Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Búsqueda de agroquímicos naturales con potencial uso en agricultura sustentable a partir de cultivos de hongos

Bertinetti, Brenda Verónica

2012-05-11

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Bertinetti, Brenda Verónica. (2012-05-11). Búsqueda de agroquímicos naturales con potencial uso en agricultura sustentable a partir de cultivos de hongos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Bertinetti, Brenda Verónica. "Búsqueda de agroquímicos naturales con potencial uso en agricultura sustentable a partir de cultivos de hongos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-05-11.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

BÚSQUEDA DE AGROQUÍMICOS NATURALES CON POTENCIAL USO EN AGRICULTURA SUSTENTABLE A PARTIR DE CULTIVOS DE HONGOS

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área Química Orgánica

Lic. Brenda Verónica Bertinetti

Directora de Tesis: Dra. Gabriela M. Cabrera

Buenos Aires, 2012

BÚSQUEDA DE AGROQUÍMICOS NATURALES CON POTENCIAL USO EN AGRICULTURA SUSTENTABLE A PARTIR DE CULTIVOS DE HONGOS

En esta tesis se detalla el aislamiento y la elucidación estructural de productos naturales a partir de cultivos de hongos, realizado mediante una búsqueda bioguiada utilizando ensayos de actividad antifúngica y antibiótica. También se describe la preparación y el estudio de la actividad en invernadero frente a hongos patógenos de soja, de una familia de compuestos derivados de un producto natural proveniente de un cultivo fúngico. Además, se presenta el estudio del comportamiento de esa familia de compuestos por espectrometría de masa, y el análisis de la presencia de determinados metabolitos de extractos fúngicos por HPLC-EM. Se trabajó con las especies fúngicas *Penicillium canescens*, *Gliocladium catenulatum* y *Fusarium oxysporum*.

La especie *Penicillium canescens* se aisló de polen de colmenas ubicadas en el apiario del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) de la ciudad de Balcarce, Buenos Aires, Argentina. Las especies *Gliocladium catenulatum* y *Fusarium oxysporum* se aislaron de suelo de plantaciones de lechuga en Las Heras (Provincia de Buenos Aires).

A partir de *P. canescens* se aislaron decetopiperazinas, pseurotina A y un tetrapéptido que no había sido descripto con anterioridad. Algunas de las dicetopiperazinas fueron responsables de la actividad antibiótica y el péptido fue responsable de la actividad antifúngica frente a *Fusarium virguliforme*.

De *G. catenulatum* se aisló un nuevo metabolito 1H, 1′H-[3,3′]biindol junto con dos epipolitiodioxopiperazinas que habían sido aisladas previamente de una cepa marina de *Gliocladium*. Además, el compuesto 1H, 1′H-[3,3′]biindol se preparó mediante un camino sintético y mostró una actividad notable como antiparasitario frente a *T. cruzi*.

De los compuestos indólicos sintéticos ensayados en experimentos de actividad en invernadero se obtuvieron muy buenos resultados con dos análogos que disminuyen la incidencia y la severidad del síndrome de muerte súbita en soja, comparado con un control.

En los extractos de *F. oxysporum* se determinó la presencia de diversas ciclosporinas, además de tres depsipéptidos cíclicos, dos conocidos y uno no informado con anterioridad.

Palabras clave: metabolitos fúngicos, potenciales agroquímicos, *P. canescens*, *G. catenulatum*, *F. oxysporum*, SDS, ESI-EM y HPLC-EM.

SEARCH FOR NATURAL AGROCHEMICAL COMPOUNDS FROM FUNGAL CULTURES WITH POTENTIAL USE IN SUSTAINABLE AGRICULTURE

This PhD thesis details the isolation and structural characterization of natural products from fungi. The isolation was performed looking for antifungal and antibiotic compounds by bioguided assays. The preparation of a group of compounds related to a natural one isolated from a fungal strain and their activity against soybean fungi pathogens in greenhouse experiments are also described. In addition many compounds from the mentioned family were studied by high resolution mass spectrometry, and chemical diversity from fungal extracts was analyzed by HPLC-MS. The strains studied are *Penicillium canescens*, *Gliocladium catenulatum* and *Fusarium oxysporum*.

Penicillium canescens strain was isolated from beehives pollen from INTA apiary in Balcarce, Buenos Aires, Argentina. *Gliocladium catenulatum* and *Fusarium oxysporum* strains were acquired from lettuce fields soil in Las Heras, Buenos Aires.

Diketopiperazines, pseurotin A and a tetrapeptide were isolated from *P. canescens*. The tetrapeptide was unknown until now. Some diketopiperazines found were responsible for the antibiotic activity showed by the extract and the tetrapeptide showed antifungal activity against *Fusarium virguliforme*.

G. catenulatum culture yielded a new metabolite 1H, 1ˈH-[3,3ˈ]biindole and two epipolitiodioxopiperazines that have been isolated before from a marine strain of *Gliocladium*. Compound 1H, 1ˈH-[3,3ˈ]biindole was prepared synthetically and showed interesting activity as antiparasitic against *T. cruzi*.

Good results were obtained from greenhouse experiments with two indolic synthetic analogues which diminish incidence and severity of sudden death syndrome in soybean compared to a control compound.

Several cyclosporines were found in *F. oxysporum* extracts apart from three cyclic depsipeptides, two already known and a new one.

Keywords: fungal metabolites, potential agrochemicals, *P. canescens*, *G. catenulatum*, *F. oxysporum*, SDS, ESI-MS y HPLC-MS.

“Los grandes conocimientos engendran las grandes dudas”

Aristóteles

“Las ideas no se imponen, se proponen”

Juan Pablo II

“Aquel que pregunta es tonto por cinco minutos, el que no pregunta es tonto por siempre”

Proverbio chino

A mis padres (Juan Esteban y Viviane) que son sostén incondicional y un gran ejemplo, difícil de imitar. Porque siempre me alientan y apoyan en el emprendimiento de enfrentar nuevos desafíos. Porque los amo.

A Barbi, Juampi y Bet que son luces en mi vida, porque son incondicionales, hermosas personas y los adoro.

Agradezco a la Dra. Cabrera, directora de mi tesis, por brindarme el lugar de trabajo y conocimientos a lo largo de estos años.

Quiero agradecer a las instituciones y personas que hicieron posible la realización de este trabajo:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Técnica por el financiamiento y al Departamento de Química Orgánica (FCEyN, UBA) por el lugar e infrestructura para realizar este trabajo.

A UMYMFOR (CONICET – FCEyN) por las determinaciones instrumentales realizadas y a su director, Dr. Gerardo Burton.

Al Dr. Jorge Palermo por su colaboración desinteresada, consejos y por la realización de muchos espectros de RMN.

A todo el personal de UMYMFOR, a la Lic. María de las Mercedes Rivera por los experimentos de CG, al Bqco. Gabriel Cases y al Sr. Aznares, por los espectros de masa, al Lic. Gernot Eskuche y al Lic. José Gallardo por los espectros de RMN.

A la Dra. Nora Peña por la recolección de las cepas fúngicas de apiarios.

A la Dra. Alejandra Rodríguez y a la Dra. Alicia Godeas (Laboratorio de microbiología del suelo, DBBE, FCEN, UBA), por la recolección e identificación del resto de las cepas.

A la Dra. Mercedes Scandiani (Laboratorio Agrícola Río Paraná, San Pedro; CEREMIC, UNR) por los ensayos de invernadero.

A la Dra. Alicia Bardon y el Lic. Federico Arrighi (INQUINOA, Tucumán) por los EM^n.

A la Dra. Clara Peña (IQUIFIB, FFyB, UBA) por la síntesis de péptidos.

Al Dr. Laurent Meijer (Rockefeller University) por los ensayos de inhibición de protein quinasas.

Agradezco mucho a mis ex compañeros de grupo: Andrés Brunetti, Matias Butler, Adriana Cirigliano y Gabriela Gallardo por acompañar el trabajo en el día a día y por los momentos compartidos en el laboratorio. También a los vecinos palermikus: Tereza Rojo, Marianela Sánchez, Gastón Siles, Flor Rodríguez Brasco, Laura Patiño y Lucía Fernández por el intercambio de materiales, ideas y buenos momentos. Y a mis ex compañeras de laboratorio: Valeria Careaga, Alejandra Fazio, Andreína Gómez, Irene Lantos, Daniela Parera y Victoria Richmond por el intercambio de carcajadas y momentos compartidos. A la Dra. Marta Maier por la buena onda, el préstamo de bibliografía, y por desoir chistes buenos, malos, miles de canciones en la radio, a capella y risotas.

Agradezco mucho a los integrantes de los laboratorios Burton, Jares y Flia. Galagovsky por liberar gases (inertes) y el préstamo desinteresado de material para algunas reacciones y por la buena onda!

A mis amigas de la vida que quiero muchísimo: Romi, Deb, Flor, Eugi y Samy (que ya no está físicamente pero del corazón no se va nunca), que sin saber si soy ingeniera o astronauta siempre me alientan y acompañan, hasta juntando honguitos en la playa.

A Juampi por haberme motivado desde siempre con las discusiones interesantes y también con la competencia, por haberme contenido en momentos difíciles, y por los sueños, proyectos y el gran amor que compartimos durante tantos años.

A mis amigas de la carrera: Estefi y Paulis por darle un toque de humor a los momentos agridulces, a Vicky por ser compañera y ponerle esa actitud a cada momento, a Lula por ser muy buena amiga, tan querible y por ser tan divertipráctica, a Vero S porque a pesar de tantas diferencias compartimos muchos ideales y la quiero muchísimo, a Jori por tanto humor, por ser lindísima compañera de emociones y hacerse querer tanto, y a Vero M que es una gran amiga, está en las buenas y en las malas con esa energía positiva contagiosa que ilumina, porque la quiero con el alma. Gracias chicas por estar y por todo lo vivido juntas!

A Guille Acuña por promover enfáticamente el socialismo en materia de papers desde el ápice geográfico de la ultraderecha, gracias por incentivarme, por ser tan linda persona y por los momentos juntos.

Tuve la suerte de encontrar no solo compañeros sino también muy buenos amigos en el laboratorio y laboratorios vecinos. Quiero agradecerle a Guille Menéndez por ilustrarme con tantos papers y porque es un gran amigo al que quiero mucho, por tantas discusiones interesantes, y también filosofía barata, tragicómica y divertida, y por su humor inteligente. A mis amigos Fer Alonso y Javi Eiras que quiero mucho y con los que compartí viajes, momentos divertidos y porque además saben estar en los tiempos difíciles. Agradezco a la Pipi por tanta risa y por el aguante, a Marian por el humor ácido y la buena predisposición para ayudar o para ir a tomar algo por ahí cerca, a Andrés por darme aliento y contención, y por el tiempo compartido, a Ale por ser muy buena compañera y amiga, a mi queridísimo compa Matibu por el intercambio de ideas, por el buen humor, lo copado y los momentos compartidos (beso!). Muchas gracias a mis amiguitas del alma: Blanket por inflar juntas sueños como globos y hasta alcanzar algunos de ellos, por acompañarme, apoyarme y por ser tan querible!; Vale por ser esa amiga de hierro en los momentos difíciles, por todo lo compartido desde viajes, ideales y mates a desecación de cerebros y porque la quiero mucho; y Vicky por ser tan buena compañera, estar, contener y escuchar, por lo divertida y por lo linda amiga y persona.

INDICE

Capítulo I - Introducción

- Historia de los productos naturales 1
- ¿Por qué buscar nuevos productos naturales? 5
- Productos naturales de hongos 7
- Agroquímicos naturales 9
- La importancia de buscar agroquímicos en el país 15
- Objetivo 20
- Bibliografía 21

Capítulo II – *Penicillium canescens*

- Introducción 25
- Aislamiento de los metabolitos secundarios 26
- Elucidación estructural de los metabolitos aislados 27
    - Compuesto 1 27
    - Compuesto 2 29
    - Compuesto 3 31
    - Compuesto 4 35
    - Compuesto 5 39
- Actividad biológica 47
- Biosíntesis 49
- Antecedentes de compuestos peptídicos y dicetopiperazinas 52
- Antecedentes de otros compuestos aislados de las mismas cepas 54
- Conclusiones 55
- Detalles experimentales 55
    - Cultivo de *P. canescens* en el laboratorio 55
    - Extracción y fraccionamiento de *P. canescens* 56
    - Preparación de los péptidos sintéticos 56
    - Preparación de los derivados de aminoácidos 57
    - Propiedades físicas de los compuestos aislados 57
- Bibliografía 64

Capítulo III – *Gliocladium catenulatum*

- Aislamiento de los metabolitos secundarios 68
- Elucidación estructural de los metabolitos aislados 69
    - Compuesto 8 69
    - Compuesto 9 77
    - Compuesto 10 83
- Actividad biológica 91
- Antecedentes de epipolitiodioxopiperazinas y derivados 93
- Antecedentes de compuestos aislados de cepas de la misma familia 95
- Biosíntesis 96
- Conclusiones 97
- Detalles experimentales 97
    - Cultivo de *G. catenulatum* 97
    - Extracción y fraccionamiento de *G. catenulatum* 98
    - Propiedades físicas de los compuestos aislados 98
    - Síntesis de 1H,1´H-[3,3´]biindol (**10**) 102
- Bibliografía 104

Capítulo IV – Actividad antifúngica de análogos de índoles naturales

- Antecedentes 108
- Preparación de los análogos *N*-alquilindólicos 109
- Ensayos de actividad 121
    - Bioautografía en silicagel 121
    - Test de germinación en el laboratorio 122
    - Experimento en invernadero 123
- Resultados 124
- Conclusiones 131
- Detalles Experimentales 132
    - Ensayos de actividad 132
    - Tratamiento estadístico de los datos 133
    - Obtención y purificación de los compuestos 134
    - Propiedades físicas de los compuestos 134
- Bibliografía 143

Capítulo V – Comportamiento de derivados indólicos por espectrometría de masa

- Introducción 146
- Análisis por ESI-MS de los compuestos 149
    - Iones comunes. Iones generados por pérdida de HX 159
    - Ión $[M+H-14]^+$ y relacionados 170
    - Iones originados por pérdida de CO_2 189
    - Iones de m/z 188 y 174 194
    - CE_{50}: efecto del heteroátomo de la cadena *N*-alquílica 205
- Conclusiones 208
- Detalles experimentales 213
    - Obtención y purificación de los compuestos 213
    - Propiedades físicas de los compuestos 215
- Bibliografía 217

Capítulo VI – Análisis de metabolitos de *Fusarium oxysporum* por HPLC-EM

- Introducción 219
- Resultados 225
- Análisis de las ciclosporinas en el extracto de micelio 236
- Análisis de otros componentes presentes en el extracto de micelio 246
- Conclusiones 254
- Detalles experimentales 255
    - Cultivo de *F. oxysporum* en el laboratorio 255
    - Extracción de *F. oxysporum* 255
    - Experimentos HPLC-EM y EM/EM 256
- Bibliografía 257

Capítulo VII – Detalles experimentales

- Instrumentos y métodos empleados 261
- Métodos cromatográficos 263
- Aislamiento de los hongos 265
- Medios de cultivo utilizados 266
- Bibliografía 268

Lista de abreviaturas utilizadas

- $[\alpha]_D^{25}$ poder rotatorio específico medido a 25°c
- AcOEt acetato de etilo
- APCI ionización química a presión atmosférica
- APPI fotoionización a presión atmosférica
- AR abundancia relativa
- Boc radical *tert*-butoxicarbonilo
- c cuarteto
- c.c.d cromatografía en capa delgada
- CE energía de colisión
- CG cromatografía gaseosa
- CG-EM cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa
- CID disociación inducida por colisión
- d doblete
- da doblete ancho
- dd doble doblete
- ddd doble doble doblete
- d.i. diámetro interno
- DCC diciclohexilcarbodiimida
- DMAP N,N-dimetil-4-aminopiridina
- DMF dimetilformamida
- EM espectrometría de masa
- EM-AR espectrometría de masa de alta resolución*****
- EI-EM espectrometría de masa, ionización por electrones

- ESI-EM espectrometría de masa, ionización por electrospray
- EtOH etanol
- FAB Bombardeo con átomos rápidos
- HPLC cromatografía líquida de alta resolución
- IR infrarrojo
- ISCID disociación inducida por colisiones en la fuente
- *J* constante de acoplamiento
- LD_{50} Dosis letal 50
- LSIMS espectrometría de masa de iones secundarios con matriz líquida
- m multiplete
- m/z relación masa/carga
- MeOH metanol
- MIC concentración de mínima inhibición
- PB pico base
- ppm parte por millón
- Py piridina
- q cuarteto
- qa cuarteto ancho
- QTOF cuadrupolo-tiempo de vuelo
- Rf relación de frente de solvente
- RMN-^{13}C resonancia magnética nuclear de carbono 13
- RMN-^{1}H resonancia magnética nuclear de hidrógeno
- RP-C18 fase reversa producida por sílica derivatizada con cadenas lineales de 18 carbonos
- s singulete
- sa singulete ancho

- SPE extracción en fase sólida
- t triplete
- ta triplete ancho
- t.a. temperatura ambiente
- TEA trietilamina
- THF tetrahidrofurano
- t_R tiempo de retención
- UV ultravioleta

*Se utilizó esta nomenclatura debido a que aún no existe una nomenclatura oficial en español.

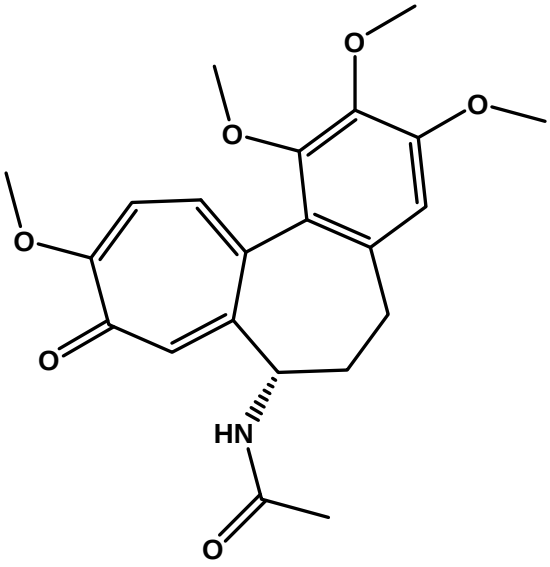
Historia de los productos naturales

El hombre se ha valido de los recursos naturales desde miles de años atrás. Tanto es así que la utilización de extractos y plantas medicinales data de tiempos inmemoriales y pueden mencionarse muchos ejemplos al respecto. En las tablas de arcilla en cuneiforme pertenecientes a La Mesopotamia del 2600 a.C. se encontraron registrados aceites de especies de *Cedrus* (cedro), *Cupressus sempervirens* (ciprés), *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), *Commiphora* (mirra) y *Papaver somniferum* (jugo de amapola) para usos medicinales, los cuales continúan en uso actualmente para tratamiento de distintas dolencias, desde resfríos hasta infecciones parasitarias. El famoso papiro egipcio de Eber, del 1500 a.C. documenta alrededor de 700 fórmulas y remedios que incluyen pastillas, ungüentos e infusiones de uso común en ese entonces para la cura de diferentes males. En China se han encontrado registros que se remontan al 1100 a.C., que incluyen prescripciones y cientos de sustancias de uso curativo y/o paliativo. También se conoce documentación del sistema ayurvédico de La India que data del 1000 a.C. Finalmente, en la antigua Grecia se han registrado la recolección, el almacenamiento y uso de hierbas medicinales, además de prescripciones y formulaciones compuestas por diversas drogas (Galeno, 300-100 a.C.)[1].

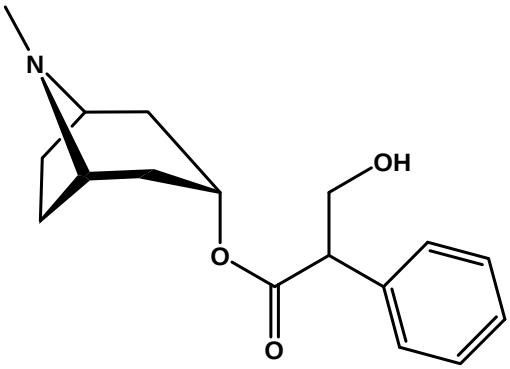
Los productos naturales pueden provenir, por un lado, del metabolismo primario de los organismos vivos, incluyéndose en ese grupo aminoácidos y proteínas, nucleósidos y nucleótidos, hidratos de carbono, todos ellos compuestos indispensables para el mantenimiento de los procesos vitales. Por otra parte, existen productos naturales que no son esenciales para el desarrollo, crecimiento y reproducción de los organismos, sino que son generalmente minoritarios entre los productos metabólicos y se obtienen del metabolismo secundario; tienen principalmente importancia toxicológica, farmacológica y ecológica. Entre ellos pueden mencionarse los terpenoides, compuestos fenólicos, metabolitos de ácidos grasos y alcaloides[2]; son los denominados metabolitos secundarios y ocupan un lugar central en este trabajo de tesis.

Para principios/mediados del siglo XX algunos biólogos celulares y fisiólogos ya habían comenzado a investigar sobre la utilización de productos naturales como herramientas experimentales que afectan o perturban funciones celulares en caminos

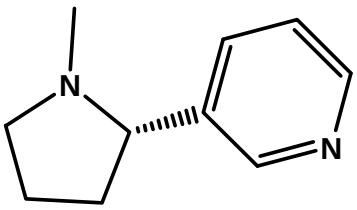
específicos. Algunos ejemplos que pueden mencionarse son la colchicina (I1) –fármaco antimitótico que detiene la división celular-, la atropina (I2) –droga anticolinérgica extraída de la belladona-, la nicotina (I3) –alcaloide de la planta de tabaco- y la digoxina –glucósido cardiotónico inhibidor de la bomba sodio-potasio ATPasa- entre otros. En la misma época, el descubrimiento de antibióticos dio gran impulso al estudio de productos naturales en laboratorios microbiológicos y les aseguró un rol central en las compañías farmacéuticas. En 1928 Fleming descubrió la penicilina y en la década de 1940 la misma se reaisló y probó en ensayos clínicos por Florey, Chain y colaboradores[3], aunque recién a partir de la década de 1970 se comenzó a apreciar el papel fundamental que cumplen los productos naturales en las interacciones entre determinadas especies[4,5].



I1. Colchicina



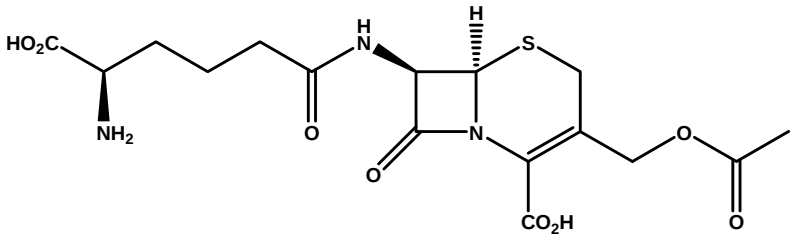
I2. Atropina



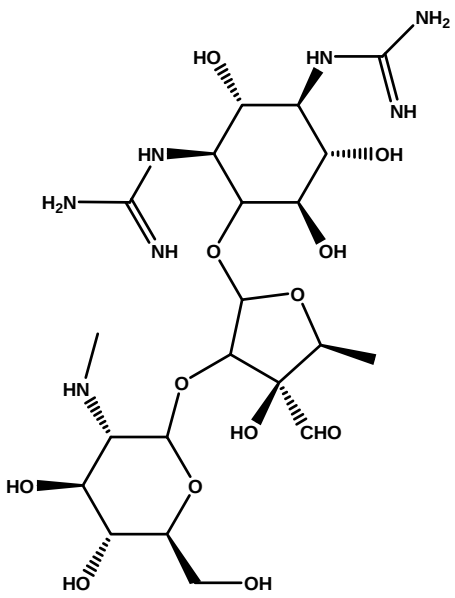
I3. Nicotina

Estos hechos sumados al desarrollo y comercialización de penicilinas sintéticas fueron el puntapié inicial para suscitar grandes esfuerzos de investigación en la búsqueda de productos naturales como metabolitos bioactivos en los años posteriores. Tras el éxito de la penicilina tanto la industria farmacéutica como los grupos de investigación se abocaron a abastecerse de enormes colecciones de microorganismos con el fin de descubrir nuevos antibióticos[6]. Todo el trabajo desarrollado en torno al

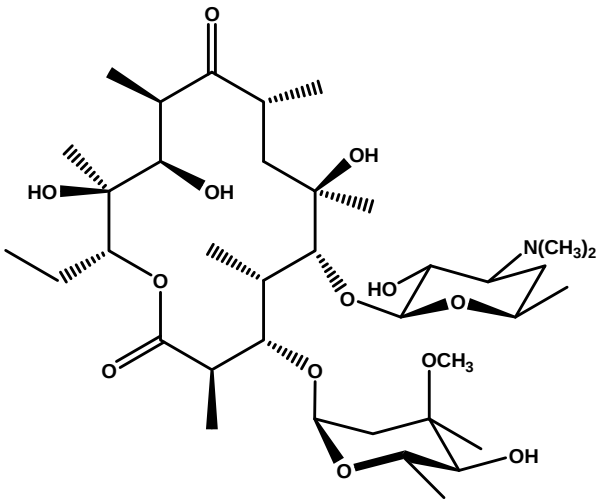
tema resultó productivo y de hecho los primeros años fueron muy prolíficos, descubriéndose diversas drogas cuyo uso sigue vigente en la actualidad. Entre ellas se cuentan agentes antibacterianos: cefalosporina C (I4), streptomicina (I5), eritromicina (I6), clortetraciclina (I7), vancomicina (I8) y cloranfenicol (I9)[3,7]; agentes inmunosupresores como ciclosporinas y rapamicina; agentes para disminuir los niveles de colesterol como mevastatina y pravastatina y antibióticos antitumorales como antraciclina, actinomicina y mitomicina (I10)[8].



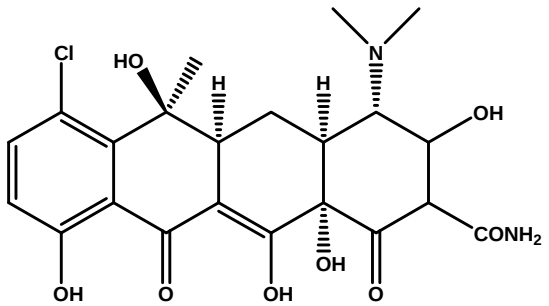
I4. Cefalosporina C



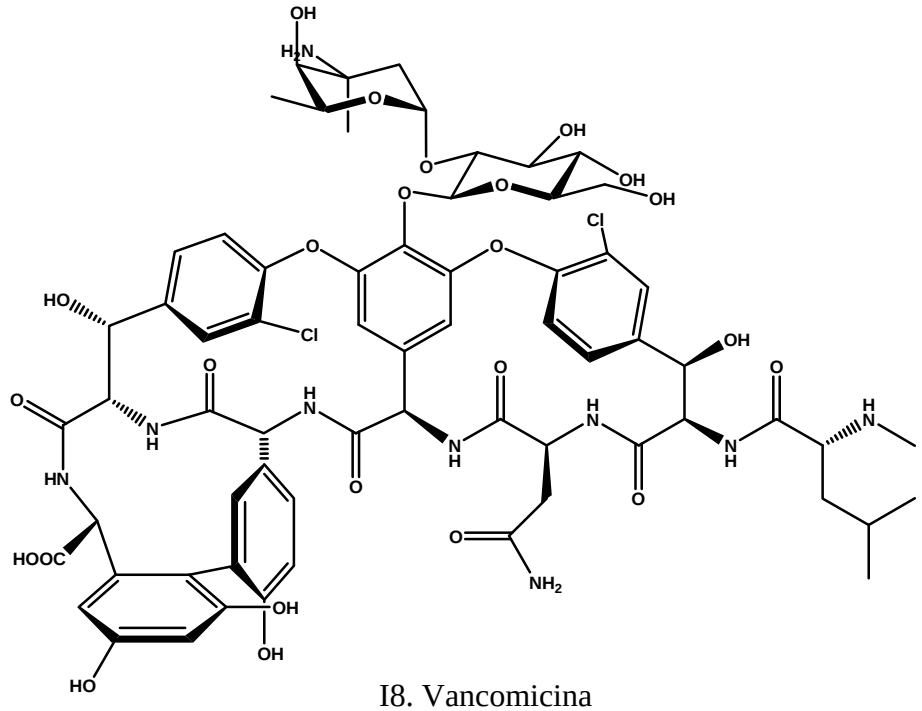
I5. Streptomicina



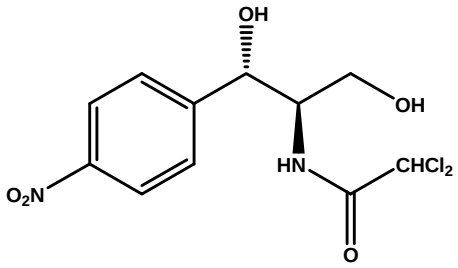
I6. Eritromicina



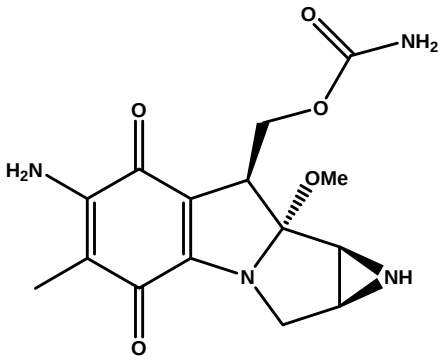
I7. Clortetraciclina



I8. Vancomicina



I9. Cloranfenicol



I10. mitomicina

Inicialmente la disponibilidad de compuestos sintéticos era limitada, la cantidad de blancos biológicos era escasa, el tiempo de screening se extendía meses ó años y se disponía de mucho tiempo para la caracterización de productos naturales que ofrecían la oportunidad de ampliar la diversidad química, por lo cual las condiciones eran las indicadas para dar un gran impulso a la investigación en productos naturales. Décadas más tarde el escenario cambió ya que se disponía de gran variedad de compuestos sintéticos, la química combinatoria se transformó en la principal alternativa para obtener bibliotecas de compuestos, se introdujeron numerosos métodos que facilitaron y agilizaron los tiempos de análisis (diseño racional de drogas[9], estudios SAR[10,11], disponibilidad de nuevas metodologías sintéticas), el desarrollo de la proteómica

permitió disponer de un gran número de blancos biológicos, el tiempo de screening disminuyó a menos de un mes y los tiempos de caracterización de los productos naturales siguieron siendo comparativamente altos. En la década de 1990 se esperaba que la química combinatoria generara una amplia biblioteca consistente en millones de compuestos que podrían ser analizados mediante screening de alto rendimiento (High Throughput Screening HTS) para dar así origen a un gran número de compuestos líder. De esta manera se obtendrían los compuestos líder en menor tiempo y en mayor cantidad en todas las áreas de interés en comparación con los métodos tradicionales utilizados hasta ese momento para el descubrimiento de drogas. En consecuencia no sorprende que se le haya dado menor importancia y prioridad a la investigación de productos naturales. A partir de 1992 se crearon más de 1250 bibliotecas combinatorias provenientes tanto de laboratorios académicos como de la industria[12]. Sin embargo, algunos años más tarde se observó que los resultados de la química combinatoria estaban lejos de cumplir con las expectativas iniciales[13,14]; el problema residía principalmente en la baja tasa de éxito en comparación con los productos naturales probablemente por la mayor complejidad y variación estructural de éstos (entre el millón de compuestos sintéticos incluídos en algunas de las primeras bibliotecas se encontró que solo algunos pocos ó ninguno exhibía actividad como para ser tenido en cuenta como potencial líder), y en los efectos colaterales de muchas de esas moléculas relativamente simples, debido a la baja especificidad de unión[15]. Estos hechos originaron un renovado interés en los productos naturales como fuente de diversidad química y generación de compuestos líderes.

¿Por qué buscar nuevos productos naturales?

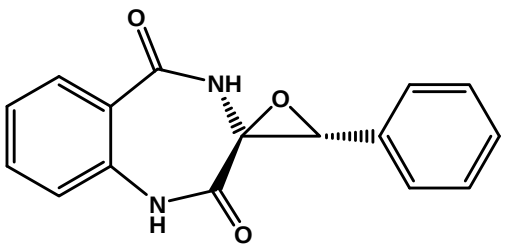
Los productos naturales como fuente de metabolitos bioactivos y de estructuras químicas novedosas, ofrecen una originalidad difícil de igualar en el laboratorio, gracias a la biodiversidad. La naturaleza posee procesos de screening de alta eficiencia propios, para la optimización de compuestos biológicamente activos[15]. Los productos naturales poseen estructuras tridimensionales bien definidas, que contienen los grupos funcionales

apropiados (aceptores y donores de hidrógeno, etc), los cuales otorgan la orientación espacial precisa para el funcionamiento correcto en cada caso[16].

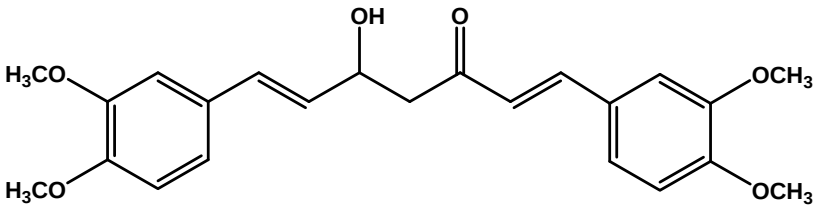
Los productos naturales han constituido una herramienta inestimable en el desciframiento de caminos biosintéticos y en la elucidación de mecanismos de acción biológicos y bioquímicos[17].

Por otra parte, la riqueza en su diversidad estructural y complejidad hacen que su obtención por vías sintéticas represente un desafío muy interesante para los grupos de investigación en síntesis química[1]. La síntesis total de productos naturales complejos ha dado lugar al descubrimiento de diversas reacciones novedosas y al desarrollo de reacciones de catálisis quiral[18,19].

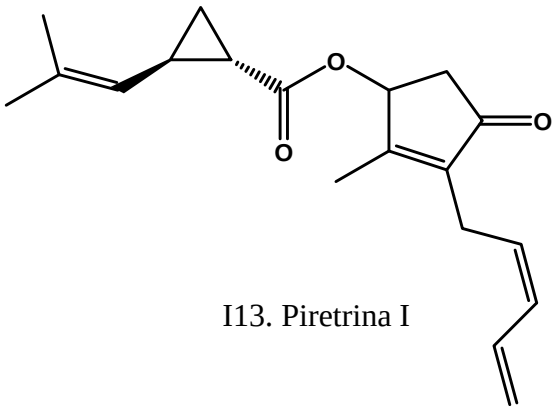
Como demostración de la amplitud del campo de investigación de productos naturales y del continuo hallazgo de metabolitos activos provenientes de fuentes naturales, pueden mencionarse algunos compuestos con distintas aplicaciones, hallados a lo largo de los años y hasta la actualidad. La ciclopenina (I11), por ejemplo, fue aislada de *Penicillium cyclopium* a mediados del siglo pasado y al descubrirse su propiedad tranquilizante se abrió un área de investigación en la búsqueda de análogos sintéticos dando lugar al desarrollo de las benzodiazepinas sintéticas actualmente comerciales (diazepam, lorazepam, alprazolam, etc)[20,21]. Existen numerosos compuestos derivados de productos naturales que se encuentran en fases de ensayos clínicos como agentes antitumorales, tales como GL-331, un análogo de etopósido, y JC-9 (ASC-9) (I12), un análogo de curcumina[22]. Se han encontrado lactonas sesquiterpénicas con potencial uso como herbicidas[23,24] y los insecticidas piretroides derivados de piretrinas naturales (I13) producidas por *Chrysanthemum cinerariaefolium*[25].



I11. Ciclopenina



I12. JC-9 (ASC-9)



I13. Piretrina I

Teniendo en cuenta la aparición continua de un número creciente de nuevos metabolitos secundarios biológicamente activos se cree que apenas se ha escarbado en la superficie de una vasta biblioteca natural de pequeñas moléculas.

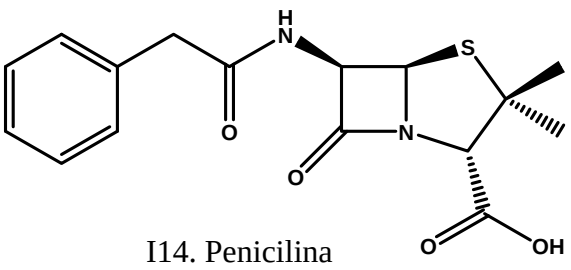
Productos naturales de hongos

Los hongos son organismos eucariontes, productores de esporas, que se nutren por absorción y que pueden reproducirse de manera sexual y asexual. La estructura somática más conocida consiste en filamentos ramificados, típicamente rodeados por pared celular (hifas). Sin embargo, algunos grupos están constituidos únicamente por formas unicelulares sin flagelo (por ejemplo levaduras) o unicelulares flagelados. Su

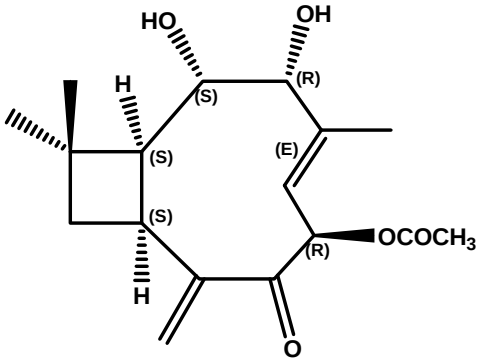
apariencia es muy diversa, encontrándose variadas estructuras morfológicas, como mohos, setas, royas, trufas, levaduras, etc[26].

La búsqueda de compuestos producidos por hongos se remonta a fines del siglo XIX, cuando los químicos orgánicos se interesaron por los pigmentos biosintetizados por estos organismos. Este grupo de organismos constituye una fuente promisoria de metabolitos secundarios por variadas razones. Como ya se ha mencionado, a lo largo de la historia los hongos han sido una fuente rica de compuestos bioactivos con diferentes propiedades, desde toxinas como las amanitinas hasta antibióticos como la penicilina[8,17,27]. Los hongos ocupan el segundo lugar entre los grupos de microorganismos productores de antibióticos (más de 1600 compuestos conocidos)[28]. Además, estos organismos presentan una amplia biodiversidad (se estima 1.5 millones de especies fúngicas en el mundo) y diversidad química a la vez[29-31]. Actualmente se cree que se conoce solo un bajo porcentaje de las especies de hongos existentes en la naturaleza[1,32,33], lo que hace que la investigación en este área sea aún de mayor interés.

Se pueden citar algunos ejemplos de hongos a partir de los cuales se han obtenido productos naturales de interés, como los antibióticos β-lactámicos penicilina (I14) y cefalosporina C (I4), producidos por los hongos *Penicillium chrysogenum* y *Cephalosporium acremonium* respectivamente, el inmunosupresor ciclosporina A, producido por *Trichoderma polysporum*, el hipotensivo ácido fusárico, producido por varias especies de *Fusarium* y el vasodilatador coronario naematolina (I15), producido por *Naematoloma fasciculare*.



I14. Penicilina



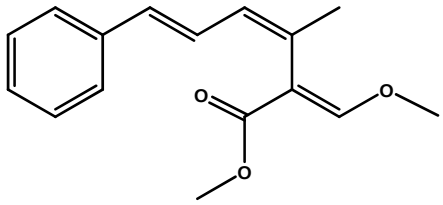
I15. Naematolina

Agroquímicos naturales

Desde principios del siglo pasado la industria de pesticidas comenzó a introducir un número creciente de agroquímicos sintéticos, tales como el DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano) y el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), prohibidos posteriormente por su alta toxicidad. Actualmente la mayor parte de los agroquímicos en uso son de origen sintético, y en general se trata de compuestos de considerable toxicidad. Si bien el empleo de agroquímicos produjo una revolución agrícola, el optimismo por el aumento de la producción fue cediendo frente a las preocupaciones relacionadas con la degradación ambiental, medida por la contaminación de los recursos naturales y alimentos[34-36]. Los agroquímicos sintéticos son agentes de baja especificidad y baja biodegradabilidad, causando en consecuencia su acumulación en reservas de agua y suelos, y eventualmente en organismos diferentes de su blanco de acción, produciendo así contaminación ambiental y problemas de salud en animales y humanos[37]. Además, la aplicación prolongada de un conjunto limitado de productos químicos puede conducir al desarrollo de resistencia en los patógenos y las alteraciones ecológicas producidas pueden dar lugar a un incremento repentino de pestes secundarias.

Estos hechos motivaron la búsqueda de estrategias alternativas para el control de pestes y la protección de cultivos, incluyendo métodos biológicos[38] y el uso de toxinas amigables con el medio ambiente. Así también surgió la agricultura orgánica, que evita el uso de plaguicidas y otros compuestos elaborados sintéticamente, dentro del marco general de la agricultura sostenible, que es aquella capaz de mantener, a través de los años, niveles aceptables de productividad biológica y económica, preservando el ambiente y los recursos naturales. Una alternativa razonable al uso de agroquímicos sintéticos es la de utilizar como agroquímicos a sustancias naturales o derivados de ellas que posean baja o ninguna toxicidad[39], es decir utilizar a los productos naturales activos como líderes para la obtención de análogos que resulten más activos ó más seguros mediante la exploración de las relaciones estructura-actividad. La investigación en este campo ha llevado a resultados valiosos para la agricultura en la actualidad, encontrándose productos que presentaron nuevos y únicos modos de acción[40,41]. Tal es el caso de las estrobilurinas. Las estrobilurinas naturales (por ejemplo estrobilurina A, I16) se han aislado desde principios de la década de 1970 a partir de *Strobilurus*

tenacellus principalmente[42], y de algunas especies de *Cyphellopsis* y *Mycenas*[43,44]. Estos compuestos despertaron gran interés como estructuras modelo para realizar modificaciones sintéticas debido a su actividad antimicótica, baja toxicidad en mamíferos y a la simplicidad de su estructura molecular, hecho poco usual en los productos naturales bioactivos[45,46]. Tempranamente se detectó que las estrobilurinas actuaban por un mecanismo novedoso de inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, donde la unión al complejo enzimático b_{C1} ocurría a nivel del centro de oxidación de hidroubiquinona (Qp) en lugar del sitio de unión habitual de los antimicóticos tóxicos para mamíferos (centro Qn)[47].

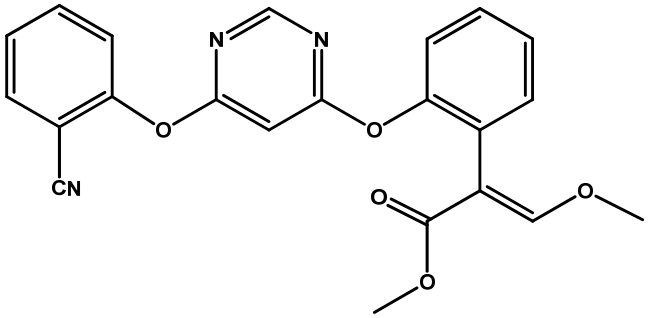


I16. Estrobilurina A

Se realizaron estudios de relación estructura-actividad, en los que se probó la actividad de numerosos análogos sintéticos de estrobilurina A, que permitieron determinar la subunidad de E-β-metoxiacrilato como el farmacóforo dentro de la molécula. Se encontró que la configuración E resultaba esencial ya que con la configuración Z se perdía por completo la actividad[47,48]. Luego se eligieron los análogos que exhibieron la mejor actividad *in vitro* para ensayar en experimentos de invernadero. El resultado de estas pruebas no fue el esperado ya que se encontró que la actividad disminuía notablemente no reflejando lo observado en los ensayos *in vitro*. A raíz de esos resultados se comenzó a sospechar de la estabilidad del sistema triénico en la molécula de estrobilurina A, por su susceptibilidad a oxidaciones y fotólisis. Esa hipótesis se confirmó con la preparación y utilización de análogos en los que se interrumpía o eliminaba directamente el trieno de la molécula[48].

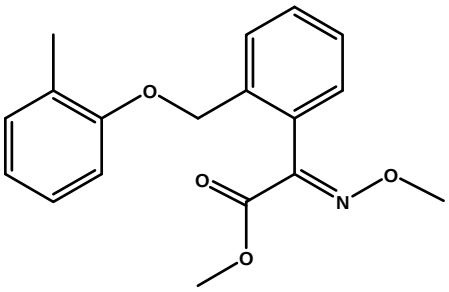
Durante la investigación llevada a cabo por numerosos grupos sobre strobilurinas se hizo un hallazgo importante, se suplantó el sustituyente unido al metilacrilato en la estrobilurina A por un difenil éter, que además de proveerle estabilidad permitía el transporte del compuesto por el xilema y el floema de las plantas

tratadas, es decir que la protección no sería localizada únicamente en las partes rociadas sino que se expandiría en toda la planta[49]. El trabajo posterior de optimización de dicha estructura condujo a la azoxistrobina (I17), compuesto que poseía las propiedades biológicas y fisicoquímicas buscadas, y que en la actualidad es ampliamente utilizado como agroquímico[49-51].

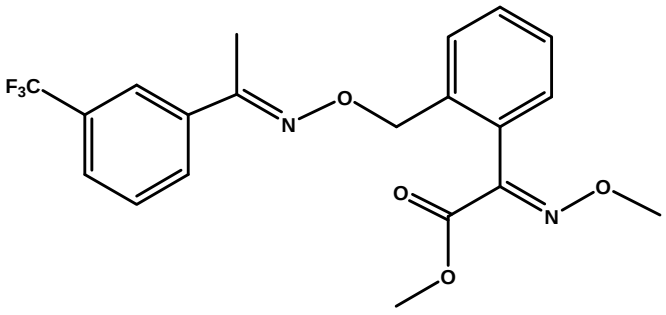


I17. Azoxistrobina

Por otra parte, la identidad del farmacóforo también fue modificada. Se ensayaron compuestos donde el enol éter de la estrobilurina A (I16) fue reemplazado por el éter de una oxima respetando la geometría E del grupo, y el desarrollo en esa dirección dio origen al fungicida de uso comercial actual denominado metil-kresoxima (I18)[52]. Con la introducción del éter de una oxima en la cadena lateral y un grupo trifluorometilo en el anillo de benceno se obtuvo el fungicida de amplio espectro trifloxistrobina (I19)[53,54]. Los ejemplos mencionados dan cuenta de la importancia que tienen los productos naturales como líderes para el desarrollo de análogos más activos o con propiedades físico-químicas más adecuadas.



I18. Metil-kresoxima

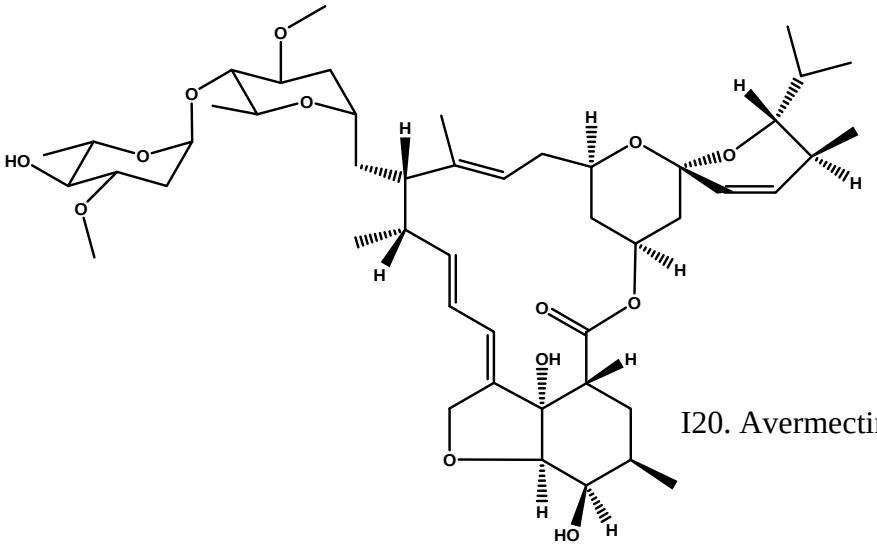


I19. Trifloxistrobina

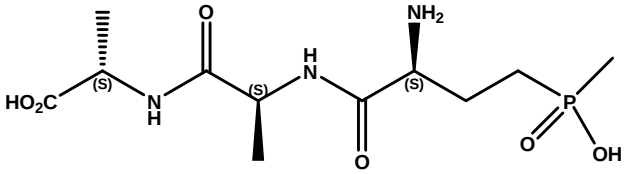
Sin embargo, a la hora de hablar de rentabilidad, los agroquímicos naturales se encuentran en desventaja respecto de los sintéticos, ya que los últimos son más fáciles de producir debido a que son moléculas pequeñas, que se pueden sintetizar sin mayores problemas en reactores, a diferencia de los compuestos que son aislados de extractos de plantas para los que se necesita entre otras cosas, mucho espacio físico para poder cultivarlas. Para lograr una buena producción del agroquímico natural, lo que es sin dudas un requisito indispensable, se exploró entonces la posibilidad de emplear microorganismos como productores de metabolitos activos, ya que pueden producir por fermentación altos rendimientos en ambientes controlados.

Los países con mayores recursos económicos están incluso fomentando el desarrollo de agentes de biocontrol (ABC)[55], en donde se busca utilizar directamente al microorganismo como controlador específico de alguna plaga en particular. El inconveniente de utilizar estos ABC es que el uso del microorganismo vivo requiere condiciones especiales ya que cada ABC se desarrolla en un ambiente específico y suele ser aplicable siempre que el medio a tratar contenga condiciones similares. Además, durante el desarrollo de los ABC, no siempre se identifican todos los metabolitos producidos por el microorganismo pudiendo éstos ser perjudiciales para la salud. Por estos motivos en algunos países como el nuestro hay resistencia a su empleo, prefiriendo los productores el uso de un producto químico.

Se pueden mencionar numerosos metabolitos provenientes de microorganismos que son capaces de controlar las enfermedades provocadas tanto por bacterias como por hongos fitopatógenos. El insecticida abamectina que es una mezcla de avermectinas (I20) y el herbicida bialaphos (I21), producidos por *Streptomyces avermitilis* y *S. viridochromogenes* respectivamente, son dos ejemplos de productos de origen microbiano comercializados actualmente[56].

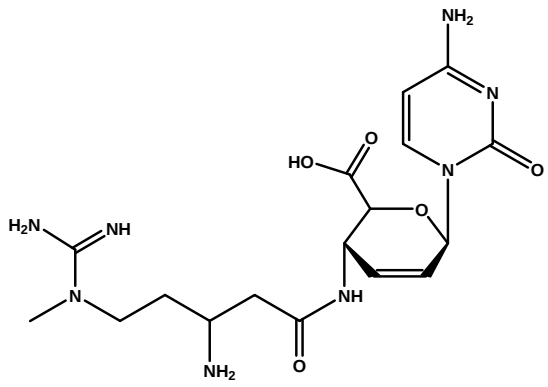


I20. Avermectina B_1b

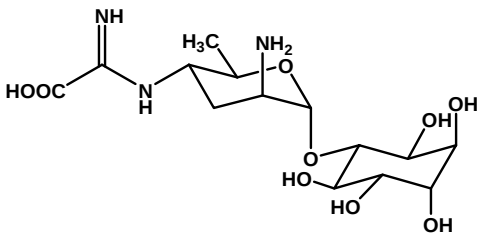


I21. Bialaphos

La blasticidina S (I22) es un metabolito aislado de *Streptomyces griseochromogenes*, activo *in vitro* frente a hongos y bacterias fitopatógenos[57], que ha sido ampliamente utilizado debido a su potente actividad curativa frente a enfermedades fúngicas en cultivos de arroz[41,58,59]. La kasugamicina (I23) es un metabolito aislado de *Streptomyces kasugaensis* y *S. kasugaspinus*, activo frente a levaduras y hongos filamentosos como *Pyricularia oryzae*, patógeno de cultivos de arroz, y algunas bacterias como por ejemplo *Pseudomonas*[60], por lo que ha sido comercializado principalmente en Japón[41].

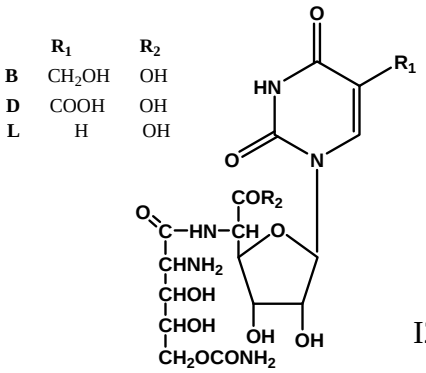


I22. Blasticidina S



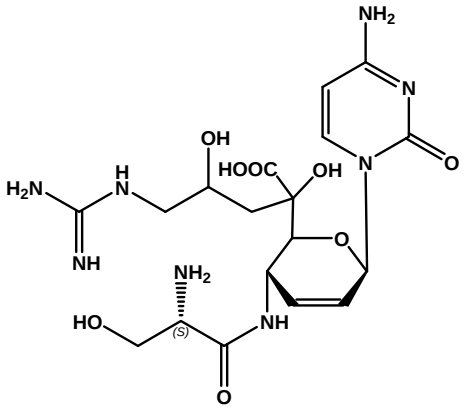
I23. Kasugamicina

Otros ejemplos son las polioxinas (I24), que son metabolitos aislados de *Streptomyces cacaoi* var. *asoensis*, activos frente a diversos hongos como *Rhizoctonia solani* que afecta a variadas clases de cultivos como arroz, y *Botrytis cinerea* que afecta a cultivos de vid y otros vegetales[61].



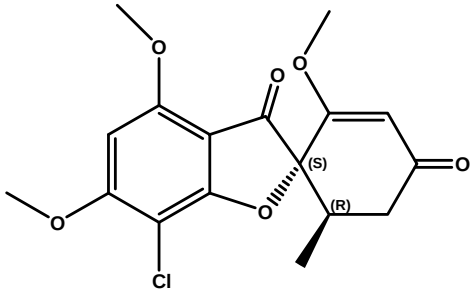
I24. Polioxinas

La mildiomicina (I25) es un metabolito aislado de *Streptoverticillium rimofaciens*, activo frente a *Sphaerotheca fuliginea*, patógeno de cultivos de zapallo, y que es resistente al compuesto antifúngico comercial bemomyl[41,62].



I25. Mildiomicina

Los hongos también constituyen una fuente promisoria para el aislamiento de compuestos antifúngicos. Entre los ejemplos más importantes se pueden mencionar las oudesmansinas, que se descubrieron junto con las estrobilurinas a partir de basidiomicetes, y la griseofulvina (I26), antimicótico de aplicación en infecciones en piel y uñas principalmente[63-65].



I26. Griseofulvina

La importancia de buscar agroquímicos en el país

Los principales productos de la agricultura en Argentina son los cereales como el trigo, el maíz, la avena y el sorgo y las oleaginosas como la soja, el girasol y el maní. Actualmente la Argentina ocupa el tercer lugar mundial como productora de soja y el primero como exportador de aceites de soja[66,67]. Muchos de los cultivos económicamente importantes para nuestro país son afectados por enfermedades producidas por hongos, contra muchos de los cuales no existe un tratamiento eficaz. Estas enfermedades afectan la calidad y cantidad de las cosechas y producen pérdidas económicas considerables, por lo que la búsqueda de compuestos antibióticos y antifúngicos con actividad específica y de origen natural para combatirlos se vuelve una necesidad imperiosa.

Se pueden citar numerosos ejemplos de enfermedades producidas por bacterias y hongos fitopatógenos que afectan los cultivos agrícolas. Para este trabajo de tesis son de incumbencia particularmente los fitopatógenos que afectan a la soja y las enfermedades que producen. En la tabla se detallan las enfermedades más usuales y sus agentes causales[68-72].

Nombre	Agente causal	Síntomas
Podredumbre del tallo	*Sclerotinia sclerotiorum*	Marchitamiento y secado de hojas que quedan adheridas al tallo. Desarrollo miceliar en la parte media y superior del tallo con formación de esclerocios (cuerpo de resistencia del hongo) en el interior y exterior. Los tallos muertos se vuelven blanquecinos y quebradizos. Hay vainas con granos pequeños y deformes.
Podredumbre de la raíz y del tallo	*Phytophthora sojae*	Podredumbre de raíz y de la base del tallo que se extiende hasta el 5º o 6º nudo. Coloración marrón oscura que contrasta con los tejidos verdes de la planta. Escaso desarrollo radicular, amarillamiento de hojas, marchitamiento y finalmente muerte. Internamente la corteza y los tejidos vasculares toman también coloración oscura.
Roya de la soja	*Phakopsora meibomiae*	Decoloración amarilla de hojas y pústulas de color marrón. Necrosis de las superficies afectadas.
Cancro del tallo	*Diaphorte phaseolorum* var. meridionalis	Lesiones necróticas (cancros) bien definidos en el tallo con tonalidades castaño claro en el centro y bordes pronunciados pardo rojizos. Los cancros se localizan en la zona de inserción del pecíolo y se extienden sobre el tallo. Fructificaciones (picnidios) distribuidas al azar.
Podredumbre marrón del tallo	*Phialophora gregata*	Necrosis internerval con borde angosto de color verde que limita las nervaduras. Los tallos presentan coloración rojiza amarronada en la médula, predominando en los nudos.
Mancha parda	*Septoria glycines*	Desfoliación prematura. Las hojas presentan manchas de tamaño variable, de color castaño rojizo, que pueden confluir provocando amarilleo y secado prematuro.

Mancha ojo de rana (MOR)	*Cercospora sojina*	Lesiones color castaño-rojizo en hojas. Pérdida prematura de hojas. Manchas alargadas más oscuras en los bordes en tallos y vainas.
Antracnosis	*Colletotrichum truncatum*	Las vainas presentan áreas oscuras de tamaño variable, donde se observan las fructificaciones del hongo como puntuaciones oscuras provistas de pelos, que pueden ser visibles con lupa.
Tizón del tallo y mancha púrpura de la semilla	*Cercospora kikuchii*	Manchas marrones o gris oscuro de forma rectangular (parche) distribuidas sobre el tallo, y en vainas de forma y tamaño irregular; sobre ellas se desarrollan las fructificaciones del hongo. Las hojas adquieren color bronceado rojizo, se encrespan y resecan promoviendo desfoliación prematura. Las semillas infectadas presentan coloración púrpura - violácea y disminuye el poder germinativo.
Tizón del tallo y vaina	*Phomopsis sojae*	Estriado oscuro y longitudinal característico en el tallo, donde se desarrollan las fructificaciones.
Oidio	*Microsphaera diffusa*	Retorcimiento de hojas, deformación de brotes y falta de floración. La planta se debilita hasta morir.
Tizón por *Sclerotium*	*Sclerotium rolfsii*	Lesiones hundidas (cancros) con decoloración castaño rojiza en el cuello de la planta. En la zona afectada se puede observar una masa filamentosa del hongo, que se extiende sobre la superficie del suelo. Sobre ella se adhieren pequeños esclerocios redondos color canela.
Podredumbre de raíz y tallo	*Rhizoctonia solani*	Cancros secos castaño rojizos en el cuello de la planta. En ocasiones pueden observarse filamentos amarronados en el interior del tallo.
Podredumbre carbonosa del tallo	*Macrophomina phaseolina*	Decoloración castaña rojiza debajo de los cotiledones, oscureciéndose posteriormente. Microesclerocios negros debajo de la corteza y en la

		médula.
Síndrome de la muerte súbita	*Fusarium solani*, *F. tucumaniae*, *F. virguliforme*, *F. brasielliense* y *F. cuneirostrum*	Las hojas presentan clorosis y necrosis internerval, distribuidas aisladamente o en forma de manchones. Las plantas mueren prematuramente y se observa una coloración gris crema en el interior de la raíz.

El manejo integrado de las fitoenfermedades (MIF) considera el uso de fungicidas aplicados al follaje como una de las técnicas para mantener el nivel de las enfermedades por debajo del umbral de daño económico (UDE). En general, en presencia de enfermedades, las pulverizaciones con fungicidas al estado de inicio de formación de vainas incrementan el rendimiento y al inicio de llenado de granos aumentan el peso del grano y la calidad de la semilla. En algunos casos se pueden tratar las semillas previamente al sembrado con el fungicida de manera de prevenir las enfermedades. Los criterios de aplicación de fungicidas varían entre preventivo, fenológico, de síntomas y/o de severidad, según la conveniencia de acuerdo a las enfermedades que sufre el cultivo. En el mercado Argentino se han registrado 20 principios activos fungicidas, pertenecientes a triazoles, bencimidazoles y estrobilurinas, competentes para el control de enfermedades en el cultivo de soja: azoxistrobina; benomil; carbendazim; clorotalonil; ciproconazol; difenoconazol; epoxiconazol; fenbuconazol; flusilazol; flutriafol; metconazol; metiltiofanato; miclobutanilo; picoxistrobina; propiconazol; piraclostrobina; tebuconazol; tetraconazol; tiabendazol y trifloxistrobina (SENASA, 2008).

El síndrome de la muerte súbita (SMS) es una enfermedad que se favorece en las condiciones óptimas para el crecimiento del cultivo, particularmente alta humedad edáfica, alta fertilidad y temperatura fresca[68]. En América las principales especies responsables de esta enfermedad en soja son *F. tucumaniae* y *F. virguliforme*, ambas aisladas en Argentina a partir de plantas con síntomas del SMS[73]. El hongo se encuentra en el suelo o en restos de raíces y la infección de las plantas se produce a través de las raíces y causa podredumbre radicular. Además, el desarrollo de los síntomas foliares varía mucho según las condiciones ambientales y la concentración del patógeno en el terreno, que no es uniforme. En ataques severos estos patógenos pueden producir

mermas de rendimiento que varían entre el 20 y el 80 %, dependiendo del cultivar y del momento de la infección.

Las opciones para combatir el SMS son limitadas, la estrategia principal es el uso de cultivares tolerantes, sin embargo aún no se ha logrado desarrollar variedades altamente resistentes. Los fungicidas aplicados durante la siembra o en el tratamiento de semillas tienen efectos limitados, y la aplicación sobre plantas no tiene efecto alguno, presumiblemente porque la infección por el hongo está restringida a las raíces[74]. Por todo lo anterior y teniendo en cuenta la importancia económica de los cultivos de soja para el país, existe una necesidad imperiosa de encontrar una solución para el tratamiento de síndrome de muerte súbita.

Paralelamente a la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas resulta ventajoso y de utilidad estudiar otras bioactividades de los productos naturales aislados y purificados tales como antimicrobiana, citotóxica, etc. En ese sentido, un campo de aplicación al cual no se le ha dedicado mucha atención es el de los productos agroquímicos de uso en apicultura, pese a que nuestro país ocupa el tercer puesto como exportador mundial de miel después de China y Estados Unidos, lo que representa grandes ingresos de divisas al país anualmente[75]. Teniendo en cuenta este hecho resulta llamativa la escasez casi total de productos agroquímicos para luchar contra las principales enfermedades que afectan a las larvas de las abejas, que implican pérdidas económicas considerables. Entre estas enfermedades, una de las más serias por su alto grado de patogenicidad y virulencia, es loque americana. La misma es producida por la bacteria *Paenibacillus larvae*, bacilo que afecta a las larvas de las abejas melíferas. Son muy pocos los países libres de esta enfermedad. A nivel mundial, los antibióticos comúnmente empleados para el control de loque americana son la oxitetraciclina (como clorhidrato) y el sulfatiazol sódico[76]. En algunos países, como EE.UU. y Argentina, el empleo de sulfatiazol sódico se ha dejado de lado debido a la alta residualidad del producto en miel (un año o más) y a la aparición de cepas bacterianas resistentes. Con respecto a la oxitetraciclina, se han detectado casos de resistencia *in vitro* en las cepas bacterianas como así también recurrencia de la enfermedad y toxicidad del antibiótico para las abejas adultas. Considerando todo lo expuesto se infiere que resulta un desafío importante tratar de eliminar la enfermedad loque americana, más aún teniendo en cuenta que no hay prácticamente grupos en el mundo que estén trabajando en este tema.

Objetivo

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos precedentemente, este trabajo de tesis doctoral tiene como objetivo el aislamiento y elucidación estructural de compuestos bioactivos producidos por cultivos de hongos provenientes de diferentes fuentes o la preparación de análogos sintéticos a partir de metabolitos fúngicos líderes, para mejorar su actividad, para su aplicación en el agro para el control de enfermedades infecciosas, que afectan a la agricultura.

El interés primario es la búsqueda de metabolitos que presenten actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos que afectan al cultivo de soja.

Bibliografía

(1) Cragg, G. M.; Newman, D. J. "Biodiversity: A continuing source of novel drug leads" *Pure and Applied Chemistry* **2005**, *77*, 7-24.

(2) Mann, J. "*Natural products: their chemistry and biological significance*"; ed.: Harborne, J., Davidson, S.; Longman Scientific & Technical: Londres, Reino Unido, **1994**.

(3) Butler, M. S. "The role of natural product chemistry in drug discovery " *Journal of Natural Products* **2004**, *67*, 2141-2153.

(4) Fraenkel, G. S. "The raison d'être of secondary plant substances" *Science* **1959**, *129*, 1466-1470.

(5) Feeny, P. P. "Plant apparency and chemical defense" *Recent Advances in Phytochemistry* **1976**, *10*, 1-40.

(6) Van der Sar, S. "Studies in the chemistry of fungal natural products".Tesis de Doctorado Universidad de Canterbury, **2006**.

(7) Mann, J. "*The elusive magic bullet: the search for the perfect drug*"; ed.; Oxford University Press: Oxford, Reino Unido, **1999**.

(8) Cragg, G. M.; Newman, D. J. "International collaboration in drug discovery and development from natural sources" *Pure and Applied Chemistry* **2005**, *77*, 1923-1942.

(9) Anderson, A. C. "The process of structure-based drug design" *Chemistry & Biology* **2003**, *10*, 787-797.

(10) Stockman, B. J.; Dalvit, C. "NMR screening techniques in drug discovery and drug design" *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2002**, *41*, 187-231.

(11) Carr, R.; Jhoti, H. "Structure-based screening of low-affinity compounds" *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 522-527.

(12) Gershell, L. J.; Atkins, J. H. "A brief history of novel drug discovery technologies" *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 321-327.

(13) Balkenhohl, F.; von dem Bussche-Hünnefeld, C.; Lansky, A.; Zechel, C. "Combinatorial synthesis of small organic molecules" *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35*, 2288-2337.

(14) Myers, P. L. "Will combinatorial chemistry deliver real medicines?" *Current Opinion in Biotechnology* **1997**, *8*, 701-707.

(15) Paterson, I.; Anderson, E. A. "The renaissance of natural products as drug candidates" *Science* **2005**, *310*, 451-453.

(16) Service, R. F. "Drug industry looks to the lab instead of rainforest and reef" *Science* **1999**, *285*, 186.

(17) Clardy, J.; Walsh, C. "Lessons from natural molecules" *Nature* **2004**, *432*, 829-837.

(18) Snyder, S. A. "Natural products: Divine inspiration for chemistry" American Chemical Society, **2007**, GEN-032

(19) Nicolaou, K. C. "Inspirations, discoveries, and future perspectives in total synthesis" *Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 951-972.

(20) Bracken, A.; Pocker, A.; Raistrick, H. "Studies in the biochemistry of microorganisms. 93. Cyclopenin, a nitrogen-containing metabolic product of *Penicillium cyclopium* Westling" *Biochemical Journal* **1954**, *57*, 587-580.

(21) Cardellina II, J. H. "*Biologically active natural products. Potential use in agriculture*"; ed.: Comstock, J. M.; ACS Symposium Series 380. American Chemical Society Washington DC., **1987**.

(22) Lee, K.-H. "Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach" *Journal of Natural Products* **2010**, *73*, 500-516.

(23) Chancellor, R. J. "*The science of allelopathy in experimental agriculture*"; ed.: Putnam, A. R., Tang, C. S.; Wiley: New York, **1987**.

(24) Macías, F. A.; Torres, A.; Molinillo, J. G.; Varela, R. M.; Castellano, D. "Potential allelopathic sesquiterpene lactones from sunflower leaves" *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1205-1215.

(25) Dremova, V. P.; Volkov, I. P. "Pyrethrins and synthetic pyrethroids (review)" *Piretriny i sinteticheskie piretroidy (obzor).* **1987**, 76-82.

(26) Casadevall, A. H., J.; Buckley, M. "The fungal kingdom: diverse and essential roles in earth's ecosystem" American Academy of Microbiology, **2008**, http://academy.asm.org/images/stories/documents/fungalkingdom.pdf

(27) Hoffmeister, D.; Keller, N. P. "Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation" *Natural Product Reports* **2007**, *24*, 393-416.

(28) Crueger, W.; Crueger, A. "*Biotechnology: a textbook of industrial microbiology*. "; ed.: Crueger, W.; Sinauer Associates: Sunderland, Reino Unido, **1990**.

(29) Firn, R. D.; Jones, C. G. "Natural products - a simple model to explain chemical diversity" *Natural Product Reports* **2003**, *20*, 382-391.

(30) Cichewicz, R. H. "Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners" *Natural Product Reports* **2010**, *27*, 11-22.

(31) Williams, R. B.; Henrikson, J. C.; Hoover, A. R.; Lee, A. E.; Cichewicz, R. H. "Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome" *Organic & Biomolecular Chemistry* **2008**, *6*, 1895-1897.

(32) Hawksworth, D. L.; Rossman, A. Y. "Where are all the undescribed fungi?" *Phytopathology* **1997**, *87*, 888-891.

(33) Hawksworth, D. L. "Fungi and international biodiversity initiatives" *Biodiversity and Conservation* **1997**, *6*, 661-668.

(34) de Snoo, G. R. "Unsprayed field margins: effects on environment, biodiversity and agricultural practice" *Landscape and Urban Planning* **1999**, *46*, 151-160.

(35) Marrs, R. H.; Frost, A. J.; Plant, R. A. "Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: The effects of plant age and surrounding vegetation structure" *Environmental Pollution* **1991**, *69*, 223-235.

(36) Marrs, R. H.; Williams, C. T.; Frost, A. J.; Plant, R. A. "Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest" *Environmental Pollution* **1989**, *59*, 71-86.

(37) Schrader, K. K.; Andolfi, A.; Cantrell, C. L.; Cimmino, A.; Duke, S. O.; Osbrink, W.; Wedge, D. E.; Evidente, A. "A survey of phytotoxic microbial and plant metabolites as potential natural products for pest management" *Chemistry & Biodiversity* **2010**, *7*, 2261-2280.

(38) "*Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*"; ed.: Jackson, C., Magan, N., Butt, T. M.; CABI Publishing: Wallingford, United Kingdom, **2001**.

(39) Copping, L. G.; Duke, S. O. "Natural products that have been used commercially as crop protection agents" *Pest Management Science* **2007**, *63*, 524-554.

(40) Irvine, N. M.; Yerkes, C. N.; Graupner, P. R.; Roberts, R. E.; Hahn, D. R.; Pearce, C.; Gerwick, B. C. "Synthesis and characterization of synthetic analogs of cinnacidin, a novel phytotoxin from *Nectria sp*" *Pest Management Science* **2008**, *64*, 891-899.

(41) Dayan, F. E.; Cantrell, C. L.; Duke, S. O. "Natural products in crop protection" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 4022-4034.

(42) Schramm, G.; Steglich, W.; Anke, T.; Oberwinkler, F. "Antibiotics from basidiomycetes, III. Strobilurin A and B, antifungal metabolites from *Strobilurus tenacellus*" *Chemische Berichte* **1978**, *111*, 2779-2784.

(43) Anke, T.; Schramm, G.; Schwalge, B.; Steffan, B.; Steglich, W. "Antibiotics from basidiomycetes, XX. Synthesis of strobilurin A and revision of the stereochemistry of natural strobilurins" *Liebigs Annalen der Chemie* **1984**, 1616-1625.

(44) Musilek, V.; Cerna, J.; Sasek, V.; Semerdzieva, M.; Vondracek, M. "Antifungal antibiotic of the basidiomycete *Oudemansiella mucida*. I. Isolation and cultivation of a producing strain" *Folia Microbiologica (Praha)* **1969**, *14*, 377-387.

(45) Anke, T.; Oberwinkler, F.; Steglich, W.; Schramm, G. "The strobilurins-new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*" *Journal of Antibiotics* **1977**, *30*, 806-810.

(46) Anke, T.; Steglich, W. "*β-Methoxyacrylate antibiotics: from biological activity to synthetic analogues in biologically active molecules*"; ed.; Springer: Berlin, **1989**.

(47) Becker, W. F.; Von, J. G.; Anke, T.; Steglich, W. "Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B, and myxothiazol: new inhibitors of the bc1 segment of the respiratory chain with an E-β-methoxyacrylate system as common structural element" *FEBS Letters* **1981**, *132*, 329-333.

(48) Sauter, H.; Steglich, W.; Anke, T. "Strobilurins: evolution of a new class of active substances" *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 1328-1349.

(49) Clough, J. M.; Godfrey, C. R. A. "*The strobirulin fungicides in fungicidal activity*"; ed.; Wiley: Chichester, **1998**.

(50) Clough, J. M.; Godfrey, C. R. A.; Streeting, I. T.; Cheetham, R.; De, F. P. J.; Bartholomew, D.; Eshelby, J. J. "Preparation of [(pyrimidinyloxy)phenyl]methoxypropenoates and related compounds as agrochemical fungicides" **1992**, EP 1991-306512.

(51) Clough, J. M.; Godfrey, C. R. A. "Azoxystrobin, a novel broad-spectrum systemic fungicide" *Yuki Gosei Kagaku Kyokaishi* **1999**, *57*, 346-350.

(52) Sauter, H.; Ammermmann, E.; Röhl, F. "*Strobilurins- From natural products to a new class of fungicides in agents from nature: natural products and analogues* "; ed.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **1996**.

(53) Reuveni, M. "Efficacy of trifloxystrobin (Flint), a new strobilurin fungicide, in controlling powdery mildews on apple, mango and nectarine, and rust on prune trees" *Crop Protection* **2000**, *19*, 335-341.

(54) Reuveni, M. "Activity of trifloxystrobin against powdery and downy mildew diseases of grapevines" *Canadian Journal of Plant Pathology* **2001**, *23*, 52-59.

(55) Shearer, M. C. "*Isolation of biotechnological organisms from nature*"; ed.: Labeda, D. P.; McGraw-Hill Publishing Company: Illinois, EEUU, **1990**.

(56) "*Ivermectin and abamectin*"; ed.: Campbell, W. C.; Springer-Verlag: Nueva York, **1989**.

(57) Takeuchi, S.; Hirayama, K.; Ueda, K.; Sakai, H.; Yonehara, H. "Blasticidin S, a new antibiotic" *The Journal of Antibiotics* **1958**, *11*, 1-5.

(58) Kimura, M.; Yamaguchi, I. "Recent development in the use of blasticidin S, a microbial fungicide, as a useful reagent in molecular biology" *Pesticide Biochemistry and Physiology* **1996**, *56*, 243-248.

(59) Kimura, M.; Yamaguchi, I. "Convergent transcription units and their promoters at both ends of Pot2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus" *Journal of Biochemistry* **1998**, *124*, 268-273.

(60) Umezawa, H.; Hamada, M.; Suhara, Y.; Hashimoto, T.; Ikekawa, T. "Kasugamycin, a new antibiotic" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1965**, *5*, 753-757.

(61) Misato, T. "*The development of agricultural antibiotics*" en "Pesticide Chemistry in the 20th Century"; American Chemical Society: **1977**; Vol. 37, p 170-192.

(62) Iwasa, T. "Mildiomycin, an effective eradicant for powdery mildew" *Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment, Natural Products* **1983**, 57-62.

(63) Taha, K. F.; Chu, C. K. "Isolation of antibiotic griseofulvin from fungus *Nematospora coryli*" *Journal of Drug Research* **1991**, *20*, 137-141.

(64) Sone, K.; Miura, M.; Fujita, K. "Dissolution and absorption of griseofulvin preparations" *Byoin Yakugaku* **1984**, *10*, 17-20.

(65) Araujo, O. E.; Flowers, F. P.; King, M. M. "Griseofulvin: a new look at an old drug" *DICP : the annals of pharmacotherapy* **1990**, *24*, 851-854.

(66) "Soybean Oil: world supply and distribution" United States Department of Agriculture: Foreign Agricultural Service, **2011**, http://www.fas.usda.gov/psdonline/

(67) "Perspectivas alimentarias: resúmen del mercado de semillas oleaginosas" Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), **2010**, http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Oilcrops/Documents/FO_June_2011_Spanish.pdf

(68) Distéfano de Vallone, S. "Enfermedades de la soja" *Revista IDIA XXI (INTA)* **2002**, *3*, 68-74.

(69) Distéfano de Vallone, S.; Salines, L. "Una enfermedad fúngica de la soja siempre vigente y en incremento: la podredumbre de la raíz y base del tallo" Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTI), **2002**, http://www.inta.gov.ar/mjuarez/info/documentos/soja/podt02.htm

(70) Pioli, R. "Enfermedades de la soja" *Agromensajes* **2000**, *2*, 10-12.

(71) Ploper, L. D.; Devani, M. R. "La roya de la soja: Principales aspectos de la enfermedad y consideraciones sobre su manejo" *Soja en Siembra Directa, Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (AAPRESID)* **2002**, 51-55.

(72) Gally, T. "Enfermedades de las semillas de soja en Argentina" Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, **2006**, 78, 86-90.

(73) Aoki, T.; O'Donnell, K.; Scandiani, M. M. "Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense sp. nov.*, *F. cuneirostrum sp. nov.*, *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*" *Mycoscience* **2005**, *46*, 162-183.

(74) Westphal, A.; Xing, L.; Abney, S.; Shaner, G. "*Diseases of soybean: sudden death syndrome*", Purdue University, http://www.ces.purdue.edu/new

(75) Oficina de Estadísticas de Comercio Exterior, SENASA, **2011**. http://www.senasa.gov.ar/estadistica.php#

(76) "*Honey bee pathology*"; ed.: Bailey, L., Ball, B. V.; Academic Press: Londres, **1991**.

Introducción

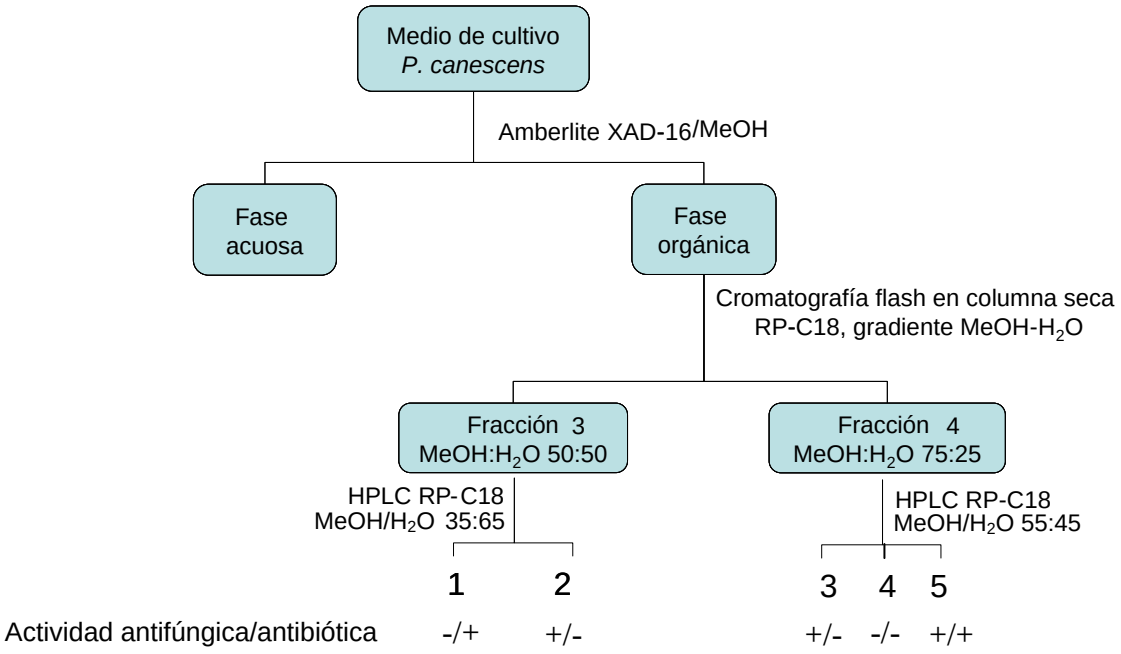
En las industrias farmacéutica y agroquímica miles de compuestos deben ser evaluados antes de decidir si alguno de ellos es potencialmente útil, lo cual conlleva gran inversión de tiempo e insumos hasta encontrar un líder. Para mejorar la búsqueda, particularmente cuando se buscan metabolitos naturales bioactivos producidos por microorganismos, se explora el espectro de biodiversidad en nuevas fuentes. Como se sabe que los entornos no estudiados previamente presentan su propio ecosistema, interacciones y evolución, estos constituyen un terreno de exploración atractivo y promisorio dado que pueden contener nuevos organismos productores. En este sentido, y en la búsqueda de productos naturales potencialmente antibióticos frente a *Paenibacillus larvae*, se han investigado los metabolitos antimicrobianos de cepas fúngicas provenientes de polen de abejas[1,2]. Las colmenas de abejas productoras de miel (*Apis melifera*) constituyen un hábitat muy favorable para el crecimiento y desarrollo de microorganismos dado que poseen alimento (miel, cera, polen), su temperatura promedio es de 30ºC y la humedad relativa oscila entre 60 y 70%.

Por ese motivo se decidió estudiar los metabolitos producidos por cepas fúngicas provenientes de polen para lo cual se trabajó en colaboración con la Doctora Nora Peña de la Universidad Nacional de Mar del Plata, quien aisló numerosas cepas de polen de colmenas ubicadas en un apiario del INTA Balcarce. Entre ellas se aisló una cepa de *Penicillium canescens* que resultó interesante por presentar sus extractos actividad antimicrobiana en ensayos preliminares de actividad biológica, además de mostrar riqueza química por ccd.

Numerosas cepas de *P. canescens* han sido reportadas como productoras de los antifúngicos griseofulvina, canescina, ácido curvulínico y Sch642305, así como también alcaloides con unidades de triptofano[3]. En este capítulo se describe el aislamiento y la identificación de metabolitos bioactivos obtenidos a partir de una cepa de *Penicillium canescens* aislada de polen, y que no habían sido aislados de esta especie con anterioridad.

Aislamiento de los metabolitos secundarios

Se cultivó la cepa de *Penicillium canescens* en medio líquido extracto de malta al 30%, descrito en la parte experimental general. Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento óptimo del hongo, se separaron el medio y el micelio por filtración. Posteriormente, el medio de cultivo se extrajo en fase sólida utilizando amberlite XAD-16 y MeOH para su elución. El solvente se evaporó en rotavap y se obtuvo de esta manera un extracto, al cual se le realizó un fraccionamiento mediante cromatografía flash en columna seca, utilizando fase reversa y mezclas de polaridad decreciente de MeOH:H_2O. La purificación de los compuestos fue guiada por los ensayos de actividad antimicrobiana de las fracciones colectadas y se aislaron cinco compuestos puros mediante HPLC. Los compuestos **1** y **2** se obtuvieron a partir de la fracción 3 (MeOH-H_2O 50:50) y los compuestos **3-5** a partir de la fracción 4 (MeOH-H_2O 75:25) (esquema 1).



Esquema 1. Diagrama de los pasos de aislamiento de los metabolitos **1** a **5** a partir del cultivo de *P. canescens*.

Elucidación estructural de los metabolitos aislados

Las estructuras de los metabolitos aislados se elucidaron analizando los datos espectroscópicos de RMN unidimensional y bidimensional y espectrometría de masa.

Compuesto 1

La fórmula molecular del compuesto **1** fue determinada como $C_{14}H_{17}N_2O_3$ por espectrometría de masa, utilizando la técnica de ionización ESI (*m/z* 261.1242 $[M+H]^+$).

El compuesto **1** presentó en su espectro RMN-^{1}H ($CDCl_3$) una señal a δ 7.30 ppm que integraba para 5 H característica de un anillo de benceno monosustituído. Se observaron además tres multipletes a δ 4.58, 4.46 y 4.31 ppm, tres dobles dobletes con desplazamientos en 3.79, 3.61 y 2.79 ppm, además un doblete a 3.57 y multipletes a δ 2.35 y 2.04 ppm.

En el espectro RMN-^{13}C se observaron señales de carbonilos de amidas a 169.6 y 165.1 ppm, además de señales en la zona de aromáticos, a 135.8, 129.3, 129.1 y 127.6 ppm. Se observó una señal a 68.4 ppm típica de C hidroxilado y señales a 57.4, 56.2, 54.4, 37.8 y 36.7 ppm.

Las señales con desplazamientos a 4.46 y 4.31 ppm podrían indicar la presencia de hidrógenos α de aminoácidos, teniendo en cuenta además las señales observadas en el espectro RMN-^{13}C a δ 169.6 y 165.1 ppm típicas de carbonilos de amidas. Se propuso entonces una dicetopiperazina como esqueleto estructural. Las señales aromáticas de un anillo monosustituído indicarían que uno de los aminoácidos es fenilalanina. Por otra parte, la señal a δ 4.58 ppm correspondiente a un metino hidroxilado y las señales alifáticas de menores deplazamientos (entre 2 y 4 ppm) indicarían la presencia de prolina sustituída con un grupo –OH, siendo este hecho consistente con la observación de la señal a 68.4 ppm, por lo tanto se propuso que el segundo aminoácido componente se trataba de 4-hidroxiprolina (4-Hyp).

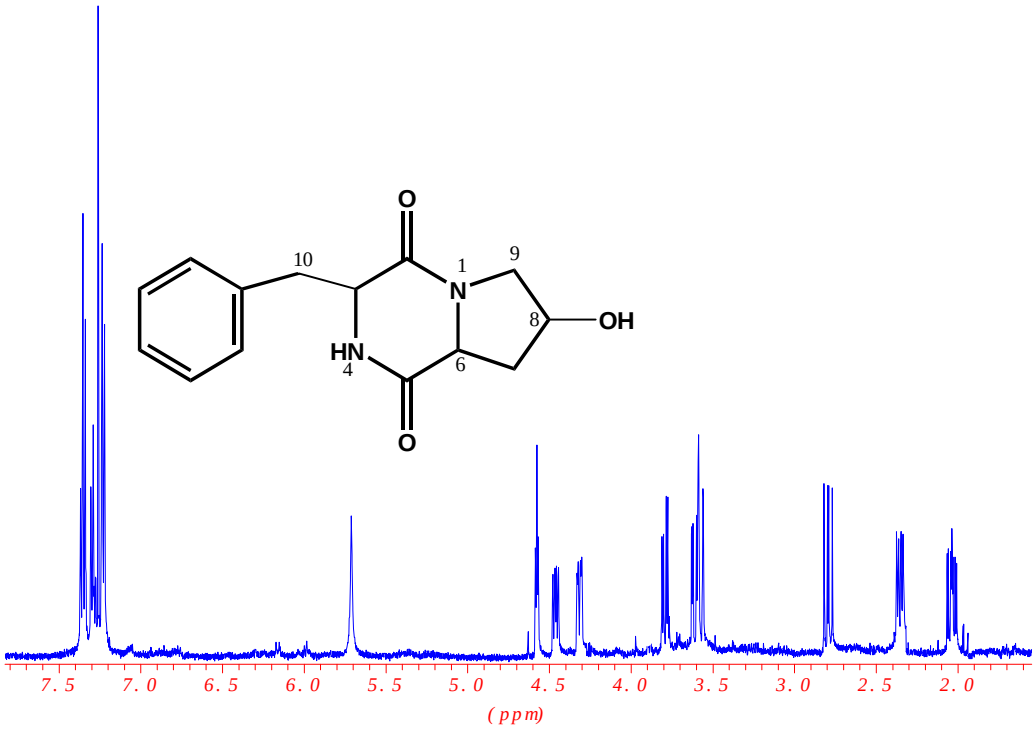


Figura 1. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **1**.

Dependiendo de si los aminoácidos componentes son L o D y que la Hyp sea cis o trans, existen diferentes posibilidades para una dicetopiperazina ciclo(Phe-Hyp). Se compararon entonces los datos espectroscópicos del compuesto **1** con diferentes ciclo(Phe-Hyp) descriptas en la literatura[4-6] y se concluyó que el mismo es ciclo(L-Phe-*trans*-L-Hyp) o su enantiómero. Se midió el poder rotatorio del compuesto **1** cuyo valor en metanol fue -9.0° mientras que el informado para la ciclo(L-fenilalanil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina) es -6.7°.

Por lo tanto se concluyó sobre la base de los datos espectroscópicos y del poder rotatorio que el compuesto **1** era ciclo (L-fenilalanil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina)[7].

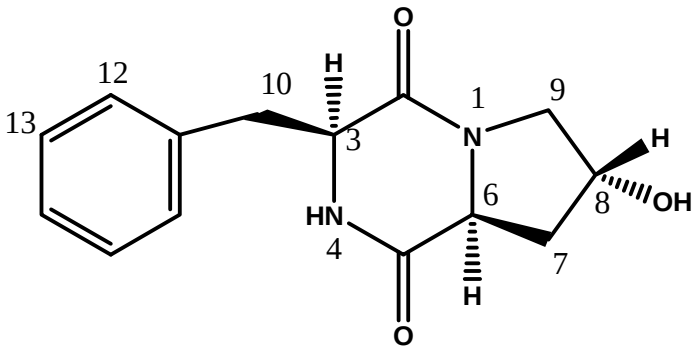


Figura 2. Compuesto **1**.

Compuesto 2

La fórmula molecular del compuesto **2** fue determinada como $C_{14}H_{17}N_2O_2$ por espectrometría de masa, utilizando ESI (*m/z* 245.1298 $[M+H]^+$). Se observó que difería solamente en un átomo de oxígeno respecto de la composición de **1**.

Los espectros de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C en $(CD_3)_2SO$ del compuesto **2** mostraron similitudes con los correspondientes al compuesto **1**, hecho que sumado al parecido en sus composiciones indicaría que se trataba de compuestos relacionados. Por lo tanto se propuso una dicetopiperazina como esqueleto estructural también en este caso.

En el espectro RMN-^{1}H ($(CD_3)_2SO$) del compuesto **2** (figuras 3 y 4) a diferencia de lo observado para el compuesto **1**, no se encontró la señal que correspondía al metino unido a un grupo hidroxilo (H-8, δ 4.58 ppm), en cambio se observó un multiplete a 1.73 ppm y las señales correspondientes a los hidrógenos de la prolina se vieron a desplazamientos químicos menores. Se vieron las mismas señales aromáticas características de fenilalanina. Estos datos sugerían la presencia de Phe y Pro. Además, en el espectro RMN-^{13}C DEPT135 se confirmaron las señales correspondientes a cuatro metilenos a δ 44.7, 35.5, 27.9 y 22.0 ppm, uno de la fenilalanina y los otros tres de la prolina.

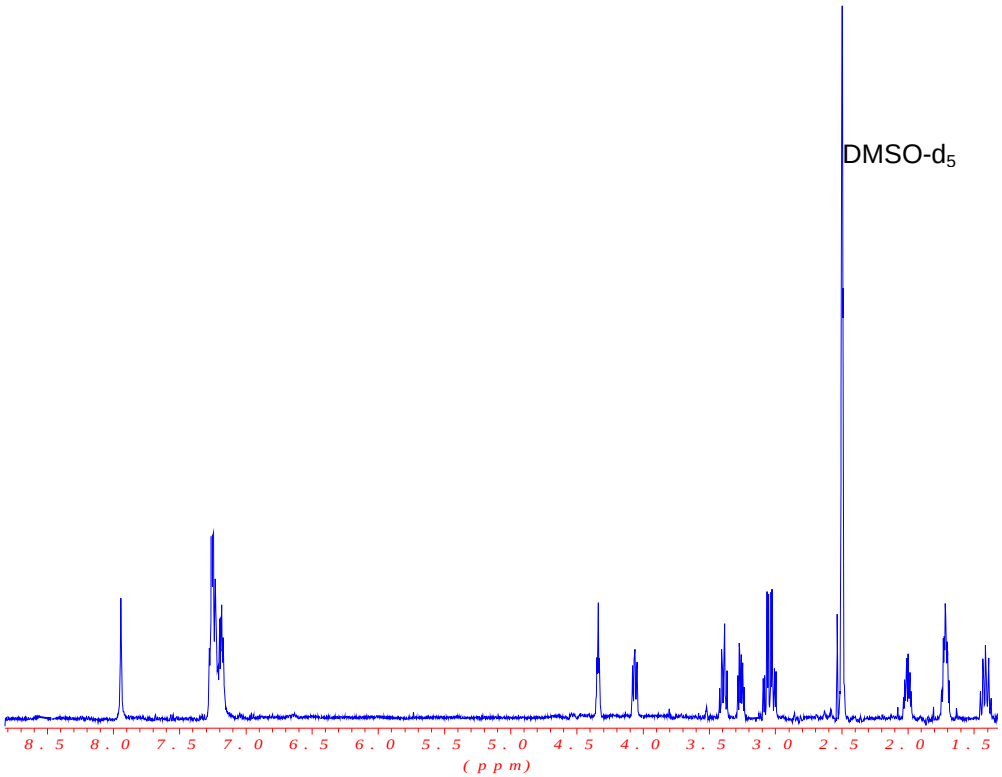


Figura 3. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **2**.

Para confirmar la configuración absoluta de los centros asimétricos, el compuesto **2** fue hidrolizado utilizando HCl 6N, dejándolo durante una noche a t. amb., obteniéndose así los aminoácidos correspondientes. Se llevó a cabo la derivatización de los mismos como *N*-pentafluoropropil ésteres de isopropilo para luego ser analizados por CG con una columna quiral Chirasil-Val. Los patrones utilizados fueron preparados por el mismo método, derivatizando los correspondientes aminoácidos comerciales. Comparando los tiempos de retención de los estándares con los obtenidos para los derivados del compuesto **2** se pudo confirmar la presencia de L-prolina (t_R estándar L-Pro 18.06 min, D-Pro 18.78 y t_R muestra 18.11 min) y de L-fenilalanina (t_R estándar L-Phe 29.4 min, D-Phe 25.3 min y t_R muestra 29.9 min).

Teniendo en cuenta los datos mencionados se identificó el compuesto **2** como ciclo (L-fenilalanil-L-prolina), cuyos datos espectroscópicos resultaron coincidentes con los de literatura[7,8], las pequeñas diferencias entre ambos conjuntos de datos se atribuyen a que el solvente utilizado fue distinto en cada caso. El poder rotatorio para el compuesto **2** en metanol resultó de -85°, mientras que el hallado en literatura para este compuesto es de -92°, medido en solución etanólica.

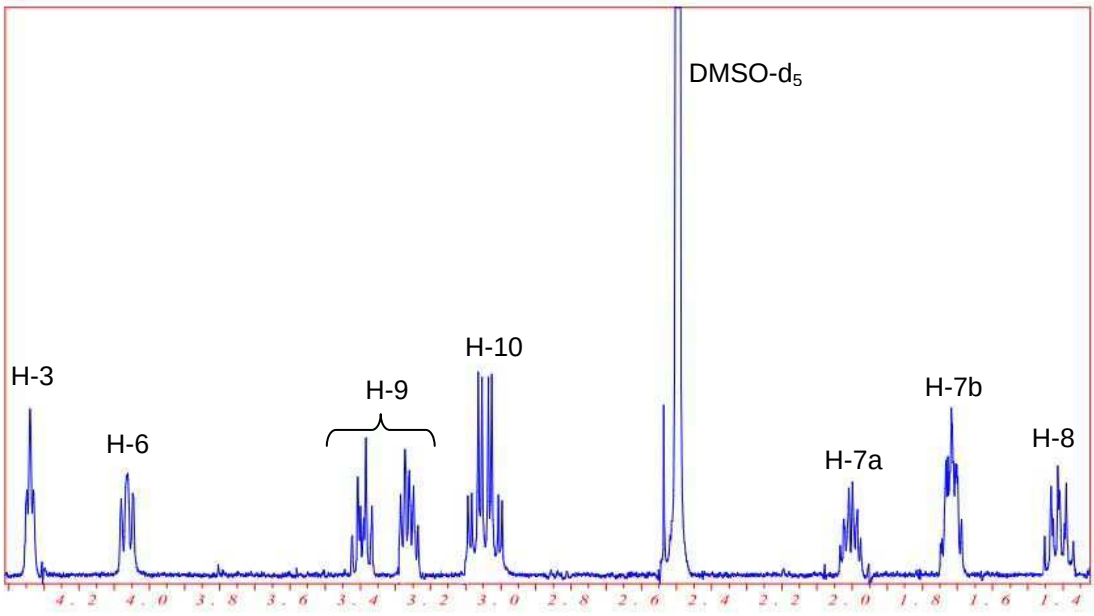


Figura 4. Ampliación del espectro RMN-^{1}H del compuesto **2**.

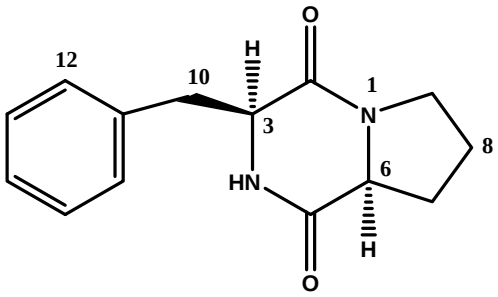


Figura 5. Estructura del compuesto **2**.

Compuesto 3

La fórmula molecular del compuesto **3** fue determinada como $C_{16}H_{23}N_4O_2$ por espectrometría de masa, utilizando ESI (*m/z* 303.1803 $[M+H]^+$).

En el espectro RMN-^{1}H ($(CD_3)_2SO$) del compuesto **3** (figura 6) se observaron siete singuletes y seis multipletes. Entre los singuletes tres eran anchos con desplazamientos químicos altos a δ 12.25, 11.85 y 8.25 ppm típicos de protones intercambiables, otros dos integraban para un hidrógeno cada uno con desplazamientos químicos a 7.80 y 6.68 ppm y los últimos a δ 3.90 (1H) y 1.41 (6H) señal característica

para dos metilos químicamente equivalentes sin hidrógenos en posición α. Entre los multipletes se observó un sistema característico de olefina terminal que consistía en dos dobletes a δ 5.07 y 5.04 ppm, con constantes de acoplamiento (*J*) de 10.5 y 17.3 Hz respectivamente y un doble doblete a δ 6.05 ppm (*J* = 17.3 y 10.5 Hz); las tres señales integraban para un hidrógeno cada una. Por otra parte se observó un multiplete a δ 2.15 ppm que integraba para un hidrógeno y dos dobletes que integraban para tres hidrógenos cada uno a δ 0.93 y 0.83 ppm respectivamente, señales que junto con el multiplete a δ 2.15 ppm indicarían la presencia de un residuo de isopropilo.

El compuesto **3** presentó 16 señales en su espectro RMN-^{13}C. Los desplazamientos químicos observados fueron los siguientes: 164.9 y 159.6 ppm que podrían indicar la presencia de amidas, 145.8 ppm, 136.5 ppm, 134.5 ppm, 131.8 ppm, 124.1 ppm, 112.0 ppm y 103.4 ppm en el rango de carbonos aromáticos y olefinas, y otras señales de desplazamientos químicos más bajos a δ 60.3, 37.6, 33.4, 28.1, 28.0, 18.3 y 16.8 ppm.

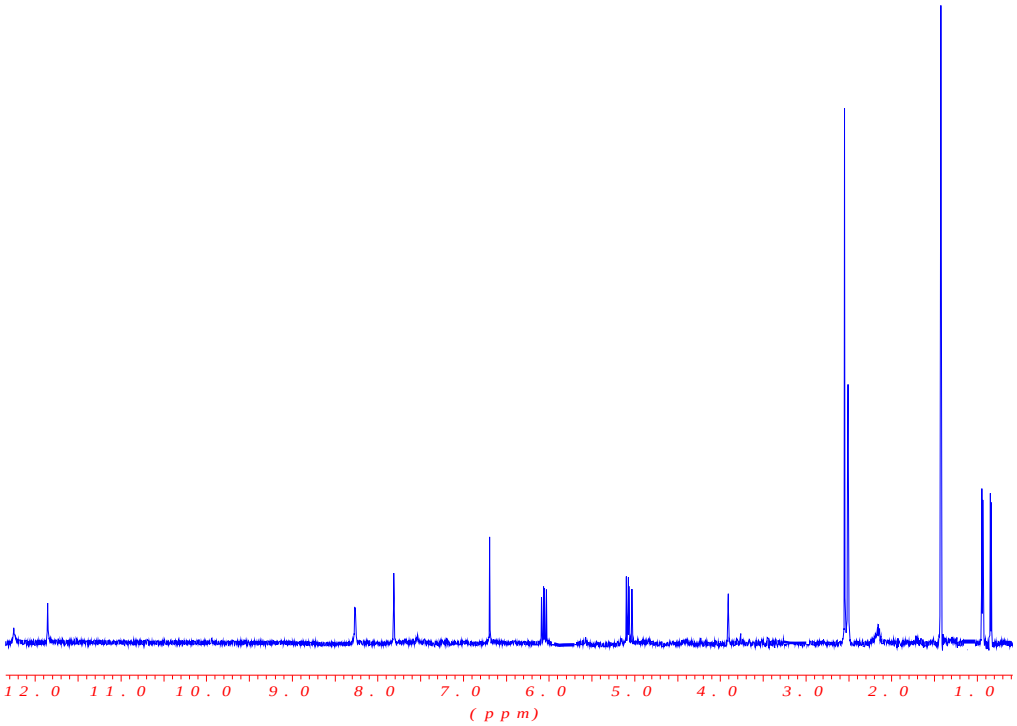


Figura 6. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **3**.

Teniendo en cuenta las dos señales en la zona de carbonilos de amidas, a δ 164.9 y 159.6 ppm y el hallazgo de las dicetopiperazinas **1** y **2** en el mismo extracto, se supuso

que **3** también podría ser una dicetopiperazina. A diferencia de las anteriores (compuestos **1** y **2**), la única señal en el rango de señales aromáticas que se observó en este caso fue el singulete a δ 7.80 ppm que integraba para un solo ^{1}H. El espectro HSQC (figura 7) reveló la correlación de esta señal con la señal de ^{13}C a δ 134.5 ppm y en el espectro HMBC (figura 8) se observó su correlación con las señales de 131.8 y 136.5 ppm. Esas dos señales correspondían a carbonos cuaternarios de baja intensidad y sin correlaciones por HSQC.

Los datos de los espectros COSY y HSQC permitieron confirmar la hipótesis de la estructura parcial de alqueno terminal; por un lado se encontró correlación en el espectro COSY entre las tres señales de hidrógenos, y por otro lado se observó que los dos dobletes a δ 5.07 y 5.04 ppm correlacionaban con la misma señal de ^{13}C a δ 112.0 ppm, y la correlación entre las señales a δ 6.05 ppm y δ 145.8 ppm en el HSQC. También se confirmó la presencia de un residuo de isopropilo ya que en el espectro COSY se observó la correlación de las señales a δ 0.93 y 0.83 ppm con la señal a δ 2.15 ppm. Por otra parte se encontró correlación entre las señales a δ 2.15 y 3.90 ppm, indicando la presencia de un metino unido al isopropilo. Los singuletes anchos a δ 12.25, 11.85 y 8.25 ppm no presentaron correlaciones en el espectro HSQC.

El espectro HSQC reveló además que el singulete a δ 6.68 ppm correlacionaba con la señal a δ 103.4 ppm, lo que indicaría que un alqueno trisustituído formaba parte de la estructura. Se encontró además en el espectro HMBC que la señal a de –N*H* a δ 11.85 ppm correlacionaba con las señales a δ 159.6 y 60.3 ppm, y que la señal a δ 6.68 ppm correlacionaba con la señal a δ 159.6 ppm también, lo que condujo a proponer una dicetopiperazina α,β-insaturada.

