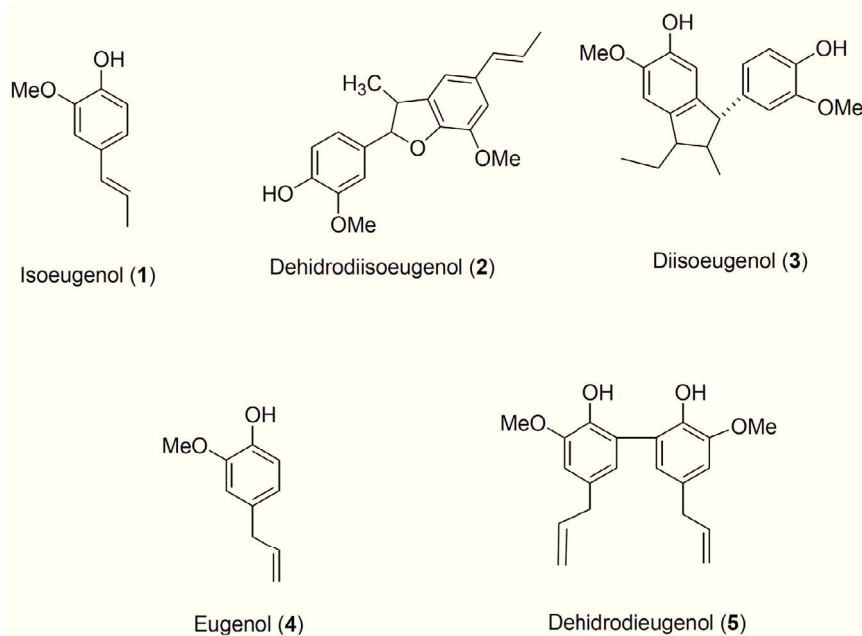


Figura 1. Estructuras de isoeugenol, eugenol y sus dímeros.