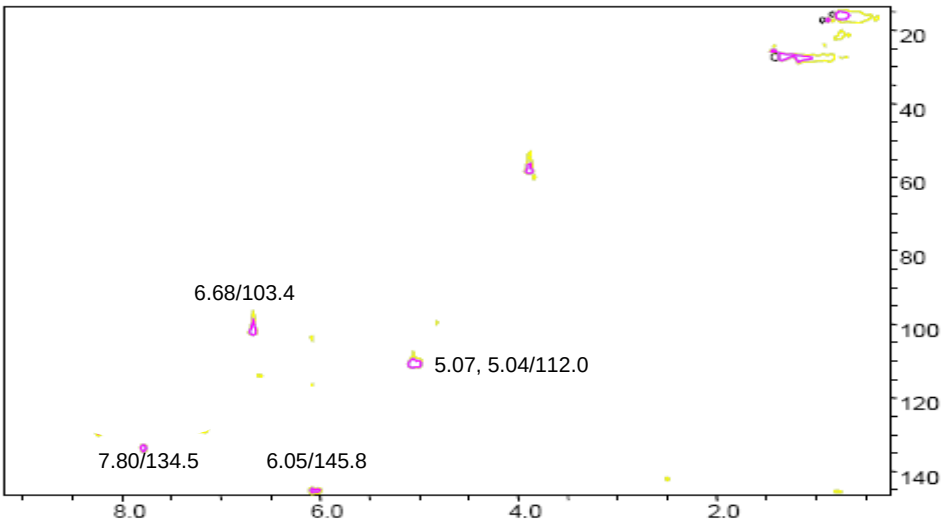


Figura 7. Espectro HSQC del compuesto **3**.

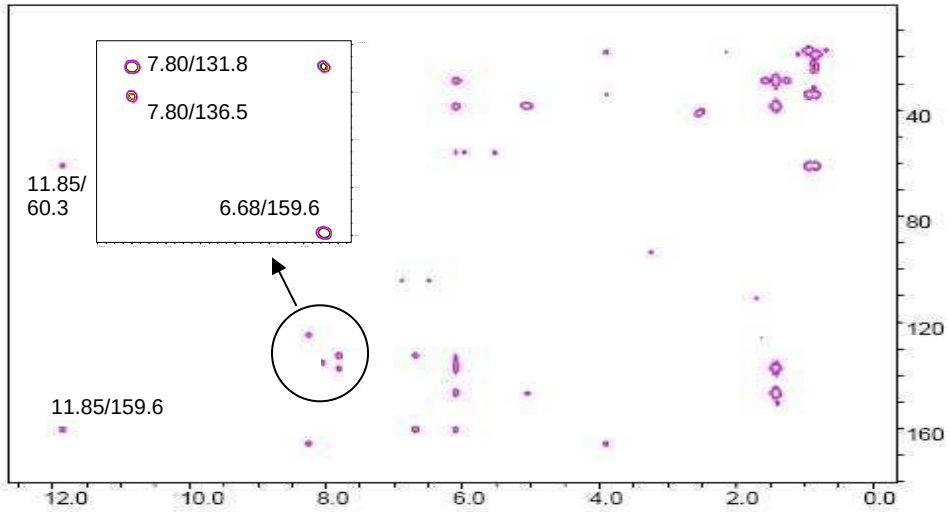


Figura 8. Espectro HMBC del compuesto **3**.

En la figura 9 se muestran estructuras parciales propuestas para el compuesto **3**.

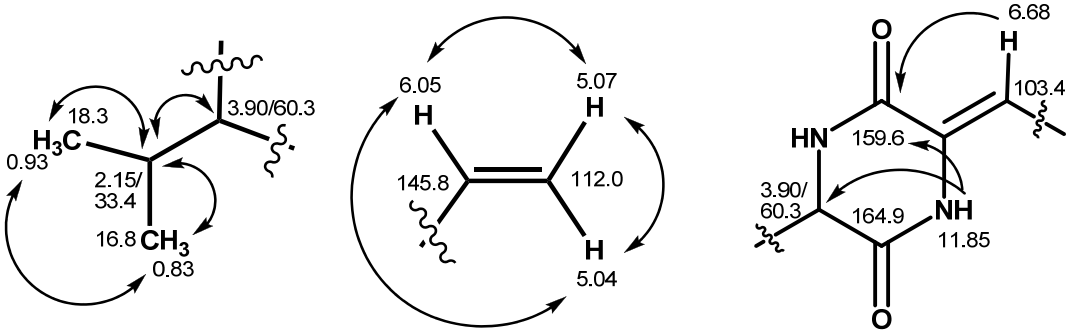


Figura 9. Estructuras parciales correspondientes al compuesto **3** y algunas correlaciones obtenidas vía COSY (↔) y HMBC (→).

Teniendo en cuenta los fragmentos elucidados de la molécula y con la ayuda de la base de datos Antibase 2000[9] se concluyó que el compuesto **3** hallado correspondía al metabolito conocido como aurantiamina[10] (figura 10). Esta estructura era consistente con el resto de las correlaciones observadas por HMBC.

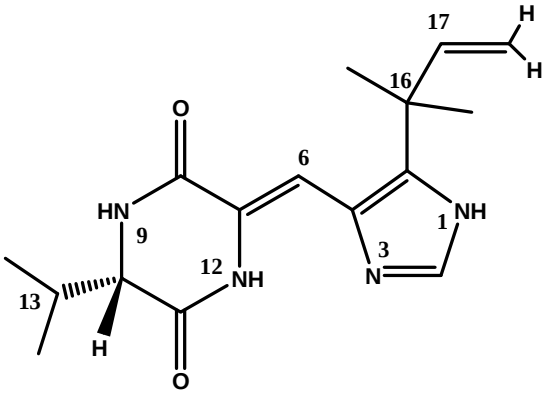


Figura 10. Estructura del compuesto **3**.

Además, los datos espectroscópicos coincidieron con los de literatura[10]; el poder rotatorio medido en metanol resultó -80° (c = 0.13) mientras que el informado es -116° (c = 0.5) o -95° (c = 0.1)[11], la diferencia puede explicarse por la baja concentración en el primer caso donde el error de la medición es mayor.

Compuesto 4

La fórmula molecular del compuesto **4** fue determinada como $C_{22}H_{25}NO_8$ por espectrometría de masa, utilizando la técnica de ionización ESI (*m/z* 454.1468 $[M+Na]^+$).

El espectro RMN-^{1}H ($(CD_3)_2SO$) del compuesto **4** (figura 11) mostró una señal a δ 9.94 ppm y tres multipletes en la región aromática, a δ 8.25, 7.68 y 7.53 ppm. La relación 2:1:2 en la integración de esas tres señales y sus multiplicidades doblete, triplete, triplete, indicaban la presencia de un anillo bencénico monosustituído con un sustituyente atractor de electrones. Se observó un doblete a δ 6.23 ppm y dos singuletes anchos con desplazamientos 5.75 y 4.88 ppm, señales características de hidrógenos intercambiables. Además, el espectro reveló dos multipletes superpuestos a δ 5.44 y 5.37 ppm, tres multipletes con desplazamientos 4.45, 4.40 y 4.33 ppm, dos singuletes

que integraban para tres hidrógenos cada uno, a δ 3.23 y 1.63 ppm, asignándose el primero a un grupo metoxilo por su desplazamiento. Y se observaron un multiplete entre 1.96-2.07 ppm que integraba para dos hidrógenos y un triplete a δ 0.89 ppm que integraba para tres hidrógenos. Las últimas dos señales sugerirían la presencia de un grupo etilo.

Las tres señales a δ 4.45, 4.40 y 4.33 ppm que integraban para un hidrógeno cada uno, sumado a las señales de protones intercambiables encontradas indujeron a proponer tres metinos hidroxilados en la estructura química de **4**.

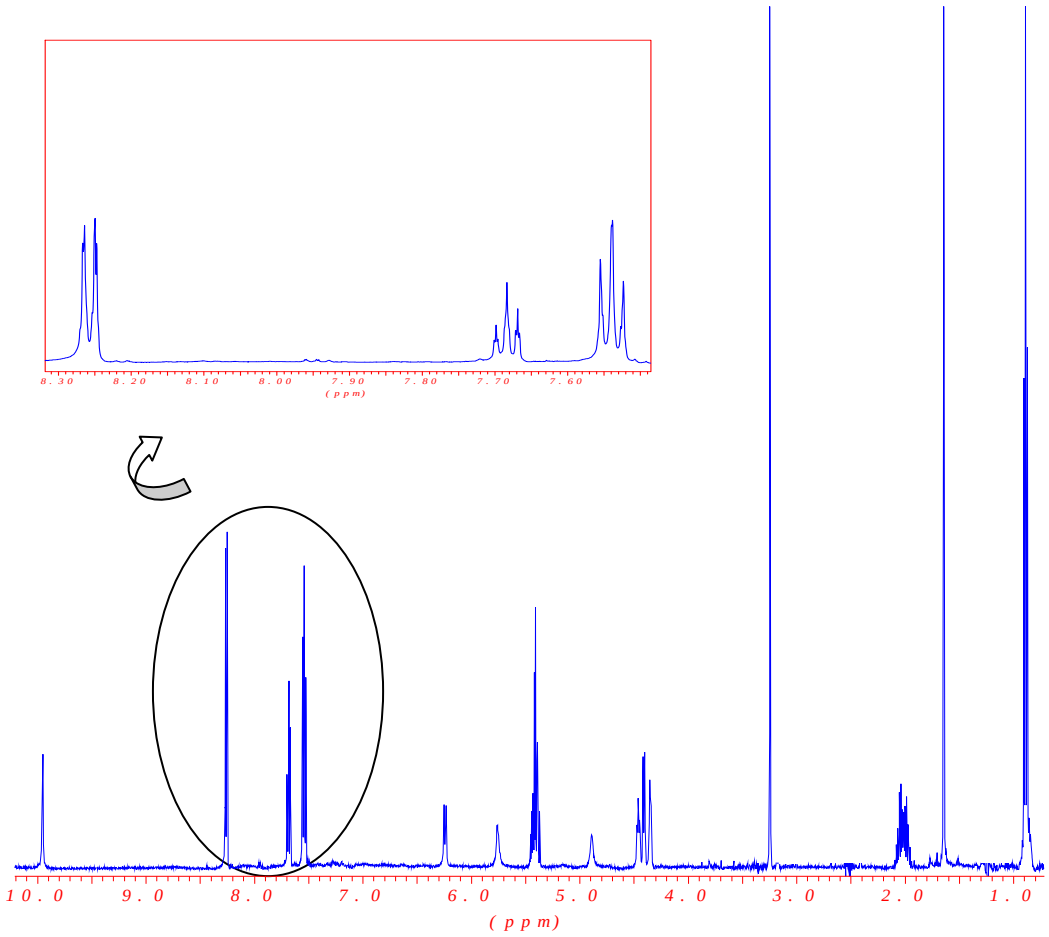


Figura 11. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **4**.

En el espectro RMN-^{13}C ($(CD_3)_2SO$) del compuesto **4** se observaron tres señales a δ 196.9, 196.7 y 187.1 ppm que, de acuerdo con los desplazamientos químicos, eran indicativas de la presencia de carbonilos de cetonas α,β-insaturadas en el caso de las dos

primeras señales. Se observó una señal a δ 166.7 ppm típica de carbonilo de amida; se observaron señales a δ 134.7, 134.1, 132.3, 130.7, 129.4, 128.8 y 111.9 ppm en la región de carbonos aromáticos y olefinas, y señales con desplazamientos típicos de carbono unido a uno o más heteroátomos a δ 92.7, 91.3, 75.1, 72.1, 68.4 y 51.9 ppm. Finalmente se observaron señales a δ 21.0, 14.4 y 6.0 ppm.

Mediante el análisis del espectro COSY (figuras 12 y 13) fue posible proponer estructuras parciales de la molécula. Se encontró correlación entre las señales a δ 5.44 y 5.37 ppm, entre la última y el multiplete a δ 1.96-2.07 ppm (2H), el que a su vez mostró correlación con el triplete a δ 0.89 ppm (3H), esto sugería la presencia de etilo unido a un doble enlace (figura 14).

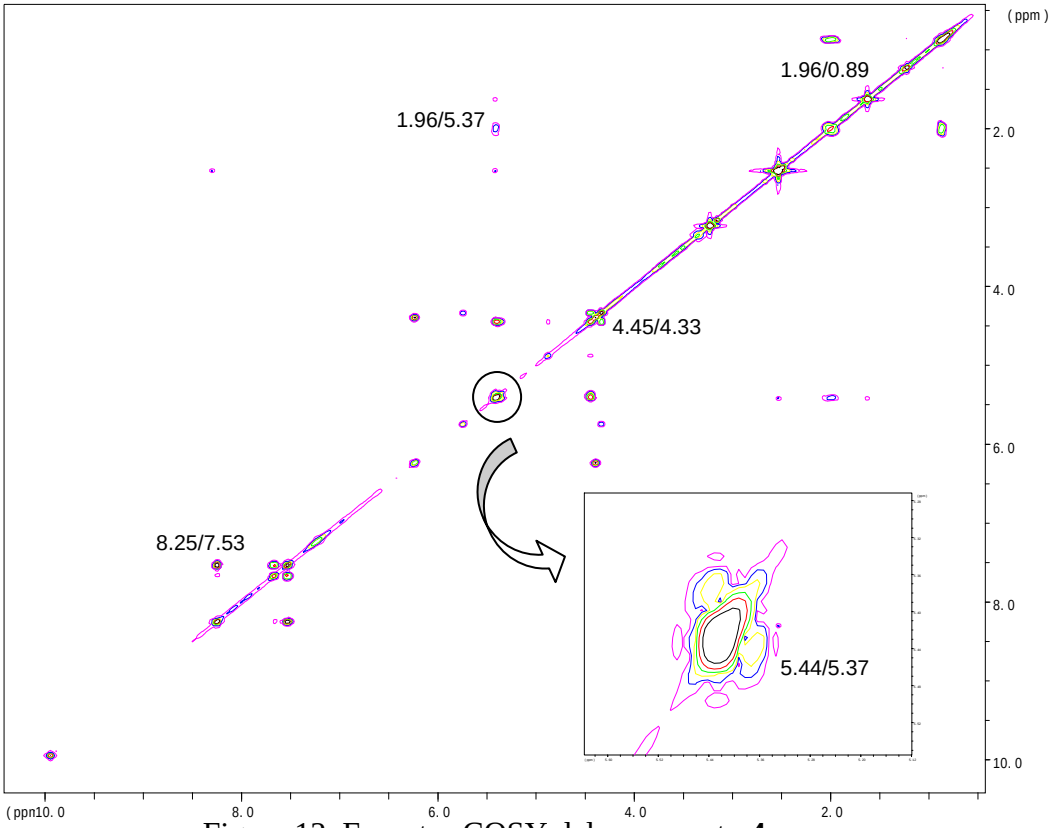


Figura 12. Espectro COSY del compuesto **4**.

Además se encontraron correlaciones entre las señales de los protones de los metinos hidroxilados 4.45 y 4.33 ppm, y de la señal a δ 4.45 con las señales del protón intercambiable a δ 4.88 ppm y el protón de la olefina a δ 5.37 ppm. También se encontró una correlación entre la señal del protón intercambiable a δ 5.75 ppm y el

protón a 4.33 ppm (figura 13). Estas correlaciones permitieron conectar los dos metinos hidroxilados entre sí y con la olefina (figura 14).

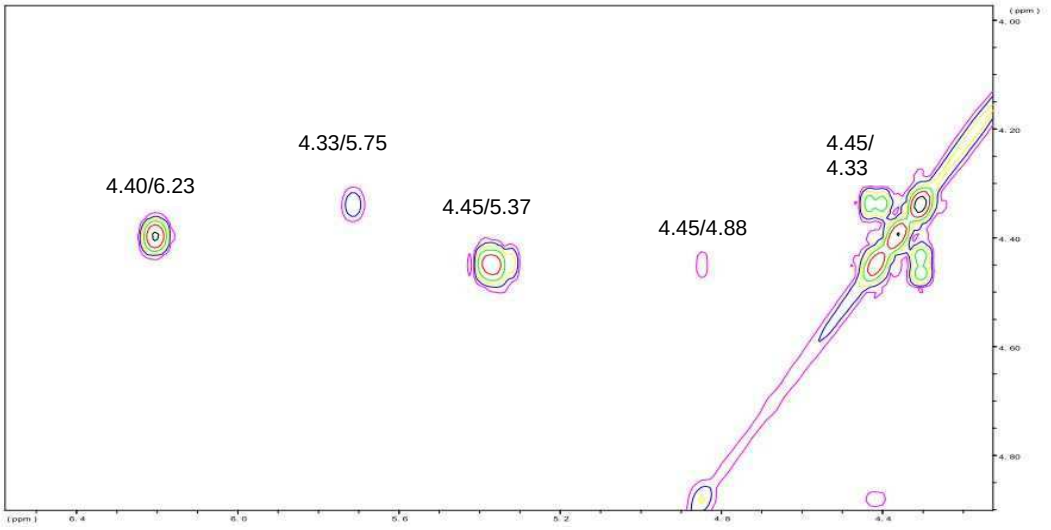


Figura 13. Ampliación del espectro COSY del compuesto **4**.

La información aportada por el espectro HSQC permitió encontrar correlaciones entre las señales de ^{1}H a 8.25, 7.68 y 7.53 ppm y las de ^{13}C a 130.7, 134.7 y 128.8 ppm respectivamente, que confirmaron la hipótesis de sistema aromático monosustituído.

En el espectro HMBC se observó una correlación entre la señal de carbonilo de cetona a δ 196.9 ppm y el singulete con desplazamiento 1.63 ppm en ^{1}H correspondiente a un metilo. Debido a la correlación que mostró esa señal de ^{1}H con las señales a δ 111.9 y 187.1 ppm se dedujo que la última señal correspondería a C de olefina y entonces el metilo estaba unido a un doble enlace de una cetona α,β-insaturada. El desplazamiento de 187.1 ppm se justificaría por la unión del carbono de la olefina a oxígeno. Los residuos propuestos se muestran en la figura 14.

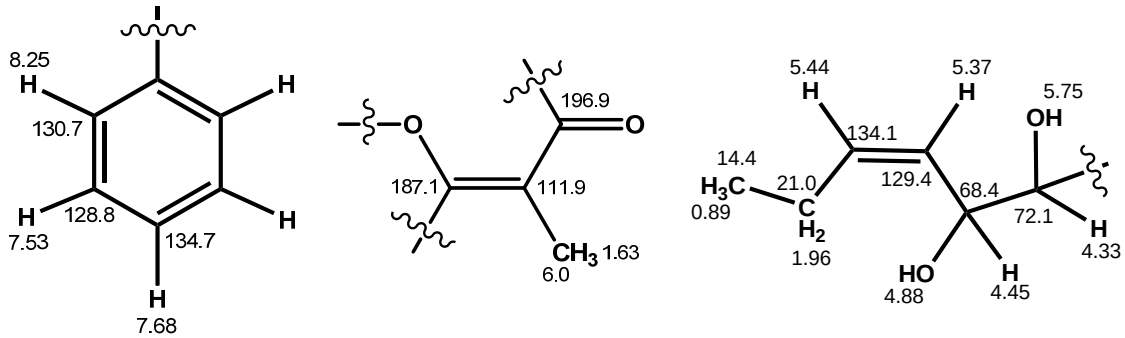


Figura 14. Estructuras parciales propuestas para el compuesto **4** y las señales correspondientes observadas en los espectros de RMN-^{1}H y ^{13}C.

Teniendo en cuenta los fragmentos elucidados de la molécula y con la ayuda de la base de datos Antibase 2000[9] se propuso la estructura de la figura 15, determinando así que el compuesto **4** hallado corresponde al metabolito conocido como pseurotina. Debido a la alta coincidencia entre los datos espectroscópicos del compuesto **4** y los informados para la pseurotina A[12-15] y la no coincidencia con las otras pseurotinas conocidas se asignó al compuesto **4** la estereoquímica correspondiente a ese metabolito aunque no se confirmó por otros métodos.

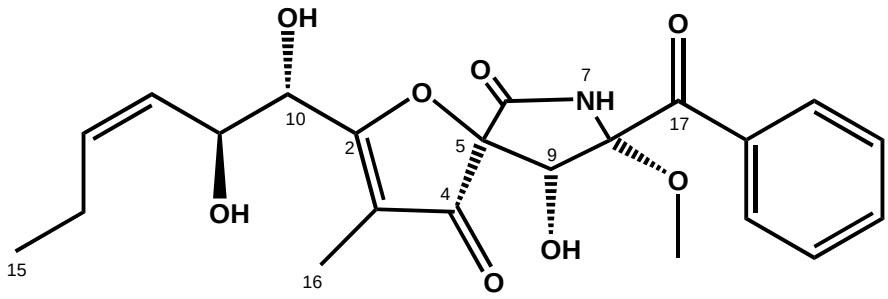


Figura 15. Pseurotina A.

Compuesto 5

La fórmula molecular del compuesto **5** fue determinada como $C_{28}H_{38}N_4O_6$ por espectrometría de masa, utilizando una probe dual ESI/APCI (*m/z* 527.2857 $[M+H]^+$).

El compuesto **5** presentó en su espectro de RMN-^{1}H en $(CD_3)_2SO$ dos dobletes anchos a δ 8.31 y 8.25 ppm, un singulete ancho a δ 7.58 ppm correspondientes a ^{1}H intercambiables, y una señal compleja entre 7.19 y 7.29 ppm que integraba para 5 H, que era indicativa de la presencia de benceno monosustituído. Se observó además un par de dobletes característicos que presentan las señales de anillo aromático *para*-disustituído, con desplazamientos químicos de 6.94 y 6.59 ppm (J = 8.3 Hz); el valor relativamente bajo de los desplazamientos químicos de estas señales sugería la presencia de un grupo –OH como uno de los sustituyentes.

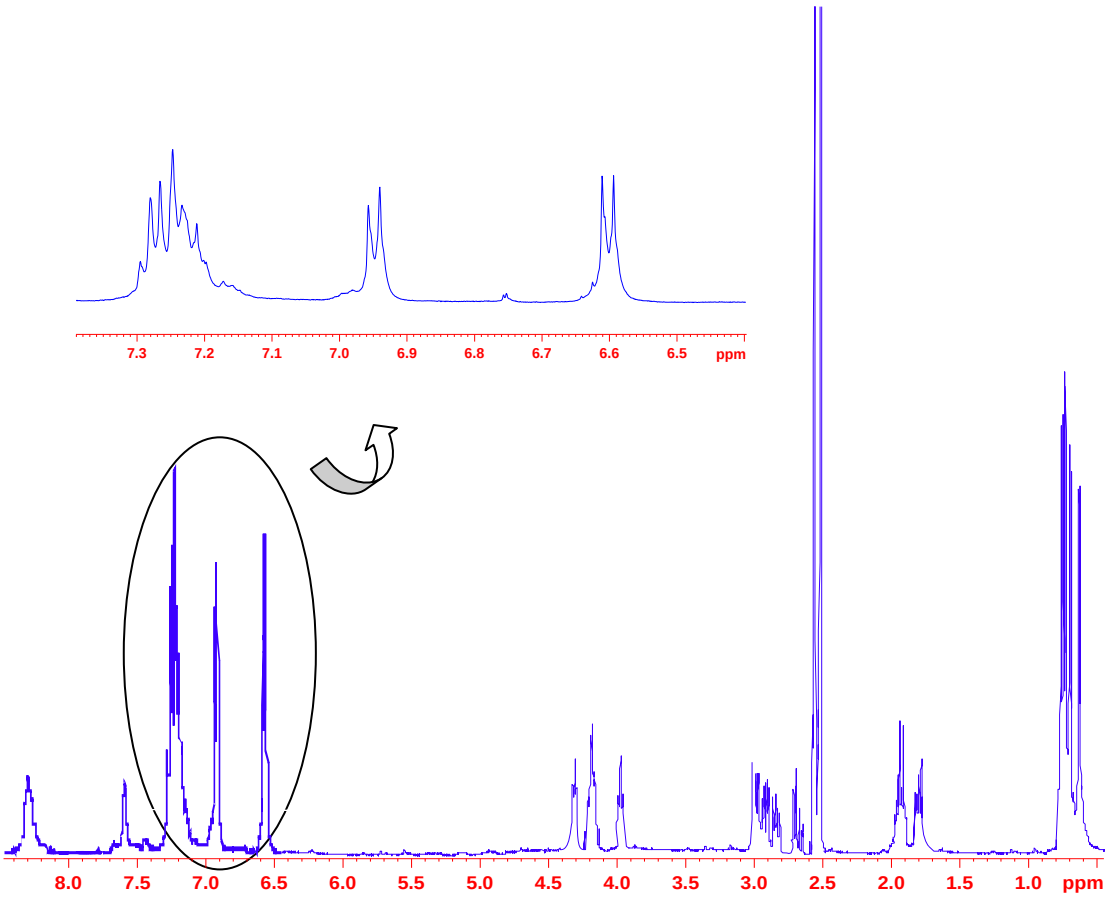


Figura 16. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **5**.

La presencia de cuatro multipletes, uno a δ 4.25 ppm, dos de ellos superpuestos a δ 4.12-4.17 ppm, y el último a δ 3.89 ppm, con integración 1:2:1 respectivamente, condujeron a proponer la presencia de cuatro aminoácidos, asignándose estas señales a los metinos α de cada uno. Se observaron además cuatro dobles dobletes a δ 2.95, 2.89, 2.79 y 2.69 ppm, dos multipletes que integraban para un hidrógeno cada uno, a δ 1.91-1.96 y 1.71-1.78 ppm, y finalmente cuatro dobletes a δ 0.73, 0.71, 0.68 y 0.57 ppm que integraban para tres hidrógenos cada uno. Las últimas señales podían corresponder a dos subunidades de isopropilo.

En el espectro RMN-^{13}C del compuesto **5** pudieron observarse 24 señales, cuatro de las cuales se encontraban en la región característica de carbonilos, a δ 173.5, 171.3, 170.7 y 169.9 ppm. Entre las señales aromáticas se encontró una muy desplazada a δ 155.8 ppm, una señal de muy baja intensidad a δ 136.6 ppm, cuatro señales intensas a δ 130.2, 129.5, 128.5 y 114.9 ppm, correspondiendo cada una a dos carbonos

químicamente equivalentes. Se observó además una señal a δ 128.6 ppm y una señal a δ 126.8 ppm.

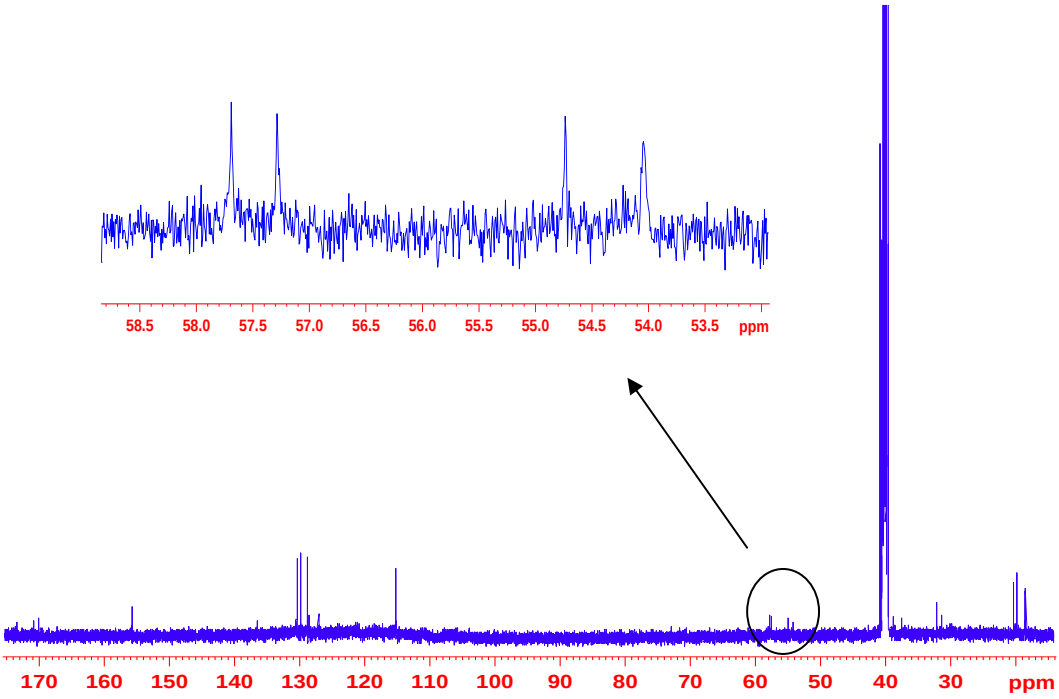


Figura 17. Espectro RMN-^{13}C del compuesto **5**.

La presencia de cuatro señales de baja intensidad a δ 57.7, 57.3, 54.8 y 54.1 ppm concordaba con la hipótesis de una naturaleza de tetrapéptido para este compuesto. Se encontraron también señales a δ 38.8, 37.0, 30.6, 28.9, 19.8, 19.2, 18.1 y 17.9 ppm

El análisis del experimento COSY (figura 18) permitió evidenciar la presencia de dos residuos de isopropilo como se había sospechado por las señales del espectro protónico, ya que se observaron correlaciones entre las señales de metilos a δ 0.71 y 0.57 ppm con el multiplete a δ 1.71-1.78 ppm, y entre las señales de metilos a δ 0.73 y 0.68 ppm con el multiplete a δ 1.91-1.96 ppm. También se observó correlación entre los dobletes a δ 6.94 y 6.59 ppm, corroborándose así la presencia de benceno *para*-disustituído, y se observaron correlaciones entre las señales a δ 7.24, 7.26 ppm y entre esta última y la señal a δ 7.21 ppm, resultando así confirmada la estructura parcial de anillo aromático monosustituído. En consecuencia se propuso que el tetrapéptido contenía dos residuos de valina, uno de fenilalanina y uno de tirosina ya que estos son los aminoácidos que contienen en su estructura un grupo isopropilo, benceno

monosustituído y *para*-disustituído respectivamente. El resto de las correlaciones permitieron asignar los ^{1}H de cada uno de los aminoácidos presentes en **5**.

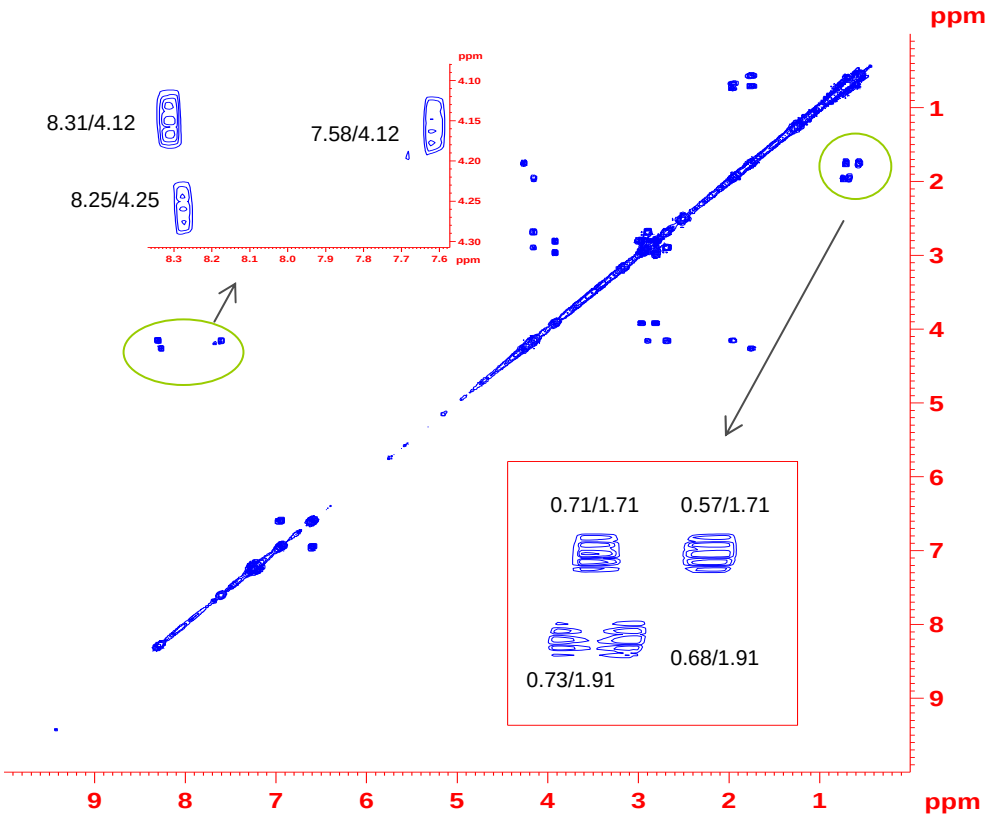


Figura 18. Espectro COSY del compuesto **5**.

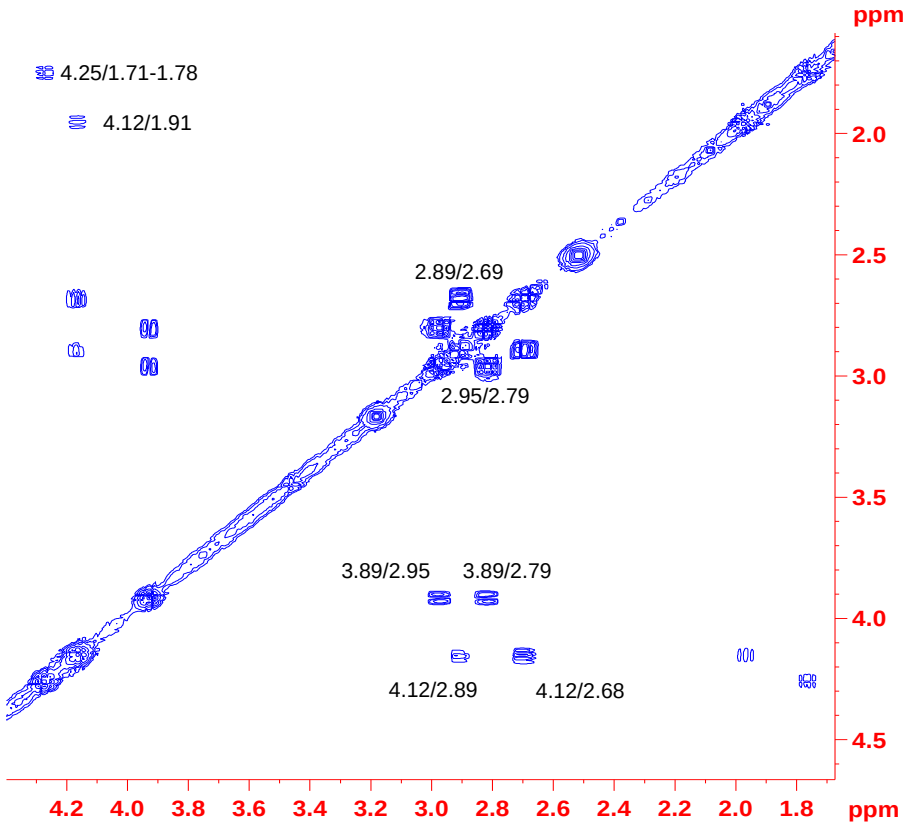


Figura 19. Ampliación del espectro COSY del compuesto **5**.

La información que brindaron los experimentos HSQC y HMBC permitió la asignación completa de los cuatro aminoácidos constituyentes. En el espectro HSQC se observó correlación entre los dobles dobletes a δ 2.95 y 2.79 ppm y la señal a δ 38.8 ppm, y se obsevó que las señales a δ 2.89 y 2.69 ppm correlacionaban con la señal a δ 37.0 ppm. Con las observaciones realizadas en el espectro HMBC (figuras 20 y 21) fue posible asignar el primer metileno a la molécula de fenilalanina y el segundo a la de tirosina, dado que se observó correlación entre las señales a δ δ 7.21-7.27 y 38.8 ppm por una parte, y entre la señal a δ 6.94 ppm y δ 37.0 ppm por otra parte.

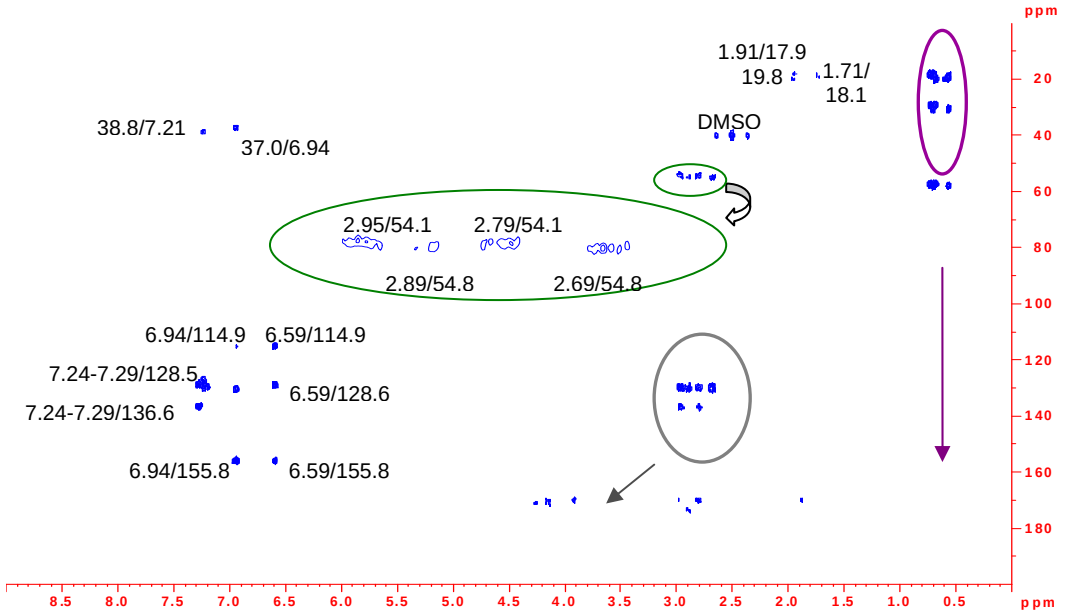


Figura 20. Espectro HMBC del compuesto **5**.

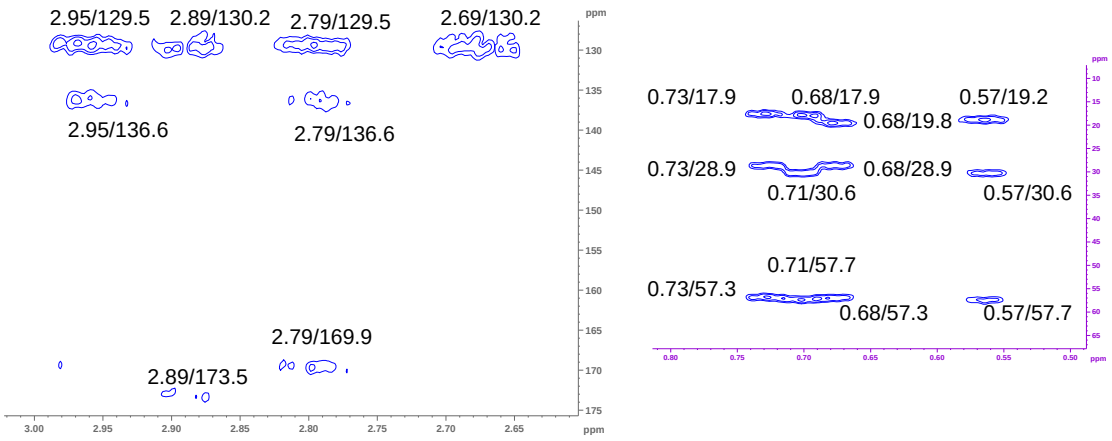


Figura 21. Ampliaciones del espectro HMBC del compuesto **5**.

A continuación se muestran las estructuras parciales de los aminoácidos que constituyen el compuesto **5** con las correspondientes asignaciones de ^{1}H y ^{13}C obtenidas según los datos espectroscópicos analizados.

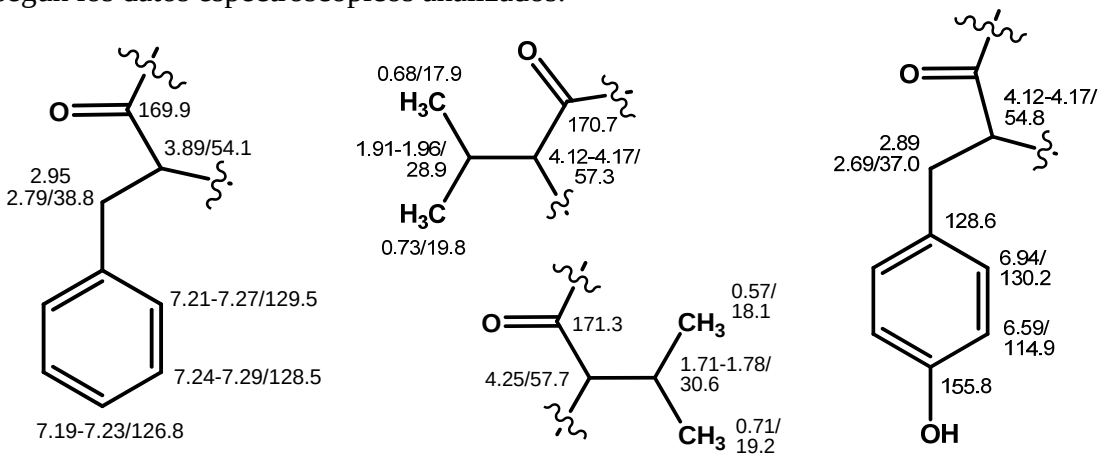


Figura 22. Estructuras parciales de los aminoácidos del compuesto **5** (asignaciones $^{1}H/^{13}C$).

Para determinar la secuencia de aminoácidos en el péptido se utilizó espectrometría de masa tandem (ESI-MS/MS). El espectro ESI-MS/MS del ión $[M+H]^+$ como precursor, mostró picos para los iones producto a *m/z* 247.1, 219.1 y 281.1 como iones mayoritarios, y *m/z* 182.1 y 120.1 para iones minoritarios. Los iones mayoritarios de *m/z* 247.1 y 219.1 se asignaron a residuos b_2 y a_2 de fenilalanina-valina y se dedujo que los tres iones restantes correspondían a residuos valina-tirosina (y_2), tirosina (y_1) y el ión imonio de la fenilalanina, a partir de lo cual se desprendió la secuencia Phe-Val-Val-Tyr (figura 23). Los iones fragmento fueron nombrados de acuerdo con la nomenclatura de Roepstorff y Biemann[16,17].

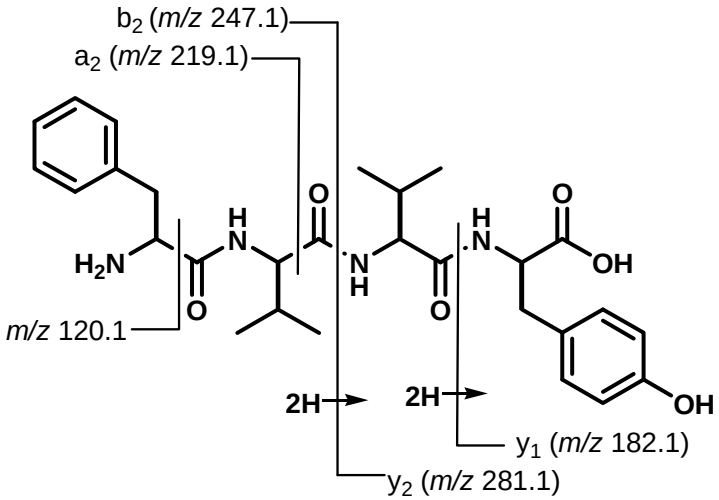


Figura 23. Iones observados en el espectro ESI-MS/MS del compuesto **5**.

La secuencia se confirmó mediante un experimento ROESY (figuras 24 y 25) en el cual se observó la correlación entre el H α de la valina$_1$ a δ 4.25 ppm y el N*H* de la valina$_2$ a δ 8.31 ppm entre otros. En la figura 26 se muestran algunas correlaciones NOE que se observaron para el compuesto.

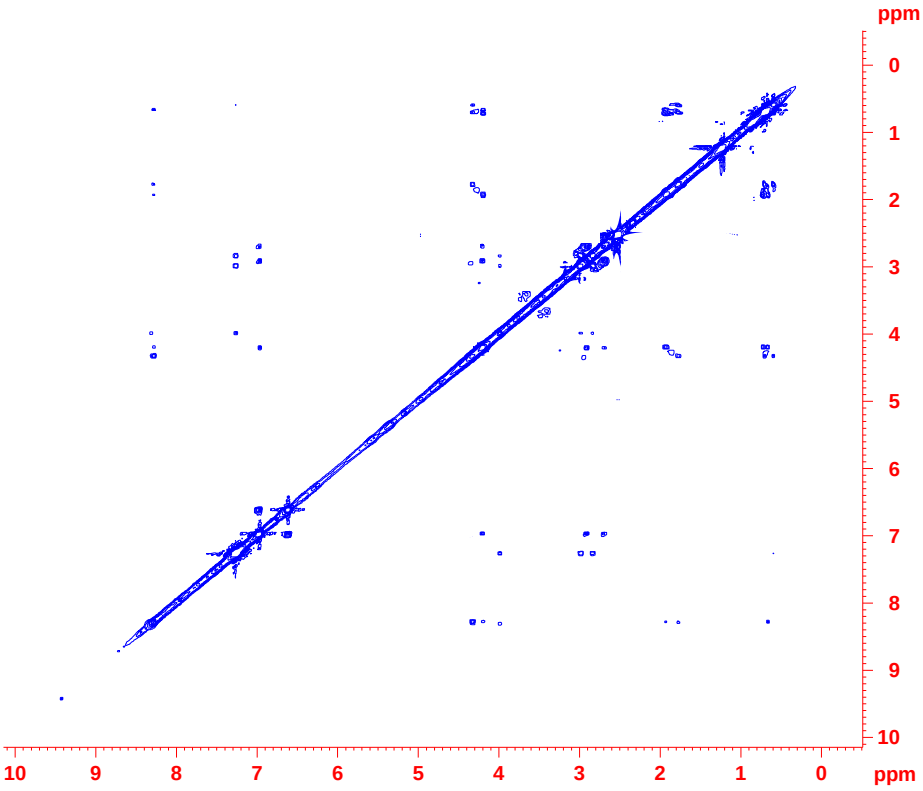


Figura 24. Espectro ROESY del compuesto **5**.

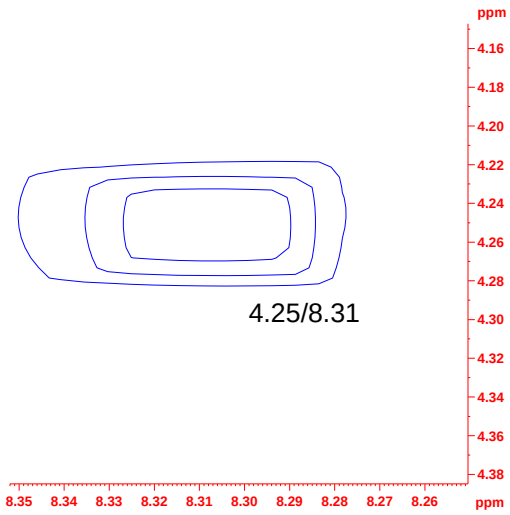


Figura 25. Ampliación del espectro ROESY del compuesto **5**.

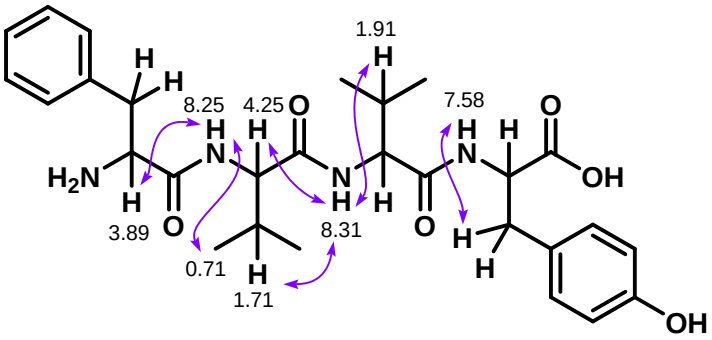


Figura 26. Correlaciones NOE para **5**.

Para determinar la configuración absoluta de los aminoácidos componentes, el compuesto **5** fue hidrolizado análogamente a lo realizado con el compuesto **2**, obteniéndose así los aminoácidos correspondientes. Se llevó a cabo la derivatización de los mismos como *N*-pentafluoroacetil ésteres de isopropilo que luego se analizaron por CG, con una columna quiral Chirasil-Val. Se prepararon patrones por el mismo método, derivatizando los correspondientes aminoácidos comerciales. Se compararon los tiempos de retención de los estándares con los obtenidos para los derivados del compuesto **5**, siendo posible determinar así su configuración absoluta (tabla 1). A modo de confirmación se realizaron co-inyecciones.

Derivado	**t_R(min)**
D-Phe	25.3
L-Phe	29.4
D-Tyr	29.8
L-Tyr	33.9
D-Val	11.0
L-Val	11.4
5 - 1	11.0
5 - 2	11.4
5 - 3	25.3
5 - 4	33.9

Tabla 1. Tiempos de retención de los derivados *N*-pentafluoroacetil ésteres de isopropilo de los aminoácidos componentes del compuesto **5** (**5**-1 a **5**-4) y de los patrones correspondientes.

Se observaron picos correspondientes a los derivados de los aminoácidos D-Fenilalanina, L- y D-Valina y L-Tirosina. Esto dió lugar a dos secuencias posibles: D-Phe-D-Val-L-Val-L-Tyr (**6**) y D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr (**7**). Para determinar cuál de ellas era la correspondiente al compuesto **5** se enviaron a sintetizar y los espectros de los péptidos sintéticos se compararon con los correspondientes al compuesto **5**. Los datos

coincidieron fehacientemente con los obtenidos para **7**, por lo tanto el compuesto **5** es D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr (tabla 6, página 62).

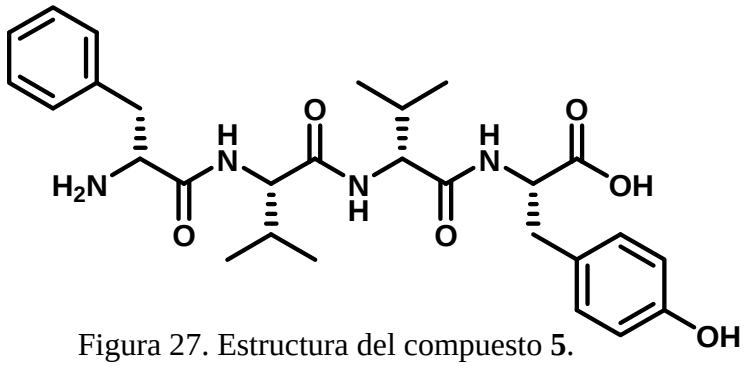


Figura 27. Estructura del compuesto **5**.

Este compuesto no había sido informado previamente

Actividad biológica

Se llevaron a cabo ensayos de actividad biológica antimicrobiana con los metabolitos aislados. Se probó la actividad antifúngica frente a varios hongos fitopatógenos de distintos cultivos y la actividad antibacteriana contra *E. coli, S. aureus* y *B. subtilis*. Se encontró que los compuestos **1** a **3** y **5** resultaron activos y fueron los responsables de la bioactividad que presentó el extracto. Los compuestos **1** y **5** presentaron actividad antibiótica y los compuestos **2**, **3** y **5** actividad antifúngica.

El compuesto **5** resultó activo frente a *Bacillus subtilis* exhibiendo un halo de inhibición de 20 mm de diámetro, mientras que el compuesto **1** presentó un halo de 16 mm frente a *Staphylococcus aureus*. Se utilizó como testigo gentamicina, un antibiótico de amplio espectro, el cual presentó halos de 30 mm de diámetro. Todos los ensayos fueron realizados a 50 µg/disco.

El compuesto **5** resultó activo frente a *Fusarium virguliforme*, patógeno responsable del síndrome de muerte súbita en soja, presentando un halo de 20 mm de diámetro, mientras que benomyl, un antifúngico comercial, exhibió un halo de 30 mm de diámetro, ambos en una concentración de 25 µg/pt. Los compuestos **2** y **3** (50 µg/pt)

mostraron actividad moderada frente a los hongos fitopatógenos *Colletotrichum truncatum* y *Fusarium lateritium*, con halos de 8 y 12 mm de diámetro respectivamente.

El péptido sintético **7** presentó los mismos resultados de actividad que el compuesto **5** en los ensayos de actividad antifúngica y el péptido sintético **6** resultó inactivo en todos los bioensayos realizados.

Dado que el compuesto **5** presentó buena actividad frente a *Fusarium virguliforme*, se determinó la concentración mínima de inhibición (MIC) para el mismo mediante el método de bioautografía en cromatoplacas de sílica-gel[18]. La concentración mínima de inhibición obtenida fue de 9.5×10^{-3} µmol. Se utilizó como testigo benomyl cuya concentración mínima de inhibición fue de 1.7×10^{-3} µmol.

Los compuestos **1** y **2** fueron informados como productos naturales con propiedades antifúngicas y bactericidas con anterioridad, en ensayos se realizados con diferentes especies a las utilizadas en este trabajo. Entre los microorganismos sensibles a estos compuestos se pueden mencionar *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium roqueforti*, *Candida albicans* y *Lactobacillus plantarum*[7]. Existen evidencias de que la función principal de estas dicetopiperazinas estaría relacionada a actividades de *quorum sensing*[8]. Por otra parte, se ha informado que la dicetopiperazina **2** ciclo (Phe-Pro) actuaría como inhibidor del crecimiento de células cancerosas e induciría apoptosis en células HT-29 de cáncer de colon[19].

El compuesto **3** se ha informado como inhibidor de la respiración mitocondrial[20] y potencial agente antitumoral[21], sin embargo no se conoce su función biológica aún. No se han encontrado estudios sobre actividad antimicrobiana de este compuesto.

Cabe mencionar que el compuesto **4** se ha informado como agente antibiótico y antifúngico con actividad moderada frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo las especies más susceptibles *Bacilus cereus* y *Shigella shiga*[22], no ensayadas en este trabajo. Entre las actividades biológicas de **4** también se cuentan la inhibición de producción de inmunoglobulina E[23] y actividad antiviral frente a *Herpes simplex*[14].

Biosíntesis

Las dicetopiperazinas constituyen una familia numerosa de compuestos que se han aislado en numerosas ocasiones de diversas fuentes[24-28]. Debido a su origen biosintético a partir de dos aminoácidos, las dicetopiperazinas más abundantes en la naturaleza presentan generalmente configuración *cis* debido a que los aminoácidos L son más abundantes[29].

A pesar del vasto número de dicetopiperazinas naturales aisladas y de que el camino biosintético de esta clase de compuestos ha sido explorado, su origen aún permanece incierto. En general, las dicetopiperazinas parecen producirse por tres caminos diferentes, de acuerdo a las rutas que se han descripto. El primero estudiado en bacterias y hongos (por ejemplo en *Claviceps purpurea*) es no ribosomal y la formación del producto es catalizada por un complejo enzimático multimodular denominado NRP sintasa (NRPS)[30-32]. La caracterización molecular de los genes de NRPS ha revelado que cada módulo con su línea de ensamblaje biosintético es responsable del reconocimiento, la activación e incorporación de ciertos aminoácidos en el péptido incipiente[33].

Las dicetopiperazinas se han descripto también como subproductos en el curso de la síntesis no ribosomal de otros péptidos, tal es el caso de formación de ciclo (Phe-Pro) durante la síntesis no ribosomal de tirocidina A y gramicidina S en algunas cepas de *Bacillus brevis*[34,35].

El tercer camino estudiado ha sido descripto para la síntesis de albonoursina, un antibiótico peptídico perteneciente a la familia de dicetopiperazinas producido por *Streptomyces noursei*. Esta ruta biosintética sería independiente de la que involucra las péptido sintasas no ribosomales (NRPS). En este caso se ha podido detectar específicamente la enzima que cataliza la condensación de los aminoácidos en la formación del núcleo de dicetopiperazina, y que es diferente a las multienzimas NRPS[36].

En el caso de la aurantiamina se puede mencionar que el camino biosintético involucra la condensación de valina e histidina en la formación del esqueleto de dicetopiperazina y luego actúa una preniltransferasa que agrega la unidad de isopreno[37].

La ruta biosintética de la pseurotina A ha sido ampliamente estudiada debido al interés que generó su novedosa estructura heterospirocíclica. Utilizando precursores marcados con ^{13}C fue posible establecer un camino biosintético que comienza con la condensación de propanoil-coenzima A y malonato en ciclos sucesivos dando como resultado una policetona de once átomos de carbono, la cual reacciona con Fenilalanina[38] (figura 28).

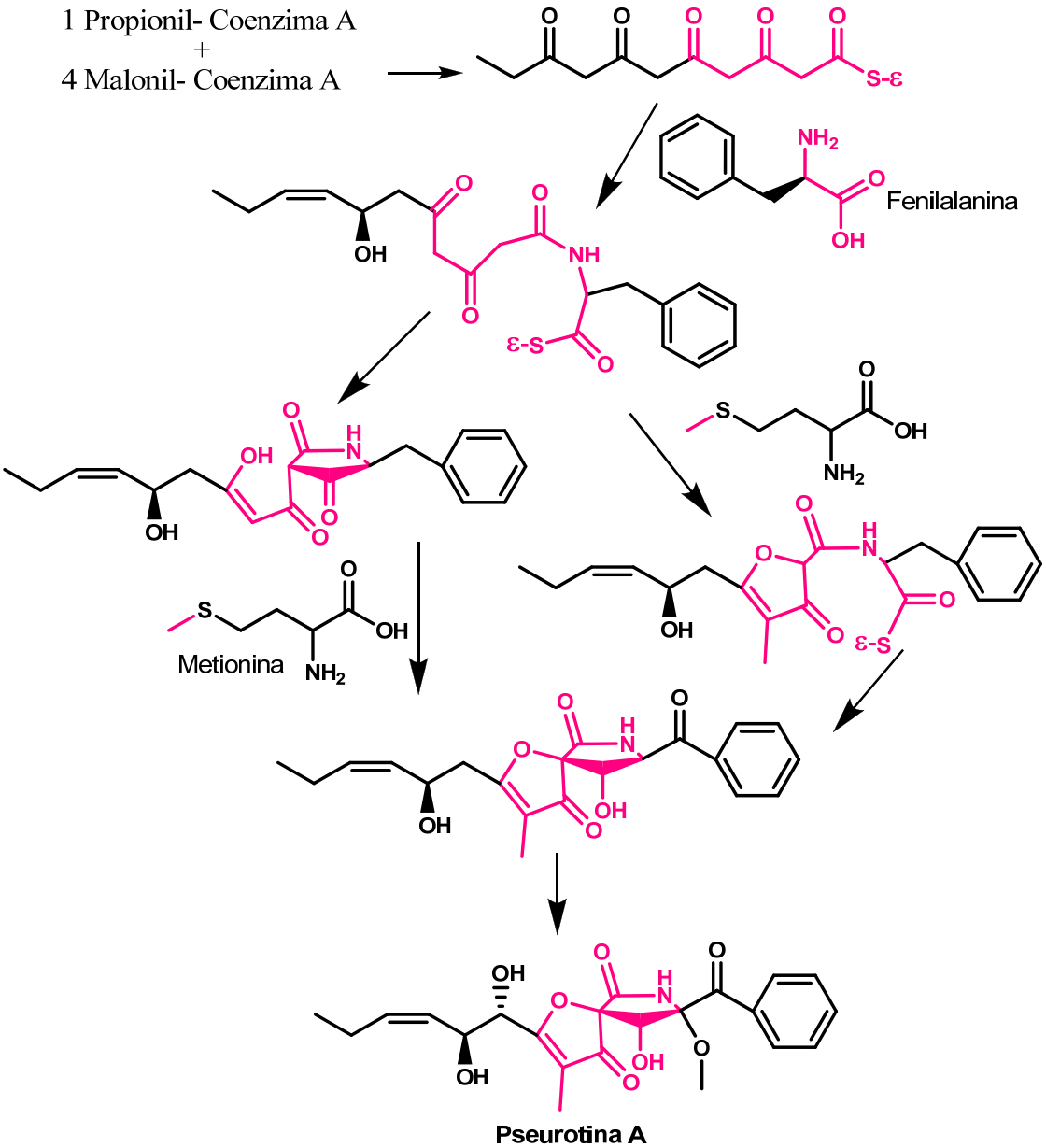


Figura 28. Ruta biosintética descripta para Pseurotina A.

En un trabajo más reciente se encontró que en la producción de pseurotina A por *Aspergillus fumigatus* resultaba fundamental la presencia de un gen híbrido de policetona sintasa-péptido sintasa no ribosomal (PKS-NRPS)[39]. La ruta propuesta en ese caso se muestra en la figura 29.

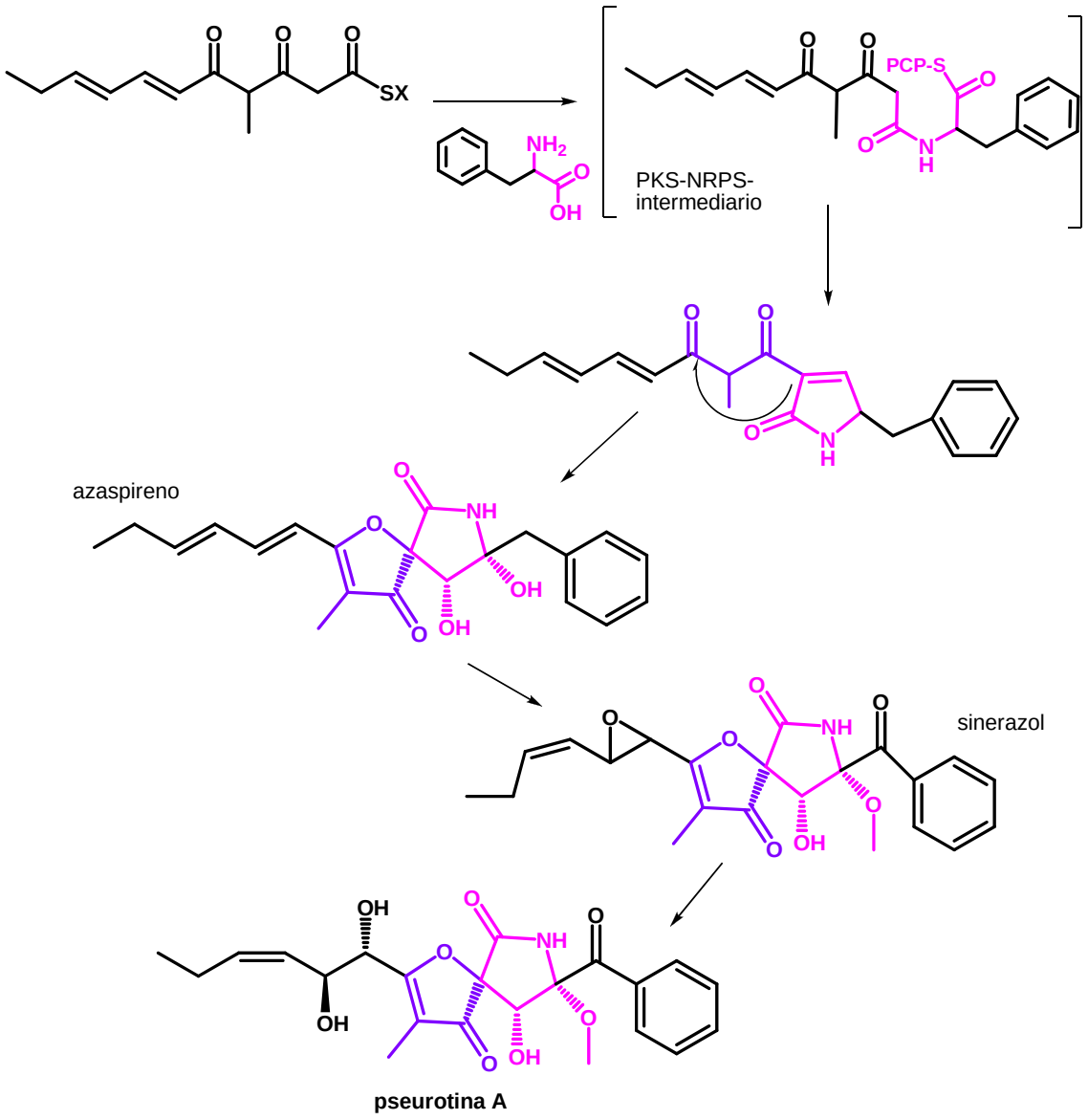


Figura 29. Ruta biosintética descripta para Pseurotina A por *A. fumigatus*.

Antecedentes de compuestos peptídicos y dicetopiperazinas

Se han aislado diversos péptidos de secuencia corta, con diferentes actividades antimicrobianas, a partir de bacterias[40,41], hongos[40,42], insectos[43,44], invertebrados marinos[40,45] y plantas[46], algunos de los cuales han sido propuestos como pesticidas. La importancia del potencial uso de péptidos antimicrobianos en producción agrícola reside en la necesidad de encontrar nuevos agentes de amplio espectro para la protección de cultivos, tal que cumplan con los requerimientos toxicológicos y de impacto ambiental[47].

En este sentido se han sintetizado péptidos utilizando compuestos naturales como modelos, entre ellos algunos hexapéptidos como los derivados de pneumocandina[48], análogos del tetrapéptido cíclico rhodopeptina[49], y otros péptidos[47]. Todos los que tienen propiedades antifúngicas, tienen en común la presencia de algún aminoácido básico en su estructura a diferencia del compuesto **5**, que no había sido informado hasta el momento como producto natural o sintético.

Se han informado también dos tetrapéptidos lineales naturales con moderada actividad antifúngica cuyas secuencias incluyen aminoácidos novedosos, uno de ellos con un anillo de imidazol (figura 30)[50].

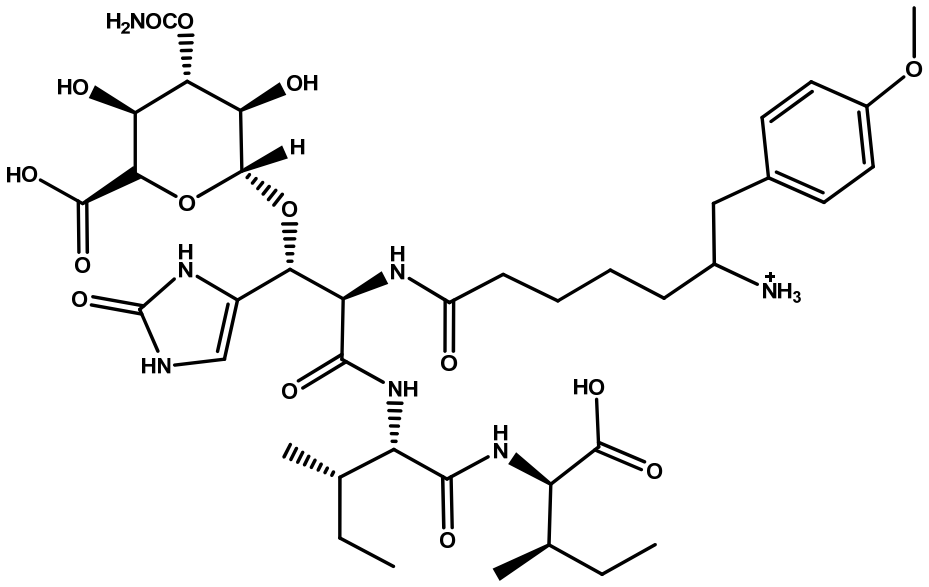
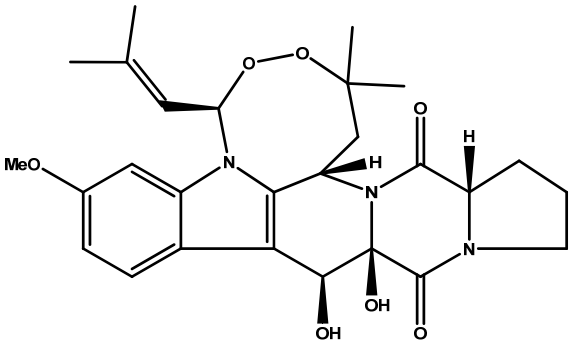


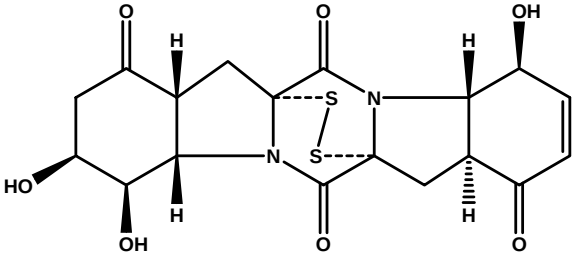
Figura 30. Citronamida A.

Entre otros, se ha encontrado una familia de tetrapéptidos que contienen tirosina en el extremo carboxilo-terminal, de relevancia por presentar actividad anti-opioide y alta selectividad por los receptores μ de los opioides, capaces de atravesar la barrera hematoencefálica[51,52].

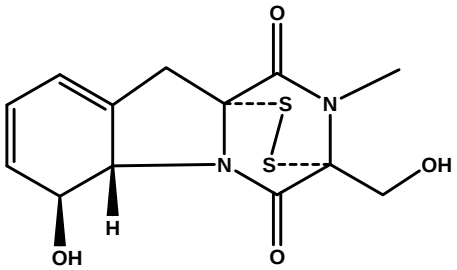
Las dicetopiperazinas constituídas por prolina son muy numerosas en la naturaleza y exhiben una gran complejidad estructural e interesante actividad biológica asociada. Cabe mencionar entre ellas a la micotoxina verruculogeno, los antibióticos epicoracinas y el inmunomodulador gliotoxina[53-57] (figura 31).



Verruculogeno



Epicorazina C



Gliotoxina

Figura 31. Compuestos de la familia de dicetopiperazinas constituidas por prolina.

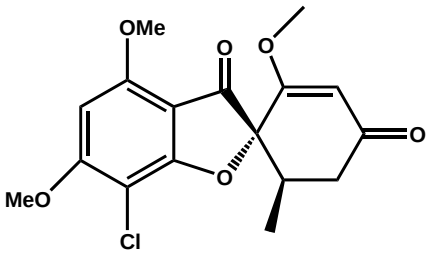
Las dicetopiperazinas **1** y **2** han sido aisladas con anterioridad a partir de *Lactobacillus plantarum, Streptomyces sp*. y *Alternaria alternata*[7,19,58] entre otros. La aurantiamina en cambio es una dicetopiperazina menos frecuente y ha sido encontrada solamente en cultivos de *Penicillium aurantiogriseum*[10,59]. La pseurotina A se ha

aislado a partir de *Pseudeurotium ovalis*, *Pseudallescheria boydii*, *Penicillum sp*. endofíticos y *Aspergillus fumigatus*[13,39,60-62].

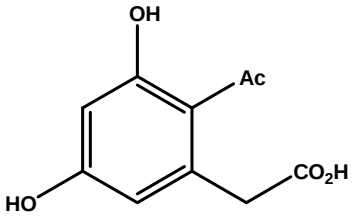
Cabe destacar que ninguno de los compuestos **1**-**5** había sido aislado previamente a partir de *Penicillium canescens*.

Antecedentes de otros compuestos aislados de las mismas cepas

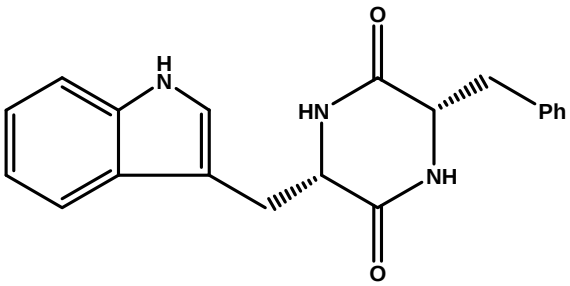
Se han informado más de 700 metabolitos aislados a partir del género *Penicillium*[63], muchos de los cuales poseen propiedades de utilidad para ser explotados en el desarrollo de nuevos fármacos[3]. La presencia de algunos metabolitos también ha asistido en el proceso de clasificación de estas cepas. De hecho, se ha llevado a cabo un análisis extensivo de los metabolitos producidos por *Penicillium* subgénero *Penicillium*[10] y el subgénero *Furcatum* se ha revisado en función de los metabolitos secundarios producidos. En particular los metabolitos griseofulvina, canescina, alcaloides que contienen triptofano como isorugulosuvina, meleagrina y roquefortina, el ácido curvulínico y el compuesto Sch642305 han sido aislados con anterioridad a partir de cepas de *P. canescens*[3].



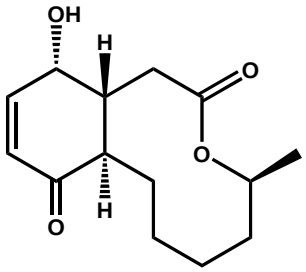
Griseofulvina



Ácido curvulínico



Isorugulosuvina



Sch 642305

Figura 32. Algunos metabolitos de *Penicillium sp*.

Conclusiones

Se llevó a cabo el aislamiento y la elucidación estructural de los metabolitos secundarios producidos a partir del cultivo de *P. canescens*, responsables de la actividad antimicrobiana medida en los ensayos preliminares. Se obtuvieron e identificaron cuatro compuestos de estructuras químicas informadas previamente, aunque no de esta cepa, y un tetrapéptido que no había sido informado hasta el momento. Este compuesto (D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr) resultó poseer una buena actividad antifúngica con un halo de inhibición de crecimiento de 20 mm de diámetro frente al hongo fitopatógeno *Fusarium virguliforme*.

Este trabajo fue publicado en el año 2009 en la revista Chemistry & Biodiversity.

Detalles Experimentales

La cepa *Penicillium canescens* fue aislada de polen y clasificada por la Dra. Nora Peña de la Universidad de Mar del Plata, y depositada en la colección de cultivos BAFC (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA) con el número BAFC 3291. El polen fue recolectado del interior de colmenas del apiario perteneciente a la Unidad Integrada INTA (Balcarce, Buenos Aires)-Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad de Mar del Plata) y diluído con solución fisiológica estéril. Se inoculó en medio de malta agarizado, en cajas de Petri, a partir de lo cual se aislaron colonias individuales, y la cepa *Penicillium canescens* entre ellas.

Cultivo de *P. canescens* en el laboratorio

Se fermentaron 3 litros de medio de cultivo de la cepa *P. canescens* utilizando extracto de malta 30% cuya composición se describe detalladamente en la parte experimental general, capítulo 7. En primer lugar se inocularon 3 erlenmeyers de 250 ml conteniendo 75 ml de extracto de malta cada uno. El inóculo se hizo introduciendo un corte del micelio del hongo (de 1 x 1 cm aproximadamente) crecido sobre medio

agarizado en cajas de Petri. Luego de una semana de fermentación en estufa a 25°C, el contenido de cada erlenmeyer se trasvasó a un erlenmeyer de 4 l conteniendo 1 l de medio cada uno, los cuales se mantuvieron a 25°C sin agitación durante tres semanas.

Extracción y fraccionamiento de *P. canescens*

Los 3 litros de cultivo se filtraron para separar el micelio del medio acuoso. La fase acuosa se extrajo con amberlite XAD-16. El material se desorbió utilizando metanol y se evaporó a presión reducida obteniéndose 3 g de extracto de medio de cultivo.

Dicho extracto se separó en primer lugar por cromatografía flash en columna seca en fase C-18, eluyendo con las siguientes mezclas de solventes de polaridad decreciente: H_2O (100%), H_2O-MeOH (75:25), H_2O-MeOH (1:1), H_2O-MeOH (25:75) y MeOH (100%). Las fracciones obtenidas mediante este método se analizaron por ccd, bioensayos y RMN-^{1}H, siendo las fracciones 3 (H_2O-MeOH 1:1) y 4 (H_2O-MeOH 25:75) las que presentaron los compuestos de interés. Esas fracciones se purificaron por HPLC utilizando una columna de fase reversa (YMC C-18, 5 µm, 22.5 x 2.5 cm). La fracción 3 del extracto de medio se purificó utilizando H_2O-MeOH 65:35 como fase móvil, obteniéndose a partir de la misma 8.0 mg del compuesto **1** y 16 mg del compuesto **2**. La fracción 4 del extracto de medio se purificó utilizando H_2O-MeOH 45:55 como fase móvil, obteniéndose a partir de la misma 6.7 mg del compuesto **3**, 9 mg del compuesto **4** y 11.6 mg del compuesto **5**.

Preparación de los péptidos sintéticos

Los compuestos D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr (**7**) y D-Phe-D-Val-L-Val-L-Tyr (**6**) fueron adquiridos del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA-CONICET) y preparados con un sintetizador de péptidos (*Applied Biosystems* modelo 431A), con el propósito de comparar sus propiedades con las del compuesto **5**. Se utilizaron los Fmoc-aminoácidos activados con HOBt/DCC (1-hidroxibenzotriazol/diciclohexilcarbodiimida) y una resina AB HMP ([p-(hidroximetil)fenoxi]-metil poliestireno). La purificación de los productos se llevó a

cabo por HPLC (RP C4, *Vydac* 214TP510, gradiente de elución 10 a 70% en 40 minutos, 1.5 ml/min, A: H_2O, B: *i*-PrOH/H_2O 8:2).

Preparación de los derivados de aminoácidos

Los compuestos **1**, **2** y **5** fueron hidrolizados con sc. HCl 6N durante 16 hs a 110ºC en ampolla cerrada, obteniéndose así los aminoácidos correspondientes para su análisis por CG. Se llevó a cabo la derivatización de los mismos y de estándares como *N*-pentafluoropropil ésteres de isopropilo, utilizando el kit de derivatización de aminoácidos IPA/PFPA (Alltech). Se disolvió 1.0 mg de muestra en 0.3 ml de HCl 0.2 M en un vial de reacción, se calentó a 110ºC en estufa por 5 minutos y se secó con corriente de N_2. En otro vial se preparó acetato de isopropilo agregando gradualmente 1.25 ml de cloruro de acetilo a 5 ml *i*-PrOH; 0.2 ml del reactivo se vertieron en el vial de reacción y la mezcla se calentó a 100ºC. Al cabo de 45 minutos se interrumpió el calentamiento e inmediatamente se secó la mezcla bajo corriente de N_2. A continuación se enfrió el vial de reacción en baño de hielo, se agregaron 0.3 ml de CH_2Cl_2, 0.2 ml de PFPA (anhídrido pentafluoropropiónico) y se calentó 15 minutos a 100ºC. Luego se dejó enfriar a t. a. y se evaporó el exceso de reactivos bajo corriente de N_2. El producto se redisolvió en CH_2Cl_2 para ser inyectado en el cromatografo gaseoso. Se utilizó una columna quiral Chirasil-Val (25 m, ID 0.25 mm, film 0.16 µm, gradiente 60ºC a 180ºC, 4ºC/min., 180ºC (10´) a 200ºC, 10ºC/min., 200ºC (20´)).

Propiedades físicas de los compuestos aislados

Los detalles de los equipos empleados se encuentran en el capítulo 7.

Compuesto **1** (ciclo (L-fenilalanil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina)): aceite; $\mathbf{[\alpha]_D^{25}}$ = -9.0 (c 0.07, MeOH); **RMN-^{1}H** y **RMN-^{13}C**: ver tabla 2. **EI-EM** (70 eV) *m/z* (AR): 260 ($[M]^{+\cdot}$, 84), 242 ($[M-H_2O]^{+\cdot}$, 6), 169 ($[M-C_7H_7]^+$, 81), 141 ($[169-CO]^+$, 87), 91 (100). **ESI-EM** *m/z*: 261.1242 $[M+H]^+$ **(**$C_{14}H_{17}N_2O_3$, calcdo. 261.1234, Δ 3.0 ppm).

Posición	ciclo L-Phe-*trans*-L-Hyp[4]		**1**	
	^{13}C NMR	^{1}H NMR	^{13}C NMR	^{1}H NMR
2	169.8		169.6	
3	56.2	4.31 dd (10.7, 2.6)	56.2	4.31 dd (10.3, 3.4)
4		5.89 s		5.71 s
5	166.2		165.1	
6	57.4	4.47 dd (11.1, 6.3)	57.4	4.46 dd (11.2, 6.2)
7	37.7	2.06 ddd (13.5, 11.4, 4.2) 2.36 dd (13.2, 6.2)	37.8	2.04 ddd (13.4, 11.2, 4.3) 2.35 dd (13.4, 6.2)
8	68.2	4.60 t (4.1)	68.4	4.58 t (4.3)
9	54.4	3.58 d (13.8) 3.80 dd (13.2, 4.5)	54.4	3.57 d (13.4) 3.79 dd (13.4, 4.3)
10	36.7	2.77 dd (14.6, 10.9) 3.63 dd (15.9, 3.9)	36.7	2.79 dd (15.0, 10.3) 3.61 dd (15.0, 3.4)
11	135.8		135.8	
12, 12´	129.3	7.29 m a	129.3	7.30 m a
13, 13´	129.2	7.29 m a	129.1	7.30 m a
14	127.6	7.29 m a	127.6	7.30 m a
α_D (MeOH)	- 6.7 (0.02)		- 9.0 (0.07)	
EM	261 $[M+H]^+$ (EM-FAB)		260 $M^{+\bullet}$ (EM-EI)	

Tabla 2. Datos de espectros RMN ^{1}H y ^{13}C en $CDCl_3$ de ciclo L-Phe-*trans*-L-Hyp y del compuesto **1**.

Compuesto **2** (ciclo (L-fenilalanil-L-prolina)): aceite; $\mathbf{[\alpha]_D^{25}}$ = -85 (c 0.16, MeOH); **RMN-^{1}H** y **RMN-^{13}C**: ver tabla 3. **EI-EM** (70 eV) *m/z* (AR): 244 ($[M]^{+\cdot}$, 30), 153 ([M-C_7H_7]$^+$, 36), 125 ([153-CO]$^+$, 97), 91 (73), 70 (100). **ESI-EM** *m/z*: 245.1298 $[M+H]^+$ **(**$C_{14}H_{17}N_2O_2$, calcdo. 245.1285, Δ 5.3 ppm).

Posición	Ciclo Phe-Pro[5,64]		**2**	
	^{13}C NMR	^{1}H NMR	^{13}C NMR	^{1}H NMR
2	165.2		165.2	
3	56.2	4.20 dd	55.9	4.35 t a (5.0)
4		5.70 s a		7.96 s a
5	169.6		169.2	
6	59.2	4.07 t	58.6	4.08 t a (8.7)
7	28.4	2.31 m	27.9	2.02 m, 1.73 m
8	22.6	1.93 m	22.0	1.43 m
9	45.6	3.59 m	44.7	3.41 dt (11.2, 3.5), 3.27 dt (11.2, 3.5)
10	36.9	3.64 dd, 2.76 dd	35.5	3.07 dd (14.4, 5.0), 3.05 dd (14.4, 5.0)
11	136.3		137.4	
12, 12´	129.4	7.22 s a	130.0	7.20-7.26 m
13, 13´	129.1	7.22 s a	128.1	7.20-7.26 m
14	127.5	7.22 s a	126.5	7.20-7.26 m
α_D	- 93 (0.36 EtOH)		- 85 (0.16 MeOH)	
EM	244 $M^{+\bullet}$ (EM-EI)		244 $M^{+\bullet}$ (EM-EI)	

Tabla 3. Datos de espectros RMN ^{1}H y ^{13}C de ciclo Phe-Pro en Cl_3CD y del compuesto **2** en $(CD_3)_2SO$.

Compuesto **3** (aurantiamina): aceite; $\mathbf{[\alpha]_D^{25}}$ = -80 (c 0.13, MeOH); **RMN-^{1}H** y **RMN-^{13}C**: ver tabla 4. **EI-EM** (70 eV) *m/z* (AR): 302 ($[M]^{+\cdot}$, 5), 203 ($[M- C_5H_9NO]^{+\cdot}$, 4), 188 ($[203-CH_3]^{+}$, 8), 175 ($[203-CO]^{+}$, 6), 41 (100). **ESI-EM** *m/z*: 303.1803 $[M+H]^{+}$ **(**$C_{16}H_{23}N_4O_2$, calcdo. 303.1816, Δ 4.3 ppm).

Posición	Aurantiamina[10]		**3**	
	^{13}C NMR	^{1}H NMR	^{13}C NMR	^{1}H NMR
1		10.0 s a		12.25 s a
2	132.6	7.57 s a	134.5	7.80 s
4	132.1		131.8	
5	136.7		136.5	
6	105.3	6.96 s	103.4	6.68 s
7	123.5		124.1	
8	160.8		159.6	
9		6.81 d a (2.3)		8.25 s
10	61.1	4.08 dd (3.1, 2.3)	60.3	3.90 s a
11	165.1		164.9	
12		12.16 s a		11.85 s a
13	33.0	2.47 m	33.4	2.15 m
14	18.6	1.09 d (7.0)	18.3	0.93 d (7.0)
15	15.8	0.95 d (7.0)	16.8	0.83 d (7.0)
16	37.5		37.6	
17	144.6	6.04 dd (10.8, 17.1)	145.8	6.05 dd (10.5, 17.3)
18	113.1	5.15 m	112.0	5.04 d (17.3) 5.07 d (10.5)
19, 20	27.9	1.49 s	28.0, 28.1	1.41 s
α_D	- 116 (0.5 MeOH)		- 80 (0.13 MeOH)	
EM	302 $M^{+\bullet}$ (EM-EI)		302 $M^{+\bullet}$ (EM-EI)	

Tabla 4. Datos de espectros RMN ^{1}H y ^{13}C en $CDCl_3$ de aurantiamina y del compuesto **3** en $(CD_3)_2SO$.

Compuesto **4** (pseurotina A): aceite; **$[\alpha]_D^{25}$** = -6 (c 0.07, MeOH); **RMN-^{1}H** y **RMN-^{13}C**: ver tabla 5. **LSIMS-EM** (glicerol) *m/z* 432 $[M+H]^+$. **ESI-EM** *m/z* 454.1468 $[M+Na]^+$ ($C_{22}H_{25}NNaO_8$, calcdo. 454.1472, Δ 0.9 ppm).

Posición	Pseurotina A[14]		**4**	
	^{13}C NMR	^{1}H NMR	^{13}C NMR	^{1}H NMR
2	187.4		187.1	
3	112.0		111.9	
4	197.3		196.9	
5	93.0		92.7	
6	167.1		166.7	
7		9.97 s		9.94 s
8	91.6		91.3	
9	75.4	4.42 s	75.1	4.40 d (7.0)
10	72.4	4.38 d (5.5)	72.1	4.33 d (5.0)
11	68.7	4.47 t (6.7)	68.4	4.45 t (5.0)
12	129.5	5.40 m	129.4	5.37 m
13	134.3	5.44 m	134.1	5.44 m
14	21.1	2.05 m	21.0	1.96-2.07 m
15	14.6	0.90 t (7.6)	14.4	0.89 t (7.5)
16	6.1	1.65 s	6.0	1.63 s
17	196.9		196.7	
18	133.7		132.3	
19, 23	130.8	8.27 d (7.3)	130.7	8.25 dd (8.3, 1.2)
20, 22	129.0	7.55 t (7.3)	128.8	7.53 t a (8.3)
21	134.5	7.70 t (7.3)	134.7	7.68 t a (7.5)
OCH_3	52.2	3.26 s	51.9	3.23 s
9-OH				6.23 d (7.0)
10-OH				5.75 s a
11-OH				4.88 s a
α_D	- 10 (0.5 MeOH)		- 6 (0.07 MeOH)	
EM	432 $[M+H]^+$ ESI		432 $[M+H]^+$ LSIMS	

Tabla 5. Datos de espectros RMN ^{1}H y ^{13}C en $(CD_3)_2SO$ de pseurotina A y del compuesto **4**.

Compuesto **5**: sólido amorfo; **$[\alpha]_D^{25}$ =** -124 (c 0.05, EtOH); **UV** (nm, ε, EtOH): 208 (3.03) **RMN-^{1}H y ^{13}C**: ver tabla 6. **LSIMS$^+$-EM** (AR; matriz glicerol): *m/z* 527 ($[M+H]^+$, 25), 72 (100); **LSIMS$^-$-EM** (AR; matriz glicerol): *m/z* 525 ($[M-H]^-$, 100); **EM(-ESI/APCI)**: *m/z* 527.2857 ($[M+H]^+$, $C_{28}H_{39}N_4O_6^+$; calc. 527.2864, Δ 0.2 ppm), 549.2675 ($[M+Na]^+$, $C_{28}H_{38}N_4NaO_6^+$; calc. 549.2684, Δ 1.6 ppm). **ESI-EM/EM** (527 u): 281.1 ($[y_2]^+$, 22), 247.1 ($[b_2]^+$, 95), 219.1 ($[a_2]^+$, 100), 182.1 ($[y_1]^+$, 13), 120.1 ($[H_2N{=}CHCH_2Ph]^+$, 5).

	5		**7**		**6**[a]	
	^{13}C NMR	^{1}H NMR	^{13}C NMR	^{1}H NMR	^{13}C NMR	^{1}H NMR
D-Phe						
1	169.9		169.8		170.6	
2	54.1	3.89 *t a* (7.2)	54.0	3.90 *t a* (7.1)	55.9	3.60 *s a*
3	38.8	2.95 *dd* (13.4, 7.2) 2.79 *dd* (13.4, 7.4)	38.5	2.96 *dd* (13.4, 7.1) 2.79 *dd* (13.4, 7.4)	40.1	3.02 *dd* (13.6, 4.4) 2.69 *dd* (13.6, 8.4)
4	136.6		136.5		137.8	
5, 9	129.5	7.21-7.27 *m*	129.6	7.22-7.28 *m*	129.7	7.21-7.25 *m*
6, 8	128.5	7.24-7.29 *m*	128.5	7.25-7.30 *m*	128.6	7.24-7.29 *m*
7	126.8	7.19-7.23 *m*	126.9	7.19-7.23 *m*	126.7	7.17-7.21 *m*
Val-1						
1	171.3		171.3		170.8[b]	
2	57.7	4.25 *t* (8.0)	57.6	4.26 *d* (8.2)	57.8	4.18 dd (8.6, 6.3)
3	30.6	1.71-1.78 *m*	30.9	1.72-1.79 *m*	30.7	1.97-2.04 *m*
4	19.2	0.71 *d* (6.7)	19.2	0.70 *d* (6.7)	19.6	0.83 d (6.7)
5	18.1	0.57 *d* (6.7)	18.0	0.56 *d* (6.7)	18.2	0.78 d (6.7)
NH		8.25 *d a* (8.0)		8.26 *d a* (8.2)		8.08-8.11 *m*[c]
Val-2						
1	170.7		170.9		170.8[b]	
2	57.3	4.12-4.17 *m*	57.2	4.15-4.20 *m*	57.5	4.37 *t a* (7.4)
3	28.9	1.91-1.96 *m*	29.4	1.89-1.96 *m*	31.5	1.89-1.96 *m*
4	19.8	0.73 *d* (6.7)	19.7	0.72 *d* (6.7)	19.6	0.82 d (6.7)
5	17.9	0.68 *d* (6.7)	17.8	0.68 *d* (6.7)	18.2	0.80 d (6.7)
NH		8.31 *d a* (8.3)		8.31 *d a* (8.5)		8.10-8.13 *m*[c]
L-Tyr						
1	173.5		173.5		173.1	
2	54.8	4.12-4.17 *m*	54.6	4.17-4.22 *m*	54.6	4.21-4.26 *m*
3	37.0	2.89 *dd* (13.6, 4.8) 2.69 *dd* (13.6, 8.4)	36.9	2.90 *dd* (13.8, 4.9) 2.68 *dd* (13.8, 8.5)	36.6	2.88 *dd* (13.9, 5.5) 2.79 *dd* (13.9, 8.1)
4	128.6		128.7		127.9	
5, 9	130.2	6.94 *d* (8.3)	130.2	6.94 *d* (8.5)	130.3	6.98 *d* (8.4)
6, 8	114.9	6.59 *d* (8.3)	114.9	6.59 *d* (8.5)	115.2	6.61 *d* (8.4)
7	155.8		155.8		155.9	
NH		7.58 *s a*		7.60 *s a*		7.99 *d a* (8.3)

Tabla 6. Datos de espectros RMN ^{1}H y ^{13}C en $(CD_3)_2SO$ del tetrapéptido natural **5** y los péptidos sintéticos **6** y **7**, δ en ppm (*J* en Hz).

[a]El compuesto **6** no mostró correlaciones vía NOESY usando diferentes tiempos de correlación entre 0.3 y 0.9 s.
[b, c] señales superpuestas.

Compuesto **6**: sólido amorfo; $[\alpha]_D^{25}$ = -31 (c 0.06 EtOH); **RMN-^{1}H y ^{13}C**: ver tabla 6. **ESI-EM**: *m/z* 527.2865 ($[M+H]^+$, $C_{28}H_{39}N_4O_6^+$; calc. 527.2864, Δ 0.2 ppm), 549.2688 ($[M+Na]^+$, $C_{28}H_{38}N_4NaO_6^+$; calc. 549.2684, Δ 0.8 ppm).

Compuesto **7**: sólido amorfo; $[\alpha]_D^{25}$ = -137 (c 0.05, EtOH); **RMN-^{1}H y ^{13}C**: ver tabla 6. **ESI-EM**: *m/z* 527.2858 ($[M+H]^+$, $C_{28}H_{39}N_4O_6^+$; calc. 527.2864, Δ 1.1 ppm), 549.2710 ($[M+Na]^+$, $C_{28}H_{38}N_4NaO_6^+$; calc. 549.2684, Δ 4.9 ppm).

Bibliografía

(1) Gallardo, G. L.; Peña, N. I.; Cabrera, G. M. "Neric acid derivatives produced by the honey bee fungal entomopathogen *Ascosphaera apis*" *Phytochemistry Letters* **2008**, *1*, 155-158.

(2) Gallardo, G.; Peña, N.; Chacana, P.; Terzolo, H.; Cabrera, G. "L-Tenuazonic acid, a new inhibitor of *Paenibacillus Larvae*" *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2004**, *20*, 609-612.

(3) Nicoletti, R.; Lopez-Gresa, M.; Manzo, E.; Carella, A.; Ciavatta, M. "Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*" *Mycopathologia* **2007**, *163*, 295-301.

(4) Adamczeski, M.; Quinoa, E.; Crews, P. "Novel sponge-derived amino acids. 5. Structures, stereochemistry, and synthesis of several new heterocycles" *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 647-654.

(5) Fdhila, F.; Vazquez, V.; Sánchez, J. L.; Riguera, R. "DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*" *Journal of Natural Products* **2003**, *66*, 1299-1301.

(6) Shigemori, H.; Tenma, M.; Shimazaki, K.; Kobayashi, J. "Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*" *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 696-698.

(7) Ström, K.; Jögren, S.; Broberg, A.; Schnürer, J. "*Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid" *Applied and Environmental Microbiology* **2002**, *68*, 4322-4327.

(8) Holden, M. T. G.; Ram Chhabra, S.; De Nys, R.; Stead, P.; Bainton, N. J.; Hill, P. J.; Manefield, M.; Kumar, N.; Labatte, M.; England, D.; Rice, S.; Givskov, M.; Salmond, G. P. C.; Stewart, G. S. A. B.; Bycroft, B. W.; Kjelleberg, S.; Williams, P. "Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria" *Molecular Microbiology* **1999**, *33*, 1254-1266.

(9) Laatsch, H.; Chemical Concepts: Weinheim, 2000.

(10) Larsen, T. O.; Frisvad, J. C.; Jensen, S. R. "Aurantiamine, a diketopiperazine from two varieties of *Penicillium aurantiogriseum*" *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1613-1615.

(11) Couladouros, E. A.; Magos, A. D. "Total asymmetric synthesis of (-)-Phenylhistine, (-)-Aurantiamine and related compounds. Part I" *Molecular Diversity* **2005**, *9*, 99-109.

(12) Bodo, B.; Rebuffat, S.; El Hajji, M.; Davoust, D. "Structure of trichorzianine A IIIc, an antifungal peptide from *Trichoderma harzianum*" *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 6011-6017.

(13) Bloch, P.; Tamm, C.; Bollinger, P.; Petcher, T. J.; Weber, H. P. "Pseurotin, a new metabolite of pseudeurotium ovalis STOLK having an unusual hetero-spirocyclic system. (Preliminary Communication)" *Helvetica Chimica Acta* **1976**, *59*, 133-137.

(14) Van der Sar, S. "Studies in the chemistry of fungal natural products".Tesis (Doctor en Química), Universidad de Canterbury, Christchurch, Nueva Zelanda **2006**.

(15) Ando, O.; Satake, H.; Nakajima, M.; Sato, A.; Nakamura, T.; Kinoshita, T.; Furuya, K.; Haneishi, T. "Synerazol, a new antifungal antibiotic" *Journal of Antibiotics* **1991**, *44*, 382-389.

(16) Roepstorff, P.; Fohlman, J. "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides" *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, *11*, 601.

(17) Biemann, K. "Mass spectrometry of peptides and proteins" *Annual Review of Biochemistry* **1992**, *61*, 977-1010.

(18) Homans, A. L.; Fuchs, A. "Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances" *Journal of Chromatography A* **1970**, *51*, 327-329.

(19) Rhee, K.-H. "Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties" *International Journal of Antimicrobial Agents* **2004**, *24*, 423-427.

(20) López-Gresa, M. P.; Cabedo, N.; González-Mas, M. C.; Ciavatta, M. L.; Avila, C.; Primo, J. "Terretonins E and F, inhibitors of the mitochondrial respiratory chain from the marine-derived fungus *Aspergillus insuetus*" *Journal of Natural Products* **2009**, *72*, 1348-1351.

(21) Hayashi, Y.; Orikasa, S.; Tanaka, K.; Kanoh, K.; Kiso, Y. "Total synthesis of anti-microtubule diketopiperazine derivatives: phenylahistin and aurantiamine" *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65*, 8402-8405.

(22) Mehedi, M. A. U.; Molla, A. H.; Khondkar, P.; Sultana, S.; Islam, M. A.; Rashid, M. A.; Chowdhury, R. "Pseurotin A: an antibacterial secondary metabolite from *Aspergillus fumigatus*" *Asian Journal of Chemistry* **2010**, *22*, 2611-2614.

(23) Ishikawa, M.; Ninomiya, T.; Akabane, H.; Kushida, N.; Tsujiuchi, G.; Ohyama, M.; Gomi, S.; Shito, K.; Murata, T. "Pseurotin A and its analogues as inhibitors of immunoglobuline E production" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 1457-1460.

(24) Barrow, C. J.; Sun, H. H. "Spiroquinazoline, a novel substance P inhibitor with a new carbon skeleton, isolated from *Aspergillus flavipes*" *Journal of Natural Products* **1994**, *57*, 471-476.

(25) Izumida, H.; Imamura, N.; Sano, H. "A novel chitinase inhibitor from a marine bacterium, *Pseudomonas sp*" *Journal of Antibiotics* **1996**, *49*, 76-80.

(26) Izumida, H.; Nishijima, M.; Takadera, T.; Nomoto, A. M.; Sano, H. "The effect of chitinase inhibitors, cyclo(Arg-Pro) against cell separation of *Saccharomyces cerevisiae* and the morphological change of *Candida albicans*" *Journal of Antibiotics* **1996**, *49*, 829-831.

(27) Murao, S.; Hayashi, H.; Takiuchi, K.; Arai, M. "Okaramine A, a novel indole alkaloid with insecticidal activity, from *Penicillium simplicissimum* AK-40" *Agricultural and Biological Chemistry* **1988**, *52*, 885-886.

(28) Gröger, D.; Floss, H. G. "*The Alkaloids: Chemistry and Biology*"; ed.: Cordell, G. A.; Academic Press: Londres, Reino Unido, **1998**.

(29) Bull, S. D.; Davies, S. G.; Parkin, R. M.; Sanchez-Sancho, F. "The biosynthetic origin of diketopiperazines derived from D-proline" *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1998**, 2313-2320.

(30) Sieber, S. A.; Marahiel, M. A. "Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics" *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 715-738.

(31) Walzel, B.; Riederer, B.; Keller, U. "Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus *Claviceps purpurea*" *Chemistry & biology* **1997**, *4*, 223-230.

(32) Schwarzer, D.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A. "Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases" *Chemistry & Biology* **2001**, *8*, 997-1010.

(33) Doekel, S.; Marahiel, M. A. "Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases" *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 373-384.

(34) Mootz, H. D.; Marahiel, M. A. "The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains" *Journal of Bacteriology* **1997**, *179*, 6843-6850.

(35) Kratzschmar, J.; Krause, M.; Marahiel, M. A. "Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes grsA and grsB has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases" *Journal of Bacteriology* **1989**, *171*, 5422-5429.

(36) Lautru, S.; Gondry, M.; Genet, R.; Pernodet, J.-L. "The albonoursin gene cluster of *S. noursei*: biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases" *Chemistry & Biology* **2002**, *9*, 1355-1364.

(37) Antia, B. S.; Aree, T.; Kasettrathat, C.; Wiyakrutta, S.; Ekpa, O. D.; Ekpe, U. J.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. "Itaconic acid derivatives and diketopiperazine from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus* CRI322-03" *Phytochemistry* **2011**, *72*, 816-820.

(38) Mohr, P.; Tamm, C. "Biosynthesis of pseurotin A" *Tetrahedron* **1981**, *37*, 201-212.

(39) Maiya, S.; Grundmann, A.; Li, X.; Li, S.-M.; Turner, G. "Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*" *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1736-1743.

(40) Mayer, A. M. S.; Gustafson, K. R. "Marine pharmacology in 2005-2006: Antitumour and cytotoxic compounds" *European Journal of Cancer* **2008**, *44*, 2357-2387.

(41) Hancock, R. E. W.; Chapple, D. S. "Peptide antibiotics" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, *43*, 1317-1323.

(42) Chianga, Y. M.; Lee, K. H.; Sanchez, J. F.; Keller, N. P.; Wang, C. C. C. "Unlocking fungal cryptic natural products" *Natural Product Communications* **2009**, *4*, 1505-1510.

(43) Otvos Jr, L. "Antibacterial peptides isolated from insects" *Journal of Peptide Science* **2000**, *6*, 497-511.

(44) Chesnokova, L. S.; Slepenkov, S. V.; Witt, S. N. "The insect antimicrobial peptide, L-pyrrhocoricin, binds to and stimulates the ATPase activity of both wild-type and lidless DnaK" *FEBS Letters* **2004**, *565*, 65-69.

(45) Tincu, J. A.; Taylor, S. W. "Antimicrobial peptides from marine invertebrates" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, *48*, 3645-3654.

(46) Pelegrini, P. B.; Murad, A. M.; Silva, L. P.; dos Santos, R. C. P.; Costa, F. T.; Tagliari, P. D.; Bloch Jr, C.; Noronha, E. F.; Miller, R. N. G.; Franco, O. L. "Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria" *Peptides* **2008**, *29*, 1271-1279.

(47) Montesinos, E.; Bardají, E. "Synthetic antimicrobial peptides as agricultural pesticides for plant-disease control" *Chemistry & Biodiversity* **2008**, *5*, 1225-1237.

(48) Datry, A.; Thellier, M. "Echinocandins: a new class of antifungal agents, a new mechanism of action" *Journal de Mycologie Medicale* **2002**, *12*, 1S5-1S9.

(49) Nakayama, K.; Kawato, H. C.; Inagaki, H.; Nakajima, R.; Kitamura, A.; Someya, K.; Ohta, T. "Synthesis and antifungal activity of rhodopeptin analogues. 2. Modification of the west amino acid moiety" *Organic Letters* **2000**, *2*, 977-980.

(50) Carroll, A. R.; Duffy, S.; Avery, V. M. "Citronamides A and B, tetrapeptides from the Australian sponge *Citronia astra*" *Journal of Natural Products* **2009**, *72*, 764-768.

(51) Pan, W.; Kastin, A. J. "From MIF-1 to endomorphin: the Tyr-MIF-1 family of peptides" *Peptides* **2007**, *28*, 2411-2434.

(52) Gelman, P. L.; Herrera, N. E. G.; Ortega, M. E. M.; Romero, L. P.; Santillán, C. T.; Juárez, A. S.; Palma, B. A. "Endomorphin peptides: pharmacological and functional implications of these opioid peptides in the brain of mammals. Part One" *Salud Mental* **2010**, *33*, 179-196.