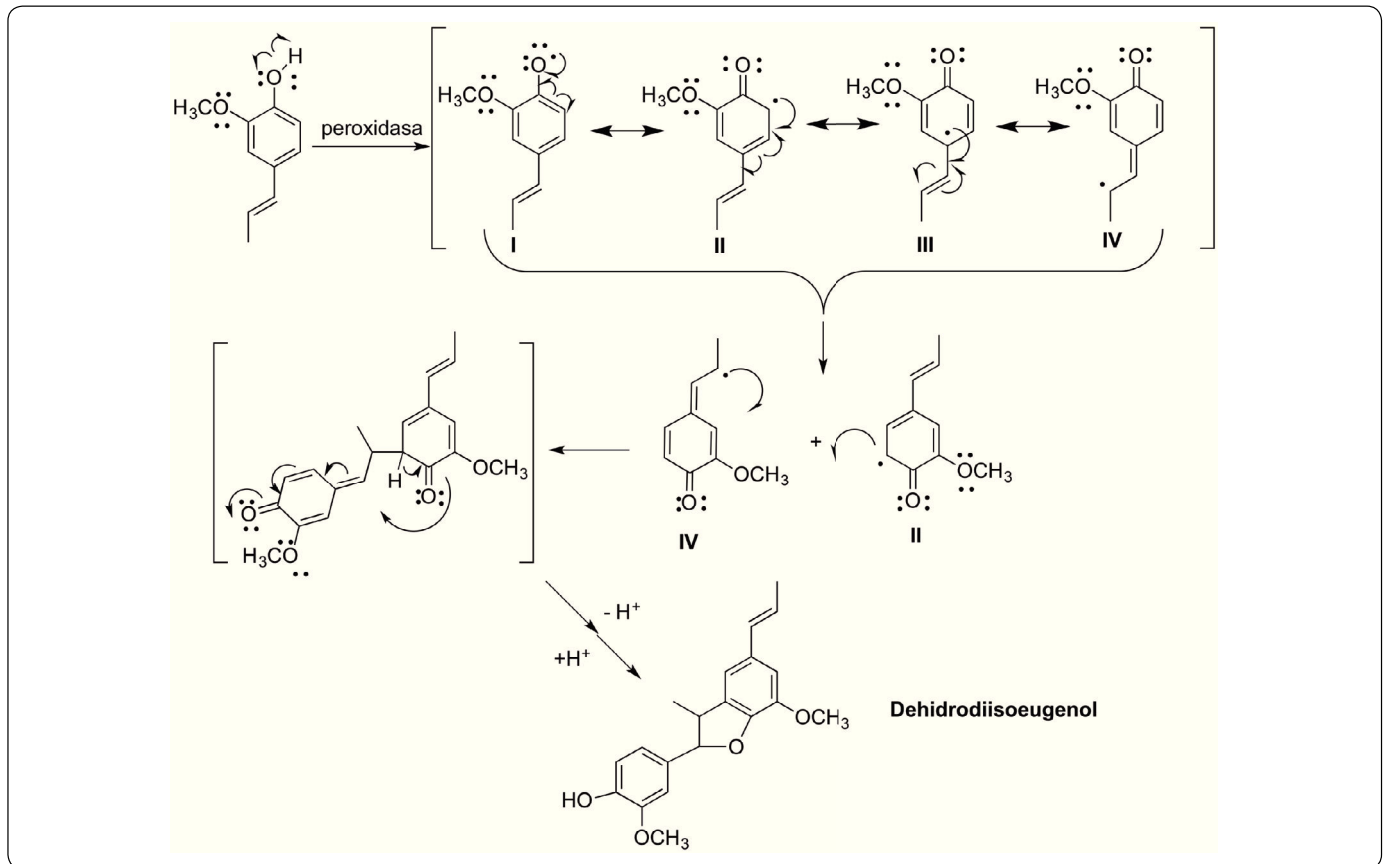


Figura 2. Mecanismo propuesto para la dimerización del isoeugenol a dehidrodiisoeugenol.

que diferentes explantes pueden ser usados para la obtención del callo homogéneo de *B. ternifolia* y también que las propiedades bioquímicas de los callos pueden ser modificadas cambiando la fuente de nitrógeno.

En este trabajo reportamos el uso de cultivos celulares de *B. ternifolia* para la síntesis de dehidrodiisoeugenol partiendo del isoeugenol (Figura 3).

### MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich y se usaron sin purificar. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , se obtuvieron en un equipo Varian 400 en  $\text{CDCl}_3$  y se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. La cromatografía en capa fina (CCF) fue utilizada de manera preliminar para determinar la presencia de los productos de las biotransformaciones. Se utilizaron placas de sílica gel en aluminio, Sílica gel Alugram® SIL G/UV<sub>254</sub>, 0.2 mm, Macherey-Nagel y una mezcla de hexano-acetato de etilo (4:6) como eluyente. Para la cuantificación del dehidrodiisoeugenol obtenido de la biotransformación, se utilizó cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y un equipo Waters-1525 HPLC equipado con detector UV Waters 2487. La columna empleada fue una Symmetry® C-18 a 280 nm,

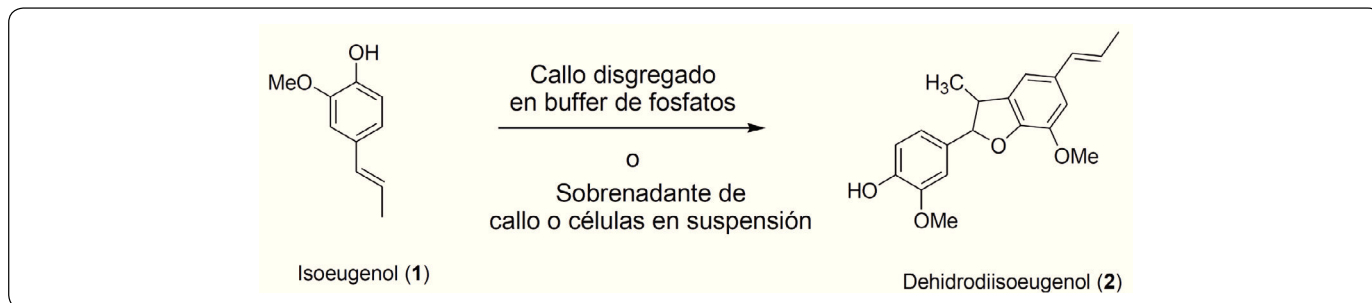
con flujo de 1 mL/min de una mezcla de ácido trifluoroacético (0.1%)-acetonitrilo (Ramachandra & Ravishankar, 1999). Se elaboraron curvas patrón en donde se usó isoeugenol en un rango de concentraciones de 0 a 0.8 mg/mL y dehidrodiisoeugenol de 0 a 8 mg/mL, para determinar los rendimientos de reacción y los porcentajes de recuperación del sustrato.