(53) Cui, C.-B.; Kakeya, H.; Osada, H. "Novel mammalian cell cycle inhibitors, cyclotroprostatins A-D, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase" *Tetrahedron* **1997**, *53*, 59-72.

(54) Cui, C.-B.; Kakeya, H.; Osada, H. "Novel mammalian cell cycle inhibitors, spirotryprostatins A and B, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase" *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12651-12666.

(55) Hodge, R. P.; Harris, C. M.; Harris, T. M. "Verrucofortine, a major metabolite of *Penicillium verrucosum* var. *Cyclopium*, the fungus that produces the mycotoxin verrucosidin" *Journal of Natural Products* **1988**, *51*, 66-73.

(56) Seigle-Murandi, F.; Krivobok, S.; Steiman, R.; Marzin, D. "Production, mutagenicity, and immunotoxicity of gliotoxin" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1990**, *38*, 1854-1856.

(57) Takahashi, C.; Numata, A.; Ito, Y.; Matsumura, E.; Araki, H.; Iwaki, H.; Kushida, K. "Leptosins, antitumour metabolites of a fungus isolated from a marine alga" *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1994**, 1859-1864.

(58) Stierle, A. C.; Cardellina, J. H., II; Strobel, G. A. "Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* **1988**, *85*, 8008-8011.

(59) Vinokurova, N. G.; Baskunov, B. P.; Zelenkova, N. F.; Arinbasarov, M. U. "The alkaloids of *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx (1901) var. aurantiogriseum VKM F-1298" *Mikrobiologiia* **2004**, *73*, 491-497.

(60) Maebayashi, Y.; Horie, Y.; Satoh, Y.; Yamazaki, M. "Isolation of pseurotin A and a new pyrazine from *Pseudallescheria boydii*" *Maikotokishin (Tokyo), Mycotoxins* **1985**, *22*, 33-34.

(61) Schmeda-Hirschmann, G.; Hormazabal, E.; Rodriguez, J. A.; Theoduloz, C. "Cycloaspeptide A and pseurotin A from the endophytic fungus *Penicillium janczewskii*" *Z Naturforsch C, Journal of Biosciences* **2008**, *63*, 383-388.

(62) Stierle, A. A.; Stierle, D. B. "Bioactive compounds from four endophytic *Penicillium sp*. of a northwest pacific yew tree" *Studies in Natural Products Chemistry* **2000**, *24*, 933-977.

(63) Frisvad, J. C.; Smedsgaard, J.; Larsen, T. O.; Samson, R. A. "Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*" *Studies in Mycology* **2004**, *49*, 201-241.

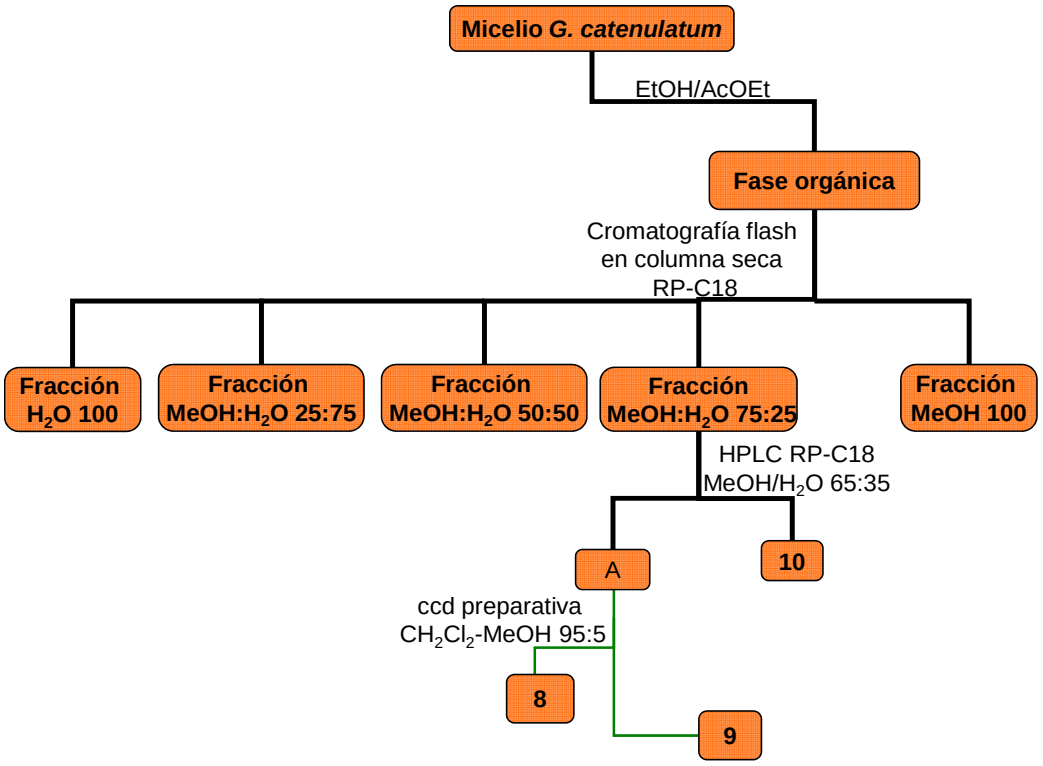
(64) Jayatilake, G. S.; Thornton, M. P.; Leonard, A. C.; Grimwade, J. E.; Baker, B. J. "Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*" *Journal of Natural Products* **1996**, *59*, 293-296.

Aislamiento de los metabolitos secundarios

Al realizarse un cultivo en pequeña escala de la cepa *Gliocladium catenulatum* aislada de sedimentos de suelo de una plantación de lechuga en Las Heras (Provincia de Buenos Aires) y analizarse los extractos de medio y micelio de este cultivo por ccd y RMN-^{1}H pudo concluirse que la cepa producía compuestos de estructura química interesante, que se encontraban en el extracto de micelio. Se estudió además la actividad de los extractos frente a diversos microorganismos, observándose resultados positivos también en el extracto de micelio.

Figura 33. Fotografía de *Gliocladium catenulatum*.

Con el fin de obtener cantidad suficiente de los metabolitos producidos por el hongo para su elucidación estructural, el mismo se hizo crecer en medio líquido extracto de malta al 30% en escala de 5 l. Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento del hongo, se separaron el medio y el micelio por filtración. Posteriormente, el micelio se extrajo con etanol y acetato de etilo. Al extracto así obtenido se le realizó un fraccionamiento mediante cromatografía flash en columna seca, utilizando fase reversa y mezclas de polaridad decreciente de metanol-agua. La fracción activa fue sometida a cromatografía líquida de alta resolución obteniéndose una mezcla de dos compuestos (**8** y **9**), que se separaron por ccd preparativa, y un compuesto puro (**10**). Los pasos seguidos para la purificación de los compuestos se representan en el esquema 2.



Esquema 2. Diagrama de los pasos seguidos para la obtención de los compuestos puros.

Elucidación estructural de los metabolitos aislados

Las estructuras de los metabolitos aislados se elucidaron analizando los datos espectroscópicos de RMN y EM.

Compuesto 8

La fórmula molecular del compuesto **8** fue determinada como $C_{22}H_{16}N_4O_3$ por espectrometría de masa, utilizando la técnica de ionización ESI, al observarse el ión de *m/z* 385.1295 $[M+H]^+$. El número de insaturaciones calculado en base a la fórmula molecular es 17.

El compuesto **8** presentó en su espectro RMN-^{1}H (Cl_3CD) un singulete ancho a δ 9.12 ppm, un doblete a δ 7.35 ppm y un multiplete a δ 7.15 ppm parcialmente

superpuesto con otro multiplete a δ 7.14 ppm; presentó además un doblete ancho y un doblete con desplazamientos químicos a 7.09 y 7.07 ppm respectivamente, un singulete ancho a δ 6.99 ppm y otro a δ 6.96 ppm, el último superpuesto a un multiplete con el mismo desplazamiento. Se observaron también en el espectro dos multipletes superpuestos a δ 6.75 y 6.76 ppm y por último dos singuletes a δ 6.26 y 3.36 ppm respectivamente.

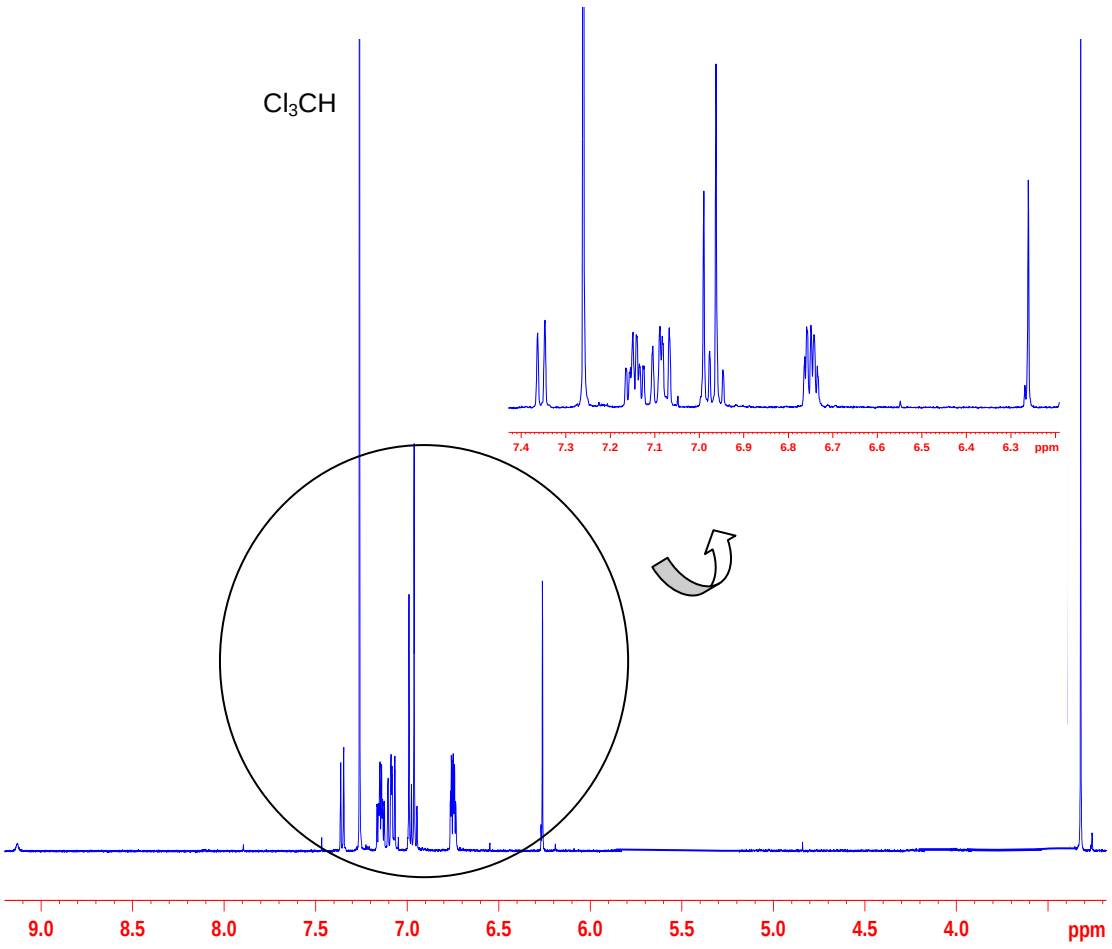


Figura 34. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **8** en Cl_3CD.

Llevando a cabo un análisis detallado del espectro COSY (figura 35), realizado específicamente en una ventana más chica, seleccionando sólo la zona aromática para tener mejor resolución, pudo establecerse la vecindad entre los distintos hidrógenos del compuesto, incluyendo los que presentaron señales superpuestas. Se observó que la señal a δ 7.35 ppm correlacionaba con la señal a δ 7.15 ppm y el multiplete a δ 6.96

ppm, y que éstas dos últimas a su vez correlacionaban entre sí. Se observó además que la señal a δ 7.09 ppm correlacionaba con el multiplete a δ 6.96 ppm (ddd).

Por otra parte se observaron correlaciones entre la señal a δ 6.76 ppm y la señal a δ 7.14 ppm (ddd), que este multiplete correlacionaba a su vez con el multiplete a δ 6.75 ppm y éste último con la señal a δ 7.07 ppm.

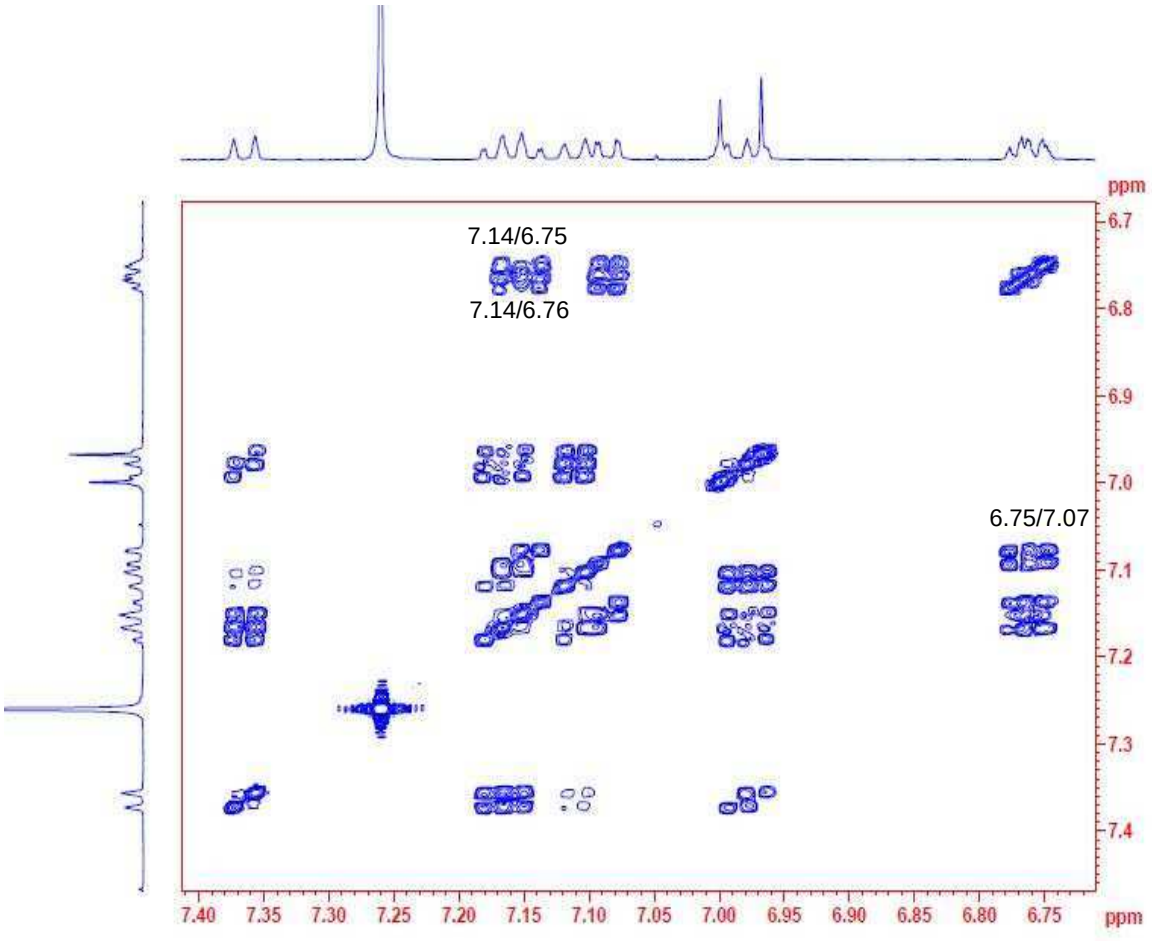


Figura 35. COSY en la región aromática del compuesto **8**.

De lo anterior se dedujo que el compuesto poseía dos sistemas aromáticos no acoplados entre sí. Teniendo en cuenta las señales singulete con desplazamientos a 6.99 y 6.96 ppm y los desplazamientos químicos y multiplicidades de las señales aromáticas se propusieron como estructuras parciales un indol sustituido en la posición 3 y una subestructura relacionada en la que llamó la atención el singulete a δ 6.26 ppm porque su desplazamiento químico en el espectro de RMN-^{13}C a 84.3 ppm era bastante menor al típico valor de la posición 2 en un indol (~124 ppm) ó de la posición 3 (~100 ppm).

En el espectro RMN-^{13}C (Cl_3CD) de **8** se observaron 22 señales, de las cuales diez se asignaron a carbonos cuaternarios según el HSQC con desplazamientos químicos a δ 157.6, 156.7, 149.8, 147.9, 137.1, 131.1, 129.1, 125.1, 115.2 y 60.5 ppm. La única señal a campos altos en el espectro de RMN-^{1}H, un singulete a δ 3.36 ppm, correlacionó en el espectro HSQC con la señal de δ 27.5 ppm en el RMN-^{13}C. Este dato sugirió la presencia de un grupo metilo unido a nitrógeno (-NMe).

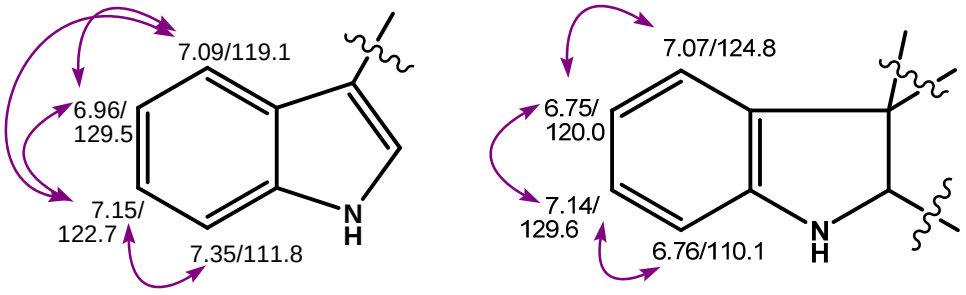


Figura 36. Estructuras parciales propuestas para el compuesto **8**, con las asignaciones de ^{1}H y ^{13}C obtenidas por HSQC (^{1}H/^{13}C) y correlaciones observadas en el espectro COSY (↔).

Observando en el espectro HMBC (figura 37) particularmente las correlaciones de la señal a 6.26 ppm, las dos más importantes fueron con las señales de carbonos cuaternarios a 147.9 y 115.2 ppm. Además se observó que los protones del sistema aromático a δ 7.14 y 7.07 ppm correlacionaban con la señal a 147.9 ppm. En consecuencia 147.9 ppm podía asignarse al carbono cuaternario del sistema aromático en posición *meta* a los dos protones mencionados. También se observó que la señal a δ 7.07 ppm correlacionaba con el carbono cuaternario a δ 60.5 ppm, lo que sugería que ese carbono se encontraba a tres enlaces de ese protón aromático (figura 38).

En el mismo espectro se observaron además las correlaciones de las señales del indol a δ 6.96, 7.09 y 7.15 ppm con la señal del carbono cuaternario a 137.1 ppm, lo que permitía asignar a esta señal al carbono adyacente al N del indol.

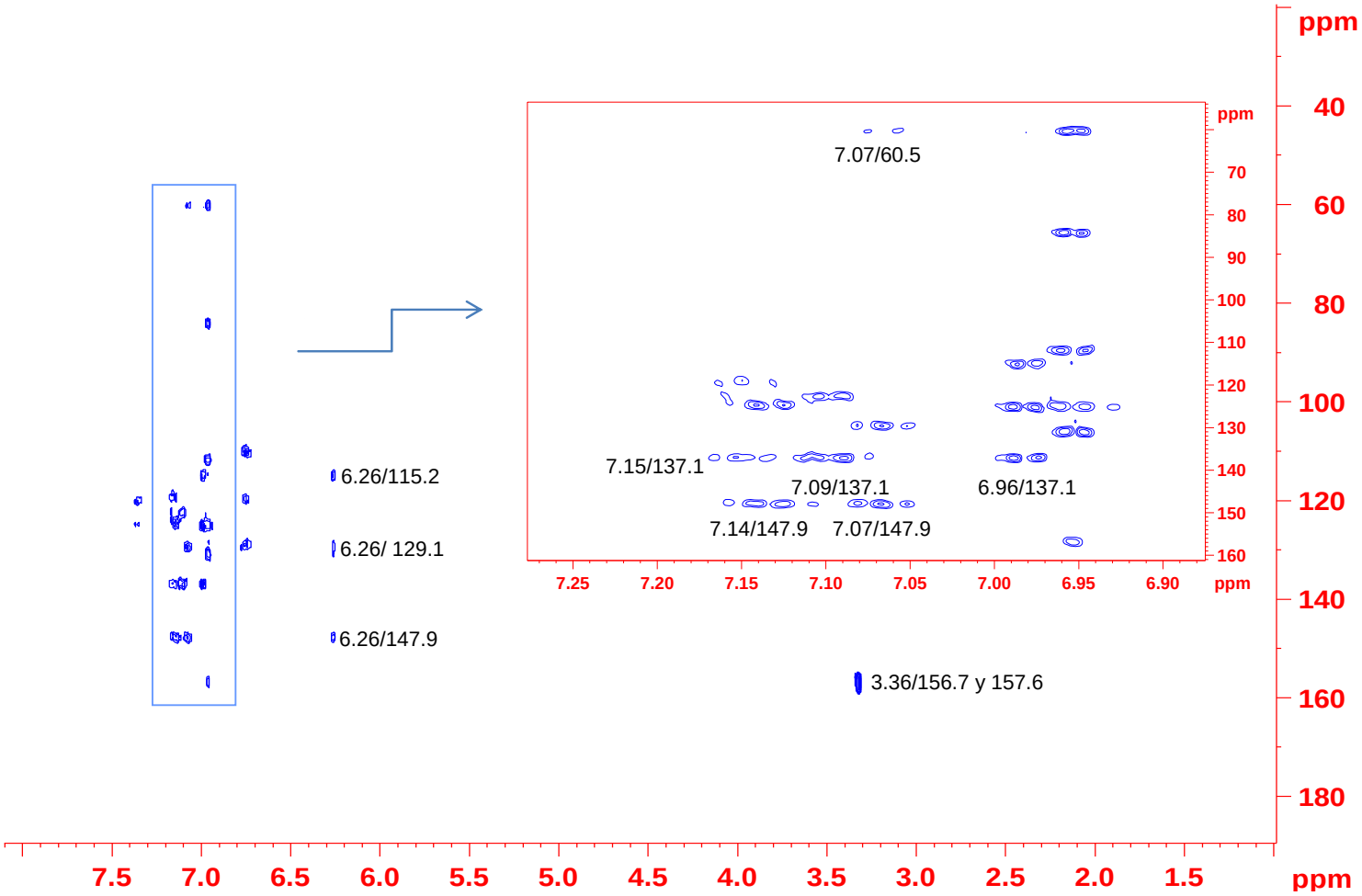


Figura 37. Espectro HMBC del compuesto **8**.

Para justificar el desplazamiento de la señal a 84.3 ppm se necesitaría la unión de ese carbono a dos heteroátomos, siendo uno un átomo de N mientras que el segundo (X) podía ser O o N según la fórmula molecular. Por otra parte, las correlaciones entre la señal de los protones de -NCH_3 y las señales a δ 157.6 y 156.7 ppm conducirían a una subestructura *N*-metil-*N*,*N*-diacilo (figura 38).

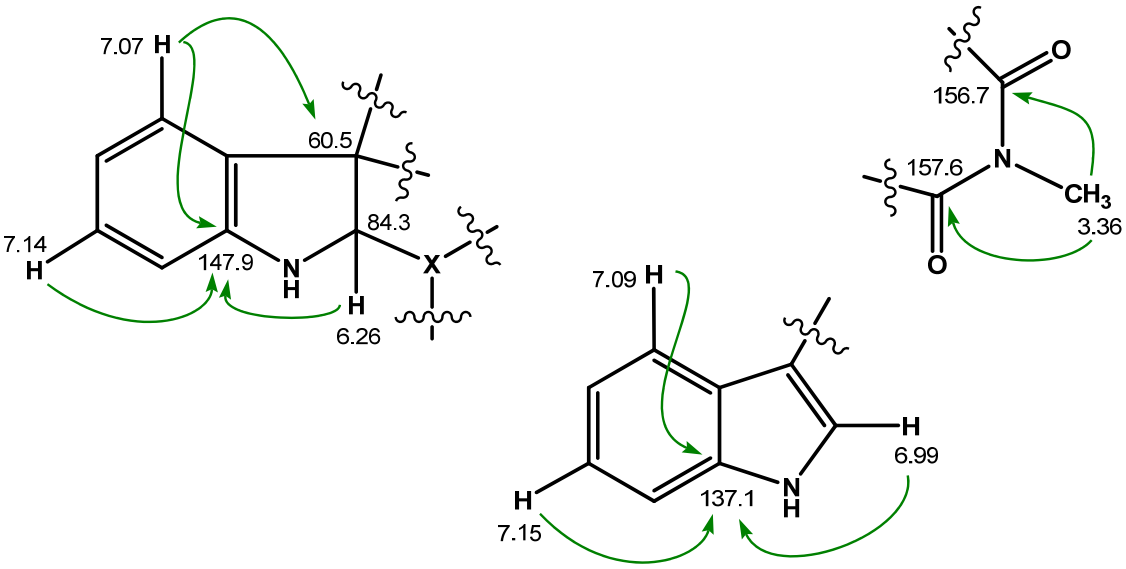


Figura 38. Subestructuras propuestas para el compuesto **8** y correlaciones observadas en el espectro HMBC

Teniendo en cuenta los fragmentos elucidados de la molécula y con la ayuda de la base de datos Heterocycles database[1] se propuso la estructura que se muestra en la figura 39, determinando así que el compuesto **8** hallado correspondía al metabolito conocido como Gliocladina C[2], que tiene un ciclo trioxopiperazina inusual en productos naturales y menos frecuentemente aún unido al fragmento pirrolidinindólico[3,4]. En la figura 40 se muestra el espectro RMN-^{1}H obtenido para la región aromática donde se asignaron las señales correspondientes.

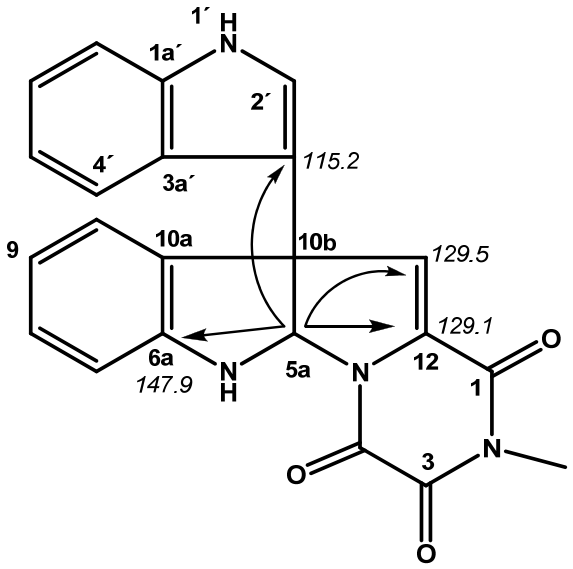


Figura 39. Estructura del compuesto **8** y correlaciones HMBC del ^{1}H a 6.26 ppm.

Pudo comprobarse que el compuesto **8** presentaba la misma estereoquímica relativa que la gliocladina C por las correlaciones observadas en el espectro NOESY, las cuales se indican en la figura 41. Además se encontró en bibliografía que este producto natural fue sintetizado enantioselectivamente pudiendo así determinarse su configuración absoluta como (5aR, 10bS)[5]. En ese trabajo algunos datos espectroscópicos de RMN-^{13}C del producto diferían de los informados para el producto natural, tal como la señal asignada al C-3´ (122.8 ppm, natural; 116.6 ppm, sintético). Cabe destacar que el valor observado para todas las señales de RMN-^{13}C del compuesto **8** fueron coincidentes con las del producto sintético. Probablemente el producto natural no esté correctamente asignado y los autores no hayan observado alguna señal de carbonos cuaternarios de baja intensidad. El poder rotatorio de **8** ($[\alpha]_D$ +134, c 0.08 en Cl_3CH) coincidió con el valor de literatura correspondiente al metabolito aislado a partir de la cepa marina *Gliocladium roseum*[2].

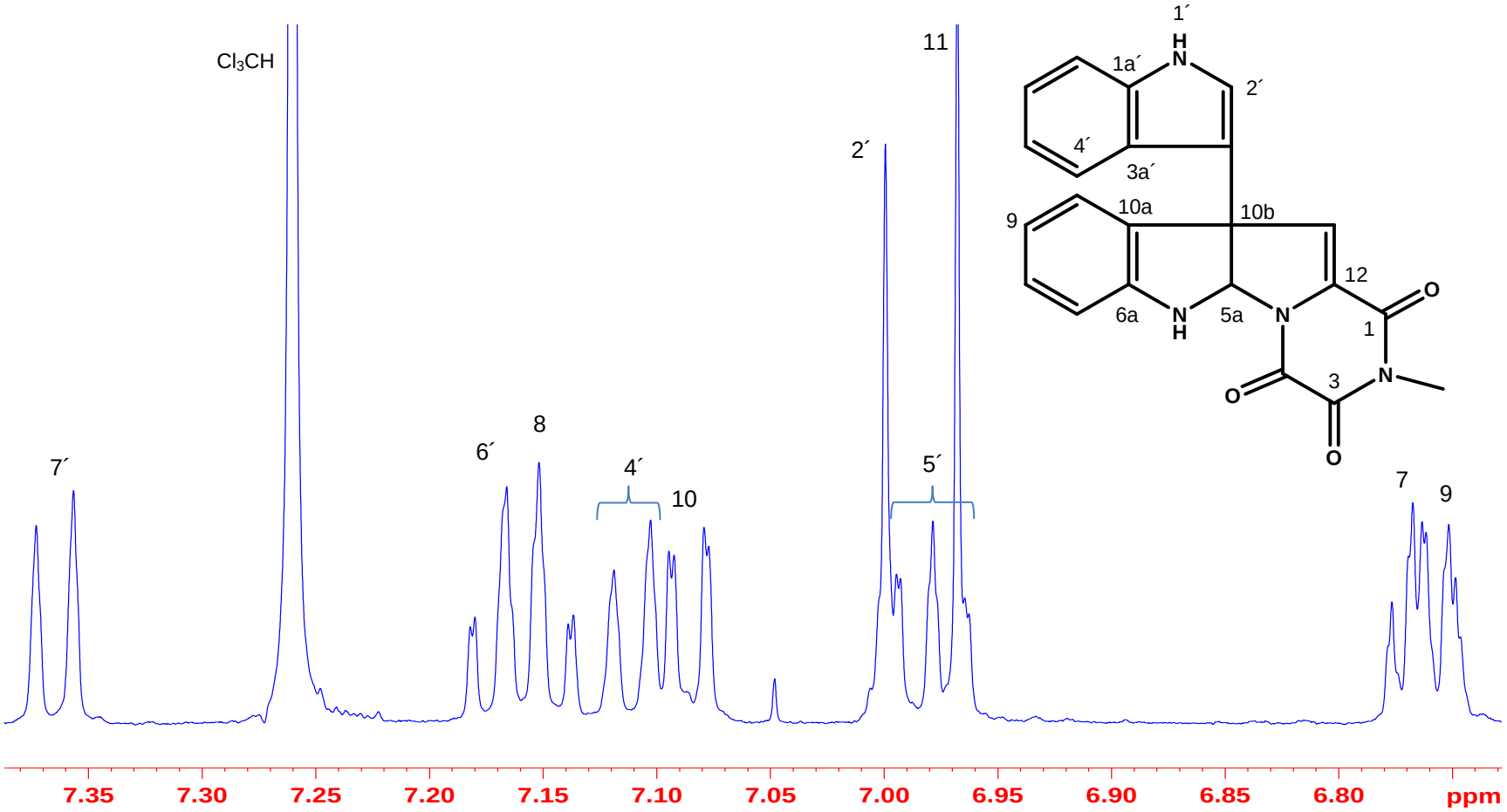


Figura 40. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **8** realizado en ventana de zona aromática.

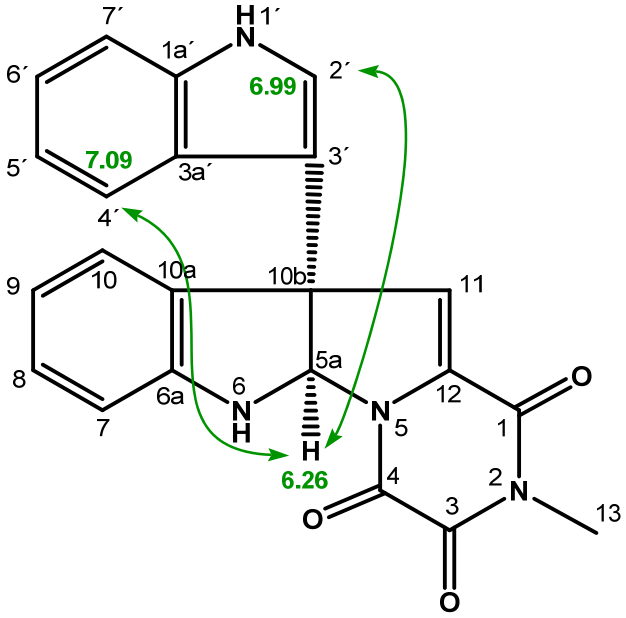


Figura 41. Correlaciones vía NOE observadas para el compuesto **8**.

Compuesto 9

La fórmula molecular del compuesto **9** fue determinada como $C_{24}H_{24}N_4O_3S_2$ por espectrometría de masa, utilizando la técnica de ionización ESI (*m/z* 480.1291 $[M+H]^+$). El número de insaturaciones calculado en base a la fórmula molecular es 17.

En el espectro RMN-^{1}H (CD_3OD) (figura 42) del compuesto **9** se observaron señales aromáticas con un patrón similar al que presentó el compuesto **8** con cuatro multipletes a δ 7.86, 7.37, 7.30 y 7.07 ppm, dos multipletes superpuestos a δ 7.02 y 6.99 ppm y dos multipletes superpuestos a δ 6.61 y 6.59 ppm.

Se observaron además en el espectro RMN-^{1}H siete señales singulete, tres de las cuales integraban para tres hidrógenos cada una y cuyos desplazamientos eran 3.06, 2.44 y 2.05 ppm respectivamente. De los desplazamientos químicos para estos singuletes se podía deducir que las señales correspondían a ^{1}H de metilos unidos a heteroátomos, dobles enlaces o carbonilo en el caso de la última. Los tres singuletes restantes integraban para un hidrógeno cada uno y sus desplazamientos químicos respectivos eran 7.15, 6.35, 5.28 y 4.90 ppm. A diferencia del espectro RMN-^{1}H del compuesto **8**, donde se observaban tres singuletes entre δ 6 y 7 ppm, en el compuesto **9**

en cambio aparecían sólo dos singuletes en ese rango, las señales a δ 7.15 y 6.35 ppm, y aparecía un tercer singulete a δ 5.28 ppm; el desplazamiento químico de una ppm menor que en el caso anterior indicaba una clara diferencia en esa parte de la estructura de la molécula (H-11 para el compuesto **8**).

Las señales descriptas se muestran en la figura 42, donde se presenta el espectro RMN-^{1}H del compuesto **9**.

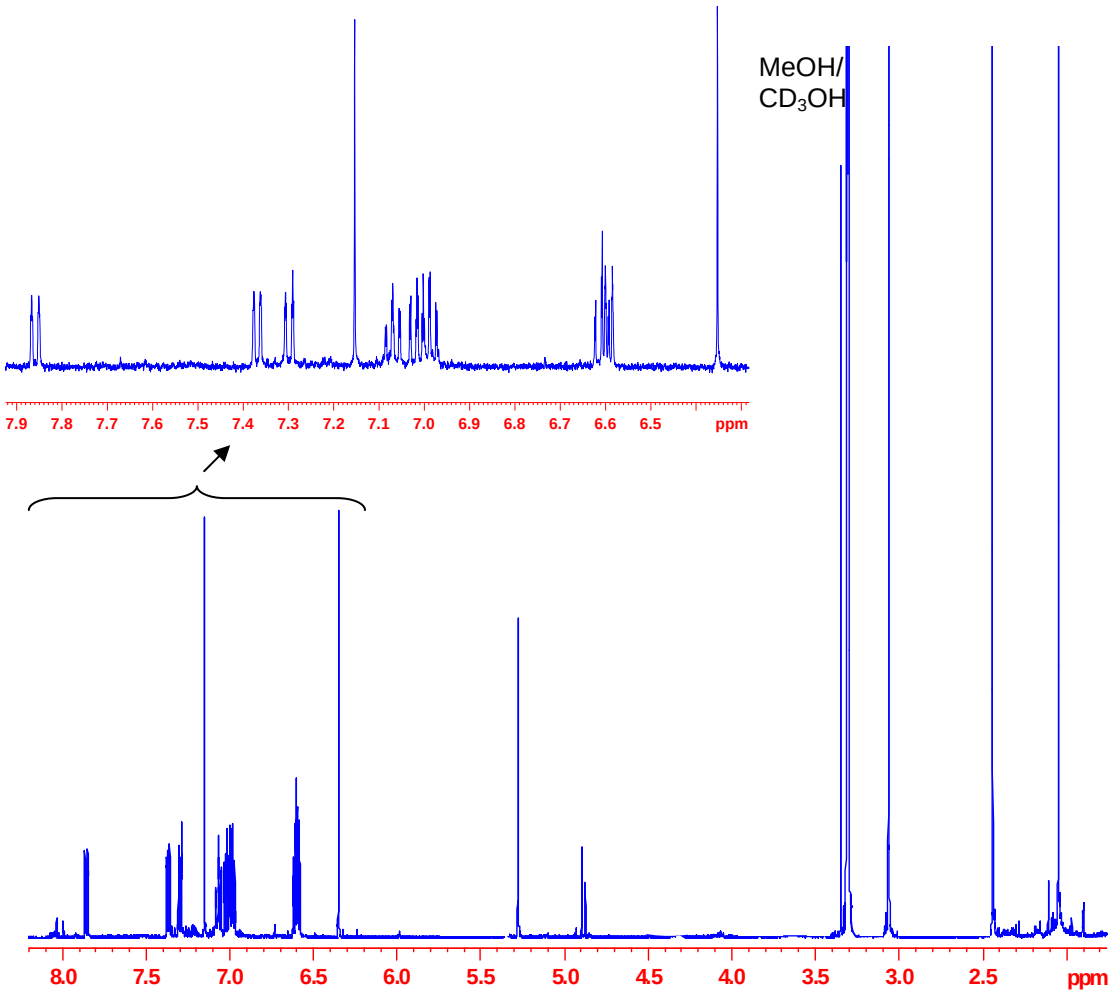


Figura 42. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **9** en CD_3OD.

A diferencia de lo observado para el compuesto **8**, en el espectro RMN-^{13}C del compuesto **9** se encontraron únicamente dos señales correspondientes a carbonilos a δ 164.8 y 164.6 ppm y se observaron además dos señales con desplazamientos químicos a

16.9 y 14.7 ppm, las cuales mostraron correlación en el espectro HSQC con los singuletes a δ 2.44 y 2.05 ppm respectivamente, asignándose a metilos unidos a un heteroátomo de S.

A partir del análisis del espectro COSY pudo establecerse correlación entre las señales a δ 6.59 y 6.99 ppm, δ 6.99 y 6.61 ppm y δ 6.61 y 7.37 ppm por un lado, y por otro lado entre las señales a δ 7.86 y 7.02 ppm y δ 7.30 y 7.07 ppm. Estas correlaciones indicaban, al igual que para el compuesto **8**, la presencia de dos sistemas aromáticos no acoplados entre sí.

El espectro HMBC de **9** (figuras 43 y 44) mostró correlaciones entre los protones a 7.86, 7.15 y 7.07 ppm y la señal de carbono cuaternario a 137.2 ppm, análogamente a lo observado para las señales del fragmento indólico en **8**. En el mismo espectro se observaron correlaciones entre las señales a 7.37, 6.99 y 6.35 ppm con la señal de carbono a 148.5 ppm, situación comparable a lo observado para las señales de la subestructura pirrolidinindólica en **8**. Sumado a esto se observaron correlaciones entre las señales aromáticas a 6.61 y 6.59 ppm y la señal de carbono a 132.7 ppm, y se observó que el singulete a 5.28 también correlacionaba con esa misma señal y con la señal a 80.7 ppm, señal que por el experimento HSQC se asignaba al carbono directamente unido al protón cuya señal salía a 6.35 ppm.

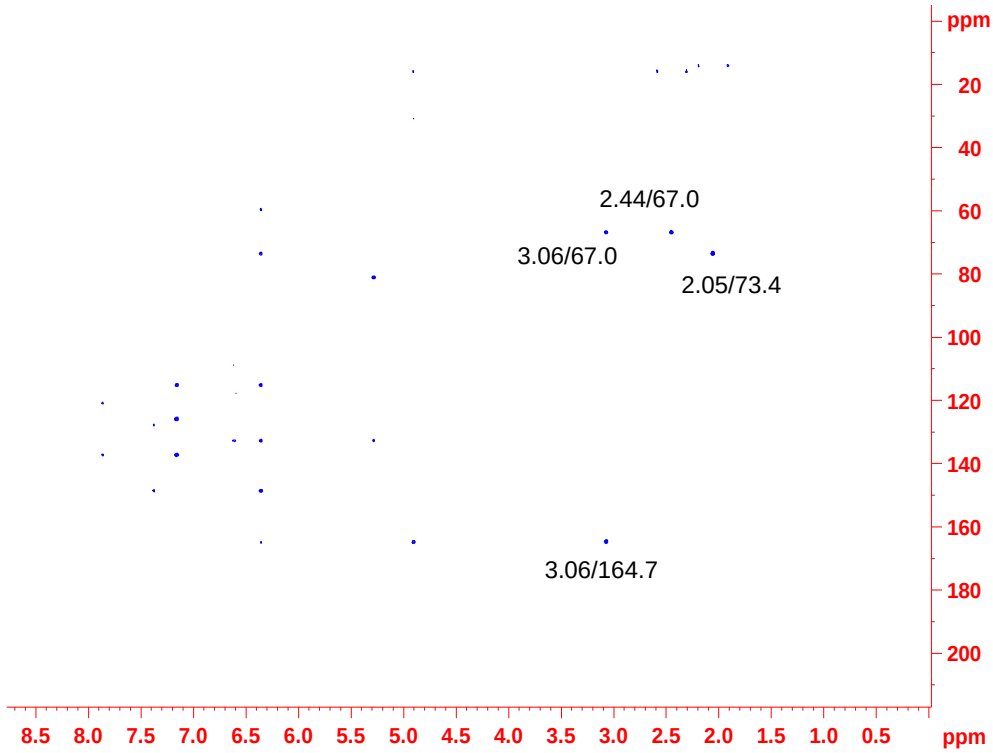


Figura 43. Espectro HMBC del compuesto **9**.

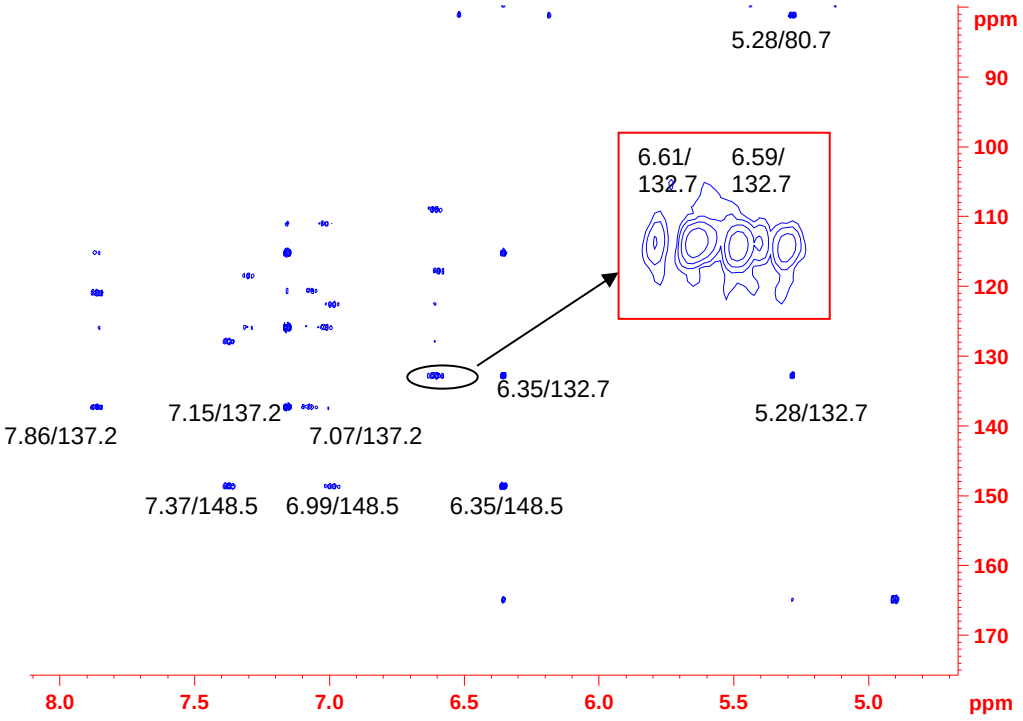


Figura 44. Ampliación del espectro HMBC del compuesto **9**.

Por otra parte, en el mismo espectro se observaron correlaciones entre las señales de los metilos unidos a heteroátomos y la señal de carbonilo a 164.6 ppm y las señales de carbono a 73.4 y 67.0 ppm, como se muestra en la figura 45.

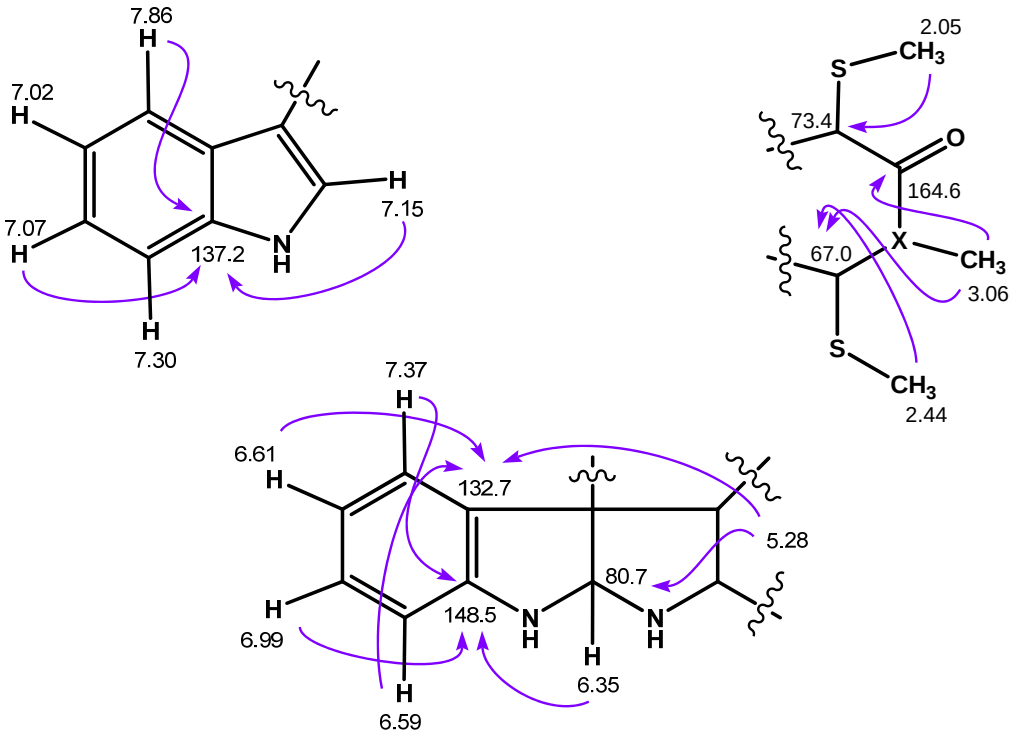


Figura 45. Subestructuras propuestas y correlaciones HMBC del compuesto **9**.

Teniendo en cuenta los fragmentos elucidados de la molécula, que se trata de un metabolito relacionado con el compuesto **8**, y con la ayuda de la base de datos Heterocycles database[1] se propuso que el compuesto **9** hallado correspondía al metabolito conocido como Gliocladina A[2]. En la figura 46 se exhibe una ampliación del espectro RMN-^{1}H con las señales aromáticas asignadas.

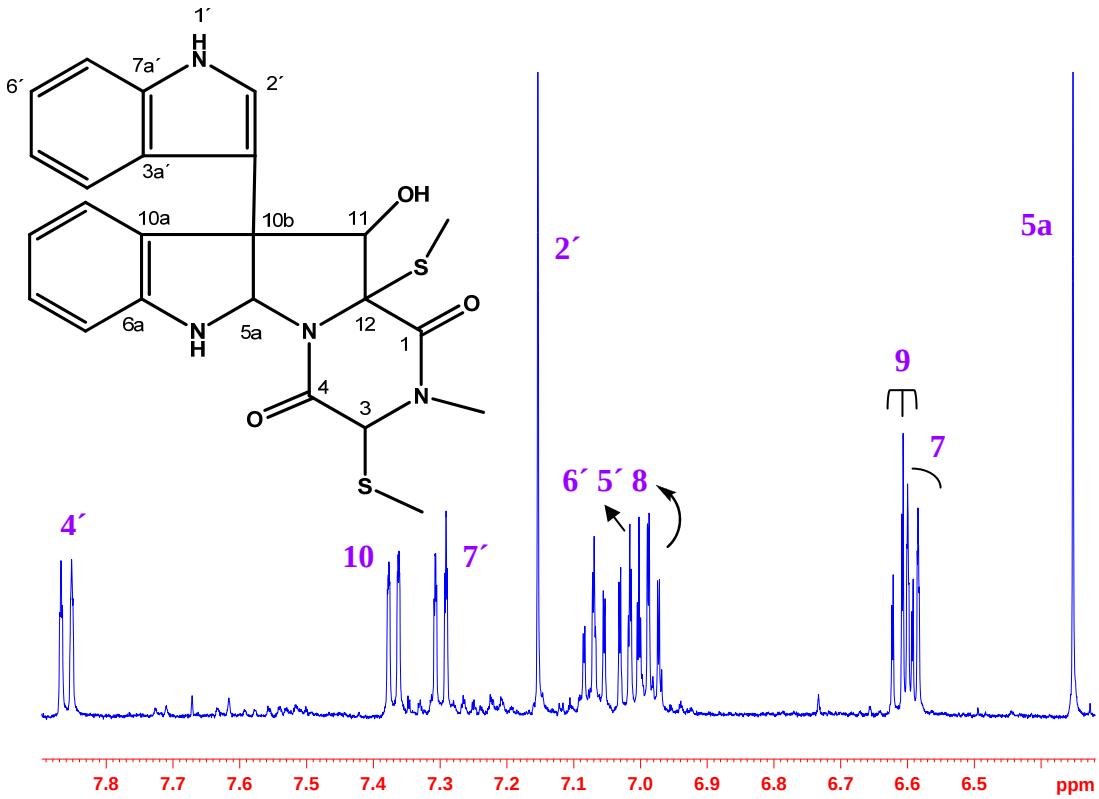


Figura 46. Ampliación de la zona aromática del espectro RMN-^{1}H del compuesto **9**.

En el espectro NOESY se observaron correlaciones entre las señales a δ 5.28 (H-11) y 2.05 ppm (SCH_3) y entre 7.37 (H-10) y 5.28 ppm. Además se observó una correlación entre los hidrógenos en posición 5a y 2´ (δ 6.35 y 7.15 ppm), corroborándose mediante este experimento que el compuesto **9** presenta la misma estereoquímica relativa que la reportada para la gliocladina A (figura 47).

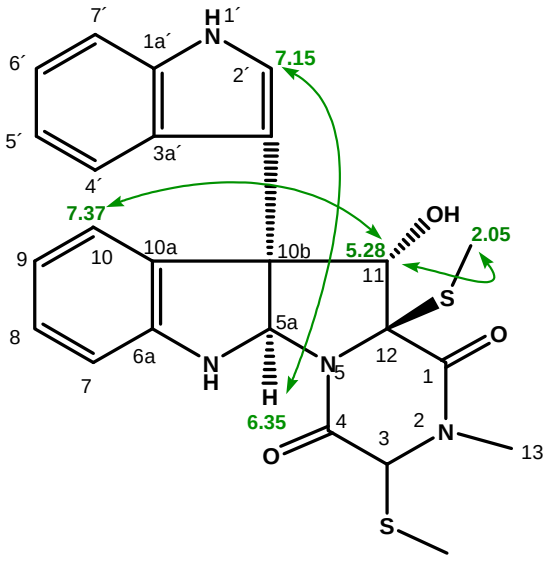


Figura 47. Correlaciones NOE observadas para el compuesto **9**.

La gliocladina A fue aislada previamente junto con la gliocladina C a partir de una cepa fúngica marina de *Gliocladium roseum*[2]. El poder rotatorio de **9** ($[\alpha]_D$ +245, c 0.05 en Cl_3CH) y los datos espectroscópicos medidos coincidieron fehacientemente con los informados para la gliocladina A ($[\alpha]_D$ +263, c 0.14 en Cl_3CH). Cabe mencionar que no se ha determinado hasta el momento la configuración absoluta de este metabolito.

Como se mencionó, los compuestos **8** y **9** fueron hallados previamente a partir de una cepa de un hongo marino *Gliocladium* y a pesar de que se espera que las especies de microorganismos marinos produzcan metabolitos notablemente diferentes de los producidos por cepas terrestres, el hecho de haber encontrado los mismos metabolitos en la cepa terrestre *G. catenulatum* indicaría que la producción de los mismos depende en mayor medida de la especie y no de la fuente de la que procede la cepa.

Compuesto 10

La fórmula molecular del compuesto **10** fue determinada como $C_{16}H_{12}N_2$ por espectrometría de masa de alta resolución, utilizando la técnica de ionización ESI que exhibió al ión $[M+H]^+$ de *m/z* 233.1072, como por la técnica EI en cuyo espectro se observó el ión $M^{+\cdot}$ de *m/z* 232.1000.

El compuesto presentó un espectro RMN-^{1}H (Cl_3CD-CD_3OD 95:5) simple, donde se observaron cinco señales en la zona aromática. Se observaron dos dobletes a δ 7.85 y 7.47 ppm, un singulete a δ 7.51 ppm, un triplete a 7.22 ppm y un doble doblete a δ 7.14 ppm. Cada una de las señales integraba para un hidrógeno (figura 48).

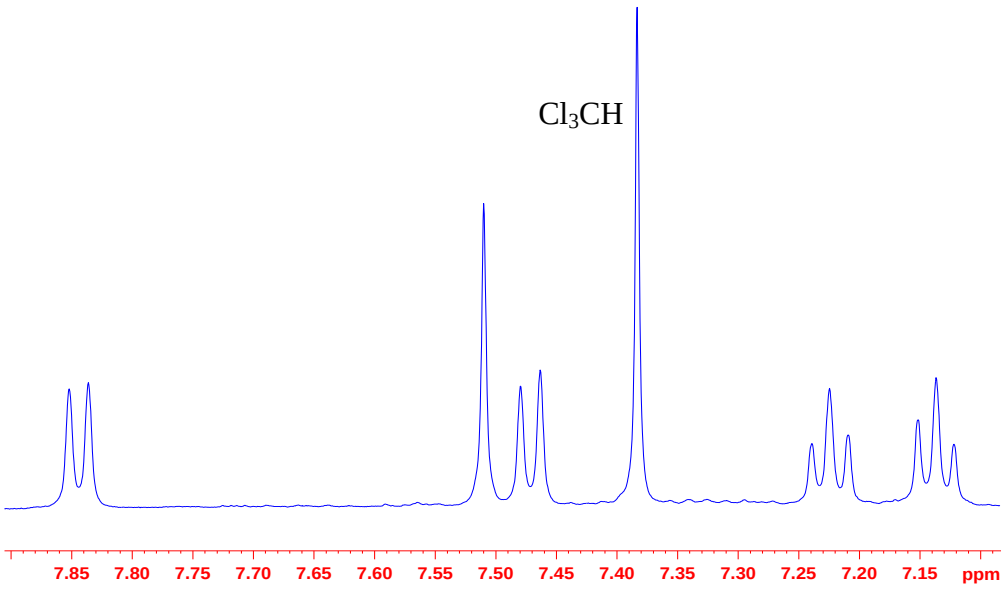


Figura 48. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **10** (Cl_3CD-CD_3COD 95:5).

Analizando el espectro COSY (figura 49) pudieron hallarse fácilmente los hidrógenos adyacentes entre sí del compuesto, observándose que la señal a δ 7.85 ppm correlacionaba con el doble doblete a δ 7.14 ppm, el doblete a δ 7.47 ppm correlacionaba con la señal a δ 7.22 ppm y que las señales a δ 7.22 y 7.14 ppm correlacionaban entre sí, tratándose entonces de cuatro metinos consecutivos.

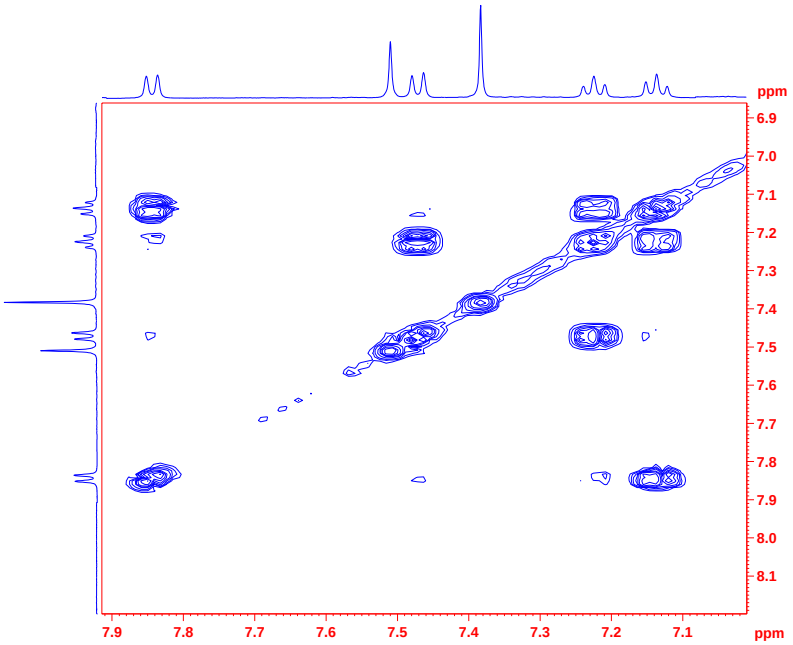


Figura 49. Espectro COSY del compuesto **10** (Cl_3CD-CD_3COD 95:5).

En el espectro de RMN-^{13}C se identificaron tres señales correspondientes a carbonos cuaternarios a δ 136.7, 126.8 y 110.8 ppm, además de las señales correspondientes a los carbonos de los metinos a δ 121.9 ppm, 121.8 ppm, 120.2 ppm, 119.4 ppm y 111.5 ppm, que pudieron correlacionarse con las señales de los hidrógenos directamente unidos observando el espectro HSQC. Teniendo en cuenta la cantidad de hidrógenos (5) y carbonos (8) observados en los espectros RMN unidimensionales y la fórmula molecular obtenida por espectrometría de masa, se dedujo que el compuesto debía presentar una estructura simétrica dimérica. Entonces, la integración para cada señal observada en los espectros RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto correspondía al doble de hidrógenos y carbonos respectivamente.

Con el espectro HMBC (figura 50) pudo proponerse una estructura indólica para el compuesto **10** a partir de la observación de correlaciones entre las señales a δ 7.85 y 7.51 ppm, correspondientes a H-4 y H-2 y los carbonos a δ 110.8 ppm (C-3) y 136.7 ppm (C-7a) (figura 51).

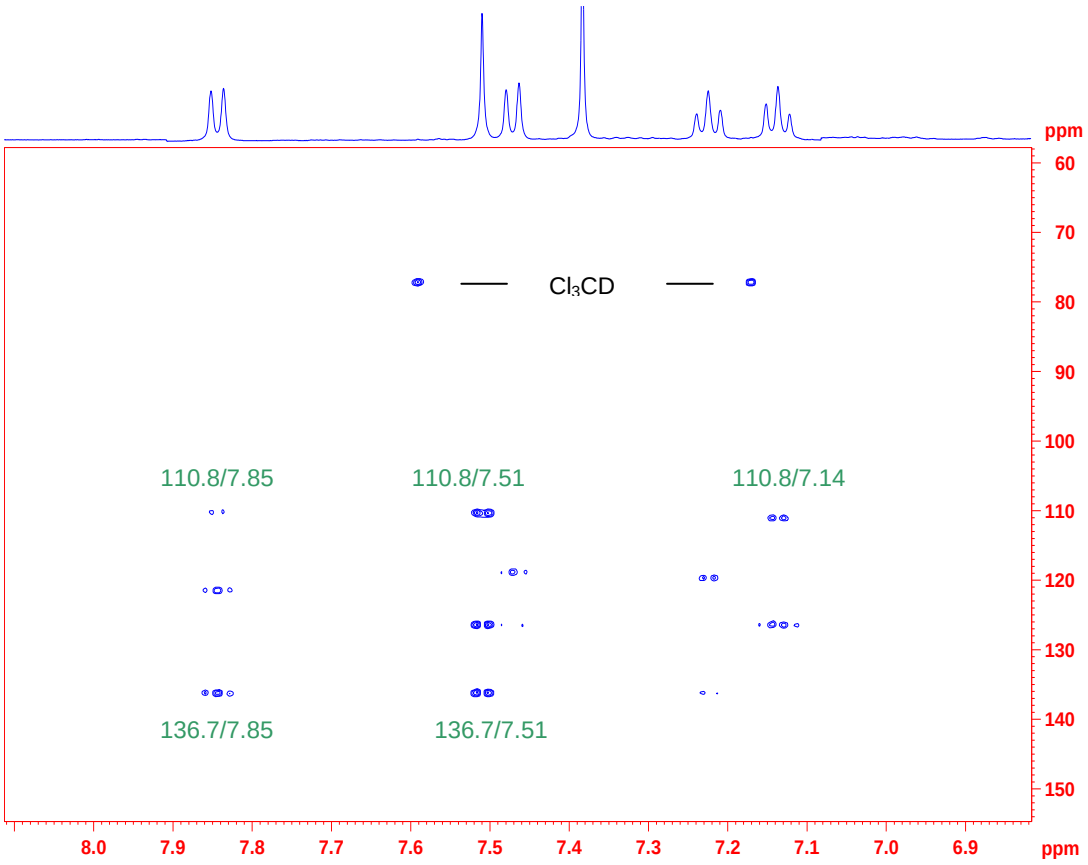


Figura 50. Espectro HMBC del compuesto **10** (Cl_3CD-CD_3COD 95:5).

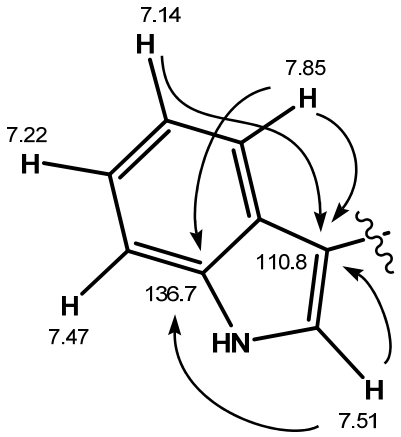


Figura 51. Subestructura del compuesto **10** y correlaciones por HMBC.

Para corroborar que el ion observado por ESI correspondía efectivamente a un dímero y que no era un artefacto producido en la fuente, se realizó un espectro de masa empleando una fuente de fotoionización a presión atmosférica APPI. En este experimento se observaron los iones de *m/z* 233.1074 ($[M+H]^+$) y *m/z* 232.1000 ($M^{+\cdot}$) que confirmaron la fórmula molecular obtenida previamente. También se realizó un experimento de EM/EM sobre el ion de *m/z* 233.1 con la fuente APPI observándose un fragmento de muy baja intensidad correspondiente al monómero, lo cual también confirma la estructura dimérica del compuesto **10**.

La estructura del compuesto **10** corresponde entonces a 1H,1'H-[3,3']biindol.

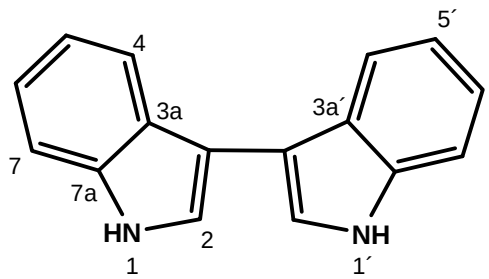
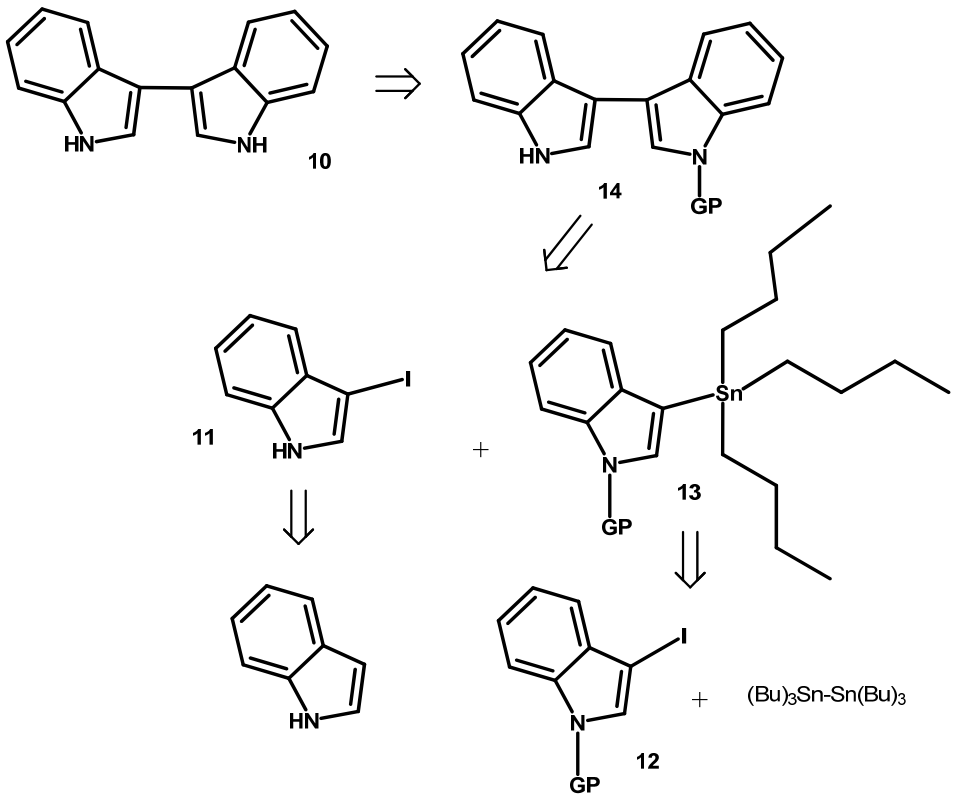


Figura 52. Compuesto **10**.

Este compuesto no había sido aislado previamente de fuentes naturales, sin embargo había sido sintetizado como intermediario en la preparación de ligandos de

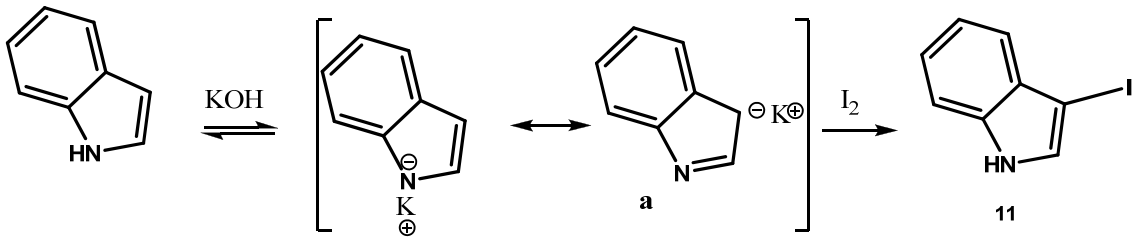
metales de transición en complejos que se utilizan como catalizadores[6]. Los datos espectroscópicos resultaron coincidentes con los de la literatura.

Debido a la actividad que presentó este compuesto, que se mencionará más adelante, y con el objetivo de preparar análogos de este compuesto en el futuro se estudió el camino sintético para obtener el acoplamiento entre índoles para lo cual se propuso llevar a cabo una reacción de Stille[7-10], partiendo de 1H-3-yodoindol y 1-(t-butoxicarbonil)-3-tributilestanilindol (esquema 3) o una reacción de Suzuki (esquema 7).



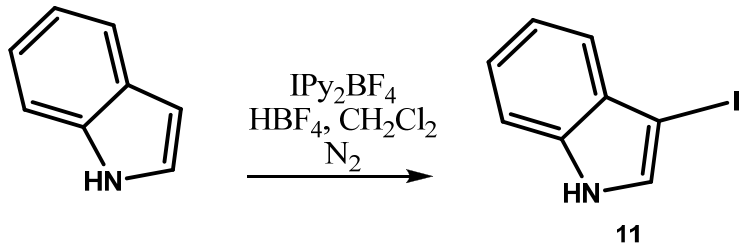
Esquema 3. Retrosíntesis para el compuesto **10**.

En cualquiera de los casos el primer paso consiste en la yodación del indol en la posición 3. Inicialmente se ensayó la halogenación utilizando I_2 y pellets de KOH en DMF a temperatura ambiente durante una hora[11]. Para yodar la posición 3 del indol era importante que no estuviese protegido en 1 porque en ese caso se reduciría mucho la velocidad y sería necesario utilizar condiciones más drásticas, al no poder generarse la especie **a**, como se plantea en el esquema 4[12].



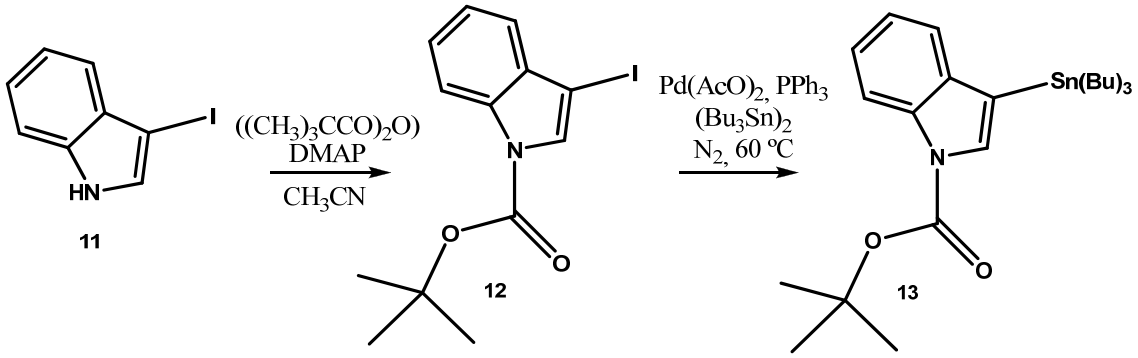
Esquema 4. Reacción de yodación de 1H-indol en posición 3.

Como fue necesario purificar cromatográficamente el intermediario **11** para separarlo del reactivo de partida, disminuyó el rendimiento por la labilidad del halógeno por lo que se utilizó otro método para su preparación que resultó en una reacción completa. En ese caso la halogenación se produjo en presencia del reactivo comercial tetrafluoroborato de bis(piridin)yodo (I) (IPy_2BF_4) y HBF_4[13-15] (esquema 5).



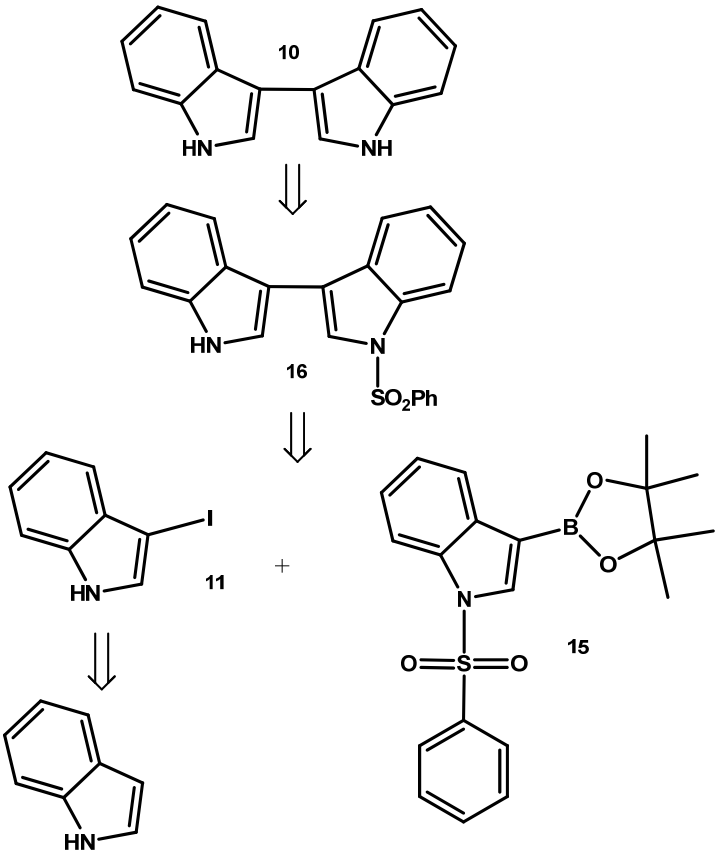
Esquema 5. Obtención del compuesto **11** utilizando IPy_2BF_4.

El compuesto **11** además era necesario como reactivo de partida para obtener **12** y luego **13** por el camino de la reacción de Stille (esquema 6)[16]. Para preparar **12** se hizo reaccionar **11** en CH_3CN con di-t-butildicarbonato en presencia de DMAP, en oscuridad durante 1 hora[17]. Como grupo protector se eligió BOC por su accesibilidad, estabilidad en medio básico y porque su labilidad facilitaría la desprotección en condiciones relativamente suaves[18-20].



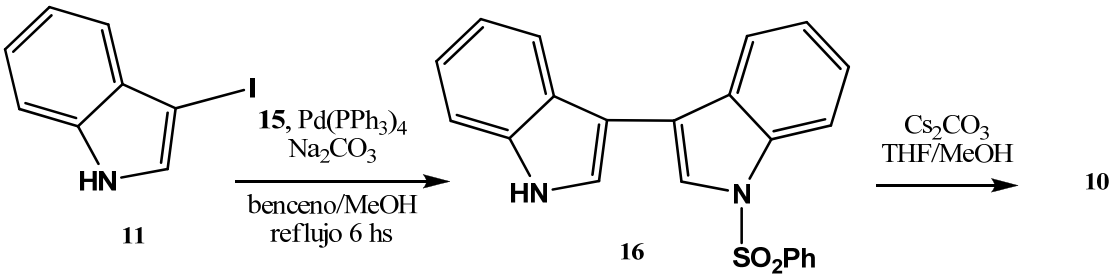
Esquema 6. Protección del 1H-3-yodoindol y preparación de **13**.

Con el fin de sintetizar el compuesto **13** se disolvió el reactivo **12** en DMF y se dejó reaccionar con hexabutildiestannano en una reacción catalizada por $Pd(PPh_3)_4$, en atmósfera de N_2 a 60ºC[21,22]. A partir de esa reacción se obtuvo una mezcla compleja de productos[23-25] por lo que se ensayó el camino vía una reacción de Suzuki-Miyaura[26] como ruta sintética partiendo de 1H-3-yodoindol y el reactivo comercial **15** (esquema 7).



Esquema 7. Retrosíntesis para el compuesto **10**.

La reacción de Suzuki entre **11** y **15** se llevó a cabo en benceno/MeOH a reflujo, en presencia de cantidades catalíticas de tetrakis(trifenilfosfina)paladio y solución acuosa de Na_2CO_3, obteniéndose **16** que a su vez rindió **10** por desprotección con un rendimiento global de 35 % (esquema 8)[26-28].



Esquema 8. Preparación del compuesto **10** según una reacción de Suzuki-Miyaura.

La obtención de **16** se verificó por ESI-EM donde se observó el ion *m/z* 373.1025 ($[M+H]^+$) correspondiente a $C_{22}H_{17}N_2O_2S$ y una vez purificado se caracterizó mediante espectroscopía RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, COSY, HSQC y HMBC. En las figuras 53 y 54 se muestra el espectro RMN-^{1}H asignado.

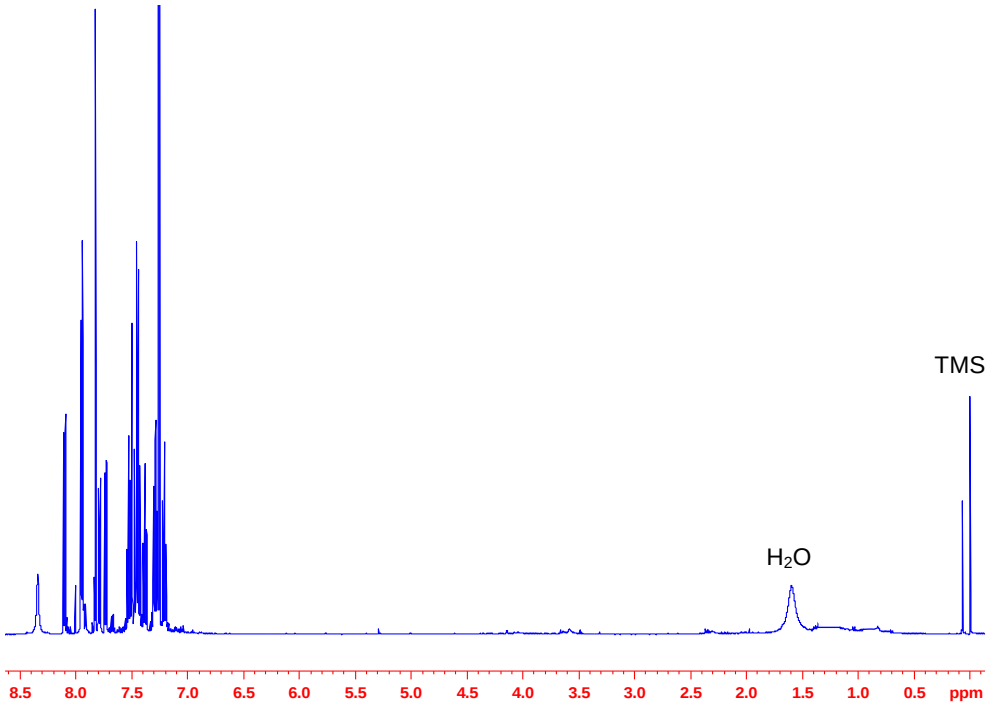


Figura 53. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **16**.

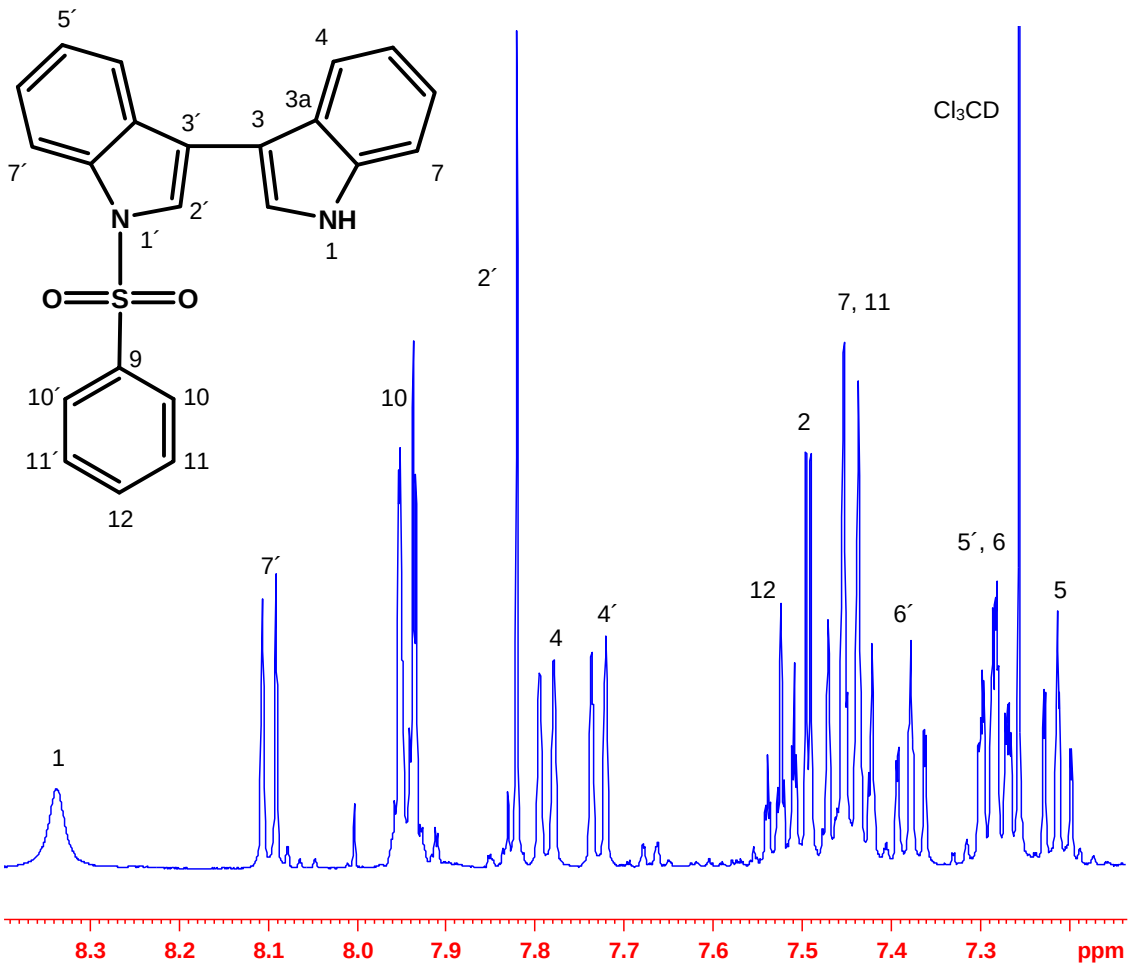


Figura 54. Ampliación del espectro RMN-^{1}H del compuesto **16**.

Actividad biológica

Los metabolitos aislados se sometieron a ensayos de actividad antifúngica y antimicrobiana. En el primer caso se estudió el efecto de los compuestos frente a hongos fitopatógenos, observándose una leve actividad inhibitoria del compuesto **10** contra *Fusarium lateritium* (halo de inhibición de 5 mm). No se observó actividad frente al resto de los fitopatógenos para ninguno de los tres compuestos obtenidos.

Los ensayos antimicrobianos se realizaron contra *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*, y los resultados fueron negativos en todos los casos. Se probó además la actividad

contra la bacteria *Paenibacillus larvae*, que es el agente responsable de la enfermedad loque americana. Esta enfermedad afecta a las larvas de abejas melíferas, provocando pérdidas significativas en la producción de miel a nivel nacional[29,30]. El compuesto **10** resultó activo, presentando halos de inhibición de 15 mm para una dosis de 50µg/disco. Los testigos, los antibióticos de amplio espectro gentamicina y oxitetraciclina presentaron halos de inhibición de 25-30 mm en dosis de 25 µg/disco. Este resultado es bueno considerando la baja difusividad en agar de **10** comparada por ejemplo con gentamicina[31] y a su especificidad.

El metabolito **10** fue sometido a ensayos antiparasitarios frente a *Trypanosoma cruzi*, agente responsable de la enfermedad de Chagas, por el Dr. Mario Sosa en el Instituto de Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza). El ensayo consistió en medir el efecto antiproliferativo del compuesto frente a epimastigotes en cultivo líquido enriquecido con suero bovino fetal. Los parásitos fueron incubados en concentraciones de 2-2.5 x 10^6 células/ml, a 29ºC por 2-3 días en 4 ml de medio, en presencia y en ausencia del compuesto **10**. Se tomaron alícuotas cada 24 hs para determinar la viabilidad de las células[32]. Los resultados se exhiben en la figura 55, donde se puede observar que las curvas de concentración de parásitos disminuyen con el aumento de concentración de **10**.

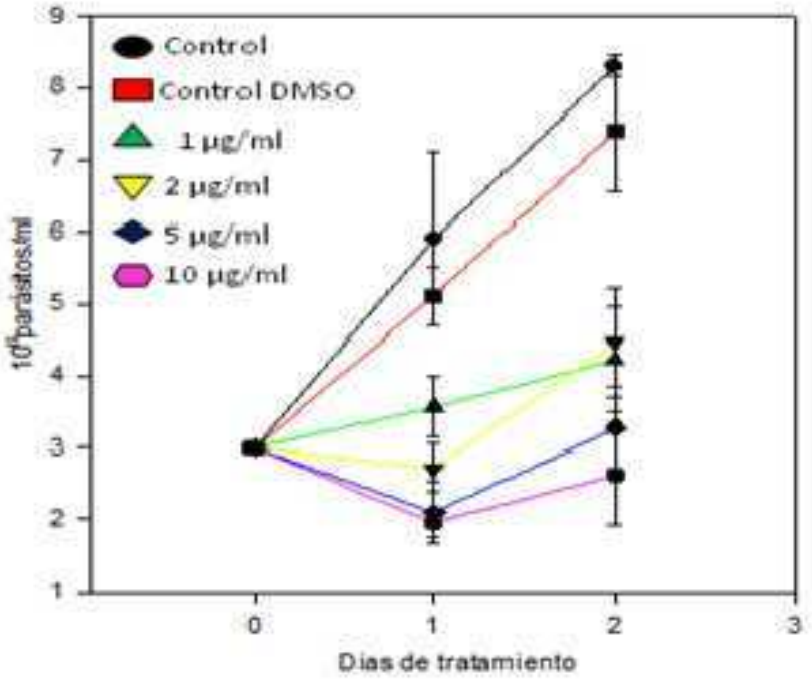


Figura 55. Concentración de parásitos *T. cruzi* en función de los días de tratamiento y concentración de **10**.

Se observó un efecto antiproliferativo desde concentraciones de 1 µg/ml, y que la actividad de **10** fue reversible en períodos de 2 días (figura 55). Cabe mencionar que las manifestaciones clínicas de Chagas son responsabilidad de amastigotes (enfermedad crónica) y trypomastigotes (aguda) por lo tanto estos resultados no necesariamente indican eficacia en las formas infectivas. Otros ensayos serán realizados próximamente.

En los ensayos se probó el efecto del DMSO por ser el solvente de disolución utilizado y la droga trypanocida benznidazol, cuyo IC_{50} en este ensayo es 12 µg/ml.

Se encontró en la literatura que las gliocladinas A y C presentan actividad citotóxica frente a la línea celular de leucemia linfocítica P388. Este tipo de actividad citotóxica es una propiedad ampliamente conocida de las epipolitiodioxopiperazinas (ETP)[33], una familia grande de toxinas fúngicas estructuralmente relacionadas con las gliocladinas sobre la que se comentará más adelante.

Antecedentes de epipolitiodioxopiperazinas y derivados

Las epipolitiodioxopiperazinas (ETP) son una familia de toxinas fúngicas, cuya característica estructural es la presencia de puentes disulfuro que les permite asociarse a proteínas y formar especies reactivas oxigenadas vía ciclación redox (figura 56). La diversidad estructural de las ETP radica en los aminoácidos que forman el esqueleto y modificaciones en los mismos. Todas las ETP naturales conocidas hasta el momento contienen al menos un aminoácido aromático[33]. Debido a que poseen un vasto espectro de actividades estos metabolitos han llamado la atención y han sido ampliamente estudiados desde esa perspectiva[34].

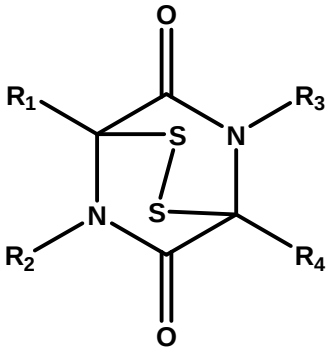
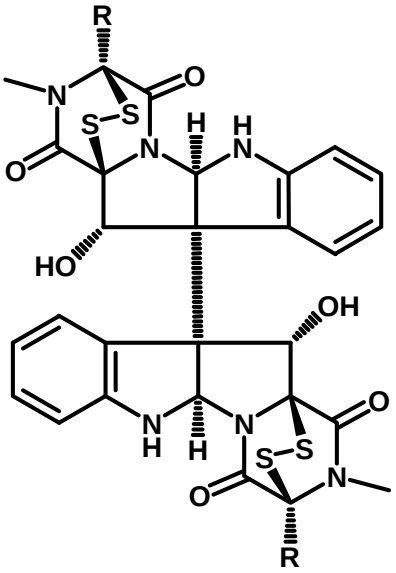
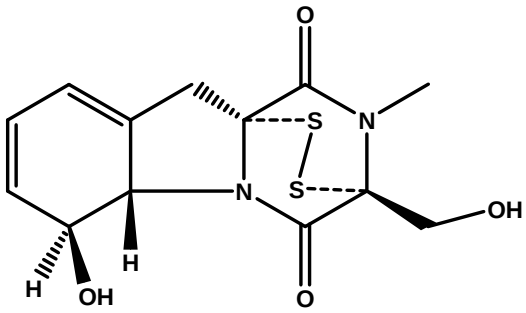


Figura 56. Estructura general de las ETP.

La primera ETP descubierta y la más estudiada es la gliotoxina (figura 57), que se aisló por primera vez a partir de *Gliocladium fimbriatum*[35,36], y luego fue encontrada principalmente en *Aspergillus fumigatus*[37-43] y también en algunas especies de *Gliocladium*[44,45]. Dentro de esta familia de compuestos las verticilinas son producidas por Sordariomycetes y Eurotiomycetes, y la caetomina, una molécula muy relacionada estructuralmente, es producida por Sordariomycetes y Dothideomycetes[33]. Entre las verticilinas, la D (figura 57) ha sido aislada previamente a partir de una cepa de *G. catenulatum*[46].





Gliotoxina

R: $CH(OH)CH_3$ Verticilina D

R: CH_2OH Caetomina

Figura 57. Epipolitiodioxopiperazinas naturales aisladas a partir de otras cepas de *G. catenulatum*.

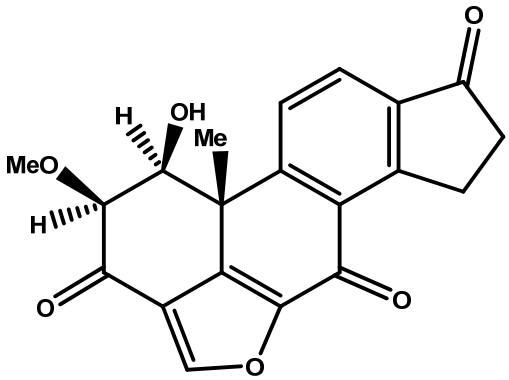
Se conocen además la emestrina, una ETP que es inhibidora de la respiración miotocondrial que se ha aislado a partir de *Emericella sp.*[47]; las epicorazinas, que poseen propiedades antibióticas[48-50], y las leptosinas producidas por *Leptosphaeria sp.*[51]. Se han encontrado algunas otras ETP muy relacionadas estructuralmente a las mencionadas, a partir de diversas especies como *Penicillium sp.*, *Candida albicans*, *Sirodesmium diversum*, *Chaetomium sp.*, *Verticillium sp.*, y *Hyalodendron sp.*[33]

Antecedentes de compuestos aislados de cepas de la misma familia

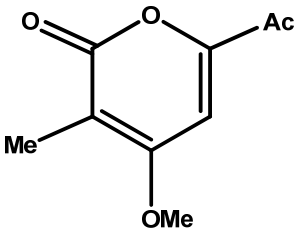
A partir de cultivos de *G. flavofuscum* y *viridens* se han aislado los metabolitos viridina y viridiol, junto con gliotoxina y metabolitos relacionados, que han sido muy estudiados por sus propiedades antitumorales (figura 58)[52,53].

También se han encontrado metabolitos de bajo peso molecular como nectriapirona y vermopirona producidas por *G. vermoesenii*[54].

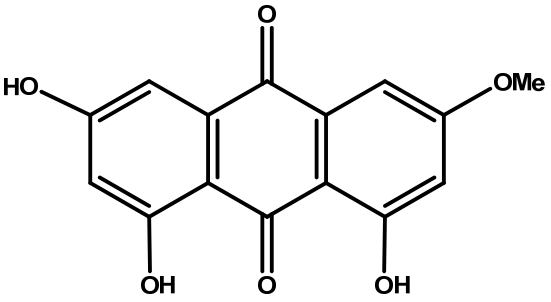
Como se mencionó anteriormente, se han aislado las verticilinas D, E y F a partir de una de cepa de *G. catenulatum*, y cabe mencionar la obtención del antibiótico policétido TMC-151 a partir de la misma cepa por Okuda en el año 2000[55]. Además se han aislado metabolitos con propiedades antitumorales producidos por *G. catenulatum*, entre ellos algunas antraquinonas como emodina, citreoroseina y lunatina[56].



Viridina



Vermopirona

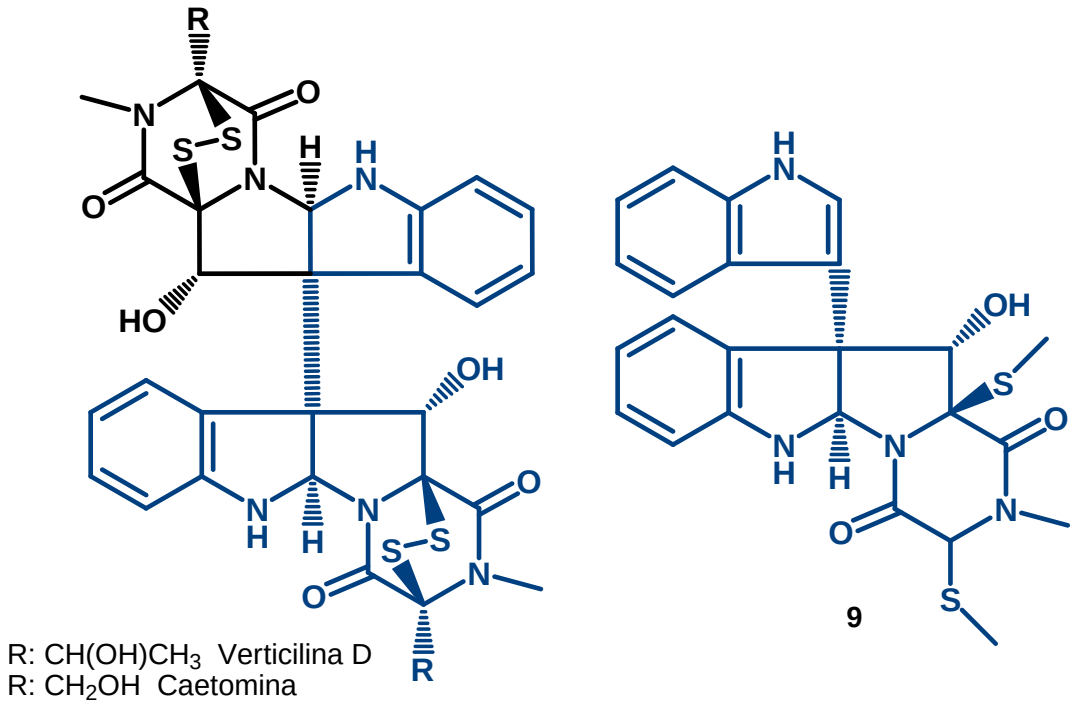


Lunatina

Figura 58. Algunos metabolitos secundarios producidos por *Gliocladium*.

Biosíntesis

El compuesto **9** probablemente deriva de una ETP tal como caetomina o alguna verticilina como se desprende de la comparación de sus estructuras (figura 59). Los compuestos **8** y **10** posiblemente sean, a su vez, metabolitos derivados del compuesto **9** ya que están estructuralmente muy relacionados. La biosíntesis de las ETP no se conoce detalladamente y su principal rol fisiológico no ha sido estudiado hasta el momento a pesar de su importancia y de los estudios extensivos sobre sus propiedades biológicas. En los últimos años ha cobrado importancia la investigación en la biosíntesis de gliotoxina (figura 57) y se han podido identificar serina y fenilalanina como precursores, y clusters de genes involucrados en su formación[57-59].



R: $CH(OH)CH_3$ Verticilina D
R: CH_2OH Caetomina

Figura 59. Estructuras de verticilina D, caetomina y compuesto **9**.

Conclusiones

Se llevó a cabo satisfactoriamente el aislamiento y la elucidación estructural de de los metabolitos responsables de la actividad que presentó la cepa *G. catenulatum* en los ensayos preliminares. Se encontraron dos metabolitos caracterizados con anterioridad[2], y un compuesto no informado previamente como producto natural.

En los ensayos *in vitro* de actividad antimicrobiana el metabolito nuevo **10** arrojó buenos resultados, siendo específicamente activo frente al patógeno de larvas de abejas *P. larvae* (halo de 15 mm, 50 µg/disco). Además exhibió propiedades como trypanocida actuando como antiproliferativo, de manera reversible, a bajas concentraciones (desde 1 µg/ml).

Este trabajo fue publicado en el año 2010 en la revista *The Journal of Antibiotics*.

Detalles Experimentales

Cultivo de *G. catenulatum*

A partir de una cepa de *G. catenulatum* crecida en agar se inocularon cinco erlenmeyers de 250 ml conteniendo cada uno 75 ml de extracto de malta 30% cuya composición se describe detalladamente en la parte experimental general, capítulo 7. El inóculo se hizo introduciendo en el medio líquido un corte del micelio del hongo (de 1 x 1 cm aproximadamente) crecido sobre medio agarizado en cajas de Petri. Al cabo de una semana el contenido de cada erlenmeyer se utilizó para inocular 1 l del mismo medio de cultivo en cinco erlenmeyers de 5 l cada uno. La fermentación se llevó a cabo a 25º C durante 20 días en condiciones estáticas y de oscuridad.

Extracción y fraccionamiento de *G. catenulatum*

El cultivo se filtró para separar el medio del micelio. El micelio filtrado se cortó en trozos para mejorar la extracción posterior. Se utilizaron etanol y acetato de etilo como solventes de extracción de manera secuenciada; ambos extractos de juntaron y secaron a presión reducida obteniéndose un residuo de 15 g.

El residuo así obtenido se sometió a cromatografía flash en columna seca en fase reversa C-18 y se eluyó con las siguientes mezclas de solventes de polaridad decreciente: H_2O (100%), H_2O-MeOH (75:25), H_2O- MeOH (1:1), H_2O- MeOH (25:75) y MeOH (100%). Se purificó solamente la cuarta fracción (H_2O- MeOH (25:75)) por ser la única que resultó activa (frente a *P. larvae*). Con esta fracción se llevó a cabo una corrida de HPLC utilizando una columna de fase reversa (YMC C-18, 5 µm, 22.5 x 2.5 cm), con una fase móvil H_2O-MeOH 35:65, obteniéndose 5.0 mg del compuesto **10** y una mezcla de los compuestos **8** y **9**. Los compuestos **8** y **9** se separaron mediante ccd preparativa en silica gel (CH_2Cl_2:MeOH, 97:3, $Rf_{\mathbf{8}}$ = 0.67, $Rf_{\mathbf{9}}$ = 0.43), obteniéndose 2 mg de cada uno.

Propiedades físicas de los compuestos aislados

Los detalles de los equipos empleados se encuentran en el capítulo 7.

*Compuesto **8** (Gliocladina C)*

Sólido amorfo amarillo. $\mathbf{[\alpha]_D^{25}}$ = 134.0 (c 0.08, Cl_3CH); **RMN-^{1}H** y **RMN-^{13}C** ver tabla 7. **ESI-EM** *m/z* 385.1284 $[M+H]^+$ (calc. $C_{22}H_{17}N_2O_3$, 385.1295, Δ 2.9 ppm).

	8 (Cl_3CD)		**Gliocladina C ($(CD_3)_2CO$)**		**Gliocladina C sintética ($(CD_3)_2CO$)**	
	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H
1	157.6		158.6		158.6	
3	156.7		158.0		158.0	
4	149.8		150.7		150.7	
5a	84.3	6.26 *sa*	84.7	6.24 *d* (3.2)	84.7	6.24 *d* (2.6)
6				6.61 *da* (3.2)		6.61 *da* (1.9)
6a	147.9		149.9		149.9	
7	110.1	6.76 *m*	110.6	6.86 *da* (8.2)	110.6	6.86 *da* (7.9)
8	129.6	7.14 *dd* (7.7, 7.2)	129.7	7.13 *dda* (8.2, 7.6)	129.7	7.13 *ddd* (8.7, 7.5, 1.1)
9	120.0	6.75 *m*	119.7	6.72 *dddd* (7.6, 7.3, 1.6, 1.1)	119.6	6.72 *ddd* (7.4, 7.3, 1.0)
10	124.8	7.07 *dd* (7.8, 1.2)	125.5	7.18 *da* (7.3)	125.5	7.18 *da* (7.4)
10a	131.1		131.1		131.1	
10b	60.5		61.0		60.9	
11	129.5	6.96 *sa*	126.9	6.96 *s*	126.9	6.96 *s*
12	129.1		133.1		133.1	
13-*N*Me	27.5	3.36 *s*	27.1	3.25 *s*	27.1	3.26 *s*
1´		9.12 *sa*		10.30 *da* (1.6)		10.33 *sa*
1a´	137.1		138.5		138.5	
2´	122.4	6.99 *sa*	123.7	7.23 *d* (1.6)	123.7	7.23 *d* (2.6)
3´	115.2		122.8		116.6	
3a´	125.1		123.6		126.3	
4´	119.1	7.09 *da* (8.1)	119.7	7.33 *da* (8.2)	120.1	7.33 *dd* (8.2, 0.7)
5´	120.1	6.96 *ddd* (8.1, 7.6, 0.9)	119.7	6.90 *ddd* (8.0, 7.1, 0.9)	120.1	6.90 *ddd* (8.0, 7.1, 0.8)
6´	122.7	7.15 *ddd* (8.2, 7.6, 0.7)	120.1	7.10 *ddd* (8.2, 7.1, 1.1)	122.7	7.11 *ddd* (8.1, 7.1, 1.0)
7´	111.8	7.35 *da* (8.2)	112.6	7.43 *da* (8.2)	112.6	7.43 *da* (8.2)

Tabla 7. Datos de RMN-^{1}H y ^{13}C del compuesto **8** aislado en este trabajo, gliocladina C aislada previamente[2] y gliocladina C sintética[60].

	9 (CD_3OD)		Gliocladina A (Cl_3CD)	
	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H
1	164.6		164.6	
3	67.0	4.90 *s*	67.6	4.60 *s*
4	164.8		164.8	
5a	80.7	6.35 *s*	81.6	6.35 *s*
6		4.88 *s*		5.12 *sa*
6a	148.5		147.4	
7	108.9	6.59 *dd* (7.6, 1.1)	109.9	6.65 *da* (7.8)
8	127.8	6.99 *ddd* (7.7, 7.6, 1.3)	128.7	7.09 *dt* (7.8, 1.1)
9	118.1	6.61 *ddd* (7.7, 7.5, 1.1)	119.1	6.73 *dt* (7.8, 0.9)
10	122.3	7.37 *dd* (7.5/1.3)	123.2	7.32 *da* (7.8)
10a	132.7		131.7	
10b	59.6		58.9	
11	79.0	5.28 *s*	80.3	5.32 *da* (3.9)
12	73.4		73.2	
13-*N*Me	31.4	3.06 *s*	32.1	3.11 *s*
3-*S*Me	16.9	2.44 *s*	18.1	2.46 *s*
12-*S*Me	14.7	2.05 *s*	15.4	2.08 *s*
11-OH				3.28 *d* (3.9)
1´		8.10 *sa*		8.04 *sa*
1a´	137.2		136.9	
2´	122.4	7.15 *s*	122.9	7.11 *d* (2.5)
3´	115.0		114.9	
3a´	125.8		125.8	
4´	119.8	7.86 *ddd* (7.9, 1.2, 0.9)	121.1	7.87 *da* (7.8)
5´	118.6	7.02 *ddd* (7.9, 7.0, 1.2)	119.9	7.15 *dt* (7.8, 1.4)
6´	121.1	7.07 *ddd* (8.0, 7.0, 1.2)	122.3	7.19 *dt* (7.8, 1.4)
7´	110.9	7.30 *ddd* (8.0, 1.2, 0.9)	111.5	7.32 *da* (7.8)

Tabla 8. Datos de RMN-^{1}H y ^{13}C del compuesto **9** aislado en este trabajo y gliocladina A aislada previamente[2].

*Compuesto **9** (Gliocladina A)*

Sólido amorfo amarillo. $[\alpha]_D^{25}$ = 245.4 (c 0.05, Cl_3CH); RMN-^{1}H y RMN-^{13}C ver tabla 8. **ESI-EM** *m/z* 503.1189 $[M+Na]^+$ (calcdo. $C_{24}H_{24}N_4NaO_3S_2$, 503.1189, Δ 3.6 ppm), 481.1375 $[M+H]^+$ (calcdo. $C_{24}H_{25}N_4O_3S_2$, 481.1363, Δ 2.5 ppm).

*Compuesto **10** (1H, 1'H-[3,3']biindol)*

Sólido amorfo blanco. **UV** ($CHCl_3$) λ_{max} (log ε) 244 (4.34) nm. **RMN-^{1}H** y **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$-CD_3OD, 95:5) en tabla 9. **EMAR-EI** *m/z* 232.1000 $M^{+\cdot}$ (calc. $C_{16}H_{12}N_2$, 232.0995, Δ -2.1 ppm); **EMAR-ESI** *m/z* 233.1072 $[M+H]^+$ (calc. $C_{16}H_{13}N_2$, 233.1073, Δ 0.6 ppm); **EMAR-APPI** *m/z* 233.1074 $[M+H]^+$ (calc. $C_{16}H_{13}N_2$, 233.1073, Δ -0.5 ppm) and 232.1000 $M^{+\cdot}$ (calc. $C_{16}H_{12}N_2$, 232.0995, Δ -2.1 ppm). **EM^2-APPI** 233.1 u, EC 15 eV, *m/z*: 206.09 $[M+H-CNH]^+$ (6), 117.05 $[C_8H_7N]^+$ (2).

	Compuesto **10**		Compuesto **10** sintético	
	δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C
1, 1´				
2, 2´	7.51 s	121.8	7.51 s	121.8
3, 3´		110.8		110.8
3a, 3a´		126.8		126.8
4, 4´	7.85 (d, 7.9)	120.2	7.85 (d, 7.9)	120.2
5, 5´	7.14 (dd, 8.0, 7.7)	119.4	7.14 (ddd, 8.0, 7.5, 1.0)	119.4
6, 6´	7.22 (t, 8.1)	121.9	7.22 (ddd, 8.1, 8.0, 0.5)	121.9
7, 7´	7.47 (d, 8.1)	111.5	7.47 (d, 8.1)	111.5
7a, 7a´		136.7		136.7

Tabla 9. Datos de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **10** natural y sintético.

Síntesis de 1H,1´H-[3,3´]biindol (**10**)

i. Síntesis de 3-yodoindol (**11**):

Se disolvieron 156 mg de IPy_2BF_4 (0.42 mmol) en 2.5 ml de CH_2Cl_2 secado sobre molecular sieves (4 mesh), se añadió solución de 1H-indol (45 mg en 1.5 ml CH_2Cl_2) y finalmente 3 µl de HBF_4. Al cabo de 30 minutos la mezcla fue tratada con $Na_2S_2O_3$ (s.s.) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 5 ml). Se secó el producto a presión reducida. La reacción se siguió por ccd observándose que fue completa, obteniéndose 88 mg de producto.

*3-yodoindol (**11**)*: Sólido amorfo pardo. Dada la labilidad del compuesto se utilizó inmediatamente en el siguiente paso de reacción (síntesis de **16**).

ii. Síntesis de 1-(fenilsulfonil)-1*H*,1´*H*-3,3´-biindol (**16**):

A una solución de 32 mg de 3-yodoindol (0.13 mmol), Na_2CO_3 (2M, 2 ml) y 31 mg de $Pd(Ph_3)_4$ (0.2 meq) en benceno/MeOH 5:1 (12 ml), se agregaron 56 mg (1.1 meq) del reactivo **15** (1-(fenilsulfonil)-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-indol), y se reflujó durante 6 hs en atmósfera de N_2. Luego se agregó Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se secó a presión reducida. La mezcla se purificó por ccd preparativa (Ciclohexano-AcOEt 7:3, $Rf_{\mathbf{15}}$:0.36) obteniéndose 32 mg del intermediario **16** (0.086 mmol).

*1-(fenilsulfonil)-1H,1´H-3,3´-biindol (**16**)*: Sólido amorfo blanco. **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): 8.34 (sa, 1H, H-1); 8.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-7´); 7.94 (dd, *J* = 8.5 y 1Hz, 1H, H-10); 7.82 (s, 1H, H-2´); 7.79 (da, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-4); 7.73 (da, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4´); 7.52 (m, 1H, H-12); 7.49 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-2); 7.46[a] (da, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-7); 7.44 [a] (ta, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-11); 7.38 (dt, *J* = 7.5 y 1.1 Hz, 1H, H-6´); 7.29[b] (td, *J* = 7.5 y 1.1 Hz, 1H, H-5´); 7.28 [b] (td, *J* = 8.1 y 1.0 Hz, 1H, H-6) y 7.21 (td, *J* = 7.7 y 1.0 Hz, 1H, H-5). a, b: señales superpuestas. **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 138.4 (C-9); 136.4 (C-7a); 135.6 (C-7a´); 133.9 (C-12); 130.6 (C-3a), 129.4 (C-11, C-11´), 126.9 (C-10, C-10´); 126.4 (C-3a´); 125.1 (C-6´); 123.6 (C-6); 123.0 (C-5´); 122.6 (C-2), 122.4 (C-2´), 121.0 (C-4´),

120.6 (C-5), 120.1 (C-4), 117.7 (C-3), 114.0 (C-7´), 111.6 (C-7); 108.9 (C-3´). **ESI-EM** *m/z*: 373.1025 $[M+H]^+$ **(**$C_{22}H_{17}N_2O_2S$, calcdo. 373.1005, Δ 5.3 ppm).

iii. Desprotección de **16** para dar **10**:

La desprotección de **16** se llevó a cabo disolviendo el intermediario y 0.5 mmol de Cs_2CO_3 en THF/MeOH 2:1 (3 ml) a reflujo durante 5 hs. El producto se purificó por ccd preparativa (Ciclohexano-AcOEt 7:3, Rf_9:0.67) obteniéndose 11 mg de producto.

Ensayo de actividad antiparasitaria

Se cultivaron epimastigotes en fase proliferativa en medio líquido diamante consistente en NaCl 0.106 M, KH_2PO_4 29 mM, K_2HPO_4 23 mM, Triptosa 12.5 g/l, triptona 12.5 g/l y extracto de levaduras 12.5 g/l, pH regulado 7.2, complementado con 2% de suero bovino fetal[61]. Los parásitos fueron incubados en tubos Falcon a concentraciones de alrededor de 2 a 2.5 x 10^6 células/ml, a 29° C durante 3 días, tanto en presencia como en ausencia del compuesto a ensayar. Las concentraciones de compuesto 10 utilizadas en los ensayos fueron de 1, 2, 5 y 10 µg/ml. Se tomaron alícuotas de los cultivos cada 24 hs y se observó la viabilidad de las células parasitarias por exclusión de azul de tripán[32].

Bibliografía

(1) Fukumoto, K., "*Heterocyclic Natural Products*", Heterocycles, http://www.heterocycles.jp/structure/structure.php

(2) Usami, Y.; Yamaguchi, J.; Numata, A. "Gliocladins A - C and glioperazine; cytotoxic dioxo- or trioxopiperazine metabolites from a *Gliocladium sp.* separated from a sea hare" *Heterocycles* **2004**, *63*, 1123-1129.

(3) Seya, H.; Nozawa, K.; Udagawa, S. I. "Studies on fungal products. IX. Dethiosecoemestrin, a new metabolite related to emestrin, from *Emericella striata*" *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1986**, *34*, 2411-2416.

(4) Dossena, A.; Marchelli, R.; Pochini, A. "Neoechinulin D, a new isoprenylated dehydrotryptophyl metabolite from *Aspergillus amstelodami*" *Cellular and Molecular Life Sciences* **1975**, *31*, 1249-1249.

(5) Overman, L. E.; Shin, Y. "Enantioselective total synthesis of (+)-gliocladin C" *Organic Letters* **2007**, *9*, 339-341.

(6) Berens, U.; Brown, J. M.; Long, J.; Selke, R. "Synthesis and resolution of 2,2'-bis-diphenylphosphino [3,3']biindolyl ; a new atropisomeric ligand for transition metal catalysis" *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 285-292.

(7) Stille, J. K. "The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organotin Reagents with Organic Electrophiles [New Synthetic Methods (58)]" *Angewandte Chemie International Edition* **1986**, *25*, 508-524.

(8) Milstein, D.; Stille, J. K. "Palladium-catalyzed coupling of tetraorganotin compounds with aryl and benzyl halides. Synthetic utility and mechanism" *Journal of the American Chemical Society* **1979**, *101*, 4992-4998.

(9) Mitchell, T. N. "Palladium-catalyzed reactions of organotin compounds " *Synthesis* **1992**, *1992*, 803-815.

(10) Espinet, P.; Echavarren, A. M. "The mechanisms of the stille reaction" *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 4704-4734.

(11) Witulski, B.; Buschmann, N.; Bergsträßer, U. "Hydroboration and Suzuki-Miyaura coupling reactions with the electronically modulated variant of an ynamine: The synthesis of (E)-β-arylenamides" *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8473-8480.

(12) Bocchi, V.; Palla, G. "High yield selective bromination and iodination of indoles in *N*,*N*-dimethylformamide " *Synthesis* **1982**, *1982*, 1096-1097.

(13) Barluenga, J.; Campos, P. J.; Gonzalez, J. M.; Suarez, J. L.; Asensio, G.; Asensio, G. "Regio- and stereoselective iodofluorination of alkenes with bis(pyridine)iodonium(I) tetrafluoroborate" *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 2234-2237.

(14) Barluenga, J.; Gonzalez, J. M.; Garcia-Martin, M. A.; Campos, P. J.; Asensio, G. "An expeditious and general aromatic iodination procedure" *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1992**, 1016-1017.

(15) Barluenga, J.; Gonzalez, J. M.; Garcia-Martin, M. A.; Campos, P. J.; Asensio, G. "Acid-mediated reaction of bis(pyridine)iodonium(I) tetrafluoroborate with aromatic compounds. A selective and general iodination method" *The Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*, 2058-2060.

(16) Mal, S. K.; Bohé, L.; Achab, S. "Convenient access to bis-indole alkaloids. Application to the synthesis of topsentins" *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5904-5914.

(17) Grehn, L.; Ragnarsson, U. "A convenient method for the preparation of 1-(tert-butyloxycarbonyl) pyrroles" *Angewandte Chemie International Edition* **1984**, *23*, 296-301.

(18) Hasan, I.; Marinelli, E. R.; Lin, L.-C. C.; Fowler, F. W.; Levy, A. B. "Synthesis and reactions of *N*-protected 2-lithiated pyrroles and indoles. The tert-butoxycarbonyl substituent as a protecting group" *The Journal of Organic Chemistry* **1981**, *46*, 157-164.

(19) Carpino, L. A.; Barr, D. E. "7-Azabenzonorbornadiene" *The Journal of Organic Chemistry* **1966**, *31*, 764-767.

(20) Rawal, V. H.; Cava, M. P. "Thermolytic removal of t-butyloxycarbonyl (BOC) protecting group on indoles and pyrroles" *Tetrahedron Letters* **1985**, *26*, 6141-6142.

(21) Ciattini, P. G.; Morera, E.; Ortar, G. "An efficient synthesis of 3-substituted indoles by palladium-catalyzed coupling reaction of 3-tributylstannylindoles with organic triflates and halides" *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 2405-2408.

(22) Azizian, H.; Eaborn, C.; Pidcock, A. "Synthesis of organotrialkylstannanes. The reaction between organic halides and hexaalkyldistannanes in the presence of palladium complexes" *Journal of Organometallic Chemistry* **1981**, *215*, 49-58.

(23) Buck, B.; Mascioni, A.; Que, L., Jr.; Veglia, G. "Dealkylation of organotin compounds by biological dithiols: toward the chemistry of organotin toxicity" *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13316-13317.

(24) Hadjispyrou, S.; Kungolos, A.; Anagnostopoulos, A. "Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*" *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2001**, *49*, 179-186.

(25) Nguyen, H.; Ogwuru, N.; Duong, Q.; Eng, G. "Toxicity of triorganotin compounds to the brine shrimp, *Artemia salina*" *Applied Organometallic Chemistry* **2000**, *14*, 349-354.

(26) Xiong, W.-N.; Yang, C.-G.; Jiang, B. "Synthesis of novel analogues of marine indole alkaloids: Mono(indolyl)-4-trifluoromethylpyridines and bis(indolyl)-4-trifluoromethylpyridines as potential anticancer agents" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, *9*, 1773-1780.

(27) Zheng, Q.; Yang, Y.; Martin, A. R. "Vinylation of the Indole 3-position via Palladium-catalyzed cross-coupling" *Heterocycles* **1994**, *37*, 1761-1772.

(28) Bajwa, J. S.; Chen, G.-P.; Prasad, K.; Repic, O.; Blacklock, T. J. "Deprotection of *N*-tosylated indoles and related structures using cesium carbonate" *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 6425-6427.

(29) Puerta, F.; Padilla, F.; Bustos, M.; Flores, J. M. "Development of chalkbrood in a honeybee colony: a review." *Bee World* **1982**, *63*, 119-130.

(30) Mogni, F. "*Sistemas agroalimentarios: miel en la Argentina*", Newsletter PAA, **2008**. https://agro.uba.ar/newsletter-paa/news-2/miel-argentina.

(31) Gallardo, G. "Aislamiento y determinación estructural de metabolitos bioactivos con potencial aplicación en apicultura y agricultura obtenidos a partir de cultivos de hongos".Tesis de Doctorado en Química, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina **2010**.

(32) Sanchez, A. M.; Jimenez-Ortiz, V.; Sartor, T.; Tonn, C. E.; García, E. E.; Nieto, M.; Burgos, M. H.; Sosa, M. A. "A novel icetexane diterpene, 5-epi-icetexone from *Salvia gilliessi* is active against *Trypanosoma cruzi*" *Acta Tropica* **2006**, *98*, 118-124.

(33) Gardiner, D. M.; Waring, P.; Howlett, B. J. "The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis" *Microbiology* **2005**, *151*, 1021-1032.

(34) Jiang, C. S.; Guo, Y. W. "Epipolythiodioxopiperazines from fungi: Chemistry and bioactivities" *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2011**, *11*, 728-745.

(35) Weindling, R. "The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*" *Phytopathology* **1936**, *26*, 1068-1070.

(36) Weindling, R. "Experimental consideration of the mold toxins of *Gliocladium* and *Trichoderma*" *Phytopathology* **1941**, *31*, 991-1003.

(37) Morgavi, D. P.; Boudra, H.; Jouany, J. P.; Michalet-Doreau, B. "Effect and stability of gliotoxin, an *Aspergillus fumigatus* toxin, on *in vitro* rumen fermentation" *Food Additives & Contaminants* **2004**, *21*, 871-878.

(38) Grovel, O.; Pouchus, Y. F.; Verbist, J.-F. "Accumulation of gliotoxin, a cytotoxic mycotoxin from *Aspergillus fumigatus*, in blue mussel (*Mytilus edulis*)" *Toxicon* **2003**, *42*, 297-300.

(39) Richard, J. L.; DeBey, M. C. "Production of gliotoxin during the pathogenic state in turkey poults by *Aspergillus fumigatus* Fresenius" *Mycopathologia* **1995**, *129*, 111-115.

(40) Pena, G. A.; Pereyra, C. M.; Armando, M. R.; Chiacchiera, S. M.; Magnoli, C. E.; Orlando, J. L.; Dalcero, A. M.; Rosa, C. A. R.; Cavaglieri, L. R. "*Aspergillus fumigatus* toxicity and gliotoxin levels in feedstuff for domestic animals and pets in Argentina" *Letters in Applied Microbiology* **2010**, *50*, 77-81.

(41) Boudra, H.; Morgavi, D. P. "Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*" *Animal Feed Science Technology* **2005**, *120*, 113-123.

(42) Lewis, R. E.; Wiederhold, N. P.; Chi, J.; Han, X. Y.; Komanduri, K. V.; Kontoyiannis, D. P.; Prince, R. A. "Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis" *Infection and Immunity* **2005**, *73*, 635-637.

(43) Reeves, E. P.; Messina, C. G. M.; Doyle, S.; Kavanagh, K. "Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*" *Mycopathologia* **2004**, *158*, 73-79.

(44) Wilhite, S. E.; Straney, D. C. "Timing of gliotoxin biosynthesis in the fungal biological control agent *Gliocladium virens* (*Trichoderma virens*)" *Applied Microbiology and Biotechnology* **1996**, *45*, 513-518.

(45) Ridout, C. J.; Lumsden, R. D. "Polypeptides associated with gliotoxin production in the biocontrol fungus *Gliocladium virens*" *Phytopathology* **1993**, *83*, 1040-1045.

(46) Joshi, B. K.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T. "New verticillin and glisoprenin analogues from *Gliocladium catenulatum*, a mycoparasite of *Aspergillus flavus* sclerotia" *Journal of Natural Products* **1999**, *62*, 730-733.

(47) Kawai, K.; Nozawa, K. "Novel biologically active compounds from *Emericella* species" *Bioactive Molecules* **1989**, *10*, 205-212.

(48) Kleinwachter, P.; Dahse, H.-M.; Luhmann, U.; Schlegel, B.; Dornberger, K. "Epicorazine C, an antimicrobial metabolite from *Stereum hirsutum* HKI 0195" *Journal of Antibiotics* **2001**, *54*, 521-525.

(49) Brown, A. E.; Finlay, R.; Ward, J. S. "Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi" *Soil Biology and Biochemistry* **1987**, *19*, 657-664.

(50) Deffieux, G.; Baute, R.; Filleau, M. J. "Production of new antibiotic metabolites by a strain of the fungus *Epicoccum nigrum* Link (Deuteromycetes). II. Structure elucidation of epicorazines A and B" *Bulletin de la Societe de Pharmie de Bordeaux* **1981**, *120*, 23-32.

(51) Takahashi, C.; Numata, A.; Matsumura, E.; Minoura, K.; Eto, H.; Shingu, T.; Ito, T.; Hasegawa, T. "Leptosins I and J, cytotoxic substances produced by a *Leptosphaeria sp*. Physico-chemical properties and structures" *Journal of Antibiotics* **1994**, *47*, 1242-1249.

(52) Ayent, A. G.; Hanson, J. R.; Truneh, A. "Metabolites of *Gliocladium flavofuscum*" *Phytochemistry* **1992**, *32*, 197-198.

(53) Lumsden, R. D.; Ridout, C. J.; Vendemia, M. E.; Harrison, D. J.; Waters, R. M.; Walter, J. F. "Characterization of major secondary metabolites produced in soilless mix by a formulated strain of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*" *Canadian Journal of Microbiology* **1992**, *38*, 1274-1280.

(54) Avent, A. G.; Hanson, J. R.; Truneh, A. "Two pyrones from *Gliocladium vermoesenii*" *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1065-1066.

(55) Okuda, T.; Kohno, J.; Kishi, N.; Asai, Y.; Nishio, M.; Komatsubara, S. "Production of TMC-151, TMC-154 and TMC-171, a new class of antibiotics, is specific to '*Gliocladium roseum*' group" *Mycoscience* **2000**, *41*, 239-253.

(56) Ren, H.; Cao, X. L.; Gu, Q. Q. "Antitumor metabolites from marine-derived fungus *Gliocladium catenulatum* T31" *Chinese Pharmaceutical Journal* **2010**, *45*, 1720-1723.

(57) Davis, C.; Carberry, S.; Schrettl, M.; Singh, I.; Stephens, J. C.; Barry, S. M.; Kavanagh, K.; Challis, G. L.; Brougham, D.; Doyle, S. "The role of glutathione S-transferase GliG in gliotoxin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*" *Chemistry and Biology* **2011**, *18*, 542-552.

(58) Fox, E. M.; Howlett, B. J. "Biosynthetic gene clusters for epipolythiodioxopiperazines in filamentous fungi" *Mycological Research* **2008**, *112*, 162-169.

(59) Kirby, G. W.; Patrick, G. L.; Robins, D. J. "cyclo-(L-Phenylalanyl-L-seryl) as an intermediate in the biosynthesis of gliotoxin" *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1978**, 1336-1338.

(60) Delorbe, J. E.; Jabri, S. Y.; Mennen, S. M.; Overman, L. E.; Zhang, F. L. "Enantioselective total synthesis of (+)-gliocladine C: Convergent construction of cyclotryptamine-fused polyoxopiperazines and a general approach for preparing epidithiodioxopiperazines from trioxopiperazine precursors" *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 6549-6552.

(61) Jimenez-Ortiz, V.; Brengio, S. D.; Giordano, O.; Tonn, C.; Sánchez, M.; Burgos, M. H.; Sosa, M. A. "The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes" *Journal of Parasitology* **2005**, *91*, 170-174.

Antecedentes

Durante la elucidación estructural de los indoles producidos por *Aporpium caryae*[1], se prepararon dos análogos (**23** y **24**, tabla 10) que, si bien presentaron una actividad antifúngica débil contra el fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum*, esta actividad era mayor que la exhibida por el compuesto natural **17**. Por esta razón se inició el trabajo de obtención de una familia de compuestos análogos con el fin de explorar la actividad antifúngica que presentan este tipo de compuestos y encontrar un análogo con actividad superior.

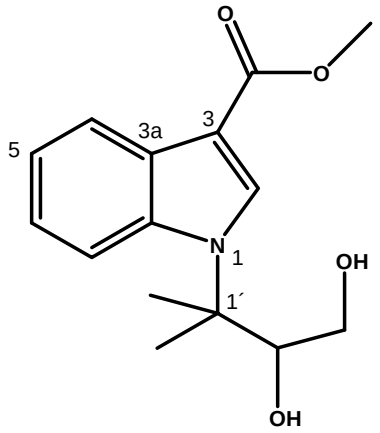


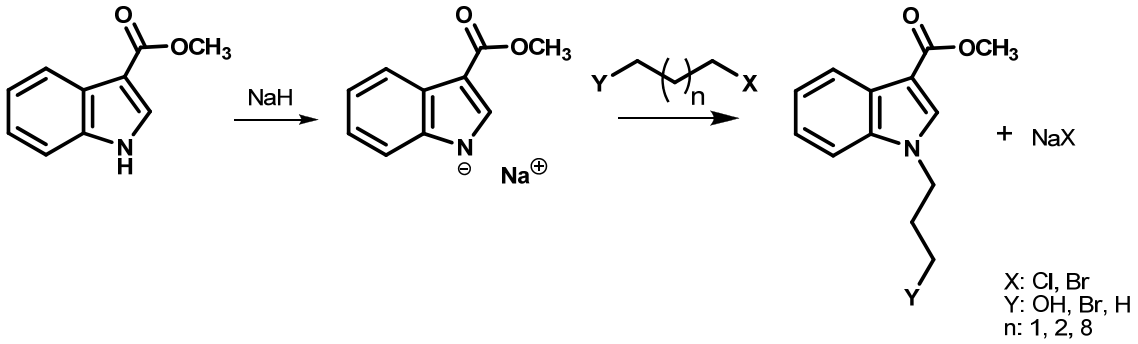
Figura 60. Metabolito aislado de *Aporpium caryae*, compuesto **17**.

En la obtención de los análogos se conservó el esqueleto indólico y se modificaron el sustituyente en posición 3 y la cadena *N*-alquílica. Cada derivado se caracterizó por experimentos espectroscópicos RMN unidimensional y bidimensional y espectrometría de masa. Con los derivados sintetizados se llevaron a cabo ensayos de actividad antifúngica *in vitro* y en condiciones de invernadero, con el fin de evaluar la actividad antifúngica y su potencial aplicación como agroquímicos frente a fitopatógenos, y en particular frente a *Fusarium virguliforme*, fitopatógeno que, como se mencionó en la introducción, afecta a los cultivos de soja.

Preparación de los análogos N-alquilindólicos

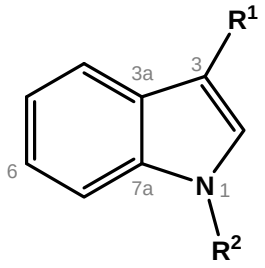
La obtención de los derivados implicó el uso de caminos sintéticos sencillos, permitiendo generar una familia de compuestos análogos útil para examinar la actividad antifúngica de este tipo de compuestos.

Los *N*-alquilindoles **18-20, 23-26, 31, 32** y **36** fueron sintetizados a partir del precursor éster metílico del ácido-1*H*-3-indol metanoico. En el esquema 9 se muestran los pasos generales involucrados en la reacción de preparación de los derivados.



Esquema 9. Esquema general de reacciones para la síntesis de *N*-alquilindoles.

Los compuestos obtenidos se muestran en la tabla 10 donde se describen R^1 y R^2:



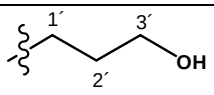
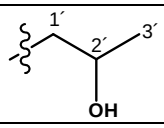
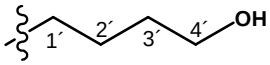
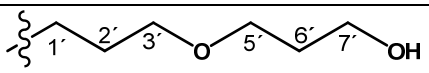
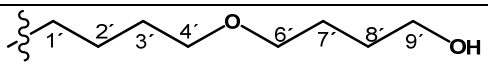
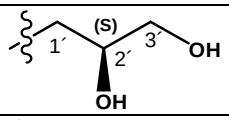
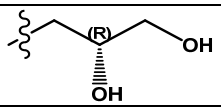
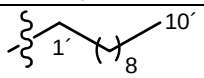
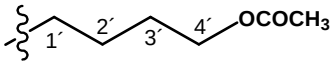
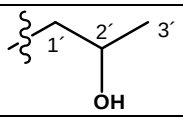
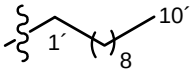
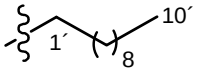
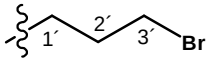
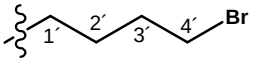
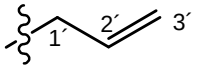
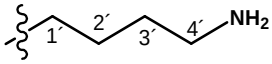
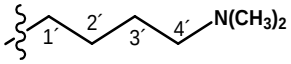
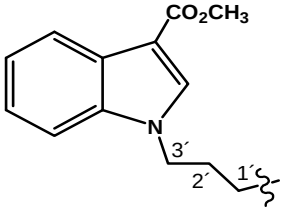
Compuesto	R^1	R^2
18	$-CO_2CH_3$	
19	$-CO_2CH_3$	
20	$-CO_2CH_3$	
21	$-CO_2CH_3$	
22	$-CO_2CH_3$	
23	$-CO_2CH_3$	
24	$-CO_2CH_3$	
25	$-CO_2CH_3$	
26	$-CO_2CH_3$	
27	$-CO_2H$	
28	$-CO_2H$	
29	$-CO_2(CH_2)_9CH_3$	
30	$-CO_2CH_3$	$-CH_3$ 1´
31	$-CO_2CH_3$	
32	$-CO_2CH_3$	
33	$-CO_2CH_3$	
34	$-CO_2CH_3$	
35	$-CO_2CH_3$	
36	$-CO_2CH_3$	

Tabla 10. Análogos *N*-alquilindólicos sintetizados.

Los compuestos **21**, **22**, **27**, **28** y **29**, y **33** se obtuvieron como sub-productos minoritarios en la preparación de los compuestos **18**, **20**, **19**, **25** y **31** respectivamente. Los compuestos **34** y **35** se sintetizaron a partir de **32** utilizando NH_3 o *N*,*N*-dimetilamina, mediante una reacción de tipo SN2.

Todos los compuestos fueron purificados por técnicas cromatográficas y una vez purificados se identificaron espectroscópicamente.

Los compuestos **19** a **29**, **32** y **34** a **36** no habían sido aislados ni descriptos previamente. El compuesto **31** se informó previamente en una patente como intermediario en la síntesis de triazoles[2], y los compuestos **18** y **33** han sido informados con anterioridad como subproducto e intermediario respectivamente, en la síntesis de alquilindoles[3,4].

Se llevaron a cabo experimentos de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C y espectros bidimensionales para la totalidad de los análogos obtenidos, presentándose algunos espectros a continuación. En los espectros RMN-^{1}H de todos los compuestos pueden observarse como patrón común las señales aromáticas correspondientes al esqueleto de indol, consistentes en un multiplete alrededor de δ 8.00 ppm para el protón en posición 4; un singulete alrededor de δ 7.80 ppm para el protón en posición 2; un multiplete alrededor de δ 7.35 ppm para el protón en posición 7 y un multiplete alrededor de δ 7.25 ppm que integra para 2 protones y corresponde a las señales de los hidrógenos en posiciones 5 y 6. Las diferencias entre los espectros de los distintos compuestos se observan en la región alifática, debido a la variedad de sustituyentes. La señal del éster metílico cuando está presente aparece como un singulete aldededor de δ 3.80 ppm. Se muestran a continuación algunos espectros representativos.

En el espectro correspondiente al compuesto **20** (figura 61) se observan dos tripletes a δ 4.13 y 3.60 ppm, señales características de los metilenos unidos a heteroátomos, al *–N* del indol y a *-OH* respectivamente, y los multipletes a δ 1.96 y 1.55 ppm correspondientes a los hidrógenos de los dos metilenos restantes (posiciones 2´ y 3´ respectivamente). En el espectro COSY (figura 62) se observaron correlaciones entre las señales a δ 4.13 y 1.96 ppm, 1.96 y 1.55 ppm y 1.55 y 3.60 ppm, confirmándose así las asignaciones.

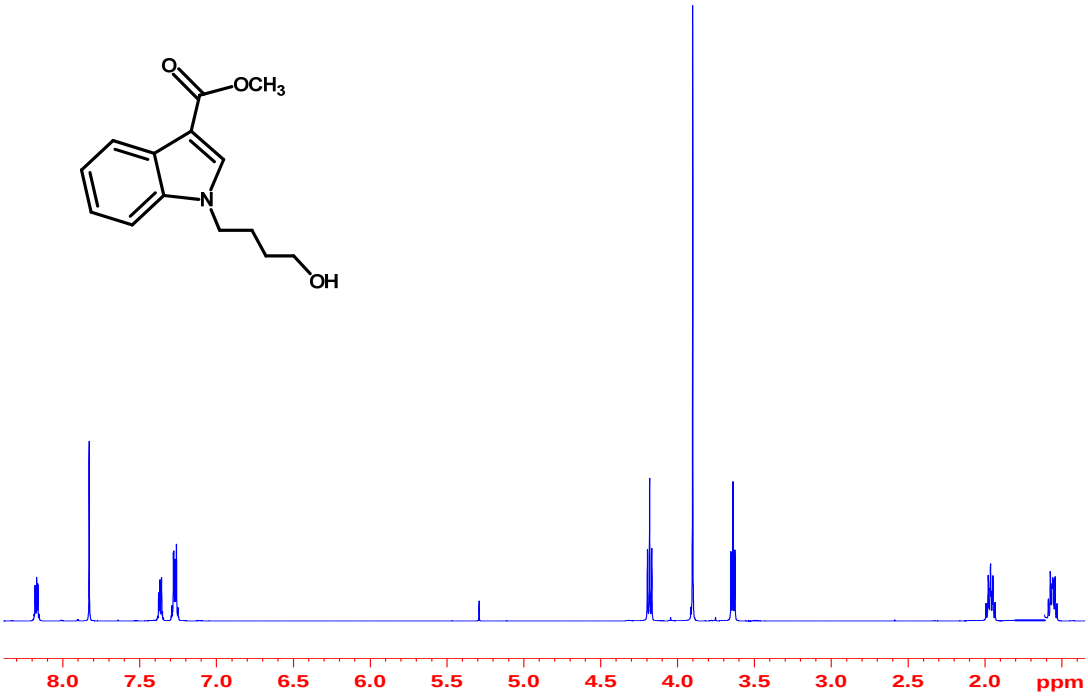


Figura 61. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **20**.

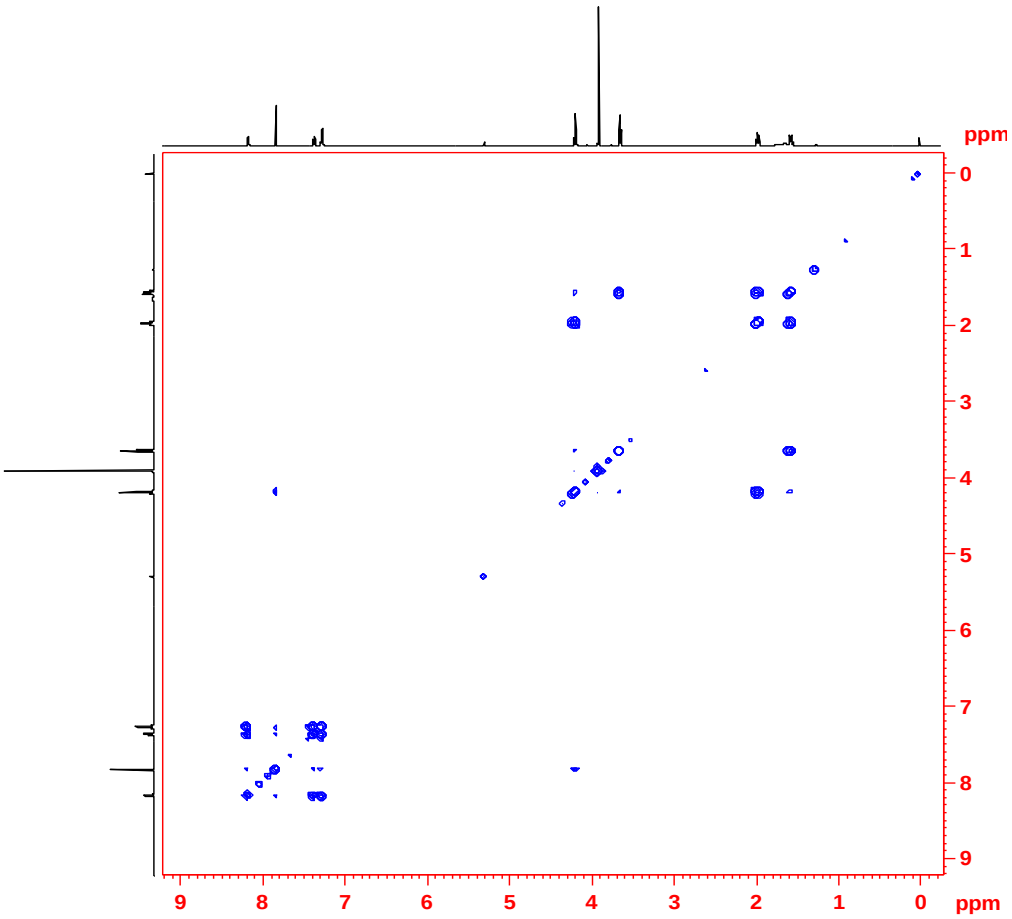


Figura 62. Espectro COSY del compuesto **20**.

Como se observa en la figura 63, el compuesto **22** presenta las señales correspondientes a los cuatro metilenos unidos a heteroátomos, a δ 4.19 ppm el triplete para H-1', a δ 3.64 ppm un multiplete para H-9', y a δ 3.43 ppm un multiplete que integra para cuatro protones, correspondiente a H-4' y 6'.

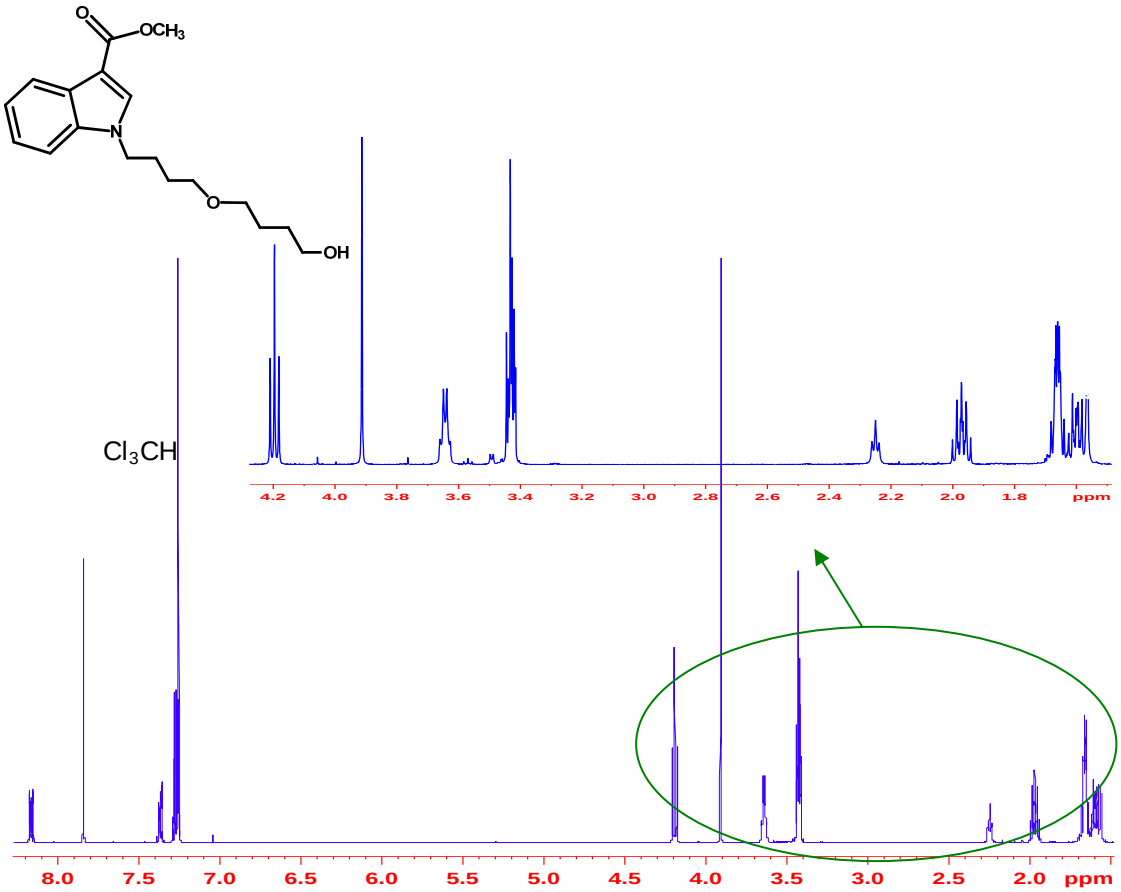


Figura 63. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **22**.

Además se ven en el espectro las señales correspondientes al resto de los metilenos a δ 1.97 ppm para H-2', 1.66 ppm para H-7'y 8', y 1.60 ppm para H-3'. Finalmente puede asignarse el triplete ancho a δ 2.20 ppm para el –O*H* terminal. En el espectro COSY de **22** (figura 64) se observan las correlaciones que facilitaron la asignación de los protones de la cadena alquílica, y en la figura 67 se muestra el espectro HSQC mediante el cual se asignaron los carbonos unidos a los mismos.

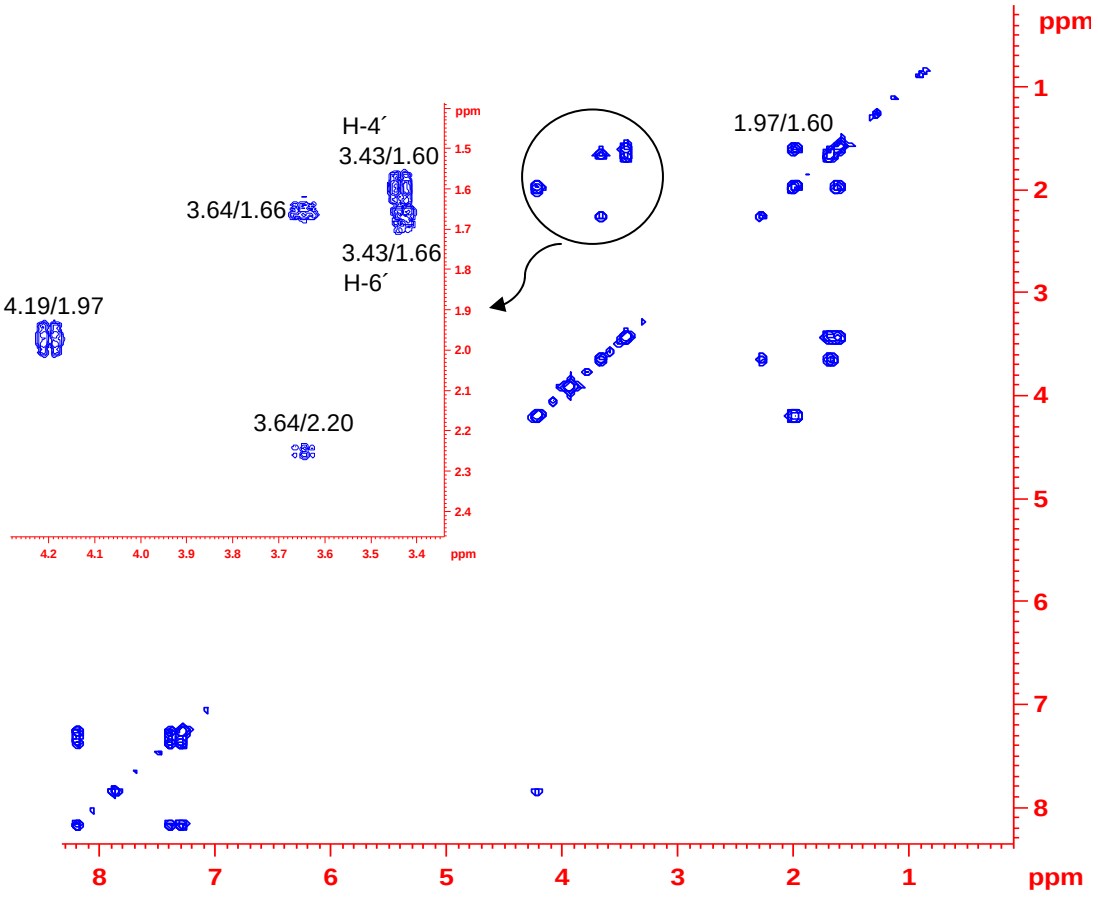


Figura 64. Espectro COSY del compuesto **22**.

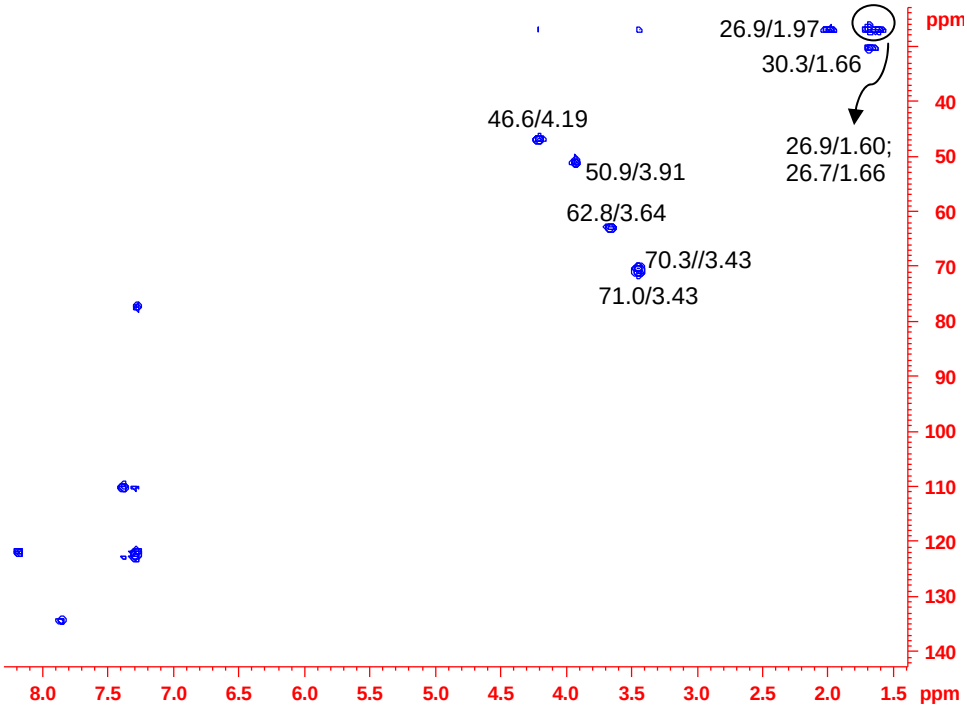


Figura 65. Espectro HSQC del compuesto **22**.

En la figura 66 se muestra el espectro del compuesto **24**. A diferencia de la mayoría de los compuestos indólicos preparados, las señales de los hidrógenos del metileno adyacente al *–N* indólico se diferencian en **24** debido al centro asimétrico contiguo, observándose a 4.28 ppm y 4.19 ppm. La señal para el metino contiguo se ve como multiplete a δ 4.10 ppm, y las señales del metileno terminal H-3´aparecen a 3.70 ppm y 3.53 ppm.

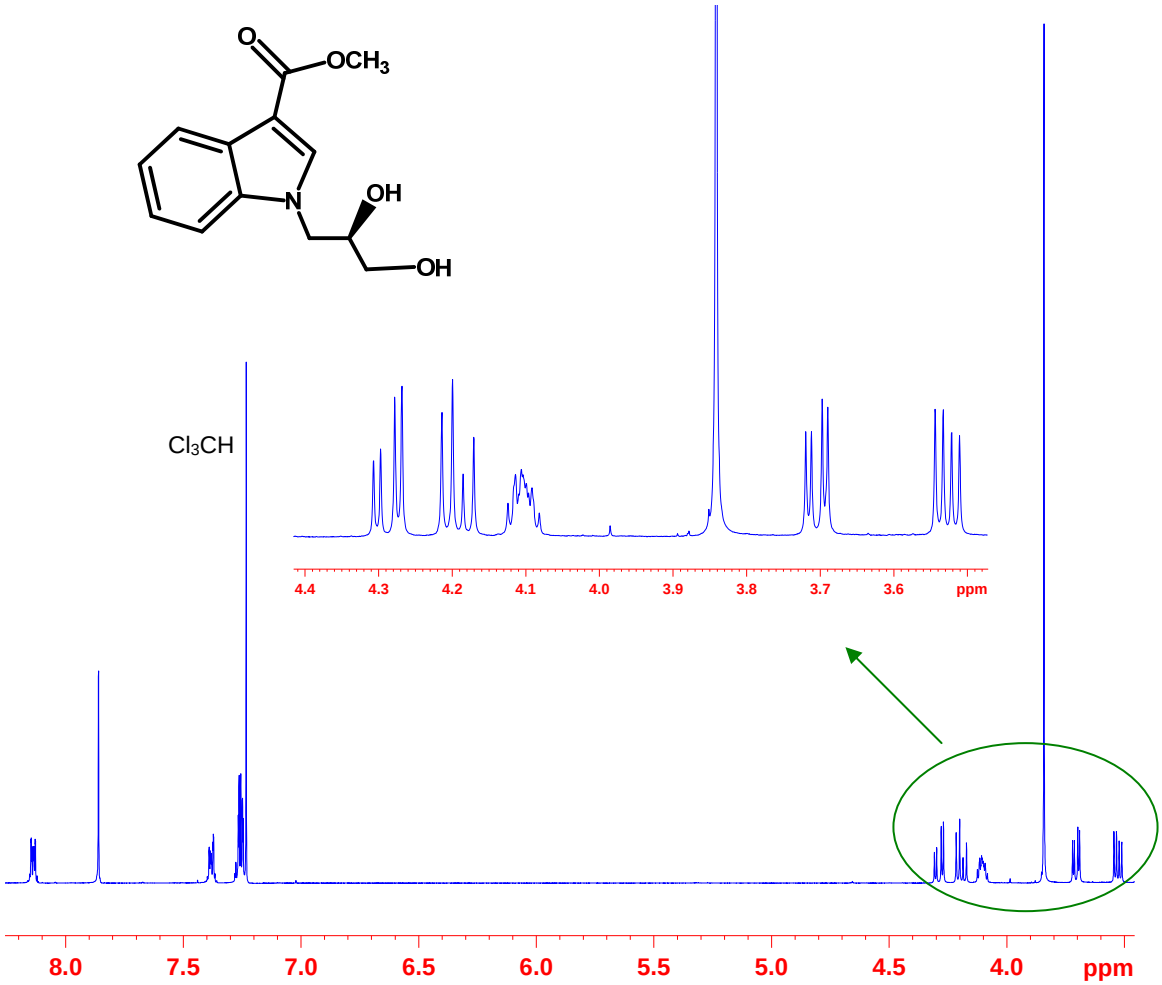


Figura 66. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **24**.

En el espectro del compuesto **25** (figura 67) se observa la señal característica del metileno adyacente al *–N* indólico a δ 4.14 ppm y el resto de las señales aparecen a δ menores a 2 ppm, dado que corresponden a los metilenos de la cadena *N*-alquílica. Se puede identificar al metilo terminal cuya señal es un triplete a δ 0.85 ppm.

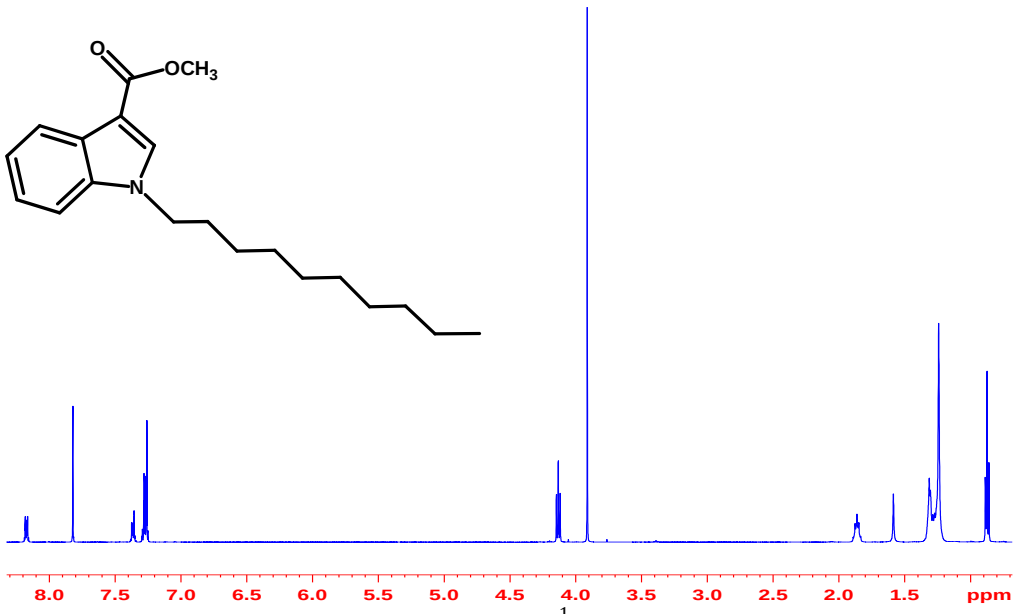


Figura 67. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **25**.

El compuesto **26** es el derivado acetilado de **20**; su espectro de RMN-^{1}H (figura 68) muestra la señal correspondiente al metilo del acetilo como singulete a δ 2.03 ppm. Además se puede observar el triplete correspondiente a H-4´ desplazada a mayor δ (4.08 ppm) que para el compuesto **20** (3.60 ppm) por efecto anisotrópico del grupo acilo.

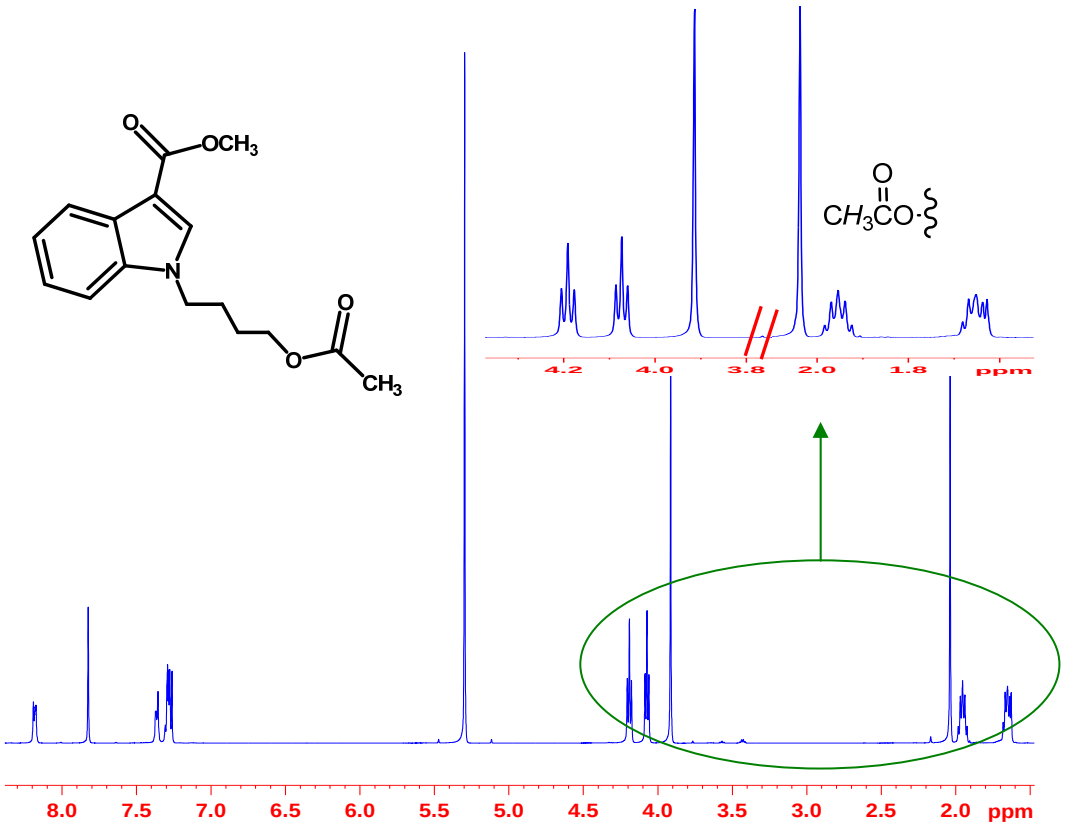


Figura 68. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **26**.

En la figura 69 se presenta el espectro RMN-^{1}H del compuesto **30**, en el que el sustituyente en posición 1 es un grupo metilo. En consecuencia, en la zona alifática se observan únicamente dos singuletes a δ 3.91 y 3.84 ppm correspondientes al metilo del éster metílico y al metilo en 1 respectivamente.

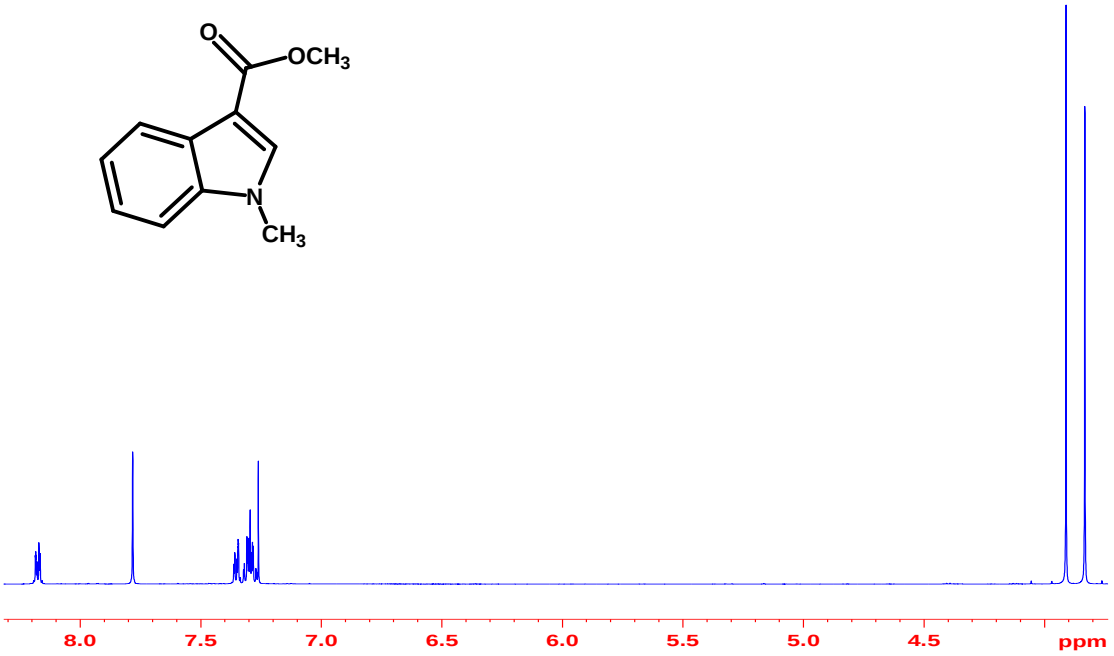


Figura 69. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **30**.

En la figura 70 se muestra el espectro RMN-^{1}H del compuesto **32**. Se observan en el espectro los tripletes característicos de H-1´y H-4´ a δ 4.20 y 3.39 ppm y los multipletes a δ 2.06 y 1.88 ppm de H-2´y H-3´.

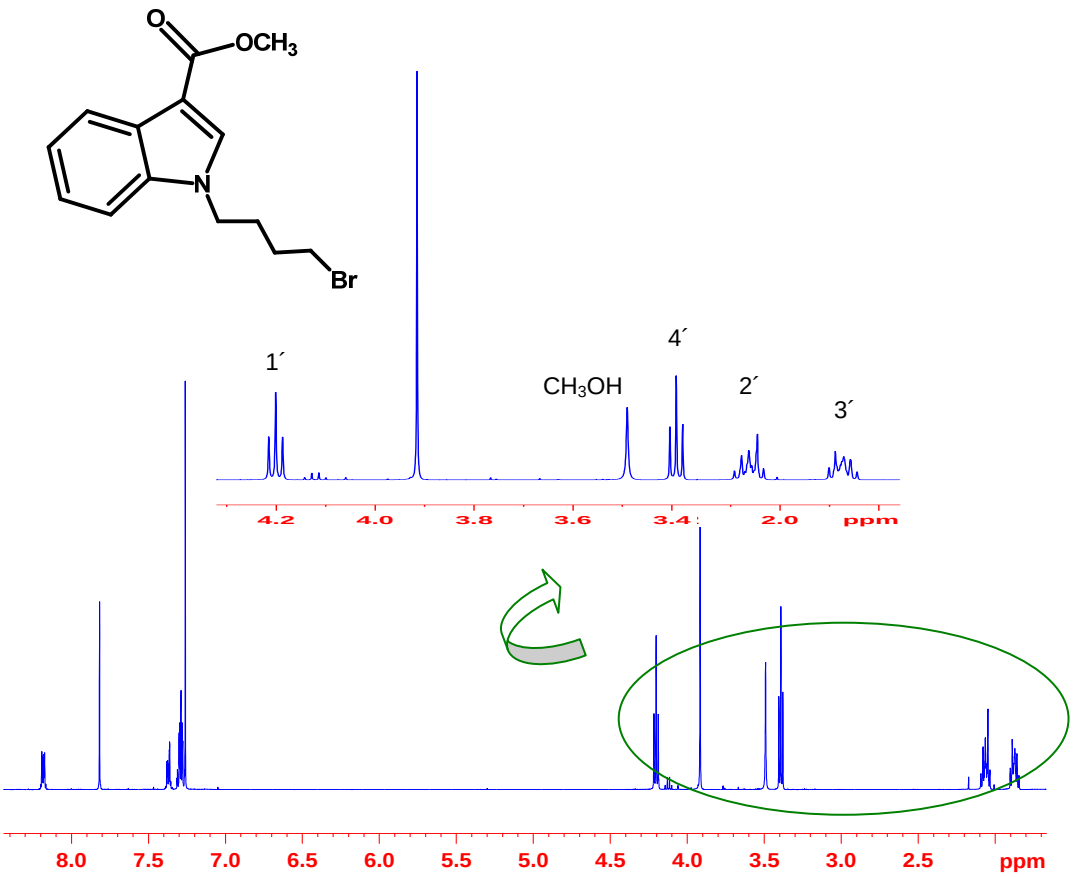


Figura 70. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **32**.

Los compuestos **34** y **35** se obtuvieron a partir del compuesto **32**, por reacciones de sustitución. Sus espectros RMN-^{1}H se exponen en las figuras 71 y 72 respectivamente. Se observa que en ambos casos cambia el desplazamiento químico del triplete correspondiente al metileno terminal, siendo éste de 3.39 ppm para **32**, 2.90 ppm para **34** y 2.40 ppm para **35**, dado que la presencia del N produce un desplazamiento químico menor que el bromo. En el espectro del compuesto **35** se ve además la señal correspondiente a los dos *N*-metilos como un singulete a 2.27 ppm que integra para 6H.

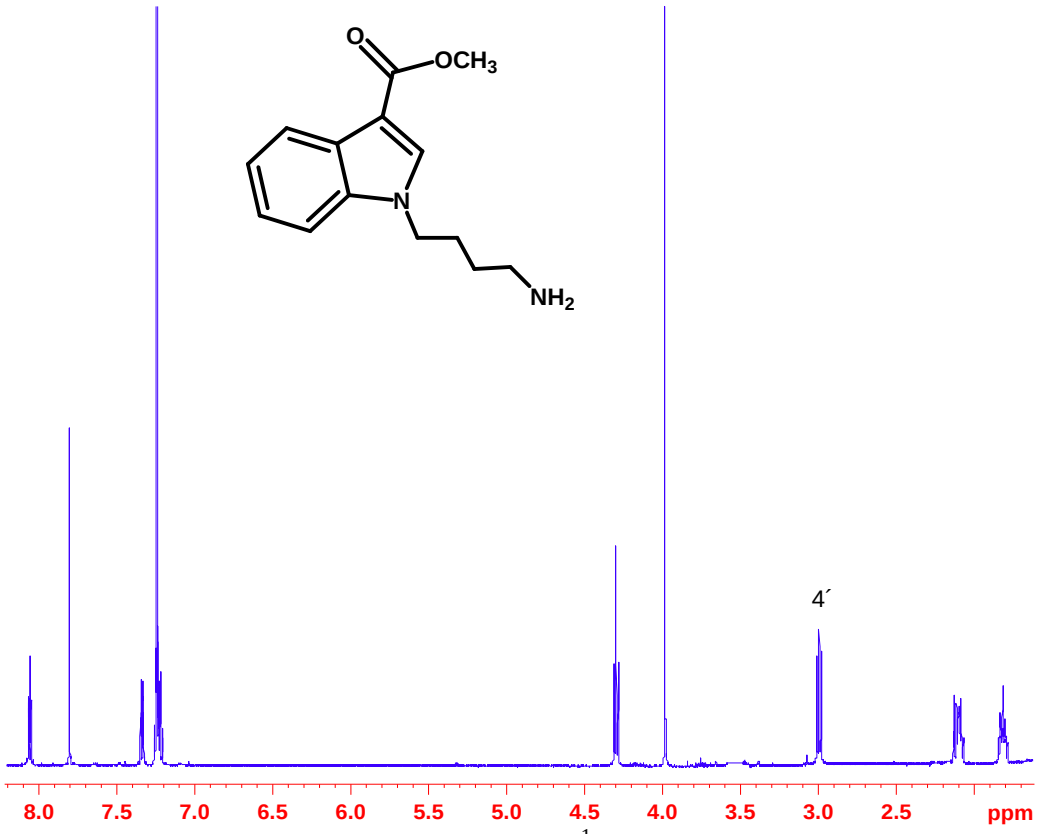


Figura 71. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **34**.

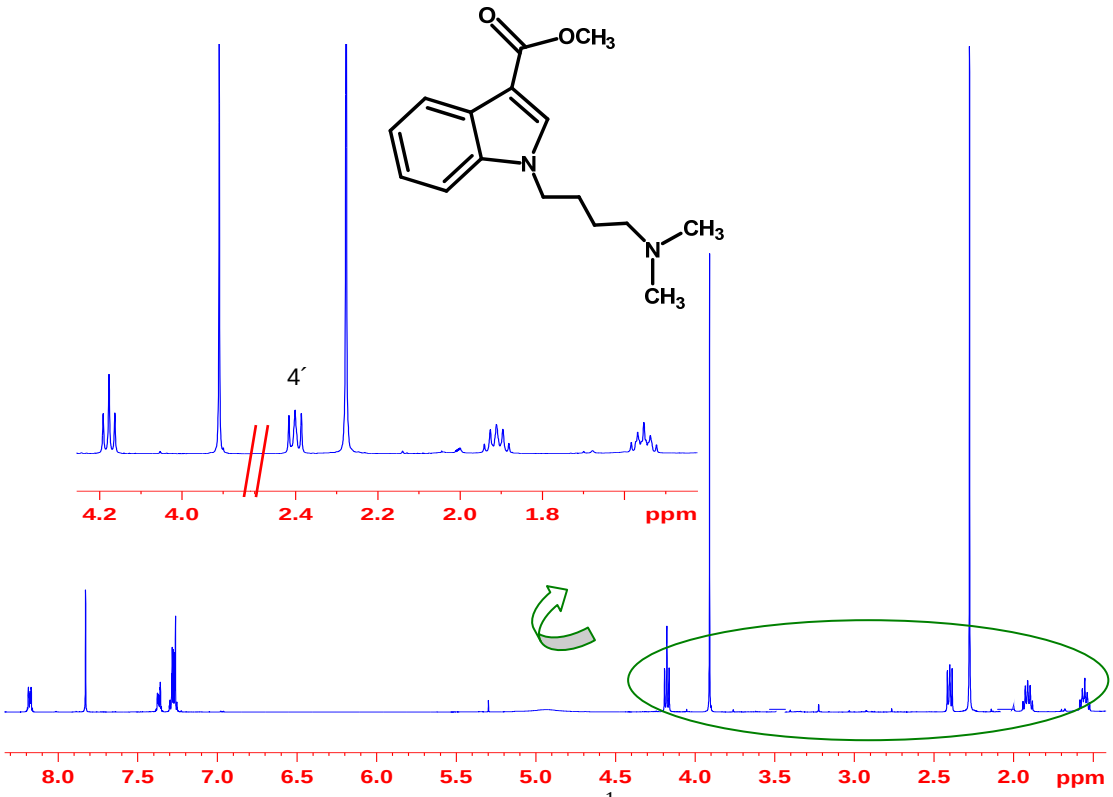


Figura 72. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **35**.

El compuesto **33** es el subproducto de eliminación obtenido durante la síntesis de **31**. Su espectro RMN-^{1}H se expone en la figura 73, donde se pueden observar las señales características de olefina terminal como dos dobles dobletes a δ 5.28 y 5.15 ppm que integran para un hidrógeno cada una. En el espectro COSY se observó la correlación entre las señales mencionadas y el multiplete a δ 6.00 ppm, y la correlación entre este último y la señal a 4.76 ppm correspondiente al H-1'.

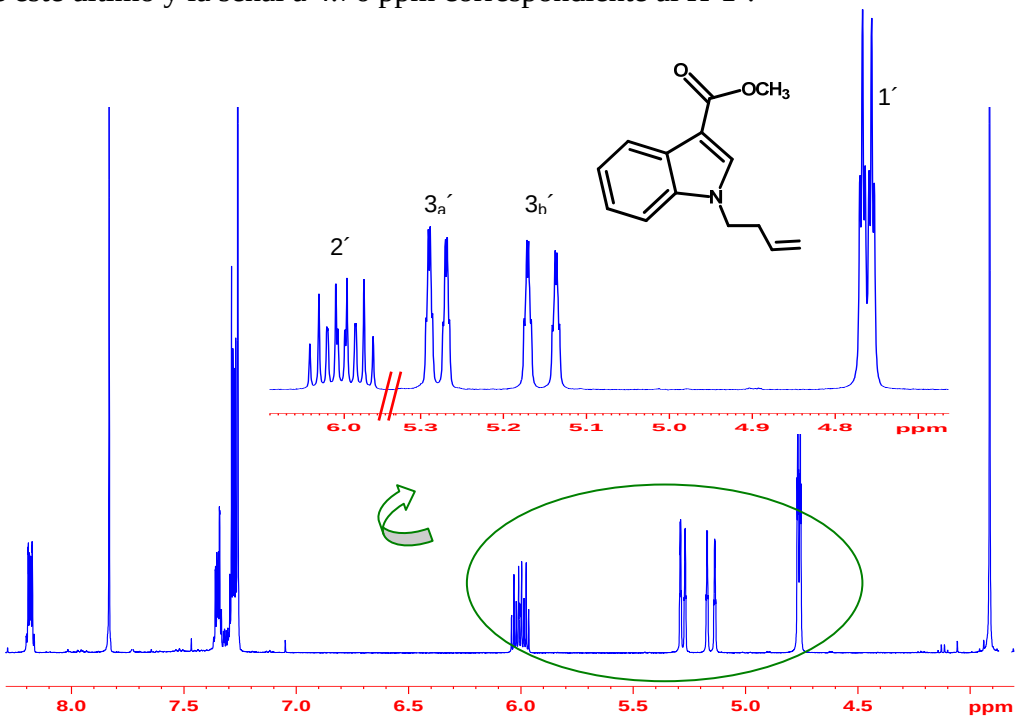


Figura 73. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **33**.

En la figura 74 se muestra el espectro RMN-^{1}H del compuesto **36**. Se trata de un compuesto simétrico como pudo corroborarse por la integración de las señales del indol.

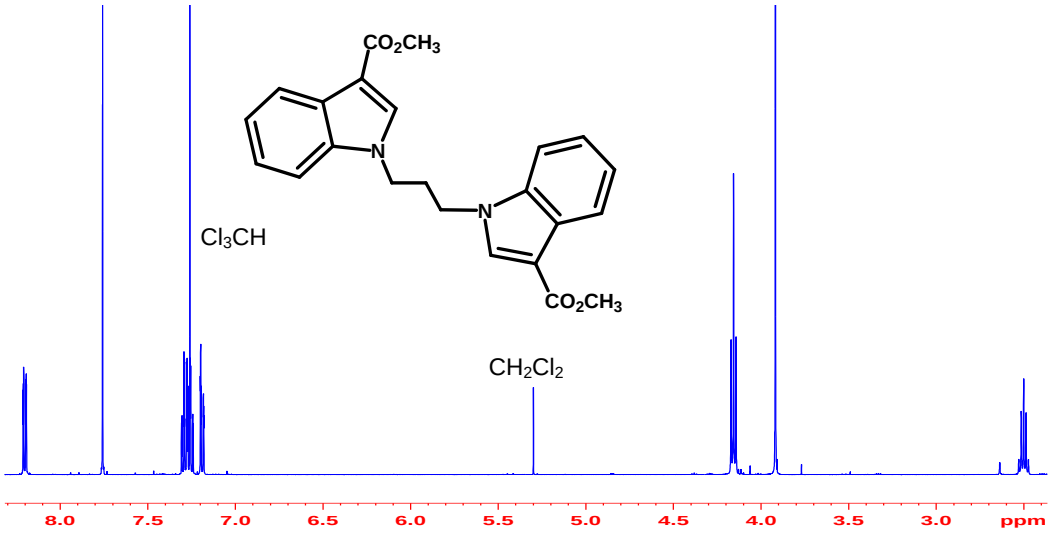


Figura 74. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **36**.

En todos los casos se realizaron los espectros de RMN-^{13}C y los espectros 2 D necesarios para completar la asignación de todas las señales de los espectros de RMN-^{1}H y ^{13}C. También se confirmaron las fórmulas moleculares a través de la medición de los espectros de masa con alta precisión.

Ensayos de actividad

1. Bioautografía en silicagel

Con el fin de detectar los compuestos que presentaban propiedades antifúngicas se realizó el experimento de bioautografia directa sobre ccd[5,6]. El procedimiento se detalla en el capítulo 7. Los hongos fitopatógenos que se utilizaron como blanco para el ensayo fueron los siguientes: *Fusarium virguliforme* O'Donnell & T. Aoki NRRL 34551, *Fusarium lateritium* Nees ex Link (BAFC 759), *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (BAFC3428) y *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (BAFC 535).

Además se realizó el ensayo con Benomyl y Maxim® XL (principios activos: fludioxonil y metalaxil) como testigos (figura 75). En los casos en que se encontraron halos de inhibición grandes se midió la concentración mínima de inhibición (MIC) mediante el mismo método[6]. Los experimentos se repitieron entre 3 y 5 veces para los compuestos que exhibieron mayor actividad.

El Benomyl pertenece a la familia de bencimidazoles, es un compuesto selectivamente tóxico para hongos[7] actuando como antifúngico sistémico. Se utiliza ampliamente en agricultura en contra de un vasto espectro de enfermedades fúngicas que afectan a árboles frutales y campos sembrados[8-11]. Se aplica sobre las partes aéreas de las plantas (foliar). Los hongos fitopatógenos de las familias Deuteromycetes y Ascomycetes son particularmente susceptibles a este antifúngico[12,13]. Cabe mencionar entre los fitopatógenos sensibles a los responsables de oidio, podredumbre de raíz y marchitez como *Erysiphe necator, Blumeria graminis, Podosphaera sp., Microsphaera, Verticillium sp., Fusarium sp., Phytophthora sp*. y *Rhizoctonia sp.*[14-20]. Sin embargo, luego de su utilización durante varios años, han aparecido cepas resistentes de los

hongos fitopatógenos blanco[21]. Se ha informado además que este fungicida induce hepatotoxicidad[22,23].

El fungicida Maxim es actualmente el producto comercial más efectivo frente a los fitopatógenos que afectan a las semillas a como *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Pythium*[24-26], y además brinda protección frente a *Penicillium* y *Aspergillus*. Se aplica sobre las semillas sin afectar su capacidad germinativa, utilizándose para la cura de semillas de maíz, sorgo, soja, girasol, maní, algodón y arvejas[27-29]. Sobre los componentes de este fungicida y también de benomyl se han informado efectos tóxicos sobre los sistemas endócrino y reproductivo en mamíferos[30].

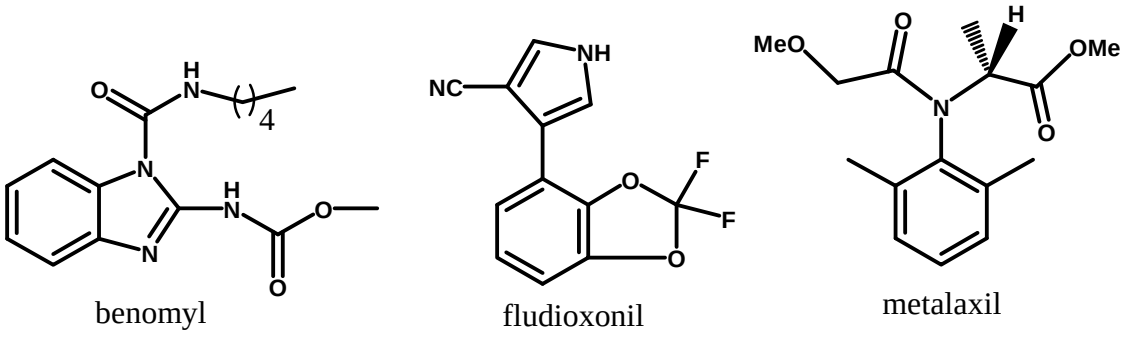


Figura 75. Benomyl y principios activos de Maxim®.

2 Test de germinación en el laboratorio. Técnica de Blotter sobre papel

Este ensayo permite comparar como afectan los compuestos a ensayar sobre la contaminación natural de las semillas, es decir no desinfectadas, midiéndose la incidencia de los hongos patógenos en las mismas[31].

Se trataron semillas de soja con una suspensión acuosa del compuesto que se deseaba evaluar tal como se describe en la parte experimental. Las semillas así tratadas fueron utilizadas en los bioensayos.

Para realizar los ensayos con un control positivo se repitió el tratamiento sobre semillas utilizando Maxim en lugar del compuesto de prueba (M), es decir, se realizó el ensayo con semillas tratadas con los compuestos más activos en el ensayo de bioautografía (C), con el control positivo (M) y semillas sin tratamiento (U).

Las semillas colocadas en bandejas se incubaron a temperatura controlada bajo períodos alternados de 12 h de luz fluorescente fría durante 7 días[31]. Luego las semillas fueron examinadas con microscopio 40x y se identificaron los hongos presentes por sus características morfológicas[32].

3 Experimento en invernadero

Este ensayo permite observar cómo afectan los compuestos ensayados al crecimiento normal de la planta y a la incidencia y a la severidad del síndrome de muerte súbita (SDS) en plantas inoculadas con patógeno.

En este experimento las semillas fueron desinfectadas previamente al tratamiento. La cuarta parte de las semillas se dejaron sin ningún tratamiento, otra cuarta parte se trató con el compuesto a ensayar, otra cuarta parte se trató con el compuesto a ensayar y se inoculó con *Fusarium virguliforme* (FV) y la última cuarta parte se trató con Maxim y se inoculó con FV.

En las plantas se evaluó la incidencia (DI) basándose en el porcentaje de plantas que presentaban los síntomas foliares típicos de SDS[33]. Los síntomas incluyen desde hojas enroscadas y rugosas, manchas, manchas cloróticas internervales, clorosis internerval y necrosis, hasta caída de hojas y retraso en el crecimiento.

Se evaluó también la severidad de la enfermedad en el follaje (DS) durante 5 semanas luego de la plantación, tomándose una escala de 1 a 5, dónde 1 = sin síntomas; 2 = desarrollo de síntomas leves con manchas y mosaico (1%–20% follaje afectado); 3 = desarrollo de síntomas moderados con clorosis internerval y necrosis (21%–50% follaje afectado); 4 = desarrollo de síntomas graves (51%–80% follaje afectado); y 5 = desarrollo de síntomas severos con clorosis internerval y necrosis y/ó muerte de la planta (81%–100% follaje afectado)[34].

Una vez concluido el experimento se midió la altura de todas las plantas y se determinó el peso de los brotes frescos. Los datos que arrojó este experimento fueron

evaluados por análisis de la varianza (ANOVA). Las medias fueron comparadas por diferencia significativa mínima a nivel $P = 0.05$.

Resultados

La presencia de actividad antifúngica de cada compuesto se observó mediante el ensayo *in vitro* por bioautografía en sílica gel frente a las especies *F. virguliforme*, *F. lateritium* y *M. phaseolina*, como se mencionó previamente. Estas especies son cepas representativas de importancia económica y generalmente presentan diferentes respuestas frente a agentes antifúngicos. Como se mencionó en la introducción, *F.virguliforme* es uno de los agentes causales del síndrome de muerte súbita (SDS) en soja, *M. phaseolina* causa podredumbre carbonosa en soja y *F. lateritium* es un fitopatógeno de cucurbitáceas. *Botrytis cinerea*, fitopatógeno de las plantaciones de vid, también se estudió en algunos casos. Los resultados de este ensayo de actividad se presentan en la tabla 11.

Puede observarse que los compuestos **18** a **20, 26, 30** y **33** mostraron evidente actividad antifúngica frente a *F. virguliforme, F. lateritium* y *M. phaseolina*. Los halos de inhibición medidos para estos compuestos resultaron entre 10 y 17 mm, sin embargo dado que el diámetro de los halos depende de la difusión y otras propiedades físicas de los compuestos, el valor absoluto puede no ser tan relevante[6]. El resto de los compuestos mostraron halos demasiado pequeños o ausencia completa de inhibición. Se determinó la concentración mínima de inhibición (MIC) para los compuestos **18**, **19**, **20** y **26** frente a *F. virguliforme* y *F. lateritium*, resultando de 5 μg/punto.

A partir de estos resultados podría deducirse como conclusión preliminar que la presencia de cadenas de tres o cuatro carbonos con tan solo un grupo hidroxilo como sustituyente, unidas al *–N* del indol, da como resultado mejor actividad. En cambio, la presencia de una cadena larga como en **25** o una cadena voluminosa como en **36** llevan

Compuesto	*Fusarium virguliforme*	*Fusarium lateritium*	*Macrophomina phaseolina*	*Botrytis cinerea*
18	17 +/- 2 (5)	16 +/- 2 (5)	22 +/- 1	19 +/- 1
19	15 +/- 1 (5)	12 +/- 2 (5)	-	6 +/- 1
20	17 +/- 2 (5)	12 +/- 2 (5)	15 +/- 2	20 +/- 2
21	-	6 +/- 1	10 +/- 1	4 +/- 1
23	3 +/- 1	-	14 +/- 1	-
24	4 +/- 1	-	4 +/- 2	-
25	-	-	10 +/- 1	-
Compuesto	*Fusarium virguliforme*	*Fusarium lateritium*	*Macrophomina phaseolina*	*Botrytis cinerea*
26	14 +/- 2 (5)	16 +/- 2 (5)	16 +/- 2	nd
27	-	-	-	-
28	7 +/- 1	-	-	7 +/- 1
29	-	-	-	-
30	10 +/- 1	13 +/- 1	15 +/- 1	nd
31	5 +/- 1	9 +/- 1	9 +/- 1	nd
32	5 +/- 1	8 +/- 1	9 +/- 1	nd
33	11 +/- 1	15 +/- 1	17 +/- 2	nd
34	-	-	-	nd
35	5 +/- 1	7 +/- 1	10 +/- 1	nd
36	-	-	-	nd
Benomyl	27 +/- 2	30 +/- 1	30 +/- 2	25 +/- 1
Maxim XL	12 +/- 2	12 +/- 1	18 +/- 1	nd

Diámetro de la zona de inhibición en mm (MIC μg/pt).
Fueron sembrados 50 μg/punto excepto Benomyl (25 μg/punto), nd: no determinado.

Tabla 11. Actividad antifúngica de los compuestos sintéticos **18**-**36**.

a la pérdida completa de actividad. El reemplazo del grupo hidroxilo del compuesto **20** por un grupo amino primario o bromo (**32** y **34**) resultó en la pérdida total de actividad frente a todas las cepas probadas. Inicialmente, el compuesto **22** mostró aproximadamente los mismos resultados que **20**, y por RMN-^{1}H pudo observarse que **22** se descomponía rápidamente a **20**. En consecuencia **22** no continuó siendo estudiado y

no se incluyó en la tabla 11. En general, las respuestas de los compuestos probados contra *F. virguliforme* y *F. lateritium* fueron similares, en cambio, se observaron algunas diferencias en las actividades contra *M. phaseolina* y *B. cynerea*, lo cual resultaría lógico teniendo en cuenta que las primeras son dos cepas del mismo género. El compuesto **19** por ejemplo resultó inactivo frente a *M. phaseolina* y **18**, **30** y **33** mostraron mayor actividad contra esta cepa que frente a las cepas de *Fusarium*.

Se eligieron cuatro de los compuestos que resultaron más activos, **18**, **20**, **26** y **30** para llevar a cabo otros análisis.

La incidencia de cepas fúngicas en semillas (naturalmente contaminadas) sin tratar y semillas tratadas con los compuestos seleccionados determinada por el test de germinación (ensayo *2*) se muestra en la tabla 12. Como puede observarse en dicha tabla, se encontraron diferencias significativas entre las semillas sin tratar (tratamiento U), que presentaron un porcentaje de incidencia fúngica alto (41.69 %), las semillas tratadas con los compuestos ensayados **18, 20**, **26** o **30**, las cuales presentaron porcentajes de incidencia entre 9,76% y 19.92 % (tratamiento Cx), y las semillas tratadas con Maxim XL, que presentaron el menor porcentaje de incidencia fúngica (2.48 %, tratamiento M). No hubo diferencias significativas entre los compuestos ensayados.

Tratamiento	% incidencia
U	41.69 a
C**18**	13.37 b
C**20**	9.76 b
C**26**	19.92 b
C**30**	13.76 b
M	2.48 c

U= semillas sin tratar; Cx= semillas tratadas con el compuesto **X**; M= semillas tratadas con Maxim XL. Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Test de Tukey $P = 0.05$.

Tabla 12. Efecto de los compuestos **18**, **20**, **26** y **30** sobre la incidencia fúngica (%).

El test de germinación se repitió además utilizando semillas de distintos lotes con distinta contaminación natural (diferentes tipo y grado de contaminación por patógenos) para observar el efecto de la actividad en diferentes situaciones naturales.

La tabla 13 muestra la frecuencia de hongos patógenos observados en estos experimentos según el género. Puede observarse como varía el efecto de los compuestos testeados en la frecuencia de patógenos dependiendo del género. Los compuestos **18, 20**, **26** o **30** demostraron ser efectivos en la inhibición de *Fusarium spp*. en lotes con menores niveles de contaminación. Se hallaron diferencias significativas entre ellos, en el orden de respuesta **20** > **18** > **30** > **26** respecto a *Fusarium spp*. (entrada i). Cuando los niveles de contaminación fueron elevados hubo una menor tendencia de inhibición y cabe destacar que con esos niveles altos de contaminación Maxim tampoco resultó muy efectivo.

La actividad de los compuestos fue menos pronunciada contra *Phomopsis spp*. a bajos niveles de contaminación y comparable a Maxim a altos niveles de contaminación. Los compuestos resultaron inactivos frente a *Cercospora kikuchii*.

Tratamiento	*Fusarium spp*.[i]	*Phomopsis spp*.[i]	*Fusarium spp*.[ii]	*Phomopsis spp*.[ii]	*Cercospora kikuchii*[iii]
U	26.50 a	7.76 a	81.89 a	28.85 a	6.67 a
C**18**	4.89 c	3.49 ab	64.93 b	9.32 d	3.49 a
C**20**	2.71 cd	3.49 ab	70.96 ab	10.93 bcd	6.89 a
C**26**	10.60 b	4.33 a	61.13 b	20.70 a	5.25 a
C**30**	6.89 bc	5.25 a	61.95 b	19.38 ab	6.33 a
M	0.00 d	0.87 b	33.88 c	9.95 cd	0.40 b

i-iii diferentes experimentos utilizando semillas de diferentes lotes (lote ii: lote con mayor contaminación natural pero de composición similar a i, lote iii: lote con alta contaminación de *Cercospora*)

U= semillas sin tratar; Cx= semillas tratadas con el compuesto **X**; M= semillas tratadas con Maxim XL. Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Test de Tukey a $P = 0.05$.

Tabla 13. Efecto de los compuestos en la frecuencia (%) de patógenos.

En los ensayos realizados también aparecieron otras cepas de hongos patógenos pero sus frecuencias fueron demasiado pequeñas como para ser considerados estadísticamente.

Los resultados expuestos sugerirían que los compuestos **18, 20**, **26** y **30** podrían actuar como inhibidores de crecimiento de *Fusarium spp*. ya que son mucho menos efectivos a mayores niveles de contaminación. Esta hipótesis concuerda con otros estudios en los que se ha informado que indoles como el ácido indol-3-acético posee actividad fungistática[35], y también el indol ha demostrado actuar como agente sinérgico de otros compuestos antifúngicos, incrementando sus propiedades fungistáticas[36].

Se llevó a cabo un experimento en invernadero (ensayo *3*) con los mismos compuestos, con el fin de evaluar la incidencia de muerte súbita en plantas de soja inoculadas con *Fusarium virguliforme* (Tabla 14). La totalidad de los compuestos de prueba previnieron la infección de las plantas en comparación con las plantas provenientes de semillas sin tratamiento, que presentaron infección en un 94.93 %. Cabe destacar que las plantas infectadas presentaron síntomas foliares leves con desarrollo de manchas cloróticas principalmente.

Tratamiento	% incidencia
U	94,93 a*
C**18**	0,00 b
C**20**	0,00 b
C**26**	0,00 b
C**30**	0,00 b
M	0,00 b

* La severidad foliar de la enfermedad (DS) se clasificó como nivel 2 (desarrollo de síntomas leves con manchas cloróticas)

U= semillas sin tratar; Cx= semillas tratadas con el compuesto **X**; M= semillas tratadas con Maxim XL. Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Test de Tukey $P = 0.05$.

Tabla 14. Efecto de los compuestos **18**, **20**, **26** y **30** sobre la incidencia del síndrome de muerte súbita (SDS) en plantas de soja inoculadas con *Fusarium virguliforme* en condiciones de invernadero.

De manera independiente, se utilizó únicamente el compuesto **18** para repetir este experimento buscando situaciones de infección global más severa. Se muestra a continuación uno de estos experimentos con alta incidencia de la enfermedad en el que se observó que el compuesto **18** no afectaba al crecimiento de las plantas, y tanto la altura como el peso fresco de los brotes no presentaron diferencias significativas con respecto a las plantas sin tratar (Tabla 15).

Tratamiento	Altura (cm)	Peso (g)
U	93.6a	11.0a
C	89.9a	12.2a
U + *Fv*	21.7c	1.4c
C + *Fv*	30.8b	4.2b

U= semillas sin tratar; C= semillas tratadas con el compuesto **2**; *Fv*= inoculación con *Fusarium virguliforme*. Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. Test de Tukey $P = 0.05$.

Tabla 15. Efecto del compuesto **18** en la altura y el peso de las plantas de soja inoculadas con *Fusarium virguliforme* en condiciones de invernadero.

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas en la altura y en el peso fresco de los brotes crecidos a partir de semillas inoculadas con *F. virguliforme* y sin otro tratamiento (U + *Fv*), y los crecidos a partir de semillas inoculadas con FV y tratadas con el compuesto **18** (C + *Fv*), obteniéndose valores promedios más altos para las plantas provenientes de semillas tratadas con **18**, aunque la incidencia de la enfermedad fue igualmente considerable en este caso. Cabe aclarar que en este ensayo las semillas con las que se trabaja han sido esterilizadas y su contenido fúngico proviene de la inoculación. Dado que este es un ensayo *in vivo* y por lo tanto depende de la respuesta y predisposición de las plantas a enfermarse, una misma cantidad de inoculación no implica que la enfermedad se manifieste con igual incidencia ni con los mismos síntomas en distintos lotes de semillas y en distintas épocas del año. Por eso para tener idea de lo que puede resultar en distintas situaciones fue necesario realizar varios experimentos.

En este experimento, el porcentaje de incidencia del síndrome de muerte súbita (SDS) fue muy alto (85 ± 2 %) desde la primera medición hecha a los 15 días post-inoculación (dpi) hasta la última, hecha 35 dpi (90 ± 2 %) para las semillas sin

tratamiento (U + *Fv*), mientras que para las semillas tratadas con **18** (C + *Fv*) la incidencia fue de 48 ± 4 % a 15 dpi y 67 ± 4 % a 35 dpi. Estos resultados se exponen en la tabla 16. Se observó que para todos los tiempos se encontraron diferencias significativas a nivel $p < 0.01$ en la incidencia entre las semillas tratadas y sin tratar.

Incidencia (%)					
Tratamiento	15 dpi	18 dpi	24 dpi	32 dpi	35 dpi
U + *Fv*	85 ± 2 a	85 ± 2 a	90 ± 2 a	90 ± 2 a	90 ± 2 a
C + *Fv*	48 ± 4 b	63 ± 5 b	63 ± 5 b	67 ± 4 b	67 ± 4 b

Test de Student, U + *Fv* vs C + *Fv*. Diferencias significativas ($p < 0.01$). La incidencia % de semillas sin tratar o tratadas con **18** sin inoculación fue 0.

Tabla 16. Efecto del compuesto **18** en la incidencia del (SDS) en plantas de soja inoculadas con *Fusarium virguliforme* en condiciones de invernadero.

Esta diferencia es particularmente relevante cuando se tienen en cuenta además los resultados obtenidos en la evaluación de la severidad (Figura 76), dado que el factor de severidad a 35 dpi fue cercano a 5 para *U + Fv*, y menor a 3 para *C + Fv*. Estos resultados son completamente consistentes con los ensayos anteriores y sustentan la conclusión sobre el claro efecto del compuesto **18** en la incidencia de *F. virguliforme* en las plantas de soja.

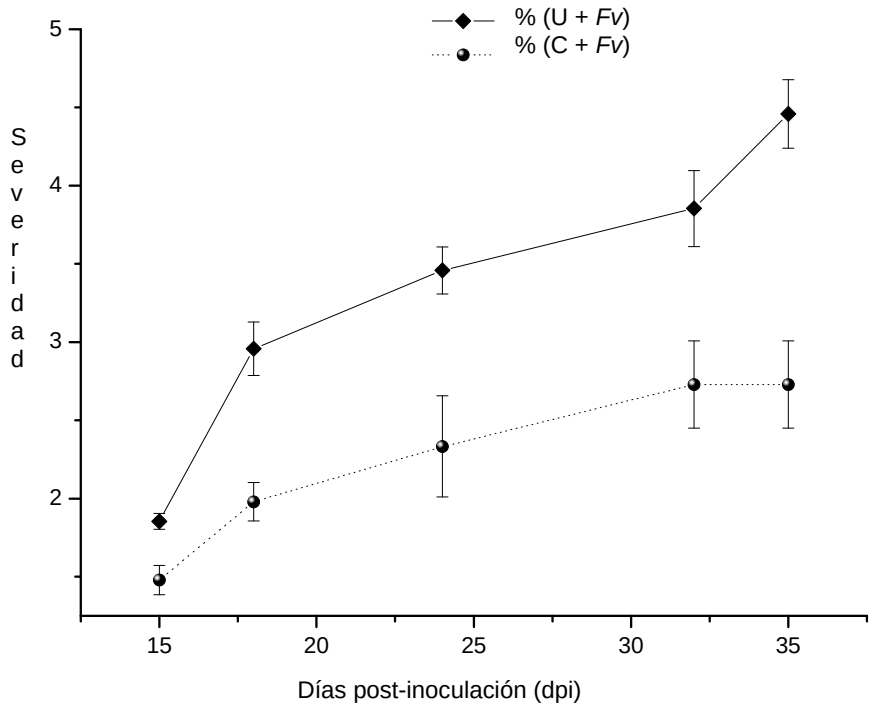


Figura 76. Efecto del compuesto **18** en la severidad del SDS en plantas de soja inoculadas con *Fusarium virguliforme* en condiciones de invernadero.

Cabe destacar la buena correlación que pudo observarse entre los ensayos antifúngicos *in vitro* utilizando bioautografía y el resto de los ensayos realizados en este trabajo, probablemente porque todos los compuestos pertenecen a la misma familia estructural y poseen propiedades físicas similares.

Otros ensayos de actividad:

Los compuestos **18** a **20**, **23** a **25** y **27** a **29** resultaron inactivos como inhibidores de protein quinasas en ensayos realizados en la Rockefeller University por el Dr. Laurent Meijer.

Conclusiones

Se prepararon, caracterizaron y se estudió la actividad antifúngica de 19 análogos del compuesto natural **17**, la mayoría de los cuales no había sido descripta previamente.

Seis de los análogos, designados **18** a **20**, **26**, **30** y **33**, exhibieron actividad antifúngica contra *F. virguliforme in vitro* y **18**, **20, 26** y **30** también resultaron efectivos como agentes antifúngicos al utilizarlos para el tratamiento de semillas naturalmente contaminadas en diversos ensayos. Su actividad resultó dependiente del grado de contaminación de las semillas, siendo más efectivos a bajo contenido de patógenos y su actividad resultó mayormente selectiva contra *Fusarium spp*. En ensayos de invernadero también resultaron ser efectivos, siendo muy efectivos en situación de baja severidad de SDS. Estas moléculas representan nuevos líderes para el tratamiento de SDS, enfermedad para la que no se ha informado un tratamiento específico hasta el momento, y para la cual existen solamente fungicidas comerciales con efectos limitados[37]. Eventualmente podrían emplearse para el desarrollo de estrategias de tratamientos combinados con fungicidas de conocida toxicidad con el fin de reducir su uso o para el desarrollo de derivados más activos.

Debido a los resultados exhibidos por los compuestos **18** a **20** en cuanto a sus propiedades antifúngicas, se presentó una solicitud de patente[38] y el trabajo se publicó en la revista *American Journal of Plant Science* en el año 2011.

Detalles Experimentales

Ensayos de actividad

1 Bioautografía en sílica gel. Ver parte experimental, capítulo 7.

2 Test de germinación en el laboratorio. Técnica de Blotter sobre papel

Se trataron 50 g de semillas de soja con una suspensión acuosa consistente en 2 gotas de tween 80 en 0.5 ml de agua y 100 mg del compuesto que se deseaba evaluar, agitándose las semillas inmersas en la solución durante 60 segundos.

Para realizar los ensayos con un control positivo se repitió el tratamiento sobre semillas utilizando Maxim XL (fludioxonyl + metalaxyl, 0.1 ml) en lugar del compuesto de prueba.

Para realizar el test se utilizaron 400 semillas tratadas con el compuesto, 400 con Maxim XL y 400 semillas sin tratamiento. Se colocaron 50 semillas por bandeja de 16 x 20 x 5 cm y se incubaron a 25 ± 1°C bajo períodos alternados de 12 h de luz fluorescente fría (Osram 18W/765) durante 7 días[31]. Luego las semillas fueron examinadas con microscopio estereoscópico con aumento 40x y la identificación de los hongos se basó en el análisis de conidióforos y conidios de los patógenos con aumento 20-40x[32]. El experimento se repitió tres veces. Los datos del experimento se estudiaron por análisis de la varianza (ANOVA). Los valores medios se compararon por diferencia significativa mínima a $P = 0.05$.

3 Experimento en invernadero

Se sembraron 96 semillas desinfectadas sin tratamiento y 96 semillas desinfectadas tratadas con alguno de los compuestos a evaluar, en macetas que contenían tierra de campo y se cubrieron con 2 cm de tierra. La mitad de las semillas de cada grupo fueron inoculadas con *Fusarium virguliforme* NRRL 34551[33]. Las macetas fueron colocadas en invernadero y se dejaron crecer en condiciones de luz natural a 25º ± 2 º C durante 4-5 semanas. La tierra se regó a saturación luego de la siembra y se mantuvo cercana a la capacidad de campo durante todo el experimento. Se tomaron finalmente los datos de los 24 grupos de 8 plantas cada uno: seis de ellos tratados con compuesto a evaluar, seis inoculados con *Fusarium virguliforme* NRRL 34551, seis tratados e inoculados, y un último conjunto de seis grupos fue tomado como control.

Tratamiento estadístico de los datos

El tratamiento estadístico se realizó en el laboratorio a partir de los datos crudos obtenidos en el Laboratorio Agrícola Río Paraná (San Pedro, Buenos Aires).

Los datos obtenidos en los ensayos de invernadero se analizaron en primera instancia como población. En cada caso se realizó un conjunto de cálculos (obtención de gráficos Box-Plot, aplicación de tests de normalidad y homocedasticidad de varianza) para conocer la naturaleza de las poblaciones a estudiar y aplicar en consecuencia los tests correspondientes (ANOVA para la comparación de más de 2 poblaciones normales o numerosas, test de Student para la comparación entre 2 poblaciones normales o numerosas)[39-41].

Para la aplicación de los tests se utilizaron softwares estadísticos como Statistix 9.0 y StatsDirect 2.7.2.

Obtención y purificación de los compuestos

El procedimiento general de obtención de los compuestos fue el siguiente: a una solución del éster metílico del ácido 1H,3-indolcarboxílico (200 mg, 1.14 mmol) en DMSO seco (2ml), se agregaron 2 eq. de NaH y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos aproximadamente, hasta que la solución se tornó verde (el color se atribuye al anión del indol generado en este paso de reacción). El cloruro de alquilo (1.2 eq) se agregó luego gota a gota en la solución resultante. La mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante una noche. Para remover el exceso de hidruro se agregaron gotas de metanol, luego se vertió agua destilada y se extrajo la mezcla de productos con acetato de etilo (3 x 5 ml). El extracto se concentró al vacío y el residuo fue purificado primero por cromatografía flash en columna seca para separar el producto de partida (CH_2Cl_2-AcOEt 95:5 hasta remoción del producto de partida y posteriormente AcOEt 100%) y luego en algunos casos se empleó HPLC C-18 o ccd preparativa (sílicagel, ciclohexano-CH_2Cl_2 1:1) (compuestos **28** y **29**). Se obtuvieron rendimientos entre 40 y 95%.

La purificación por HPLC (YMC C18, 5 μm, 22.5 x 2.5 cm) se realizó en condiciones que variaron de un caso a otro según las características de cada compuesto: MeOH-H_2O 6:4 (compuestos **18** t_R 25 min, **19** t_R 25 min, **20** t_R 30 min, **21** t_R 35 min y **22** t_R 40 min), MeOH-H_2O 7:3 (compuestos **26** t_R 25 min, **30** t_R 35 min, **31** t_R 80 min, **32** t_R 55 min y **33** t_R 55 min).

Propiedades físicas de los compuestos

Los detalles de los equipos empleados se encuentran en el capítulo 7.

*Ester metílico del ácido 1-(3-hidroxipropil)-1H-indol-3-metanoico (**18**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 3492 (OH), 2951 (CH), 2876 (CH), 1685 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.06 (m, 1H, H-4); 7.75 (s, 1H, H-2); 7.28 (m, 1H, H-7); 7.15 (m, 2H, H-5, 6); 4.16 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1´); 3.78 (s, 3H, C*H*$_3$O); 3.46 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-3´); 2.60 (sa, 1H, O*H*); 1.93 (m, 2H, H-2´). **RMN -^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.6 (C-8); 136.4 (C-

7a); 134.6 (C-2); 126.5 (C-3a); 122.6, 121.7, 121.5 (C-4, C-5, C-6); 109.9 (C-7); 106.7 (C-3); 58.6 (C-3´); 50.8 (*C*H_3O); 43.2 (C-1´); 32.0 (C-2´). **ESI-EM** *m/z*: 234.1131 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{13}H_{16}NO_3$, 134.1125, Δ -2.8 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 233 $[M]^{+\cdot}$ (65), 202 (33), 189 (45), 188 (44), 130 (100).

*Ester metílico del ácido 1-(2-hidroxipropil)-1H-indol-3-metanoico (**19**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 3453 (OH), 2937 (CH), 1677 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.04 (m, 1H, H-4); 7.75 (s, 1H, H-2); 7.27 (m, 1H, H-7); 7.16 (m, 2H, H-5,6); 4.10 (m, 1H, H-2'); 4.04 (dd, *J* = 14.4 and 3.9 Hz, 1H, H-1'); 3.92 (dd, *J* = 14.4 and 7.7 Hz, 1H, H-1'); 3.69 (s, 3H, C*H*$_3$O); 2.40 (sa, 1H, O*H*); 1.16 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, H-3'). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.5 (C-8); 136.8 (C-7a); 135.2 (C-2); 126.5 (C-3a); 122.7, 121.9 (C-5, C-6); 121.7 (C-4); 110.0 (C-7); 107.1 (C-3); 66.6 (C-2'); 54.0 (C-1'); 50.9 (*C*H_3O); 20.6 (C-3'). **ESI-EM** *m/z*: 234.1119 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{13}H_{16}NO_3$, 234.1125, Δ 2.4 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 233 $[M]^{+\cdot}$ (52), 202 (15), 188 (100), 130 (43).

*Ester metílico del ácido 1-(4-hidroxibutil)-1H-indol-3-metanoico (**20**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 3408 (OH), 2951 (CH), 2876 (CH), 1696 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.16 (m, 1H, H-4); 7.81 (s, 1H, H-2); 7.34 (m, 1H, H-7); 7.25 (m, 2H, H-5, 6); 4.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-1'); 3.88 (s, 3H, C*H*$_3$O); 3.60 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-4'); 1.96 (m, 2H, H-2'); 1.55 (m, 2H, H-3'). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.6 (C-8); 136.4 (C-7a); 134.2 (C-2); 126.6 (C-3a); 122.6, 121.7, 121.6 (C-4, C-5, C-6); 109.9 (C-7); 106.7 (C-3); 61.8 (C-4'); 50.7 (*C*H_3O); 46.6 (C-1'); 29.6 (C-3'); 26.3 (C-2'). **ESI-EM** *m/z*: 248.1207 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{14}H_{18}NO_3$, 248.1281, Δ 2.9 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 247 $[M]^{+\cdot}$ (100), 216 (27), 188 (86), 144 (50).