### Obtención del callo de *Bouvardia ternifolia* a partir de hojas e inflorescencias

Los callos de *B. ternifolia* fueron establecidos partiendo de hojas jóvenes e inflorescencias de plantas de trompetilla colectadas en Ciudad Universitaria (UNAM).

### Método de desinfección de hojas e inflorescencias

Las hojas jóvenes e inflorescencias fueron lavadas con agua y jabón. Éstas se pusieron en una caja Petri con etanol al 70 % por 1 min y se lavaron tres veces con agua esterilizada. Posteriormente, se colocaron en agitación constante con una disolución al 20 % de hipoclorito de sodio comercial ( $\text{NaClO}$  con 6 % de ingrediente activo), 0.1 % de tween y 10  $\mu\text{L}$  de Mycrodyn®, por 20 minutos, se lavaron tres veces con agua esterilizada. Después a las hojas e inflorescencias se les adicionaron 250 mL de Promil® (2g/250 mL) y esta mezcla se agitó por 30 min,



**Figura 3. Reacción de obtención de Dehidrodiisoeugenol a partir de isoeugenol.**

se enjuagaron tres veces más con agua esterilizada. Al cabo de este tiempo se adicionaron 250 mL of Agrimicin® 1 g/250 mL y se agitaron por 20 min, posteriormente se enjuagaron cuatro veces con agua esterilizada.

#### Siembra de explantes e inducción de callo

Las hojas y flores (explantes) se pusieron en una disolución 1:1 de ácido ascórbico y cítrico (100 mg/L). Las hojas se cortaron en segmentos de 1 cm<sup>2</sup> y las flores se cortaron en cuatro segmentos colocándolas en el medio de cultivo Murashige and Skoog (MS) (Sánchez & Fernández, 1983) suplementado con sacarosa (3%), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 1 mg/L), ácido ascórbico (50 mg/L)– ácido cítrico (50 mg/L), quinina (0.05 mg/L), cefotaxime (250 mg/L) y gelzan™ CM como agente gelante (2.5 g/L), se ajustó el pH 5.7. Las condiciones de incubación fueron 25 ± 2 ° C, con 16 horas de luz y 8 de oscuridad. El primer subcultivo se realizó después de tres semanas, el callo se conservó en medio MS sólido y se subcultivó cada tres semanas (21 días, Figura 4).

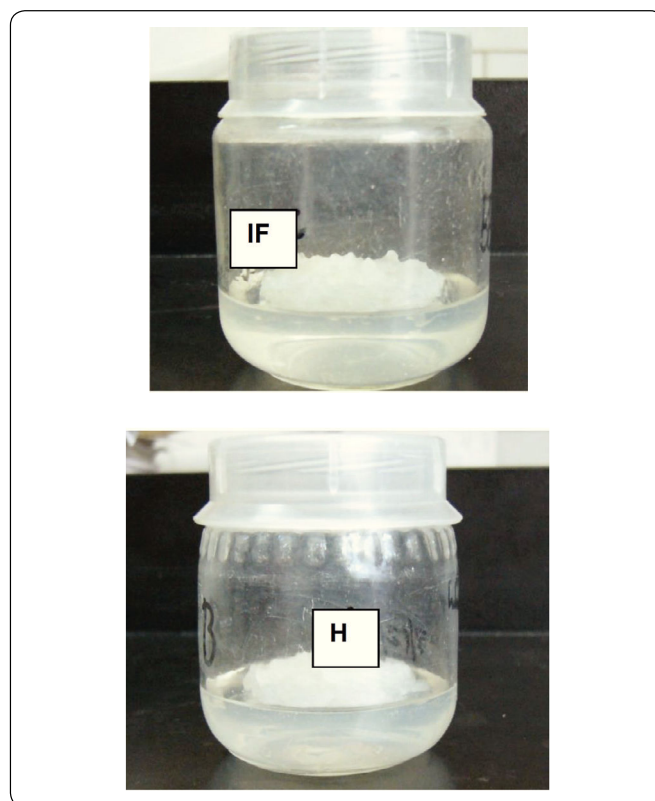
#### Obtención de cultivos celulares en suspensión