*Ester metílico del ácido 1-[3-(3-hidroxipropoxi)-propil]-1H-indol-3-metanoico (**21**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 3417 (OH), 2928 (CH), 1696 (C=O), 1105 (C-O-C). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.17 (m, 1H, H-4); 7.84 (s, 1H, H-2); 7.38 (m, 1H, H-7); 7.27 (m, 2H, H-5, 6); 4.29 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-1'); 3.91 (s, 3H, C*H*$_3$O); 3.81 (dd, *J* = 6.1, 5.0 Hz, 2H, H-7'); 3.56 (t, *J* = 5.70 Hz, 2H, H-3'); 3.33 (t, *J* = 5.70 Hz, 2H, H-5'); 2.15 (sa, 1H, O*H*); 2.11 (m, 2H, H-2'); 1.86 (m, 2H, H-6'). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.6 (C-8); 136.5 (C-7a); 134.6 (C-2); 126.7 (C-3a); 122.7, 121.9, 121.8 (C-4, C-5, C-6); 109.9 (C-7); 107.1 (C-3); 69.7, 67.1 (C-5', C-7'); 61.4 (C-3'); 50.9 (*C*H$_3$O); 43.5 (C-1'); 32.2 (C-2'); 29.8 (C-6'). **ESI-EM** *m/z*: 292.1550 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{16}H_{22}NO_4$, 292.1543, Δ -2.4 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 291 $[M]^{+\cdot}$ (60), 260 (7), 189 (76), 188 (39), 130 (100).

*Ester metílico del ácido 1-[4-(4-hidroxibutoxi)-butil]-1H-indol-3-metanoico (**22**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 3431 (OH), 2945 (CH), 2862 (CH), 1699 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.18 (m, 1H, H-4); 7.85 (s, 1H, H-2); 7.37 (m, 1H, H-7); 7.27 (m, 2H, H-5, 6); 4.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-1'); 3.91 (s, 3H, C*H*$_3$O); 3.64 (dd, *J* = 11.0 y 5.6 Hz,, 2H, H-9'); 3.43 (m, 4H, H-4' y 6'); 2.20 (sa, 1H, O*H*); 1.97 (m, 2H, H-2'); 1.66 (m, 4H, H-7', 8'); 1.60 (m, 2H, H-3'). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.6 (C-8); 136.4 (C-7a); 134.2 (C-2); 126.6 (C-3a); 122.6, 121.7, 121.6 (C-4, C-5, C-6); 109.9 (C-7); 106.7 (C-3); 71.0 (C-6'); 70.3 (C-4'); 62.8 (C-9'); 62.8 (C-9'); 50.9 (*C*H$_3$O); 46.6 (C-1'); 30.3 (C-7'); 26.9 (C-2', C-3'); 26.7 (C-8'). **ESI-EM** *m/z*: 320.1866 $[M+H]^+$ (calcdo. para $C_{18}H_{26}NO_4$, 320.1856, Δ -3.0 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 319 $[M]^{+\cdot}$ (39), 216 (37), 188 (100), 172 (73), 130 (83).

*Ester metílico del ácido (S) 1-(2,3-dihidroxipropil)-1H-indol-3-metanoico (**23**)*

Pf 108-110ºC. **$[\alpha]_D^{25}$**= -25 (c 0.4, MeOH). **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 3459 (OH), 2900 (CH), 1674 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.02 (m, 1H, H-4); 7.79 (s, 1H, H-2); 7.29 (m, 1H, H-7); 7.16 (m, 2H, H-5, 6); 4.15 (dd, *J* = 14.4 y 4.8 Hz, 1H, H-1'); 4.03 (dd, *J* = 14.4 y 7.3 Hz, 1H, H-1'); 3.94 (m, 1H, H-2'); 3.72 (s, 3H, C*H*$_3$O); 3.53 (dd, *J* = 11.4 y 3.9 Hz, 1H, H-3'); 3.38 (dd, *J* = 11.4 y 5.7 Hz, 1H, H-3'); 3.05 (sa, 1H, O*H*). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.6 (C-8); 136.8 (C-7a); 135.2 (C-2); 126.6 (C-3a); 123.0, 122.1, 121.8 (C-4, C-5, C-6); 109.9 (C-7); 107.5 (C-3); 70.6 (C-2'); 63.7 (C-3'); 51.0 (*C*H$_3$O); 49.1 (C-1'). **ESI-EM** *m/z*: 250.1061 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{13}H_{16}NO_4$, 250.1074, Δ 5.2 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 249 $[M]^{+\cdot}$ (63), 218 (20), 189 (22), 188 (100), 130 (24).

*Ester metílico del ácido (R) 1-(2,3-dihidroxipropil)-1H-indol-3-metanoico (**24**)*

Pf 109-110ºC. **$[\alpha]_D^{25}$**= 25 (c 0.4, MeOH). **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 3459 (OH), 2910 (CH), 1674 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.06 (m, 1H, H-4); 7.86 (s, 1H, H-2); 7.37 (m, 1H, H-7); 7.21 (m, 2H, H-5, 6); 4.28 (dd, *J* = 14.4 y 5.0 Hz, 1H, H-1'); 4.19 (dd, *J* = 14.4 y 7.3 Hz, 1H, H-1'); 4.10 (m, 2H, H-2'); 3.83 (s, 3H, *C*H$_3$O); 3.70 (dd, *J* = 11.4 y 4.3 Hz, 1H, H-3'); 3.53 (dd, *J* = 11.4, 5.5 Hz, 1H, H-3'). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 166.0 (C-8); 136.8 (C-7a); 135.5 (C-2); 126.4 (C-3a); 122.7, 121.8, 121.4 (C-4, C-5, C-6); 110.0 (C-7); 106.8 (C-3); 70.3 (C-2'); 63.4 (C-3'); 50.9 (*C*H$_3$O); 49.0 (C-1'). **ESI-EM** *m/z*: 250.1078 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{13}H_{16}NO_4$, 250.1074, Δ -1.7 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 249 $[M]^{+\cdot}$ (52), 218 (12), 189 (18), 188 (100), 130 (13).

*Ester metílico del ácido 1-decil-1H-indol-3-metanoico (**25**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2920 (CH), 2851 (CH), 1702 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.10 (m, 1H, H-4); 7.74 (s, 1H, H-2); 7.28 (m, 1H, H-7); 7.19 (m, 2H, H-5, 6); 4.04 (t, *J*

= 7.3 Hz, 2H, H-1'); 3.83 (s, 3H, C*H*$_3$O); 1.78 (qi, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-2´); 1.15-1.23 (m, 14H, H-3´ a 9´); 0.80 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-10'). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.5 (C-8); 136.6 (C-7a); 134.2 (C-2); 126.7 (C-3a); 122.6, 121.7 (C-4, C-5, C-6); 109.9 (C-7); 106.9 (C-3); 50.9 (*C*H$_3$O); 47.0 (C-1'); 31.8 (C-2'); 29.8, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 26.8, 22.6 (C-3´ a C-9´); 14.1 (C-10´). **ESI-EM** *m/z*: 316.2261 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{20}H_{30}NO_2$, 316.2271, Δ 3.1 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 315 $[M]^{+\cdot}$ (100), 284 (18), 188 (64), 130 (42).

*Ester metílico del ácido 1-(4-acetoxibutil)-1H-indol-3-metanoico (**26**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2954 (CH), 1735 (C=O), 1696 (C=O), 1241 (C-O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.20 (t, 1H, H-4); 7.82 (s, 1H, H-2); 7.34 (t, 1H, H-7); 7.29 (m, 2H, H-5, 6); 4.19 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-1'); 4.06 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H-4'); 3.92 (s, 3H, C*H*$_3$O); 2.03 (s, 3H, C*H*$_3$CO); 1.92 (qi, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-2'); 1.63 (m, 2H, H-3'). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 170.9 (CH_3*C*O); 165.3 (C-8); 136.4 (C-7a); 134.2 (C-2); 126.7 (C-3a); 122.7, 121.8, 121.7 (C-4, C-5, C-6); 109.9 (C-7); 106.9 (C-3); 63.7 (C-4'); 51.1 (*C*H$_3$O); 46.6 (C-1'); 26.7, 26.1 (C-2', C-3'); 20.9 (*C*H$_3$CO). **ESI-EM** *m/z*: 290.1403 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{16}H_{20}NO_4$, 290.1387, Δ -4.53 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 289$[M]^{+\cdot}$ (99), 258 (27), 188 (100), 144 (22).

*Ácido 1-(2-hidroxipropil)-1H-indol-3-metanoico (**27**)*

Pf 150-151 ºC. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 3342 (OH), 2923 (CH), 1549.1 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$-CD_3OD 5%): δ 8.20 (m, 1H, H-4); 7.73 (s, 1H, H-2); 7.36 (m, 1H, H-7); 7.12 (m, 2H, H-5, 6); 4.13 (m, 2H, H-2'); 4.10 (m, 2H, H-1'); 1.16 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, H-3'). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$-CD_3OD 5%): δ 174.1 (C-8); 138.1 (C-7a); 134.6 (C-2); 128.6 (C-3a); 122.7, 122.4, 121.2 (C-4, C-5, C-6); 114.1 (C-3); 110.5 (C-7); 67.3 (C-2'); 54.4 (C-

1'); 20.9 (C-3'). **ESI-EM** *m/z*: 220.0979 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{12}H_{14}NO_3$, 220.0968, Δ -4.8 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 219 $[M]^{+\cdot}$ (27), 175(35), 174 (39), 130 (100).

*Ácido 1-decil-1H-indol-3-metanoico (**28**)*

Pf 87-88ºC. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 3239 (OH), 2917 (CH), 1663 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.13 (m, 1H, H-4); 7.80 (s, 1H, H-2); 7.27 (m, 1H, H-7); 7.18 (m, 2H, H-5, 6); 4.02 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-1'); 1.76 (qi, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-2´); 1.15-1.23 (m, 14H, H-3´ to H-9´); 0.78 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-10´). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 168.9 (C-8); 136.6 (C-7a); 135.1 (C-2); 126.9 (C-3a); 122.6, 121.8, 121.7 (C-4, C-5, C-6); 109.9 (C-7); 106.3 (C-3); 46.9 (C-1'); 31.7 (C-2'); 29.7, 29.3, 29.3, 29.1, 29.0, 26.7, 22.5 (C-3´ to C-9´); 13.9 (C-10´). **ESI-EM** *m/z*: 302.2128 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{19}H_{28}NO_2$, 302.2115, Δ -4.6 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 301 $[M]^{+\cdot}$ (100), 256 (14), 174 (80), 130 (56).

*Ester decílico del ácido 1-decil-1H-indol-3-metanoico (**29**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2929 (CH), 1707 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.17 (m, 1H, H-4); 7.82 (s, 1H, H-2); 7.36 (m, 1H, H-7); 7.26 (m, 2H, H-5, 6); 4.32 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-1´´); 4.13 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-1'); 1.80-1.87 (m, 4H, H-2´, 2´´); 1.25-1.47 (m, 28H, H-3´ a H-9´, H-3´´ a H-9´´); 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, H-10´*); 0.87 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-10´´*). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.4 (C-8); 136.6 (C-7a); 134.2 (C-2); 126.7 (C-3a); 122.5, 121.8, 121.7 (C-4, C-5, C-6); 109.9 (C-7); 107.3 (C-3); 63.9 (C-4'); 47.0 (C-1'); 31.9, 29.9, 29.5, 29.3, 29.2, 29.0, 26.9, 22.7 (C-3´ a C-9´, C-3´´ a C-9´´); 14.1 (C-10´, C-10´´). **ESI-EM** *m/z*: 442.3689 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{29}H_{48}NO_2$, 442.3680, Δ -2.1 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 441 $[M]^{+\cdot}$ (100), 301 (17), 284 (23), 174 (15), 130 (13).* pueden intercambiarse.

*Ester metílico del ácido 1-metil-1H-indol-3-metanoico (**30**)*

Pf 85-86 ºC. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2948 (CH), 1691 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.17 (m, 1H, H-4); 7.79 (s, 1H, H-2); 7.36 (m, 1H, H-7); 7.29 (m, 2H, H-5, 6); 3.91 (s, 3H, C*H*$_3$O); 3.84 (H-1´). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.6 (C-8); 137.3 (C-7a); 135.3 (C-2); 126.7 (C-3a); 122.9, 122.0 (C-5, C-6); 121.8 (C-4); 109.9 (C-7); 107.1 (C-3); 51.1 (*C*H$_3$O); 33.6 (C-1'). **ESI-EM** *m/z*: 190.0865 $[M+H]^+$ (calcdo. para $C_{11}H_{12}NO_2$, 190.0863, Δ -1.3 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 189 $[M]^{+\cdot}$ (43), 158 (100), 130 (22), 77 (18).

*Ester metílico del ácido 1-(3-bromopropil)-1H-indol-3-metanoico (**31**)*

Pf 49-50 ºC. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2948 (CH), 1693 (C=O), 750 (CBr). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.18 (m, 1H, H-4); 7.87 (s, 1H, H-2); 7.41 (m, 1H, H-7); 7.29 (m, 2H, H-5, 6); 4.38 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-1'); 3.91 (s, 3H, C*H*$_3$O); 3.32 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-3'); 2.39 (m, 2H, H-2'). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.5 (C-8); 136.5 (C-7a); 134.4 (C-2); 126.9 (C-3a); 123.1, 122.2 (C-5, C-6); 122.1 (C-4); 109.9 (C-7); 107.3 (C-3); 51.2 (*C*H$_3$O); 44.8 (C-1'); 32.5 (C-2'); 29.9 (C-3'). **ESI-EM** *m/z*: 296.0278 $[M+H]^+$ (calcdo. para $C_{13}H_{15}BrNO_2$, 296.0281, Δ 1.1 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 297 $[M+2]^{+\cdot}$ (39), 295 $[M]^{+\cdot}$ (38), 266 (22), 264 (20), 188 (100), 41 (58).

*Ester metílico del ácido 1-(4-bromobutil)-1H-indol-3-metanoico (**32**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2942 (CH), 1691 (C=O), 747 (CBr). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.18 (m, 1H, H-4); 7.82 (s, 1H, H-2); 7.37 (m, 1H, H-7); 7.29 (m, 2H, H-5, 6); 4.20 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1'); 3.91 (s, 3H, C*H*$_3$O); 3.39 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-4'); 2.06 (m, 2H, H-2'); 1.88 (m, 2H, H-3'). **RMN-^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.6 (C-8); 136.6 (C-7a); 134.1 (C-2); 126.9 (C-3a); 123.0, 122.1 (C-5, C-6); 122.0 (C-4); 109.9 (C-7); 107.4 (C-3); 51.2

(*C*H_3O); 46.3 (C-1'); 32.8 (C-4'); 29.9 (C-3'); 28.6 (C-2') . **ESI-EM** *m/z*: 310.0440 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{14}H_{17}BrNO_2$, 310.0437, Δ -0.9 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 311 $[M+2]^{+\cdot}$ (48), 309 $[M]^{+\cdot}$ (44), 280 (13), 278 (13), 188 (100), 55 (49).

*Ester metílico del ácido 1-alil-1H-indol-3-metanoico (**33**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2931 (C=C-H), 1699 (C=O/C=C). **RMN -^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.18 (m, 1H, H-4); 7.83 (s, 1H, H-2); 7.35 (m, 1H, H-7); 7.28 (m, 2H, H-5, 6); 6.00 (ddd, *J*=17.0, 10.3 y 5.5 Hz, 1H, H-2'); 5.28 (dd, *J*=10.3 y 1.1 Hz, 1H, H-3'); 5.15 (dd, *J*=17.0 y 1.0 Hz, 1H, H-3'); 4.76 (dt, *J* = 5.5 and 1.1 Hz, 2H, H-1'); 3.91 (s, 3H, C*H*$_3$O). **RMN- ^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.6 (C-8); 136.7 (C-7a); 134.4 (C-2); 132.3 (C-2'); 126.9 (C-3a); 122.9, 122.1 (C-5, C-6); 121.9 (C-4); 118.7 (C-3'); 110.3 (C-7); 107.4 (C-3); 51.2 (*C*H_3O); 49.5 (C-1'). **ESI-EM** *m/z*: 216.1133 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{13}H_{14}NO_2$, 216.1019, Δ -5.2 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 215 $[M]^{+\cdot}$ (66), 184 (78), 156 (96), 41 (100).

*Ester metílico del ácido 1-(4-aminobutil)-1H-indol-3-metanoico (**34**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 3459, 3423 (NH_2), 2917 (CH), 1680 (C=O). **RMN -^{1}H** ($CDCl_3$-CD_3OD 5%): δ 8.14 (m, 1H, H-4); 7.88 (s, 1H, H-2); 7.39 (m, 1H, H-7); 7.29 (m, 2H, H-5, 6); 4.24 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-1'); 3.91 (s, 3H, C*H*$_3$O); 2.90 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-4'); 1.97 (m, 2H, H-2'); 1.68 (m, 2H, H-3'). **RMN -^{13}C** ($CDCl_3$-CD_3OD 5%): δ 165.9 (C-8); 136.2 (C-7a); 134.4 (C-2); 126.4 (C-3a); 123.1, 122.2 (C-5, C-6); 121.9 (C-4); 110.0 (C-7); 106.9 (C-3); 51.2 (*C*H_3O); 46.2 (C-1'); 39.4 (C-4'); 26.8 (C-2'); 25.2 (C-3'). **ESI-EM** *m/z*: 247.1449 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{14}H_{19}N_2O_2$, 247.1441, Δ -3.0 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 246 $[M]^{+\cdot}$ (15), 214 (16), 188 (21), 144 (36), 43 (100).

*Ester metílico del ácido 1-(4-dimetilaminobutil)-1H-indol-3-metanoico (**35**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2942 (CH), 1702 (C=O). **RMN -^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.18 (m, 1H, H-4); 7.83 (s, 1H, H-2); 7.37 (m, 1H, H-7); 7.28 (m, 2H, H-5, 6); 4.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-1'); 3.91 (s, 3H, C*H*$_3$O); 2.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-4'); 2.27 (s, 6H, NC*H*$_3$); 1.91 (m, 2H, H-2'); 1.55 (m, 2H, H-3'). **RMN -^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.6 (C-8); 136.6 (C-7a); 134.3 (C-2); 126.9 (C-3a); 122.9, 122.0 (C-5, C-6); 121.9 (C-4); 110.0 (C-7); 107.2 (C-3); 51.1 (*C*H$_3$O); 58.3 (C-4'); 46.9 (C-1'); 44.7 (N*C*H$_3$); 27.7 (C-2'); 24.3 (C-3'). **ESI-EM** *m/z*: 275.1741 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{16}H_{23}N_2O_2$, 275.1754, Δ 4.7 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 274 $[M]^{+\cdot}$ (4), 188 (2), 58 (100).

*Ester metílico del ácido 1,3-di-[(3´-metoxicarbonil)-1H-indol-1-il] propano (**36**)*

Pf 176-177 ºC. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2920 (CH), 1691 (C=O). **RMN -^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.20 (m, 2H, H-4); 7.76 (s, 2H, H-2); 7.29 (m, 2H, H-5); 7.26 (m, 2H, H-6); 7.19 (m, 2H, H-7); 4.16 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, H-1'); 3.91 (s, 6H, C*H*$_3$O); 2.50 (qi, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-2'). **RMN -^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.4 (C-8); 136.4 (C-7a); 133.8 (C-2); 126.9 (C-3a); 123.3 (C-6); 122.4 (C-5); 122.2 (C-4); 109.8 (C-7); 107.9 (C-3); 51.2 (*C*H$_3$O); 43.9 (C-1'); 29.8 (C-2'). **ESI-EM** *m/z*: 391.1669 $[M+H]^+$ (Calcdo. para $C_{23}H_{23}N_2O_4$, 391.1652, Δ -4.2 ppm). **EI-EM** (70 eV): m/z (%) 390 $[M]^{+\cdot}$ (24), 359 (6), 189 (50), 188 (15), 130 (100).

Bibliografía

(1) Levy, L. M.; Cabrera, G. M.; Wright, J. E.; Seldes, A. M. "Indole alkaloids from a culture of the fungus *Aporpium caryae*" *Phytochemistry* **2000**, *54*, 941-943.

(2) Karabelas, K.; Lepisto, M.; Sjo, P. "Preparation of new triazoles as pharmaceutically active compounds activity as kinase inhibitors" **2000**, Appl. 646972.

(3) Ishikura, M.; Ida, W.; Yanada, K. "A one-pot access to cycloalkano[1,2-a]indoles through an intramolecular alkyl migration reaction in indolylborates" *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1015-1024.

(4) Ziegler, F. E.; Jeroncic, L. O. "A new route to 9,9a-Dihydro-3H-pyrrolo[1,2-a]indoles via radical cyclization" *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 3479-3486.

(5) Homans, A. L.; Fuchs, A. "Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances" *Journal of Chromatography A* **1970**, *51*, 327-329.

(6) Hadacek, F.; Greger, H. "Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice" *Phytochemical Analysis* **2000**, *11*, 137-147.

(7) Gupta, K.; Bishop, J.; Peck, A.; Brown, J.; Wilson, L.; Panda, D. "Antimitotic antifungal compound benomyl inhibits brain microtubule polymerization and dynamics and cancer cell proliferation at mitosis, by binding to a novel site in tubulin " *Biochemistry* **2004**, *43*, 6645-6655.

(8) Actor, P.; Anderson, E. L.; DiCuollo, C. J.; Ferlauto, R. J.; Hoover, J. R. E.; Pagano, J. F.; Ravin, L. R.; Scheidy, S. F.; Stedman, R. J.; Theodorides, V. J. "New broad spectrum anthelmintic, methyl 5(6)-butyl-2-benzimidazolecarbamate" *Nature (London)* **1967**, *215*, 321-322.

(9) Davidse, L. C.; Flach, W. "Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*" *The Journal of Cell Biology* **1977**, *72*, 174-193.

(10) Shillingford, C. A. "Banana fruit rot control in Jamaica" *Tropical Pest Management* **1970**, *16*, 69-75.

(11) Chauhan, M. S.; Yadav, J. P. S.; Gangopadhyay, S. "Chemical control of soilborne fungal pathogen complex of seedling cotton" *Tropical Pest Management* **1988**, *34*, 159-161.

(12) Foster, M. G.; McQueen, D. J. "Multiple applications of benomyl and effects on non-target soil fungi" *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1977**, *17*, 468-476.

(13) Foster, M. G. "The *in vivo* antifungal effects of benomyl on non-target soil fungi" *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1975**, *14*, 353-360.

(14) Maraite, H.; Meyer, J. A. "Systemic fungitoxic action of benomyl against *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis *in vivo*" *European Journal of Plant Pathology* **1971**, *77*, 1-5.

(15) Upham, P. M.; Delp, C. J. "Role of benomyl in the systemic control of fungi and mites on herbaceous plants" *Phytopathology* **1973**, *63*, 814-820.

(16) Young, H.; Hammett, K. R. W. "Comparative uptake of benomyl-2-carbon-14 and methyl benzimidol-2-yl carbamate-2-carbon-14 by cucumber leaves" *New Zealand Journal of Science* **1973**, *16*, 533-537.

(17) Saenger, H. L. "Control of *Thielaviopsis* root rot of tobacco with benomyl fungicide drenches" *Plant Disease Reporter* **1970**, *54*, 136-140.

(18) Minton, E. B.; Papavizas, G. C.; Lewis, J. A. "Effect of fungicide seed treatments and seed quality on seedling diseases and yield of cotton" *Plant Disease Reporter* **1982**, *66*, 832-835.

(19) Papavizas, G. C.; Lewis, J. A.; Minton, E. B.; O'Neill, N. R. "New systemic fungicides for the control of cotton seedling disease" *Phytopathology* **1980**, *70*, 113-118.

(20) Papavizas, G. C.; Lewis, J. A. "Effect of seed treatment with fungicides on bean root rots" *Plant Disease Reporter* **1975**, *59*, 24-28.

(21) Potočnik, I.; Vukojević, J.; Stajić, M.; Rekanović, E.; Milijaševic, S.; Todorović, B.; Stepanović, M. "In vitro toxicity of selected fungicides from the groups of benzimidazoles and demethylation inhibitors to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*" *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **2009**, *44*, 365-370.

(22) Igbedioh, S.; Akinyele, I. "Effect of benomyl toxicity on some liver constituents of albino rats" *Archives of Environmental Health* **1992**, *47*, 314-317.

(23) McCarroll, N. E.; Protzel, A.; Ioannou, Y.; Frank, S. H.; Jackson, M. A.; Waters, M. D.; Dearfield, K. L. "A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim" *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* **2002**, *512*, 1-35.

(24) Goulart, A. C. P. "Effect of cotton seed treatment with fungicides in the control of *Rhizoctonia solani* seedling damping-off under greenhouse conditions" *Tropical Plant Pathology* **2008**, *33*, 394-398.

(25) Ellis, M. L.; Broders, K. D.; Paul, P. A.; Dorrance, A. E. "Infection of soybean seed by *Fusarium graminearum* and effect of seed treatments on disease under controlled conditions" *Plant Disease* **2011**, *95*, 401-407.

(26) Punja, Z. K.; Wan, A.; Goswami, R. S. "Root rot and distortion of ginseng seedling roots caused by *Fusarium oxysporum*" *Canadian Journal of Plant Pathology* **2008**, *30*, 565-574.

(27) Solorzano, C. D.; Malvick, D. K. "Effects of fungicide seed treatments on germination, population, and yield of maize grown from seed infected with fungal pathogens" *Field Crops Research*, *122*, 173-178.

(28) Marchi, J. L.; Cicero, S. M. "Influence of chemical treatment of maize seeds with different levels of mechanical damage on electrical conductivity values" *Seed Science and Technology* **2003**, *31*, 481-486.

(29) Pereira, C. E.; Oliveira, J. A.; Oliveira, G. E.; Rosa, M. C. M.; Neto, J. C. "Fungicide treatment by film coating and soybean seed inoculation with *Bradyrhizobium* " *Revista Ciencia Agronomica* **2009**, *40*, 433-440.

(30) Kojima, H.; Sata, F.; Takeuchi, S.; Sueyoshi, T.; Nagai, T. "Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using in vitro reporter gene assays" *Toxicology* **2011**, *280*, 77-87.

(31) Sharma-Poudyal, D.; Duveiller, E.; Sharma, R. C. "Effects of seed treatment and foliar fungicides on *Helminthosporium* leaf blight and on performance of wheat in warmer growing conditions" *Journal of Phytopathology* **2005**, *153*, 401-408.

(32) Leach, C. M. "The qualitative and quantitative relationship of monochromatic radiation to sexual and asexual reproduction of *Pleospora herbarum*" *Mycologia* **1963**, *55*, 151-163.

(33) Aoki, T.; O'Donnell, K.; Scandiani, M. M. "Sudden-death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense*

sp. nov., *F*. *cuneirostrum sp*. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*" *Mycoscience* **2005**, *46*, 162-183.

(34) Huang, Y. H.; Hartman, G. L. "Reaction of Selected Soybean Genotypes to Isolates of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and Their Culture Filtrates" *Plant Disease* **1998**, *82*, 999-1002.

(35) Yue, Q.; Miller, C. J.; White, J. F.; Richardson, M. D. "Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloe festucae*" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 4687-4692.

(36) Himejima, M.; Kubo, I. "Fungicidal activity of polygodial in combination with anethole and indole against *Candida albicans*" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, *41*, 1776-1779.

(37) Shaner, G. E.; Scott, D. H.; Abney, T. S. “Sudden-death syndrome in soybeans” Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University, **2004**,

(38) Cabrera, G.; Bertinetti, B.; Scandiani, M. "Compuestos derivados de indoles útiles como antifúngicos, su proceso de preparación y método para controlar hongos dañinos" **2006**, Ap. 06 0102909

(39) Alabouvette, C.; Olivain, C.; Steinberg, C. "Biological control of plant diseases: the european situation" *European Journal of Plant Pathology* **2006**, *114*, 329-341.

(40) García-Villalpando, J. A.; Castillo-Morales, A.; Ramírez-Guzmán, M. E.; Rendón-Sánchez, G.; Larqué-Saavedra, M. U. "Comparación de los procedimientos de Tukey, Duncan, Dunnett, Hsu y Bechhofer para selección de medias" *Agrociencia* **2001**, *35*, 79-86.

(41) Glynn, N. C.; Hare, M. C.; Edwards, S. G. "Fungicide seed treatment efficacy against *Microdochium nivale* and *M. majus in vitro* and *in vivo*" *Pest Management Science* **2008**, *64*, 793-799.

Introducción

Los indoles son compuestos de importancia biológica por presentar variadas actividades[1-3]; existen numerosas drogas que poseen *N*-alquilindoles en su estructura química, tales como los canabinoides JWH018 y JWH073[4], una amina que actúa como agente antimigraña[5], la droga oncolítica vinblastina, mencionada en la introducción, y nuevas drogas antitumorales en fases preclínicas[6,7] (figura 77).

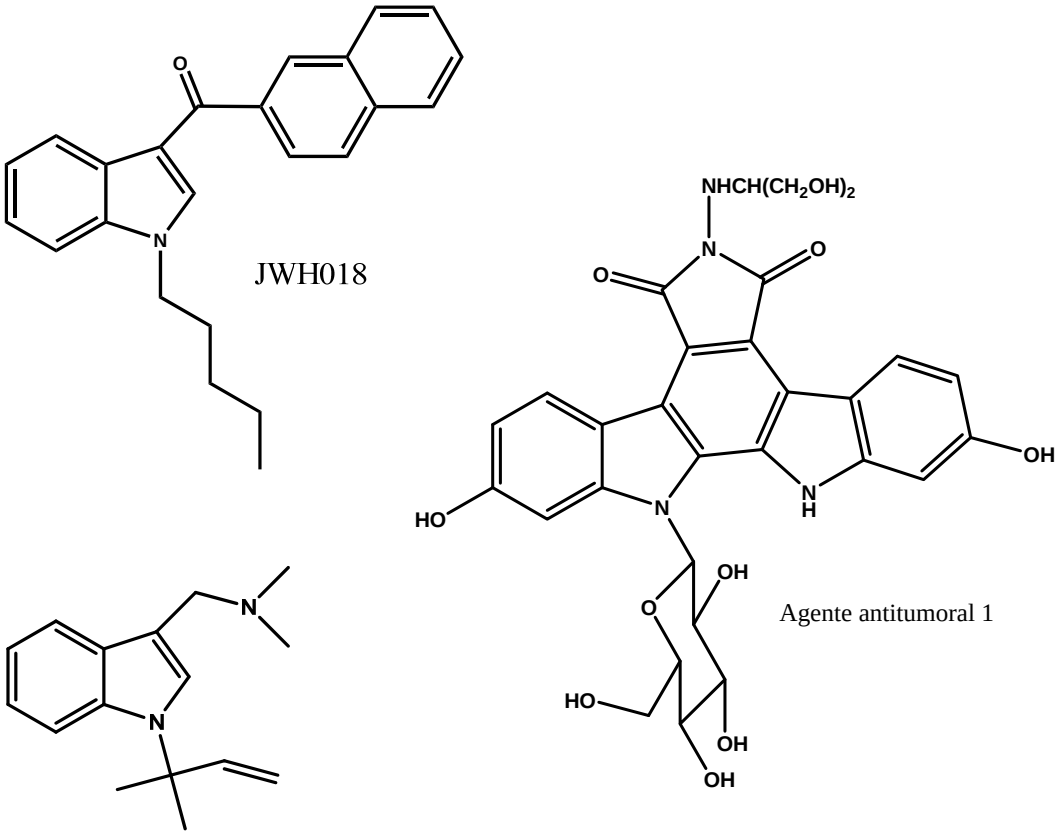
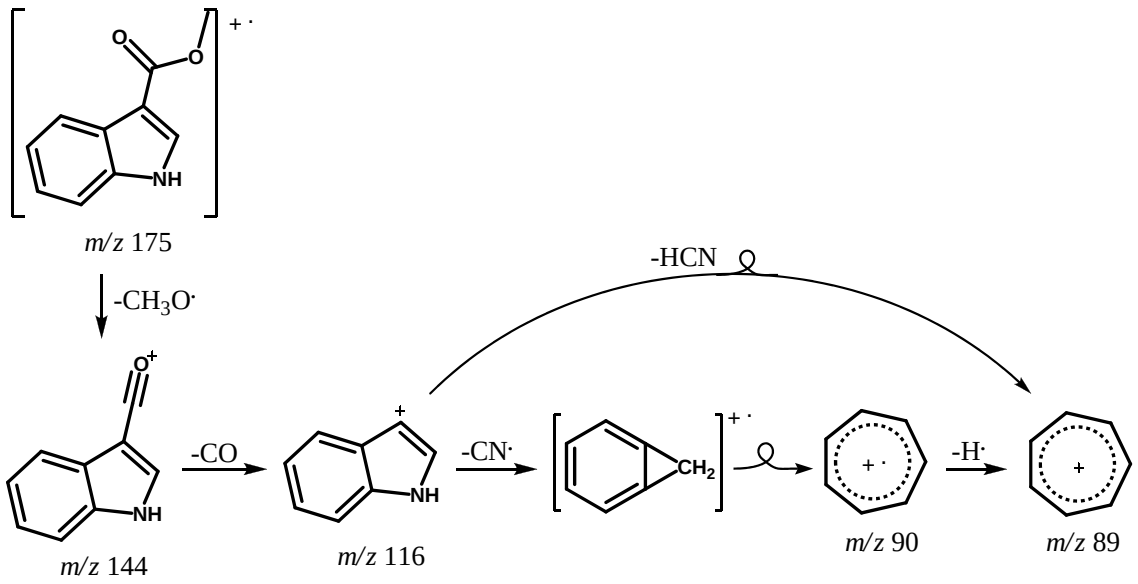


Figura 77. Algunas drogas con estructura de *N*-alquilindoles.

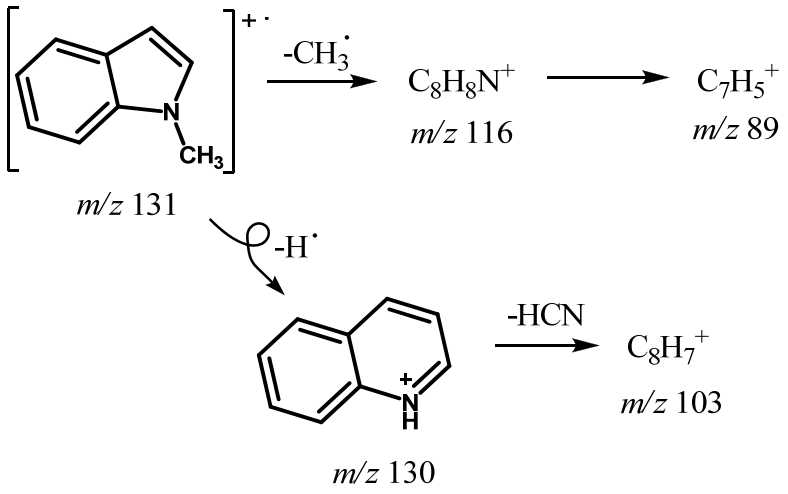
A pesar de su simplicidad estructural no se ha estudiado en detalle el comportamiento de esta clase de compuestos por EM utilizando técnicas suaves de ionización. En cambio se han estudiado extensivamente caminos de fragmentación por

EI desde los años '70[8-11]. Para los ésteres del ácido 3-indolmetanoico se han planteado los caminos de fragmentación que se muestran en el esquema 10. La estructura de los iones fragmento se planteó en función de los iones metaestables observados[10,12].



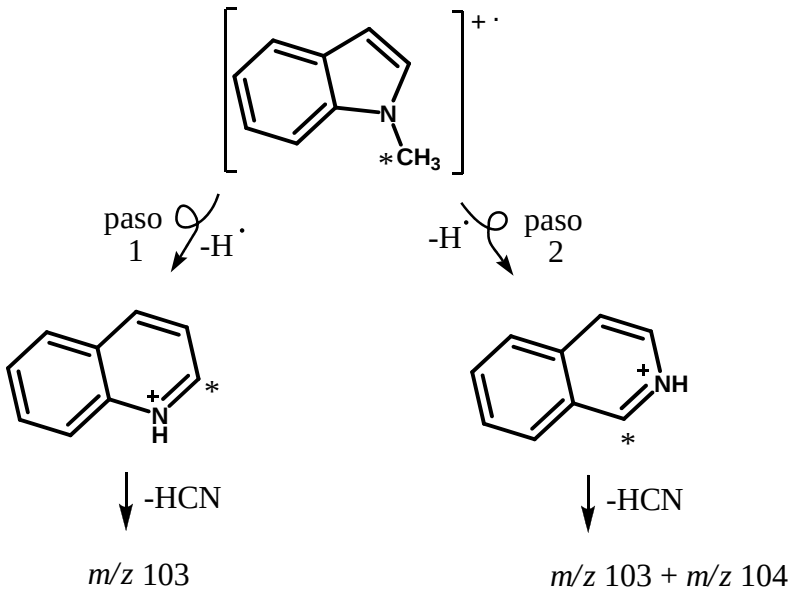
Esquema 10. Iones fragmento informados para el éster metílico del ácido 3-indolmetanoico en experimentos EI-EM.

En el caso de los metilindoles como el *N*-metilindol se observaron además de los iones fragmento esperados, iones provenientes de un reordenamiento (esquema 11)[9,12]



Esquema 11. Fragmentos informados para metilindoles en experimentos EI-EM.

Este reordenamiento se estudió con el *N*-metilindol marcado con ^{13}C en el metilo y se observó que el 52% de la marca era retenida por el ión $[M-(H^{\cdot}+HCN)]^{+}$ por lo que se postuló que el mecanismo de reordenamiento vía el paso 2 era el más probable (esquema 12)[13].



Esquema 12. Mecanismos de reordenamiento propuestos para *N*-metilindol.

Debido a que no hay estudios similares recientes sobre la fragmentación de indoles empleando técnicas modernas de ionización y debido a la disponibilidad de un gran número de ésteres metílicos del ácido 3-indolmetanoico con variedad de grupos alquilos en posición 1, se decidió realizar un análisis detallado por EM tandem utilizando electrospray (ESI) y ionización química a presión atmosférica (APCI).

El equipo empleado para hacer este estudio consiste en un analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) que puede utilizarse con fuentes ESI, APCI y APPI (detalles en el capítulo 7). Todos los iones en los espectros se obtienen con alta precisión.

El análisis por espectrometría de masa tandem en este instrumento consiste en obtener los espectros a partir de inyección directa de la muestra utilizando las fuentes mencionadas, seleccionar el precursor en el cuadrupolo, hacerlo colisionar con Ar en una celda de colisión (CID) y registrar los iones producto con el TOF. Por lo tanto

debido a las características del instrumento no es posible realizar experimentos de EM^n, sino solo EM/EM.

Para emular un experimento de EM/EM/EM puede aplicarse un potencial extra en la fuente para lograr la disociación de los iones precursores; puede entonces seleccionarse un ion fragmento en el cuadrupolo y colisionarlo en la celda de colisión para obtener nuevos iones fragmento, producidos a partir del ión fragmento seleccionado. Este experimento se conoce como "*In source* CID" (ISCID) y cabe destacar que no es exactamente un EM^3 ya que las condiciones de obtención de los iones fragmento que se seleccionan en la fuente son a presión atmosférica.

Estos experimentos CID e ISCID permiten determinar las fórmulas moleculares de iones fragmento para establecer la genética iónica.

Análisis por ESI-MS de los compuestos

Se realizaron los espectros ESI MS en modo positivo de los compuestos estudiados en el capítulo anterior. En particular se estudiaron los ésteres metílicos. En todos los casos fue necesario el agregado de solución de acetato de amonio (NH_4AcO) a la solución metanólica de los compuestos para suprimir los iones sodiados y observar los $[M+H]^+$.

Se repitieron los espectros empleando APCI-EM y APCI-EM/EM y no se observaron diferencias importantes, por lo que se comentarán en adelante los resultados obtenidos por ESI. Como era de esperar, en los espectros de masa obtenidos por APCI no se observaron especies sodiadas.

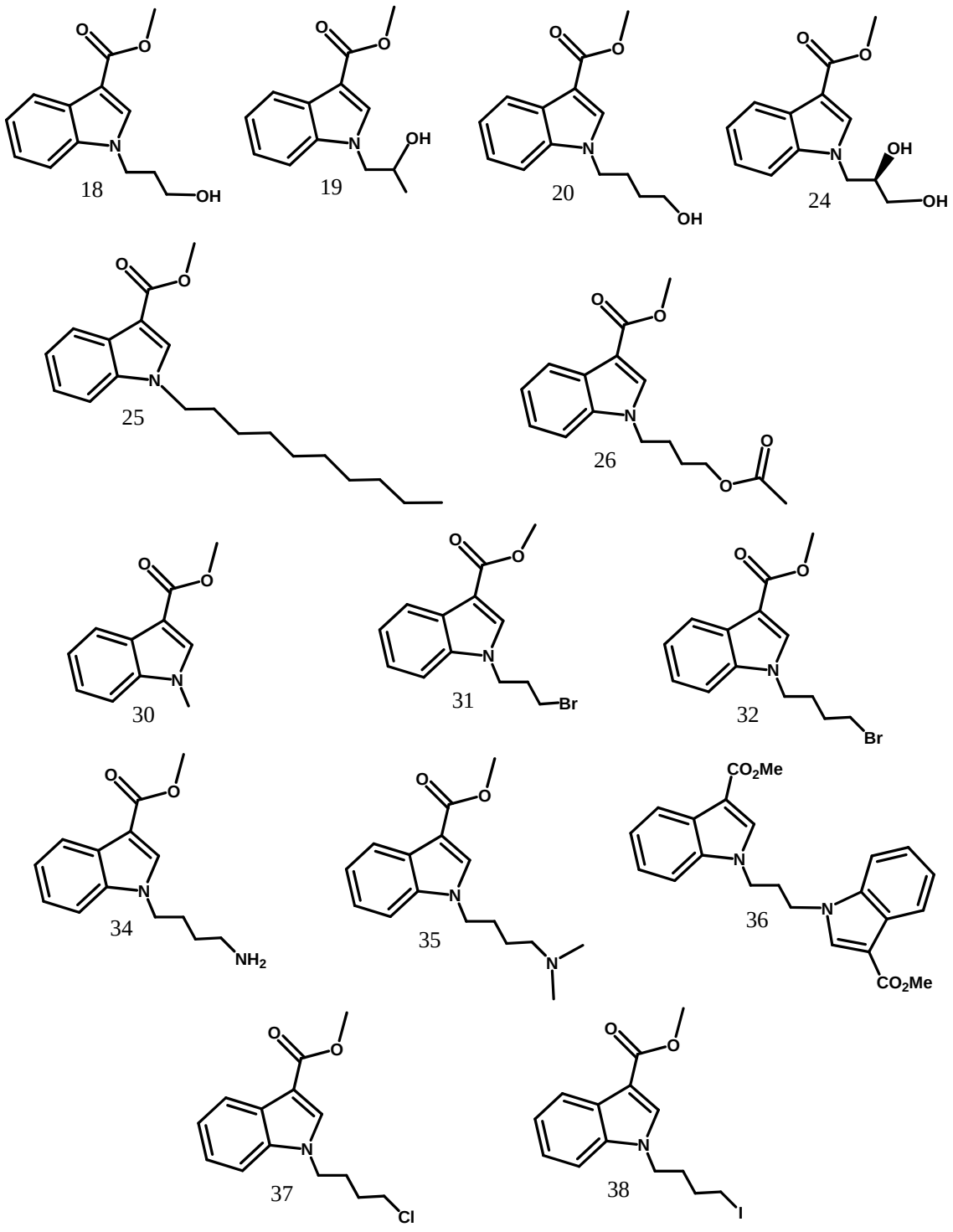


Figura 78. *N*-alquilindoles analizados por ESI-MS.

Los resultados obtenidos por ESI se muestran en la tabla 18. En la columna de los iones observados se muestran los iones $[2M+Na]^+$, $[M+Na]^+$ y $[M+H]^+$ de los espectros de masa y los iones fragmento obtenidos a partir del precursor $[M+H]^+$ por EM/EM (CE 15 eV).

Compuesto **18**				
Iones observados en los espectros EM y EM/EM	*m/z* (AR)	*m/z* teórico	Error (ppm)	Fórmula molecular
$[2M+Na]^+$	489.2005	489.1996	-1.9	$C_{26}H_{30}N_2O_6Na$
$[M+Na]^+$	256.0956	256.0944	-4.7	$C_{13}H_{15}NO_3Na$
$[M+H]^+$	234.1130	234.1125	-2.1	$C_{13}H_{16}NO_3$
f1	216.1018 (0.8)	216.1019	0.3	$C_{13}H_{14}NO_2$
f2	202.0871 (69.4)	202.0863	-4.2	$C_{12}H_{12}NO_2$
f3	190.0872 (17.3)	190.0863	-4.7	$C_{11}H_{12}NO_2$
f4	188.0703 (42.0)	188.0706	1.9	$C_{11}H_{10}NO_2$
f5	184.0756 (23.8)	184.0757	0.5	$C_{12}H_{10}NO$
f6	174.0559 (100)	174.0550	5.6	$C_{10}H_8NO_2$
f7	158.0599 (32.6)	158.0600	0.9	$C_{10}H_8NO$
f8	156.0795 (10.8)	156.0808	8.0	$C_{11}H_{10}N$
f9	144.0437 (10.1)	144.0444	4.9	C_9H_6NO
f10	130.0651 (0.8)	130.0651	0.1	C_9H_8N
Espectro ESI-EM/EM en figura 113				
Compuesto **19**				
$[2M+Na]^+$	489.2014	489.1996	-3.7	$C_{26}H_{30}N_2O_6Na$
$[M+H]^+$	234.1132	234.1125	-3.0	$C_{13}H_{16}NO_3$
f1	216.1033 (20.1)	216.1019	-6.4	$C_{13}H_{14}NO_2$
f2	202.0872 (21.6)	202.0863	-4.9	$C_{12}H_{12}NO_2$
f3	184.0767 (100)	184.0757	-7.5	$C_{12}H_{10}NO$
f4	158.0955 (8.5)	158.0964	5.8	$C_{11}H_{12}N$

f5	156.0811 (24.1)	156.0808	-2.1	$C_{11}H_{10}N$
f6	131.0734 (8.1)	131.0730	-3.3	C_9H_9N
Espectro ESI-EM/EM en figura 89				
Compuesto **20**				
$[2M+Na]^+$	517.2314	517.2309	-1.0	$C_{28}H_{34}N_2O_6Na$
$[M+Na]^+$	270.1113	270.1101	-4.4	$C_{14}H_{17}NO_3Na$
$[M+H]^+$	248.1287	248.1281	-2.2	$C_{14}H_{18}NO_3$
f1	230.1166 (1.1)	230.1176	4.1	$C_{14}H_{16}NO_2$
f2	216.1027 (100)	216.1019	-3.6	$C_{13}H_{14}NO_2$
f3	198.0915 (31.2)	198.0913	-0.9	$C_{13}H_{12}NO$
f4	188.0717 (34.3) 188.1070	188.0706 188.1075	-5.8 2.7	$C_{11}H_{10}NO_2$ $C_{12}H_{14}NO$
f5	174.0551 (20.0)	174.0550	-0.6	$C_{10}H_8NO_2$
f6	170.0963 (29.6)	170.0964	1.0	$C_{12}H_{12}N$
f7	144.0450 (84)	144.0444	-4.2	C_9H_6NO
f8	132.0803 (6.7)	132.0808	3.7	$C_9H_{10}N$
f9	117.0577 (3.4)	117.0573	-3.4	C_8H_7N
Espectro ESI-EM/EM en figura 115				
Compuesto **24**				
$[2M+Na]^+$	521.190	521.1894	-2.2	$C_{26}H_{30}N_2O_8Na$
$[M+K]^+$	288.0639	288.0633	-2.1	$C_{13}H_{15}NO_4K$
$[M+Na]^+$	272.0901	272.0893	-3.0	$C_{13}H_{15}NO_4Na$
$[M+H]^+$	250.1065	250.1074	3.4	$C_{13}H_{16}NO_4$
f1	232.0975 (1.2)	232.0968	-3.1	$C_{13}H_{14}NO_3$
f2	218.0820 (36.1)	218.0812	-3.6	$C_{12}H_{12}NO_3$
f3	214.0872 (3.2)	214.0863	-4.5	$C_{13}H_{12}NO_2$
f4	200.0711 (7.1)	200.0706	-2.7	$C_{12}H_{10}NO_2$
f5	188.0708 (100)	188.0706	-1.2	$C_{11}H_{10}NO_2$
f6	182.0603 (7.7)	182.0600	-1.6	$C_{12}H_8NO$

f7	174.0553 (83.9)	174.0550	-2.0	$C_{10}H_8NO_2$
f8	172.0753 (3.1)	172.0757	2.4	$C_{11}H_{10}NO$
f9	154.0654 (17.9)	154.0651	-1.8	$C_{11}H_8N$
f10	144.0453 (8.9)	144.0444	-6.3	C_9H_6NO
f11	130.0650 (6.4)	130.0651	0.8	C_9H_8N
f12	118.0655 (2.5)	118.0651	-2.8	C_8H_8N
Espectro ESI-EM/EM en figura 114				
Compuesto **25**				
$[2M+Na]^+$	653.4313	653.4289	-3.8	$C_{40}H_{58}N_2O_4Na$
$[M+Na]^+$	338.2098	338.2091	-2.4	$C_{20}H_{29}NO_2Na$
$[M+H]^+$	316.2272	316.2271	-0.4	$C_{20}H_{30}NO_2$
f1	284.2015 (88.7)	284.2009	-2.1	$C_{19}H_{26}NO$
f2	272.2369 (3.9)	272.2373	1.4	$C_{19}H_{30}N$
f3	190.0861 (30.1)	190.0863	1.0	$C_{11}H_{12}NO_2$
f4	176.0702 (11.5)	176.0706	2.5	$C_{10}H_{10}NO_2$
f5	146.0957 (8.4)	146.0964	5.1	$C_{10}H_{12}N$
f6	144.0445 (13.6)	144.0444	-0.7	C_9H_6NO
f7	132.0801 (9.1)	132.0808	5.0	$C_9H_{10}N$
f8	130.0646 (2.7)	130.0651	4.2	C_9H_8N
f9	117.0568 (1.2)	117.0573	4.4	C_8H_7N
Compuesto **26**				
$[M+Na]^+$	312.1210	312.1206	-1.3	$C_{16}H_{19}NO_4Na$
$[M+H]^+$	290.1381	290.1387	2.1	$C_{16}H_{20}NO_4$
f1	276.1242 (2.3)	276.1230	-4.2	$C_{15}H_{18}NO_4$
f2	258.1137 (100)	258.1125	-4.8	$C_{15}H_{16}NO_3$
f3	216.1028 (1.1)	216.1019	-4.2	$C_{13}H_{14}NO_2$
f4	198.0925 (4.8)	198.0913	-5.8	$C_{13}H_{12}NO$
f5	188.0715 (2.5)	188.0706	-4.8	$C_{11}H_{10}NO_2$
f6	144.0446 (2.8)	144.0444	-1.5	C_9H_6NO

Espectro ESI-EM/EM en figura 99				
Compuesto **30**				
$[M+Na]^+$	212.0686	212.0682	-2.1	$C_{11}H_{11}NO_2Na$
$[M+H]^+$	190.0871	190.0863	-4.5	$C_{11}H_{12}NO_2$
f1	158.0614 (100)	158.0600	-6.7	$C_{10}H_8NO$
f2	146.0961 (6.5)	146.0964	2.6	$C_{10}H_{12}N$
f3	175.0635 (1.6)	175.0628	-4.2	$C_{10}H_9NO_2$
f4	131.0738 (48.7)	131.0730	-6.5	C_9H_9N
f5	130.0652 (9.4)	130.0651	-0.8	C_9H_8N
Espectro ESI-EM/EM en figura 111				
Compuesto **31**				
$[M+Na]^+$	318.0116	318.0100	-5.0	$C_{13}H_{14}{}^{79}BrNO_2Na$
$[M+2+Na]^+$	320.0089	320.0081	-2.4	$C_{13}H_{14}{}^{81}BrNO_2Na$
$[M+H]^+$	296.0276	296.0281	1.7	$C_{13}H_{15}{}^{79}BrNO_2$
$[M+2+H]^+$	298.0249	298.0261	4.0	$C_{13}H_{15}{}^{81}BrNO_2$
f1	264.0009 (100)	264.0029	3.5	$C_{12}H_{11}{}^{79}BrNO$
f2	265.9986 (85.4)	265.9999	4.9	$C_{12}H_{11}{}^{81}BrNO$
f3	237.0159 (4.4)	237.0148	-4.8	$C_{11}H_{12}{}^{79}BrN$
f4	239.0137 (3.9)	239.0128	-4.2	$C_{11}H_{12}{}^{81}BrN$
f5	156.0803 (2.0)	156.0808	3.0	$C_{11}H_{10}N$
f6	131.0732 (18.8)	131.0730	-1.5	C_9H_9N
Espectro ESI-EM/EM en figura 110				
Compuesto **32**				
$[M+Na]^+$	332.0251	332.0257	1.8	$C_{14}H_{16}{}^{79}BrNO_2Na$
$[M+2+Na]^+$	334.0229	334.0237	2.4	$C_{14}H_{16}{}^{81}BrNO_2Na$
$[M+H]^+$	310.0430	310.0437	2.3	$C_{14}H_{17}{}^{79}BrNO_2$
$[M+2+H]^+$	312.0405	312.0418	4.2	$C_{14}H_{17}{}^{81}BrNO_2$

f1	278.0179 (100)	278.0175	-1.5	$C_{13}H_{13}{}^{79}BrNO$
f2	280.0163 (86.1)	280.0156	-2.5	$C_{13}H_{13}{}^{81}BrNO$
f3	251.0307 (4.1)	251.0304	-1.1	$C_{12}H_{14}BrNO$
f4	198.0910 (1.4)	198.0913	1.9	$C_{13}H_{12}NO$
f5	172.1124 (4.1)	172.1121	-1.8	$C_{12}H_{14}N$
f6	144.0448 (4.3)	144.0444	-2.8	C_9H_6NO
f7	134.9800 (35.6)	134.9804	3.3	C_4H_8Br
Compuesto **34**				
$[M+Na]^+$	269.1262	269.1260	-0.6	$C_{14}H_{18}N_2O_2Na$
$[M+H]^+$	247.1440	247.1441	0.2	$C_{14}H_{19}N_2O_2$
f1	233.1295 (4.3)	233.1285	-4.6	$C_{13}H_{17}N_2O_2$
f2	215.1188 (63)	215.1179	-4.4	$C_{13}H_{15}N_2O$
f3	198.0918 (4.0)	198.0913	-2.2	$C_{13}H_{12}NO$
f4	170.0957 (2.4)	170.0964	4.4	$C_{12}H_{12}N$
f5	144.0447 (100)	144.0444	-1.9	C_9H_6NO
Espectro ESI-EM/EM en figura 92				
Compuesto **35**				
$[M+Na]^+$	297.1580	297.1573	-3.0	$C_{16}H_{22}N_2O_2Na$
$[M+H]^+$	275.1764	275.1754	-3.8	$C_{16}H_{23}N_2O_2$
f1	261.1602 (7.9)	261.1598	-1.8	$C_{15}H_{21}N_2O_2$
f2	243.1500 (37.8)	243.1492	-3.2	$C_{15}H_{19}N_2O$
f3	232.1333 (17.4)	232.1332	0.2	$C_{14}H_{18}NO_2$
f4	230.1184 (26.3)	230.1176	-3.6	$C_{14}H_{16}NO_2$
f5	198.0917 (29.2)	198.0913	-1.8	$C_{13}H_{12}NO$
f6	186.1281 (1.1)	186.1277	-1.9	$C_{13}H_{16}N$
f7	172.1114 (2.6)	172.1121	3.7	$C_{12}H_{14}N$
f8	170.0957 (2.8)	170.0964	4.4	$C_{12}H_{12}N$
f9	100.1125 (100)	100.1121	-4.3	$C_6H_{14}N$
Espectro ESI-EM/EM en figura 80				

Compuesto **36**				
$[2M+Na]^+$	803.3025	803.3051	3.3	$C_{46}H_{44}N_4NaO_8$
$[M+Na]^+$	413.1470	413.1472	0.5	$C_{23}H_{22}N_2NaO_4$
$[M+H]^+$	391.1639	391.1652	3.3	$C_{23}H_{23}N_2O_4$
f1	377.1484 (100)	377.1500	3.0	$C_{22}H_{21}N_2O_4$
f2	363.1335 (3.5)	363.1339	1.1	$C_{21}H_{19}N_2O_4$
f3	359.1376 (10.7)	359.1390	4.0	$C_{22}H_{19}N_2O_3$
f4	347.1386 (3.2)	347.1390	1.2	$C_{21}H_{19}N_2O_3$
f5	333.1568 (1.0)	333.1598	8.9	$C_{21}H_{21}N_2O_2$
f6	188.0703 (3.3)	188.0706	1.9	$C_{11}H_{10}NO_2$
f7	184.0759 (6.5)	184.0757	-1.1	$C_{12}H_{10}NO$
f8	158.0605 (20.5)	158.0600	-2.8	$C_{10}H_8NO$
f9	130.0644 (4.0)	130.0651	5.7	C_9H_8N
Espectro ESI-EM/EM en figura 100				
Compuesto **37**				
$[2M+Na]^+$	553.1617	553.1631	2.5	$C_{28}H_{32}{}^{35}Cl_2N_2O_4Na$
$[2M+2+Na]^+$	555.1589	555.1601	2.2	$C_{28}H_{32}{}^{35}Cl{}^{37}ClN_2O_4Na$
$[M+Na]^+$	288.0772	288.0762	-3.6	$C_{14}H_{16}{}^{35}ClNO_2Na$
$[M+2+Na]^+$	290.0742	290.0762	6.9	$C_{14}H_{16}{}^{37}ClNO_2Na$
$[M+H]^+$	266.0951	266.0942	-3.2	$C_{14}H_{17}{}^{35}ClNO_2$
$[M+2+H]^+$	268.0926	268.0942	5.9	$C_{14}H_{17}{}^{37}ClNO_2$
f1	234.0676 (77.4)	234.0680	1.6	$C_{13}H_{13}ClNO$
f2	207.0812 (4.3)	207.0809	-3.9	$C_{12}H_{14}ClN$
f3	198.0911 (1.6)	198.0913	1.2	$C_{13}H_{12}NO$
f4	144.0434 (5.2)	144.0444	6.8	C_9H_6NO
f5	132.0805 (11.0)	132.0808	1.7	$C_9H_{10}N$
Compuesto **38**				
$[M+Na]^+$	380.0124	380.0118	-1.6	$C_{14}H_{16}INO_2Na$
$[M+H]^+$	358.0290	358.0298	2.2	$C_{14}H_{17}INO_2$

f1	326.0022 (89.0)	326.0036	4.4	$C_{13}H_{13}INO$
f2	299.0152 (3.1)	299.0165	4.6	$C_{12}H_{14}IN$
f3	230.1167 (7.4)	230.1176	3.9	$C_{14}H_{16}NO_2$
f4	216.1015 (13.3)	216.1019	1.7	$C_{13}H_{14}NO_2$
f5	198.0911 (7.9)	198.0913	1.2	$C_{13}H_{12}NO$
f6	190.0854 (7.0)	190.0863	4.5	$C_{11}H_{12}NO_2$
f7	182.9663 (100)	182.9665	1.3	C_4H_8I
f8	176.0700 (1.8)	176.0706	3.6	$C_{10}H_{10}NO_2$
f9	172.1121 (37.0)	172.1121	0.0	$C_{12}H_{14}N$
f10	154.9348 (1.3)	154.9352	3.0	C_2H_4I
f11	146.0961 (1.8)	146.0964	2.1	$C_{10}H_{12}N$
f12	144.0439 (2.4)	144.0444	3.5	C_9H_6NO
f13	130.0657 (3.2)	130.0651	-4.3	C_9H_8N
Espectro ESI-EM/EM en figura 81				

Tabla 17. Iones observados en los espectros de masa ESI-EM y ESI-EM/EM de los *N*-alquilindoles estudiados.

En los espectros de masa por ESI se observaron principalmente las especies $[M+Na]^+$ y $[M+H]^+$ y en muchos casos también $[2M+Na]^+$. Se muestra en la figura 82 un ejemplo de este tipo de espectro.

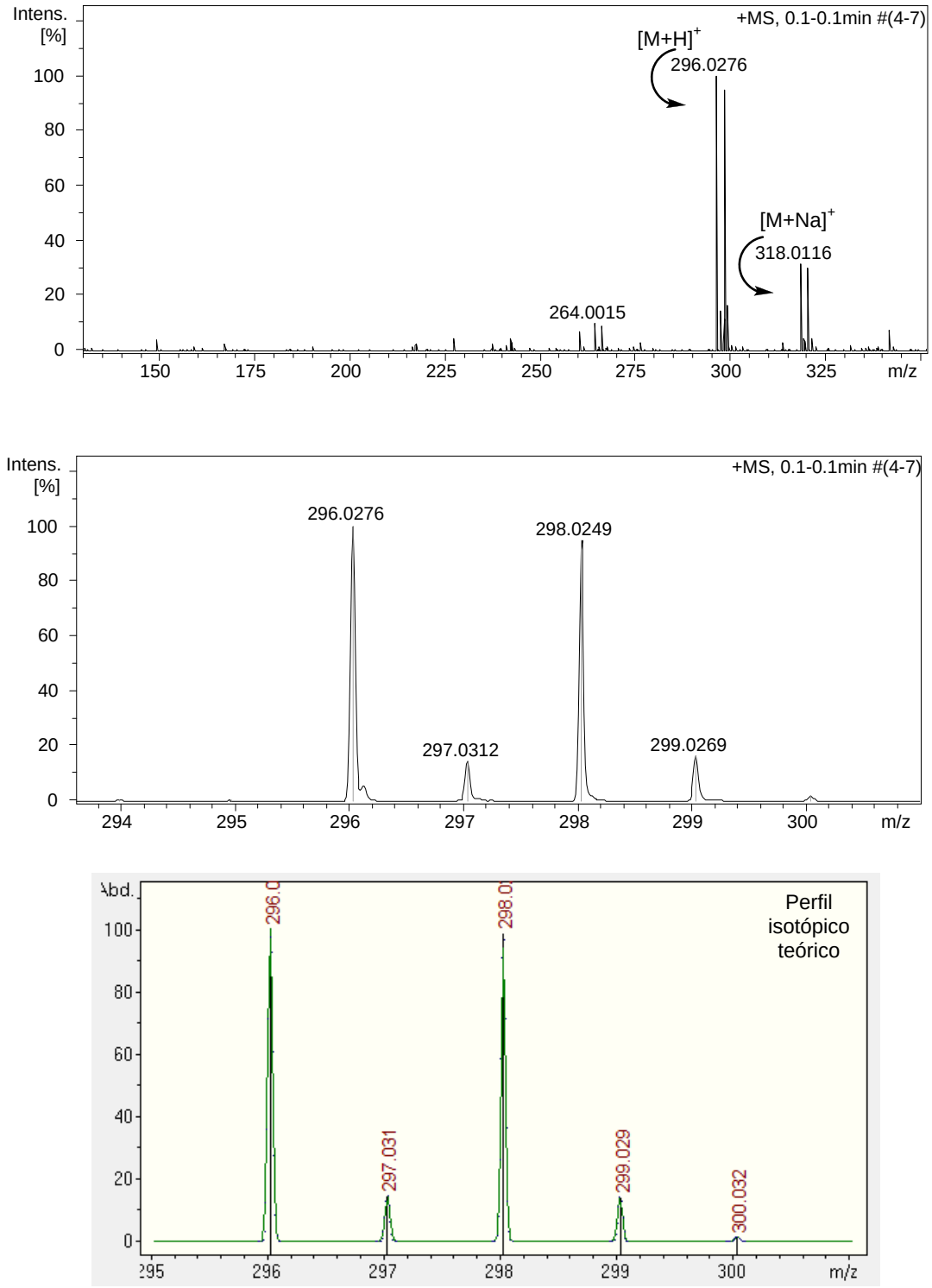
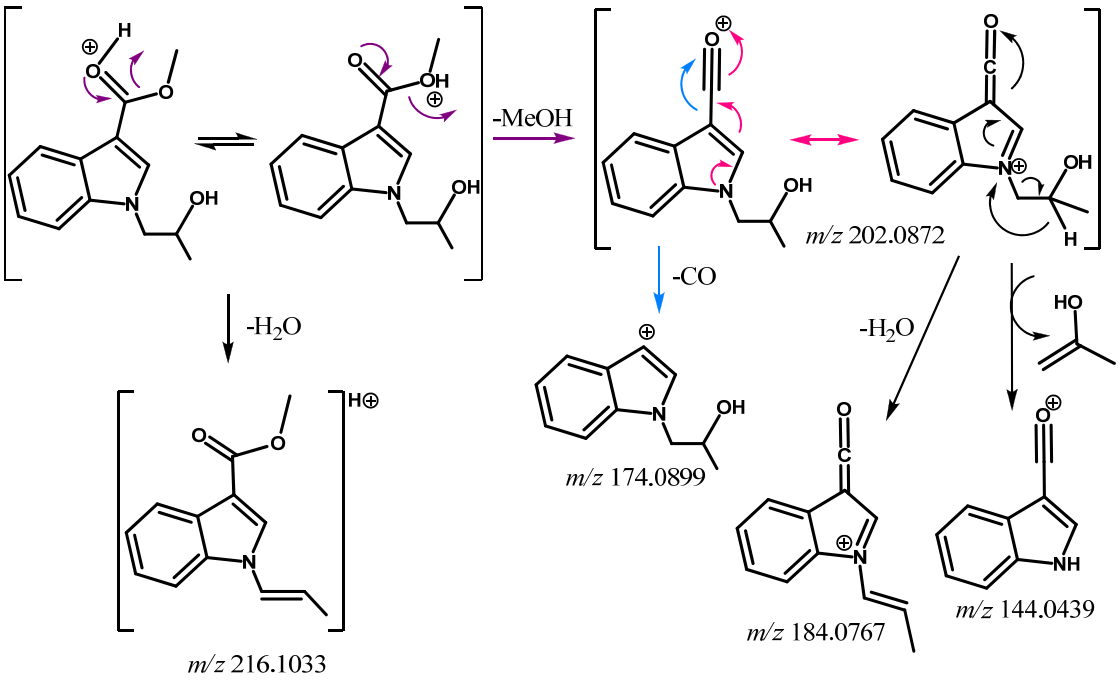


Figura 79. Espectro ESI del compuesto **31**, ampliación y comparación con el perfil isotópico teórico.

Iones comunes. Iones generados por pérdida de HX.

De la tabla 17 se desprende que algunos fragmentos obtenidos por CID del $[M+H]^+$ son comunes a todos los compuestos, e implican pérdidas de MeOH, MeOH y CO, y MeOH y la cadena unida al N indólico (*m/z* 144). Estos resultados se resumen en la tabla 18. En el esquema 13 se ejemplifican esas fragmentaciones con el compuesto **19**.



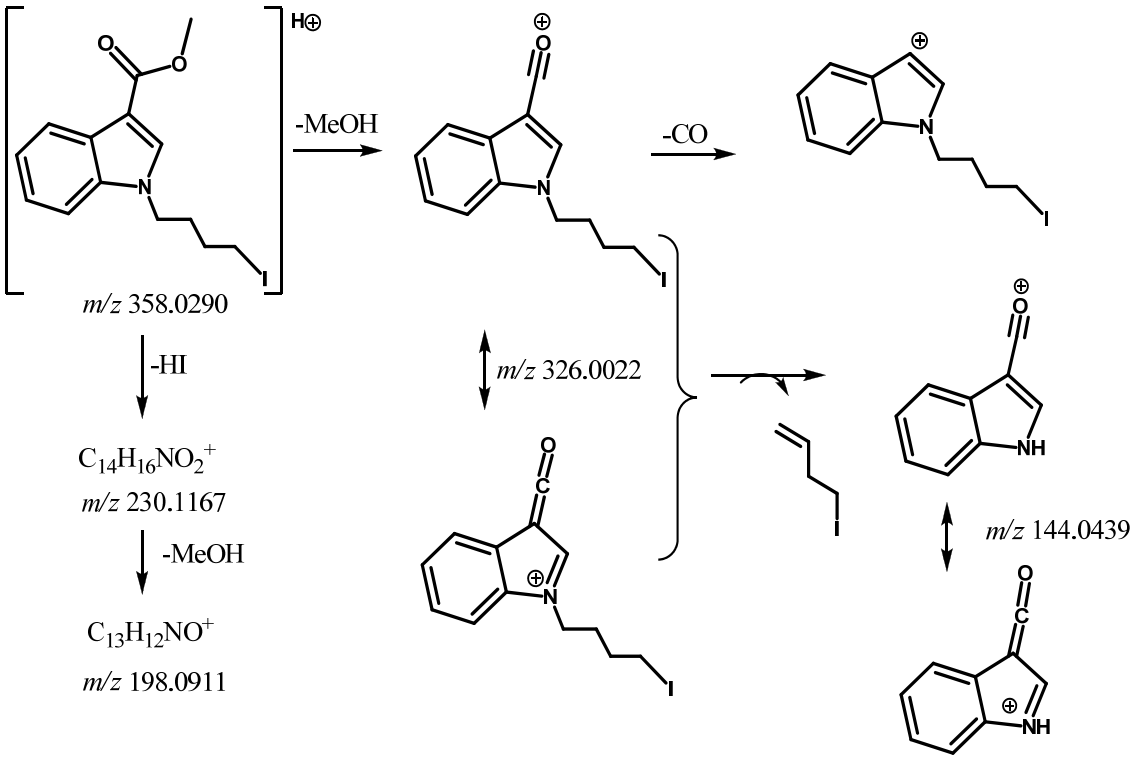
Esquema 13. Caminos propuestos para las fragmentaciones del compuesto **19** y que son comunes a todos los compuestos estudiados.

En la tabla 18 puede observarse que la fragmentación producida por pérdida de MeOH (a 15 eV) es muy importante en todos los casos, así como también son importantes las fragmentaciones producidas a partir del ión $[M+H\text{-}MeOH]^+$. La intensidad relativa de estos fragmentos varía de acuerdo a la energía de colisión (CE) empleada, predominando $[M+H+MeOH]^+$ a bajas energías y $[M+H+MeOH\text{-}\mathcal{N}]^+$, donde $\mathcal{N}$ es una molécula neutra como la cadena alquílica-H (cad), CO, HX, CO + HX, a mayores energías. Este hecho se observa en el esquema 14 ejemplificada para el compuesto **38**.

Compuesto	$[M+H]^+$ *m/z* (AR)	$[M+H\text{-}MeOH]^+$ *m/z* (AR)	$[M+H\text{-}MeOH\text{-}CO]^+$ *m/z* (AR)	$[M+H\text{-}MeOH\text{-}cad]^+$ *m/z* (AR)	$[M+H\text{-}HX]^+$ *m/z* (AR)	$[M+H\text{-}MeOH\text{-}HX]^+$ *m/z* (AR)	$[M+H\text{-}MeOH\text{-}CO\text{-}HX]^+$ *m/z* (AR)
18	234.1130 (<1)	202.0871 (69.4)	174.0561 (100)	144.0437 (12.0)	216.1018 (<1)	184.0756 (23.9)	156.0851 (10.8)
19	234.1132 (<1)	202.0872 (21.6)	a	(3.8)	216.1033 (20.1)	184.0771 (100)	156.0811 (24.1)
20	248.1287 (<1)	216.1028 (100)	a	144.0450 (8.4)	230.1166 (<1)	198.0915 (31.2)	170.0963 (29.6)
24	250.1065 (<1)	218.0820 (36.1)	-	144.0453 (8.9)	232.0975 (1.2)	200.0711 (7.1)	172.0753 (3.1)
25	316.2278 (100)	284.2015 (88.7)	256.2052 (1.2)	144.0445 (13.6)			
26	290.1381 (<1)	258.1137 (100)	-	144.0446 (2.8)	-	198.0925 (4.8)	170.0928 (<1)
30	190.0871 (3.5)	158.0611 (100)	130.0652 (9.4)	-			
31	296.0276 (20.1)	264.0009 (100)	236.0000 (<1)	-	-	184.0743 (4.0)	156.0803 (2.1)
32	310.0430 (42.1)	278.0179 (100)	-	144.0448 (4.3)	-	198.0910 (1.4)	-
34	247.1451 (<1)	215.1188 (61.6)	-	144.0447 (100)	-	198.0919 (4.0)	170.0971 (2.4)
35	275.1764 (25.8)	243.1500 (37.8)	-	(<1)	230.1184 (26.3)	198.0917 (29.2)	170.0957 (2.8)
36	-	359.1376 (10.7)	-	(<1)	216.1015 (1.5)	184.0759 (6.5)	-
37	266.0949 (100)	234.0691 (77.4)	-	144.0434 (5.2)	-	198.0911 (1.5)	-
38	358.0290 (84.2)	326.0022 (89.0)	-	144.0439 (2.4)	230.1164 (7.4)	198.0915 (7.9)	-

a: no puede determinarse por estar superpuesto con otro ión (AR < 5%).
Cad: cadena alquílica –H o +H.

Tabla 18. Comparación de las abundancias relativas de iones fragmentos comunes obtenidos a partir de los correspondientes precursores $[M+H]^+$ por ESI-EM/EM a 15 eV.



Esquema 14. Diagrama de descomposición del ión precursor $[M+H]^+$ del compuesto **38**.

Los fragmentos anteriores son predecibles y esperables, su aparición no resulta novedosa. Sin embargo pueden observarse otros iones (tabla 17) que resultan no triviales y cuyas estructuras fueron entonces analizadas. Además resultó de interés analizar las estructuras de los iones fragmento que provienen de la pérdida de HX ya que éstas no siempre resultaban obvias. En todos los casos en los que se plantean caminos de fragmentación, la genética fue verificada por experimentos ISCID.

El fragmento $[M+H-HX]^+$ se encontró visiblemente en los espectros ESI-EM/EM de los compuestos **19**, **35** y **38** (figuras 89, 80 y 81), siendo X: -OH, $-N(Me)_2$ y -I respectivamente. Se propusieron dos estructuras posibles para la especie que se forma a partir de esa pérdida en los compuestos **35** y **38** como puede observarse en el esquema 15 ejemplificado con el compuesto **38**. Estructuras cicladas de ese tipo se han informado con anterioridad en experimentos EI-EM de derivados de indoles[14] aunque dichas estructuras no fueron confirmadas.

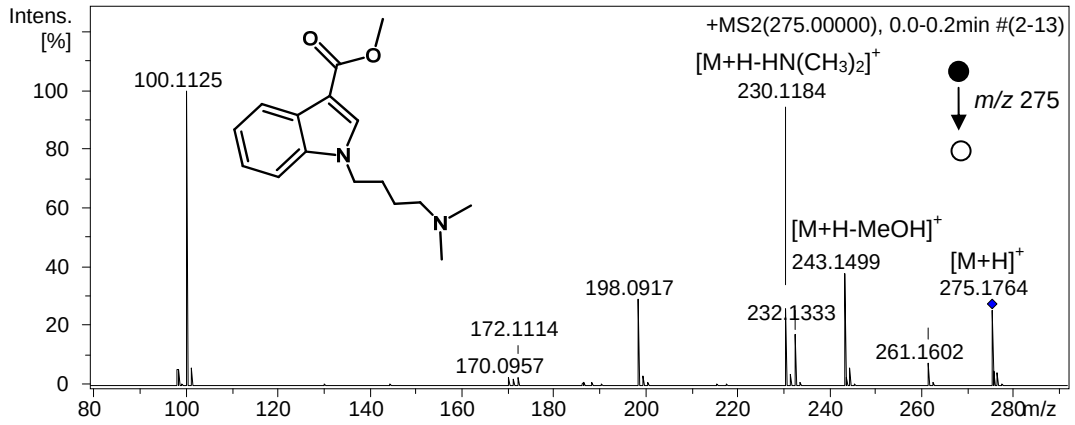


Figura 80. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ correspondiente al compuesto **35**.

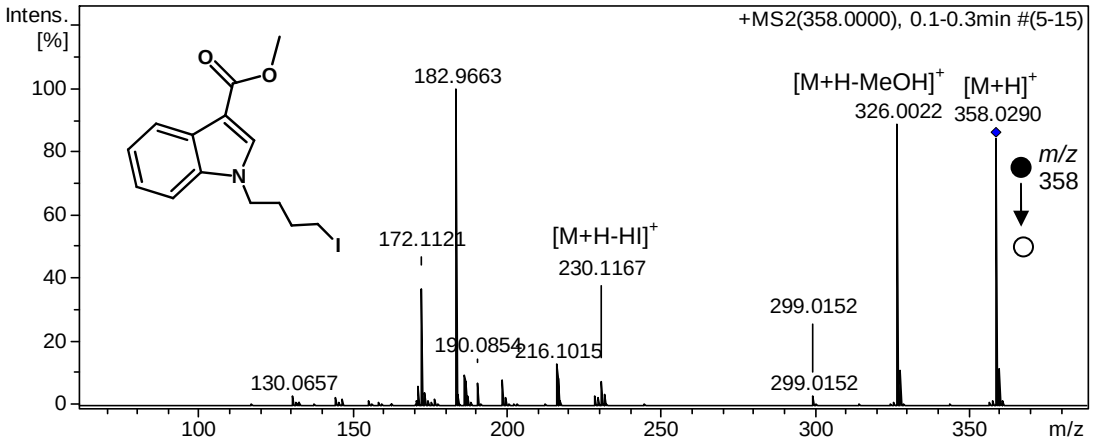
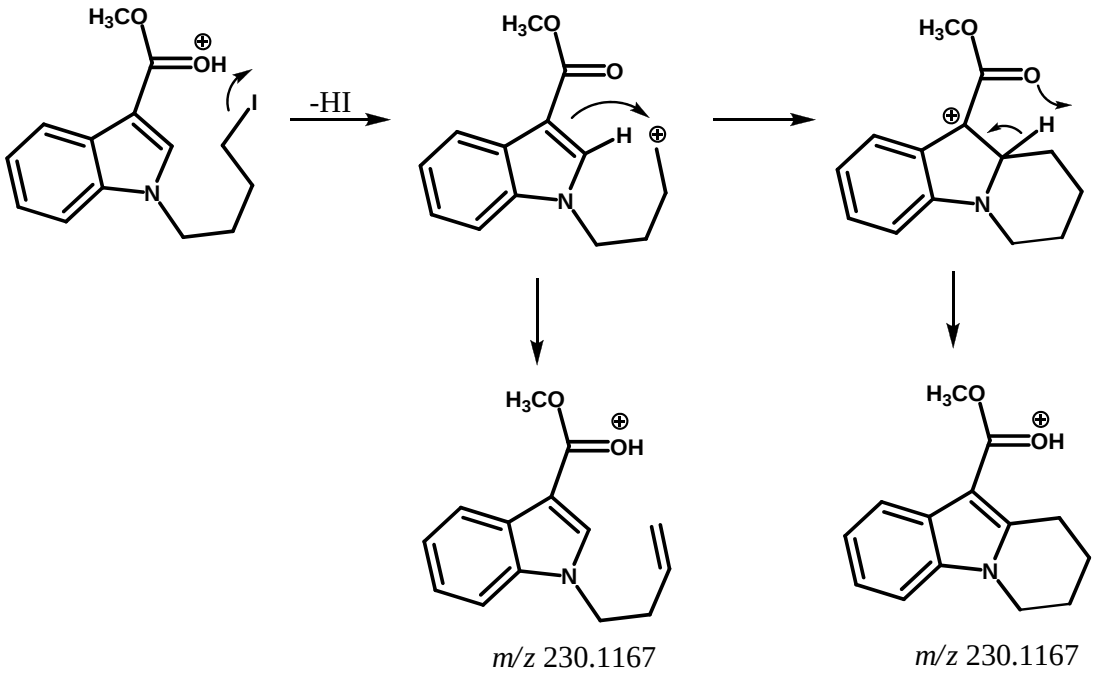
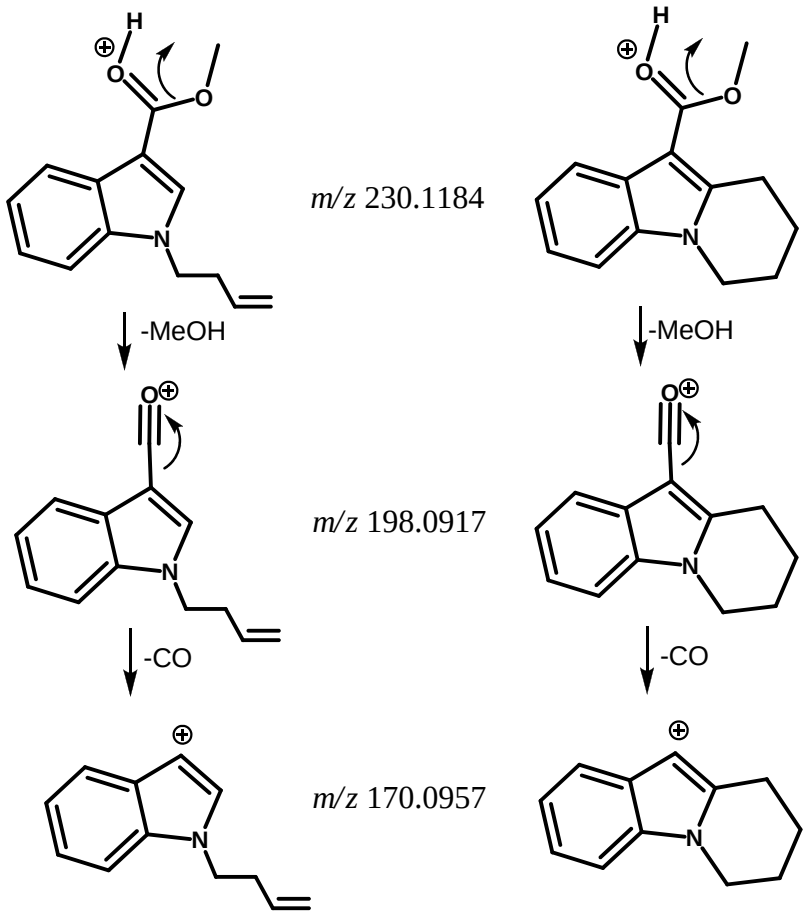


Figura 81. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ correspondiente al compuesto **38**.



Esquema 15. Estructuras propuestas para el ión m/z 230.

Teniendo en cuenta las estructuras planteadas para el ión $[M+H-HX]^+$, existirían también dos posibles estructuras para la especie $[M+H-HX-MeOH]^+$ y dos para $[M+H-HX-MeOH-CO]^+$ como se muestra en el esquema 16.



Esquema 16. Estructuras propuestas para los iones $[M+H-HX-MeOH]^+$ y $[M+H-HX-MeOH-CO]^+$.

Con el fin de verificar o descartar alguna de las estructuras propuestas para los iones $[M+H-HX]^+$, $[M+H-HX-MeOH]^+$ y $[M+H-HX-MeOH-CO]^+$ se sintetizó el éster metílico del ácido 6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-α]indol-10-carboxílico, designado como compuesto **39**, por un camino sintético descripto previamente[15] y que se detalla más adelante en la parte experimental.

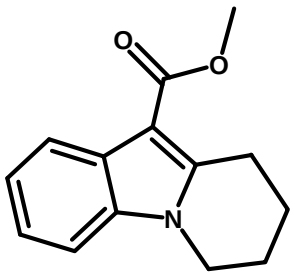


Figura 82. Compuesto sintético **39**.

En su espectro ESI-EM se observó el ión de *m/z* 252.1007 y fórmula molecular $C_{14}H_{15}NNaO_2$, que se asignó como $[M+Na]^+$, y el ión de *m/z* 230.1169 correspondiente al ión $[M+H]^+$. El espectro ESI-EM/EM de este último presentó el ión de *m/z* 198.0922 como pico base (figura 83) y el de *m/z* 170.0958 en una proporción mucho menor (6.0%).

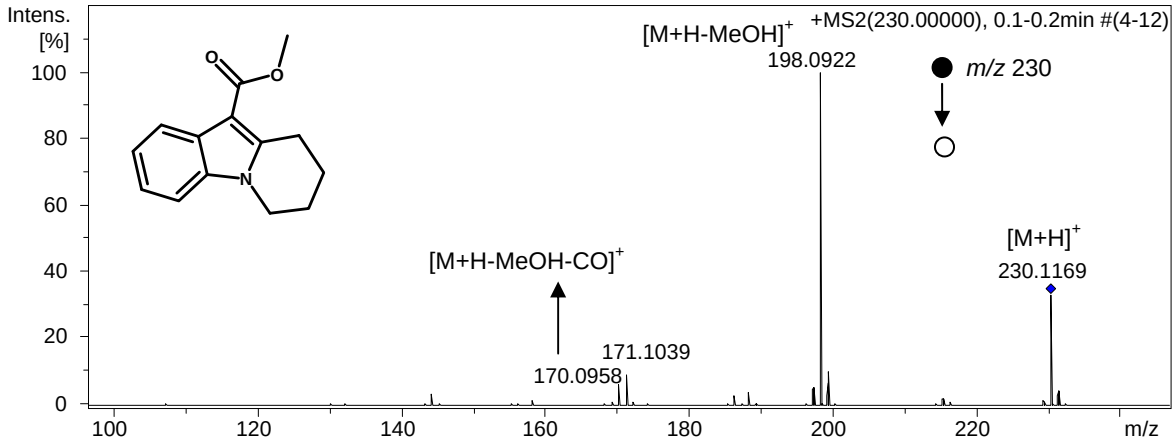


Figura 83. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ del compuesto **39**.

Cabe destacar que los espectros ESI-EM/EM de **39** (figura 83) y del ión de *m/z* 230 seleccionado a partir de **35** (figura 84) obtenido por ISCID resultaron casi idénticos. Esto indicaría una similitud estructural entre ambos iones.

No fue posible observar por ISCID a todos los fragmentos con una abundancia relativa suficiente como para realizar posteriores experimentos de EM/EM. Por este motivo y aprovechando que los espectros ESI-EM/EM y APCI-EM/EM habían resultado idénticos, se decidió realizar experimentos de EM^n en una trampa iónica con ionización química, equipo accesible en el país (INQUINOA, Tucumán).

Se analizaron entonces en este instrumento los compuestos **35** y **39**, realizando experimentos de EM^2 y EM^3. Como gas reactivo de CI se empleó isobutano.

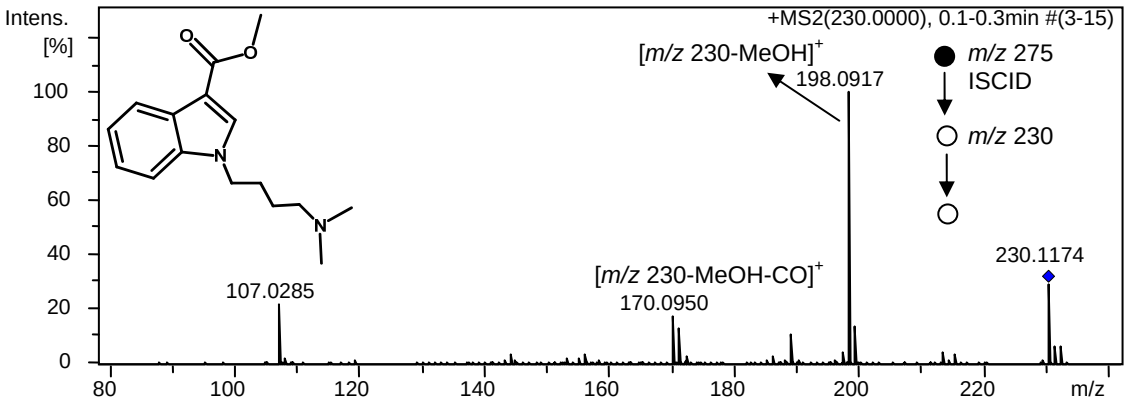


Figura 84. Espectro ESI-EM/EM del ión de *m/z* 230 seleccionado a partir del ión $[M+H]^+$ **35**.

A diferencia del equipo QTOF, en la trampa iónica se pueden obtener espectros de EM^n en el tiempo, por lo que la limitación estaría sujeta a la estabilidad de los iones en ese caso. Los espectros CI-EM^3 del ión de *m/z* 198 para **35** y **39** se exponen en las figuras 85 y 86 respectivamente. Como puede apreciarse estos espectros resultaron idénticos observándose en ambos casos el ión de *m/z* 170 como pico base, producto de una pérdida de 28 u correspondiente a una molécula de CO proveniente del grupo acilio. Esto indicaría que la estructura de la especie de *m/z* 198 es igual en **35** que en **39** y está ciclada y quedarían confirmadas las identidades de los iones de *m/z* 198 y 170.

Sin embargo, al comparar los espectros EM^2 y EM^3 por CI (i-butano) de los compuestos **35** y **39** (figuras 87 y 88) se encontró una diferencia evidente en la intensidad relativa del ión *m/z* 188 (3.8 % vs 65.2 % respectivamente). Este hecho podría indicar que la especie de *m/z* 230 (en el compuesto **35**) no corresponde exclusivamente a la estructura cerrada, aunque no puede descartarse que la diferencia se deba a cuestiones experimentales. Si bien el mecanismo de ionización en APCI y CI es el mismo, la energía involucrada en ambos procesos no es la misma, quedando los iones producidos por CI con una energía residual mayor. Por este motivo, el ión *m/z* 230 (de **39**) podría fragmentarse tanto para dar *m/z* 198 $[M+H-MeOH]^+$ como *m/z* 188

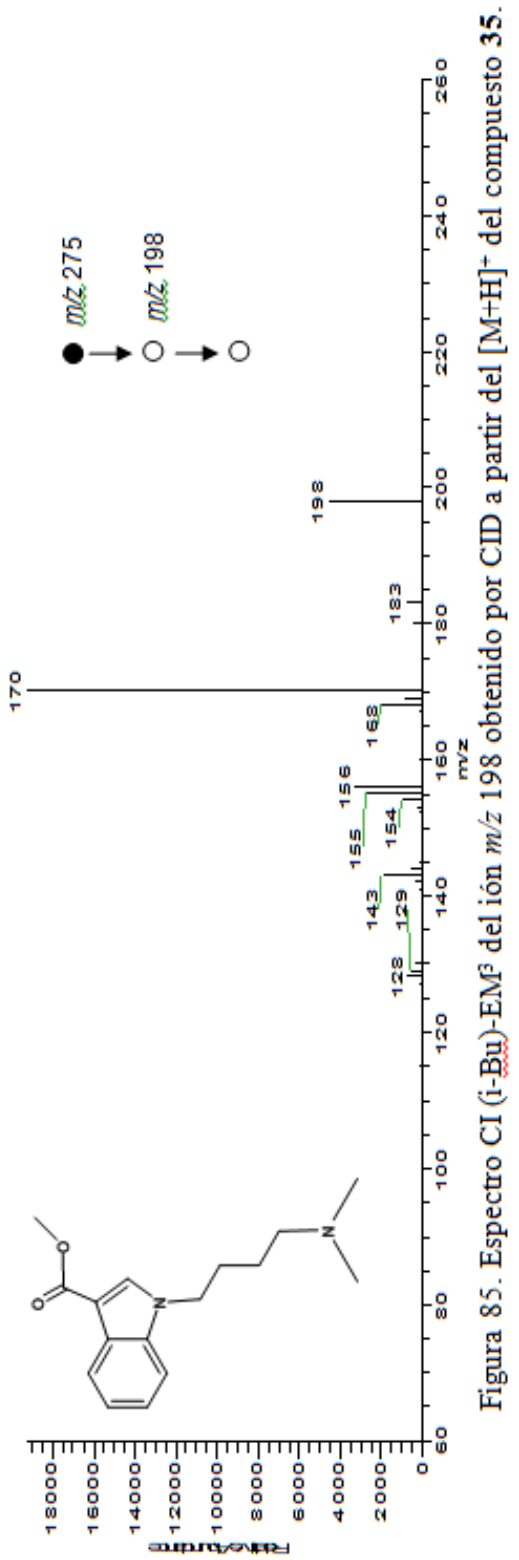


Figura 85. Espectro CI (i-Bu)-EM^3 del ión *m/z* 198 obtenido por CID a partir del $[M+H]^+$ del compuesto **35**.

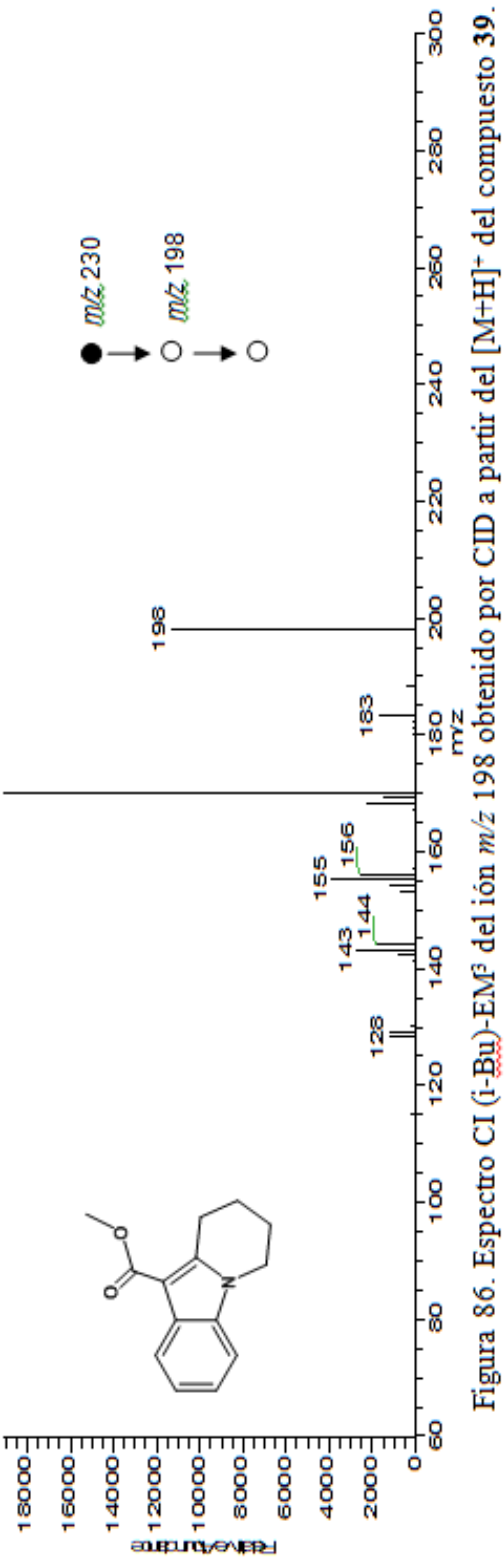


Figura 86. Espectro CI (i-Bu)-EM^3 del ión *m/z* 198 obtenido por CID a partir del $[M+H]^+$ del compuesto **39**.

$[M+H-C_3H_6]^+$, ambos con alta abundancia relativa. En cambio el ión *m/z* 230 de **35** proviene de un proceso CID posterior a la ionización química.

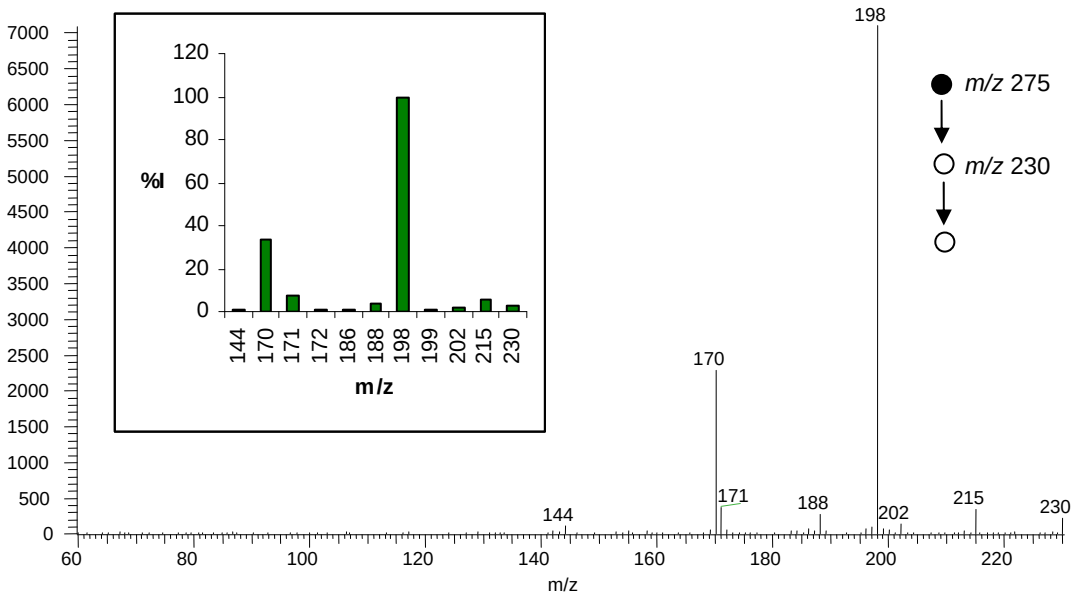


Figura 87. Espectro CI (i-Bu)-EM^2 del ion de *m/z* 230 obtenido por CID a partir del compuesto **35**.

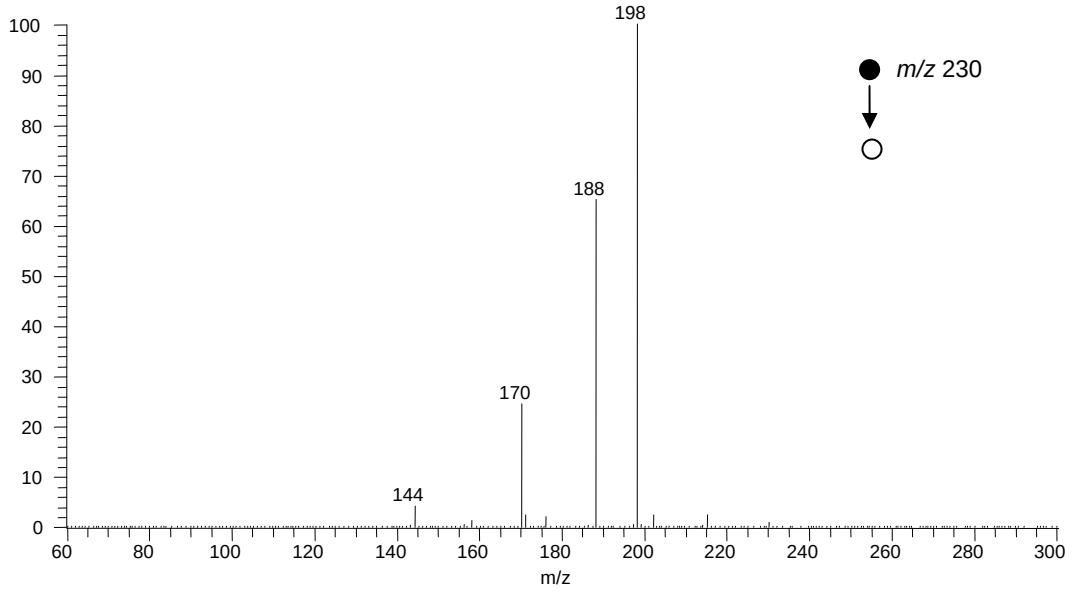


Figura 88. Espectro CI (i-Bu)-EM^2 del ion $[M+H]^+$ del compuesto **39**.

Por analogía a las especies propuestas para los iones de *m/z* 230, 198 y 170, se propusieron estructuras cicladas por pérdida de HX también en el caso de los compuestos con cadenas *N*-alquílicas de 3 carbonos (iones de *m/z* 216, 184 y 156), sin embargo sus identidades no fueron confirmadas por lo tanto no pueden descartarse las formas abiertas o que existan ambas. En el caso particular del compuesto **19** en el cual el grupo hidroxilo se encuentra en posición 2´, la forma ciclada implicaría una especie muy inestable dado que el ciclo sería de 4 miembros y en cambio la forma abierta tendría la contribución de una estructura altamente conjugada (esquema 17). Eso explicaría que el ión de *m/z* 184 sea el pico base del espectro ESI-EM/EM del $[M+H]^+$ del compuesto **19** (figura 89).

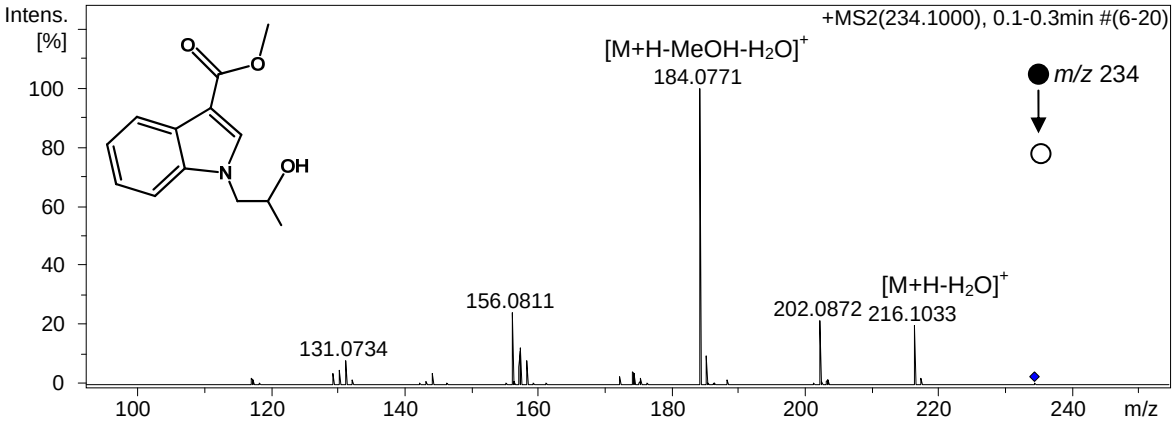
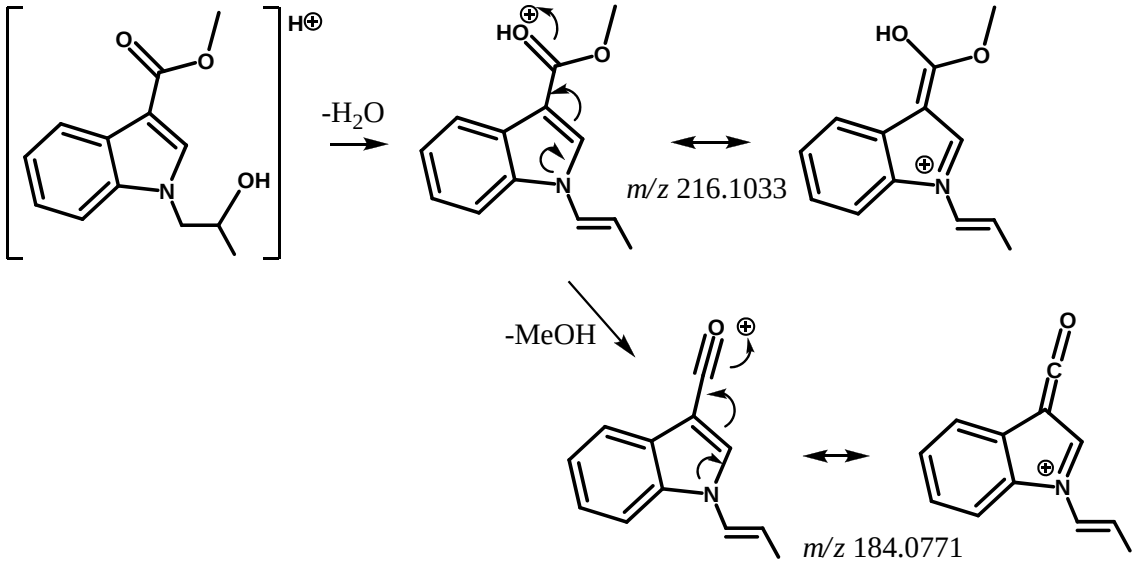


Figura 89. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ion $[M+H]^+$ correspondiente a **19**.



Esquema 17. Camino de fragmentación propuesto para la pérdida de HX a partir del ion $[M+H]^+$ del compuesto **19**.

Para confirmar la identidad del ión de *m/z* 184 se realizaron los espectros de masa tándem de los iones de *m/z* 216 $[M+H-H_2O]^+$ y *m/z* 184 obtenidos por ISCID a 50 eV a partir del compuesto **19** (figuras 90 y 91). Se observó en el espectro EM/EM de *m/z* 216 que el pico base era *m/z* 184 el cual se origina por pérdida de metanol a partir del ión seleccionado, lo cual sería coherente porque está estabilizado por resonancia, y con intensidad mucho menor se observó el ión de *m/z* 156 que implica la pérdida de metanol y de monóxido de carbono ($[M+H-H_2O-MeOH-CO]^+$). En el espectro ESI-EM/EM del ión de *m/z* 184 (figura 91) se encontró como pico base el ión de *m/z* 156 que se originó por pérdida de monóxido de carbono; esto confirmó la presencia del grupo acilio en la estructura de *m/z* 184.

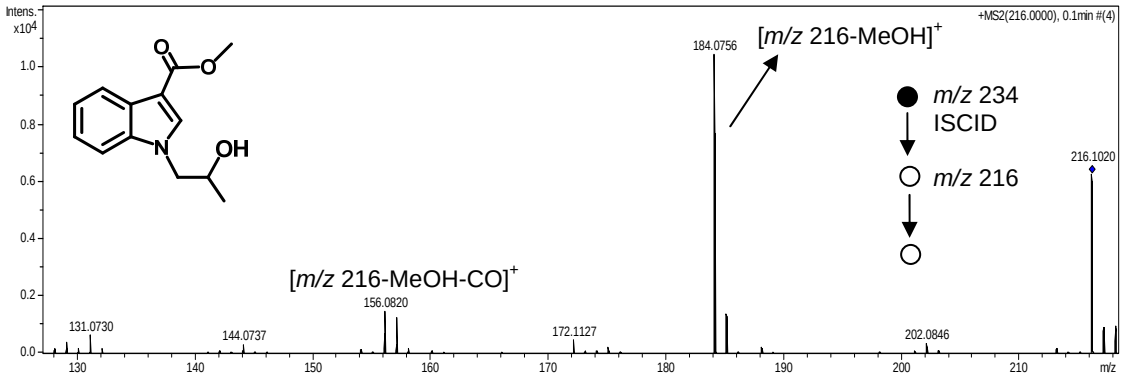


Figura 90. Espectro ESI-EM/EM del ión de *m/z* 216 obtenido por ISCID a 50 eV a partir del compuesto **19**.

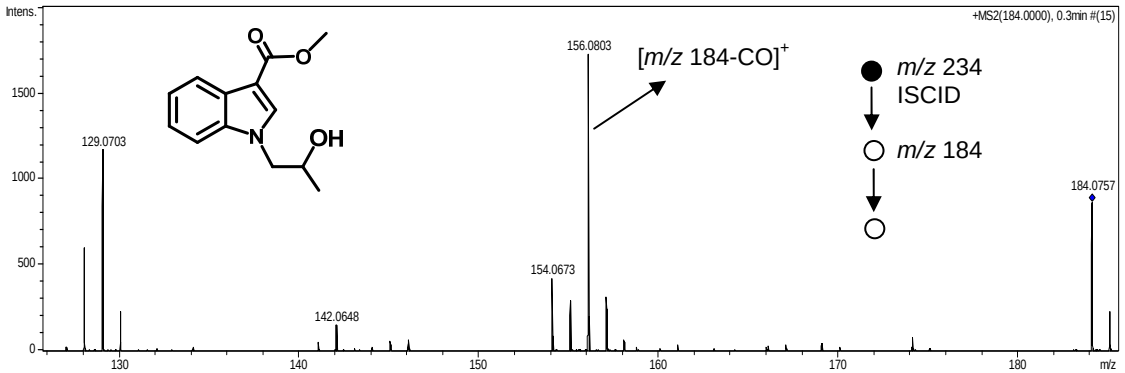


Figura 91. Espectro ESI-EM/EM del ión de *m/z* 184 obtenido por ISCID a 50 eV a partir del compuesto **19**.

Estos hechos permitirían explicar las diferencias entre las abundancias relativas de estas especies en el caso de los compuestos hidroxilados. El ión $[M+H-H_2O-$

$MeOH]^+$ es pico base y el ión $[M+H-H_2O]^+$ de AR 20 % en el caso de **19**, mientras que en el caso de los compuestos **18** y **20** estos fragmentos aparecen con abundancias muy inferiores, lo cual es coherente porque en el primer caso las especies están estabilizadas por resonancia (esquema 17) mientras que para los otros compuestos no.

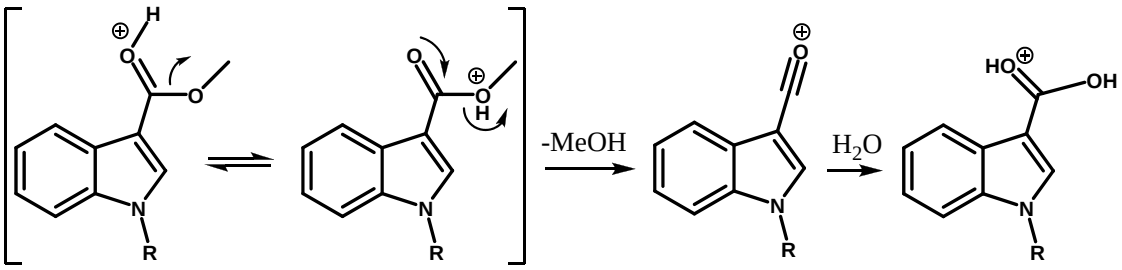
Ión $[M+H-14]^+$ y relacionados

En los espectros ESI-EM/EM de los compuestos **26**, **34**, **35** y **36** se encontraron iones que correspondían a una diferencia de 14 u. En la tabla 19 se exponen esos iones y sus abundancias relativas.

	$[M+H]^+$ (AR)	$[M+H-14]^+$ (AR)	$[M+H-MeOH]^+$ (AR)
26	290.1381 (0.1)	276.1242 (2.3)	258.1137 (100)
34	247.1451 (0.2)	233.1295 (4.3)	215.1188 (61.6)
35	275.1764 (25.8)	261.1602 (7.9)	243.1500 (37.8)
36	-	377.1484 (100)	359.1376 (10.7)

Tabla 19. Iones originados por pérdida de 14 u en los espectros ESI-EM/EM a 15 eV de los compuestos **26**, **34**, **35** y **36**.

Las fórmulas moleculares de los iones precursor ($[M+H]^+$) y producto ($[M+H-14]^+$) revelaron una diferencia de CH_2 en todos los casos. Se podría explicar la pérdida nominal de 14 u a partir de los iones moleculares protonados, como resultado de la pérdida de metanol (32 u) y posterior formación de un aducto con H_2O (+18 u), siendo los iones producto de la forma $[M+H - CH_3OH + H_2O]^+$ (esquema 18).



Esquema 18. Camino propuesto para la formación de los iones $[M+H-14]^+$.

Los espectros ESI-EM/EM de los compuestos **34** y **35** (figuras 92 y 80) se repitieron variando la fuente de ionización para descartar la formación de la especie en la fuente ESI debido al mecanismo de ionización. Como fuente alternativa se utilizó APCI y en los espectros resultantes se observó nuevamente el fragmento originado por pérdida de 14 u con intensidad relativa similar, lo cual sugería que la formación del aducto se producía en fase gaseosa independientemente del mecanismo de ionización, sin poder determinar *a priori* el origen de la molécula de agua que se adiciona. Se realizaron entonces experimentos variando gradualmente el flujo del gas nebulizador (N_2, entre 0.4 y 5 Bar) y/o el gas de secado (N_2, hasta 6 l/min) y/o agregando externamente MeOH o D_2O, pero en ningún caso hubo un cambio apreciable en la intensidad del ión $[M+H-14]^+$. Todos estos experimentos confirmarían que no se forma en la fuente.

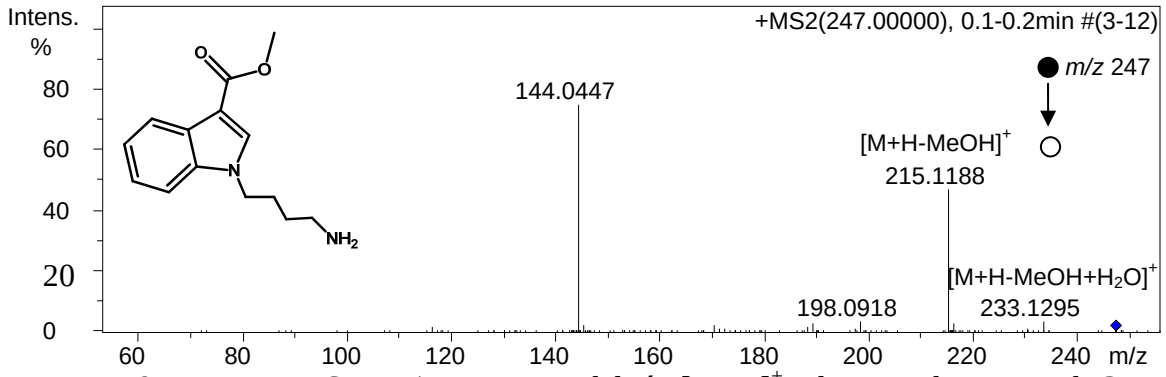
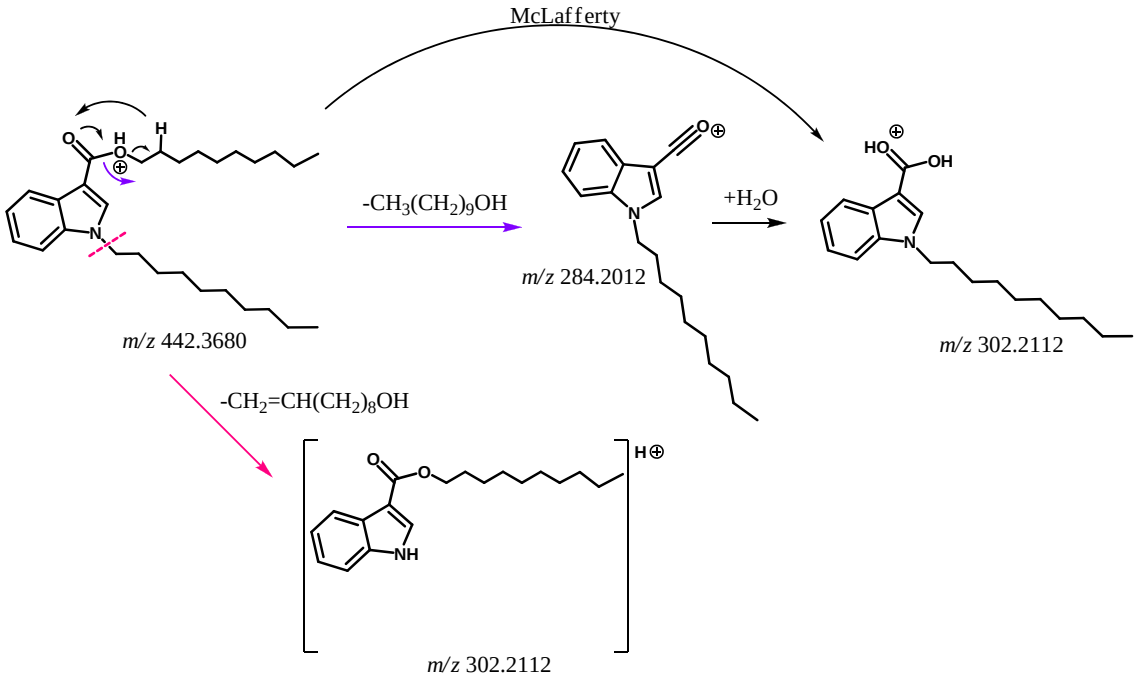


Figura 92. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ seleccionado a partir de **34**.

Cabe mencionar que el mismo comportamiento se observó aparentemente para el compuesto **29** de sustituyente *N*-decilo y éster decílico (capítulo 4). En el espectro ESI-EM/EM (figura 93) de este último se observó el ión de *m/z* 302.2112 como pico base. Se pueden plantear dos estructuras para ese ión, una en la que se ha perdido la cadena alquílica del éster, ya sea vía reordenamiento de McLafferty o vía formación del aducto con agua del ión acilio, y la otra por eliminación de la cadena alquílica unida al N (esquema 19).



Esquema 19. Caminos de fragmentación propuestos para la formación del ión de *m/z* 302 a partir del compuesto **29**.

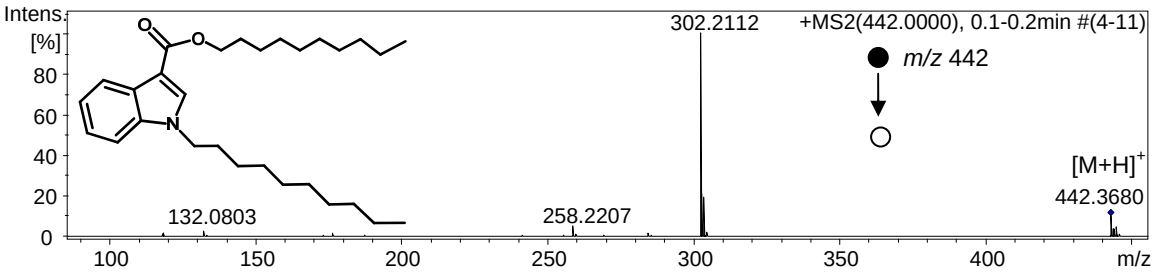
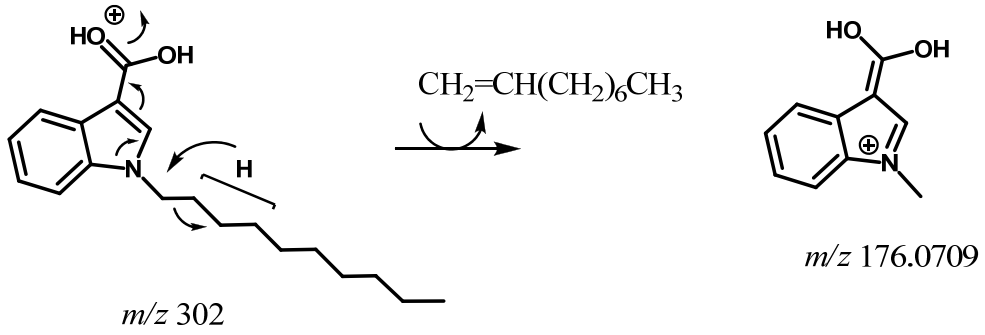


Figura 93. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ del compuesto **29**.

Para determinar la estructura del ión *m/z* 302 se llevó a cabo el experimento de ESI-EM/EM sobre ese ión seleccionado por ISCID a 50 eV a partir del $[M+H]^+$ del compuesto **29** (figura 94). Se encontró como pico base el ión de *m/z* 258.2212 y fórmula $C_{18}H_{28}N$ que reveló la pérdida de CO_2 a partir del ión de m/z 302.2112, lo cual indicaría que tiene un grupo ácido carboxílico. Este hecho también se confirmaría por la presencia del ión *m/z* 284.2012 que correspondería a $[m/z\ 302\text{-}H_2O]^+$. Además se observó un ión de *m/z* 176.0709 y fórmula $C_{10}H_{10}NO_2$ que teniendo en cuenta la fórmula del ión precursor $C_{19}H_{28}NO_2$ correspondería a la fragmentación α al N de la cadena n-decílica, eliminándose C_9H_{18} (126 u) (esquema 20). También se observó el ión de *m/z* 132.0803 con intensidad baja pero apreciable, que podría explicarse por pérdida de C_9H_{18} y CO_2 a partir de *m/z* 302. Toda la evidencia confirma la estructura planteada

con un grupo ácido carboxílico como la más razonable para esta especie, aunque no puede descartarse que ambas estructuras planteadas coexistan.



Esquema 20. Camino de fragmentación propuesto para la obtención del ión de *m/z* 176 a partir de *m/z* 302 por ruptura α al N.

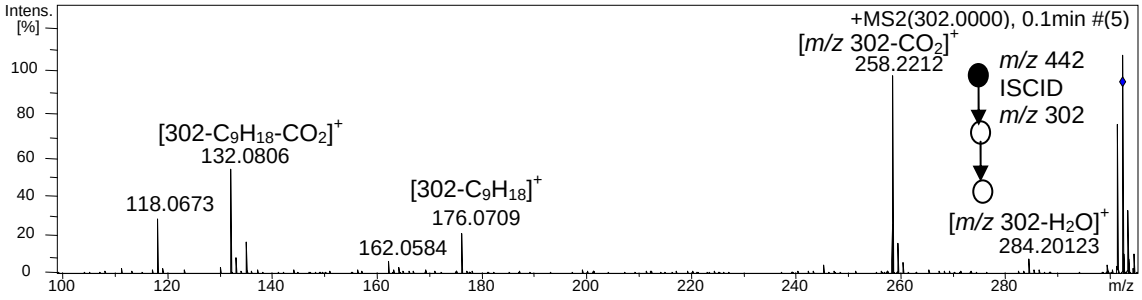
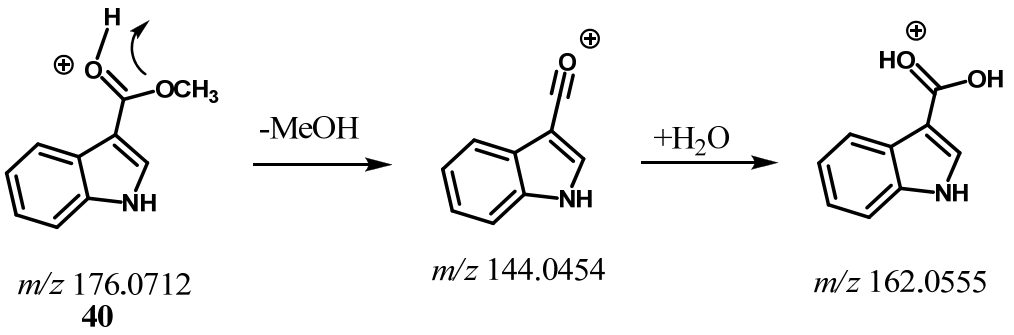


Figura 94. Espectro ESI-EM/EM del ión de *m/z* 302 obtenido por ISCID a 50 eV a partir del ión $[M+H]^+$ del compuesto **29**.

La formación del aducto con agua también se observó en el caso del indol-3-carboxilato de metilo (**40**) ($[M+H]^+$ 176.0712, $C_{10}H_{10}NO_2$, Δ -3.2 ppm). Se observó en su espectro de EM/EM a 15 eV el ión de *m/z* 162.0555 ($[M+H-MeOH+H_2O]^+$, $C_9H_8NO_2$, Δ -3.5 ppm) con una AR de 23 % (figura 95, esquema 21).



m/z 176.0712
40

m/z 144.0454

m/z 162.0555

Esquema 21. Esquema de fragmentación propuesto para la formación del ión $[M+H-MeOH+H_2O]^+$ a partir del ión $[M+H]^+$ del compuesto **40**.

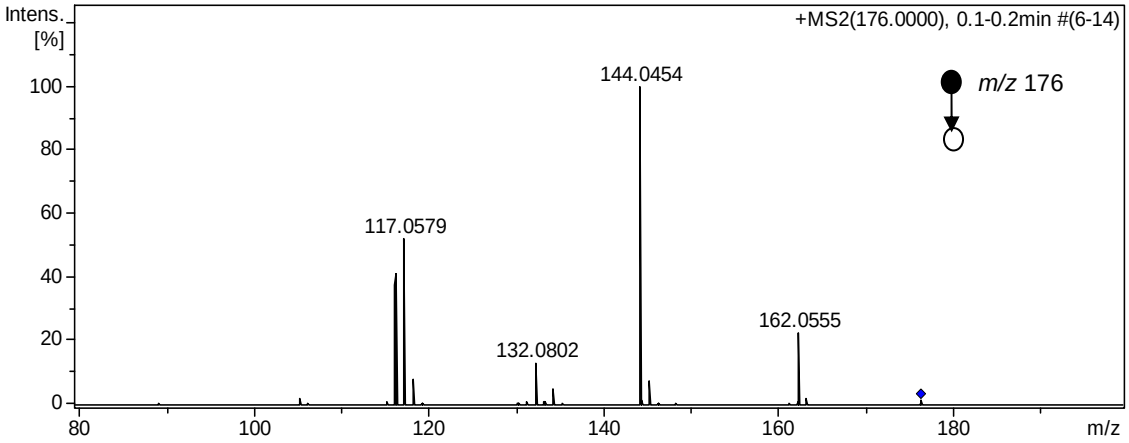


Figura 95. Espectro ESI-EM/EM del ión $[M+H]^+$ del compuesto **40**.

Es llamativo que derivados con cadenas hidrofóbicas hayan presentado también iones $[M+H-MeOH+H_2O]^+$ al igual que los análogos con heteroátomos en cadenas cortas. De esto se desprende que no resultaría evidente la influencia ejercida, si es que hay alguna, por la naturaleza de la cadena alquílica unida al N en la posibilidad de la formación del aducto con agua del ión acilio.

La adición de una molécula de agua por reacciones ión-molécula en condiciones ESI-CID en modo positivo, ha sido previamente informada en el caso de la droga hidroclortiazida analizada con distintos tipos de trampas iónicas y también con triple cuadrupolo. Para esta droga se observó un ión $[M+H-11]^+$ correspondiente a la pérdida de $NH=CH_2$ para dar origen a un ión sulfonio y posterior formación del aducto con agua. Este ión se halló independientemente del analizador empleado[16]. No se encontró

el origen de la molécula de agua adicionada pero se pudo determinar que la adición no ocurría en la fuente mediante experimentos en los que se variaba el solvente de inyección (etanol, metanol, etc.), dada la ausencia de aductos con los solventes elegidos en los espectros resultantes.

También se ha informado sobre la adición de agua a iones acilio en trampas iónicas en experimentos ESI-CID de los productos naturales ilicicolina H y ácido perlatolínico[17], y de compuestos derivados de 3-isoquinolincarboxiamidas[18,19]. En esos trabajos se confirmó la asociación del ión acilio y agua en fase gaseosa mediante experimentos de masa tándem sobre análogos deuterados de las moléculas estudiadas y cálculos DFT, y aunque quedó sin determinar la procedencia del agua se descartaron la fuente de ionización y el gas de colisión entre las posibilidades. Para descartar la formación del aducto en la fuente de ionización se disolvieron las muestras en solventes deuterados (D_2O y CD_3OD), de manera de evitar que agua presente en el solvente se adicione, sin embargo los aductos con agua siguieron estando presentes y así resultó evidente que el agua no provenía de la fuente. También se observaron dichas especies al utilizarse gases de alta pureza, y así quedó descartada la posibilidad de que el agua adicionada fuera contaminación de los gases.

En un trabajo realizado sobre bases nitrogenadas con un equipo LCQ (trampa iónica) en una fuente APCI se encontró que ocurría la adición de agua y/o de metanol al utilizar esos solventes, por lo que en ese caso se concluyó que el agua provenía de la fuente de ionización[20].

La formación de aductos con agua se ha informado también en una oportunidad en experimentos CID con un equipo QTOF en modo positivo[21]. En ese trabajo se realizaron experimentos utilizando gas de colisión dopado con $H_2{}^{18}O$ para descartar la posibilidad de que la fuente del agua adicionada proviniera del gas de colisión. Se encontró que aún en esas condiciones predominaban los iones asociados con $H_2{}^{16}O$, y que la abundancia de los aductos con $H_2{}^{18}O$ resultaba mayor que con $H_2{}^{16}O$ únicamente en el caso de conectar el gas dopado directamente a la válvula de la celda de colisión. De esa manera se dejó en evidencia que el agua provenía de las tuberías de acero del equipo por las que se inyectan los gases, teniendo en cuenta la capacidad de adsorción de agua de las superficies de acero inoxidable[22,23].

Para comenzar con el análisis de los iones $[M+H-MeOH+H_2O]^+$ observados en los experimentos ESI-CID se compararon las intensidades de las especies $[M+H]^+$, $[M+H-MeOH]^+$ y $[M+H-MeOH+H_2O]^+$ a distintas energías de colisión para los compuestos **34** y **35** (figuras 96 y 97). En los diagramas de descomposición se observó que las abundancias de las especies $[M+H-MeOH]^+$ y $[M+H-MeOH+H_2O]^+$ variaban proporcionalmente lo que indicaría que a mayor concentración de $[M+H-MeOH]^+$ mayor es la probabilidad de que se origine $[M+H-MeOH+H_2O]^+$, y que se trata de procesos íntimamente relacionados.

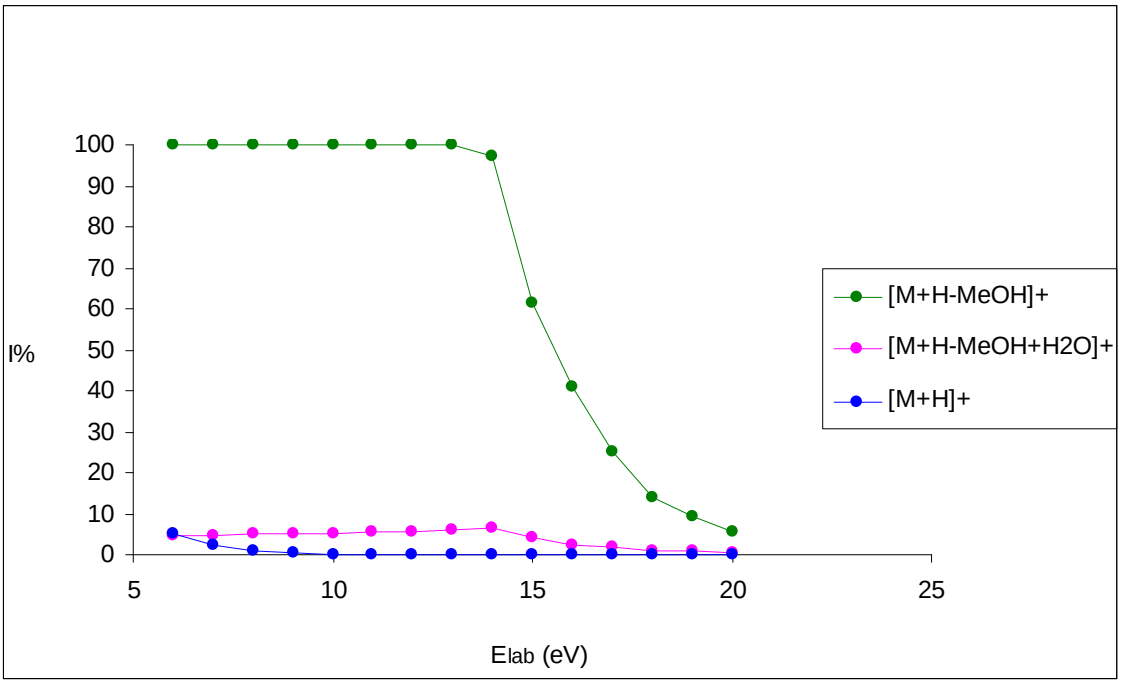


Figura 96. Diagrama de descomposición del ión precursor $[M+H]^+$ de **34** y formación de fragmentos.

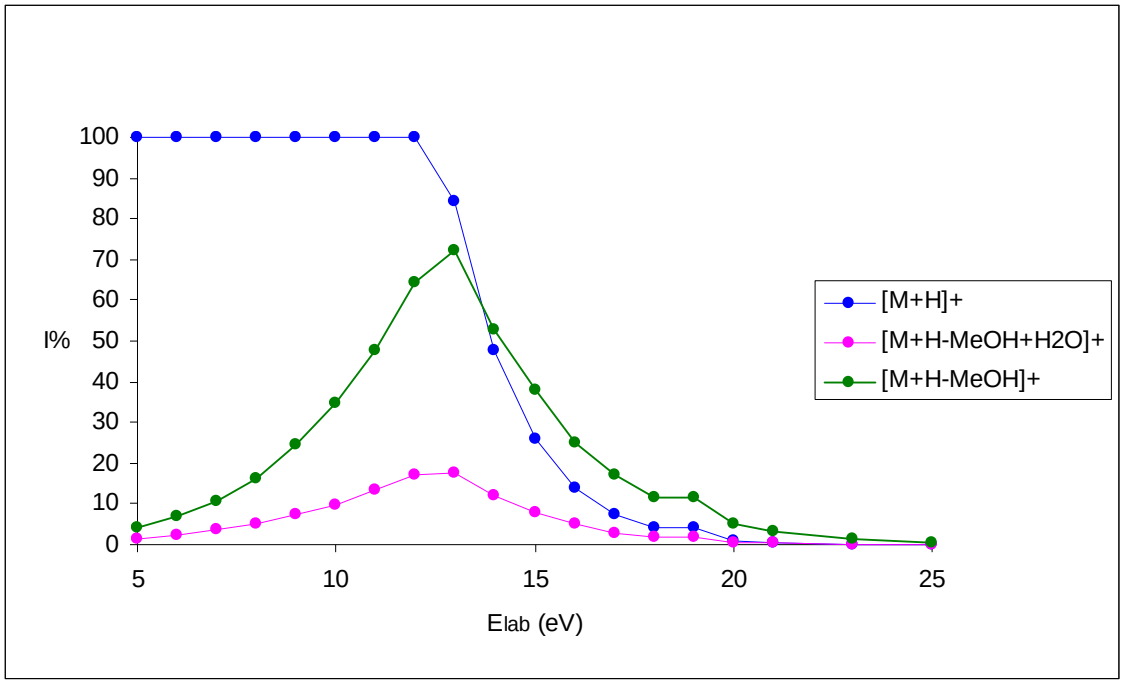


Figura 97. Diagrama de descomposición del ión precursor $[M+H]^+$ de **35** y formación de fragmentos.

Además fue posible observar el ión de *m/z* 233 en el espectro ESI-EM/EM de *m/z* 215 ($[M+H-MeOH]^+$) obtenido por ISCID a partir del $[M+H]^+$ del compuesto **34** (figura 98). Esto demostró que la incorporación de agua es posterior a la pérdida de metanol y ocurre en la celda de colisión y se corroboró que los procesos están relacionados. Esta observación se repitió al analizar los iones $[M+H-MeOH]^+$ de todos los compuestos que fragmentan dando $[M+H-14]^+$.

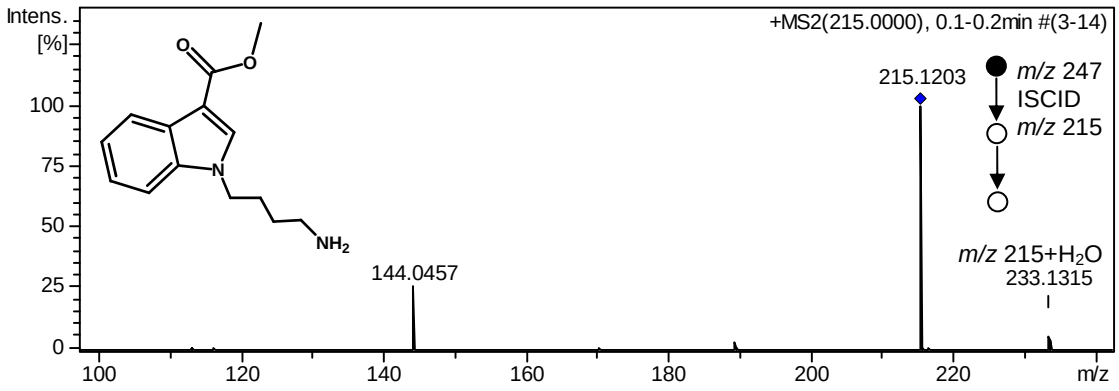


Figura 98. Espectro ESI-EM/EM del ión de *m/z* 215 seleccionado por ISCID a 50 eV a partir del $[M+H]^+$ del compuesto **34**.

La diferencia entre las intensidades de los iones $[M+H-MeOH+H_2O]^+$ exhibidas por los compuestos **26**, **34**, **35** y **36** fue muy marcada (tabla 19). En los espectros de los primeros se observó que estas especies tienen una abundancia relativa baja, mientras que en el último caso constituye el pico base del espectro (figura 100). Esta diferencia posiblemente se deba a la presencia de dos grupos éster en **36**, que generaría una mayor probabilidad de que ocurra la formación de fragmentos acilio dado que la molécula posee dos sitios de protonación equivalentes.

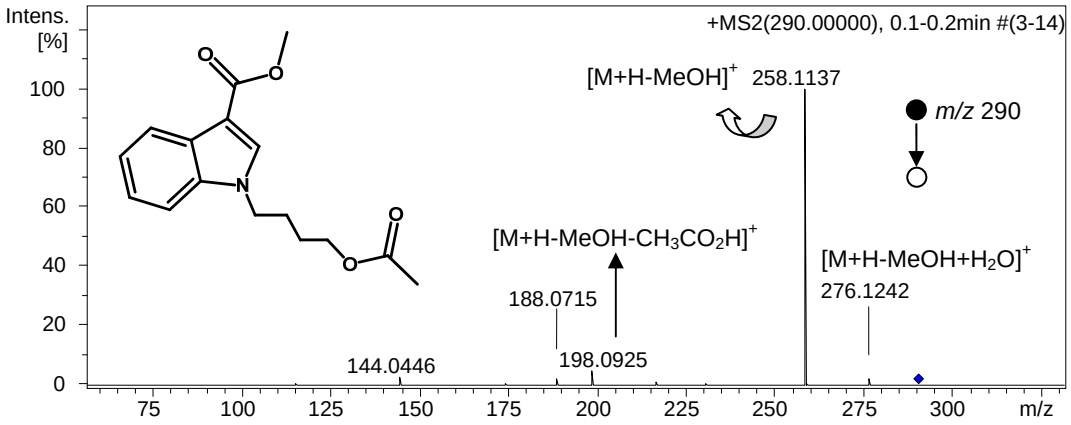


Figura 99. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ de **26**.

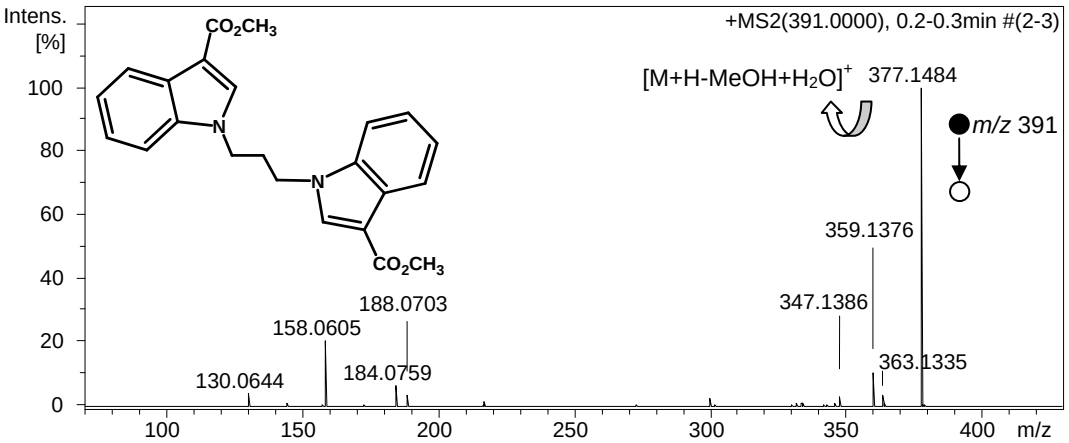
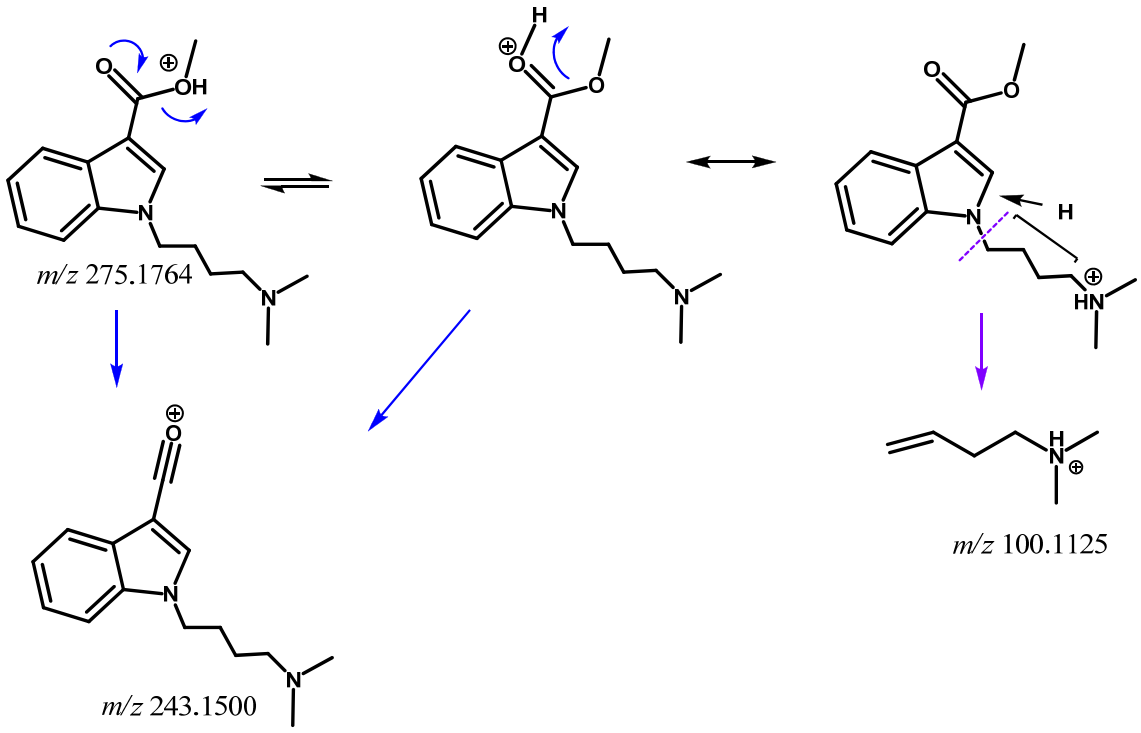


Figura 100. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ion $[M+H]^+$ de **36**.

Sumado a lo anterior, en **34** y **35** existe un sitio alternativo de protonación, el N alifático en el extremo de la cadena butílica, es decir que habría una competencia entre los sitios de protonación y por lo tanto disminuiría aún más la probabilidad de que se origine la especie en cuestión ya que cada sitio protonado conduciría a distintas fragmentaciones específicas (esquema 22). De hecho en el espectro de **35** (figura 80) se encontró con intensidad relativa alta (100%) el ión de *m/z* 100.1125 de composición

$C_6H_{14}N$, correspondiente al fragmento *N*,*N*-dimetilbut-3-en-1-amonio. Un fragmento equivalente no se observó en el caso de **34**. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta la basicidad mucho mayor de las aminas terciarias frente a las primarias en fase gaseosa. De acuerdo a lo analizado para estos casos puede concluirse que la naturaleza del grupo sustituyente en el extremo de la cadena *N*-alquílica resultó influyente en la factibilidad de formación del aducto con agua al actuar como sitio alternativo de protonación, induciendo otros caminos de fragmentación más favorecidos aunque también podría estar asistiendo a la formación del aducto, o previniendo su formación al estabilizar al ión $[M+H-MeOH]^+$ intermediario.



Esquema 22. Sitios de protonación del compuesto **35** y algunos fragmentos obtenidos.

Con el objetivo de profundizar el análisis del origen de la molécula de agua que se adiciona y del mecanismo de adición se realizó el análisis del compuesto **35** disuelto en MeOD/$AcOND_4$ y se prepararon además tres análogos a partir de **35** y **36**. Se llevó a cabo la transesterificación de **35** para obtener un éster etílico, compuesto **41**, se hizo un intercambio del metilo del éster por su análogo trideuterado, compuesto **42** y se realizó la transesterificación del compuesto **36** para obtener también un análogo deuterado,

compuesto **43** (figura 101). Los procedimientos de transesterificación se detallan en la parte experimental de este capítulo.

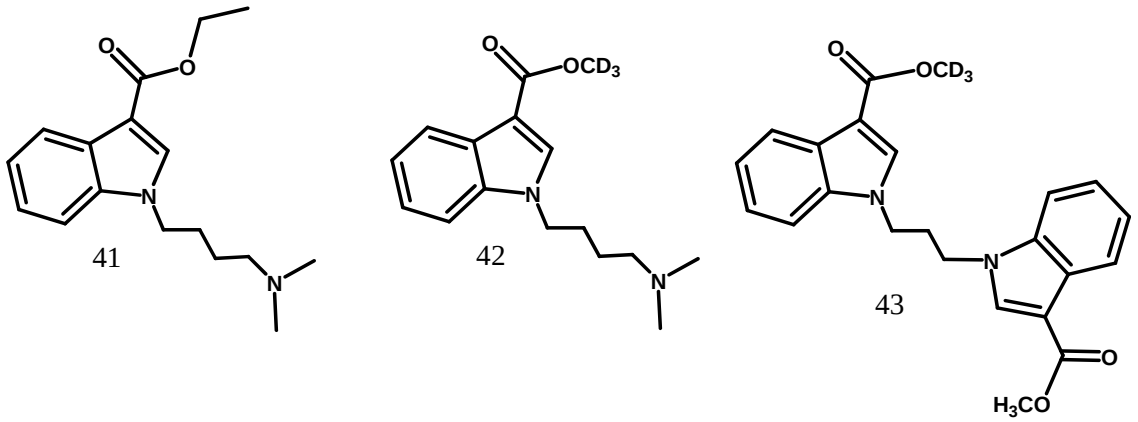
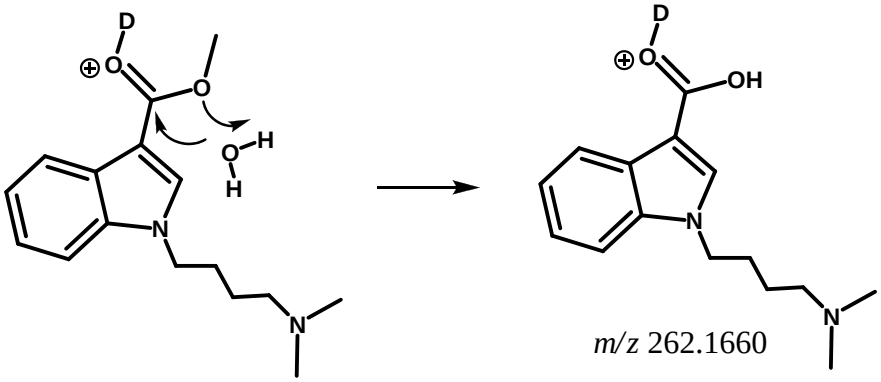


Figura 101. Análogos de **35** y **36** obtenidos por transesterificación.

En el espectro EM/EM del ión $[M+D]^+$ del compuesto **35** (figura 102) se observó, además del fragmento esperado $[M+D\text{-}MeOD+H_2O]^+$ *m/z* 261.1603, el ión *m/z* 262.1660 ($C_{15}H_{20}DN_2O_2$, Δ 0.2 ppm $[M+D\text{-}MeOH+H_2O]^+$) incluso con mayor abundancia relativa. Este ión indicaría que el D puede migrar antes de la fragmentación o que la adición de agua ocurre concertadamente con la eliminación de MeOH (esquema 23). La posibilidad de que el ión fuera $[M+D\text{-}MeOD+HDO]^+$ se descartó ya que en experimentos previos se determinó que el solvente empleado no influye en la adición de agua.



Esquema 23. Un mecanismo posible para la eliminación de MeOH y adición de agua del ión $[M+D]^+$ del compuesto **35**.

Pero en el espectro de la figura 102 también se observó el ión fragmento de *m/z* 244.1556 ($C_{15}H_{18}DN_2O$, Δ -0.6 ppm $[M+D\text{-}MeOH]^+$) y otros relacionados con él, que

indicarían que el D puede efectivamente migrar previo a la fragmentación. Lo que resulta curioso es que el ión *m/z* 100.1125 ($C_6H_{14}N$) no presenta su equivalente deuterado, por lo que si el N de la cadena alquílica se deutera, el D migra completamente antes de la fragmentación de la cadena o se fragmenta la cadena cuyo N no se ha deuterado.

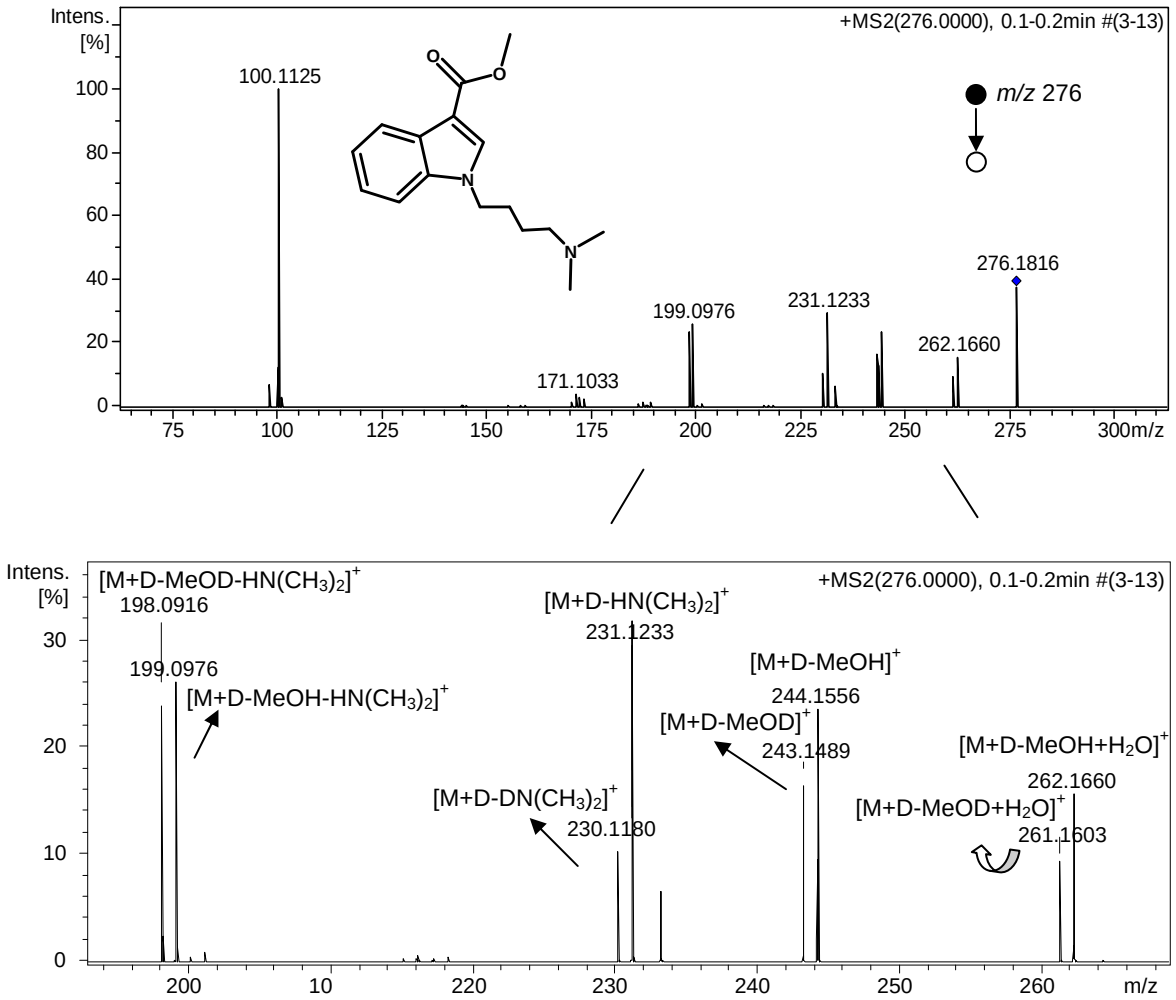


Figura 102. Espectro y ampliación del espectro ESI-EM/EM del ión $[M+D]^+$ correspondiente al compuesto **35**.

En los espectros ESI-EM/EM del ión molecular protonado de **41** y de **42** (figuras 103 y 104) se encontraron los iones de *m/z* 243 y *m/z* 261, al igual que lo observado en el análisis del compuesto **35**, lo que dejó en evidencia que estos análogos, en los que se modificó la naturaleza del éster, también forman aducto con agua en fase gaseosa (tabla 20).

	$[M+H]^+$ (AR) *error*	$[M+H-EtOH+H_2O]^+$ (AR) *error*	$[M+H-CD_3OH+H_2O]^+$ (AR) *error*	$[M+H-MeOH+H_2O]^+$ (AR) *error*	$[M+H-CH_3OH-CD_3OH+2H_2O]^+$ (AR) *error*
41	289.1921 (47.6) $C_{17}H_{25}N_2O_2$ *-3.6*	261.1607 (21.2) $C_{15}H_{21}N_2O_2$ *-3.6*			
42	278.1956 (26.2) $C_{16}H_{20}D_3N_2O_2$ *-4.9*		261.1613 (10.3) $C_{15}H_{21}N_2O_2$ *-5.9*		
43	394.1844 (13.6) $C_{23}H_{20}D_3N_2O_4$ *-1.0*		377.1510 (100) $C_{22}H_{21}N_2O_4$ *-3.8*	380.1689 (98.5) $C_{22}H_{18}D_3N_2O_4$ *-1.3*	363.1356 (7.0) $C_{21}H_{19}N_2O_4$ *-4.6*

Tabla 20. Iones originados por adición de agua observados en los espectros ESI-EM/EM de los $[M+H]^+$ de los compuestos **41**, **42** y **43**.

El ión molecular protonado de **43** sufrió pérdidas de 14, 17 y 31 u, que dieron origen a los iones de m/z 380.1689, 377.1510 y 363.1356 respectivamente (figura 105). Conforme a la composición de cada uno $C_{22}H_{18}D_3N_2O_4$, $C_{22}H_{21}N_2O_4$ y $C_{21}H_{19}N_2O_4$ se concluyó que su procedencia implicaba también pérdidas respectivas de CH_3OH, CD_3OH y CH_3OH + CD_3OH e incorporación de H_2O. El ión de *m/z* 363.1356 se originaría entonces a partir de la fragmentación consecutiva de los dos ésteres presentes en la molécula y la incorporación de dos moléculas de agua (esquema 24).

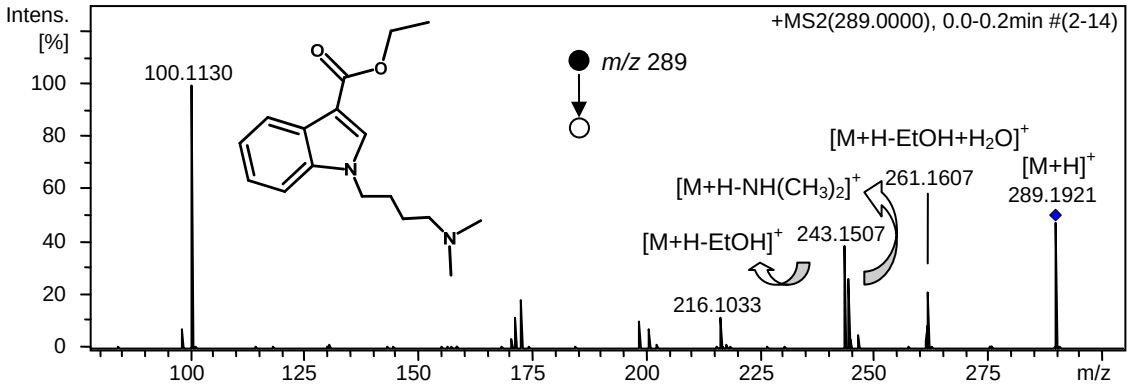


Figura 103. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ correspondiente al compuesto **41**.

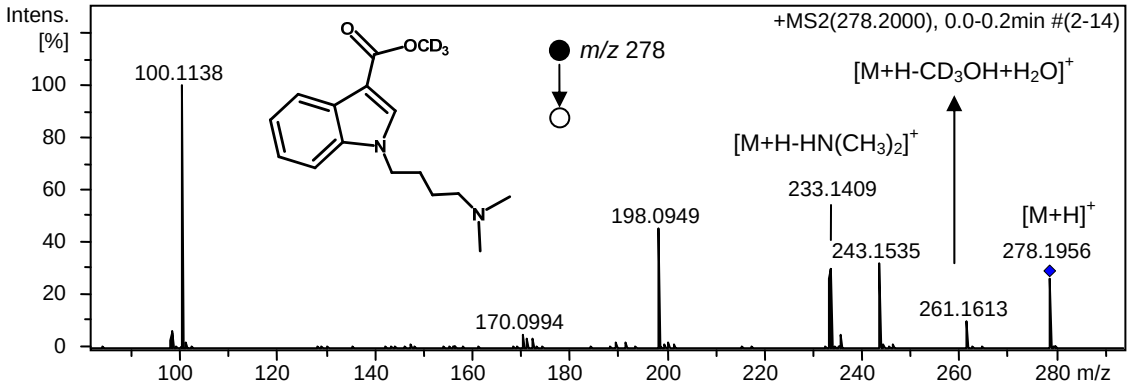


Figura 104. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ correspondiente al compuesto **42**.

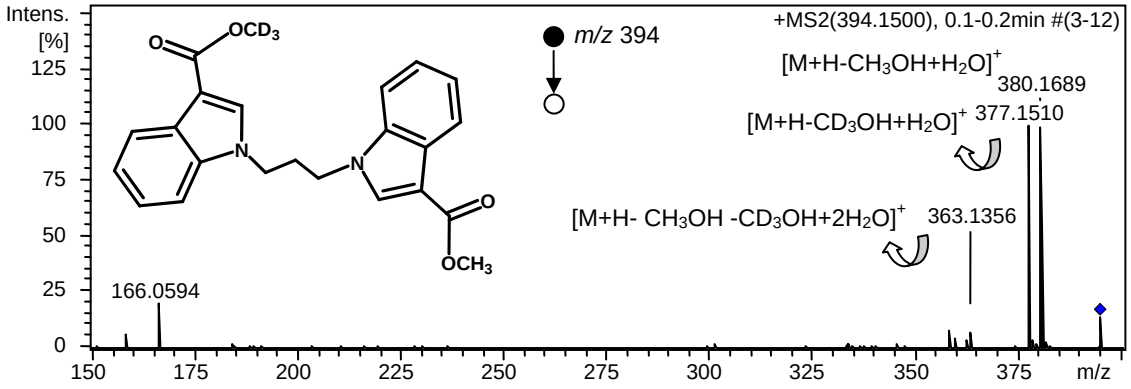
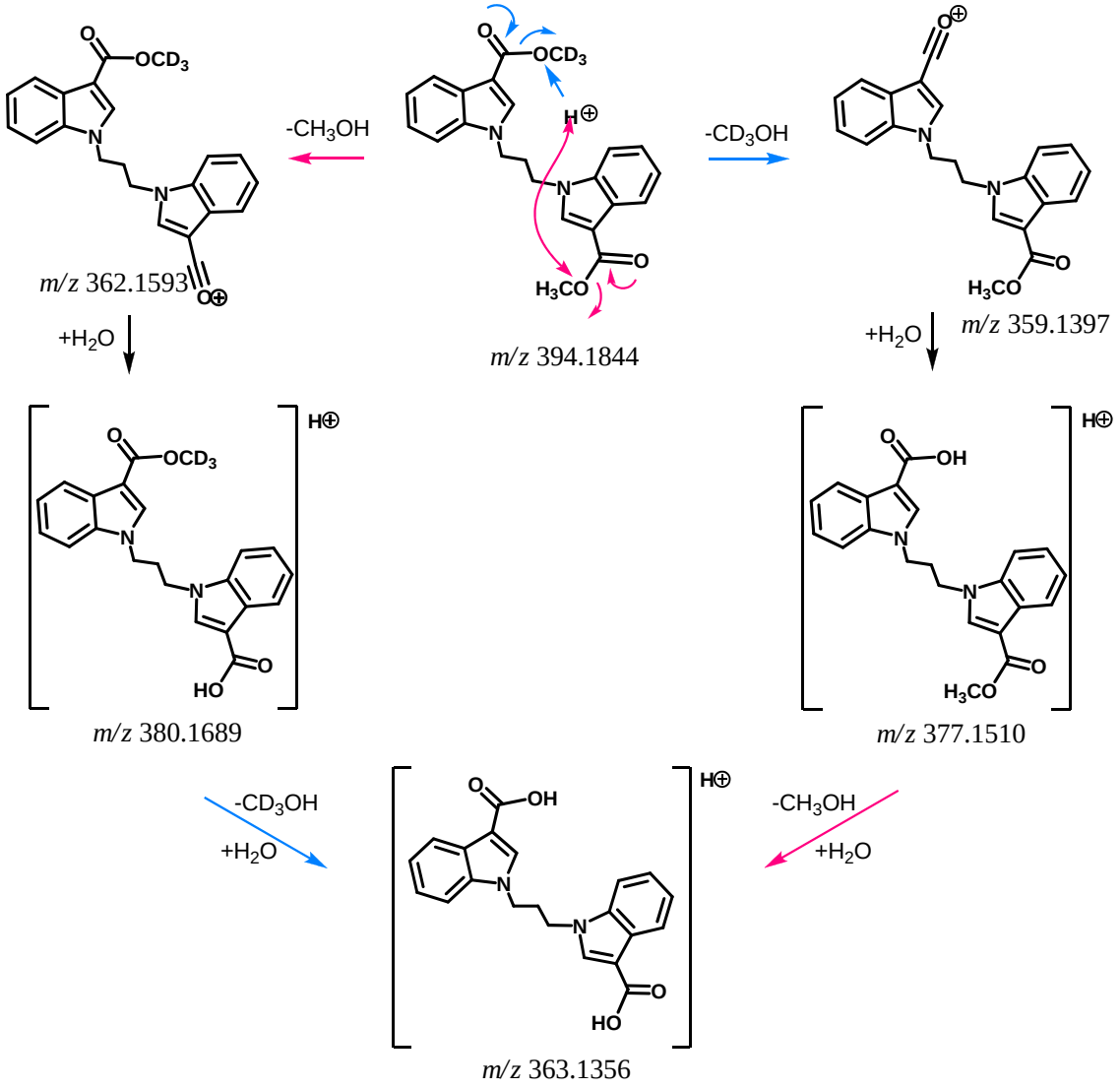


Figura 105. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ correspondiente al compuesto **43**.



Esquema 24. Camino propuesto para la formación de aductos con agua observados en los experimentos ESI-EM/EM del compuesto **43**.

Estos resultados indican que la formación del aducto con agua es independiente del alcohol que forma parte del éster y que los H de estos alcoholes no están involucrados en el mecanismo de formación de los aductos.

Se repitieron los experimentos ESI-EM/EM de los compuestos **41**, **42** y **43** disueltos en CD_3OD con agregado de $AcOND_4$. En los espectros obtenidos se observaron nuevamente los iones formados por adición de H_2O (tabla 21, figuras 106, 107 y 108) y no se observaron aductos con los solventes deuterados, lo cual reconfirmó que el agua no proviene de la fuente, como ya se había comprobado anteriormente.

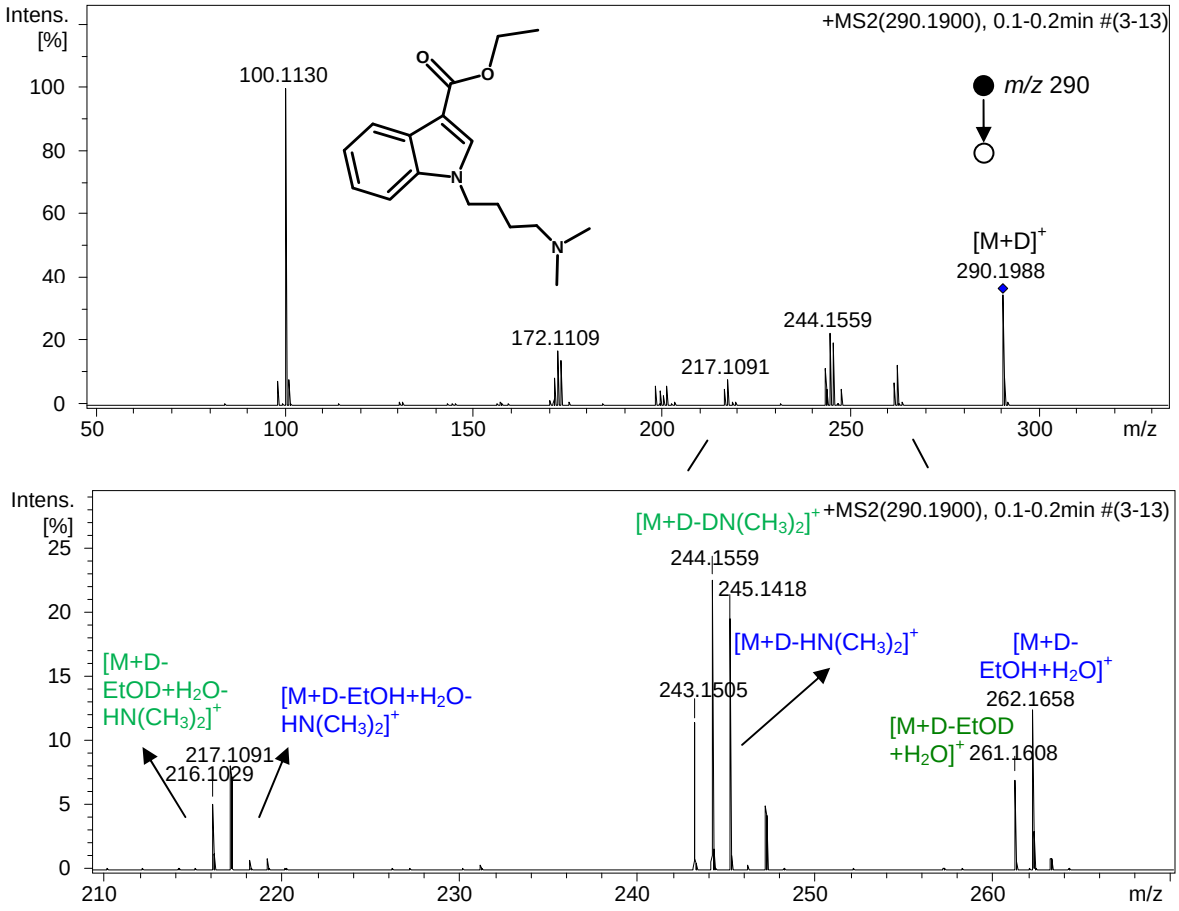


Figura 106. Espectro y ampliación del espectro ESI-EM/EM del $[M+D]^+$ correspondiente al compuesto **41**.

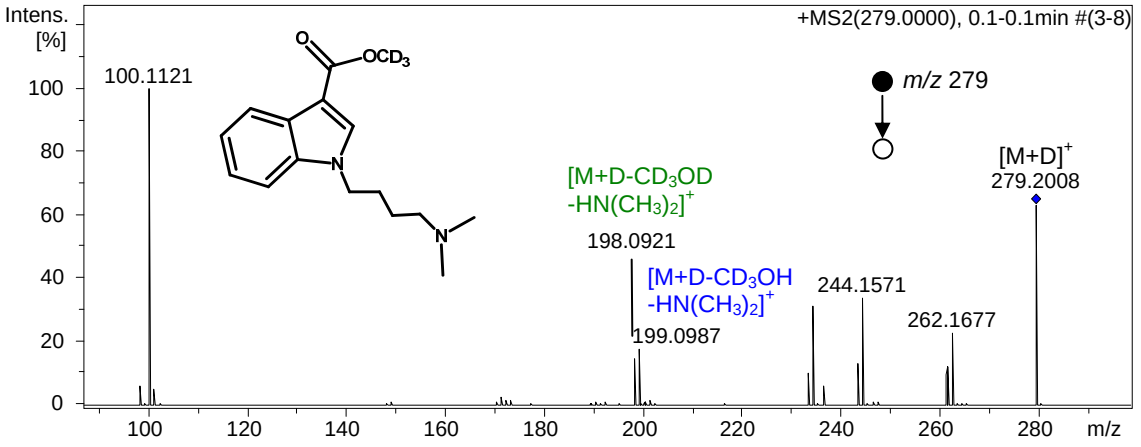


Figura 107. Espectro ESI-EM/EM del ión $[M+D]^+$ correspondiente al compuesto **42**.

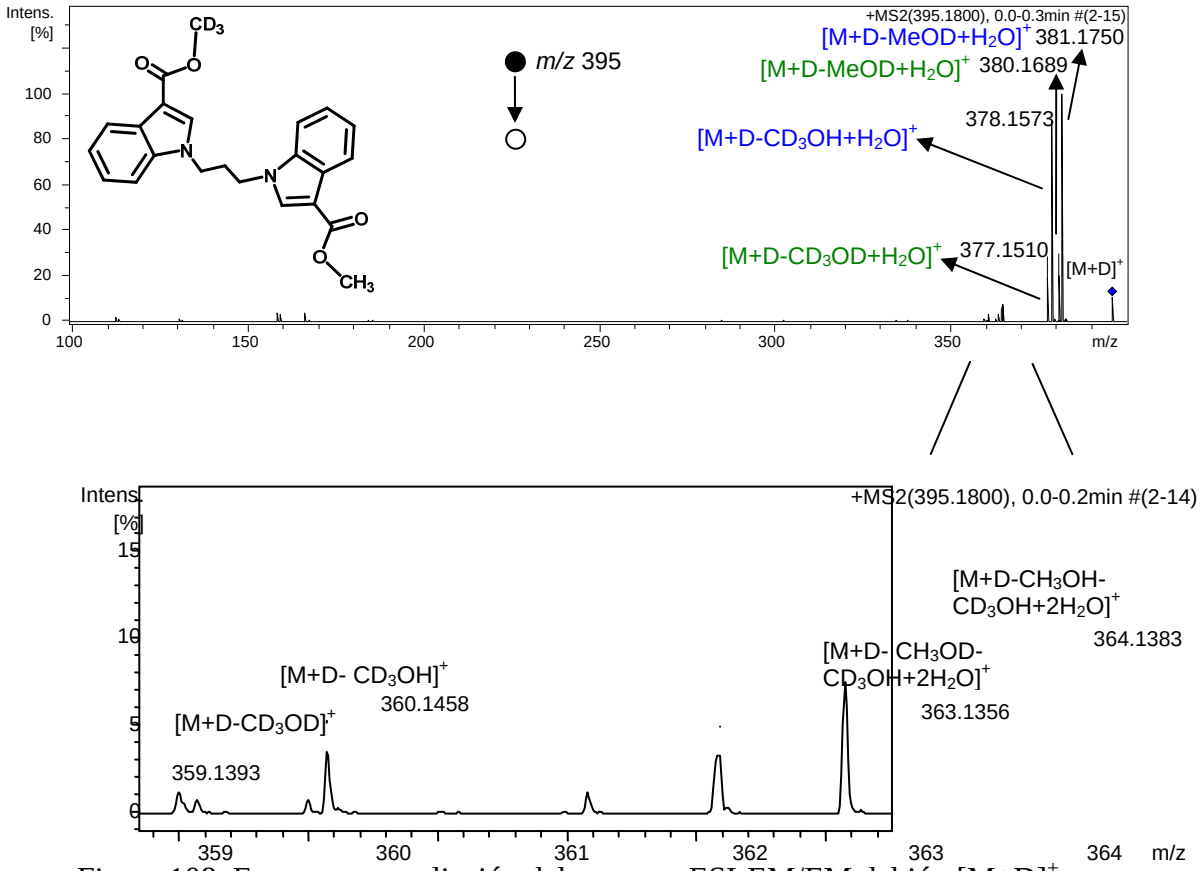


Figura 108. Espectro y ampliación del espectro ESI-EM/EM del ión $[M+D]^+$ correspondiente al compuesto **43**.

Como se desprende de la tabla 21 en los tres casos se observaron algunos de los fragmentos hallados anteriormente al analizar los iones moleculares protonados. En el espectro ESI-EM/EM del ión $[M+D]^+$ de **35** (figura 102) se observaron los iones de *m/z* 243.1489 y 230.1180 que se originaron por pérdidas de CH_3OD y $(CH_3)_2ND$ y el aducto con agua *m/z* 261.1603, lo que indicaría que la deuteración puede efectivamente ocurrir en los O del éster metílico o en el N de la cadena lateral.

	35	**41**	**42**	**43**
$[M+D]^+$	276.1816 (37.9) $C_{16}H_{22}DN_2O_2$ *0.2*	290.1988 (35.4) $C_{17}H_{24}DN_2O_2$ *-5.0*	279.2008 (28.1) $C_{16}H_{19}D_4N_2O_2$ *-1.0*	395.1902 (11.3) $C_{23}H_{19}D_4N_2O_4$ *0.4*
$[M+D-ROD]^+$	243.1489 (16.4) $C_{15}H_{19}N_2O$ *1.4*	243.1505 (11.5) $C_{15}H_{19}N_2O$ *-4.0*	243.1502 (13.3) $C_{15}H_{19}N_2O$ *-4.0*	377.1510 (19.5) $C_{22}H_{21}N_2O_4$ *-3.8*
$[M+D-ROH]^+$	244.1556 (23.5) $C_{15}H_{18}DN_2O$ *-0.6*	244.1559 (23.1) $C_{15}H_{18}DN_2O$ *-1.7*	244.1571 (34.3) $C_{15}H_{18}DN_2O$ *-6.9*	378.1573 (87.9) $C_{22}H_{20}DN_2O_4$ *-3.8*
$[M+D-ROD+H_2O]^+$	261.1603 (9.4) $C_{15}H_{21}N_2O_2$ *-2.0*	261.1608 (7.0) $C_{15}H_{21}N_2O_2$ *-4.0*	261.1590 (12.3) $C_{15}H_{21}N_2O_2$ *-3.0*	380.1689 (20.4) $C_{22}H_{18}D_3N_2O_4$ *-1.3*
$[M+D-ROH+H_2O]^+$	262.1669 (15.7) $C_{15}H_{20}DN_2O_2$ 0.2	262.1658 (12.4) $C_{15}H_{20}DN_2O_2$ 0.9	262.1663 (12.3) $C_{15}H_{20}DN_2O_2$ -6.2	381.1750 (100) $C_{22}H_{17}D_4N_2O_4$ -0.8
$[M+D-DN(CH_3)_2]^+$	230.1180(10.4) $C_{14}H_{16}NO_2$ *-1.9*	n.o	233.1374 (2.2) $C_{14}H_{13}D_3NO_2$ *-4.6*	
$[M+D-HN(CH_3)_2$	231.1233 (29.5) $C_{14}H_{15}DNO_2$ *2.1*	245.1418 (19.2) $C_{15}H_{19}NO_2$ *-3.2*	234.1440 (29.3) $C_{14}H_{12}D_4NO_2$ *-5.8*	
$[M+D-ROD-HN(CH_3)_2]^+$	198.0916 (23.8) $C_{13}H_{12}NO$ -1.5	198.0919 (5.8) $C_{13}H_{12}NO$ -2.8	198.0921 (8.6) $C_{13}H_{12}NO$ -3.8	
$[M+D-ROH-HN(CH_3)_2]^+$	199.0976 (26.0) $C_{13}H_{11}DNO$ *-0.1*	199.0978 (4.6) $C_{13}H_{11}DNO$ *-0.9*	199.0987 (35.8) $C_{13}H_{11}DNO$ *-5.3*	
$[M+D- ROD-HN(CH_3)_2- CO]^+$	n.o	170.0959 (1.7) $C_{12}H_{12}N$ *3.1*		
$[M+D- ROH-HN(CH_3)_2- CO]^+$	171.1033 (4.2) $C_{12}H_{11}DN$ *-3.5*	171.1038 (8.6) $C_{12}H_{11}DN$ *-6.4*	171.1031 (5.5) $C_{12}H_{11}DN$ *-2.3*	
$[M+D-ROD+H_2O-HN(CH_3)_2]^+$	n.o	216.1029 (5.1) $C_{13}H_{14}NO_2$ *-4.6*	n.o	
$[M+D-EtOH+H_2O-HN(CH_3)_2]^+$	n.o	217.1091 (8.1) $C_{13}H_{13}DNO_2$ *-4.2*	n.o	
m/z 216-CO_2		172.1109 (17.1) $C_{12}H_{14}N$ 6.8		
m/z 217-CO_2		173.1181 (14.0) $C_{12}H_{13}DN$ *1.5*		

En todos los casos se informa *m/z*, (AR), FM, *error* en ppm. n.o: no se observa

Tabla 21. Iones observados en los espectros ESI-EM/EM de los $[M+D]^+$ de los compuestos **35**, **41**, **42** y **43**.

También en el espectro del ión $[M+D]^+$ de **41** (figura 106) se observaron los iones de *m/z* 261.1608, 243.1505 y 198.0919, por lo tanto hubo pérdidas de CH_3CH_2OD y $(CH_3)_2ND$. Lo mismo se observó en el caso del compuesto **42** (figura 107). En el caso de **43** (figura 108) se observaron los iones de *m/z* 380.1689, 377.1510 y 363.1356 al igual que en el espectro de su ión molecular protonado, pero en intensidades relativas bajas. La presencia de estos iones se explicó teniendo en cuenta las pérdidas CD_3OD y CH_3OD.

Los iones mencionados previamente son los previsibles en cada caso. Sin embargo en los espectros se hallaron además iones de relación *m/z* una unidad mayor que las correspondientes a los iones mencionados, con intensidades similares entre cada par, o incluso mayor. Su presencia implicaría pérdidas de CH_3OH, CH_3CH_2OH y $(CH_3)_2NH$ a partir del ión molecular deuterado $[M+D]^+$ correspondiente, e indicarían que el átomo de deuterio quedó retenido por el fragmento cargado (tabla 21).

Este hecho podría explicarse a través de un reordenamiento en el que ocurra un intercambio de H por D previo a la fragmentación del ión precursor $[M+D]^+$. En el año 2010 se publicó un estudio sobre el comportamiento de un grupo de fármacos pequeños por espectrometría de masa en condiciones CID[24]. Todos los compuestos presentaban en su estructura un átomo de N básico y diferentes entornos químicos (grupos aromáticos, alifáticos y diversos grupos funcionales). En ese trabajo se concluyó que existía un intercambio intramolecular iónico de H/D en las moléculas que presentaban al menos un H en posición γ relativa al N y que lo mismo no ocurría en ausencia de H en esa posición, o en presencia de grupos atractores de electrones unidos al C γ. Se comprobó además que el intercambio ocurría en fase gaseosa. Este proceso podría explicar la presencia de los iones observados por CID en el caso de los compuestos **35**, **41** y **42**. En el caso de **43** el resultado es razonable dado que en la molécula existen varios sitios equivalentes para la deuteración, análogamente a lo que se describió en el caso de la protonación. Cabe mencionar además que para este compuesto dicha fragmentación es prácticamente exclusiva, lo que podría justificarse por la ausencia de sitios protonables en la molécula fuera del éster metílico.

Cabe destacar que no se observó el ión de m/z 101 en forma apreciable en los espectro de **35**, **41** y **42**, y que el ión de m/z 100 siguió apareciendo como pico base.

Este hecho conduciría a proponer que la fragmentación de la cadena no ocurre o lo hace en menor proporción cuando el N está deuterado. Otra posibilidad sería que el intercambio H/D ocurra de manera casi completa antes o durante dicha fragmentación.

Iones originados por pérdida de CO_2

Se observó en los espectros de EM/EM de algunos compuestos una pérdida de 44 u (CO_2) o relacionada, como se muestra en la tabla 22.

	$[M+H-CO_2]^+$	$[M+H-CO_2-HX]^+$	$[M+H-Cad-CO_2]^+$	$[M+H-\alpha_N-CO_2]^+$
20			130.0648 (3.4) C_9H_8N *2.5*	
25	272.2369 (4.1) $C_{19}H_{30}N$ *1.4*		132.0801 (9.1) $C_9H_{10}N$ *5.0*	146.0957 (8.4) $C_{10}H_{12}N$ *5.1*
30	146.0961 (5.7) $C_{10}H_{12}N$ *2.2*			
31	252.0389 (4.2) $C_{12}H_{15}BrN$ *-2.5*	172.1125 (5.9) $C_{10}H_{12}N$ *-2.5*	132.0810 (19.4) $C_9H_{10}N$ *-1.7*	
32	266.0539 (1.0) $C_{13}H_{17}BrN$ *0.1*		132.0802 (1.9) $C_9H_{10}N$ *4.4*	
34			130.0658 (<1) C_9H_8N *-5.1*	
37			132.0805 (11.0) $C_9H_{10}N$ *1.7*	
40			132.0802 (13.3) $C_9H_{10}N$ *4.3*	

En todos los casos se informa *m/z*, (AR), FM, *error* en ppm. Cad: cadena lateral (+H en el caso de x=O, N y –H si x=H, halógeno).

Tabla 22. Iones fragmento originados por pérdida de CO_2.

A pesar de que estos fragmentos no son muy abundantes son destacables ya que la pérdida de CO_2 en ésteres en experimentos de EM/EM no es muy habitual. Esta pérdida en cambio es característica de los ácidos carboxílicos, ejemplificada en la figura 109 con el espectro ESI-EM/EM del ácido 1H-1-metilindol-3-carboxílico **44**, donde se observa el ión *m/z* 132.0813 $[M+H-CO_2]^+$ con una AR de 68.1 %.

Los iones observados en la tabla 22 que provienen de otro ión fragmento fueron asignados en función de experimentos ISCID. Por ejemplo el ión *m/z* 172.1125 $[M+H-CO_2-HX]^+$ para el compuesto **31** se observó en el espectro EM/EM del ión fragmento *m/z* 252 obtenido por ISCID (figuras 110 y 111). Si bien se observaron iones fragmento con masa nominal 172 en los espectros de EM/EM de otros compuestos, estos iones se originaron por otros caminos de fragmentación.

En el caso de algunos compuestos en cuyos espectros de EM/EM se observaba el aducto con agua $[M+H-MeOH+H_2O]^+$, se observó también la presencia de $[M+H-MeOH+H_2O-CO_2]^+$ (*m/z* 189.1383 $C_{12}H_{17}N_2$, Δ 1.7, 2.6% y *m/z* 333.1568 $C_{12}H_{17}N_2O_2$, Δ 8.8, 1.1% para los compuestos **34** y **36** respectivamente), aunque en estos casos la pérdida de CO_2 podría atribuirse al grupo ácido carboxílico de los iones precursores.

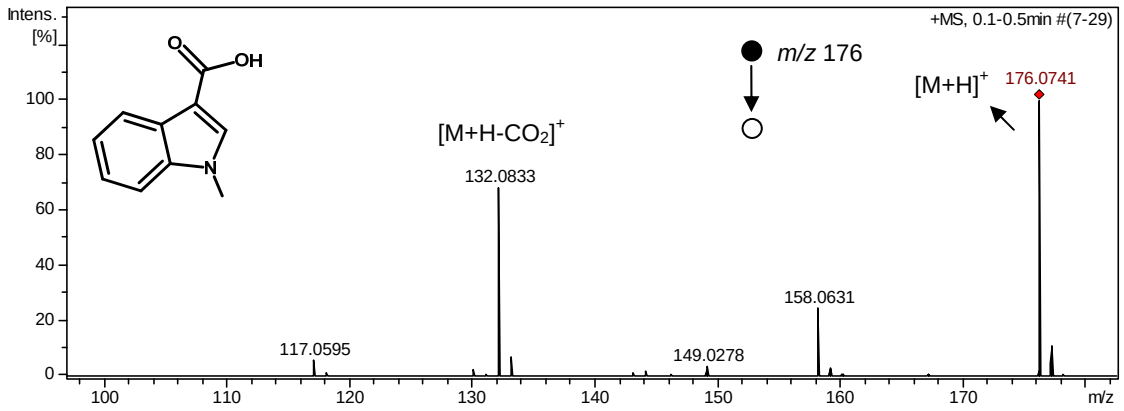


Figura 109. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ correspondiente al ácido 1*H*-1-metilindol-3-carboxílico (**44**).

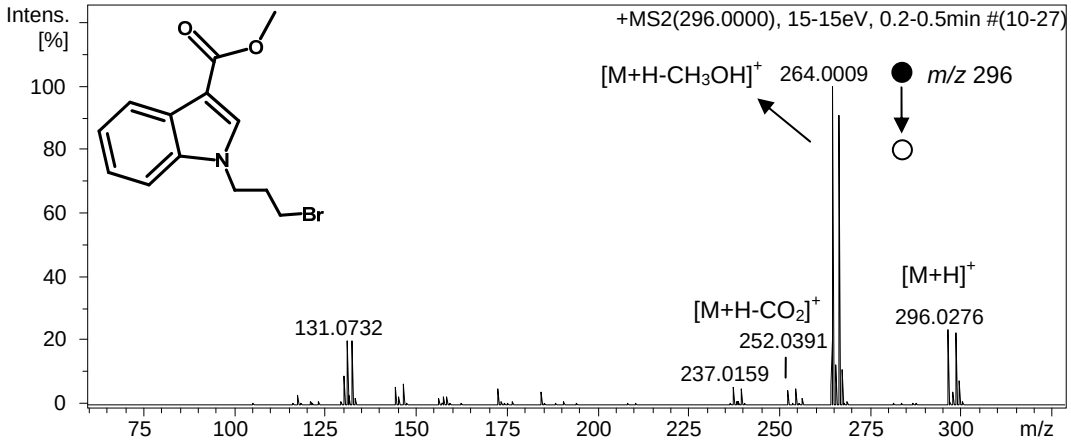


Figura 110. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ correspondiente al compuesto **31**.

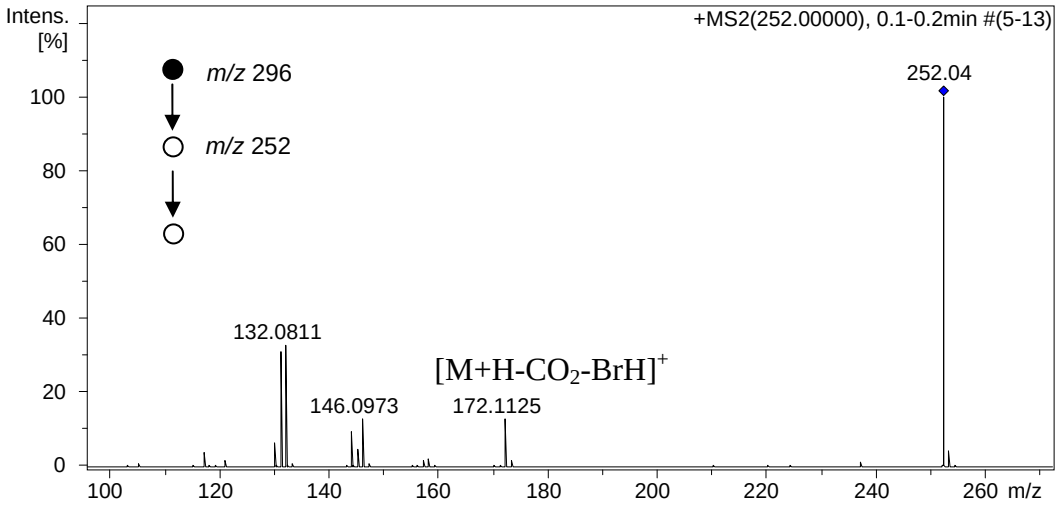
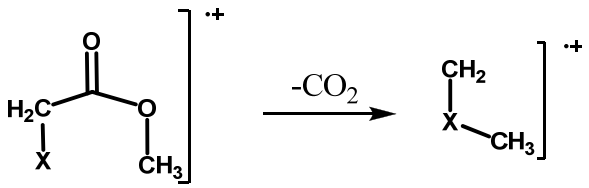


Figura 111. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ion $[M+H-CO_2]^+$ obtenido por ISCID a partir del $[M+H]^+$ del compuesto 31.

La pérdida de CO_2 para ésteres ha sido estudiada y corroborada por el grupo de Weisz, realizando experimentos de masa tándem para una serie de haloacetatos metílicos ionizando con EI y colisionando los iones precursores con alta energía[11]. En este trabajo se concluyó tanto por experimentos de EM/EM como por cálculos teóricos que el metilo se transfería al halógeno y no al carbono vecino al carbonilo (esquema 25).

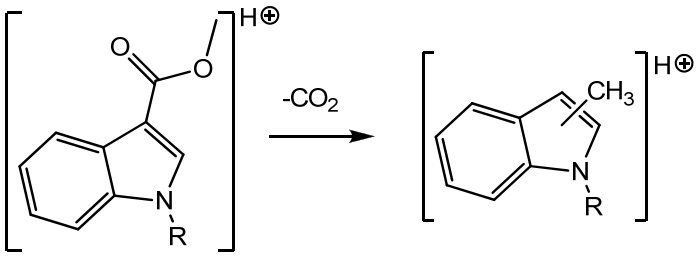


complejo entre $CH_2X^{\cdot}$ y CH_3^+

Esquema 25. Pérdida de CO_2 en haloacetatos metílicos.

También se ha informado este tipo de fragmentación en experimentos ESI-CID sobre lactonas[25]. En este caso la molécula de CO_2 que se elimina corresponde a la lactona y se observa solo bajo ciertos requisitos estructurales y por lo tanto no puede asociarse a los compuestos objeto de estudio de este trabajo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la información bibliográfica puede plantearse que la pérdida de CO_2 implica la transferencia del metilo del éster (esquema 26), aunque no puede fehacientemente determinarse la estructura del ión fragmento producido.



Esquema 26. Pérdida de CO_2 propuesta directamente a partir de un éster.

La pérdida posterior de $CH_3^{\cdot}$ (figuras 112 y 113) permitiría plantear un esquema de fragmentación como se muestra en el esquema 27, similar al caso de los haloacetatos de metilo.

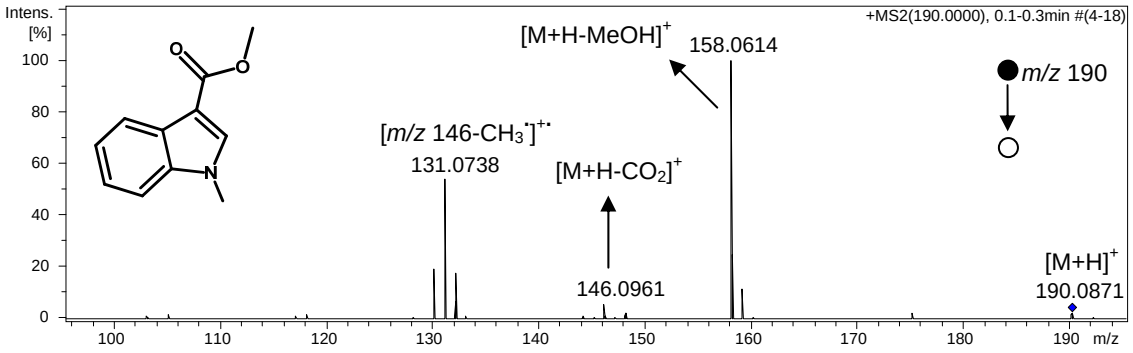


Figura 112. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ correspondiente al compuesto **30**.

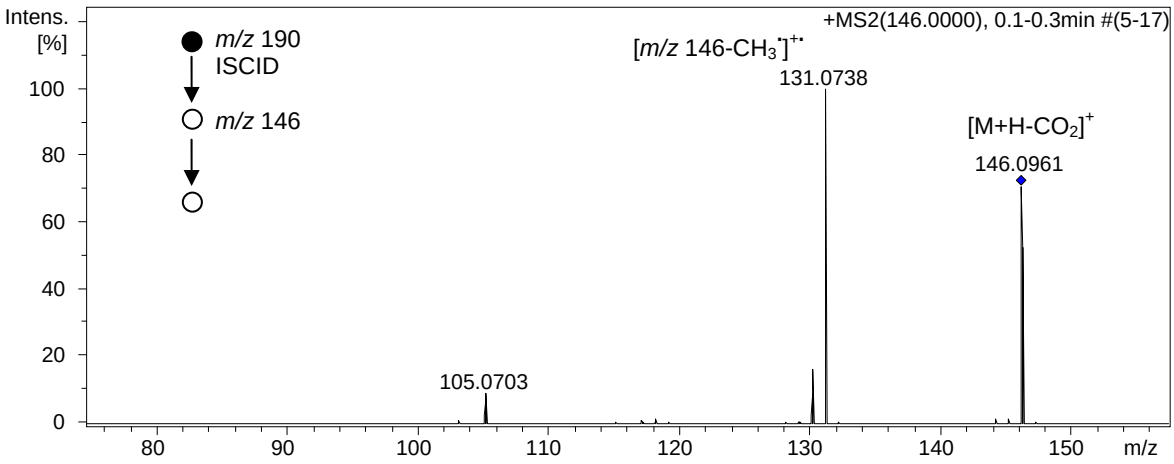
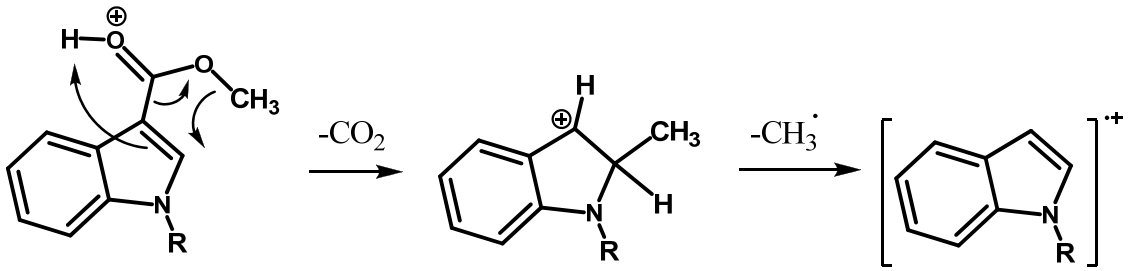


Figura 113. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión de *m/z* 146 obtenido por ISCID a partir del $[M+H]^+$ del compuesto **30**.



Esquema 27. Pérdida de CO_2 y fragmentación posterior propuesta directamente a partir del éster.

Otros iones que compiten con la pérdida de CO_2 y están relacionados con ella, observados en los espectros de EM/EM de los compuestos halogenados **31**, **32**, **37** y **38** y con sustituyente -CH_3 (**30**) o H (**40**), fueron los correspondientes a la pérdida de 59 u ($^{\cdot}CO_2CH_3$), iones *m/z* 237.0159, 251.0307, 207.0812, 299.0152, 131.0738 y 117.0579 respectivamente. Estos iones de naturaleza radicalaria, en el caso de los compuestos halogenados, se fragmentan posteriormente eliminando el radical $X^{\cdot}$ originando los iones de masa nominal *m/z* 158 (**31**) y 172 (**32**, **37** y **38**). La genética iónica fue determinada por experimentos ISCID-EM/EM al igual que en casos anteriores.

Iones de m/z 188 y 174

Los iones de *m/z* 174 y 188 se observaron únicamente en los experimentos ESI-EM/EM realizados sobre los compuestos cuyas cadenas *N*-alquílicas poseen al menos un átomo de oxígeno en 3´o 4´ (tabla 23).

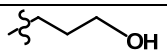
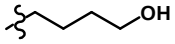
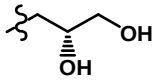
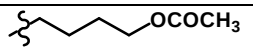
	R	$[M+H]^+$ (AR)	Ion de *m/z* 188 $C_{11}H_{10}NO_2$ (AR)	Ion de *m/z* 174 $C_{10}H_8NO_2$ (AR)
18		234.1130 (0.3)	188.0703 (42.0)	174.0559 (100)
20		248.1287 (0.1)	188.0717 (34.3)	174.0551 (20.0)
24		250.1065 (0.1)	188.0708 (100)	174.0553 (83.9)
26		290.1381 (0.1)	188.0715 (2.5)	-

Tabla 23. Iones de *m/z* 188 y 174 observados en algunos de los experimentos ESI-EM/EM realizados con los compuestos.

De la tabla se desprende que los iones de *m/z* 174 y 188 son muy abundantes en los espectros EM/EM de los compuestos **18** y **24** que tienen tres átomos de carbono y un O en posición 3´ en la cadena. Las composiciones de ambas especies coincidieron en todos los casos siendo $C_{10}H_8NO_2$ para *m/z* 174 y $C_{11}H_{10}NO_2$ para *m/z* 188.

En la tabla 23 se observa que el ión de *m/z* 174 resultó ser el pico base en el espectro EM/EM del compuesto **18** (figura 114), tener gran abundancia (84%) en el espectro EM/EM del compuesto **24** (figura 115) y 20% de AR en el caso del compuesto **20** (figura 116).

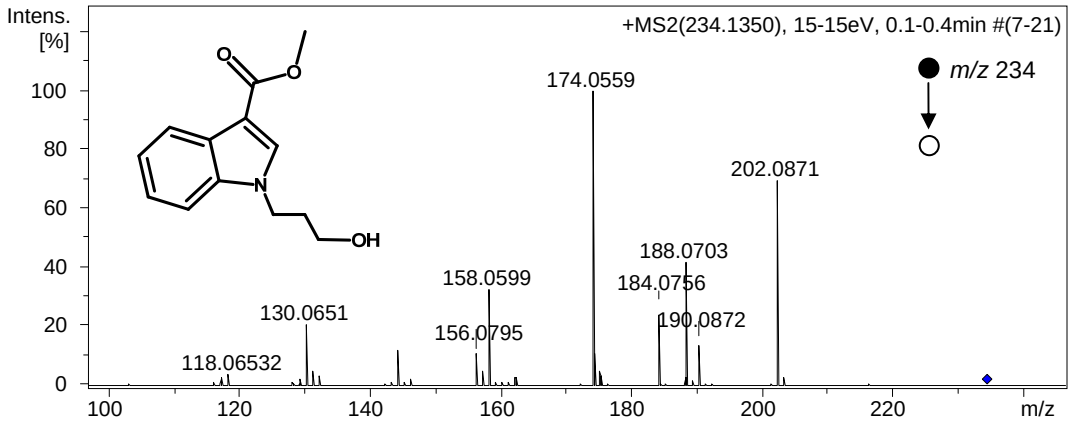


Figura 114. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ correspondiente al compuesto **18**.

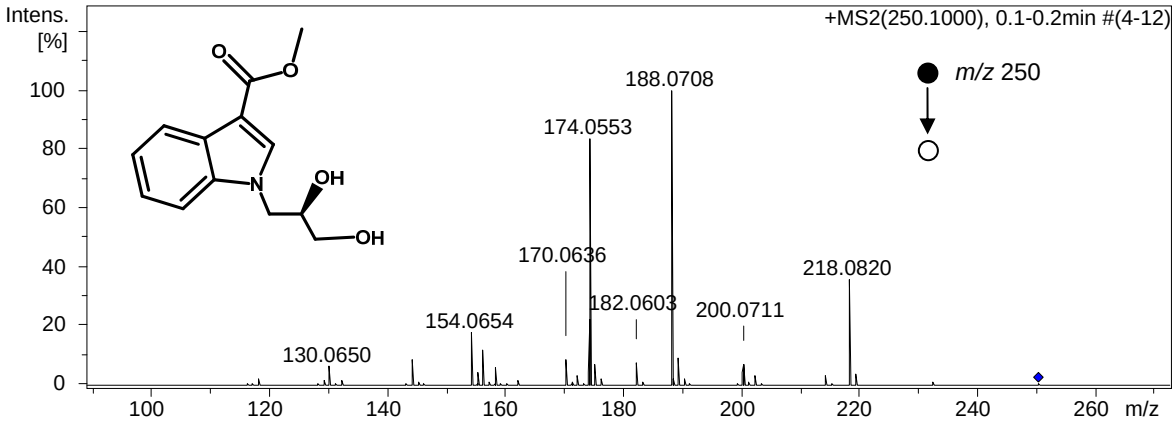


Figura 115. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ correspondiente al compuesto **24**.

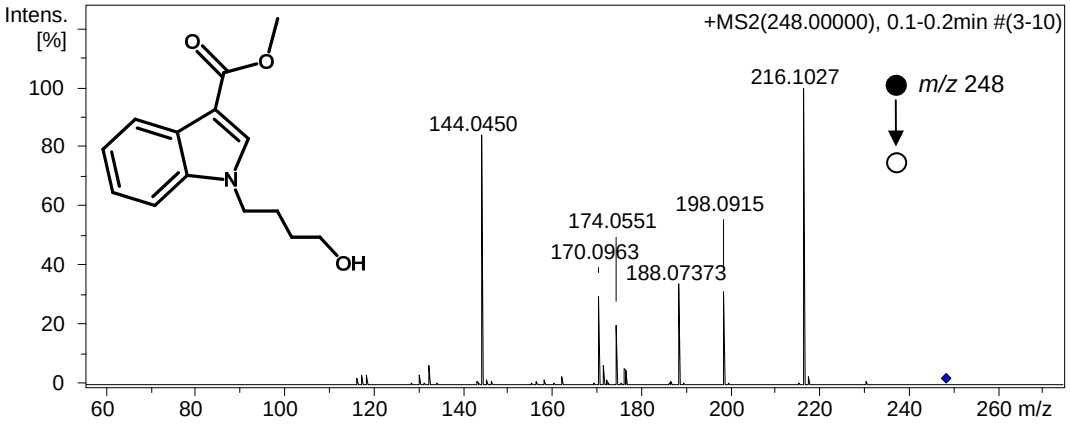


Figura 116. Espectro ESI-EM/EM a 15 eV del ión $[M+H]^+$ correspondiente al compuesto **20**.

Debido a su composición ($C_{10}H_8NO_2$) se pensó inicialmente que podía provenir de una fragmentación α al N, tal como ha sido informada anteriormente en experimentos EI-EM y se han confirmado las estructuras resultantes (figura 117) por cálculos teóricos[14].

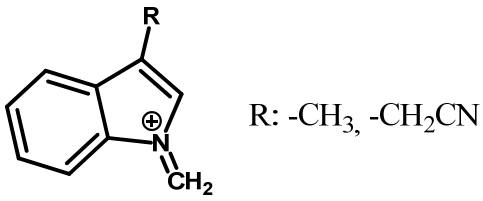
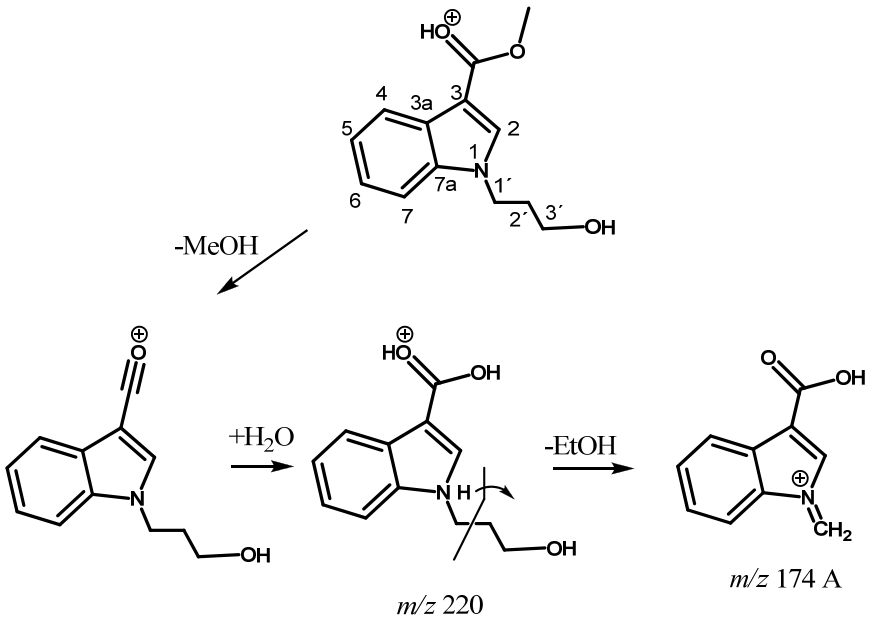


Figura 117. Estructuras por fragmentación α al N del indol confirmadas en trabajos previos con otros indoles[14].

Sin embargo para plantear esta fragmentación se hacía necesario proponer que debía haber una pérdida de MeOH y posterior adición de agua tal como se explicó precedentemente para los compuestos **35** y **36** (esquema 28). Pero la especie *m/z* 220 no había sido observada en el espectro EM/EM del compuesto **18**.



Esquema 28. Camino de fragmentación planteado para la formación del ión de *m/z* 174.

Por lo tanto para estudiar la identidad del ión *m/z* 174 se hicieron experimentos ISCID (50 eV) seleccionando el ión $[M+H-MeOH]^+$ que se propone como precursor en los compuestos **18**, **20** y **24**. El espectro EM/EM del ión de *m/z* 218 ($[M+H-MeOH]^+$)

que se seleccionó a partir del compuesto **24**, mostró el ión de *m/z* 174 con abundancia relativa 98% (figura 118).

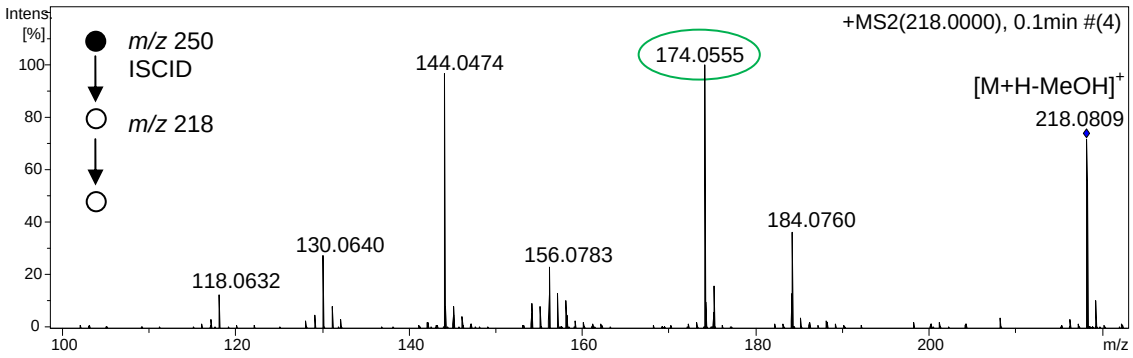


Figura 118. Espectro ESI-EM/EM del ión de *m/z* 218 ($[M+H-MeOH]^+$) obtenido por ISCID a 50 eV a partir del compuesto **24**.

También a partir de los compuestos **18** y **20** se aisló el ión $[M+H-MeOH]^+$ (*m/z* 202 y 216 respectivamente) obtenido por ISCID, y en ambos espectros EM/EM se observó el ión de *m/z* 174 (figuras 119 y 120).

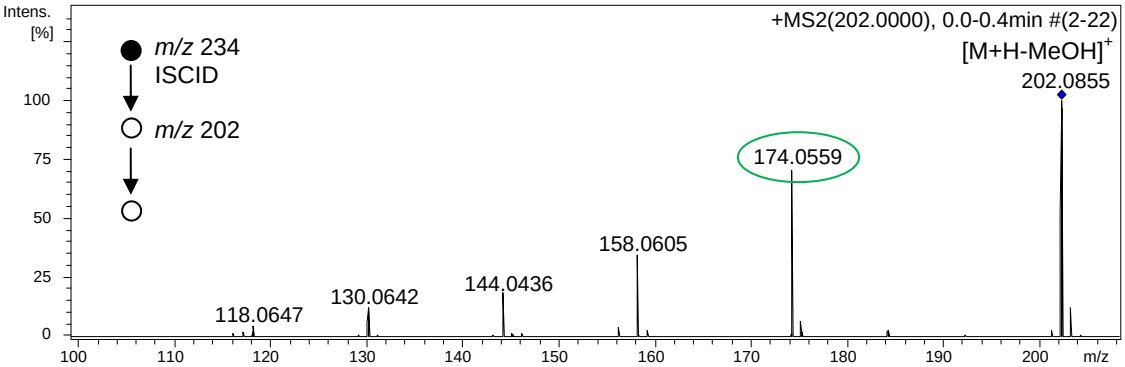


Figura 119. Espectro ESI-EM/EM del ión de *m/z* 202 obtenido por ISCID a 50 eV a partir del compuesto **18**.