El medio que se usó fue el mismo pero sin gelzan™ CM, el cultivo se estableció por inoculación de 10 g de callo de hojas en un matraz Erlenmeyer con 250 mL del medio MS antes descrito, las condiciones de incubación son las mismas que se describieron anteriormente para la generación de callos, pero bajo agitación constante (150 rpm). Las células fueron subcultivadas por intervalos de 14 días. Al cabo de este tiempo este cultivo se filtró al vacío y se tomaron 20 g de estas células con las que se realizó la biotransformación.

Adicionalmente, se obtuvieron cultivos de células en suspensión de *B. ternifolia* de hoja en estrés nutritivo, para lo cual se utilizó el medio antes descrito, pero se redujo el porcentaje de nitratos del medio a un 50 % y 25 %.

#### Biotransformación con callo disgregado en una solución amortiguadora de fosfatos

Se pesaron 20 g de callo de hoja y otro de inflorescencias y se adicionaron a un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL



**Figura 4. Callo de inflorescencias (IF) y hojas de *B. ternifolia* (H).**

de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6, la mezcla se agitó a 150 rpm en un agitador rotatorio. Posteriormente, a cada matraz se agregaron 25 mg ( $1.52 \times 10^{-4}$  moles) de isoeugenol que previamente se disolvió en 1 mL de acetona, se adicionó o no agua oxigenada (34.5 μL,  $3.04 \times 10^{-4}$  moles) según el experimento. En todos los casos la reacción se realizó por triplicado, se usó un control que contuvo sólo los callos disgregados en el amortiguador de fosfatos y otro al que se adicionó todo excepto el sustrato. Las mezclas de reacción se colocaron en agitación a 180 rpm durante 48 horas, al término de este tiempo, se filtró la suspensión de reacción para separar

el sólido y el líquido y al filtrado se le hicieron dos extracciones con acetato de etilo (AcOEt, 50 mL x 2), se deshidrataron con sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporaron a sequedad. Una muestra de la mezcla de reacción se analizó por HPLC bajo las condiciones que se describieron en el procedimiento general, ver resultados en la Tabla I. Las mezclas de reacción de las tres repeticiones se juntaron y se purificaron por cromatografía en columna.

El mismo procedimiento se realizó (Tabla II) para el callo obtenido en condiciones de estrés nutritivo.

Muestra	Descripción	Rendimiento (%)	Recuperación de isoeugenol (%)
Control	*Callo	2.0	0.0
Control	*Callo, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.0	1.0
Biotrans	*Callo, isoeugenol	45	24
Biotrans	*Callo, isoeugenol y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13.0	4.0
Control	**Sobrenadante	0.0	0.0
Control	**Sobrenadante, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.0	1.0
Biotrans	**Sobrenadante, isoeugenol	44.0	21.0
Biotrans	**Sobrenadante, isoeugenol, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	44.0	2.0

\* Callo de hojas disgregado en solución amortiguadora de fosfatos.  
\*\*Sobrenadante obtenido de callos de hojas homogeneizados y centrifugados.

**Tabla I. Resultados de las reacciones de obtención de dehidrodiisoeugenol a partir de isoeugenol con callo disgregado en solución amortiguadora de fosfatos y sobrenadante.**

#### Biotransformación con el sobrenadante obtenido después de homogeneizar y centrifugar

Se pesaron 20 g de callo de hojas y 20 g de las células del cultivo en suspensión que se obtuvieron por filtración al vacío según se describió anteriormente. Estos callos o células se adicionaron a un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6, y se homogeneizaron con ayuda de un homogeneizador Ultra-turrax IKA T10, se centrifugó a 1500 rpm por 2 min. Se recuperó el sobrenadante y éste se utilizó para la biotransformación de isoeugenol, para lo cual se adicionaron 25 mg de isoeugenol previamente disuelto en 1 mL de acetona y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (34.5 µL, 3.04 X 10<sup>-4</sup> moles) según sea el caso, la reacción se realizó por triplicado y dos controles: uno de ellos con sólo el sobrenadante y al otro se le adicionó todo excepto el sustrato. Las mezclas de reacción se pusieron en agitación continua a 180 rpm durante 48 horas, al término de este tiempo, se filtraron, para separar sólidos y al filtrado se le realizó una extracción con AcOEt (50 mL x 2), se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporaron a sequedad, Figura 3. Una muestra de

Muestra	Descripción	Rendimiento (%)	Recuperación de isoeugenol (%)
Control	*Callo N 100%	0.0	0.0
Biotrans	*Callo N 100%, isoeugenol	13.0	5
Control	**Callo N 50%	1.0	0
Biotrans	**Callo N 50% , isoeugenol	14.5	3
Control	***Callo N 25 %	1.0	0
Biotrans	***Callo N 25% isoeugenol	14.5	5

\* Callo de hojas disgregado en solución amortiguadora de fosfatos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 100, 50 y 25 % de nitratos.

**Tabla II. Resultados de las reacciones de obtención de dehidrodiisoeugenol a partir de isoeugenol con callo disgregado generado en condiciones de estrés nutritivo.**

la mezcla de reacción se analizó por HPLC bajo las condiciones que se describieron en el procedimiento general, ver resultados en la Tabla I y III.

El mismo método se efectuó para los callos y células en suspensión que crecieron en condiciones de estrés nutritivo (con 50 % y 25 % de nitratos).

#### Purificación del dehidrodiisoeugenol producido en la biotransformación

La mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna usando como soporte sílica gel y como eluyente una mezcla de diclorometano-hexano 1:1, se tomaron fracciones de 25 mL, siguiendo la purificación por CCF reuniendo las primeras fracciones que contienen el isoeugenol recuperado y las fracciones posteriores en las que se eluyó al producto de la biotransformación del dehidrodiisoeugenol (40 % de rendimiento), se evaporaron a sequedad y el producto fue identificado por RMN<sup>1</sup>H. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>/TMS): δ 1.37 (d, 3H, J = 6.8 Hz), 1.86 (dd, 3H, J = 6.8, 1.6 Hz, 3.40–3.50 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 5.09 (d, 1H, J = 9.6 Hz), 5.80 (s, 1H), 6.11 (dq, 1H, J = 15.6, 110, 6.4 Hz), 6.36 (dd, 1H, J = 15.6, 1.2 Hz), 6.76 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 111, 6.86–6.91 (m, 2H), 6.96 (s, 1H); (Ramachandra & Ravishankar, 1999) CRMN (CDCl<sub>3</sub>/TMS): δ 17.4, 18.4, 45.5, 55.7, 55.8, 93.5, 108.6, 108.8, 113, 113.8, 119.6, 123.2, 130.5, 131.6. Los datos son consistentes con los reportados en la literatura (Bartolomeazzi et al., 2010).

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### Obtención de cultivos de *Bouvardia ternifolia* de hojas e inflorescencias

Los callos que se obtuvieron a partir de las hojas e inflorescencias presentaron una coloración crema y aspecto espumoso, no

Muestra	Descripción	Rendimiento (%)	Recuperación de isoeugenol (%)
Control	*Sobrenadante N 100%	4	1.0
Control	*Sobrenadante N 100 % y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	0.0
Biotrans	*Sobrenadante N 100 %, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e isoeugenol	0	1.0
Biotrans	*Sobrenadante N100 % e isoeugenol	73	9.0
Control	*Sobrenadante N 25 %	8.0	1.0
Control	*Sobrenadante N 25 %, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.0	0.0
Biotrans	*Sobrenadante N 25 %, isoeugenol	77	11
Biotrans	*Sobrenadante N25 %, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , isoeugenol	46	3.0

\*Sobrenadante obtenido de células en suspensión de hojas homogeneizadas y centrifugadas.

**Tabla III. Resultados de las reacciones de obtención de dehidroisoeugenol a partir de isoeugenol con el sobrenadante de las células en suspensión generadas bajo condiciones de estrés nutritivo.**

son susceptibles a la oxidación, son disgregables y aumentan rápidamente su masa en un periodo corto de crecimiento.