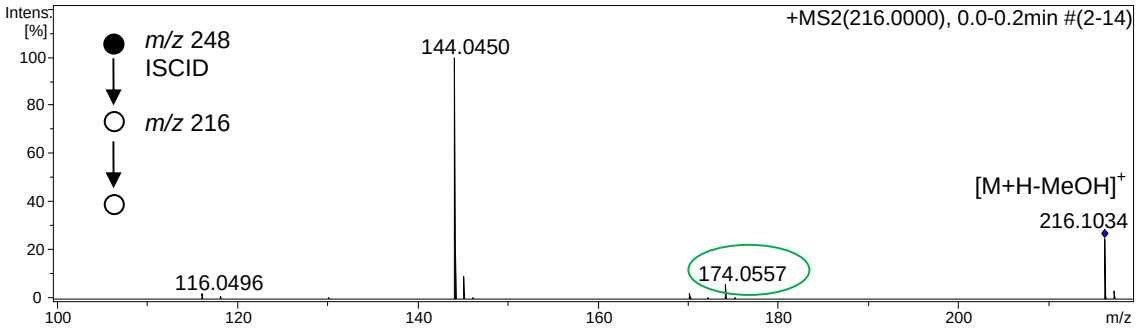


Figura 120. Espectro ESI-EM/EM del ión de *m/z* 216 obtenido por ISCID a 50 eV a partir del compuesto **20**.

Estos experimentos indican que efectivamente el ión de masa nominal *m/z* 174 proviene de una fragmentación a partir de $[M+H-MeOH]^+$.

Cuando se realizaron los experimentos de EM/EM del ión m/z 174 obtenido por ISCID a partir de los compuestos **18**, **20** y **24** se observó en primer término que los tres espectros eran idénticos y por lo tanto tenían la misma estructura.

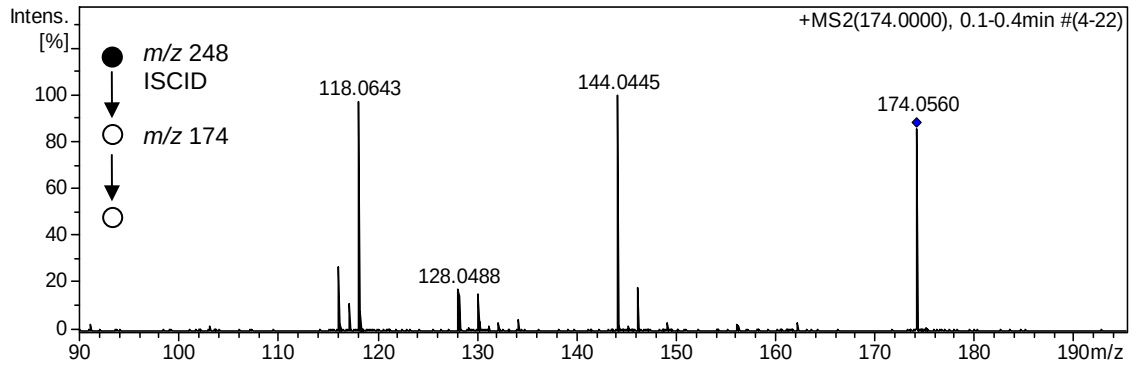


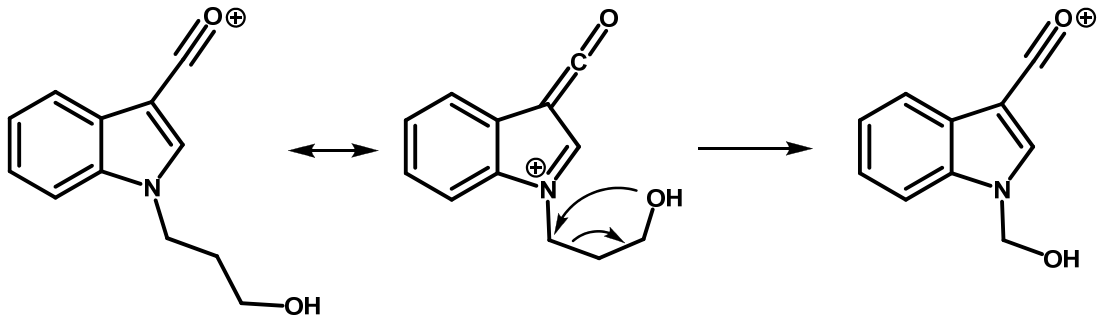
Figura 121. Espectro ESI-EM/EM del ión de *m/z* 174 obtenido por ISCID a 50 eV a partir del $[M+H]^+$ compuesto **20**.

Los iones más importantes observados en dichos espectros se muestran en la tabla 24 y figura 121 (ejemplificada para los resultados con el compuesto **20**).

m/z	FM	*m/z* teórico	error (ppm)	AR	asignación
118.0643	C_8H_8N	118.0651	7.2	97.0	$[indol + H]^+$
128.0488	C_9H_6N	128.0495	5.4	17.4	$[m/z\ 174\text{-}CO\text{-}H_2CO]^+$
130.0644	C_9H_8N	130.0651	5.5	15.3	$[m/z\ 174\text{-}CO_2]^+$
144.0445	C_9H_6NO	144.0444	-0.5	100	$[m/z\ 174\text{-}H_2CO]^+$
174.0560	$C_{10}H_8NO_2$	174.0550	-5.9	86.0	

Tabla 24. Iones observados en el espectro EM/EM del ión m/z 174.

Como puede observarse en la tabla, salvo el ión de m/z 130.0644 que provendría de una pérdida de CO_2 y que justificaría la estructura planteada 174A, los iones más importantes no la avalarían ya que indicarían la presencia de un alcohol primario. Por lo tanto se propuso otra estructura alternativa 174B que se presenta en el esquema 29. Para esta estructura resultaría evidente la pérdida de H_2CO y H_2CO + CO.



Estructura 174B

Esquema 29. Estructura alternativa propuesta para el ión *m/z* 174.

Otros datos que reforzarían esta estructura son las abundancias relativas observadas para los distintos compuestos, muy elevada o PB para compuestos con O en C-3´ y menor para **20** con un O en C-4´, y el hecho de que este ión *m/z* 174 a pesar de ser muy abundante en los espectros EM/EM resulta muy poco abundante por ISCID. Esto podría deberse a la inestabilidad del ión en condiciones de presión atmosférica.

Para corroborar estos resultados el compuesto **18** se trató con D_2O para intercambiar H por D (compuesto **45**) y se realizaron los espectros de EM/EM en MeOD/$AcOND_4$. Se observaron en los espectros los iones *m/z* 176 y 175 consistentes

con la retención de 1 o 2 D (uno del OD y otro del $[M+D]^+$) avalando la estructura 174B (figura 122). La presencia del ión *m/z* 130.0644 (figura 121, tabla 24) podría indicar que existe una pequeña porción de iones *m/z* 174 con estructura 174A o que puede haber un reordenamiento de 174B para perder CO_2.

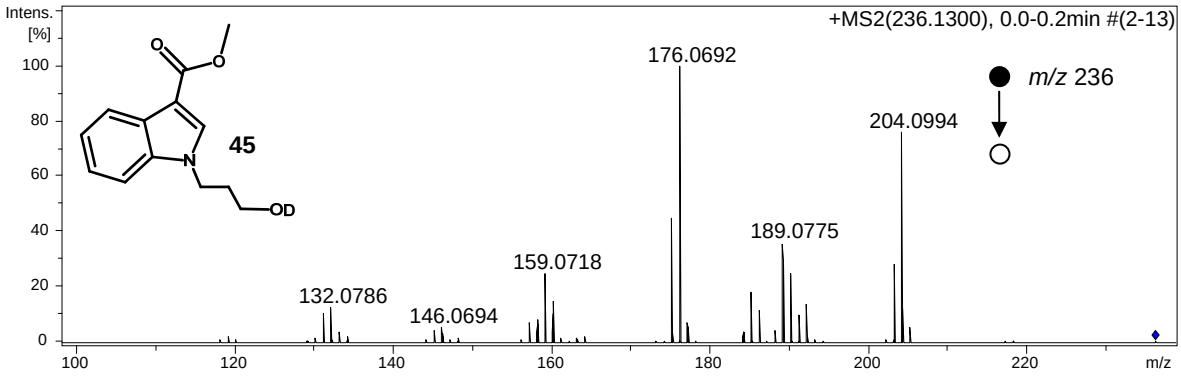
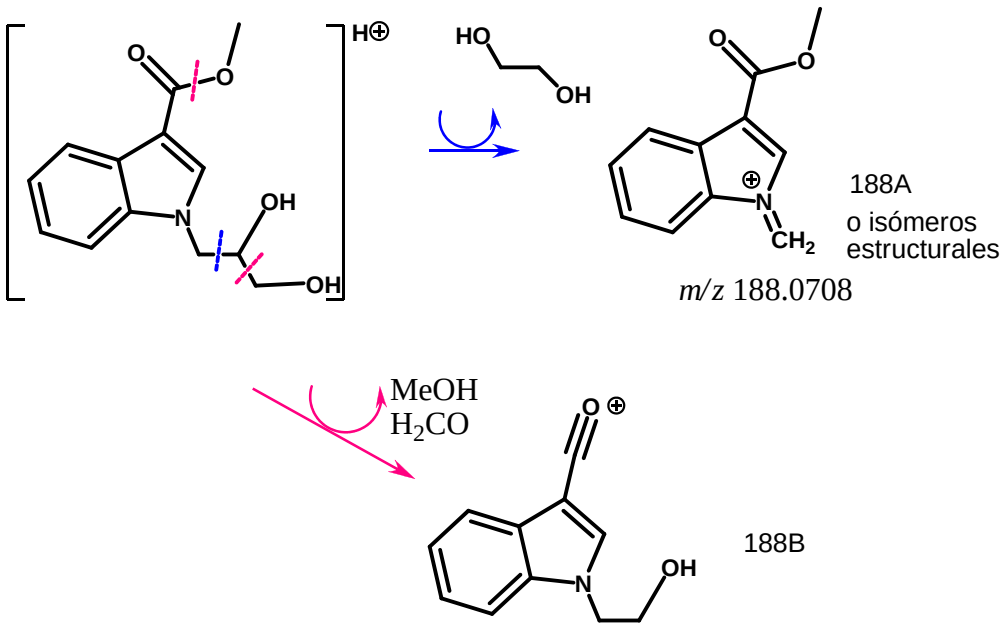


Figura 122. Espectro ESI-EM/EM del ión $[M+D]^+$ del compuesto **45**.

Para el ión *m/z* 188 también es posible plantear distintas estructuras teniendo en cuenta su composición $C_{11}H_{10}NO_2$. En el caso del compuesto **24** los caminos de fragmentación propuestos se muestran en el esquema 30.



Esquema 30. Caminos de fragmentación propuestos para la formación del ión de *m/z* 188 a partir del compuesto **24**.

Para identificarlo se obtuvo este ión por ISCID (50 eV) a partir del $[M+H]^+$ del compuesto **24**. En su espectro EM/EM (figura 123) se observaron los iones de *m/z* 160.0749 ($C_{10}H_{10}NO$, AR 28), 158.0592 ($C_{10}H_8NO$, AR 60), 145.0514 (C_9H_7NO, AR 57) y 128.0489 (C_9H_6N, AR 39) que implicarían fragmentaciones con pérdidas de CO, CH_2O, $C_2H_3O^{\cdot}$ y CH_3OH + CO respectivamente (esquema 31). Los iones fragmento de masa nominal *m/z* 160 y 158 avalarían la estructura 188B mientras que el ión de *m/z* 128 sería más coherente para la estructura 188A, por lo que ambas podrían coexistir.

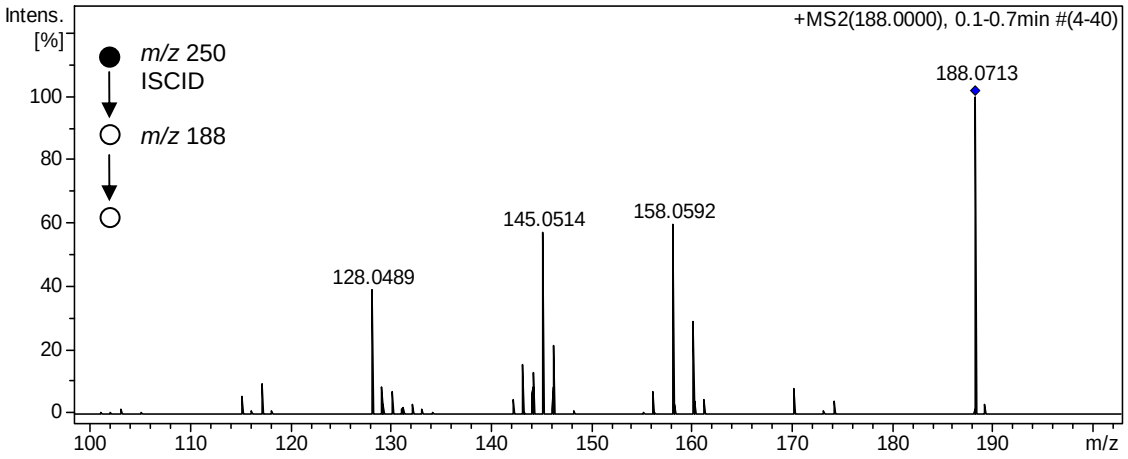
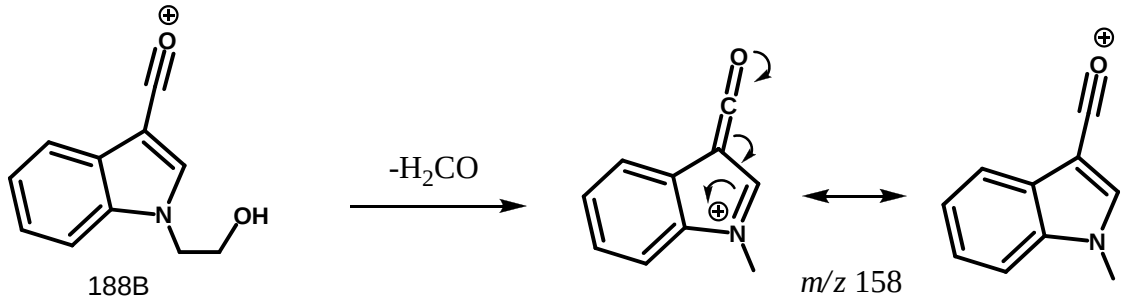


Figura 123. Espectro ESI-EM/EM (15 eV) del ión de *m/z* 188 obtenido por ISCID a 50 eV a partir del $[M+H]^+$ del compuesto **24**.



Esquema 31. Fragmentaciones propuestas a partir del ión de *m/z* 188B.

Se preparó el análogo dideuterado **46** (figura 124) a partir del compuesto **24** realizando el intercambio de los H de los dos grupos OH con MeOD, en busca de evidencias sobre la identidad del ión de *m/z* 188.

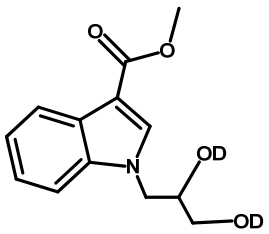


Figura 124. Análogo **46** obtenido a partir del compuesto **24**.

En el espectro ESI-EM/EM del ión $[M+D]^+$ del compuesto **46** se observaron los iones de *m/z* 221.1013 ($C_{12}H_9D_3NO_3$) y 220.0941 ($C_{12}H_{10}D_2NO_3$) generados por pérdida de MeOH y MeOD respectivamente (figura 125), lo que indicaría que hay intercambio intramolecular de H/D como ya se explicó en casos anteriores. Además se observaron los iones de *m/z* 190.0828 ($C_{11}H_8D_2NO_2$) y 189.0780 ($C_{11}H_9DNO_2$) que son los mono y dideuterados correspondientes al ión m/z 188.

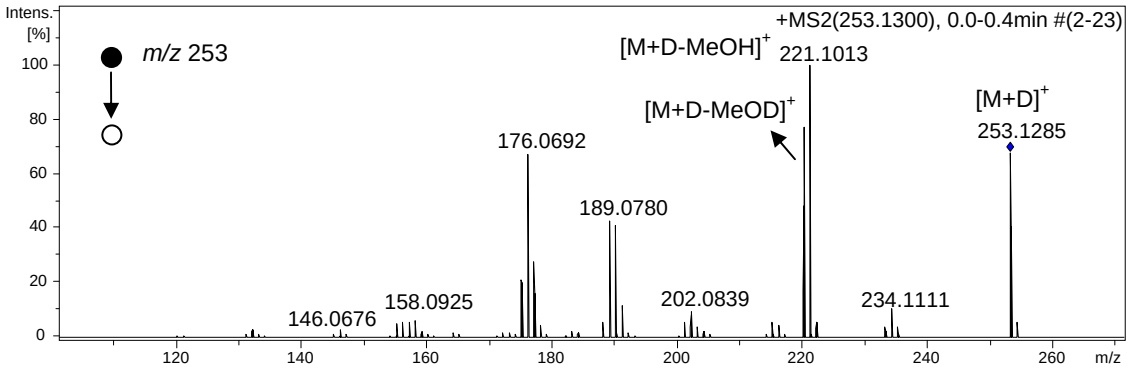


Figura 125. Espectro ESI-EM/EM del ión $[M+D]^+$ correspondiente al compuesto **46**.

Se realizaron los espectros EM/EM de los iones *m/z* 189 y 190 obtenidos por ISCID a partir del $[M+H]^+$ del compuesto **46** y se observaron los mismos iones que para *m/z* 188 desplazados 1 u o 2 u respectivamente por lo cual no agregaron mayor información sobre la estructura de *m/z* 188.

Cabe mencionar que en la ampliación del espectro ESI-EM/EM del ión $[M+H]^+$ de **20** se observaron dos iones de *m/z* 188 (figura 126).

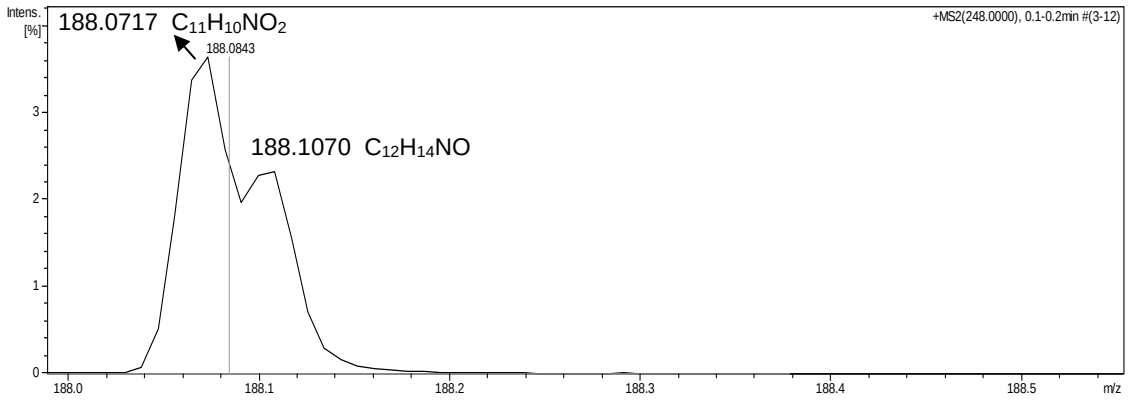
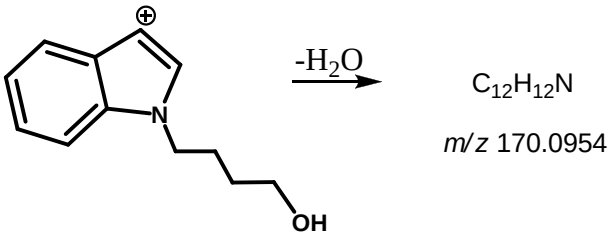


Figura 126. Ampliación del espectro ESI-EM/EM del ión $[M+H]^+$ del compuesto **20**.

En el espectro de EM/EM del ión *m/z* 188 obtenido por ISCID a partir del $[M+H]^+$ del compuesto **20** se observaron además de los iones mencionados para el compuesto **24**, el ión *m/z* 170.0954. Dado que la selección de un ión para realizar un experimento CID se realiza con una ventana de 1 u, es lógico que no puedan seleccionarse los dos iones distintos de masa nominal *m/z* 188 y que en el espectro resultante se ven fragmentos de ambos (esquema 32).



Esquema 32. Estructura propuesta para el ión *m/z* 188.1070 originado por CID a partir del $[M+H]^+$ del compuesto **20**.

No resultó evidente un camino de fragmentación único para obtener el ión *m/z* 188 a partir del compuesto **18**. Probablemente también en este caso contribuyan al ión *m/z* 188 más de una estructura. Debido a la complejidad en la asignación estructural de los iones *m/*z 174 y 188 se realizarán otros estudios con otros análogos y estudios teóricos para tratar de determinar y confirmar sus estructuras.

El hecho de que el ión de *m/z* 174 se observara principalmente en los espectros de los compuestos **18** y **24** es razonable teniendo en cuenta que en los compuestos con

otras cadenas hay otras fragmentaciones competitivamente más probables como las que involucran que la carga quede en los fragmentos de la cadena alquílica después de la fragmentación. De hecho se observó el ión de *m/z* 100.1125 ($C_6H_{14}N^+$) en el espectro ESI-EM/EM de **35**, *m/z* 134.9800 ($C_4H_8Br^+$) en el de **32** y *m/z* 182.9663 ($C_4H_8I^+$) en el de **38**. Cuando se repitieron todos los espectros de EM/EM a distintas energías de colisión, el ión de *m/z* 100.1125 se observó con una intensidad alta aproximadamente en todo el rango de energías de colisión, en cambio en los otros dos casos, esos iones cobraron importancia a energías más altas (de entre 15 y 25 eV) (figuras 127 a 129).

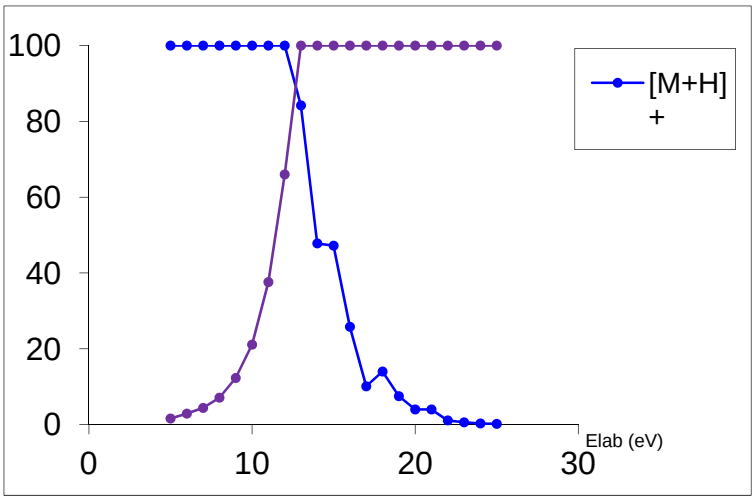


Figura 127. Abundancia relativa de los iones $[M+H]^+$ y $C_6H_{14}N^+$ del compuesto **35**.

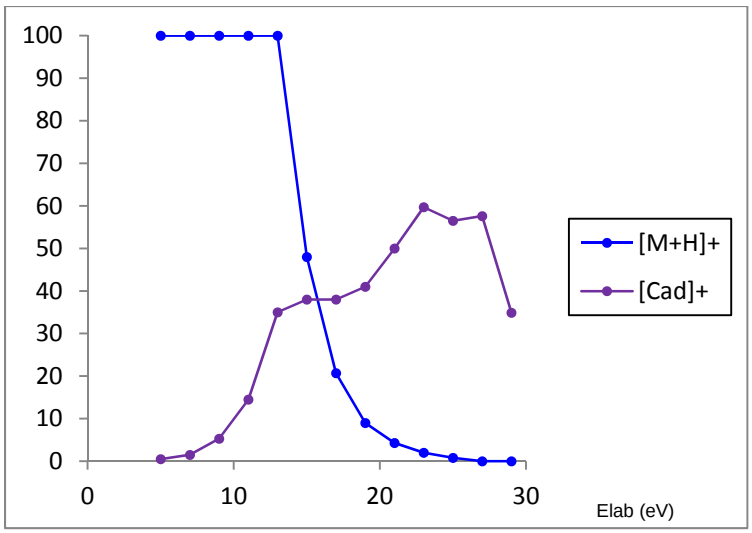


Figura 128. Abundancia relativa de los iones $[M+H]^+$ y 134.9800 del compuesto **32**.

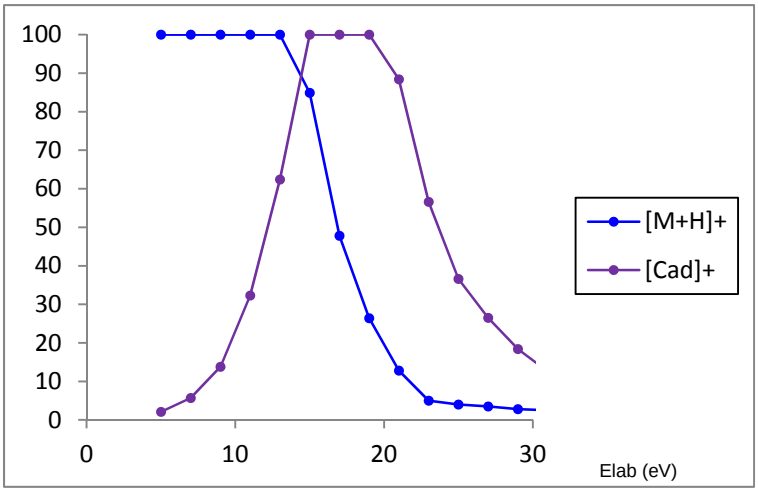


Figura 129. Abundancia relativa de los iones $[M+H]^+$ y $C_4H_8I^+$ del compuesto **38**.

<u>CE_{50}: efecto del heteroátomo de la cadena *N*-alquílica</u>

Por último, aprovechando que se habían realizado con los compuestos experimentos a distintas energías de colisión para ver la relación entre los diferentes fragmentos, se midieron los CE_{50}, que es una medida del decaimiento de la supervivencia del ión precursor y por lo tanto de su estabilidad[11]. En el caso de los compuestos con cadenas de 4 C podía resultar un parámetro útil para comparar el efecto del heteroátomo de la cadena. Se analizaron entonces los espectros ESI-EM/EM de los iones moleculares protonados correspondientes a los compuestos **20**, **26**, **32**, **34**, **35**, **37** y **38** variando la energía de colisión entre 5 y 30 eV aproximadamente, hasta el completo decaimiento del precursor.

Para calcular el CE_{50} fue necesario calcular en primera instancia el rendimiento de supervivencia del ión precursor en cada caso como se muestra en la ecuación 1.

$$SY_{experimental} = \text{Intensidad P}/(\text{Intensidad P} + \sum(\text{intensidad F})) \qquad (1)$$

Dónde SY es el rendimiento de supervivencia (survival yield), P es el ión precursor y F son todos los fragmentos presentes en el espectro EM/EM de P a una energía de colisión dada.

Dado que el decaimiento de SY con la energía de colisión se ajusta a curvas sigmoideas (ecuación 2), se aplica a SY una función logarítmica en base natural y entonces resulta una recta en función de la energía de colisión (ecuación 3). El CE_{50} se define como la energía tal que el rendimiento de supervivencia cae a la mitad (SY = 0.5).

$$SY = 1/(1+c.e^{-b.CE}) \qquad (2)$$

Dónde b y c son parámetros de la curva.

$$\ln[(1-SY)/SY] = \ln(c) - b.(CE) \qquad (3)$$

$$CE_{50} = \ln(c)/b \qquad (4)$$

Los compuestos **20**, **26** y **34** arrojaron valores de CE_{50} comparables entre sí, menores a 3 eV, siendo estos los menores del conjunto estudiado, lo que indicó un decaimiento rápido. En cambio las CE_{50} calculadas para los compuestos **32**, **35**, **37** y **38** resultaron más grandes, con valores entre 10 y 15 eV, es decir que se necesita una energía mayor para fragmentar en la misma medida a los iones $[M+H]^+$ correspondientes (tabla 25).

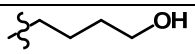
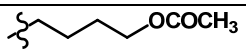
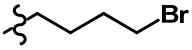
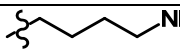
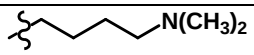
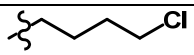
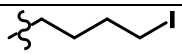
Compuesto	Cadena *N*-alquílica	CE_{50} (eV)	Pico base (rango de E en eV)
20		≤ 3.0	$[M+H-MeOH]^+$ (5-15)/ $[M+H-MeOH-Cad]^+$ (17-21)
26		≤ 2.0	$[M+H-MeOH]^+$ (5-15)
32		13.1	$[M+H]^+$ (5-13)/ $[M+H-MeOH]^+$ (15-23)/ *m/z* 130 (25-29)
34		≤ 3.0	$[M+H-MeOH]^+$ (5-13)/$[M+H-MeOH-Cad]^+$ (14-20)
35		10.8	$[M+H]^+$ (5-12)/$C_6H_{14}N^+$ (13-25)
37		14.6	$[M+H]^+$ (5-15)/ $[M+H-MeOH]^+$ (17-21)
38		12.7	$[M+H]^+$ (6-14)/ $[M+H-MeOH]^+$ (16-24)

Tabla 25. Valores de CE_{50} para los iones moleculares protonados de algunos análogos sintéticos.

De acuerdo con los valores de CE_{50} expuestos en la tabla los derivados halogenados **32**, **37** y **38** y el análogo **35** requieren mayor energía de colisión que el resto de los compuestos para obtener un rendimiento de supervivencia de 50%. La tendencia en orden decreciente de energía entre estos compuestos es **37** > **32** > **38** > **35** y, exceptuando **35**, para todos el ión mayoritario es $[M+H - MeOH]^+$ a rangos aproximados de 15 a 20 eV. Para **35** y **38** los fragmentos originados por las cadenas laterales resultaron ser más abundantes a energías mayores. En esos dos casos la comparación con el resto de los compuestos es más compleja porque no predomina la pérdida de MeOH en todo el rango de energías medido como ocurre con los demás compuestos. Podría concluirse que hay un efecto de debilitamiento del enlace simple C-O del éster metílico en posición 3, que es más pronunciado en presencia de los grupos -OH, $-OC(O)CH_3$ y $-NH_2$ frente a halógenos y amina terciaria en la cadena *N*-alquílica. Aunque no se puede asegurar que tales grupos asistan a la fragmentación o la diferencia se deba simplemente a la menor probabilidad de otras fragmentaciones competitivas, se observó que tienen un efecto marcado. Entre los compuestos halogenados CE_{50} decrece

de cloro a yodo lo cual es lógico teniendo en cuenta su electronegatividad y polarizabilidad, aunque las diferencias son pequeñas. Por otra parte los grupos I y $N(CH_3)_2$ favorecen la ruptura 1-1´ (N-C) dada su capacidad para soportar la carga positiva en el fragmento escindido.

Conclusiones

Fue posible describir detalladamente el comportamiento por espectrometría de masa de una familia de análogos *N*-alquilindólicos. Cabe mencionar que no se encuentran en bibliografía hasta el momento trabajos sobre estudios de espectrometría de masa de ésteres del ácido 3-indolcarboxílico utilizando fuentes ESI, APCI y equipos QTOF.

Además de los resultados predecibles por la presencia del éster como las pérdidas del alcohol correspondiente en cada caso, y la presencia de los iones de menores pesos moleculares típicos de compuestos indólicos, se encontraron especies cuya formación no era predecible como los iones producto con la cadena alquílica probablemente ciclada, que presentaron en sus espectros de masa tándem los compuestos **20**, **26**, **31**, **32**, **34**, **35** y **38**. Se concluyó que su formación se favorece cuanto mayor es la basicidad (en fase gaseosa) del heteroátomo en la cadena alquílica o mejor es el grupo saliente.

También se observó la formación de especies que implicaban la incorporación de agua por parte de los iones acilio, lo cual tampoco era predecible.

La pérdida de dióxido de carbono a partir de ésteres metílicos fue otro hallazgo interesante, dado que se encontraron pocos reportes sobre el tema en bibliografía.

En la tabla 26 se listan asignados los iones producto observados en los experimentos ESI-EM de los compuestos.

Compuesto **18**				
Iones producto observados en los espectros EM/EM	*m/z*	Teórico	Error (ppm)	Asignación
f1	216.1018 (0.8)	216.1019	0.3	$[M+H-H_2O]^+$
f2	202.0871 (69.4)	202.0863	-4.2	$[M+H-MeOH]^+$
f3	190.0872 (17.3)	190.0863	-4.7	$[M+H-CO_2]^+$
f4	188.0703 (42.0)	188.0706	1.9	*
f5	184.0756 (23.8)	184.0757	0.5	$[M+H-MeOH-H_2O]^+$
f6	174.0559 (100)	174.0550	5.6	$[M+H-MeOH-CH_2=CH_2]^+$/ $[M+H-MeOH+H_2O-EtOH]^+$
f7	158.0599 (32.6)	158.0600	0.9	$[M+H-MeOH-CH_3CHO]^+$
f8	156.0795 (10.8)	156.0808	8.0	$[M+H-MeOH-CO-H_2O]^+$
f9	144.0437 (10.1)	144.0444	4.9	$[M+H-MeOH-Cad]^+$
f10	130.0651 (0.8)	130.0651	0.1	$[M+H-MeOH-CO-CH_3CHO]^+$
Compuesto **19**				
f1	216.1033 (20.1)	216.1019	-6.4	$[M+H-H_2O]^+$
f2	202.0872 (21.6)	202.0863	-4.9	$[M+H-MeOH]^+$
f3	184.07671 (100)	184.0757	-7.5	$[M+H-MeOH-H_2O]^+$
f4	158.0955 (8.5)	158.0964	5.8	*
f5	156.0811 (24.1)	156.0808	-2.1	$[M+H-MeOH-CO-H_2O]^+$
f6	131.0734 (8.1)	131.0730	-3.3	$[M+H-CH_3OCO^{\cdot}-CH_3CHO]^{+\cdot}$
Compuesto **20**				
f1	230.1166 (1.1)	230.1176	4.1	$[M+H-H_2O]^+$
f2	216.1027 (100)	216.1019	-3.6	$[M+H-MeOH]^+$
f3	198.0915 (31.2)	198.0913	-0.9	$[M+H-MeOH-H_2O]^+$
f4	188.1070 + 188.0717 (34.3)	188.0706	-5.8	$[M+H-MeOH-CO]^+$ + $[M+H-nPrOH]^+$
f5	174.0551 (20.0)	174.0550	-0.6	$[M+H-MeOH-CH_2=CH_2CH_3]^+$/

				$[M+H-MeOH+H_2O-nPrOH]^+$
f6	170.0963 (29.6)	170.0964	1.0	$[M+H-MeOH-CO-H_2O]^+$
f7	144.0450 (84)	144.0444	-4.2	$[M+H-MeOH-Cad]^+$
f8	132.0803 (6.7)	132.0808	3.7	$[m/z\ 170-C_2H_4]^+$
f9	117.0577 (3.4)	117.0573	-3.4	$[M+H-Cad-\ CH_3OCO^{\cdot}]^{+\cdot}$
Compuesto **24**				
f1	232.0975 (1.2)	232.0968	-3.1	$[M+H-H_2O]^+$
f2	218.0820 (36.1)	218.0812	-3.6	$[M+H-MeOH]^+$
f3	214.0872 (3.2)	214.0863	-4.5	$[M+H-2H_2O]^+$
f4	200.0711 (7.1)	200.0706	-2.7	$[M+H-MeOH-H_2O]^+$
f5	188.0708 (100)	188.0706	-1.2	$[M+H-MeOH-H_2CO]^+$/ $[M+H-CH_2OHCH_2OH]^+$
f6	182.0603 (7.7)	182.0600	-1.6	$[M+H-MeOH-2H_2O]^+$
f7	174.0553 (83.9)	174.0550	-2.0	$[M+H-MeOH-CH(OH)=CH_2]^+$/$[M+H-MeOH+H_2O-CH_2OHCH_2OH]^+$
f8	172.0753 (3.1)	172.0757	2.4	$[M+H-MeOH-CO-H_2O]^+$
f9	154.0654 (17.9)	154.0651	-1.8	$[M+H-MeOH-CO-2H_2O]^+$
f10	144.0453 (8.9)	144.0444	-6.3	$[M+H-MeOH-Cad]^+$
f11	130.0650 (6.4)	130.0651	0.8	$[M+H-MeOH-CO-C_2H_4O_2]^+$
f12	118.0655 (2.5)	118.0651	-2.8	$[indol+H]^+$
Compuesto **25**				
f1	284.2015 (88.7)	284.2009	-2.1	$[M+H-MeOH]^+$
f2	272.2369 (3.9)	272.2373	1.4	$[M+H-CO_2]^+$
f3	190.0861 (30.1)	190.0863	1.0	$[M+H-C_9H_{18}]^+$
f4	176.0702 (11.5)	176.0706	2.5	$[M+H-Cad]^+$
f5	146.0957 (8.4)	146.0964	5.1	$[M+H-C_9H_{18}-CO_2]^+$
f6	144.0445 (13.6)	144.0444	-0.7	$[M+H-MeOH-Cad]^+$
f7	132.0801 (9.1)	132.0808	5.0	$[M+H-Cad-CO_2]^+$
f8	130.0646 (2.7)	130.0651	4.2	$[M+H-MeOH-CO-C_9H_{18}]^+$
f9	117.0568 (1.2)	117.0573	4.4	$[M+H-Cad-\ CH_3OCO^{\cdot}]^{+\cdot}$

Compuesto **26**				
f1	276.1242 (2.3)	276.1230	-4.2	$[M+H-MeOH+H_2O]^+$
f2	258.1137 (100)	258.1125	-4.8	$[M+H-MeOH]^+$
f3	216.1028 (1.1)	216.1019	-4.2	$[M+H-MeOH-H_2C=C=O]^+$
f4	198.0925 (4.8)	198.0913	-5.8	$[M+H-MeOH-AcOH]^+$
f5	188.0715 (2.5)	188.0706	-4.8	$[M+H-AcOPr]^+$
f6	144.0446 (2.8)	144.0444	-1.5	$[M+H-MeOH-Cad]^+$
Compuesto **30**				
f1	158.0614 (100)	158.0600	-6.7	$[M+H-MeOH]^+$
f2	146.0961 (6.5)	146.0964	2.6	$[M+H-CO_2]^+$
f3	175.0635 (1.6)	175.0628	-4.2	$[M+H-CH_3^{\cdot}]^{+\cdot}$
f4	131.0738 (48.7)	131.0730	-6.5	$[M+H-CH_3OCO^{\cdot}]^{+\cdot}$
f5	130.0652 (9.4)	130.0651	-0.8	$[M+H-MeOH-CO]^+$
Compuesto **31**				
f1	264.0009 (100)	264.0029	3.5	$[M+H-MeOH]^+$
f2	265.9986 (85.4)	265.9999	4.9	$[M+2+H-MeOH]^+$
f3	252.0389 (3.8)	252.0382	-3.6	$[M+H-CO_2]^+$
f5	237.0159 (4.4)	237.0148	-4.8	$[M+H-CH_3OCO^{\cdot}]^{+\cdot}$
f6	239.0137 (3.9)	239.0128	-4.2	$[M+2+H-CH_3OCO^{\cdot}]^{+\cdot}$
f7	156.0803 (2.0)	156.0808	3.0	$[M+H-MeOH-CO-HBr]^+$
f8	131.0732 (18.8)	131.0730	-1.5	$[M+H-CH_3OCO^{\cdot}-C_2H_3Br]^{+\cdot}$
Compuesto **32**				
f1	278.0179 (100)	278.0175	-1.5	$[M+H-MeOH]^+$
f2	280.0163 (86.1)	280.0156	-2.5	$[M+2+H-MeOH]^+$
f3	251.0307 (4.1)	251.0304	-1.1	$[M+H-CH_3OCO^{\cdot}]^{+\cdot}$
f4	198.0910 (1.4)	198.0913	1.9	$[M+H-MeOH-HBr]^+$
f5	172.1124 (4.1)	172.1121	-1.8	$[M+H-CH_3OCO^{\cdot}-Br^{\cdot}]^+$
f6	144.0448 (4.3)	144.0444	-2.8	$[M+H-MeOH-Cad]^+$
	134.9800 (35.6)	134.9804	3.3	$[CH_2CHCH_2CH_2Br + H]^+$

Compuesto **34**				
f1	233.1295 (4.3)	233.1285	-4.6	$[M+H-MeOH+H_2O]^+$
f2	215.1188 (63)	215.1179	-4.4	$[M+H-MeOH]^+$
f3	198.0918 (4.0)	198.0913	-2.2	$[M+H-MeOH-NH_3]^+$
f4	170.0957 (2.4)	170.0964	4.4	$[M+H-MeOH-CO-NH_3]^+$
f5	144.0447 (100)	144.0444	-1.9	$[M+H-MeOH-Cad]^+$
Compuesto **35**				
f1	261.1602 (7.9)	261.1598	-1.8	$[M+H-MeOH+H_2O]^+$
f2	243.1500 (37.8)	243.1492	-3.2	$[M+H-MeOH]^+$
f3	232.1333 (17.4)	232.1332	0.2	$[M+H-N(CH_3)=CH_2]^+$
f4	230.1184 (26.3)	230.1176	-3.6	$[M+H-N(CH_3)_2]^+$
f5	198.0917 (29.2)	198.0913	-1.8	$[M+H-MeOH-N(CH_3)_2]^+$
f6	186.1281 (1.1)	186.1277	-1.9	$[M+H-N(CH_3)_2 - CO_2]^+$
f7	172.1114 (2.6)	172.1121	3.7	$[M+H-MeOH-CO-CH_2=NCH_3]^+$
f8	170.0957 (2.8)	170.0964	4.4	$[M+H-MeOH-CO-N(CH_3)_2]^+$
f9	100.1125 (100)	100.1121	-4.3	$CH_2=CH(CH_2)_2N(CH_3)_2H^+$
Compuesto **36**				
f1	377.1484 (100)	377.1500	3.0	$[M+H-MeOH+H_2O]^+$
f2	363.1335 (3.5)	363.1339	1.1	$[M+H-2MeOH+2H_2O]^+$
f3	359.1376 (10.7)	359.1390	4.0	$[M+H-MeOH]^+$
f4	347.1386 (3.2)	347.1390	1.2	*
f5	333.1568 (1.0)	333.1598	8.9	$[M+H-MeOH+H_2O-CO_2]^+$
f6	188.0703 (3.3)	188.0706	1.9	$[M+H-CH_2=CHX]^+$
f7	184.0759 (6.5)	184.0757	-1.1	$[M+H-MeOH-HX]^+$
f8	158.0605 (20.5)	158.0600	-2.8	$[M+H-MeOH-C_{12}H_{11}NO_2]^+$
f9	130.0644 (4.0)	130.0651	5.7	$[M+H-MeOH-CO-C_{12}H_{11}NO_2]^+$
Compuesto **37**				
f1	234.0676 (77.4)	234.0680	1.6	$[M+H-MeOH]^+$
f2	207.0812 (4.3)	207.0809	-3.9	$[M+H-CH_3OCO^{\cdot}]^{+\cdot}$
f3	198.0911 (1.6)	198.0913	1.2	$[M+H-MeOH-HCl]^+$

f4	144.0434 (5.2)	144.0444	6.8	$[M+H-MeOH-Cad]^+$
f5	132.0805 (11.0)	132.0808	1.7	$[M+H-Cad-CO_2]^+$
Compuesto **38**				
f1	326.0022 (89.0)	326.0036	4.4	$[M+H-MeOH]^+$
f2	299.0152 (3.1)	299.0165	4.6	$[M+H-CH_3OCO^{\cdot}]^{+\cdot}$
f3	230.1167 (7.4)	230.1176	3.9	$[M+H-HI]^+$
f4	216.1015 (13.3)	216.1019	1.7	$[M+H-CH_3I]^+$
f5	198.0911 (7.9)	198.0913	1.2	$[M+H-MeOH-HI]^+$
f6	190.0854 (7.0)	190.0863	4.5	$[M+H-C_3H_5I]^+$
f7	182.9663 (100)	182.9665	1.3	$[CH_2=CHCH_2CH_2I+H]^+$
f8	176.0700 (1.8)	176.0706	3.6	$[M+H-MeOH+H_2O$ $CH_2=CHCH_2I]^+$
f9	172.1121 (37.0)	172.1121	0	$[M+H-CH_3OCO^{\cdot}-I^{\cdot}]^+$
f10	154.9348 (1.3)	154.9352	3.0	$CH_2=CHIH^+$
f11	146.0961 (1.8)	146.0964	2.1	$[M+H-CO_2-C_3H_5I]^+$
f12	144.0439 (2.4)	144.0444	3.5	$[M+H-MeOH-Cad]^+$
f13	130.0657 (3.2)	130.0651	-4.3	$[M+H-MeOH-CO-C_3H_5I]^+$

Cad: cadena alquílica –H o +H
*: La formación de estos iones implicaría un reordenamiento que no fue verificado

Tabla 26. Iones producto observados en los espectros de masa ESI-EM/EM de los *N*-alquilindoles estudiados y asignación correspondiente.

Detalles Experimentales

Obtención y purificación de los compuestos

La preparación de los compuestos **18**-**36** se describió en el capítulo anterior.

Éster metílico del ácido 1-(4-iodobutil)-1*H*-indolmetanoico (**38**):

El compuesto **38** se preparó por sustitución bimolecular partiendo del ácido 1-(4-bromobutil)-1*H*-indolmetanoico (compuesto **32**). Se disolvieron 15 mg (0.048 mmoles)

del compuesto **32** en 0.5 ml de solución de NaI en acetona (exceso) y la mezcla se dejó agitando a t. amb. Al cabo de 30 minutos se cortó la reacción agregando $NaHSO_3$ (2 ml) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 5 ml).

Ácido 1-(4-clorobutil)-1*H*-indolmetanoico (**37**):

El compuesto **37** se obtuvo por descomposición de **38** a t. amb. en solución metanólica y presencia de NaCl. Se purificó por TLC preparativa, ciclohexano-AcOEt 9:1 (Rf: 0.68).

Éster metílico del ácido 6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-α]indol-10-carboxílico (**39**):

Para obtener el compuesto ciclado **39** se llevó a cabo una reacción radicalaria informada previamente para la preparación del mismo compuesto y relacionados[12]. Se partió de 8.5 mg del compuesto iodado **38** (0.024 mmoles) disuelto en 3 ml de clorobenceno destilado, secado con $CaCl_2$ y purgado con N_2. Debido a que **38** se descompone fácilmente fue preparado justo antes de usarlo, su formación se siguió por ESI-EM. Para la reacción radicalaria se utilizaron 12 mg de peróxido de dicumilo (DCP 0.44 mmoles) que actuó como iniciador y oxidante. La mezcla se dejó a reflujo durante 8 hr. El producto se purificó por cartucho de extracción en fase sólida de sílica (6 ml, Interchemistry), eluído con mezcla de ciclohexano-Cl_2CH_2 1:1.

Compuestos **41** a **43**:

Las transesterificaciones para obtener los compuestos **41**, **42** y **43** se llevaron a cabo partiendo de 10 mg del compuesto **35** disuelto en 0.7 ml de etanol (**41**) o 0.7 ml de CD_3OD (**42**) y a partir de 18 mg del compuesto **36** disuelto en 1.5 ml de CD_3OD (**43**). Sobre cada solución se agregó AcOEt o $AcOCD_3$, preparados previamente por una reacción a 0ºC entre 0.3 ml de cloruro de acetilo y 0.4 ml de EtOH o CD_3OD respectivamente. La mezcla de reacción se reflujó durante 1,5 hr.

Propiedades físicas de los compuestos

Los detalles de los equipos empleados se encuentran en el capítulo 7.

Los experimentos de espectrometría de masa se llevaron a cabo en un equipo QTOF Bruker, utilizando una fuente ESI con las muestras disueltas en MeOH-$AcONH_4$ 9:1. La fuente APCI se utilizó con las muestras disueltas en MeOH. El rango de energía utilizado en los experimentos CID fue de 5 a 30 eV o hasta que la abundancia de los iones fuera 5 veces superior al ruido. En los experimentos ISCID se utilizaron energías entre 50 y 100 eV. La ventana de selección del ión precursor se eligió de ancho 1 o 3 u según el experimento.

Los experimentos EM^2 y EM^3 se llevaron a cabo en un equipo Polaris Q Thermo Electron Corporation que posee un analizador de masas tipo trampa de iones. Se utilizó una fuente de Ionización Química, empleando Isobutano 5.0 para generar el gas reactivo.

*Éster metílico del ácido 1-(4-clorobutil)-1H-indolcarboxílico (**37**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2945 (CH), 1690 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.18 (m, 1H, H-4); 7.82 (s, 1H, H-2); 7.37 (m, 1H, H-7); 7.29 (m, 2H, H-5, 6); 4.20 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1'); 3.91 (s, 3H, C*H*$_3$O); 3.53 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-4'); 2.06 (m, 2H, H-2'); 1.80 (m, 2H, H-3'). **RMN- ^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.6 (C-8); 136.6 (C-7a); 134.1 (C-2); 126.9 (C-3a); 123.0, 122.1 (C-5, C-6); 122.0 (C-4); 109.9 (C-7); 107.4 (C-3); 51.2 (*C*H_3O); 46.2 (C-1'); 44.1 (C-4'); 29.9 (C-3'); 28.6 (C-2'). Espectros de masa en tabla 18.

*Éster metílico del ácido 1-(4-iodobutil)-1H-indolcarboxílico (**38**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2953 (CH), 1686 (C=O). **RMN-^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.18 (m, 1H, H-4); 7.82 (s, 1H, H-2); 7.35 (m, 1H, H-7); 7.29 (m, 2H, H-5, 6); 4.20 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H-1'); 3.91 (s, 3H, C*H*$_3$O); 3.51 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-4'); 2.06 (m, 2H, H-2'); 1.80 (m, 2H, H-3'). **RMN- ^{13}C** ($CDCl_3$): δ 165.6 (C-8); 136.6 (C-7a); 134.1 (C-2); 126.9 (C-3a); 123.0, 122.1 (C-5, C-6); 122.0 (C-4); 109.9 (C-7); 107.4 (C-3); 51.2

(*C*H_3O); 46.5 (C-1'); 30.1 (C-3'); 28.6 (C-2'); 20.1 (C-4'). Espectros de masa en tabla 18.

*Éster metílico del ácido 6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-α]indol-10-carboxílico (**39**)*

Aceite. **IR** (KBr, cm^{-1}) ν_{max}: 2950 (CH), 2878 (CH), 1687 (C=O). **RMN- ^{1}H** ($CDCl_3$): δ 8.11 (m, 1H, H-1); 7.29 (m, 1H, H-4); 7.24 (m, 2H, H-2, 3); 4.09 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-6); 3.91 (s, 3H, C*H*$_3$O); 3.34 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-9); 2.10 (m, 2H, H-7); 1.95 (m, 2H, H-8). **RMN- ^{13}C** ($CDCl_3$): δ 164.3 (C-11); 145.9 (C-9a); 135.9 (C-4a); 126.5 (C-10a); 121.7, 121.5, 121.1 (C-2, C-3, C-1); 108.6 (C-4); 107.3 (C-10); 50.6 (*C*H_3O); 42.5 (C-6); 24.6 (C-9); 22.6 (C-7); 20.1 (C-8). ESI-EM: m/z 230.1176 $[M+H]^+$, $C_{14}H_{16}NO_2$ (calcdo. 230.1176, Δ -0.2 ppm). ESI-EM/EM (*m/z* 230.1): *m/z* 230.1169 ($C_{14}H_{16}NO_2$, calcdo. 230.1176, Δ 3.0 ppm, AR 33.0), 198.0922 ($C_{13}H_{12}NO$, calcdo. 198.0913, Δ -4.2 ppm, AR 100), 188.0715 ($C_{11}H_{10}NO_2$, calcdo. 188.0706, Δ -4.5 ppm, AR 4.0), 186.1274 ($C_{13}H_{16}N$, calcdo. 186.1278, Δ 1.6 ppm, AR 2.7), 171.1039 ($C_{12}H_{13}N$, calcdo. 171.1043, Δ 2.3 ppm, AR 9.3), 170.0958 ($C_{12}H_{12}N$, calcdo. 170.0964, Δ 3.8 ppm, AR 6.0).

Bibliografía

(1) Sharma, V.; Kumar, P.; Pathak, D. "Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review" *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2010**, *47*, 491-502.

(2) Pathak, D.; Yadav, M.; Siddiqui, N.; Kushawah, S. "Antileishmanial agents: an updated review" *Pharma Chemica* **2011**, *3*, 239-249.

(3) Kochanowska-Karamyan, A. J.; Hamann, M. T. "Marine indole alkaloids: potential new drug leads for the control of depression and anxiety" *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 4489-4497.

(4) Atwood, B. K.; Lee, D.; Straiker, A.; Widlanski, T. S.; Mackie, K. "CP47497-C8 and JWH073, commonly found in 'Spice' herbal blends, are potent and efficacious CB1 cannabinoid receptor agonists" *European Journal of Pharmacology* **2011**, *659*, 139-145.

(5) Lam, Y.; Borris, R.; Dombrowski, A.; Ransom, R.; Young, G.; Beer, M.; Middlemiss, D.; Smith, J. "A new indole from *Penicillium daleae*" *The Journal of Antibiotics* **1994**, *47*, 724-726.

(6) Breslin, D.; Sato, Y.; Karki, S. B. "Mechanism of hydrolysis of a novel indolocarbazole topoisomerase I inhibitor" *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *39*, 291-297.

(7) Robey, R. W.; To, K. K. K.; Polgar, O.; Dohse, M.; Fetsch, P.; Dean, M.; Bates, S. E. "ABCG2: A perspective" *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61*, 3-13.

(8) Khmel´nitskii, R. A. "Mass spectrometry of indole compounds" *K. A. Timiryazev Agricultural Academy, Moscow. Traducido de Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii* **1974**, *3*, 291-309.

(9) Safe, S.; Jamieson, W. D.; Hutzinger, O. "Ion kinetic energy and mass spectra of isomeric methyl indoles" *Organic Mass Spectrometry* **1972**, *6*, 33-37.

(10) Powers, J. C. "Mass spectrometry of simple indoles" *The Journal of Organic Chemistry* **1968**, *33*, 2044-2050.

(11) Apeloig, Y.; Ciommer, B.; Frenking, G.; Karni, M.; Mandelbaum, A.; Schwarz, H.; Weisz, A. "Mechanism of carbon dioxide elimination from ionized methyl haloacetates in the gas phase. Formation of $CH_3XCH_2^{+\cdot}$ and $CH_3XCHX^{+\cdot}$ (X = Cl, Br) halonium radical ions" *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105*, 2186-2193.

(12) Terent'ev, P. B.; Thao, N. M.; Yurovskaya, M. A.; Kost, A. N. "Mass-spectral study of esters of keto acids of the indole series" *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **1977**, *12*, 170-174.

(13) Marx, M.; Djerassi, C. "Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXLIX. Question of ring expansion in the fragmentation of carbon-13 nitrogen heterocycles" *Journal of the American Chemical Society* **1968**, *90*, 678-681.

(14) Rodriguez, J. G.; Urrutia, A.; Canoira, L. "Electron impact mass spectrometry of indole derivatives" *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1996**, *152*, 97-110.

(15) Menes-Arzate, M.; Martinez, R.; Cruz-Almanza, R.; Muchowski, J. M.; Osornio, Y. M.; Miranda, L. D. "Efficient, Tin-free radical cyclization to aromatic systems. Synthesis of 5,6,8,9,10,11- hexahydroindolo[2,1-a]isoquinolines" *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 4001-4004.

(16) Lee, S. K.; Kim, H. J.; Jin, C.; Lee, J. "Formation of the unusual [M+H-11 Da]+ ion peak in the collision-induced dissociation mass spectrum of [M+H]+ ion of hydrochlorothiazide" *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *44*, 1538-1541.

(17) Guan, Z.; Liesch, J. M. "Solvation of acylium fragment ions in electrospray ionization quadrupole ion trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry" *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36*, 264-276.

(18) Beuck, S.; Schwabe, T.; Grimme, S.; Schloerer, N.; Kamber, M.; Schaenzer, W.; Thevis, M. "Unusual mass spectrometric dissociation pathway of protonated isoquinoline-3-carboxamides due to multiple reversible water adduct formation in the gas phase" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20*, 2034-2048.

(19) Thevis, M.; Kohler, M.; Schloerer, N.; Schaenzer, W. "Gas phase reaction of substituted isoquinolines to carboxylic acids in Ion Trap and Triple Quadrupole Mass Spectrometers after Electrospray Ionization and Collision-Induced Dissociation" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, *19*, 151-158.

(20) Frycak, P.; Huskova, R.; Adam, T.; Lemr, K. "Atmospheric pressure ionization mass spectrometry of purine and pyrimidine markers of inherited metabolic disorders" *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *37*, 1242-1248.

(21) Tuytten, R.; Lemiere, F.; Van, D. W.; Esmans, E. L.; Witters, E.; Herrebout, W.; Van, D. V. B.; Dudley, E.; Newton, R. P. "Intriguing mass spectrometric behavior of guanosine under low energy Collision-Induced Dissociation: H_2O adduct formation and gas-phase reactions in the collision cell" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 1291-1304.

(22) Shiokawa, Y.; Ichikawa, M. "Measurement and control of sticking probability of H_2O on stainless steel surfaces" *Journal of Vacuum Science & Technology, A: Vacuum, Surfaces, and Films* **1998**, *16*, 1131-1136.

(23) Hinkle, L. D. "Effect of purge pressure on desorbing water removal rate" *Journal of Vacuum Science & Technology, A: Vacuum, Surfaces, and Films* **2004**, *22*, 1799-1803.

(24) Holman, S. W.; Wright, P.; Wells, N. J.; Langley, G. J. "Evidence for site-specific intra-ionic hydrogen/deuterium exchange in the low-energy Collision-Induced Dissociation product ion spectra of protonated small molecules generated by Electrospray Ionization" *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *45*, 347-357.

(25) Crotti, A. E. M.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. "Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: A study of goyazensolide and its congeners" *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40*, 1030-1034.

Introducción

La importancia de encontrar una metodología adecuada para el análisis eficiente del perfil metabólico de los microorganismos ha ido creciendo a lo largo del tiempo[1,2] y hoy es un área muy relevante en el campo de los productos naturales[3-6]. Por una parte se han desarrollado técnicas y estrategias para el análisis metabolómico de microorganismos[7-10], con el fin de identificarlos y clasificarlos, para describir relaciones entre el fenotipo y el genotipo de los mismos[11] y complementar estudios de genómica[8,12]. Una caracterización química detallada del metaboloma de los microorganismos conduce sin dudas a un mejor entendimiento y a un conocimiento más completo de estos sistemas biológicos.

Por otra parte, es indispensable contar con metodologías rápidas y eficaces de de-replicación a la hora de detectar la presencia de metabolitos de estructuras ya conocidas en el estudio de microorganismos. De esa manera se logra hacer del screening una labor expeditiva, determinándose prematuramente si los agentes responsables de la actividad del sistema en estudio son compuestos conocidos o no, además de permitir identificar cuando diferentes especies producen los mismos metabolitos, ó si por el contrario, las mismas especies difieren en su perfil metabólico[13]. Encontrar un método eficiente es también crucial en el estudio de productos naturales cuando una cepa es cultivada repetidas veces porque es usual encontrar que su perfil metabólico cambia parcialmente con el tiempo[14].

Entre los métodos desarrollados hasta ahora para la de-replicación de productos naturales se puede mencionar el sistema HPLC-UV para el cual se han creado algoritmos con el fin de automatizar el análisis[15]. Este método no es confiable cuando dos o más compuestos coeluyen, y en esos casos en necesario recurrir a estudios complementarios capaces de distinguir entre los diferentes metabolitos, tal como espectrometría de masa ó espectroscopía de RMN, y así permitir la confirmación de la identidad de cada uno de ellos. También se ha utilizado HPLC-UV-^{1}H RMN por ejemplo para la de-replicación de tricotecenos macrocíclicos en extractos de hongos filamentosos[16] y en la detección de metabolitos nuevos en extractos fúngicos[17]; la técnica de HPLC-RMN se ha empleado en la identificación de metabolitos activos en

extractos de esponjas marinas[18] y en la de-replicación de extractos fúngicos y de bacterias[19,20]. Por otra parte se han llevado a cabo estrategias de screening y elucidación estructural a partir de extractos crudos de cultivos fúngicos utilizando la "tríada" analítica HPLC-EM-RMN-CD[21], en la que se han combinado los métodos HPLC-RMN, HPLC-EM y HPLC-DC. La triada fue optimizada con anterioridad para extractos de plantas[22]. Cabe mencionar además el estudio del perfil metabólico de hongos y bacterias utilizando infusión directa en espectrometría de masa aunque esta última es una metodología riesgosa ya que se sabe que pueden ocurrir interacciones entre distintos componentes de una mezcla conducentes a la inhibición de la ionización[8].

Desde fines de la década del `90 y principios del 2000 comenzó a utilizarse la técnica HPLC-EM para analizar productos naturales de diversas fuentes en busca de metabolitos activos *líderes*[23], así como en el estudio de extractos fúngicos, por ejemplo en la detección de depsipéptidos cíclicos como las destruxinas[24] y en la identificación de cepas con perfiles metabólicos y citotóxicos novedosos[25]. En la actualidad se continúa con el desarrollo de este tipo de metodologías útiles para agilizar el análisis de extractos crudos de microorganismos, por ejemplo para la detección de micotoxinas[26], para la detección de antibióticos[27] y en el perfil y detección de metabolitos activos en cianobacterias marinas[28,29].

En un trabajo previo realizado por el grupo de trabajo, se encontró que una cepa de *Fusarium oxysporum* aislada de suelo, presentaba muy buenas propiedades como agente biocontrolador frente al hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum.* Se demostró en ese trabajo que dichas propiedades se debían a la producción de ciclosporina A por parte de la cepa[30].

Debido a que los extractos de otra cepa de *Fusarium oxysporum* presentaron una importante actividad antifúngica, y que por TLC se podría inferir la presencia de ciclosporina A, se decidió determinar en forma preliminar la presencia inequívoca de esta u otras ciclosporinas por un método rápido y simple.

Teniendo en cuenta que el uso de HPLC-UV tiene la necesidad indefectible del uso de otras técnicas para lograr la identificación inequívoca, que ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN son de baja sensibilidad y no se dispone de equipamiento para hacer HPLC-RMN, se

decidió hacer el estudio por HPLC-EM, ya que se dispone del equipamiento necesario y cumple con los requisitos buscados.

Esta metodología presenta alta sensibilidad, alta resolución y rapidez en la adquisición de los espectros y además permitiría evaluar en función de los resultados la conveniencia o no de realizar un estudio más profundo sobre los metabolitos producidos por esta cepa.

Las ciclosporinas son undecapéptidos cíclicos naturalmente producidos por hongos de distintos géneros entre los que se encuentran *Tolypocladium*, *Fusarium*, *Beauveria*, *Acremonium* y otros[31,32]. Las ciclosporinas difieren mayoritariamente en uno o dos aminoácidos, en general en la posición 2 y en menor medida en el resto de las posiciones. En todas se conserva el residuo de sarcosina en la posición 3 y de D-alanina en la posición 8. La popularidad de las ciclosporinas se debe a la ciclosporina A, la cual posee una fuerte actividad como inmunosupresor e inmunomodulador, por lo que es ampliamente utilizada en la terapia de transplantes de órganos y en diferentes tratamientos clínicos en casos de psoriasis, síndrome nefrótico idiopático, artritis reumatoide, entre otros[33-37]. También es conocida la actividad antifúngica de varias ciclosporinas[38]. En la tabla 27 se resumen las ciclosporinas naturales conocidas[31,32,39-43].

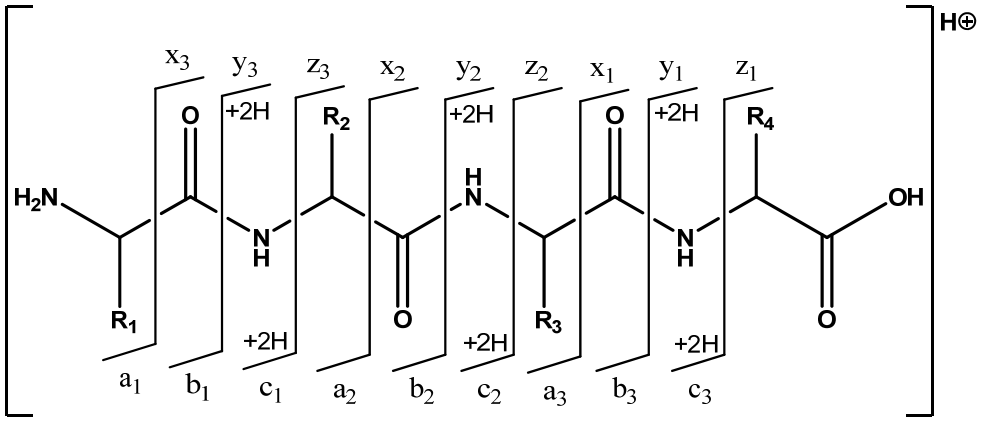
El análisis de este tipo de compuestos por espectrometría de masa resulta particularmente difícil debido a que, por tratarse de péptidos cíclicos, la primera ruptura y apertura no selectiva del ciclo conduce posteriormente a un gran número de potenciales fragmentos que complican la secuenciación.

Los péptidos lineales se fragmentan usualmente en las posiciones indicadas en el esquema 33, produciendo iones denominados a, b o c cuando la carga queda en el extremo N terminal, o bien iones denominados x, y o z cuando la carga es retenida en el extremo C terminal. El subíndice indica la cantidad de residuos de aminoácidos que contiene un fragmento dado a partir del extremo correspondiente[44,45].

Cy	PM	FM	Secuencia de posición 1 a 11
A	1201.8	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	MeBmt*-Abu-Sar-MeL-V-MeL-A-A-MeL-MeL-MeV
B	1187.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$	[Ala^{2}]Cy A
C	1217.8	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{13}$	[Thr^{2}]Cy A
D	1215.9	$C_{63}H_{113}N_{11}O_{12}$	[Val^{2}]Cy A
E	1187.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$	[Val^{11}]Cy A
F	1185.8	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{11}$	[Desoxi MeBmt^{1}]Cy A
G	1215.9	$C_{63}H_{113}N_{11}O_{12}$	[Nva^{2}]Cy A
H	1201.8	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	[D-MeVal^{11}]Cy A
I	1201.8	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	[Val^{2}, Leu^{10}]Cy A
K	1199.9	$C_{63}H_{113}N_{11}O_{11}$	[Desoxi MeBmt^{1}, Val^{2}]Cy A
L	1187.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$	[Bmt^{1}]Cy A
M	1215.9	$C_{63}H_{113}N_{11}O_{12}$	[Nva^{2}, Nva^{5}]Cy A
N	1201.8	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	[Nva^{2}, Leu^{10}]Cy A
O	1159.8	$C_{60}H_{109}N_{11}O_{11}$	[MeLeu^{1}, Nva^{2}]Cy A
P	1203.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{13}$	[Bmt^{1}, Thr^{2}]Cy A
Q	1173.8	$C_{60}H_{107}N_{11}O_{12}$	[Val^{4}]Cy A
R	1173.8	$C_{60}H_{107}N_{11}O_{12}$	[Leu^{6}, Leu^{10}]Cy A
S	1189.9	$C_{60}H_{107}N_{11}O_{13}$	[Thr^{2}, Val^{4}]Cy A
T	1187.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$	[Leu^{10}]Cy A
U	1187.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$	[Leu^{6}]Cy A
V	1215.9	$C_{63}H_{113}N_{11}O_{12}$	[Abu^{7}]Cy A
W	1203.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{13}$	[Thr^{2}, Val^{11}]Cy A
X	1201.8	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	[Nva^{2}, Leu^{9}]Cy A
Y	1201.8	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	[Nva^{2}, Leu^{6}]Cy A
Z	1201.8	$C_{61}H_{111}N_{11}O_{11}$	[ácido *N*-metil-2-aminooctanoico^{1}]Cy A
a	1145.8	$C_{59}H_{107}N_{11}O_{11}$	[MeLeu^{1}]Cy A
b	1187.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$	[Leu^{4}]Cy A
c	1187.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$	[Ile^{4}]Cy A
d	1215.9	$C_{63}H_{113}N_{11}O_{12}$	[Leu^{5}]Cy A
e	1187.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$	[Leu^{9}]Cy A
f	1173.8	$C_{60}H_{107}N_{11}O_{12}$	[Ala^{2}, val^{11}]Cy A
g	1247.8	$C_{63}H_{113}N_{11}O_{14}$	Hidroperóxido de Cy D
h	1217.8	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{13}$	[Thr^{2}, Leu^{5}, Leu^{10}]Cy A
i	1203.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{13}$	[Thr^{2}, Leu^{5}, Ala^{10}]Cy A
j	1231.8	$C_{63}H_{113}N_{11}O_{13}$	[Thr^{2}, Ile^{5}]Cy A
k	1187.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$	[MeNva^{10}]Cy A
l	1187.8	$C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$	[Abu^{5}]Cy A

*Bmt: ácido (2S, 3R, 4R, 6E)-2-amino-3-hidroxi-4-metil-6-octenoico

Tabla 27. Ciclosporinas naturales (aisladas a partir de cultivos fúngicos) conocidas actualmente.



Esquema 33. Nomenclatura de iones fragmento de péptidos de acuerdo con Roepstorff y Biemann[44,45].

Existirían por lo tanto numerosas posibilidades de secuencias de fragmentación si las rupturas ocurrieran en cualquiera de los 11 enlaces peptídicos presentes en la molécula de ciclosporina. Sin embargo, en un trabajo realizado por el grupo de Havliček[46] se determinó que las principales vías de fragmentación comienzan con una ruptura primaria entre los aminoácidos 2-3, 1-11 o 5-6, y a partir de estos precursores se obtienen fragmentos tipo b como los fragmentos más típicos en los espectros de masa de las ciclosporinas (figura 130i y 130ii). La ruptura inicial llevaría al isómero oxazolona lineal del ión $[M+H]^+$ como se ha planteado con los *N*-alquil péptidos en general[47]. Trabajos posteriores corroboraron estos resultados[43,48-50]. Para la denominación de estos iones fragmento obtenidos por CID a partir de la fragmentación primaria se agrega al ion bn designado según Roepstorff y Biemann, un superíndice e-f, donde e y f representan las posiciones de los aminoácidos cuya unión amida se clivó para dar el ión acilio lineal. Además e se reserva para el aminoácido que queda como N-terminal y f para el C-terminal[49].

Por lo tanto, la observación de las series b_n^{3-2}, b_n^{1-11}, que aparecen casi completas, y b_n^{6-5} permiten la determinación de la secuencia de aminoácidos y la consecuente identificación de las ciclosporinas.

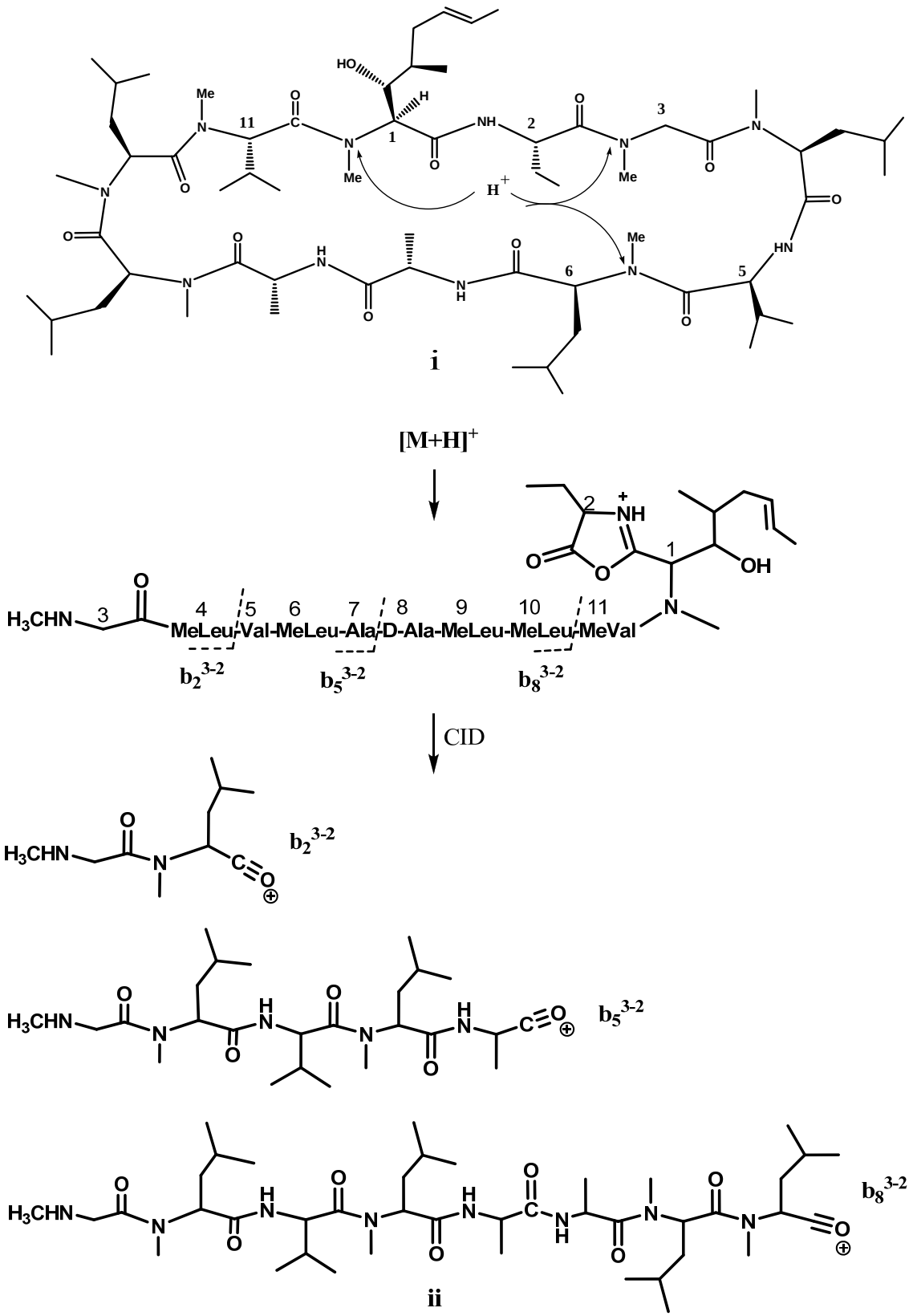


Figura 130. i) Ciclosporina A y sus sitios de protonación más probables. ii) Ion obtenido por ruptura entre los aminoácidos 2 y 3 de la ciclosporina A y algunos iones fragmento de la serie b_n^{3-2} correspondiente.

Cabe mencionar que acompañando a estas series, se observa la serie b_n-18^{1-11} que se atribuye al equilibrio entre las ciclosporinas y sus isoformas en medio ácido (figura 131). Si bien se ha informado que este equilibrio ocurre en medio ácido, se ha postulado que el reordenamiento puede ser espontáneo "in situ" en el espectrómetro de masa[48]. Se ha informado que presentan esta serie de fragmentos solamente aquellas ciclosporinas que posean el grupo MeBmt en la posición 1 o aquellas que contengan β-hidroxi-*N*-metilaminoácidos, porque son las que pueden sufrir el reordenamiento N-O acilo.

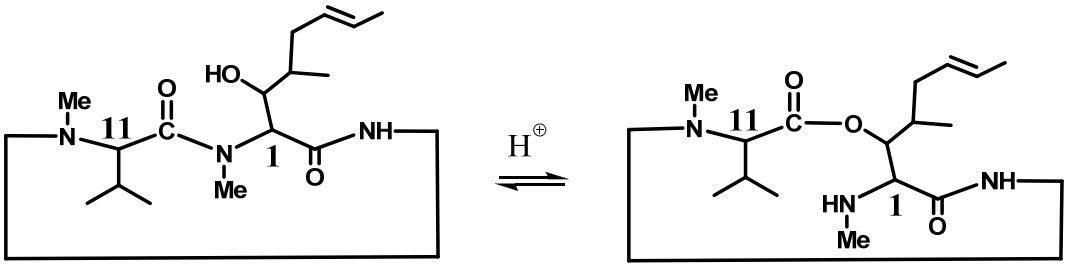


Figura 131. Equilibrio entre ciclosporina A y su isoforma.

Resultados

Se cultivó el hongo *Fusarium oxysporum* en medio líquido de extracto de malta y una vez transcurridos 30 días de crecimiento se filtró obteniéndose el micelio separado del medio acuoso. El micelio fue extraído con etanol y acetato de etilo sucesivamente, mientras que el medio acuoso fue extraído en fase sólida con amberlite XAD-16 y fue desorbido de la fase utilizando metanol. Ambos extractos fueron llevados a seco por evaporación al vacío.

Cada extracto se analizó por HPLC/EM variando las condiciones experimentales. Se emplearon 4 columnas de distintas fases: HILIC, C-8, PFP y C-18, y sistemas de solventes H_2O-CH_3CN, H_2O-MeOH, HCOOH-MeOH y HCOOH-CH_3CN.

Se buscó en primer término obtener una mayor separación y resolución entre los distintos componentes. En la figura 132 se muestra el cromatograma obtenido para el

que resultó ser el mejor sistema de solventes y mejor columna en el caso del extracto de medio y en la figura 133 el cromatograma según las mejores condiciones encontradas en el caso del extracto de micelio. Se grafica el cromatograma de picos base ("base peak chromatogram" BPC) en función del tiempo de retención. Los cromatogramas de pico base son similares a los de corriente iónica total (TIC), aunque se monitorean solo los picos más intensos en cada espectro de masa, con lo que adquieren un aspecto más limpio y más informativo al eliminar impurezas de fondo presentes a lo largo de la corrida. En estos BPC puede seleccionarse el rango de masas de picos base a monitorear, por ejemplo en las figuras mencionadas se muestran los BPC entre 150-1500 u, es decir en casi todo el rango de m/z medido.

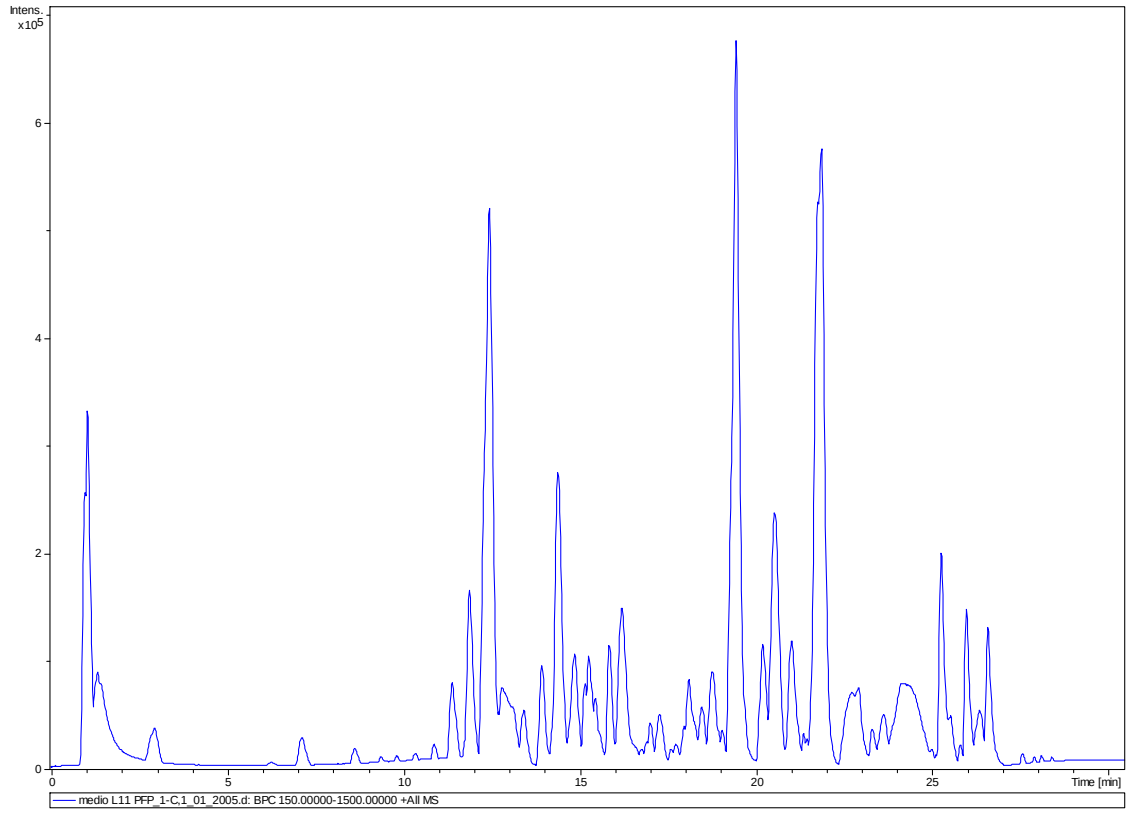


Figura 132. Cromatograma BPC de extracto de medio de *F. oxysporum*. Columna PFP, gradiente HCOOH 0.1%-MeOH.

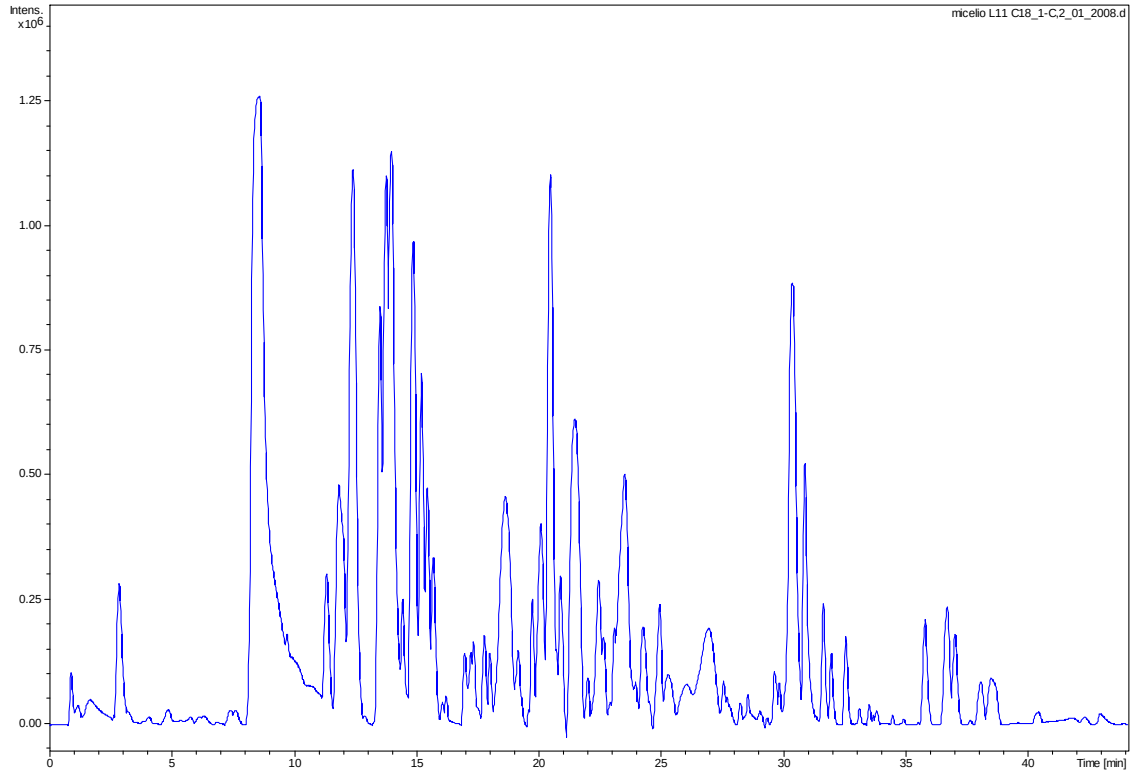


Figura 133. Cromatograma BPC de extracto de micelio de *F. oxysporum*. Columna C-18, gradiente HCOOH 0.1%-MeOH.

Se observó que las columnas de fases HILIC y C8 no resultaron adecuadas, no encontrándose condiciones mínimas en las que la mayoría de los metabolitos se separaran. La fase HILIC no ha sido informada previamente para el análisis de ciclosporinas y la fase C8 había sido empleada previamente por el grupo para la cuantificación de ciclosporina A[30].

Las fases PFP y C18 resultaron similares, aunque con la fase PFP hubo una mejor separación y resolución de los picos en el cromatograma en el caso del extracto de medio. En cuanto a los sistemas de solventes, HCOOH 0.1%-MeOH resultó ser el mejor y la presencia de HCOOH fundamentalmente permitió observar los $[M+H]^+$ en los espectros de masa en lugar o además de los $[M+Na]^+$. Este hecho es importante cuando se desean analizar los EM/EM ya que los $[M+Na]^+$ no suelen fragmentarse.

Por lo tanto se eligieron los sistemas empleados en las figuras 132 y 133 para continuar con este trabajo. En ambos casos se utilizó un gradiente HCOOH 0.1%-MeOH 45:55 (2 min) a MeOH 100% en 28 minutos y luego isocrático en MeOH.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo principal era identificar la presencia de ciclosporinas por lo que se buscaron en primera instancia los iones relacionados con tales compuestos. Para ello se graficó el cromatograma de iones seleccionados o *m/z* 1100 a 1250, "extracted ion chromatogram" (EIC) (figuras 134 y 135).

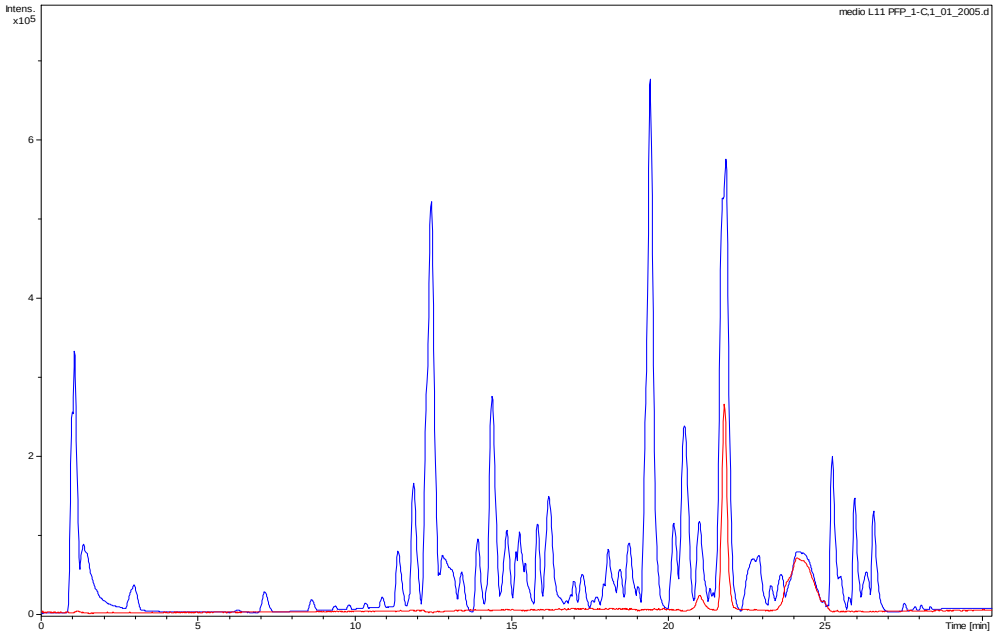


Figura 134. BPC de extracto de medio de *F. oxysporum* (azul) y EIC de los iones buscados (rojo).

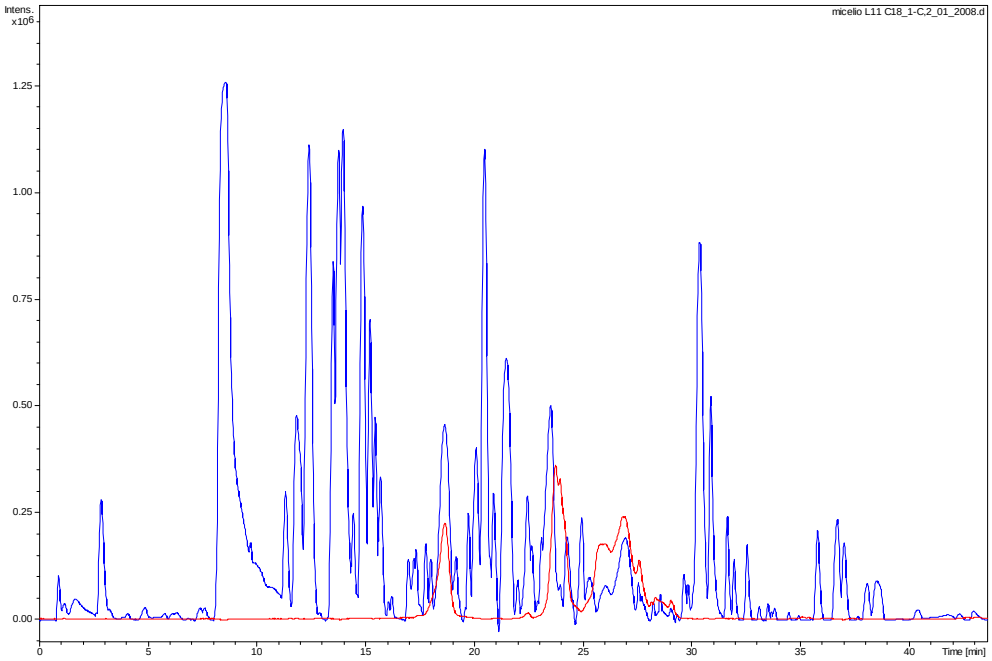


Figura 135. BPC de extracto de micelio de *F. oxysporum* (azul) y EIC de los iones correspondientes a ciclosporinas conocidas (rojo).

Se comenzó entonces con el análisis de los espectros de masa correspondientes a

los picos en los tiempos de retención donde se detectaron los iones de interés. Tanto en el extracto de medio como de micelio se detectó la presencia de posibles ciclosporinas teniendo en cuenta las fórmulas moleculares obtenidas a partir de los iones $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$ (tablas 28 y 29) y las ciclosporinas conocidas (tabla 27), además de otros componentes. Los espectros se observan en las figuras 136 a 139 8tabla 28) y figuras 140 a 143 (tabla 29).

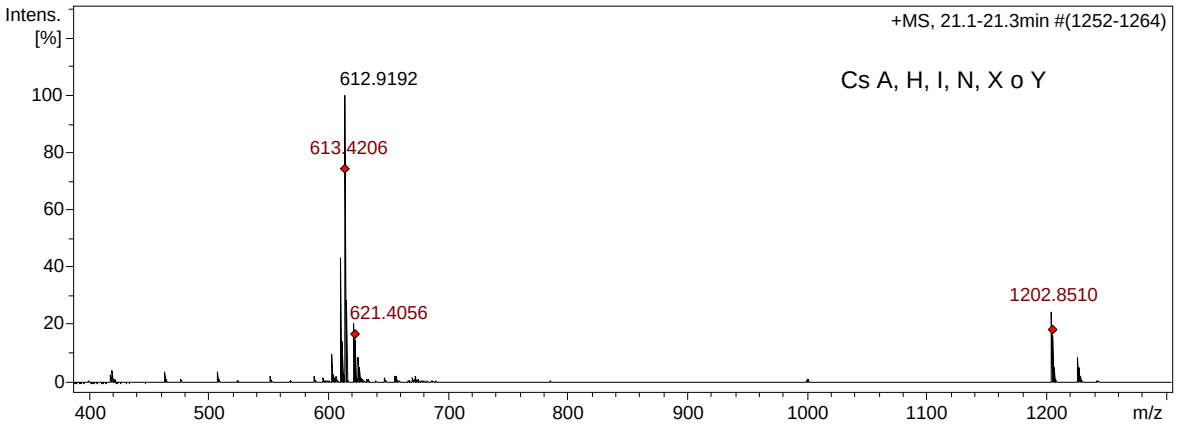


Figura 136. Espectro de masa del componente de t_R 21.2 min del extracto de medio de *F. oxysporum*.

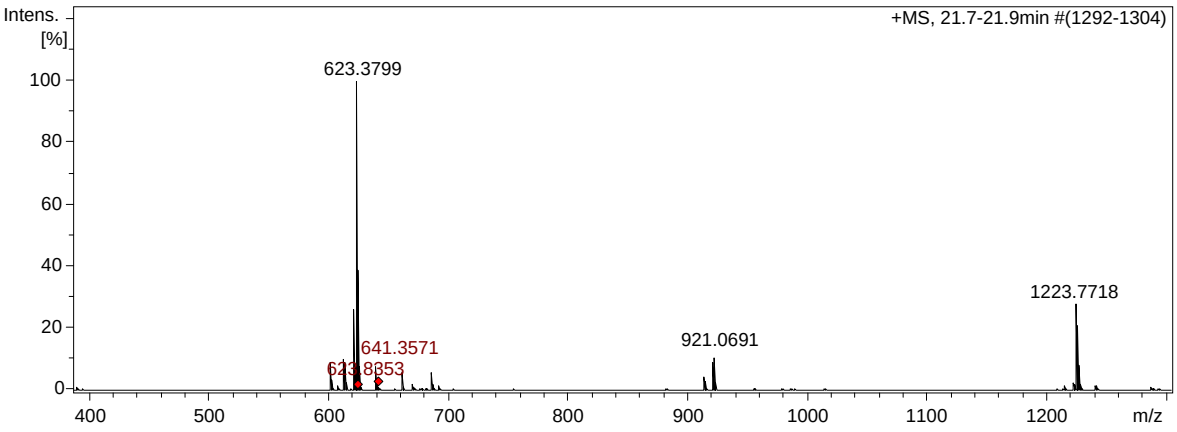


Figura 137. Espectro de masa del componente de t_R 21.7 min del extracto de medio de *F. oxysporum*.

Extracto de medio:

T_R (min)	***m/z* observado**	**Especie**	**FM**	**Error (ppm)**	**Cs**
21.2	601.9620	$[M+2H]^{2+}$	$C_{62}H_{113}N_{11}O_{12}$	3.3	A, H, I, N, X, Y
	612.9192	$[M+H+Na]^{2+}$	$C_{62}H_{112}N_{11}NaO_{12}$	-0.4	
	1202.8510	$[M+H]^+$	$C_{62}H_{112}N_{11}O_{12}$	-1.9	
	1224.8337	$[M+Na]^+$	$C_{62}H_{111}N_{11}NaO_{12}$	-2.5	
21.7	601.3959	$[M+H]^+$	$C_{33}H_{53}N_4O_6$	0.2	
	623.3799	$[M+Na]^+$	$C_{33}H_{52}N_4NaO_6$	-3.1	
	1223.7717	$[2M+Na]^+$	$C_{66}H_{104}N_8NaO_{12}$		
23.3	1196.7908	$[M+Na]^+$	$C_{60}H_{107}N_{11}NaO_{12}$	7.0	Q, R
	1210.8156	$[M_1+Na]^+$ o $[M_2+H]^+$	$C_{61}H_{109}N_{11}NaO_{12}$	-0.5	B, E, L, T, U
			$C_{63}H_{108}N_{11}O_{12}$	1.5	
	1218.8441	$[M_3+H]^+$ o $[M_4+Na]^+$	$C_{62}H_{112}N_{11}O_{13}$	-0.5	C
			$C_{60}H_{113}N_{11}NaO_{13}$	-2.4	
	1240.8260	$[M_3+Na]^+$	$C_{62}H_{111}N_{11}NaO_{13}$	-0.4	C
	1256.7987	$[M_5+Na]^+$	$C_{65}H_{107}N_{11}NaO_{12}$	0.5	
	1226.8105	$[M_6+H]^+$ o $[M_7+Na]^+$	$C_{63}H_{108}N_{11}O_{13}$	1.4	
			$C_{61}H_{109}N_{11}NaO_{13}$	-0.5	P, W, i
24.2	1210.8184	$[M_1+Na]^+$ o $[M_2+H]^+$	$C_{61}H_{109}N_{11}NaO_{12}$	-2.9	
			$C_{63}H_{108}N_{11}O_{12}$	-3.8	
	1224.8326	$[M+Na]^+$	$C_{62}H_{111}N_{11}NaO_{12}$	-1.6	A, H, I, N, X, Y

Cs: ciclosporina

Tabla 28. Iones observados en los espectros de masa de los componentes del extracto de medio de *F. oxysporum*.

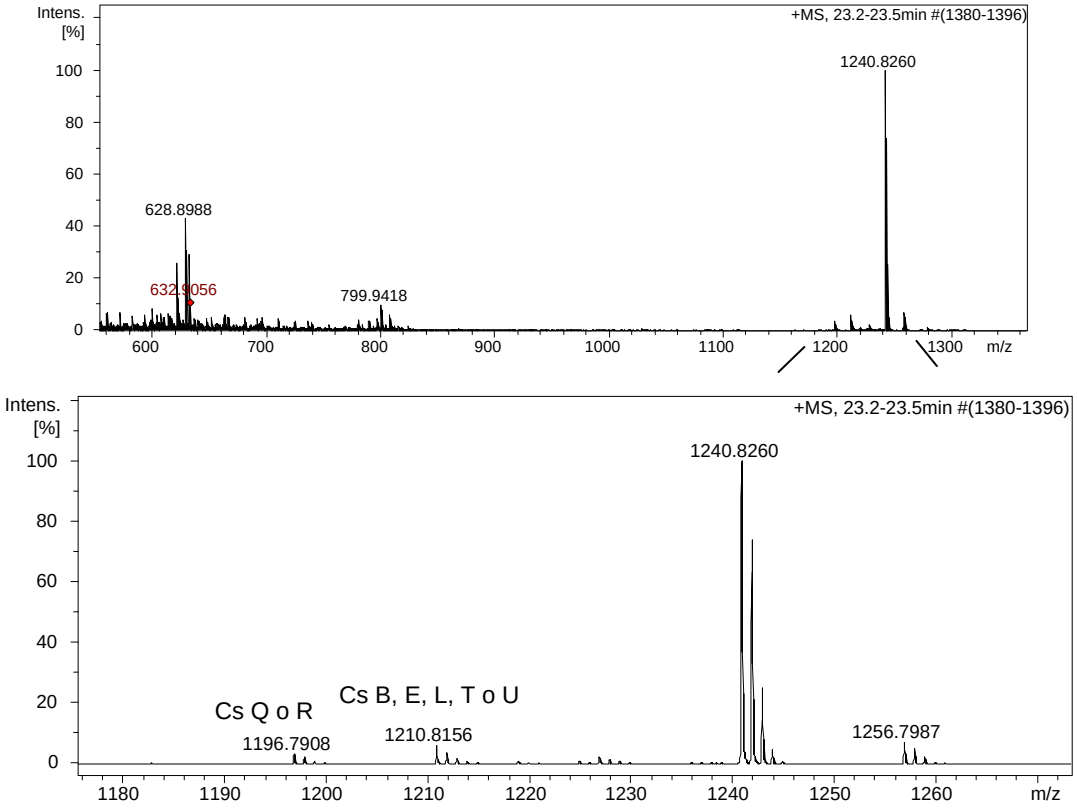


Figura 138. Espectro de masa (y ampliación) de los componentes de t_R 23.3 minutos del extracto de medio de *F. oxysporum*.

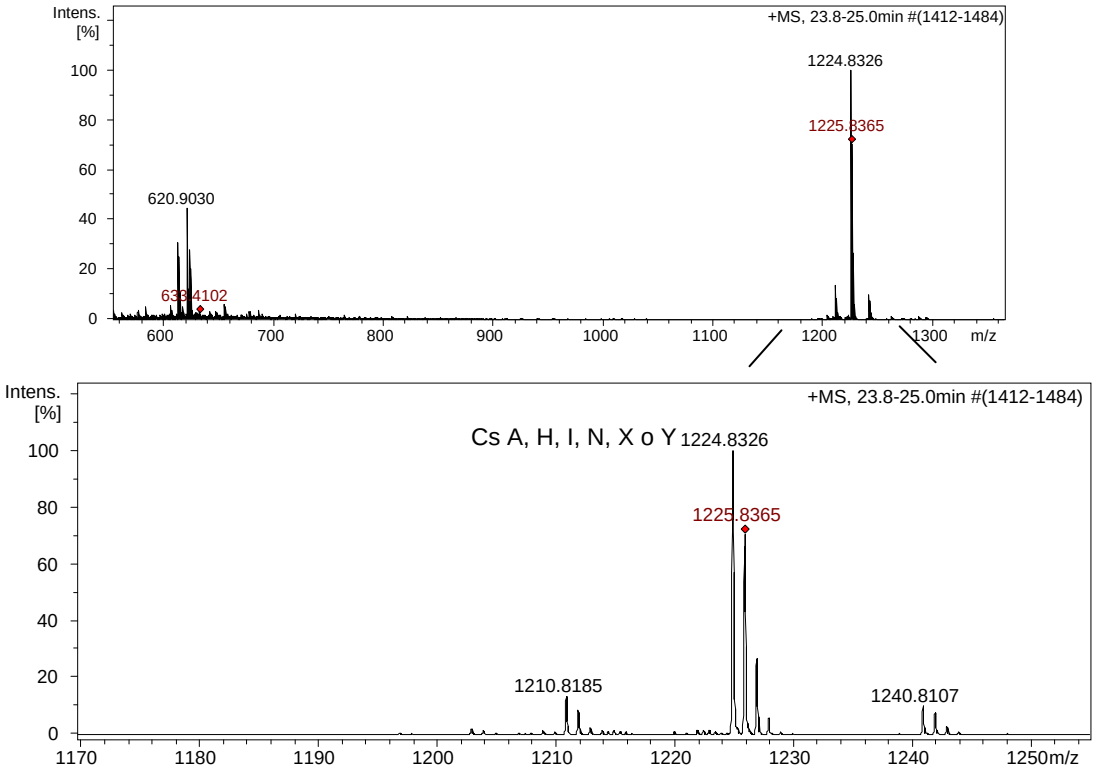


Figura 139. Espectro de masa (y ampliación) de los componentes de t_R 24.2 minutos del extracto de medio de *F. oxysporum*.