Los cultivos en suspensión de *B. ternifolia*, son de color crema y no presentan oxidación. Se realizó la cinética de crecimiento del cultivo de células en suspensión en peso seco y fresco por 14 días, debido a que se observó un crecimiento acelerado con la formación de agregados que dificultaban la toma de la muestra. En el periodo evaluado se observa que el crecimiento se presenta con una tendencia ascendente y con dos fases: la fase "lag" y la fase de crecimiento exponencial o lineal sin observarse la fase estacionaria. Los resultados obtenidos permiten concluir que los cultivos duplican su peso a los ocho días y lo cuatriplican a los 14 días. Esta etapa de crecimiento fue la seleccionada para efectuar las biotransformaciones.

#### **Biotransformación de isoeugenol con callo disgregado en solución amortiguadora de fosfatos de inflorescencia y hoja**

De manera preliminar y para determinar si existe diferencia entre el uso de la hoja y la inflorescencia en la biotransformación de isoeugenol se realizaron las reacciones sin adición de peróxido de hidrógeno utilizando callos disgregados en solución amortiguadora de fosfatos de los dos explantes antes mencionados, las mezclas de reacción de las

biotransformaciones fueron aplicadas en una cromatoplaqueta poniendo isoeugenol y dehidroisoeugenol como referencia, observando que en las placas de cromatografía no hubo consumo total de la materia prima, pero sí presencia de productos más polares que el isoeugenol, uno de ellos mayoritario con el mismo R<sub>f</sub> el dehidroisoeugenol. Los resultados obtenidos indican que no existen diferencias observables entre el uso de los callos de las hojas o el de los callos de las inflorescencias, por lo que se decidió continuar con los cultivos celulares provenientes de las hojas para las demás biotransformaciones, Figura 4.

#### **Biotransformación de isoeugenol con callo disgregado en solución amortiguadora de fosfatos y del sobrenadante**

En la Tabla I se describen los resultados obtenidos de la biotransformación de isoeugenol con callos de hojas disgregados en solución amortiguadora de fosfatos y con el sobrenadante, con y sin adición de peróxido de hidrógeno. Se evaluó la influencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la reacción, ya que los reportes indican que la adición de éste puede favorecer la formación de los productos de dimerización, por ser el sustrato de las enzimas peroxidadas. Sin embargo, también es sabido que un exceso del mismo puede disminuir los rendimientos (Figura 2).

Los datos presentados en la Tabla I, indican que se obtienen rendimientos moderados similares para las biotransformaciones con el callo disgregado y los sobrenadantes (45 y 44 %, respectivamente). Pero, para aquellos casos en los que se les adicionó peróxido de hidrógeno a la reacción, la biotransformación con el callo disgregado mostró una caída significativa en el rendimiento (13 %); mientras que con el sobrenadante no hubo tal efecto (44 %). La influencia del peróxido de hidrógeno en esta serie de reacciones no es clara. Rendimientos similares se obtienen cuando se usa la lacasa cruda y purificada de *Rhus verticifera* (41 %) (Shiba *et al.*, 2000), pero menores a los resultados obtenidos por Nascimento *et al.*, 2000 con peroxidasa pura de rábano (90 %). Cabe mencionar que la comparación se basa sólo en los rendimientos correspondientes, en el entendido que se trata de enzimas y condiciones de reacción diferentes, debido al interés preparativo de estos compuestos.

Por lo anterior, se puede proponer el mecanismo mostrado en la Figura 2, de acuerdo a lo propuesto por Anita *et al.*, 2014 para guaiacol y por Moussouni *et al.*, 2011, para el isoeugenol, en lo que respecta a sistemas *O*-metoxifenoles éste sería el radical formado por la peroxidasa y posteriormente el radical se dimeriza de acuerdo al mecanismo propuesto por Bartolomeazzi *et al.*, 2010 en la reacción de formación de dehidroisoeugenol y dehidroisoeugenol con DPPH de isoeugenol y eugenol, respectivamente.

Con respecto a la recuperación del isoeugenol, éste disminuye cuando se usan callos disgregados y también cuando se utiliza

el sobrenadante en presencia de peróxido de hidrógeno. Esto puede ser debido a que el isoeugenol puede sufrir otras reacciones de acoplamiento oxidativo y formar trímeros, tetrámeros e inclusive polímeros.

Cabe resaltar que los cultivos celulares parecen formar pequeñas cantidades de isoeugenol en las condiciones evaluadas entre 0 y 1 % y de dehidrodiisoeugenol entre 0-3 %, sin embargo, estos resultados pueden también ser debidos al error asociado al método de análisis.