Extracto de micelio:

T_R (min)	***m/z* observado**	**Especie**	**FM**	**Error (ppm)**	**Cs**
18.5	601.9289	$[M+2H]^{2+}$	$C_{62}H_{113}N_{11}O_{12}$	-1.5	A, H, I, N, X, Y
	612.9108	$[M+H+Na]^{2+}$	$C_{62}H_{112}N_{11}NaO_{12}$	-3.1	
	1202.8510	$[M+H]^{+}$	$C_{62}H_{112}N_{11}O_{12}$	-0.8	
	1224.8337	$[M+Na]^{+}$	$C_{62}H_{111}N_{11}NaO_{12}$	-0.6	
19.9	619.4094	$[M+H]^{+}$	$C_{33}H_{55}N_4O_7$	-4.7	
	641.3908	$[M+Na]^{+}$	$C_{33}H_{54}N_4NaO_7$	-3.6	
	1259.7891	$[2M+Na]^{+}$	$C_{66}H_{104}N_8NaO_{14}$	-1.1	
21.3	633.4247	$[M+H]^{+}$	$C_{34}H_{57}N_4O_7$	-4.0	
	655.4072	$[M+Na]^{+}$	$C_{34}H_{56}N_4NaO_7$	-4.7	
	1287.8215	$[2M+Na]^{+}$	$C_{68}H_{112}N_8NaO_{14}$	-1.9	
22.4	609.3640	$[M_1+Na]^{+}$	$C_{32}H_{50}N_4NaO_6$	-2.9	
	1195.7354	$[2M_1+Na]^{+}$	$C_{64}H_{100}N_8NaO_{12}$	-0.1	
	669.4221	$[M_2+Na]^{+}$	$C_{35}H_{58}N_4NaO_7$	-3.4	
	1315.8503	$[2M_2+Na]^{+}$	$C_{70}H_{116}N_8NaO_{14}$	-5.0	
23.5	601.3979	$[M+H]^{+}$	$C_{33}H_{53}N_4O_6$	-3.3	
	623.3812	$[M+Na]^{+}$	$C_{33}H_{52}N_4NaO_6$	-5.2	
	1223.7704	$[2M+Na]^{+}$	$C_{66}H_{104}N_8NaO_{12}$	-3.1	
24.1	587.3819	$[M+H]^{+}$	$C_{32}H_{51}N_4O_6$		
	609.3597	$[M+Na]^{+}$	$C_{32}H_{50}N_4NaO_6$		

T_R (min)	*m/z* observado	Especie	FM	Error (ppm)	Cs
24.4	1196.7957	$[M+Na]^+$	$C_{60}H_{107}N_{11}NaO_{12}$	3.0	Q, R
	1210.8149	$[M_1+Na]^+$	$C_{61}H_{109}N_{11}NaO_{12}$	0.0	B, E, L, T, U
	1226.8039	$[M_2+Na]^+$	$C_{61}H_{109}N_{11}NaO_{13}$	4.9	P, W
	1256.8074	$[M_3+Na]^+$	$C_{65}H_{107}N_{11}NaO_{12}$	-4.6	
25.3	637.3958	$[M_1+Na]^+$	$C_{34}H_{54}N_4NaO_6$	-3.6	
	1240.8273	$[M_2+Na]^+$	$C_{62}H_{111}N_{11}NaO_{13}$	-1.5	C
25.7-26.8	1188.8310	$[M_1+H]^+$	$C_{61}H_{110}N_{11}O_{12}$	1.7	B, E, L, T, U
	1210.8189	$[M_1+Na]^+$	$C_{61}H_{109}N_{11}NaO_{12}$	-3.3	
	1202.8493	$[M_2+H]^+$	$C_{62}H_{112}N_{11}O_{12}$	-0.6	A, H, I, N, X, Y
	1224.8323	$[M_2+Na]^+$	$C_{62}H_{111}N_{11}NaO_{12}$	-1.4	
27.6-27.9	1194.8243	$[M_1+Na]^+$	$C_{61}H_{109}N_{11}NaO_{11}$	-3.6	
	1210.8146	$[M_2+Na]^+$	$C_{61}H_{109}N_{11}NaO_{12}$	0.3	B, E, L, T, U
	1238.8434	$[M_3+Na]^+$	$C_{63}H_{113}N_{11}NaO_{12}$	2.3	D, G, M, V
	1254.8102	$[M_4+Na]^+$	$C_{62}H_{109}N_{11}NaO_{14}$	-4.3	j
28.7	1208.8372	$[M_1+Na]^+$	$C_{62}H_{111}N_{11}NaO_{11}$	-1.2	F
	1250.8446	$[M_2+Na]^+$	$C_{64}H_{113}N_{11}NaO_{12}$	1.3	

Cs: ciclosporina

Tabla 29. Iones observados en los espectros de masa de los componentes del extracto de micelio de *F. oxysporum*.

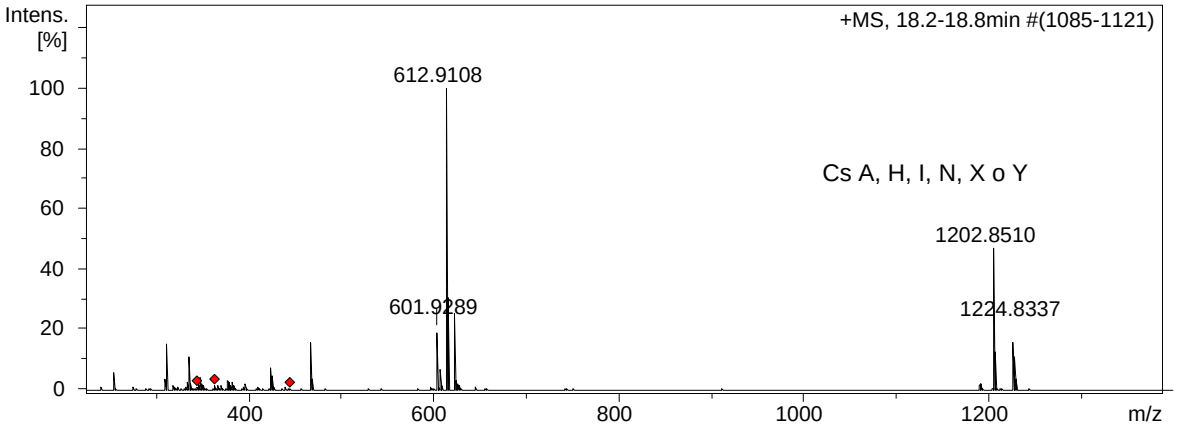


Figura 140. Espectro de masa del componente del extracto de micelio de *F. oxysporum* de t_R 18.5 minutos.

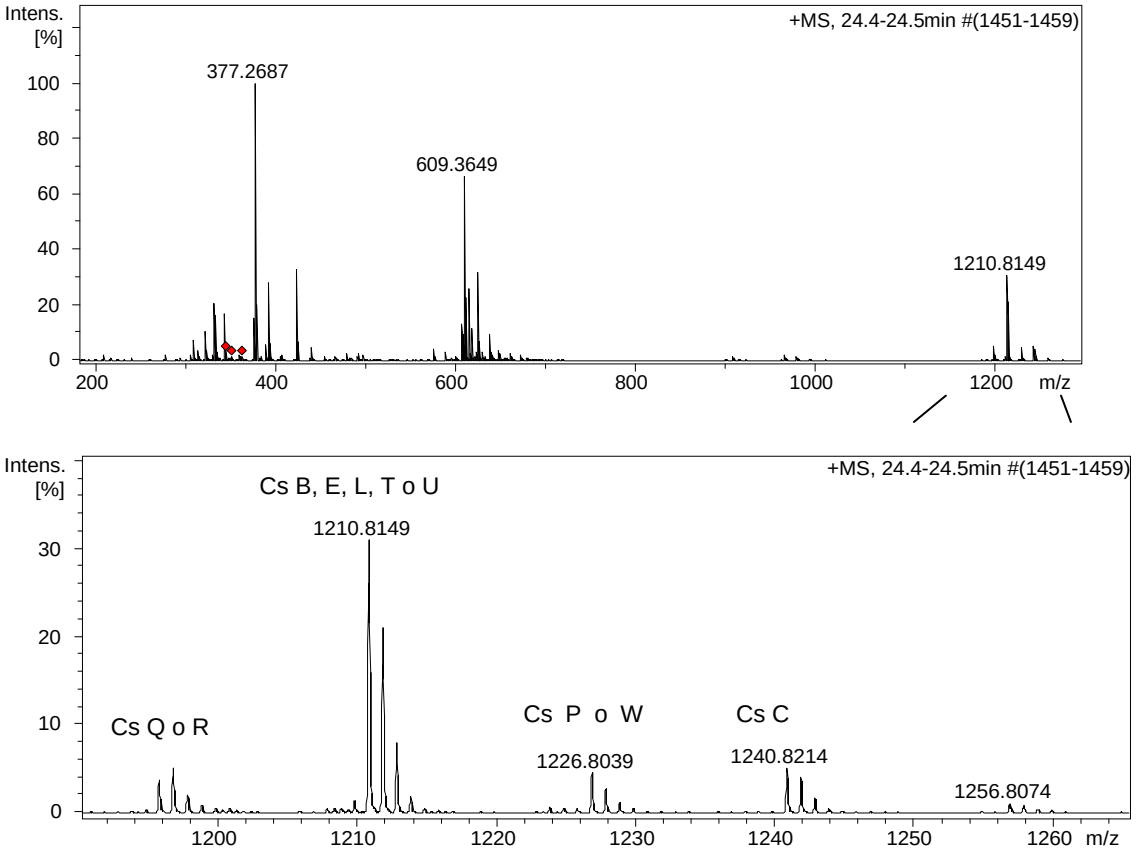


Figura 141. Espectro de masa de los componentes del extracto de micelio de *F. oxysporum* de t_R 24.4 minutos.

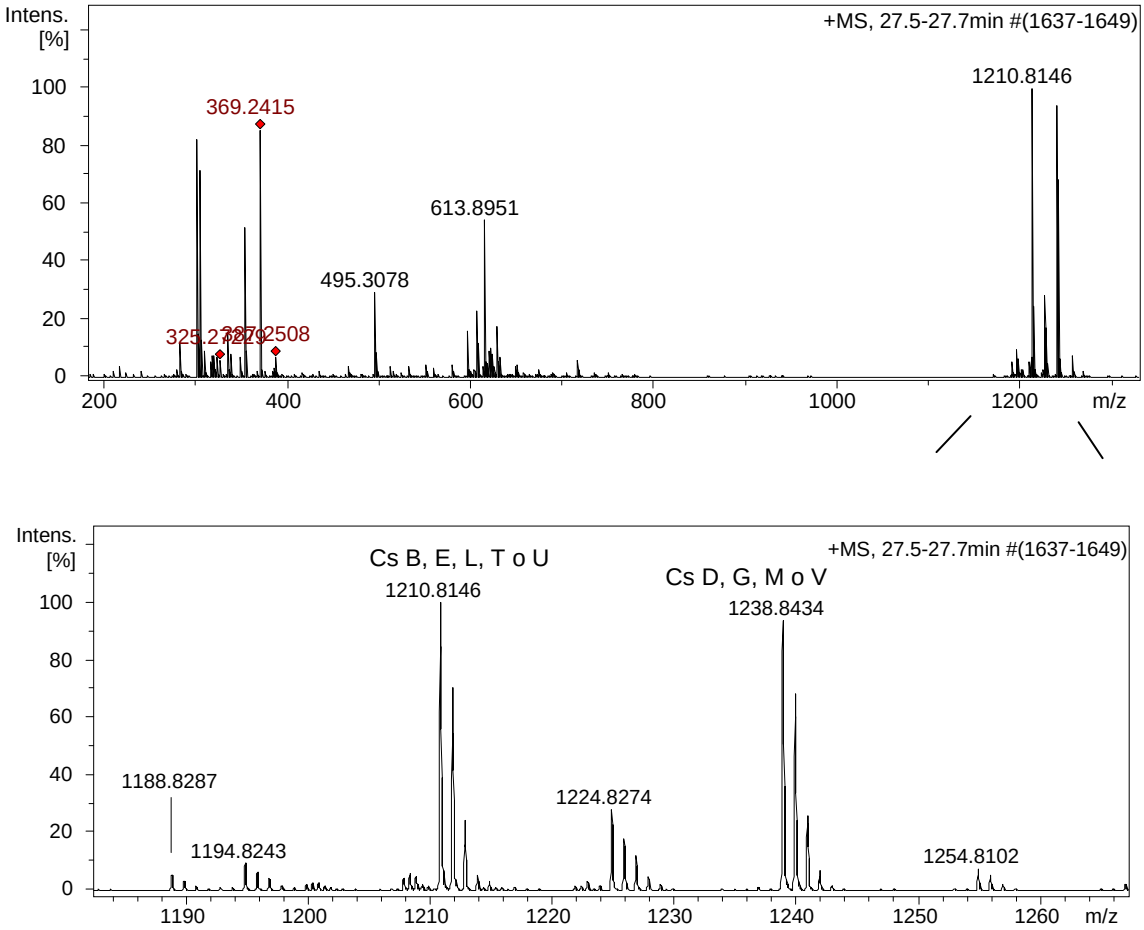


Figura 142. Espectro de masa (y ampliación) de los componentes del extracto de micelio de *F. oxysporum* de t_R 27.6 minutos.

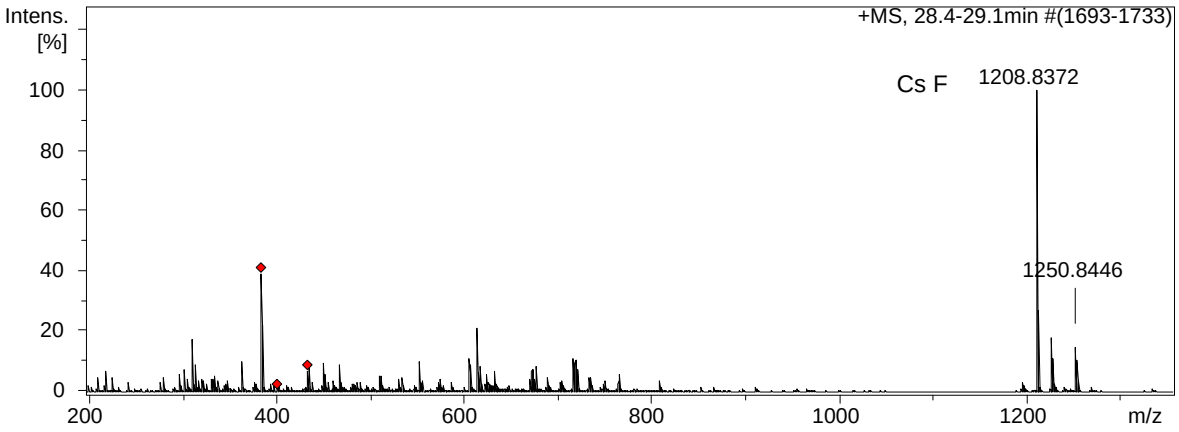


Figura 143. Espectro de masa del componente del extracto de micelio de *F. oxysporum* de t_R 28.7 minutos.

Para confirmar la identidad de las ciclosporinas detectadas, así como para identificar de qué isómero se trataba, se analizaron los espectros EM/EM en los casos en los que fue posible dada la abundancia de los iones precursores. Como es sabido que las ciclosporinas son extraídas tanto en el medio de cultivo como en el micelio, y que normalmente hay mayores concentraciones en el micelio[30], y los resultados obtenidos (tablas 287 y 29) se decidió estudiar únicamente el extracto de micelio.

Análisis de las ciclosporinas en el extracto de micelio

Para mejorar la intensidad relativa de los iones $[M+H]^+$ y evitar la formación de $[M+Na]^+$, se repitió la corrida de HPLC en las mismas condiciones cromatográficas, pero empleando la fuente de APCI en lugar de la fuente ESI. Durante la corrida todos los iones fueron sometidos a CID, registrándose los respectivos espectros de EM/EM. Los espectros obtenidos fueron analizados, asignando los fragmentos sobre la base de los estudios previos de EM/EM de ciclosporinas[41-43,46,48-50] en los que se han tabulado los iones fragmento correspondientes a las distintas ciclosporinas.

Los espectros de EM/EM del ion 1203 correspondientes a los componentes de tiempos de retención 18.5 y 25.7 minutos resultaron idénticos entre sí (figura 144) y todos los fragmentos resultaron ser coincidentes con Cs A, descartándose las Cs I, N, X, e Y (tabla 29). Una muestra de Cs A patrón presentó un t_R de 25.7 minutos, por lo cual la identidad del componente que eluyó a ese t_R corresponde inequívocamente a Cs A (**47**).

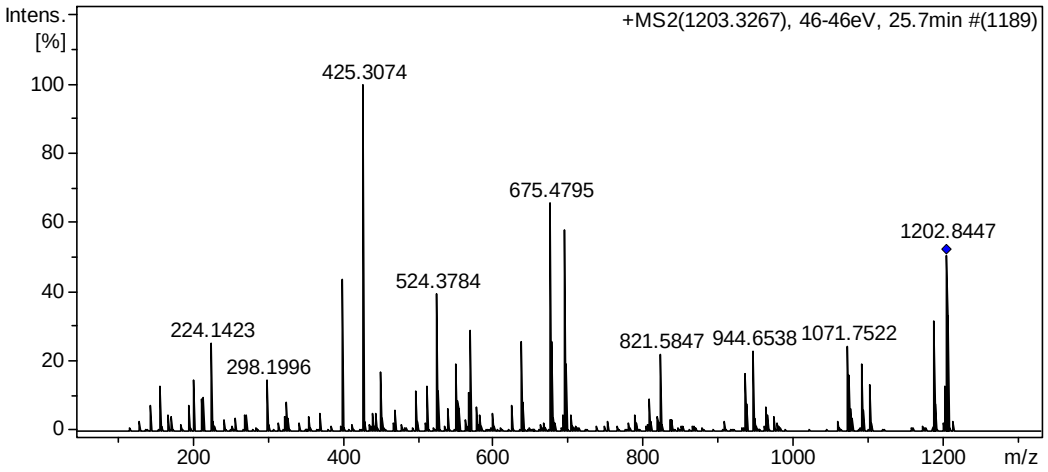


Figura 144. Espectro EM/EM del ion *m/z* 1203.

m/z	FM	asignación	error
397.2760	$C_{20}H_{37}N_4O_4$	b_4^{6-5}	12.3
425.3074	$C_{22}H_{41}N_4O_4$	b_4^{3-2}	11.4
449.3070	$C_{24}H_{41}N_4O_4$	$[b_4\text{-}18]^{1-11}$	11.70
524.3784	$C_{27}H_{50}N_5O_5$	b_5^{6-5}	4.3
567.3852	$C_{28}H_{51}N_6O_6$	b_6^{3-2}	2.2
637.4634	$C_{33}H_{61}N_6O_6$	b_6^{6-5}	2.1
675.4795	$C_{36}H_{63}N_6O_6$	$[b_6\text{-}18]^{1-11}$	1.3
694.4876	$C_{35}H_{64}N_7O_7$	b_7^{3-2}	-2.1
821.5847	$C_{42}H_{77}N_8O_8$	b_8^{3-2}	1.5
944.6538	$C_{49}H_{86}N_9O_9$	$[b_9\text{-}18]^{1-11}$	0.5
1071.7522	$C_{56}H_{99}N_{10}O_{10}$	$[b_{10}\text{-}18]^{1-11}$	1.7
1089.7711	$C_{56}H_{101}N_{10}O_{11}$	b_{10}^{1-11}	-5.9
1184.8332	$C_{62}H_{110}N_{11}O_{11}$	$[M+H\text{-}H_2O]^+$	4.1

Tabla 30. Iones observados en el espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ de la ciclosporina A.

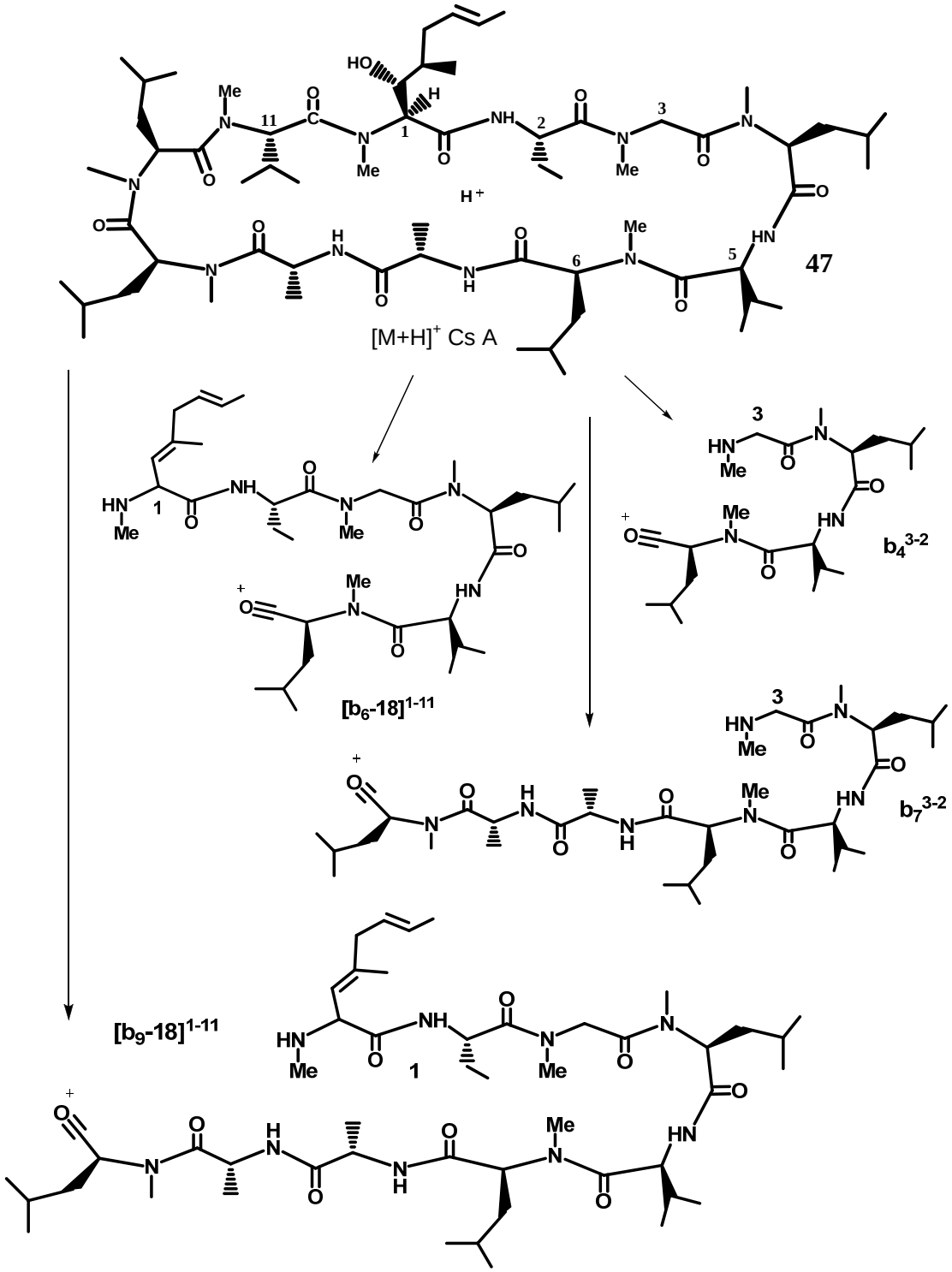


Figura 145. Algunos de los fragmentos mayoritarios observados en el espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ la ciclosporina A.

El componente que eluye a t_R 18.5 minutos podría corresponder a Cs H, que difiere solamente en la configuración absoluta de la MeVal de la posición 11, o a la isoforma de Cs A, isociclosporina A, en la cual una unión éster se forma por transferencia del acilo del residuo *N*-peptídico de MeVal[11] al oxígeno del OH de MeBmt[1] (figura 131). Es sabido que este reordenamiento ocurre en medio ácido y por lo tanto podría tratarse de un artefacto[48]. Los espectros de EM/EM de la Cs H y de la isociclosporina A son idénticos a los de la Cs A[48].

Los componentes que eluyen a tR 24.4 minutos presentaron en sus espectros de masa los iones [M+H]+ correspondientes *m/z* 1174.8129 ($C_{60}H_{108}N_{11}O_{12}$, 3.8 ppm) y 1188.8297 ($C_{61}H_{110}N_{11}O_{12}$, 2.8 ppm). Los componentes minoritarios no se observaron con abundancia relativa suficiente para su análisis por EM/EM.

Teniendo en cuenta las ciclosporinas conocidas y el espectro de EM/EM del ion de m/z 1189 del componente que eluye a t_R 24.4 minutos, éste correspondería a la Cs b (**48**) debido a que coinciden todos sus fragmentos.

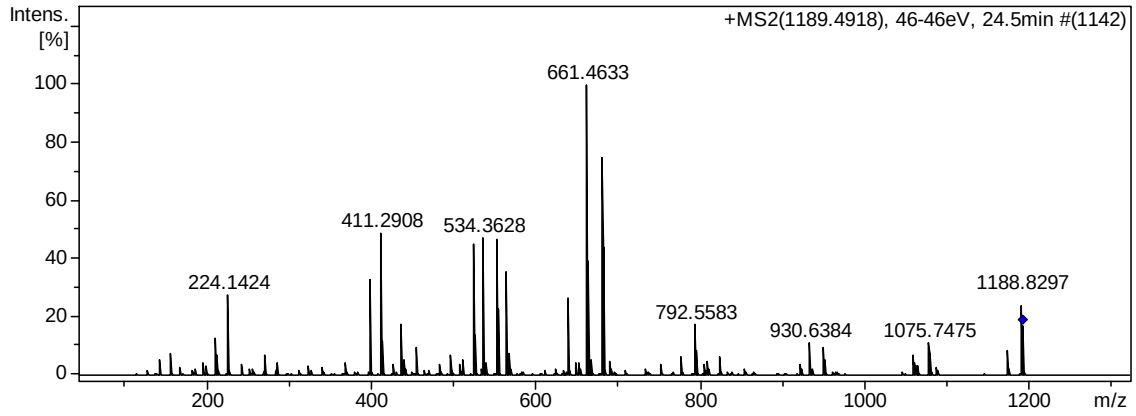


Figura 146. Espectro EM/EM del ion de *m/z* 1189 del compuesto **48**.

m/z	FM	asignación	error
397.2759	$C_{20}H_{37}N_4O_4$	b_4^{6-5}	12.5
524.3780	$C_{27}H_{50}N_5O_5$	b_5^{6-5}	6.3
534.3628	$C_{28}H_{48}N_5O_5$	$[b_5\text{-}18]^{1-11}$	3.9
637.4628	$C_{33}H_{61}N_6O_6$	b_6^{6-5}	5.1
661.4633	$C_{35}H_{61}N_6O_6$	$[b_6\text{-}18]^{1-11}$	2.6
679.4739	$C_{35}H_{63}N_6O_7$	b_6^{1-11}	2.8
930.6384	$C_{48}H_{84}N_9O_9$	$[b_9\text{-}18]^{1-11}$	0.9
948.6506	$C_{48}H_{86}N_9O_{10}$	b_9^{1-11}	2.3
1057.7353	$C_{55}H_{97}N_{10}O_{10}$	$[b_{10}\text{-}18]^{1-11}$	2.9
1075.7475	$C_{55}H_{99}N_{10}O_{11}$	b_{10}^{1-11}	1.3
1170.8206	$C_{61}H_{108}N_{11}O_{11}$	$[M+H\text{-}H_2O]^+$	1.5

Tabla 31. Iones observados en el espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **48**.

El espectro EM/EM del ión de *m/z* 1174 del componente **49** de t_R 24.4 minutos (figura 147) que por su fórmula molecular podía corresponder a Cs Q o R, presentó los fragmentos típicos de la ciclosporina Q, como pudo deducirse a partir de la tabla comparativa (tabla 32).

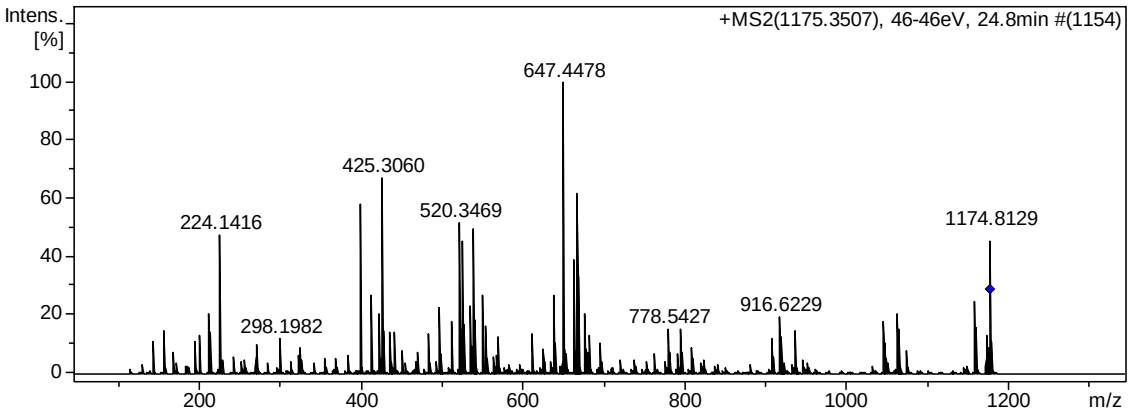


Figura 147. Espectro EM/EM del $[M+H]^+$ del compuesto **49**.

Fragmentos	$[b_5\text{-}18]^{1\text{-}11}$	$[b_6\text{-}18]^{1\text{-}11}$	$[b_9\text{-}18]^{1\text{-}11}$	$[b_{10}\text{-}18]^{1\text{-}11}$	$b_6^{1\text{-}11}$
Cs Q (Val^4 Cs)	520.4	647.5	916.7	1043.7	665.9
Cs R (Leu^6, Leu^{10} Cs)	548.5	661.4	930.7	1043.7	679.7
Compuesto 49	520.3469	647.4478	916.6229	1043.7180	665.4602

Fragmentos	$b_4^{6\text{-}5}$	$b_5^{6\text{-}5}$	$b_6^{6\text{-}5}$	$b_7^{6\text{-}5}$	$b_8^{6\text{-}5}$
Cs Q (Val^4 Cs)	397.3	524.4	637.5	820.6	919.6
Cs R (Leu^6, Leu^{10} Cs)	383.3	496.4	609.5	792.6	891.6
Compuesto 49	397.2756	524.3805	637.4616	-	-

Fragmentos	$b_4^{3\text{-}2}$	$b_5^{3\text{-}2}$	$b_6^{3\text{-}2}$	$b_7^{3\text{-}2}$	$b_8^{3\text{-}2}$
Cs Q (Val^4 Cs)	397.3	468.3	539.4	666.5	793.6
Cs R (Leu^6, Leu^{10} Cs)	411.3	482.3	553.4	680.5	793.6
Compuesto 49	397.32756	-	-	666.4901	-

Tabla 32. Tabla comparativa de algunos fragmentos típicos de Cs Q y Cs R y del componente **49** de t_R 24.4 minutos.

El espectro de EM/EM del ion *m/z* 1219 correspondiente al $[M+H]^+$ del componente que eluye a t_R 25.3 minutos (figura 148) presentó iones característicos de ciclosporina C (**50**) tal como se muestra en la tabla 33[46,48].

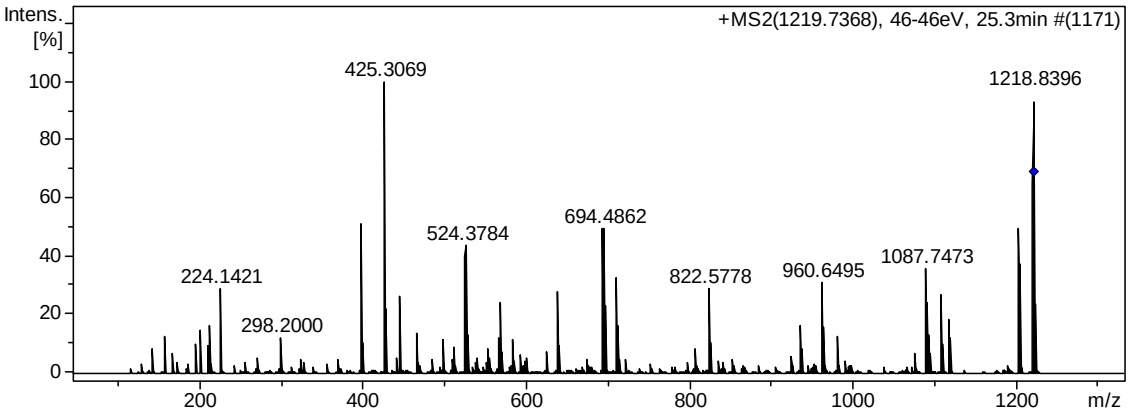


Figura 148. Espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **50**.

m/z	FM	Asignación	Error (ppm)
397.2753	$C_{20}H_{37}N_4O_4$	b_4^{6-5}	14
425.3069	$C_{22}H_{41}N_4O_4$	b_4^{3-2}	12.3
524.3784	$C_{27}H_{50}N_5O_5$	b_5^{6-5}	4.2
567.3831	$C_{28}H_{51}N_6O_6$	b_6^{3-2}	-6.0
637.4631	$C_{33}H_{61}N_6O_6$	b_6^{6-5}	-2.5
691.4757	$C_{36}H_{63}N_6O_7$	$[b_6\text{-}18]^{1-11}$	0.6
694.4862	$C_{35}H_{64}N_7O_7$	b_7^{3-2}	0.0
709.4861	$C_{36}H_{65}N_6O_8$	b_6^{1-11}	0.4
934.6667	$C_{48}H_{88}N_9O_9$	b_9^{3-2}	-3.5
960.6595	$C_{49}H_{86}N_9O_{10}$	$[b_9\text{-}18]^{1-11}$	0.3
978.6579	$C_{49}H_{88}N_9O_{11}$	b_9^{1-11}	1.9
1087.7473	$C_{56}H_{99}N_{10}O_{11}$	$[b_{10}\text{-}18]^{1-11}$	-1.5
1105.7565	$C_{56}H_{101}N_{10}O_{12}$	b_{10}^{1-11}	-2.7
1200.8309	$C_{62}H_{110}N_{11}O_{12}$	$[M+H\text{-}H_2O]^+$	-1.7

Tabla 33. Iones observados en el espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **50**.

El componente que eluye a 27.6 minutos presentó en el espectro de EM/EM del ion *m/z* 1189 (*m/z* 1188.8282 $[M+H]^+$, $C_{61}H_{110}N_{11}O_{12}$, 4.0 ppm) iones fragmento característicos de Cs E (**51**), muchos de los cuales difieren de los correspondientes a los otros posibles isómeros, por lo cual fue posible su distinción (figura 149, tabla 34)[46,48].

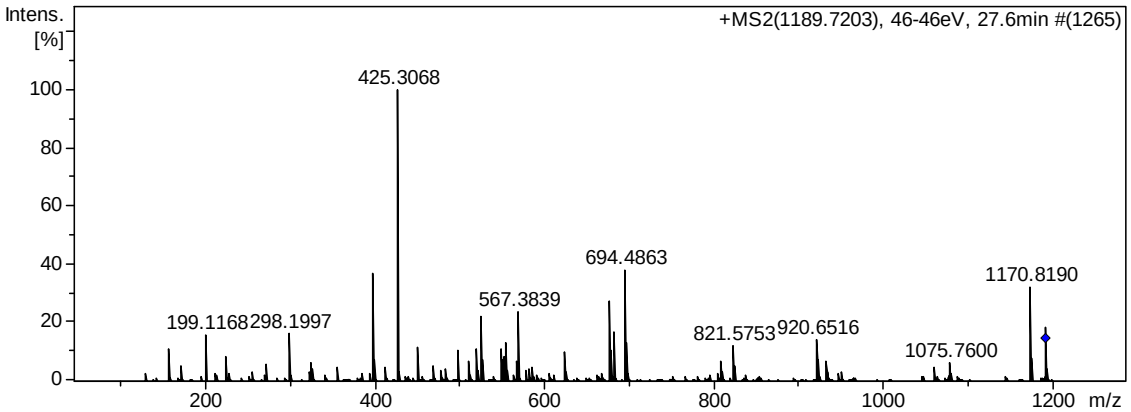


Figura 149. Espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **51**.

Fragmentos	b_4^{6-5}	b_5^{6-5}	b_6^{6-5}	b_4^{3-2}
Cs E (Val^{11} Cs)	397.3	524.4	623.3	425.3
Cs L (Bmt^{1} Cs)	397.3	524.2	637.2	425.3
Cs T (Leu^{10} Cs)	397.3	510.3	623.5	425.3
Cs U (Leu^{6})	383.1	510.3	623.3	411.0
Compuesto 51	397.2757	524.3775	623.4483	425.3068

Fragmentos	b_6^{3-2}	b_7^{3-2}	b_8^{3-2}	b_9^{2-3}
Cs E (Val^{11} Cs)	567.4	694.5	821.6	920.7
Cs L (Bmt^{1} Cs)	567.4	694.5	821.6	934.3
Cs T (Leu^{10} Cs)	567.4	694.5	807.5	920.7
Cs U (Leu^{6})	553.2	680.3	807.5	920.7
Compuesto 51	567.3839	694.4863	821.5753	920.6516

Tabla 34. Tabla comparativa de algunos fragmentos típicos de Cs E, Cs L, Cs T y Cs U y del componente **51** de t_R 27.6 minutos.

Los iones fragmento observados en el espectro EM/EM del ion m/z 1217 (*m/z* 1216.8588 $C_{63}H_{114}N_{11}O_{12}$, 4.5 ppm), correspondiente al [M+H]+ del componente **52** que eluye a 27.8 minutos pueden corresponder a Cs D, Cs G o Cs M ya que las tres no se distinguen por EM (figuras 150 y 151, tabla 35)[46,48].

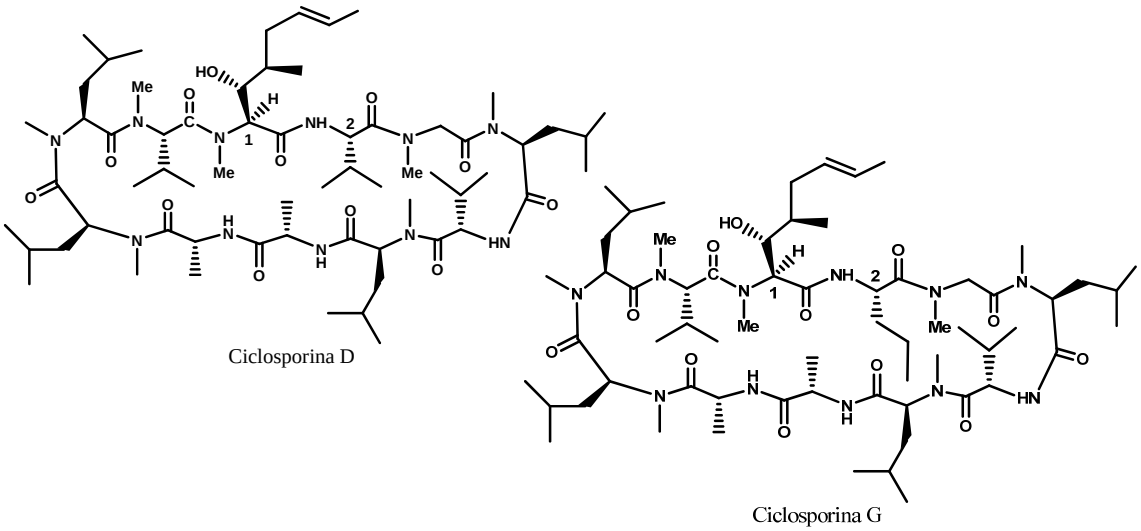


Figura 150. Ciclosporinas D (Val^{2} Cs) y G (Nva^{2} Cs).

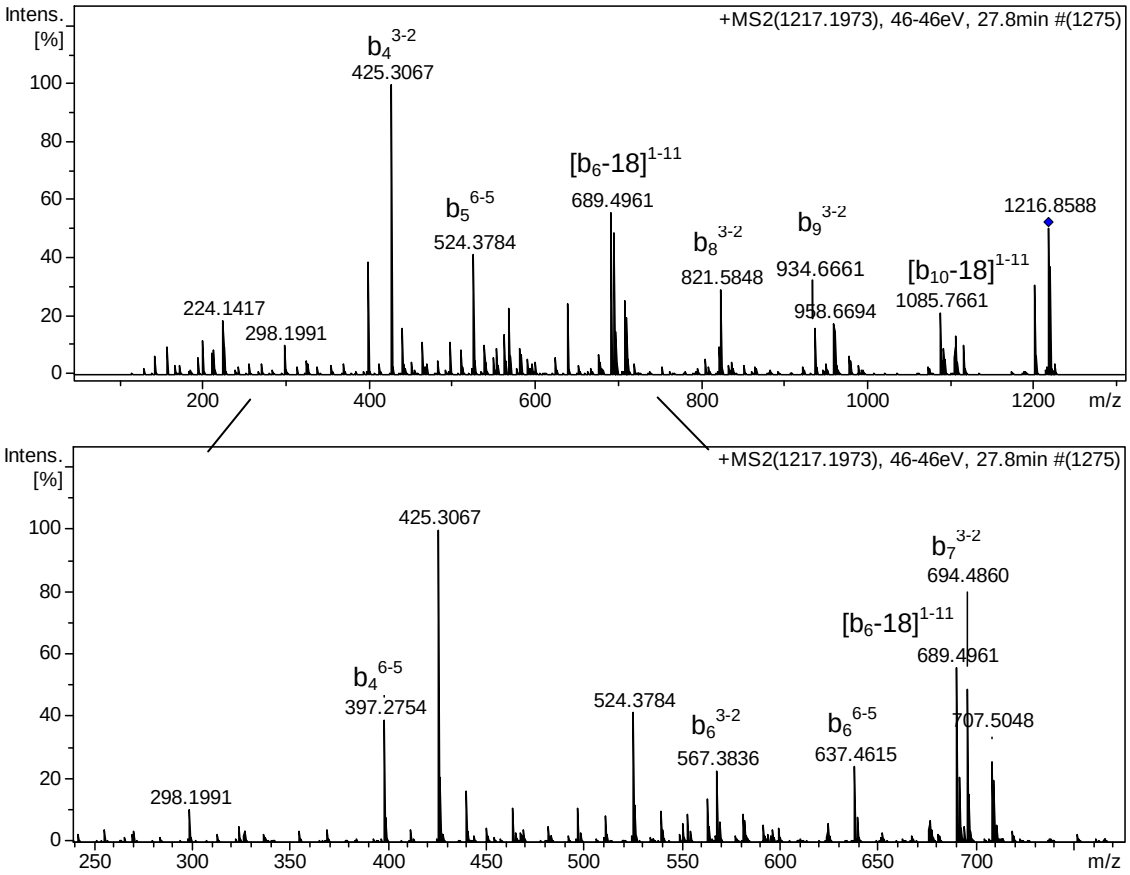


Figura 151. Espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **52**.

Fragmentos	b_4^{6-5}	b_5^{6-5}	b_6^{6-5}	b_5^{3-2}
Cs D (Val² Cs)	397.3	524.4	637.5	496.3
Cs G (Nva² Cs)	397.3	524.4	637.5	496.3
Cs M (Nva², Nva⁵ Cs)	397.3	524.4	637.5	496.3
Cs V (Abu⁷)	411.3	538.2	651.4	510.3
Compuesto 52	397.2754	524.3784	637.4615	496.3009

Fragmentos	b_6^{3-2}	b_7^{3-2}	b_8^{3-2}	b_9^{3-2}
Cs D (Val² Cs)	567.4	694.5	821.6	934.7
Cs G (Nva² Cs)	567.4	694.5	821.6	934.7
Cs M (Nva², Nva⁵ Cs)	567.4	694.5	821.6	934.7
Cs V (Abu⁷)	581.4	708.4	835.4	948.4
Compuesto 52	567.3836	694.4860	821.5848	934.6661

Tabla 35. Tabla comparativa de algunos fragmentos típicos de Cs D, Cs G, Cs M y Cs V y del componente **52** de t_R 27.8 minutos.

El espectro EM/EM del ion *m/z* 1187 (m/z 1186.8533 $[M+H]^+$, $C_{62}H_{112}N_{11}O_{11}$, 0.4 ppm, correspondiente al componente que eluye a 28.5 minutos) presentó todos los iones fragmento descriptivos de la ciclosporina F (**53**) (figura 152, tabla 36).

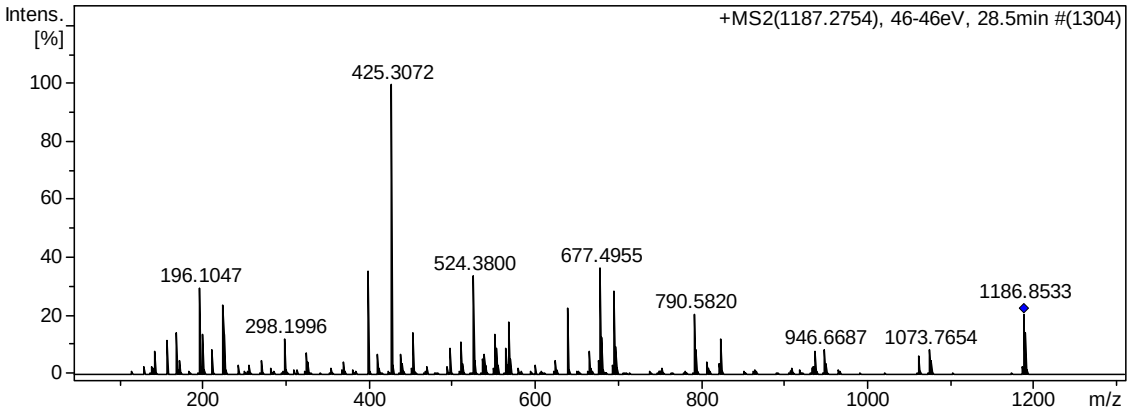


Figura 152. Espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **53**.

m/z	FM	Asignación	Error (ppm)
397.2764	$C_{20}H_{37}N_4O_4$	b_4^{6-5}	11.0
425.3072	$C_{22}H_{41}N_4O_4$	b_4^{3-2}	11.7
524.3800	$C_{27}H_{50}N_5O_5$	b_5^{6-5}	1.1
567.3838	$C_{28}H_{51}N_6O_6$	b_6^{3-2}	4.8
637.4636	$C_{33}H_{61}N_6O_6$	b_6^{6-5}	1.7
677.4955	$C_{36}H_{65}N_6O_6$	b_6^{1-11}	0.7
694.4876	$C_{35}H_{64}N_7O_7$	b_7^{3-2}	-2.0
821.5823	$C_{42}H_{77}N_8O_8$	b_8^{3-2}	4.4
934.6635	$C_{48}H_{88}N_9O_9$	b_9^{3-2}	7.0
946.6687	$C_{49}H_{88}N_9O_9$	b_9^{1-11}	1.4
1059.7563	$C_{55}H_{99}N_{10}O_{10}$	$[M+H\text{-}MeLeu]^+$	-2.2
1073.7654	$C_{56}H_{101}N_{10}O_{10}$	b_{10}^{1-11}	4.0

Tabla 36. Iones observados en el espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **53**.

Vale aclarar que el hecho de que se vean favorecidos determinados fragmentos depende del analizador empleado (de la escala de tiempo de análisis)[48] y que en la mayoría de los trabajos informados en la literatura se emplean trampas de iones.

De todos modos la correlación entre los fragmentos observados en este trabajo y los de literatura ha sido bastante buena. En particular en este trabajo se ha observado una muy buena intensidad relativa de los fragmentos diagnóstico sobre todo a masas más bajas, mejor que la obtenida en los trabajos informados, debido a las limitaciones de las trampas en este sentido. También en algunos casos se han obtenido otros fragmentos correspondientes a iones fragmento internos, que no han sido analizados en profundidad en este momento ya que no era el objetivo del trabajo.

Análisis de otros componentes presentes en el extracto de micelio

Durante el análisis de las ciclosporinas se detectó la presencia de otros componentes con PM alrededor de 600 u (ver tabla 29 con compuestos de micelio). Con las fórmulas moleculares encontradas para estos componentes se realizó una búsqueda en la literatura entre metabolitos fúngicos, principalmente del género *Fusarium*.

Se encontró entonces que el componente **54** con t_R 23.5 minutos podía corresponder al metabolito conocido como *N*-metilsansalvamida[51], y algunos de los componentes isómeros de t_R 22.4 (**55**) y 24.1 minutos (**56**) podían ser sansalvamida[52] (figura 153).

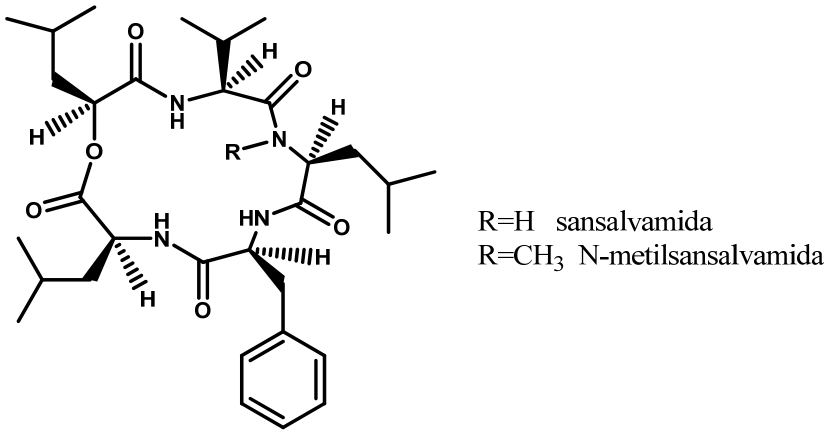


Figura 153. Estructura química de *N*-metilsansalvamida y sansalvamida.

La sansalvamida es un depsipéptido cíclico constituido por Val, 2 Leu, Phe y ácido leucico y la *N*-metilsansalvamida es su derivado metilado en una de las leucinas.

Con el fin de corroborar la identidad de la *N*-metilsansalvamida se seleccionó el ión de *m/z* 601, que se sometió a experimentos EM/EM (figura 154).

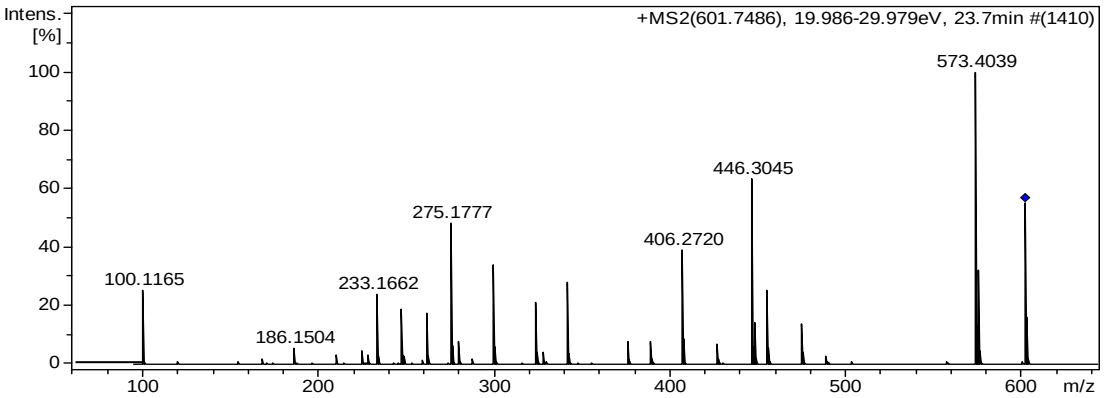
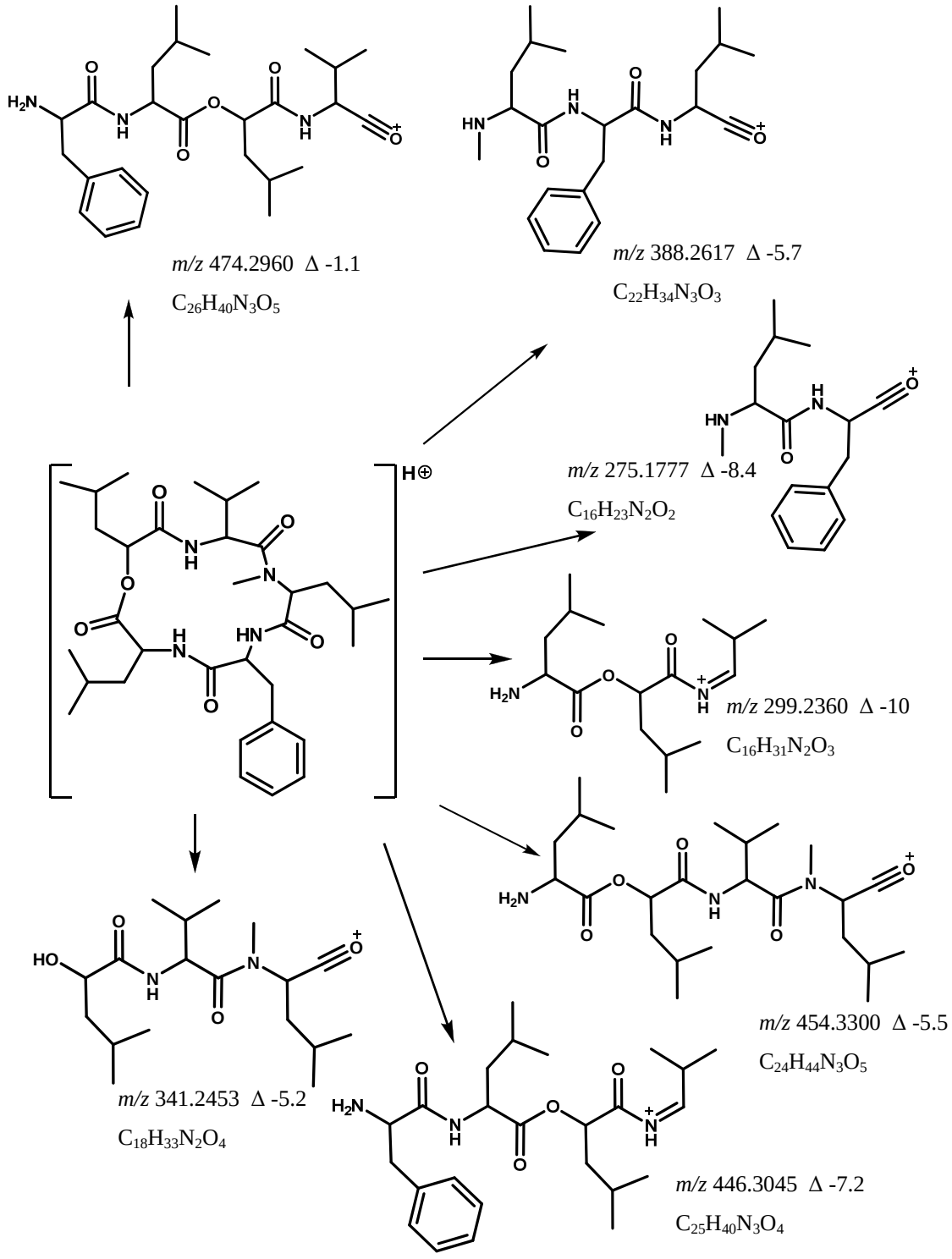


Figura 154. Espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **54**.

El ión *m/z* 573.4039 ($C_{32}H_{53}N_4O_5$, -5.0 ppm), que es el pico base del espectro EM/EM del ion m/z 601, se forma por pérdida de CO a partir del ión molecular protonado, y el resto de los iones observados corresponden a los fragmentos esperados para este compuesto. Algunos de ellos se muestran en el esquema 34. Se sobreentiende que se produce inicialmente la ruptura del ciclo y a partir del ion lineal se producen las fragmentaciones subsecuentes.



Esquema 34. Esquema de fragmentación de la *N*-metilsansalvamida.

Por lo tanto, se corroboró la identidad del componente **54** de t_R 23.5 minutos como *N*-metilsansalvamida.

Cuando se analizó el espectro EM/EM del ion *m/z* 587 (figura 155) correspondiente a uno de los componentes que podía ser sansalvamida (t_R 22.4 min.), en cambio se observó que los fragmentos no se correspondían con la estructura planteada, ya que se seguían observando fragmentos como los de *m/z* 275 y 341 que contenían N-MeLeu.

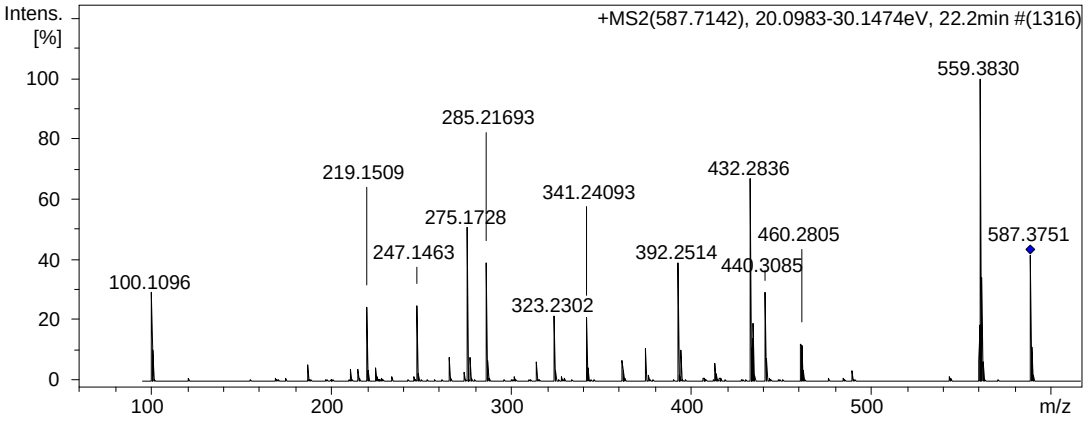


Figura 155. Espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **55**.

Se procedió entonces a dilucidar la estructura sobre la base de los fragmentos (esquema 35) y pudo determinarse que la estructura correspondía al péptido cíclico similar a la *N*-metilsansalvamida, en el cual la leucina no metilada estaba reemplazada por una valina tal como se observa en la figura 156.

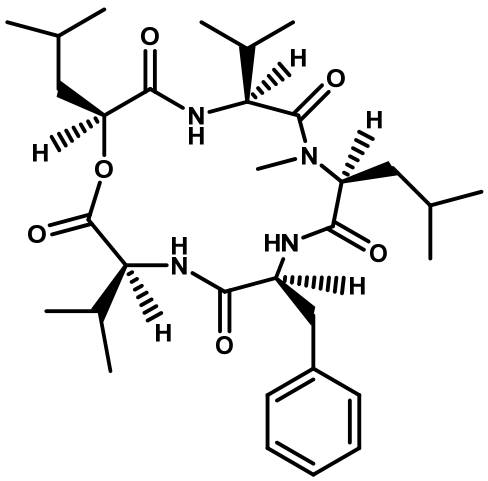
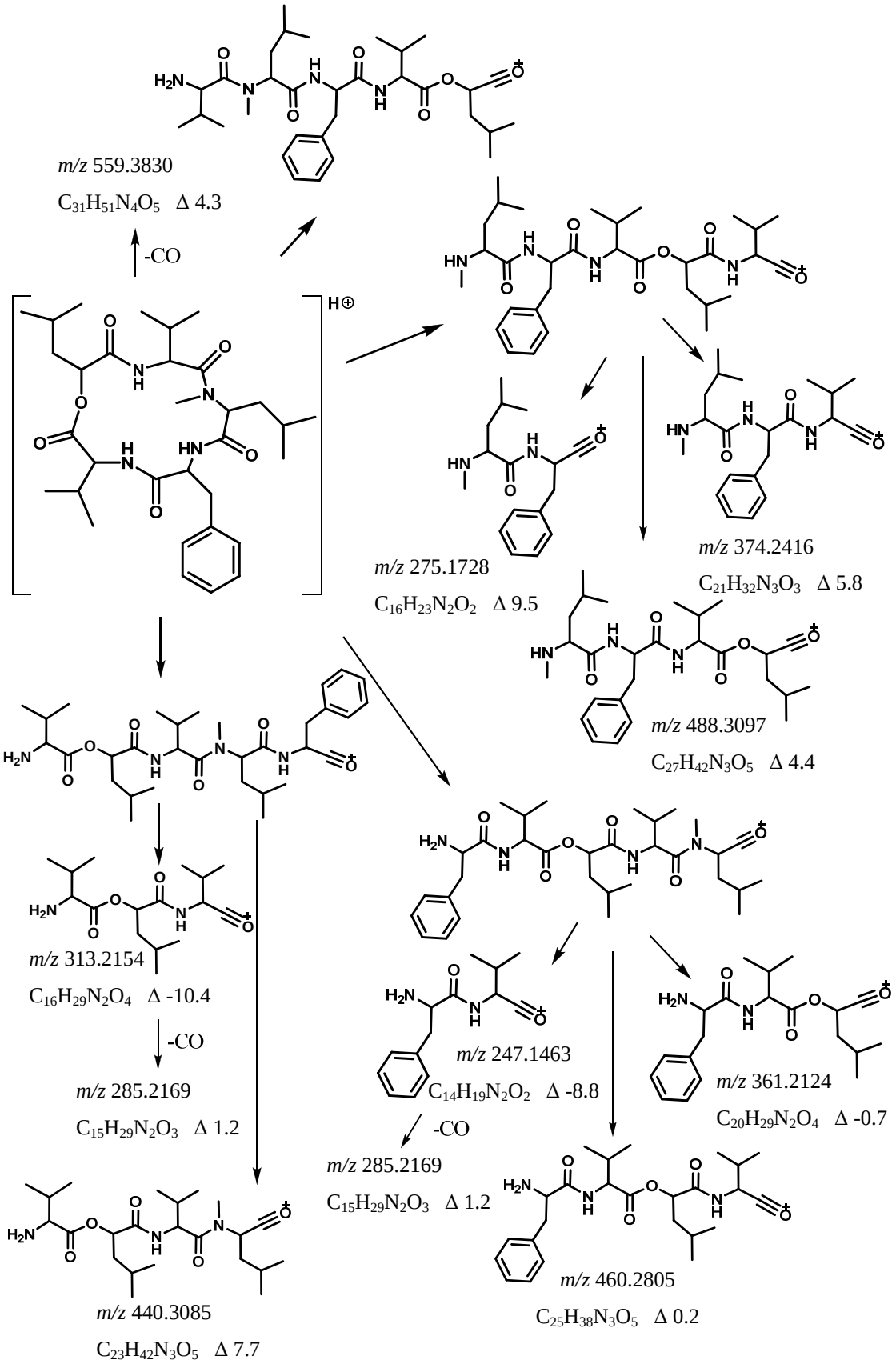
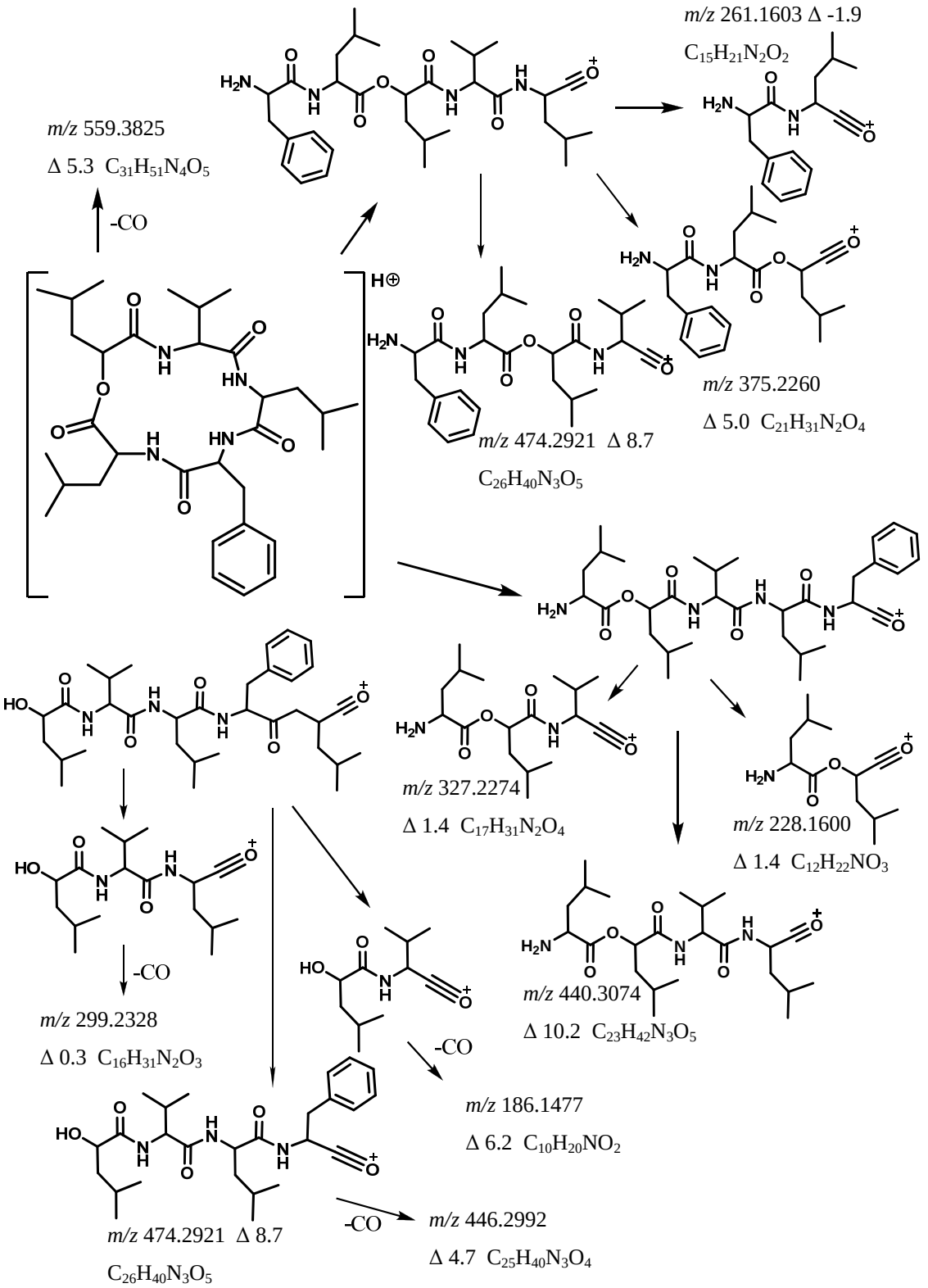


Figura 156. Estructura del compuesto **55**.



Esquema 35. Esquema de fragmentación del compuesto **55**.

El análisis del espectro EM/EM del ion m/z 587 obtenido a partir del componente **56** de t_R 24.1 minutos permitió determinar que este compuesto sí correspondía a sansalvamida. Se muestra el espectro en la figura 157 y el esquema de fragmentación en el esquema 36.



Esquema 36. Esquema de fragmentación del compuesto **56**.

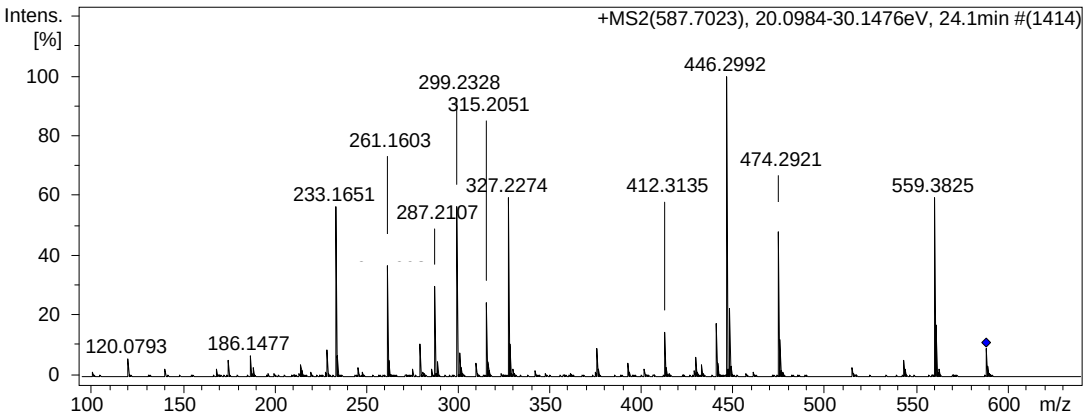


Figura 157. Espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **56**.

El componente de t_R 19.9 minutos (compuesto **57**) presentó en su espectro de EM/EM del ion $[M+H]^+$ *m/z* 619; iones fragmento característicos de la secuencia OLeu-Val-Leu-Phe-X (figura 158), donde X tendría una fórmula $C_7H_{14}NO_2$. Estos resultados podrían indicar que el compuesto **57** es la forma abierta O-metilada de la sansalvamida y no puede descartarse que sea un artefacto (figura 160).

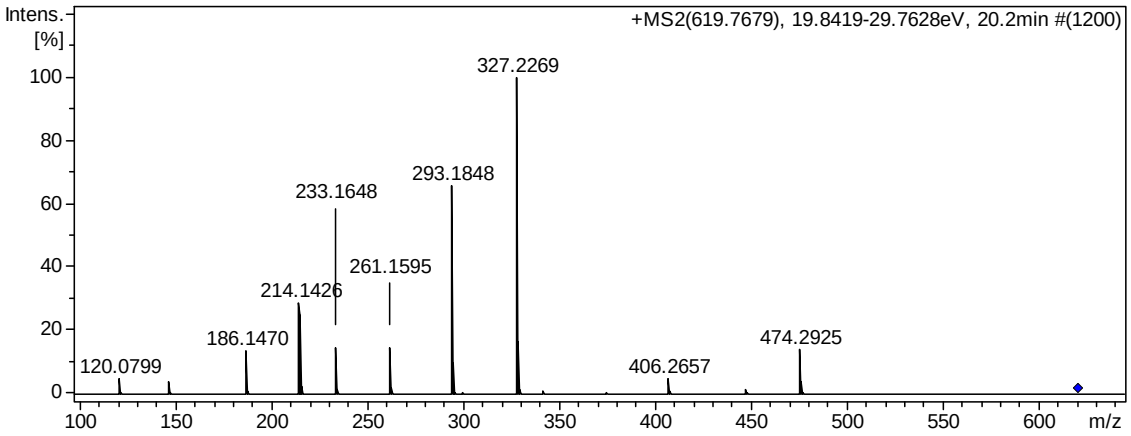


Figura 158. Espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **57**.

El componente de t_R 21.3 minutos (**58**) presentó en su espectro de EM/EM del ion *m/z* 633 ($[M+H]^+$) iones fragmento característicos de la secuencia OLeu-Val-N-MeLeu-Phe-X (figura 160), donde X al igual que en el caso anterior tendría una FM $C_7H_{14}NO_2$. Esto indicaría que este compuesto **58** sería la forma abierta O-metilada de la *N*-metilsansalvamida. Este compuesto fue preparado previamente durante la elucidación estructural de la *N*-metilsansalvamida[51], y no puede descartarse tampoco que en este caso sea un artefacto.

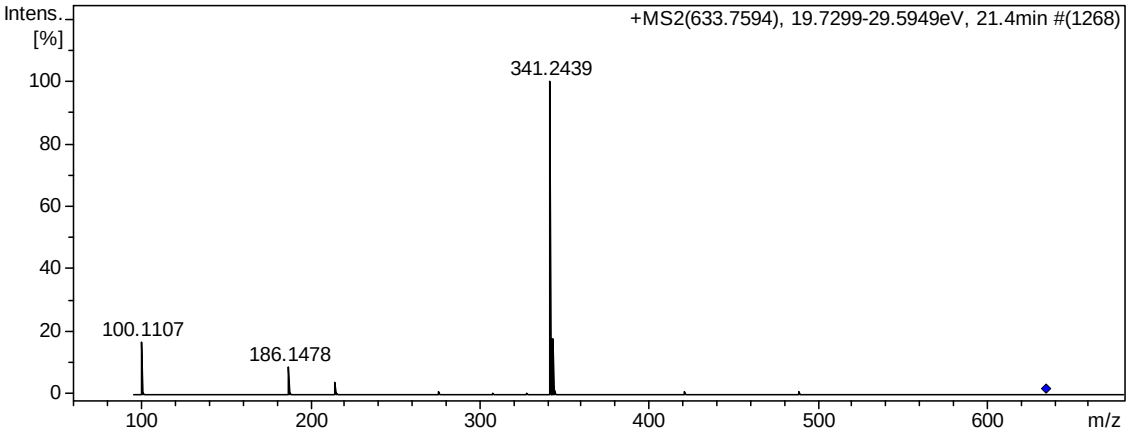


Figura 159. Espectro EM/EM del ion $[M+H]^+$ del compuesto **58**.

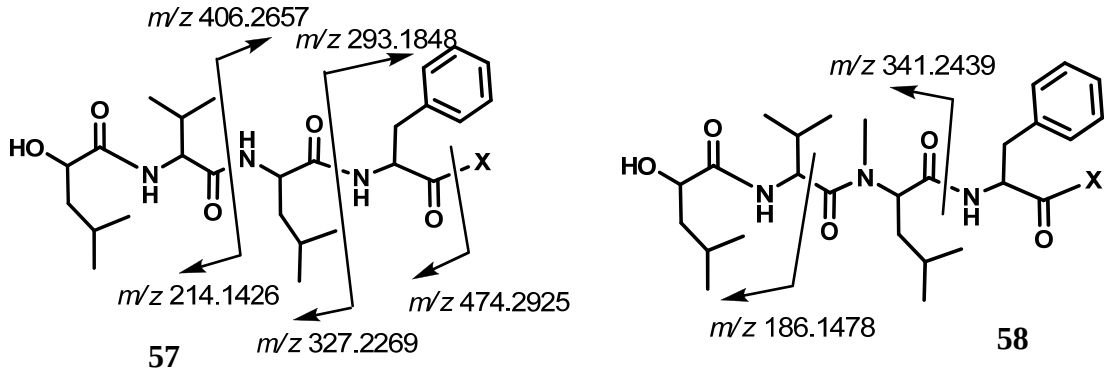


Figura 160. Fragmentos de los compuestos **57** y **58**.

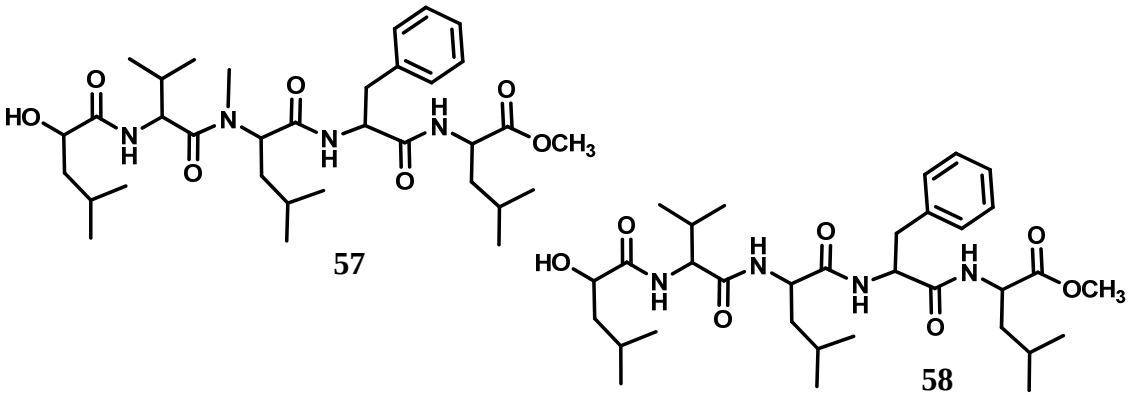


Figura 161. Estructuras de los compuestos **57** y **58**.

El componente de t_R 22.4 minutos de *m/z* 669 de masa nominal correspondiente al $[M+Na]^+$ presentó en el espectro correspondiente ionizado con APCI una abundancia

relativa muy baja como para poder ser analizado por EM/EM y por lo tanto no pudo determinarse su estructura.

Se identificaron por lo tanto en este trabajo tres sansalvamidas (**54**, **55** y **56**), una de las cuales no había sido informada previamente.

Con respecto a estos péptidos cíclicos no hay en literatura muchos más ejemplos. Además de los mencionados sansalvamida[52] y *N*-metilsansalvamida[51] se ha presentado una patente en el año 2009 sobre la producción de este tipo de compuestos también por una cepa de *Fusarium*. Los compuestos presentados en la patente poseen varias bioactividades como antibiótica y citotóxica[53].

Conclusiones

A partir de unos pocos mg de un extracto crudo de micelio de un cultivo de una cepa de *Fusarium oxysporum*, y empleando ESI y/o APCI-HPLC-EM y EM/EM fue posible evaluar la riqueza química del extracto.

Se identificaron las ciclosporinas A, H o isociclosporina A, B, C, E, F, Q y D, G o M. Se observó también la presencia de otras ciclosporinas minoritarias, algunas de las cuales no tienen PM de ciclosporinas conocidas, que debido a la baja intensidad de los iones $[M+H]^+$ no pudieron ser analizadas por EM/EM.

También se identificaron los péptidos cíclicos sansalvamida, *N*-metilsansalvamida y otra *N*-metilsansalvamida no informada previamente.

Puede concluirse que el análisis fue exitoso, que el extracto de la cepa presentó una riqueza química poco habitual y que merece profundizarse su análisis.

Detalles Experimentales

La cepa *Fusarium oxysporum* LMS-L11 fue aislada de suelo de cultivos de lechuga y clasificada por la Dra. Alejandra Rodríguez (Dto. de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEyN, Universidad de Buenos Aires). Se recolectaron áreas de suelo donde había supresión de *Sclerotinia sclerotiorum* (la cepa es antagonista de esta especie) y se aisló la cepa de *F. oxysporum* por lavado de partículas de ese suelo. Se inoculó en medio de malta agarizado, en cajas de Petri, donde se desarrolló la cepa *F. oxysporum*[30].

Cultivo de *F. oxysporum* en el laboratorio

Se fermentaron 5 litros de medio de cultivo de la cepa *F. oxysporum* utilizando extracto de malta 30% cuya composición se describe detalladamente en la parte experimental general, capítulo 7. En primer lugar se inocularon 5 erlenmeyers de 250 ml conteniendo 75 ml de extracto de malta cada uno. El inóculo se hizo introduciendo un corte del micelio del hongo (de 1 x 1 cm aproximadamente) crecido sobre medio agarizado en cajas de Petri. Luego de una semana de fermentación en estufa a 25°C, el contenido de cada erlenmeyer se trasvasó a un erlenmeyer de 4 l conteniendo 1 l de medio cada uno, los cuales se mantuvieron a 25°C sin agitación durante cuatro semanas. Cabe mencionar que se cultivaron 5 l ya que al momento del cultivo aún no se disponía del uso del instrumental para hacer HPLC-EM.

Extracción de *F. oxysporum*

Los 5 litros de cultivo se filtraron para separar el micelio del medio acuoso. La fase acuosa se extrajo con amberlite XAD-16. El material se desorbió utilizando MeOH y se evaporó a presión reducida obteniéndose 1.3 g de extracto de medio de cultivo. Por otra parte, el micelio se cortó en partes pequeñas y se extrajo utilizando EtOH y AcOEt sucesivamente. Nuevamente se obtuvo el residuo seco por evaporación a presión reducida (500 mg).

Se tomaron 5-10 mg de los extractos, se diluyeron con 1 ml de MeOH y las soluciones resultantes se usaron directamente en los experimentos de HPLC-EM.

Experimentos HPLC-EM y EM/EM

Con el fin de optimizar el sistema cromatográfico para el análisis por HPLC-EM de las ciclosporinas presentes en los extractos de *F. oxysporum* se utilizaron las columnas: Luna C-18 Phenomenex, 3 µm, 100 x 2.0 mm; Luna PFP (2) Phenomenex, 3 µm, 100 x 2.0 mm; Kinetex HILIC Phenomenex, 2.6 µm, 150 x 2.10 mm, y C-8 Pinacle II Restek, 5 µm, 150 x 4.6 mm. Para las columnas C8, C18 y PFP se emplearon diferentes gradientes de H_2O-MeOH, HCOOH 0.1%-MeOH, H_2O-CH_3CN y HCOOH 0.1 %-CH_3CN de polaridad decreciente. Con la columna HILIC se emplearon los mismos sistemas de solventes pero los gradientes fueron de polaridad creciente. Las condiciones óptimas se hallaron utilizando la columna Luna PFP para el extracto de medio y Luna C-18 para el extracto de micelio. Se empleó un gradiente HCOOH 0.1%-MeOH 45:55 (2 min.) a MeOH 100% a los 30 minutos e isocrático en MeOH por el resto de la corrida para ambos extractos.

Se empleó un flujo de 0.3 ml/min y 30° C.

Condiciones de la fuente ESI: capilar 4.5 kV, nebulizador 0.4 bar, gas de secado 4.0 l/min, temperatura 160 °C.

Condiciones de la fuente APCI: capilar 4.5 kV, nebulizador 3 bar, gas de secado 6.0 l/min, temperatura 200°C.

Condiciones generales de CID: modo automático, ventana de 5 a 10 u dependiente del PM, energía de colisión 15 a 30 eV o 22 a 45 eV dependiente de PM.

Bibliografía

(1) Middlesworth, F.; Cannell, R. J. P. "*Dereplication and Partial Identification of Natural Products*" en "Natural Products Isolation"; Cannell, R. J. P., Ed.; Humana Press: Totowa, New Jersey, **1998**; Vol. 4, p 279-327.

(2) Hook, D. J.; Pack, E. J.; Yacobucci, J. J.; Guss, J. "Approaches to Automating the Dereplication of Bioactive Natural Productsâ€"The Key Step in High Throughput Screening of Bioactive Materials From Natural Sources" *Journal of Biomolecular Screening* **1997**, *2*, 145-152.

(3) Smedsgaard, J.; Frisvad, J. C. "Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts" *Journal of Microbiological Methods* **1996**, *25*, 5-17.

(4) Smedsgaard, J. "Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures" *Journal of Chromatography A* **1997**, *760*, 264-270.

(5) Scott, P. M.; Lawrence, J. W.; van Walbeek, W. "Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts" *Applied Microbiology* **1970**, *20*, 839-842.

(6) Frisvad, J. C. "The use of high-performance liquid chromatography and diode array detection in fungal chemotaxonomy based on profiles of secondary metabolites" *Botanical Journal of the Linnean Society* **1989**, *99*, 81-95.

(7) Smedsgaard, J. r.; Hansen, M. E.; Frisvad, J. C. "Classification of terverticilliate by electrospray mass spectrometric profiling" *Studies in Mycology* **2004**, *49*, 243-251.

(8) Smedsgaard, J. r.; Nielsen, J. "Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics" *Journal of Experimental Botany* **2005**, *56*, 273-286.

(9) Moco, S.; Vervoort, J.; Moco, S.; Bino, R. J.; De Vos, R. C. H.; Bino, R. "Metabolomics technologies and metabolite identification" *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2007**, *26*, 855-866.

(10) Schroeder, F. C.; Gibson, D. M.; Churchill, A. C. L.; Sojikul, P.; Wursthorn, E. J.; Krasnoff, S. B.; Clardy, J. "Differential Analysis of 2D NMR Spectra: New Natural Products from a Pilot-Scale Fungal Extract Library" *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 901-904.

(11) Jewett, M. C.; Hofmann, G.; Nielsen, J. "Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics" *Current Opinion in Biotechnology* **2006**, *17*, 191-197.

(12) Dettmer, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. "Mass spectrometry-based metabolomics" *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, *26*, 51-78.

(13) Moslem, M.; Abd-Elsalam, K.; Yassin, M.; Bahkali, A. "First morphomolecular identification of penicillium griseofulvum and penicillium aurantiogriseum toxicogenic isolates associated with blue mold on apple" *Foodborne Pathogens and Disease* **2010**, *7*, 857-861.

(14) Wang, M.; Liu, S.; Li, Y.; Xu, R.; Lu, C.; Shen, Y. "Protoplast mutation and genome shuffling induce the endophytic fungus Tubercularia sp. TF5 to produce new compounds" *Current microbiology* **2010**, *61*, 254-260.

(15) Hansen, M. E.; Smedsgaard, J.; Larsen, T. O. "X-hitting: An algorithm for novelty detection and dereplication by UV spectra of complex mixtures of natural products" *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 6805-6817.

(16) Sy-Cordero, A. A.; Graf, T. N.; Wani, M. C.; Kroll, D. J.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. "Dereplication of macrocyclic trichothecenes from extracts of filamentous fungi through UV and NMR profiles" *J Antibiot* **2010**, *63*, 539-544.

(17) Bringmann, G.; Lang, G.; Steffens, S.; Günther, E.; Schaumann, K. "Evariquinone, isoemericellin, and stromemycin from a sponge derived strain of the fungus Emericella variecolor" *Phytochemistry* **2003**, *63*, 437-443.

(18) Bobzin, S. C.; Yang, S.; Kasten, T. P. "LC-NMR: a new tool to expedite the dereplication and identification of natural products" *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2000**, *25*, 342-345.

(19) Lang, G.; Mayhudin, N. A.; Mitova, M. I.; Sun, L.; Van Der Sar, S.; Blunt, J. W.; Cole, A. L. J.; Ellis, G.; Laatsch, H.; Munro, M. H. G. "Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: New methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts" *Journal of Natural Products* **2008**, *71*, 1595-1599.

(20) Mitova, M. I.; Murphy, A. C.; Lang, G.; Blunt, J. W.; Cole, A. L. J.; Ellis, G.; Munro, M. H. G. "Evolving trends in the dereplication of natural product extracts. 2. The isolation of chrysaibol, an antibiotic peptaibol from a New Zealand sample of the mycoparasitic fungus Sepedonium chrysospermum" *Journal of Natural Products* **2008**, *71*, 1600-1603.

(21) Edrada, R. A.; Heubes, M.; Brauers, G.; Wray, V.; Berg, A.; Gräfe, U.; Wohlfarth, M.; Mühlbacher, J.; Schaumann, K.; Sudarsono; Bringmann, G.; Proksch, P. "Online Analysis of Xestodecalactones A-C, Novel Bioactive Metabolites from the Fungus Penicillium cf. montanense and Their Subsequent Isolation from the Sponge Xestospongia exigua[#]" *Journal of Natural Products* **2002**, *65*, 1598-1604.

(22) Bringmann, G.; Messer, K.; Wohlfarth, M.; Kraus, J.; Dumbuya, K.; Rückert, M. "HPLC-CD On-Line Coupling in Combination with HPLC-NMR and HPLC-MS/MS for the Determination of the Full Absolute Stereostructure of New Metabolites in Plant Extracts" *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 2678-2686.

(23) Strege, M. A. "High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening" *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1999**, *725*, 67-78.

(24) Potterat, O.; Wagner, K.; Haag, H. "Liquid chromatography-electrospray time-of-flight mass spectrometry for on-line accurate mass determination and identification of cyclodepsipeptides in a crude extract of the fungus Metarrhizium anisopliae" *Journal of Chromatography A* **2000**, *872*, 85-90.

(25) Gautschi, J. T.; Amagata, T.; Amagata, A.; Valeriote, F. A.; Mooberry, S. L.; Crews, P. "Expanding the Strategies in Natural Product Studies of Marine-Derived Fungi: A Chemical Investigation of Penicillium Obtained from Deep Water Sediment" *Journal of Natural Products* **2004**, *67*, 362-367.

(26) Senyuva, H. Z.; Gilbert, J. "*Rapid analysis of crude fungal extracts for secondary metabolites by LC/TOF-MS-A new approach to fungal characterization*", Agilent Technologies, **2010**. http://www.chem.agilent.com/en-US/Search/Library/_layouts/Agilent/PublicationSummary.aspx?whid=52177

(27) Tang, J. S.; Zhao, F.; Gao, H.; Dai, Y.; Yao, Z. H.; Hong, K.; Li, J.; Ye, W. C.; Yao, X. S. "Characterization and online detection of surfactin isomers based on HPLC-MSn analyses and their inhibitory effects on the overproduction of nitric oxide and the release of TNF-Î± and IL-6 in LPS-induced macrophages" *Marine Drugs* **2010**, *8*, 2605-2618.

(28) Engene, N.; Choi, H.; Esquenazi, E.; Rottacker, E. C.; Ellisman, M. H.; Dorrestein, P. C.; Gerwick, W. H. "Underestimated biodiversity as a major explanation for the perceived rich secondary metabolite capacity of the cyanobacterial genus Lyngbya" *Environmental Microbiology* **2011**, *13*, 1601-1610.

(29) Silva-Stenico, M. E.; Silva, C. S. P.; Lorenzi, A. S.; Shishido, T. K.; Etchegaray, A.; Lira, S. P.; Moraes, L. A. B.; Fiore, M. F. "Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity" *Microbiological Research* **2011**, *166*, 161-175.

(30) Rodríguez, M. A.; Cabrera, G.; Godeas, A. "Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*" *Journal of Applied Microbiology* **2006**, *100*, 575-586.

(31) Sakamoto, K.; Tsujii, E.; Miyauchi, M.; Nakanishi, T.; Yamashita, M.; Shigematsu, N.; Tada, T.; Izumi, S.; Okuhara, M. "FR901459, a novel immunosuppresant isolated from *Stachybotrys chartarum* No. 19392. Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities" *Journal of Antibiotics* **1993**, *46*, 1788-1798.

(32) Sakamoto, K.; Tsujii, E.; Miyauchi, M.; Nakanishi, T.; Yamashita, M.; Shigematsu, N.; Tada, T.; Izumi, S.; Okuhara, M. "Correction: FR901459, a novel immunosuppressant isolated from *Stachybotrys chartarum* No. 19392. Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities " *Journal of Antibiotics* **1994**, *47*.

(33) Balakrishnan, K.; Pandey, A. "The panorama of cyclosporin research" *Journal of Basic Microbiology* **1996**, *36*, 121-147.

(34) Kahan, B. D. "Immunosuppressive therapy" *Current Opinion in Immunology* **1992**, *4*, 553-560.

(35) Pratschke, J.; Tullius, S. G.; Neuhaus, P. "Immunosuppression in solid organ transplantation: A review" *Graft* **2002**, *5*, 338-343.

(36) Evers, M.; Barrière, J.-C.; Bashiardes, G.; Bousseau, A.; Carry, J.-C.; Dereu, N.; Filoche, B.; Henin, Y.; Sablé, S.; Vuilhorgne, M.; Mignani, S. "Synthesis of non-immunosuppressive cyclophilin-Binding cyclosporin A derivatives as potential anti-HIV-1 drugs" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 4415-4419.

(37) Morton, S. J.; Powell, R. J. "An audit of cyclosporin for systemic lupus erythematosus and related overlap syndromes: limitations of its use" *Annals of the Rheumatic Diseases* **2000**, *59*, 487-489.

(38) Cruz, M. C.; Del Poeta, M.; Wang, P.; Wenger, R.; Zenke, G.; Quesniaux, V. F. J.; Movva, N. R.; Perfect, J. R.; Cardenas, M. E.; Heitman, J. "Immunosuppressive and nonimmunosuppressive cyclosporine analogs are toxic to the opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* via cyclophilin-dependent inhibition of calcineurin" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**, *44*, 143-149.

(39) Traber, R.; Hofmann, H.; Loosli, H. R. "Novel cyclosporins from *Tolypocladium inflatum*. The cyclosporins K-Z" *Helvetica Chimica Acta* **1987**, *70*, 13-36.

(40) Buchta, M.; Jegorov, A.; Cvak, L.; Havlíček, V.; Buděšínský, M.; Sedmera, P. "A cyclosporin from *Mycelium sterilae*" *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1195-1198.

(41) Jegorov, A.; Maťha, V.; Sedmera, P.; Havlíček, V.; Stuchlík, J.; Seidel, P.; Šimek, P. "Cyclosporins from *Tolypocladium terricola*" *Phytochemistry* **1995**, *38*, 403-407.

(42) Sedmera, P.; Havliček, V.; Jegorov, A.; Segre, A. L. "Cyclosporin D hydroperoxide a new metabolite of *Tolypocladium terricola*" *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 6953-6956.

(43) Havlíček, V.; Jegorov, A.; Sedmera, P.; Wagner-Redeker, W.; Ryska, M. "Distinguishing isobaric amino acids in sequence analysis of cyclosporins by fast atom bombardment and linked-scan mass spectrometry" *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, *30*, 940-948.

(44) Roepstorff, P.; Fohlman, J. "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides" *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, *11*, 601.

(45) Biemann, K. "Mass Spectrometry of Peptides and Proteins" *Annual Review of Biochemistry* **1992**, *61*, 977-1010.

(46) Havlíček, V.; Jegorov, A.; Sedmera, P.; Ryska, M. "Sequencing of cyclosporins by fast atom bombardment and linked-scan mass spectrometry" *Organic Mass Spectrometry* **1993**, *28*, 1440-1447.

(47) Vaisar, T.; Urban, J. "Gas-phase fragmentation of protonated mono-N-methylated peptides. Analogy with solution-phase acid-catalyzed hydrolysis" *Journal of Mass Spectrometry* **1998**, *33*, 505-524.

(48) Jegorov, A.; Havlíček, V. "Spontaneous N → O acyl shift in the [M + H]+ ions of [MeBmt1]-cyclosporins in an ion trap" *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36*, 633-640.

(49) Kuzma, M.; Jegorov, A.; Hesso, A.; Tornaeus, J.; Sedmera, P.; Havlíček, V. "Role of amino acid N-methylation in cyclosporins on ring opening and fragmentation mechanisms during collisionally induced dissociation in an ion trap" *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *37*, 292-298.

(50) Kuzma, M.; Sedmera, P.; Jegorov, A.; HavlÃ-cek, V. "Cyclosporins from Mycelium sterilae MS 2929" *J Nat Prod* **2009**, *72*, 159-163.

(51) Cueto, M.; Jensen, P. R.; Fenical, W. "N-Methylsansalvamide, a cytotoxic cyclic depsipeptide from a marine fungus of the genus *Fusarium*" *Phytochemistry* **2000**, *55*, 223-226.

(52) Belofsky, G. N.; Jensen, P. R.; Fenical, W. "Sansalvamide: a new cytotoxic cyclic depsipeptide produced by a marine fungus of the genus *Fusarium*" *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 2913-2916.

(53) Lee, C.; Song, H. H.; Lee, H. S. "*Fusarium solani* strain producing cyclic pentadepsipeptides" **2010**, Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.

➢ Instrumentos y métodos empleados

Las rotaciones ópticas fueron determinadas en un polarímetro Perkin-Elmer 141 o Perkin-Elmer 343 (UMYMFOR-DQO), empleando una lámpara de sodio (λ = 589 nm), en microceldas de 1 dm de longitud a temperatura ambiente, utilizando el solvente y la concentración que se indica en cada caso.

Los espectros de absorción en el infrarrojo fueron efectuados en un espectrofotómetro Nicolet-Magna 550 FT-IR (UMYMFOR-DQO). Se utilizó la técnica de pastilla, homogeneizando la muestra con KBr (anh) y compactando la misma mediante el uso del dispositivo QWIK Handi-Press.

Los espectros UV fueron obtenidos con un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8453 (DQO) con arreglo de diodos para los compuestos aislados de *Penicillium canescens* y *Gliocladium catenulatum*, utilizando los solventes y concentraciones que se señalan en cada caso.

Los espectros de masa por EI a 70 eV, de los compuestos aislados fueron efectuados en un espectrómetro de masa tipo cuadrupolo Trio-2 VG o Shimadzu QP5000 (UMYMFOR-DQO)

Los espectros de LSIMS fueron realizados en un híbrido BEqQ (UMYMFOR, FCEN, UBA).

Los espectros de EM y EM/EM de alta precisión del compuesto **5** fueron realizados en un equipo Micromass Ultima Global QTOF high resolution mass spectrometer con fuente dual ESI-APCI, Universidad de California Riverside, EE. UU. Los espectros de EM y EM/EM del resto de los compuestos fueron realizados en un equipo Bruker MicrOTOF QII (UMYMFOR, FCEN, UBA) empleando fuentes APCI, APPI o ESI. Debido a que todos los espectros se obtuvieron con alta precisión, no se hace indicación particular de este hecho en el texto.

Para las corridas de HPLC-EM se empleó el mismo instrumento acoplado a un HPLC Agilent serie 1200.

Los experimentos EM^2 y EM^3 presentados en el capítulo 5 se llevaron a cabo en un equipo Polaris Q Thermo Electron Corporation que posee un analizador de masas tipo trampa de iones. Se utilizó una fuente de Ionización Química, empleando Isobutano 5.0 para generar el gas reactivo.

La nomenclatura utilizada para espectrometría de masa es la recomendada por IUPAC[1,2].

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{1}H y ^{13}C se midieron en los instrumentos Bruker AC-200 (200,13 y 50,32 MHz respectivamente), Bruker AM 500 (500,13 y 125,13 MHz) (UMYMFOR), Bruker Avance 400 (400 y 100 MHz) (compuesto **3**,), (INTI) y Bruker Avance 500 (500.13 y 125.13 MHz) (UMYMFOR).

Los desplazamientos químicos para RMN en todos los casos se expresaron en la escala δ, en ppm respecto de la resonancia del tetrametilsilano utilizado como referencia interna (0,00 ppm) o el pico central del solvente utilizado según el caso, cloroformo-d_1 (7.26 ppm), metanol-d_4 (3.30 ppm) o DMSO-d_6 (2.50 ppm). Los desplazamientos químicos para RMN-^{13}C se expresaron en ppm utilizando como referencia el pico central de la señal del cloroformo-d_1 (77.0 ppm), metanol-d_4 (49.0 ppm) o DMSO-d_6 (39.7 ppm).

Los experimentos de RMN-2D fueron adquiridos utilizando secuencias de pulsos estándar.

Todos los solventes empleados fueron purificados por destilación. La evaporación de los mismos fue efectuada a temperaturas menores de 40˚C y a presión reducida en evaporador rotatorio Büchi o en evaporador centrífugo SpeedVac SC210A. Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes (v/v).

Los solventes deuterados utilizados fueron los comercializados por Aldrich.

➢ Métodos cromatográficos

a) Cromatografía en capa delgada

Se utilizaron las siguientes cromatoplacas:

- Sílicagel 60 preparadas sobre hojas de aluminio (Merck), espesor 0.2 mm, con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm (F_{254}).
- Sílicagel 60 preparadas sobre placas de vidrio (Merck), espesor 0.2 mm, con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm (F_{254}).
- Sílicagel modificada de fase reversa C_{18} preparadas sobre hojas de aluminio (Merck), con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm (F_{254}).

Como agentes reveladores se utilizaron luz UV (λ = 254 nm y λ = 366 nm), vainillina/H_2SO_4 (c) y posterior calentamiento en estufa a 110˚C[3] y/o vapores de I_2.

b) Cromatografía en capa delgada preparativa

Se utilizaron las mismas cromatoplacas y los mismos reveladores que en el caso anterior y también se utilizaron cromatoplacas con zona de concentración (Merck).

c) Cromatografía flash en columna seca[4]

Este método fue efectuado para un fraccionamiento rápido de los extractos, para obtener una separación de los compuestos en grandes grupos de acuerdo con sus polaridades. Se emplearon embudos con placa filtrante de vidrio sinterizado, poro 3 o 4, de distintos tamaños según la masa de extracto a purificar y con aplicación de succión. Las muestras fueron sembradas en pastilla.

Los extractos se purificaron mediante la utilización de sílicagel 60 G (Merck) como fase estacionaria, eluyendo con gradiente creciente en polaridad según se indicó en cada caso; sílicagel modificada de fase reversa C_{18} (Aldrich Chemical Co), eluyendo con gradiente decreciente en polaridad de H_2O-MeOH.

d) Cromatografía gas-líquida

Se utilizó un cromatógrafo gaseoso HP 5890 con detector de ionización de llama (FID) y N_2 como gas carrier. Columna capilar Chirasil-Val, Alltech, 25m largo, 0.25 mm de diámetro interno.

e) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se utilizaron dos cromatógrafos líquidos, el primero que se empleó para purificar los compuestos, consta de los siguientes módulos: una bomba Thermo Separations, un detector UV Micrometrics, modelo 787, de longitud de onda variable y un detector de índice de refracción Shodex RI-71 conectados en serie, con inyector manual del tipo Rheodyne; y el segundo, que se empleó analíticamente para evaluar los extractos, es un equipo Gilson, con una bomba cuaternaria modelo 322 Gilson, un detector de arreglo de diodos modelo 170 HP, con inyector manual del tipo Rheodyne.

Las columnas utilizadas para las separaciones fueron una YMC RP C-18 (250 x 20 mm), YMC RP C-18 (250 x 4.6 mm) y una Phenomenex Synergi (150 x 4.6 mm); el tamaño de partícula de la fase estacionaria en todas las columnas fue de 5 μm.

Las mezclas de solventes utilizadas se indican en cada caso y están expresadas en relación de volúmenes. Los solventes utilizados en esta instancia fueron comerciales grado HPLC (Merck) o bidestilados. Todos fueron filtrados a través de membranas de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro. Las muestras fueron filtradas a través de filtros de membrana inorgánica de 0.2 μm (Anotop 10 plus Whatman).

f) Extracción en fase sólida

Se utilizaron cartuchos SPE-RP C-18 o sílica de 6 ml (Silicycle), y de 3 ml (Supelco). Se utilizó Amberlite XAD-16 (Sigma).

➢ Aislamiento de los hongos.

Las cepa del hongo *Penicillium canescens* fue aislada de polen colectado de colmenas del apiario de la unidad integrada INTA de la ciudad de Balcarce, provincia de Buenos Aires. El polen fue diluido con solución fisiológica estéril y sembrado sobre cajas de Petri con medio agar malta, aislándose luego colonias individuales de la especie. La cepa fue aislada y clasificada por la Dra. Nora Peña.

Las cepas de los hongos *Gliocladium catenulatum* y *Fusarium oxysporum* estudiados fueron aisladas por la Dra. Alejandra Rodríguez (Laboratorio de Microbiología del suelo, DBBE, FCEN, UBA) de suelo de cultivos de lechuga.

Las cepas se mantuvieron por repique cada 45 días aproximadamente y fueron preservadas en tubos con agar malta con glicerol[5]. Las cepas fueron depositadas en el cepario de hongos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina (BAFC).

➢ Ensayos de actividad biológica.

a) Para determinar la actividad antibiótica frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) *y Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) se utilizó el ensayo de difusión en agar[6].

   Las diferentes cepas se sembraron sobre cajas de Petri conteniendo medio agar Mueller-Hinton, se esperó 15 minutos aproximadamente y se colocaron en ellas los discos de papel de filtro conteniendo a los compuestos a ensayar. Las cajas se incubaron en estufa a 37°C durante 24 hs.

b) La actividad antibacteriana frente a *P. larvae* se determinó mediante el método de difusión en agar[6].

   Método de difusión en agar: Las diferentes cepas se sembraron sobre cajas de Petri conteniendo un medio modificado Columbia y se colocaron en ellas los discos de

papel de filtro conteniendo a los compuestos a ensayar dentro de las mismas. Las cajas se incubaron en estufa a 37°C con 10% de CO_2. Como compuestos testigos se utilizaron los antibióticos comerciales gentamicina y oxitetraciclina, los cuales brindaron halos de inhibición entre 25-30 mm con concentraciones de 25 μg/disco.

c) Para determinar la actividad antifúngica se empleó el método de bioautografía directa sobre placas de ccd[7], sembrando 50 μg/punto de cada compuesto puro aislado o 50-100 μg de extracto crudo o fracción. Se utilizó Benomyl como compuesto testigo que originó zonas de inhibición de 20 a 28 mm con una concentración de 25 μg/punto.

Método de bioautografía: Se preparó una suspensión de esporas del hongo patógeno en medio líquido estéril enriquecido con glucosa y con esta suspensión se humedecieron las placas de sílica en las que previamente se sembraron los compuestos a ensayar. Las placas se dejaron en una cámara húmeda en oscuridad y al cabo de 48 a 72 hs se midieron los halos de inhibición.

➢ Medios de cultivos utilizados.

a) Agar malta: Este medio consistió de extracto de malta (Oxoid) (3 %), peptona (Oxoid) (5 g), agar (Britania) (15 g) suspendidos en 1 l de agua destilada.

b) Extracto de malta: Este medio consistió de extracto de malta (Oxoid) (3 %), peptona (Oxoid) (5 g), suspendidos en 1 l de agua destilada.

c) Medio de cultivo Columbia modificado para *P. larvae* : Este medio consistió de extracto de levadura (Oxoid) (15 g), caldo Mueller-Hinton (Britania) (15 g), K_2HPO_4 (J. T.Baker) (3 g), piruvato de sodio (J. T.Baker) (1 g), agar (Britania) (10 g), glucosa (Oxoid) (2 g), tiamina (Parafarm) (100 mg) suspendidos en 1 l de agua destilada.

d) Agar Mueller-Hinton: Este medio consistió de agar Mueller-Hinton (Britania) (38 g) suspendidos en 1 L de agua destilada.

Todos los medios fueron autoclavados en un autoclave vertical de 75 litros de capacidad (VZ).

Bibliografía

(1) Todd, J. F. J. "Note for IUPAC recommendations" *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1995**, *142*, 209-240.

(2) Murray, K. K.; Boyd, R. K.; Eberlin, M. N.; Langley, G. J.; Li, L.; Naito, Y.; Tabet, J. C. "IUPAC standard definitions of terms relating to mass spectrometry" International Union of Pure and Applied Chemistry. Analytical Chemical Division. American Chemical Society, **2006**, 1-48.

(3) Merck, E. "*Vainillina- ácido sulfúrico*" en "Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel"; **1980**, p 103.

(4) Harwood, L. M. "Dry-column flash chromatography" *Aldrichimica Acta* **1985**, *18*, 25.

(5) Smith, D.; Onions, A. H. S. "*Continous growth and adaptations for storage*" en "The preservation and maintenance of living fungi"; CAB International: **1994**, p 15-30.

(6) Vanden-Berghe, D. A.; Vlietinck, A. J. "*Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. Assays for bioactivity*" en "Methods in Plant Biochemistry"; Dey, P. M., Harbone, J. B., Eds.; Academic Press INC.: **1991**, p 47-69.

(7) Homans, A. L.; Fuchs, A. "Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances" *Journal of Chromatography A* **1970**, *51*, 327-329.