La Tabla II presenta los resultados obtenidos con callo disgregado en solución amortiguadora de fosfato con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidos en un medio donde se disminuyó la cantidad de nitratos a 50 y 25 % (estrés nutritivo), puede observarse que los rendimientos en la obtención de dehidrodiisoeugenol aumentan cuando se disminuye la cantidad de nitrato es decir bajo condiciones de estrés, sin embargo, el incremento no es significativo. Como los resultados son iguales cuando se tiene un 50 % y un 25 % de nitratos en el medio, se decidió seguir el estudio empleando sólo los callos con 25 % de nitratos.

Por último, presentamos una serie de experimentos que se realizaron con células en suspensión de *B. ternifolia*. Se eligió el uso de células en suspensión, en lugar de callo, con base en resultados previos, donde el uso de células en suspensión incrementa el rendimiento en la obtención de dehidrodieugenol a partir de eugenol con cultivos celulares de *B. ternifolia* (Hernández-Vázquez *et al.*, 2011).

Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla III, como puede observarse el rendimiento se incrementa de manera importante a 73 y 77 % cuando se usa el sobrenadante obtenido con 100 % y 25 % de nitratos respectivamente. Esto es indicativo de que las células en suspensión son mejores fuentes del biocatalizador que los callos, además que el estrés nutritivo genera un incremento en el rendimiento del dehidrodiisoeugenol. Nuevamente cuando se usa el sobrenadante, adicionando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el rendimiento disminuye a 0 y 46 % para las células en suspensión obtenidas con 100 % y 25 % de nitratos respectivamente.

Los datos descritos indican que el sobrenadante obtenido a partir de células en suspensión, es un biocatalizador eficiente para la transformación de isoeugenol, aunque los rendimientos son menores a los informados por Nascimento *et al.*, 2000 con peroxidasa de rábano pura (90 %).

Cabe resaltar, que en estas series de reacciones se utilizaron crudos enzimáticos, y las condiciones de reacción no fueron optimizadas para lograr el rendimiento máximo. Se determinó que la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tuvo un efecto negativo en el rendimiento en la obtención de dehidrodiisoeugenol en todos los casos, posiblemente por la formación de otros productos como trímeros, tetrámeros o polímeros.

## CONCLUSIONES

Podemos concluir que los cultivos celulares de *B. ternifolia* pueden ser empleados como catalizadores en la obtención de dehidrodiisoeugenol y las mejores condiciones de reacción, son las que utilizan el sobrenadante obtenido a partir de células en suspensión bajo condiciones de estrés nutritivo y sin adición de peróxido de hidrógeno (77 %). El rápido crecimiento de las células de *B. ternifolia*, su fácil disgregación y poca oxidación las hacen candidatos ideales para su uso como biocatalizador en la transformación de fenoles naturales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT Proyectos de Ciencia Básica 2012-CB180128 y 2009-CBIN129061, además el apoyo técnico de la QA. Mariana León-Pérez.

## REFERENCIAS

- Anita, Y., Widiyarti, G. & Abbas, J. (2014). Synthesis and elucidation structure of *O-para* dehydroguaiaicol prepared by crude of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* peroxidase-catalyzed oxidation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **4**, 062-065. DOI: 10.7324/JAPS.2014.40411
- Bartolomeazzi, R., Verardo, G., Liessi, A. & Callea, A. (2010). Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol with DPPH radical and their Role in the radical scavenging activity. *Food Chemistry*. **118**, 256-265. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.04.115
- Farías-Días, A. (1988). An improved high yield synthesis of dehydrodieugenol *Phytochemistry* **27**, 3008-3009. DOI: 10.1016/0031-9422(88)80715-5
- Findik, E., Ceylan, M. & Elmastaş, M. (2011). Isoeugenol-based novel potent antioxidants: synthesis and reactivity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **46**, 4618-4624. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.07.041
- Giri, A., Dhingra, V., Giri, C. C., Singh, A., Ward, O. P. & Narasu, M. L. (2001). Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*. **19** (3)175-199. DOI: 10.1016/S0743-9750(01)85155-9
- Hernández-Vázquez, L., Olivera-Flores, M.T.J., Ruiz-Terán, F., Ayala, I & Navarro-Ocaña, A. (2011). Screening of plant cell culture for their capacity to dimerize eugenol and isoeugenol: preparation of dehydrodieugenol. *Journal Molecular Catalysis. B: Enzymatic*. **72**, 102-106. DOI: 10.1016/molcab.2011.05.005
- Hua, D., Ma, C., Lin, S., Song, L., Deng, Z., Maomy, Z., Zhang, Z., Yu, B. & Xu, P. (2007). Biotransformation of Isoeugenol to vainillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: Identification of major metabolites. *Journal of Biotechnology*. **130**, 463-470. DOI: 10.1016/j.biotech.2007.05.003
- Ishihara, K., Hamada, H., Hirata, T. & Nakajima, N. (2003). Biotransformation using plant cultured cells. *Journal Molecular Catalysis. B: Enzymatic*. **23** (2.6), 145-170.

- DOI: 10.1016/S1381-1177(03)00080-8
- Juhász, L., Kürti, L. & Antus, S. (2000). Simple synthesis of benzofuranoid neolignans from *Myristica fragrans*. *Journal of Natural Products*. **63**, 866-870. DOI: 10.1021/np990327h
- Moussouni, S., Saru, M.L., Ioannou, E., Mansour, M., Detsi, A., Roussis, V. & Kefalas, P. (2011). Crude peroxidase from onion solid waste as a tool for organic synthesis. Part II: oxidative dimerization-cyclization of methyl *p*-coumarate, methyl caffeate and methyl ferulate. *Tetrahedron. Letters*. **52**, 1165-1168. DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.01.004
- Murakami, Y., Shoji, M., Hirata, A., Tanaka, S., Yokoe, I. & Fujisawa, S. (2005). Dehydrodiisoeugenol, an Isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **434**, 326-332. DOI: 10.1016/j.abb.2004.11.013
- Nascimento, I. R., Lopes, L. M. X., Davin, L. B. & Lewis, N. G. (2000). Stereoselective synthesis of 8,9-llcarinediols. *Tetrahedron* **56** (47), 9181-9193. DOI: 10.1016/S0040-4020(00)00873-5
- Pereira, A.C., Magalhães L.G., Gonçalves, U.O., Luz, P.P., Moraes, A.C.G., Rodrigues, V., Da Matta Guades, P.M., Da Silva Filho, A.A., Cunha, W.R., Bastos, J.K., Nanayakkara, N.P.D., e Silva, M.L.A. (2011). Schistosomicidal and trypanocidal structure-activity relationships for (±)-licarin A and its (-) and (+)-enantiomers. *Phytochemistry* **72**, 1424-1430. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.04.007
- Ramachandra Rao, S & Ravishankar, G.A. (1999) Biotransformation of isoeugenol to vanilla flavour metabolites and capsaicin in suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*: study of the influence of β-cyclodextrin and fungal elicitor. *Process Biochemistry*. **35** (3-4), 341-348. DOI: 10.1016/s0032-9592(99)00077-1
- Sánchez de Jiménez, E. & Fernández, L. (1983). Biochemical parameters to assess cell differentiation of *Bouvardia ternifolia* Schlecht callus. *Planta* **158** (5), 377-383. DOI: 10.1007/BF00397728
- Shiba, T., Xiao, L., Miyakoshi, T. & Chen, C.-L. (2000). Oxidation of Isoeugenol and coniferyl alcohol catalyzed by laccases isolated from *Rhus vernicifera* Stokes and *Pycnoporus coccineus*. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*. **10** (6), 605-615. DOI: 10.1016/s1381-1177(00)00184-3
- Suga, T. & Hirata, T. (1990) Biotransformation of exogenous substrates by plant cell cultures. *Phytochemistry* **29**, 2393-2406. DOI: 10.1016/0031-9422(90)85155-9
- Wang, E.-C, Wein, Y.-S. & Kuo, Y.-H. (2006). A concise and efficient synthesis of salvinial from isoeugenol via a phenoxenium ion intermediate. *Tetrahedron Letters*. **47**, 9195-9197. DOI: 10.1016/tetlet.2006.10.131
- Wenqiang, G., Shufen, L., Ruixiang, Y., Shaoku, T. & Can, Q. (2007). Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other tree traditional extraction methods. *Food Chemistry*. **101**, 1558-1564. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.04.009